

· 研究论文 ·

SR1078 激活 ROR α 诱导卵巢癌细胞凋亡的机制研究程琳^{1,2}, 侯宇^{1,2}, 王伟章^{1,2*}

(广东药科大学 1. 基础学院, 2. 广东省生物活性药物研究重点实验室, 广东 广州 510006)

摘要: 本文主要探讨 ROR α 激动剂 SR1078 对卵巢癌细胞的作用及其分子机制。采用 MTS 法检测 *N*-[4-[2,2,2-三氟-1-羟基-1-(三氟甲基)乙基]苯基]-4-(三氟甲基)苯甲酰胺 (SR1078) 对卵巢癌细胞 HeyA8 和 Hey 细胞活性的影响。通过流式细胞术检测 SR1078 对卵巢癌细胞 HeyA8 和 Hey 细胞周期和凋亡的影响。利用 p53 siRNA 或 p53 抑制剂 PFT- α 和 PFT- β 处理 HeyA8 和 Hey 细胞, 流式细胞术检测干扰 p53 后对 SR1078 诱导卵巢癌细胞凋亡的影响。Western blot 检测 SR1078 和 p53 siRNA 对 p53 蛋白表达的影响, 以及 p53 抑制剂单独或联合 SR1078 对 p53、p-p53 及其调控的下游促凋亡蛋白 Noxa 表达的影响。实验结果显示, SR1078 明显降低了 HeyA8 和 Hey 的细胞活性, 且显著诱导 HeyA8 和 Hey 细胞凋亡; 此外, SR1078 能够上调 p53 和 Noxa 表达, 而干扰 p53 能够显著抑制 SR1078 诱导卵巢癌细胞凋亡和 Noxa 的表达; 综上所述, ROR α 激动剂 SR1078 通过活化 p53 信号通路诱导卵巢癌细胞凋亡。

关键词: 维甲酸相关孤儿核受体 α ; *N*-[4-[2,2,2-三氟-1-羟基-1-(三氟甲基)乙基]苯基]-4-(三氟甲基)苯甲酰胺; 卵巢癌细胞; p53; 细胞凋亡

中图分类号: R966

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 01-0062-06

Mechanism of apoptosis induced by SR1078 activating ROR α in ovarian cancer cellsCHENG Lin^{1,2}, HOU Yu^{1,2}, WANG Wei-zhang^{1,2*}

(1. School of Basic Courses, 2. Guangdong Province Key Laboratory of Pharmaceutical Bioactive Substances, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: This study was to investigate the effect of ROR α activator SR1078 on ovarian cancer cells and its molecular mechanism *in vitro*. The survival rate of HeyA8 and Hey cells was detected by MTS assay; the apoptosis and cells cycle distribution after SR1078 treatment and the effect of p53 siRNA or PFT- α and PFT- β of p53 inhibitors on SR1078-induced apoptosis of HeyA8 or Hey cells were analyzed by flow cytometry. Western blot was used to detect the effect of SR1078 and p53 siRNA on the expression of p53 protein and the effect of p53 inhibitors alone or in combination with SR1078 on the expression of p53, p-p53 and its downstream pro-apoptotic protein Noxa. The results showed that SR1078 significantly reduced the cell viability and induced apoptosis in HeyA8 and Hey cells. In addition, SR1078 up-regulated the protein expression of p53 and Noxa, and p53 suppression led to significant inhibition of SR1078-induced apoptosis and the expression of Noxa in ovarian cancer cells. In summary, SR1078 induced apoptosis of ovarian cancer cells by activation of p53 signaling pathway.

收稿日期: 2017-08-20; 修回日期: 2017-09-18.

