

小鼠 mdm2 的表达及活性鉴定

王晓杜¹, 赵阿勇¹, 邓绪芳², 马志永²

(1. 浙江农林大学 林业与生物技术学院, 浙江 临安 311300; 2. 中国农业科学院 上海兽医研究所, 上海 200241)

摘要: mdm2(murine double minute 2, 鼠双微体-2)是抑制 p53(肿瘤抑制因子)活性的重要分子之一, 它们之间相互作用对细胞的生存具有重要功能。克隆得到小鼠 *Mus musculus* mdm2 cDNA, 构建其真核表达载体 p3xFLAG-CMV-7.1-mdm2, Western blotting 验证其在真核细胞中的表达大约为 60 kDa 的蛋白表达产物, 间接免疫荧光技术检测 mdm2 的表达和亚细胞定位, mdm2 主要在细胞核内表达。利用 p53 蛋白泛素化试验和 p53 报告基因活性检测试验, 验证了 FLAG-mdm2 的活性, 构建了 mdm2 调节 p53 泛素化和抑制 p53 活性的细胞模型, 为研究 p53 活性调控、mdm2 与 p53 相互作用等提供了基础和手段。图 5 参 15

关键词: 动物学; mdm2 表达; mdm2 活性; 细胞模型

中图分类号: Q952; S865.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-0756(2012)02-0155-06

Expression and activity analysis of mouse mdm2

WANG Xiao-du¹, ZHAO A-yong¹, DENG Xu-fang², MA Zhi-yong²

(1. School of Forestry and Biotechnology, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 2. Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Science, Shanghai 200241, China)

Abstract: The mdm2 (murine double minute 2) is one of the factors inhibiting p53 activity, and their interaction is important to hold cell survival. In this paper, mouse *mdm2* gene was cloned from mouse 3T3 cell strain, and the recombinant plasmid p3xFLAG-CMV-7.1-mdm2 was constructed and confirmed by restriction enzyme digestion and DNA sequencing. Western blotting analysis and indirect immune-fluorescent analysis showed that FLAG-mdm2 expressed in p3xFLAG-CMV-7.1-mdm2-transfected H1299 cells, which was 60 kDa in size and dominantly localized in nucleus. The activity of FLAG-mdm2 protein was confirmed by p53 ubiquitination assay and luciferase assay. The result showed that mdm2 cell model inhibiting p53 activity is established. Our results would be useful for studying the mdm2 biological function in regulating p53 activity and interaction between mdm2 and p53. [Ch, 5 fig. 15 ref.]

Key words: zoology; mdm2 expression; mdm2 activity; cell model

p53(肿瘤抑制因子)是细胞内信号转导网络中最重要的分子, 它在细胞周期调控、DNA 损伤修复、细胞衰老、细胞凋亡等方面具有重要功能, 是最重要的肿瘤抑制因子^[1]。p53 作为转录激活因子, 其活性受到自身修饰的影响, 包括磷酸化、泛素化、乙酰化、甲酰化等^[2]。mdm2(murine double minute 2, 鼠双微体基因-2)作为其主要的泛素化分子, 主要功能是调节 p53 的泛素化和抑制 p53 转录活性。mdm2 分子是一个调节 p53 泛素化的 E3 泛素化连接酶^[3]。它是由 1 476 bp 编码的, 由 491 个氨基酸残基组成的蛋白质, 其结构包括 p53 绑定域、锌指结构域、RING 结构域、核定位和核输出序列等不同功能域, 在调节 p53 活性方面发挥重要作用^[4]。mdm2 调节 p53 活性表现在 2 个方面: 一是增加 p53 蛋白泛素化以减

收稿日期: 2011-07-20; 修回日期: 2011-10-26

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(Y3110124); 浙江农林大学人才启动基金资助项目(2010FR080)

作者简介: 王晓杜, 博士, 从事实验动物研究。E-mail: xiaoduwang@163.com。通信作者: 马志永, 研究员, 博士, 博士生导师, 从事动物病毒和宿主细胞相互作用关系研究。E-mail: zhiyongma@shvri.ac.cn

