

前列腺癌细胞中雄激素调控核糖体蛋白和 氨酰-tRNA合成酶蛋白棕榈酰化修饰

李文卿¹ 张伟² 崔芦伟³ 刁统祥³ 张大磊³ 张亚群³ 肖飞¹ 刘明^{3*}

¹北京医院 国家老年医学中心 卫生部老年医学重点实验室, 北京 100730;

²北京医院病理科, 北京100730; ³北京医院泌尿外科, 北京 100730)

摘要 作者对雄激素R1881或DMSO处理的LNCaP细胞进行炔基棕榈酸代谢标记, 之后利用点击化学反应形成的共价键富集棕榈酰化修饰蛋白, 并对富集蛋白进行质谱定量分析, 从而筛选、鉴定棕榈酰化修饰水平受雄激素诱导的蛋白。结果发现, 雄激素在LNCaP细胞内促进核糖体蛋白RPL12、RPS4X和谷氨酰脯氨酰-tRNA合成酶(EPRS)棕榈酰化修饰, 在细胞上清中促进甘氨酸-tRNA合成酶(GARS)棕榈酰化修饰。对RPL12、RPS4X和EPRS棕榈酰化调控机制的研究将为前列腺癌的治疗提供新的指导思路; 雄激素诱导下细胞内RPL12、RPS4X和EPRS棕榈酰化修饰水平的升高可以作为相关的肿瘤标志物, 细胞上清中GARS棕榈酰化修饰水平的升高对于前列腺癌的早期筛查具有重要的参考价值。

关键词 前列腺癌; 雄激素; 棕榈酰化

Androgen Regulates Palmitoylation of Ribosomal Proteins and Aminoacyl-tRNA Synthetases in the Prostate Cancer-Derived LNCaP Cells

Li Wenqing¹, Zhang Wei², Cui Luwei³, Diao Tongxiang³, Zhang Dalei³, Zhang Yaquin³, Xiao Fei¹, Liu Ming^{3*}

¹The MOH Key Laboratory of Geriatrics, Beijing Hospital, National Center of Gerontology, Beijing 100730, China;

²Department of Pathology, Beijing Hospital, Beijing 100730, China; ³Department of Urology, Beijing Hospital, Beijing 100730, China)

Abstract Firstly, the LNCaP cells were treated with androgen (R1881) or DMSO and meanwhile the cells were metabolically labeled with Alk-C16, an alkyne analogue of palmitic acid. Secondly, the proteins conjugated with Alk-C16 were enriched in azide agarose beads based on the alkyne-azide reaction (click chemistry). At last, the conjugated proteins were digested for mass spectrum (MS) and label-free quantitation. By comparing the protein palmitoylation levels between androgen-treated LNCaP cells and the non-treated, the proteins of which the palmitoylation levels were induced by androgen were screened and identified. The results demonstrated that androgen treatment significantly increased the palmitoylation levels of ribosomal protein RPL12, RPS4X and glutamyl-prolyl-tRNA synthetase (EPRS). In addition, androgen treatment also increased the palmitoylation levels of glycyl-tRNA synthetase (GARS) in cell supernatant. The regulation of the palmitoylation for RPL12, RPS4X and EPRS might provide new directions for the therapy of prostate cancer. Moreover, the high palmitoylation level of RPL12, RPS4X and EPRS induced by androgen may be tumor biomarkers. The high palmitoylation level of GARS induced

收稿日期: 2018-07-05 接受日期: 2018-08-13

十三五国家重点研发计划(批准号: 2017YFC840102)、中央保健局课题(批准号: W2016ZD01)和首都临床特色应用研究专项(批准号: Z171100001017201)资助的课题

*通讯作者。Tel: 010-85136272, E-mail: liuming3222@bjhmoh.cn

Received: July 5, 2018 Accepted: August 13, 2018

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (Grant No.2017YFC840102), the Key Research Program for Health Care in China (Grant No.W2016ZD01) and Capital Clinical Characteristics Applications Research Program (Grant No.Z171100001017201)

*Corresponding author. Tel: +86-10-85136272, E-mail: liuming3222@bjhmoh.cn

网络出版时间: 2018-09-30 14:41:03 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180930.1440.002.html>

by androgen in supernatant might be a biomarker for tumor early screening.