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (2014A030313580).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-20-39352617, E-mail: wwzss@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0814

Key words: retinoid acid receptor related orphan receptor α ; *N*-[4-(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-hydroxypropan-2-yl)phenyl]-4-(trifluoromethyl)benzamide; ovarian neoplasms; p53; apoptosis

卵巢癌是妇科三大恶性肿瘤之一,其发病率高,预后差,五年存活率不足 30%,对患者生命造成极大威胁^[1]。由于缺乏明确有效的治疗靶点及相应药物,当前的治疗手段仍以细胞毒性药物进行化疗为主。因此,急需探索全新的分子靶标及进行相应的药物开发。维甲酸相关孤儿核受体 α (retinoid acid receptor related orphan receptor α , ROR α) 是一类广泛分布于机体各组织的核受体超家族成员之一,参与调节昼夜节律、炎症与免疫反应及糖脂代谢等多种生理活动^[2-7]。由于 ROR α 基因定位于常见的脆性区域而经常发生丢失,因此,普遍认为其具有抑制肿瘤的功能^[8]。尽管研究发现 ROR α 在卵巢癌细胞系中的表达明显下调,但其在卵巢癌中的作用迄今尚无研究报道。

N-[4-[2,2,2-三氟-1-羟基-1-(三氟甲基)乙基]苯基]-4-(三氟甲基)苯甲酰胺 (SR1078) (图 1) 是第一个合成的 ROR α 激动剂,能够提高 ROR α 的活性,促使 ROR α 与目的基因启动子上的 ROR 调控元件 (ROR response element, RORE) 结合,刺激 ROR α 目的基因的表达。因此,本文以卵巢癌为研究对象,通过利用 SR1078 处理卵巢癌细胞系实验探讨 ROR α 在卵巢癌细胞中的作用及其调控机制,为寻求治疗卵巢癌的临床有效药物靶点提供实验依据。

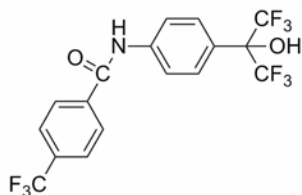


Figure 1 Chemical structure of SR1078. SR1078: *N*-[4-(1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-hydroxypropan-2-yl)phenyl]-4-(trifluoromethyl)benzamide

材料与amp;方法

试剂 SR1078 (溶于 DMSO, 母液 10 mmol·L⁻¹) 购自美国 MCE 公司; Pifithrin- α/β (PFT- α/β) 粉剂购自美国 Selleck 公司,溶于 DMSO; MTS 购自美国 Promega 公司; 凋亡试剂盒购自北京四正柏公司; 二甲基亚砜 (DMSO) 和碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 购自美国 Sigma 公司; 总 RNA 提取试剂盒购自 OMEGA 公司; Takara 逆转录试剂盒购自大连宝生物工程公司; ROR α 抗体购自美国 GeneTex 公司;

GAPDH 和 Noxa 抗体购自美国 Abcom 公司; p-p53、p53 和 β -actin 抗体购自武汉博士德公司; ECL 购自美国 Pierce 公司。

细胞培养 上皮性卵巢癌细胞 HeyA8 和 Hey 购自中国科学院上海分院细胞库^[9]。细胞培养在含有 10% 胎牛血清、100 μ mol·L⁻¹ 青霉素和链霉素的 DMEM 培养基 (美国 Gibco 公司) 中,培养条件为含 5% CO₂ 的 37 $^{\circ}$ C 培养箱。

药物处理 当 HeyA8 和 Hey 细胞贴壁长至培养瓶底部 80% 即处于对数生长期时,将细胞消化后按一定浓度接种到孔板中,待贴壁长至 70%~80% 时去除旧培养基,予以分组加入不同浓度的 SR1078 进行处理。

