

DOI: 10.11844/cjcb.2013.07.0072

*DNMT3a*表达上调与A549细胞对 顺铂耐受关系的实验探究

吴艳凤 侯玉磊 薛成军 李德涛 郑倩 陈辉*

(重庆医科大学附属第一医院检验科, 重庆 400016)

摘要 基因甲基化状态改变是肿瘤获得性耐药产生的重要途径之一。DNMTs是基因甲基化的重要调节因子。为了寻找预测肺腺癌A549细胞对顺铂敏感性的生物标志, 该研究以A549细胞和对顺铂耐受的同源A549细胞(A549-DDP)为研究对象, 利用质粒转染技术上调A549细胞*DNMT3a*表达, 通过RT-PCR检测转染前后*DNMT3a*在mRNA水平的表达情况。在不同浓度顺铂作用下, 通过MTT法、克隆形成实验检测转染前后细胞增殖率并计算IC₅₀和计数细胞克隆形成数。在相同顺铂浓度作用下, 流式细胞仪检测转染前后细胞凋亡分数的改变。结果显示: 顺铂作用24 h后, 转染*DNMT3a*表达质粒的A549细胞对顺铂IC₅₀明显高于A549细胞[(9.19±0.91) μmol/L vs (4.96±0.58) μmol/L, *P*=0.000], 转染后的细胞凋亡率明显低于未转染细胞[(1.33±0.38)% vs (5.22±0.67)%], *P*=0.039; 不同浓度顺铂连续作用5 d后, 转染*DNMT3a*表达质粒的A549细胞形成的克隆数均明显高于A549细胞组。结果提示, *DNMT3a*表达上调是肺腺癌A549细胞对顺铂获得性耐受的重要原因之一。检测肺癌患者血清*DNMT3a*水平作为预测肺癌患者对顺铂敏感性的生物标志值得进一步研究。

关键词 *DNMT3a*; 非小细胞肺癌; A549细胞株; 顺铂; 化疗耐受

The Up-regulation Expression of *DNMT3a* Resensitizes A549 Cell to Cisplatin

Wu Yanfeng, Hou Yulei, Xue Chengjun, Li Detao, Zheng Qian, Chen Hui*

(Clinical Laboratories, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract The change of gene methylation status is a main cause for acquired chemo resistance of cancer. DNMTs plays an indispensable role in methylation regulations. In order to find a biomarker predicting chemo sensitivity of A549 cell to cisplatin, human lung adenocarcinoma A549 cells were chosen and transfected with a *DNMT3a* plasmid to enhance the expression of *DNMT3a*. Semi-quantitative RT-PCR was performed to confirm the expression of *DNMT3a* mRNA before and after plasmid transfect. Exposing to different concentrations of cisplatin, MTT assays were used to evaluate cell viability and calculate the IC₅₀ value to cisplatin before and after plasmid transfect respectively; clone formation assay were detected to evaluate the clone forming ability before and after cell transfect. Exposing to the same concentration of cisplatin, flow cytometric analysis was used to assess apoptosis rate before and after plasmid transfect. The results indicated: exposing to cisplatin 24 h, IC₅₀ value to cisplatin increased greatly in A549 cell with exogenous expression of *DNMT3a* than that in A549 cell [(9.19±0.91) μmol/L vs (4.96±0.58)

收稿日期: 2013-03-21 接受日期: 2013-04-28

重庆市自然科学基金(批准号: cstc2012jjA10105)、重庆市卫生局医学科科研项目(批准号: 2012-2-016)和国家临床重点专科建设项目经费[批准号: 财社2010(305)号]资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-89012033, E-mail: chen1970chen@yahoo.com

Received: March 21, 2013 Received: April 28, 2013

This work was supported by the Natural Science Foundation of CQ CSTC (Grant No.cstc2012jjA10105), the Medical Scientific Program of Chongqing Municipal Health Bureau (Grant No.2012-2-016) and the National Clinical Key Subject Construction Project [Grant No.2010(305)]

*Corresponding author. Tel: +86-23-89012033, E-mail: chen1970chen@yahoo.com

网络出版时间: 2013-06-03 14:45 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130603.1445.001.html>

$\mu\text{mol/L}$, $P=0.000$]. After exposing to cisplatin for 5 days, the clone number of A549 with exogenous expression of *DNMT3a* was significantly increased than that of A549; with the same concentration of cisplatin, the apoptosis percentage decreased greatly in A549 with exogenous expression of *DNMT3a* than that of A549 [(1.33±0.38)% vs (5.22±0.67)%], $P=0.039$]. The results suggest that the up-regulation expression of *DNMT3a* may be a vital cause for acquired chemo resistance of lung cancer and it needs deeply study about serum *DNMT3a* acts as biomarker and a predictive factor for chemosensitivity of lung cancer patients in clinic.