少其稳定性；二是通过与 p53 绑定抑制转录活性^[5]。细胞内恒量水平的 p53 发挥维持细胞稳态的作用，而当发生应激时，p53 水平明显升高，细胞为了防止其过分升高，建立起了一套调节 p53 活性的精巧机制，从而使细胞生存下去，mdm2 就是这个过程中的主要负性调节因子之一^[4]。因此，研究在应激条件下 p53 的功能，了解 p53 活性变化机制，建立一个 mdm2 抑制 p53 活性的细胞模型是十分重要的手段之一。本研究拟克隆小鼠 *Mus musculus* 的 *mdm2* cDNA，构建重组真核表达载体，并在哺乳动物细胞中表达，验证该蛋白的 E3 连接酶活性和抑制 p53 活性的能力，建立 mdm2 抑制 p53 活性的细胞模型，为研究 mdm2 活性、mdm2 与 p53 之间的相互作用和 mdm2 对 p53 活性调节等相关研究提供技术手段。

1 材料和方法

1.1 材料

小鼠 3T3，H1299 细胞株购于中国科学院上海细胞保藏中心。

质粒：p3xFLAG-CMV-7.1，pEGFP-N1-p53 由浙江农林大学林业与生物技术学院实验室保存。

常用的酶和试剂：AMV(avian myeloblastosis virus，禽骨髓母细胞瘤病毒)反转录酶、PCR(polymerase chain reaction，聚合酶链式反应)扩增用 *Taq* 酶购自宝生物公司；lipofectamine 2 000 转染试剂购于 Invitrogen 公司；DMEM (Dulbecco's modified eagle edium)和胎牛血清购于 Gibco 公司；ECL(electrochemiluminescens)发光试剂盒和 BCA (bicinchoninic acid) 试剂盒购于 Pierce 公司；质粒 DNA 中提试剂盒购于 Nucleobond AX 公司；Promega's Steady-Glo® 荧光素酶检测试剂盒购于 Promega 公司。

各种抗体：小鼠抗 p53 单克隆抗体(Do-1)，小鼠抗 mdm2(SMP-14)，小鼠抗 FLAG，小鼠抗 GFP(green fluorescent protein，绿色荧光蛋白融合单链抗体)，小鼠抗 β -actin 抗体，HRP(horseradish peroxidase，辣根过氧化物酶)标记的羊抗小鼠 IgG，HRP 标记的羊抗兔 IgG，TFITC(fluorescein isothiocyanate，异硫氰酸荧光素)标记的羊抗小鼠 IgG 等抗体购于 Santa Cruz 公司。

其他试剂采用国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 基因克隆及重组质粒的构建 刮取单层培养的小鼠 3T3 细胞样品后，采用 Trizol 试剂盒提取细胞总核糖核酸(RNA)，利用 olig(d)T 作为反转录引物合成 cDNA。以此 cDNA 为模板，利用引物(Forward: 5'-TCTGAATTCGATGTGCAATACCAAC-3'，Reverse: 5'-GCGGTGACCTAGTTGAAGTAAGTT-3')进行 PCR 扩增 *mdm2* 基因的全长编码区。PCR 程序为：94℃ 5 min；94℃ 40 s，56℃ 40 s，72℃ 2min，运行 35 个循环；72℃ 10 min；10℃ 5 min。PCR 产物分别用 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切后，与相应的双酶切 p3xFLAG-CMV-7.1 载体相连接，转化大肠埃希菌 *Escherichia coli* DH5 α 。挑取单菌落扩大培养，然后分别用菌落 PCR 和质粒酶切鉴定阳性克隆，并将阳性克隆送去上海英骏生物公司进行 DNA 测序。结果表明：获得 *mdm2* 的重组真核表达载体 p3xFLAG-CMV-7.1-*mdm2*。

1.2.2 细胞转染与蛋白免疫印迹(Western blotting) 真核表达质粒(p3xFLAG-CMV-7.1-*mdm2* 和 pEGFP-N1-p53 等)转染细胞：取质粒 2.0 g 和 2.0 L 脂质体在 200.0 L 无血清培养基中混匀，室温作用 20 min；在六孔板中单层培养的 H1299 细胞长满后，去掉培养液，PBS(phosphate buffer solution，磷酸盐缓冲溶液)洗涤 2 次，然后，加入真核表达质粒和脂质体混合液，在 37℃ 培养 4~6 h 后更换完全培养基，继续培养 24 h，然后按照下面方法收集各种细胞样品。

