

# O-GlcNAc 糖基化修饰在糖尿病性白内障中的作用

罗茜, 杨聪聪, 景刘洁, 张春巍

引用: 罗茜, 杨聪聪, 景刘洁, 等. O-GlcNAc 糖基化修饰在糖尿病性白内障中的作用. 国际眼科杂志, 2024, 24(12): 1882-1887.

基金项目: 黑龙江省自然科学基金 (No.LH2020H041); 黑龙江省残疾人福利基金会资助项目 (No.2023IIT088); 哈尔滨医科大学附属第一医院科研创新基金 (No.2020M23)

作者单位: (150000) 中国黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属第一医院眼科

作者简介: 罗茜, 哈尔滨医科大学硕士研究生, 研究方向: 青光眼、白内障。

通讯作者: 张春巍, 博士, 博士后, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 白内障、青光眼. [zcw1229@163.com](mailto:zcw1229@163.com)

收稿日期: 2024-04-27 修回日期: 2024-10-30

## 摘要

**目的:** 分析 O-连接 N-乙酰氨基葡萄糖 (O-GlcNAc) 修饰在年龄相关性白内障和糖尿病性白内障晶状体前囊膜中的表达变化, 探讨 O-GlcNAc 糖基化修饰在糖尿病性白内障中的作用。

**方法:** 以糖尿病性白内障患者 54 例 56 眼和年龄相关性白内障患者 115 例 120 眼的晶状体前囊膜为研究对象, 利用免疫印迹技术检测年龄相关性和糖尿病性白内障晶状体前囊膜中 O-GlcNAc 蛋白的表达水平, 富集晶状体前囊膜组织中 O-GlcNAc 糖蛋白并通过质谱方法鉴定两组样本晶状体前囊膜中 O-GlcNAc 差异蛋白的表达。

**结果:** 免疫印迹结果显示, 糖尿病性白内障组晶状体前囊膜中 O-GlcNAc 蛋白表达水平显著高于年龄相关性白内障组 ( $P < 0.01$ ), 且随着糖化血红蛋白水平的升高, O-GlcNAc 蛋白表达水平也升高 ( $P < 0.01$ )。我们采用质谱法对糖尿病性白内障和年龄相关性白内障晶状体前囊膜中 O-GlcNAc 蛋白进行差异分析, 在糖尿病性白内障组中发现 5 种表达上调的 O-GlcNAc 蛋白 (FABP5、KRT16、PGK1、CTSD、S100A7), 18 种表达下调的 O-GlcNAc 蛋白 (CRYβB1 等), 同时我们还鉴定出 3 个新的 O-GlcNAc 糖基化修饰位点: 蛋白质 PTPRQ 的 T1730 和 S1738 位的 O-GlcNAc 糖基化和蛋白质 ATP5MC2 的 T61 位的 O-GlcNAc 糖基化。

**结论:** O-GlcNAc 糖基化修饰可能参与了糖尿病性白内障的形成和发展。质谱鉴定出的 O-GlcNAc 差异蛋白为进一步研究糖尿病性白内障的发病机制提供了理论依据。

**关键词:** O-连接 N-乙酰氨基葡萄糖 (O-GlcNAc) 修饰; 糖尿病性白内障; 年龄相关性白内障; 晶状体前囊膜; 质谱

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2024.12.04

## Role of O - GlcNAc glycosylation in diabetic cataract

Luo Xi, Yang Congcong, Jing Liujie, Zhang Chunwei

**Foundation items:** Natural Science Foundation of Heilongjiang Province (No. LH2020H041); Heilongjiang Welfare Fund Organization of Disabled Persons (No. 2023IIT088); Scientific Research and Innovation Foundation of the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University (No.2020M23)

Ophthalmology Hospital, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150000, Heilongjiang Province, China

**Correspondence to:** Zhang Chunwei. Ophthalmology Hospital, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150000, Heilongjiang Province, China. [zcw1229@163.com](mailto:zcw1229@163.com)

Received: 2024-04-27 Accepted: 2024-10-30

## Abstract

• **AIM:** To analyze the expression changes of O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) glycoprotein in the lens capsule of age-related cataract and diabetic cataract and investigate the role of O-GlcNAc glycoprotein in diabetic cataract.

