

ROR α 高表达抑制人胃癌MGC803细胞 Wnt/ β -catenin信号通路靶基因表达

苏 坚^{1,2#} 赵晓红^{2#} 刘 芳² 夏 红² 苏 波² 曾 希² 凌 晖² 苏 琦^{2*}

(¹南华大学附属第二医院病理科, 衡阳 421001; ²湖南省胃癌研究中心,
湖南省高校肿瘤细胞与分子病理学重点实验室, 南华大学肿瘤研究所, 衡阳 421001)

摘要 该文探讨了ROR α (retinoid acid receptor related orphan receptor α)高表达对人胃癌MGC803细胞Wnt/ β -catenin信号通路靶基因的作用。采用MTT检测了MGC803细胞增殖。采用RT-PCR、Western blot与免疫共沉淀检测了Wnt/ β -catenin信号通路相关分子与靶基因表达。荧光素酶报告基因方法检测*c-Myc*基因启动子活性。MTT结果显示, ROR α 高表达人胃癌MGC803细胞的增殖能力较对照组明显减弱($P < 0.05$)。RT-PCR与Western blot结果显示, ROR α 高表达组Wnt1 mRNA与蛋白质水平较对照组下调($P < 0.05$), 而 β -catenin mRNA与蛋白质水平无差异($P > 0.05$)。免疫共沉淀结果显示, ROR α 高表达组ROR α 与 β -catenin结合明显增加($P < 0.05$)。ROR α 高表达可显著下调核内 β -catenin水平($P < 0.05$), 同时可显著下调TCF-4(T cell factor-4)蛋白质水平($P < 0.05$)。ROR α 高表达可显著下调Axin、*c-Myc*、*c-Jun* mRNA与蛋白质水平($P < 0.05$)。荧光素酶报告基因实验结果显示, ROR α 高表达*c-Myc*启动子活性明显降低($P < 0.05$)。以上结果表明, ROR α 高表达可通过调控Wnt/ β -catenin信号通路相关分子基因表达来抑制人胃癌细胞增殖。

关键词 ROR α ; 人胃癌MGC803细胞; 增殖; Wnt/ β -catenin信号通路; 靶基因

Overexpression of ROR α Influence Target Genes of Wnt/ β -catenin Signaling Pathway in Human Gastric MGC803 Cells

Su Jian^{1,2#}, Zhao Xiaohong^{2#}, Liu Fang², Xia Hong², Su Bo², Zeng Xi², Ling Hui², Su Qi^{2*}

(¹Department of Pathology, the Second Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang 421001, China;

²Cancer Research Institute, Center for Gastric Cancer Research of Hunan Province, Key Laboratory of Cancer Cellular and Molecular Pathology of Hunan Provincial University, University of South China, Hengyang 421001, China)

Abstract This work was aimed to investigate the effect of target genes of Wnt/ β -catenin signaling pathway in human gastric MGC803 cells by overexpression of ROR α . The proliferation of MGC803 cells was detected by MTT. The expressions of signal molecules in Wnt/ β -catenin signaling pathway were tested by RT-PCR, Western blot and co-immunoprecipitation. Luciferase report gene assay was used to assess the promoter activity of *c-Myc*. MTT showed that the proliferation of MGC803 cells with overexpression of ROR α was significantly attenuated compared with control group ($P < 0.05$). The mRNA and protein levels of Wnt1 were respectively downregulation ($P < 0.05$).

收稿日期: 2016-07-11 接受日期: 2016-09-02

国家自然科学基金(批准号: 81374013)和湖南省卫计委课题(批准号: B2015-182)资助的课题

#共同第一作者

*通讯作者。Tel: 0734-8281547, E-mail: suqi1945@163.com

Received: July 11, 2016 Accepted: September 2, 2016

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81374013) and the Scientific Research Foundation of Health and Family Planning Committee of Hunan Province (Grant No.B2015-182)

#These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: +86-734-8281547, E-mail: suqi1945@163.com

网络出版时间: 2016-11-04 17:14:15 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20161104.1714.008.html>

And, the β -catenin mRNA and protein level were not significant deviation ($P>0.05$). Co-immunoprecipitation exhibitet that ROR α bind to β -catenin was significant increased in MGC803 cells with overexpression of ROR α ($P<0.05$). However, the expression of intranuclear β -catenin was markedly downregulated ($P<0.05$). At the meantime, the expression of TCF-4 (T cell factor-4) was downregulated in MGC803 cells with overexpression of ROR α ($P<0.05$). MGC803 cells with overexpression of ROR α has the decrease of mRNA and proteins levels of target genes by Wnt/ β -catenin signaling pathway, such as Axin, c-Myc and c-Jun, and inhibit the promoter activity of *c-Myc*. These results indicated that overexpression of ROR α in MGC803 cells could suppress the expression of target genes by Wnt/ β -catenin signaling pathway, and then inhibit the proliferation in MGC803 cells.