Key words *DNMT3a*; NSCLC; A549 cell line; cisplatin; chemo resistance

肺癌是临床上常见的发病率和致死率极高的恶性肿瘤之一^[1-2], 其中80%~85%均为非小细胞肺癌(non-small lung cancer, NSCLC)^[3], 由于其发病隐匿, 有三分之二的肺癌病人在初诊时已经发生转移, 丧失了手术治疗的机会。以顺铂为基础的联合化疗已成为延缓病情进展、提高病人生存率的重要手段, 在临床上广泛使用^[4], 但随之出现的耐药对肺癌病人来说是雪上加霜, 既加重了病情, 又可因药物毒副作用产生新的痛苦, 甚至加速死亡。因此, 寻找预测顺铂敏感性的实验室指标迫在眉睫。甲基化表现修饰是肿瘤发生发展的重要因素, 并与肿瘤的耐药、生存期等密切相关。DNA甲基转移酶(DNA methyltransferases, DNMTs)是调节基因甲基化的关键酶之一, 是基因表达的重要调控因子^[5], 但在肿瘤中的异常表达常与肿瘤分化、分期、转移、凋亡密切相关。DNMTs与肿瘤对顺铂敏感性的关系已在胃癌、前列腺癌、食管癌中报道^[6-8]。*DNMT3a*是DNMTs中的重要成员之一, 在新形成甲基化时发挥关键作用。来自神经母细胞瘤的研究证实, *DNMT3a*与顺铂耐受密切相关^[9], 但尚未见肺癌中的相关报道。本课题组在前期研究中发现, *DNMT3a*在顺铂耐受的A549细胞(DDP-A549)中的表达水平明显高于亲本A549细胞中的表达, 基于此, 本研究拟通过质粒转染上调A549细胞*DNMT3a*的表达来探究*DNMT3a*表达与A549细胞对顺铂耐受产生的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 肺腺癌A549细胞株由重庆医科大学附属第一医院邱峰教授惠赠, A549-DDP是在人肺腺癌细胞A549的基础上, 以顺铂作为诱导药物, 采用逐步递增浓度的方法诱导获得, 在常规培养中使用2 $\mu\text{g/mL}$ 的顺铂维持其耐药性状。

1.1.2 主要试剂 RPMI-1640培养基与新生小牛血清购自美国Hyclon公司, 顺铂、MTT购自美国Sigma公司, RNA提取试剂盒、逆转录试剂盒和TaqDNA聚合酶购自TaKaRa公司, pcDNA3-*DNMT3a*表达质粒购自美国Addgene公司, 转染试剂(X-TremeGENEHP DNA Transfection Regent)购自美国Roche公司, 质粒小量提取试剂盒购自Omega公司。

1.2 方法

1.2.1 *DNMT3a*表达质粒的提取 向无菌的玻璃试管中添加5 mL含100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄西林的经高温灭菌的LB培养基, 用无菌接种环挑取适量含有*DNMT3a*表达质粒的DH5 α 菌液于试管中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min, 振荡12~16 h, 按质粒小量提取试剂盒说明书进行质粒提取, 用分光光度计检测*DNMT3a*表达质粒浓度和纯度。

1.2.2 细胞培养 用含10%小牛血清的RPMI-1640完全培养基37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下常规培养A549细胞24 h, 0.25%胰酶消化贴壁A549细胞, 新鲜RPMI-1640完全培养基中和胰酶并收集细胞, 室温500 r/min离心5 min, 弃上清, RPMI-1640完全培养基重悬细胞, 用牛鲍氏计数板计数, 按照每孔 3×10^5 细胞铺6孔板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养24 h。

1.2.3 pcDNA3-*DNMT3a*表达质粒转染A549细胞选择对数生长期的A549细胞株, 常规细胞换液, 严格按照转染试剂说明书将2 μL 转染试剂+1 μg DNA分别转染pcDNA3-*DNMT3a*和pcDNA3空载体, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养24 h。

