

中国肝癌病人 p53 突变体 R248W 的 细胞功能研究

赵 晶, 郭泽坤

(西北农林科技大学 生命科学学院, 农业分子生物学重点实验室, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] **【目的】**探索 p53 基因突变对细胞正常功能的影响, 阐明肝癌的发病机制。**【方法】**利用 PCR 产物直接测序的方法, 对 202 例中国肝癌患者 p53 基因的 11 个外显子进行突变筛查; 利用定点突变的方法构建真核表达载体 pCMV-R248W, Western blot 检测突变体蛋白 R248W 在 p53 缺失型 H1299 细胞中的表达情况; 采用双荧光素酶报告基因检测系统和流式细胞仪, 研究 R248W 突变对转录活性及促凋亡能力的影响。**【结果】**在其中 1 例样本的 7 号外显子处筛查到突变形式为 CGG→TGG 的点突变, 使 p53 蛋白 248 位的精氨酸(Arg)突变为色氨酸(Trp), 即 R248W, 突变率为 0.495%; 在 H1299 细胞中转染等量的 pCMV-p53 和 pCMV-R248W 时, 野生型 p53 与突变体 R248W 的蛋白表达量相当, 但 R248W 的转录活性及促凋亡能力显著低于野生型 p53。**【结论】**R248W 突变可能引起 p53 蛋白构象的改变, 从而影响 p53 的转录活性及促凋亡能力, 使细胞的正常生理功能紊乱, 导致肿瘤发生。

[关键词] p53; 突变; Western blot; 转录活性; 凋亡

[中图分类号] Q279

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2008)10-0186-07

The cytological function study on a p53 mutant, R248W, in Chinese Hepatocellular Carcinoma

ZHAO Jing, GUO Ze-kun

(Key Laboratory for Molecular Biology of Agriculture, College of Life Sciences, Northwest A&F
University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】** The study investigated the effect of p53 gene mutation on the normal cellular function and further revealed the pathological mechanism of Hepatocellular carcinoma (HCC). **【Method】** 11 exons of p53 gene were amplified by polymerase chain reaction (PCR) in 202 Chinese HCC patients, and the mutations were detected by direct DNA sequencing; the expression plasmid pCMV-R248W was constructed by site-direct mutagenesis; and the protein expression, the transcriptional activity and the inducing apoptosis ability were respectively investigated by Western blot, Dual Luciferase assay and Flow Cytometry. **【Result】** A missense mutation R248W (CGG→TGG), in exon 7 codon 248 of p53 gene was identified in one of the 202 Chinese HCC samples, and the mutation rate was 0.495%. Western blot analysis showed that the p53-null cell line H1299 with equal recombinant pCMV-p53 and pCMV-R248W transfection nearly had the equal protein expression level, however R248W transcriptional activity and the inducing apoptosis ability fell significantly compared with the wild type p53. **【Conclusion】** The R248W mutant in Chinese

* [收稿日期] 2007-10-29

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (30024001)

[作者简介] 赵 晶 (1982—), 女, 黑龙江鸡西人, 在读硕士, 主要从事生物化学与分子生物学研究。E-mail: xnzhaojing@126.com

[通讯作者] 郭泽坤 (1969—), 男, 黑龙江齐齐哈尔人, 副教授, 硕士生导师, 主要从事肿瘤发生分子机制研究。
E-mail: gzk@nwsuaf.edu.cn

HCC may change the p53's structure, which may affect p53's transcriptional activity and the inducing apoptosis ability. As a result, the normal cytological function is severely impaired, leading to the tumorigenesis.

Key words: p53; mutation; Western blot; transcriptional activity; apoptosis

肝癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)是全世界最高发的恶性肿瘤之一。在我国, HCC 是威胁人们生命健康的第二大恶性肿瘤“杀手”, 其发病率呈上升趋势。p53 基因是迄今为止发现的与人类肿瘤相关性最高的基因, 约半数以上的人类肿瘤存在 p53 基因的突变。作为细胞应激的关键性调控因子, p53 能够整合多种细胞危急事件信号, 通过转录或非转录途径对这些信号作出包括生长抑制及凋亡在内的不同反应, 监视细胞基因组的完整性。p53 突变会影响 p53 蛋白对靶基因或靶蛋白特定结合部位的识别, 使其不能发挥对生长的调控作用^[1-3]。本研究对 202 例中国肝癌病理组织样本的 p53 基因进行突变筛查, 并对在 7 号外显子处筛查到的突变体 R248W 进行转录活性及促凋亡能力的研究。Mal-kin 等^[4]曾在 Li-Fraumeni 综合症(LFS) 家系的研究中报道过 p53 的 R248W 突变, 但在中国肝癌研究中还未见有关该突变的报道。本研究将进一步丰富在中国肝癌中对 p53 突变的研究, 并将深入了解 p53 突变对细胞正常功能的影响, 为阐明肝癌的发病机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织样本 本试验所用的 202 例肝癌组织样本, 122 例由复旦大学附属中山医院肝癌研究所提供, 65 例由江苏启东肝癌防治研究所提供, 其他 15 例由河南省洛阳市中心医院提供。

