

doi:10.3969/j.issn.1672-5565.2014.04.04

基于乳腺癌 ChIP-seq 数据的 p53 抑癌机制研究

王立山, 祝鹏飞, 祁福娟, 曹鑫恺, 孔 艳, 臧卫东*

(上海丰核信息科技有限公司研发部, 上海 200241)

摘要:采用生物信息学方法分析野生型 p53 乳腺癌 MCF7 细胞的 ChIP-seq(染色质免疫共沉淀-测序)数据,以揭示 p53 的抑癌分子机制。从 NCBI 下载的编号为 GSE47041 的 ChIP-seq 数据来源于三组试验,分别为:未经处理的乳腺癌 MCF7 细胞对照(NS_input),Nutlin-3a(一种 MDM2 拮抗剂)处理的 MCF7 细胞对照(S_input)和 Nutlin-3a 刺激 MCF7 细胞后加入 p53 抗体的实验组(S_p53)。ChIP 获得的 DNA 数据的测序平台为 Illumina HiSeq 2000。利用 Bowtie 参照人基因组 hg19 进行序列比对;利用 MACS 进行峰信号检测,并利用自定义软件筛选 p53 可能的靶基因;利用 DAVID 在线工具对靶基因进行通路富集分析;最后利用 STRING 构建蛋白互作网络。研究共得到 50 个 p53 的靶基因,其中 8 个靶基因(*CDKN1A*、*BBC3*、*BAX*、*DDB2*、*MDM2*、*CCNG1*、*XPC* 和 *PCNA*)分别富集到 p53 信号转导通路和核苷酸切除修复通路两个通路上。在得到的由 19 个靶基因构成的蛋白质相互作用网络中,连通度最高的前 5 个基因分别是 *PCNA*、*MDM2*、*REV3L*、*CDKN1A* 和 *BAX*。研究中采用的分析 ChIP-seq 数据的方法能有效揭示野生型 p53 乳腺癌 MCF7 细胞中 Nutlin-3a 激活的 p53 的抑癌分子机制。

关键词:野生型 p53 乳腺癌 MCF7 细胞;p53;ChIP-seq 数据;通路富集分析;蛋白互作网络

中图分类号:Q71 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-5565(2014)-04-257-06

Molecular mechanism of p53-mediated tumor suppression in p53-WT breast cancer using ChIP-seq data

WANG Lishan, ZHU Pengfei, QI Fujuan, CAO Xinkai, KONG Yan, ZANG Weidong*

(Research and Development Department of Fenghe(Shanghai) Information Technology Co., Ltd., Shanghai 200241, China)

Abstract: To unveil the molecular mechanism of p53-mediated tumor suppression in p53-WT breast cancer via analyzing ChIP-seq (chromatin immunoprecipitation-sequencing) data by bioinformatics methods. ChIP-Seq dataset GSE47041 was downloaded from Gene Expression Omnibus, which includes three groups of samples: untreated MCF-7 cells (NS_input), MCF-7 cells treated with a Mdm2 antagonist Nutlin-3a (S_input), Nutlin-3a-treated MCF-7 cells plus p53 antibody treatment (S_p53). The obtained DNA fragments were sequenced using the Illumina HiSeq 2000 platform. Sequence alignment was performed with reference to hg19 using Bowtie; peak calling was performed using MACS; a self-programmed software was used to detect p53 target genes. A total of 50 p53 target genes were predicted. Among them, eight (*CDKN1A*, *BBC3*, *BAX*, *DDB2*, *MDM2*, *CCNG1*, *XPC* and *PCNA*) were enriched in p53 signaling transduction pathway and nucleotide excision repairing pathways respectively. A protein-protein interaction network consisting of 19 target genes was obtained; *PCNA*, *MDM2*, *REV3L*, *CDKN1A* and *BAX* were the top five genes with the highest degrees of connection. The methods recruited to investigate the molecular mechanism underlying p53-mediated tumor suppression in p53-WT MCF-7 breast cancer cells based on ChIP-seq data are proven feasible and reliable.