• **METHODS:** The lens capsules of 54 patients (56 eyes) with diabetic cataract and 115 patients (120 eyes) with age-related cataract were studied. Immunoblotting was used to detect the expression level of O-GlcNAc protein in the lens capsules of age-related and diabetic cataracts, and mass spectrometry was used to identify the O-GlcNAc glycoproteins in lens capsules.

• **RESULTS:** Immunoblotting results showed that the expression level of O-GlcNAc protein in the lens capsule of diabetic cataracts was significantly higher than in the age-related cataracts ( $P < 0.01$ ). With the level of glycosylated hemoglobin increasing, the expression level of O-GlcNAc protein also increased ( $P < 0.01$ ). Totally 5 O-GlcNAc proteins with up-regulated expression (FABP5, KRT16, PGK1, CTSD and S100A7), and 18 O-GlcNAc proteins with down-regulated expression (CRYβB1, etc.) were identified in the lens capsule of patients with diabetic cataract by mass spectrometry. Three new O-GlcNAc glycosylation sites were identified in this study. They were O-GlcNAcylation at T1730 position and S1738 position of PTPRQ and O-GlcNAcylation at T61 position of ATP5MC2.

• **CONCLUSION:** O-GlcNAc glycosylation may be involved in the formation and development of diabetic cataract. The differential O-GlcNAc glycoprotein identified by mass spectrometry provided the data for further study about

pathogenesis of diabetic cataract.

• KEYWORDS: O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) glycosylation; diabetic cataract; age-related cataract; lens capsule; mass spectrometry

**Citation:** Luo X, Yang CC, Jing LJ, et al. Role of O-GlcNAc glycosylation in diabetic cataract. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)*, 2024,24(12):1882-1887.

## 0 引言

白内障是世界主要致盲眼病之一,年龄相关性白内障是其最常见的类型。糖尿病是一种全球范围内常见的慢性疾病,且发病率逐年增高。白内障是糖尿病的一种常见眼部并发症,而且糖尿病患者发生白内障的年龄更早、进展更快、预后更差。糖尿病患者是白内障手术的高危人群<sup>[1]</sup>,因此对糖尿病性白内障的机制研究至关重要。糖尿病性白内障的发病机制复杂,目前有渗透压反应<sup>[2]</sup>、氧化应激<sup>[3]</sup>、蛋白质非酶糖基化<sup>[4]</sup>等多种学说。其中蛋白质非酶糖基化学说被大家广泛研究。近年来研究开始关注酶促糖基化,O-连接 N-乙酰氨基葡萄糖(O-linked N-acetylglucosamine,O-GlcNAc)修饰是酶促糖基化的其中一种形式,其动态修饰过程由两种酶介导,O-GlcNAc糖基转移酶(OGT)负责催化添加 GlcNAc 基团,使目标蛋白发生 O-GlcNAc 修饰,O-GlcNAc 糖苷酶(OGA)负责将 O-糖苷键水解,去除 GlcNAc 基团,使 O-GlcNAc 糖蛋白发生去糖基化反应<sup>[5]</sup>。细胞内多种蛋白均可发生 O-GlcNAc 修饰<sup>[6]</sup>,O-GlcNAc 糖基化修饰参与细胞信号传导等多种重要生命过程,且 O-GlcNAc 蛋白分布广泛<sup>[7]</sup>,因此异常的 O-GlcNAc 糖基化修饰会影响多种疾病的发生发展,O-GlcNAc 糖基化异常已证明与糖尿病<sup>[8]</sup>、神经退行性疾病<sup>[9-11]</sup>和癌症<sup>[12]</sup>等重大疾病密切相关。有研究<sup>[13]</sup>发现小鼠晶状体蛋白 O-GlcNAc 糖基化修饰增加与白内障有关,但 O-GlcNAc 糖基化修饰是否参与人糖尿病性白内障的发生及其可能的作用机制目前尚不完全清楚。本研究比较年龄相关性白内障和糖尿病性白内障患者晶状体前囊膜中 O-GlcNAc 蛋白表达水平,初步探讨了 O-GlcNAc 蛋白表达变化与糖尿病性白内障的相关性,为揭示糖尿病性白内障患者发病的分子机制提供理论依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 选取 2022-01/2023-12 期间哈尔滨医科大学附属第一医院眼科医院收治的白内障患者 169 例 176 眼,收集其临床资料及晶状体前囊膜。其中糖尿病性白内障患者 54 例 56 眼,年龄相关性白内障患者 115 例 120 眼。所有患者均进行白内障超声乳化吸除术联合人工晶状体植入术,术中连续环形撕囊得到晶状体前囊膜组织,大小约 5-6 mm,立即置入 EP 管中,-20℃ 保存待用。本研究经哈尔滨医科大学附属第一医院伦理委员会批准,遵循伦理学原则,所有患者均签署知情同意书。