1.1.2 试剂与仪器 DH5 α 菌株、JM109 感受态菌和 H1299 细胞来源于复旦大学人类新基因研究实验室, 组织总 DNA 抽提试剂盒购于上海华舜生物工程有限公司, PCR 扩增试剂盒、信号通路试剂盒购于上海 Promega 公司, PCR 产物纯化试剂盒购于 Boehringer 公司, 使用 STRATAGENE 公司的 Site-directed Gene Mutagenesis Kit 进行定点突变, 细胞培养液及胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料公司, 用 Invitrogen 脂质体转染试剂盒进行细胞瞬时转染, 鼠抗 p53 单克隆抗体(DO1)购于 SAN-TA CRUZ 公司, 细胞凋亡试剂盒购于 Pharmingen 公司, 用 Berthod 公司的 Luminometer LB9507 测

定信号通路, 用 Becton Dickinson 公司的流式细胞仪(FCM)检测细胞凋亡情况, 所用引物均由上海博亚生物技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 组织 DNA 的提取 从肝癌及相应的癌旁组织中各取 0.1 g 样本, 用组织捣碎棒将其彻底捣碎, 然后按上海华舜生物工程有限公司生产的组织 DNA 提取试剂盒说明书进行操作, 将得到的基因组 DNA 进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.2.2 p53 突变体 R248W 的筛查 针对 p53 基因的 7 号外显子设计引物, 利用 PCR 进行扩增。7 号外显子扩增引物为: p53-7F: 5'-CAA GGC GCA CTG GCC TCA TCT TG-3' 和 p53-7R: 5'-AAC TGA GTG GGA GCA GTA AGG AG-3'。PCR 反应体系(50 μ L)为: 1 $\times$ Buffer, 5 mmol dNTP, 各引物 10 pmol, 2 mmol MgCl₂, 0.8 U *Taq* DNA 聚合酶, 500 ng 基因组 DNA。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 50 s, 循环 35 次; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物经试剂盒纯化后测序, 测序结果利用 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>网站的 blast 软件进行比对分析。

1.2.3 pCMV-p53 及 pCMV-R248W 真核表达载体的构建与鉴定 (1)pCMV-p53 载体的构建与鉴定。在人肝 cDNA 文库中, 以含 *EcoR* I 酶切位点的引物 p53-A(5'-GAA TTC CCA TGG AGG AGC CGC AGT CAG ATC C-3')和含 *Xho* I 酶切位点的引物 p53-B(5'-CTC GAG TCA GGC CCT TCT GTC TTG AAC ATG-3')进行 PCR 扩增。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 62 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 循环 35 次; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。将扩增所得的 p53 全长表达序列纯化定量后, 进行 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切, 与经过同样双酶切的 pCMV 载体连接, 转化 JM109 感受态菌株, 涂布 LB-Ampr 平板, 抽提质粒, 进行 *EcoR* I / *Xho* I 双酶切鉴定并测序验证。

(2)pCMV-R248W 真核表达载体的构建与鉴定。以 pCMV-p53 为模板, 定点突变引物分别为 R248W-A (5'-TCC TGC ATG GGC GGC ATG

AAC TGG AGG CCC ATC CTC ACC ATC ATC ACA-3') 和 R248W-B (5'-TGT GAT GAT GGT GAG GAT GGG CCT CCA GTT CAT GCC GCC CAT GCA GGA-3')。PCR 反应条件为:94 ℃预变性 4 min;94 ℃变性 40 s,55 ℃退火 1 min ,68 ℃延伸 11 min,循环 12 次;最后 72 ℃延伸 10 min。PCR 产物为在突变位点带有缺口的环形 pCMV-p53 质粒和甲基化的环形 pCMV-p53 质粒,加入 *Dn*p1 将甲基化的环形模板质粒 pCMV-p53 降解。将带有缺口的点突变环形质粒 pCMV-R248W 转化 DH5 α 感受态菌株,利用宿主菌的修复系统将缺口修复,涂布 LB-Amp^r 平板,抽提质粒并测序验证。