Keywords: p53-WT MCF-7 breast cancer cells; p53-mediated tumor suppression; ChIP-seq data; Bioinformatics pathway enrichment analysis; Protein-protein interaction network

收稿日期:2014-07-31;修回日期:2014-10-20。

基金项目:2013年度第二批闵行区中小企业技术创新计划项目的支持(2013MH211)。

作者简介:王立山,男,博士。研究方向:基因调控网络构建和分析;芯片以及测序数据的分析和方法的创新;有效药物分子分子的筛选和药物作用靶点;E-mail:wanglishan001@gmail.com。

* 通信作者:臧卫东,男,硕士研究生,研究方向:发育生物学,生物信息学;E-mail:zangweidong@microsci.com。

乳腺癌是女性中最常见的恶性肿瘤,其发病率近年来逐渐上升,且呈现年轻化趋势^[1]。p53 是人体内的一个抑癌基因。超过 50% 的人类癌症都与 TP53 的突变有关^[2]。TP53 基因位于人类染色体 17p13.1,基因全长 16~20 kb,由 11 个外显子和 10 个内含子组成,其中第一个外显子不编码^[3]。TP53 基因在 DNA 损伤,低氧,原癌基因激活等情况下会被激活并表达 p53 转录因子。该转录因子由 393 氨基酸组成,包括 5 个高度保守的区域^[4]。p53 信号转导通路通过 p53 与其大量下游靶基因的相互作用参与细胞周期控制,细胞凋亡和 DNA 修复等众多生物功能^[5]。MDM2 是正常细胞中 p53 活性和稳定性的负调节蛋白^[6]。Nutlin-3a 是一种 MDM2 拮抗剂,能有效抑制 MDM2 从而激活 TP53 基因,已经作为一种小分子抗癌药物被用于野生型 p53 肿瘤的治疗^[7]。

将染色质免疫共沉淀与第二代高通量测序相结合的 ChIP-seq (染色质免疫共沉淀-测序) 技术,能够高效地在全基因组范围内检测与组蛋白、转录因子等互作的 DNA 区段信息,具有低成本,高分辨率和高覆盖度的优点^[8],因而已在实践中得到广泛应用^[9-11]。但该技术应用于乳腺癌研究中的应用至今还未被报道过。此外,面对大量的 ChIP-seq 数据,数据分析方法仍显得十分滞后。本文采用生物信息学方法首次分析野生型 p53 乳腺癌 MCF7 细胞的 ChIP-seq 数据,以揭示 p53 抑癌作用的分子机制。

1 材料与方法

1.1 数据来源

从 NCBI GEO (Gene Expression Omnibus) 数据库下载编号为 GSE47041 的野生型 p53 乳腺癌 MCF7 细胞的 ChIP-seq 数据。该数据集来源于三组试验,分别为无刺激下的 MCF7 细胞对照 (NS_input), Nutlin-3a 处理后的 MCF7 细胞对照 (S_input) 和 Nutlin-3a 处理 MCF7 细胞后加入 p53 蛋白抗体的实验组 (S_p53)。ChIP 获得的 DNA 数据的测序平台为 Illumina HiSeq 2000。

1.2 数据预处理

首先将 NCBI 中下载的 sra 格式文件转化为 fastq 格式文件,再利用自定义脚本对文件进行预处理:去除低质量序列。要求质量低于 20 的碱基小于序列总长的 10%,碱基 'N' 的个数小于序列总长的 5%。

1.3 序列比对

使用软件 Bowtie 进行序列比对。Bowtiesh 采用一种称为 Burrow-Wheeler 的压缩算法对参考基因组

序列进行索引,是目前效率最高的序列比较工具^[12]。本研究使用的参考基因组为人基因组 hg19,序列比对所设参数为: -m 1 -v 2 -best-strata (最多允许两个碱基错配、只保留单一位置匹配的序列结果)。使用软件 samtools^[13] 将 SAM 格式的比对结果压缩为 bam 格式。之后,去除冗余序列。

