

## 前列腺癌

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.003307

胰凝乳蛋白酶样蛋白酶体的活性作为前列腺癌  
生物标志物的潜在应用

曾维威,赵永斌,李煜罡,刘为池,周宇辰,刘其炼,曾京华

(南方医科大学中西医结合医院泌尿外科,广州 510315)

**【摘要】目的:**探讨胰凝乳蛋白酶样蛋白酶体(chymotrypsin-like proteasome, CLP)活性作为前列腺癌生物标志物的可行性。**方法:**检测在体和离体的蛋白酶体活性,同时检测核因子 $\kappa$ B的抑制蛋白 $\alpha$ (inhibitory protein  $\alpha$  of nuclear factor  $\kappa$ B, I $\kappa$ B- $\alpha$ )、Bcl-2 相关 X 蛋白(BCL-2 associated X protein, Bax)和细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子(cyclin-dependent kinase inhibitor, p27)的表达。**结果:**与正常前列腺上皮细胞及对照小鼠前列腺组织相比,前列腺癌细胞和前列腺肿瘤异种移植瘤中蛋白酶体底物蛋白 I $\kappa$ B- $\alpha$ 、Bax 和 p27 的表达水平降低,CLP 的离体和在体活性分别升高 70% 和 23%。**结论:**CLP 的活性可能是一种潜在的前列腺癌生物标志物,可能适合前列腺特异性抗原(prostate-specific antigen, PSA)在前列腺癌诊断中的补充。

**【关键词】**胰凝乳蛋白酶样蛋白酶体;前列腺癌;前列腺特异性抗原;生物标志物

**【中图分类号】**R691.9

**【文献标志码】**A

**【收稿日期】**2023-05-31

Potential application of chymotrypsin-like proteasome activity  
as a biomarker for prostate cancer

Zeng Weiwei, Zhao Yongbin, Li Yugang, Liu Weichi, Zhou Yuchen, Liu Qilian, Zeng Jinghua

(Department of Urology, Integrated Hospital of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University)

**【Abstract】Objective:** To investigate the feasibility of chymotrypsin-like proteasome (CLP) activity as a biomarker for prostate cancer. **Methods:** Proteasome activity was determined *in vitro* and *in vivo*. We also measured the expression of inhibitory protein  $\alpha$  of nuclear factor  $\kappa$ B (I $\kappa$ B- $\alpha$ ), Bcl-2 associated X protein (Bax), and cyclin-dependent kinase inhibitor (p27). **Results:** CLP activity was elevated by 70% *in vitro* and 23% *in vivo*, and the expression levels of the proteasome substrate proteins I $\kappa$ B- $\alpha$ , Bax, and p27 decreased in prostate cancer cells and prostate tumor xenografts compared with normal prostate epithelial cells and control mouse prostate tissue. **Conclusion:** CLP activity is a potential biomarker for prostate cancer and may be used to supplement prostate-specific antigen in clinical diagnosis of prostate cancer.

**【Key words】**chymotrypsin-like proteasome; prostate cancer; prostate specific antigen; biomarker

前列腺癌是西方国家男性最常见的恶性肿瘤<sup>[1]</sup>。作为男性癌症相关死亡的第二大原因,前列腺癌在美国造成约 27 540 人死亡(2022 年)<sup>[2]</sup>。此外,在亚洲,包括中国,前列腺癌的发病率和病死率也明显上升<sup>[3]</sup>。近年来,尽管前列腺癌的新治疗方法已被证实对提高生存率有好处<sup>[4-5]</sup>,但总体生存率的增加仍微不足道。前列腺癌的主要临床挑战之一是目前可用诊断的检测手段不足。自 20 世纪

80 年代以来,血清前列腺特异性抗原(prostate-specific antigen, PSA)筛查问世,前列腺癌的诊断和治疗一直以这一生物标志物为指导;目前它仍然是前列腺癌诊断和术后监测以及预后评估最为常用的肿瘤标志物。PSA 是由上皮细胞分泌的一种蛋白,在前列腺癌患者血清中,血清 PSA 常常异常升高<sup>[6-7]</sup>。然而,PSA 易受各种混杂因素的影响,包括良性前列腺增生、前列腺炎和尿道手术,这些因素可能导致其临床可靠性降低<sup>[8-9]</sup>。特异性和敏感性不高是 PSA 作为前列腺癌生物标志物的主要缺陷,甚至可能导致假阳性或假阴性结果。因此,寻找一种新的标志物,对明确前列腺癌的诊断、辅助治疗和预后监测具有重要意义。

作者介绍:曾维威,Email:448615313@qq.com,

研究方向:前列腺癌的临床诊治及机制研究。

通信作者:曾京华,Email:yuea748n9@qq.com。

优先出版:https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20230814.0927.006

(2023-08-15)

