

p53 对 STK11 的转录调控研究^{*}

姚茂金^{**} 王永俊^{**} 沈宏伟 汤建光 王向平
周世权 宁文锋 汪 斐 施小六^{1***}

中南大学湘雅第二医院, 长沙 410011

摘要 PJ 综合征(Peutz-Jeghers syndrome)是一种常染色体显性遗传疾病, 其致病基因所编码的蛋白质为一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(STK11). STK11 可以激活 AMPK, p53 等多条信号通路. 文中在克隆了 *STK11* 的基本启动子区域基础上, 用生物信息学分析预测该区域内可能存在 p53 结合位点和 Sp1 结合位点. EMSA 结果证实了信息学分析的预测. Sp1 结合位点核心碱基定点突变后, 其 PGL3 重组突变体质粒荧光素酶活性下降 1.9 倍; p53 结合位点核心碱基的定点突变后, PGL3 重组突变体质粒荧光素酶活性下降 14.6 倍, 均有统计学意义. 利用内源表达 STK11 的 L02 细胞株, 瞬时转染 pcDNA 3.1-myc-his-B(-)-p53, 经 Real-time PCR 和 Western blotting 检测发现, p53 过表达可以上调 STK11 的表达, 因此 p53 对 STK11 的表达有正反馈调节放大作用.

关键词 PJ 综合征 STK11 p53 转录调控

PJ 综合征(Peutz-Jeghers syndrome, PJS)是一种常染色体显性遗传疾病. 其疾病基因 *Serine/Threonine Kinase 11* (*STK11*) 于 1998 年被克隆^[1,2]. *STK11* 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 在细胞内广泛表达, 并通过 p53, Wnt, AMPK 及 PTEN 等多种信号系统活性的调节行使多种重要复杂的生理功能^[3,4]. *STK11* 表达丰度在个体发育的不同阶段存在组织与时相差异性, 提示 *STK11* 的表达受到复杂而又精密的调控. 本研究小组在初步定位 *STK11* 启动子区位于 -1322—-1160 区间的基础上^[5], 又经生物信息学分析发现该区间存在可能的 Sp1 结合位点和与 p53 结合的顺式作用元件. p53 假定结合位点的存在提示 p53 对 *STK11* 的表达可能有反馈调节作用, 这引起了我们极大的兴趣, 这是因为 *STK11* 与 p53 在功能上有密切关系, *STK11* 被公认为 p53 信号通路上游调节蛋白; 如无 *STK11* 内源性表达的 G361 细胞株, *STK11* 的过表

达通过 p53 依赖的方式诱导 p21/WAF1 表达导致细胞周期 G1 期阻滞^[6], 并且 *STK11* 与 p53 存在直接相互作用^[7]. 最近, Zeng 等的研究进一步明确了 *STK11* 上调 p53 信号通路的机制: *STK11* 可被招募至 p21/WAF1 启动子区参与调节 p53 对 p21/WAF1 的转录激活^[8].

本研究通过电泳迁移率分析(EMSA)证实了 *STK11* 启动子区域(-1322—-1160)存在 Sp1 和 p53 的结合位点; 突变体双荧光素酶活性分析发现 p53 的结合位点核心碱基的突变明显影响其转录活性, 过表达 p53 能上调 *STK11* 表达水平, 发现了 p53 对 *STK11* 的表达有正反馈的调节作用.

1 材料与方法

1.1 材料

L02 细胞系(正常人胎肝细胞)及 HeLa 细胞由中国典型生物保藏中心提供; p53 单克隆抗体购自

2006-09-20 收稿, 2006-12-26 收修改稿

^{*} 国家自然科学基金资助项目(批准号: 30400537)

^{**} 同等贡献作者

^{***} 通信作者, E-mail: shixiaoliu61766@y.ahoo.com.cn

©1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

BD 公司, STK11 单克隆抗体购自 UpState 公司; Pyrobest 酶、限制性内切酶为 TaKaRa 公司产品; Lipofectamine 2000 和 pcDNA 3.1-myc-his-B(-) 购自 Invitrogen 公司; Hotstar 酶、逆转录试剂盒、Tip100 质粒抽提试剂盒和 SYBR-Green PCR Master Mix 购自 Qiagen 公司; PGEM-T-p53 质粒由医学遗传学国家重点实验室张雅坤提供; 双荧光素酶检测试剂盒、EMSA 试剂盒购自 E3050 公司; Luminometer 单光子检测仪为 Promega 公司产品; 核蛋白抽提试剂盒购自 Active Motif 公司.

