

特约综述



本实验室的研究方向主要集中在核受体生物学功能及其调控机制和信号转导通路, 其中重点关注孤儿核受体TR3(也称为Nur77)。尽管TR3体内特异性配体未被发现, 但是它在肿瘤发生发展、代谢性疾病、心血管疾病等方面具有重要的调控作用, 小鼠模型和临床疾病都证明TR3作为正负调控因子的重要性, 是一个良好的药物研究靶标。我们课题组通过多年的研究, 建立了筛选TR3体外配体的模型, 发现第一个TR3激动剂Csn-B, 并基于Csn-B母体结构构建了能够特异结合TR3配体结合域的小分子化合物库。在深入探讨和阐明TR3在自噬性诱导肿瘤细胞死亡、通过AMPK通路调控糖代谢、以及p38拮抗TR3抑制炎症反应等分子机制和信号通路基础上, 进一步确定了能够通过TR3的介导来治疗肿瘤、降低血糖和抑制炎症的先导化合物。我们希望能更深入地开展核受体功能和信号调控网络的基础理论研究, 籍以推动核受体为靶标的药物研究发展。

核受体TR3/Nur77与肿瘤治疗

王维嘉 王渊 吴乔*

(厦门大学细胞应激生物学国家重点实验室, 厦门361102)

摘要 核孤儿受体TR3(也称Nur77)是NR4A1编码的立早基因产物, 属于类固醇/甲状腺受体/视黄酸受体超家族成员。TR3广泛参与各种生命活动过程, 如细胞生长、分化、凋亡和自噬等调控, 被认为是良好的抗肿瘤药物设计靶标。TR3不仅作为转录因子通过结合DNA应答元件调控基因的转录和表达, 而且还能作为调节蛋白通过蛋白相互作用和亚细胞不同定位发挥独特的作用。该文将重点综述TR3在肿瘤发生发展中的功能和调控机制, 及其以TR3为靶标治疗肿瘤的药物研究进展。

关键词 孤儿核受体; TR3/Nur77; 肿瘤治疗; 凋亡; 自噬

Nuclear Receptor TR3/Nur77 and Cancer Therapy

Wang Weijia, Wang Yuan, Wu Qiao*

(State Key Laboratory of Cellular Stress Biology, Xiamen University, Xiamen 361102, China)

Abstract Orphan nuclear receptor TR3 (also known as Nur77) is a product of an immediate-early gene encoded by NR4A1, and belongs to the steroid/thyroid/retinoid nuclear receptor superfamily. TR3 is widely involved in the regulation of biological processes, such as cell proliferation, differentiation, apoptosis and autophagy. It is considered as an important molecular target for anti-tumor drug design. TR3, as a transcription factor, regulates gene transcription and expression through targeting to the DNA response elements, also functions

*通讯作者。Tel: 0592-2187959, E-mail: qiaow@xmu.edu.cn

*Corresponding author. Tel: +86-592-2187959, E-mail: qiaow@xmu.edu.cn

as a regulator through interaction with other proteins in distinct subcellular localizations. Here, we review the functions and regulatory mechanisms of TR3 in tumorigenesis, and progress in the development of therapeutics with TR3 as the target.

Keywords orphan nuclear receptor; TR3/Nur77; cancer therapy; apoptosis; autophagy

核受体(nuclear receptor, NR)是一类由配体激活的转录因子超家族,是后生动物中含量最丰富的转录调节因子之一。核受体通过与相应的配体及其辅调节因子相互作用,调控基因的转录和表达,从而在机体的生长发育、新陈代谢、细胞分化及体内许多生理过程中发挥重要作用。核受体几乎参与人体所有组织和器官的功能调节,其功能紊乱将导致一系列疾病,如癌症、不育、肥胖、糖尿病、老年痴呆、心血管疾病等。核受体通过与特异性配体或激动剂/拮抗剂结合而被调控,因而被认为是良好的药物设计靶点。2006年统计数据表明,美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration)批准的2万个药物中,以核受体为靶标的药物占总药物的13%,位于第二位^[1]。

在人核受体超家族已发现的48个成员中,25个成员被划分为孤儿核受体(orphan nuclear receptor),因为它们特异性的体内配体至今没有被发现^[2-3]。TR3(也称为Nur77)就是其中一个孤儿核受体。TR3定位于人12号染色体,由NR4A1编码,是类固醇/甲状腺受体/视黄酸受体超家族成员^[4]。NR4A家族包含三个成员:TR3(NR4A1)、Nurr1(NR4A2)和Nor-1(NR4A3)^[5],它们在结构上都具有典型的核受体特征。

虽然作为一个孤儿受体,TR3却能够被胞内和胞外的多种刺激以及特异的激动剂/拮抗剂所调控,参与细胞的生长、分化、凋亡和自噬、机体的代谢、衰老与免疫等生理调控过程。尤其在肿瘤细胞或癌组织中TR3受到异常激活,往往呈现高水平的蛋白表达,亚细胞定位发生改变,以及复杂的翻译后修饰等表征^[6-8]。TR3通过靶向不同的下游靶基因,或者

与不同蛋白的相互作用和相互影响,最终发挥其在肿瘤细胞中复杂的生物学功能。近十年来,TR3生物学功能和信号转导通路以及靶向药物的研究,为以TR3为靶点的肿瘤治疗提供了重要的理论基础。

1 TR3的结构特征

TR3在结构上具有核受体的典型特征,主要分为N端的转录激活区(transactivation domain, TAD),中部的DNA结合区(DNA binding domain, DBD)以及C端的配体结合区(ligand binding domain, LBD)等功能区域。其中,N端含有一个配体非依赖的转录区域AF-1(activation function-1),而C端则含有配体依赖的转录区域(AF-2)^[9](图1)。

TR3虽被称为孤儿受体,但是否存在外源性配体尚有争论。2003年,Wang等^[10]首先报道TR3家族的另一个成员Nurr1的LBD结构不同于一般核受体,其配体结合口袋被一些庞大的疏水氨基酸侧链所覆盖;同时,Nurr1的LBD缺少经典的辅激活因子结合位点。同年,Baker等^[11]通过对DHR38(TR3在果蝇中的同源蛋白)的LBD进行解析,认为DHR38的LBD同样缺少典型的配体结合口袋以及辅激活因子结合位点。但是随着研究深入,尤其是人源TR3的LBD功能区域的解析,越来越多的证据显示,TR3可能有特异性配体存在。首先,由于TR3的LBD区转录激活能力比较低^[12],需要配体激活来发挥较高的转录激活活性。其次,2005年他人报道的人源TR3的LBD功能域的解析显示(晶体结构参见图2的PDB: 2QW4),那些在其它NR4A家族中(如Nurr1)被认为会覆盖配体结合口袋的氨基酸在TR3的LBD中却是隐藏在配体结合口袋的底部^[13]。2012年,我们和林



TAD: N端转录激活区; DBD: DNA结合区; LBD: 配体结合区。

TAD: transactivation domain; DBD: DNA binding domain; LBD: ligand binding domain.

图1 TR3结构示意图

Fig.1 Schematic representation of TR3

天伟课题组进一步分析了人源TR3的LBD晶体结构(参见图2的PDB: 3V3E)。结果显示LBD是由两个不同构象的分子(分别命名为Molecule I和Molecule II)组成,二者通过H11和H12上多个疏水氨基酸的疏水作用形成二聚体。Molecule II的构象与2007年他人解析的人源TR3 LBD分子构象(图2的PDB: 2QW4)基本一致,但是Molecule I在H9-H10区域有更深的结合口袋域,相比Molecule II差别明显^[7,14](图2)。