目前,已经有部分研究提出了对 PSA 检测的改进,包括测量早期 PSA、良性病变的 PSA、游离 PSA、动态 PSA 参数变化(包括 PSA 的变化速度和 PSA 倍增时间)、PSA 密度(PSA 与前列腺体积比)和年龄特异性 PSA 水平等<sup>[1]</sup>。尽管这些改进可能在一定程度上提高前列腺癌诊断的准确性,但其相对复杂的过程和总 PSA(tPSA)的影响等将继续限制其应用<sup>[10]</sup>。

蛋白酶体是一种多催化的蛋白酶复合物,负责降解大多数细胞内蛋白质,包括细胞周期调节和凋亡所需的蛋白质<sup>[11]</sup>。26S 蛋白酶体由 2 个 19S 调控亚基和 1 个 20S 核心亚基组成。在蛋白酶体降解系统中,靶蛋白在泛素化后被 19S 亚基识别,然后进入 20S 核心进一步降解。20S 亚基具有 3 种类型的酶活性,分别为胰凝乳蛋白酶样、胰蛋白酶样和半胱天冬酶样。作为泛素-蛋白酶体途径的一部分,蛋白酶体在多种细胞的蛋白质降解中均起着至关重要的作用<sup>[12]</sup>。蛋白酶体降解一系列与癌症相关的内源性蛋白,包括转录因子、细胞周期蛋白、核因子  $\kappa$ B 的抑制蛋白  $\alpha$  (inhibitory protein  $\alpha$  of nuclear factor  $\kappa$ B, I $\kappa$ B- $\alpha$ )、Bcl-2 相关 X 蛋白(BCL-2 associated X protein, Bax)和细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子(cyclin-dependent kinase inhibitor, p27)等,已成为癌症治疗的重要潜在靶点。

关于这一主题的大多数研究都集中在治疗肿瘤的蛋白酶体抑制剂上,针对蛋白酶体在疾病诊断中的应用研究尚不充分。Stoebner PE 等<sup>[13]</sup>报道在 20 例肿瘤患者(包括乳腺癌、胃癌、肾癌、结肠癌、睾丸癌、肝癌和肺癌)中,血清蛋白酶体 20S 水平较对照组显著升高,提示血清蛋白酶体可用于肿瘤诊断。课题组前期研究发现蛋白酶体抑制剂通过抑制胰凝乳蛋白酶样蛋白酶体(chymotrypsin-like proteasome, CLP)的活性影响前列腺癌细胞的增殖和凋亡,从而影响靶蛋白 I $\kappa$ B- $\alpha$ 、Bax 和 p27 的表达<sup>[14]</sup>。因此,本研究通过检测培养的人前列腺癌细胞(LNCaP 细胞)和荷瘤小鼠前列腺肿瘤组织中胰凝乳蛋白酶样、胰蛋白酶样和半胱天冬酶样蛋白酶体的活性,以及蛋白酶体的底物 I $\kappa$ B- $\alpha$ 、Bax 和 p27 的表达,来分析蛋白酶体活性作为前列腺癌候选生物标志物的可行性。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

LNCaP 人前列腺细胞由莱德广州联康生物科技有限

公司(中国广州)提供。前列腺上皮细胞培养基试剂盒(Prostate Epithelial Cell Medium BulletKit™)购自 Lonza Group, Ltd(Basel, Switzerland)。无角质细胞血清培养基购自 Gibco(Thermo Fisher Scientific, USA), PBS 来自 Hyclone(GE Healthcare Life Sciences, Logan, UT, USA)。RPMI1640,青霉素和链霉素购自 Invitrogen(Thermo Fisher Scientific, Inc., USA)。胎牛血清购自 Hyclone(GE Healthcare Life Sciences, USA)。小鼠抗 Bax 单克隆抗体(cat. no. sc-23959)和 p27(cat. no. sc-1641)和抗 I $\kappa$ B- $\alpha$  的兔多克隆抗体(I $\kappa$ B- $\alpha$ ; cat. no. sc-203)和 GAPDH(FL-335; cat. no. sc-25778)均来自 Santa Cruz Biotechnology, Inc(Dallas, TX, USA)。Suc-LLVY-AMC, Z-LLE-NA, and BZVGR-AMC 都来自 Sigma-Aldrich 公司(USA);默克公司(Darmstadt, 德国)。