实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 检测

细胞总 RNA 提取 用 1 \times PBS 溶液洗涤细胞 2 次后,将 RNAiso plus 液 1 mL 加入 6 孔板中,充分吹打混匀,收集。加入氯仿 200 μ L,涡旋混匀,冰上孵育 10 min。12 000 r·min⁻¹, 4 $^{\circ}$ C 下离心 15 min,取上清液,加入 1/3 体积的乙醇,涡旋混匀,将上清液转至 2 mL RNeasy Mini spin column,吸附柱置于 2 mL column 中,室温,1 000 \times g 离心 1 min。依次加入 300 μ L 和 400 μ L wash buffer 1 以及 500 μ L wash buffer 2 至 column,清洗 RNA 沉淀,室温,1 000 \times g 离心 1 min。加入 30 μ L 无菌 DEPC 水于吸附柱的薄膜上,放置 2 min,室温,最高转速离心 1 min,将 RNA 洗脱下来。核酸蛋白分析仪检测 RNA 浓度及纯度,OD_{260/280} = 1.8~2.1,表明提取的 RNA 纯度较高。1% 琼脂糖凝胶电泳图显示两个条带且条带亮度 28S : 18S = 2 : 1,无弥散,表明提取的 RNA 纯度高且无降解。

RNA 逆转录成 cDNA 按照逆转录试剂盒说明书将 RNA 逆转录成 cDNA。引物设计引物由 Invitrogen 公司设计合成, h-ROR α F:5'-AAGCAATGCCACCTACTCCT-3'; R:5'-CAGCATCTCGAGACATCCCT-3'。

Q-PCR 反应 反应体系 20 μ L, SYBR Premix Ex TaqTM 10 μ L, 去离子水 6.4 μ L, 上下游引物各 0.8 μ L, 模板 cDNA 2 μ L。两步法反应过程如下: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 进入循环, 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 退火和延伸 50 s, 循环次数 40 次。以 GAPDH 作为内参,将所得 Ct 值按照 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 的方法进行处理。

Western blot 检测 SR1078 (终浓度为 5.0 和 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理 HeyA8 和 Hey 细胞 48 h 后, 收集细胞并提取蛋白。样品经 SDS-PAGE 电泳分离, 湿电转移至硝酸纤维素膜, 膜在室温下用封闭液封闭 2 h, 加入 5% BSA 稀释的 GAPDH 抗体 (1 : 8000)、ROR α (1 : 1000)、p-p53 和 Noxa 抗体 (1 : 2000)、p53 和 β -actin 抗体 (1 : 400), 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 洗膜 3 次, 加入封闭液稀释的二抗稀释液 (1 : 2000), 室温 1 h。用 ECL solution 显色, 最后进行显影, 定影。用 Banksan 软件进行灰度分析, 分析目标基因的表达水平时用 GAPDH 和 β -actin 为内源对照。

MTS 检测 用 0.25% 胰酶消化处于对数生长期的 HeyA8 和 Hey 细胞并接种于 96 孔培养板, 每孔加入 2×10^3 个细胞, 培养液 100 μL , 每组设 3 个复孔。共分 4 组, 分别以终浓度为 1.25、2.5、5.0 和 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SR1078 处理为实验组, 加入等体积的 DMSO 作为阴性对照, 36 和 72 h 后, 每孔加入 MTS 20 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1~2 h。490 nm 测定吸收度 (A) 值的变化并计算细胞存活率。细胞存活率 (%) = $(A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

细胞周期和凋亡检测

流式细胞仪检测细胞周期 SR1078 (终浓度 5.0 和 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理 HeyA8 和 Hey 细胞, 以 DMSO 处理组为阴性对照组, 72 h 后收集细胞。加入预冷的 70% 乙醇进行固定, -20 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。离心去上清, 用 PBS 润洗 2 次。PBS 100 μL 重悬细胞并加入 RNA 酶 2 μL , 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min, 再以 PBS 润洗并以 100 μL 重悬, 加入 PI 5 μL 混匀, 避光, 室温孵育 5 min, 上机检测前加入 PBS 调整细胞数为每毫升 1×10^6 个, 混匀。