2 TR3在肿瘤中的生物学功能

在肿瘤中,TR3拥有相当复杂的、甚至截然相反的生物学功能。TR3既能促进肿瘤细胞增殖,也可以促进肿瘤细胞凋亡和死亡,并且与肿瘤类型、肿瘤的发展阶段有关。

2.1 促癌作用

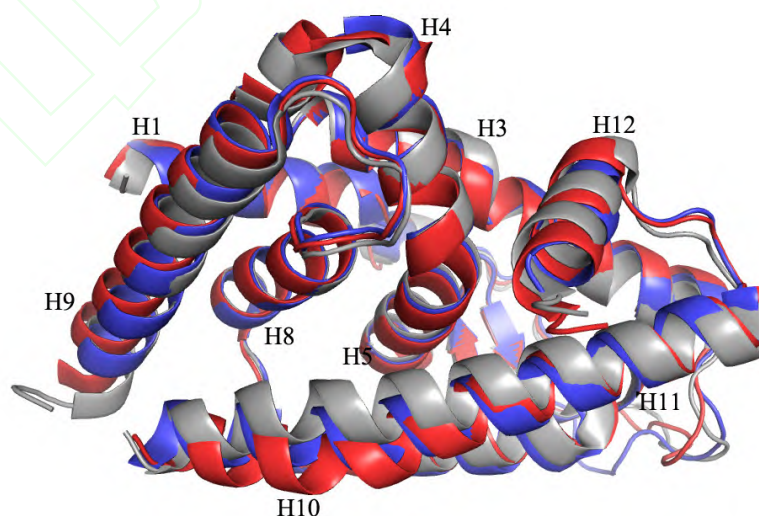
在多种肿瘤中TR3蛋白水平被显著上调^[15]。胰腺癌、膀胱癌、结肠癌及其癌旁组织的病理切片显示,在肿瘤样本中TR3存在明显的高表达^[16-18]。例如,80%的胰腺癌组织中都可检测到TR3的高表达,而正常的胰腺组织中仅有20%的样本可被检测到TR3的存在^[17]。同样,在癌基因诱导的小鼠结肠癌模型中可检测到TR3高表达,但在癌旁组织中则难以检测到其表达水平^[18]。不仅如此,在人乳腺癌、肺癌、结肠癌、前列腺癌、膀胱癌、胰腺癌、卵巢癌、黑色素瘤、神经瘤及宫颈癌中也同样存在TR3高表

达,且在肿瘤细胞、小鼠模型及病人样品中的检测结果一致^[16-28]。

TR3在肿瘤中高表达,提示TR3可能参与肿瘤的发生发展过程。最初TR3基因是作为生长因子刺激下的立早基因而被发现的,各种有丝分裂原都可以显著提高TR3的蛋白表达。TR3可以通过促进细胞周期的进程来诱导细胞增殖。Kollurid等^[29]的研究证实,在肺癌细胞系H460和Calu-6中,EGF(epidermal growth factor)、血清等促有丝分裂刺激物能够强烈地诱导TR3表达,从而促进细胞增殖。转染外源TR3质粒能够加速细胞周期进程,增加S/G₂期的细胞数目,而抑制内源TR3表达水平则明显抑制H460细胞生长和EGF、血清诱导的细胞增殖。

TR3高水平表达是许多肿瘤存活、增殖、恶性转化的前提条件。Lee等^[17]研究证实,当内源TR3被敲低后,胰腺癌细胞的生长被抑制,细胞内生存因子下调,Caspase-3及PPAR[poly (ADP-ribose) polymerase]的剪切增强。同样,来自宫颈癌、淋巴瘤、肺癌、结肠癌细胞及黑色素瘤细胞中过表达或敲低内源TR3所得到的实验结果也表明,TR3能够促进癌症发生,能够增强肿瘤细胞的存活及增殖,有利癌细胞的转化^[18,25,29-31]。

肿瘤的快速增殖离不开养份供给及血管形成。TR3同样在血管形成过程中起着重要作用^[32-33]。Zeng等^[32]的研究表明,血管内皮生长因子(vascular



蓝色为先前报道的LBD结构(PDB: 2QW4);红色(Molecule I)和灰色(Molecule II)为我们报道的LBD结构(PDB: 3V3E)。

Blue: crystal structure of LBD reported previously (PDB: 2QW4); Red (molecule I) and grey (Molecule II): crystal structures of LBD reported by our group (PDB:3V3E).

图2 不同的TR3 LBD晶体结构图
Fig.2 Crystal structures of TR3 LBD

endothelial growth factor, VEGF)能迅速诱导TR3蛋白表达,帮助血管内皮细胞增殖和存活,诱导细胞周期因子的表达,从而促进血管新生。此外,TR3还可以通过稳定HIF1 α (hypoxia-inducible factor 1 α)的蛋白水平进一步提高VEGF的合成,同样促进血管新生^[34]。

TR3还具有促进肿瘤细胞的转移能力。在结肠癌病理样本中发生侵袭转移的癌细胞内TR3高水平表达^[35]。同时在结肠癌细胞HCT116中,TR3可结合到MMP9(matrix metalloprotein-9)启动子,激活MMP9转录,从而加速癌细胞的侵袭转移^[35]。To等^[36]发现,低氧可以诱导 β -Catenin与TR3表达水平增强,并协同增强结肠癌细胞的迁移、侵袭及EMT(epithelial-mesenchymal transition)过程。

2.2 抑癌作用

TR3促进细胞凋亡的作用首先在T淋巴细胞的阴性选择(negative selection)中被发现^[37]。1994年,Liu等^[38]报道,TR3参与了由TCR介导的未成熟的自身反应性T淋巴细胞(self-reactive T cells)的克隆剔除过程,其中在未成熟的胸腺细胞和T细胞杂交瘤发生凋亡过程中TR3被迅速诱导表达,并促进细胞凋亡^[38]。随后在其他肿瘤细胞中,如前列腺癌、肺癌、乳腺癌和胃癌细胞等,人们也发现,n-butylphenylthalide^[39-40]、Cytosporone-B^[41]、VP-16^[42-43]、Di-n-butyltin dichloride^[44]、镭^[21]、顺铂^[45-47]、组蛋白去乙酰化酶抑制剂^[48]、1,1-bis(30-indolyl)-1-(p-substituted phenyl)-methanes^[49]、佛波酯(12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, TPA)^[42-43,50-51]、合成鹅脱氧胆酸衍生物^[52]、6-巯基嘌呤^[34]、乙酰紫草素及其类似物^[53]等都可以迅速提高TR3蛋白水平诱导肿瘤细胞凋亡。反之,运用反义RNA或者显性副作用的TR3质粒敲低内源TR3的蛋白水平,则可以明显抑制上述凋亡诱导剂引起的细胞凋亡^[22,27,43,54]。这些数据证明了TR3也可作为肿瘤抑制因子参与肿瘤细胞凋亡过程。

TR3的抑癌作用同样可以在小鼠模型和病人样本中观察到。Mullican等^[55]发现,单独敲除TR3或者Nor-1基因的小鼠表型正常,但是TR3/Nor-1基因双敲除小鼠的体形较野生型小,特别是表现出血液中未成熟的髓系细胞显著增多等致命性白血病的特征,小鼠在出生2~4周后夭折。在46位急性髓系白血病(acute myelocytic leukemia, AML)临床患者的血液

样品中,CD34⁺(髓系造血祖细胞的标志蛋白)细胞中的TR3蛋白水平都远低于健康组^[55]。同样,Deutsch等^[56-57]也发现,在淋巴B细胞白血病(lymphocytic B-cell leukemia)、滤泡性淋巴瘤(follicular lymphoma)和B细胞淋巴瘤(B-cell lymphoma)中TR3的表达水平显著降低。而过表达TR3可以诱导B淋巴瘤细胞凋亡,并且削弱其裸鼠成瘤能力。

我们课题组也发现,TR3能够抑制 β -Catenin的转录激活活性,从而影响Wnt信号通路的激活,抑制结肠癌的发生。通过自发产生肠道肿瘤的Apc^{min/+}小鼠模型证实,敲除TR3基因显著提高Apc^{min/+}小鼠肠道中的肿瘤数;相反地,在小鼠肠黏膜过表达TR3基因,或者用TR3的激动剂Csn-B灌喂小鼠,均明显抑制肿瘤的发生。但是在人结肠癌临床组织标本中,尽管TR3也高水平表达,但其活性却被高活性的激酶GSK-3 β 磷酸化修饰,结果导致TR3丧失抑制Wnt信号通路的能力^[8]。因此,TR3抑癌作用不能简单以表达水平的高低来判断,还与其蛋白修饰(如磷酸化)密切相关。

3 TR3的调控方式

TR3在肿瘤发生发展中的作用在不同肿瘤类型以及肿瘤发展的不同阶段有所不同,而且TR3的调控方式和亚细胞定位也会对TR3发挥的生物学功能起着决定性的作用。

3.1 通过基因转录方式调控

作为核受体,TR3最基本的功能是利用其转录因子的特性参与生物学功能的调控。TR3主要通过其DBD与DNA应答元件(response element, RE)结合,从而调控下游基因的转录和表达。能被TR3识别的应答元件主要有NBRE(AAAGTCA或TGACCTTT)^[58]和NurRE(TGATTT ACCTCC AAATGCCA)^[59-60]。