### 1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 LNCaP 细胞在 RPMI1640 中培养,并添加 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100  $\mu$ g/mL 链霉素,在 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 1 周。通过常规组织培养方法从前列腺组织中获得前列腺上皮细胞:从接受机器人手术根治性前列腺癌切除术的男性中获得人类前列腺组织标本,切片成 1 mm<sup>3</sup> 小块,放置在涂有胶原蛋白的 T25 烧瓶中。组织块在 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 的前列腺上皮细胞培养基中培养 1 周,每 3 d 更换 1 次培养基。当原代单层细胞覆盖在烧瓶表面时,消化并收集细胞,用无角质细胞血清的培养基传代。第一代细胞用于进一步实验,以确保前列腺上皮细胞的完整性。观察细胞形态变化,在相差倒置显微镜下拍照(放大倍数,100 $\times$ ; Olympus, 东京, 日本)。人体组织的使用经广州医科大学广州第一人民医院伦理委员会批准(批准号: A-2021-046-01),并在研究中使用组织前获得患者的书面知情同意。

1.2.2 人前列腺肿瘤异种移植实验 本研究的动物实验按照广州医科大学实验动物研究所(中国广州)制定的指导方针进行。BALB/C-nu 雄性小鼠 30 只,4~6 周龄,平均体质量 20 g,购自广东省医学实验动物中心(中国佛山)。按照先前<sup>[15]</sup>描述的规程进行安置。将小鼠随机分为两组,每组 15 只。实验组将悬浮于 0.2 mL PBS 中的  $5 \times 10^5$  个 LNCaP 细胞接种于每只小鼠的左侧,对照组小鼠注射 0.2 mL PBS。定期用游标卡尺测量肿瘤大小,肿瘤体积按标准公式计算:  $0.52 \times \text{宽度}^2 \times \text{长度}$ 。4 周时,处死小鼠。取血液和肿瘤组织作进一步分析。

1.2.3 蛋白酶体活性测定 将 100  $\mu$ L LNCaP 悬浮细胞( $1.0 \times 10^5$  个/mL)和前列腺上皮细胞( $1.0 \times 10^5$  个/mL)分别置于 96 孔板中培养 24 h。然后在孔中加入 1  $\mu$ L 含有 4 mmol/L 荧光肽底物的蛋白酶体活性测定缓冲液,缓冲液中包括检测胰凝乳蛋白酶样活性的 Suc-LLVY-AMC、检测半胱天冬酶样活性的 Z-LLE-NA 或检测胰蛋白酶样活性的 BZVGR-AMC。孵育 2 h 后,用激发波长 380 nm、发射波长 460 nm 的酶标仪测定荧光强度。血清检测时,在 100  $\mu$ L 小鼠血清中加入 1  $\mu$ L 含 4 mmol/L 的荧光底物,37  $^{\circ}$ C 孵育 2 h,

用酶标仪检测荧光强度即代表蛋白酶体活性,激发和发射波长分别为 380 nm 和 460 nm。

1.2.4 蛋白免疫印记分析 弃去培养基,用预冷 PBS 清洗细胞,RIPA 裂解液裂解 30 min,细胞刮刀刮取细胞,12 000 r/min 离心 15 min,取上清,二喹啉甲酸(bicinchoninic acid,BCA)法测定蛋白浓度,100 °C 使蛋白变性。从小鼠身上提取良性前列腺组织样本以及前列腺癌组织使用 RIPA 裂解液裂解,研磨成匀浆,12 000 r/min 离心 15 min 后取上清,BCA 法测定蛋白浓度,100 °C 使蛋白变性。经 10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳后,将蛋白电转至二氟化树脂膜上,5% 牛血清白蛋白(bovine serum albumin,BSA)封闭 1 h,切取相应蛋白条带,用特异性抗体 4 °C 孵育过夜,二抗常温孵育 1 h,蛋白条带浸于增强化学发光试剂中,曝光,使用 Image J 软件进行统计与分析。

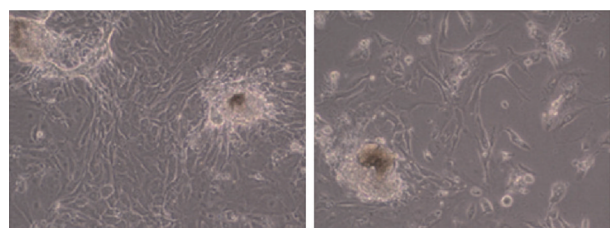
### 1.3 统计学处理

使用软件 GraphPad Prism 6.0、Image Pro Plus 7.0、BD Accuri C6 Plus 及 Adobe Illustrator CC 2020 进行数据处理与分析。使用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析,计量资料以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,2 组间比较使用 *t* 检验,检验水准  $\alpha=0.05$ 。