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析

顺式元件的分析主要使用 MatInspector 软件对 STK11 启动子区(-1322-1160)进行扫描, 分析预测可能的转录因子结合位点. 现行 MatInspector 2.2 版本以 TransFac (Transcription Factors Database) 7.0 中所收录的转录因子结合位点数据库作为共有序列库, 与待检序列进行比对扫描, 网址如下:

http://www.genomatix.de/cgi-bin/matinspector_prof/matfam.pl

1.2.2 载体构建

萤光素酶报告基因重组质粒的构建: 采用巨引物法^[9], 以野生型 PGL3-1425-1160 质粒为模板^[5], 用引入突变碱基引物(见表 1)进行两轮 PCR 扩增, 从而得到定点突变的片段, 用 *XhoI* 和 *KpnI* 双酶切后连入 PGL3-Basic 质粒, 得到突变质粒 PGL3-Sp1mut 和 PGL3-P53mut. 真核表达质粒 pcDNA 3.1-myc-his-B(-)-p53 采用 *Apal* 和 *NotI* 双酶切 PGEM-T-p53 后连入 pcDNA 3.1-myc-his-B(-), 经酶切、测序证实, 用 Tip100 抽提质粒后备用.

1.2.3 细胞培养及瞬时转染

Hela 细胞株(无 STK11 内源性表达)和 L02 细胞株(有 STK11 内源性表达)在含 10% 灭活小牛血清的高糖 DMEM 培养液中, 37 °C, 5% CO₂ 和适合湿度的细胞培养箱传代培养. 瞬时转染采用脂质体 Lipofectamine2000, 具体转染方法参照其说明书进行. 每次转染均用 24 孔板, 每个样品转 2 个孔. 转染体系如下: Lipofectamin2000 脂质体 1.5 μL, 待检或对照质粒 600 ng, phRL-SV40 质粒(内对照)4.0 ng, DMEM 培养液 100 μL. 每个质粒至少单独转染 3 次.

1.2.4 电泳迁移率分析(EMSA)

T4 多核苷酸激酶催化法对转录因子 p53 和 sp1 结合的特异性核苷酸片段(见表 1)进行(³²P-ATP)末端标记, 在加入标记的探针前, 将 5x 结合缓冲液 3.0 μL, L02 细胞核蛋白提取物 15 μg(约 3-5 μL)混合, 并用无核酸酶的水补充至 15.0 μL. 对于竞争性反应, 在此体系中加入非标记的竞争性或非竞争性寡核苷酸 30 ng, 竞争性探针与标记探针加入量的摩尔比例为 50 : 1. 样品经 4% PAGE (40 : 1, 0.5xTBE, 350 V 电泳 45 min), 干胶后在 -70 °C 曝光 24 h.

表 1 构建突变重组质粒及 Real-time PCR 所用引物^{a)}

引物	碱基序列(5'-3')
R-a(-1160)	CCGctcgagGGACACCGCACGCC
F-1425	GGggtaccTCACAGCCGTGGCTTCGTCTC
Sp1-mut1	TCAGCGGCGT <u>TC</u> AGGGCGGCAGAG
Sp1-mut1-mut2	TCAGCGGCGT <u>TC</u> AG <u>AG</u> CGTGCAGAG
p53-mut	AACGGGTGGGCGC <u>AT</u> CTCTCTCGC
Stk11-F	cttgagtacgaaccggcca
Stk11-R	acggcaccacagtcatgct
Beta-actin-R	aatctggcaccacacctct
Beta-actin-F	agcacagcctgtagcaac

a) R-a(-1160)和 F-1425 为构建野生型启动子重组质粒用引物; Sp1-mut1 和 p53-mut 为构建突变重组质粒用引物, 小写字母为引入的限制性酶切位点, 下划线为引入的定点突变, 大写字母为引物特异性序列; 同时, Sp1-mut1, Sp1-mut1-mut2 和 p53-mut 为 EMSA 实验中使用突变探针, 野生型探针为其未引入突变序列. Stk11-F, Stk11-R, Beta-actin-R 和 Beta-actin-F 为 Real-time PCR 用引物

1.2.5 双荧光素酶活性分析

HeLa 细胞转染前培养于 24 孔板, 生长密度约 90% 时进行 Lipofectamine2000 协助转染, 转染 32 h 后, 收集细胞, 按照试剂盒操作手册进行双荧光素酶活性分析, 每个孔测 2 次. 各孔细胞之间的转染效率通过内对照活性进行校正. 样品校正转染效率后的活性, 分别减去阴性对照的背景值, 除以阳性对照的标准值, 最后得到各样品相对于对照 pG L3-Basic 的相对活性(Basic 相对活性值为 1).

