

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.06.0724

## PRDM5 基因抑制前列腺癌细胞 22Rv1 生长

王洋<sup>1△</sup>, 夏梓元<sup>2△</sup>, 黄美金<sup>3</sup>, 任善成<sup>4</sup>, 朱焱<sup>1</sup>, 高莉<sup>1</sup>, 贺湘洁<sup>1</sup>, 徐光<sup>4</sup>, 丁桂龄<sup>1</sup>, 陆斌<sup>2</sup>, 孙颖浩<sup>4\*</sup>

1. 第二军医大学长海医院病理科, 上海 200433
2. 第二军医大学药学院生化药学教研室, 上海 200433
3. 解放军成都军区昆明总医院肿瘤科, 昆明 650010
4. 第二军医大学长海医院泌尿外科, 上海 200433

**[摘要]** **目的** 探讨 PRDM5 基因在前列腺癌细胞中的抑癌作用。 **方法** 采用聚合酶链反应(PCR)、限制性内切酶酶切、T4 DNA 连接酶连接等方法, 克隆 PRDM5 基因并插入慢病毒载体中。将携带 PRDM5 基因的慢病毒质粒(或阴性对照质粒)与慢病毒包装质粒通过脂质体法共转染 293T 细胞, 收集病毒上清, 感染人前列腺癌细胞株 22Rv1。用蛋白质印迹法检测细胞 PRDM5 的表达, 细胞倍增实验和平板克隆实验检测细胞增殖和克隆形成能力, 软琼脂克隆形成实验检测细胞非锚着依赖性生长能力。 **结果** 成功构建 PRDM5 重组慢病毒载体, 并包装获得慢病毒上清。将 PRDM5 重组慢病毒载体感染 22Rv1 细胞后, 筛选得到稳定表达细胞株, 蛋白质印迹法结果显示该细胞株能稳定表达外源性 PRDM5 蛋白。过表达 PRDM5 的前列腺癌 22Rv1 细胞的增殖能力[倍增时间: (52.5±1.4) h vs (44.0±1.3) h]、克隆形成能力[克隆形成数: (114±98)/皿 vs (361±123)/皿]和非锚着依赖性生长能力[克隆形成数: (94.6±8.7)/孔 vs (154.0±3.5)/孔]均低于阴性对照组 ( $P < 0.05$ )。 **结论** 前列腺癌 22Rv1 细胞中 PRDM5 的过表达具有抑制肿瘤细胞增殖、克隆形成和非锚着依赖性生长的能力。

**[关键词]** PRDM5; 前列腺肿瘤; 细胞增殖; 克隆形成; 非锚着依赖性生长

**[中图分类号]** R 737.25 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2016)06-0724-05

### PRDM5 gene can inhibit the growth of prostate cancer cell line 22Rv1

WANG Yang<sup>1△</sup>, XIA Zi-yuan<sup>2△</sup>, HUANG Mei-jin<sup>3</sup>, REN Shan-cheng<sup>4</sup>, ZHU Yan<sup>1</sup>, GAO Li<sup>1</sup>, HE Xiang-jie<sup>1</sup>, XU Guang<sup>4</sup>, DING Gui-ling<sup>1</sup>, LU Bin<sup>2</sup>, SUN Ying-hao<sup>4\*</sup>