1.2.4 细胞培养 本试验所采用的 H1299 细胞为 p53 缺失型的非小细胞肺癌细胞,其生长特性为贴壁生长。所用细胞培养基即完全培养基(1640 培养基中含有 100 mL/L 小牛血清,4.5 g/L 葡萄糖,1 mmol/L 丙酮酸钠及 10 mmol/L HEPES)。

1.2.5 Western blot 检测 将 H1299 细胞接种于 24 孔板,各孔分别转染 20 ng pCMV 空载体、pCMV-p53 或 pCMV-R248W。转染 48 h 后,取等量细胞裂解液样品进行 Western blot 检测。以广泛分布于胞浆且表达量丰富的 β -actin 作为内参,指示目的蛋白 p53 及突变体 R248W 表达量的相对变化。电泳所用的分离胶质量浓度为 120 g/L。湿电转移法在 4 ℃、电压 100 V 条件下,将蛋白转至硝酸纤维素膜,室温下封闭 1 h 后,加入用封闭液按 1:1 000 稀释的鼠抗 p53 单克隆抗体 DO1,室温下孵育 2 h,加入用封闭液按 1:5 000 稀释的羊抗鼠二抗孵育 1 h。用化学发光法显色,暗房中显影、定影。

1.2.6 转录活性的检测 分别取 8.0×10^4 个 H1299 细胞接种于 24 孔细胞培养板,每孔转染 100 ng 报告质粒 p53-TA-Luc(该质粒的启动子区含有 p53 特异识别并结合的靶序列:2 拷贝的 50-PuPu-PuC(A/T)(T/A)GPyPyPy-30,中间被 0~13 bp 隔开)或 p21 启动子荧光报告质粒,20 ng 目的质粒(包括 pCMV 空载体、pCMV-p53 或 pCMV-R248W),30 ng pRL-SV40 内参质粒。每种目的质粒 4 个重复。转染后 5 h 换成无血清的完全培养基,培养 48 h 后收细胞,用 2 mL 预冷的 1 $\times$ PBS 洗 1 次,每孔加入 120 μ L 细胞裂解液,冰上裂解细胞 20 min,测定荧光强度。测定时先泵入 25 μ L LAR II Reagent 测定萤火虫荧光,完成试验报告基因的检测;再泵入 Stop&Glo Reagent 淬灭萤火虫荧光,并同时激活海肾荧光素酶的荧光反应,完成对照报告基因的活

性检测;最后,检测系统综合 2 个检测结果,对来自转染细胞裂解液中共同表达的 2 个报告基因快速地提供定量结果,数据采用 *t*-test 软件进行分析。

1.2.7 细胞凋亡的检测 取 4×10^5 个 H1299 细胞接种于 60 mm 培养皿,分别共转阳性质粒 pBB14-GFP 0.3 μ g/皿和目的质粒(包括 pCMV 空载体、pCMV-p53 或 pCMV-R248W)3 μ g/皿,每种目的质粒 4 个重复,CO₂ 培养箱内培养 24 h。将细胞培养基和细胞一起收集到细胞离心管中,1 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,用 2 mL 预冷的 PBS 洗 2 次,1 000 r/min 离心 10 min,弃上清液;细胞用 100 μ L 1 $\times$ Binding Buffer 重悬,避光下依次加入 5 μ L Annexin V-PE,10 μ L 7-ADD 轻轻混匀,室温暗处标记 15 min 后用 FCM 检测细胞凋亡情况,统计凋亡细胞比例。

2 结果与分析

2.1 p53 基因 7 号外显子的扩增

利用引物 p53-7F 和 p53-7R,对 202 例中国 HCC 患者的癌组织及相应癌旁组织的 p53 基因 7 号外显子进行 PCR 扩增。结果显示,扩增片段长度约为 300 bp(图 1),与预期的 302 bp 相符,且无非特异扩增现象。

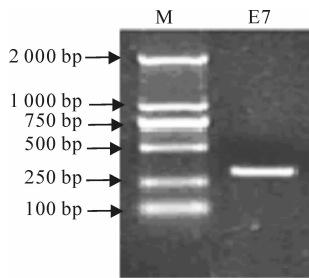


图 1 p53 基因 7 号外显子 PCR 扩增产物电泳图
M. DNA 标样;E7. p53 基因 7 号外显子的 PCR 扩增产物
Fig. 1 Amplification of p53 gene exon 7 by PCR
M. DL 2000 Marker;E7. PCR product of p53 gene exon 7

