

p53 突变蛋白对人肺腺癌细胞中 E-cadherin 的表达调控及细胞迁移的影响

万 杨, 吕 涛, 肖智雄

(四川大学生命科学学院生长代谢与衰老研究中心, 成都 610064)

摘 要: 在人肺肿瘤细胞 H1299 中稳定表达含 R273H 点突变的 p53 蛋白(p53-R273H), 观察到细胞中 E-cadherin mRNA 和蛋白水平下调, 同时细胞迁移能力增强. 免疫荧光方法检测发现 p53-R273H 显著降低 E-cadherin 在肿瘤细胞间的表达. 这些结果表明 p53-R273H 突变蛋白具有下调 E-cadherin 基因的表达和促使肿瘤细胞迁移的新功能.

关键词: 肿瘤细胞; p53-R273H; E-cadherin; 细胞迁移

中图分类号: Q279

文献标识码: A

文章编号: 0490-6756(2016)03-0657-07

Mutant p53 down-regulates E-cadherin expression in human lung adenocarcinoma cells to enhance cell migration

WAN Yang, LV Tao, XIAO Zhi-Xiong

(Center of Growth, Metabolism and Aging, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: Stably-expressing p53-R273H in H1299 human lung cancer cells promoted cell migration and concomitant of down-regulated E-cadherin expression. Immunofluorescent staining showed reduced E-cadherin at cell-cell junction. Together, these data suggest that mutant p53-R273H protein acquires a new activity in down-regulating E-cadherin expression and promoting cancer cell migration.

Key words: Cancer cell; p53-R273H; E-cadherin; Migration

1 引 言

p53 作为最重要的抑癌基因, 与癌症的发生发展联系紧密. 超过 50% 的人类肿瘤细胞中存在着 p53 基因的突变^[1-3]. p53 突变的类型包括基因片段缺失、插入 和点突变引起的错义突变, 但是在所有 p53 突变形式中, 占主导地位的还是因点突变引起的错义突变, 其比例约占总体的 80%. 而在这些 p53 错义突变中, 发生在 DNA 结合域(DNA Binding Domain, DBD)的点突变比例高达 97%. 但是以下 6 个位点的突变在癌症中高频率出现, 与癌症进程紧密关联被称为热点突变, 它们分别

是: R175、G245、R248、R249、R273、R282^[4]. 长期以来, 大量证据表明这些点突变蛋白完全丧失了 p53 蛋白的 DNA 结合和转录功能, 称为功能性缺失(loss of function, LOF), 近来有报道这些点突变蛋白有可能获得新的功能(gain of function, GOF), 如肿瘤发生, 侵袭, 转移等^[5-7]. E-cadherin 是上皮粘着连接(Adherent junctions, AJ)的主要组成部分, 介导细胞间粘附. 粘着连接位于顶端紧密连接(Tight junction, TJ)基部上, 形成一个带状结构连接相邻细胞即粘着小带(Belt-like structure)^[8]. E-cadherin 在上皮细胞间质转换(the epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)和细胞

收稿日期: 2015-03-01

基金项目: 国家自然科学基金(31171362, 31170729)

作者简介: 万杨(1987-), 女, 安徽颍上人, 硕士, 研究方向为生物化学与分子生物学.

通讯作者: 肖智雄. E-mail: bmc605@hotmail.com.

迁移的过程中起着重要的作用^[9]. 为研究 p53-R273H 突变蛋白的生物学功能,我们在人肺癌 H1299 细胞中稳定表达 p53-R273H,用划痕实验进行研究细胞的迁移,同时用免疫荧光染色实验定位 E-cadherin 在细胞中的分布.

2 材料与方法

2.1 材料

pCMV-neo-Bam-p53-R273H 质粒来自于 Bert Vogelstein 实验室;质粒中提试剂盒购自 invitrogen 公司;H1299 细胞为本实验室保存;DMEM 高糖培养基(500 mL 高糖培养基含 10% 胎牛血清(FBS),1% 双抗(青霉素、链霉素)均购自 Hyclone 公司;脂质体 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司;一抗:p53 鼠单克隆抗体 DO-1、 β -actin、羊多克隆抗体,均购自 Santa Cruz Biotechnology 公司,E-cadherin 兔多克隆抗体购自 Epitomics 公司;二抗:goat anti-mouse IgG-HRP、goat anti-rabbit IgG-HRP 均购自 Santa Cruz Biotechnology 公司;RNA 提取试剂盒购自 QIAGEN 公司;Q-PCR 试剂盒购自 Promega 公司;免疫荧光染色抗体/试剂 Phalloidin 购自 Cell Signaling 公司,DAPI 及 anti-fading 封片剂购自碧云天公司;chamber slide 购自 Millipore 公司;其他试剂购自成都奥克生物公司.