Keywords ROR α ; human gastric cancer MGC803 cells; proliferation; Wnt/ β -catenin pathway; target genes

据最新统计, 胃癌在我国每年新发约67.9万, 死亡约49.8万人, 发生率与死亡率位于肿瘤类疾病第二。由于患者就诊时大多已发生侵袭转移, 5年生存率低于10%^[1-2]。因此, 研究胃癌侵袭转移机制、寻找诊断与治疗的新靶点具有重要的意义。

维甲酸相关孤核受体 α (retinoid acid receptor related orphan receptor α , ROR α)是核受体超家族成员之一, 广泛分布于体内, 可调节正常组织细胞的发育和/或分化、生化代谢、生理节律、机体稳态维持及高级神经功能等。ROR α 在多种肿瘤中表达下调, 与肿瘤发生密切相关, 可能成为肿瘤治疗的靶点^[3-4]。我们发现, ROR α 在胃癌中低表达, 与胃癌发生和分化程度有关^[5]。本文观察了ROR α 高表达对胃癌细胞Wnt/ β -catenin信号通路靶基因影响。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人胃癌MGC803细胞由本实验室保存, 稳定高表达ROR α 的人胃癌MGC803细胞由本实验室构建^[6], 置于含10%小牛血清的RPMI 1640培养基中, 37 °C, 5% CO₂及饱和湿度的培养箱内传代培养。取对数生长期的细胞用于实验。

1.2 主要试剂

RNA提取试剂盒购自Omega公司。逆转录试剂盒与BCA蛋白质定量试剂盒为Promega公司产品。细胞核蛋白和胞质蛋白提取试剂盒购于凯基生物有限公司。 β -actin抗体购自Abcam公司。 β -catenin、p- β -catenin、Wnt-1、TCF-4、Axin、c-Jun、c-Myc抗体与ECL发光试剂盒购自Santa Cruz公司。新生牛血清购自杭州四季青生物工程公司。引物用Primer Premier 5.0软件设计, 由上海生工生物工程有

限公司合成。c-Myc-pGL-3萤光素酶报告基因质粒

1.3 MTT检测细胞增殖

为广州赛业生物科技有限公司惠赠。取对数生长期细胞, 用0.25%胰蛋白酶-0.02% EDTA消化成单细胞悬液, 接种于96孔平底培养板, 每个样本设6个重复孔。细胞贴壁6~8 h后常规培养, 更换细胞培养基为150 μ L RPMI 1640完全细胞培养基, 再加入20 μ L 5 mg/mL MTT溶液, 继续培养4 h。终止培养, 吸去培养基, 加入150 μ L DMSO溶液。置于摇床上室温震荡10 min, 使结晶物充分溶解。酶联免疫检测仪在570 nm处测量各孔的吸光度(D)值。细胞增殖抑制率=(1-实验组 D_{570} /对照组 D_{570}) \times 100%。

1.4 RT-PCR分析

用Total RNA Kit提取细胞总RNA, AMV酶作用下逆转录合成cDNA。设计并合成PCR引物序列, 具体序列如下, β -catenin-F: 5'-GTT GTA CCG GAG CCC TTC AC-3', β -catenin-R: 5'-TCC CAC CCT ACC AAC CAA GT-3', 产物长度729 bp; Wnt1-F: 5'-TGC ACG CAC ACG CGC GTA CTG CAC-3', Wnt1-R: 5'-CAG GAT GGC AAG AGG GTT CAT G-3', 产物长度400 bp; Axin-F: 5'-CCT CAA ACA CCA CCC CAC AG-3', Axin-R: 5'-AGC CGT GTC GGA CAT GGA-3', 产物长度254 bp; c-Myc-F: 5'-CTG CTT GGA CGG ACA GGA TG-3', c-Myc-R: 5'-CGT CTC CAC ACA TCA GCA CAA-3', 产物长度323 bp; c-Jun-F: 5'-ATG CCT CCC GCA CTC TTA CT-3', c-Jun-R: 5'-CGC ACC GGT TGT TGA ACT TG-3', 产物长度292 bp; β -actin-F: 5'-TCT ACA ATG AGC TGC GTG TGG-3', β -actin-R: 5'-GGA ACC GCT CAT TGC CAA TG-3', 产物长度498 bp。PCR反应条件: 94 °C预变性5 min; 94 °C变性40 s, 各基因Tm退火45 s, 72 °C延伸80 s, 28个循环; 72 °C延伸10 min。5 μ L的PCR产

