高等学校化学学报
CHEMICAL JOURNAL OF CHINESE UNIVERSITIES
研究论文

化学酶法解析乳腺癌细胞治疗性早衰进程中线粒体蛋白质*O*-GlcNAc修饰时序性改变

蒋馨雅[1#]，马起乐[2#]，程洪英[3]，刘　寅[3]，
黄　煌[2,4]，赵　然[2]，刘宇博[2]，仲小敏[1,3]
（1. 南京医科大学附属淮安第一医院肿瘤科，淮安 223000；
2. 大连理工大学生命科学与药学系，盘锦 124000；
3. 徐州医科大学附属淮安临床学院肿瘤科，淮安 223000；
4. 艾美诚信生物制药有限公司博士后工作站，大连 116620）

摘要　细胞早性衰老与线粒体功能障碍密切相关. 本文以阿霉素诱导乳腺癌细胞MCF-7构建了治疗性早性衰老细胞模型，采用基于Gal-T1酶(Y289L)的化学酶法标记早衰进程中多个时间点的MCF-7细胞线粒体*O*-GlcNAc糖蛋白质组，通过点击化学反应正交捕获线粒体糖蛋白，利用LC-MS/MS进行非标定量蛋白质组学分析，研究了细胞早性衰老进程中线粒体*O*-GlcNAc糖蛋白的时序性定量变化，并对其进行了生物学功能富集解析，以寻找参与调控乳腺癌细胞早性衰老的线粒体*O*-GlcNAc修饰蛋白，从而解析线粒体*O*-GlcNAc糖基化调控细胞早性衰老的机制.

关键词　化学酶标记；细胞早性衰老；*O*-GlcNAc修饰；蛋白质组学
中图分类号　O657.6；Q51　　**文献标志码**　A　　doi：10.7503/cjcu20250121

Chemical Enzymatic Analysis of Temporal Alterations in Mitochondrial Protein *O*-GlcNAc Modification during the Therapeutic Senescence Process of Breast Cancer Cells

JIANG Xinya[1#], MA Qile[2#], CHENG Hongying[3], LIU Yin[3], HUANG Huang[2,4],
ZHAO Ran[2], LIU Yubo[2*], ZHONG Xiaomin[1,3*]
(*1. Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Huai'an, Nanjing Medical University, Huai'an* 223000, *China*;
2. Department of Life Sciences and Pharmacy, Dalian University of Technology, Panjin 124000, *China*;
3. Department of Oncology, Huai'an Clinical College Affiliated to Xuzhou Medical University, Huai'an 223000, *China*;
4. Postdoctoral Workstation of Dalian Hissen Bio Pharm, Inc., Dalian 116620, *China*)

Abstract　Cellular premature senescence is closely related to mitochondrial dysfunction. In this study, doxorubicin was used to induce breast cancer cells MCF-7 to establish a model of therapeutic premature senescence cells. The

收稿日期：2025-04-23. 网络首发日期：2025-05-25.
联系人简介：仲小敏，女，博士，教授，主要从事肿瘤分子生物学方面的研究. E-mail：13912074971@163.com
刘宇博，男，博士，教授，主要从事化学糖生物学和肿瘤糖生物学的研究. E-mail：liuyubo@dlut.edu.cn
基金项目：徐州医科大学附属医院科技发展基金(批准号：XYFZ202204)和江苏省研究生实践创新计划(批准号：SJCX24_1559)资助.
Supported by the Science and Technology Development Fund of the Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, China(No.XYFZ202204) and the Jiangsu Postgraduate Practice Innovation Program, China(No.SJCX24_1559).
共同第一作者.

chemical enzymatic method based on GalT1 enzyme (Y289L) was employed to label the mitochondrial *O*-GlcNAc glycoproteome of MCF-7 cells at multiple time points during the premature senescence process. Click chemistry reaction was utilized to orthogonally capture mitochondrial glycoproteins. Label-free quantitative proteomics analysis was carried out through LC-MS/MS to investigate the temporal quantitative changes of mitochondrial *O*-GlcNAc glycoproteins during the cellular premature senescence process. Moreover, the biological function enrichment analysis was conducted to identify mitochondrial *O*-GlcNAc modified proteins involved in the regulation of premature senescence of breast cancer cells, and to elucidate the mechanism by which mitochondrial *O*-GlcNAc glycosylation regulates cellular premature senescence.

Keywords Chemoenzymatic labelling method; Cell senescence; *O*-GlcNAcylation; Proteomics

细胞衰老(Cell senescence)是指细胞在内外因素共同作用下，不可逆地脱离细胞周期，进入到增殖停滞状态[1]. 与因端粒缩短所引发的细胞复制性衰老不同，细胞早性衰老(早衰)是由诸如氧化应激、癌基因激活或抑癌基因失活、DNA损伤等外部刺激诱导所致[2]. 在细胞早衰进程中，会伴随产生一系列特征性表型，包括周期阻滞[3]、β-半乳糖苷酶(SA-β-Gal)激活[4]及线粒体功能失调等[5]. 细胞早衰与肿瘤发生发展既密切相关又相互制约[6]. 常见的细胞早衰包括癌基因诱导的细胞衰老[7]、氧化应激诱导的细胞衰老[8]和治疗诱导的细胞早衰[9]. 阿霉素是一种临床常用的抗生素类药物，在多种人类肿瘤疾病治疗中发挥作用[10]. 阿霉素可短时间刺激肿瘤细胞在不杀死细胞的情况下造成其DNA损伤，从而诱导细胞发生早性衰老. 研究细胞早衰的调控机制，既能为更好地阐释细胞衰老在肿瘤发生发展中的作用提供理论基础[11]，还将为寻找治疗肿瘤潜在靶点及预测肿瘤转归提供新的思路和方法.

肿瘤演进过程中伴随着蛋白质O连接*N*-乙酰葡糖胺(*O*-GlcNAc)糖基化的异常[12]. *O*-GlcNAc糖基化是广泛发生在细胞核和线粒体等多种亚细胞结构的蛋白质翻译后修饰，参与几乎所有生理和肿瘤等病理过程的调控[13,14]，由糖基转移酶(OGT)和糖苷酶(OGA)催化修饰和水解蛋白质丝/苏氨酸残基与*O*-GlcNAc基团连接[15~17]. 近年来的研究表明，*O*-GlcNAc糖基化在调控线粒体功能中发挥着重要作用[18,19]，但目前线粒体*O*-GlcNAc修饰在肿瘤细胞早衰中的系统性调控网络尚未明确.

本文以乳腺癌细胞MCF-7为研究对象，使用阿霉素短时刺激构建了DNA损伤诱导的肿瘤细胞早衰模型[20]，通过优化Gal-T1酶(Y289L)的化学酶法标记并富集乳腺癌细胞早衰进程中多时间点的线粒体*O*-GlcNAc糖蛋白用于定量蛋白质谱分析[21]，进而以组学视角解析了细胞治疗性早衰进程中线粒体*O*-GlcNAc修饰蛋白的定量变化[22]，探究了线粒体*O*-GlcNAc糖基化对肿瘤细胞早衰的调控作用.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

乳腺癌细胞MCF-7，中国科学院上海细胞库；Gal-T1(Y289L)酶，中国科学院大连化学物理研究所尹恒研究员课题组馈赠；*N*-糖酰胺酶F(PNGase F)试剂盒，上海Beyotime公司；4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES，1 mol/L)溶液，北京Solarbio公司；澳洲胎牛血清，美国Hyclone公司；青霉素-链霉素抗生素，上海Beyotime公司；DMEM培养基，美国Hyclone公司；磷酸盐缓冲溶液(PBS)，北京Solarbio公司；阿霉素，德国Sigma公司；线粒体裂解液和BCA蛋白定量试剂盒，上海Beyotime公司；三色预染蛋白质marker，美国Thermo Fisher公司；Western Bright™ECL试剂盒，美国Advansta公司；PVDF膜，美国Pall公司；*O*-GlcNAc特异性抗体Mix、*O*-GlcNAc特异性抗体CTD110.6和ATP5B特异性抗体，美国Cell Signaling Technology公司.