1.2.4 总RNA提取和RT-PCR检测转染前后*DNMT3a* mRNA水平 用Trizol法提取各组总RNA, 分光光度法检测RNA浓度。参照文献[8,10]设计引物, 其中以*GAPDH*为内参基因。取500 ng总RNA按逆转录试剂盒说明书合成cDNA序列, 然后进行PCR反应, 条件如下: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸30 s, 共35个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min。

*GAPDH*以相同条件反应35个循环。PCR产物在2%琼脂糖凝胶中电泳30 min。

1.2.5 MTT法检测细胞活力并计算 IC_{50} 选择转染后24 h的A549细胞,按照每孔4 000个细胞的密度铺96孔板,每个浓度设5个平行孔,培养24 h,给予不同浓度顺铂,顺铂浓度如下:0, 1.25, 2.5, 3.75, 7.5, 10 $\mu\text{mol/L}$ 。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养至20 h时,每孔加入MTT(5 mg/mL)试剂20 μL ,继续培养4 h,然后弃去细胞培养液,每孔加入150 μL DMSO,摇床避光摇10 min,然后用酶标仪在490 nm处比色,计算 IC_{50} 。

1.2.6 细胞克隆形成实验 选择转染后24 h的A549细胞,按照每孔 1×10^5 细胞的密度铺12孔板,培养24 h,不同浓度顺铂处理(0, 2.5, 5 $\mu\text{mol/L}$)。连续培养5 d,弃去细胞培养液,用PBS洗涤2次,然后用甲醇固定15 min,弃去甲醇并用流水轻轻冲洗两次,结晶紫染色5 min,用流水轻轻冲去染液。自然干燥后计数细胞克隆形成数。

1.2.7 流式细胞术检测细胞凋亡情况 选择转染后的A549细胞,按照每孔 3×10^5 细胞的密度铺6孔板,培养24 h后,给予顺铂(终浓度2.5 $\mu\text{mol/L}$),继续培养24 h,收集细胞,用冷的PBS洗涤细胞3次,2 000 r/min,离心5 min,收集细胞。加入500 μL 的Binding Buffer悬浮细胞并加入5 μL Annexin V-EGFP混匀后,再加入5 μL Propidium Iodide,混匀;室温、避光、反应15 min后,用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.3 统计学处理

所有的实验至少重复3次,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,不同实验组之间的比较用 F 检验,所有的统计学分析均在统计学软件Spss17.0上进行, $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 RT-PCR检测转染前后*DNMT3a*在mRNA水平的变化

转染pcDNA3-*DNMT3a*的A549细胞*DNMT3a* mRNA水平明显升高,转染pcDNA3空质粒的A549细胞和正常A549细胞,*DNMT3a* mRNA变化不大(图1A)。经计算*DNMT3a*与*GAPDH*灰度比值发现,转染pcDNA3-*DNMT3a*的A549细胞*DNMT3a/GAPDH*在mRNA水平大于转染pcDNA3组和阴性对照组($P=0.015$; $P=0.021$)(图1B)。

2.2 *DNMT3a*质粒转染前后A549细胞活力及 IC_{50}

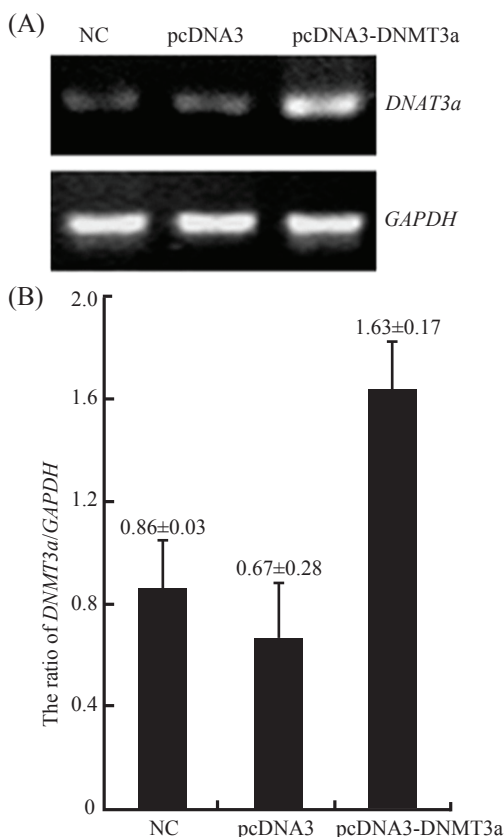
的改变

转染pcDNA3-*DNMT3a*表达质粒24 h后,A549细胞在含不同浓度的顺铂培养液中,其活力明显均高于转染pcDNA3空质粒组和未转染的阴性对照组,但转染pcDNA3空质粒的A549细胞和正常A549细胞活力无显著差异(图2)。