1.2.6 Real-time PCR 检测 p53 过表达对 STK11 基因的影响

L02 细胞株在含 15% 灭活胎牛血清的 1640 培养液中, 37 °C, 5% CO₂ 和适合湿度的细胞培养箱传代培养. 转染前一天接种于 6 cm 培养皿, pcDNA 3.1-myc-his-B(-)-p53 真核表达质粒瞬时转染采用脂质体 Lipofectamine 2000, 用 pcDNA 3.1-

myc-his-B(-)空质粒作为阴性对照, 具体转染方法参照其说明书进行。分别于转染后 24, 36 h 收获细胞, 常规抽提 RNA, 逆转录为 cDNA, PCR 反应条件: SYBR-Green PCR Master Mix 15 μ L, cDNA 0.8 μ L, Primer Mix (10 μ mol/L) 0.8 μ L, 混匀后 10 μ L 每孔上样, 每样品设 3 个复孔。PCR 程序: 95 $^{\circ}$ C, 10 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s; 60 $^{\circ}$ C 30 s 循环 40 次, 循环结束后以 Beta-actin 为内参计算相对定量值 (relative quantity), 所用引物见表 1。

1.2.7 Western blotting 检测 p53 过表达对 STK11 基因的影响 L02 细胞株转染前一天接种于 10 cm 培养皿, pcDNA 3.1-myc-his-B(-)-p53 真核表达质粒瞬时转染采用脂质体 2000, 具体转染方法参照其说明书进行, 转染后分别于 24, 36 h 收获细胞, 抽提细胞总蛋白质, 并测定样品蛋白浓度 (按 BCA 试剂盒说明书进行), 取 10 μ g 总蛋白行 12% SDS-PAGE 蛋白电泳并将蛋白转至 PVDF 膜, 依次与一

```

--1322GCCAAGCGCCGACCAATCGCCGCTCGGGCGCCCGCCGGGTCCAAAC
          Sp1-1 Sp1-2
GCTCCAATCGTCAgCGgcGGCGGGGCGGcagaGGGCGGGGATGGCAGGTTCAA
          P53
CCAACGGgtgggCACGTcgtccTCGCGAGGAGGCGTGCCTGCGGCCGGGGCGTGC
GGTG--1160
  
```

图 1 生物信息学预测的部分结果, 显示预测的 Sp1 和 p53 结合位点中的核心碱基小写为侧翼序列

2.2 重组质粒的构建及鉴定

萤光素酶报告基因重组质粒的构建是以野生型 PGL3-1425-1160 质粒为模板定点引入突变碱基引物, 得到了突变质粒 PG L3-Sp1mut 和 PGL3-P53mut。经 *Xho* I 和 *Kpn* I 双酶切, 琼脂糖凝胶电泳检测, 证实突变体大小与目的片段一致, 经测序证实定点突变已经成功地被引入。pcDNA 3.1-myc-his-B(-)-p53 真核表达质粒用 *Apa* I 和 *Not* I 双酶切, 琼脂糖凝胶电泳检测目的基因片段, 并测序证实, pcDNA 3.1-myc-his-B(-)-p53A 按正确阅读框插入了 p53 的 CDS cDNA (图 2、图 3)。

2.3 EMSA 结果

同位素标记的“Sp1 识别序列”和核蛋白提取物孵育后能观察到阻滞带, 阻滞现象能够被自身非

抗 (STK11 : 1 : 300, Beta-actin 1 : 2500) 和二抗 (羊抗鼠 IgG, 1 : 5000) 各在室温下孵育 1 h, ECL 试剂盒显影。实验重复 3 次。