2.2 实验方法

2.2.1 pCMV-neo-Bam-VEC 和 pCMV-neo-Bam-p53-R273H 扩增 pCMV-neo-Bam-p53 经测序验证后,分别将含有质粒的 DH5 α 大肠杆菌接种于 250 mL 含氨苄青霉素的 LB 培养基中过夜培养.收集细菌沉淀后,参照 DNA 纯化制备试剂盒说明书进行质粒的纯化制备.

2.2.2 pCMV-neo-Bam-p53-R273H 的转染 收集细胞汇合度 70%~80% 的 H1299 细胞,悬于培养液,采用细胞计数板在普通倒置相差显微镜下计数.用含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养液将其配制成 1×10^6 细胞/mL 的细胞悬液.将该细胞悬液接种于 60 mm 细胞培养皿中,于 37℃,5% CO₂ 条件下,在二氧化碳培养箱内进行培养.24 h 后更换培养液.在倒置显微镜下观察,待 H1299 细胞生长至 30%~40% 融合时,去除培养液,用 $1 \times$ PBS 缓冲液洗 3 次,补加无血清 DMEM 2 mL.按照 Lipofectamine 2000 说明书操作,将 2 μ g 质粒与 500 μ L 空 DMEM 培养液(A 溶液)混匀;并将

5 μ L Lipofectamine 2000 与 500 μ L 无 FBS 的 DMEM 培养液(B 溶液)混匀后放置 5 min.然后 A 溶液和 B 溶液混匀后在 37℃ 放置 20 min.最后将混合液加入 H1299 细胞中,于 37℃,5% CO₂ 条件下,在二氧化碳培养箱内进行培养.6 h 后更换为含 10% FBS 和 1% 双抗的完全 DMEM 培养液.将换液后的培养皿置于 37℃,5% CO₂ 孵箱中培养,12 h 后,更换新鲜 DMEM 培养液.

2.2.3 转染细胞的稳定筛选 收集细胞汇合度 60%~70% 的 H1299 细胞,悬于培养液,采用细胞计数板在普通倒置相差显微镜下计数.用含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养液将其配制成 1×10^6 细胞/mL 的细胞悬液.将该细胞悬液接种于 24 孔板中,接种量以第 2 d 长成 25% 单层为宜,置 CO₂ 孵箱中 37℃ 培养过夜.将培养液换成含 neomycin 以及 10% FBS 和 1% 双抗的完全 DMEM 培养液.抗生素浓度按梯度递增,每个浓度梯度做两个重复(0、100、200、400、600、800、1000、2000 μ g/mL).培养 14 d,以绝大部分细胞死亡的浓度为准.

转染按 2.2.2 项中所述操作进行.转染 72 h 后,将转染细胞传代至 6 孔板中,并将培养基更换为含预试验中已确定浓度的抗生素的选择培养基(neomycin 的筛选浓度为 2 mg/mL).传代后,使用普通倒置相差显微镜观察可见单个细胞,继续培养 10 d 后可见单个细胞分裂繁殖形成单个抗性集落.此时可用滤纸片法挑选单克隆.用胰酶浸透经高温灭菌的 5 mm² 滤纸片,用镊子将滤纸片贴在单细胞集落上约 20 s(一片滤纸只得覆盖一个细胞集落,若细胞生长较密,可先将周围细胞集落刮去,再用滤纸片覆盖其上).消化后,取出粘附有细胞的滤纸片置于 24 孔板中用含预试验中已确定浓度的抗生素的选择培养基(neomycin 的筛选浓度为 2 mg/mL)继续加压培养.待细胞传代后,使用 Western blot 检测单克隆细胞中外源蛋白的表达情况.由于不同克隆的表达水平存在差异,因此可同时挑选多个克隆,选择表达量最高的克隆传代并保种.