物经1%的琼脂糖电泳, 溴化乙啶染色, 通过IS1000图像分析软件读取条带灰度值, 相对值以目的基因与 β -actin灰度值之比表示。

1.5 Western blot检测

(1)总蛋白质的提取。弃去细胞培养液, 用预冷的PBS洗涤细胞3次, 倒置培养瓶放置, 吸干培养瓶内的液体。加入配置好的裂解液, 将培养瓶细胞面平铺置于冰面上30 min。用洗净并干燥的细胞刮将细胞顺一个方向刮6 min左右, 倾角静置3 min。用移液枪把提取液移至干净1.5 mL的EP管中, 冰上放置并摇床上摇20 min。将EP管于4 °C离心机内, 12 000 r/min, 持续离心15 min, 将上清液分装于100 μ L EP管内置于-80 °C备用。(2)核蛋白的提取。将贴壁的MGC803细胞用胰蛋白酶消化液消化细胞成悬浮细胞, 2 000 r/min离心10 min收集细胞, 再用预冷的PBS洗涤2次。清洗细胞后, 去除上清液, 根据细胞压积比, 细胞压积: Buffer A=1:1.5, 加入预冷的Buffer A(每mL Buffer A加入1 μ L DTT, 5 μ L 100 mmol/L PMSF和1 μ L蛋白酶抑制剂), 在混匀器上以最大转速漩涡剧烈震荡15 s, 混匀后放置在冰上10~15 min。加入总体积的1/20体积的Buffer B, 快速震荡混匀, 置冰上1 min后, 4 °C 16 000 r/min离心30 s。收集上清至新的离心管中, 即为胞质蛋白; 在离心沉淀物即细胞核中加入100 μ L已配好的预冷Buffer C(每mL Buffer C加入1 μ L DTT, 5 μ L 100 mmol/L PMSF, 1 μ L蛋白酶抑制剂), 在漩涡振荡器上最大转速剧烈震荡15 s后置冰上30 min, 每隔10 min漩涡剧烈震荡15 s; 将离心管放入4 °C离心机中, 16 000 r/min离心10 min, 离心结束后尽快将上清转入预冷的无酶微量离心管中, 上清液即是核蛋白。BCA法测定蛋白质浓度, 每组取等量样本进行SDS-PAGE凝胶电泳, 电泳后转膜, 封闭1 h, 加一抗, 4 °C过夜, TBST洗膜, 加二抗孵育1 h, 洗膜, ECL发光, X片曝光、显影、定影。

1.6 免疫共沉淀

按照Seize Classic Mammalian Immunoprecipitation试剂盒说明进行操作。将瓶中细胞培养液吸去, 加入M-PER裂解液, 13 000 r/min离心5 min, 收集细胞。将抗ROR α 抗体加入细胞裂解物, 4 °C过夜, 然后将其加入含蛋白G的旋转柱上, 孵育30 min, 2 000 r/min离心3 min, 弃去滤过液, PBS洗3次, 加入洗脱液洗脱2次, 得到抗体复合物, 加入上样缓冲液, SDS-PAGE电泳, 进行Western blot分析。

1.7 荧光素酶报告基因分析

制备单细胞悬液, 细胞计数, 以 3×10^4 /cm²的细胞数量种入24孔板。细胞贴壁后, 脂质体Lipofectamine 2000转染c-Myc-pGL-3荧光素酶报告质粒入细胞。24 h后, 每孔加入100 μ L裂解液, 室温裂解30 min。将裂解液移入离心管中, 取上清20 μ L, 加入50 μ L荧光素酶底物, 小心混匀。液体闪烁仪检测荧光值。每次每个样品设立复孔, 实验重复3次。

1.8 统计学分析

各组实验数据采用均值 \pm 标准差表示, 采用SPSS 13统计软件进行统计学分析, 结果比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有显著性意义。

2 结果

2.1 ROR α 高表达对MGC803细胞增殖的影响

MTT检测结果显示, 48、72、96 h后, ROR α 高表达MGC803细胞增殖能力(D_{570} 值)较对照组和空载体组均明显降低($P < 0.05$, 表1), 提示ROR α 高表达可抑制MGC803细胞增殖。

2.2 ROR α 高表达对Wnt/ β -catenin信号通路的影响

为探讨ROR α 高表达对Wnt/ β -catenin信号通路相关分子的影响, 采用RT-PCR与Western blot检测Wnt1与 β -catenin mRNA与蛋白质表达。结果表明, ROR α 高表达较对照组与空载体组Wnt1 mRNA

