

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01020

• 论 著 •

mda-7/IL-24 通过内质网应激通路诱导肝癌细胞生长抑制和凋亡

张小峰^{1△},施乐华^{1△},艾莉¹,康晓燕²,温莹浩²,钱海华²,张 好²,殷正丰^{2*}

1. 第二军医大学东方肝胆外科医院综合治疗科,上海 200438
2. 第二军医大学东方肝胆外科医院分子肿瘤实验室,上海 200438

[摘要] 目的:观察 mda-7/IL-24 对不同类型的肝肿瘤细胞及正常肝脏细胞增殖及凋亡的影响并探讨其可能的作用机制。方法:构建携带 mda-7 基因的重组腺病毒 Ad-mda-7,转染肝癌细胞系 HepG2、Hep3B、PLC/PRF/5 和正常肝细胞 L02,MTT 法和流式细胞术检测细胞增殖及凋亡情况,Western 印迹检测细胞相关蛋白的表达。应用钙蛋白酶抑制剂 I (ALLN,25 μmol/L)预处理上述细胞 30 min,观察阻断内质网应激通路后上述指标的变化。结果:MTT 法和流式细胞术检测结果表明,与感染 Ad-GFP 比较,Ad-mda-7 选择性抑制肝癌细胞生长($P<0.01$),诱导肝癌细胞凋亡($P<0.01$,其中对 HepG2 细胞影响最明显),而对正常肝细胞生长无明显影响;ALLN 预处理能部分抑制 Ad-mda-7 的上述作用。Western 印迹结果表明 Ad-mda-7 能诱导 HepG2 细胞 BiP/GRP78、Bax 蛋白高表达($P<0.01$),caspase-12、caspase-3 活化及 p38 MAPK 磷酸化;ALLN 预处理能抑制 Ad-mda-7 转染引起的 Bax 蛋白高表达及 caspase-12、caspase-3 活化;而对 BiP/GRP78 的高表达及 p38 MAPK 磷酸化无影响。结论:mda-7/IL-24 可能通过内质网应激通路诱导肝癌细胞生长抑制和凋亡。

[关键词] mda-7 基因;内质网;应激;细胞凋亡;肝肿瘤

[中图分类号] R 735.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)09-1020-05

mda-7/IL-24 induces apoptosis of hepatic carcinoma cells through endoplasmic reticulum stress pathway

ZHANG Xiao-feng^{1△},SHI Le-hua^{1△},AI Li¹,KANG Xiao-yan²,WEN Ying-hao²,QIAN Hai-hua²,ZHANG Yu²,YIN Zheng-feng^{2*}

1. Department of Comprehensive Treatment, Eastern Hepatobiliary Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China
2. Department of Molecular Oncology, Eastern Hepatobiliary Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438

[ABSTRACT] **Objective:** To study the effects of mda-7/IL-24 on the growth, proliferation, apoptosis of different hepatic carcinoma cell lines and the related mechanisms. **Methods:** A recombinant adenovirus Ad-mda-7 was constructed and was used to transfect human hepatic carcinoma cell lines (HepG2, Hep3B and PLC/PRF/5) and normal liver cell line L02. MTT assay and FACS were employed to assess the growth and apoptosis of cells; the expression of related protein expression was examined by Western blotting. The cells were treated with calpastatin I (ALLN,25 μmol/L) for 30 min to block the endoplasmic reticulum stress (ER-stress) and the above indices were examined again. **Results:** Treatment with Ad-mda-7 resulted in selective inhibition of cell proliferation and induced apoptosis, especially in HepG2 cells; Ad-mda-7 showed no influence on normal cells. Pretreatment with ALLN partially inhibited the above effects of Ad-mda-7. Western blotting revealed that Ad-mda-7 induced up-regulation of BiP/GRP78 and Bax protein, activation of caspase-12, caspase-3 and phosphorylation of p38 MAPK in HepG2 cells. Blocking ER-stress with ALLN down-regulated Bax, caspase-12 expression and inhibited activation of caspase-3 and caspase-12, but showed no effect on the expression of BiP/GRP78 or phosphorylation of p38 MAPK. **Conclusion:** mda-7/IL-24 can cause growth inhibition and promote apoptosis of hepatic carcinoma cells through the ER-stress pathway.

