

参赛学生姓名：赵晗聿

中学：中国人民大学附属中学

省份：北京

国家/地区：中国

指导老师姓名：杜鹏

指导老师单位：北京大学生命科学学院

指导老师姓名：田双杰

指导老师单位：北京理工大学附属中学

论文题目：跨物种 p53 蛋白筛选及其在非小
细胞肺癌中的抑癌功能研究

跨物种 p53 蛋白筛选及其在非小细胞肺癌中的抑癌功能研究

赵晗聿¹ 温汉光² 田双杰³ 杜鹏^{2,4}

¹ 中国人民大学附属中学, 北京, 100080; ² 北京大学前沿交叉学科研究院生命科学联合中心, 北京 100871; ³ 北京理工大学附属中学, 北京 100089; ⁴ 北京大学生命科学学院 北京, 100871

摘要

非小细胞肺癌约占全部肺癌的 80%-84%, *TP53* 突变导致的功能缺失是该肺癌发生的主要原因之一, 而以恢复 p53 功能为核心的基因治疗策略仍面临蛋白稳定性差、转录活性不足等瓶颈。自然界中不同物种的 p53 同源蛋白在结构和功能上存在显著分化, 部分物种展现出卓越的抗肿瘤特性, 提示跨物种来源的 p53 变体可能具备独特的抑癌优势。本研究以在癌症发生能力存在显著差异的物种中挖掘高效抑癌 *TP53* 功能变体为目标, 在非小细胞肺癌 H1299 细胞中外源表达不同物种来源的 p53 蛋白, 系统对比异源 p53 与人源 p53 (以下简称 Hop53) 对肿瘤细胞增殖及基因表达的调控差异, 并通过转录组测序解析其潜在作用机制, 为基于弥补 p53 为基础的肿瘤基因治疗提供分子靶点。

结果表明, 本研究从侏儒鮃、澳洲针鼹、双条吻蚓、果蝇、鲢鱼和鲨鱼中共筛选得到 6 种异源 p53 蛋白, 其中 2 种蛋白的对非小细胞肿瘤增殖抑制效果显著优于人源 Hop53; 其中表现最优的是从癌症发生率很低的鲨鱼克隆来源的 p53 (以下简称 Ccp53) 能够逃逸 MDM2 介导的泛素化降解, 且对下游周期蛋白依赖性激酶抑制因子 1A (Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A, CDKN1A) 等功能基因的转录激活能力显著强于 Hop53。另一方面, Ccp53 不会抑制正常肺上皮细胞 BEAS-2B 的增殖。

综上所述, 本研究明确了不同物种 p53 蛋白对非小细胞肺癌 H1299 细胞的增殖抑制功能存在显著差异, 证实 Ccp53 等天然变体具有更高效的抑癌作用, 为筛选高效抑癌 p53 变体、突破人源 *TP53* 基因治疗的疗效瓶颈提供了新的候选分子与理论依据。

关键词: *TP53* (p53), 非小细胞肺癌, 跨物种基因工程

Abstract

Non-small-cell lung cancer (NSCLC) accounts for approximately 80%-84% of all lung cancers. Loss-of-function mutations in *TP53* represent one of the major drivers of NSCLC pathogenesis. Nevertheless, gene-therapy strategies centered on restoring p53 function still face bottlenecks including poor protein stability and insufficient transcriptional activity. Homologous p53 proteins from distinct natural species exhibit substantial structural and functional divergence, and some species display remarkable anti-tumor properties, suggesting that cross-species p53 variants may possess unique tumor-suppressive advantages. This study aims to identify potent tumor-suppressive *TP53* functional variants from species with markedly different cancer susceptibility. We exogenously expressed p53 proteins derived from diverse species in H1299 NSCLC cells, and systematically compared heterologous p53 orthologs with human p53 (hereafter referred to as Hop53) in their regulatory effects on tumor-cell proliferation and gene expression. Transcriptome sequencing was applied to dissect the underlying mechanisms, providing molecular candidates for p53-compensatory tumor gene therapy.

Our results identified six heterologous p53 proteins from the *Suncus etruscus*, *Tachyglossus aculeatus*, *Rhinatrema bivittatum*, *Drosophila melanogaster*, *Megalops cyprinoides* and *Carcharodon carcharias*. Two of these orthologs exerted significantly stronger proliferation-inhibitory effects on NSCLC tumor cells than human Hop53. Among them, shark-derived p53 (hereafter designated Ccp53), which originates from a species with extremely low cancer incidence, could evade MDM2-mediated ubiquitination and degradation. Moreover, Ccp53 showed markedly higher transcriptional-activation capacity toward downstream functional genes such as cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (*CDKN1A*) compared with Hop53. On the other hand, Ccp53 did not suppress the proliferation of normal lung epithelial BEAS-2B cells.

In summary, this study demonstrates significant functional differences in proliferation suppression toward H1299 NSCLC cells among p53 orthologs from different species. It validates that natural variants such as Ccp53 confer superior tumor-suppressive activity, offering novel candidate molecules and theoretical foundations for screening potent p53 variants and overcoming therapeutic bottlenecks of *TP53*-based gene therapy for cancer.

Key words: Tumor protein p53, Non-small-cell lung cancer (NSCLC), Cross-species genetic engineering

目录

摘要	1
Abstract	2
目录	4
1 研究背景	5
1.1 p53 功能缺失是肺癌发生发展的重要诱因	5
1.2 p53 靶向抗肿瘤治疗的临床研究进展与瓶颈	6
1.3 目的与意义	7
2 材料与方法	8
2.1 实验材料	8
2.2 实验试剂	8
2.3 细胞培养	8
2.4 慢病毒转染	9
2.5 细胞增殖实验	9
2.6 TRIZOL 法提取动物细胞总 RNA	9
2.7 荧光定量 PCR	10
2.8 Western blotting 检测	10
3 实验结果	12
3.1 哺乳动物源 p53 蛋白筛选及表达	12
3.2 侏儒鮡鰭源 p53 有效抑制非小细胞肺癌 H1299 增殖	14
3.3 非哺乳动物源 p53 蛋白筛选及表达	16
3.5 鲨鱼源 p53 有效抑制非小细胞肺癌 H1299 增殖	18
3.6 鲨鱼源 p53 不影响正常肺上皮细胞 BEAS-2B 生长及靶基因表达	20
4 讨论	22
参考文献	24
致谢	26

1 研究背景

1.1 p53 功能缺失是肺癌发生发展的重要诱因

恶性肿瘤是威胁全球生命健康的重大公共卫生问题。国际癌症研究机构 (International Agency for Research on Cancer, IARC) 数据显示, 2022 年全球新增癌症病例约 2000 万例, 癌症相关死亡约 970 万例¹。肺癌是发病率和死亡率最高的癌种之一, 其中非小细胞肺癌 (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC) 约占全部肺癌的 80%-84%²。

p53 蛋白是肿瘤发生发展中最为关键的抑癌因子之一, 人源 p53 由 *TP53* 基因编码, 包含 393 个氨基酸, 自 N 端至 C 端依次划分为反式激活结构域 (TAD)、DNA 结合结构域 (DBD)、四聚化结构域 (TET) 及 C 末端调控结构域³。其发挥功能时, 依赖 DBD 精准识别靶基因启动子区的特异性 DNA 序列, 并通过 TET 寡聚化形成具有转录活性的四聚体, 最终由 TAD 招募共激活因子启动下游抑癌转录程序。因其在维持基因组稳定性中的关键作用, 被冠以“基因组守护者”之称。在生理状态下, E3 泛素连接酶 MDM2 通过直接结合 p53 并介导其泛素化降解, 将 p53 维持在较低的基础水平, 从而防止过度抑癌信号干扰正常细胞周期^{4,5}。而当 DNA 损伤等应激信号出现时, ATM、ATR 等上游激酶磷酸化 p53, 阻断其与 MDM2 的互作, p53 遂在胞内积累并迅速激活下游抑癌网络。

在人类肿瘤中, *TP53* 是突变频率最高的基因之一。在我国与美国患者群体中, *TP53* 突变检出率分别约为 51% 与 34%, 均为各自人群中最常发生突变的肿瘤相关基因^{6,7}。其中肺癌小细胞肺癌 (Small Cell Lung Cancer, SCLC) 的 *TP53* 突变率高达约 89%, NSCLC 亦可达 55%⁸。*TP53* 突变不仅使野生型 p53 的抑癌功能丧失, 部分突变体甚至获得促癌的“功能获得”特性, 加之 MDM2 在多种肿瘤中的异常高表达, 使得依赖恢复内源 p53 功能的治疗策略面临巨大挑战。

值得注意的是, p53 的抑癌功能并非人类基因组所独有。在漫长的物种进化过程中, 不同脊椎动物的 p53 同源蛋白在氨基酸序列、结构热稳定性及对 MDM2 的响应敏感性上产生了显著分化。例如, 大象进化出多达 20 个 *TP53* 拷贝, 裸鼹鼠则通过独特的翻译后修饰机制展现出极强的抗癌表型, 这提示自然界中蕴藏着大量功能迥异、可能具备“超强抑癌活性”的 p53 变体。尽管 p53 的 DBD 核