表1 ROR α 高表达对胃癌MGC803细胞增殖活性的影响

Table 1 The effect of proliferation in MGC803 cells with overexpression of ROR α

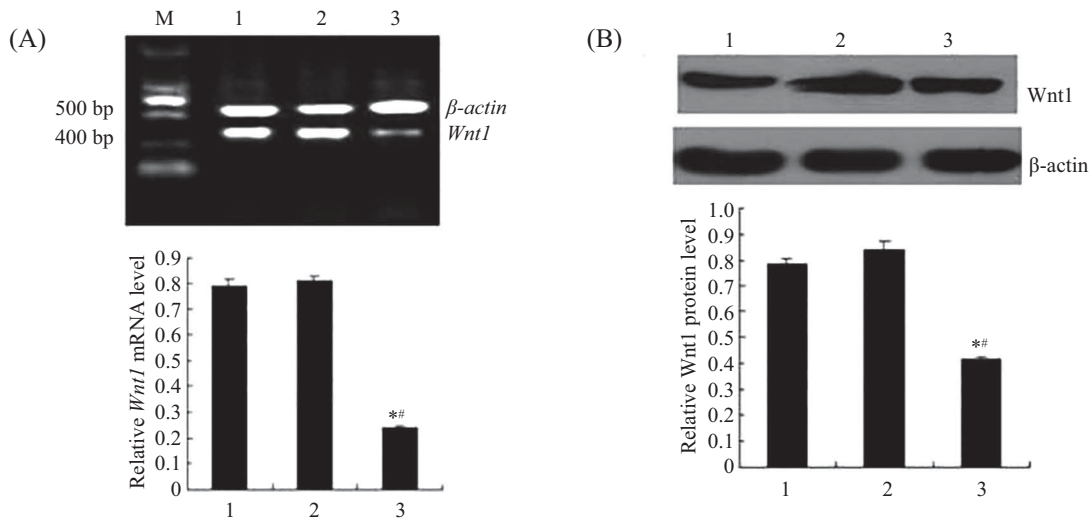
时间(h) Time (h)	MGC803组 MGC803 group	空载体组 Empty vector group	ROR α 高表达组 ROR α group
24	0.374 \pm 0.031	0.369 \pm 0.068	0.277 \pm 0.071
48	0.631 \pm 0.068	0.647 \pm 0.027	0.347 \pm 0.051 [#]
72	1.129 \pm 0.017	1.211 \pm 0.031	0.581 \pm 0.024 [#]
96	1.974 \pm 0.045	2.033 \pm 0.038	0.698 \pm 0.046 [#]

* $P < 0.05$, 与MGC803组比较; [#] $P < 0.05$, 与空载体组比较。

* $P < 0.05$ vs MGC803 group; [#] $P < 0.05$ vs empty vector group.

与蛋白质水平明显下调($P < 0.05$, 图1)。但 β -catenin mRNA与蛋白质水平无显著差异($P > 0.05$, 图2)。为了证实ROR α 是否与 β -catenin结合, 进一步采用免疫共沉淀检测ROR α 与 β -catenin结合, 结果显示, 用Anti-ROR α 抗体沉淀MGC803细胞的裂解蛋白中, 可见 β -catenin存在, 并且, ROR α 高表达组较对照组与空载体组ROR α 与 β -catenin结合明显增加($P < 0.05$,

图3)。为证实ROR α 与 β -catenin结合增加是否影响核内 β -catenin表达含量, 核内蛋白检测结果显示, ROR α 高表达可显著降低核内 β -catenin含量($P < 0.05$, 图4)。ROR α 高表达较对照组与空载体组TCF-4蛋白质表达水平显著下调($P < 0.05$, 图5)。以上结果表明, ROR α 高表达可下调MGC803细胞的Wnt1表达水平, 抑制 β -catenin入核, 继而下调TCF-4表达。

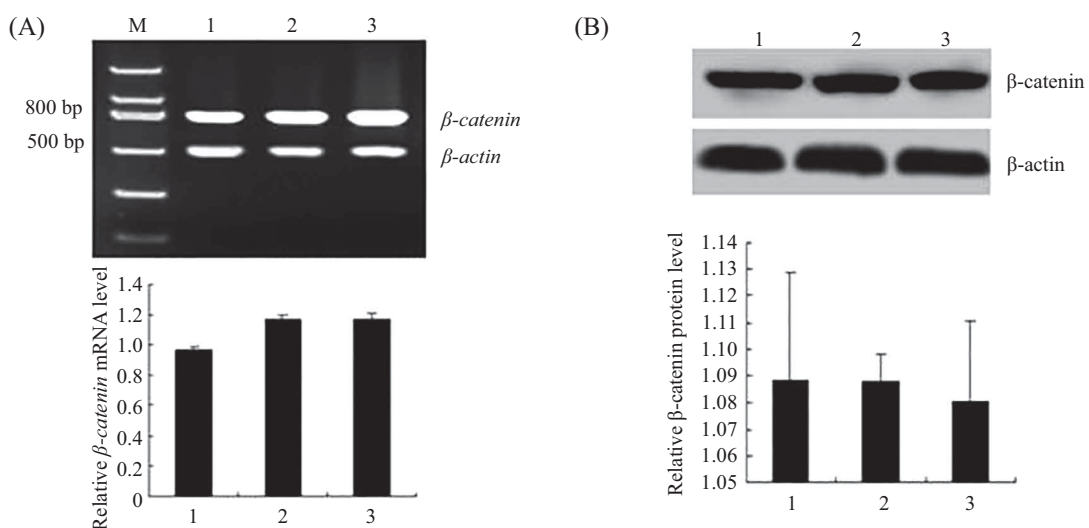


A: RT-PCR检测Wnt1 mRNA表达; B: Western blot检测Wnt1蛋白表达。1: MGC803组; 2: 空载体组; 3: ROR α 高表达组。* $P < 0.05$, 与MGC803组比较; ** $P < 0.05$, 与空载体组比较。

A: the expression of Wnt1 mRNA detected by RT-PCR; B: the expression of Wnt1 protein detected by Western blot. 1: MGC803 group; 2: empty vector group; 3: ROR α overexpression group. * $P < 0.05$ vs MGC803 group; ** $P < 0.05$ vs empty vector group.