[KEY WORDS] mda-7 gene; endoplasmic reticulum; stress; apoptosis; liver neoplasms

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(9):1020-1024]

[收稿日期] 2008-01-20 **[接受日期]** 2008-05-26

[基金项目] 国家自然科学基金(30500477),国家重点基础研究发展计划(“973”计划,2002CB513100). Supported by National Natural Science Foundation of China(30500477) and National Program on Key Basic Research Project of China(“973” Program,2002CB513100).

[作者简介] 张小峰,硕士生,E-mail: zxf_ghbh@126.com;施乐华,博士,教授,硕士生导师.

△共同第一作者(Co-first authors).

* 通讯作者(Corresponding author). Tel:021-25070859,E-mail: yinzfk@yahoo.com.cn

黑素瘤分化相关基因-7 (melanoma differentiation associated gene-7/interleukin-24, mda-7/IL-24) 是一种肿瘤抑制基因, 定位于染色体的 1q32 位点, 基于其编码蛋白的氨基酸序列及其细胞因子样特性被命名为 IL-24^[1-3]。一系列研究^[4-5]表明腺病毒介导的 mda-7/IL-24 能选择性诱导不同类型的肿瘤细胞凋亡, 而对正常细胞无明显毒性。因此, 其成为目前相关肿瘤基因治疗的热点。肝细胞癌是目前公认的病死率最高的肿瘤之一, 其发病率近年来仍有上升的趋势^[6]。研究^[7-8]发现 mda-7/IL-24 可选择性抑制肝癌细胞增殖并促进其凋亡, 但确切机制尚不清楚。因此, 本研究进一步观察 mda-7/IL-24 对肝癌细胞系内质网通路的影响, 探讨其抑制肝癌生长并诱导其凋亡的作用机制。

1 材料和方法

1.1 细胞培养 肝癌细胞系 HepG2 (p53 野生型)、Hep3B (p53 缺失型)、PLC/PRF/5 (p53 突变型) 和正常肝细胞系 L02 购自美国 ATCC 公司。HepG2、Hep3B 和 L02 在含 10% 胎牛血清的 DMEM (Gibco), PLC/PRF/5 在含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 (Gibco), 100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素, 体积分数 5% CO₂ 和 37℃ 孵箱培养。细胞活性经锥虫蓝染色检测 >95%。

1.2 重组腺病毒 Ad-mda-7 的构建及转染 参照前期研究^[8]的方法构建携带 mda-7 基因的复制缺陷型腺病毒-5 (Ad-mda-7), 构建携带绿色荧光蛋白的重组腺病毒 Ad-GFP 作为对照。细胞转染重组腺病毒载体前 24 h 按 2 × 10⁵/孔传于 6 孔板。转染后 2 h 更换新鲜培养液, 继续培养 72 h。测定肝癌细胞系和正常肝细胞系转染病毒效率, 保证 >70%, 用于后续实验。

1.3 MTT 法检测细胞增殖抑制率 收集对数生长期细胞, 按 5 × 10³/孔传于 96 孔板。细胞贴壁 24 h 后, 分别加入 MOI 值不等的 Ad-mda-7、Ad-GFP, 继续培养 3 d 后, 采用 MTT 法^[7]检测细胞增殖抑制率; 以 2 μmol/L 毒胡萝卜素 (thapsigargin, TG; Tocris) 作为阳性对照诱导内质网应激凋亡通路, 处理细胞 72 h。所有实验重复 3 次。为进一步明确 mda-7 抑制肝癌细胞增殖与内质网通路的关系, 在诱导细胞凋亡前, 用 25 μmol/L 钙蛋白酶抑制剂 I (N-acetyl-leucyl-leucyl-norleucinal, ALLN; Calbiochem) 处理细胞 30 min, 应用 MTT 法观察转染 Ad-mda-7、Ad-GFP 后细胞增殖率, 并与未应用 ALLN 的转染细胞作对比。

1.4 流式细胞仪检测细胞凋亡率 收集细胞, 75%

乙醇 4℃ 固定过夜, 碘化丙啶 (PI) 染色 30 min, FACSaria 流式细胞仪 (Becton Dickinson) 分析转染后细胞及 ALLN 预处理转染细胞的细胞周期, 测定各组 (Ad-mda-7、Ad-GFP、ALLN + Ad-mda-7、ALLN + Ad-GFP) 细胞凋亡率。采用 modifit 3.0 软件分析处理所得数据。