Micro 21R型冷冻高速离心机(RHS-C)、Multiskan FC型酶标仪(MPR)和Orbitrap Fusion Tribrid型光谱仪(MS)，美国Thermo Fisher公司；FluorCHEMHD2型化学发光系统(ECLS)，美国ProteinSimple公司；DYY-12型电泳仪(EA)，北京六一生物公司；JY92-IIDN型超声细胞破碎机(UCC)，宁波新芝生物科技有限公司.

1.2 实验过程

1.2.1 Gal-T1(Y289L)化学酶法标记*O*-GlcNAc糖蛋白反应体系的构建及优化 先用PBS缓冲液洗涤细胞并离心收集，再用放射免疫沉淀法裂解缓冲液(RIPA裂解液)重悬细胞，经超声处理后进行蛋白定量；然后通过PNGase F反应去除*N*-乙酰葡萄糖胺，再进行醇沉蛋白，风干后用含1%(质量分数)十二烷基硫酸钠(SDS)的HEPES重悬. 进行Gal-T1(Y289L)酶标记反应，于4 ℃反应16 h. 进行铜(I)催化的叠氮化物炔烃环加成反应(CuAAC)[23]，室温下旋转孵育1 h，随后沉淀蛋白、洗涤干燥，最后用缓冲液重溶用于后续分析. 进行SDS-PAGE电泳分析. 转膜时，先切取分离胶，将聚偏氟乙烯(PVDF)膜激活，同时把滤纸和海绵垫浸泡，然后按顺序铺好并扣紧夹板，在恒流冰水浴条件下电转1 h. 转膜后，用5%(质量分数)脱脂奶粉或5%(质量分数)牛血清白蛋白于室温封闭膜2 h. 抗体孵育阶段，先将一抗稀释后于37 ℃孵育2 h或4 ℃过夜，清洗后加入二抗于室温孵育1 h，再次清洗. 最后，配制ECL显影液显影并保存结果，使用AlphaViewSA软件对结果进行分析.

1.2.2 乳腺癌细胞早性衰老模型的构建 将适量MCF-7细胞铺在六孔板中，待细胞贴壁、状态稳定后向每个孔中加入不同浓度梯度的阿霉素. 刺激细胞一段时间后撤去含阿霉素的培养基，用PBS缓冲液轻柔漂洗细胞3遍，更换无阿霉素的新鲜培养基继续培养细胞. 通过SA-β-Gal染色观察细胞衰老进程，确定最佳诱导浓度和时间. 参照碧云天细胞衰老SA-β-Gal染色试剂盒说明书，使用显微镜观察染色情况并拍照保存.

1.2.3 乳腺癌细胞线粒体蛋白的提取 于冰上制备1×MS溶液[210 mmol/L甘露醇+70 mmol/L蔗糖+5 mmol/L Tris-HCl(pH=7.5)+1 mmol/L EDTA(pH=7.5)]，2.5×MS溶液[525 mmol/L甘露醇+175 mmol/L蔗糖+12.5 mmol/L Tris-HCl(pH=7.5)+2.5 mmol/L EDTA(pH=7.5)]和RSB缓冲液[10 mmol/L NaCl+1.5 mmol/L $MgCl_2$+10 mmol/L Tris-HCl(pH=7.5)]. 将细胞用胰酶从培养皿上消化下来，细胞沉淀用11 mL RSB缓冲液重悬，在低渗溶液中膨胀5~10 min，接着用匀浆器匀浆. 迅速加入8 mL 2.5×MS缓冲液以恢复等渗条件，将样品管颠倒混合均匀. 用1×MS缓冲液调整体积至30 mL，在4 ℃，1300*g*条件下离心5 min，将上层清液转移至离心管中，弃去沉淀，重复2次. 获取的上层清液在16000*g*条件下离心15 min，弃去上层清液. 将沉淀用1×MS重悬，在16000*g*条件下离心15 min，洗涤后弃去上层清液，所得沉淀为线粒体. 向线粒体沉淀中加入适量添加了PMSF的线粒体裂解液，在4 ℃，12000 r/min条件下离心10 min得到线粒体蛋白溶液. 对提取的蛋白溶液进行免疫印迹，以验证线粒体蛋白富集是否成功.

1.2.4 细胞早衰进程中*O*-GlcNAc糖基化蛋白的富集 提取乳腺癌细胞早性衰老模型中诱导衰老后0，24，72和120 h的线粒体蛋白，进行BCA定量. 分别向4种蛋白溶液中加入100 mmol/L $MnCl_2$、5 mmol/L UDP-*N*-叠氮氨基乙酰半乳糖二钠(UDP-GalNAz. 2Na)、Gal-T1 (Y289L)酶溶液和10 mmol/L Tris-HCl缓冲液(pH=8.0)，进行化学酶标记反应[24]，于4 ℃反应16 h. 待酶标记反应结束后，向每个反应体系中依次加入100 mmol/L炔烃探针、100 mmol/L BTTAA、50 mmol/L $CuSO_4$、1.25 mol/L抗坏血酸钠(现用现配)和50×蛋白酶抑制剂(50×Cocktail)，室温下进行点击化学反应2 h. 反应完成后，每2 mg蛋白加入800 μL甲醇，于−80 ℃放置1 h. 在4 ℃，8000*g*条件下离心5 min，用1 mL冰冷甲醇洗涤2次. 随后，将蛋白重悬于含1.2%(质量分数)SDS的1 mL PBS缓冲液中. 将链霉亲和素磁珠用PBS缓冲液[含0.05%(体积分数)Tween-20]洗涤3次，每次5 min. 将洗好的磁珠与前述步骤中得到的蛋白溶液混合于EP管中，将EP管置于旋转混匀仪上，室温下反应2 h. 反应结束后，用磁力架收集珠子并弃去上层清液，用PBS缓冲液洗涤3次，每次10 min. 将磁珠洗涤后预留一部分，加入适量2×Loading buffer，置于沸水浴中煮10 min使蛋白变性，于−20 ℃保存，用于后续被富集蛋白的*O*-GlcNAc糖基化鉴定.