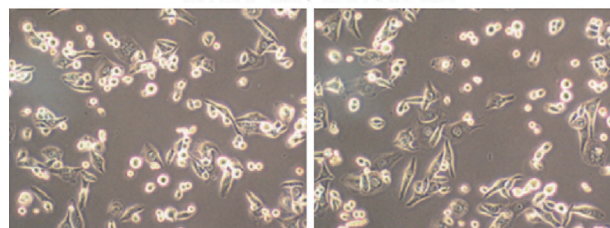
## 2 结果

### 2.1 前列腺上皮细胞的分离与培养

从前列腺组织中获得前列腺上皮细胞常规组织。经观察,前列腺上皮细胞与胶原蛋白表面黏附紧密且生长良好(图 1A)。在第 16 天,前列腺上皮细胞呈上皮样形态且细胞活力增强,扩散满瓶底。形成单层细胞之后,用无角质细胞 SFM 培养基将细胞传代(图 1B)。第一代细胞用于进一步实验。



A. 从前列腺组织中分离出细胞,置于前列腺上皮细胞培养基中培养,形成单层细胞



B. 从单层中收获前列腺上皮细胞,并在无角质细胞血清的培养基中传代培养

图 1 通过常规组织培养方法从人前列腺组织中获得的前列腺上皮细胞的显微镜图像(100 $\times$ )

### 2.2 小鼠前列腺癌模型的建立

LNCaP 细胞接种到裸鼠后的第 4 天,可以观察到肿瘤形成。实验结束(第 29 天),肿瘤的平均大小为 350 mm<sup>3</sup>(图 2)。处死小鼠,收集血液和肿瘤组织进行进一步分析。

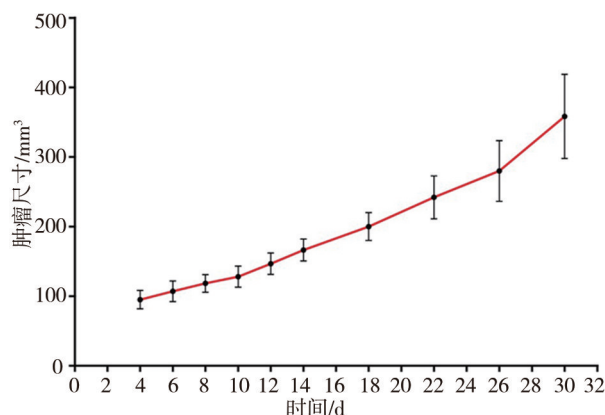


图 2 LNCaP 细胞接种到小鼠后形成肿瘤的大小

### 2.3 LNCaP 细胞的 CLP 活性升高,而 Bax、I $\kappa$ B- $\alpha$ 和 p27 蛋白水平降低

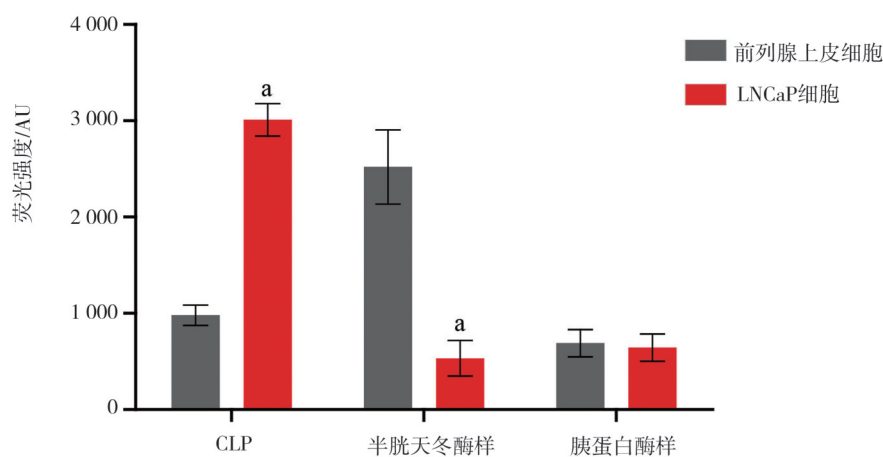
先前的报告已经证明了髓系造血恶性肿瘤<sup>[18-20]</sup>、实体瘤<sup>[19]</sup>和自身免疫性疾病<sup>[21]</sup>患者的蛋白酶体水平升高。为了确定非细胞水平的蛋白酶体活性变化,本课题组在 LNCaP 前列腺癌细胞和正常前列腺上皮细胞中检测了 4 次胰凝乳蛋白酶样、半胱天冬酶样和胰蛋白酶样蛋白酶体的活性。LNCaP 细胞与前列腺上皮细胞相比,CLP 活性升高约 70% ( $3\,286.00 \pm 259.01$  vs.  $1\,080.00 \pm 100.13$ ,  $P=0.007$ )。LNCaP 细胞半胱天冬酶样蛋白酶体的活性降低( $P=0.016$ );而胰蛋白酶样蛋白酶体的活性没有明显改变(图 3A)。3 种最重要的蛋白酶体靶蛋白 Bax、I $\kappa$ B- $\alpha$  和 p27<sup>[22-23]</sup>的表达水平随后通过蛋白免疫印迹进行评估,这 3 种蛋白质在 LNCaP 细胞的表达均低于 PE 细胞( $P=0.032, 0.003, 0.002$ ;图 3B 和 C),这与之前的研究一致<sup>[14]</sup>。

