

ZDHHC20 对 m5C 阅读器 YBX1 的棕榈酰化修饰通过调节 mRNA m5C 甲基化促进结直肠癌进展

罗城¹, 蒙长远², 夏术森², 黄珊³, 彭洪³

(1. 遂宁市中医院普外科, 四川 遂宁 629000; 2. 川北医学院附属医院胃肠外科; 3. 南充市中心医院肛肠外科, 四川 南充 637000)

【摘要】目的: 探讨棕榈酰基转移酶 20 (ZDHHC20) 通过棕榈酰化修饰调节 5-甲基胞嘧啶 (m5C) 阅读器 Y-框结合蛋白 1 (YBX1) 蛋白稳定性, 并提高 mRNA m5C 修饰水平参与结直肠癌 (CRC) 发生发展的分子机制。**方法:** 通过生物信息学方法分析 ZDHHC20 mRNA 和蛋白在 CRC 组织中的表达及 ZDHHC20 表达水平与 CRC 患者临床病理特征的关系。通过 RT-qPCR 检测 CRC 细胞中 ZDHHC20 的表达水平。CCK-8 检测 ZDHHC20 对 CRC 细胞增殖的影响, Transwell 实验用于检测 ZDHHC20 对细胞侵袭的影响。通过生物信息学数据库分析 ZDHHC20 与 YBX1 的相关性及 YBX1 蛋白的棕榈酰化修饰位点。酰基生物素交换法 (ABE) 富集棕榈酰化蛋白, Western blot 实验检测 CRC 细胞中 YBX1 的棕榈酰化修饰。过表达 ZDHHC20 检测 YBX1 的棕榈酰化修饰水平, 并用 Western blot 实验检测 2-BP 和放线菌酮处理后 YBX1 蛋白的稳定性, CCK-8 和 Transwell 法检测 YBX1 对 CRC 细胞增殖和迁移的影响, LC-MS 法检测 YBX1 对 CRC 细胞中 m5C 修饰水平的影响。**结果:** ZDHHC20 mRNA 和蛋白在 CRC 组织和细胞中高表达 ($P < 0.05$), 且 ZDHHC20 的表达与年龄、肿瘤分期和淋巴结转移相关 ($P < 0.05$)。过表达 ZDHHC20 可促进 CRC 细胞增殖和侵袭 ($P < 0.05$)。ZDHHC20 与 YBX1 表达水平正相关 ($P < 0.05$), 且 YBX1 上存在多个潜在棕榈酰化修饰位点。YBX1 是棕榈酰化修饰蛋白, ZDHHC20 可提高 YBX1 蛋白棕榈酰化修饰水平及 YBX1 蛋白稳定性 ($P < 0.05$)。YBX1 可促进 CRC 细胞增殖和侵袭, 并提高 CRC 细胞的 m5C 修饰水平 ($P < 0.05$)。**结论:** ZDHHC20 可通过棕榈酰化修饰增强 YBX1 蛋白稳定性, 提高 mRNA m5C 修饰水平并促进 CRC 细胞增殖和侵袭。

【关键词】 结直肠癌; 5-甲基胞嘧啶; Y-框结合蛋白 1; 棕榈酰基转移酶 20; 增殖; 侵袭

【中图分类号】 R735.34 **【文献标志码】** A

Palmitoylation of m5C reader YBX1 by ZDHHC20 promotes colorectal cancer progression through regulating mRNA m5C methylation

LUO Cheng¹, MENG Chang-yuan², XIA Shu-sen², HUANG Shan³, PENG Hong³

(1. Department of General Surgery Suining Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Suining 629000; 2. Department of Gastrointestinal Surgery Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College; 3. Department of Anorectal Surgery Nanchong Central Hospital, Nanchong 637000, Sichuan, China)

【Abstract】 Objective: To explore the molecular mechanism that palmitoyl acyltransferase 20 (ZDHHC20) participates in the pathogenesis of colorectal cancer (CRC) through Palmitoylation modification to regulate 5-methylcytosine (m5C) reader Y-box binding protein1 (YBX1) protein stability, and improve mRNA m5C modification level. **Methods:** The expression of ZDHHC20 mRNA and protein in CRC was analyzed by bioinformatics. Further analysis of the association among ZDHHC20 expression levels and the clinicopathological features of CRC patients was performed. The expression level of ZDHHC20 in CRC cells was verified using RT-qPCR. A CCK-8 assay was used to detect the effect of ZDHHC20 on the proliferation of CRC cells. Transwell was used for cell invasion assays. The relationship between the expression of ZDHHC20 and YBX1 in CRC and the palmitoylation site of YBX1 was investigated by bioinformatics database analysis. Palmitoylation protein was enriched by ABE method and Westernblot experiment was used to detect YBX1 palmitoylation modification in CRC. Overexpression of ZDHHC20 was used to detect the palmitoylation modification level of YBX1. The Western blot was used to measure the stability of YBX1 protein under 2-BP and actinomycin. The influence of YBX1 on the proliferation and migration of CRC cells was measured by CCK-8 and Transwell. LC-MS was used to analyze the impact of YBX1 on m5C modification level

基金项目: 四川省医学青年创新项目 (Q22049); 四川省南充市市级科技研发计划项目 (23JCYJP0066, 23JCYJP0064); 川北医学院校级项目 (CBY23-QNA07)

