文章编号:1000-5404(2014)09-0847-05

论著

5-氮杂-2′-脱氧胞苷抑制肾癌细胞增殖的机制研究

熊浩君[1],赵 凯[2],何凤田[2],曾益军[2],陈 姗[2],陈丙波[1] (400038 重庆,第三军医大学:实验动物中心[1],基础医学部生物化学与分子生物学教研室[2])

[摘要] **目的** 探讨5-氮杂-2′-脱氧胞苷(5-Aza-CdR)抑制肾癌细胞增殖的分子机制。**方法** 采用不同浓度的5-Aza-CdR作用于769-P和ACHN 2种肾癌细胞,处理72 h后CCK-8法检测其对细胞增殖的影响;5-Aza-CdR处理769-P细胞48 h后,流式细胞仪测定细胞周期分布,RT-PCR测定甲基化转移酶DNMT1、DNMT3a、DNMT3b以及细胞信号抑制因子3(suppressor of cytokine signaling 3,SOCS3)的表达,Western blot测定SOCS3、P21在蛋白质水平的表达;siRNA干扰SOCS3表达以后,加5-Aza-CdR处理769-P细胞48 h,Western blot检测细胞内SOCS3、P21的表达。**结果** 5-Aza-CdR可以剂量性依赖地抑制肾癌细胞系769-P和ACHN的增殖($P<0.05$),且使769-P细胞阻滞在G_2/M期。RT-PCR检测发现,5-Aza-CdR可以下调DNMT1和DNMT3a的表达和上调SOCS3的表达($P<0.05$)。Western blot检测发现5-Aza-CdR可以促进SOCS3蛋白质的表达,并且伴随着P21蛋白的升高。在干扰SOCS3的表达后,用5-Aza-CdR处理769-P细胞48 h,P21的表达明显降低。**结论** 5-Aza-CdR通过抑制甲基化转移酶,增强SOCS3介导P21的表达,从而抑制肾癌细胞769-P增殖。

[关键词] 5-氮杂-2′-脱氧胞苷;肾细胞癌;细胞增殖;细胞信号抑制因子3;P21
[中图法分类号] R730.23; R737.11; R979.19 [文献标志码] A

5-aza-2′-deoxycytidine inhibits proliferation in renal carcinoma cells *via* suppressing methyltransferases and enhancing P21

Xiong Haojun[1], Zhao Kai[2], He Fengtian[2], Zeng Yijun[2], Chen Shan[2], Chen Bingbo[1] ([1]Laboratory Animal Center, [2]Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the underlying molecular mechanism of 5-aza-2′-deoxycytidine (5-Aza-CdR) in inhibition of renal carcinoma cell proliferation. **Methods** Cell proliferation was assessed by CCK-8 assay after the renal carcinoma cell lines 769-P and ACHN were treated with 5-Aza-CdR at different concentrations for 72 h. Flow cytometry was used to detect cell cycle in 769-P cells after treatment of 5-Aza-CdR at different concentrations for 48 h. RT-PCR was used to detect the expression of methyltransferases DNMT1/3a/3b and suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3). The expression of P21 and SOCS3 at protein level was detected by Western blot analysis, and detected again in the 769-P cells with SOCS3 knockdown by small interfering RNA (siRNA) after 48 hours' treatment of 5-Aza-CdR at different concentrations. **Results** CCK-8 assay revealed that 5-Aza-CdR remarkably inhibited the proliferation in the 2 cell lines in a dose-dependent manner ($P<0.05$). 5-Aza-CdR treatment also resulted in the 769-P cells arrested at G_2/M phase. RT-PCR showed 5-Aza-CdR down-regulated DNMT1 and DNMT3a but up-regulated SOCS3 ($P<0.05$). Western blotting found that 5-Aza-CdR enhanced the expression of SOCS3 and P21. After knocking down the expression of SOCS3 of 769-P cells, we treated 769-P cells with 5-Aza-CdR for 48 h and found that the up-regulation of P21 was weakened compared with control group. **Conclusion** 5-Aza-CdR suppresses DNA

[基金项目] 国家自然科学基金(81273226);重庆市科技攻关重点项目(CSTC2011ggB10014,CSTC2011AB1045);重庆市自然科学基金(CSTC2009BB5171);教育部留学回国人员科研启动基金(2011)
[通信作者] 陈 姗,E-mail:cs723cn@aliyun.com
陈丙波:E-mail:chenbb81@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140107.2040.002.html(2014-01-07)

methyltransferases, and enhances the expression of P21 mediated by SOCS3, and then inhibits the proliferation in renal carcinoma 769-P cells.