### 2.4 异种移植物的 CLP 活性增加,同时 Bax、I $\kappa$ B- $\alpha$ 和 p27 蛋白水平降低

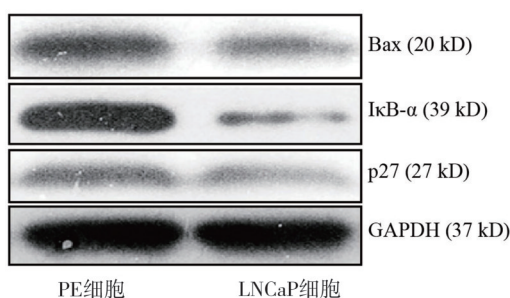
为了明确在体 CLP 活性是否也升高,本课题组收集了 LNCaP 移植或未移植前列腺癌细胞的小鼠血清用于蛋白酶体活性测定。与对照组比较,移植前列腺癌细胞的小鼠血清 CLP 增加了 23% ( $37\,344.67 \pm 2\,719.64$  vs.  $28\,845.87 \pm 1\,880.47$ ;  $P=0.042$ ),符合离体实验结果。胰蛋白酶样蛋白酶体活性提高 21% ( $824.53 \pm 164.87$  vs.  $648.36 \pm 97.50$ ,  $P=0.034$ ),而 2 组半胱天冬酶样活性蛋白酶体处于相似水平 ( $2\,540.57 \pm 130.20$  vs.  $2\,517.36 \pm 142.52$ ,  $P=0.09$ ;图 4)。

此外,采用蛋白印记分析荷瘤小鼠和正常小鼠前列腺癌组织中 Bax、I $\kappa$ B- $\alpha$  和 p27 的蛋白水平。与对照组小鼠前列腺组织相比,小鼠肿瘤组织中 Bax、I $\kappa$ B- $\alpha$  和 p27 蛋白水平降低( $P=0.026, 0.012, 0.007$ ;图 5A 和 B)。

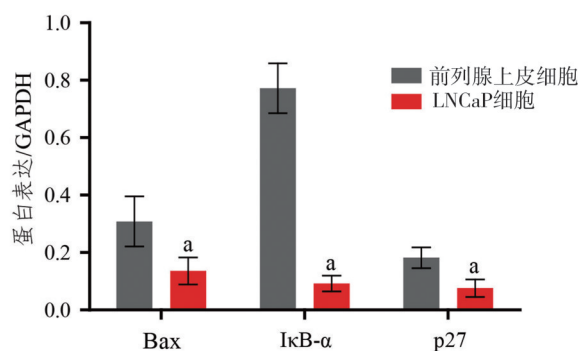




A. 细胞中测定胰凝乳蛋白酶样、半胱天冬酶样和胰蛋白酶样蛋白酶活性



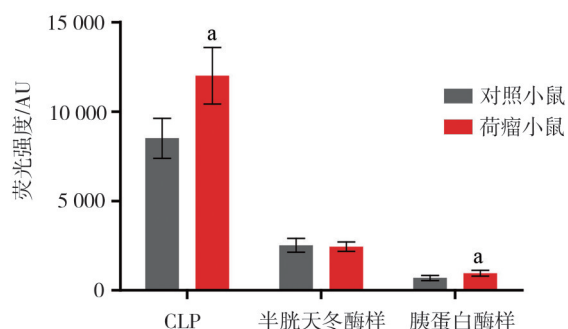
B. 蛋白免疫印迹检测LNCaP细胞中Bax、IκB-α和p27表达的代表性图像