2.2.4 Western blot 分别收集稳定细胞系(Stable cell line)——稳定表达 pCMV-neo-Bam-VEC 的 H1299 VEC 细胞和稳定表达 pCMV-neo-Bam-p53-R273H 的 H1299 p53-R273H 细胞,离心沉淀后加入裂解液作匀浆及涡旋振荡处理.样品经 2 $\times$ SDS 上样缓冲液处理后通过 10% 的 SDS-

PAGE 电泳, 并电转移到 PVDF 膜上, 4% 脱脂奶粉封闭 1 h 后, TBST 洗 3×10 min, 加入一抗 (p53、E-cadherin、 β -actin 抗体分别按 1 : 2000、1 : 400、1 : 2000 稀释, 室温孵育 2 h. TBST 洗 3×10 min, 加入二抗室温孵育 1 h, 再使用 TBST 洗 3×10 min, 加入 ECL 显影液, 凝胶成像仪成像. 用 β -actin 作内参照验证蛋白的含量.

2.2.5 RNA 的提取和 Q-PCR 分别在冰上收集稳定细胞系 VEC 和 p53-R273H 细胞. 使用预冷的 $1 \times$ PBS 缓冲液洗一次后, 使用 RNA 提取试剂盒提取 RNA, 然后用 4 μ g RNA 反转录成 cDNA, Q-PCR 检测突变型 p53-R273H 和 E-cadherin RNA 的水平; p53-R273H、E-cadherin 和 GAPDH 的 Q-PCR 引物见表 1.

表 1 Q-PCR 引物序列
Tab. 1 Primers of Q-PCR

名称	序列
GAPDHF	5'-TGGACTCCACGACGTACTCA-3'
GAPDHR	5'-AATCCCATCACCATCTTCCA-3'
E-cadherinF	5'-ATTCTGATTCTGCTGCTCTTG-3'
E-cadherinR	5'-AGTAGTCATAGTCCTGGTCTT-3'
p53F	5'-CCTCACCATCATCACACTGG-3'
p53R	5'-GCTCTCGGAACATCTCGAAG-3'

Q-PCR 的反应体系为 10 μ L: Sybr green Mix 5 μ L, 0.2 μ M primerF (0.2 μ L), 0.2 μ M primerR (0.2 μ L), cDNA 1 μ L, 无菌水 3.6 μ L. 然后用 Q-PCR 仪检测突变型 p53-R273H 和 E-cadherin 的表达量, 每个实验重复 3 次, 用生物学统计软件分析实验数据.

2.2.6 划痕实验 (Wound healing assay) 将稳定细胞系按 5×10^4 细胞/孔, 接种至 6 孔板中. 细胞长满后, 使用无菌枪头在细胞层中划出约 2 mm 的划痕. 使用含 1% FBS 的 DMEM 培养液, 置于 37°C 、5% CO_2 孵箱中培养. 使用 Leica 公司的活细胞工作站 (37°C 、5% CO_2) 对划痕进行拍照, 记为 0 min, 之后每 10 min 进行照相, 共拍照 20 h. 使用 SPOT Advance 软件测量划痕汇合度. 即使用 SPOT Advance 软件测量每个特定时间段照片中划痕宽度, 每个时间段测量三个不同视野, 每个视野测量 5 个不同位点, 取平均值进行计算. 以 0 min 时划痕宽度为 100%, 被细胞覆盖距离的平均值与 0 min 宽度做比较得到的数值定义为 wound closure^[10].

2.2.7 单细胞集落形态试验 收集细胞汇合度 60%~70% 的稳定细胞, 用胰酶消化后形成细胞悬液. 采用细胞计数板在普通倒置相差显微镜下计数. 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养液将其配制成 1×10^3 细胞/mL 的细胞悬液. 将约 100 个各类细胞悬液分别接种于 60 mm 细胞培养皿中 (数目约为 10 倍目镜下使用显微镜观察每个视野有 2~3 个细胞), 于 37°C 、5% CO_2 条件下, 在二氧化碳培养箱内进行培养. 每 3d 更换一次培养液. 在倒置显微镜下观察, 细胞生长 5 d 后, 形成单个的细胞集落. 使用 0.1% 结晶紫水溶液染色, 倒置显微镜下观察细胞集落及细胞的形态.