培养细胞样品的制备：去掉培养液，PBS 洗涤 2 次，然后加 1.0 mL PBS，用细胞刮铲刮下细胞，收集细胞放入 1.5 mL EP(epoxy epoxide，环氧树脂)管中，4℃ 3 000 r·min⁻¹ 离心 5 min，小心去掉上清，-70℃ 保存或进行下一步操作。收集的细胞加入适量的裂解液，冰上裂解 5 min，超声裂解 1~2 s，煮沸 5 min，4℃ 离心 10 min，转移上清至新的 EP 管中。取 2.0 L 用 BCA 试剂盒测定总蛋白浓度，加 5× 上样缓冲溶液煮沸 5 min，4℃ 高速离心 10 min，取上清-20℃ 储存。SDS-PAGE(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis，十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶)电泳和转印：按照分子克隆实验指南上的方法进行 SDS-PAGE，上样 30.0 μ g·样品⁻¹，同时采用彩色预染蛋白质标记(marker)作为指示。电泳完成后，卸下凝胶浸泡在转印缓冲液中，剪下与胶同样大小的 NC(nitrocellulose filter membrane，硝酸纤维素膜)膜和滤纸，在转印缓冲液浸泡 15~20 min。按照从负极到正极先滤纸—胶—NC 膜—滤纸安装好三明治夹心后，放

在全湿转印槽中, 65 V 恒压转印 2~3 h。封闭、一抗及二抗处理: 转印完毕后, 取下 NC 膜, 放在 $50.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 脱脂乳的 TBST(tris-buffered saline Tween-20)溶液(封闭液)中封闭 2 h, 用含有 $2.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Tween-20 的 Tris (三羟甲基氨基甲烷)缓冲液(TBST 洗涤缓冲液)洗涤 2 次($5 \text{ min}\cdot\text{次}^{-1}$)。加入 1:4 000 稀释的一抗(小鼠抗 p53, 小鼠抗 FLAG, 小鼠抗 GFP, 小鼠抗 *mdm2* 等), $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜轻摇振荡。回收一抗后, NC 膜用 TBST 洗涤 3 次, 加入带有 HRP 标记的羊抗小鼠二抗 (1:10 000 稀释), 室温反应 1 h, TBST 洗涤 5 次。显色: 显色利用 ECL 发光试剂盒在暗室中进行。试剂盒中 A 液和 B 液等体积混合后, 滴在上述 NC 膜上, 轻微摇动混匀 5 min, 放入暗盒中, 然后压上 X 光胶片, 根据亮度确定曝光时间。曝光完成后, 在显影液中显影待条带出现后, 放入定影液中定影 2~3 min。胶片洗涤晾干后标记蛋白质标记, 扫描胶片并进行剪辑。转印(reblotting): 上述显完色的膜, 加入 5.0 mL 脱膜缓冲液(reblotting buffer)或 Stripping 缓冲液($100 \text{ mmol } \beta\text{-mercapto-ethanol}$, $20.0 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ SDS, $62.5 \text{ mmol Tris-Cl pH } 6.8$), $55 \text{ }^\circ\text{C}$ 反应 30 min, TBST 洗涤 2 次后, 加入封闭液, 然后按照上述过程, 更换一抗和二抗, 可以进行第 2 次显色。

1.2.3 间接免疫荧光染色 在盖玻片上培养 H1299 细胞, 转染 2.0 g 的质粒 24 h 后, 体积分数为 4% 甲醛: 体积分数为 10% 甲醇(1:1)混合液固定 30 min, PBS 洗涤 3 次, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 下用体积分数为 1% NP40(乙基苯基聚乙二醇)处理 30 min, PBS 洗涤 3 次, $100.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 山羊血清 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 封闭 30 min, PBS 洗涤 3 次, 1:100 比例稀释的一抗(小鼠抗 FLAG 抗体) $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 30 min, PBS 洗涤 3 次, 羊抗小鼠 FITC 标记的二抗(1:500) $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 30 min, TBS 洗涤 3 次, DAPI 室温染色 10 min, 封片剂封片, 荧光显微镜下观察目的蛋白表达和亚细胞定位情况。

1.2.4 荧光素酶活性测定 各种试验质粒(pEGFP-N1-p53, p3xFLAG-CMV7.1-*mdm2*)和 p53 荧光素酶报告基因质粒(p53-Luc), Rinna 质粒(pRL-TK), 采用脂质体方法在 H1299 细胞上进行共转染, 24 h 后收集细胞样品, 然后按照 Promega 公司双荧光素酶报告系统检测试剂盒的方法, 在 Modulus 多功能检测仪上检测 p53 的相对荧光素酶活性, 对获得数据进行 *t* 检验等统计分析。