心结构在物种间高度保守，但微小的序列差异往往导致其 DNA 结合亲和力及对肿瘤突变微环境的耐受性发生显著改变。因此系统筛选具有天然强抑癌活性、且能规避 NSCLC 突变负反馈的跨物种 p53 同源物，有望成为 p53 靶向治疗的重要突破点。

1.2 p53 靶向抗肿瘤的临床试验进展与瓶颈

长期以来，基于 p53 的抗肿瘤治疗始终是研究的热点方向，但受限于靶点特殊性、肿瘤异质性与突变多样性，相关临床转化工作整体进展缓慢、落地困难。在临床应用层面，我国自主研发的重组人 p53 腺病毒药物“今又生”，已于 2003 年通过国家药品监督管理局审批上市，临床应用证实其具备可靠的安全性与一定的抗肿瘤疗效，为 p53 基因治疗提供了重要的临床实践依据⁹。然而截至目前，国际上尚未有任何 p53 靶向疗法获批上市，凸显了该类治疗手段临床转化的瓶颈与争议。尽管 p53 靶向治疗的临床落地现状仍面临诸多挑战，但各类新型干预策略持续迭代更新，为突破现有治疗困境提供了全新思路与潜力。

当前 p53 靶向临床治疗的核心研发逻辑，主要聚焦于重塑肿瘤细胞内野生型 p53 的蛋白结构与生物学功能，以此恢复细胞抑癌通路、阻滞肿瘤恶性进展。肿瘤中 TP53 突变类型复杂多样，包含错义突变、无义突变等多种形式，其中错义突变是临床肿瘤中最主流的突变亚型。针对该类突变，通过小分子药物矫正突变 p53 异常空间构象、重塑其野生型功能，是目前最具应用前景的治疗策略之一。APR-246 (eprenetapopt) 是现阶段研究最为成熟的 p53 构象修复小分子药物，可有效诱导突变失活的 p53 蛋白重新折叠、恢复正常转录调控功能。相关二期临床研究表明，APR-246 与阿扎胞苷联合用药，可显著提升骨髓增生异常综合征与急性髓系白血病患者临床总缓解率；同时在针对患者移植后巩固治疗的二期临床试验中，该联合方案可有效延长患者中位总生存期，展现出优异的远期治疗获益¹⁰。

三氧化二砷 (ATO) 也是一类已被证实具备突变 p53 修复活性的小分子药物，可通过矫正部分突变 p53 的蛋白折叠方式，重启其抑癌功能。目前，ATO 联合地西他滨的靶向治疗方案，已进入 I 期临床试验阶段 (NCT03855371)，用于突变 p53 相关肿瘤的治疗探索。除高频错义突变外，p53 无义突变约占全部突变类型的 10%，该类突变会提前终止蛋白翻译，导致截短型无功能 p53 蛋白产生，而

诱导转录通读是靶向干预无义突变的核心策略¹¹。已有研究证实,氨基糖苷类药物 G418 联合 eRF3 降解干预手段,可有效恢复携带 R213X 无义突变的细胞全长功能性 p53 蛋白表达^{12,13};此外,5-氟尿嘧啶可在体外肿瘤细胞与体内模型中,有效诱导 R213X 突变细胞产生全长 p53 蛋白并恢复其抑癌活性,为 p53 无义突变肿瘤的治疗提供了可行方案¹⁴。

除传统的 p53 功能修复策略外,近年来新型生物技术的迭代也为 p53 靶向治疗开辟了多元化研发方向。MDM2 作为 p53 核心负调控因子,是间接激活 p53 通路的重要靶点,已有研究利用 PROTAC 蛋白降解技术特异性靶向降解 MDM2,有效解除其对 p53 的抑制作用,在非小细胞肺癌治疗中展现出良好的应用潜力¹⁵。同时,基于特异性抗原识别的双特异性抗体技术,可精准靶向携带特定 p53 突变的肿瘤细胞,实现肿瘤的精准靶向清除,为个体化抗肿瘤治疗提供了新的技术路径。

总体而言,虽然 p53 靶向抗肿瘤治疗仍存在转化难度大、适应症有限等问题,但随着小分子构象修复、突变通读干预、蛋白靶向降解、特异性抗体靶向等多种新型策略的不断完善, p53 靶向疗法的临床价值持续凸显。现阶段多款候选药物已进入不同阶段的临床试验,有望在后续大样本临床研究中进一步验证疗效与安全性,成为肿瘤精准治疗的重要手段。

1.3 目的与意义

p53 是真核细胞关键的功能调控蛋白,主要参与细胞周期调控、DNA 损伤修复及细胞凋亡等生理过程,对维持基因组稳定、抑制细胞癌变至关重要。*TP53* 在人类肿瘤中突变频率高,其功能缺陷是肿瘤发生发展的重要诱因,也是肿瘤靶向治疗的热门靶点。在长期进化过程中,不同物种的 p53 蛋白产生了结构与功能分化,部分物种 p53 展现出独特的抗肿瘤、抗衰老优势,具备优于 Hop53 的抑癌潜力。

目前多数研究聚焦于 Hop53 的致病机制与靶向治疗,关于不同物种 p53 对人类癌细胞的作用效果及功能差异仍缺乏系统探究。为此,本研究通过筛选多种异源 p53 蛋白,对比分析其与 Hop53 的抑癌能力差异,并探究其对肿瘤细胞基因表达的调控特征。本研究旨在阐明跨物种 p53 的功能分化规律,挖掘高效抑癌的 p53 变体,为 p53 靶向抗肿瘤研究及跨物种基因工程的临床应用提供理论参考

与实验依据。

2 材料与方法

2.1 实验材料

动物细胞系：非小细胞肺癌细胞 H299 和正常肺上皮细胞 BEAS-2B 均为实验室保存。

表达载体及克隆菌株：表达载体 pTRE 和 pSIN 均为实验室保存；大肠杆菌 DH5 α 为实验室保存。

2.2 实验试剂

PCR 扩增缓冲液：购自 Vazyme 公司，货号为 P525-03。

质粒提取试剂盒：购自 TIANGEN 公司，货号为 DP103-03。

切胶回收试剂盒：购自生工 BBI 公司，货号为 B610353-0100。

同源重组酶：购自 Vazyme 公司，货号为 C112-02（单）和 C113-02（多）。

qPCR 扩增缓冲液：购自 Vazyme 公司，货号为 Q711-02。

TRIZOL（RNA 提取缓冲液）：购自 Invitrogen 公司，货号为 15596018。

Western blotting 相关试剂：PVDF 膜，购自 GE 公司，货号为 10600023；FLAG 抗体，购自 Sigma 公司，货号为 F1804；羊抗鼠 IgG-HRP 抗体，购自 Easybio 公司，货号为 BE0102；其余试剂，如蛋白提取缓冲液、TBST、电泳液和转膜液等均由自己配制。

2.3 细胞培养

所有细胞均置于 37℃、二氧化碳体积分数 5% 的恒温培养箱内孵育。所有细胞均使用 DMEM 完全培养基或者 1640 完全培养基进行培养，培养基配方为基础培养基添加 10%胎牛血清、2% HEPES 缓冲液以及 1%青链霉素混合液。当细胞汇合度生长至 70%-80%时，按 10:1 的传代比例进行传代培养。所有需要诱导表达的细胞株均在上述完全培养基基础中额外添加 4 mg/mL 多西环素（Dox）进行培养。

细胞冻存时，收集细胞沉淀后重悬于冻存液（90% FBS+10% DMSO），置于

-80℃冰箱长期保存。

大肠杆菌 DH5 α 感受态菌株涂布于添加相应抗生素的 LB 固体平板，37℃ 条件下培养 12-14 h；随后挑取单菌落接种至含同等抗生素的 LB 液体培养基扩大摇菌，培养 12-14 h 后收集菌液用于质粒提取。

2.4 慢病毒转染

将目的质粒与慢病毒包装质粒 (psPAX2、pMD2G) 利用 Lipofectamine 3000 试剂共转染 HEK293T 细胞 (psPAX2:pMD2G:目标质粒=3:1:4)。转染 48 h 后收集细胞上清中的慢病毒并进行浓缩处理。将浓缩后的病毒液与适宜浓度的 polybrene 混合，加入靶细胞中感染培养 24 h；随后弃去含病毒的培养液，更换添加 Dox 的完全培养基继续培养 24 h。最后使用 BD FACS Aria III 流式分选仪筛选 EGFP 阳性细胞，分选得到的阳性细胞继续培养用于后续实验。

2.5 细胞增殖实验

将 10^4 个细胞接种至 12 孔板，使用添加 Dox 的培养基进行培养，并且每日更换新鲜培养液。使用胰酶消化细胞后，将细胞悬液与台盼蓝染液按照 1:1 体积比混匀，使用 Coulter Counter 完成细胞计数。随后于每日固定时间点统计细胞数量，连续检测 3-6 天。