2.2.8 免疫荧光染色 收集细胞配制成 1×10^6 细胞/mL 的细胞悬液. 分别接种 1000 个稳定 VEC 和 R273H 细胞于 chamber slide 上, 37°C 、5% CO_2 条件下, 在二氧化碳培养箱内进行培养. 48 h 后, 弃掉上清液, 用 $1 \times$ PBS 缓冲液清洗三次. 使用含 10% BSA 和 1% 双抗的 DMEM 培养基、4% BSA、4% 多聚甲醛 (pH 7.2~7.3) 配置成细胞固定液, 于冰上在细胞中加入该固定液, 固定 30 min. 细胞加入含 0.1% TRITON X-100 的 $1 \times$ PBS 溶液进行细胞通透, 共三次每次 5 min. 用含有 4% BSA 的 $1 \times$ PBS 缓冲液配置免疫荧光染色一抗稀释液, 按抗体说明比例稀释抗体. 每片玻片上滴加 100 μ L 的一抗稀释液, 在避光 4°C 的条件下孵化过夜. 为防止染色过程中液体蒸发, 在密闭湿盒中进行染色.

第 2d, 使用 $1 \times$ PBS 缓冲液漂洗 3 次, 每次 10 min. 使用 4% BSA 的 $1 \times$ PBS 配置免疫荧光染色二抗稀释液, 按抗体说明比例稀释抗体. 每片玻片上滴加 100 μ L 二抗稀释液, 避光常温条件下孵化 2 h. 将 Phalloidin 储存液按 1 : 100 的比例加入 $1 \times$ PBS 缓冲液中配成工作液用于细胞染色, 室温染色 60 min.

用 $1 \times$ PBS 清洗经过染色的细胞 3 次, 每次 5 min 后. 用 DAPI 将细胞核染成荧光蓝, 染色 3 min (DAPI 浓度为 0.6 μ M 溶于 $1 \times$ PBS 中). 将抗淬灭剂 (Anti-fading) 点在玻片上. 最后使用无色指甲油将免疫荧光玻片封住. 用 Confocal 显微镜观察结果.

2.2.9 生物学统计 所有实验数据以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{X} \pm S$) 表示, 用统计软件对数据进行分析. 两组均数间比较采用 T-test 检验.

3 结 果

3.1 质粒 pCMV-neo-Bam-VEC 和 pCMV-neo-Bam- p53-R273H 的提取及验证

p53-R273H 质粒使用前经酶切和 DNA 测序证明 p53-R273H 序列及阅读框正确. 使用质粒抽提试剂盒提取质粒 pCMV-neo-Bam-VEC 和 pCMV-neo-Bam-p53-R273H. 并用提取的质粒 DNA 进行酶切鉴定. 用 *Bam*H I 酶切质粒 pCMV-neo-Bam-p53-R273H 得到 1.5 kb 左右的 p53-R273H 特异性条带和线性化的 pCMV-neo-Bam 载体, 结果见图 1.

3.2 p53-R273H 促使 E-cadherin 蛋白表达水平下调

E-cadherin 蛋白表达的减少能促使细胞迁移, 也是细胞发生 EMT 的一个标志^[8,9]. 我们用 H1299 稳定表达 p53-R273H 的细胞以及 VEC 对照, 用 EBC250 裂解液^[11] 裂解后按照 1. 2. 4 项中所述方法进行 western blot 实验; 同时, 使用 RNA 提取试剂盒分别提取上述两种细胞的总 RNA, 反转录成 cDNA 后用 Q-PCR 检测 E-cadherin 的表

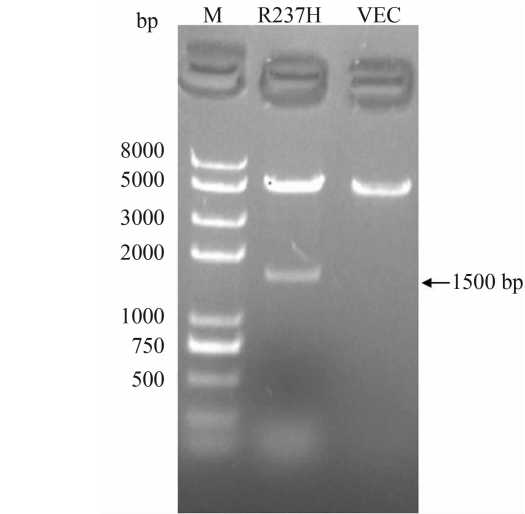
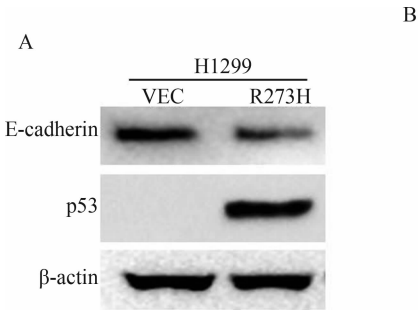


图 1 pCMV-neo-Bam-p53-R273H 和 pCMV-neo-Bam-VEC 质粒的酶切鉴定

M: DNA marker; 用限制性内切酶 *Bam*H I 酶切 pCMV-neo-Bam-p53-R273H 和 pCMV-neo-Bam-VEC 质粒;

Fig. 1 Identified plasmid by restriction enzyme digestion M: DNA marker; Plasmid pCMV-neo-Bam-p53-R273H and pCMV-neo-Bam-VEC were digested by *Bam*H I

达水平, GAPDH 为内参. 发现 E-cadherin 在蛋白水平和 mRNA 水平均被 p53-R273H 下调, 结果见图 2.