1.5 Western 印迹检测各组细胞蛋白表达 收集 Ad-mda-7、Ad-GFP、ALLN + Ad-mda-7、ALLN + Ad-GFP 组及未转染细胞, 用 RIPA 细胞裂解液制备细胞蛋白, 蛋白分析系统 (Bio-Rad) 测定蛋白浓度, 上样进行 12% SDS-PAGE, 并电转染至硝酸纤维素膜 (Schleicher and Schnell)。室温下用含 5% 脱脂奶粉的 1 × PBS 封膜 2 h。更换检测蛋白抗体室温下孵育 2 h。检测蛋白抗体包括兔抗人 BiP/GRP78 (Stressgen)、兔抗人 caspase-12 (Biovision)、兔抗人 caspase-3、兔抗人 P-p38 MAPK 和兔抗人 β-actin (Cell Signaling), 鼠抗人 Bax (Santa Cruz) 和鼠抗人 caspase-8 (Biolegend)。辣根过氧化物酶标记的鼠抗兔或兔抗鼠 IgG (Santa Cruz) 室温下孵育 2 h。ECL (Amersham) 显影。

1.6 统计学处理 所有数据由 SPSS 10.0 专业统计软件计算得出, 显著性检验采用独立样本 *t* 检验和 ANOVA。P < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Ad-mda-7 转染选择性抑制肝癌细胞增殖 MTT 法检测各组细胞存活率, 结果显示, Ad-mda-7 或 Ad-GFP 感染对正常肝细胞 L02 增殖无明显抑制作用。而与感染 Ad-GFP 比较, 感染 Ad-mda-7 能明显抑制各种肝癌细胞系生长 (P < 0.05, 图 1)。在 3 种肝癌细胞系中, HepG2 (p53 野生型) 生长抑制最为显著, 当 MOI 为 10 时, HepG2 细胞生长抑制率是 66%。这些研究证明了 Ad-mda-7 选择性抑制肝癌细胞的增殖, 而对正常肝细胞无明显抑制作用。

2.2 Ad-mda-7 转染选择性诱导肝癌细胞凋亡 流式细胞仪观察结果 (表 1) 表明, 与感染 Ad-GFP 相比, 肝癌细胞系感染 Ad-mda-7 后细胞凋亡率明显升高 (P < 0.001); 而正常肝细胞 L02 感染 Ad-mda-7 或 Ad-GFP 没有明显改变。结果提示: Ad-mda-7 可能通过非 p53 途径选择性诱导肝癌细胞凋亡。

2.3 Ad-mda-7 转染对肝癌细胞内质网应激通路相关蛋白表达的影响 选择对 Ad-mda-7 作用最为敏感的 HepG2 肝癌细胞进一步探讨其诱导凋亡的机制。Western 印迹结果 (图 2) 发现 HepG2 细胞转染 Ad-mda-7 后高表达 BiP/GRP78; 转染 Ad-mda-7 和阳性

对照 TG 的 HepG2 细胞检测到内质网应激相关蛋白 caspase-12(57 000)活化降解片段(48 000),而阴性对照组 caspase-12 仍是酶原形式。而 Ad-mdm-7 转染正

常肝细胞 L02 未能激活 BiP/GRP78 和 caspase-12。结果提示:Ad-mdm-7 可能通过 caspase-12 激活内质网应激通路诱导肝癌细胞凋亡。

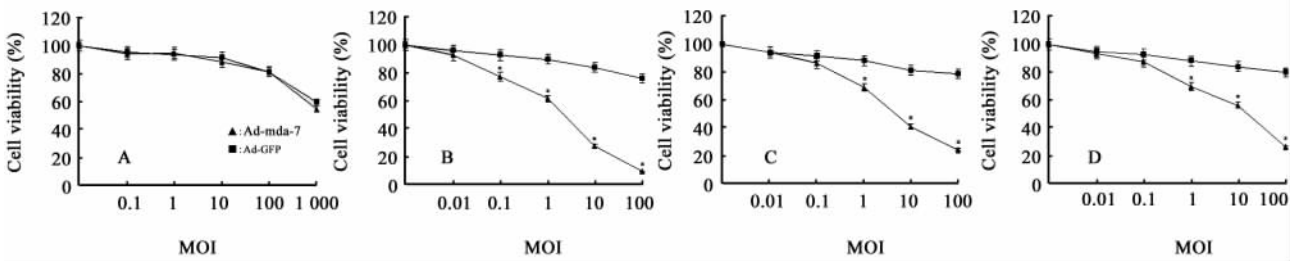


图 1 Ad-mdm-7 转染对肝癌细胞及正常肝细胞增殖的影响

Fig 1 Influence of Ad-mdm-7 transfection on proliferation of liver cancer cells and normal liver cells