C. 免疫印迹定量结果

注: a, 与前列腺上皮细胞比较,  $P < 0.05$

图3 离体水平蛋白酶活性



注: a, 与对照小鼠比较,  $P < 0.05$

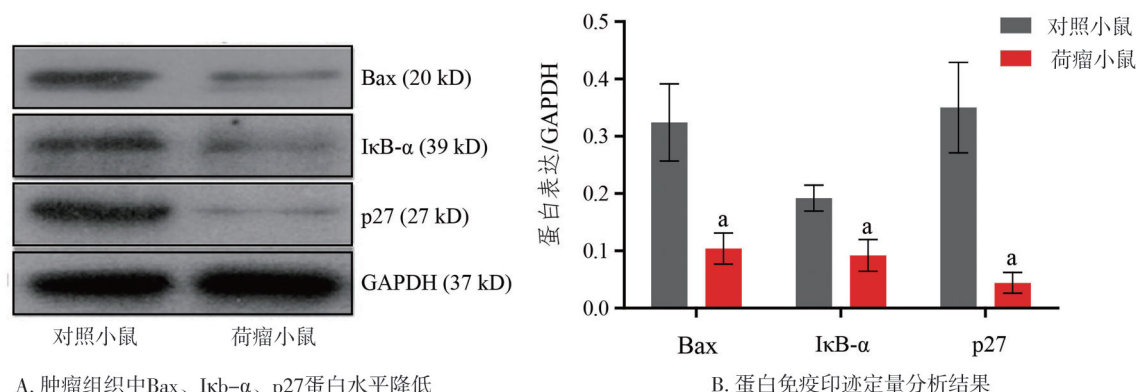
图4 胰凝乳蛋白酶样、半胱天冬酶样和胰蛋白酶样蛋白酶体在小鼠血清中的活性

### 3 讨论

前列腺癌是全世界关注的问题,其发病率和病死率不断上升<sup>[3,24-25]</sup>;自20世纪80年代以来,PSA已被用作前列腺癌的生物标志物,但因其特异性不

高,PSA的使用仍存在争议。以前的研究报道了CLP的活性与多种肿瘤有关,包括急性髓性白血病(26例)和黑色素瘤(13例)等。本研究探讨了CLP的活性在前列腺癌细胞与正常前列腺上皮细胞、荷瘤小鼠与对照小鼠中的表达,表明CLP的活性可能是一个候选的前列腺癌生物标志物,可配合PSA来更精准地诊断前列腺癌。因PSA的局限性可能导致前列腺癌的过度诊断及过度治疗,给患者带来不必要的心理应激及过度治疗引起的疼痛及身体机能丧失,所以提高前列腺癌诊断的精准性至关重要。CLP活性的测定相对简单,可重复,可在外周血血浆中进行。因此,CLP的活性测定与PSA检测相结合有可能提高对于前列腺癌诊断的准确性,最终减少不必要的治疗及患者负担。

尽管先前的研究已经证明血浆蛋白酶体可作为几种肿瘤的生物标志物<sup>[18-19,26]</sup>,但蛋白酶体活性的来源未被确认。Deng XR等<sup>[28]</sup>假设前列腺癌细胞



A. 肿瘤组织中Bax、Iκb-α、p27蛋白水平降低

B. 蛋白免疫印迹定量分析结果

注:a,与对照小鼠比较, $P < 0.05$ 

图5 Bax、Iκb-α和P27在荷瘤小鼠肿瘤组织和正常小鼠前列腺组织中的表达

更频繁地进入血液循环系统,血清中的CLP的活性可随着这些癌细胞的增加而升高。这个假设与LnCaP细胞的培养液及荷瘤小鼠血清中CLP的活性增加是一致的。此外,半胱天冬酶样和胰蛋白酶样蛋白酶体的活性在细胞培养水平和小鼠血清水平均发生改变,半胱天冬酶样蛋白酶体的活性在LNCaP细胞中显著降低而胰蛋白酶样蛋白酶体的活性在荷瘤小鼠血清中增加,提示蛋白酶体途径或可改变肿瘤的发生和发展。

在本研究中,CLP的目标蛋白质也被评估,包括p27(作用于细胞周期的进程)、Bax(促进凋亡的发生)和IκB-α(NF-κB通路的一部分)<sup>[29]</sup>,在前列腺癌细胞和异种移植肿瘤组织中,3种底物的表达水平降低。升高的CLP的活性可能诱导了这些肿瘤抑制蛋白的降解,最终导致细胞凋亡的抑制,以及更具侵略性的肿瘤行为。作为一个NF-κB的抑制剂,CLP对IκB-α的降解促进了NF-κB转运进入细胞核从而促进细胞的存活<sup>[30]</sup>,导致减少抗癌治疗的有效性<sup>[31-32]</sup>。在人类肿瘤中,p27的水平相对较低,CLP对p27的降解可能导致细胞分裂的失控,最终促进肿瘤的发展<sup>[33]</sup>。在侵袭性前列腺癌中发现Bax的表达减少与本研究的结果一致<sup>[34]</sup>。作为Bcl-2家族成员,Bax是促进细胞凋亡的关键分子;它的降解有助于维持癌细胞存活<sup>[35]</sup>。据报道,CLP活性的抑制可能导致Iκb-α、Bax和p27在不同部位的积累<sup>[14]</sup>诱导细胞死亡。因此,CLP的活性的靶向抑制剂可能是前列腺癌的治疗的一种潜在策略。