Keywords prostate cancer; androgen; palmitoylation

前列腺癌是男性生殖系统最常见的恶性肿瘤。在世界范围内男性癌症死亡率排名中,前列腺癌的死亡率仅次于肺癌,位居第二^[1]。前列腺癌在欧洲、北美以及澳大利亚、新西兰等国家发病率较高。其中,澳大利亚和新西兰发病率最高,约为86.4/10万人^[1]。前列腺癌以中老年患者居多,随着年龄的增长发病率不断升高。近年来,我国前列腺癌的发病率也不断上升,2012年我国肿瘤登记区前列腺癌的发病率已达9.92/10万人。目前,我国前列腺癌的早期筛查工作并不到位,据2008~2013年统计新诊断的前列腺癌患者中,局部进展性和转移性达58%,远高于发达国家^[2]。前列腺癌的发生、发展与雄激素受体信号通路的持续激活密切相关。早期和中期患者以手术和放疗为主^[3],对于雄激素敏感型晚期患者治疗方法以去势和/或抗雄激素治疗为主^[4]。但经过治疗后,几乎所有患者最终都发展为去势抵抗性前列腺癌,即在雄激素被抑制的情况下雄激素受体信号通路仍然被激活。目前针对去势抵抗治疗的药物有很多,但预后较差,原因在于其治病机理的研究仅仅围绕雄激素受体本身进行^[5],而雄激素受体耐药性进化非常迅速,并且个体之间差异很大。因此,发现晚、预后差是我国前列腺癌诊疗面临的重要问题。在本文中,我们致力于寻找受体以外的雄激素受体信号通路的调控因子和/或响应因子,从而为前列腺癌的早期筛查和/或诊疗提供新的指导方向。

蛋白质翻译后修饰有许多种,比较常见的有泛素化、磷酸化、糖基化等。由于受研究手段的限制,人们对于脂肪酸修饰的关注相对较少。蛋白质棕榈酰化修饰是16个碳的饱和脂肪酸修饰,该修饰通过共价键将脂肪酸连接到目的蛋白氨基酸残基上,从而增强蛋白的疏水性,促进蛋白与蛋白、蛋白与细胞膜组分间的互作^[6]。该修饰与人类生理和病理过程密切相关^[7]。

在过去的十年里,研究人员以人工合成的炔基棕榈酸作探针针对细胞进行代谢标记,利用点击化学反应(click reaction)并结合蛋白质谱分析发现了许多新的棕榈酰化修饰蛋白^[8]。同时,研究人员利用定量蛋白质组学分析方法,比较不同生理或病理条件下蛋白质棕榈酰化修饰的变化情况^[9-10]。在本研究

中,我们利用以上方法分析在前列腺癌细胞LNCaP中加入雄激素R1881后蛋白棕榈酰化修饰的变化情况,希望发现雄激素诱导后棕榈酰化修饰增强的蛋白。对该类蛋白棕榈酰化调控机制的研究将为前列腺癌的治疗提供新的指导思路。另外,在雄激素诱导下棕榈酰化修饰明显增强的蛋白,其修饰水平的变化可以作为肿瘤标志物,对于前列腺癌的早期筛查具有重要的参考价值。

1 材料与方法

1.1 材料

人前列腺癌细胞株LNCaP购买于ATCC。LNCaP细胞培养基为RPMI-1640,内含10%胎牛血清,培养环境为37℃、5.0% CO₂及饱和湿度的培养箱。

1.2 抗体、试剂与仪器

抗体有: Rabbit anti-GARS购自Protein Tech公司,效价1:2 000; Goat anti-Rabbit IgG-HRP购自北京康为世纪生物科技有限公司,效价1:5 000。

试剂有: Protein A/G UltraLink Resin购自Thermo公司; 叠氮化物琼脂糖珠(azide-agarose beads)购自Nanocs公司; Thiopropyl sepharose 6B、羟胺(hydroxylamine, HAM)、N-乙基马来酰亚胺(Nethylmaleimide)、蛋白酶抑制剂cocktail、三(2-羧乙基)膦盐酸盐[Tris (2-carboxy-ethyl) phosphine hydrochloride, TCEP]和三[(1-苄基-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲基]胺{Tris [(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl) methyl] amine, TBTA}购自Sigma公司; 美曲勃龙(R1881)购自上海源叶生物科技有限公司; 细胞培养基RPMI-1640购自Gibco公司; 胎牛血清购自Hyclone公司; 其他试剂均为国产分析纯。

仪器有: Forma Steri-Cycle CO₂细胞培养箱、液相色谱仪Easy nLC1000和质谱仪LTQ-Orbitrap-Elite,均购自Thermo公司。