1.4 峰检测

峰信号检测是指搜索读段数特别集中的区域的过程,是分析 ChIP-seq 数据的一个关键步骤。本研究中分别以 NS_input 和 S_input 为对照,使用软件 MACS (Model-base Analysis of ChIP-seq)^[14] 检测 S_p53 样本中的峰信号区域,所设参数为 $P = 1.0 \times 10^{-5}$ 。同时利用 intersectBed^[15] 软件分析两组检测后得到的共同峰信号。

1.5 靶基因信息提取

Cistromes 生物分析平台是一个专门收集 ChIP 实验数据并定期更新,同时建立顺时作用元件的数据库^[16]。本研究中利用该平台分析共有峰信号区的保守 motif 所对应的转录因子,并利用自定义软件筛选该转录因子可能的靶基因。筛选条件为:基因上游 1 500 bp 或下游 500 bp 具有 p53 蛋白结合位点的即被认为是 p53 蛋白的靶基因。所用基因注释文件为 UCSC 来源的 RefSeq 基因注释文件。

1.6 靶基因功能分析

DIVID 是一个能为大规模的基因或蛋白列表提供系统综合的生物功能注释信息的在线数据库^[17]。本研究中利用 DAVID 对 p53 蛋白靶基因进行 GO (gene ontology,基因本体论) 功能注释和 KEGG (京都基因和基因组百科全书, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 通路富集分析,筛选标准为 $P < 0.05$ 。

1.7 蛋白互作网络分析

STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) 是一个预测蛋白质间功能相关性的在线数据库^[18]。本研究中利用 STRING 提取靶基因之间的相互作用关系 (score > 0.4),并用 cytoscape^[19] 软件可视化所得到的蛋白质互作网络。同时统计各节点的连通度。

2 结果与分析

2.1 峰检测结果

与 NS_input 样本组相比, S_p53 样本中共检测到 660 个峰信号区域;与 S_input 样本组相比, S_p53 样本中共检测到 627 个峰信号区域;进一步比较后发现两组中 520 个峰信号是相同的。

2.2 靶基因信息提取

根据 Cistrome 平台信息,520 个共有的峰信号区所对应的最显著的 motif 为 p53 蛋白(*TP53* 基因

产物)的结合区(见图 1)。这与设计实验时的预期结果一致。根据 RefSeq 基因注释文件,从这 520 个峰信号中共检测到 50 个可能的 p53 的靶基因。

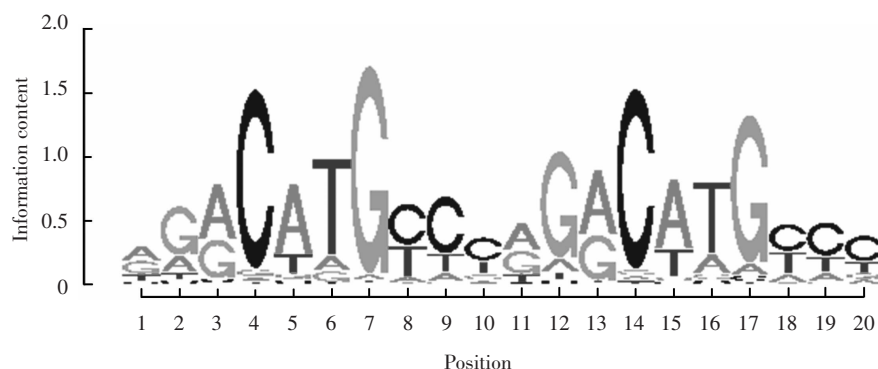


图 1 峰信号区的保守性 motif

Fig.1 The conserved motifs detected from peaks

2.3 靶基因功能分析结果

对所得到的 50 个靶基因进行通路富集分析后发现,其中 8 个靶基因分别富集到两个通路上,即 p53 信号转导通路和核苷酸切除修复通路(见表 1)。GO

功能注释分析发现这 50 个靶基因共富集到 41 个 GO 生物过程(BP)上。根据富集的显著性(*P* 值),前十个 GO 条目见表 2 所示。

表 1 靶基因的 KEGG 通路富集分析结果

Table 1 The result of KEGG pathway enrichment analysis experimental and control group