A:L02 cell; B:HepG2 cell; C:Hep3B cell; D:PLC/PRF/5 cell. * $P<0.05$ vs Ad-GFP. $n=3,\bar{x}\pm s$

表 1 流式细胞仪分析各组细胞凋亡率

Tab 1 FACS analysis of cell apoptosis in each group
($n=3,\bar{x}\pm s$)

Cell lines	Percent of apoptotic cells(%)		<i>t</i>	<i>P</i>
	Ad-mdm-7	Ad-GFP		
HepG2	47.31±4.35	13.17±3.46	10.64	0.001
Hep3B	38.22±3.71	10.83±2.54	10.55	0.001
PLC/PRF/5	35.43±3.39	12.16±3.25	8.582	0.001
L02	15.07±1.83	13.65±2.17	0.866 4	0.435 1

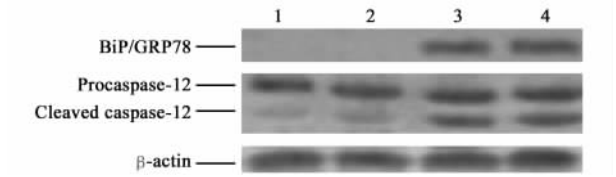


图 2 Ad-mdm-7 激活内质网应激通路诱导肝癌细胞凋亡

Fig 2 Ad-mdm-7 activated ER-stress and induced apoptosis of liver cancer cells

1:Control; 2:Ad-GFP; 3:Ad-mdm-7; 4:Thapsigargin

2.4 Ad-mdm-7 转染对肝癌细胞 Bax、caspase-3 和 p38 MAPK 蛋白表达的影响 Ad-mdm-7 转染 HepG2 细胞 48 h 后 Bax 蛋白表达明显高于转染 Ad-GFP 细胞及对照细胞;caspase-3 从酶原形式(32 000)活化为降解片段(17 000);而 caspase-8 仍为酶原形式;并且,观察到 p38 MAPK 的磷酸化(图 3)。这些结果说明,Ad-mdm-7 可上调 Bax 表达,诱导 caspase-3 活化,促进 p38 MAPK 磷酸化,可能通过非死亡受体通路诱导肝癌细胞凋亡。

2.5 ALLN 预处理对 Ad-mdm-7 诱导的肝癌细胞增殖抑制及凋亡的影响

2.5.1 肝癌细胞增殖 25 μmol/L 的 ALLN 对 HepG2 无明显增殖抑制作用。MTT 法检测结果显示(图 4),经 ALLN 预处理 30 min 后转染 Ad-mdm-

7(ALLN+Ad-mdm-7)的 HepG2 细胞,3 d 后细胞存活率为 75%,而未经 ALLN 预处理的转染 Ad-mdm-7 的 HepG2 细胞存活率为 40% ($P<0.05$)。而经或未经 ALLN 预处理转染 Ad-GFP 的 HepG2 细胞存活率为 86% 和 83%,与 ALLN+Ad-mdm-7 间无统计学差异($P>0.05$)。

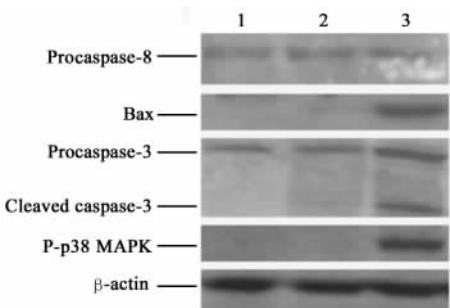


图 3 Ad-mdm-7 转染后肝癌细胞 Bax、caspase-3 和 p38 MAPK 蛋白的表达

Fig 3 Ad-mdm-7 induced apoptosis and up-regulated Bax, caspase-3 and p38 MAPK in liver cancer cells

