

技术与方法

CRISPR/Cas9技术敲除人前列腺癌 PC-3细胞BLM解旋酶基因的研究

陈琨^{1,2,3} 许厚强^{1*} 赵佳福^{1,2} 段志强¹ 吴萍¹¹贵州大学高原山地动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室, 贵阳 550025;²贵州大学生命科学学院, 贵阳 550025; ³贵州省人民医院, 贵阳 550003)

摘要 BLM解旋酶是人类RecQ解旋酶家族的重要一员,在DNA的复制、修复、重组、转录、端粒的维持等细胞代谢过程中具有重要的作用。BLM基因与前列腺癌易感性相关,可作为治疗前列腺癌的候选基因。该研究设计了5个Cas9/SgRNA载体,并通过T7E1酶筛选出活性最强的SgRNA3载体,利用脂质体LTX将其与供体载体共同导入前列腺癌PC-3细胞。BLA和Puro抗性筛选及荧光蛋白标记甄别获得带阳性标记的细胞。Western blot及RTq-PCR检测证明,前列腺癌PC-3细胞中的BLM解旋酶基因被成功敲除,为深入研究BLM解旋酶基因在前列腺癌中的作用提供了重要的科学数据。

关键词 BLM解旋酶基因; CRISPR/Cas9表达载体; 基因敲除; 前列腺癌PC-3细胞

Research of CRISPR/Cas9 Technique to Knock Out Bloom Helicase Gene in Human Prostate Cancer PC-3 Cells

Chen Kun^{1,2,3}, Xu Houqiang^{1*}, Zhao Jiafu¹, Duan Zhiqiang¹, Wu Ping¹¹Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Production in the Plateau Mountains Region, Ministry of Education, Guizhou University, Guiyang 550025, China; ²College of Life Science,Guizhou University, Guiyang 550025, China; ³Guizhou Province People's Hospital, Guiyang 550003, China)

Abstract BLM helicase is an important member of the human RecQ helicase family, which plays a crucial role in DNA replication, repair, recombinant, transcription, telomere maintenance and other cell metabolism. The BLM helicase gene is associated with susceptibility to prostate cancer and it is also a candidate gene for treatment of prostate cancer. In this study, the five Cas9/SgRNA vectors were designed, and we selected the most active SgRNA3 vector by using T7E1 enzyme. Two vectors of Cas9/SgRNA3 and donor vector were jointly transduced into human prostate cancer PC-3 cell by LTX liposomes. BLA and Puro resistance screenings and fluorescent protein markers were used to identify cells with positive markers. The BLM helicase gene in PC-3 cells of prostate cancer was successfully knocked out detected by Western blot and RTq-PCR tests. This study can provide the important scientific data which play a role of the BLM helicase in prostate cancer.

Keywords BLM helicase gene; CRISPR/Cas9 expression vector; gene knockout; human prostate cancer PC-3 cell

前列腺癌是发生在前列腺的上皮性恶性肿瘤^[1]。有约新发病221 000例、死亡27 500例^[2-3]。我国前列腺癌是美国男性中最常见的肿瘤,仅2015年就 腺癌的发病率为11/10万,随着人口老龄化和生活方

收稿日期: 2018-04-17 接受日期: 2018-06-04

国家自然科学基金(批准号: 31360215)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0851-8292183, E-mail: gzdxhq@163.com

Received: April 17, 2018 Accepted: June 4, 2018

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31360215)

*Corresponding author. Tel: +86-851-8292183, E-mail: gzdxhq@163.com

网络出版时间: 2018-08-29 14:36:42

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180829.1436.006.html>

式的改变,我国前列腺癌的发病率和死亡率呈明显的逐年上升趋势^[4]。

BLM解旋酶是人类RecQ解旋酶家族的重要一员,在DNA的复制、修复、重组、转录、端粒的维持等细胞代谢过程中具有重要的作用^[5-6]。BLM(bloom syndrome protein)的缺失,将直接导致Bloom综合症(Bloom syndrome, BS)的发生,而BS患者易患恶性肿瘤^[7-8]。同时研究已证实,BLM解旋酶基因与中国人前列腺癌的易感性相关^[9]。

CRISPA/Cas9基因编辑技术是一种来源于细菌获得性免疫的由RNA指导Cas蛋白对靶向基因进行修饰的技术,具有操作简单、构建组装时间短、突变效率高、突变位点选择性强、成本低及可同时沉默任意数量的基因等优点,成为近年来分子生物学领域研究的热点技术之一^[10]。利用CRISPA/Cas9基因编辑技术对前列腺癌PC-3细胞中BLM解旋酶基因进行定点敲除,为随后探明BLM解旋酶作为抗前列腺癌靶标的研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 试剂与仪器