作者简介: 罗城 (1980 -), 男, 副主任医师。E-mail: 2730019558@qq.com

通讯作者: 彭洪, 博士。E-mail: 1041910523@qq.com

in CRC cells. **Results:** An upregulation of ZDHHC20 mRNA and protein were observed in the sample CRC cells and tissues ($P < 0.05$). ZDHHC20 expression was correlated with age, tumor stage and lymph node metastasis ($P < 0.05$). Overexpression of ZDHHC20 contributes to proliferation and invasion in CRC cells ($P < 0.05$). The expression between ZDHHC20 and YBX1 were positively correlated ($P < 0.05$), and YBX1 had multiple palmitoylation modification site. YBX1 was a palmitoylated protein and ZDHHC20 could increase YBX1 palmitoylation modification level and improve the stability of YBX1 protein ($P < 0.05$). YBX1 could enhance CRC cell proliferation and invasion. Also YBX1 could improve m5C modification level in CRC ($P < 0.05$). **Conclusion:** ZDHHC20 can improve the stability of YBX1 protein through Palmitoylation modification and mRNA m5C modification level, and enhance CRC cell proliferation and invasion.

[Key words] Colorectal Cancer; 5-methylcytosine; Y-box binding protein1; Palmitoyl acyltransferase 20; Proliferation; Invasion

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是消化系统最常见的恶性肿瘤之一, 其发病率逐年上升。目前结直肠癌是全球第三大最常见的肿瘤, 也是癌症相关死亡的第二大原因, 严重威胁着人们的生命^[1]。近年来, 化疗、放疗和靶向治疗等围手术期辅助治疗的出现和应用, 改善了部分结直肠癌患者的预后^[2]。由于治疗过程中的肿瘤耐药导致许多患者的预后并不理想, 迫切需要寻找新的有效治疗策略。

S-酰化也称为棕榈酰化, 指长链脂肪酸通过称为蛋白质 S-酰化的硫酯键共价连接到半胱氨酸上, 是人类蛋白质最丰富的脂质化形式。由于最常见的 S-酰化形式涉及 C16 或棕榈酸, 蛋白质 S-酰化通常被称为蛋白质棕榈酰化。已知有数千种蛋白质可以被棕榈酰化修饰, 这突出了棕榈酰化在几乎所有细胞生理学领域的重要性^[3]。蛋白质 S-酰化是可逆的, 棕榈酸的添加由蛋白质酰基转移酶催化, 而其去除由酰基蛋白质硫酯酶催化^[4]。属于蛋白质酰基转移酶的 ZDHHC 家族 (包括 ZDHHC1-ZDHHC23) 具有天冬氨酸-组氨酸-组氨酸-半胱氨酸 (DHHC) 基序, 并与多种病理状况如癌症、自身免疫性疾病和神经退行性疾病直接相关^[5]。但是棕榈酰基转移酶 20 (palmitoyl acyltransferase 20, ZDHHC20) 与结直肠癌发生发展的关系尚无报道。

RNA 甲基化是一种转录后修饰, 而 5-甲基胞嘧啶 (5-methylcytosine, m5C) 甲基化是胞嘧啶第五个 N 被添加活性甲基的修饰形式, 其广泛存在于各种 RNA 中, 参与 RNA 的稳定性和翻译效率^[6]。m5C 甲基化的形成过程由甲基转移酶催化, 甲基转移酶也被称为“writers”, 如 NSUN 和 DNMT 家族成员, 并且可以被脱甲基酶 (如 TET 家族) 和结合蛋白 (如 YBX1) 动态调节, 脱甲基酶和结合蛋白分别被称为“Eraser”和“Reader”。越来越多的证据^[7]表明, m5C 调节因子在多种生物学和病理过程中发挥着重要作用, 包括细胞增殖和分化、干细胞命运决定、胚胎发育、肿瘤发生、肿瘤恶性进展和肿瘤免疫。然而 m5C 阅读器 Y-框结合蛋白 1 (Y-box binding protein1, YBX1) 通过 m5C 甲基化调控基因表达在结直肠癌发展中的潜在功能和机制仍不明确, 且 YBX1

蛋白的稳定性是否通过棕榈酰化修饰调节及 ZDHHC20 是否为 YBX1 蛋白的蛋白质酰基转移酶也未见报道。本研究拟探讨 ZDHHC20 通过棕榈酰化修饰 YBX1 蛋白并使其蛋白稳定, YBX1 蛋白表达上调通过 m5C 修饰促进结直肠癌的发生和进展。观察 ZDHHC20 在 CRC 进展中发挥作用的一种新机制, 这可能为 CRC 患者提供新的治疗选择。

1 材料与方法

1.1 材料

SW480 (批号: CBP60019)、SW620 (批号: CBP60036)、DLD1 (批号: CBP60037)、HCT116 (批号: CBP60028) 和人正常结肠粘膜细胞 FHC (批号: CBP61139) 购自南京科佰生物科技有限公司, RPMI 1640 培养基购自 ThermoFisher 公司 (批号: 12633012)。Lipofectamine 3 000 (批号: L3000015) 购自 Invitrogen 公司。RIPA 裂解液购自碧云天 (批号: P0013E), RNA 提取剂 (批号: 15596026) 购自 ThermoFisher 公司。PVDF 膜购自 Merck 公司 (批号: IPFL00010), CCK8 试剂盒购自 Abcam 公司 (批号: ab228554), Transwell 试剂盒购自 Solarbio 公司 (批号: G4740)。