TR3可以通过三种方式与应答元件结合。第一种形式是以单体的形式与应答元件NBRE结合^[58];第二种形式是以同源二聚体或者与NR4A家族的另两个成员Nor-1或Nurr1形成异源二聚体与应答元件NurRE结合^[59-60];第三种形式是在视黄素受体RXR(retinoid X receptor)配体9-cis retinoic acid存在时,TR3与RXR形成异源二聚体并结合到视黄酸应答元件DR-5上发挥转录激活作用^[61]。

在小鼠垂体瘤细胞中,促肾上腺皮质激素释放激

素(corticotrophin-releasing hormone, CRH)可以通过蛋白激酶A(protein kinase A, PKA)磷酸化TR3, 提高TR3同源二聚体与应答元件NurRE的结合, 并激活下游基因的转录^[12]。另外, 在一些组织中TR3与应答元件的结合起到转录抑制因子的作用。例如, TR3能募集SP1(specificity protein 1)、SIN3A(swi-independent-3 transcription regulator family member A)、CoREST(corepressor of REST)、LSD1(lysine(K)-specific demethylase 1A)和HDAC1(lysine(K)-specific demethylase 1A)到TGF- β (transforming growth factor- β)靶向基因启动子上, 组成转录抑制复合体, 从而削弱TGF- β 的促纤维化作用^[62]。

3.2 通过蛋白相互作用方式调控

蛋白-蛋白相互作用是调控蛋白生物学功能常见的和重要的方式。TR3可以通过与其它转录因子结合影响它们的转录激活活性。我们证实, TR3可以通过负调控Wnt信号通路活性抑制结肠癌的发生。一方面, TR3通过结合 β -Catenin阻断其定位于Wnt下游基因的启动子上; 另一方面, TR3与转录因子TCF4(transcription factor 4)的结合进一步增强了TCF4募集转录抑制因子的能力, 从而抑制Wnt下游基因*c-myc*和*cyclin D1*的表达, 最终抑制肠道黏膜上皮细胞的增殖和肿瘤的发生^[8]。另外, 我们还发现TR3依赖于与转录因子p53的结合, 在转录和转录后水平调控癌蛋白MDM2(mouse double minute 2)表达水平, 从而抑制肝癌细胞生长。TR3通过与p53的结合阻断p300诱导的p53乙酰化活性, 从而抑制p53的转录活性, 直接降低p53诱导的MDM2基因表达水平; 另外, 在转录后水平上这种结合还会导致MDM2从p53分子解离, 并通过自身泛素化而降解^[63]。

TR3还可通过与细胞中的多种酶, 包括蛋白激酶、乙酰化转移酶以及甲基化转移酶等相互作用, 抑制它们的酶活性, 从而削弱各种(激)酶对TR3或其它靶蛋白的修饰和生物学功能。例如, TR3 LBD上的FLELFIL序列与p300的TRAM(transcriptional adapter motif)区域结合, 抑制p300乙酰化转移酶活性, 而TR3激动剂Csn-B能明显增强TR3对p300的抑制能力, 从而抑制乳腺癌细胞增殖^[64]。TR3结合到甲基化转移酶PRMT1(protein arginine methyltransferase 1)催化活性区域则抑制了PRMT1对底物的甲基化能力^[65]。

TR3与蛋白的结合还可能改变一些蛋白的功

能。例如, TR3结合到Bcl-2上使得Bcl-2分子发生变构, 暴露其BH3结构域。这一构象的改变不仅使得Bcl-2无法再抑制促凋亡蛋白Bax和Bak的功能, 反而抑制抗凋亡蛋白Bcl-xL的功能, 使Bcl-2从抗凋亡蛋白转变为促凋亡蛋白^[43,50,66]。

3.3 通过亚细胞定位方式调控

TR3亚细胞定位也是其参与生物学功能调控的重要方式之一, 其中TR3的线粒体定位是其参与诱导细胞凋亡的最主要方式。

Li等^[43]发现, 在前列腺癌细胞LNCaP中, TPA可诱导TR3从细胞核转运到线粒体触发肿瘤细胞凋亡, 而与TR3的DNA结合能力、转录激活活性无关。TR3转运到线粒体外膜后, 引起线粒体膜通透性改变, 释放一些凋亡前体分子如胱冬氨酸蛋白酶(caspase)前体、细胞色素C(cytochrome C)等, 从而启动肿瘤细胞凋亡。TR3 DBD上包括2个核定位序列(nuclear localization signal, NLS)。当DBD缺失后, TR3突变体就自发地定位于线粒体上诱导细胞凋亡, 而利用LMB阻断TR3的出核转运则抑制TPA诱导的细胞凋亡。可见, TR3的线粒体定位与其诱导的细胞凋亡密切相关。Cheng等^[67]发现, 在心肌梗死/再灌注模型中, TR3也是通过定位到线粒体来诱导受氧化损伤的心肌细胞凋亡。

TR3的内质网(endoplasmic reticulum, ER)定位也是TR3诱导细胞凋亡的一种补充机制。细胞内Ca²⁺稳态是维持细胞存活的重要因素, 而ER是细胞内Ca²⁺的主要储存场所。在成神经瘤细胞SK-N-SH、食道鳞片状瘤细胞EC109和EC9706中, 凋亡诱导剂AHPN/CD437诱导TR3出核并转运到内质网, 引起内质网应激, 引发早期钙库Ca²⁺的释放, 从而激活Caspase-4级联反应引发的内质网应激凋亡途径, 最终通过诱发Cytochrome C的释放, 启动线粒体凋亡途径协同促进细胞凋亡^[68]。我们也发现, 在肝癌HepG2细胞中, TR3通过LBD与内质网定位蛋白TRAP γ 的C端结合。在TPA和CD437诱导下, TR3-TRAP γ 的结合导致TR3内质网定位, 不仅引发了内质网内钙库的空竭, 还激活了促凋亡蛋白CHOP(C/EBP homologous protein)的表达, 最终促进肝癌细胞凋亡^[69]。

4 靶向TR3的肿瘤治疗

TR3在肿瘤细胞的增殖、凋亡、代谢、转移和

血管生成等方面的重要调控作用, 为以TR3为靶点的小分子药物在肿瘤治疗研究领域提供了多方面的、广阔的应用前景。目前, 利用化疗药物、多肽、天然产物和合成化合物靶向TR3来治疗肿瘤已成为转化医学的研究热点(表1)。

4.1 化疗药物

顺铂是一个临床上广泛使用的化疗药物, 它通过诱导DNA损伤, 最终诱导癌细胞死亡。我们发现顺铂诱导的细胞凋亡依赖于TR3的存在。顺铂首先激活细胞周期检控点激酶Chk2, 在该激酶的作用下TR3的T88位点发生磷酸化, 蛋白稳定性增强; 继而, 发生磷酸化修饰的TR3募集转录抑制因子N-CoR, 通过结合到下游基因*BRE*(brain and reproductive organ-expressed)和*RNF-7*(ring finger protein 7)启动子的TR3应答元件上, 下调这些抗凋亡基因的表达, 从而诱导肠癌细胞凋亡。在小鼠模型中也同时观察

到敲除TR3基因后顺铂对Apc^{min/+}小鼠肠道肿瘤或裸鼠移植瘤的抑制效果被明显地削弱^[45]。此外, Lin等^[46]也证实, 顺铂以TR3依赖的方式诱导肿瘤细胞凋亡。JNK诱导的TR3磷酸化是TR3出核转运到线粒体诱导细胞凋亡所必需的, 而Smurf1则通过TR3的非经典泛素化修饰来抑制JNK磷酸化所诱导的TR3蛋白降解, 共同促进顺铂诱导的肿瘤细胞凋亡。

离子霉素能够诱导胸腺淋巴瘤发生凋亡, 但是TR3的蛋白水平提高削弱了离子霉素对胸腺淋巴瘤凋亡的诱导效果, 使之产生耐药性。Kochel等^[70]分别采用免疫抑制剂FK506来减弱TR3与DNA的结合能力, 以及丝氨酸/苏氨酸蛋白酶抑制剂HA1004来阻断TR3的入核。FK506和HA1004联合使用可以显著回复离子霉素诱导胸腺淋巴瘤凋亡的能力。因此, 在传统的临床化疗药物治疗肿瘤过程, TR3有可能成为一个全新的治疗靶点。

