

SETDB1 通过 p53/p21 通路调控结肠癌细胞衰老

吴倩¹, 侯吉学¹, 贺强¹, 崔晓宾², 黄桂林¹, 孙旭凌¹

摘要 目的 探讨组蛋白甲基化酶 SET 结构域分支型 1 (SETDB1) 对结肠癌细胞衰老与增殖影响。方法 利用多柔比星(DOX)诱导结肠癌细胞衰老, Western blot 证实 SETDB1 在衰老细胞中的蛋白表达量。利用 SETDB1 的 shRNA (shSETDB1#1 和 shSETDB1#2) 和过表达质粒分别构建低表达和过表达 SETDB1 的结肠癌细胞模型, 用 Western blot 检测 SETDB1 表达程度; 用 CCK8 法和 β -半乳糖苷酶染色法分别检测细胞增殖能力及衰老细胞的百分比, p53 和 p21 的变化由 Western blot 检测; 针对 p53 过表达质粒进行逆转实验。结果 DOX 诱导细胞衰老后 SETDB1 的蛋白表达量可降低。低表达 SETDB1 后结肠癌细胞的增殖能力下降, 衰老细胞比例由 $(22.00 \pm 4.35)\%$ 升至 $(54.00 \pm 5.56)\%$ 和 $(53.33 \pm 4.93)\%$ ($P < 0.001$); 过表达 SETDB1 后结肠癌细胞增殖能力升高, 衰老细胞比例从 $(43.33 \pm 6.11)\%$ 降低至 $(21.33 \pm 3.51)\%$ ($P < 0.01$); 通过 GSE56496 数据富集分析发现 SETDB1 与 p53 信号通路有关, 沉默 SETDB1 可增高 p53 和 p21 蛋白水平, 而过表达 SETDB1 可降低 p53 和 p21 蛋白水平; 过表达 p53 可逆转过表达 SETDB1 引起的细胞衰老减少现象。结论 SETDB1 通过下调 p53/p21 信号通路抑制结肠癌细胞衰老。

关键词 结肠癌; SETDB1; 细胞增殖; 细胞衰老; p53

中图分类号 R 735.3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)09-1442-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.09.019

结肠癌在我国的发病率与死亡率分别居于第 3 位和第 5 位^[1]。目前, 针对结肠癌的靶向治疗研究在临床上受到越来越多的重视^[2-3], 关于结肠癌发病机制的研究得到广泛关注。研究^[4]显示, 在部分

相关肿瘤的发生及发展中, 细胞衰老扮演着重要角色。结肠癌细胞中存在一种属于组蛋白赖氨酸 N 端甲基转移酶的组蛋白甲基化酶 SET 结构域分支型 1 (SET domain bifurcated histone lysine methyltransferase 1, SETDB1), 其编码基因的位置在人类染色体 1q21 上, 其过度表达和下调广泛存在于多种恶性肿瘤中^[5-7], 但具体机制仍有待进一步的研究。鉴于课题组前期研究发现 SETDB1 可以影响细胞衰老^[8], 遂以结肠癌细胞为研究对象, 拟进一步探讨 SETDB1 在结肠癌发生发展中的作用, 为进一步阐明结肠癌发病机制和开发新的靶向治疗策略提供思路。

1 材料与方法

1.1 材料 结肠癌细胞 HT29、SW480 由石河子大学医学院第一附属医院病理科提供; 多柔比星 (doxorubicin, DOX) 购于德国 Sigma 公司; 衰老 β -半乳糖苷酶染色 (SA- β -Gal) 试剂盒、CCK8 试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司; 转染试剂购于赛默飞世尔科技(中国)有限公司; p53 和 p21 抗体、SETDB1 和 GAPDH 购于美国圣克鲁斯生物技术(上海)有限公司; 针对 SETDB1 的 shRNA、过表达质粒与 p53 质粒购于上海吉凯基因化学技术有限公司; 高糖培养基及嘌呤霉素等购于武汉启动子生物有限公司。

1.2 方法

1.2.1 稳转细胞系的建立 shRNA 慢病毒用于感染预铺在 6 孔板中的 SW480 细胞(每孔约 5×10^4 个细胞), 首先 $5 \mu\text{g/ml}$ 慢病毒感染细胞 12 h, 其次将培养基更换成高糖培养基。感染 72 h 后, 再将培养基更换为含 $2 \mu\text{g/ml}$ 嘌呤霉素的培养基。之后每 2 d 更换含嘌呤霉素的培养基, 直到对照细胞完全死亡。使用 MD2-G、PAX、pLKO-SETDB1 三包系统进行高表达病毒包装, 包装好的慢病毒立即感染 HT29 细胞系。