1.3 蛋白S-棕榈酰化修饰检测方法

在进行棕榈酰化修饰检测之前, LNCaP细胞需要在6 cm培养皿中培养48 h, 细胞起始密度为1×10⁵个/mL, 每皿4 mL, 共培养4皿。之后, 其中2皿加入雄激素R1881(10 nmol/L), 另外2皿加入等体积二甲基亚砜(DMSO)作为阴性对照。处理期间培养基为RPMI-1640外加0.2%胎牛血清, 每皿细胞加入4 mL

培养基。处理24 h后分别收集4皿细胞上清, 进行棕榈酰化修饰检测。蛋白S-棕榈酰化修饰检测方法参考He等^[11]的文章, 并根据实验目的稍作修改, 具体步骤如下。首先, 取1 mL细胞上清加入protein A/G resin、anti-GARS抗体、50 mmol/L N-乙基马来酰亚胺以及蛋白酶抑制剂cocktail, 4 °C旋转混合仪中过夜反应, 使细胞上清中的GARS蛋白通过免疫共沉淀富集到protein A/G resin上。第2天利用蛋白裂解液(10 mmol/L磷酸氢二钠, 2 mmol/L乙二醇四乙酸二钠, 0.32 mol/L蔗糖和1% Triton X-100, pH7.4)将富集GARS蛋白的protein A/G resin清洗5次。之后, protein A/G resin中加入50 μ L洗脱液(10 mmol/L磷酸氢二钠, 2 mmol/L乙二醇四乙酸二钠, 0.32 mol/L蔗糖和1% SDS), 50 °C反应5 min, 将富集的GARS蛋白洗脱下来。将protein A/G resin洗脱液混合液以12 000 r/min离心5 min, 取上清进行后续实验, 同时取5 μ L上清作为input。DMSO处理组或R1881处理组2个样品分别加入950 μ L 1 mol/L羟胺(pH7.4)和1 mol/L Tris-HCl(pH7.4)(阴性对照), 并加入thiopropyl sepharose 6B, 旋转混合仪中室温反应2 h, 富集含有游离巯基的蛋白。最后用洗脱液(10 mmol/L磷酸氢二钠, 2 mmol/L乙二醇四乙酸二钠, 0.32 mol/L蔗糖, 500 mmol/L氯化钠, 1% Triton X-100和0.2% SDS)将thiopropyl sepharose 6B于4 °C清洗3次, 每次10 min。之后加入上样缓冲液, 95 °C变性5 min, SDS-PAGE电泳, 利用anti-GARS作蛋白免疫印记检测GARS表达。

1.4 炔基棕榈酸合成、代谢标记以及点击化学反应

本研究中, 需要在细胞培养过程中加入人工合成的棕榈酸相似物作为探针, 对细胞进行代谢标记。棕榈酸相似物有两种——炔基棕榈酸和叠氮化物棕榈酸。本研究中, 选择合成炔基棕榈酸(Alk-C16)作为探针。在Alk-C16中, 炔基基团位于碳链的 ω 位置。末端炔基的合成是利用炔异构化反应, 将内部炔在强碱作用下经由丙二烯中间体, 最终异构得到末端炔烃。之后通过琼斯氧化反应, 以乙醇为原材料, 逐步合成饱和脂肪酸链^[12]。

在进行代谢标记之前, LNCaP细胞需要在6 cm培养皿中培养48 h, 细胞起始密度为 1×10^5 个/mL, 每皿4 mL。代谢标记与点击化学反应方法主要参考Hannoush等^[12]的方法, 并稍作修改。炔基棕榈酸相似物Alk-C16溶解于DMSO中, 配置50 mmol/L母液并于-80 °C长期保存。使用之前将Alk-C16溶解于

含有5% BSA的RPMI-1640培养基中, 配置100 μ mol/L工作液。将以上工作液室温反应15 min后平均分为两份, 一份加入R1881(10 nmol/L), 另一份加入等体积DMSO(阴性对照), 充分混匀后分别加入相应的细胞中, 每皿细胞加入4 mL混合液。细胞在37 °C、5% CO₂的条件下培养24 h, 收集细胞, 加入500 μ L裂解液(1% Nonidet P-40, 150 mmol/L氯化钠, 蛋白酶抑制剂Cocktail, 100 mmol/L磷酸氢二钠, pH7.5), 4 °C裂解30 min。之后, 12 000 r/min离心10 min。取上清, 加入点击化学反应液, 于旋转混合仪中室温反应1 h。点击化学反应液包含: 1 mmol/L叠氮化物琼脂糖珠, 1 mmol/L TCEP(溶于水), 0.2 mmol/L TBTA[溶于DMSO/叔丁醇(20%/80%)], 1 mmol/L硫酸铜(溶于PBS)。以上四种试剂需按以上顺序加入。伴随点击化学反应, 标记有Alk-C16的蛋白能够富集到叠氮化物琼脂糖珠上。富集蛋白的琼脂糖珠用蛋白裂解液于室温旋转混合仪中洗3次, 每次10 min。之后在琼脂糖珠上进行蛋白酶解, 为下一步质谱分析作准备。