人类前列腺癌细胞系PC-3细胞购买于ATCC,培养条件为:DMEM、10% FBS、100 U/mL青霉素、100 mg/mL链霉素、2 mmol/L谷氨酰胺。表达载体骨架(hU6-gRNA-CMV-cas9-2A-bla)、供体载体骨架(left arm-loxp-hef1a-EYFP-2A-puro-2A-TK-terminator-loxp-right arm)以及T7E1引物合成均由北京华夏凯奇生物技术有限公司完成。T4连接酶购自Thermo公司。T7核酸内切酶I购自北京唯尚立德生物科技有限公司。胎牛血清和DMEM高糖培养基购自Gibco公司。质粒小提试剂盒购自Sigma公司。质粒大提试剂盒和基因组DNA提取试剂盒购

自Omega公司。RNA提取试剂盒、荧光定量PCR试剂盒均购自康为世纪生物技术有限公司。PCR仪购自BD公司。冷冻高速离心机购自Thermo公司。全自动蛋白质印迹定量分析仪购自Proteinsimple公司。BLM抗体(159 kDa, Source: rabbit)购自Abcam公司。 β -actin(49 kDa)购自Santa Cruz公司。

1.2 方法

1.2.1 gRNA的靶点设计及Cas9/SgRNA表达载体的构建 根据Cas9打靶位点的选择原则: SgRNA一般为20个碱基,其识别的序列位于NGG序列的上游,识别位点在基因组中的序列为5'-NNN NNN NNN NNN NNN NNN GG-3'(N代表任意碱基)。在SgRNA设计网站<http://crispr-era.stanford.edu>进行SgRNA设计。设计5个SgRNA且评分均在10,序列如下, SgRNA1: 5'-ATC AAC CCA TCA AGG AAG GT-3'; SgRNA2: 5'-GGA ACG AAC TGC TTC AGC AG-3'; SgRNA3: 5'-TCA CTT GAT GGC CCT ATG GA-3'; SgRNA4: 5'-TGC TTC AGC AGC GGA ACA TA-3'; SgRNA5: 5'-TTC ACT TGA TGG CCC TAT GG-3'。使用T4连接酶将SgRNA与载体骨架hU6-gRNA-CMV-Cas9-2A-bla连接,通过测序检测SgRNA均正确插入。

1.2.2 gRNA活性检测及供体载体构建 分别针对5个SgRNA位置以基因组为模板设计6对T7核酸内切酶I(T7E1)引物,通过对野生型PC-3基因组进行温度梯度PCR扩增,筛选出3对引物,退火温度选择60 °C(表1)。将5组Cas9/SgRNA质粒分别转染至PC-3细胞,转染72 h后加氨苄青霉素调整浓度为6 μ g/mL筛选一周(Bla为表达载体骨架所带抗性,可特异性切割氨苄青霉素的b-内酰胺环)。筛选剩余的细胞提取基因组DNA,PCR后产物T7E1酶检测,筛选出活性最强序列为: SgRNA3。根据SgRNA3切口上下游序列设计同源臂,连接供体骨架后完成供体载体构建。