2.2 p53 突变体 R248W 的筛查

对 p53 基因 7 号外显子的 PCR 产物测序分析发现,其中 1 例肝癌组织样本的 7 号外显子处存在错义点突变,突变形式正向(图 2A)为:CGG $\rightarrow$ TGG,反向(图 2B)为:CCG $\rightarrow$ CCA,该突变使 p53 蛋白 248 位的氨基酸由 Arg 突变为 Trp,即 R248W,突变率为 0.495%。但在其相应的癌旁组织中未检测到该突变(图 2C 和 2D)。图 2E 和 2F 分别为 p53 基因 7 号外显子与 GenBank 中野生型

p53 的正向和反向 Blast 比对结果,证实突变发生在 Trp。
p53 蛋白的 248 位氨基酸处,突变形式为 Arg→

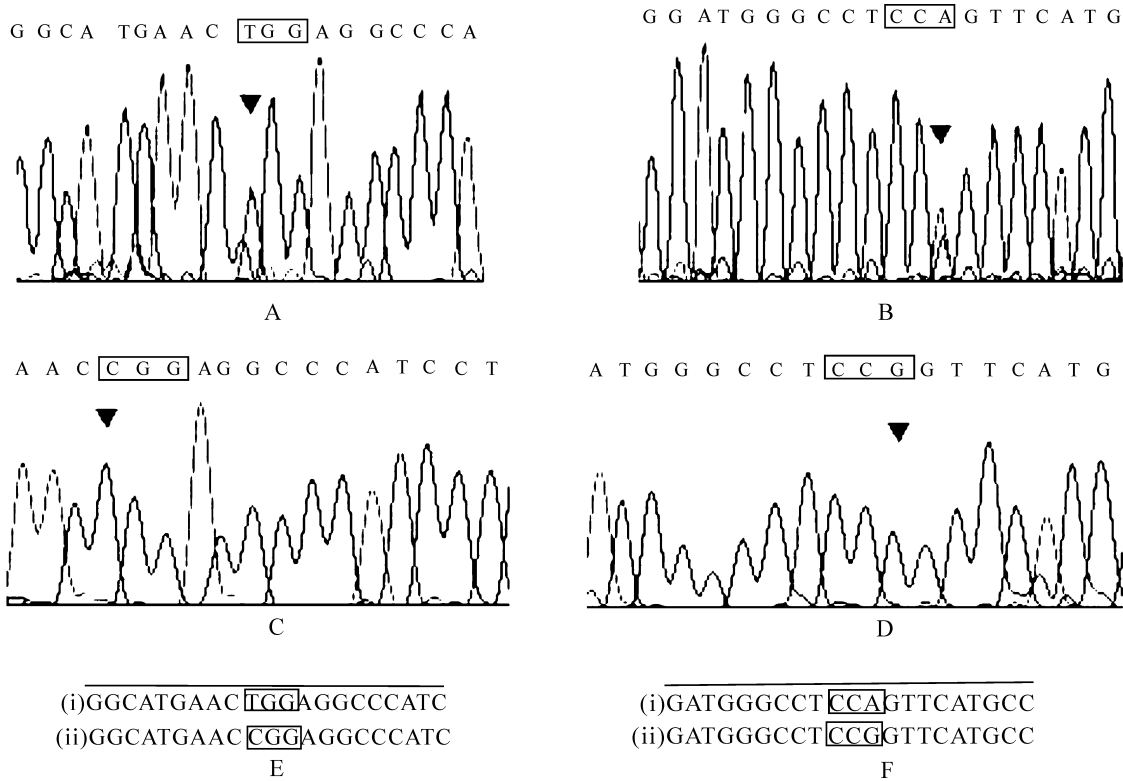


图 2 p53 基因 7 号外显子的突变筛查

A. 癌组织中 p53 蛋白第 248 位密码子正向由 CGG 突变为 TGG;B. 癌组织中 p53 蛋白第 248 位密码子反向由 CCG 突变为 CCA;C. 癌旁组织中 p53 蛋白第 248 位密码子正向为 CGG;D. 癌旁组织中 p53 蛋白第 248 位密码子反向为 CCG;E. 正向 Blast 比对结果((i)为 p53 基因 7 号外显子正向测序结果,(ii)为 GenBank(gi|35213)野生型 p53 正向序列,p53 蛋白第 248 位密码子正向由 CGG 突变为 TGG); F. 反向 Blast 比对结果((i)为 p53 基因外显子反向测序结果,(ii)为 GenBank(gi|35213)野生型 p53 反向序列,p53 蛋白第 248 位密码子反向由 CCG 突变为 CCA)。箭头所指为突变碱基;方框内为突变密码子