1.2.8 数据处理及分析 各质粒的相对萤光素酶活性的计算及分析见参考文献 [5]。

2 结果

2.1 生物信息学分析结果

使用 MatInspector 软件进行 -1322-1160 片段分析, 搜寻可能的转录因子结合位点, 发现 -1220-1196 区间可能是与 p53 结合的顺式作用元件, 以“p53 识别序列”表示 (下同); 在 -1240-1236 区间可能是与 Sp1 结合的顺式作用元件以“Sp1 识别序列”表示 (下同), 并且在“Sp1 识别序列”中存在两个紧邻的“Sp1 识别序列”, 分别以 Sp1-1 和 Sp1-2 表示 (图 1)。

标记探针竞争, 但不被非标记的突变探针竞争, 表明 Sp1 可以特异性结合于本“Sp1 识别序列”; “Sp1 识别序列”含有两个可能的 Sp1 结合位点 (Sp1-1 和 Sp1-2), Sp1-1 突变和 Sp1-1/ Sp1-2 双突变非标记探针均无竞争作用, 提示 Sp1 是结合于 Sp1-1 (图 4)。

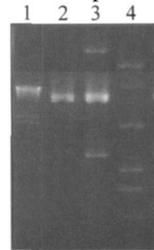


图 2 pcDNA3.1-myc-his-B(-)-p53 重组质粒酶切结果

1 和 4, DNA 标志; 2, pcDNA 3.1-myc-his-B;
3, pcDNA 3.1-myc-his-B(-)-p53



图 3 突变体重组质粒酶切结果

M, DNA 标志;
1, PGL3-Sp1mut1;
2, PGL3-p53mut;
3, PGL3-Basic

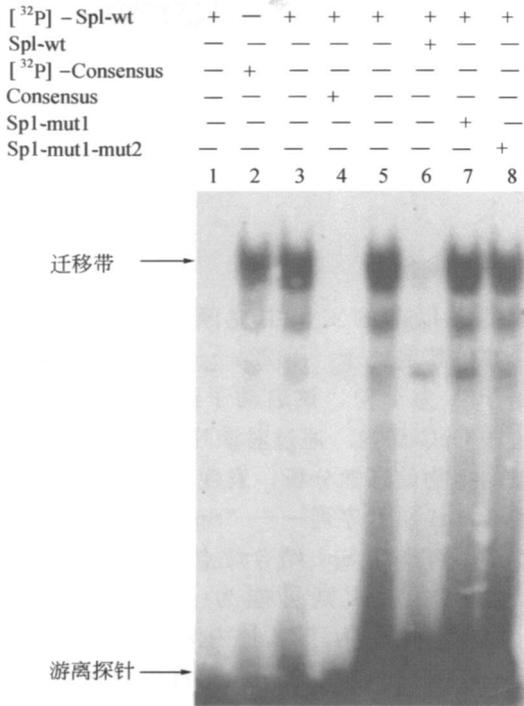


图 4 “Sp1 识别序列” EMSA 结果

[³²P]-Sp1-Wt 为同位素标记的“Sp1 识别序列”; Sp1-wt 为非同位素标记的“Sp1 识别序列”; [³²P]-Consensus 为同位素标记的 Sp1 识别共有序列; Consensus 非为同位素标记的 Sp1 识别共有序列; Sp1-1-mut1 为非同位素标记的 Sp1-1 突变序列; Sp1-1-mut1-mut2 为非同位素标记的 Sp1-1/ Sp1-2 双突变序列。泳道 1, 未加核蛋白的阴性对照; 2-8, 均加有 L02 细胞核蛋白提取物, 其中 2 为 Sp1 EMSA 阳性对照; 3 显示非同位素标记 AP2 识别共有序列对 [³²P]-Consensus 无竞争作用; 4 显示 Consensus 对 [³²P]-Sp1-wt 呈现出竞争作用; 5 为 [³²P]-Sp1-wt 阳性对照 (同 2); 6 显示 Sp1-wt 对 [³²P]-Sp1-wt 呈现竞争作用; 7 和 8 显示单突变与双突变序列均不能对 [³²P]-Sp1-wt 产生竞争作用, 两者的竞争效果无明显差异

同位素标记的 p53 结合片段和核蛋白提取物孵育后能观察到阻滞带, 阻滞现象能够被自身非标记探针竞争, 但不被非标记的突变探针竞争, 加入 p53 单克隆抗体, 可以观测到超阻滞带, 表明 p53 可以特异性结合于“p53 识别序列”(图 5)。