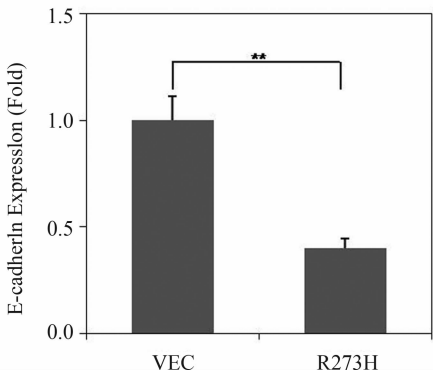


图 2 在 H1299 细胞中表达 p53-R273H 导致 E-cadherin 的 mRNA 以及蛋白的表达降低.

(A) Western blot 检测 p53-R273H 对 E-cadherin 蛋白表达的影响;
(B) Q-PCR 检测 p53-R273H 对 E-cadherin mRNA 的影响; 用 GAPDH 作为内参. 实验数据来自三组独立的实验.
* * 表示 $P < 0.01$

Fig. 2 Expression of p53-R273H decreases E-cadherin mRNA and protein levels.

(A) The effects of p53-R273H on the protein levels of E-cadherin by western blot analysis;
(B) The effects of p53-R273H on E-cadherin mRNA levels by Q-PCR analysis. GAPDH was used as internal control. Three independent experiments in duplicate were performed. * * indicated $P < 0.01$

3.3 p53-R273H 能促进 H1299 细胞形态改变, 并促使细胞迁移

我们使用划痕实验来检测 p53-R273H 稳定表达的 H1299 细胞, 20 h 后观察细胞的愈合度. 我们发现表达 p53-R273H 的 H1299 细胞已经愈合, 而对照 (VEC) 的细胞还没有愈合, 说明表达 p53-

R273H 迁移能力变强, 如图 3A 和图 3B 所示. 同时研究中我们还观察到表达 p53-R273H 的细胞发生了类似于 EMT 的变化, 表现在原有的上皮细胞形态变成梭状的细胞形态, 并且细胞呈分散形生长. 细胞边缘纤长且伴有枝状伪足, 如图 3C 所示.