1.5 蛋白质谱分析及数据处理

采用液相色谱Easy nLC1000结合LTQ-Orbitrap-Elite质谱仪, 液相色谱-质谱分析方法参考Liu等^[13]的文章。

对获得的MS质谱数据利用MaxQuant软件进行分析(软件版本1.5.5.1)。对MS/MS峰图列表文件利用UniProtKB/Swiss-Prot人类数据库进行正向和反向搜索(数据库版本2017_05)。针对肽段和蛋白鉴定的错误发现率上限(FDR)设为0.01, ≥ 7 个氨基酸残基的肽段可用于鉴定蛋白。MaxQuant软件通过对razor肽段和特异肽段进行非标记定量(LFQ), 从而对目的蛋白进行定量^[13]。利用DAVID 6.8软件对所鉴定蛋白进行基因本体分析(Gene Ontology), 从而对蛋白进行功能分类。

目的蛋白丰度首先利用LFQ归一化, 之后利用Log2转换作进一步分析。Perseus软件(版本1.5.5.3)用于进行统计学分析, 包括Log2转换、统计学t检验等^[13]。 $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 基于炔基棕榈酸探针代谢标记的蛋白质组分析

本研究中, 我们在LNCaP细胞培养过程中加入炔基棕榈酸探针(Alk-C16)进行蛋白代谢标记, 并通过点击化学反应将标记有Alk-C16的蛋白富集, 从而进行质谱分析。具体步骤见1.4, 反应原理如图1所示。

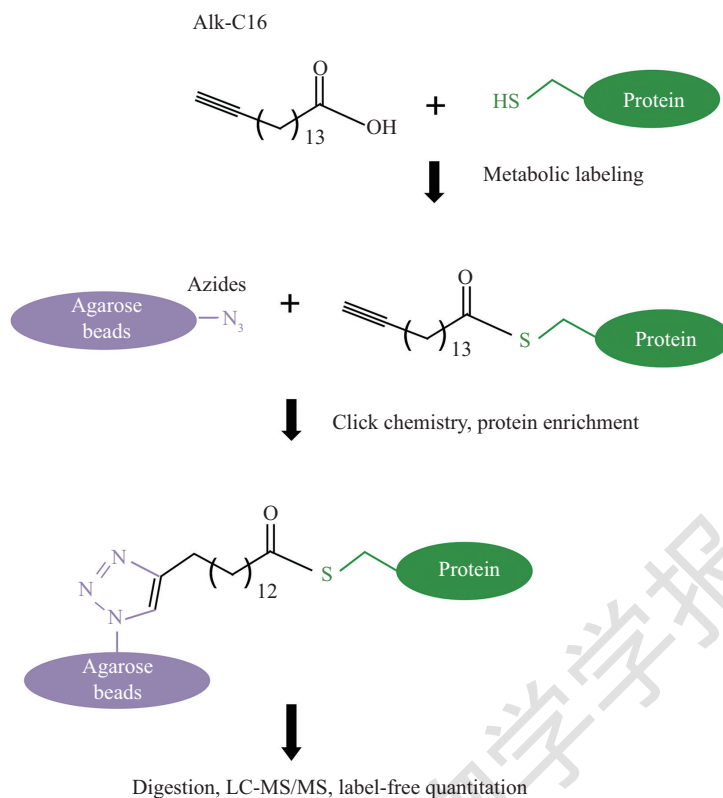


图1 棕榈酸探针细胞代谢标记以及点击化学反应示意图

Fig.1 A schematic overview of Alk-C16 metabolic labeling and click chemistry reaction