表1 靶向TR3信号通路的肿瘤药物

Table 1 Anti-tumor drug with targeting TR3 pathway

药物 Drug	药物类别 Type of agent	生物学功能 Biological function	机制 Mechanism	肿瘤类型 Tumor type
NuBCP-9 ^[66]	Mimic peptide	Apoptosis	Mimics TR3 interaction with Bcl-2	Breast, lung, cervical
Paclitaxel ^[72]	Mimic peptide	Apoptosis	Mimics TR3 interaction with Bcl-2	Ovarian
Fenretinide ^[81]	Retinoid	TR3-mediated apoptosis	Induction of TR3 expression, TR3 mitochondrial targeting	Liver
AHPN/CD437 ^[43,68-69]	Retinoid	TR3-mediated apoptosis	TR3 mitochondrial or cytoplasmic targeting	Neuroblastoma, squamous carcinoma
N-butylidenephthalide and analogs ^[39-40,76]	Plant extract derivatives	TR3-mediated apoptosis	Induction of TR3 expression, TR3 cytoplasmic targeting	Liver, tongue, oral
Methylene-substituted diindolylmethanes (C-DIMs) ^[16-17,28,82]	Plant extract derivatives	TR3-mediated apoptosis	Negative regulation on antiapoptotic genes	Bladder, breast, colon, pancreatic
Acetylshikonin derivatives ^[53]	Plant extract derivatives	TR3-mediated apoptosis	TR3 mitochondrial targeting, interaction with Bcl-2	Lung, cervical
Cytosporone B and analogs ^[41,73]	Fungus extract	TR3-mediated apoptosis	TR3 mitochondrial targeting, negative regulation on antiapoptotic genes, β -catenin degradation	Gastric
ATE-i2-b4 and H-9 ^[77]	Digitalis-like compounds	Inhibit TR3-mediated cell cycle progression		Colon, cervical
VP-16 (Etoposide) ^[42]	Chemotherapeutic	TR3-mediated apoptosis	Induction of TR3 expression, TR3 cytoplasmic targeting	Gastric
Panobinostat ^[83]	Chemotherapeutic	TR3-mediated apoptosis	TR3 mitochondrial targeting, interaction with Bcl-2	T-cell lymphoma
FK506 and HA1004 ^[70]	Chemotherapeutic	Restore sensitivity to ionomycin-induced apoptosis	Inhibits TR3 DNA-binding activity and TR3 nuclear import	Thymic lymphoma
Cisplatin ^[45-47]	Chemotherapeutic	TR3-mediated apoptosis	TR3 mitochondrial targeting, negative regulation on antiapoptotic genes	Colon, cervical, osteosarcoma, liver, gastric
12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) ^[22,42,84]	Chemotherapeutic	TR3-mediated apoptosis	Induction of TR3 expression, TR3 mitochondrial targeting, interaction with Bcl-2	Gastric, prostate
1-(3,4,5-trihydroxyphenyl)nonan-1-one(THPN) ^[7]	Cytosporone B analogue	TR3-mediated autophagic cell death	Induce TR3 translocate to mitochondria inner membrane	Melanoma

4.2 多肽模拟物

TR3结合到Bcl-2上使得Bcl-2分子发生变构,从抑凋亡蛋白转变成促凋亡蛋白。因此,利用TR3/Bcl-2相互作用这个潜在的治疗靶点, Kolluri等^[50,66]选取了一段源于TR3蛋白上的短多肽序列(命名为NuBCP-9)模拟TR3的作用方式与Bcl-2结合,使Bcl-2变构为促凋亡蛋白,诱导线粒体Cytochrome C的释放,引起细胞凋亡,发挥治疗肿瘤的作用。另外,NuBCP-9在Bcl-2高表达的肿瘤细胞(比如乳腺癌细胞)中也有很好的疗效^[71]。因此,TR3/Bcl-2相互作用可作为高效筛选Bcl-2小分子抑制剂的有效手段。

抗癌药物紫杉醇(Paclitaxel)广泛应用于卵巢癌、乳腺癌、肺癌、胰腺癌等的临床治疗。紫杉醇一方面可以促进微管蛋白聚合而抑制解聚,抑制细胞有丝分裂;另一方面可以打开膜孔通道复合体,引起线粒体去极化,最后导致线粒体凋亡。Ferlini等^[72]证实紫杉醇引起线粒体凋亡的原因正是因为它能够很好地模拟与Bcl-2结合的TR3多肽。紫杉醇通过与Bcl-2相互作用使得Bcl-2变构为促凋亡蛋白,诱导线粒体膜电位的丧失,从而导致肿瘤细胞凋亡。

4.3 天然产物及其衍生物

2008年,我们课题组利用一套独特的筛选模型在微生物代谢产物库(天然产物)中进行了TR3体外配体的筛选,最终发现并确定了从红树植物桐花树皮内生真菌*Dothiorella* sp.的菌丝中分离得到的天然聚酮类化合物cytosporone B(Csn-B)是TR3的特异性激动剂,这也是第一个被发现并确定的TR3体外激动剂。Csn-B可与TR3的LBD的疏水口袋相互作用,进而激活TR3的转录活性,并加强辅激活因子SRC2(steroid receptor coactivator 2)的募集。在肿瘤细胞中,Csn-B不仅能够通过诱导TR3转运到线粒体,引起Cytochrome C释放,同时也能够在核内下调抗凋亡蛋白BRE的转录活性,发挥促细胞凋亡的功能,最终诱导肿瘤细胞死亡,并抑制移植瘤的生长^[41]。以Csn-B为母体结构,我们合成了大量的Csn-B衍生物,不仅阐明了Csn-B衍生物通过TR3介导在诱导细胞凋亡中的构效关系,并且筛选到了比Csn-B更高效的抑制肿瘤生长的化合物^[73]。通过衍生物的研究,我们构建了专一靶向TR3的化合物库,为后续进一步发现特异性治疗黑色素瘤的化合物奠定了基础。

C-DIMs(methylene-substituted diindolylmethanes)及其衍生物是Stephen Safe课题组根据indole-3-

carbinol代谢物设计合成的。与Csn-B不同的是,C-DIMs及其衍生物发挥抗肿瘤的活性是通过TR3依赖和非依赖两条途径同时进行:它既可以通过抑制TR3的转录激活活性来诱导细胞凋亡,也可以通过TR3非依赖的方式促进内质网应激来诱导细胞凋亡。有意思的是,其中一个衍生物DIMC-pPhOCH₃可以提高TR3转录水平和促凋亡基因表达的能力,诱导胰腺癌细胞凋亡;而另一个衍生物DIM-C-pPhOH却是TR3的转录抑制剂,通过抑制TR3调控的促增殖和抗凋亡基因的表达来诱导细胞凋亡^[17,74-75]。

紫草素(Shikonin)是从中草药紫草中提炼而来。Liu等^[53]发现紫草素可以提高TR3的蛋白水平,诱导TR3的线粒体转运,并利用经典的TR3/Bcl-2通路来诱导细胞凋亡,发挥抗肿瘤的作用。基于这一分子模型,Liu等人筛选出紫草素的衍生物SK07,使其更高效地启动这一死亡通路。丁稀基肽酚(N-butylidenephthalide, BP)及其衍生物是从传统中草药当归中提取出来,能够显著提高TR3的表达水平,进而诱导TR3依赖的凋亡,达到抑制脑癌、肝癌和口腔鳞状细胞癌的目的^[39-40,76]。此外,两种毛地黄类似化合物分别提取自桑科植物的ATE-i2-b4和蟾蜍皮的H-9也都可有效地提高TR3表达水平,通过降解结肠癌中的 β -Catenin表达来诱导肿瘤细胞凋亡^[77]。