1.2.2 细胞衰老 β -半乳糖苷酶染色 将高表达 SETDB1 的 HT29 细胞及对照组细胞、低表达 SETDB1 的 SW480 细胞及对照组细胞预铺在 6 孔板中

2021-12-30 接收

基金项目: 国家自然科学基金-新疆联合基金(编号: U1903305); 石河子大学创新发展专项基金(编号: CXFZ202113); 石河子大学医学院第一附属医院博士基金(编号: BS202102)

作者单位: ¹ 石河子大学医学院第一附属医院胃肠乳腺外科, 石河子 832008

² 石河子大学医学院病理教研室, 石河子 832008

作者简介: 吴倩, 女, 硕士研究生;

黄桂林, 男, 博士, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: 13899523416@163.com;

孙旭凌, 男, 博士, 副主任医师, 责任作者, E-mail: tjhsxl@126.com

(每孔约 5×10^4 个细胞),用 DOX 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 诱导不同组别的 HT29 细胞或 SW480 细胞,加 β -半乳糖苷酶染色固定液 1 ml,25 $^{\circ}\text{C}$ 静置 30 min,PBS 冲洗 3 次。每孔均加 1 ml 染色工作液,封口胶封闭 6 孔板保存在无 CO_2 的 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中 15 min,于显微镜下观察拍照。

1.2.3 CCK8 检测 将 DOX 预处理的 HT29 细胞及 DMSO 处理的对照组细胞、高表达 SETDB1 的 HT29 细胞及对照组细胞、低表达 SETDB1 的 SW480 细胞及对照组细胞铺在 96 孔板中(每孔 3 000 个细胞),设复孔 3 个。待细胞贴壁,分别于 0、24、48、72 h 后,将混有 10 μl CCK8 的培养基 100 μl 加入每孔当中,孵育 2 h 后,酶标仪检测后绘制各时间点细胞生长曲线,比较细胞生长情况。

1.2.4 Western blot 检测 用蛋白裂解液提取不同处理组的细胞蛋白,计算好蛋白样品浓度及上样量。加样以 SDS-PAGE 胶电泳分离蛋白,湿转至 PVDF 膜,封闭孵育一抗 1 h,4 $^{\circ}\text{C}$ 7 h,第 2 天孵育对应的二抗 2 h,TBST 洗 30 min,利用 ECL 发光剂在曝光机下拍照。

1.2.5 细胞周期检测 将 DOX 预处理的 HT29 细胞及 DMSO 处理的对照组细胞分别用胰酶消化后,

低速离心弃上清液,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 环境下每管加入预冷的 80% 乙醇固定细胞 7 h,低速离心洗涤弃上清液,分别将 200 μl binding buffer、5 μl PI 和 5 μl RNase 加入,吹打均匀后常温避光静置 30 min 后上流式细胞仪进行分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 25.0 版统计软件进行数据分析,重复实验 3 次,各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SETDB1 在 DOX 诱导的结肠癌细胞衰老模型中表达 于 HT29 细胞中加入 DOX 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 诱导 2 d,细胞衰老现象明显增加,以此确认 SETDB1 是否参与了结肠癌细胞衰老(图 1A)。诱导组细胞增殖活性呈显著降低趋势($t = 10.242, P < 0.001$,图 1B)。同时诱导组细胞发生了 G_2/M 期阻滞,证明 DOX 诱导结肠癌细胞的衰老模型构建成功(图 1C、D)。另收集细胞行 Western blot 检测 SETDB1 的蛋白表达量,结果诱导组中 SETDB1 蛋白表达量较对照组明显下降,提示结肠癌细胞衰老过程中或许有 SETDB1 蛋白参与(图 1E)。