2.2 部分核糖体蛋白和氨酰-tRNA合成酶蛋白发生棕榈酰化修饰

本研究中, 我们通过蛋白质谱定量分析, 比较在前列腺癌LNCaP细胞中雄激素R1881诱导后蛋白质组棕榈酰化修饰的变化情况, 从中筛选出受雄激素调控的棕榈酰化修饰蛋白。该实验做了3次生物学重复, 我们利用MaxQuant软件针对特异肽段鉴定相关蛋白, 并进行非标记定量分析(label-free quantitation, LFQ)。蛋白LFQ活性水平与蛋白棕榈酰化修饰水平呈正相关。如果一个蛋白的LFQ活性为0, 代表该蛋白没有棕榈酰化修饰。在鉴定出的蛋白中, 有504个蛋白在未处理的LNCaP细胞中LFQ活性至少有2次不为0。这些蛋白初步确定为发生棕榈酰化修饰的蛋白。在这些蛋白中, 除了微管蛋白(alpha-tubulin、beta-tubulin)、脂肪酸合酶(fatty acid synthase)、 δ 链接素(catenin delta-1)和细胞色素b-c1复合体亚基1(cytochrome b-c1 complex subunit 1)等已有文献证明存在棕榈酰化修饰外^[14-15], 还发现部分参与蛋白质从头合成的蛋白, 主要包括核糖体蛋白(ribosomal protein, RP)和氨酰-tRNA合成酶蛋白。在真核细胞中, 核糖体蛋白包括60S大亚基和40S小

亚基两部分。大亚基有45~50种蛋白组成, 小亚基有30种蛋白。在本研究中, 我们通过蛋白质谱分析发现, 大亚基中RPL1D1、3、4、5、7、7A、8、9、11、12、13、15、17、18、18A、22L1、23A、24、28、32、35和37A存在棕榈酰化修饰; 小亚基中RPSA、2、3、3A、4X、6、8、9、11、13、20、24和25存在棕榈酰化修饰。氨酰-tRNA合成酶有20种, 本研究中, 我们发现, 甘氨酸-tRNA合成酶(GARS)、丙氨酸-tRNA合成酶(AARS)、谷氨酰脯氨酰-tRNA合成酶(EPRS)、精氨酸-tRNA合成酶(RARS)、天冬氨酸-tRNA合成酶(DARS)和缬氨酸-tRNA合成酶(VARS)存在棕榈酰化修饰。利用Swiss Palm软件对以上蛋白进行比对, 结果发现, 14个蛋白在已有的棕榈酰化蛋白数据库中存在, 包括60S核糖体蛋白RPL3、RPL4、RPL7A、RPL8、RPL12、RPL23A、RPL37A, 40S核糖体蛋白RPS3、RPS11、RPS20、RPS25以及RARS、EPRS和AARS(表1)。

2.3 筛选棕榈酰化修饰水平受雄激素诱导的核糖体蛋白和氨酰-tRNA合成酶蛋白

如上文所述, 通过比较雄激素处理和未处理的前列腺癌LNCaP细胞中蛋白棕榈酰化修饰水平的

表1 Swiss Palm分析核糖体蛋白和氨酰-tRNA合成酶蛋白棕榈酰化修饰情况

Table 1 The palmitoylation of ribosomal proteins and aminoacyl-tRNA synthetases was analyzed by Swiss Palm

UniProt序列号 UniProt ID	基因名称 Gene name	蛋白功能 Protein function	蛋白质组数量(A) Number of proteome (A)	蛋白质组类型(B) Category of proteome (B)
P39023	<i>RPL3</i>	60S ribosomal protein L3	7	Chemical modification, metabolic labeling
C9J4Z3	<i>RPL37A</i>	60S ribosomal protein L37A	2	Metabolic labeling
P62280	<i>RPS11</i>	40S ribosomal protein S11	8	Chemical modification, metabolic labeling
P30050	<i>RPL12</i>	60S ribosomal protein L12	7	Chemical modification, metabolic labeling
P23396	<i>RPS3</i>	40S ribosomal protein S3	4	Chemical modification, metabolic labeling
P62424	<i>RPL7A</i>	60S ribosomal protein L7A	3	Chemical modification, metabolic labeling
P36578	<i>RPL4</i>	60S ribosomal protein L4	4	Chemical modification, metabolic labeling
P62851	<i>RPS25</i>	40S ribosomal protein S25	2	Metabolic labeling
P54136	<i>RARS</i>	Arginine-tRNA synthetase	3	Metabolic labeling
P60866	<i>RPS20</i>	40S ribosomal protein S20	5	Chemical modification, metabolic labeling
P62917	<i>RPL8</i>	60S ribosomal protein L8	4	Chemical modification, metabolic labeling
P62750	<i>RPL23A</i>	60S ribosomal protein L23	1	Metabolic labeling
P07814	<i>EPRS</i>	Bifunctional glutamate/proline-tRNA synthetase	4	Chemical modification, metabolic labeling
P49588	<i>AARS</i>	Alanyl-tRNA synthetase	3	Chemical modification, metabolic labeling

A: 指能够检测到目的蛋白的棕榈酰化修饰蛋白质组数量; B: 指能够检测到目的蛋白的棕榈酰化修饰蛋白质组的类型。
A: represents the number of palmitoyl-proteome in which target proteins are searched; B: represents the category of palmitoyl-proteome in which target proteins are searched.