2.6 TRIZOL 法提取动物细胞总 RNA

- (1) 吸取 1 mL TRIZOL 裂解液至 2 mL 离心管中，置于冰上备用。
- (2) 取适当材料于液氮中研磨成粉，加入 TRIZOL 裂解液中，振荡混匀。
- (3) 吸取 200 μ L 预冷的氯仿加入离心管中，振荡混匀，于室温静置 5 min，13000 rpm 离心 15 min。
- (4) 吸取 600 μ L 上清液至新的 2 mL 离心管中，加入 200 μ L 预冷的氯仿，振荡混匀，于室温静置 5 min，13000 rpm 离心 15 min。
- (5) 吸取 500 μ L 上清液至新的 1.5 mL 离心管中，加入等体积预冷的异丙醇，振荡混匀，于室温静置 10 min，13000 rpm 离心 15 min。
- (6) 弃上清，加入 500 μ L 预冷的 75%乙醇，吸打洗涤沉淀后，13000 rpm

离心 3 min。

(7) 弃上清，于室温静置 10 min，待沉淀干燥后，加入 40 μL 预热的 50% 去离子甲酰胺溶解 RNA，测定浓度并保存于 -80°C 备用。

2.7 荧光定量 PCR

(1) 吸取 1 μg 总 RNA 在 RNase-free 离心管中加入 4 μL gDNA wiper Mix，并用 RNase-free ddH₂O 补齐至 16 μL 。用移液器轻轻吹打混匀后， 42°C 反应 2 min。

(2) 在上一步反应结束后，向反应体系中加入 4 μL HiScript III qRT SuperMix。用移液器轻轻吹打混匀后，进行逆转录反应 (37°C 反应 15min 后 85°C 终止反应 5 s)。

(3) 使用反转录后的 cDNA 进行荧光定量 PCR，体系如下：

组分	体积
2 $\times$ Realtime PCR Super Mix	10 μL
Primer (F & R)	1 μL
cDNA	1 μL
ddH ₂ O	8 μL

使用荧光定量 PCR 扩增程序进行检测 (变性-退火-延伸进行 40 个循环)。

2.8 Western blotting 检测

(1) 10 $\times$ 蛋白提取母液配制如下表所示：

组分	用量
Tris	12.1 g
NaCl	87.7 g
EDTA	1.86 g

提取前，配制适量蛋白提取液，如下表所示 (10 mL 体系)：

组分	用量
母液	1 mL
TritonX-100	1 mL
50 $\times$ protease inhibitor	200 μL
ddH ₂ O	定容至 10 mL

TBST 配制如下表所示：(定容至 1 L)

组分	用量
Tris	2.42 g
NaCl	8.77 g
吐温 20	1 mL

- (2) 吸取 200 μ L 蛋白提取液至 1.5 mL 离心管中，置于冰上备用。
- (3) 取适量细胞加入试管中，振荡混匀，冰浴 30 min。
- (4) 4℃，13000 rpm 离心 15 min，吸取 200 μ L 上清液至新的 1.5 mL 离心管中，加入 40 μ L protein loading buffer，吸打混匀。
- (5) 将蛋白置于沸水中煮沸 10 min 后，迅速置于冰上冷却 5 min。
- (6) 4℃，13000 rpm 离心 3 min，吸取上清液进行电泳。剩余蛋白保存于 -20℃。
- (7) 10×电泳缓冲液配制如下表所示：

组分	用量
Tris	12.1 g
NaCl	87.7 g
EDTA	1.86 g

稀释成 1×电泳缓冲液，180 V 恒压电泳 30 min。

- (8) 转膜缓冲液配制：将 14.4 g Glycine 和 3 g Tris 溶于 800 mL ddH₂O 中，再加入 200 mL 甲醇。置于冰上预冷。
- (9) 裁剪两张长为 9 cm、宽为 7 cm 的厚滤纸和一张长为 8 cm、宽为 6 cm 的 PVDF 膜。
- (10) 将适量转膜缓冲液倒入转膜仪中，将海绵、厚滤纸、凝胶和 PVDF 膜在转膜缓冲液中浸泡 1 min (PVDF 膜先在甲醇中浸泡，再放入转膜缓冲液中)。从上到下按照海绵、厚滤纸、PVDF 膜、凝胶、厚滤纸和海绵的顺序依次摆放。
- (11) 将整个转膜装置置于冰水之中，100-110 V 恒压转膜 1.5 h。
- (12) 拆除转膜装置，将 PVDF 膜置于 5%脱脂牛奶中，室温慢速孵育 1 h。
- (13) 吸取 1 μ L 一抗加入 5 mL 5%脱脂牛奶中，将膜置于其中，室温慢速孵育 1 h 或 4℃慢速孵育过夜。
- (14) 使用 10 mL TBST 洗涤 PVDF 膜 10 min，重复 3 次。
- (15) 吸取 1 μ L 二抗加入 5 mL 5%脱脂牛奶中，将膜置于其中，室温慢速孵育 1 h。
- (16) 使用 10 mL TBST 洗涤 PVDF 膜 10 min，重复 3 次。
- (17) 将 ECL 发光液（黑、白瓶等量混匀即可）均匀涂布在 PVDF 膜上，于全自动成像仪中进行显影并拍照留存。

3 实验结果

3.1 哺乳动物源 p53 蛋白筛选及表达

在实验前期, 我们利用 NCBI-Protein BLAST 工具, 基于 Hop53 蛋白序列检索不同物种的 p53 同源蛋白, 结合序列相似性与关键位点氨基酸特征完成候选分子筛选。BLAST 结果提示, 物种进化距离越远, 对应的 p53 同源蛋白序列越短, 编码的功能结构域也相应减少。已有研究证实, 哺乳动物与非哺乳动物 p53 在负反馈调控模式及转录激活靶基因方面存在显著差异, 据此我们对两类来源的 p53 同源蛋白分开开展筛选工作。

为削弱 MDM2 介导的 p53 负反馈抑制效应, 筛选过程中优先规避第 19、23 和 26 位为苯丙氨酸 (Phe)、色氨酸 (Trp) 和亮氨酸 (Leu) 的候选蛋白, 同时保留已有文献报道的关键功能位点, 不引入已知有害突变。依据上述筛选标准, 本研究最终获得侏儒鼯鼠 (*Suncus etruscus*)、澳洲针鼹 (*Tachyglossus aculeatus*) 以及双条吻蚓 (*Rhinatrema bivittatum*) 来源的 p53 同源蛋白, 其序列信息如下 (包括人源 p53 蛋白 Hop53 序列):

>Hop53(*Homo sapiens* p53)

MEEPQSDPSVEPPLSQETFSDLWKLLPENNVLSPLPSQAMDDLMLSPDDI
EQWFTEDPGPDEAPRMPEAAPPVAPAPAAPTPAAPAPAPSWPLSSSVPSQKTY
QGSYGFRLLGFLHSGTAKSVTCTYSPALNKMFCQLAKTQCPVQLWVDSTPPPGT
RVRAMAIYKQSQHMTEVVRRCPHHERCSDSDGLAPPQHLIRVEGNLRVEYL
DDRNTFRHSVVVPYEPPEVGSDCTTIHYNMCMNSSCMGGMNRRPILTIITLED
SSGNLLGRNSFEVVRVCACPGRRTEENLRKKGEPHHELPPGSTKRALPNNT
SSSPQPKKKPLDGEYFTLQIRGRERFEMFRELNEALELKDAQAGKEPGGSRAH
SSHLKSKKGQSTSRHKKLMFKTEGPDSD

>Rbp53 (*Rhinatrema bivittatum* p53)

MRVEGAQPIEGAFFSLSCFLIGRPDVMGVPTDRFRAPDKNDSCAGGLFSL
WTAMDLYPEDADTHPFGDLFPPCLETVFSEEGHCSTPELSLACCCPEGHPPAL
AMMSVSENGLEEPLSQESFSTLWNLLPNLPASLENGNNELWQMETEQFLTDT
ALYPEVPDHELGGCLLPEAFSLEANSVTTSSSTVLSTEDYPGEHNFRLAFQQSG

TAKSVTCTYSPENLNLFCQLSKTCPIQIKVQDMPPAGALIRATAVYKKSEHVA
EVVKRCPPHHERSTDPMDDAAPPSHLIRVEGNQLAKYSENISTRHSVYVPFEA
PQVGSDCTTVLYNYMCNSSCMGGMNRRPILTIVTLESKEGQLLGRRSFEVRIC
ACPGRDRKSEEENCQKKTMGKSGSSKRAIREVSQAVACTESRKKQVTSSDDE
IFTLQVRGRDRYEFLKKINDAFECQDYVSQQELEKIKQQKQLVKSRRERDTV
APKKGKRLLQKDETQDSD

>Sep53(*Suncus etruscus* p53)