1.2 细胞培养和转染

SW480、SW620、DLD1、HCT116 和 FHC 细胞在含有 10% 胎牛血清的 1640 培养基中进行培养, 培养基中含有 1% 青霉素和链霉素。细胞在 37 °C 含有 5% CO₂ 的细胞培养箱中生长。ZDHHC20 蛋白过表达质粒 Flag-ZDHHC20 和 YBX1 蛋白过表达质粒 Flag-YBX1 由 GenePharma (中国上海) 合成并构建, 按照制造商的说明通过 Lipofectamine 3000 转染到结直肠癌细胞内。

1.3 生物信息学分析

通过 ualcan 数据库 (<https://ualcan.path.uab.edu/index.html>) 和 GEPIA2 数据库 (<http://gepia2.cancer-pku.cn/#index>) 分析 ZDHHC20 基因和蛋白表达水平及与患者临床病理特征的相关性, 及不同基因间的相关性。使用 CSS-Palm 数据库 (<http://csspalm.biocuckoo.org/index.php>) 和 GPS-Palm 数据库 (<http://gpspalm.biocuckoo.cn/>) 预测棕榈酰化修饰位点。

1.4 RT-qPCR

使用 TRIzol 试剂从 CRC 细胞系中提取总 RNA,并根据制造商的说明使用逆转录试剂盒进行逆转录,然后使用 SYBR Green Master mix 通过 RT-qPCR 扩增互补 DNA 以检测 ZDHHC20 表达,使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算相对表达水平。引物序列如下:F:5'-TGGAGCTCTGCGTGTACT-3', R: 5'-GGGAAGCGG GAGATGTGAAA-3'。

1.5 CCK-8

使用细胞计数试剂盒 CCK-8 检测细胞增殖能力。按照制造商的说明,将细胞接种到 96 孔板中 (5 000 个细胞/孔)。然后将处理好的细胞用 CCK-8 试剂处理。使用微孔板读取器测量 450 nm 处的 OD 值。检测 ZDHHC20 对结直肠癌细胞增殖的影响时分为空白对照组,阴性对照组 (转染空质粒 Flag-ZDHHC20) 和 ZDHHC20 过表达组 (转染过表达质粒 Flag-ZDHHC20)。检测 YBX1 对结直肠癌细胞增殖的影响时分为空白对照组,阴性对照组 (转染空质粒 Flag-YBX1) 和 YBX1 过表达组 (转染过表达质粒 Flag-YBX1)。

1.6 Transwell

按照制造商的说明进行 Transwell 实验。预先用 Matrigel 涂覆腔室。然后将 1×10^5 个转染的细胞接种到无血清培养基的上腔中,并将含有 10% FBS 的培养基加入到基底外侧腔中。在培养 36 h 后用 4% 多聚甲醛固定细胞 10 min,并用 0.1% 结晶紫染色 10 min,进行细胞侵袭测定。在显微镜下随机选择的视野中对细胞进行拍照。检测 ZDHHC20 对结直肠癌细胞侵袭的影响时分为空白对照组,阴性对照组 (转染空质粒 Flag-ZDHHC20) 和 ZDHHC20 过表达组 (转染过表达质粒 Flag-ZDHHC20)。检测 YBX1 对结直肠癌细胞侵袭的影响时分为空白对照组,阴性对照组 (转染空质粒 Flag-YBX1) 和 YBX1 过表达组 (转染过表达质粒 Flag-YBX1)。

1.7 Western blot

收获细胞并将其溶解在 RIPA 裂解缓冲液和蛋白酶抑制剂混合物中。将全细胞裂解物进行 SDS-PAGE,并转移到 PVDF 膜上。用脱脂牛奶进行封闭并与特异性一级和二级抗体孵育后对膜上的蛋白进行可视化检测。做蛋白稳定性分析时分为 DMSO 组 (可减少细胞损伤) 和 2-BP 组 (抑制棕榈酰化修饰),处理 48 h 后用 50 μ m 可有效抑制蛋白质合成的放线菌酮 (cycloheximide, CHX) 处理 2、4、6、8 h,并检测 YBX1 蛋白的表达。

1.8 酰基-生物素置换法 (acyl-biotinyl exchange, ABE)

取适量的链霉亲和素琼脂糖糖株对棕榈酰化修饰

蛋白质进行富集。使用含有 0.1% SDS、0.2% Triton X-100 的缓冲液充分洗涤琼脂糖株;用包含 0.2% Triton X-100 和 1 mmol/L PMSF 的缓冲液进行稀释,使其中 SDS 浓度降低至 0.1%,加入平衡好的琼脂糖株,振荡混匀,室温反应 1.5 h,5 000 r/min 离心,弃去上清液。使用含有 0.1% SDS 和 0.2% Triton X-100 的 ABE 缓冲液洗涤琼脂糖株 3 次,ABE 缓冲液洗涤 3 次,最后使用 50 mmol/L NH_4HCO_3 洗涤 3 次。每次洗涤时均在室温反应 5 min,随后以 5 000 r/min 离心,弃去上清液。在琼脂糖株中加入 50 μ L 洗脱液 (50 mmol/L NH_4HCO_3 、25 mmol/L DTT) 洗脱目标蛋白,37 $^\circ\text{C}$ 孵育 30 min,以 5 000 r/min 离心 1 min,收集上清液。加入等体积 50 mmol/L 碘代乙醇胺溶液,振荡混匀,室温避光静置 60 min 后,于 -20 $^\circ\text{C}$ 保存。