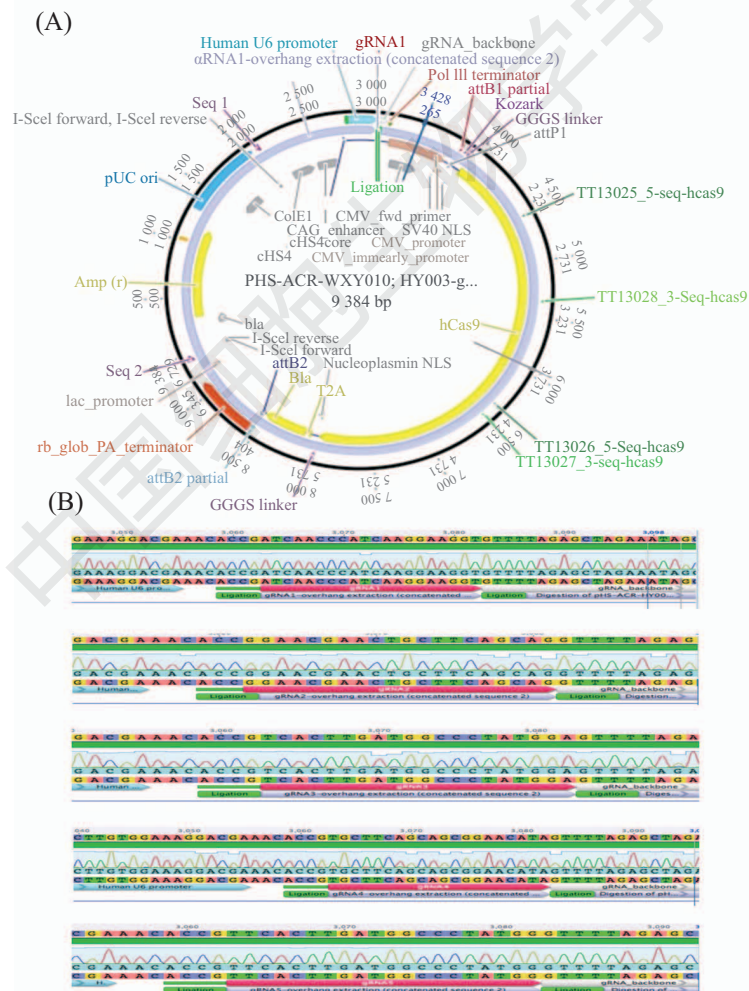
表1 本研究使用的引物
Table 1 The PCR primers in this study

引物名称 Primer name	测定靶点 Testing target	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	限制性内切酶位点 Restriction enzyme cutting site
1-L	SgRNA1	ACT GGG CTG AAA CAC CAA GA	260/629 890
1-R	SgRNA1	GCA GTG AGC CCT TAG ACC C	260/629 890
4-L	SgRNA3, SgRNA5	GTG GGA ACG AAC TGC TTC AG	447/210 658; 446/211 658
4-R	SgRNA3, SgRNA5	TCT TGG TGT TTC AGC CCA GT	447/210 658; 446/211 658
5-L	SgRNA2, SgRNA4	AGA CAG ATA AGT TTA CAG CAG CAG	119/444 564; 128/435 564
5-R	SgRNA2, SgRNA4	CTG TAG GGC AGG AAT CAC CC	119/444 564; 128/435 564

1.2.3 细胞转染和细胞筛选 PC-3细胞培养在10 cm培养皿中,待贴壁细胞汇合度为80%时进行转染。使用脂质体LTX将表达载体(Cas9-SgRNA3)与供体载体(PHS-AVC-LW230)按照1:1比例共转染PC-3细胞。转染2~3天后先用表达载体上的Bla抗性筛选(氨苄青霉素筛选浓度为6 $\mu\text{g}/\text{mL}$,处理6天),再用供体载体上的Puro抗性筛选(嘌呤霉素筛选浓度0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$,处理5天),设置未转染组作为阴性对照,两次筛选均造成阴性对照组细胞完全死亡。借助倒置荧光显微镜甄别筛选后剩余细胞,分离带绿色荧光标记细胞(供体载体上有hefla启动子和EYFP荧光基团,若二者整合到PC-3细胞基因组中则可以持续发绿色荧光)。

1.2.4 绿色荧光标记细胞增殖情况观察、Western blot及RTq-PCR检测 绿色荧光细胞增殖缓慢,且

逐渐出现细胞空泡化直至死亡,无法获得单克隆细胞。通过多次转染、富集后才能获得实验所需细胞量。检测带绿色荧光标记的PC-3细胞与野生型PC-3细胞(各3管,每管细胞量为6孔板1孔细胞汇合度90%)BLM蛋白表达,一抗为兔抗人BLM特异性抗体,二抗为山羊抗兔抗体。分别提取两株细胞总RNA,逆转录生成cDNA进行荧光定量PCR检测。利用Primer 5.0软件设计BLM引物,上游引物为:5'-CCA GCC TCC CAA AGG TCT AAG-3';下游引物为:5'-TGC TAT TGG CTC CTG ATG TCG-3',扩增片段为124 bp。内参选用 β -actin, β -actin上游引物为:5'-CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT-3';下游引物为:5'-AGC CTT CTC GAT GGT GGT GAA GAC-3',扩增片段为268 bp。扩增体系为:SYBR 10 μL ,上



A: BLM解旋酶CRISPR/Cas9表达载体骨架; B: 通过测序检测5个SgRNA已成功与表达载体骨架连接。

A: BLM helicase CRISPR/Cas9 expression vector was constructed by inserting SgRNA sequence into hU6-gRNA-CMV-cas9-2A-bla vector; B: it is proved by sequence analysis that SgRNA are correctly inserted into the expression vector.