图1 ROR α 高表达对MGC803细胞Wnt1表达的影响

Fig.1 The effect of ROR α overexpression on the expression of Wnt1 in MGC803 cells

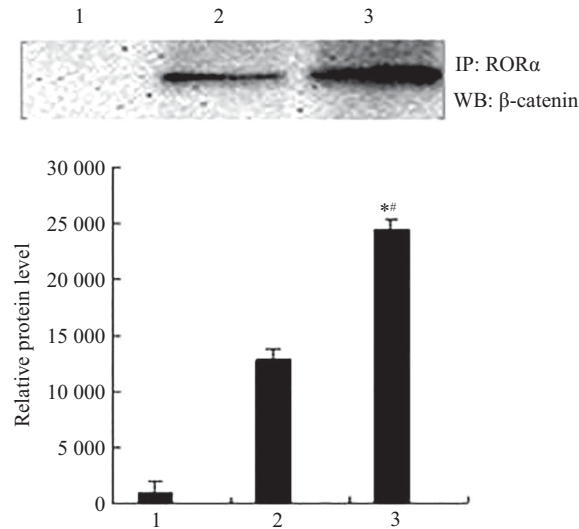


A: RT-PCR检测 β -catenin mRNA表达; B: Western blot检测 β -catenin蛋白表达。1: MGC803组; 2: 空载体组; 3: ROR α 高表达组。

A: the expression of β -catenin mRNA detected by RT-PCR; B: the expression of β -catenin protein detected by Western blot. 1: MGC803 group; 2: empty vector group; 3: ROR α overexpression group.

图2 ROR α 高表达对MGC803细胞 β -catenin表达的影响

Fig.2 The effect of ROR α overexpression on the expression of β -catenin in MGC803 cells

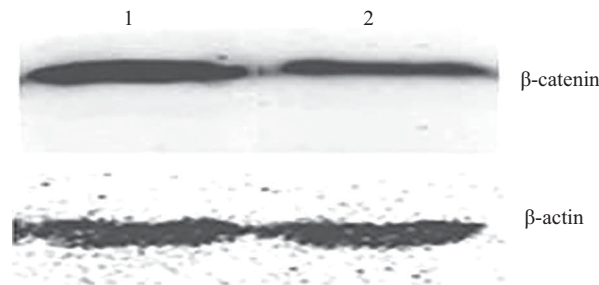


1: IgG组; 2: MGC803组; 3: ROR α 高表达组。* P <0.05, 与MGC803组比较; # P <0.05, 与IgG组比较。

1: IgG group; 2: MGC803 group; 3: ROR α overexpression group. * P <0.05 vs MGC803 group; # P <0.05 vs IgG group.

图3 免疫共沉淀检测MGC803细胞ROR α 与 β -catenin结合

Fig.3 ROR α bind to β -catenin in MGC803 cells detected by co-immunoprecipitation

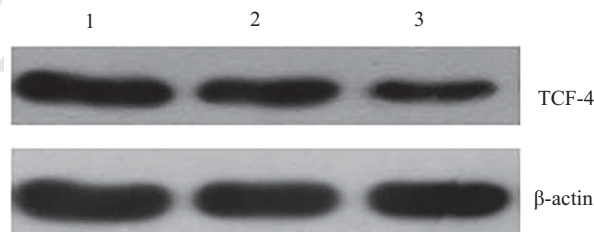


1: MGC803组; 2: ROR α 高表达组。* P <0.05, 与MGC803组比较。

1: MGC803 group; 2: ROR α overexpression group. * P <0.05 vs MGC803 group.

图4 ROR α 高表达对MGC803细胞核内 β -catenin表达含量的影响

Fig.4 The effect of ROR α overexpression on the content of intranuclear β -catenin in MGC803 cells



1: MGC803组; 2: 空载体组; 3: ROR α 高表达组。

1: MGC803 group; 2: empty vector group; 3: ROR α overexpression group.