**1.1.1 纳入标准** 糖尿病性白内障组:(1)裂隙灯下观察到晶状体明显混浊;(2)最佳矫正视力低于 0.5;(3)内科确诊为 2 型糖尿病并且糖化血红蛋白 $\geq 6.0\%$ ;(4)年龄为 50-90 岁。

年龄相关性白内障组:(1)无糖尿病史,并且糖化血红蛋白 $< 6.0\%$ ;(2)裂隙灯下观察到晶状体明显混浊;(3)

最佳矫正视力低于 0.5;(4)年龄为 50-90 岁。

**1.1.2 排除标准** (1)青光眼、视网膜脱离、葡萄膜炎、眼外伤等眼部病变及其他内眼手术史。(2)甲状腺功能亢进、心脏病、传染病等全身疾病。(3)其他类型白内障如外伤性、葡萄膜炎性、青光眼性、糖皮质激素性、中毒性、辐射性等。

## 1.2 方法

**1.2.1 临床资料采集** 记录白内障患者的年龄、性别、糖尿病病史、全身及眼部病史等。检测血糖及糖化血红蛋白水平、视力、眼压、眼部 B 超、眼底检查、人工晶状体设计等临床指标。

**1.2.2 标本分组** 糖尿病性白内障为 DC(diabetic cataract, DC)组,同时根据糖化血红蛋白水平分为 DC1 组 17 例 18 眼( $6.0\% \leq$ 糖化血红蛋白 $< 7.0\%$ )、DC2 组 16 例 17 眼( $7.0\% \leq$ 糖化血红蛋白 $< 8.0\%$ )、DC3 组 21 例 21 眼( $8.0\% \leq$ 糖化血红蛋白 $< 10.0\%$ )。年龄相关性白内障为 ARC(age-related cataract, ARC)组,糖化血红蛋白均 $< 6.0\%$ 。

**1.2.3 免疫印迹分析** 晶状体前囊膜经组织裂解液裂解后提取蛋白,测定蛋白浓度后制样。分别取 100  $\mu\text{g}$  蛋白样本进行免疫印迹检测。电泳 1.5 h,再经电转将样品转移至硝酸-纤维素膜上室温晾干。5%脱脂牛奶封闭 2 h 后一抗(Anti-O-GlcNAc (RL2) antibody) 4℃ 孵育过夜。TBST 漂洗 3 次加入二抗(goat anti-mouse IgG (H+L)-HRP)室温孵育 2 h。最后以 ECL 化学发光剂(THMO 公司)孵育 1 min。Strip 后室温孵育内参蛋白(GAPDH)2 h 后再次曝光、显影、定影。免疫印迹结果采用 Image J 软件进行密度灰度值定量分析。