[**Key words**] 5-aza-2′-deoxycytidine; renal carcinoma cells; proliferation; suppressor of cytokine signaling 3; P21

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81273226), the Key Tackling Project of Science and Technology Research of Chongqing (CSTC2011ggB10014, CSTC2011AB1045), the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2009BB5171) and the Starting Fund for Overseas Returners of Ministry of Education (2011). Corresponding author: Chen Shan, E-mail: cs723cn@aliyun.com; Chen Bingbo, E-mail: chenbb81@126.com

肾癌是泌尿系统常见的恶性肿瘤之一,其发病率在泌尿生殖系统肿瘤中仅次于膀胱癌,高居第二位,占成人肾恶性肿瘤的80%～85%[1]。肾细胞癌约占肾脏恶性肿瘤的90%[2]。因肾癌早期无明显的症状,新发病例中25%～30%的患者已出现扩散和转移,一旦发生转移,其预后相当差。肾细胞癌Ⅳ期的患者,平均存活时间为10个月,3年内的存活率仅为11%[3],严重危害着人们的生命健康。目前对肾细胞癌的治疗主要是免疫疗法,如用白细胞介素2(IL-2)和干扰素α(IFN-α)[4],但是,免疫耐受仍是一个比较棘手的问题。近年来随着对肾细胞癌的生物学和相关基因研究的深入,发现了几种对肾细胞癌较敏感的药物,如索拉非尼、舒尼替尼、帕唑帕尼[5],但是仅对部分患者有显著疗效。因此,探索对肾细胞癌治疗的新策略尤为重要。

随着表观遗传学的兴起,近年运用表观遗传学的方法,如甲基化酶抑制剂、乙酰化酶抑制剂对肿瘤进行治疗越来越受到重视。5-氮杂-2′-脱氧胞苷(5-Aza-CdR),也称为地西他滨,是DNA甲基化转移酶的抑制剂,临床上已用于对血液系统恶性肿瘤的治疗。它通过插入DNA抑制甲基化转移酶与DNA结合,进而使甲基化的抑癌基因得以重新表达,从而发挥其抗肿瘤效应。目前对5-Aza-CdR抗肿瘤增殖方面的研究很多,但其具体机制仍不清楚。研究表明,5-Aza-CdR能够促进P21的表达进而发挥其抑制肿瘤细胞增殖的作用,但其具体是通过什么途径使P21上调的,仍不清楚[6]。有研究发现,在肝癌细胞中,5-Aza-CdR能使SOCS3基因启动子发生去甲基化进而恢复SOCS3的表达[7]。那么,5-Aza-CdR能否诱导肾癌细胞中SOCS3的表达呢? SOCS3和P21之间有什么联系吗? 基于以上思路,本实验从调控细胞增殖的角度出发,对5-Aza-CdR抑制肾癌细胞的增殖机制进行探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人肾癌细胞系ACHN和769-P购自美国菌种保藏中心(ATCC),由第三军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室保存并传代。

1.1.2 试剂 胎牛血清、胰酶、DMEM低糖细胞培养基和RPMI1640培养基均为美国HyClone公司产品;DMSO、5-Aza-CdR为美国Sigma公司产品;CCK-8试剂盒为日本Dojindo Laboraories产品;RNA OUT为北京天恩泽公司产品;细胞裂解液、BCA蛋白浓度测定试剂盒、Tubulin抗体购自江苏碧云天生物技术公司;蛋白酶抑制剂为Roche公司产品;P21抗体为美国Santa Cruz公司产品;SOCS3抗体为美国Abcam公司产品;化学发光底物试剂盒、PVDF膜购自Millipore公司;封闭蛋白粉购自武汉博士德公司;细胞培养板为美国Costar公司产品,二抗抗兔的抗体购自美国Cell Signaling公司,二抗抗鼠的抗体购自北京中杉公司,lipofectamine 2000购自Invitrogen公司。