1. Department of Pathology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Department of Biochemical Pharmacy, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
3. Department of Oncology, Kunming General Hospital, PLA Chengdu Military Area Command, Kunming 650010, Yunnan, China
4. Department of Urology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the antitumor effect of PRDM5 gene in prostate cancer cells. **Methods** PRDM5 gene was cloned and inserted into lentiviral vector using polymerase chain reaction (PCR), restriction endonuclease and T4 DNA ligase connected method. The lentiviral plasmids carrying PRDM5 gene (LV-PRDM5) or control lentivirus (LV-Luc) were co-transfected with lentiviral packaging plasmid mix into 293T cells by liposome method. The viral supernatants were collected and transduced into human prostate cancer cells 22Rv1. The expression of PRDM5 was verified by Western blotting analysis. The cell proliferation and clone formation ability were detected by cell multiplication and cell cloning experiments. The anchorage independent growth rate of prostate cancer cells was assessed by soft agar colony formation assay. **Results** The lentivirus vector expressing PRDM5 gene was constructed successfully, and the viral supernatants were obtained. The prostate cancer cell line 22Rv1 stably expressing exogenous PRDM5 was screened and verified by Western blotting analysis. Compared with control cells, the prostate cancer cell line 22Rv1 expressing PRDM5 showed a lower growth rate (multiplication time: [52.5±1.4] vs [44.0±1.3] h), clone formation rate ([114±98] vs [361±123] colonies per dish) and anchorage independent growth rate ([94.6±8.7] vs [154.0±3.5] colonies per cell,  $P < 0.05$ ). **Conclusion**

**[收稿日期]** 2015-09-06 **[接受日期]** 2015-12-19

**[基金项目]** 中国博士后科学基金面上项目(2013M532124), 上海市卫生和计划生育委员会科研课题面上项目(2013356). Supported by Postdoctoral Science Foundation of China (2013M532124) and Science Foundation of Health and Family Planning Commission of Shanghai (2013356).

**[作者简介]** 王洋, 博士, 讲师、主治医师。E-mail: docwy@sina.com; 夏梓元, 硕士生。E-mail: vih\_baby@sina.com

△共同第一作者(Co-first authors).

\* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81873409, E-mail: sunyh@medmail.com.cn

Overexpression of PRDM5 has inhibitory effect against proliferation, clone formation and anchorage independent growth of prostate cancer cells *in vitro*.

[Key words] PRDM5; prostatic neoplasms; cell proliferation; clone formation; anchorage independent growth

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(6): 724-728]

PR 域蛋白 (PRDM) 是近年来新发现的 Kruppel 样锌指基因产物家族的亚型, 在细胞分化和恶性转化中起着重要作用<sup>[1]</sup>。现已发现该家族有 17 个成员, 分别是 PRDM1~17, 其末端都存在具有转录调控作用的 PR 结构域和 SET 结构域<sup>[2]</sup>。PRDM5 (PFM2) 被认为是一个抑癌基因<sup>[3]</sup>, Deng 等<sup>[4]</sup> 研究发现重组腺病毒表达的 PRDM5 能引起感染的肿瘤细胞出现 G<sub>2</sub>/M 的阻滞并促进肿瘤细胞发生凋亡; Watanabe 等<sup>[5]</sup> 发现, 在胃肠道癌细胞系过表达 PRDM5 能抑制癌细胞的生长。但目前关于 PRDM5 在前列腺癌中的表达和作用还未见相关研究报道。本研究以 PRDM5 慢病毒感染低表达 PRDM5 的前列腺癌 22Rv1 细胞, 通过细胞倍增实验、平板克隆实验和软琼脂克隆形成实验, 探讨 PRDM5 在前列腺癌中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料及试剂

前列腺癌 22Rv1 细胞系由第二军医大学长海医院泌尿外科保存, 用含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM/RPMI 1640 混合培养基在 37℃、7%CO<sub>2</sub> 条件下培养。DMEM 培养基、RPMI 1640 培养基、胰蛋白酶、青霉素 G 钠和氯霉素购自 Gibco 公司, FBS 购自 SAFC Biosciences 公司, 二甲亚砜 (DMSO)、嘌呤霉素 (puromycin, PM) 购自 Sigma 公司, 多西环素 (doxycycline, DOX) 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司, RNAPure 超纯总 RNA 快速提取试剂盒、EASYspin 组织/细胞 RNA 快速提取试剂盒购自北京艾德来生物科技有限公司, pZERO/Blunt 零背景快速克隆试剂盒、TIANprep 快速质粒小提试剂盒、DNA Marker、DNA 纯化试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司, T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司, Bgl II、Age I、Nde I 和 Cla I 限制性内切酶购自宝生物工程 (上海) 有限公司 (TaKaRa)。Pure Yield™ 质粒小提试剂盒购自 Promega 公司, Lipofectamine™ 2000 转染试剂购自 Invitrogen 公司, 化学发光试剂盒购自 Thermo 公司, 兔抗 PRDM5 单克隆抗体购自 Abcam