MLSPEDVDQWLNRPTEEVSGMPEAPAPAAPLPPASAPASSWPLSSSVPN
QNIDPGKYGFSLGFLQSGTAKSVTCTYSPILNKLYCQLAKTCPVQEWVTSPPP
PGSRVRAMAIYKKSQFMTEVVRRCPHHERSSDHNDGLVPPQHLIRVEGNSCA
QYLDDENTFRHSVVVPYKLPEDDSGCTTIHYNFMCNSSCMGGMNRRPIVTIIT
LEDASGNVLGRSNFEVRVCACPGRDRRSDEDNLQKKGGSQPQPAPGSAKQA
LPSSTSSSPQPRKKPQEEYFNLKIRGRRRYDMLRELNEALELKDSLAEKEPG
GSKAHSSHLKSKKGKSASSHKKMVLKTEGLDSD

>TaP53 (*Tachyglossus aculeatus* p53)

MWLVGAKLGTVGRRRCIRRQRRTPGTPAFGGPQRDPSPPRPPLAPDDF
RAQGSATGIVFRGYIRLQASSTIGVIQLSDSPVYHGARLPTAVDPKMESLTELE
PPLSQETFLDLWQILTGQNQGGLLVSNGGDRGILASWSSSLRTRGLPRRSRPPS
SQPPFRRTPSRRPLPRRPPVPPAPTTPASVSPAPTTPDPIPPASASPGPASPAPAL
AATSTVPSIEDYPGEYGFHLGFLQSGTAKSVTCTYSPLLNLFCQLARTCPVQ
LWADSPPPPGAQVRAMAVYKKTDHRAEVVKRCPPHHERSSDGDGAAPPQHLLI
RVEGNPQARYLNDERTTRQSVVVPYEPQVGCECTTVFYNYMCNSSCMGGM
NRRPILTIVTLETASGQLLGRQSFEVRVCACPGRDRKTEENHQKKGESSGPQ
PPSKEPKRACPSPPKSPPETKKRLLDEEVFTLKIRGRERYEMFRIMNEAFEFKD
AKGGQEPEGTRTSRQSLKSKREAPGPKKGKRLLVKEETPESN

首先，将上述三个物种来源的 *TP53* 以及 *HoTP53* 通过慢病毒转染非小细胞肺癌 H1299 细胞，构建稳定表达细胞株，随后采用流式细胞分选仪完成阳性细胞分选。流式分选结果显示，异源表达 Sep53 的 H1299 细胞红色荧光信号最强，Hop53 表达株荧光强度次之，Rbp53 与 Tap53 表达细胞的荧光强度最低(图 3-1)。

本研究选取荧光信号最高的 H1299 细胞群体用于后续功能实验。

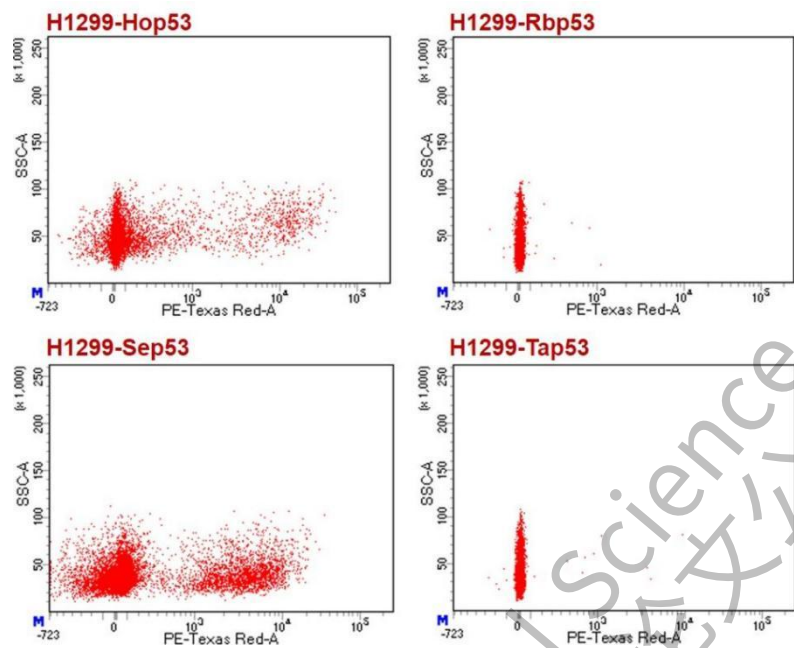


图 3-1 哺乳动物源 p53 稳转 H1299 流式分选结果图。流式细胞分选技术基于红色荧光强度分选获得成功表达哺乳动物源 p53 蛋白的非小细胞肺癌细胞 H1299。横坐标为红色荧光强度，纵坐标为侧向散射光面积。

3.2 侏儒鼯鼠源 p53 有效抑制非小细胞肺癌 H1299 增殖

为评估不同哺乳动物来源 p53 对非小细胞肺癌 H1299 细胞的增殖抑制效应，本研究首先采用荧光定量 PCR 检测各 p53 稳转细胞株中 *TP53* 的转录水平。荧光定量 PCR 结果与流式分选的荧光检测结果趋势一致：H1299-Sep53 细胞的 *TP53* 表达水平最高，H1299-Hop53 次之，H1299-Rbp53 与 H1299-Tap53 的 *TP53* 表达量最低（图 3-2 A）。

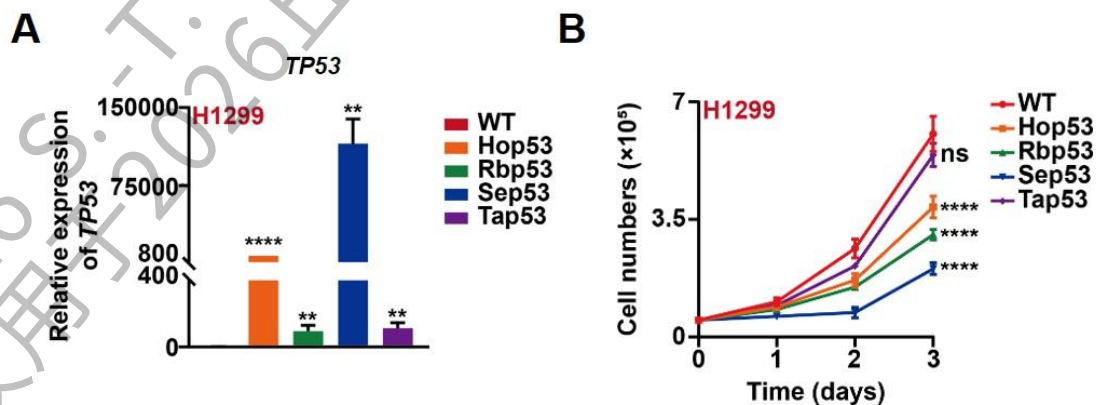


图 3-2 哺乳动物源 p53 稳转 H1299 表达量及增殖速率检测。A. 荧光定量 PCR 柱状图展示了哺乳动物源 p53 稳转 H1299 中 *TP53* 在转录水平的表达量。内参基因是 *GAPDH* 基因，目的基因是 *mCherry* 基因。数据用 means $\pm$ SD 表示。B. 细胞增殖折线图展示了哺乳动物

源 p53 稳转 H1299 的增殖速率差异。数据用 means $\pm$ SD 表示。

随后将等量的各组细胞接种于 12 孔板，进行细胞增殖速率检测。增殖实验结果显示，Hop53、Rbp53 以及 Sep53 均能够抑制 H1299 细胞增殖；其中 Hop53 与 Rbp53 的增殖抑制效率约为 50%，Sep53 的抑制效率可达 66%（图 3-2 B）。上述结果表明，部分哺乳动物来源 p53 具备更优异的肿瘤细胞抑制潜能，Sep53 可作为后续功能研究的重点对象。