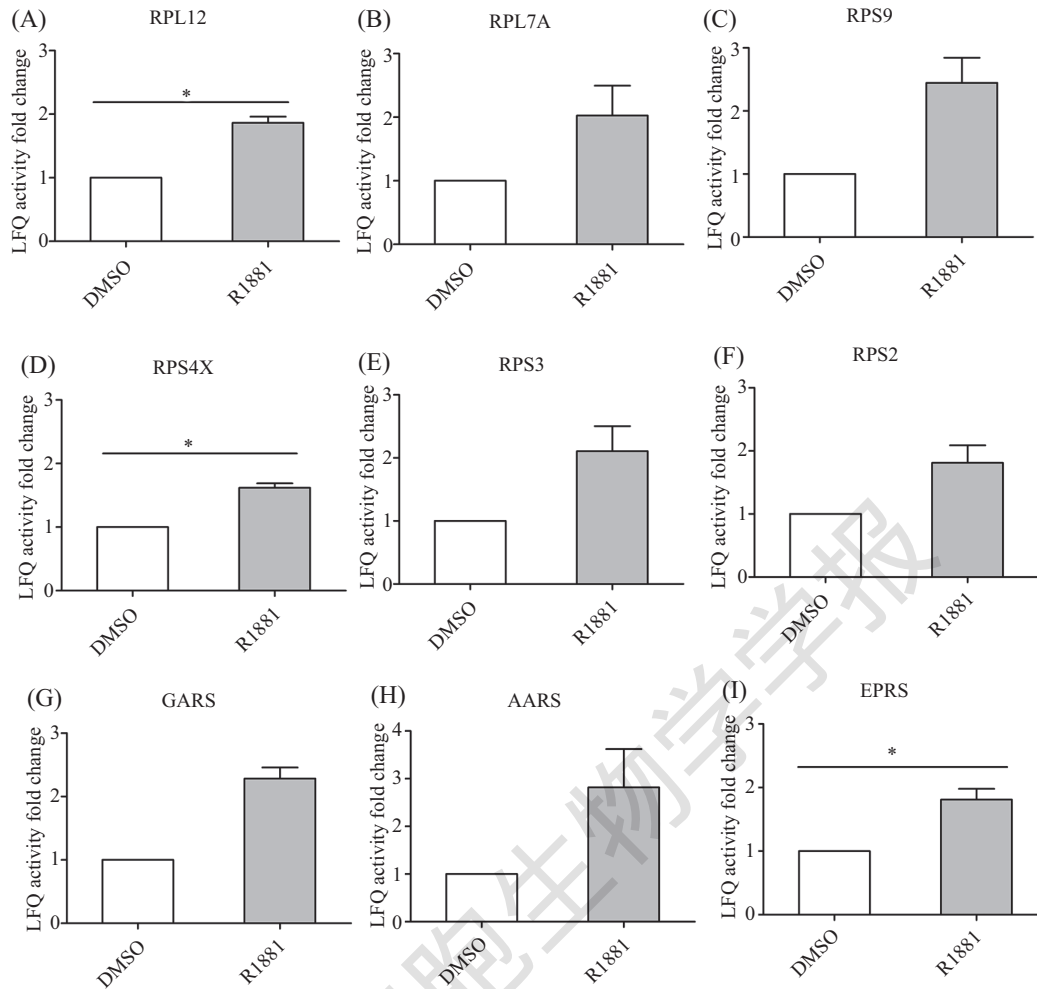
差异, 从中筛选棕榈酰化修饰水平受雄激素诱导的蛋白。在35个核糖体蛋白和6个氨酰-tRNA合成酶蛋白中, 如果雄激素处理和未处理条件下蛋白LFQ比值在3次重复实验中至少有2次结果大于1.5, 该蛋白为候选蛋白。结果发现, 核糖体蛋白中RPL7A、RPL12、RPS2、RPS3、RPS4X和RPS9为候选蛋白(图2A~图2F), 氨酰-tRNA合成酶中甘氨酸-tRNA合成酶(GARS)、丙氨酸-tRNA合成酶(AARS)和谷氨酰脯氨酸-tRNA合成酶(EPRS)为候选蛋白(图2G~图2I)。但在该候选蛋白中, 只有RPL12、RPS4X和EPRS LFQ比值的升高具有统计学意义(图2A、图2D和图