Term	Count	%	P-value	Genes
hsa04115:p53 signaling pathway	6	13.64	1.44×10^{-6}	<i>CDKN1A, BBC3, BAX, DDB2, MDM2, CCNG1</i>
hsa03420:Nucleotide excision repair	3	6.82	8.13×10^{-3}	<i>XPC, DDB2, PCNA</i>

表 2 靶基因 GO_BP 富集分析的部分结果

Table 2 The top 10 biological process terms according to GO functional annotation

Term	Count	%	P-value	Genes
GO:0006974~ response to DNA damage stimulus	11	25.00	1.18×10^{-8}	<i>TRIAP1, CDKN1A, XPC, BBC3, BAX, AEN, DDB2, PCNA, RPS27L, PHLDA3, REV3L</i>
GO:0008629~ induction of apoptosis by intracellular signals	6	13.64	1.83×10^{-7}	<i>CDKN1A, BBC3, BAX, AEN, RPS27L, PHLDA3</i>
GO:0030330~ DNA damage response, signal transduction by p53 class mediator	5	11.36	4.22×10^{-7}	<i>TRIAP1, BBC3, AEN, RPS27L, PHLDA3</i>
GO:0033554~ cellular response to stress	11	25.00	5.88×10^{-7}	<i>TRIAP1, CDKN1A, XPC, BBC3, BAX, AEN, DDB2, PCNA, RPS27L, PHLDA3, REV3L</i>
GO:0006915~ apoptosis	11	25.00	1.03×10^{-6}	<i>TRIAP1, MJC2, TNFRSF10C, KRT18, BBC3, BAX, AEN, KRT8, DRAM1, PHLDA3, TP53INP1</i>
GO:0012501~ programmed cell death	11	25.00	1.18×10^{-6}	<i>TRIAP1, MUC2, TNFRSF10C, KRT18, BBC3, BAX, AEN, KRT8, DRAM1, PHLDA3, TP53INP1</i>
GO:0042770~ DNA damage response, signal transduction	6	13.64	1.33×10^{-6}	<i>TRIAP1, XPC, BBC3, AEN, RPS27L, PHLDA3</i>
GO:0008219~ cell death	11	25.00	5.12×10^{-6}	<i>TRIAP1, MUC2, TNFRSF10C, KRT18, BBC3, BAX, AEN, KRT8, DRAM1, PHLDA3, TP53INP1</i>
GO:0016265~ death	11	25.00	5.45×10^{-6}	<i>TRIAP1, MUC2, TNFRSF10C, KRT18, BBC3, BAX, AEN, KRT8, DRAM1, PHLDA3, TP53INP1</i>
GO:0042771~ DNA damage response, signal transduction by p53 class mediator resulting in induction of apoptosis	4	9.09	5.90×10^{-6}	<i>BBC3, AEN, RPS27L, PHLDA3</i>

2.4 蛋白互作网络分析

利用 cytoscape 软件对提取的靶基因蛋白间相互作用关系进行可视化后,得到一个由 19 个基因构成的蛋白质相互作用网络(见图 2),其中连通度最高的前 10 个蛋白节点如表 3 所示,包括 *PCNA*, *CDKN1A*, *CCNG1*, *REV3L*, *MDM2* 等。

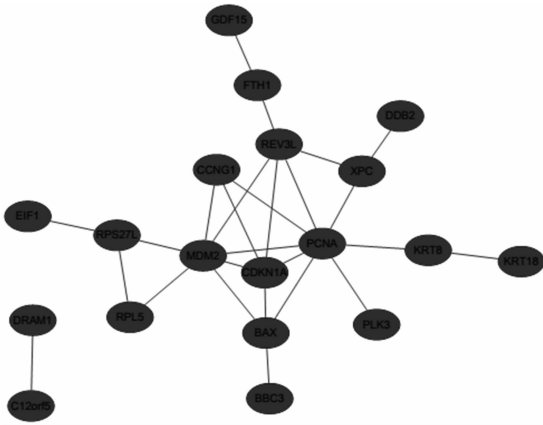


图 2 靶基因的蛋白互作网络

Fig.2 The protein-protein interaction network built with the predicted p53 target genes. An edge between two nodes indicates an interaction between the two proteins