4.4 Csn-B衍生物THPN

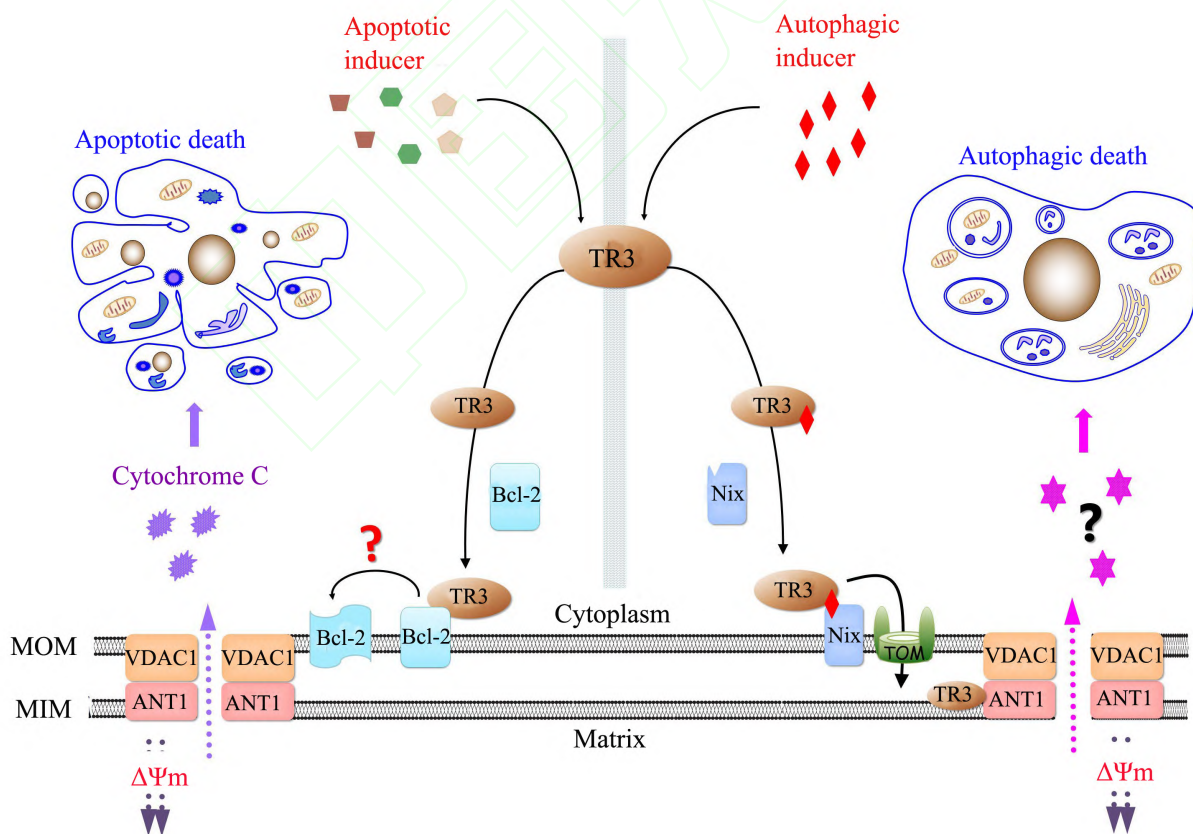
细胞自噬最早是由Ashford和Porter在1962年发现细胞内存在“自己吃自己”的现象提出的^[78]。细胞自噬在细胞增殖和死亡中起着重要作用,被认为是治疗癌症的新药理学靶点。适度的自噬,一方面可以及时有效地清除不利于内环境的物质,另一方面细胞自噬所产生的物质和能量还可以重新被细胞利用,维持生命活动,因而有利于肿瘤细胞存活和增殖。但是异常调控的细胞自噬往往会导致胞内物质过度降解,使细胞走向不可逆的死亡。许多肿瘤细胞由于调控细胞凋亡的相关信号通路紊乱,对凋亡产生抵抗(apoptotic resistance),不能应答凋亡诱导剂类的化疗药物。因此,通过自噬性细胞死亡来杀灭这类凋亡抵抗的肿瘤细胞可能成为另外一条有效的途径。松杉灵芝是从真菌中提取的免疫调节蛋白,Li等^[79]发现其对于顺铂耐药性的尿路上皮癌细胞具有明显的抑制作用,并且是通过自噬依赖途径诱导细胞死亡。

我们实验室最新的研究成果首次详细阐述了

TR3通过线粒体通路诱导的自噬机制,拓展了人们对核受体在自噬中作用的认识。我们通过对TR3为靶点的化合物库进行筛选时发现化合物1-(3,4,5-trihydroxyphenyl)nonan-1-one(THPN)是一个选择性诱导细胞自噬的药物,可以特异性地诱导黑色素瘤细胞死亡,但是对非黑色素瘤细胞生长并无明显的抑制作用。当细胞内自噬关键基因*Atg5*或*Atg7*被敲低后,THPN就丧失了特异性诱导黑色素瘤细胞死亡的能力。THPN诱导细胞自噬性死亡依赖于TR3的存在。在黑色素瘤细胞中,TR3定位在胞质,THPN结合到TR3的LBD上能够增强TR3与线粒体外膜蛋白Nix的结合,并在Nix的辅助下TR3转运到线粒体外膜,进一步通过线粒体的外膜通道Tom复合体,TR3穿过线粒体外膜(mitochondrial outer membrane, MOM)进入线粒体内膜(mitochondrial inner membrane, MIM)与线粒体膜孔通道复合体(mitochondrial permeability transition pore complex, mPTPC)的关键蛋白ANT1(adenine nucleotide translocator 1)结合,促

进mPTPC孔道的开放,导致线粒体膜电位的丧失,最终诱导不可逆的和致死性的细胞自噬。同时,在黑色素瘤肺转移模型和自发产生黑色素瘤的小鼠模型中进一步验证了THPN在体内同样具有良好的诱导自噬和抗黑色素瘤生长和转移的作用^[7]。

线粒体是细胞能量的提供场所。越来越多的研究表明,线粒体同时参与了凋亡和自噬诱导两条重要的信号通路。肿瘤细胞在凋亡诱导剂(如化疗药物顺铂)的刺激下,TR3从细胞核转运至线粒体外膜,诱导Bcl-2转变为促凋亡蛋白,促使mPTPC孔道开放,线粒体膜电位的丧失,诱发Cytochrome C的释放,导致细胞凋亡的发生^[43,46-47,50,80]。同样,THPN能够激活TR3依赖的线粒体途径,使得TR3跨越线粒体外膜进入内膜并与内膜蛋白ANT1结合,引起mPTPC孔道开放,也导致线粒体膜电位的丧失。有趣的是,在这一过程中并未检测到Cytochrome C的释放,并且引起细胞自噬性死亡而非细胞凋亡^[7]。这提示我们,TR3介导细胞死亡方式转换的关键可能与其在线粒



MOM: 线粒体外膜; MIM: 线粒体内膜; $\Delta \Psi_m$: 线粒体膜电位。

MOM: mitochondrial outer membrane; MIM: mitochondrial inner membrane; $\Delta \Psi_m$: mitochondrial membrane potential.

图3 TR3介导细胞死亡方式与其线粒体内外膜定位的关系

Fig.3 The relationship between TR3-mediated cell death and its MIM/MOM location

体内外膜定位的不同有关。虽然在凋亡和自噬过程中都引起mPTPC孔道开放和线粒体膜电位的去极化,但由于结合TR3的线粒体靶向蛋白(如Bcl-2和Nix)不同,导致TR3定位到线粒体的不同部位,由此触发截然不同的细胞应答机制,使细胞或走向凋亡或走向自噬性死亡(图3)。

5 总结与展望

TR3在肿瘤中具有复杂的生物学功能。在肿瘤组织中TR3的蛋白水平往往高表达,亚细胞定位改变,发生磷酸化等多种蛋白翻译后修饰。TR3不仅可以通过转录激活调节下游靶基因表达水平,还可以通过蛋白与蛋白相互作用影响肿瘤细胞的关键信号通路。目前,对靶向TR3的肿瘤治疗研究主要集中在利用TR3诱导肿瘤细胞凋亡的特性上。TR3已被报道在多种肿瘤中作为原癌基因促进肿瘤的发生、发展、转移。因此,我们一方面可以使用小分子药物或siRNA抑制TR3的促癌作用;另一方面我们甚至可以“招降”TR3,利用凋亡诱导剂和TR3特异激动剂诱导其出核转运至线粒体,激活caspase依赖的凋亡程序,达到肿瘤治疗的目的。