**1.2.4 O-GlcNAc 蛋白的富集及质谱分析** 各组分别取 100  $\mu\text{g}$  蛋白样本,加入 PBS 至总体积 400  $\mu\text{L}$ ,进行蛋白富集。O-GlcNAc 蛋白的富集采用 O-GlcNAc 蛋白富集试剂盒(天津莱森生物科技有限公司)并根据说明书完成,富集后的蛋白经凝胶电泳纯化后切胶送北京大学分析测试中心进行蛋白及 O-GlcNAc 修饰位点质谱鉴定,以 Coverage 相差 1.5 倍以上为有差异。

统计学分析:采用统计软件 SPSS28.0.1.1 处理数据,采用单因素方差分析比较组间差异,组间的进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 O-GlcNAc 蛋白在糖尿病性白内障组晶状体前囊膜中表达增加** 采用免疫印迹的方法检测年龄相关性白内障及不同糖化血红蛋白水平的糖尿病性白内障晶状体前囊膜中 O-GlcNAc 蛋白表达相对强度,即 O-GlcNAc 蛋白条带灰度值与 GAPDH 条带灰度值之比,结果显示:糖尿病性白内障晶状体前囊膜中 O-GlcNAc 蛋白的表达明显高于年龄相关性白内障组,差异有统计学意义(均  $P < 0.01$ ,表 1,图 1),揭示 O-GlcNAc 蛋白水平可能与糖尿病性白内障发生发展有关。

糖尿病性白内障 DC3 组 O-GlcNAc 蛋白水平高于 DC2 组和 DC1 组,差异有统计学意义(均  $P < 0.01$ ),此结果提示 O-GlcNAc 蛋白水平可能与血糖增高有关。DC2 组 O-GlcNAc 蛋白水平高于 DC1 组,但是差异无统计学意义( $P = 0.182$ ) (图 1)。

**2.2 各组白内障患者晶状体前囊膜中差异蛋白分析** 比较糖尿病性白内障组与年龄相关性白内障组晶状体前囊膜蛋白的质谱结果,发现差异表达的 O-GlcNAc 蛋白 23 种,其中 5 种蛋白在糖尿病性白内障组中表达上调:脂肪酸结合蛋白 5 (fatty acid-binding protein 5, FABP5)、角蛋白 16 (keratin, type I cytoskeletal 16, KRT16)、磷酸甘油激酶 1 (phosphoglycerate kinase 1, PGK1)、组织蛋白酶 D (cathepsin D, CTSD)、钙结合蛋白 S100A7 (protein S100-A7, S100A7) (表 2), 18 种蛋白表达下调:CRYβB1 等(表 3)。

**2.3 糖尿病性白内障晶状体前囊膜中新发现的 O-GlcNAc 蛋白及糖基化修饰位点** 通过质谱分析及比对 O-GlcNAc

蛋白质库,在糖尿病性白内障晶状体前囊膜中发现了 3 个新的 O-GlcNAc 糖基化修饰位点,一个是蛋白酪氨酸磷酸酶受体 Q 型 (protein tyrosine phosphatase receptor type Q, PTPRQ) T1730 和 S1738 位的 O-GlcNAc 糖基化;一个是蛋白质 ATP 合酶 C 亚基位点 2 (ATP synthase membrane subunit c locus 2, ATP5MC2) T61 位的 O-GlcNAc 糖基化 (表 4)。