1.9 m5C 检测

以总量 200 ng 样品 RNA,孵育高核酸亲和力板上,随后洗涤去除未结合的 RNA 后,向其中加入 m5C 检测复合物溶液,室温下孵育 50 min。孵育结束后,倾倒复合物溶液,并洗涤 3 次。向孔中加入荧光显色溶液,待溶液变红,随即置于荧光分光光度计下检测,在 530 ex/590 em nm 条件下收集荧光信号。以 m5C 标准品绘制标准曲线,计算样品中 m5C 修饰水平。

1.10 统计学分析

所有数据均使用 SPSS 22.0 软件和 GraphPad Prism8 进行分析。计量资料表示为 ($\bar{x} \pm s$),方差齐时,组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 SNK-*q* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ZDHHC20 mRNA 在结肠癌和直肠癌中高表达

通过 GEPIA2 数据库分析 ZDHHC20 在结肠癌和直肠癌组织中的表达。结果表明,与癌旁正常组织相比,ZDHHC20 在结肠癌和直肠癌组织中的表达水平均增高 ($P < 0.05$)。见图 1。

2.2 ZDHHC20 蛋白在结肠癌中高表达

通过 ualcan 数据库分析 ZDHHC20 蛋白在结肠癌组织中的表达。结果表明,与癌旁组织相比,ZDHHC20 蛋白在结肠癌组织中高表达 ($P < 0.05$)。见图 2。

2.3 ZDHHC20 在不同肿瘤分期患者中的表达

进一步分析 ZDHHC20 表达水平与结直肠癌患者病理分期的关系。结果表明,肿瘤分期愈高的结直肠癌患者 ZDHHC20 的表达水平愈高。见图 3。

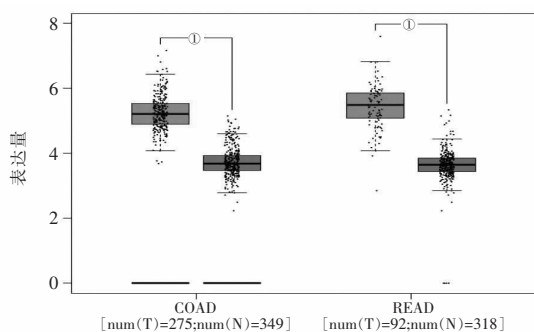


图1 ZDHHC20 在结直肠癌组织中的表达

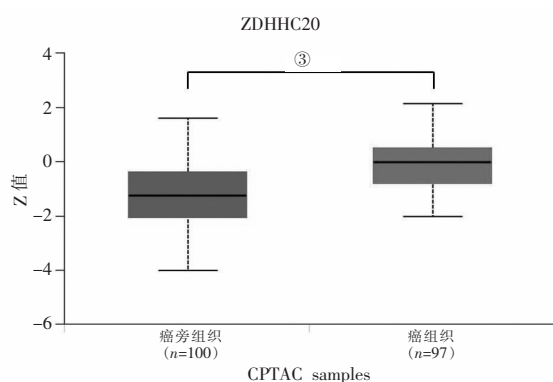
① $P < 0.05$, 与癌旁组织相比。

图2 ZDHHC20 蛋白在结直肠癌组织中的表达

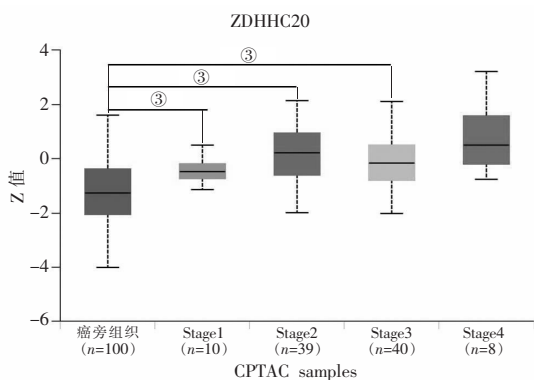
③ $P < 0.001$, 与癌旁组织相比。

图3 ZDHHC20 表达与肿瘤分期的关系

③ $P < 0.001$, 与癌旁组织相比

2.4 ZDHHC20 在结直肠癌细胞中高表达

通过 RT-qPCR 检测 ZDHHC20 在结直肠癌细胞株 SW480、SW620、DLD1 和 HCT116 及正常结肠粘膜上皮细胞 FHC 中的表达。结果表明, ZDHHC20 在结直肠癌细胞中的表达水平均较 FHC 细胞增高($P < 0.05$)。因为 ZDHHC20 在 DLD1 细胞中表达稳定且转染效率较高, 在后续研究中选择 DLD1 细胞。见图 4。

2.5 ZDHHC20 促进结直肠癌细胞增殖

在结直肠癌细胞中转染 Flag-ZDHHC20 过表达 ZDHHC20。结果表明, 与空白对照组及阴性对照组相比, ZDHHC20 高表达组中结直肠癌细胞增殖水平

增高($P < 0.05$)。见图 5。

2.6 ZDHHC20 促进结直肠癌细胞侵袭

通过 Transwell 检测 ZDHHC20 对细胞侵袭能力的影响。结果发现, 与空白对照组 (38.33 ± 2.52) 及阴性对照组 (35.67 ± 4.16) 相比, ZDHHC20 过表达组 (122.67 ± 19.43) 中细胞侵袭能力均增高。($t = 7.457, 7.585, P = 0.002, 0.002$)。