靶向TR3抑制肿瘤的另一个思路是利用细胞自噬诱导肿瘤细胞死亡。肿瘤预后不佳的最重要因素是肿瘤细胞对放、化疗药物的耐受,特别是产生凋亡抗性。而自噬性细胞死亡作为一种II型程序性细胞死亡,使杀灭这类凋亡抵抗的肿瘤细胞成为可能。THPN通过线粒体信号通路诱导细胞自噬性死亡,克服了黑色素瘤细胞逃逸凋亡的问题,无论在细胞水平还是在小鼠水平都可以非常明显地抑制黑色素瘤的生长和转移,由此为黑色素瘤的治疗开辟了新思路、提供了新靶点,同时也为寻找其它通过自噬机制的抗肿瘤药物提供了有益的理论依据。

尽管TR3转运至线粒体是研究mPTPC孔道调控自噬和凋亡信号通路的理想模型,但目前仍然有些问题需要进一步搞清楚。首先,TR3线粒体上的不同定位是如何促进mPTPC孔道开放,其间是否有不同蛋白分子的参与,由此导致不同的生理学效应(凋亡还是自噬)?其次,为什么THPN诱导的mPTPC孔道的开放能激活线粒体的自噬性清除?是否有一些未知蛋白或代谢物从mPTPC孔道释放到细胞质诱导细胞自噬?其它的自噬诱导剂是否具备这样的作用?再者,THPN诱导mPTPC孔道开放

并不会引起凋亡,是否因为TR3-ANT1的结合阻断了Cytochrome C的释放而诱发单纯性的线粒体清除呢?其它mPTPC复合物是否通过ANT参与了自噬调控过程?因此,进一步通过蛋白质组学、代谢组学和信号转导的研究,将能够在阐明诱导肿瘤细胞凋亡或者自噬性死亡的作用机制的基础上,根据不同肿瘤发生发展特征特别是抗药性来指导设计靶向TR3的候选药物,通过选择性地诱导凋亡或者自噬通路更好地抑制肿瘤细胞生长,治疗肿瘤。

目前,TR3体外激动剂已经被确定,它们如同其它核受体的配体一样,通过结合到TR3配体结合域发挥功能调控作用。我们与林天伟教授合作,通过共晶结构分析解释了TR3的LBD与THPN结合的分子模型。结果显示,THPN的确不是结合在LBD经典的配体结合口袋,而是结合在Molecule I的由H8-H9-H10构成的新口袋;但是由于结构的不对称性,在Molecule II对应的位置上却没有这个口袋的存在^[7]。事实上,在生理或者病理过程中一些孤儿受体需要被激活才能发挥其生物学功能,从严格意义上来说它们可能不是真正的“孤儿受体”,但是其体内特异性配体至今还没有被发现,原因可能有:1)体内配体不存在;2)体内配体极其微量,目前的技术可能还无法分离和检测到极微量配体的存在;3)体内配体可能不是类似于激素的脂溶性物质,而是一些未知的蛋白,甚至有可能是一些长链非编码RNA。因此,要发现和鉴定这些孤儿核受体的体内配体需要依靠分离技术和检测方法上的突破,以及我们对调控孤儿核受体功能的内在因子的进一步认识和拓展。目前,体外激动剂和拮抗剂的发现和应用至少为我们的科学研究提供一个非常有利的工具去探索孤儿核受体功能调控的奥秘。

参考文献 (References)

- 1 Overington JP, Al-Lazikani B, Hopkins AL. How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5(12): 993-6.
- 2 Sever R, Glass CK. Signaling by nuclear receptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013; 5(3): a016709.
- 3 Germain P, Staels B, Dacquet C, Spedding M, Laudet V. Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev* 2006; 58(4): 685-704.
- 4 Hazel TG, Nathans D, Lau LF. A gene inducible by serum growth factors encodes a member of the steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85(22): 8444-8.
- 5 Hedvat CV, Irving SG. The isolation and characterization of

- MINOR, a novel mitogen-inducible nuclear orphan receptor. *Mol Endocrinol* 1995; 9(12): 1692-700.
- 6 To SKY, Zeng JZ, Wong AST. Nur77: A potential therapeutic target in cancer. *Expert Opin Ther Tar* 2012; 16(6): 573-85.
- 7 Wang WJ, Wang Y, Chen HZ, Xing YZ, Li FW, Zhang Q, *et al.* Orphan nuclear receptor TR3 acts in autophagic cell death via mitochondrial signaling pathway. *Nat Chem Biol* 2014; 10(2): 133-40.
- 8 Chen HZ, Liu QF, Li L, Wang WJ, Yao LM, Yang M, *et al.* The orphan receptor TR3 suppresses intestinal tumorigenesis in mice by downregulating Wnt signalling. *Gut* 2012; 61(5): 714-24.
- 9 Martinez-Gonzalez J, Badimon L. The NR4A subfamily of nuclear receptors: New early genes regulated by growth factors in vascular cells. *Cardiovasc Res* 2005; 65(3): 609-18.
- 10 Wang ZL, Benoit G, Liu JS, Prasad S, Aarnisalo P, Liu XH, *et al.* Structure and function of Nurr1 identifies a class of ligand-independent nuclear receptors. *Nature* 2003; 423(6939): 555-60.
- 11 Baker KD, Shewchuk LM, Kozlova T, Makishima M, Hassell A, Wisely B, *et al.* The *Drosophila* orphan nuclear receptor DHR38 mediates an atypical ecdysteroid signaling pathway. *Cell* 2003; 113(6): 731-42.
- 12 Maira M, Martens C, Batsche E, Gauthier Y, Drouin J. Dimer-specific potentiation of NGFI-B (Nur77) transcriptional activity by the protein kinase a pathway and AF-1-dependent coactivator recruitment. *Mol Cell Biol* 2003; 23(3): 763-76.
- 13 Flaig R, Greschik H, Peluso-Iltis C, Moras D. Structural basis for the cell-specific activities of the NGFI-B and the Nurr1 ligand-binding domain. *J Biol Chem* 2005; 280 (19): 19250-58.
- 14 Zhan YY, Chen Y, Zhang Q, Zhuang JJ, Tian M, Chen HZ, *et al.* The orphan nuclear receptor Nur77 regulates LKB1 localization and activates AMPK. *Nat Chem Biol* 2012; 8(11): 897-904.
- 15 Beard JA, Tenga A, Chen TS. The interplay of NR4A receptors and the oncogene-tumor suppressor networks in cancer. *Cell Signal* 2015; 27(2): 257-66.
- 16 Cho SD, Lee SO, Chintharlapalli S, Abdelrahim M, Khan S, Yoon K, *et al.* Activation of nerve growth factor-induced B alpha by methylene-substituted diindolylmethanes in bladder cancer cells induces apoptosis and inhibits tumor growth. *Mol Pharmacol* 2010; 77(3): 396-404.
- 17 Lee SO, Abdelrahim M, Yoon K, Chintharlapalli S, Papineni S, Kim K, *et al.* Inactivation of the orphan nuclear receptor TR3/Nur77 inhibits pancreatic cancer cell and tumor growth. *Cancer Res* 2010; 70(17): 6824-36.
- 18 Wu H, Lin YY, Li WG, Sun Z, Gao WW, Zhang HP, *et al.* Regulation of Nur77 expression by beta-catenin and its mitogenic effect in colon cancer cells. *Faseb J* 2011; 25(1): 192-205.
- 19 Holmes WF, Soprano DR, Soprano KJ. Comparison of the mechanism of induction of apoptosis in ovarian carcinoma cells by the conformationally restricted synthetic retinoids CD437 and 4-HPR. *J Cell Biochem* 2003; 89(2): 262-78.
- 20 Holmes WF, Soprano DR, Soprano KJ. Early events in the induction of apoptosis in ovarian carcinoma cells by CD437: Activation of the p38 MAP kinase signal pathway. *Oncogene* 2003; 22(41): 6377-86.
- 21 Shin HJ, Lee BH, Yeo MG, Oh SH, Park JD, Park KK, *et al.* Induction of orphan nuclear receptor Nur77 gene expression and its role in cadmium-induced apoptosis in lung. *Carcinogenesis* 2004; 25(8): 1467-75.
- 22 Wu Q, Liu S, Ye XF, Huang ZW, Su WJ. Dual roles of Nur77 in selective regulation of apoptosis and cell cycle by TPA and ATRA in gastric cancer cells. *Carcinogenesis* 2002; 23(10): 1583-92.
- 23 Milbrandt J. Nerve growth factor induces a gene homologous to the glucocorticoid receptor gene. *Neuron* 1988; 1(3): 183-8.
- 24 Wu Q, Dawson MI, Zheng Y, Hobbs PD, Agadir A, Jong L, *et al.* Inhibition of trans-retinoic acid-resistant human breast cancer cell growth by retinoid X receptor-selective retinoids. *Mol Cell Biol* 1997; 17(11): 6598-608.
- 25 Li QX, Ke N, Sundaram R, Wong-Staal F. NR4A1, 2, 3-an orphan nuclear hormone receptor family involved in cell apoptosis and carcinogenesis. *Histol Histopathol* 2006; 21(5): 533-40.
- 26 Alexopoulou AN, Leao M, Caballero OL, Da Silva L, Reid L, Lakhani SR, *et al.* Dissecting the transcriptional networks underlying breast cancer: NR4A1 reduces the migration of normal and breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res* 2010; 12(4): R51.
- 27 Uemura H, Chang CS. Antisense TR3 orphan receptor can increase prostate cancer cell viability with etoposide treatment. *Endocrinology* 1998; 139(5): 2329-34.
- 28 Cho SD, Yoon K, Chintharlapalli S, Abdelrahim M, Lei P, Hamilton S, *et al.* Nur77 agonists induce proapoptotic genes and responses in colon cancer cells through nuclear receptor-dependent and nuclear receptor-independent pathways. *Cancer Res* 2007; 67(2): 674-83.
- 29 Kolluri SK, Bruey-Sedano N, Cao XH, Lin BZ, Lin F, Han YH, *et al.* Mitogenic effect of orphan receptor TR3 and its regulation by MEKK1 in lung cancer cells. *Mol Cell Biol* 2003; 23(23): 8651-67.
- 30 Bras A, Albar JP, Leonardo E, de Buitrago GG, Martinez AC. Ceramide-induced cell death is independent of the Fas/Fas ligand pathway and is prevented by Nur77 overexpression in A20 B cells. *Cell Death Differ* 2000; 7(3): 262-71.
- 31 Lee SO, Andey T, Jin UH, Kim K, Singh M, Safe S. The nuclear receptor TR3 regulates mTORC1 signaling in lung cancer cells expressing wild-type p53. *Oncogene* 2012; 31(27): 3265-76.
- 32 Zeng H, Qin L, Zhao D, Tan X, Manseau EJ, Van Hoang M, *et al.* Orphan nuclear receptor TR3/Nur77 regulates VEGF-A-induced angiogenesis through its transcriptional activity. *J Exp Med* 2006; 203(3): 719-29.
- 33 Azoitei N, Pusapati GV, Kleger A, Moller P, Kufer R, Genze F, *et al.* Protein kinase D2 is a crucial regulator of tumour cell-endothelial cell communication in gastrointestinal tumours. *Gut* 2010; 59(10): 1316-30.
- 34 Yoo YG, Na TY, Yang WK, Kim HJ, Lee IK, Kong G, *et al.* 6-Mercaptopurine, an activator of Nur77, enhances transcriptional activity of HIF-1 alpha resulting in new vessel formation. *Oncogene* 2007; 26(26): 3823-34.
- 35 Wang JR, Gan WJ, Li XM, Zhao YY, Li Y, Lu XX, *et al.* Orphan nuclear receptor Nur77 promotes colorectal cancer invasion and metastasis by regulating MMP-9 and E-cadherin. *Carcinogenesis* 2014; 35(11): 2474-84.
- 36 To SK, Zeng WJ, Zeng JZ, Wong AS. Hypoxia triggers a Nur77-beta-catenin feed-forward loop to promote the invasive growth of colon cancer cells. *Br J Cancer* 2014; 110(4): 935-45.