1.2.5 细胞早衰进程中*O*-GlcNAc糖基化蛋白的质谱分析 样品经真空干燥后，将其溶解在纯水或有机溶剂中，经过适当的净化和前处理后即可进入后续质谱分析. 通过与Orbitrap Fusion Tribrid光谱仪相连接的纳米LC系统进行分析. 将肽段样品装入一个内部长10 cm的分析柱中，该分析柱用3 mm的C_{18}树脂包装，使用流动相A[0.1%(质量分数)甲酸]. 然后，使用流动相B(ACN/0.1%甲酸)梯度洗脱分

离多肽：0~35%B，30 min；35%~80%B，10 min；80%B，10 min，流速300 nL/min. 质谱仪操作采用Orbitrap模式. MS1光谱以最高速度的数据依赖方式收集，在2次重复的激活事件后动态排除前体20 s. 数据依赖的采集HCD光谱用28个NCE收集. EThcD在高压线性离子阱中进行，ETD的优化反应时间为50 ms，补充25%的碰撞能量. 使用Proteome Discoverer 2.2对原始数据与Uniprot人类数据库进行搜索. 选取胰蛋白酶作为蛋白酶，最多允许有2次错误裂解. 肽段以≥95%的置信度标识，并以1%的错误率进行过滤.

1.2.6 *LC-MS/MS结果的生物信息学分析* 使用MaxQuant(v1.5.3.28)软件对LC-MS/MS返回的raw格式文件进行分析. 在SwissProt Human数据库(20379个序列)中搜索串联质谱，此数据库包含反向诱饵数据库以及常见污染物的蛋白序列，可同时去反库去污染. 设置裂解酶为Trypsin，最多允许丢失2个裂解物，每个肽有5个修饰和5个电荷. 固定修饰调整为胱氨酸上的氨基甲酰甲基化，可变修饰调整为蛋氨酸氧化和蛋白N端的乙酰化修饰. 蛋白质、肽和修饰位点的错误发现率(FDR)阈值设定为0.01，最小肽长度设置为7. 其它MaxQuant中的参数均设置为默认值. 本研究的数据分析满足蛋白质差异水平表达倍数变化≥2且P≤0.05(t检验)，FDR临界值为0.05. 利用Metascape软件进行蛋白亚线粒体定位分析和GO功能注释分析；利用Kobas软件进行KEGG通路富集分析；使用R软件进行其它生物信息学分析.

1.2.7 *乳腺癌细胞早衰进程中ATP5B的功能分析* 提取细胞全蛋白，按照抗体使用说明书中的推荐方法稀释浓度，加入抗体和蛋白酶抑制剂，于4 ℃反应12 h使蛋白与抗体偶联. 将ProteinA/G磁珠清洗3次后加入蛋白抗体偶联物，于4 ℃反应3~4 h，形成蛋白-抗体-磁珠复合物. 反应结束后，用Tris-盐酸缓冲盐溶液TBST[含0.1%~0.2%(体积分数) tween-20]清洗磁珠3次. 向清洗后的磁珠中加入2×SDS-PAGE loading buffer，于沸水浴中煮10 min使蛋白变性与磁珠分离. 提取细胞全蛋白，将sWGA珠子清洗3次后[25]，加入至蛋白裂解液中，于4 ℃反应12 h，形成蛋白-珠子复合物. 反应结束后，收集珠子，用PBS缓冲液清洗珠子3次. 向清洗后的珠子中加入2×SDS-PAGE loading buffer，于沸水浴中煮10 min使蛋白变性从sWGA珠子上解离下来. 将适量MCF-7细胞铺在六孔板中，待细胞生长至密度约为70%且状态较好时，将培养基更换为Opti-MEM诱导培养基，置于细胞培养箱中继续培养2 h. 将ATP5B siRNA稀释后加入Lipo2000转染试剂稀释液中，室温下静置20 min. 静置结束后，将混合液加入六孔板中，每孔加250 μL混合液，置于细胞培养箱中继续培养6 h. 之后，更换正常DMEM培养基，置于培养箱中继续培养48 h. 检测提取的细胞蛋白ATP5B的表达情况.

2 结果与讨论

2.1 乳腺癌细胞线粒体*O*-GlcNAc糖蛋白的Gal-T1(Y289L)化学酶法标记反应体系的优化及治疗性早衰模型的构建

为系统解析*O*-GlcNAc糖基化的衰老调控功能，本研究采用化学酶标记策略，具体步骤为收集早衰模型中不同衰老时间点的细胞蛋白(包括总蛋白和线粒体蛋白)，使用Gal-T1 (Y289L)酶进行化学酶标记，在*O*-GlcNAc糖蛋白上添加叠氮基团，通过点击反应(Click反应)，使用链霉亲和素磁珠富集，获取*O*-GlcNAc糖蛋白，用于进一步的免疫印迹和定量质谱分析[图1(A)].

为探究原核表达纯化的Gal-T1(Y289L)酶的催化活性，以乳腺癌细胞MCF-7全细胞裂解液总蛋白为反应底物，添加UDP-GalNAz为底物糖供体，后续利用点击化学反应将*O*-GlcNAc糖蛋白与Biotin-炔烃连接，通过改变Gal-T1(Y289L)酶用量，在相同反应时间条件下初步检测Gal-T1(Y289L)酶对样品蛋白中的*O*-GlcNAc修饰的标记情况. 通过链霉亲和素印迹观察到，随着GalT1(Y289L)酶用量的增加，检测到的总蛋白*O*-GlcNAc修饰呈增加趋势，证明Gal-T1(Y289L)酶具有催化活性，标记效率与酶用量呈正相关，可用于标记蛋白质的*O*-GlcNAc糖基化[图1(B)]. 进一步利用阿霉素(DOX)短时间处理MCF-7细胞6 h，对提取总蛋白分别利用*O*-GlcNAc特异性抗体与Gal-T1(Y289L)化学酶法检测*O*-GlcNAc糖基化. 结果显示，2种方法均检测到乳腺癌细胞总蛋白的*O*-GlcNAc糖基化在给药后发生上