1:Control; 2:Ad-GFP; 3:Ad-mdm-7

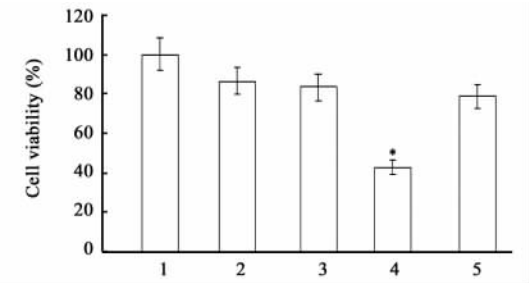


图 4 MTT 法检测各组细胞生存率

Fig 4 MTT analysis of cell viability in each group

1:Control; 2:Ad-GFP; 3:ALLN + Ad-GFP; 4:Ad-mdm-7; 5:ALLN+Ad-mdm-7. * $P<0.05$ vs ALLN+Ad-mdm-7. $n=3,\bar{x}\pm s$

2.5.2 肝癌细胞的凋亡 流式细胞仪分析结果表明,Ad-mda-7 处理的 HepG2 细胞凋亡率为 44%,而 ALLN+Ad-mda-7 处理的细胞只有 28%出现凋亡($P<0.05$)。而经或未经 ALLN 处理转染 Ad-GFP 的 HepG2 细胞凋亡率分别为 13%和 11.5%,未感染病毒的对照 HepG2 细胞 9%出现凋亡,3 组间无统计学差异($P>0.05$)。这些结果提示,Ad-mda-7 可通过激活内质网应激通路诱导肝癌细胞凋亡,而这一作用可被 ALLN 抑制。

2.6 ALLN 预处理对肝癌细胞 caspase-3、caspase-12 和 Bax 表达的影响 Western 印迹结果(图 5)表明,经 ALLN 处理后转染 Ad-mda-7 的 HepG2 细胞与未经 ALLN 处理转染 Ad-mda-7 的 HepG2 细胞比较,caspase-12 活化受到显著抑制;Bax 和 caspase-3 的活化明显下降。然而 BiP/GRP78 经或不经 ALLN 处理表达未见改变;并且 p38 MAPK 的磷酸化并没有因为 ALLN 的处理而变化。这些结果提示 Ad-mda-7 通过包括 caspase-12 在内的内质网应激通路诱导肝癌细胞凋亡,并且可能与线粒体通路有着密切关联。

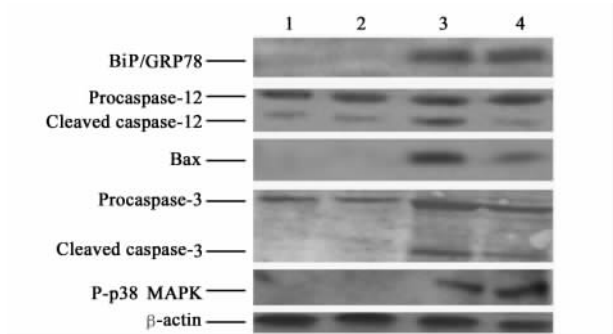


图 5 Western 印迹检测肝癌细胞 caspase-3、caspase-12 和 Bax 表达

Fig 5 Inhibition of ER-stress blocked Ad-mda-7 induced down-regulation of caspase-3,-12 and Bax

1:Ad-GFP; 2:ALLN+Ad-GFP; 3:Ad-mda-7; 4:ALLN+Ad-mda-7

3 讨论

尽管几十年来肝癌的诊疗水平不断进步,但肝癌患者的总生存率并没有显著提高。虽然外科手术、动脉栓塞治疗、化疗和各种物理治疗等在肝癌治疗中显示了各自的一定优势,但许多患者就诊时已是肝癌晚期,并且肝癌复发率高,这些手段并没有明显地改善患者预后^[6]。分子肿瘤学的发展和进步给恶性肿瘤患者的诊治带来新的方向和希望^[9-10]。基因治疗将为肝癌的治疗提供新的前景,基因治疗的关键是选择合适的基因。本研究选择的 mda-7/IL-

24 不仅具有选择性促进肿瘤细胞凋亡、抗肿瘤血管形成和抗肿瘤侵袭转移的作用,而且对正常组织细胞无明显不良反应^[11]。本研究结果再次证明 Ad-mda-7 对肝癌细胞有着选择性抑制生长、增殖和促凋亡作用,而对正常肝细胞 L02 无作用。