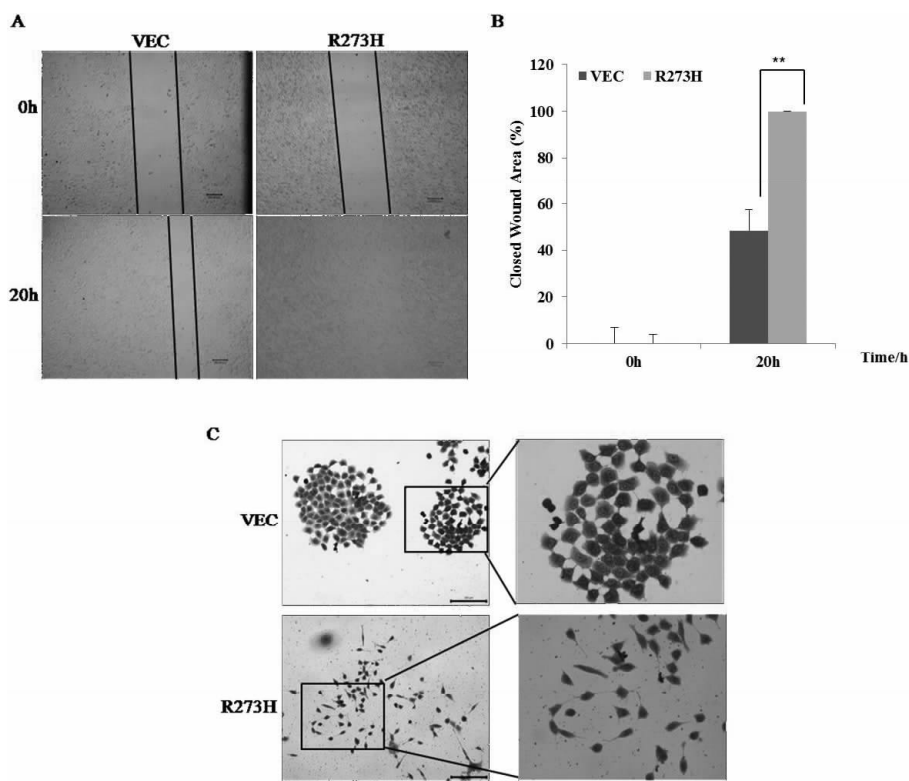


图 3 p53-R273H 促进 H1299 细胞的迁移和细胞形态的变化。

(A) H1299 对照细胞(VEC)和过表达 p53-R273H 的 H1299 细胞(R273H)的划痕实验。

(B) 使用 SPOT Advance 软件定量划痕愈合度^[10](见实验方法)。* * 表示 $P<0.01$

(C) 对照(VEC)细胞生成集落,而过表达 p53-R273H 的细胞形态多呈梭长形,细胞生长分散,不能形成集落。scale bar: 200 μ m

Fig. 3 p53-R273H promotes H1299 cell migration and morphological changes

(1)Wound-healing assay using control H1299 cells (VEC) and p53-R273H-expressing H1299 cells (R273H)

(2)Quantification of wound-healing assays using SPOT Advance software as described previously ^[10]. Data were presented as % of closed wound area. * * indicated $P<0.01$

(3)ControlH1299 cells (VEC) grow to form big and tight colonies, but H1299 cells expressing p53-R273H showed significant morphological changes and grow loosely and scattered. Scale bar: 200 μ m

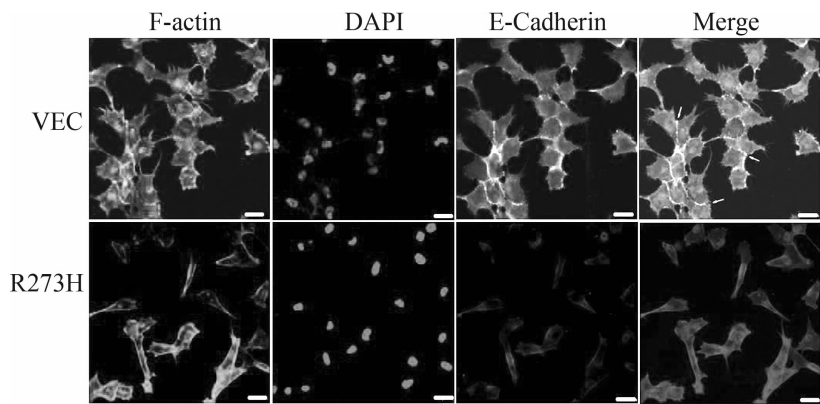


图 4 免疫荧光染色检测 p53-R273H 对 E-cadherin 表达和分布的影响

Fig. 4 Effects of p53-R273H on expression of E-cadherin in H1299 cells by immunofluorescent staining

Scale Bar: 25 μ m

3.4 p53-R273H 对 H1299 细胞中 E-cadherin 的分布的影响

文献报道 E-cadherin 的表达量和分布与

EMT 相关^[8,12]. 我们在前面的实验中发现表达 p53-R273H 的细胞的形态发生变化,变得纤长且伴有枝状伪足,且同时伴随有 E-cadherin 的表达

下调,于是我们进一步检测了 p53-R273H 对 E-cadherin 的细胞分布的影响.我们用 p53-R273H 的稳定细胞和 VEC 细胞进行对照实验,使用 E-cadherin 抗体进行免疫荧光染色(图 4 第三列),采用 phalloidin 染料特异性标记细胞内 F-actin(图 4 第一列),使用 DAPI 染料标记细胞核的位置(图 4 第二列).从荧光染色结果我们可以发现,对照细胞中, E-cadherin 主要分布在细胞之间的粘着小带.但是此带在 p53-R273H 细胞中显著减少.结果见图 4.