2I)($P<0.05$)。因此, 我们通过蛋白质组定量实验发现, 在前列腺癌LNCaP细胞中雄激素处理能够增强RPL12、RPS4X和EPRS棕榈酰化修饰水平。

另外, 值得注意的是, 虽然质谱分析显示, 甘氨酸-tRNA合成酶(GARS)棕榈酰化修饰水平的升高没有统计学意义, 但我们在细胞上清中通过羟胺还原的方法检测到R1881处理能够明显增强GARS棕榈酰化修饰水平(图3)。

3 讨论

利用炔基棕榈酸探针(Alk-C16)能够发现新的

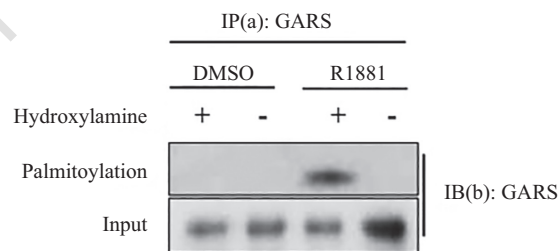


A~F: 核糖体蛋白; G~I: 氨酰-tRNA合成酶蛋白。P值分析采用Two-tailed Student's *t*检验, **P*<0.05。

A~F: ribosomal proteins; G~I: aminoacyl-tRNA synthetases. The *P* values were analyzed using Two-tailed Student's *t* distribution function, **P*<0.05.

图2 在前列腺癌细胞中雄激素处理对部分核糖体蛋白和氨酰-tRNA合成酶蛋白棕榈酰化修饰的调控

Fig.2 The regulation of androgen on the palmitoylation levels of ribosomal proteins and aminoacyl-tRNA synthetases in LNCaP cells



(a): 免疫共沉淀; (b): 免疫印记。

(a): immunoprecipitation; (b): immunoblotting.

图3 雄激素增强细胞上清GARS棕榈酰化修饰水平

Fig.3 Androgen increased the palmitoylation level of GARS in the supernatant of LNCaP cells

棕榈酰化修饰蛋白, 能够研究棕榈酰化修饰蛋白亚细胞定位的变化。最重要的是, 该探针能够对活细胞进行代谢标记, 结合蛋白质组定量分析, 有助于比较特定条件下(例如某些基因过表达或敲低、相关

药物处理等)蛋白棕榈酰化修饰的变化情况, 从而探索目的基因或药物相关的作用机制。

在本研究中, 通过比较雄激素处理和未处理的前列腺癌细胞中蛋白棕榈酰化修饰变化情况, 我

们发现,核糖体蛋白RPL12、RPS4X和谷氨酰脯氨酰-tRNA合成酶(EPRS)在雄激素R1881处理后蛋白棕榈酰化修饰水平明显增强。

在真核细胞中,核糖体蛋白主要参与蛋白从头合成,合成场所可以在细胞质中,也可以在糙面内质网上。由于核糖体蛋白本身没有跨膜结构域,而棕榈酰化修饰能够促进目的蛋白的疏水性,增强蛋白与细胞膜组分的亲和力,因此,核糖体蛋白棕榈酰化修饰应该与其内质网定位密切相关。研究表明,游离核糖体在信号识别颗粒(SRP)的引导下与内质网上的嵌入蛋白结合,之后SRP解离,核糖体重新开始蛋白合成,当合成结束后,随着肽链从核糖体脱下,核糖体大小亚基离开内质网^[16]。我们推测,在SRP解离后,核糖体蛋白通过棕榈酰化修饰锚定在内质网上,辅助其与嵌入蛋白结合,而当蛋白合成结束后,通过去棕榈酰化反应,核糖体大小亚基与膜亲和力减弱,从内质网上脱离。可以理解为,棕榈酰化修饰能够精确调控核糖体在内质网上进行蛋白合成的过程。在本研究中,我们发现,雄激素能够促进核糖体大亚基蛋白RPL12和小亚基蛋白RPS4X的棕榈酰化修饰,该过程可能促进核糖体在内质网上持续合成某一类蛋白,从而导致前列腺癌的发生。如果能够找到RPL12和RPS4X对应的棕榈酰化转移酶,通过RNA干扰抑制该酶的表达,RPL12和RPS4X棕榈酰化修饰将受到抑制,从而缓解前列腺癌的发生、发展。

另外,值得注意的是,R1881处理LNCaP细胞后,甘氨酰-tRNA合成酶(GARS)棕榈酰化修饰在胞外显著升高。该结果为前列腺癌的早期筛查提供了新的指导思路。在未来的实验中,我们可以尝试比较在前列腺癌患者和正常人群的尿液中GARS棕榈酰化修饰的差异,并结合其他检测指标与病理学分析,为前列腺癌的早期筛查提供新的参考数据。