表 3 蛋白质互作网络中连通度最高的前 10 个蛋白节点
Table 3 The top ten hubs with the highest degrees of connection within the protein-protein interaction network

蛋白	连通度
PCNA	8
MDM2	7
REV3L	5
CDKN1A	5
BAX	4
XPC	3
CCNG1	3
RPS27L	3
RPL5	2
FTH1	2

3 讨论

利用 Cistrome 分析得到的峰信号区域,发现最显著的 motif 是 p53 蛋白的结合区,说明 Nutlin-3a 处理野生型 p53 乳腺癌 MCF7 细胞后确实激活了 p53 参与的相关抑癌通路,进一步说明本研究中采用生物信息学方法分析 ChIP-seq 数据来揭示乳腺癌细胞中 p53 的抑癌分子机制是可行的。本研究中,通过

生物信息学分析,共得到 50 个 p53 的靶基因。其中 8 个靶基因分别富集到 p53 信号转导和核苷酸切除修复两个通路上,说明这两个通路都参与了 p53 的抑癌作用。

目前,普遍认为 *TP53* 激活后表达的 p53 蛋白(一种转录因子)主要通过两种途径实现抑癌作用。在第一种途径中 p53 蛋白可以通过抑制下游 *CDKN1*(周期蛋白依赖性激酶抑制因子 p21^{WAF1/Cip1})的活性,使正常的细胞周期阻滞在 G1 期,从而实现 *CDKN1* 依赖 p53 途径的肿瘤抑制作用^[20]。*CDKN1* 是一种依赖细胞周期蛋白 E 的激酶 2,属于 CDK 抑制因子家族。本研究通过生物信息学分析,检测到 *CDKN1A* 作为 p53 的靶基因,参与了 *TP53* 激活后的抑癌作用,说明该细胞周期控制途径在加入 Nutlin-3a 的乳腺癌细胞中被 p53 激活。在第二条途径中, p53 通过激活下游的 BCL-2 家族成员诱导细胞凋亡^[21-22]。BCL-2 类相关蛋白是一个决定细胞凋亡或存活的蛋白家族^[23]。本研究中, *BAX* 和 *BBC3*(BCL2-binding component 3, PUMA)被检测到作为 p53 的靶基因,参与了 *TP53* 被激活后的抑癌过程。*BAX* 和 *BBC3* 都是 BCL-2 家族中的促凋亡因子,能够诱导细胞凋亡^[22]。其中, *BBC3* 能够直接与 p53 结合而被激活,启动细胞凋亡^[24-25]。此外, *MDM2* 和 *CCNG1*(细胞周期蛋白 G 编码基因)也被检测到作为 p53 的靶基因参与了 p53 信号转导通路。之前的研究报道 *MDM2* 可以通过直接与 p53 结合或催化其泛素化而抑制其活性^[26]。*MDM2* 与 *P53* 之间存在着一种负反馈调节机制,即当 p53 高水平表达时,可以激活 *MDM2* 基因的表达,而 *MDM2* 表达产物可以与 p53 结合而抑制其功能。*CCNG1* 则可以通过磷酸化激活 *MDM2* 从而降低 *TP53* 的活性^[27]。