1.2 方法

1.2.1 CCK8法检测细胞增殖 取对数生长期的2种肾癌细胞769-P和ACHN,0.25 g/L胰蛋白酶消化,调整细胞至一定密度,接种于96孔细胞培养板中,每孔加100 mL培养基,放置于37 ℃、5% CO_2 培养箱中,12 h后吸弃上清;阴性对照组中加入等量的DMSO,药物处理组加入5-Aza-CdR,浓度分别是0、0.01、0.05、0.5、1、5、50 μmol/L,每组3个复孔,5-Aza-CdR处理72 h以后取出,将CCK-8试剂与培养基按照1∶10稀释后,每孔加入100 mL稀释后的CCK-8试剂,在细胞培养箱中孵育1 h后,取出到酶标仪上读数,波长设定为450 nm,小干扰RNA(si-SOCS3)合成于上海吉玛公司。

1.2.2 流式细胞仪分析细胞周期 分别将2种肾癌细胞769-P和ACHN接种于6孔板中,每孔10^5个细胞,12 h后吸弃上清,阴性对照组加入溶有等量DMSO的培养基,实验组加入5-Aza-CdR,浓度分别是0.5、1、5 μmol/L。37 ℃、5% CO_2 细胞培养箱培养48 h后,将上清吸入10 mL EP管中,PBS洗2遍,0.25 g/L的胰蛋白酶消化,吸入EP管中,1 000×g离心5 min,弃上清,用PBS洗2遍,预冷的75%乙醇重悬,4 ℃过夜;PBS洗涤2次,加入核糖核酸酶A(100 ng/L),37 ℃水浴锅消化30 min,加入PI(500 ng/mL)染液300 μL,4 ℃避光孵育1 h,400目细胞筛选过滤,流式细胞仪检测细胞周期,Mcycle软件分析各组G_0、G_1、S、G_2、M各期细胞百分比。

1.2.3 RT-PCR(reverse transcription-PCR)检测甲基化转移酶DNMT1、DNMT3a、DNMT3b和细胞信号抑制因子3(SOCS3)基因的表达 将769-P肾癌细胞按每孔10^5个接种于6孔板中,12 h后吸弃上清,对照组加入溶有等量DMSO的培养基,实验组加入5-Aza-CdR,浓度分别是0.5、1、5 μmol/L。处理48 h后取出细胞,加RNA OUT裂解后,提取细胞内的总RNA,测浓度后标化,逆转录成cDNA,扩增所需要的序列,取5 μL扩增产物跑1.5%琼脂糖凝胶电泳。Dec 2000凝胶成像仪扫描成像。

引物序列如下:DNMT1 上游,5′-CGCTGTATCTAGCAAGGGTCA-3′, 下游,5′-TCGAATCTCGCGTAGTCTTG-3′;DNMT3a 上游,5′-ACCACAGAGGCGGAAATACC-3′,下游,5′-GTCTCCCTGCTGCT-AACTGG-3′;DNMT3b 上游,5′-CAGGAGACCTACCCTCCACA-3′,下游,5′-TTACGTCGTGGCTCCAGTTA-3′;SOCS3 上游,5′-CAAG-GACGGAGACTTCGATT-3′, 下游, 5′-GACTGGGTCTTGACGCT-GA-3′;β-actin 上游,5′-GTGAAGGTGACAGCAGTCGGTT-3′,下游,5′-GAAGTGGGGTGGTTTTAGGA-3′。