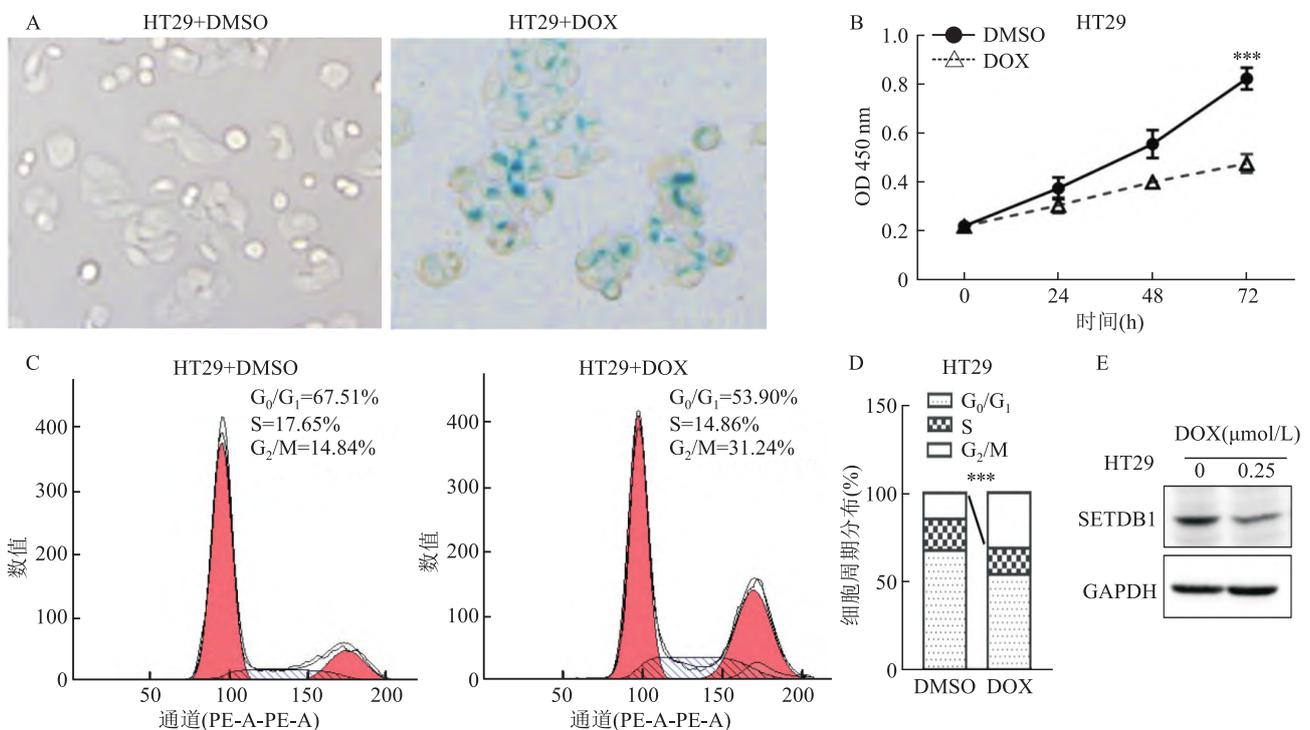


图1 SETDB1 在 DOX 诱导的结肠癌衰老模型中的表达

A: DOX 诱导 HT29 细胞衰老后经 β -半乳糖苷酶染色在显微镜下的染色情况 $\times 400$; B: CCK8 法酶标检测仪检测细胞生长曲线; C、D: 不同处理组的细胞周期变化; 与 DMSO 处理的对照组比较: $*** P < 0.001$; E: Western blot 检测 SETDB1 的蛋白表达