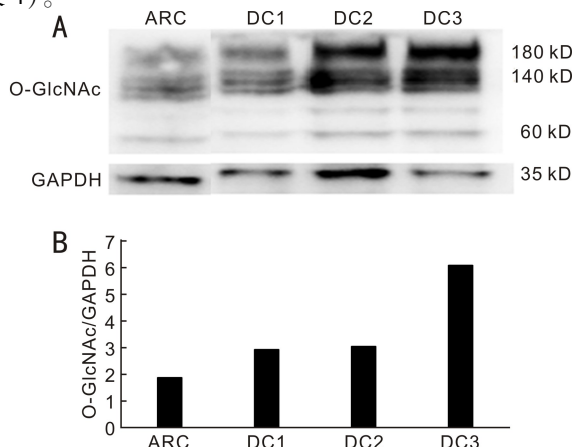


图 1 年龄相关性白内障和糖尿病性白内障晶状体前囊膜中 O-GlcNAc 蛋白的表达 A: 各组白内障晶状体前囊膜中 O-GlcNAc 蛋白 Western Blot 检测结果; B: 各组 O-GlcNAc 蛋白相对表达水平。

表 1 各组 O-GlcNAc 蛋白表达相对强度

组别	O-GlcNAc 蛋白表达相对强度
ARC	1.888±0.021
DC1	2.943±0.050
DC2	3.050±0.106
DC3	6.104±0.083
<i>F</i>	1245.141
<i>P</i>	<0.01

注: DC1 组为 6.0% ≤ 糖化血红蛋白 < 7.0%; DC2 组为 7.0% ≤ 糖化血红蛋白 < 8.0%; DC3 组为 8.0% ≤ 糖化血红蛋白 < 10.0%。

表 2 糖尿病性白内障组中表达上调的 O-GlcNAc 蛋白质列表

基因名	蛋白质名	肽段覆盖率 (%)			MW (kDa)
		ARC 组	DC1 组+DC2 组	DC3	
FABP5	Fatty acid-binding protein 5	0	14	23	15.2
KRT16	Keratin, type I cytoskeletal 16	13	37	28	51.2
PGK1	Phosphoglycerate kinase 1	4	4	10	44.6
S100A7	Protein S100-A7	11	24	0	11.5
CTSD	Cathepsin D	2	2	4	44.5

表 3 糖尿病性白内障组中表达下调的 O-GlcNAc 蛋白质列表

基因名	蛋白质名	肽段覆盖率 (%)			MW (kDa)
		ARC	DC1+DC2	DC3	
CRYβB1	Beta-crystallin B1	26	14	0	28
HBB	Hemoglobin subunit beta	96	85	34	16
HBA1	Hemoglobin subunit alpha	70	76	22	15.2
VIM	Vimentin	61	42	18	53.6
KRT9	Keratin, type I cytoskeletal 9	56	44	33	62
H4C1	Histone H4	43	34	19	11.4
ANXA2	Annexin A2	31	19	0	38.6
ACTB	Actin, cytoplasmic 1	31	25	14	41.7
TUBA1A	Tubulin alpha-1A chain	16	10	0	50.1
LDHA	L-lactate dehydrogenase A chain	25	13	2	36.7
H2BC21	Histone H2B type 2-E	21	14	0	13.9
CLU	Clusterin	20	14	3	52.5
TP53	Cellular tumor antigen p53	15	8	3	43.6
SERPINB3	Serpin B3	8	4	0	44.5
AZGP1	Zinc-alpha-2-glycoprotein	8	0	4	34.2
COL4A2	Collagen alpha-2(IV)	7	6	1	167.4
LAMA5	Laminin subunit alpha-5	4	2	0	399.5
PHGDH	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	4	2	2	56.6



表 4 糖尿病性白内障组中发现的 3 个新 O-GlcNAc 糖基化位点

序列号	基因名	肽段	蛋白质名	糖基化位点	糖基化位点在蛋白质中的位置
Q9UMZ3	PTPRQ	EDDPTAVQIHNLISIIQK	Phosphatidylinositol phosphatase PTPRQ	2xHexNAc[ T5;S13 ]	Q9UMZ3[ 1726-1742 ]
Q06055	ATP5MC2	SFQTSAISRDIDTAAK	ATP synthase F(0) complex subunit C2, mitochondrial	1xHexNAc[ T4 ]	Q06055[ 58-73 ]