1.2.4 Western blot 检测 SOCS3、P21 蛋白的表达 将 769-P 细胞接种于 6 孔板中,12 h 后弃上清,对照组中加入溶有等量 DMSO 的培养基,实验组加入 5-Aza-CdR,浓度分别是 1、5 μmol/L。处理 48 h 后,取出培养板,弃上清,用 PBS 洗 2 遍,每孔加入含有蛋白酶抑制剂的裂解液裂解细胞后提取总蛋白。测浓度后标化,加入上样缓冲液后在 100 ℃水浴锅煮 10 min。取等量蛋白,跑 12% 的蛋白凝胶;转膜 40 min;37 ℃封闭 1 h;抗兔 SOCS3 的多克隆抗体(1∶1 000)、抗兔的 P21 多克隆抗体(1∶1 000)、山羊抗鼠的 α-Tublin(1∶1 000),分别于 4 ℃过夜孵育;二抗分别用山羊抗兔和山羊抗鼠辣根过氧化物酶(1∶5 000)室温孵育 2 h;用 PBST 洗膜 3 次,每次 5 min;加显影剂显影。

1.2.5 Western blot 检测 siRNA 干扰 SOCS3 表达后 5-Aza-CdR 对 P21 表达的影响 干扰 SOCS3 的 siRNA 干扰序列正义链:5′-CACCUGGACUCCUAUGAGAdTdT-3′,反义链:5′-UCUCAU-AGGAGUCCAGGUGdTdT-3′。首先将合成的 siRNA 稀释成 20 μmol/L 的浓度,然后将 769-P 细胞接种于 6 孔板中,12 h 后弃上清,用 PBS 洗 2 遍,每孔加入 1 mL Opti-MEM 培养基,放回细胞培养箱;实验组每个 EP 管加入 20 μmol/L 的 SOCS3 干扰 RNA 5 μL 和 500 μL Opti-MEM 培养基,相应的 EP 管加入 5 μL lipofectamine 2000 和 500 μL Opti-MEM 培养基,阴性对照组加无关序列;5 min 后分别混合,20 min 后将混合均匀的溶液加到 6 孔板中;6 h 后换液,加 5-Aza-CdR,浓度分别是 0、5、5 μmol/L。处理 48 h 后按照上述步骤提细胞内总蛋白,进行 Western blot 实验。

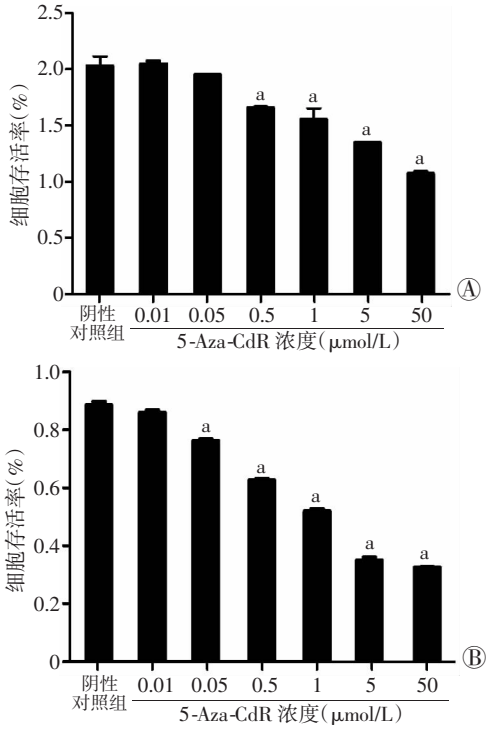
1.3 统计学分析

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Graph Prism 5 统计软件进行组间方差分析和两两比较。

2 结果

2.1 5-Aza-CdR 显著抑制 769-P、ACHN 的增殖

5-Aza-CdR 处理 769-P 和 ACHN 细胞 72 h 后,明显抑制 2 种细胞的增殖,而且表现出剂量依赖性(图 1)。在 769-P 细胞中,当 5-Aza-CdR 浓度 >0.5 μmol/L,其显著抑制细胞增殖;在 ACHN 细胞中,当 5-Aza-CdR 浓度 >0.05 μmol/L,其显著抑制细胞增殖。因 769-P 细胞系属于肾透明细胞癌细胞系,具有高转移、高侵袭力,更具有代表性,故后面的实验只选取 769-P 细胞系。