公司, actin 多克隆抗体购自 Sigma 公司, 山羊抗小鼠 IgG-HRP (sc-2005)、山羊抗兔 IgG-HRP (sc-2004) 购自 Santa Cruz 公司。

### 1.2 PCR 引物的设计、合成

利用 NCBI 网上的 GenBank 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) 以及 Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 对基因序列进行查找和序列比对。采用 DNAMAN 6.0、Vector NTI suite 8.0 及 Primer Premier 5.0 等软件进行基因序列分析和引物设计。根据 GenBank 数据库中的人 PRDM5 基因序列 (NM\_018699.2), 应用 Primer Premier 5.0 软件设计引物: Forward 5'-aaA CCG GTC ACC ATG CTG GGC ATG TAC GTG CC-3', Reverse 5'-aaA TCG ATT TAG CTG TCA GCT ACA CCA TGG-3'。引物由 Invitrogen 公司合成。从人 cDNA 文库中克隆获得人 PRDM5 基因, 5' 端和 3' 端分别设计 Age I (ACC GGT) 和 Cla I (ATC GAT) 酶切位点, 用于表达载体的定向克隆。人 PRDM5 基因内部 1 013 bp 处存在一个 Nde I 位点, 设计 NdeF (5'-ACG TCA TAT GAT CAC CCA CTC AG-3') 和 NdeR (5'-GAT CAT ATG ACG TTT TAG CTG ATT AG-3') 引物进行分段 PCR 扩增, 最后以 Nde I 酶切位点进行拼接。

### 1.3 PRDM5 基因的克隆和慢病毒表达载体的构建

以人 PRDM5 的 cDNA 为模板进行 PCR, 反应结束后, 用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳, 切取目的片段, 用 DNA 纯化试剂盒进行目的片段的回收, 连接克隆载体。连接产物转化大肠杆菌感受态细胞, 将细胞均匀涂布于含氨苄青霉素的 LB 琼脂平板表面, 于 37℃ 孵箱中倒置培养过夜。挑取单克隆接种于加入氨苄青霉素的 LB 培养液中摇菌, 进行质粒抽提和酶切鉴定。将鉴定正确的克隆送测序公司测序。将测序正确的克隆质粒分别用 Age I 和 Nde I、Nde I 和 Cla I 双酶切, 慢病毒载体质粒 pLV-TOF 用 Age I 和 Cla I 双酶切。回收 pZERO/Blunt-PRDM5 酶切产物中的目的片段和 pLV-TOF 酶切产物中的载体部分, 以 T4 DNA 连接酶进行连接。转化铺板后进行质粒抽提和