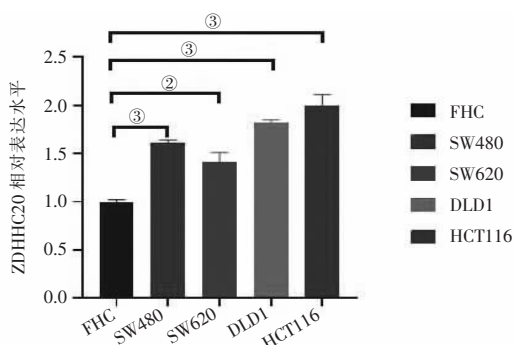


图4 ZDHHC20 在结直肠癌细胞中的表达

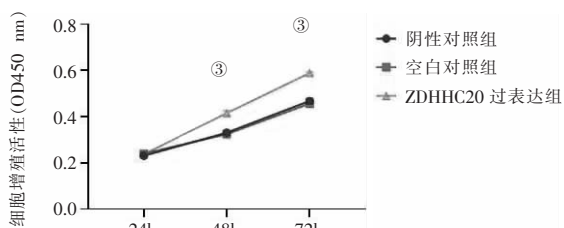
② $P < 0.01$; ③ $P < 0.001$, 与 FHC 细胞比较。

图5 ZDHHC20 对结直肠癌细胞增殖的影响

③ $P < 0.001$, 与 ZDHHC20 过表达组比较。

2.7 ZDHHC20 和 YBX1 的相关性

进一步探索 ZDHHC20 发挥作用的机制, 通过 GEPIA2 数据库分析 ZDHHC20 与 m5C 修饰阅读器 YBX1 的关系, 结果发现, 结直肠癌中 ZDHHC20 和 YBX1 的表达水平正相关($r = 0.23, P < 0.05$)。见图 6。

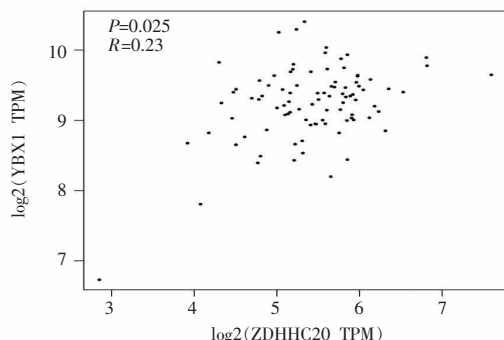


图6 ZDHHC20 和 YBX1 的相关性

2.8 YBX1 蛋白棕榈酰化修饰位点预测

通过 CSS-Palm 数据库和 GPS-Palm 数据库对 YBX1 蛋白的棕榈酰化修饰位点进行预测, CSS-Palm 数据库发现 YBX1 蛋白的 C22 位点可以被棕榈酰化修饰, 而 GPS-Palm 数据库预测 YBX1 蛋白的

棕榈酰化修饰位点在 C103 位点。见表 1。

表 1 YBX1 蛋白棕可能的桐酰化修饰位点

YBX1	修饰位点	具体肽链
CSS-Palm 数据库	C22	ALGPARRCSRHPHPA
GPS-Palm 数据库	C103	PRTRAVERKGCQVAAAGVRG

2.9 YBX1 为棕榈酰化修饰蛋白

为证实 YBX1 为棕榈酰化修饰蛋白,在结直肠癌

细胞中添加 2 μm 可特异性抑制去棕榈酰化修饰的小分子 Palm B,其可有效提高 YBX1 的棕榈酰化修饰水平。然后用 ABE 法富集结直肠癌细胞中的棕榈酰化修饰蛋白并用 Western blot 检测。结果显示,与未用 Palm B 的对照组相比,添加 Palm B 的实验组中 YBX1 棕榈酰化修饰水平增高($P < 0.05$)。见图 7。

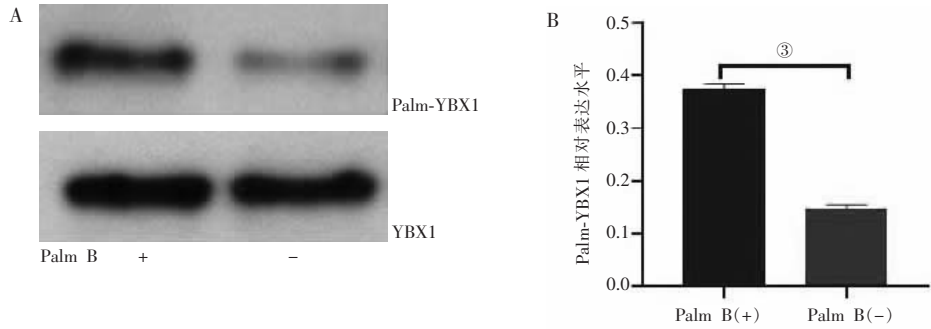


图 7 验证 YBX1 为棕榈酰化修饰蛋白

A. 蛋白条带图;B. 棕榈酰化修饰蛋白相对表达。③ $P < 0.001$ 。YBX1 是 Palm B 处理前的总蛋白,Palm-YBX1 是加用 Palm B 处理后富集的棕榈酰化修饰蛋白;Palm B+为加用 Palm B 处理的实验组,Palm B-为未用 Palm B 处理的对照组。