流式细胞仪检测细胞凋亡 凋亡检测的实验分组同检测周期, 72 h 后收集细胞, PBS 润洗 2 次, 离心去上清, 加入 1 \times binding buffer 100 μL 重悬, 再加入 Alexa Flour 647 Annexin-V 试剂 4 μL , 混匀, 室温避光孵育 10 min。再加入 PI 7 μL , 最后加入 1 \times binding buffer 200 μL 调整细胞数为每毫升 1×10^6 , 上机检测。

p53 RNAi 实验 p53 siRNA 由广州锐博生物科技有限公司合成, 序列如下: si-h-TP53-001, GACTC CAGTGGTAATCTAC; si-h-TP53-002, GTAATCTA CTGGGACGGAA。取 HeyA8 和 Hey 细胞以每毫升 1×10^5 个接种于 12 孔板, 加入含 10% FBS 的 DMEM 培养基至 800 μL 体积。将 siRNA (siRNA 1+2, 终浓度 100 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 100 μL) 稀释于 opti-MEM 100 μL 中, 轻轻混匀; 另外, 将 lipofectamine RNAi MAX 2 μL 稀释于 opti-MEM 100 μL 中, 室温放置 5 min 后将

两种稀释液混合, 轻轻混匀室温孵育 20 min 后, 将 lipofectamine RNAi MAX/siRNA 混合液加入培养孔中, 混合后培养箱中培养 48 h, 补加 10% FBS 的 DMEM 培养基至 1 mL, 加入终浓度为 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SR1078 处理细胞 72 h 后, 检测细胞凋亡。

PFT- α 和 PFT- β 抑制实验 将 PFT- α 和 PFT- β 溶于 DMSO, 配制为 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 工作液。取 HeyA8 和 Hey 细胞以每毫升 2×10^5 个接种于 6 孔板, 加入含 10% FBS DMEM 培养基 2 mL。将 PFT- α 和 PFT- β 工作液分别稀释到 10 和 25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 加入培养孔中, 至终浓度分别为 10 和 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 处理细胞 5 h 后, 加入终浓度为 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SR1078, 混匀后培养箱中培养 72 h。

统计学分析 使用 Graphpad Prism 5 软件进行数据分析, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间均数比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 进行 *t* 检验。

结果

1 MTS 比色法检测 SR1078 对 HeyA8 和 Hey 细胞活性的影响

Q-PCR 和 Western blot 检测结果显示, HeyA8 和 Hey 细胞中均表达 ROR α mRNA 和蛋白 (图 2A, B), 且 Hey 细胞的 ROR α 蛋白表达水平高于 HeyA8 细胞。

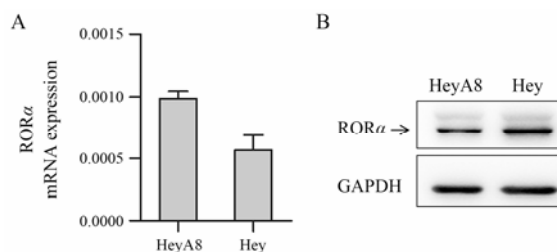


Figure 2 The expression ROR α mRNA (A) and protein (B) in Hey and HeyA8 cells

细胞增殖实验结果显示, SR1078 呈时间及剂量依赖性抑制 Hey (图 3A) 和 HeyA8 (图 3B) 的细胞活性。5.0 和 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SR1078 分别处理细胞 36 和 72 h 后, 细胞活性显著下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$)。这些结果提示, ROR α 激活剂 SR1078 能有效抑制卵巢癌细胞 HeyA8 和 Hey 的细胞活性。

2 SR1078 对 HeyA8 和 Hey 细胞周期和凋亡及 p53 蛋白表达的影响

流式细胞术检测结果显示, 5.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SR1078 对 HeyA8 和 Hey 细胞凋亡有一定的促进作用, 而处理浓度为 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时能够诱导细胞发生显著的调

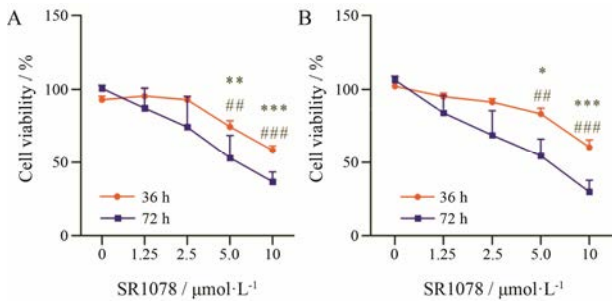


Figure 3 Effect of SR1078 on cell viability of Hey (A) and HeyA8 (B) cells. $n=3$, $\bar{x} \pm s$. Hey and HeyA8 cells were treated with different dose of SR1078 for 36 and 72 h, and then cell viability was detected by MTS assay. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs control group (36 h); ## $P<0.01$, ### $P<0.001$ vs control group (72 h)