图1 BLM解旋酶CRISPR/Cas9表达载体

Fig.1 The construction of BLM helicase CRISPR/Cas9 expression vector

游引物0.4 μL , 下游引物0.4 μL , cDNA 1.5 μL , 纯水 2.7 μL , Mix 5 μL 。扩增条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性10 s, 60.5 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸30 s, 共40个循环。每组设5个复孔, 实验重复3次以上。以 β -actin作为内参, 计算Ct均值, 应用相对定量法 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 进行分析。

1.2.5 统计分析 应用SPSS 19.0软件进行分析, 实验数据以 $\bar{x}\pm s$ (平均数 \pm 标准差)表示, 两组以上数据采用方差分析, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 合成载体测序及酶切验证

将设计好的5个SgRNA分别与表达载体骨架连接, 通过测序检测SgRNA是否正确插入, Cas9/SgRNA表达载体构建成功(图1)。5个表达载体分别转染PC-3细胞72 h后, 加氨苄青霉素调整浓度为6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 筛选一周, 待阴性对照组细胞完全死亡(Bla为表达载体骨架所带抗性, 可特异性切割氨苄青霉素的 β -内酰胺环), 阴性对照组为野生型PC-3细胞。筛选后剩余细胞提取基因组DNA。根据SgRNA对应基因片段上下游引物进行PCR扩增, 用T7核酸内切酶1(T7E1, 可识别并切割不完全配对DNA、十字型结构DNA、Holliday结构或交叉DNA、异源双链DNA, 以此检测CRISPR/Cas9形成的突变体)酶切检测, 以确定所设计的SgRNA活性(图2)。经过筛选, SgRNA4提取基因组DNA质量差无法进行后续实验, SgRNA3活

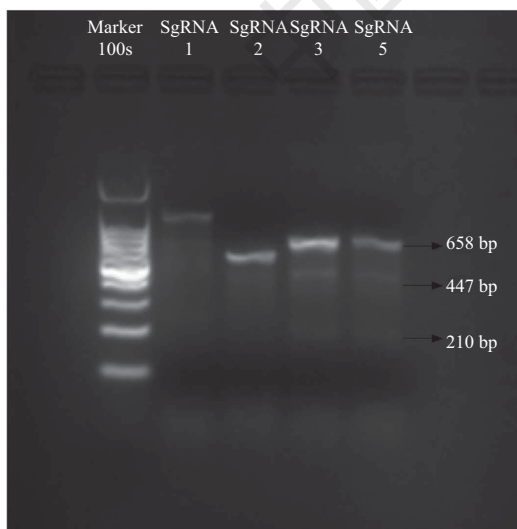


图2 T7E1酶切结果

Fig.2 The target efficiency analyzed by T7E1 enzyme digestion

性最强可根据其切口上下游序列设计左右同源臂与供体骨架连接, 同时通过测序明确插入位置正确, 供体载体构建成功(图3)。

2.2 转染及细胞筛选

将表达载体与供体载体共同转染PC-3细胞, 同时加入scr-7抑制DNA连接。转染48 h后, 先进行表达载体上的Bla抗性筛选(氨苄青霉素筛选浓度为6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 处理6天), 再进行供体载体上的Puro抗性筛选(嘌呤霉素筛选浓度0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 处理5天), 最后借助倒置荧光显微镜甄别筛选剩余细胞, 分离带绿色荧光标记细胞(图4)。因为供体载体上有hef1a启动子和EYFP荧光基因, 若二者整合到PC-3细胞基因组中则可以持续发绿色荧光, 将绿色荧光细胞标记为敲除BLM的PC-3细胞(BLM KO PC-3)。

2.3 Western blot及RTq-PCR检测

野生型PC-3细胞具有单克隆增殖能力, 细胞培养3周可以形成明显单克隆细胞团。对敲除BLM的PC-3细胞进行单克隆筛选发现, 该细胞失去单克隆增殖能力, 细胞增殖缓慢, 出现老化、空泡化, 逐渐死亡(图5)。由于无法获得单克隆细胞, 仅能通过反复转染扩大转染体系获得足够数量的敲除BLM的PC-3细胞。利用全自动蛋白印迹分析系统(Western blot)检测敲除BLM的PC-3细胞与野生型PC-3细胞BLM解旋酶蛋白质水平变化情况。结果发现, 与野生型PC-3细胞比较, 敲除BLM的PC-3细胞BLM解旋酶表达水平明显下调(图6)。提取敲除BLM的PC-3