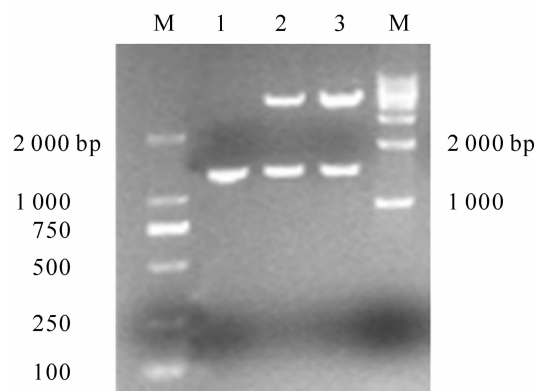
2 结果与分析

2.1 小鼠 *mdm2* 基因的克隆

由于在小鼠 3T3 细胞中, *mdm2* 的 mRNA 表达很多, 所以本试验以该细胞为材料, 提取其总 RNA, 反转录为 cDNA, 再以 cDNA 为模板, 以 1.1.1 中的引物, PCR 扩增获得大约 1 500 bp 的片段(图 1), 以 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切, 把片段亚克隆到 p3xFLAG-CMV-7.1 真核表达载体上, 酶切和测序结果表明: 重组真核表达质粒 p3xFLAG-CMV-7.1-*mdm2* 构建成功(图 1)。所得序列经过 NCBI(美国国家生物技术信息中心)上的 Blast 软件比对, 结果表明: 本实验所得到 *mdm2* 核苷酸序列与 NCBI 公布的小鼠 *mdm2* 序列(NM_010786) 100% 同源。

2.2 小鼠 *mdm2* 蛋白真核表达

重组真核表达质粒 p3xFLAG-CMV7.1-*mdm2* 和 pEGFP-N1-p53 转染 H1299 细胞, 采用蛋白免疫印迹(Western blotting)和间接免疫荧光方法检测 *mdm2* 的表达和亚细胞定位, 分别采用 FLAG-vector(p3x-FLAG-CMV-7.1), GFP-vector(pEGFP-N1)作为阴性对照, 空载体 FLAG-vector 表达的 FLAG 片段太小无法检测到, 而 GFP-vector 能表达大约 27 kDa 蛋白。实验结果表明: 在 Western-blotting 试验中, 用抗 FLAG 抗体检测 FLAG-*mdm2*, 在发现大约 60 kDa 有一条特异条带(图 2), 抗 p53(Do-1)抗体检测 GFP-p53, 发现一条大约 80 kDa 处的特异性条带(GFP+p53 大小为 79 kDa)。本试验以 GFP-p53 蛋白表达作为对照, *mdm2* 蛋白大小与文献报道基本一致^[3]。间接免疫荧光检测中, 利用小鼠抗 FLAG 抗体为一抗检



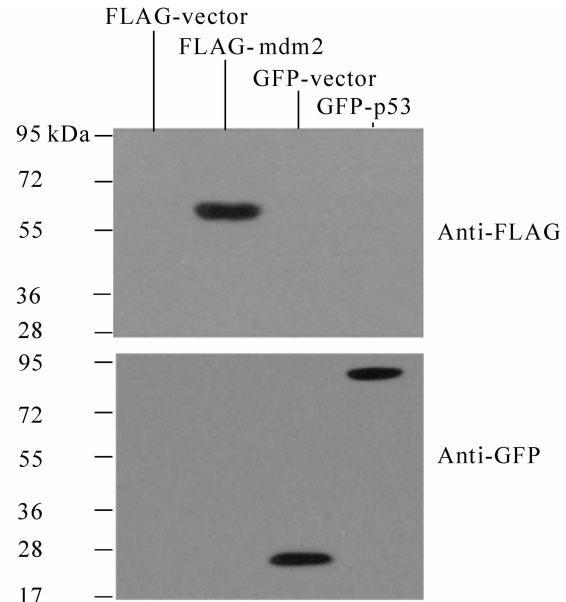
M. DNA 梯度标记; 1. 小鼠 *mdm2* 基因 PCR 产物; 2~3. p3xFLAG-CMV7.1-*mdm2* 酶切结果。