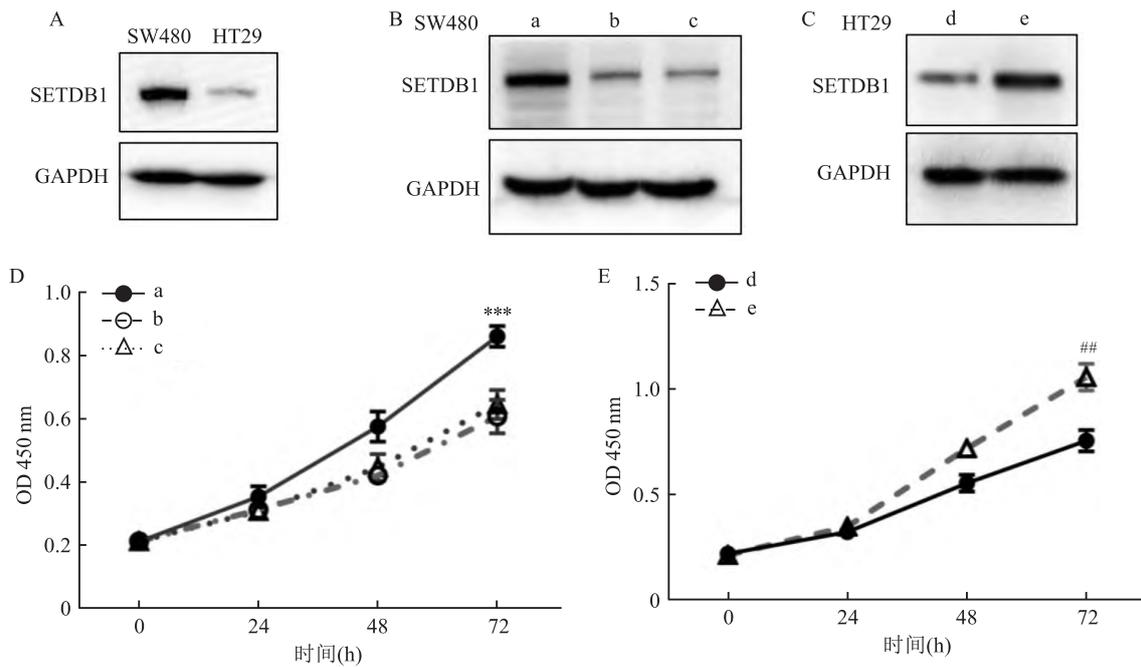


图2 SETDB1对结肠癌细胞增殖情况的影响

A: Western blot 检测 SETDB1 在 SW480 细胞系和 HT29 细胞系中表达; B、C: Western blot 检测经慢病毒转染技术分别建立稳定低表达 SETDB1 的 SW480 细胞系和高表达 HT29 细胞系; D、E: CCK8 法定量检测不同细胞系细胞增殖; a: shNC 组; b: shSETDB1#1 组; c: shSETDB1#2 组; d: Vector 组; e: 高表达 SETDB1#1 组; 与 shNC 组比较: *** $P < 0.001$, 与 Vector 组比较: ## $P < 0.01$

2.2 SETDB1 对结肠癌细胞增殖的影响 SETDB1 在 SW480 细胞系和 HT29 细胞系均有表达, 但表达差异有统计学意义(图 2A)。利用慢病毒转染技术分别建立稳定低表达 SETDB1 的 SW480 细胞系和高表达 HT29 细胞系, 并经 Western blot 检测证实(图 2B、C)。在 96 孔板中接种不同组细胞, CCK8 法检测不同组细胞在 0、24、48 和 72 h 时的增殖情况, 结果发现低表达 SETDB1 抑制结肠癌细胞增殖($F = 25.527, P < 0.001$, 图 2D), 而高表达 SETDB1 可促进结肠癌细胞的增殖($t = -6.328, P < 0.01$, 图 2E)。

2.3 SETDB1 对结肠癌细胞衰老的影响 利用 β -半乳糖苷酶染色法对用 DOX 诱导后的稳定低表达 SETDB1 的 SW480 细胞和稳定高表达 SETDB1 的 HT29 细胞进行染色, 观察不同组细胞中染色情况。结肠癌细胞的增殖能力在 SETDB1 低表达后下降, 衰老细胞占比从(22.00 \pm 4.35)% 增加至(54.00 \pm 5.56)% 和(53.33 \pm 4.93)% ($F = 40.484, P < 0.001$, 图 3A、B); 结肠癌细胞的增殖能力在过表达 SETDB1 后上升, 衰老细胞比例从(43.33 \pm 6.11)% 降低至(21.33 \pm 3.51)% ($t = 5.407, P < 0.01$, 图 3C、D)。

2.4 SETDB1 可对 p53/p21 通路进行调控 GEO

数据库分析发现 SETDB1 的表达与 P53 信号通路相关(图 4A), 由 Western blot 证实 p53 及 p21 的蛋白水平在低表达 SETDB1 组细胞明显增高(图 4B), 反之, 过表达 SETDB1 可抑制 p53 及 p21 的蛋白表达(图 4C), 提示改变 SETDB1 的表达可调节 p53/p21 信号通路。进一步检测 Vector、SETDB1 及 SETDB1 + p53 组细胞衰老水平, 过表达 SETDB1 后结肠癌细胞衰老比例从(52.33 \pm 5.51)% 降至(21.67 \pm 5.03)% ($t = 7.119, P < 0.01$, 图 4D), 经过 p53 质粒转染, 衰老细胞的占比则再次升至(40.67 \pm 4.04)% ($t = -5.098, P < 0.01$, 图 4E), 由此证明过表达 p53 可以逆转高表达 SETDB1 引起的细胞衰老减少, 说明结肠癌的细胞衰老可能是由 SETDB1 影响 p53/p21 信号通路调控来影响肿瘤的增殖。