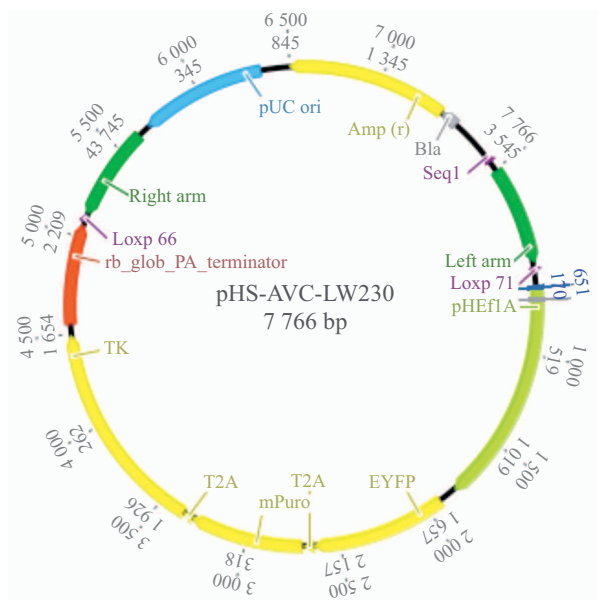
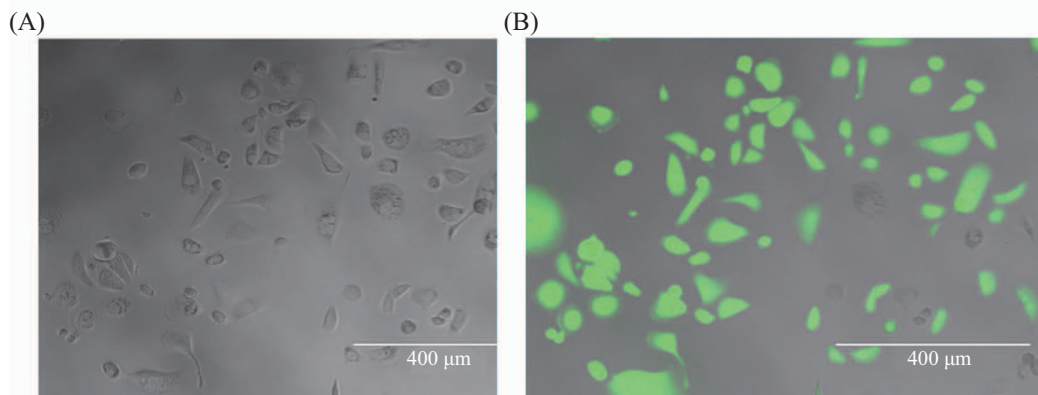


图3 BLM解旋酶CRISPR/Cas9供体载体

Fig.3 The construction of BLM CRISPR/Cas9 donor vector



A: 普通显微镜下筛选出的PC-3细胞; B: 荧光显微镜下筛选出的PC-3细胞。

A: PC-3 cells observed by normal microscope; B: PC-3 cells observed by the fluorescence microscope.

图4 荧光显微镜下筛选出的绿色荧光标记PC-3细胞

Fig.4 PC-3 cells transfected with both BLM CRISPR/Cas9 expression vector and donor vector observed by fluorescence microscope