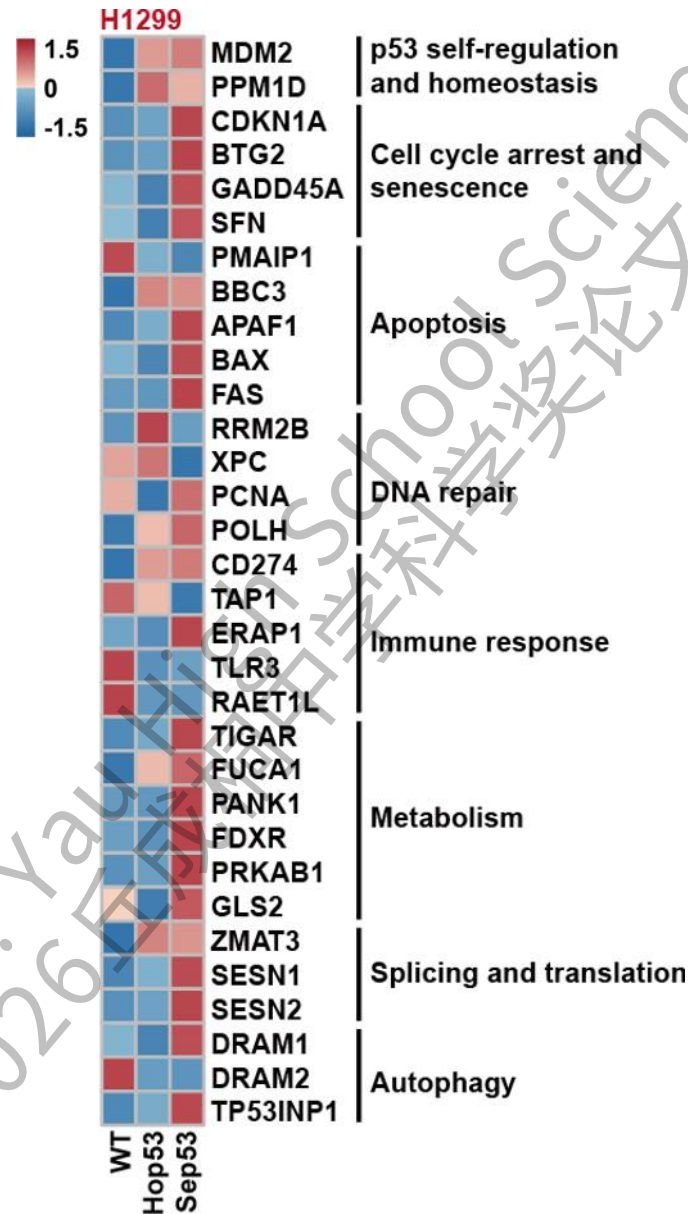


图 3-3 哺乳动物源 p53 稳转 H1299 转录组分析。热图展示了不同哺乳动物源 p53 在 H1299 细胞中对 p53 下游靶标基因的激活情况。红色表示高表达，蓝色表示低表达。

p53 蛋白作为转录激活因子，可直接驱动下游众多靶基因的转录，进而调控

细胞周期、细胞衰老、代谢稳态、基因组稳定性、转录剪接、凋亡及自噬等多种生物学过程。为此，本研究利用 RNA 测序解析哺乳动物来源 p53 对 H1299 细胞下游靶基因的转录激活效应。热图分析结果表明，*HoTP53* 能够在一定程度上激活 p53 下游靶基因的表达；相比之下，*SeTP53* 可更为显著地上调细胞周期、凋亡、代谢及转录剪接等通路相关基因（图 3-3）。上述结果提示，*SeTP53* 能够有效结合下游靶基因的 DNA 序列，且转录激活活性强于 *HoTP53*。

综上，本部分对 3 种哺乳动物来源的 p53 同源蛋白开展抑癌功能表征，证实不同哺乳动物 p53 对非小细胞肺癌细胞 H1299 的增殖抑制效果存在显著异质性。在这些候选分子中，来自侏儒鲟的 *Sep53* 能够识别 p53 下游靶基因位点并介导有效的转录激活。这一发现说明进化起源不同的哺乳动物 p53 可产生功能分化，*Sep53* 也因此成为后续探究 p53 功能优化机制的理想研究对象。

3.3 非哺乳动物源 p53 蛋白筛选及表达

非哺乳动物体内缺乏 p53-MDM2 负反馈调控环路，因此 p53 蛋白能够实现更高水平的蛋白积累。然而与哺乳动物 p53 相比，非哺乳动物来源的 p53 可激活的下游靶基因数量相对有限，主要参与基因组稳定性维持与细胞周期阻滞相关基因的调控，该特征也提示其可能具备更强的靶向调控能力。结合已有文献报道与蛋白序列相似性分析，本研究选取果蝇（*Drosophila melanogaster*）、鲢鱼（*Megalops cyprinoides*）以及鲨鱼（*Carcharodon carcharias*）的 *TP53* 基因开展肿瘤细胞增殖抑制功能检测，对应的序列信息如下：

> DmP53 (*Drosophila melanogaster* p53)

MSLHKSASFSLTFNQNTSIVSRNSRTIFEAFKEFLDFWDIGNEVSAESAV
RVSSNGAFNLPQSFGNESNEYAHLATPVDPA YGGNNTNNMMQFTNNLEILA
NNNSDGNKINACNKFVCHKGTDEDDSTEVDIKEDIPKTVEVSGSELTTEPM
AFLQGLNSGNLMQFSQQSVLREMMLQDIQIQANTLPKLENHNIGGYCFSMVL
DEPPKSLWMYSIPLNKLYIRMNKA FNVDVQFKSKMPIQLNLRVFLCFSNDVS
APVVRCQNHLSVEPLTANNAKMRESLLRSENPN SVYCGNAQKGKISERFSVV
VPLNMSRSVTRSGLTRQTLAFKFVCQNSCIGRKETSLVFCLEKACGDIVGQHV
IHVKICTCPKRDRIQDERQLNSKKRKSVP EAAEEDEPSKVRRCIAIKTEDTESN
DSRDCDDSAAEWNVSRTPDGDYRLAITCPNKEWLLQSIEGMIKEAAAEVLRN

PNQENLRRHANKLLSLKKRAYELP

>McP53 (*Megalops cyprinoides* p53)

MNEQEEAGRLAFDNQETFQDLWNSVSVPGGDQNWNSLESYLLQGHLO
EEFDEQLFDVPATPAPQPSVSALDSGAPPSSTVPTTTDYPGVLGFQLRFQQSST
AKSVTCTYSPDLNKLKLYCQLAKTCVPVQMLVDSPPPPGAQLRATAVYKKSEHV
AEVVRRCPHHERTSENNDGSTPPSHLIRVEGSQRTQYVEDSNTLRHSVLVPYE
PPQLGSECTTVLYNFMCMSSCMGGMNRRPILTIITLETQEGQVLGRRCFEVRV
CACPGRDRKTEEDNFRKLQEKTAADKASTGTKRSFKETSQSAPRPEGSKKTKSS
SSNEEEIFTLQIRGKERYEMLKKINESLELKDLVPAADLDKYRQKLHSHKNNNSK
REKERDGVPEPKRGKKLLVKEEKNSDSD

>CcP53 (*Carcharodon carcharias* p53)

MSESQLDEPLSQETFRELWNQLEVP SANVGLLENELQIWDNEFSGLELAM
EELDNNPLEFPVLPDNPLPYSSSQAGPATDIHVAAPCTVLATTEYPPGPHEFQL
QFQQSSTAKSVTCTYSPSLNKLFCQLAKTCVPVQVVVASVPPTGTLLRATAVY
KKPEHVAEVLKRCPPHHERGSETDGPAPPSHLIRVEANSRARYAEDEHTKRQS
VIVPYESPQVGSDYTTVLNFMCMSSCMGGMNRRPILSILTLETDPGHLLGRR
CFEVRVCACPGRDRKSEEEENLKRQQENSMVKSGGSATKRTIKEVSQATTSPD
SRKKKALSDDEVFTLQVRGRERYELMKKLNEALEISELIPTGVIEAYKQQQKH
RLKASHKKEKESTEIKNGKKLLVKDERDSD

与前述实验策略一致，首先利用慢病毒转染体系构建非哺乳动物源 p53 的 H1299 稳定表达细胞株，并通过流式细胞分选获得阳性细胞群体。流式分选结果显示，异源表达 Dmp53 与 Ccp53 的 H1299 细胞均呈现较强的红色荧光信号，而 Hop53 和 Mcp53 过表达细胞的荧光强度相对偏低（图 3-4）。本研究选取荧光信号最高的 H1299 细胞群体用于后续功能实验。

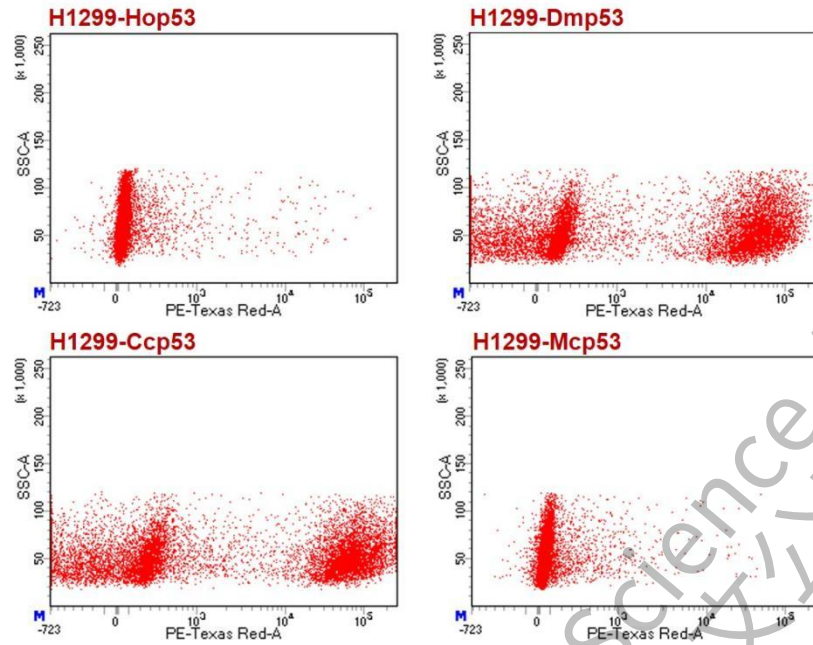


图 3-4 非哺乳动物源 p53 稳转 H1299 流式分选结果图。流式细胞分选技术基于红色荧光强度分选获得成功表达非哺乳动物源 p53 蛋白的非小细胞肺癌细胞 H1299。横坐标为红色荧光强度，纵坐标为侧向散射光面积。