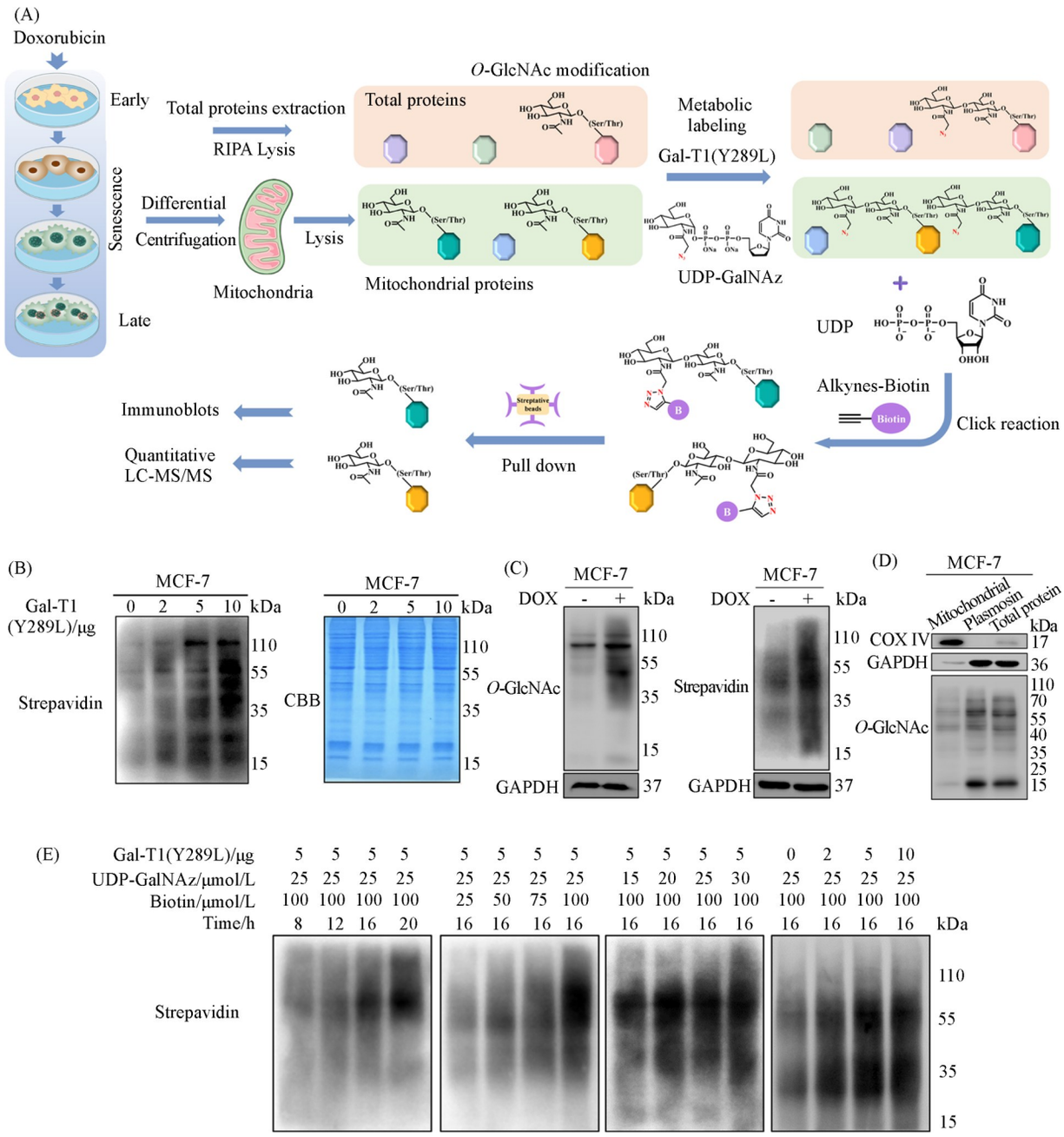


Fig. 1 Validation and optimization of the chemoenzymatic reaction system for labeling *O*-GlcNAc glycoproteins using Gal-T1(Y289L)

(A) Chemoenzymatic labelling methods technology roadmap; (B) SDS-PAGE analysis for the detection of *O*-GlcNAcylation in human breast cancer cells; left: immunoblot analysis of *O*-GlcNAc glycoprotein in human breast cancer cells by chemoenzymatic assay; right: coomassie brilliant blue staining; (C) immunoblot analysis of *O*-GlcNAcylation in human breast cancer cells by antibody and chemoenzyme assay; left: *O*-GlcNAc specific antibody mix; right: chemoenzymatic assay; (D) purity verification of extracted mitochondrial proteins and *O*-GlcNAc glycosylation modification verification; (E) analysis of *O*-GlcNAcylation in the mitochondria of human breast cancer cells based on chemoenzymatic methods.

调，提示原核表达纯化的Gal-T1(Y289L)酶可以用于蛋白质*O*-GlcNAc糖基化的定量分析[图1(C)]. 为了进一步探究线粒体糖蛋白化学酶法标记及后续点击化学反应的最优条件，提取了MCF-7细胞的线粒体，并将其裂解获取蛋白. 对提取所得线粒体的纯度以及线粒体蛋白的*O*-GlcNAc糖基化进行了验证，经过免疫印记检测，发现线粒体标志物细胞色素c氧化酶IV(COX IV)出现在提取的线粒体蛋白和总蛋

白中，而GAPDH作为胞浆标志物则只出现在胞浆蛋白和总蛋白中，证明成功实现了对纯净线粒体的富集，并且线粒体中具有与胞浆蛋白和细胞总蛋白不同的*O*-GlcNAc修饰[图1(D)]. 实验中还通过控制反应体系中的UDP-GalNAz用量、Biotin-炔烃用量、Gal-T1(Y289L)酶用量以及酶反应时间进行实验条件的优化[图1(E)]. 链霉亲和素印迹结果显示，每200 μL Gal-T1(Y289L)化学酶法标记反应体系(150 μg线粒体蛋白底物)，使用5 μg Gal-T1(Y289L)酶、25 μmol/L UDP-GalNAz和100 μmol/L Biotin-炔烃探针反应16 h，即可获得最佳的标记效果，可用于后续早衰模型的标记.

为了构建乳腺癌细胞治疗性早衰模型，首先对诱导衰老条件中阿霉素的浓度和诱导细胞时间进行了探索[图2(A)]. 未加入阿霉素的对照组细胞生长迅速，而加入不同浓度阿霉素诱导2 h的实验组均出现增殖停滞现象. 随着阿霉素使用浓度的增加，细胞衰老标志物SA-β-Gal的染色程度逐渐加深，证明早衰诱导成功. 然而，过高浓度(1200 nmol/L)的阿霉素刺激则会导致MCF-7细胞在继续培养120 h后大量死亡. 使用1000 nmol/L阿霉素诱导细胞不同时间同样影响早衰表型的出现[图2(C)]. 诱导1 h虽然会引起细胞应激，但细胞并未出现衰老表型；而刺激时间过长(4 h)细胞则会出现大量死亡. 通过显微镜观察可见，SA-β-Gal染色阳性的细胞形态发生改变，体积变大，呈平摊状，细胞核变大且胞内出现多核现象. 基于此，最终确定以1000 nmol/L阿霉素诱导MCF-7细胞2 h为条件构建MCF-7治疗性早衰模型. 在此条件下，检测了MCF-7早衰模型诱导后继续培养0~120 h的细胞衰老标志蛋白p53，p21和p16的表达情况，结果均显示表达水平明显升高[图2(B)]，证明乳腺癌细胞MCF-7的治疗性早衰模型已构建成功.