不同浓度顺铂作用24 h后,pcDNA3-*DNMT3a*转染组、pcDNA3组和A549组的 IC_{50} 分别为(9.19 ± 0.91) $\mu\text{mol/L}$ 、(4.30 ± 0.30) $\mu\text{mol/L}$ 、(4.96 ± 0.58) $\mu\text{mol/L}$,其中,pcDNA3-*DNMT3a*转染后的A549细胞对顺铂的 IC_{50} 明显高于转染pcDNA3空质粒组($P=0.000$)和A549组($P=0.001$),而转染pcDNA3空质粒的A549细胞和A549细胞对顺铂的 IC_{50} 无明显差异($P=0.173$)(图3)。

2.3 pcDNA3-*DNMT3a*质粒转染前后A549细胞克隆形成能力的改变

不同浓度顺铂作用下,转染pcDNA3-*DNMT3a*



A: 转染前后*DNMT3a*在mRNA水平的变化; B: 在mRNA水平,*DNMT3a*与*GAPDH*的灰度比值。

A: RT-PCR analysis for *DNMT3a* mRNA; B: quantification of *DNMT3a* mRNA levels relative to *GAPDH*.

图1 转染前后*DNMT3a*在mRNA水平的变化

Fig.1 Changes of *DNMT3a* mRNA levels in A549 before and after transfecting *DNMT3a* plasmid

质粒的A549细胞形成的克隆数明显多于转染空质粒组和阴性对照组, 差异具有明显的统计学意义(表1)。

2.4 pcDNA3-DNMT3a质粒转染前后各组细胞在相同浓度顺铂作用下凋亡的比较

2.5 μmol/L顺铂作用24 h后, pcDNA3-DNMT3a

转染组、pcDNA3转染组和A549细胞组凋亡分数分别为: (1.33±0.38)%、(4.22±0.74)%、(5.22±0.67)%, 如图4所示, pcDNA3-DNMT3a转染组的细胞凋亡分数显著低于pcDNA3转染组($P=0.039$)和A549组($P=0.019$), 而转染pcDNA3空质粒的A549细胞和正常A549细胞凋亡分数无显著差异($P=0.292$)。

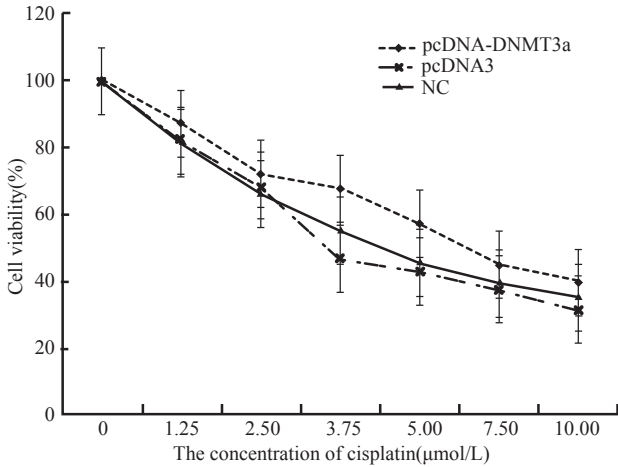


图2 不同浓度顺铂作用后各组细胞活力变化情况
Fig.2 Changes of cell viability among different groups

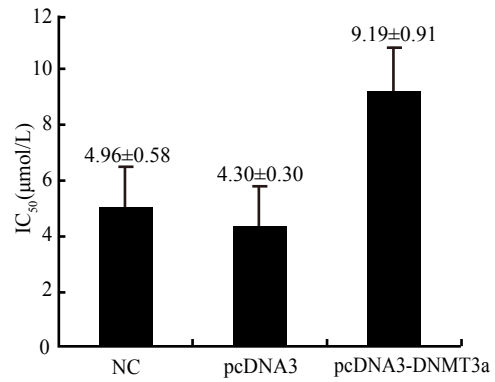


图3 不同浓度顺铂作用24 h后各组IC₅₀的变化
Fig.3 Changes of IC₅₀ among different groups with different concentrations of cisplatin for 24 h