2.10 ZDHHC20 可提高 YBX1 的棕榈酰化修饰水平

为验证 ZDHHC20 对 YBX1 棕榈酰化修饰水平的影响,在结直肠癌细胞中转染 ZDHHC20 蛋白过表达质粒 Flag-ZDHHC20 并检测 YBX1 棕榈酰化修

饰水平。结果表明,与阴性对照组相比,过表达 ZDHHC20 后 YBX1 的棕榈酰化修饰水平增高($P < 0.05$)。见图 8。

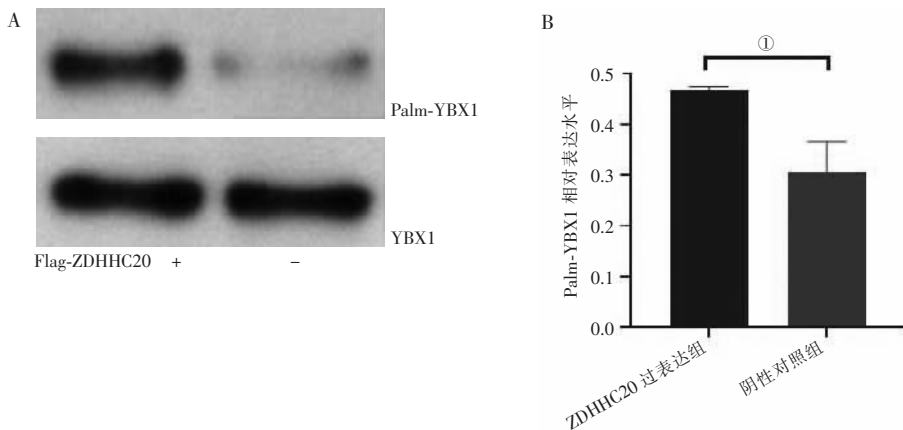


图 8 ZDHHC20 可提高 YBX1 的棕榈酰化修饰水平

A. 蛋白条带图;B. 棕榈酰化修饰蛋白相对表达。① $P < 0.05$ 。YBX1 是 Flag-ZDHHC20 处理前的总蛋白,Palm-YBX1 是加用 Flag-ZDHHC20 处理后富集的棕榈酰化修饰蛋白;Flag-ZDHHC20+为加用 Flag-ZDHHC20 处理的实验组,Flag-ZDHHC20-为未用 Flag-ZDHHC20 处理的对照组。

2.11 棕榈酰化修饰促进 YBX1 蛋白稳定性

蛋白质半衰期是指蛋白降解为原有一半所需的时间,蛋白质半衰期越短蛋白质稳定性越低。主要采用可有效抑制蛋白质合成的 CHX 处理细胞,并每隔一段时间检测蛋白含量以得到半衰期。本研究分两组分别用 DMSO 和 2-BP 处理细胞,处理 48 h 后用 50 μm 的 CHX 处理并检测 YBX1 蛋白的表达。结果表明,2-BP 处理后,YBX1 在 CHX 处理 2 h 后

蛋白达到半衰期,而 2-BP 未处理的细胞在 CHX 处理 4 h 后,YBX1 蛋白才基本达到半衰期;说明 2-BP 处理后,棕榈酰化水平降低,导致细胞内 YBX1 的稳定性降低,证实 ZDHHC20 通过 YBX1 蛋白棕榈酰化修饰提高 YBX1 蛋白的稳定性。见图 9。

2.12 YBX1 促进结直肠癌细胞增殖

通过 CCK8 分析 YBX1 对细胞增殖的影响。结果发现,与空白对照组及阴性对照组相比,YBX1 过

表达组中细胞增殖活性明显增强,表明 YBX1 可促进结直肠癌细胞增殖。见图 10。

2.13 YBX1 促进结直肠癌细胞侵袭

通过 Transwell 分析 YBX1 对结直肠癌细胞侵

袭能力的影响。结果发现,与空白对照组(67.00 ± 8.54)及阴性对照组(66.67 ± 6.51)相比,YBX1 过表达组(113.67 ± 6.03)中细胞侵袭能力均增高($t = 7.730, 9.970, P = 0.002, 0.001$)。