3.5 鲨鱼源 p53 有效抑制非小细胞肺癌 H1299 增殖

为评估不同非哺乳动物来源 p53 对非小细胞肺癌细胞 H1299 的增殖抑制作用，本研究利用荧光定量 PCR 检测各 p53 稳转细胞株中 *TP53* 与 *MDM2* 的转录水平。荧光定量 PCR 结果显示，H1299 细胞中异源表达 *HoTP53*、*DmTP53* 和 *CcTP53* 均可使 *TP53* 转录水平大幅上调，可达对照组的 10000 倍以上；*McTP53* 过表达的细胞尽管在流式分选时可检测到红色荧光信号，但 *TP53* 的转录丰度却处于极低水平。此外，*MDM2* 的激活模式在各组间存在明显差异：H1299-Ccp53 细胞中 *MDM2* 发生显著激活，转录水平最高；H1299-Hop53 细胞仅出现微弱的 *MDM2* 激活；而异源表达 *McTP53* 与 *DmTP53* 均未诱导 *MDM2* 的转录上调（图 3-5 A）。上述结果初步提示，相较于 Hop53 以及其他非哺乳动物来源的 p53，Ccp53 不仅自身转录水平上调更为显著，还能够更有效地驱动下游靶基因的转录激活。

进一步，本研究采用 Western blotting 检测各非哺乳动物源 p53 稳转 H1299 细胞中 p53 与 MDM2 的蛋白积累水平。蛋白免疫印迹结果显示，除 H1299-Dmp53 细胞外，其余 p53 稳转株均可检测到 p53 蛋白积累，其中 Sep53 与 Ccp53 的蛋白积累水平最高；而 MDM2 蛋白仅在 HoTP53 和 CcTP53 过表达的 H1299 细胞中出现明显富集，其余细胞系中 MDM2 蛋白均仅有微弱本底水平积累（图 3-5 B）。

上述结果提示，鲨鱼来源 Ccp53 能够诱导下游 MDM2 蛋白累积，尽管激活了负反馈调控通路，但仍可维持自身 p53 蛋白的高水平稳定积累。

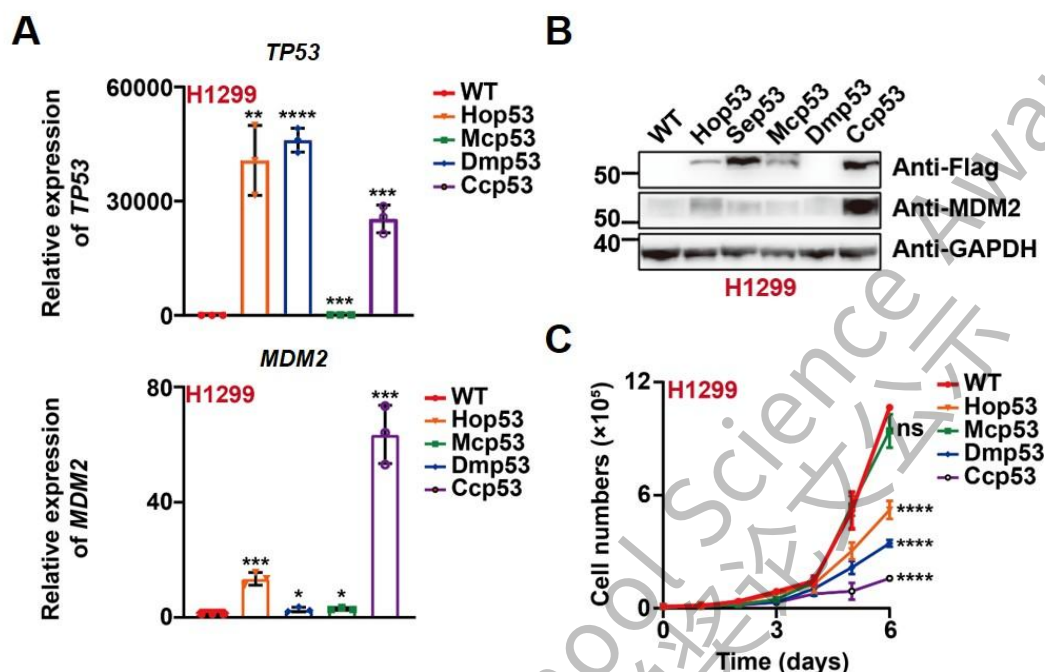


图 3-5 非哺乳动物源 p53 稳转 H1299 表达量及增殖速率检测。A. 荧光定量 PCR 柱状图展示了非哺乳动物源 p53 稳转 H1299 中 *TP53* 和 *MDM2* 在转录水平的表达量。内参基因是 *GAPDH* 基因，目的基因是 *mCherry* 和 *MDM2* 基因。数据用 means $\pm$ SD 表示。B. Western blotting 蛋白杂交图展示了非哺乳动物源 p53 稳转 H1299 中 p53 和 MDM2 在蛋白水平的积累量。内参蛋白是 GAPDH，目的蛋白是 Flag 和 MDM2 蛋白。C. 细胞增殖折线图展示了非哺乳动物源 p53 稳转 H1299 的增殖速率差异。数据用 means $\pm$ SD 表示。

随后，本研究测定各组非哺乳动物源 p53 稳转 H1299 细胞的增殖速率。增殖实验结果表明，Mcp53 对 H1299 细胞增殖无显著抑制作用；Hop53 的抑制效果与前文结果保持一致，增殖抑制率约为 50%；Dmp53 与 Ccp53 均展现出更强的增殖抑制能力，抑制效率分别约为 65% 和 85% (图 3-5 C)。

上述结果证实 Dmp53 和 Ccp53 均可有效抑制 H1299 细胞增殖。值得注意的是，尽管在 H1299-Dmp53 细胞中未能检测到明显的 Dmp53 蛋白积累，该蛋白依旧能够发挥显著的增殖抑制功能。对比哺乳动物来源 p53，非哺乳动物 p53 整体表现出更为优异的肿瘤细胞增殖抑制活性，其中 Ccp53 的抑癌效果最为突出，因此本研究选取 Ccp53 开展后续的机制探究。

为探究非哺乳动物来源 p53 对 H1299 细胞下游靶基因的转录激活效应，本研究开展 RNA-seq 转录组分析。基因表达热图结果表明，相较于 Hop53，Ccp53

能够更为高效地激活绝大多数 p53 下游靶基因的转录；Dmp53 与 Mcp53 仅可诱导少量靶基因的表达上调。值得关注的是，Dmp53 和 Mcp53 的靶基因激活能力有限，该现象与已有的研究结论相一致；而 Ccp53 却表现出出乎意料的能力，可激活几乎全部下游靶基因，广泛调控多条细胞生物学过程。该发现也提示，基于蛋白序列对蛋白互作进行预测的传统思路可能存在局限性。

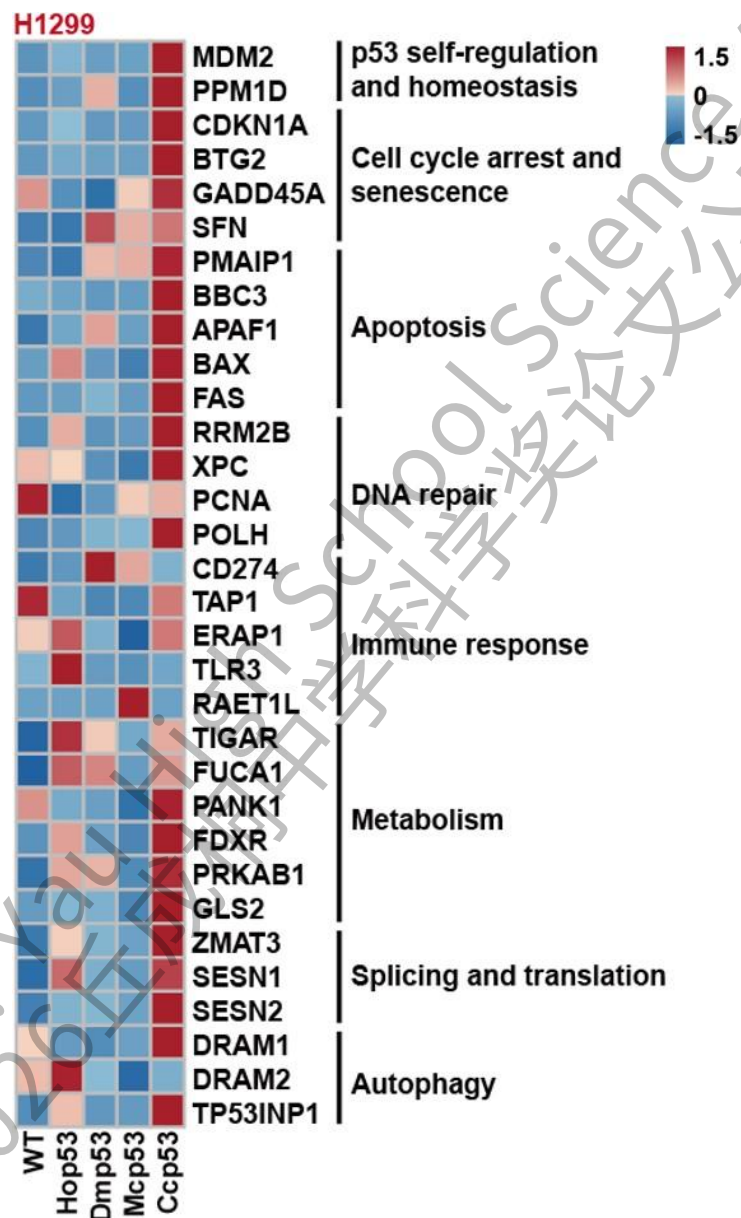


图 3-6 非哺乳动物源 p53 稳转 H1299 转录组分析. 热图展示了不同哺乳动物源 p53 在 H1299 细胞中对 p53 下游靶标基因的激活情况。红色表示高表达，蓝色表示低表达。