富集到核苷酸切除修复通路上的三个靶基因中, *DDB2*(DNA damage-binding protein 2)和 *XPC*(xeroderma pigmentosum group C-complementing protein)都是参与全基因组修复途径的基因。该 DNA 修复途径普遍存在于真核细胞中。*DDB2* 是 *XPE* 的一个亚单位。*DDB2* 和 *XPC* 蛋白对于该途径 DNA 修复过程中损伤位点的识别非常重要^[28]。有研究表明 p53 能在翻译水平调节 *DDB2* 和 *XPC* 的表达^[29-30]。富集到该通路中的第三个基因 *PCNA*,同时也是所构建的蛋白互作网络中连通度最高的节点基因,说明该基因在乳腺癌的发病机制中具有重要地位。*PCNA*(增殖细胞核抗原)是真核生物中 DNA 聚合酶 δ 的一种辅助因子,与 DNA 复制密切相关^[31-32]。由于肿瘤细胞具有很高的增殖活性, *PCNA* 常被作为评估肿瘤细胞增殖和预后的指标,

但这种相关在乳腺癌中并不明显^[33]。以上检测到的三个靶基因说明 Nutlin-3a 处理野生型 p53 乳腺癌 MCF7 细胞后激活了核苷酸切除修复通路,即全基因组 DNA 修复和复制参与了 p53 的抑癌作用。

本研究中采用的 ChIP-seq 数据的生物信息学方法能有效揭示野生型 p53 乳腺癌 MCF7 细胞中 Nutlin-3a 激活的 p53 的抗癌分子机制。*CDKN1A*、*BBC3*、*BAX*、*DDB2*、*MDM2*、*CCNG1*、*XPC* 和 *PCNA* 在 p53 的抑癌作用中可能有重要地位。

参考文献(References)

- [1] 唐志柳,白洁,顾丽娜,等. 2000~2010 年我国前列腺癌和乳腺癌流行状况的系统性综述 [J]. 中国肿瘤, 2013(4):260-265.
TANG Zhiliu, BAI Jie, GU Lina, et al. A Systematic Review: Epidemic status of prostate cancer and breast cancer from 2000 to 2010 in China [J]. China Cancer, 2013(4):260-265.
- [2] HOLLSTEIN M, SIDRANSKY D, VOGELSTEIN B, et al. p53 mutations in human cancers [J]. Science, 1991, 253(5015):49-53.
- [3] ISOBE M, EMANUEL B S, GIVOL D, et al. Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13 [J]. Nature, 1986, 320(6057):84-85.
- [4] SOUSSI T, CARON D F C, and MAY P. Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution [J]. Oncogene, 1990, 5(7):945.
- [5] ISSAEVA N, FRIEDLER A, BOZKO P, et al. Rescue of mutants of the tumor suppressor p53 in cancer cells by a designed peptide [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003, 100(23):13303-13307.
- [6] KUSSIE P H, GORINA S, MARECHAL V, et al. Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain [J]. Science, 1996, 274(5289):948-953.
- [7] KUMAMOTO K, SPILLARE E A, FUJITA K, et al. Nutlin-3a activates p53 to both down-regulate inhibitor of growth 2 and up-regulate mir-34a, mir-34b, and mir-34c expression, and induce senescence [J]. Cancer Research, 2008, 68(9):3193-3203.
- [8] PARK P J. ChIP-seq: advantages and challenges of a maturing technology [J]. Nature Reviews Genetics, 2009, 10(10):669-680.
- [9] 睦维国,何慧燕,晏强,等. ChIP-seq 技术在全基因组范围内分析膜性肾病患者组蛋白 H3K9 三甲基化状态的改变 [J]. 中国现代医学杂志, 2013, 23(32):50-56.
SUI Weiguo, HE Huiyan, YAN Qiang, et al. Genome-wide analysis of histone H3K9 trimethylation by ChIP-seq of membranous nephropathy patients [J]. China Journal of Modern Medicine, 2013, 23(32):50-56.
- [10] 董小明,郑巍巍,尹荣华,等. 利用 ChIP-seq 技术研究转录因子 EDAG 在全基因组的结合谱 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2013, 29(6):578-584.
DONG Xiaoming, ZHENG Weiwei, YIN Ronghua, et al. Genome-wide research on transcription factor EDAG binding profiling by using ChIP-seq [J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2013, 29(6):578-584.
- [11] 顾婷玉,何志颖,吴侠,等. ChIP-Seq 技术在研究转录因子调控干细胞分化中的应用 [J]. 中国细胞生物学学报, 2013, 35(6):870-879.
GU Yuting, HE Zhiying, WU Xia, et al. Analysis of transcription factors regulated stem cell differentiation by ChIP-Seq [J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2013, 35(6):870-879
- [12] LANGMEAD B, TRAPNELL C, POP M, et al. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome [J]. Genome Biol, 2009, 10(3):R25.
- [13] LI H, HANDSAKER B, WYSOKER A, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools [J]. Bioinformatics, 2009, 25(16):2078-2079.
- [14] ZHANG Y, LIU T, MEYER C A, et al. Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS) [J]. Genome Biol, 2008, 9(9):R137.
- [15] QUINLAN A R, HALL I M. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features [J]. Bioinformatics, 2010, 26(6):841-842.
- [16] LIU T, ORTIZ J A, TAING L, et al. Cistrome: an integrative platform for transcriptional regulation studies [J]. Genome Biol, 2011, 12(8):R83.
- [17] DENNIS G, JR., SHERMAN B T, HOSACK D A, et al. David: database for annotation, visualization, and integrated discovery [J]. Genome Biol, 2003, 4(5):3.
- [18] FRANCESCHINI A, SZKLARCZYK D, FRANKILD S, et al. STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration [J]. Nucleic Acids Res, 2013, 41(Database issue):D808-815.
- [19] KOHL M, WIESE S, WARSCHEID B. Cytoscape: software for visualization and analysis of biological networks [J]. Methods Mol Biol, 2011, 696:291-303.
- [20] ABBAS T, DUTTA A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities [J]. Nature Reviews Cancer, 2009, 9(6):400-414.
- [21] AGARWAL M L, TAYLOR W R, CHERNOV M V, et al. The p53 network [J]. Journal of Biological Chemistry, 1998, 273(1):1-4.
- [22] CORY S, HUANG D C, ADAMS J M. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis [J]. Oncogene,