Gupta 等^[11]发现,细胞内的 mda-7/IL-24 通过多种通路诱导细胞的凋亡,如死亡受体通路、线粒体通路和内质网应激通路等。死亡受体通路通过激活 caspase-8 引起细胞凋亡;线粒体通路通过激活细胞色素 C 和 caspase-3 引起细胞凋亡。BiP/GRP78 是内质网应激反应的标志,caspase-12 作为凋亡起始因子在内质网应激反应诱导凋亡过程中发挥了关键作用^[12]。免疫荧光染色显示胞内的 mda-7/IL-24 定位于内质网和高尔基体复合物,并且 mda-7/IL-24 通过其 C 和 F 环与内质网伴随蛋白 BiP/GRP78 偶联^[9]。本研究结果显示,Ad-mda-7 上调 BiP/GRP78 蛋白表达,可能通过激活内质网应激通路最后导致肝癌细胞凋亡。

内质网是蛋白质加工合成的重要场所,维持着细胞内环境的稳定;在缺氧、应激或各种理化条件的长期刺激下,内质网发生未折叠蛋白反应(UPR)和 Ca^{2+} 平衡失调,称为内质网应激(ER-stress),进而导致细胞凋亡^[13]。如 TG 可引起细胞内 Ca^{2+} 平衡失调,激活 caspase-12 促使内质网应激^[14]。体外研究^[15]发现内质网内的钙蛋白酶是 caspase-12 的上游调控蛋白,而 ALLN 可阻断 Ad-mda-7 和 TG 介导的 caspase-12 的激活^[16]。本研究采用 ALLN 预处理 HepG2 细胞后,明显减少了 Ad-mda-7 诱导的细胞凋亡和生长抑制作用。

Ad-mda-7 通过各种通路诱导肿瘤细胞凋亡。本研究发现 Ad-mda-7 转染的 HepG2 细胞 Bax 表达、caspase-3 活化和 p38 MAPK 磷酸化增加,而死亡受体通路的特异性蛋白 caspase-8 没有激活;当 ALLN 抑制了 caspase-12 的激活和内质网应激通路,Bax 和 caspase-3 表达明显下调。这些结果提示在肝癌细胞中,Ad-mda-7 可能通过诱导内质网应激、激活 BiP/GRP78 和 caspase-12、促进 Bax 易位、p38 MAPK 磷酸化和 caspase-3 降解,最后导致细胞凋亡。然而,目前还不清楚 Ad-mda-7 介导的细胞线粒体凋亡通路是否由内质网应激通路调控,或者后者受前者调控,或者两者间有着共同刺激或交互对话,这些问题仍需进一步研究证实。

mda-7/IL-24 是细胞因子 IL-10 家族的重要成员之一,IL-20R1/IL-20R2 和 IL-22R1/IL-20R2 是它的异二聚体受体。Caudell 等^[3]研究表明,mda-7/

IL-24 通过异二聚体受体激活 JAK/STAT 通路,在正常组织细胞的免疫调理和抗肿瘤血管形成中起着重要作用。然而,Inoue 等^[17]研究发现 mda-7/IL-24 可通过非受体和(或)非 JAK/STAT 通路诱导肿瘤细胞凋亡,并且其诱导肿瘤细胞凋亡作用通过非 p53 途径。另外,HepG2 细胞虽高表达 IL-22R1 mRNA,但是缺乏 IL-20R1 和 IL-20R2^[18]。本研究发现,Ad-mda-7 对另 2 种肝癌细胞系 Hep3B(p53 缺失型)和 PLC/PRF/5(p53 突变型)也有着显著的生长抑制和凋亡作用。这些结果进一步证实了 mda-7/IL-24 通过非受体和非 p53 途径诱导肿瘤细胞凋亡。

总之,本研究结果显示,Ad-mda-7 选择性诱导肝癌细胞生长抑制和凋亡,而对正常肝细胞无明显影响,其可能主要通过激活内质网应激通路诱导肝癌细胞凋亡。目前,mda-7/IL-24 已顺利完成 I 期临床试验,并开始在黑色素瘤患者中进行 II 期临床试验^[17]。本研究将为 mda-7/IL-24 基因治疗肝癌提供更广阔前景和希望。

[参考文献]

[1] Jiang H, Lin J J, Su Z Z, Goldstein N I, Fisher P B. Subtraction hybridization identifies a novel melanoma differentiation associated gene, mda-7, modulated during human melanoma differentiation, growth and progression[J]. *Oncogene*, 1995, 11: 2477-2486.