- 37 Woronicz JD, Calnan B, Ngo V, Winoto A. Requirement for the orphan steroid-receptor Nur77 in apoptosis of T-cell hybridomas. *Nature* 1994; 367(6460): 277-81.
- 38 Liu ZG, Smith SW, McLaughlin KA, Schwartz LM, Osborne BA. Apoptotic signals delivered through the T-cell receptor of a T-cell hybrid require the immediate-early gene Nur77. *Nature* 1994; 367(6460): 281-4.
- 39 Chen YL, Jian MH, Lin CC, Kang JC, Chen SP, Lin PC, *et al.* The induction of orphan nuclear receptor nur77 expression by n-butylphenylthioacetamide as pharmaceuticals on hepatocellular carcinoma cell therapy. *Mol Pharmacol* 2008; 74(4): 1046-58.
- 40 Lin PC, Chen YL, Chiu SC, Yu YL, Chen SP, Chien MH, *et al.* Orphan nuclear receptor, Nur77 was a possible target gene of butylphenylthioacetamide chemotherapy on glioblastoma multiforme brain tumor. *J Neurochem* 2008; 106(3): 1017-26.
- 41 Zhan YY, Du XP, Chen HZ, Liu JJ, Zhao BX, Huang DH, *et al.* Cyclosporin B is an agonist for nuclear orphan receptor Nur77. *Nat Chem Biol* 2008; 4(9): 548-56.
- 42 Liu S, Wu Q, Ye XF, Cai JH, Huang ZW, Su WJ. Induction of apoptosis by TPA and VP-16 is through translocation of TR3. *World J Gastroenterol* 2002; 8(3): 446-50.
- 43 Li H, Kolluri SK, Gu J, Dawson MI, Cao X, Hobbs PD, *et al.* Cytochrome c release and apoptosis induced by mitochondrial targeting of nuclear orphan receptor TR3. *Science* 2000; 289(5482): 1159-64.
- 44 Gennari A, Bleumink R, Viviani B, Galli CL, Marinovich M, Pieters R, *et al.* Identification by DNA microarray of nur77 as a gene induced by Di-n-butyltin dichloride: Its role in organotin-induced apoptosis. *Toxicol Appl Pharm* 2002; 181(1): 27-31.
- 45 Yao LM, He JP, Chen HZ, Wang Y, Wang WJ, Wu R, *et al.* Orphan receptor TR3 participates in cisplatin-induced apoptosis via Chk2 phosphorylation to repress intestinal tumorigenesis. *Carcinogenesis* 2012; 33(2): 301-11.
- 46 Lin H, Lin Q, Liu M, Lin Y, Wang X, Chen H, *et al.* PKA/Smurf1 signaling-mediated stabilization of Nur77 is required for anticancer drug cisplatin-induced apoptosis. *Oncogene* 2014; 33(13): 1629-39.
- 47 Wilson AJ, Liu AY, Roland J, Adebayo OB, Fletcher SA, Slaughter JC, *et al.* TR3 modulates platinum resistance in ovarian Cancer. *Cancer Res* 2013; 73(15): 4758-69.
- 48 Chinnaiyan P, Varambally S, Tomlins SA, Ray S, Huang SM, Chinnaiyan AM, *et al.* Enhancing the antitumor activity of ErbB blockade with histone deacetylase (HDAC) inhibition. *Int J Cancer* 2006; 118(4): 1041-50.
- 49 Chintharlapalli S, Burghardt R, Papineni S, Ramaiah S, Yoon K, Safe S. Activation of Nur77 by selected 1,1-bis(3'-indolyl)-1-(p-substituted phenyl) methanes induces apoptosis through nuclear pathways. *J Biol Chem* 2005; 280(26): 24903-14.
- 50 Lin BZ, Kolluri SK, Lin F, Liu W, Han YH, Cao XH, *et al.* Conversion of Bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear orphan receptor Nur77/TR3. *Cell* 2004; 116(4): 527-40.
- 51 Cao X, Liu W, Lin F, Li H, Kolluri SK, Lin B, *et al.* Retinoid X receptor regulates Nur77/TR3-dependent apoptosis by modulating its nuclear export and mitochondrial targeting. *Mol Cell Biol* 2004; 24(22): 9705-25.
- 52 Jeong JH, Park JS, Moon B, Kim MC, Kim JK, Lee S, *et al.* Orphan nuclear receptor Nur77 translocates to mitochondria in the early phase of apoptosis induced by synthetic chenodeoxycholic acid derivatives in human stomach cancer cell line SNU-1. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 1010: 171-7.
- 53 Liu J, Zhou W, Li SS, Sun Z, Lin B, Lang YY, *et al.* Modulation of orphan nuclear receptor Nur77-mediated apoptotic pathway by acetylshikonin and analogues. *Cancer Res* 2008; 68(21): 8871-80.
- 54 Young CYF, Murtha PE, Zhang JY. Tumor-promoting phorbol ester-induced cell-death and gene-expression in a human prostate adenocarcinoma cell-line. *Oncol Res* 1994; 6(4/5): 203-10.
- 55 Mullican SE, Zhang S, Konopleva M, Ruvolo V, Andreeff M, Milbrandt J, *et al.* Abrogation of nuclear receptors Nr4a3 and Nr4a1 leads to development of acute myeloid leukemia. *Nat Med* 2007; 13(6): 730-5.
- 56 Deutsch AJA, Rinner B, Wenzl K, Pichler M, Troppan K, Steinbauer E, *et al.* NR4A1-mediated apoptosis suppresses lymphomagenesis and is associated with a favorable cancer-specific survival in patients with aggressive B-cell lymphomas. *Blood* 2014; 123(15): 2367-77.
- 57 Wenzl K, Troppan K, Neumeister P, Deutsch AJ. The nuclear orphan receptor NR4A1 and NR4A3 as tumor suppressors in hematologic neoplasms. *Curr Drug Targets* 2015; 16(1): 38-46.
- 58 Wilson TE, Fahrner TJ, Johnston M, Milbrandt J. Identification of the DNA-binding site for Ngfi-B by genetic selection in yeast. *Science* 1991; 252(5010): 1296-300.
- 59 Meinke G, Sigler PB. DNA-binding mechanism of the monomeric orphan nuclear receptor NGFI-B. *Nat Struct Biol* 1999; 6(5): 471-77.
- 60 Phillips A, Lesage S, Gingras R, Maira MH, Gauthier Y, Hugo P, *et al.* Novel dimeric Nur77 signaling mechanism in endocrine and lymphoid cells. *Mol Cell Biol* 1997; 17(10): 5946-51.
- 61 Perlmann T, Jansson L. A novel pathway for vitamin-a signaling mediated by Rxr heterodimerization with Ngfi-B and Nurr1. *Gene Dev* 1995; 9(7): 769-82.
- 62 Palumbo-Zerr K, Zerr P, Distler A, Fliehr J, Mancuso R, Huang JG, *et al.* Orphan nuclear receptor NR4A1 regulates transforming growth factor-beta signaling and fibrosis. *Nat Med* 2015; 21(2): 62-70.
- 63 Zhao BX, Chen HZ, Lei NZ, Li GD, Zhao WX, Zhan YY, *et al.* p53 mediates the negative regulation of MDM2 by orphan receptor TR3. *EMBO J* 2006; 25(24): 5703-15.
- 64 Li GD, Fang JX, Chen HZ, Luo J, Zheng ZH, Shen YM, *et al.* Negative regulation of transcription coactivator p300 by orphan receptor TR3. *Nucleic Acids Res* 2007; 35(21): 7348-59.
- 65 Lei NZ, Zhang XY, Chen HZ, Wang Y, Zhan YY, Zheng ZH, *et al.* A feedback regulatory loop between methyltransferase PRMT1 and orphan receptor TR3. *Nucleic Acids Res* 2009; 37(3): 832-48.
- 66 Kolluri SK, Zhu XW, Zhou X, Lin BZ, Chen Y, Sun K, *et al.* A short Nur77-derived peptide converts Bcl-2 from a protector to a killer. *Cancer Cell* 2008; 14(4): 285-98.
- 67 Cheng Z, Volkens M, Din S, Avitabile D, Khan M, Gude N, *et al.* Mitochondrial translocation of Nur77 mediates cardiomyocyte apoptosis. *Eur Heart J* 2011; 32(17): 2179-88.
- 68 Liang B, Song X, Liu G, Li R, Xie J, Xiao L, *et al.* Involvement of TR3/Nur77 translocation to the endoplasmic reticulum in ER stress-induced apoptosis. *Exp Cell Res* 2007; 313 (13): 2833-44.