4 讨 论

野生型 p53 是在细胞胁迫条件下细胞生长的“监控器”,具有细胞周期阻滞、诱导凋亡发生、介导细胞衰老、维护基因组稳定、错配 DNA 碱基修复等抑癌基因功能^[13]. p53 发生突变后,会丧失野生型 p53 所具有的抑癌基因功能,这称为突变型 p53 的“功能缺失”(Loss of function, LOF). 近来研究表明, p53 突变蛋白具有新的、野生型 p53 不具有的生物学功能,称为突变型 p53 的“功能获得”(Gain of function, GOF). 这些功能包括促进肿瘤细胞迁移和侵袭等. 而且突变型 p53 还能与野生型 p53 蛋白结合,以 dominant negative 的方式抑制后者活性^[14,15]. 从结构上来讲,突变型 p53 可以分为两类,一类为 DNA 结合缺陷突变体 (DNA contact-defective mutant),是指那些负责与特定 DNA 序列结合的氨基酸残基发生点突变,致使 p53 丧失与 DNA 特异性的结合能力,例如 R273H (小鼠中为 R270H);另一类称为构象突变体,是指那些发生点突变后改变了原来野生型 p53 的蛋白构象,例如 R175H (小鼠中为 R172H)^[15,16].

本研究以 p53 热点突变, R273H, 为研究对象,发现在人肺癌 H1299 细胞中稳定地表达 p53-R273H 后,细胞的迁移能力增强,并且发现细胞的形态以及细胞集落的形态发生了重大的变化:对照组的细胞集落形态较紧密,为较为典型的上皮细胞形态;而表达 p53-R273H 的细胞不能形成集落,比较分散,细胞集落边缘的细胞形态纤长且伴有枝状伪足,这些现象和细胞发生 EMT 过程中的细胞形态相似. 所以我们检测细胞发生 EMT 的标志 E-cadherin,发现在表达 p53-R273H 的细胞中 E-cadherin 蛋白水平和 mRNA 水平均有减少,这些实验结果表明 表达 p53-R273H 的细胞可能发生了 EMT.

已有文献报道 p53 突变蛋白下调 E-cadherin 的表达并参与 EMT 转化. p53-R175H 下调 E-cadherin 并诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞的 EMT 发生^[17,18]. 在 MDCK 细胞中敲除野生型 p53 的细胞中同时表达人 p53 突变体 R273H 也会下调 E-cadherin 并诱导细胞发生 EMT^[19]. 在分子水平上, p53-R175H 和 p53-R273H 可能结合在 E-cadherin 基因的 E-box 上直接参与 E-cadherin 基因表达的负调控, p53 突变蛋白也有可能上调转录因子 Snail、Slug 和 Zeb1 从而抑制 E-cadherin 的表达^[20,21].

已有报道 p53 突变蛋白促进细胞迁移,但是文献表明这一过程有细胞特异性而且分子机理没有完全清楚. 在人子宫内膜癌细胞 HHUA 表达 p53-R273H 显著增加细胞的迁移和侵袭能力. 但是 p53-R273H 对人肉瘤细胞和 Saos-2 和人卵巢癌细胞 SK-OV-3 没有影响^[22]. 在小鼠输卵管上皮细胞 (MOE) 表达人 p53-R273H 导致细胞迁移增加. 但人 p53-R273H 对小鼠卵巢表面上皮细胞 (MOSE) 的迁移无明显影响^[23]. p53-R273H 上调趋化因子 CXCL5, CXCL8 和 CXCL12 促使 H1299 细胞迁移^[24].

我们的实验结果明确证明在人肺癌 H1299 细胞,表达 p53-R273H 抑制 E-cadherin 的基因转录,并伴随类似 EMT 的变化和细胞迁移能力的增加. 这和肿瘤细胞中 E-cadherin 蛋白的缺失导致肿瘤的转移^[25,26]相一致. 该研究结果有助于进一步了解 p53 突变蛋白在肿瘤发生发展中的作用及其分子机理.

参考文献:

- [1] Soussi T, Bérout C. Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome [J]. *Nat Rev Cancer*, 2001, 1 (3): 233.
- [2] 刘戟, 敬慧娥, 茹钦华, 等. 毛细管电泳技术快速检测 p53 基因点突变[J]. *四川大学学报: 医学版*, 2003, 34(3): 476.
- [3] 胡琳珊, 张海波, 童英, 等. 筛选 p53 靶向药物的细胞模型的构建[J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2013, 50(4): 849.
- [4] Freed-Pastor W A, Prives C. Mutant p53: one name, many proteins [J]. *Genes Dev*, 2012, 26 (12): 1268.
- [5] Ali A, Shah A S, Ahmad A. Gain-of-function of mutant p53: mutant p53 enhances cancer progression by inhibiting KLF17 expression in invasive