Fig. 2 The mutation detection of p53 gene exon 7

A. The forward codon 248 of p53 changed from CGG to TGG in the malignant tissue;B. The reverse codon 248 of p53 changed from CCG to CCA in the malignant tissue;C. The forward codon 248 of p53 was CGG in the nonmalignant tissue;D. The reverse codon 248 of p53 was CCG in the nonmalignant tissue;E. The forward Blast analysis ((i) was the forward sequence of p53 gene exon 7 in the malignant tissue and (ii) was the p53 sequence from GenBank(gi|35213),the forward codon 248 of p53 changed from CGG to TGG in the malignant tissue);F. The reverse Blast analysis;((i) was the reverse sequence of p53 gene exon 7 in the malignant tissue and (ii) was the p53 sequence from GenBank(gi|35213),the reverse codon 248 of p53 changed from CCG to CCA in the malignant tissue); The arrow pointed the transition mutation;The frame showed the changed codon

2.3 突变体 R248W 的真核表达载体构建

从人肝 cDNA 文库中扩增野生型 p53 基因,并将其克隆在真核表达载体 pCMV 中,经测序验证,野生型 p53 基因长度为 1 179 bp。
以 pCMV-p53 为模板,利用定点突变引物 R248W-A 和 R248W-B 进行扩增,构建突变体 R248W 的真核表达载体 pCMV-R248W,测序验证结果见图 3。由图 3 可知,野生型 p53 的 248 位密码子由 CGG 突变为 TGG。

2.4 突变体 R248W 在 H1299 细胞中的表达

为研究突变体 R248W 蛋白在细胞中的表达情况,分别取转染 pCMV 空载体、pCMV-p53、pCMV-R248W 质粒的 H1299 细胞裂解液,进行 Western Blot 检测。结果(图 4)显示,在 p53 缺陷型的 H1299 细胞中,野生型 p53 和突变体 R248W 均可表达,且在等量转染条件下,蛋白表达量相当。因此排除了突变体 R248W 与野生型 p53 由于蛋白表达水平的差异,而产生的对细胞功能影响的不同。

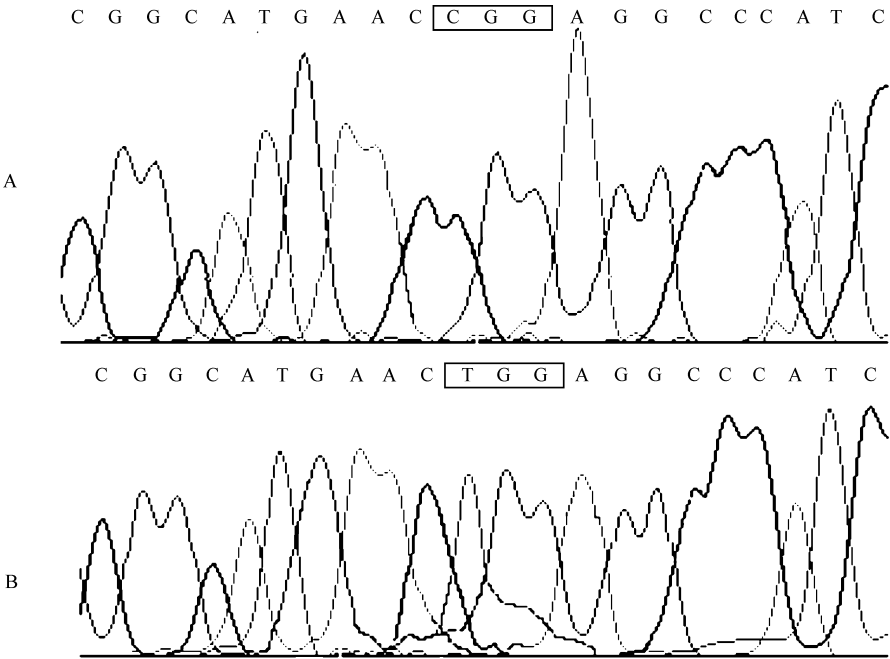


图 3 定点突变体 R248W 的测序结果

A. 在质粒 pCMV-p53 中,第 248 位密码子为方框内 CGG;B. 在质粒 pCMV-R248W 中,第 248 位密码子突变为方框内的 TGG

Fig. 3 Sequencing verification of the R248W mutant

A. The codon 248 was CGG in the frame in the plasmid pCMV-p53;B. The codon 248 was changed into TGG in the frame in the plasmid pCMV-R248W