[2] Huang E Y, Madireddi M T, Gopalkrishnan R V, Leszczyniecka M, Su Z, Lebedeva I V, et al. Genomic structure, chromosomal localization and expression profile of a novel melanoma differentiation associated (mda-7) gene with cancer specific growth suppressing and apoptosis inducing properties[J]. *Oncogene*, 2001, 20: 7051-7063.

[3] Caudell E G, Mumm J B, Poindexter N, Ekmekcioglu S, Mhashilkar A M, Yang X H, et al. The protein product of the tumor suppressor gene, melanoma differentiation-associated gene 7, exhibits immunostimulatory activity and is designated IL-24[J]. *J Immunol*, 2002, 168: 6041-6046.

[4] Yacoub A, Gupta P, Park M A, Rhamani M, Hamed H, Hanna D, et al. Regulation of GST-MDA-7 toxicity in human glioblastoma cells by ERBB1, ERK1/2, PI3K, and JNK1-3 pathway signaling[J]. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7: 314-329.

[5] Yacoub A, Park M A, Gupta P, Rahmani M, Zhang G, Hamed H, et al. Caspase-, cathepsin-, and PERK-dependent regulation of MDA-7/IL-24-induced cell killing in primary human glioma

cells[J]. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7: 297-313.

[6] Llovet J M. Updated treatment approach to hepatocellular carcinoma[J]. *J Gastroenterol*, 2005, 40: 225-235.

[7] 薛新波, 郑建伟, 王从俊, 陈 堃, 胡回忆, 胡 慧, 等. 腺病毒介导 MDA-7/IL-24 选择性促进肝癌细胞的凋亡和增殖阻滞[J]. *中华肝脏病杂志*, 2006, 14: 670-675.

[8] 温莹浩, 殷正丰, 康晓燕, 李 瑾, 钱海华, 陈 玮. 腺病毒介导 IL-24 联合化疗药物增强对肝癌细胞 PLC/PRF/5 增殖的抑制[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2007, 14: 338-341.

[9] Gupta P, Walter M R, Su Z Z, Lebedeva I V, Emdad L, Randolph A, et al. BiP/GRP78 is an intracellular target for MDA-7/IL-24 induction of cancer-specific apoptosis[J]. *Cancer Res*, 2006, 66: 8182-8191.

[10] Strumberg D, Richly H, Hilger R A, Schleucher N, Korfee S, Tewes M, et al. Phase I clinical and pharmacokinetic study of the Novel Raf kinase and vascular endothelial growth factor receptor inhibitor BAY 43-9006 in patients with advanced refractory solid tumors[J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23: 965-972.

[11] Gupta P, Su Z Z, Lebedeva I V, Sarkar D, Sauane M, Emdad L, et al. mda-7/IL-24: multifunctional cancer-specific apoptosis-inducing cytokine[J]. *Pharmacol Ther*, 2006, 111: 596-628.

[12] Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner B A, et al. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta [J]. *Nature*, 2000, 403: 98-103.

[13] Patil C, Walter P. Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2001, 13: 349-355.

[14] Thastrup O, Cullen P J, Drobak B K, Hanley M R, Dawson A P. Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca^{2+} stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 2466-2470.

[15] Nakagawa T, Yuan J. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis[J]. *J Cell Biol*, 2000, 150: 887-894.

[16] Oubrahim H, Chock P B, Stadtman E R. Manganese(II) induces apoptotic cell death in NIH3T3 cells via a caspase-12-dependent pathway[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 20135-20138.

[17] Inoue S, Shanker M, Miyahara R, Gopalan B, Patel S, Oida Y, et al. MDA-7/IL-24-based cancer gene therapy: translation from the laboratory to the clinic[J]. *Curr Gene Ther*, 2006, 6: 73-91.

[18] Nagalakshmi M L, Murphy E, McClanahan T, de Waal Malefyt R. Expression patterns of IL-10 ligand and receptor gene families provide leads for biological characterization[J]. *Int Immunopharmacol*, 2004, 4: 577-592.

[本文编辑] 贾泽军