a:$P<0.05$,与阴性对照组比较

A:769-P 细胞;B:ACHN 细胞

图 1 CCK-8 法检测不同浓度 5-Aza-CdR 处理 769-P、ACHN 细胞 72 h 后细胞增殖

2.2 5-Aza-CdR 将 769-P 细胞周期阻滞在 G_2/M 期

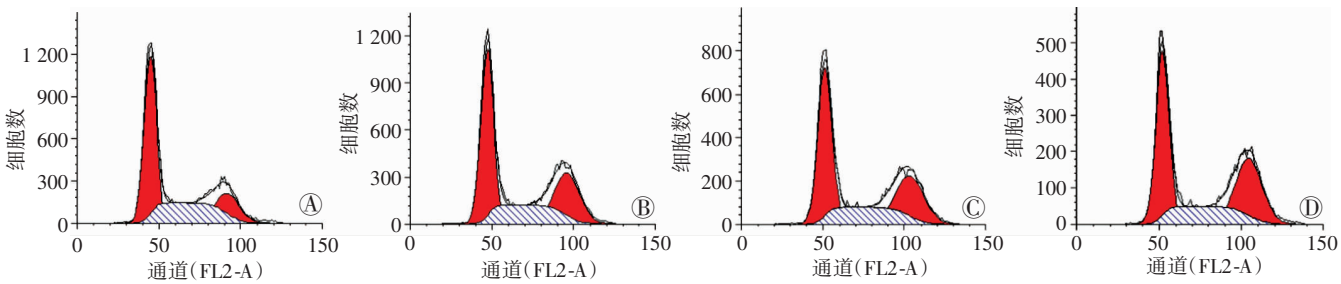
如图 2 所示,随着 5-Aza-CdR 浓度的升高,其对 769-P 细胞周期的阻滞也越明显,表现为 G_2 期细胞数量增多。

2.3 5-Aza-CdR 明显下调 DNMT1、DNMT3a 的表达和上调 SOCS3 基因的表达

不同浓度 5-Aza-CdR(0.5、1、5 μmol/L)处理 769-P 细胞后,5-Aza-CdR 可以剂量依赖性地下调 DNMT1、DNMT3a 表达,而对 DNMT3b 无明显影响,同时,还伴随着 SOCS3 的显著上调(图 3)。

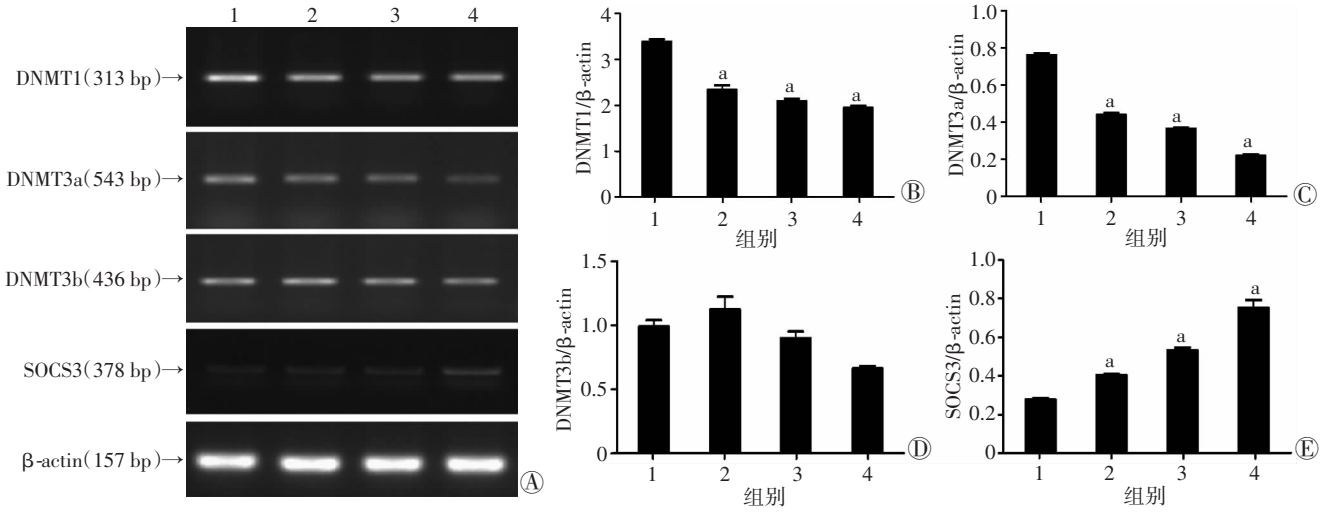
2.4 5-Aza-CdR 显著上调 769-P 细胞中 SOCS3、P21 蛋白的表达