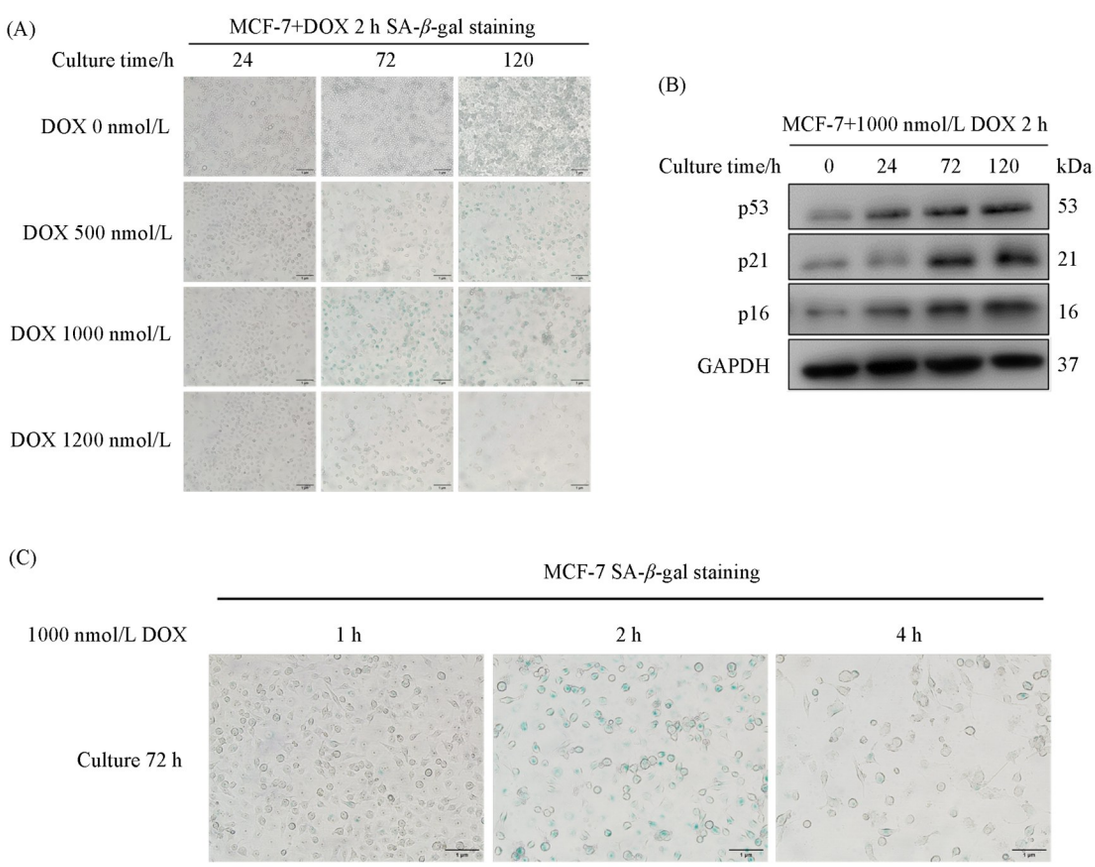


Fig. 2 Exploration of induction conditions for a premature senescence model in breast cancer cells and validation by Western blotting

(A) Exploration of the concentration of drug administration in the construction of breast cancer cell premature senescence model; (B) analysis of the expression levels of senescence-related marker proteins in the early senescence model of breast cancer cells; (C) exploration of the time of drug administration in the construction of breast cancer cell premature senescence mode.

2.2 化学酶法解析乳腺癌细胞早衰进程中的线粒体*O*-GlcNAc糖蛋白

为了深入探究*O*-GlcNAc糖基化在乳腺癌细胞治疗性早衰进程中的作用，首先使用*O*-GlcNAc糖基化特异性抗体CTD110.6[26]，检测了诱导衰老后0~120 h的乳腺癌细胞线粒体蛋白*O*-GlcNAc糖基化水平的改变. 结果表明，随着细胞治疗性早衰程度加深，线粒体蛋白的*O*-GlcNAc糖基化水平呈显著升高趋势，同时伴随线粒体*O*-GlcNAc糖基转移酶(mOGT)表达上调[图3(A)]，提示*O*-GlcNAc修饰可能通过调控线粒体功能参与细胞早衰进程.

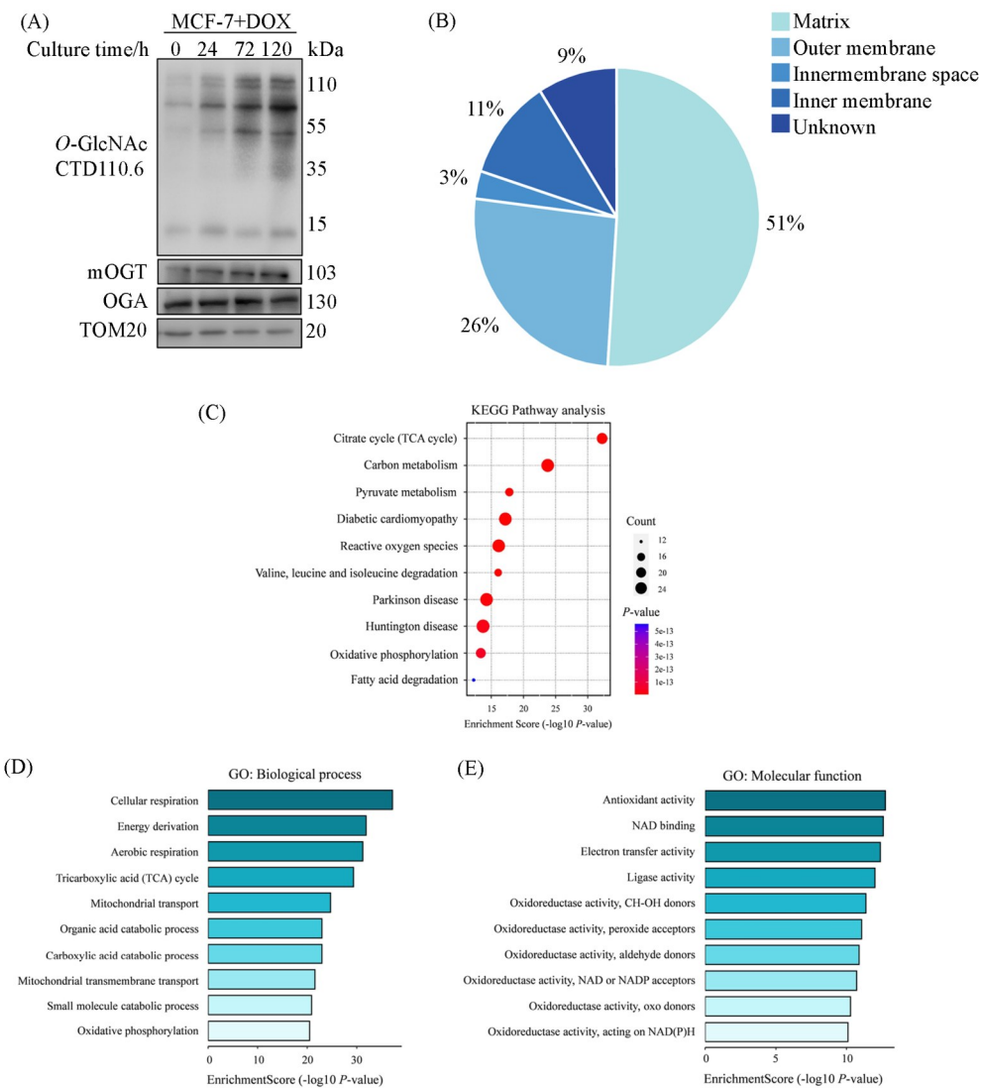


Fig. 3 Mitochondrial *O*-GlcNAc glycoproteins orchestrate premature senescence in breast cancer cells: subcellular distribution and functional profiling

(A) Mitochondrial *O*-GlcNAc-modified proteins are involved in regulating early senescence in breast cancer cells; (B) distribution of subcellular localization of 188 *O*-GlcNAc glycosylated proteins; (C) the horizontal axis indicates the enrichment significance *P*-value, the vertical axis is the KEGG pathway description, and the size of the points indicates the number of proteins contained in each KEGG pathway; (D), (E) GO functional annotation of 188 *O*-GlcNAc glycosylated proteins; (D) biological process; (E) molecular function.

为了系统解析*O*-GlcNAc修饰的线粒体蛋白组，进一步采用化学酶标记法标记富集并使用串联质谱(LC-MS/MS)分析. 首先，通过Gal-T1(Y289L)酶将GalNAz标记至乳腺癌细胞的*O*-GlcNAc修饰蛋白上，分离细胞线粒体，继而通过CuAAC点击化学反应偶联炔烃探针实现生物素化，最终利用链霉亲和素磁珠富集目标蛋白. 对治疗性早衰模型中诱导衰老后0，24，72和120 h的线粒体*O*-GlcNAc糖基化蛋白样品进行了非标定量LC-MS/MS分析[27]，每组设置3次生物学重复. 通过比对人类蛋白质数据库

(Swiss-Prot人类数据库20379序列)，共鉴定到唯一肽段数≥2的蛋白数量为578. 经Perseus软件筛选高置信度蛋白后(任一时间点3次生物学重复实验中鉴定到2次)，最终鉴定到255个*O*-GlcNAc修饰蛋白，进一步结合人类线粒体数据库(MitoCarta 3. 0)，共获得188个线粒体定位糖蛋白(见本文支持信息表S1).