- 69 Chen HZ, Wen Q, Wang WJ, He JP, Wu Q. The orphan nuclear receptor TR3/Nur77 regulates ER stress and induces apoptosis via interaction with TRAPgamma. *Int J Biochem Cell Biol* 2013; 45(8): 1600-9.
- 70 Kochel I, Rapak A, Ziolo E, Strzadala L. Nur77 nuclear import and its NBRE-binding activity in thymic lymphoma cells are regulated by different mechanisms sensitive to FK506 or HA1004. *Biochem Bioph Res Co* 2005; 334(4): 1102-6.
- 71 Yip KW, Godoi PHC, Zhai DY, Garcia X, Cellitti JF, Cuddy M, *et al.* A TR3/Nur77 peptide-based high-throughput fluorescence polarization screen for small molecule Bcl-2 inhibitors. *J Biomol Screen* 2008; 13(7): 665-73.
- 72 Ferlini C, Cicchillitti L, Raspaglio G, Bartollino S, Cimitan S, Bertucci C, *et al.* Paclitaxel directly binds to Bcl-2 and functionally mimics activity of Nur77. *Cancer Res* 2009; 69(17): 6906-14.
- 73 Liu JJ, Zeng HN, Zhang LR, Zhan YY, Chen Y, Wang Y, *et al.* A unique pharmacophore for activation of the nuclear orphan receptor Nur77 *in vivo* and *in vitro*. *Cancer Res* 2010; 70(9): 3628-37.
- 74 Yoon K, Lee SO, Cho SD, Kim K, Khan S, Safe S. Activation of nuclear TR3 (NR4A1) by a diindolylmethane analog induces apoptosis and proapoptotic genes in pancreatic cancer cells and tumors. *Carcinogenesis* 2011; 32(6): 836-42.
- 75 Cho SD, Lei P, Abdelrahim M, Yoon K, Liu SX, Guo JJ, *et al.* 1,1-Bis(3'-indolyl)-1-(p-methoxyphenyl)methane activates Nur77-independent proapoptotic responses in colon cancer cells. *Mol Carcinogen* 2008; 47(4): 252-63.
- 76 Liu PY, Sheu JJC, Lin PC, Lin CT, Liu YJ, Ho LI, *et al.* Expression of Nur77 induced by an n-butylidene-phthalide derivative promotes apoptosis and inhibits cell growth in oral squamous cell carcinoma. *Invest New Drug* 2012; 30(1): 79-89.
- 77 Sun Z, Cao X, Jiang MM, Qiu Y, Zhou H, Chen L, *et al.* Inhibition of beta-catenin signaling by nongenomic action of orphan nuclear receptor Nur77. *Oncogene* 2012; 31(21): 2653-67.
- 78 Ashford TP, Porter KR. Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes. *J Cell Biol* 1962; 12: 198-202.
- 79 Li JR, Cheng CL, Yang WJ, Yang CR, Ou YC, Wu MJ, *et al.* FIP-gts potentiate autophagic cell death against cisplatin-resistant urothelial cancer cells. *Anticancer Res* 2014; 34(6): 2973-83.
- 80 Pinton P, Kroemer G. Cancer therapy: Altering mitochondrial properties. *Nat Chem Biol* 2014; 10(2): 89-90.
- 81 Yang H, Bushue N, Bu PL, Wan YJY. Induction and intracellular localization of Nur77 dictate fenretinide-induced apoptosis of human liver cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2010; 79(7): 948-54.
- 82 Lee SO, Li X, Hedrick E, Jin UH, Tjalkens RB, Backos DS, *et al.* Diindolylmethane analogs bind NR4A1 and are NR4A1 antagonists in colon cancer cells. *Mol Endocrinol* 2014; 28(10): 1729-39.
- 83 Chen J, Fiskus W, Eaton K, Fernandez P, Wang Y, Rao R, *et al.* Cotreatment with BCL-2 antagonist sensitizes cutaneous T-cell lymphoma to lethal action of HDAC7-Nur77-based mechanism. *Blood* 2009; 113(17): 4038-48.
- 84 Mu XM, Chang CS. TR3 orphan nuclear receptor mediates apoptosis through up-regulating E2F1 in human prostate cancer LNCaP cells. *J Biol Chem* 2003; 278(44): 42840-45.