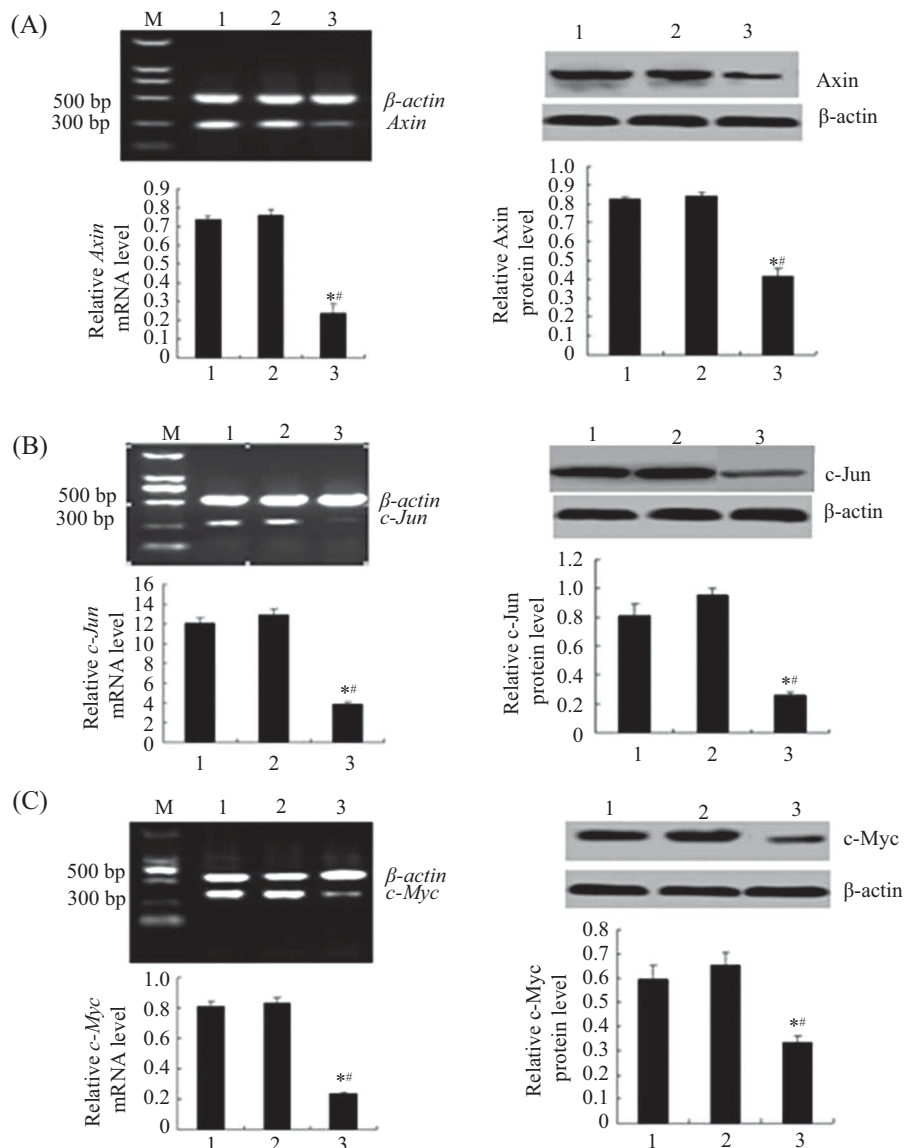
图5 ROR α 高表达对MGC803细胞TCF-4蛋白表达的影响

Fig.5 The effect of ROR α overexpression on the expression of TCF-4 protein in MGC803 cells

2.3 ROR α 高表达对Wnt/ β -catenin信号通路靶基因表达的影响

为了探明ROR α 高表达是否影响Wnt/ β -catenin信号通路相关靶基因的表达, 分别采用RT-PCR与Western blot检测Axin、c-Myc、c-Jun mRNA与蛋白

质表达。RT-PCR显示, ROR α 高表达分别可显著下调Axin、c-Myc与c-Jun mRNA表达水平(P <0.05, 图6)。Western blot显示, ROR α 高表达分别可明显下调Axin、c-Myc与c-Jun蛋白质表达水平(P <0.05, 图6)。提示ROR α 高表达可抑制Wnt/ β -catenin信号通路的



A: RT-PCR与Western blot检测Axin表达; B: RT-PCR与Western blot检测c-Jun表达; C: RT-PCR与Western blot检测c-Myc表达。1: MGC803组; 2: 空载体组; 3: ROR α 高表达组。* P <0.05, 与MGC803组比较; [#] P <0.05, 与空载体组比较。

A: the expression of Axin detected by RT-PCR and Western blot; B: the expression of c-Jun detected by RT-PCR and Western blot; C: the expression of c-Myc detected by RT-PCR and Western blot. 1: MGC803 group; 2: empty vector group; 3: ROR α overexpression group. * P <0.05 vs MGC803 group; [#] P <0.05 vs empty vector group.

图6 ROR α 高表达抑制MGC803细胞Wnt/ β -catenin信号通路靶基因表达

Fig.6 Overexpression of ROR α inhibit expression of target genes of Wnt/ β -catenin signaling pathway in MGC803 cells

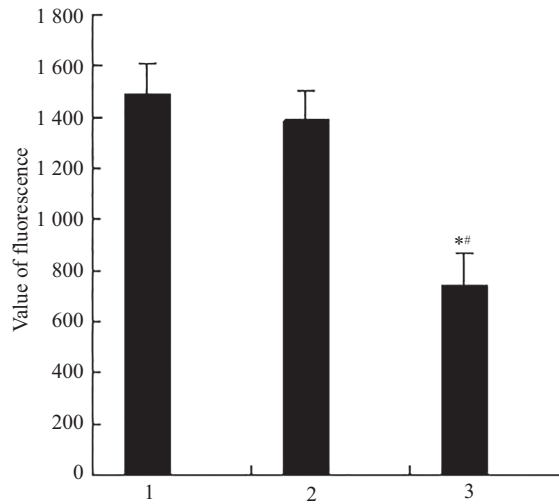
靶基因表达。

2.4 ROR α 高表达对c-Myc启动子活性的影响

为了进一步证实ROR α 高表达是否影响MGC803细胞的c-Myc启动子活性, 采用荧光素酶报告基因方法检测c-Myc启动子活性。结果显示, ROR α 高表达组c-Myc启动子活性明显低于MGC803组与空载体组(P <0.05, 图7), 表明ROR α 可抑制MGC803细胞的c-Myc启动子活性。