亡 (图 4A, $P<0.01$)。细胞周期检测结果显示 (图 4B), $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SR1078 明显引起 HeyA8 细胞发生 G_0/G_1 周期阻滞, 而对 Hey 细胞的周期分布并无明显影响。

Western blot 结果显示, 不同浓度 SR1078 处理 HeyA8 和 Hey 细胞 48 h 后, p53 的表达上调 (图 4C)。

3 p53 在 SR1078 诱导卵巢癌细胞 HeyA8 和 Hey 凋亡中的作用

为验证 p53 在 SR1078 诱导卵巢癌细胞凋亡中的作用, 采用 p53 抑制剂 PFT- α 和 PFT- β 抑制 p53 活性后观察对 SR1078 诱导 HeyA8 和 Hey 细胞凋亡的影响。流式细胞仪检测结果显示, $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SR1078

诱导细胞发生显著的凋亡 ($P<0.001$), 而抑制 p53 后 SR1078 诱导的细胞凋亡明显减少, 尤其 PFT- β ($25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的作用更为显著 (图 5A, $P<0.001$)。

另外, 为进一步验证 p53 的作用, 采用 RNAi 的方法抑制 p53 表达, 观察对 SR1078 诱导细胞凋亡的影响。Western blot 结果显示 (图 5B), 针对 p53 的 siRNA 可以明显降低 Hey 细胞中 p53 蛋白的表达。流式细胞术检测结果显示 (图 5C), $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SR1078 能够明显诱导 Hey 细胞凋亡 ($P<0.001$), 抑制 p53 表达后 SR1078 诱导的细胞凋亡显著降低 ($P<0.01$)。

同时, 为了研究 p53 介导 SR1078 诱导细胞凋亡的分子机制, Western blot 检测 SR1078、PFT- α 和 PFT- β 单独或联合作用对 p53 及其调控的促凋亡蛋白表达的影响。结果显示, SR1078 处理 Hey 细胞后 p53、p-p53 及 Noxa 蛋白的表达水平明显上调, 而抑制 p53 后明显地抑制 SR1078 对这些蛋白的促进作用 (图 6)。

讨论

肿瘤的发生和发展往往与抑癌基因突变或失活密切相关, 靶向肿瘤形成与恶化过程中发生变化的基因治疗肿瘤成为一种可能。研究已经发现, ROR α 在多种肿瘤中表达下调或失活, 过表达 ROR α 能够抑制乳腺癌细胞的生长和侵袭, 并促进胃癌细胞凋亡^[8, 10-12]。同样, ROR α 激活剂激活 ROR α 也能够抑