亚线粒体定位注释分析结果显示，这些蛋白主要定位于线粒体基质和线粒体内膜[图3(B)]. GO功能富集分析显示，这些线粒糖蛋白中42. 6%(80个)与三羧酸循环和呼吸电子传递链高度相关，26. 6%的蛋白(50个)参与线粒体建构，44. 1%的蛋白(83个)与核苷酸代谢功能相关. 此外，还参与到蛋白质定位、单羧酸代谢、丙酮酸代谢、小分子生物合成及线粒体发生等生物过程中[图3(C)和(D)].

上述结果表明，线粒体*O*-GlcNAc糖蛋白参与众多线粒体功能调控，对线粒体活性可能具有重要影响，进而可能与线粒体参与的治疗性早衰进程存在密切联系. 据文献[28]报道，细胞治疗性早衰进程中能量代谢会发生显著改变，线粒体数量代偿性增加但功能受损，同时线粒体DNA(mtDNA)的损伤和突变会通过正反馈机制加速衰老进程. 与此相对应，本研究利用化学酶法鉴定到的188个线粒体*O*-GlcNAc修饰蛋白经KEGG通路富集分析显示，主要富集于包括三羧酸循环、氧化磷酸化、脂肪酸降解、丁酸代谢和丙酮酸代谢等能量代谢相关的通路[图3(E)]. 这些结果表明，参与线粒体能量代谢及细胞早衰关键通路的线粒体蛋白普遍存在*O*-GlcNAc糖基化，提示这一单糖修饰可能通过动态调控线粒体功能参与细胞衰老进程.

2.3 化学酶法定量蛋白质组学揭示线粒体蛋白*O*-GlcNAc糖基化时序性改变参与治疗性早衰的能量代谢

为系统解析线粒体*O*-GlcNAc修饰蛋白在治疗性衰老进程中的变化规律，基于化学酶法非标定量蛋白质组学数据，对线粒体*O*-GlcNAc修饰蛋白进行了时序性定量分析. 统计结果[图4(A)]显示，0 h

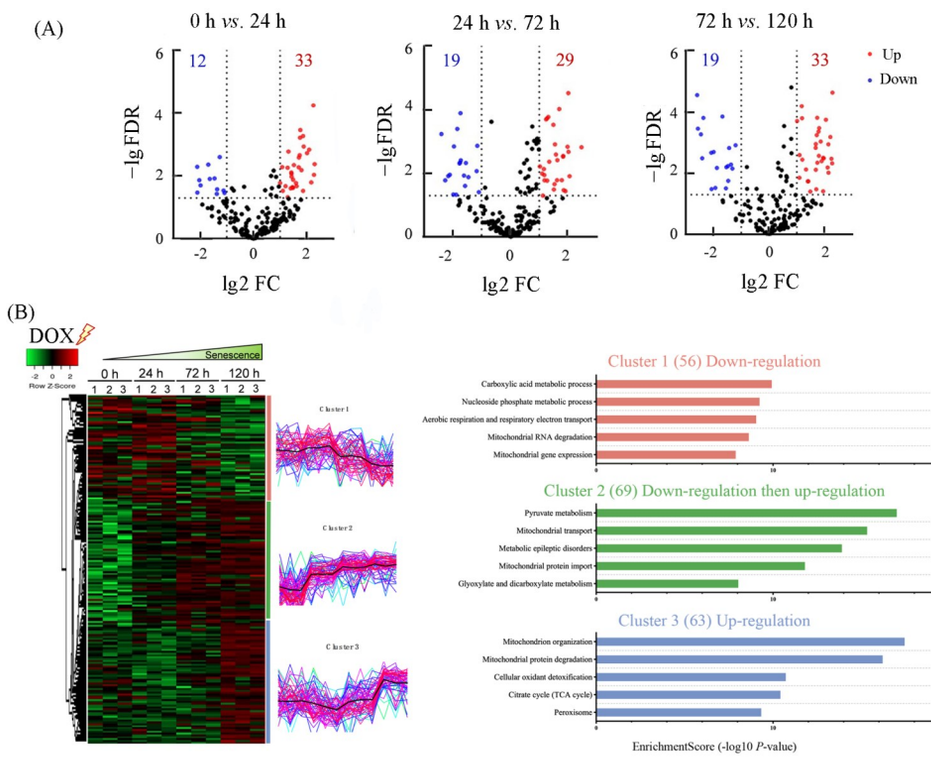


Fig. 4 Integrated analysis of differential expression and functional profiling of *O*-GlcNAc glycosylated proteins based on volcano plot and clustering analysis

(A) Differential protein volcano map; (B) clustering analysis of 188 *O*-GlcNAc glycosylated proteins; left: a cluster analysis of the protein; right: enrichment analysis of signaling pathways for each group of proteins analyzed by clustering separately.

组与24 h组中共鉴定出45个定量均值差异≥2倍的蛋白(FDR≤0. 05，33个显著上调，12个显著下调)；24 h组与72 h组中共鉴定出48个定量均值差异≥2倍的蛋白(FDR≤0. 05，29个显著上调，19个显著下调)；72 h组与120 h组中共鉴定出52个定量均值差异≥2倍的蛋白(FDR≤0. 05，33个显著上调，19个显著下调).

进一步通过聚类分析188个线粒体*O*-GlcNAc修饰蛋白的定量信息动态变化模式，发现了3类典型变化趋势：56个蛋白随衰老进程持续下调，69个呈现先降后升的双相变化，63个表现为持续上调(见本文支持信息表S2). 为明确这3类具有不同表达趋势的蛋白的生物学功能，对3类典型变化趋势聚类糖蛋白进行了GO功能富集分析. 结果显示，3组蛋白分别显著富集在能量代谢整合、三羧酸循环及呼吸电子传递链等通路，提示这些糖蛋白参与的通路与细胞治疗性早衰进程密切相关[图4(B)]. 线粒体*O*-GlcNAc糖蛋白可能通过调控这些关键通路参与细胞衰老进程.

2.4 线粒体蛋白ATP5B的*O*-GlcNAc修饰参与调控乳腺癌细胞治疗性早衰

为进一步验证化学酶法定量分析蛋白质谱数据所得结果的可靠性，选取质谱定量上调的线粒体呼吸链蛋白ATP5B进行后续分析. ATP5B是线粒体ATP合酶的重要亚基，参与线粒体呼吸链的最终步骤[29]. 通过ATP5B免疫共沉淀实验(co-IP)富集线粒体目标蛋白后，采用*O*-GlcNAc糖基化特异性抗体(MultiMab mix)检测ATP5B糖基化水平. 免疫印迹结果显示，在治疗性早衰进程中ATP5B总蛋白水平保持稳定，但其*O*-GlcNAc糖基化修饰水平随衰老进程呈现时序性上调[图5(A)]，与质谱鉴定结果一致，表明在衰老进程中大部分ATP5B发生*O*-GlcNAc修饰.