3 讨论

大量研究证实, Wnt/ β -catenin信号通路在肿瘤发生与侵袭转移中起着重要作用, 可能成为药物干预治疗肿瘤靶点之一^[7]。Wnt/ β -catenin信号通路由细胞外的Wnt、膜受体Frizzled、胞质内的 β -catenin以及下游的靶基因组成, 其中 β -catenin起着关键作用。当胞外Wnt增加时, Wnt与Frizzled结合, 激活dishevelled(Dsh/Dvl)蛋白



1: MGC803组; 2: 空载体组; 3: ROR α 高表达组。* P <0.05, 与MGC803组比较; # P <0.05, 与空载体组比较。

1: MGC803 group; 2: empty vector group; 3: ROR α overexpression group. * P <0.05 vs MGC803 group; # P <0.05 vs empty vector group.

图7 ROR α 高表达对MGC803细胞c-Myc启动子活性的影响

Fig.7 The effect of ROR α overexpression on the activity of c-Myc promoter in MGC803 cells

质, 进而抑制GSK3 β (glycogen synthase kinase-3 β)/APC(adenomatous polyposis coli)/Axin(axis inhibitor)复合物对 β -catenin的磷酸化, 保护其不被降解, 从而增加细胞内 β -catenin, 增多的 β -catenin进入细胞核, 与Tcf/Lef结合, 引起*c-Myc*、*Cyclin D1*、*survivin*、*c-jun*、*Fra*等靶基因的转录, 导致肿瘤发生^[8]。

研究表明, ROR α 在结肠癌、食管癌、胰腺癌、肝癌、乳腺癌、子宫颈癌、卵巢癌、前列腺癌、膀胱癌、头颈部癌、白血病等多种肿瘤中表达下调^[4]。恢复ROR α 表达可体内外抑制乳腺癌细胞增殖与侵袭等恶性表型。ROR α 可通过经典的Wnt/ β -catenin与非经典的Wnt5a/PKC、p53-dependent、Hypoxia/Angiogenesis、NF- κ B等多种信号通路调控肿瘤细胞增殖、凋亡与侵袭等功能。ROR α 与 β -catenin结合抑制Wnt/ β -catenin信号通路的下游靶基因转录。这些都提示, ROR α 在肿瘤起着抑癌基因的作用, 可作为肿瘤治疗的潜在靶点^[4]。Lee等^[8]报告, ROR α 通过Wnt5a与PKC依赖方式负调控结肠癌细胞Wnt/ β -catenin信号通路, 抑制 β -catenin激活Wnt/ β -catenin靶基因转录。ROR α 可通过第35位丝氨酸残基磷酸化, 竞争结合 β -catenin, 抑制Wnt/ β -catenin信号通路的靶基因*Cyclin D1*、*c-Myc*、*Axin*, 从而调控细胞增殖与肿瘤进展。并且, ROR α 可依赖PGE2/PKC α 途径磷酸化减弱结肠癌细胞Wnt信号通路的靶基因表达。这表明, ROR α 是肿瘤细胞增殖的关键调控因子^[9]。

本研究在构建高表达ROR α 的人胃癌MGC803

细胞基础上, 探讨ROR α 高表达对Wnt/ β -catenin信号通路相关信号分子及其靶基因的影响。结果显示, ROR α 高表达可明显抑制MGC803细胞增殖, 下调Wnt1 mRNA与蛋白质水平。虽然, β -catenin mRNA与蛋白质水平无明显影响, 但免疫共沉淀结果证明, ROR α 高表达可增加ROR α 与 β -catenin结合, 并发现ROR α 高表达可下调核内 β -catenin, 下调TCF-4。进一步研究结果显示, ROR α 高表达可下调Axin、*c-Myc*、*c-Jun* mRNA与蛋白质水平, 抑制*c-Myc*启动子活性, 表明ROR α 高表达可下调Wnt1, 抑制 β -catenin入核, 继而下调TCF-4表达, 抑制Wnt/ β -catenin通路靶基因表达。

近年来, 研发促进ROR α 表达的有效药物为治疗肿瘤开拓了新的途径^[4]。有人从12 000种植物提取物发现, neoruscogenin是与ROR α 高亲和力的激动剂, 其可体内外活化ROR α 及影响其靶基因的表达^[10]。采用ROR α 激动剂SR1078处理肿瘤细胞可稳定p53表达与诱导凋亡^[11]。研究显示, 二烯丙基二硫(diallyl disulfide, DADS)对多种肿瘤均有明显的抑制作用, 是一种很有开发价值的抗肿瘤药物^[12]。我们前期工作证明, DADS可上调组蛋白乙酰化与p21 WAF1, 调节ATR/Chk1/Cdc25C/Cyclin B1, 阻滞G₂/M, 并通过Rac1-Pak1/Rock1通路下调LIMK1(LIM kinase 1)抑制人胃癌细胞EMT(epithelial-mesenchymal transition)与侵袭^[13-15]。但是, 其作用靶点尚不十分清楚。近来, 我们在鉴定DADS抑制人胃癌细胞的