- breast carcinoma cells [J]. *Cancer Lett*, 2014, 354 (1): 87.
- [6] Subramanian M, Francis P, Bilke S, *et al.* A mutant p53/let-7i-axis-regulated gene network drives cell migration, invasion and metastasis[J]. *Oncogene*, 2014, 34(9): 1094.
- [7] Muller P A, Vousden K H. Mutant p53 in cancer; new functions and therapeutic opportunities [J]. *Cancer Cell*, 2014, 25(3): 304.
- [8] Repetto O, De Paoli P, De Re V, *et al.* Levels of Soluble E-Cadherin in Breast, Gastric, and Colorectal Cancers [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 9 (16): 408047.
- [9] Gheldof A, Berx G. Cadherins and epithelial-to-mesenchymal transition [J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2013, 116: 317.
- [10] Hwang C I, Matoso A, Corney D C, *et al.* Wild-type p53 controls cell motility and invasion by dual regulation of MET expression [J]. *PNAS*, 2011, 108 (34): 14240.
- [11] Sdek P, Ying H, Chang DL, *et al.* MDM2 promotes proteasome-dependent ubiquitin-independent degradation of retinoblastoma protein [J]. *Mol Cell*, 2005, 20(5): 699.
- [12] Weber G F, Bjerke M A, DeSimone D W. Integrins and cadherins join forces to form adhesive networks [J]. *J Cell Sci*, 2011, 124(8): 1183.
- [13] Bode A M, Dong Z. Post-translational modification of p53 in tumorigenesis [J]. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4(10): 793.
- [14] Ali A, Shah A S, Ahmad A. Gain-of-function of mutant p53; mutant p53 enhances cancer progression by inhibiting KLF17 expression in invasive breast carcinoma cells [J]. *Cancer Lett*, 2014, 354 (1): 87.
- [15] Muller P A, Caswell P T, Doyle B, *et al.* Mutant p53 drives invasion by promoting integrin recycling [J]. *Cell*, 2009, 139(7): 1327.
- [16] Torchia E C, Caulin C, Acin S, *et al.* Myc, Aurora Kinase A, and mutant p53(R172H) co-operate in a mouse model of metastatic skin carcinoma [J]. *Oncogene*, 2012, 31(21): 2680.
- [17] Rieber M, Strasberg Rieber M. p53 inactivation decreases dependence on estrogen/ERK signalling for proliferation but promotes EMT and susceptibility to 3-bromopyruvate in ER α + breast cancer MCF-7 cells[J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 88 (2): 169.
- [18] Rieber M, Strasberg Rieber M. DN-R175H p53 mutation is more effective than p53 interference in inducing epithelial disorganization and activation of proliferation signals in human carcinoma cells; role of E-cadherin [J]. *Int J Cancer*, 2009, 125(7): 1604.
- [19] Zhang Y, Yan W, Chen X. Mutant p53 cooperates with knockdown of endogenous wild-type p53 to disrupt tubulogenesis in Madin-Darby canine kidney cells [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e85624.
- [20] Roger L, Jullien L, Gire V, *et al.* Gain of oncogenic function of p53 mutants regulates E-cadherin expression uncoupled from cell invasion in colon cancer cells [J]. *J Cell Sci*, 2010, 123(8): 1295.
- [21] Zhang Y, Yan W, Chen X. Mutant p53 disrupts MCF-10A cell polarity in three-dimensional culture via epithelial-to-mesenchymal transitions [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(18): 16218.
- [22] Dong P, Tada M, Hamada J, *et al.* p53 dominant-negative mutant R273H promotes invasion and migration of human endometrial cancer HHUA cells [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2007, 24(6): 471.
- [23] Quartuccio S M, Karthikeyan S, Eddie S L, *et al.* Mutant p53 expression in fallopian tube epithelium drives cell migration [J]. *Int J Cancer*. 2015 3(21). doi: 10.1002/ijc.29528.
- [24] Yeudall W A, Vaughan C A, Miyazaki H, *et al.* Gain-of-function mutant p53 upregulates CXC chemokines and enhances cell migration [J]. *Carcinogenesis*. 2012, 33(2): 442.
- [25] Yang Y, Ahn Y H, Chen Y, *et al.* ZEB1 sensitizes lung adenocarcinoma to metastasis suppression by PI3K antagonism [J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(6): 2696.
- [26] Mathenge E G, Dean C A, Clements D, *et al.* Core needle biopsy of breast cancer tumors increases distant metastases in a mouse model [J]. *Neoplasia*, 2014, 16(11): 950.