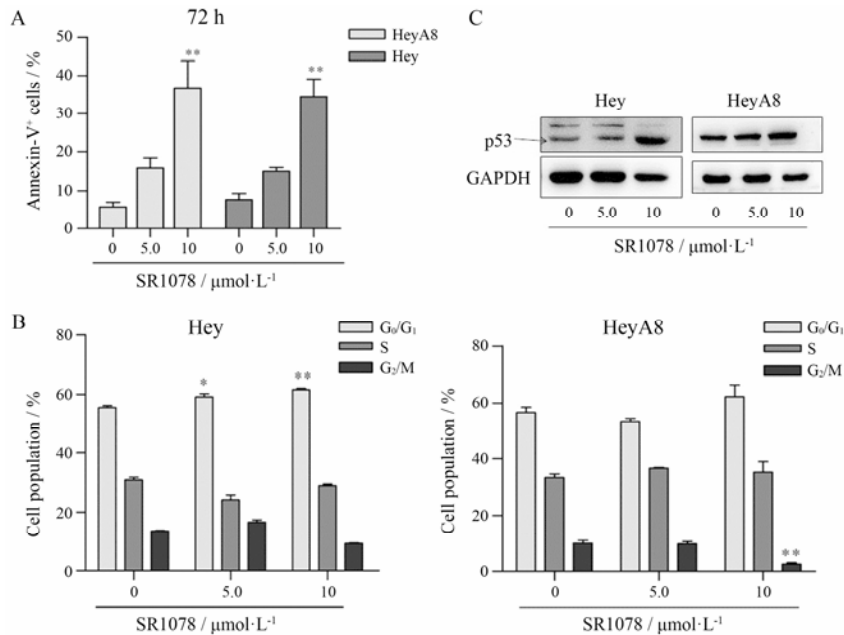


Figure 4 Effect of SR1078 on apoptosis (A), cell cycle (B) and the p53 protein expression (C) of HeyA8 and Hey cells. A, B: Hey and HeyA8 cells were treated with different dose of SR1078 (5.0 and $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 72 h and then cells went apoptosis and cell cycle were detected by flow cytometry; C: Hey and HeyA8 cells were treated with different dose of SR1078 (5.0 and $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 48 h and then the p53 protein expression were evaluated by Western blot. $n=3$, $\bar{x} \pm s$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control group

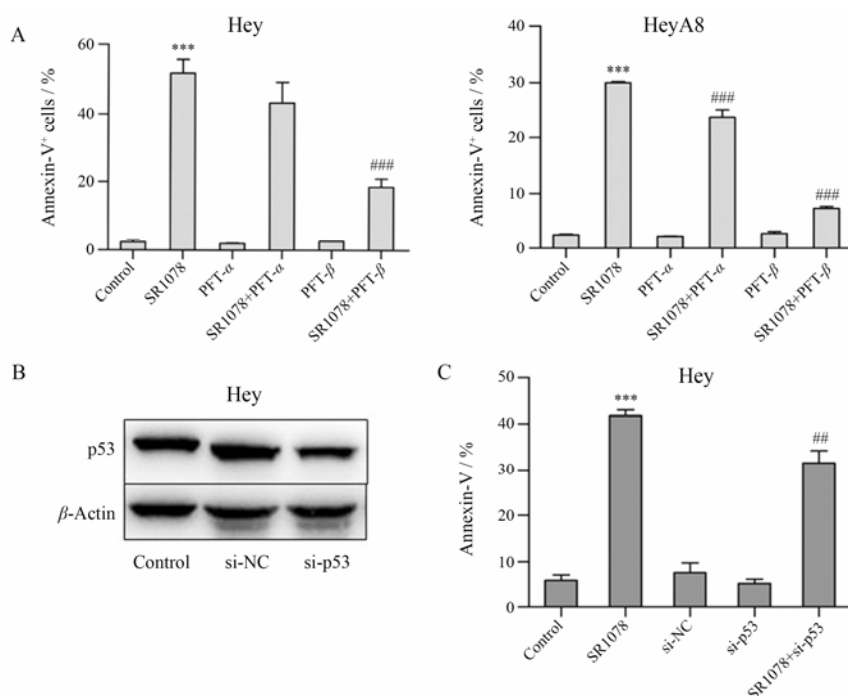


Figure 5 Role of p53 in ROR α -induced apoptosis of HeyA8 and Hey cells. A: HeyA8 and Hey cells were treated with PFT- α (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and PFT- β (25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 4 h, followed by treated with 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SR1078 for 72 h, and then the apoptosis was detected by flow cytometry. B: Hey cells were transfected with si-p53 for 48 h, and then the expression of p53 protein was detected by Western blot. C: Hey cells were transfected with si-p53 for 48 h, treated with 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SR1078 for 72 h, and then the apoptosis was detected by flow cytometry. $n=3$, $\bar{x}\pm s$. *** $P<0.001$ vs control group; ## $P<0.01$, ### $P<0.001$ vs SR1078 group. si-NC: si-Negative control