3 讨论

近年来, 组蛋白相关功能的研究逐渐被医学界所重视。组蛋白甲基化由 27 种不同的甲基转移酶共同完成, 这些甲基转移酶在特定的点起作用, 发挥不同的生物学功能。当甲基转移酶 SETDB1 进入细胞质发挥非组蛋白的功能, 可修饰 p53 细胞衰老^[9-11]。目前参与细胞衰老调控的信号通路主要有 p53/p21 通路、Wnt/ β -catenin 通路, 其中 p53/p21

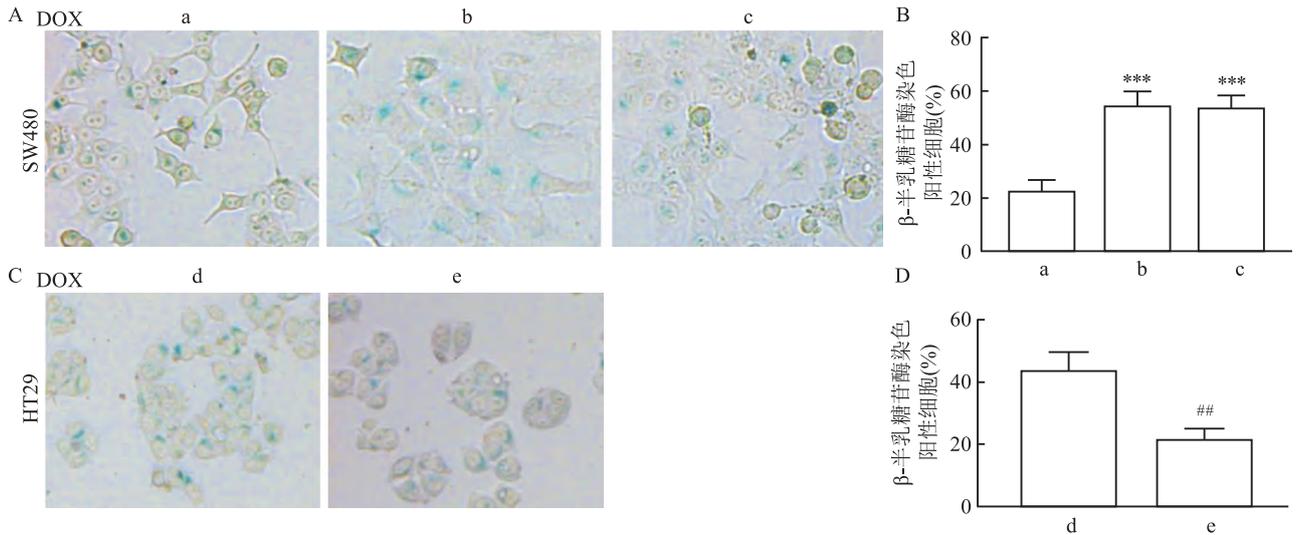


图3 SETDB1对结肠癌细胞衰老的影响

A: DOX 诱导后 SW480 细胞经 β-半乳糖苷酶染色法后的染色情况 ×400; B: β-半乳糖苷酶染色法对低表达 SETDB1 的结肠癌细胞衰老的定量分析, 与 shNC 组比较: *** $P < 0.001$; C: DOX 诱导后 HT29 组细胞经 β-半乳糖苷酶染色法后的染色情况 ×400; D: β-半乳糖苷酶染色法对高表达 SETDB1 的结肠癌细胞衰老的定量分析, 与 Vector 组比较: ** $P < 0.01$; a: shNC 组; b: shSETDB1#1 组; c: shSETDB1#2 组; d: Vector 组; e: 高表达 SETDB1#1 组