### 3 讨论

目前糖尿病性白内障发病的分子生物学机制至今仍不明确,以往研究发现糖基化与白内障发生发展有关。糖基化是糖基供体与糖基受体的羟基或其他官能团相连,以形成糖共轭物的反应,根据反应的类型可分为酶促糖基化和非酶糖基化。目前研究大多集中于糖基化终末产物在糖尿病性白内障发病中的作用,研究发现糖尿病白内障患者晶状体中糖基化终末产物水平远高于非糖尿病患者<sup>[14]</sup>;糖基化的 $\alpha$ B晶状体蛋白交联程度增高,分子伴侣功能减弱,蛋白质异常聚集从而导致晶状体混浊<sup>[15]</sup>;晶状体上皮细胞中糖基化蛋白的过度表达使囊膜破裂后通透性增加,促进白内障的进展<sup>[16]</sup>。然而对于酶促糖基化在糖尿病性白内障中的研究目前国内外报道较少。本研究聚焦于酶促糖基化中的O-GlcNAc糖基化修饰在糖尿病性和年龄相关性白内障晶状体前囊膜中的表达变化,探讨O-GlcNAc修饰在糖尿病性白内障的作用。在*International Journal of Ophthalmology*杂志既往发表的研究<sup>[17]</sup>发现下调小鼠体内NF- $\kappa$ B的O-GlcNAc糖基化修饰可以防止糖尿病诱导的视神经节细胞凋亡,该实验在小鼠体内研究NF- $\kappa$ B的O-GlcNAc糖基化修饰对糖尿病视网膜病变小鼠视神经节细胞的作用。本研究通过比较糖尿病性和年龄相关性白内障患者晶状体前囊膜中O-GlcNAc糖蛋白的表达水平,探讨O-GlcNAc蛋白表达变化与糖尿病性白内障的相关性。

本研究结果表明糖尿病性白内障组晶状体前囊膜中O-GlcNAc蛋白表达水平明显高于年龄相关性白内障组,差异有统计学意义(均 $P < 0.01$ ),揭示了O-GlcNAc修饰可能参与了糖尿病性白内障的形成。

糖化血红蛋白是衡量血糖控制水平的重要指标,通常可以反映患者近8-12 wk的血糖控制情况。糖化血红蛋白4.0%-6.0%代表血糖控制正常;6.0%-7.0%代表血糖控制比较理想;7.0%-8.0%血糖控制一般;糖化血红蛋白 $> 8.0\%$ ,表示血糖控制不理想。我们的实验结果发现糖尿病性白内障DC3组( $8.0\% \leq$ 糖化血红蛋白 $< 10.0\%$ )的O-GlcNAc蛋白水平明显高于DC2组( $7.0\% \leq$ 糖化血红蛋白 $< 8.0\%$ )和DC1组( $6.0\% \leq$ 糖化血红蛋白 $< 7.0\%$ ),即血糖控制不理想的糖尿病性白内障晶状体前囊膜中O-GlcNAc蛋白水平最高,揭示O-GlcNAc修饰可能与血糖控制水平和糖尿病严重程度有关。

O-GlcNAc修饰是一种蛋白质翻译后修饰,在真核细胞中广泛存在,参与细胞多个重要生命过程。晶状体蛋白的翻译后修饰、异常聚集以及蛋白质降解失调,引起晶状体蛋白结构的改变,可能是白内障形成的直接原因。晶状体内蛋白质的降解主要由蛋白酶体完成,自噬蛋白酶体途径在晶状体上皮细胞分化为晶状体纤维细胞的过程中负

责细胞核和细胞器的降解,最终形成无细胞器区。该途径在去除受损细胞器和错误折叠的蛋白质的过程中也至关重要,这些细胞器和错误折叠的蛋白质被自噬体吞噬,然后被蛋白酶体降解<sup>[18]</sup>。如果这些大分子不能被溶酶体消化,则会导致白内障的发生。有研究发现O-GlcNAc修饰可抑制蛋白酶体的功能<sup>[19]</sup>,这表明O-GlcNAc修饰可能通过抑制蛋白酶体的功能从而促进糖尿病性白内障的发生发展。这与本研究结果相一致,从一定程度上解释了糖尿病患者白内障发生发展的原因。