5-Aza-CdR 在 1、5 μmol/L 的时候均显著上调 SOCS3 蛋白的表达,并且呈剂量依赖性增加,在 SOCS3 蛋白上调的同时,也伴随着 P21 的显著上调,表现出剂量依赖性(图 4)。



A:阴性对照组;B:5-Aza-CdR 0.5 μmol/L 组;C:5-Aza-CdR 1 μmol/L 组;D:5-Aza-CdR 5 μmol/L 组

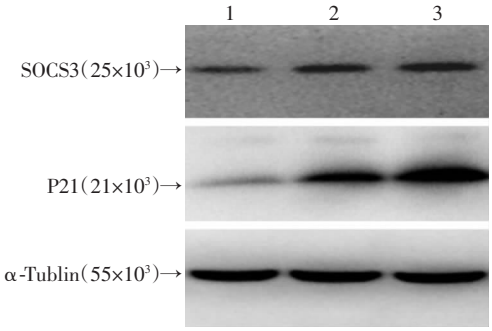
图 2 流式细胞仪检测不同浓度 5-Aza-CdR 处理 769-P 细胞 48 h 后细胞周期



1:阴性对照组;2:5-Aza-CdR 0.5 μmol/L 组;3:5-Aza-CdR 1 μmol/L 组;4:5-Aza-CdR 5 μmol/L 组

A:RT-PCR 检测结果;B~E: 分别为 DNMT1、DNMT3a、DNMT3b 和 SOCS3 mRNA 表达半定量分析结果 a:$P<0.05$,与阴性对照组比较

图3 RT-PCR 检测不同浓度 5-Aza-CdR 处理 769-P 细胞 48 h 后 DNMT1、DNMT3a、DNMT3b 和 SOCS3 mRNA 表达

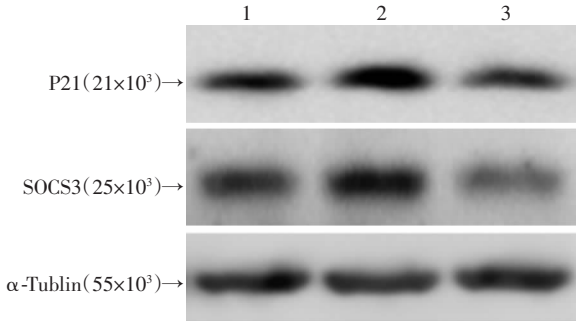


1:阴性对照组;2:5-Aza-CdR 1 μmol/L 组;3:5-Aza-CdR 5 μmol/L 组

图4 Western blot 检测不同浓度 5-Aza-CdR 处理 769-P 细胞 48 h 后 SOCS3、P21 蛋白表达

2.5 5-Aza-CdR 通过上调 SOCS3 促进 P21 的表达

图5可见阴性对照组 P21 和 SOCS3 的表达都随着 5-Aza-CdR 浓度的增加而增强,而实验组干扰 SOCS3 后,相同浓度(5 μmol/L)下的 5-Aza-CdR 对 P21 的上调作用明显减弱。