差异蛋白质中发现, ROR α 表达明显上调^[16]。然而, DADS上调ROR α 是否通过Wnt/ β -catenin信号通路抑制其靶基因表达、ROR α 是否是DADS抑制人胃癌细胞的靶点, 尚待进一步深入研究。

参考文献 (References)

- 1 Chen W, Zheng R, Baade PD, Zhang S, Zeng H, Bray F, *et al.* Cancer statistics in China, 2015. *CA Cancer J Clin* 2016; 66(2): 115-32.
- 2 Orditura M, Galizia G, Sforza V, Gambardella V, Fabozzi A, Laterza MM, *et al.* Treatment of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2014; 20(7): 1635-49.
- 3 赵晓红, 苏琦. 维甲酸相关孤儿受体 α 与Wnt信号途径及肿瘤的关系. *国际病理科学与临床杂志*(Zhao Xiaohong, Su Qi. Retinoid acid receptor related orphan receptor α and Wnt signaling pathway and tumor. *Int J Pathol Clin*) 2011; 31(3): 234-7.
- 4 Du J, Xu R. ROR α , a potential tumor suppressor and therapeutic target of breast cancer. *Int J Mol Sci* 2012; 13(12): 15755-66.
- 5 石莺, 黄建军, 苏坚, 唐海林, 廖前进, 曾希, 等. ROR α 蛋白在胃癌中的表达及临床病理意义. *临床与实验病理学杂志*(Shi Ying, Huang Jianjun, Su Jian, Tang Hailin, Liao Qianjin, Zeng Xi, *et al.* *J Clin Exp Pathol*) 2012; 28(3): 270-3.
- 6 赵晓红, 向姝霖, 刘芳, 夏红, 曾希, 苏波, 等. 稳定高表达ROR α 基因的人胃癌MGC803细胞系的构建与鉴定. *中南医学科学杂志*(Zhao Xiaohong, Xiang Shulin, Liu Fang, Xia Hong, Zhen Xi, Su Bo, *et al.* Construction and identification of MGC803 cell transfected by ROR α gene. *Med Sci J Central South China*) 2016; 44(1): 5-10.
- 7 Mook RA Jr, Chen M, Lu J, Barak LS, Lyerly HK, Chen W. Small molecule modulators of Wnt/ β -catenin signaling. *Bioorg Med Chem Lett* 2013; 23(7): 2187-91.
- 8 Lee JM, Kim IS, Kim H, Lee JS, Kim K, Yim HY, *et al.* ROR α attenuates Wnt/ β -catenin signaling by PKC α -dependent phosphorylation in colon cancer. *Mol Cell* 2010; 37(2): 83-195.
- 9 Shin D, Kim IS, Lee JM, Shin SY, Lee JH, Baek SH, *et al.* The hidden switches underlying ROR α -mediated circuits that critically regulate uncontrolled cell proliferation. *J Mol Cell Biol* 2014; 6(4): 338-48.
- 10 Hellebood S, Haug C, Lamottke K, Zhou Y, Wei J, Daix S, *et al.* The identification of naturally occurring neurtosogenin as a bioavailable, potent, and high-affinity agonist of the nuclear receptor ROR α (NR1F1). *J Biomol Screen* 2014; 19(3): 399-406.
- 11 Wang Y, Solt LA, Kojetin DJ, Burris TP. Regulation of p53 stability and apoptosis by a ROR agonist. *PLoS One* 2012; 7(4): e34921.
- 12 Yi L, Su Q. Molecular mechanisms for the anti-cancer effects of diallyl disulfide. *Food Chem Toxicol* 2013; 57: 362-70.
- 13 Su B, Xiang SL, Su J, Tang HL, Liao QJ, Zhou YJ, *et al.* Diallyl disulfide increased histone acetylation and p21WAF1 expression in human gastric cancer cells *in vivo* and *in vitro*. *Biochem Pharmacol* 2012; 1(7): 1-10.
- 14 Ling H, Lu LF, He J, Xiao GH, Jiang H, Su Q. Diallyl disulfide selectively causes Checkpoint kinase-1 mediated G₂/M arrest in human MGC803 gastric cancer cell line. *Oncol Rep* 2014; 32(5): 2274-82.
- 15 Su B, Su J, Zeng Y, Liu F, Xia H, Ma YH, *et al.* Diallyl disulfide suppresses epithelial-mesenchymal transition, invasion and proliferation by downregulation of LIMK1 in gastric cancer. *Oncotarget* 2016; 7(9): 10498-512.
- 16 Su B, Su J, He H, Wu YH, Xia H, Zeng X, *et al.* Identification of potential targets for diallyl disulfide in human gastric cancer MGC-803 cells using proteomics approaches. *Oncol Rep* 2015; 3(5): 2484-94.