3.6 鲨鱼源 p53 不影响正常肺上皮细胞 BEAS-2B 生长及靶基因表达

为探究 Ccp53 是否对正常细胞的生长状态与基因表达谱产生影响，本研究

利用慢病毒转染构建稳定表达 Hop53 与 Ccp53 的正常肺上皮细胞 BEAS-2B，分别检测细胞增殖能力及下游靶基因的表达变化。细胞增殖实验结果表明，Hop53 可显著抑制 BEAS-2B 细胞增殖，抑制率约为 50%；与之相反，Ccp53 并未对 BEAS-2B 细胞增殖产生抑制效应（图 3-7 A）。基因表达热图显示，Hop53 介导的下游靶基因转录无一致变化趋势，部分基因上调、部分基因下调；而 Ccp53 处理组中多数 p53 下游靶基因呈现明显的转录下调（图 3-7 B）。上述结果提示，Hop53 在 BEAS-2B 正常肺上皮细胞中仍可激活部分下游靶基因，从而发挥细胞生长抑制作用；Ccp53 则未发生明显的靶基因转录激活，因此不会干扰正常肺上皮细胞的增殖。

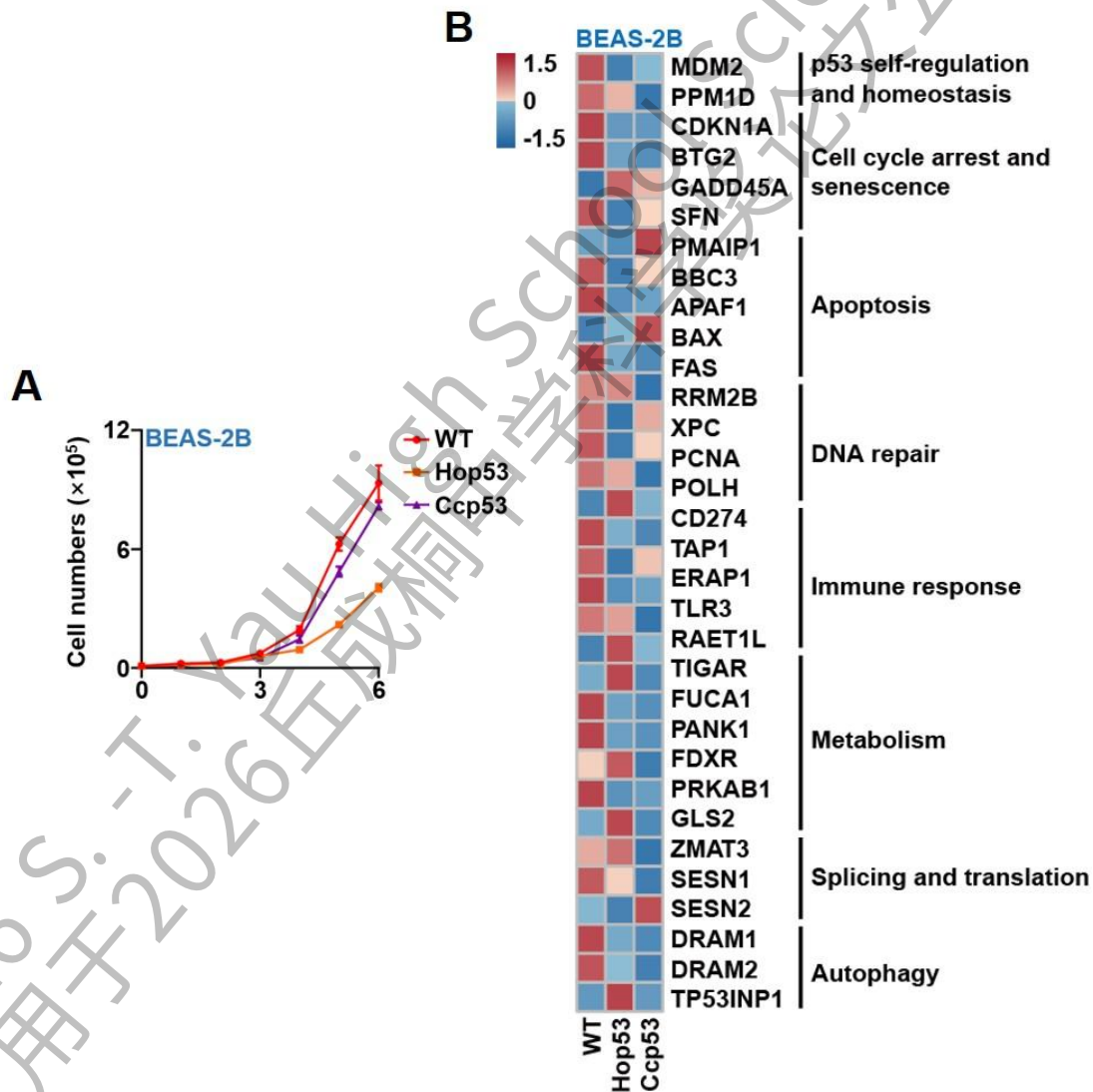


图 3-7 Ccp53 稳转 BEAS-2B 增殖速率检测及转录组分析。A. 细胞增殖折线图展示了人源 Hop53 和鲨鱼源 Ccp53 稳转 BEAS-2B 细胞的增殖速率差异。数据用 means $\pm$ SD 表示。B. 热图展示了人源 Hop53 和鲨鱼源 Ccp53 稳转 BEAS-2B 细胞中对 p53 下游靶标基因的激活情况。

红色表示高表达，蓝色表示低表达。

4 讨论

本研究系统开展了哺乳动物与非哺乳动物来源异源 p53 蛋白的跨物种功能筛选，通过细胞增殖表型、基因转录水平、蛋白积累特征及转录组表达谱的多维度验证，明确了不同物种 p53 蛋白在非小细胞肺癌细胞 H1299 中的功能分化特征，并筛选获得具有优异肿瘤选择性抑癌活性的鲨鱼源 Ccp53 蛋白。综合实验结果可知，本研究多数核心表型与既往研究报道一致，同时也发现了多项突破传统认知的新颖现象，为 p53 靶向抗肿瘤基因治疗的优化与革新提供了全新的实验依据与理论支撑。

本研究中多数实验结论与现有研究成果相互印证。已有研究证实，哺乳动物 p53 蛋白严格受 MDM2 负反馈通路调控，高表达的人源 Hop53 可被 MDM2 识别并降解，导致蛋白积累水平有限，抑癌活性存在明显局限¹⁶。本研究结果显示，Hop53 在 H1299 细胞中仅能发挥中等强度的增殖抑制作用，对下游靶基因的转录激活能力有限，且在正常肺上皮 BEAS-2B 细胞中仍具备明显的生长抑制毒性，这与临床 p53 基因治疗疗效有限的现状高度吻合。同时，既往进化生物学研究表明，非哺乳动物缺乏经典 p53-MDM2 负反馈调控环路，使得其 p53 蛋白更易实现胞内积累¹⁷。本研究也证实鲨鱼源 Ccp53 可有效逃逸 MDM2 介导的蛋白降解，维持高水平蛋白积累，进一步验证了跨物种进化差异是 p53 功能分化的核心机制，与现有进化调控理论一致。

与此同时，本研究发现了多项区别于传统认知、尚未被报道的新颖实验现象。既往研究普遍认为，非哺乳动物源 p53 的下游调控靶基因数量有限，仅保守调控细胞周期阻滞与基因组稳定性通路，转录调控谱窄、抑癌功能单一¹⁸。但本研究转录组结果证实，鲨鱼源 Ccp53 可广谱激活 p53 下游绝大多数靶基因，广泛调控细胞周期、凋亡、代谢及转录剪接等多条核心抑癌通路，其转录激活能力显著优于人源 Hop53，打破了“非哺乳动物 p53 调控功能保守且单一”的传统认知。此外，本研究发现果蝇源 Dmp53 虽无明显蛋白积累，却仍可显著抑制肺癌细胞增殖，提示 p53 蛋白的抑癌功能并非完全依赖稳态蛋白积累，可能存在瞬时激活、非经典调控等新型作用模式，补充了 p53 功能调控的潜在新机制。最为关键的是，