酶切鉴定,将鉴定正确的克隆进行保种。

1.4 携带 *PRDM5* 基因的慢病毒的包装 转染前 24 h 将生长状态良好的 293T 细胞接种到直径为 6 cm 的平皿中,细胞融合度达到约 80% 时进行病毒包装,转染前更换 2 mL 新鲜含血清培养基。在 1.5 mL 离心管中加入 2.4  $\mu\text{g}$  pLV-*PRDM5* (pLV-Luc 作为阴性对照) 和 7.6  $\mu\text{g}$  包装质粒 Mix, 加入 250  $\mu\text{L}$  无血清培养基,轻柔吹打混匀;在另一个 1.5 mL 离心管中以 250  $\mu\text{L}$  无血清培养基稀释 10  $\mu\text{L}$  Lipofectamine™ 2000 脂质体,轻柔吹打混匀,室温静置 5 min。将含 Lipofectamine™ 2000 的培养基加入到质粒 DNA 中,轻轻混匀,室温放置孵育 20 min,以形成转染复合物;然后将上述混合物加到细胞培养皿中,培养 6~8 h 后更换新鲜培养基 5 mL,放回孵箱培养;分别于转染后 48 h 和 72 h 收集上清,4℃、350×*g* 离心 15 min,去除细胞沉淀和细胞碎片;分装,−80℃ 保存。采用有限稀释法测定病毒滴度。

1.5 稳定表达 *PRDM5* 的前列腺癌 22Rv1 细胞株的建立 选取 *PRDM5* 低表达的 22Rv1 细胞株进行病毒感染。培养次日,更换新鲜培养基;48 h 后加入抗生素 PM 进行稳转筛选。该慢病毒系统为 Tet-off 系统,加入 DOX 溶液(质量浓度 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )暂时抑制目的基因的表达,隔天补加或更换一次含有 PM 和 DOX 的培养基。药物筛选约 1 周,获得稳定表达 *PRDM5* 的 22Rv1/LV-*PRDM5* 细胞和 22Rv1/LV-Luc 对照细胞。收集细胞,采用 RIPA 蛋白裂解液提取细胞总蛋白,聚丙烯酰胺凝胶电泳,半干电转 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h。一抗 4℃ 孵育过夜,二抗室温孵育 2 h,化学发光试剂盒显色,ChemiDoc™ System 凝胶成像系统拍照。

1.6 细胞倍增实验 将稳定表达 *PRDM5* 的 22Rv1/LV-*PRDM5* 细胞株和 22Rv1/LV-Luc 对照细胞撤药 3 d 后,消化,计数,铺板,每种细胞设 6 个复孔,每孔  $1 \times 10^5$  个细胞,次日取 24、48、72 h 3 个时间点,每个时间点消化细胞进行细胞计数,最后统计数据,在网上 (<http://www.doubling-time.com/compute.php>) 进行在线计算,得到每组细胞的倍增时间。

1.7 平板克隆实验 撤药 3 d 后,用 0.25% 的胰蛋白酶消化细胞,用含 10% FBS 的 RPMI 1640/DMEM 培养基配成单个细胞悬液,以 2 500/皿接种于直径为 10 cm 的培养皿,37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中

培养 2 周。出现肉眼可见的细胞克隆时,终止培养,弃去培养液,以 1×PBS 洗 2 次;10% 甲醛固定 20 min,弃甲醛;用 0.1% 结晶紫染色 15 min,弃染色液;流水缓慢洗去染液,空气干燥。采用 Bio-Rad Quantity One 软件对克隆进行拍照计数。

1.8 软琼脂克隆形成实验 撤药 3 d 后,用胰酶消化细胞,制成单细胞悬液。调整细胞密度为  $5 \times 10^4/\text{mL}$ ,取 1 mL 细胞悬液加入 146  $\mu\text{L}$  2.5% 琼脂糖,迅速混匀,按 500  $\mu\text{L}$ /孔加入含 0.5% 底层胶的 24 孔板中,常温放置 30 min 以上。待上层胶完全凝固,放入孵箱中培养 2 周。用 0.1% 结晶紫进行染色,在显微镜下观察集落形成情况并拍照计数。

1.9 统计学处理 实验数据采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析。计数资料分析采用  $\chi^2$  检验。实验组与对照组两组资料均数的比较采用 *t* 检验。检验水准( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