综上所述,雄激素处理前列腺癌LNCaP细胞能够促进胞内核糖体蛋白RPL12和RPS4X棕榈酰化修饰,该修饰相关的棕榈酰化转移酶将是雄激素受体信号通路重要的调控因子,该调控机制将为前列腺癌的诊疗提供新的指导方向。RPL12、RPS4X和EPRS棕榈酰化修饰水平在雄激素诱导下显著增强,该结果可以作为相关的肿瘤标志物。雄激素能够促进细胞上清中GARS棕榈酰化修饰水平,该结果对于前列腺癌的早期筛查具有重要的参考价值。

参考文献 (References)

- 1 Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018; doi: 10.3322/caac.21492.
- 2 陈锐, 谢立平, 周利群, 黄翼然, 傅强, 贺大林, 等. 中国前列腺癌联盟成员医院前列腺穿刺活检现状的调查报告. *中华泌尿外科杂志*(Chen Rui, Xie Liping, Zhou Liqun, Huang Yiran, Fu Qiang, He Dalin, *et al.* Current status of prostate biopsy in Chinese Prostate Cancer Consortium member hospitals. *Chin J Urol* 2015; 36(5): 342-5.
- 3 Klein EA, Ciezki J, Kupelian PA, Mahadevan A. Outcomes for intermediate risk prostate cancer: are there advantages for surgery, external radiation, or brachytherapy? *Urol Oncol* 2009; 27(1): 67-71.
- 4 Loblaw DA, Virgo KS, Nam R, Somerfield MR, Ben-Josef E, Mendelson DS, *et al.* Initial hormonal management of androgen-sensitive metastatic, recurrent, or progressive prostate cancer: 2006 update of an American Society of Clinical Oncology practice guideline. *J Clin Oncol* 2007; 25(12): 1596-605.
- 5 Tilki D, Schaeffer EM, Evans CP. Understanding mechanisms of resistance in metastatic castration-resistant prostate cancer: the role of the androgen receptor. *Eur Urol Focus* 2016; 2(5): 499-505.
- 6 Aicart-Ramos C, Valero RA, Rodriguez-Crespo I. Protein palmitoylation and subcellular trafficking. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1808(12): 2981-94.
- 7 Yeste-Velasco M, Linder ME, Lu YJ. Protein S-palmitoylation and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1856(1): 107-20.
- 8 Hannoush RN, Sun J. The chemical toolbox for monitoring protein fatty acylation and prenylation. *Nat Chem Biol* 2010; 6(7): 498-506.
- 9 Hernandez JL, Davda D, Majmudar JD, Won SJ, Prakash A, Choi AI, *et al.* Correlated S-palmitoylation profiling of Snail-induced epithelial to mesenchymal transition. *Mol Biosyst* 2016; 12(6): 1799-808.
- 10 Greaves J, Munro KR, Davidson SC, Riviere M, Wojno J, Smith TK, *et al.* Molecular basis of fatty acid selectivity in the zDHHC family of S-acyltransferases revealed by click chemistry. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017; 114(8): E1365-e74.
- 11 He M, Jenkins P, Bennett V. Cysteine 70 of ankyrin-G is S-palmitoylated and is required for function of ankyrin-G in membrane domain assembly. *J Biol Chem* 2012; 287(52): 43995-4005.
- 12 Hannoush RN, Arenas-Ramirez N. Imaging the lipidome: omega-alkynyl fatty acids for detection and cellular visualization of lipid-modified proteins. *ACS Chem Biol* 2009; 4(7): 581-7.
- 13 Liu NQ, Braakman RB, Stingl C, Luider TM, Martens JW, Foekens JA, *et al.* Proteomics pipeline for biomarker discovery of laser capture microdissected breast cancer tissue. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2012; 17(2): 155-64.
- 14 Caron JM. Posttranslational modification of tubulin by palmitoylation: I. *in vivo* and cell-free studies. *Mol Biol Cell* 1997; 8(4): 621-36.
- 15 Shen LF, Chen YJ. Role of S-palmitoylation by ZDHHC13 in mitochondrial function and metabolism in liver. *Sci Rep* 2017; 7(1): 2182.
- 16 陈誉华. 医学细胞生物学. 北京: 人民卫生出版社(Chen Yuhua. *Medical Cell Biology*. Beijing: People's Medical Publishing House) 2013, 107.