本研究证实 Ccp53 具备独特的肿瘤选择性抑癌特征，可高效杀伤非小细胞肺癌细胞 H1299，但对正常肺上皮细胞 BEAS-2B 的生长与基因表达无不良影响，完全规避了人源 Hop53 损伤正常细胞的弊端，这一特异性优势是现有 p53 变体鲜有具备的重要特性。

本研究的创新发现具备重要的科学价值与临床应用意义。目前临床主流的肿瘤治疗手段普遍存在耐药复发、适用范围有限、正常组织毒性大、远期根治率低等问题，p53 靶向基因治疗也受限于人源 Hop53 易降解、活性弱的缺陷，难以实现高效安全的临床应用。本研究通过跨物种筛选策略，挖掘得到的鲨鱼源 Ccp53，兼具逃逸 MDM2 降解、强效转录激活、广谱抑癌、肿瘤特异性靶向四大核心优势，有效弥补了人源 Hop53 抗肿瘤治疗的短板。从理论层面，本研究证实了跨物种进化差异可重塑 p53 蛋白的功能活性，为筛选高活性、高特异性的抑癌基因变体提供了全新的研究思路；从应用层面，Ccp53 无毒、高效、肿瘤特异性强的特性，使其成为非小细胞肺癌靶向基因治疗的理想候选分子，为开发新型 p53 基因治疗药物提供了优质先导靶点。

本研究仍存在一定的局限性，也为后续研究指明了方向。首先，本研究仅在非小细胞肺癌细胞 H1299 及正常肺上皮细胞 BEAS-2B 中验证了 Ccp53 的功能，后续可拓展至多种肿瘤细胞系、类器官模型及动物体内模型，验证其体内抑癌效果与生物安全性。其次，本研究初步证实 Ccp53 具备优异的转录激活与肿瘤选择性抑癌功能，但其逃逸 MDM2 降解、区分肿瘤与正常细胞的具体分子机制仍需进一步深入探究。最后，后续可通过蛋白定点突变、结构域重构等方式进一步优化 Ccp53 蛋白功能，筛选活性更强、特异性更高的突变体，为其临床转化应用奠定更坚实的实验基础。综上，本研究通过跨物种 p53 功能筛选，突破了传统人源 Hop53 的治疗局限，为非小细胞肺癌的精准基因治疗提供了新靶点、新策略，具备良好的基础研究价值与广阔的临床转化前景。

参考文献

- 1 Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* **74**, 229-263 (2024). <https://doi.org/10.3322/caac.21834>
- 2 Siegel, R. L., Miller, K. D., Wagle, N. S. & Jemal, A. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin* **73**, 17-48 (2023). <https://doi.org/10.3322/caac.21763>
- 3 Wang, W. *et al.* p53: from understanding its structure to advances in therapeutic targeting. *Signal Transduction and Targeted Therapy* **11**, 121 (2026). <https://doi.org/10.1038/s41392-025-02549-5>
- 4 Momand, J., Zambetti, G. P., Olson, D. C., George, D. & Levine, A. J. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* **69**, 1237-1245 (1992). [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90644-R](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90644-R)
- 5 Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A. & Oren, M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* **387**, 296-299 (1997). <https://doi.org/10.1038/387296a0>
- 6 Collisson, E. A. *et al.* Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature* **511**, 543-550 (2014). <https://doi.org/10.1038/nature13385>
- 7 Hammerman, P. S. *et al.* Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature* **489**, 519-525 (2012). <https://doi.org/10.1038/nature11404>
- 8 Liu, T., Du, J., Cheng, X. & Wei, J. Integrative Analysis of the Role of TP53 in Human Pan-Cancer. *Current issues in molecular biology* **45**, 9606-9633 (2023). <https://doi.org/10.3390/cimb45120601>
- 9 Wei-Wei, Z. *et al.* The First Approved Gene Therapy Product for Cancer Ad-p53 (Gendicine): 12 Years in the Clinic. *Human Gene Therapy* **29**, 160-179 (2018).
- 10 Hassin, O. & Oren, M. Drugging p53 in cancer: one protein, many targets.

- Nature Reviews Drug Discovery* **22**, 127-144 (2023).
<https://doi.org/10.1038/s41573-022-00571-8>
- 11 Chen, S. *et al.* Arsenic Trioxide Rescues Structural p53 Mutations through a Cryptic Allosteric Site. *Cancer cell* **43**, 1590-1592 (2025).
<https://doi.org/10.1016/j.ccell.2025.07.020>
- 12 Strandgren, C. & Wiman, K. G. Therapeutic targeting of TP53 nonsense mutations in cancer. *Uppsala Journal of Medical Sciences* **129** (2024).
- 13 Heldin, A. *et al.* Novel compounds that synergize with aminoglycoside G418 or eRF3 degraders for translational readthrough of nonsense mutant TP53 and PTEN. *RNA Biology* **20**, 368-383 (2023).
<https://doi.org/10.1080/15476286.2023.2222250>
- 14 Palomar-Siles, M. *et al.* Translational readthrough of nonsense mutant TP53 by mRNA incorporation of 5-Fluorouridine. *Cell Death & Disease* **13**, 997 (2022).
<https://doi.org/10.1038/s41419-022-05431-2>
- 15 He, S. *et al.* Homo-PROTAC mediated suicide of MDM2 to treat non-small cell lung cancer. *Acta Pharmaceutica Sinica B* **11**, 1617-1628 (2021).
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.11.022>
- 16 Kasthuber, E. R. & Lowe, S. W. Putting p53 in Context. *Cell* **170**, 1062-1078 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.028>
- 17 Lu, W. J. & Abrams, J. M. Lessons from p53 in non-mammalian models. *Cell Death & Differentiation* **13**, 909-912 (2006).
<https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401922>
- 18 Levine, A. J. p53: 800 million years of evolution and 40 years of discovery. *Nature Reviews Cancer* **20**, 471-480 (2020).
<https://doi.org/10.1038/s41568-020-0262-1>

致谢

从课题构思、反复试错，到最终完成整篇论文，这段科研经历充实而又意义非凡。作为一名高中生，我利用学期周末和暑假走进北京大学的实验室，在学校与实验室的双重磨练下，感受到了科研的严谨与魅力，也逐步养成了独立思考、直面问题的习惯。在此，谨向所有给予我无偿指导、帮助与支持的老师致以最真诚的谢意。

本研究的指导老师为北京大学的杜鹏教授。感谢杜老师愿意接收一名高中生进入实验室，为我提供了宝贵的科研平台，让我得以近距离接触真正的科研。课题初期，我对非小细胞肺癌和跨物种 p53 同源蛋白的相关研究现状几乎一无所知，是杜老师耐心向我介绍课题背景，给我列出文献清单，引导我利用课余时间大量阅读梳理，逐步理解课题的研究意义，最终确定了“跨物种 p53 蛋白筛选及其在非小细胞肺癌中的抑癌功能研究”这一主题。因为我不能每天在实验室，杜老师便指导我学会规划实验节奏，哪些必须到现场做，哪些可以在家推进。再次感谢杜老师在选题确立、实验方案设计与整体研究方向把控方面提供了关键的指导。

感谢实验室的温汉光老师教我学习实验技术，向我讲解实验原理。周末做实验经常感觉时间紧任务重，来一趟实验室难免会遇到实验失败的时候，温老师总是细心帮我分析失败背后的原因，也会不厌其烦地回答我的各种问题，还教我把问题记在本子上、把有限的时间用在刀刃上。正是在这样的帮助下，我在一次次摸爬滚打中感受到了实验成功的喜悦，慢慢变得游刃有余。同时也要感谢实验室里的师兄师姐，在实验过程中给予的协助与支持。

感谢理工大学附属中学的田双杰老师。我在撰写论文初稿时，关于实验结果的呈现缺乏清晰的逻辑关系，数据的堆砌显得论文结构混乱，感谢田老师利用休息时间帮我修改论文，从结构框架到语句表述逐一打磨；更让我受益的是，田老师会在日常聊天中将课题相关的一些理论与课内所学的细胞生物学与遗传学的知识联系起来，也让我对高中生物学的学科思想有了更深入的理解。每当我带着困惑找到田老师，她总会耐心答疑解惑，帮助我厘清思路。

关于人工智能工具的使用，我在研究过程中使用了豆包，主要用于辅助翻译英文专业词汇、润色论文语句等，使用时间大概每周约 2 次。所有实验设计、

数据采集与分析、研究结论及论文核心内容的撰写均由本人独立完成, 凡参考 AI 生成信息的部分均经本人阅读原始文献进行核实。

最后, 再次感谢北京大学提供的实验平台与科研环境, 感谢各位老师给予的帮助与支持。这段在课业与科研之间辗转奔波、反复试错的经历, 将是我学业生涯中尤为珍贵的成长财富。