图 1 重组表达质粒 p3xFLAG-CMV7.1-*mdm2* 的构建
Figure 1 Construction of recombinant plasmid p3xFLAG-CMV7.1-*mdm2*

测 FLAG-mdm2 表达和定位, DAPI 染细胞核。结果表明: mdm2 主要在细胞核中表达(图 3)。mdm2 蛋白具有核定位序列, 这种细胞核定位可能与其绑定和调节 p53 活性的生理功能密切相关。

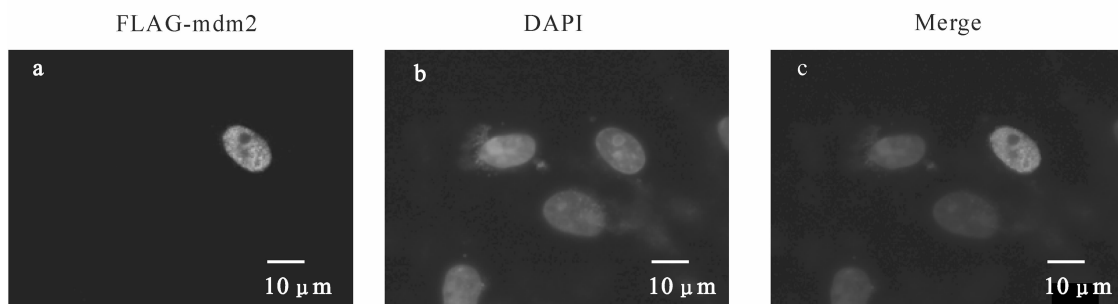
2.3 小鼠 mdm2 蛋白提高 p53 泛素化水平

mdm2 作为 E3 连接酶, 其主要功能体现在促进 p53 蛋白的泛素化, 从而促进 p53 的降解, 所以 p53 泛素化水平变化是衡量 mdm2 活性的重要手段。本试验把 p3xFLAG-CMV-7.1-mdm2 和 pEGFP-N1-p53 质粒按照一定量的比例转染 H1299 细胞, 转染 8 h 后添加泛素化酶抑制剂 MG132 ($10.0 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 18 h 后收集细胞样品, 以小鼠抗 p53 (Do-1) 抗体为一抗, Western blotting 检测 p53 泛素化水平。结果表明: 在阴性对照中, p53 泛素化水平几乎没有变化, 这可能与 mdm2 在正常细胞中表达量低有关, 而转染表达 mdm2 细胞中, 不但 mdm2 表达量较大, p53 的泛素化水平也得到提高(图 4)。并且随着 mdm2 表达量的增加, p53 泛素化水平逐步增加, 表明 p53 的泛素化对 mdm2 的表达水平表现出一定的依赖性。



分别用 FLAG-vector(p3xFLAG-CMV-7.1), p3xFLAG-CMV-7.1-mdm2, GFP-vector(pEGFP-N1) 和 pEGFP-N1-p53 转染 H1299 细胞, 抗 FLAG 抗体和抗 GFP 抗体检测了重组蛋白的表达。

图 2 Western blotting 检测 FLAG-mdm2 的表达
Figure 2 Expression of recombinant protein FLAG-mdm2 detected by Western blotting



p3x FLAG-CMV-7.1-mdm2 质粒转染 H1299 细胞, 分别用抗 FLAG 抗体和 DAPI 进行标记和染色。
a. FLAG-mdm2(绿色); b. DAPI(细胞核蓝色); c. a 和 b 重叠整合的图片。

图 3 间接免疫荧光检测 FLAG-mdm2 的表达和亚细胞定位

Figure 3 Subcellular localization and expression of FLAG-mdm2 indicated by indirect immunofluorescence

2.4 小鼠 mdm2 蛋白抑制 p53 转录活性

mdm2 的另一功能是抑制 p53 蛋白的转录活性, 那么采用 p53 报告基因系统可以检测 mdm2 调节 p53 活性的变化, 从而判断 mdm2 是否具有活性。本试验把 FLAG-vector (p3xFLAG-CMV-7.1), GFP-vector (pEGFP-N1), pEGFP-N1-p53, p3xFLAG-CMV7.1-mdm2, p53-Luc 和内参质粒 pRL-TK 按照一定比例转染 H1299 细胞, 收集细胞样品后, 利用 Promega 公司的试剂盒检测 p53 的相对转录活性, 结果表明在无 mdm2 表达时, p53 蛋白的转录活性较高, 在有 mdm2 蛋白表达时, p53 的转录活性较低(图 5), 验证了 mdm2 对 p53 转录活性的抑制作用。因此, 也证明我们克隆表达的鼠 mdm2 具有完整的生物学功能, 建立了 mdm2 蛋白抑制 p53 活性的细胞模型。