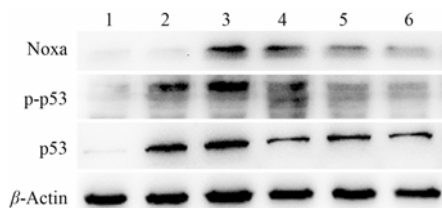


Figure 6 Effect of SR1078 on expression of p53, p-p53 and Noxa protein in Hey cells. Hey cells were treated with PFT- α (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and PFT- β (25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 4 h, followed by treated with 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SR1078 for 48 h, and then the p53, p-p53 and Noxa protein expression were evaluated by Western blot. 1: Control; 2: PFT- α ; 3: SR1078; 4: PFT- β ; 5: SR1078+PFT- α ; 6: SR1078+PFT- β

制前列腺癌细胞的增殖和侵袭，并且通过调节糖代谢阻止肝癌细胞的生长及诱导肝癌细胞凋亡^[13-15]。这些结果说明，恢复 ROR α 基因的表达或激活其蛋白活性可以起到抗癌的作用。在本研究中，ROR α 激动剂 SR1078 通过激活 ROR α 显著降低卵巢癌 HeyA8 和 Hey 细胞活性和诱导其发生细胞凋亡，提示 ROR α 具有成为卵巢癌治疗药物靶点的潜能。

早期文献^[2, 16]报道，ROR α 作为一种转录调节因子，通常以经典方式与靶基因启动子上的 RORE 结合，调节目的基因及其下游基因的表达而发挥作用。在乳腺癌中，ROR α 可以直接转录调节 SEMA3F

(transcription regulator of semaphorin 3F) 基因的表达抑制乳腺癌细胞的增殖与侵袭^[11]。另一方面，ROR α 也能够通过非转录激活作用发挥功能。如 ROR α 在结肠癌中通过与 β -catenin 蛋白的相互结合而抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路，调节细胞增殖和肿瘤进展^[17]。此外，p53 通路是机体应对 DNA 损伤的天然防护屏障，研究发现，DNA 损伤可诱导 ROR α 活化，进而抑制 p53 蛋白的泛素化而增强 p53 稳定性，最终激活 p53 的转录活性，促进肿瘤细胞凋亡^[18, 19]。有意思的是，ROR α 的人工合成配体 SR1078 同样能够通过活化 ROR α 增强 p53 蛋白稳定性而诱导肝癌细胞发生凋亡^[13, 20]。在本研究中，ROR α 激动剂 SR1078 处理卵巢癌细胞后，p53 及其下游调控的促进凋亡蛋白 Noxa 同样明显增多，而 p53 抑制剂和 p53 siRNA 均能显著削弱其作用，表明 p53 是介导 SR1078 诱导卵巢癌细胞凋亡的关键分子。由于 p53 在抑制肿瘤形成过程中发挥着至关重要的作用，SR1078 能够增强 p53 蛋白稳定性的结果提示 ROR α 小分子激动剂将是一种潜在肿瘤治疗策略^[21]。需要指出的是，虽然 p53 siRNA 同样能够显著抑制 SR1078 的作用，但是其抑制效果却明显低于 p53 抑制剂 PFT- β (图 5C)，这与 p53 siRNA 并不能完全抑制 p53 蛋白的表达所造成的 (图 5B)。

综上, ROR α 激活剂 SR1078 通过激活 p53 信号通路诱导细胞凋亡发挥抗卵巢癌的作用。由于晚期卵巢癌易发生转移及产生耐药, 因此, 深入研究 SR1078 对卵巢癌细胞转移和药物敏感性方面的影响及相关机制, 必将有助于进一步将 ROR α 开发成为卵巢癌治疗药物新靶点。