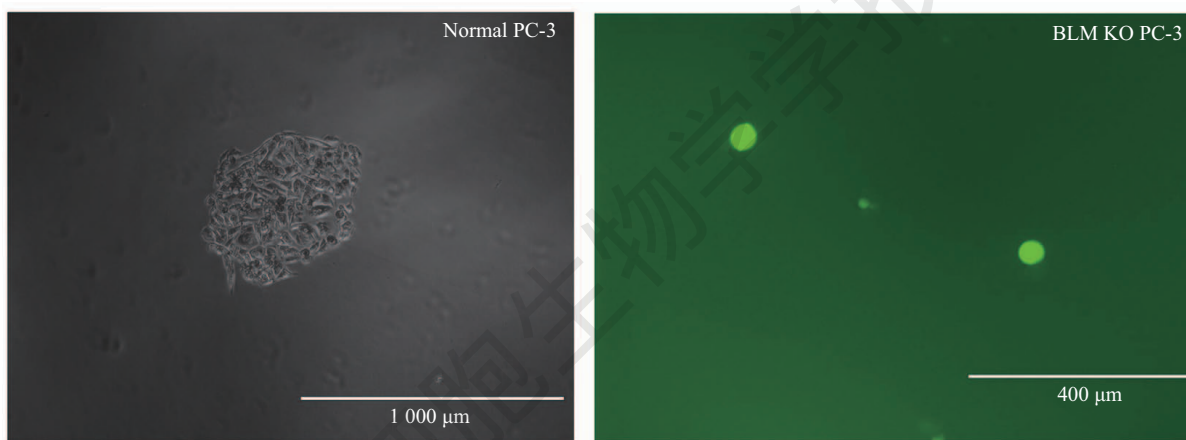
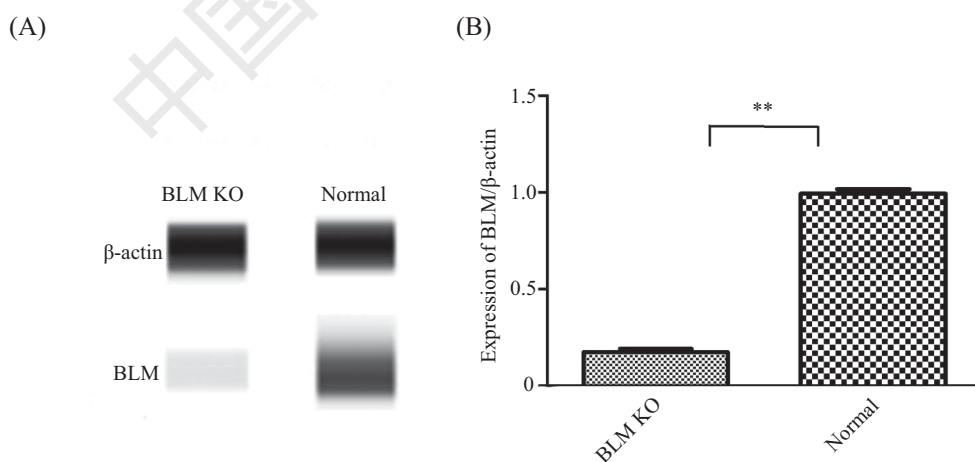


图5 PC-3细胞单克隆培养3周后结果

Fig.5 Monoclonal PC-3 cell clustered for 3 weeks

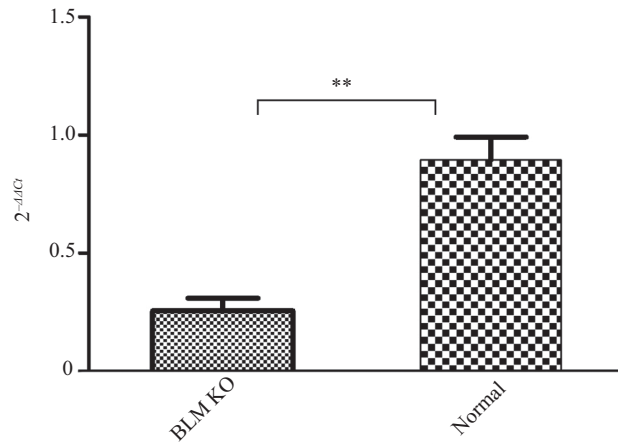


A: 利用全自动蛋白质印迹定量分析系统检测不同PC-3细胞中BLM解旋酶的表达量, 条带的深浅表示蛋白表达量的水平; B: BLM敲除的PC-3细胞与正常PC-3细胞比较BLM解旋酶表达量显著下调, $**P < 0.01$ 。

A: expression of BLM helicase in different PC-3 cells. Simple Western lane view with the results automatically generated by the WES system software. The thickness and darkness of the band reflects the expression level of the protein. A significant decrease was observed in the BLM/β-actin ratio in the BLM KO PC-3, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$.

图6 在PC-3细胞中BLM解旋酶的表达

Fig.6 Expression of BLM helicase in PC-3 cells



** $P < 0.01$.

图7 PC-3细胞中BLM解旋酶mRNA表达水平

Fig.7 Expression of *BLM* helicase gene mRNA in PC-3 cells

细胞与野生型PC-3细胞总RNA, 逆转录成cDNA后行RTq-PCR检测。结果发现, 敲除BLM的PC-3细胞中BLM解旋酶mRNA相对表达量 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 为 0.26 ± 0.05 , 野生型PC-3细胞中 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 为 0.89 ± 0.10 ; BLM解旋酶mRNA水平明显下降, 基因敲除的效率为71%, 差异具有显著性($P < 0.05$)(图7)。