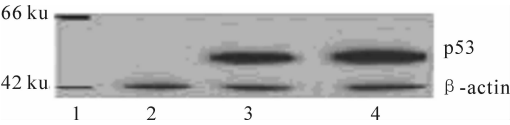


图 4 Western Blot 检测 pCMV-p53,pCMV-R248W 在 H1299 细胞中的表达

1. 低分子量蛋白 Marker;2~4. 分别为转染 pCMV 空载体、pCMV-p53、pCMV-R248W 质粒的细胞裂解液

Fig. 4 Expression of pCMV-p53 and pCMV-R248W protein by Western Blot in the H1299 cells

1. Protein marker;2-4. The H1299 cells were transfected respectively with the pCMV empty-plasmid,pCMV-p53 and pCMV-R248W

2. 5 突变体 R248W 对转录活性的影响

p53 作为转录因子,通过多种方式参与对下游基因的转录激活。为了研究突变是否影响其转录激活功能,在 p53 缺失型的 H1299 细胞中,对 R248W 突变体进行了 p53-Luc-TA 质粒、p21 启动子荧光报告质粒的转录活性测定,并将结果采用 *t*-test 软件进行分析,结果见图 5。

由图 5 可知,与野生型 p53 相比,R248W 突变对报告质粒 pP53-TA-Luc 和 p21 启动子几乎丧失了转录激活作用。

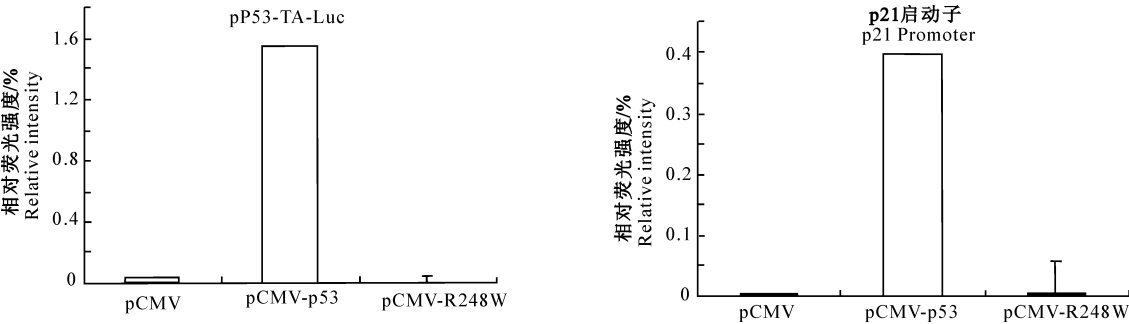


图 5 突变体 R248W 对 p53-Luc-TA 质粒和 p21 启动子荧光报告质粒的相对荧光强度

Fig. 5 Relative fluorescence intensity assay of the pP53-TA-Luc and p21-promoter luciferase reporter plasmid activated by the R248W mutant

2.6 R248W 突变丧失对细胞凋亡的影响

采用流式细胞仪测定突变体 R248W 促细胞凋亡的能力,结果见图 6。由图 6 可知,与野生型 p53 相比,突变体 R248W 促凋亡能力极显著降低($P<0.01$),野生型 p53 的凋亡细胞比例约为 19.08%,而突变体 R248W 的凋亡细胞比例仅为 2.04%。