本研究存在一些局限性。首先,本研究检测了小鼠在体和细胞水平的CLP的活性,而不是在前列腺癌患者的临床样本中。作为概念验证,本研究提供了一些数据提示CLP的活性可以作为前列腺癌

的潜在候选生物标志物,为以后的研究打下基础。第二,CLP活性不是前列腺癌的特异性标志物<sup>[36-38]</sup>。因此,升高的CLP的活性不能独立提示前列腺癌的发生;然而,它与PSA水平升高的结合,可能会提高前列腺癌诊断的准确性,从而降低患者过度诊断和过度治疗的概率。

Ma WL等<sup>[26]</sup>报道了血浆中CLP的活性可能是急性髓系白血病和晚期骨髓增生异常综合征风险分层的有力标志,这为CLP的活性在肿瘤中的应用提供了一个新的视角,但仍需要进一步的研究来验证该血清学试验是否可作为前列腺癌患者的疾病危险分层及预后的判断指标。

## 参 考 文 献

- [1] Saini S. PSA and beyond: alternative prostate cancer biomarkers[J]. Cell Oncol(Dordr), 2016, 39:97-106.
- [2] Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, et al. Cancer statistics, 2023[J]. CA Cancer J Clin, 2023, 73(1):17-48.
- [3] 雷涛,毛伟敏,杨红健,等. 中国城乡11市县常见恶性肿瘤发病趋势分析[J]. 中华流行病学杂志, 2009, 30(11):1165-1170.
- Lei T, Mao WM, Yang HJ, et al. Study on cancer incidence through the cancer registry program in 11 cities and counties, China[J]. Chin J Epidemiol, 2009, 30(11):1165-1170.
- [4] Fong MK, Hare R, Jarkowski A. A new era for castrate resistant prostate cancer: a treatment review and update[J]. J Oncol Pharm Pract, 2012, 18(3):343-354.
- [5] Rodrigues DN, Butler LM, Estelles DL, et al. Molecular pathology and prostate cancer therapeutics: from biology to bedside[J]. J Pathol, 2014, 232(2):178-184.
- [6] Lilja H. Testing new PSA subforms to enhance the accuracy of predicting cancer risk and disease outcome in prostate cancer[J]. Clin Chem, 2008, 54(7):1248-1249.
- [7] Lilja H, Ulmert D, Vickers AJ. Prostate-specific antigen and pros-