1:阴性对照组;2:5 μmol/L 5-Aza-CdR 组;3:si-SOCS3 + 5 μmol/L 5-Aza-CdR 组

图5 Western blot 检测 769-P 细胞中干扰 SOCS3 表达后 5-Aza-CdR 对 P21 表达的影响

3 讨论

5-Aza-CdR 是一种 DNA 甲基化转移酶抑制剂,从而使一些在肿瘤中高甲基化的抑癌基因重新表达而发挥抗肿瘤的效应。虽然临床上已用于白血病的治疗,但其对于其他肿瘤的治疗作用以及具体机制仍不十分清楚。有研究表明,在肾癌细胞 786-0 中,5-Aza-CdR 能诱导 P21 的表达,但研究发现 P21 的启动子上并没有被甲基化[8]。这提示:5-Aza-CdR 并不是直接调控 P21 的表达的,而是通过间接机制导致 P21 的上调。传统观点认为,P21 受 P53 的调控。最新研究发现,在肺癌细胞中[6],干扰了 P53 的表达后,5-Aza-CdR 仍能导致 P21 表达的明显上调。这表明5-Aza-CdR 并不是通过 P53 依赖的方式上调 P21 的表达的,那么其具体机制是什么呢?

SOCS 家族包括 CISH (cytokine inducible SH2-containing protein)和 SOCS1~7 等 8 个分子[9]。尽管各个成员之间氨基酸数不同,结构上也有差异,但它们都具有共同的结构特点,即 N 末端为一段可变序列,中间为一个 SH2 结构域(可与其他信号蛋白的磷酸化酪氨酸残基结合),C 末端有一段约 40 个氨基酸残基组成的保守序列,称为“SOCS 盒”(可促进所结合的靶蛋白发生蛋白酶体依赖途径的降解)。这些家族分子主要通过对细胞因子诱导的 Janus 激酶(janus kinase, JAK)/信号转导及转录激活子(signal transducers and activators of transcription, STAT)信号通路进行负反馈性调节而发挥生物学效应,另一方面,JAK 信号通路的

激活又可以诱导 SOCS 家族分子的表达,这样 SOCS 家族就和 JAK 信号通路形成了一个负反馈调节机制[10]。细胞因子刺激后,导致 JAK 信号通路的持续激活进而导致慢性炎症、细胞的恶性增殖以及肿瘤的发生,因此,对 JAK 信号通路的抑制将抑制细胞炎症和细胞增殖。而 SOCS 蛋白家族就是 JAK 信号通路的负性调控子[11]。目前研究较多的是 SOCS3 蛋白。SOCS3 在抗炎和抗肿瘤方面都有一定的作用,Stahl 等[12]发现 SOCS3 可以抗肿瘤血管生成;Niwa 等[13]发现 SOCS3 可以抑制 JAK/STAT 通路进而抑制肝癌细胞增殖和迁移。将携带 SOCS3 或 SOCS3 细胞渗透肽融合蛋白的溶瘤腺病毒(AdCN305-socs3/AdCN305-cpp-SOCS3)转染肝肿瘤细胞,可抑制 STAT3 的磷酸化和下调 cyclin D1 和 Bcl-xl 表达,明显抑制肿瘤生长[14]。在人类多种疾病的发生、发展中,SOCS3 均表现出水平异常或功能发挥异常。有研究指出,在大部分人类肿瘤中,SOCS3 呈高甲基化状态[15]。所以,SOCS3 在抑制肿瘤生长方面有着重要作用。

那么在肿瘤细胞中,如果用药物使得一些甲基化的基因恢复表达,能达到抑制肿瘤生长的目的吗?我们利用 5-Aza-CdR 降低 DNMTs 的表达,进而恢复 SOCS3 在肿瘤中的水平以达到抑制肿瘤的发生和发展。恢复表达的 SOCS3 是怎样发挥其抗肿瘤的效应的呢?本研究发现,用 5-Aza-CdR 处理 769-P 细胞 48 h 后,SOCS3 和 P21 的表达均显著升高。那么 SOCS3 和 P21 之间会有什么联系吗?P21 是细胞周期蛋白依赖激酶抑制剂,通过结合到细胞周期蛋白激酶和细胞周期蛋白(Cdk/cyclin)复合物上发挥抑制细胞增殖的作用。现在普遍认为,P21 是 P53 的靶基因,其表达受到 P53 的调控。但是,最近有研究称在干扰了 P53 后,5-Aza-CdR 仍能显著上调 P21[6]。这提示我们,除了 P53 以外,还会有其他分子会参与 5-Aza-CdR 介导的 P21 蛋白的表达调控。