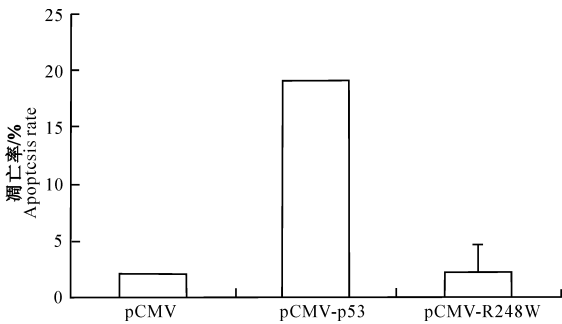


图 6 突变体 R248W 对细胞凋亡的影响
Fig.6 Effect of the R248W mutant on the apoptosis assay

3 讨论

正常 p53 功能的改变或缺失与不同种类的人类肿瘤有密切关系,因此 p53 基因的突变和失活成为其与肿瘤相关的研究热点^[1-3]。Malkin 等^[4]究了 5 个 Li-Fraumeni 综合征(LFS)家系,发现有 2 个家系存在 R248W 突变;此外,该突变在乳腺癌、胃癌、肺癌、卵巢癌中曾被大量报道^[5-9],但在中国 HCC 研究中,未见有关 R248W 突变的相关报道。本研究采用 PCR 扩增产物直接测序法,对 202 例中国 HCC 病人进行 p53 基因突变筛查,在其中 1 例样本中发现 R248W 点突变,该突变丰富了对中国肝癌患者 p53 基因突变的研究。

p53 作为转录因子,可以形成四聚体与目的基因启动子区的特异 DNA 序列结合。当细胞受到压力时,p53 可以转录激活与 DNA 修复、细胞周期、细胞凋亡相关的多种下游基因的转录,用以维持基因组的完整性。当 DNA 损伤时,p53 可以激活目的基因 p21^{WAF}的表达。p21^{WAF}编码蛋白是一个依赖 Cyclin 的蛋白激酶抑制剂,可以与一系列 Cyclin-cdk 复合物结合,如 Cyclin E-cdk2 等,抑制相应的蛋白激酶活性,使 E2F 转录调节因子不能活化,引起 G1 期阻滞,从而为受损 DNA 的修复赢得时间;对于损伤不能被正确修复的细胞,p53 将启动对细胞的凋亡程序^[10-14]。现有的研究认为,p53 可以通过依赖转录和不依赖转录两种途径来调节细胞凋亡,p53 作为转录因子可以转录激活促凋亡基因 *bax*、

apaf-1、*cd95/fas/apo1*、*pigs* 等的转录,同时 p53 可以抑制抗凋亡基因 *bcl-2* 的转录,诱导细胞色素 C 的释放,促进细胞凋亡。研究表明,p53 的 DNA 结合结构域还可以直接与 BclXL、Bcl2 相互作用形成复合体,定位在线粒体外膜,促使线粒体外膜透化、细胞色素 C 释放,诱导细胞凋亡^[15-19]。

本试验研究了突变体 R248W 对细胞功能的影响,结果表明,突变体 R248W 对报告质粒 pP53-TA-Luc 和 p21 启动子几乎丧失转录激活作用,且 R248W 突变的促凋亡能力显著降低,这与 Kakudo 等^[15]在酵母及 saos-2 细胞中研究 R248W 突变对 p21 启动子的转录活性及促凋亡能力的结果一致。本试验的 Western Blot 检测结果表明,野生型 p53 和突变体 R248W 在等量转染条件下蛋白表达量相当,说明突变体 R248W 对细胞功能的影响可能是突变本身所致,而与蛋白表达水平无关。

对不同 p53 突变体的分子动力学研究表明,有些突变会使 p53 的 DNA 结合面原有的功能构象全部丧失,有的甚至会使核心区 β -片层结构形成的三明治骨架系统发生散解,核心区原有的疏水核心松散暴露,使整个 p53 核心区正常构象趋于解体^[20-22]。野生型 p53 的 248 位氨基酸为 Arg,Arg 的胍基与 DNA 双螺旋小沟内碱基形成的氢键对 p53 与 DNA 的结合至关重要。当 Arg 突变为 Trp 后,一方面可能破坏 p53 蛋白与 DNA 碱基形成的氢键;另一方面由于 Trp 侧链的吲哚环会比 Arg 侧链的胍基产生更大的空间位阻,从而影响 R248W 与 DNA 的结合,使其作为转录因子的功能受到破坏,影响了对其下游相关靶基因的调控。

本研究首次在中国 HCC 患者中筛查到了 R248W 突变,丰富了中国 HCC 病人 p53 基因的突变图谱。此外对 R248W 突变体的细胞功能进行了研究,这有助于深入了解 p53 基因突变与功能改变之间的关系,加深对肝癌发生分子机制的认识,为在分子水平上寻找治疗肝癌的新方法提供了科学依据。

[参考文献]

[1] Patrick M,O'Connor,Jackman J,et al. Role of the p53 tumor suppressor gene in Cell cycle arrest and radiosensitivity of Burkitt's lymphoma cell lines [J]. Cancer Res, 1993, 53: 4776-4780.