3 讨论

mdm2 在细胞稳态调节中发挥重要作用, 正是它的负向调节作用, 控制了 p53 活性过高而损伤细胞。在人类肿瘤疾病中, 7% 是由于 mdm2 的过表达造成的, 而且在 mdm2 启动子的 309 位 SNP(single-

nucleotide polymorphism)能导致 *mdm2* 转录水平增加, 从而导致该人群患肿瘤的几率增加 [6]。p53 蛋白作为转录因子又能促进 *mdm2* 的转录和表达, 形成一个负反馈调节环 [7]。外界因素刺激机体或细胞可以改变它们之间的这种调节机制, 打破该平衡之后果就是导致肿瘤的发生或疾病的蔓延与恶化 [8]。因此, *mdm2* 可以作为肿瘤治疗的靶标, Nutlin 3a [9], HLI98 [10] 是与 *mdm2* 结合的小分子, 能够干扰 p53 和 *mdm2* 之间的相互作用, 具有治疗肿瘤疾病潜在药物的可能。病原微生物也能打破这种平衡, 从而使其能够逃逸机体的先天性免疫机能。如呼吸道合胞病毒 [11]、人巨细胞病毒 [12]、流感病毒 [13] 等病毒能通过干扰 *mdm2* 和 p53 之间的相互作用调节 p53 活性, 使 p53 的活性增加, 进而使病毒复制免受机体先天性免疫机制的影响。

本研究从小鼠的 3T3 细胞中克隆了小鼠 *mdm2* cDNA, 并把该基因编码区亚克隆到真核表达质粒上, 使重组 FLAG-*mdm2* 蛋白在哺乳动物细胞中得以表达, 利用间接免疫荧光的方法观测了重组蛋白的亚定位, 发现 *mdm2* 主要定位在细胞核内, 这可能与参与 p53 活性调节的功能密切相关。*mdm2* 的活性主要体现在提高 p53 泛素化水平和抑制 p53 转录活性 [5]。本研究使 *mdm2* 和 p53 共表达, 通过检测 p53 的泛素化水平, 发现 *mdm2* 能明显提高 p53 泛素化水平, 两者之间具有一定的剂量依赖性。本文还利用报告基因系统验证了 *mdm2* 抑制 p53 相对荧光素酶活性, 从而证明本实验成功构建了 *mdm2* 抑制 p53 活性的细胞模型。此模型, 将为进一步研究 *mdm2* 活性和功能、*mdm2* 与 p53 相互作用、p53 活性位点突变等与 p53 活性调节的研究提供了工具, 同时也为今后研究微生物因子干扰 *mdm2* 和 p53 相互作用, 逃逸 p53 的抗病毒作用 [14] 和机体先天性免疫 [15] 相关研究提供了技术手段, 为今后开展抗肿瘤药物筛选、病毒致病机理等研究提供基础。

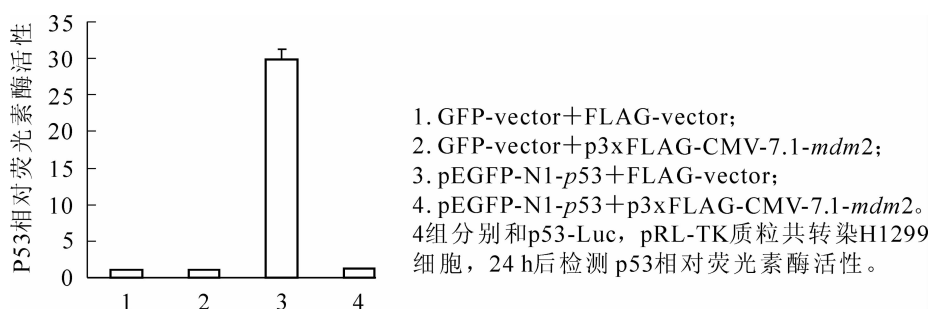
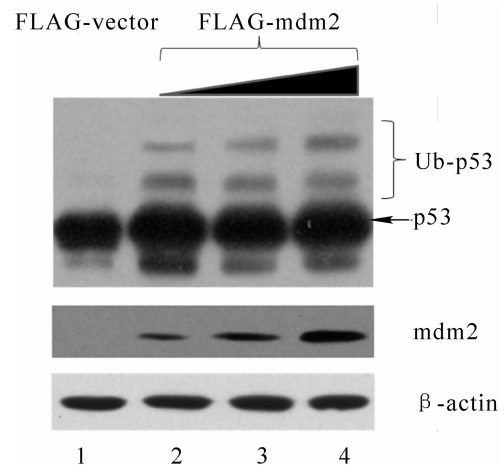