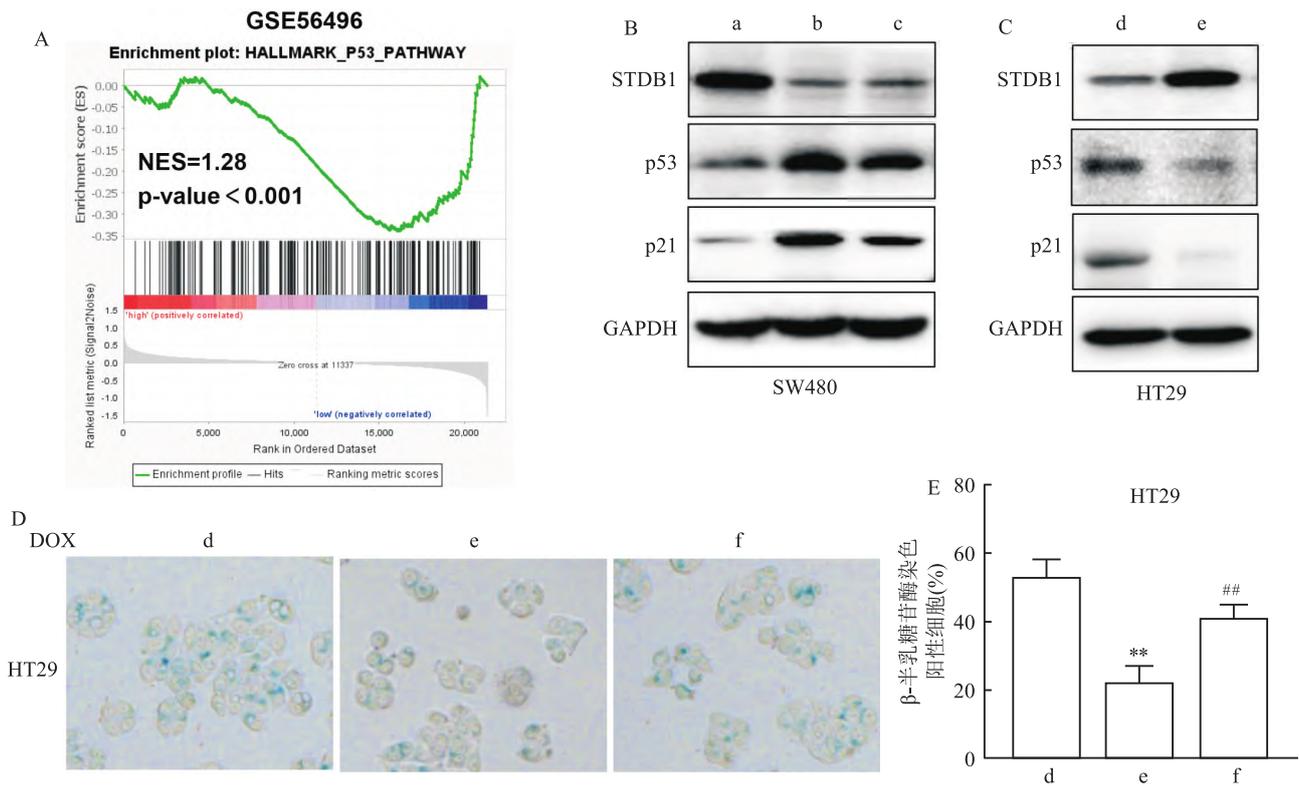


图4 SETDB1通过p53/p21通路调控结肠癌细胞衰老

A: GEO 数据库富集分析; B, C: Western blot 检测不同细胞系的相关蛋白水平; D: 不同处理的细胞系经 β-半乳糖苷酶染色法后的染色情况 ×400; E: β-半乳糖苷酶染色法对结肠癌细胞衰老的定量分析; a: shNC 组; b: 高表达 SETDB1 组; c: 同时高表达 SETDB1 与 p53 组; d: Vector 组; e: 高表达 SETDB1 组; f: 同时高表达 SETDB1 与 p53 组; 与 Vector 组比较: ** $P < 0.01$; 与高表达 SETDB1 组比较: ** $P < 0.01$

通路最为重要^[12-13]。研究^[14]表明, SETDB1 是参与 p53 稳定性调节的重要调节器之一。为确定 SET-

DB1 是否会直接影响 p53, 利用 GEO 数据测序分析富集后呈现结果为低表达 SETDB1 时 p53 表达上

调。

结肠癌是致人死亡的主要疾病之一。如何抑制结肠癌生长和转移的方式既是临床工作重点,也是基础科研的主攻方向。SETDB1 或许在结肠癌中起了癌基因的作用,但其作用机制未完全阐明,需要进一步的研究来探索其分子机制。课题组在前期研究^[8]中所建立的细胞衰老模型中发现,升高或降低 SETDB1 的表达量可以影响细胞衰老。近临床前研究^[15]证实,细胞衰老在抗肿瘤和促进肿瘤发生特性的调节中 SETDB1 起到核心作用。有研究发现^[12], SETDB1 在非小细胞肺癌患者中反复扩增和高表达。靶向 SETDB1 的抑制剂可能使过表达 SETDB1 的非小细胞肺癌患者受益。本研究发现,在肿瘤细胞衰老的过程中,SETDB1 蛋白表达水平明显下降,提示肿瘤衰老的过程有 SETDB1 参与。并且进一步通过慢病毒转染稳定低表达 RNA 构建了低表达 SETDB1 的结肠癌细胞模型以此来阐明 SETDB1 可否调节结肠肿瘤的衰老。通过 β -半乳糖苷酶染色提示 SETDB1 低表达确实可促进结肠癌细胞的衰老,其低表达可抑制结肠癌细胞增殖由 CCK8 实验来进一步揭示。以上证据证明,SETDB1 通过 p53/p21 通路影响结肠癌细胞衰老进而影响肿瘤细胞的生长方式,对肿瘤起到调控作用。综上所述,本研究为 SETDB1 通过激活 p53/p21 通路参与结肠癌细胞衰老过程提供了依据。