2.4 突变体的双萤光素酶分析

p53 核心结合位点突变后, 突变体萤光素酶活性(35.0±1.8)相对野生型(516±13.2)下降 14.6 倍, P<0.01(图 5); Sp1-1 核心结合位点突变体萤光素酶活性(269±4.2)相对野生型(516±13.2)下降 1.9 倍, P<0.01(图 6)。

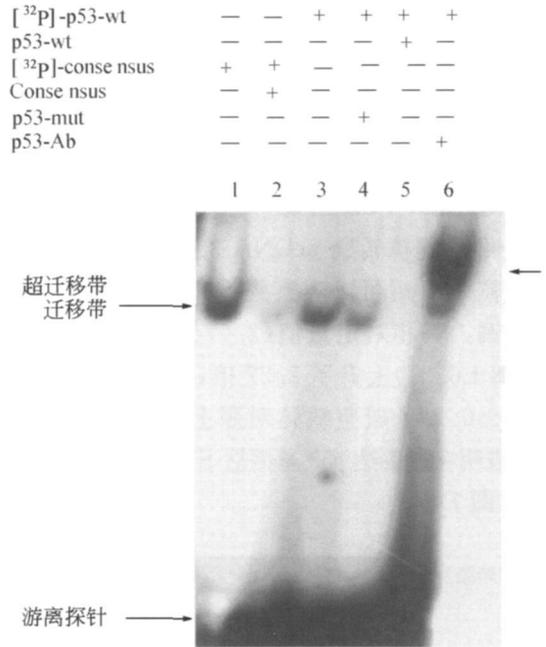


图 5 “p53 识别序列” EMSA 结果

[³²P]-p53-wt 为同位素标记的“p53 识别序列”; p53-wt 为非同位素标记的“p53 识别序列”; [³²P]-Consensus 为同位素标记的 p53 识别共有序列; Consensus 非为同位素标记的 p53 识别共有序列; p53-mut 为非同位素标记的 p53 突变序列; p53-Ab 为 p53 抗体。泳道 1-6 均为以上序列与 L02 细胞核蛋白提取物作用的结果。1 为 p53 EMSA 的阳性对照; 2 显示 Consensus 对 [³²P]-Consensus 呈现出竞争作用; 3 为 [³²P]-p53-wt 阳性对照 (同 1); 4 显示 p53-mut 对 [³²P]-p53-wt 竞争作用不明显; 5 显示 p53-wt 对 [³²P]-p53-wt 呈现出竞争作用; 6 显示加入 p53 抗体对 [³²P]-p53-wt 的 EMSA 呈现超阻滞效应

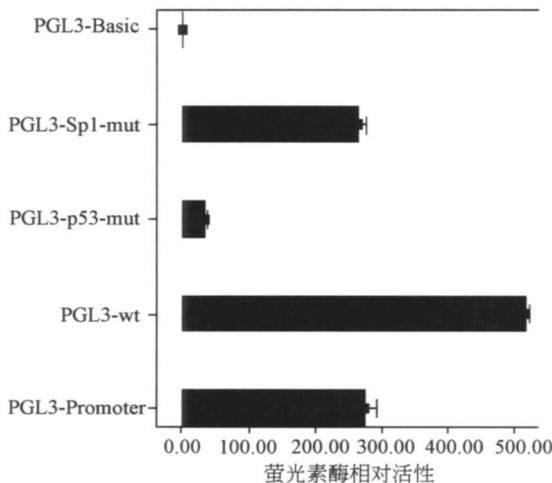


图 6 p53 突变体萤光素酶活性分析结果

突变体萤光素酶活性(35.0±1.8)相对野生型(516±13.2)下降 14.6 倍, Sp1-1 核心结合位点突变体萤光素酶活性(269±4.2) 相对野生型(516±13.2)下降 1.9 倍。P<0.01

2.5 Real time PCR 结果

L-02 细胞株转染 pcDNA 3.1-myc-his-B(-)-p53 重组质粒 24h 后可以观察到 *STK11* 基因的 mRNA 水平上调, 其相对定量值(2.07±0.20)较空载体对照(4.73±0.21)上升了 2.27 倍, 36h 后相对定量值 (14.98±0.22) 较空载体对照上升至 7.23 倍, P<0.01, 表明在过表达 p53 基因后 *STK11* 基因 mRNA 转录增加(图 7)。