2.1 成功获得稳定表达 *PRDM5* 的前列腺癌 22Rv1 细胞 通过 PCR 分段克隆方法获得 *PRDM5* 序列,电泳结果显示,PCR 产物大小基本正确,但有非特异性条带(图 1),需要在后期克隆的酶切鉴定和测序中进行选择。将克隆获得的正确 *PRDM5* 基因序列的 2 个片段同时装入慢病毒表达载体 pLV-TOF 中,通过 Age I 和 Cla I 双酶切,确定目的基因的插入。电泳结果显示,3 个克隆均插入了目的基因 *PRDM5* (图 2)。通过将携带 *PRDM5* 基因的慢病毒感染 22Rv1 细胞,经 PM 筛选阳性克隆后,用蛋白质印迹法检测转染后细胞中 *PRDM5* 蛋白的表达,结果显示,*PRDM5* 基因已成功转入 22Rv1 细胞中(图 3)。

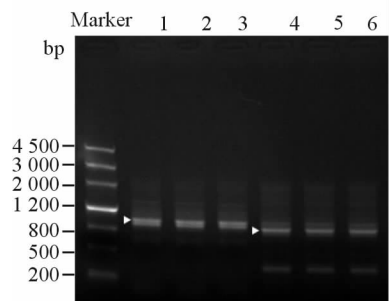


图 1 *PRDM5* 基因的 PCR 克隆

Fig 1 PCR cloning of *PRDM5* gene

1-3: 5' fragment (1 031 bp); 4-6: 3' fragment (880 bp)



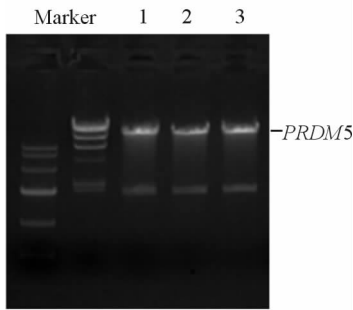


图 2 PRDM5 基因慢病毒表达载体的鉴定

Fig 2 Identification of PRDM5 gene lentiviral expression vector

1-3: Three colonies of PRDM5 gene lentiviral expression vector

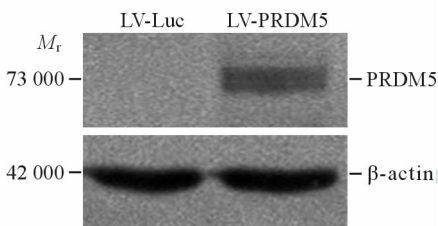


图 3 PRDM5 基因慢病毒感染后前列腺癌 22Rv1 细胞中 PRDM5 表达的鉴定

Fig 3 Identification of PRDM5 expression in prostate cancer cell line 22Rv1 infected with PRDM5 gene lentiviral vector

2.2 PRDM5 对前列腺癌 22Rv1 细胞的抑制作用 细胞倍增实验结果显示, 经 LV-Luc 感染后的 22Rv1 细胞倍增时间为  $(44.0 \pm 1.3)$  h, 而经 LV-PRDM5 感染的 22Rv1 细胞倍增时间为  $(52.5 \pm 1.4)$  h, 比 LV-Luc 组延长约 8.5 h ( $P < 0.05$ , 图 4)。

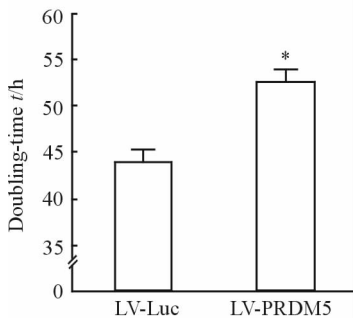


图 4 PRDM5 对前列腺癌 22Rv1 细胞倍增时间的影响

Fig 4 Effect of PRDM5 on multiplication rate of prostate cancer cells 22Rv1

\*  $P < 0.05$  vs LV-Luc group.  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$

平板克隆实验结果显示, 经 LV-Luc 感染后的 22Rv1 细胞克隆数为  $(1\ 361 \pm 123)$  /皿, 而经 LV-PRDM5 感染后的 22Rv1 细胞克隆数为  $(1\ 114 \pm 98)$  /皿, 统计分析显示 LV-PRDM5 组的细胞克隆形