- tate cancer: prediction, detection and monitoring[J]. Nat Rev Cancer, 2008, 8(4): 268–278.
- [8] Romero OJ, Garcia GB, Campos JF, et al. Prostate cancer biomarkers: an update[J]. Urol Oncol, 2014, 32(3): 252–260.
- [9] Cary KC, Cooperberg MR. Biomarkers in prostate cancer surveillance and screening: past, present, and future[J]. Ther Adv Urol, 2013, 5(6): 318–329.
- [10] Prensner JR, Rubin MA, Wei JT, et al. Beyond PSA: the next generation of prostate cancer biomarkers[J]. Sci Transl Med, 2012, 4(127): 127rv3.
- [11] Li XY, Pu WC, Zheng QQ, et al. Proteolysis-targeting chimeras (PROTACs) in cancer therapy[J]. Mol Cancer, 2022, 21(1): 99.
- [12] Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life[J]. EMBO J, 1998, 17(24): 7151–7160.
- [13] Stoeckner PE, Lavabre BT, Henry L, et al. High plasma proteasome levels are detected in patients with metastatic malignant melanoma[J]. Br J Dermatol, 2005, 152(5): 948–953.
- [14] Yang HJ, Zhou P, Huang HB, et al. Shikonin exerts antitumor activity via proteasome inhibition and cell death induction *in vitro* and *in vivo*[J]. Int J Cancer, 2009, 124(10): 2450–2459.
- [15] Piantanelli L, Zaia A, Rossolini G, et al. Long-live euthymic BALB/c-nu mice. I. Survival study suggests body weight as a life span predictor[J]. Mech Ageing Dev, 2001, 122(5): 463–475.
- [16] An B, Goldfarb RH, Siman R, et al. Novel dipeptidyl proteasome inhibitors overcome Bcl-2 protective function and selectively accumulate the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 and induce apoptosis in transformed, but not normal, human fibroblasts[J]. Cell Death Differ, 1998, 5(12): 1062–1075.
- [17] Harmelin A, Danon T, Kela I, et al. Biopsy of the mouse prostate[J]. Lab Anim, 2005, 39(2): 215–220.
- [18] Wada M, Kosaka M, Saito S, et al. Serum concentration and localization in tumor cells of proteasomes in patients with hematologic malignancy and their pathophysiologic significance[J]. J Lab Clin Med, 1993, 121(2): 215–223.
- [19] Lavabre B T, Henry L, Carillo S, et al. Plasma proteasome level is a potential marker in patients with solid tumors and hemopoietic malignancies[J]. Cancer, 2001, 92(10): 2493–2500.
- [20] Dutaud D, Aubry L, Henry L, et al. Development and evaluation of a sandwich ELISA for quantification of the 20S proteasome in human plasma [J]. Immunol Methods, 2002, 260(1/2): 183–193.
- [21] Egerer K, Kuckelkorn U, Rudolph PE, et al. Circulating proteasomes are markers of cell damage and immunologic activity in autoimmune diseases[J]. J Rheumatol, 2002, 29(10): 2045–2052.
- [22] Goldberg AL. Functions of the proteasome: the lysis at the end of the tunnel[J]. Science, 1995, 268(5210): 522–523.
- [23] Chen X, Yang QQ, Xiao L, et al. Metal-based proteasomal deubiquitinase inhibitors as potential anticancer agents[J]. Cancer Metastasis Rev, 2017, 36(4): 655–668.
- [24] Siegel R, Ma J, Zou ZH, et al. Cancer statistics, 2014[J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64(1): 9–29.
- [25] Heidenreich A, Bastian PJ, Bellmunt J, et al. EAU guidelines on prostate cancer. part 1: screening, diagnosis, and local treatment with curative intent—update 2013[J]. Eur Urol, 2014, 65(1): 124–137.
- [26] Ma WL, Kantarjian H, Bekele B, et al. Proteasome enzymatic activities in plasma as risk stratification of patients with acute myeloid leukemia and advanced-stage myelodysplastic syndrome[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(1): 3820–3826.
- [27] Fowler FJ, Barry MJ, Walker CB, et al. The impact of a suspicious prostate biopsy on patients' psychological, socio-behavioral, and medical care outcomes[J]. J Gen Intern Med, 2006, 21(7): 715–721.
- [28] Deng XR, Zhou P, Wei XH, et al. Plasma proteasomal chymotrypsin-like activity correlates with prostate cancer progression[J]. Tumour Biol, 2015, 36(6): 4115–4121.
- [29] Frankland SS, Bhaumik SR. The 26S proteasome complex: an attractive target for cancer therapy[J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1825(1): 64–76.
- [30] Adams J. The proteasome: structure, function, and role in the cell[J]. Cancer Treat Rev, 2003, 29(s1): 3–9.
- [31] Jeremias I, Kupatt C, Baumann B, et al. Inhibition of nuclear factor kappaB activation attenuates apoptosis resistance in lymphoid cells[J]. Blood, 1998, 91(12): 4624–4631.
- [32] Patel NM, Nozaki S, Shortle NH, et al. Paclitaxel sensitivity of breast cancer cells with constitutively active NF-kappaB is enhanced by IkappaBalpha super-repressor and parthenolide[J]. Oncogene, 2000, 19(36): 4159–4169.
- [33] Chen D, Dou QP. The ubiquitin-proteasome system as a prospective molecular target for cancer treatment and prevention[J]. Curr Protein Pept Sci, 2010, 11(6): 459–470.
- [34] Lu C, Li XY, Ren YY, et al. Disulfiram: a novel repurposed drug for cancer therapy[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2021, 87(2): 159–172.
- [35] Li B, Dou QP. Bax degradation by the ubiquitin/proteasome-dependent pathway: involvement in tumor survival and progression[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(8): 3850–3855.
- [36] Kondakova IV, Spirina LV, Koval VD, et al. Chymotrypsin-like activity and subunit composition of proteasomes in human cancers[J]. Mol Biol (Mosk), 2014, 48(3): 444–451.
- [37] Oldziej A, Bolkun L, Galar M, et al. Assessment of proteasome concentration and chymotrypsin-like activity in plasma of patients with newly diagnosed multiple myeloma[J]. Leuk Res, 2014, 38(8): 925–930.
- [38] Krawczuk RM, Leszczynska E, Malinowska I, et al. Proteasome chymotrypsin-like activity in plasma as a useful marker for children with acute lymphoblastic leukemia[J]. Scand J Clin Lab Invest, 2012, 72(1): 67–72.

(责任编辑:冉明会,曾玲)