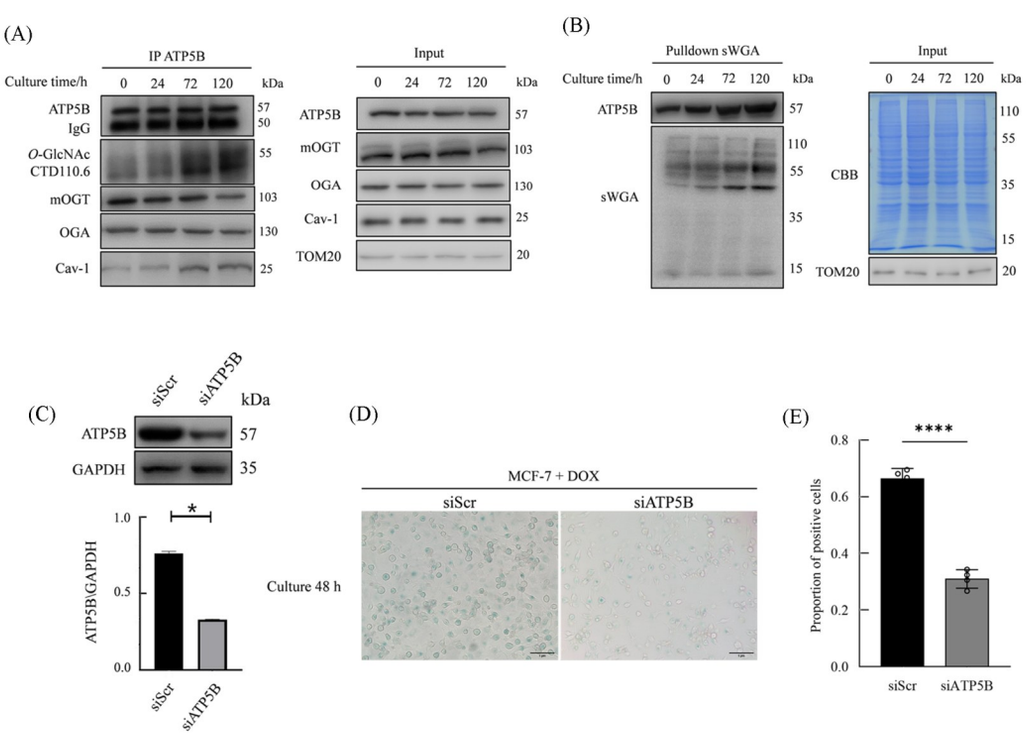


Fig. 5 Characterization of *O*-GlcNAc-modified ATP5B and its functional role in cellular processes

(A) Validation of *O*-GlcNAc modification of ATP5B; left: *O*-GlcNAc glycosylation signal of this protein and its interaction with related proteins by Western blotting using ATP5B specific antibody IP protein; right: Western blotting to detect the expression of Input group-related proteins; (B) sWGA validates the *O*-GlcNAc modification of ATP5B; left: ATP5B signal detected by Western blotting using sWGA IP *O*-GlcNAc glycosylated protein; right: detection of Input histone expression by Komas Brilliant Blue staining; (C) Western blotting to detect the efficiency of siRNA knockdown of ATP5B; (D) validation of the biological function of ATP5B, SA-β-Gal staining after transfection of ATP5B-siRNA induced cell senescence for 48h; (E) the proportion of SA-β-Gal staining positive cells.

进一步分析显示，ATP5B与线粒体糖基转移酶mOGT的互作随衰老进程有增强趋势，与糖苷酶OGA的相互作用水平基本恒定. 据文献[30]报道，窖蛋白-1(Caveolin-1，Cav-1)可能以分泌型形式存在于线粒体中，通过抑制丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)活性或与p53抑制剂Mdm2结合，从而抑制细胞生长并诱导细胞衰老. 基于此，本研究检测了线粒体内*O*-GlcNAc修饰的ATP5B与Cav-1随细胞治疗性早衰进程的互作水平变化. 结果显示，二者互作水平随着衰老程度的加深显著增强[图5(A)]，提示*O*-GlcNAc糖基化可能通过影响ATP5B与其它蛋白的相互作用在衰老进程中发挥功能.

实验中使用特异性结合*O*-GlcNAc的凝集素琥珀酰化小麦胚芽凝集素(sWGA)偶联的琼脂糖凝珠富集全细胞*O*-GlcNAc糖蛋白，同时使用ATP5B抗体检测了被富集的*O*-GlcNAc修饰ATP5B水平变化. 免疫印迹结果显示，在细胞治疗性早衰进程中，全细胞*O*-GlcNAc修饰水平随着衰老增加，ATP5B的糖基化信号同样呈现上调趋势[图5(B)]，与质谱定量结果一致.

为进一步探究乳腺癌细胞治疗性早衰进程中*O*-GlcNAc修饰的ATP5B发挥的生物学功能，使用ATP5B的siRNA敲低ATP5B表达水平，通过SA-β-Gal染色探究了乳腺癌治疗性早衰表型是否发生变化. 使用ATP5B的siRNA转染乳腺癌MCF-7细胞，继而检测细胞内的ATP5B表达水平. 对比Control组与siRNA转染组ATP5B蛋白表达的免疫印迹条带及其灰度值分析(*P<0.05)，发现siRNA显著敲低了ATP5B的表达[图5(C)]. 转染6 h后更换培养基，加入低浓度阿霉素诱导MCF-7治疗性早衰，2 h后更换正常培养基并继续培养. 由于siRNA的有效敲低时间最长约为48 h，因此选择转染ATP5B的siRNA并诱导衰老后48 h的细胞进行SA-β-Gal染色[图5(D]. 与未敲低ATP5B直接诱导衰老的细胞相比，敲低ATP5B后诱导衰老细胞的SA-β-Gal染色阳性细胞/总体细胞的比值明显减少，表明敲低*O*-GlcNAc修饰的ATP5B后可以抑制细胞治疗性早衰表型[图5(E)]. 基于以上结果初步推测，ATP5B及其*O*-GlcNAc糖基化在乳腺癌细胞治疗性早衰进程中发挥着重要作用.

3 结　论

利用化学酶法探究了线粒体蛋白的*O*-GlcNAc糖基化在肿瘤细胞治疗性早衰进程中的作用机制. 基于化学酶法标记并富集了MCF-7细胞早衰进程中多个时间点的*O*-GlcNAc糖蛋白，通过LC-MS/MS技术对糖蛋白进行定性、定量分析. 共鉴定到与治疗性早衰有关的188个*O*-GlcNAc糖基化的线粒体蛋白. 其中，56个*O*-GlcNAc修饰蛋白随着衰老表达下调，69个蛋白呈现下调再上调的趋势，63个蛋白质表达上调. 进一步通过蛋白功能聚类分析发现，定量变化的线粒体糖蛋白参与能量代谢、线粒体生物发生等与细胞治疗性早衰密切相关的生物学过程，提示*O*-GlcNAc糖基化通过影响这些蛋白的功能参与线粒体功能障碍调控过程，进而在肿瘤细胞治疗性早衰调控中发挥作用.