成数低于 LV-Luc 组 ( $P < 0.05$ )。而从克隆大小上看, LV-Luc 组的大克隆细胞数目多于 LV-PRDM5 组 (图 5)。

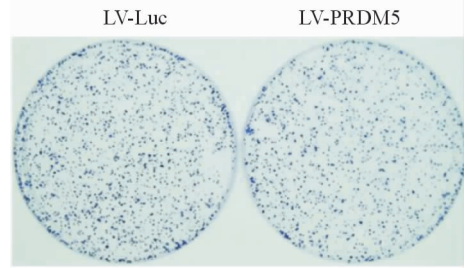


图 5 PRDM5 对前列腺癌 22Rv1 细胞克隆形成能力的影响

Fig 5 Effect of PRDM5 on clone formation rate of prostate cancer cells 22Rv1

软琼脂克隆形成实验结果显示, 经 LV-PRDM5 感染后的 22Rv1 细胞的克隆形成数为  $(94.6 \pm 8.7)$  /孔, 而经 LV-Luc 感染后的 22Rv1 细胞的克隆形成数约为 LV-PRDM5 组的 1.63 倍 ( $P < 0.05$ )。同时 PRDM5 表达后细胞的克隆变小, 提示 PRDM5 的表达可能抑制前列腺癌 22Rv1 细胞的非锚着依赖性生长能力 (图 6)。

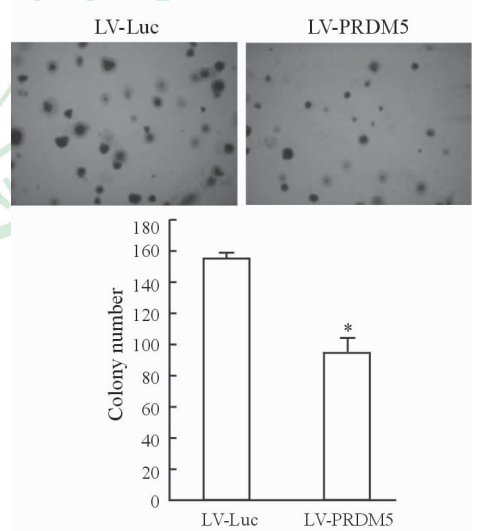


图 6 PRDM5 对前列腺癌 22Rv1 细胞的非锚着依赖性生长能力的影响

Fig 6 Effect of PRDM5 on anchorage independent growth rate of prostate cancer cells 22Rv1

Original magnification:  $\times 100$ . \*  $P < 0.05$  vs LV-Luc group.  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$

### 3 讨论

前列腺癌是男性泌尿生殖系统最常见的恶性肿瘤之一, 是老年男性的好发肿瘤。在西方发达国家, 前列腺癌是男性发病率最高的恶性肿瘤, 病死率也

仅次于肺癌<sup>[6-7]</sup>,严重威胁男性健康。我国前列腺癌发病率虽然与欧美国家相比要低,但是近年已明显有逐年增高的趋势,而且病死率远高于欧美国家<sup>[8-9]</sup>。与大多数肿瘤一样,前列腺癌的发生和发展也是多基因参与的多因素、多步骤的过程,涉及癌基因的激活和抑癌基因的失活。