图 5 *mdm2* 抑制 p53 的转录活性

Figure 5 Inhibitory effect of *mdm2* on p53-mediated transcriptional activity by luciferase assay

参考文献:

- [1] GREEN D R, KROEMER G. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53 [J]. *Nature*, 2009, **458**: 1127 - 1130.
- [2] BROOKS C L, GU Wei. Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2003, **15**: 164 - 171.
- [3] HAUPT Y, MAYA R, KAZAZ A, *et al.* Mdm2 promotes the rapid degradation of p53 [J]. *Nature*, 1997, **387**: 296 - 299.
- [4] COUTTS A S, ADAMS C J, LA THANGUE N B. p53 ubiquitination by mdm2: a never ending tail? [J]. *DNA Repair*, 2009, **8** (4): 483 - 490.
- [5] MOMAND J, ZAMBETTI G P, OLSON D C, *et al.* The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated trans-activation [J]. *Cell*, 1992, **69**: 1237 - 1245.



泳道1: FLAG-vector(p3xFLAG-CMV-7.1) 阴性对照; 泳道2~4: 不同剂量p3xFLAG-CMV-7.1-*mdm2*转染真核细胞; Ub-p53: 泛素化p53; mdm2: 小鼠抗FLAG抗体检测mdm2的表达; β -actin: 蛋白上样量对照。

图 4 FLAG-*mdm2* 调节 p53 多泛素化

Figure 4 Polyubiquitination of p53 in p3xFLAG-CMV-7.1-*mdm2* transfected cells

- [6] BOND G L, HU Wenwei, BOND E E, *et al.* A single nucleotide polymorphism in the mdm2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans [J]. *Cell*, 2004, **119**: 591 – 602.
- [7] PICKSLEY S M, LANE D P. The p53-mdm2 autoregulatory feedback loop: a paradigm for the regulation of growth control by p53? [J]. *BioEssays*, 1993, **15**: 689 – 690.
- [8] LUKASHCHUK N, VOUSDEN K H. Ubiquitination and degradation of mutant p53 [J]. *Mol Cell Biol*, 2007, **27**: 8284 – 8295.
- [9] VASSILEV L T, VU B T, GRAVES B, *et al.* In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of mdm2 [J]. *Science*, 2004, **303**: 844 – 848.
- [10] YANG Yiyi, LUDWIG R L, JENSEN J P, *et al.* Small molecule inhibitors of hdm2 ubiquitin ligase activity stabilize and activate p53 in cells [J]. *Cancer Cell*, 2005, **7**: 547 – 559.
- [11] ECKARDT-MICHEL J, LOREK M, BAXMANN D. The fusion protein of respiratory syncytial virus triggers p53-dependent apoptosis [J]. *J Virol*, 2008, **82** (7): 3236 – 3249.
- [12] CHEN Zhenping, KNUTSON E, WANG Shuo, *et al.* Stabilization of p53 in human cytomegalovirus-initiated cells is associated with sequestration of hdm2 and decreased p53 ubiquitination [J]. *J Biol Chem*, 2007, **282**: 29284 – 29295.
- [13] TURPIN E, LUKE K, JONES J, *et al.* Influenza virus infection increases p53 activity: role of p53 in cell death and viral replication [J]. *J Virol*, 2005, **79** (14): 8802 – 8811.
- [14] MUNOZ-FONTELA C, GARCIA M A, GARCIA-CAO I, *et al.* Resistance to viral infection of super p53 mice [J]. *Oncogene*, 2005, **24**: 3059 – 3062.
- [15] TAKAOKA A, HAYAKAWA S, YANAI H, *et al.* Integration of interferon- α/β signaling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence [J]. *Nature*, 2003, **424**: 516 – 523.