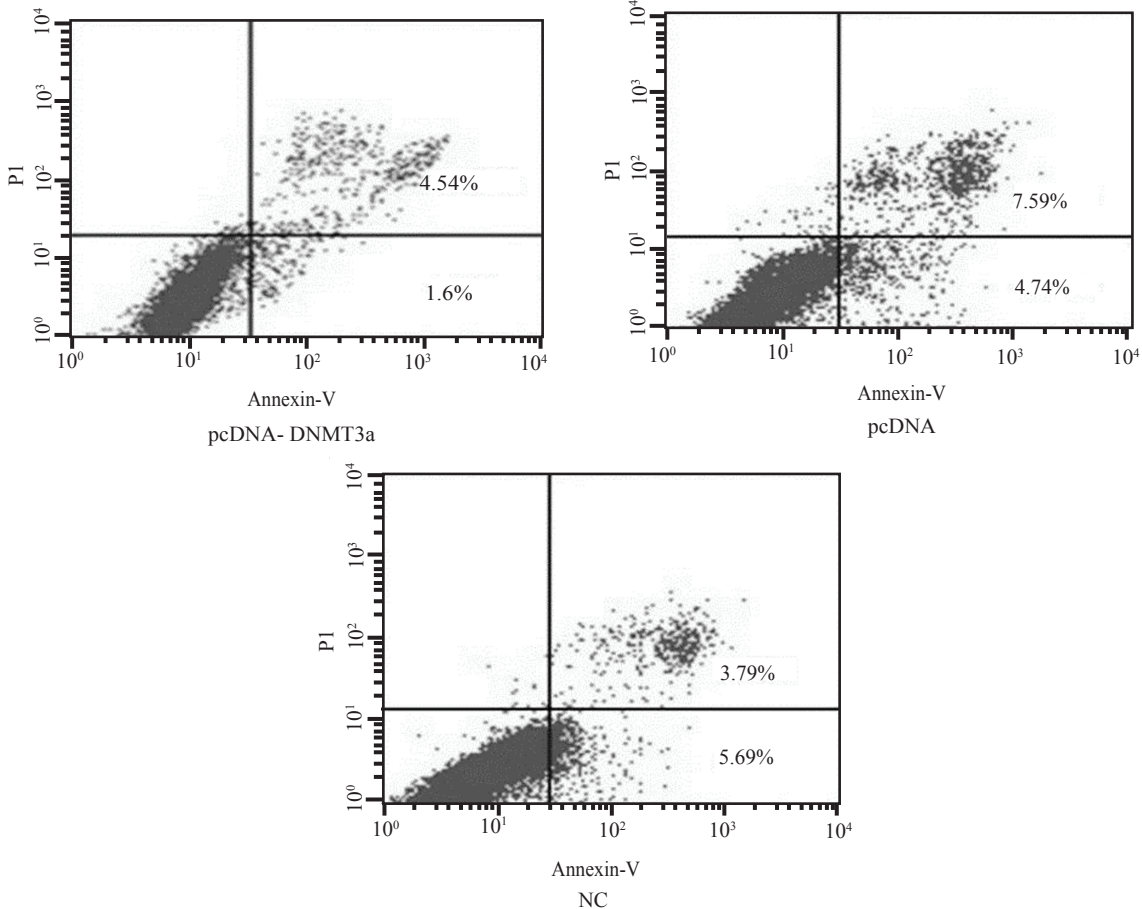


图4 流式细胞仪检测顺铂作用24 h后各组的细胞凋亡变化情况
Fig.4 Changes of apoptosis among different groups after exposing A549 cell to cisplatin for 24 h

表1 不同浓度顺铂作用下各组细胞克隆形成数($\bar{x}\pm s$)Table 1 Clone numbers among different groups with different concentrations of cisplatin($\bar{x}\pm s$)

组别 Groups	细胞克隆形成数 Clone numbers of cells		
	0	2.5 $\mu\text{mol/L}$ cisplatin	5 $\mu\text{mol/L}$ cisplatin
NC	2491.3 \pm 599.9	983.7 \pm 60.6	14.0 \pm 4.6
pcDNA3	2551.6 \pm 644.8	958.7 \pm 111.2	13.3 \pm 7.8
pcDNA3-DNMT3a	2109.3 \pm 374.2* [#]	1439.3 \pm 98.8* [#]	63.3 \pm 8.5* [#]

* $P < 0.05$, 与NC组比较; [#] $P < 0.05$, 与pcDNA3组比较。

* $P < 0.05$ vs NC group, [#] $P < 0.05$ vs pcDNA3 group.