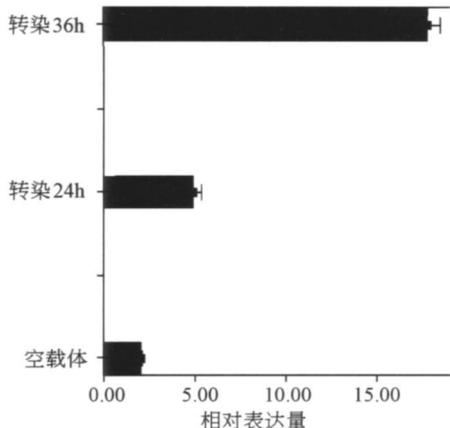


图 7 Real-Time PCR 检测 STK11 的表达

p53 过表达 24 和 36h 分别导致 L02 细胞 STK11 mRNA 相对量增加 2.27 倍和 7.23 倍, P<0.01

2.6 Western blotting 结果

L-02 细胞株转染 pcDNA 3.1-myc-his-B(-)-p53 重组质粒 24h 后可以检测到细胞内表达的 STK11 蛋白水平, 并较空载体对照为高, 至 36h 时 STK11 蛋白水平增加更加明显, 表明过表达 p53 基因导致 STK11 蛋白表达增加(图 8)。

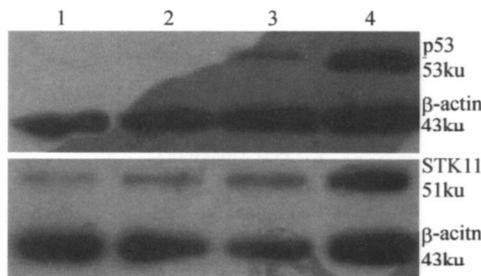


图 8 Western blotting 检测结果

1, 未转染组; 2 转染 pcDNA 3.1-myc-his-B(-)空载体; 3 pcDNA 3.1-myc-his-B(-)-p53 转染 24h; 4 pcDNA 3.1-myc-his-B(-)-p53 转染 36h, 表明过表达 p53 诱导 STK11 蛋白的表达升高

3 讨论

我们在以前的工作中克隆了 STK11 的启动子^[9], 并将其定位于-1322—-1160 区域(翻译起始密码子 A 为+1), 该启动子没有典型的 TATA 盒, 位于 CpG 岛内. 通过对该片段进行转录因子结合位点的生物信息学分析, 发现-1256—-1247 序列可能为 Sp1 结合序列——“Sp1 识别序列”. 该片段含有两个可能的 Sp1 结合位点(Sp1-1 和 Sp1-2); 而-1207—-1203 则可能为 p53 结合序列——“p53 识别序列”. 为了解上述两个片段是否能与 Sp1 蛋白和 p53 蛋白结合, 我们首先合成了以上两个片段, 然后采用 EMSA 实验证实了它们能分别和 p53 和 Sp1 特异性地结合. 由于“Sp1 识别序列”含有两个可能的 Sp1 结合位点(Sp1-1 和 Sp1-2), 为确定 Sp1 是与哪个 Sp1 识别序列结合, 在行 EMSA 实验时, 我们采用了 Sp1-1 位点突变探针和 Sp1-1/Sp1-2 双位点突变探针进行竞争实验, 结果显示: Sp1-1 位点突变探针和 Sp1-1/Sp1-2 双位点突变探针均不能对“Sp1 识别序列”与 Sp1 特异结合产生竞争作用, 提示 Sp1 是结合于 Sp1-1, 因为, 如果 Sp1 结合位点在 Sp1-2, 非标记 Sp1-1 突变片段应该产生类似非标记探针“Sp1 识别序列”的竞争效果。