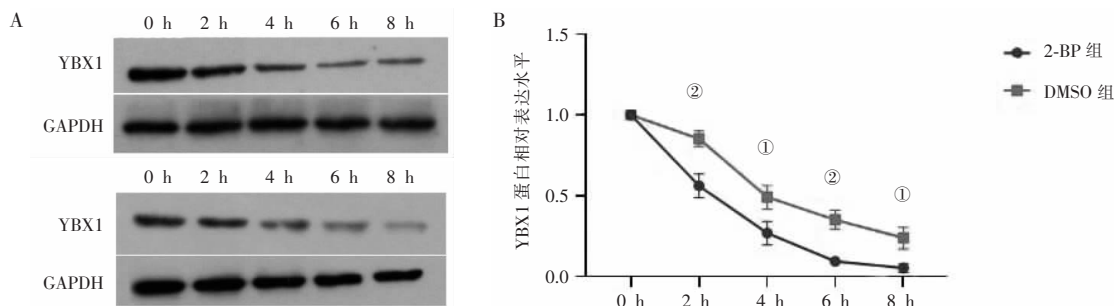


图 9 棕榈酰化修饰对 YBX1 蛋白稳定性的影响

A. 蛋白条带图;B. YBX1 蛋白相对表达水平。① $P < 0.05$;② $P < 0.01$ 。

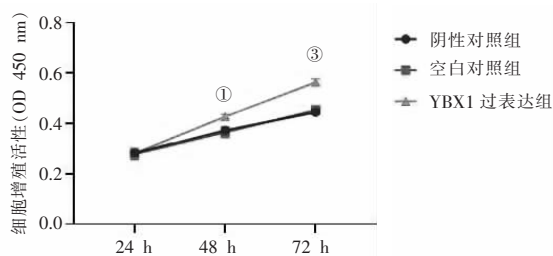


图 10 YBX1 对结直肠癌细胞增殖的影响

① $P < 0.05$;③ $P < 0.001$,与 YBX1 过表达组比较。

2.14 YBX1 提高结直肠癌细胞的 m5C 修饰水平

为验证 YBX1 对结直肠癌细胞 m5C 修饰水平的影响,设立空白对照组、阴性对照组及 YBX1 过表达组,并检测各组细胞的 m5C 含量。结果发现,与空白对照组及阴性对照组相比,YBX1 过表达组 m5C 含量均增高($P < 0.05$)。见图 11。

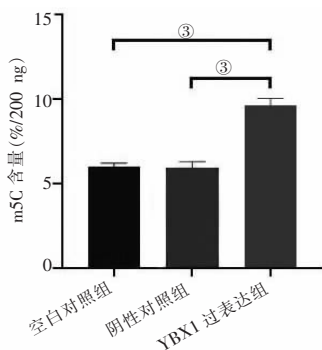


图 11 YBX1 对 m5C 修饰水平的影响

③ $P < 0.001$ 。

3 讨论

S-棕榈酰化是指通过形成可靠的硫酯键将饱和的 16 碳脂肪酸棕榈酸酯添加到半胱氨酸残基上,这种修饰改变了靶蛋白的疏水性,可调节其细胞定位、运输、稳定性、活性和信号传导^[8]。蛋白的棕榈酰

化修饰是可逆的,由“writer”(蛋白质酰基转移酶)和“eraser”(酰基蛋白硫酯酶)分别催化棕榈酰化和去棕榈酰化过程。目前在哺乳动物中共有 23 种含跨膜锌指 Asp-His-His-Cys (DHHC) 的蛋白质,即酰基转移酶(ZDHHCs)^[9]。最近的研究^[10]表明,DHHC 家族蛋白的失调与人类疾病的病理过程密切相关,包括癌症进展、炎症和神经官能障碍。例如 ZDHHC18 可棕榈酰化修饰 MDH2 蛋白以维持线粒体呼吸并促进卵巢癌的发生发展^[11],而 ZDHHC9 在结直肠癌中表达上调,参与白血病的发生发展,并且其功能缺失突变与 X 连锁智力残疾有关^[12]。研究^[13]表明,敲除 DHHC20 抑制了来源于人 KRAS-突变型癌症细胞的生长,增加了这些细胞对 PI3K 抑制剂的敏感性,并且对大型肺癌患者数据集的分析显示,低 DHHC20 表达与提高生存概率之间存在强烈相关性,进一步显示了抑制肺癌患者 DHHC20 表达的潜在临床益处。然而 DHHC20 与结直肠癌发生作用机制方面的研究尚无报道。通过生物信息学分析发现,ZDHHC20 mRNA 和蛋白在结直肠癌组织和细胞中高表达,并且肿瘤分期愈高的结直肠癌患者 ZDHHC20 的表达水平愈高。不仅如此,ZDHHC20 还可促进结直肠癌细胞增殖和侵袭,说明 ZDHHC20 在结直肠癌的发生发展过程中扮演着癌基因的角色,其可作为结直肠癌诊断和治疗的潜在生物标志物和作用靶点。

进一步探讨 ZDHHC20 发挥作用的机制,为分析 ZDHHC20 发挥作用的下游靶蛋白,本课题组把目光转向 m5C 甲基化调控因子。通过生物信息学发现 ZDHHC20 与 m5C 阅读器 YBX1 的表达水平正相关($P < 0.05$)。研究^[14]表明,基因调控的异常,如 RNA 甲基化,是肿瘤发生、进展和复发的关键标志。5-甲基胞嘧啶(m5C)是最著名和最保守的

RNA 修饰之一,广泛发生在各种类型的真核 RNA 上,包括 rRNA、lncRNA、tRNA 和 mRNA^[15]。YBX1 是 m5C 修饰的阅读器,可特异性识别并结合 m5C 基序并发挥进一步的生物学功能^[16]。既往研究^[17]表明,YBX1 可通过 m5C 修饰增加 TSPAN13 转录物的稳定性和表达,从而促进白血病发生。还有研究^[18]发现,YBX1 通过靶向其 3'UTR 上的 m5C 修饰位点来稳定 HDGF 基因的 mRNA,因此在膀胱尿路上皮癌中表现出重要的致癌作用。而在结直肠癌组织中 YBX1 明显高表达并与患者预后相关,并且结直肠癌患者血液中 YBX1 的表达也明显增加^[19],表明 YBX1 可能通过 m5C 修饰参与结直肠癌的发生发展,然而其上下游调控关系并不清楚。本研究发现,YBX1 蛋白上存在 C22 和 C103 两个棕榈酰化修饰位点,并且在结直肠癌细胞中添加可特异性抑制去棕榈酰化修饰的小分子 Palm B 后 YBX1 的棕榈酰化修饰水平明显增高,证实 YBX1 为棕榈酰化修饰蛋白。进一步的研究还发现,ZDHHC20 可提高 YBX1 的棕榈酰化修饰水平,而 YBX1 的棕榈酰化修饰可明显促进 YBX1 蛋白稳定,证实其在结直肠癌中 ZDHHC20 通过棕榈酰化修饰稳定 YBX1 蛋白从而上调 YBX1 蛋白的表达。本研究还发现,过表达 YBX1 可促进结直肠癌细胞增殖和侵袭,与既往结果相符。不仅如此,过表达 YBX1 还可提高结直肠癌细胞的 m5C 修饰水平,这也与 YBX1 的功能一致,即稳定 RNA 表达,从而提高总 RNA 的 m5C 水平。本研究证实,YBX1 可通过调控 RNA m5C 修饰参与结直肠癌进展,其可能是结直肠癌潜在的治疗靶点。