3 讨论

RecQ解旋酶在促进细胞的核酸代谢方面有着重要作用, 且该作用贯穿复制、重组、修复及转录全程。BLM解旋酶作为RecQ解旋酶家族中的一员在维持基因组稳定性上也发挥重要作用。BLM解旋酶缺陷会引起Bloom综合征(Bloom syndrome, BS, 一种隐性常染色体遗传疾病)。BS病人易患前列腺癌、肺癌等恶性肿瘤^[11-12]。有研究发现, RecQ解旋酶在肿瘤细胞中高表达, WRN解旋酶(Werner syndrome RecQ like helicase)也是RecQ家族成员, 通过RNAi干扰技术沉默肿瘤细胞中特定WRN基因, 可达到治疗肿瘤的目的^[13-15]。BLM解旋酶在乳腺癌中高表达, 可以作为新颖的乳腺癌生物标记物^[16]。同时, 研究已证实, BLM解旋酶基因与中国人群前列腺癌的易感性相关^[17]。在人A549肺癌细胞、SGC7901胃癌细胞及PC-3前列腺癌细胞中, BLM解旋酶的表达量均高于正常细胞^[18], 同时, 通过RNAi干扰的方法进一步证明, BLM的低表达严重影响了PC-3细胞增殖, 说明BLM解旋酶对癌细胞的增殖具有一定作用^[19-20]。所以将BLM解旋酶作为治疗前列腺癌的靶点越来越受到科研工作者的关注^[21-22]。

本研究采用CRISPA/Cas9介导的同源重组基因编辑技术, 以BLM解旋酶基因为靶基因, 通过T7E1酶切验证活性最强的SgRNA3表达载体并设计相应的供体载体, 应用脂质体将双载体转入前列腺癌PC-3细胞中。Western blot实验结果证明, 通过对带阳性标记的细胞筛选分离BLM解旋酶表达明显下调。同时对阳性标记细胞进行增殖观察发现, 细胞失去单克隆增殖能力, 细胞增殖缓慢, 出现老化、空泡化, 逐渐死亡。使用RNAi干扰技术敲减BLM基因后的PC-3细胞增殖、迁移及侵袭能力受到抑制, 同时对丝裂霉素C敏感性增加^[19-20]。使用CRISPA/Cas9介导的同源重组基因编辑技术敲除BLM基因后, PC-3细胞丧失增殖能力, 然后逐渐死亡。RNAi干扰技术是对BLM基因敲减, 而CRISPA/Cas9同源重组基因编辑技术是对BLM基因的敲除, 两者对BLM基因的影响程度不同。该结果不仅为BLM解旋酶靶向治疗前列腺癌的研究奠定了良好的实验基础, 还为后续BLM解旋酶影响前列腺癌增殖机理的研究提供了宝贵的实验材料。

参考文献 (References)

- Kovac JR, Pan MM, Lipshultz LI, Lamb DJ. Current state of practice regarding testosterone supplementation therapy in men with prostate cancer. *Steroids* 2014; 89: 27-32.
- 韩苏军, 张思维, 陈万青, 李长岭. 中国前列腺癌发病现状和流行趋势分析. *临床肿瘤学杂志*(Han Sujun, Zhang Siwei, Chen Wangqing, Li Changling. Analysis of the status and trends of prostate cancer incidence in China. *Chinese Clinical Oncology*) 2013; 18(4): 330-4.
- Gokce MI, Wang X, Frost J, Roberson P, Volk RJ, Brooks D, et al. Pettaway CA. Informed decision making before prostate-