通过对化学酶法定量蛋白质谱结果进一步分析，筛选得到在乳腺癌细胞早衰进程中持续上调的线粒体呼吸链*O*-GlcNAc修饰蛋白ATP5B. 免疫沉淀和凝集素印迹实验证明，ATP5B存在*O*-GlcNAc糖基化并与OGT蛋白发生互作. 同时，在细胞治疗性早衰进程中，ATP5B的*O*-GlcNAc糖基化水平呈现出增强的趋势，表明ATP5B在治疗性早衰进程中可能起到促进作用. 通过敲低ATP5B表达水平，证实了减低*O*-GlcNAc修饰的ATP5B表达对乳腺癌细胞治疗早衰表型具有明显的抑制作用.

未来可以通过化学酶法结合可剪切的Biotin-炔烃linker，获取乳腺癌细胞早性衰老模型中不同时间点线粒体糖蛋白的*O*-GlcNAc糖肽，对细胞早衰进程中线粒体*O*-GlcNAc修饰蛋白进行的糖基化位点进行组学水平的定量分析. 进而获得包括ATP5B在内的众多糖蛋白位点信息，实现位点特异性改变线粒体糖蛋白的*O*-GlcNAc糖基化修饰水平，观察细胞衰老表型的改变，进一步深入探究包括ATP5B在内的线粒体蛋白糖基化对细胞衰老产生影响的分子机制.

综上所述，本文研究结果揭示了线粒体蛋白*O*-GlcNAc修饰对肿瘤细胞治疗性早衰的调控作用，证实线粒体呼吸链因子ATP5B的*O*-GlcNAc糖基化在此过程中发挥重要作用. 所得结果为深入阐释*O*-GlcNAc糖基化修饰的线粒体蛋白在肿瘤细胞治疗性早衰进程中的作用机制提供了实验依据和理论基础.

支持信息见http://www.cjcu.jlu.edu.cn/CN/10.7503/cjcu20250121.

参 考 文 献

[1] Chaib S., Tchkonia T., Kirkland J. L., *Nat. Med.*, **2022**, *28*(8), 1556—1568
[2] Huang W., Hickson L. T. J., Eirin A., Kirkland J. L., Lerman L. O., *Nat. Rev. Nephrol.*, **2022**, *18*(10), 611—627
[3] Di Micco R., Krizhanovsky V., Baker D., di Fagagna F. D., *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.*, **2021**, *22*(2), 75—95
[4] Hu B. T., Xing Y., Li Y., Li F., *Chin. J. Biochem. Mol. Biol.*, **2021**, *37*(4), 495—503
[5] Hayflick L., Moorhead P. S., *Exp. Cell. Res.*, **1961**, *25*(3), 585—621
[6] Schmitt C. A., Wang B. S., Demaria M., *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, **2022**, *19*(10), 619—636
[7] Chan A. S. L., Zhu H. R., Narita M., Cassidy L. D., Young A. R. J., Bermejo-Rodriguez C., Janowska A. T., Chen H. C., Gough S., Oshimori N., Zender L., Aitken S. J., Hoare M., Narita M., *Nature*, **2024**, *633*(8030), 678—685
[8] Kim Y. H., Choi Y. W., Lee J., Soh E.Y., Kim J. H., Park T. J., *Nat. Commun.*, **2017**, *8*, 15208
[9] Serrano M., Lin A. W., McCurrach M. E., Beach D., Lowe S. W., *Cell*, **1997**, *88*(5), 593—602
[10] Sritharan S., Sivalingam N., *Life Sci.*, **2021**, *278*, 119527
[11] Wang L. Q., Lankhorst L., Bernards R., *Nat. Rev. Cancer*, **2022**, *22*(6), 340—355
[12] Ma J. F., Hart G. W., *Clin. Proteomics*, **2014**, *11*, 8
[13] Meng L. H., Zhang W., Wang J. J., *Chin. J. Biochem. Mol. Biol.*, **2024**, *40*(4), 463—473
[14] Wulff-Fuentes E., Berendt R. R., Massman L., Danner L., Malard F., Vora J., Kahsay R., Stichelen S. O. V., *Sci. Data*, **2021**, *8*(1), 25
[15] Ma J. F., Hou C. Y., Wu C., *Chem. Rev.*, **2022**, *122*(20), 15822—15864
[16] Saha A., Bello D., Fernández-Tejada A., *Chem. Soc. Rev.*, **2021**, *50*(18), 10451—10485
[17] Lubas W. A., Frank D. W., Krause M., Hanover J. A., *J. Biol. Chem.*, **1997**, *272*(14), 9316—9324
[18] Trapannone R., Mariappa D., Ferenbach A. T., van Aalten D. M. F., *Biochem. J.*, **2016**, *473*(12), 1693—1702
[19] Dontaine J., Bouali A., Daussin F., Bultot L., Vertommen D., Martin M., Rathagirishnan R., Cuillerier A., Horman S., Beauloye C., Gatto L., Lauzier B., Bertrand L., Burelle Y., *Commun. Biol.*, **2022**, *5*(1), 349
[20] Gao Y. Y., Wu T., Tang X. A., Wen J. Y., Zhang Y., Zhang J. J., Wang S. X., *Geroscience*, **2023**, *45*(3), 1775—1790
[21] Jia F. Y., Jiang T., Xu W., *Chem. Res. Chinese Universities*, **2025**, *41*(2), 211—221
[22] Yu Y. L., Fan J. H., Liu H. H., Nie Z. X., *Chem. Res. Chinese Universities*, **2025**, *41*(2), 254—265
[23] Hein J. E., Fokin V. V., *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, *39*(4), 1302—1315
[24] Pan Y. B., Tang W., Fan W. P., Zhang J. M., Chen X. Y., *Chem. Soc. Rev.*, **2022**, *51*(23), 9759—9830
[25] Kubota Y., Fujioka K., Takekawa M., *PLoS One*, **2017**, *12*(7), e0180714
[26] Zou L. Y., Zhang D. G., Ha C. M., Wende A. R., Chatham J. C., *Am. J. Physiol. Heart C*, **2023**, *325*(4), H601—H616
[27] Yang W. M., Tian E., Chernish A., McCluggage P., Dalal K., Lara A., Ten Hagen K. G., Tabak L. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2023**, *120*(43), e2303703120
[28] Victorelli S., Salmonowicz H., Chapman J., Martini H., Vizioli M. G., Riley J. S., Cloix C., Hall-Younger E., Espindola-Netto J. M., Jurk D., Lagnado A. B., Gomez L. S., Farr J. N., Saul D., Reed R., Kelly G., Eppard M., Greaves L. C., Dou Z. X., Pirius N., Szczepanowska K., Porritt R. A., Huang H. J., Huang T. Y., Mann D. A., Masuda C. A., Khosla S., Dai H. M., Kaufmann S. H., Zacharioudakis E., Gavathiotis E., LeBrasseur N. K., Lei X., Sainz A. G., Korolchuk V. I., Adams P. D., Shadel G. S., Tait S. W. G., Passos J. F., *Nature*, **2023**, *622*(7983), 627—636
[29] Hu Y. H., Zheng Y. J., Liu C., You Y. Y., Wu Y., Wang P. X., Wu Y. Y., Ba H. J., Lu J., Yuan Y. Q., Liu P. Q., Mao Y., *Cell Rep.*, **2024**, *43*(10), 114839
[30] Wang Y., Li Y. Q., Zhong J. P., Li M., Zhou Y. J., Lin Q., Zong S. W., Luo W. T., Wang J. Y., Wang K. Q., Wang J., Xiong L. X., *Theranostics*, **2023**, *13*(5), 1684—1697

(Ed.: L, V, K)