参考文献

- [1] 曹毛毛,陈万青. 中国恶性肿瘤流行情况及防控现状[J]. 中国肿瘤临床,2019,46(3):145-9.
- [2] Chen B F, Wang J D, Wang J L, et al. miR-29A regulatory circuitry comprising TP53, family, and SETDB1 in non-small cell lung cancer[J]. *Biosci Rep*, 2018, 38(5): BSR20180678.
- [3] Klonou A, Korkolopoulou P, Gargalionis A, et al. Histone mark pro-

- filin in pediatric astrocytomas reveals prognostic significance of H3K9 trimethylation and histone methyltransferase SUV39H1[J]. *Neurotherapeutics*, 2021, 18(3): 2073-90.
- [4] Karanth A, Maniswami R, Prashanth S, et al. Emerging role of SETDB1 as a therapeutic target[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2017, 21(3): 319-31.
- [5] Chen K, Zhang F, Ding J, et al. Histone methyltransferase SETDB1 promotes the progression of colorectal cancer by inhibiting the expression of TP53[J]. *J Cancer*, 2017, 8(16): 3318-30.
- [6] Strepkos D, Markouli M, Klonou A, et al. Histone methyltransferase SETDB1: a common denominator of tumorigenesis with therapeutic potential[J]. *Cancer Res*, 2021, 81(3): 525-34.
- [7] Guo J, Dai X, Laurent B, et al. AKT methylation by SETDB1 promotes AKT kinase activity and oncogenic functions[J]. *Nat Cell Biol*, 2019, 21(2): 226-37.
- [8] Hou Z, Sun L, Xu F, et al. Blocking histone methyltransferase SETDB1 inhibits tumorigenesis and enhances cetuximab sensitivity in colorectal cancer[J]. *Cancer Lett*, 2020, 487: 63-73.
- [9] Yuan L, Sun B, Xu L, et al. The updating of biological functions of methyltransferase SETDB1 and its relevance in lung cancer and mesothelioma[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(14): 7416.
- [10] Wang Z, Chen J, Gao C, et al. Epigenetic dysregulation induces translocation of histone H3 into cytoplasm[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2021, 8(19): e2100779.
- [11] Guo Y, Mao X, Xiong L, et al. Structure-guided discovery of a potent and selective cell-active inhibitor of SETDB1 tudor domain[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2021, 60(16): 8760-5.
- [12] Sun Q, Ding L, Xiao J, et al. SETDB1 accelerates tumorigenesis by regulating the WNT signalling pathway[J]. *J Pathol*, 2015, 235(4): 559-70.
- [13] 李根林, 刘杰, 谢晶, 等. miR-122-5p 靶向 ADAM10 调控 Notch 信号通路对人卵巢癌细胞 SKOV-3 的上皮-间质转化的抑制作用[J]. 安徽医科大学学报, 2021, 56(1): 54-9.
- [14] Fei Q, Shang K, Zhang J, et al. Histone methyltransferase SETDB1 regulates liver cancer cell growth through methylation of p53[J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 8651.
- [15] Harjes U. SETDB1, a new target for immunotherapy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2021, 21(7): 412.

SETDB1 regulates cell senescence through p53/p21 signaling

Wu Qian¹, Hou Jixue¹, He Qiang¹, Cui Xiaobin², Huang Guilin¹, Sun Xuling¹

(¹Dept of Gastrointestinal and Breast Surgery, The First Affiliated Hospital of Medical College of Shihezi University, Shihezi 832008; ²Dept of Pathology, School of Medicine, Shihezi University, Shihezi 832008)

Abstract Objective To investigate the effects of SETDB1 on the proliferation and apoptosis of human colon cancer cells. **Methods** The senescence of colon cancer cells was induced by doxorubicin, and the protein expression of SETDB1 in the senescent cells was detected by Western blot. Colon cancer cell models with low expression of SETDB1 and overexpression of SETDB1 were constructed by using shRNA (shSETDB1#1 and shSETDB1#2) of SETDB1 and overexpression plasmid, respectively. Western blot was used to detect the expression of SETDB1, the CCK8