目前关于晶状体前囊膜中O-GlcNAc蛋白质谱鉴定的研究较少,我们采用CpOGA法富集晶状体囊膜中的O-GlcNAc蛋白后通过质谱鉴定,在年龄相关性白内障组中共鉴定出105个蛋白质(其中O-GlcNAc蛋白89种),在糖尿病性白内障组中共鉴定出118个蛋白质(其中O-GlcNAc蛋白96种),coverage相差1.5倍以上的为差异蛋白,共鉴定出23种差异表达的O-GlcNAc蛋白,其中5种O-GlcNAc蛋白表达上调:FABP5、KRT16、PGK1、CTSD、S100A7。

FABP5是一种在大多数哺乳动物中表达的低分子量细胞质蛋白,分子量约为15 kDa,主要参与细胞质内脂肪酸的摄取、转运和代谢。FABP5在晶状体、肝、视网膜、心脏等多种组织和器官均有表达<sup>[20]</sup>,在多种疾病中起着关键作用,如糖尿病<sup>[21]</sup>、动脉粥样硬化<sup>[22]</sup>、癌症<sup>[23-24]</sup>等。有研究表明FABP5可能通过调节视网膜循环参与了视网膜血管疾病的发病机制<sup>[25]</sup>。目前对于FABP5在白内障中的作用尚罕见报道,本实验发现FABP5在糖尿病性白内障晶状体前囊膜中表达上调,为糖尿病性白内障发病机制研究提供了一个新的思路。

角蛋白是脊椎动物上皮细胞中的主要结构蛋白,对维持上皮细胞的结构完整性至关重要。角蛋白是识别肿瘤细胞和癌细胞的常用标志物,一些研究表明角蛋白与肿瘤发生和转移有关<sup>[26-27]</sup>。与其他角蛋白相比,对KRT16的研究目前尚且不足。角蛋白16由KRT16基因编码,可在多种上皮组织中正常表达,对维持表皮屏障功能十分重要。在表皮损伤的早期阶段,伤口附近的角质形成细胞被激活,迁移到伤口重建屏障功能。而KRT16可以参与角质形成细胞迁移和上皮细胞增殖<sup>[28]</sup>。有研究发现通过下调KRT16可以促进真菌性角膜炎的角膜上皮修复<sup>[29]</sup>。本实验研究发现糖尿病性白内障血糖控制良好组和血糖控制不良组晶状体前囊膜细胞中KRT16表达均上调,这提示KRT16可能与晶状体前囊膜细胞损伤增殖相关,从而导致白内障的形成。

PGK1是糖酵解中第一个产生ATP的酶,在许多人类癌症中过表达,并受多种机制调节。其活性由不同的翻译后修饰介导,当T255发生O-GlcNAc糖基化激活其酶活

性,同时诱导 PGK1 易位到线粒体中,随后磷酸化依赖性抑制丙酮酸代谢和氧化磷酸化,促进细胞增殖和肿瘤发生,研究发现阻断 PGK1T255 的 O-GlcNAc 糖基化可以减少结肠癌细胞增殖,抑制糖酵解<sup>[30]</sup>。PGK1 被乙酰化后其酶活性增强,促进肝癌的发展<sup>[31]</sup>。PGK1 被磷酸化后可以促进其线粒体易位并调节线粒体丙酮酸的利用<sup>[32]</sup>。我们的研究鉴定出 PGK1 在糖尿病性白内障血糖控制不良组中表达增多,提示 PGK1 可能参与糖尿病性白内障的发生发展。