3 讨论

以顺铂为基础的联合化疗是临床治疗晚期肺癌的首选方式,但近年来肺癌对顺铂耐受日益突出,成为晚期肺癌化疗难以突破的瓶颈,因此目前研究肺癌对顺铂耐受的机制成为一个新的热点。顺铂是多种实体肿瘤的基础化疗药,在临床广泛使用,其主要作用机制是诱导细胞凋亡^[11]。肿瘤细胞往往通过启动子异常甲基化的表观修饰途径引起抗凋亡途径异常激活,降低化疗药物对肿瘤细胞促凋亡的能力,引起肿瘤细胞对化疗药物的耐受^[12]。

甲基化是表观遗传修饰的重要方式之一, DNMTs是甲基化调节的关键酶,在哺乳动物细胞中,具有催化活性的DNMTs有三个亚型,分别为DNMT1、DNMT3a和DNMT3b,其中, DNMT3a和DNMT3b在哺乳动物的发育和形成甲基化阶段发挥重要作用, DNMT1则在DNA复制时,维持甲基化由母链向子链的传递^[13-14]。在正常情况下DNMTs对维持染色体结构的稳定、基因组的完整、胚胎发育、细胞分化和个体成长等过程发挥着重要的作用^[15],而DNMTs在肿瘤中的异常表达则与肿瘤发生、分期、分化程度及转移密切相关。新近研究发现, DNMTs在DNA的损伤修复中发挥了重要作用^[16],顺铂所致的DNA损伤通过多种途径被修复是其耐受产生的重要原因,同时DNMTs过表达还可使hMLH1发生异常甲基化而表达沉默,而hMLH1不仅是DNA错配修复过程中最重要的基因之一,也参与肿瘤细胞增殖凋亡的调控^[17-18]和耐药突变体的产生,可通过多种机制参与肿瘤的化疗耐药。此外, DNMTs的异常表达还可激活STAT3^[7],而STAT3可通过激活的靶基因(*Bcl-2*、*Bcl-X*等)延长细胞的生存周期, STAT3还可与c-Jun协同抑制Fas的表达,抑制肿瘤细胞凋亡^[19]。Chang等^[20]运用DNMTs抑制剂5'-氮

杂-脱氧胞苷(5-aza-2'-deoxycytidine, 5-aza-dC)处理三组对顺铂敏感(口腔上皮癌细胞株、肝癌细胞株、上皮癌细胞株)及其同源的耐受细胞株后,耐受细胞株对顺铂的敏感性大大增加。。Chen等^[7]研究发现,高表达DNMT3b的食道癌患者对放疗和化疗的反应性降低,总体存活率下降,并且在CE81T食管鳞癌细胞株中沉默DNMT3b,有效提高其对放射治疗和顺铂化疗的敏感性; Mutze等^[6]通过RNA干扰技术敲除胃癌细胞株AGS的DNMT1,大大提高AGS对顺铂的敏感性。这些临床研究和细胞水平的研究均证实, DNMTs及其调控的多基因异常甲基化所致肿瘤细胞抗凋亡途径激活是影响放疗和化疗敏感性的重要因素。

以甲基化为主的表观遗传学修饰是肿瘤获得性耐药的重要机制^[20],本研究成功利用质粒转染技术将DNMT3a表达质粒转入A549细胞,转染后A549细胞对顺铂的IC₅₀显著提高,并促进了A549细胞在含顺铂培养基中的凋亡和死亡,表明DNMT3a的表达在A549对顺铂耐受中发挥了较重要的作用。Qiu等^[9]转染DNMT3a至顺铂敏感的鼠成纤维母细胞,降低了该细胞对顺铂的敏感性,5-aza-CdR处理后,其对顺铂的敏感性恢复。我们在肺癌细胞中验证了DNMT3a与顺铂耐受的关系,在细胞水平上首次证实了DNMT3a的表达上调是A549细胞对顺铂获得性耐受的重要原因之一,这有望为肺癌新化疗药物的研发设计提供关键的靶点,也可为临床预测肺癌对顺铂敏感性提供潜在的实验室标志,为肺癌的个体化治疗提供新的循证医学证据。