(下转第 1452 页)

- mice[J]. *Gut Microbes*,2020,11(6):1774-89.
- [9] De La Fuente-Nunez C, Meneguetti B T, Franco O L, et al. Neuro-microbiology; how microbes influence the brain[J]. *ACS Chem Neurosci*,2018,9(2):141-50.
- [10] Powell N, Walker M M, Talley N J. The mucosal immune system; master regulator of bidirectional gut-brain communications[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*,2017,14(3):143-59.
- [11] Lee K E, Kim J K, Kim D H. Orally administered antibiotics vancomycin and ampicillin cause cognitive impairment with gut dysbiosis in mice with transient global forebrain ischemia[J]. *Front Microbiol*,2020,11:564271.
- [12] Ferguson J F, Aden L A, Barbaro N R, et al. High dietary salt-induced dendritic cell activation underlies microbial dysbiosis-associated hypertension[J]. *JCI Insight*,2019,5(13):e126241.
- [13] Dinan T G, Cryan J F, Stanton C. Gut microbes and brain development have black box connectivity[J]. *Biol Psychiatry*,2018,83(2):97-9.

Effect of antibiotics on gut microbiota and cognitive behaviors in rats

Li Yanli¹, Yang Xiaorong², Zhang Ce², Guo Junhong¹

(¹Dept of Neurology, First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001; ²Dept of Physiology, Key Laboratory of Cellular Physiology, Ministry of Education, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001)

Abstract Objective To investigate the changes and recovery of gut microbiota in rats after broad-spectrum antibiotic exposure and its effect on cognitive behaviors. **Methods** Rats were randomly divided into antibiotic (AT) group and control group. AT group was treated with antibiotic cocktail containing ampicillin, vancomycin, metronidazole and imipenem for 3 days, and control group was gavaged with the same amount of normal saline. On the 4th day (24 h after the last antibiotic treatment) and 2 months, feces were collected for 16S rRNA gene sequencing to detect the changes of gut microbiota; At 2 months, the cognitive behaviors were detected by operant-based delayed matching to position (DMTP) task and Y maze. **Results** On day 4, the gut microbiota in AT group decreased, including a decrease in microbiota diversity ($P < 0.0001$), a reduction of *Bacteroidetes* ($P < 0.0001$) and *Firmicutes* ($P = 0.0001$), and an increase of *Proteobacteria* ($P < 0.0001$). After discontinuation of antibiotics, the microbiota began to recover, which had no difference from control group at 2 months. And there was no significant difference in cognitive behaviors between AT group and control group. **Conclusion** The broad-spectrum antibiotics can decrease gut microbiota in rats. However, this decrease is temporary. The microbiota returns to normal at 2 months after discontinuation of antibiotics. And it does not affect the cognitive behaviors of rats.

Key words antibiotics; gut microbiota; cognitive behaviors; DMTP; Y maze

(上接第 1446 页)

assay was performed to detect cell proliferation while a Senescence β -Galactosidase Staining Kit was used to detect senescent cells, and Western blot was used to detect the changes of p53 and p21. The reverse experiment was carried out with p53 overexpression plasmid. **Results** Cell senescence evoked by doxorubicin could down-regulate the protein expression of SETDB1. After low expression of SETDB1, the proliferation ability of colonic cancer cells decreased, and the proportion of senescent cells increased from $(22.00 \pm 4.35)\%$ to $(54.00 \pm 5.56)\%$ and $(53.33 \pm 4.93)\%$ ($P < 0.001$). After overexpression of SETDB1, the proliferation ability of colon cancer cells increased, and the ratio of senescent cells decreased from $(43.33 \pm 6.11)\%$ to $(21.33 \pm 3.51)\%$ ($P < 0.01$). Through GSE56496 enrichment and analysis, it was found that SETDB1 was related to p53 signal pathway, silencing SETDB1 could increase the levels of p53 and p21 protein, while overexpression of SETDB1 could decrease the level of p53 and p21 protein, and overexpression of p53 reversed the decrease of cell senescence caused by overexpression of SETDB1. **Conclusion** SETDB1 inhibits the senescence of colon cancer cells by inhibiting p53/p21 signal pathway, which provides a potential target for individualized tumor therapy.

Key words colon cancer; SETDB1; cell proliferation; cellular senescence; p53