为了初步了解 p53 和 Sp1 对 *STK11* 转录可能产生的影响, 我们构建了针对“Sp1 识别序列”和“p53 识别序列”核心碱基的 pGL3 突变载体, 观察它们与野生型 pGL3 重组载体转录活性的差异. 我们在进行 *STK11* 启动子克隆研究时, *STK11* 启动子在 HeLa 细胞和 L02 细胞中均有转录活性^[9], 因此, 在本研究中只用了 HeLa 细胞进行转录活性研究. 结果发现 Sp1-1 核心碱基的突变可轻微地下调其转录活性. 基于 Sp1 结合元件为无 TATA 盒的启动子的基本元件的考虑^[10], 我们将研究的重点集中在 p53 对 *STK11* 转录的影响上, 其原因来自以下几个方面: 首先, 本研究发现“p53 识别序列”核心碱基的突变可明显下调其转录活性. 再者, 已有研究显示 *STK11* 生物学功能的实现与 p53 有着十分密切的联系. 早在 2001 年, Karuman 等就发现 *STK11* 与 p53 有密切的关系——*STK11* 诱导的细胞凋亡呈现出 p53 依赖特性^[7]. Wei 等从基因敲除小鼠得到的研究结果发现 *STK11* 与 p53 在肿瘤发生过程中存在协同作用, *STK11*^{+/-}/*p53*^{+/-} 小鼠与 *STK11*^{+/-} 或者 *p53*^{+/-} 小鼠相比, 生存期短, 错构瘤性息肉的形成时间也较 *STK11*^{+/-} 小鼠提前, 同时其肿瘤易感性增加^[11]. 最近 Zeng 等的研究发现 *STK11* 和 p53 在细胞核内存在直接相互作用, 不但对 p53 蛋白进行磷酸化修饰, 还直接参与 p53 对 p21/WAF1 的转录激活, 上调 p21/WAF1 的表达, 诱导细胞周期 G1 期阻滞^[8]. *STK11* 为 p53 的上游调节蛋白已得到公认. 还有, 来自 p53 自身调控的研究结果显示 p53 的表达调控在转录、翻译后修饰及降解过程均存在复杂的正、负反馈机制^[12], 这就使我们联想到 p53 对 *STK11* 的表达调控作用可能是 *STK11* 转录调控的重要机制之一.

为了观察 p53 对内源性 *STK11* 表达调控作用, 我们选用有 *STK11* 内源性表达的 L02 细胞, 瞬时转染 pcDNA 3.1-myc-his-B(-)-p53 真核表达质粒, 在 RNA 水平和蛋白水平观察 p53 的过表达对 *STK11* 表达的影

响. 结果发现 p53 过表达导致了 *STK11* 的 mRNA 表达水平增高, 并且随之引起蛋白表达丰度的明显增加. 我们的研究证实了 p53 可以在转录水平上调 *STK11* 的表达, 发现了 p53 与 *STK11* 的表达之间正反馈通路的存在, 对了解 *STK11* 表达调控机制及 *STK11* 调控细胞增殖机制注入了新的内容.

参 考 文 献

- 1 Hemminki A, Markie D, Tomlinson I, et al. A serine/ threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature*, 1998, 391: 184—187
- 2 Jenne DE, Reimann H, Nezu J, et al. Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase. *Nat Genet*, 1998, 18: 38—43
- 3 Hardie DG. New roles for the LKB1→ AMPK pathway. *Curr Opin Cell Biol*, 2005, 17: 167—173
- 4 Stambolic V, MacPherson D, Sas D, et al. Regulation of PTEN transcription by p53. *Mol Cell*, 2001, 8: 317—325
- 5 宁文锋, 王永俊, 姚茂金, 等. 人 *STK11* 基因启动子区域的克隆. *自然科学进展*, 2006, 16: 1042—1046
- 6 Tiainen M, Ylikorkala A, Makela TP. Growth suppression by LKB1 is mediated by a G1 cell cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 9248—9251
- 7 Karuman P, Gozani O, Robert D, et al. The Peutz-Jegher gene product LKB1 is a mediator of p53-dependent cell death. *Molecular Cell*, 2001, 7: 1307—1319
- 8 Zeng PY, Berger SL. LKB1 is recruited to the p21/WAF1 promoter by p53 to mediate transcriptional activation. *Cancer Res*, 2006, 66: 10701—10708
- 9 Sarkar G, Sommer SS. The “megaprimer” method of site-directed mutagenesis. *Biotechniques*, 1990, 8(4): 404—407
- 10 Ru Lee W, Chen CC, Liu S, et al. 17beta-estradiol(E2) induces cdc25A gene expression in breast cancer cells by genomic and non-genomic pathways. *J Cell Biochem*, 2006, 99: 209—220
- 11 Wei C, Christopher I, Amos L, et al. Mutation of *LKB1* and *p53* genes exert a cooperative effect on tumorigenesis. *Cancer Res*, 2005, 65: 11297—11303
- 12 Vousden KH, Lu X. Live or let die: The cell's response to p53. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(8): 594—604