- specific antigen screening: initial results using the American Cancer Society (ACS) Decision Aid (DA) among medically underserved men. *Cancer* 2017; 123(4): 583-91.
- 4 沈棋, 胡帅, 李俊, 王静华, 何群. 膀胱前列腺切除术中前列腺偶发癌发生率及临床病理特点分析. *北京大学学报(医学版)* [Shen Qi, Hu Shuai, Li Jun, Wang Jinghua, He Qun. Incidence and clinicopathological characteristics of incidental prostatic adenocarcinoma in radical cystoprostatectomy specimens. *Journal of Peking University (Health Sciences)*] 2014; 46(4): 515-8.
- 5 Huang JD, Zheng BJ, Sun HZ. Helicases as antiviral drug targets. *Hong Kong Med J* 2008; 14 Suppl 4: 36-8.
- 6 Gupta R, Brosh RM Jr. Helicases as prospective targets for anti-cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem* 2008; 8(4): 390-401.
- 7 Amor-Gueret M, Dubois-d'Enghien C, Lauge A, Onclercq-Delic R, Barakat A, Chadli E, *et al.* Three new BLM gene mutations associated with Bloom syndrome. *Genet Test* 2008; 12(2): 257-61.
- 8 Ben Salah G, Salem IH, Masmoudi A, Ben Rhouma B, Turki H, Fakhfakh F, *et al.* Chromosomal instability associated with a novel BLM frameshift mutation (c.1980-1982delAA) in two unrelated Tunisian families with Bloom syndrome. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2014; 28(10): 1318-23.
- 9 Antczak A, Kluzniak W, Wokolorczyk D, Kashyap A, Jakubowska A, Gronwald J, *et al.* A common nonsense mutation of the BLM gene and prostate cancer risk and survival. *Gene* 2013; 532(2): 173-6.
- 10 Haeussler M, Schonig K, Eckert H, Eschstruth A, Mianne J, Renaud JB, *et al.* Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR. *Genome Biol* 2016; 17(1): 148.
- 11 Wang J, Chen J, Gong Z. TopBP1 controls BLM protein level to maintain genome stability. *Mol Cell* 2013; 52(5): 667-78.
- 12 Manthei KA, Keck JL. The BLM dissolvosome in DNA replication and repair. *Cell Mol Life Sci* 2013; 70(21): 4067-84.
- 13 Grandori C, Robinson KL, Galloway DA, Swisshelm K. Functional link between Myc and the Werner gene in tumorigenesis. *Cell Cycle* 2004; 3(1): 22-5.
- 14 Van Maldergem L, Siitonen HA, Jalkh N, Chouery E, De Roy M, Delague V, *et al.* Revisiting the craniosynostosis-radial ray hypoplasia association: Baller-Gerold syndrome caused by mutations in the RECQL4 gene. *J Med Genet* 2006; 43(2): 148-52.
- 15 Bagley MC, Dwyer JE, Baashen M, Dix MC, Murziani PG, Rokicki MJ, *et al.* The effect of RO3201195 and a pyrazolyl ketone P38 MAPK inhibitor library on the proliferation of Werner syndrome cells. *Org Biomol Chem* 2016; 14(3): 947-56.
- 16 Arora A, Abdel-Fatah TM, Agarwal D, Doherty R, Moseley PM, Aleskandarany MA, *et al.* Transcriptomic and protein expression analysis reveals clinicopathological significance of bloom syndrome helicase (BLM) in breast cancer. *Mol Cancer Ther* 2015; 14(4): 1057-65.
- 17 Wang Q, Lv H, Lv W, Shi M, Zhang M, Luan M, *et al.* Genome-wide haplotype association study identifies BLM as a risk gene for prostate cancer in Chinese population. *Tumour Biol* 2015; 36(4): 2703-7.
- 18 孟惠惠, 许厚强, 刘金河, 王时雄. 三种癌细胞株中Bloom综合征解旋酶(BLM)的表达水平高于正常细胞. *细胞与分子免疫学杂志*(Meng Huihui, Xu Houqiang, Liu Jinhe, Wang Shixiong. The expression level of Bloom syndrome helicase (BLM) in three cancer cells was higher than normal cells. *Chin J Cell Mol Immunol*) 2014; 30(6): 649-51.
- 19 吴萍, 许厚强, 赵佳福, 刘忠伟, 段志强, 陈福, 等. 敲减BLM解旋酶表达增强前列腺癌PC3细胞对丝裂霉素C的敏感性. *中国生物化学与分子生物学报*(Wu Ping, Xu Houqiang, Zhao Jiafu, Liu Zhongwei, Duan Zhiqiang, Chen Fu, *et al.* Knockdown of BLM Helicase Promotes the sensitivity of prostate cancer PC3 cells to mitomycin C. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*) 2017; 33(2): 190-7.
- 20 罗霖蕾, 许厚强, 刘忠伟, 段志强, 赵佳福, 吴萍, 等. 人前列腺癌PC3细胞Bloom解旋酶基因干扰载体的构建. *中国细胞生物学学报*(Luo Lina, Xu Houqiang, Liu Zhongwei, Duan Zhiqiang, Zhao Jiafu, Wu Ping, *et al.* Construction of RNAi vectors for RNA interference of bloom helicase gene in human prostate cancer PC3 cells. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2015; 37(11): 1497-502.
- 21 Sharma S, Doherty KM, Brosh RM Jr. DNA helicases as targets for anti-cancer drugs. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2005; 5(3): 183-99.
- 22 Tripathi V, Kaur S, Sengupta S. Phosphorylation-dependent interactions of BLM and 53BP1 are required for their anti-recombinogenic roles during homologous recombination. *Carcinogenesis* 2008; 29(1): 52-61.