- 2003, 22(53):8590-8607.
- [23] ADAMS J M, CORY S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival [J]. *Science*, 1998, 281(5381):1322-1326.
- [24] EGAN M F, GOLDBERG T E, KOLACHANA B S, et al. Effect of COMT Val108/158 Met genotype on frontal lobe function and risk for schizophrenia [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(12):6917-6922.
- [25] HUANG D C, STRASSER A. BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death [J]. *Cell*, 2000, 103(6):839-842.
- [26] JUVEN-GERSHON T, OREN M. Mdm2: the ups and downs [J]. *Molecular Medicine*, 1999, 5(2):71.
- [27] CHEN X. Cyclin G: a regulator of the p53-Mdm2 network [J]. *Developmental Cell*, 2002, 2(5):518-519.
- [28] KULAKSZ G, REARDON J T, SANCAR A. Xeroderma pigmentosum complementation group E protein (XPE/DDB2): purification of various complexes of XPE and analyses of their damaged DNA binding and putative DNA repair properties [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2005, 25(22):9784-9792.
- [29] ADIMOOLAM S, FORD J M. p53 and DNA damage-inducible expression of the xeroderma pigmentosum group C gene [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, 99(20):12985-12990.
- [30] HWANG B J, FORD J M, HANAWALT P C, et al. Expression of the p48 xeroderma pigmentosum gene is p53-dependent and is involved in global genomic repair [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999, 96(2):424-428.
- [31] LEONARDI E, GIRLANDO S, SERIO G, et al. PCNA and Ki67 expression in breast carcinoma: correlations with clinical and biological variables [J]. *J Clin Pathol*, 1992, 45(5):416-419.
- [32] ZHANG G, GIBBS E, KELMAN Z, et al. Studies on the interactions between human replication factor C and human proliferating cell nuclear antigen [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999, 96(5):1869-1874.
- [33] HALL P, LEVISON D, WOODS A, et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: An index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms [J]. *The Journal of pathology*, 1990, 162(4):285-294.