综上,本研究证明 ZDHHC20 在结直肠癌中高表达并可在体外促进结直肠癌细胞的增殖和侵袭,且 ZDHHC20 可通过棕榈酰化修饰提高 YBX1 蛋白稳定性,上调 YBX1 蛋白表达并调控 RNA m5C 修饰参与结直肠癌发生发展。

参考文献

[1] O'Sullivan DE, Sutherland RL, Town S, et al. Risk factors for early-onset colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2022, 20(6): 1229–1240. e5.

[2] Gupta S. Screening for colorectal cancer [J]. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 2022, 36(3): 393–414.

[3] Azizi SA, Delalande C, Lan T, et al. Charting the chemical space of acrylamide-based inhibitors of zDHHC20 [J]. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 2022, 13(10): 1648–1654.

[4] Lee CJ, Stix R, Rana MS, et al. Bivalent recognition of fatty acyl-CoA by a human integral membrane palmitoyltransferase [J]. *Pro-*

ceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2022, 119(7): e2022050119.

[5] Main A, Fuller W. Protein S-Palmitoylation: advances and challenges in studying a therapeutically important lipid modification [J]. *The FEBS Journal*, 2022, 289(4): 861–882.

[6] Wang Y, Wei J, Feng L, et al. Aberrant m5C hypermethylation mediates intrinsic resistance to gefitinib through NSUN2/YBX1/QSOX1 axis in EGFR-mutant non-small-cell lung cancer [J]. *Molecular Cancer*, 2023, 22(1): 81.

[7] Fang L, Huang H, Lv J, et al. m5C-methylated lncRNA NR_033928 promotes gastric cancer proliferation by stabilizing GLS mRNA to promote glutamine metabolism reprogramming [J]. *Cell Death & Disease*, 2023, 14(8): 520.

[8] Chen Y, Li Y, Wu L. Protein S-palmitoylation modification: implications in tumor and tumor immune microenvironment [J]. *Frontiers in Immunology*, 2024, 15: 1337478.

[9] Liao D, Huang Y, Liu D, et al. The role of s-palmitoylation in neurological diseases: implication for zDHHC family [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2023, 14: 1342830.

[10] Li M, Zhang L, Chen CW. Diverse roles of protein palmitoylation in cancer progression, immunity, stemness, and beyond [J]. *Cells*, 2023, 12(18): 2209.

[11] Pei X, Li KY, Shen Y, et al. Palmitoylation of MDH2 by ZDHHC18 activates mitochondrial respiration and accelerates ovarian cancer growth [J]. *Science China Life Sciences*, 2022, 65(10): 2017–2030.

[12] Azizi SA, Lan T, Delalande C, et al. Development of an acrylamide-based inhibitor of protein S-acylation [J]. *ACS Chemical Biology*, 2021, 16(8): 1546–1556.

[13] Kharbanda A, Walter DM, Gudiel AA, et al. Blocking EGFR palmitoylation suppresses PI3K signaling and mutant KRAS lung tumorigenesis [J]. *Science Signaling*, 2020, 13(621): eaax2364.

[14] Liu Y, Zhang S, Gao X, et al. Research progress of N1-methyladenosine RNA modification in cancer [J]. *Cell Communication and Signaling*, 2024, 22(1): 79.

[15] Xu Z, Chen S, Zhang Y, et al. Roles of m5C RNA modification patterns in biochemical recurrence and tumor microenvironment characterization of prostate adenocarcinoma [J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 869759.

[16] Yu G, Bao J, Zhan M, et al. Comprehensive analysis of m5C methylation regulatory genes and tumor microenvironment in prostate cancer [J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 914577.

[17] Li Y, Xue M, Deng X, et al. TET2-mediated mRNA demethylation regulates leukemia stem cell homing and self-renewal [J]. *Cell Stem Cell*, 2023, 30(8): 1072–1090. e10.

[18] Chen X, Li A, Sun BF, et al. 5-methylcytosine promotes pathogenesis of bladder cancer through stabilizing mRNAs [J]. *Nature Cell Biology*, 2019, 21(8): 978–990.

[19] Yin H, Huang Z, Niu S, et al. 5-Methylcytosine (m5C) modification in peripheral blood immune cells is a novel non-invasive biomarker for colorectal cancer diagnosis [J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 967921.

(收稿日期: 2024-01-04

修回日期: 2024-06-02)