References

- [1] Cress RD, Chen YS, Morris CR, et al. Characteristics of long-term survivors of epithelial ovarian cancer [J]. *Obstet Gynecol*, 2015, 126: 491–497.
- [2] Giguère V, Tini M, Flock G, et al. Isoform-specific amino-terminal domains dictate DNA-binding properties of ROR alpha, a novel family of orphan hormone nuclear receptors [J]. *Gene Dev*, 1994, 8: 538–553.
- [3] Kang HS, Okamoto K, Takeda Y, et al. Transcriptional profiling reveals a role for ROR α in regulating gene expression in obesity-associated inflammation and hepatic steatosis [J]. *Physiol Genomics*, 2011, 43: 818–828.
- [4] Lau P, Fitzsimmons RL, Raichur S, et al. The orphan nuclear receptor, ROR α , regulates gene expression that controls lipid metabolism: staggerer (SG/SG) mice are resistant to diet-induced obesity [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283: 18411–18421.
- [5] Wong SH, Walker JA, Jolin HE, et al. Transcription factor ROR α is critical for nuocyte development [J]. *Nat Immunol*, 2012, 13: 229–236.
- [6] Zhao X, Han C, Yu RT, et al. Nuclear receptors rock around the clock [J]. *EMBO Rep*, 2014, 15: 518–528.
- [7] Byun JK, Choi YK, Kang YN, et al. Retinoic acid-related orphan receptor alpha reprograms glucose metabolism in glutamine-deficient hepatoma cells [J]. *Hepatology*, 2015, 61: 953–964.
- [8] Zhu Y, Mcavoy S, Kuhn R, et al. ROR α , a large common fragile site gene, is involved in cellular stress response [J]. *Oncogene*, 2006, 25: 2901–2908.
- [9] Buick RN, Pullano R, Trent JM. Comparative properties of five human ovarian adenocarcinoma cell lines [J]. *Cancer Res*, 1985, 45: 3668–3676.
- [10] Jun D, Ren X. ROR α , a potential tumor suppressor and therapeutic target of breast cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13: 15755–15766.
- [11] Xiong G, Wang C, Evers BM, et al. ROR α suppresses breast tumor invasion by inducing SEMA3F expression [J]. *Cancer Res*, 2012, 72: 1728–1739.
- [12] Wang Z, Xiong F, Wang X, et al. Nuclear receptor retinoid-related orphan receptor alpha promotes apoptosis but is reduced in human gastric cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 8: 11105–11113.
- [13] Wang Y, Solt LA, Kojetin DJ, et al. Regulation of p53 stability and apoptosis by a ROR agonist [J]. *PLoS One*, 2012, 7: e34921.
- [14] Moretti RM, Montagnani MM, Motta M, et al. Role of the orphan nuclear receptor ROR alpha in the control of the metastatic behavior of androgen-independent prostate cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2002, 9: 1139–1143.
- [15] Moretti RM, Marelli MM, Motta M, et al. Activation of the orphan nuclear receptor ROR α induces growth arrest in androgen-independent DU 145 prostate cancer cells [J]. *Prostate*, 2001, 46: 327–335.
- [16] Zhang Y, Luo XY, Wu DH, et al. ROR nuclear receptors: structures, related diseases, and drug discovery [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2015, 36: 71–87.
- [17] Kim H. ROR α attenuates Wnt/ β -catenin signaling by PKC α -dependent phosphorylation in colon cancer [J]. *Mol Cell*, 2010, 37: 183–195.
- [18] Kim H, Lee JM, Lee G, et al. DNA damage-induced ROR α is crucial for p53 stabilization and increased apoptosis [J]. *Mol Cell*, 2011, 44: 797–810.
- [19] Wang YJ, Sun H, Liu GD, et al. Advances in the study of p53 in response to DNA damage [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2011, 46: 1413–1419.
- [20] Wang Y, Kumar N, Nuhant P, et al. Identification of a synthetic agonist for the orphan nuclear receptors ROR α and ROR γ , SR1078 [J]. *ACS Chem Biol*, 2010, 5: 1029–1034.
- [21] Li T, Kon N, Jiang L, et al. Tumor suppression in the absence of p53-mediated cell-cycle arrest, apoptosis, and senescence [J]. *Cell*, 2012, 149: 1269–1283.