综上所述,本研究结果显示 5-Aza-CdR 能显著抑制肾癌细胞的增殖,将肾癌细胞阻滞在 G_2/M 期。其机制是 5-Aza-CdR 通过下调甲基化转移酶 DNMT1 和 DNMT3a,导致肿瘤细胞 SOCS3 基因的甲基化状态难以维持,进而使 SOCS3 的表达增加,最终导致 P21 蛋白表达的升高,抑制肿瘤细胞增殖。本研究发现了 P21 升高的 P53 非依赖机制,即是由于 SOCS3 的重新表达所导致的,阐明了 5-Aza-CdR 抑制细胞增殖的具体分子机制,为 5-Aza-CdR 在肿瘤化疗方面提供一定的科学依据。

参考文献:

[1] 周立斌, 凡杰, 刘勇超, 等. miR-27a 下调肾癌细胞 FOXO1 表达并促进其细胞增殖[J]. 现代肿瘤医学, 2012, 20(2): 239 - 241.
[2] Ljungberg B, Campbell S C, Choi H Y, *et al*. The epidemiology of renal cell carcinoma[J]. Eur Urol, 2011, 60(4): 615 - 621.
[3] Chen T, Ji B, Chen Y. Tetrandrine triggers apoptosis and cell cycle arrest in human renal cell carcinoma cells[J]. J Nat Med, 2014, 68(1): 46 - 52.
[4] Eisen T, Sternberg C N, Robert C, *et al*. Targeted therapies for renal cell carcinoma: review of adverse event management strategies[J]. J Natl Cancer Inst, 2012, 104(2): 93 - 113.
[5] Escudier B, Eisen T, Stadler W M, *et al*. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma[J]. N Engl J Med, 2007, 356(2): 125 - 134.
[6] Shin D Y, Kang H S, Kim G Y, *et al*. Decitabine, a DNA methyltransferases inhibitor, induces cell cycle arrest at G_2/M phase through p53-independent pathway in human cancer cells[J]. Biomed Pharmacother, 2013, 67(4): 305 - 311.
[7] Baltayiannis G, Baltayiannis N, Tsianos E V. Suppressors of cytokine signaling as tumor repressors. Silencing of SOCS3 facilitates tumor formation and growth in lung and liver[J]. J BUON, 2008, 13(2): 263 - 265.
[8] Iwata H, Sato H, Suzuki R, *et al*. A demethylating agent enhances chemosensitivity to vinblastine in a xenograft model of renal cell carcinoma[J]. Int J Oncol, 2011, 38(6): 1653 - 1661.
[9] Starr R, Willson T A, Viney E M, *et al*. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling[J]. Nature, 1997, 387(6636): 917 - 921.
[10] Inagaki-Ohara K, Kondo T, Ito M, *et al*. SOCS, inflammation, and cancer[J]. JAKSTAT, 2013, 2(3): e24053.
[11] Babon J J, Nicola N A. The biology and mechanism of action of suppressor of cytokine signaling 3[J]. Growth Factors, 2012, 30(4): 207 - 219.
[12] Stahl A, Joyal J S, Chen J, *et al*. SOCS3 is an endogenous inhibitor of pathologic angiogenesis[J]. Blood, 2012, 120(14): 2925 - 2929.
[13] Niwa Y, Kanda H, Shikauchi Y, *et al*. Methylation silencing of SOCS-3 promotes cell growth and migration by enhancing JAK/STAT and FAK signalings in human hepatocellular carcinoma[J]. Oncogene, 2005, 24(42): 6406 - 6417.
[14] Cui Q, Jiang W, Wang Y, *et al*. Transfer of suppressor of cytokine signaling 3 by an oncolytic adenovirus induces potential antitumor activities in hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2008, 47(1): 105 - 112.
[15] Molavi O, Wang P, Zak Z, *et al*. Gene methylation and silencing of SOCS3 in mantle cell lymphoma[J]. Br J Haematol, 2013, 161(3): 348 - 356.

(**收稿**:2013-10-19;**修回**:2013-12-19)
(编辑 栾 嘉)