参考文献 (References)

- 1 Kamangar F, Dores GM, Anderson WF. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: Defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic

- regions of the world. *J Clin Oncol* 2006; 24(14): 2137-50.
- 2 Stinchcombe TE, Lee CB, Socinski MA. Current approaches to advanced-stage non-small-cell lung cancer: First-line therapy in patients with a good functional status. *Clin Lung Cancer* 2006; 7 Suppl 4: S111-7.
 - 3 Spira A, Ettinger DS. Multidisciplinary management of lung cancer. *N Engl J Med* 2004; 350(4): 379-92.
 - 4 Azzoli CG, Baker S, Temin S, Pao W, Aliff T, Brahmer J, *et al.* American society of clinical oncology clinical practice guideline update on chemotherapy for stage IV Non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27(36): 6251-66.
 - 5 Jones PA, Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* 2001; 293(5532): 1068-70.
 - 6 Mutze K, Langer R, Schumacher F, Becker K, Ott K, Novotny A, *et al.* DNA methyltransferase 1 as a predictive biomarker and potential therapeutic target for chemotherapy in gastric cancer. *Eur J Cancer* 2011; 47(12): 1817-25.
 - 7 Chen MF, Lu MS, Lin PY, Chen PT, Chen WC, Lee KD, *et al.* The role of DNA methyltransferase 3b in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 2012; 118(16): 4074-89.
 - 8 Zhang Q, Chen L, Helfand BT, Jang TL, Sharma V, Kozlowski J, *et al.* TGF- β regulates DNA methyltransferase expression in prostate cancer, correlates with aggressive capabilities, and predicts disease recurrence. *PLoS One* 2011; 6(9): e25168.
 - 9 Qiu YY, Bernard LM, Rama SD. Inhibition of DNA methyltransferase reverses cisplatin induced drug resistance in murine neuroblastoma cells. *Cancer Detect Prev* 2005; 29(5): 456-63.
 - 10 Attwood J, Richardson B. Relative quantitation of DNA methyltransferase mRNA by real-time RT-PCR Assay. *Methods Mol Biol* 2004; 287: 273-83.
 - 11 Köberle B, Tomicic MT, Usanova S, Kaina B. Cisplatin resistance: Preclinical findings and clinical implications. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1806(2): 172-82.
 - 12 Koul S, McKiernan JM, Narayan G, Houldsworth J, Bacik J, Dobrzynski DL, *et al.* Role of promoter hypermethylation in Cisplatin treatment response of male germ cell tumors. *Mol Cancer* 2004; 3: 16.
 - 13 Robertson KD, Keyomarsi K, Gonzales FA, Velicescu M, Jones PA. Differential mRNA expression of the human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b during the G₀/G₁ to S phase transition in normal and tumor cells. *Nucleic Acids Res* 2000; 28(10): 2108-13.
 - 14 Rhee I, Bachman KE, Park BH, Jair KW, Yen RW, Schuebel KE, *et al.* DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature* 2002; 416(6680): 552-6.
 - 15 Turek-Plewa J, Jagodzinski PP. The role of mammalian DNA methyltransferase in regulation of gene expression. *Cell Mol Biol Lett* 2005; 10(4): 631-47.
 - 16 Mortusewicz O, Schermelleh L, Walter J, Cardoso MC, Leonhardt H. Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(25): 8905-9.
 - 17 Li LS, Morales JC, Hwang A, Wagner MW, Boothman DA. DNA mismatch repair-dependent activation of c-Abl/p73alpha/GADD45alpha-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 2008; 283(31): 21394-403.
 - 18 Kishi K, Doki Y, Yano M, Yasuda T, Fujiwara Y, Takiguchi S, *et al.* Reduced MLH1 expression after chemotherapy is an indicator for poor prognosis in esophageal cancers. *Clin Cancer Res* 2003; 9(12): 4386-75.
 - 19 Ivanov VN, Bhoumik A, Krasilnikov M, Raz R, Owen-Schaub LB, Levy D, *et al.* Cooperation between STAT3 and c-jun suppresses Fas transcription. *Mol Cell* 2001; 7(3): 517-28.
 - 20 Chang X, Monitto CL, Demokan S, Monitto CL, Demokan S, Kim MS, *et al.* Identification of hypermethylated genes associated with cisplatin resistance in human cancers. *Cancer Res* 2010; 70(7): 2870-9.