PRDM5 是近年确认的抑癌基因 *PRDM* 家族成员<sup>[4]</sup>,位于人染色体 4q25~q26,有一个编码 630 个氨基酸的开放阅读框架,N 末端含有一个 PR 结构域和 16 个锌指结构序列。研究发现 PRDM5 与多种肿瘤的发生和发展有关<sup>[5,10-13]</sup>,但在前列腺癌中还未见相关研究报道。本研究通过基因转染手段上调前列腺癌 22Rv1 细胞中的 PRDM5 的表达,以探讨 PRDM5 在前列腺癌中的作用。目前基因转染途径很多,而慢病毒是较为有效的一种,它具有毒力低、感染效率高、容纳外源性基因片段大等特点。本研究构建了可调控的 PRDM5 慢病毒表达系统,将其感染低表达 PRDM5 的前列腺癌 22Rv1 细胞,获得了稳定的可调控表达的细胞。通过细胞倍增、克隆形成等体外实验发现,过表达 PRDM5 可延长前列腺癌 22Rv1 细胞的倍增时间,抑制细胞的克隆形成能力和非锚着依赖性生长能力。

本研究表明 *PRDM5* 可作为一个抑癌基因抑制前列腺癌细胞增殖,提示其可能在前列腺癌的发生和发展中起着重要作用,有望成为前列腺癌治疗的新靶点。但 *PRDM5* 是如何发挥抑癌作用的,其中涉及哪些下游信号通路分子,还需要进行深入的探讨。

## [参考文献]

- [1] FOG C K, GALLI G G, LUND A H. PRDM proteins: important players in differentiation and disease[J]. *Bioessays*, 2012, 34: 50-60.
- [2] FUMASONI I, MEANI N, RAMBALDI D, SCAFETTA G, ALCALAY M, CICCARELLI F D. Family expansion and gene rearrangements contributed to the functional specialization of *PRDM* genes in vertebrates[J]. *BMC Evol Biol*, 2007, 7: 187.
- [3] MEANI N, PEZZIMENTI F, DEFLORIAN G, MIONE M, ALCALAY M. The tumor suppressor PRDM5 regulates Wnt signaling at early stages of Zebrafish development [J]. *PLoS One*, 2009, 4: e4273.
- [4] DENG Q, HUANG S. PRDM5 is silenced in human cancers and has growth suppressive activities [J]. *Oncogene*, 2004, 23: 4903-4910.
- [5] WATANABE Y, TOYOTA M, KONDO Y, SUZUKI H, IMAI T, OHE-TOYOTA M, et al. PRDM5 identified as a target of epigenetic silencing in colorectal and gastric cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13: 4786-4794.
- [6] JEMAL A, SIEGEL R, WARD E, MURRAY T, XU J, THUN M J. Cancer statistics, 2007 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2007, 57: 43-66.
- [7] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65: 5-29.
- [8] SIM H G, CHENG C W. Changing demography of prostate cancer in Asia [J]. *Eur J Cancer*, 2005, 41: 834-845.
- [9] 彭 鹏, 龚杨明, 鲍萍萍, 柯居中, 向咏梅, 张敏璐, 等. 中国 2008 年前列腺癌发病、死亡和患病情况的估计及预测 [J]. *中华流行病学杂志*, 2012, 33: 1056-1059.
- [10] CHENG H Y, CHEN X W, CHENG L, LIU Y D, LOU G. DNA methylation and carcinogenesis of PRDM5 in cervical cancer [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2010, 136: 1821-1825.
- [11] SHU X S, GENG H, LI L, YING J, MA C, WANG Y, et al. The epigenetic modifier PRDM5 functions as a tumor suppressor through modulating WNT/ $\beta$ -catenin signaling and is frequently silenced in multiple tumors [J]. *PLoS One*, 2011, 6: e27346.
- [12] TAN S X, HU R C, TAN Y L, LIU J J, LIU W E. Promoter methylation-mediated downregulation of PRDM5 contributes to the development of lung squamous cell carcinoma [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35: 4509-4516.
- [13] BOND C E, BETTINGTON M L, PEARSON S A, MCKEONE D M, LEGGETT B A, WHITEHALL V L. Methylation and expression of the tumour suppressor, PRDM5, in colorectal cancer and polyp subgroups [J]. *BMC Cancer*, 2015, 15: 20.

[本文编辑] 孙 岩