[2] Hollstein M,Sidransky D,Vogelstein B,et al. p53 mutation in human cancers [J]. Science,1991,253(5015):49-53.

[3] Goh H S,Yao J,Smith D R,et. al. p53 point mutation and sur-

- vival in colorectal cancer patients [J]. *Cancer Res*, 1995, 55: 5217-5221.
- [4] Malkin D, Jolly K W, Barbier N, et al. Germline mutations of the p53 tumor-suppressor gene in children and young adults with second malignant neoplasms [J]. *N Engl J Med*, 1992, 326: 1309-1315.
- [5] Coles C, Condie A, Chetty L, et al. p53 mutations in breast cancer [J]. *Cancer Res*, 1992, 52: 5291-5294.
- [6] Andrea E, Baffa R, Menin C, et al. TP53 gene mutations in gastric carcinoma detected by polymerase chain reaction/single-strand conformation polymorphism analysis of archival material [J]. *Cancer Res Clin Oncol*, 1995, 121: 79-83.
- [7] Vahakangas K H, Bennett W P, Castren K, et al. p53 and K-ras mutations in lung cancers from former and never-smoking women [J]. *Cancer Res*, 2001, 61: 4350-4356.
- [8] Niwa K, Itoh M, Murase T, et al. Alteration of p53 gene in ovarian carcinoma: clinico pathological correlation and prognostic significance [J]. *Br J Cancer*, 1994, 70(6): 1191-1197.
- [9] Varley J M, Thorncroft M, McGown G, et al. A detailed study of loss of heterozygosity on chromosome 17 in tumors from Li-Fraumeni patients carrying a mutation to the TP53 gene [J]. *Oncogene*, 1997, 14: 865-871.
- [10] Bartek J, Lukas J. Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage [J]. *FEBS Letters*, 2001, 490: 117-122.
- [11] Minella A C, Swanger J, Bryant E, et al. p53 and p21 form an inducible barrier that protects cells against cyclin E-cdk2 de-regulation [J]. *Current Biology*, 2002, 12(21): 1817-1827.
- [12] Caelles C, Helmberg A, Karin M. p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes [J]. *Nature*, 1994, 370: 220-223.
- [13] Kokontis J M, Wagner A J, O'Leary M, et al. A transcriptional activation function of p53 is dispensable for and inhibitory of its apoptotic function [J]. *Oncogene*, 2001, 20: 659-668.
- [14] Mihara M, Erster S, Zaika A, et al. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria [J]. *Molecular Cell*, 2003, 11(3): 577-590.
- [15] Kakudo Y, Shibata H, Otsuka K, et al. Lack of correlation between p53-dependent transcriptional activity and the ability to induce apoptosis among 179 mutant p53s [J]. *Cancer Research*, 2005, 65: 2108-2114.
- [16] Chipuk J E, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, et al. Direct activation of bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis [J]. *Science*, 2004, 303(5660): 1010-1014.
- [17] Gomez-Lazaro M, Galindo M F, Fernandez-Gomez F J, et al. Activation of p53 and the pro-apoptotic p53 target gene PU-MA during depolarization-induced apoptosis of chromaffin cells [J]. *Experimental neurology*, 2005, 196(1): 96-103.
- [18] Alves N L, Derks I A, Berk E, et al. The Noxa/Mcl-1 axis regulates susceptibility to apoptosis under glucose limitation in dividing T cells [J]. *Immunity*, 2006, 6: 703-716.
- [19] Fontanini G, Boldrin L, Vignati S, et al. bcl2 and p53 regulate vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis in non-small cell lung carcinoma [J]. *European Journal of Cancer*, 1998, 24: 718-723.
- [20] Notarbartolo M, Cervello M, Dusancho L, et al. Resistance to diverse apoptotic triggers in multidrug resistant HL60 cells and its possible relationship to the expression of P-glycoprotein, Fas and of the novel anti-apoptosis factors IAP (inhibitory of apoptosis proteins) [J]. *Cancer Letters*, 2002, 180(1): 91-101.
- [21] Cho Y, Girina S, Jeffrey P D, et al. Crystal structure of a p53 tumor suppressor DNA complex: understanding tumorigenic mutations [J]. *Science*, 1994, 265(5170): 346-355.
- [22] Kato S, Han S, Liu W, et al. Understanding the function-structure and function-mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(14): 8424-8429.