本研究通过质谱法在年龄相关性白内障和糖尿病性白内障晶状体前囊膜中鉴定出差异表达 O-GlcNAc 蛋白 23 种,除了以上 5 种表达上调的蛋白,还有 18 种表达下调的蛋白,其中的  $\beta$ B1 晶状体蛋白与白内障有关,其余 17 种表达下调的蛋白与白内障的相关性尚未发现相关研究报道。

$\beta$ B1 晶状体蛋白由 CRYBB1 基因编码,是晶状体主要的结构蛋白,在维持晶状体结构和透明性中有重要作用,他们通过特定的范德华反应、氢键和离子键在晶状体中形成更稳定的蛋白质复合物<sup>[33]</sup>,因此  $\beta$ B1 晶状体蛋白下调可能会导致蛋白复合物不稳定而引起白内障的发生,我们的研究结果显示糖尿病组中  $\beta$ B1 晶状体蛋白下调,这与以往的研究结果相符。

本研究还在糖尿病性白内障晶状体前囊膜中鉴定出 3 个新的 O-GlcNAc 糖基化修饰位点:蛋白质 PTPRQ 的 T1730 位和 S1738 位的 O-GlcNAc 糖基化以及蛋白质 ATP5MC2 的 T61 位的 O-GlcNAc 糖基化,是对 O-GlcNAc 蛋白质库的补充,但还需进一步用蛋白泛素化检测方法进行验证。

PTPRQ 是 III 型酪氨酸磷酸酶受体家族的成员,可调节细胞增殖、凋亡、分化和存活。最近在许多类型的癌症中观察到 PTPRQ 基因的突变、缺失和扩增,这表明 PTPRQ 可能在许多癌症的发展中起着至关重要的作用<sup>[34]</sup>。我们通过质谱在 PTPRQ 蛋白上鉴定出新的 O-GlcNAc 糖基化修饰位点,有助于进一步了解 PTPRQ,为治疗相关疾病提供新的理论。

ATP5MC2 是线粒体 ATP 合酶的一个亚基,属于跨膜组分,在心脏和卵巢等组织中普遍表达,参与 ATP 合成,在氧化磷酸化过程中利用质子穿过内膜的电化学梯度。目前对 ATP5MC2 在疾病中作用的研究尚缺乏,本研究在 ATP5MC2 蛋白上鉴定出新的 O-GlcNAc 糖基化修饰位点,为 ATP5MC2 在眼科疾病中的研究提供新的作用靶点。

综上所述,本研究结果表明 O-GlcNAc 蛋白在糖尿病性白内障组晶状体中表达显著增加,提示 O-GlcNAc 修饰参与白内障的形成和发展。质谱鉴定出的 3 个潜在的 O-GlcNAc 糖基化修饰位点和 O-GlcNAc 差异蛋白为进一步研究糖尿病白内障的发病机制提供理论依据,为防治糖尿病性白内障提供一种新方向。本实验尚存在一定局限性:(1)本研究对晶状体前囊膜中 O-GlcNAc 表达水平进行了检测,发现糖尿病性白内障晶状体前囊膜中 O-GlcNAc 表达增加,还需进一步研究其机制及通路;(2)本研究是体外实验,还需进一步建立动物模型,在体内进行验证。

## 参考文献

- [1] Go JA, Mamalis CA, Khandelwal SS. Cataract surgery considerations for diabetic patients. *Curr Diab Rep*, 2021,21(12):67.
- [2] Kumar CU, Suryavanshi U, Sontake V, et al. Effect of sorbitol on alpha-crystallin structure and function. *Biochemistry (Mosc)*, 2022,87(2):131-140.
- [3] Chen YY, Wu TT, Ho CY, et al. Blocking of SGLT2 to eliminate NADPH-induced oxidative stress in lenses of animals with fructose-induced diabetes mellitus. *Int J Mol Sci*, 2022,23(13):7142.
- [4] Chitra PS, Chaki D, Boiroju NK, et al. Status of oxidative stress markers, advanced glycation index, and polyol pathway in age-related cataract subjects with and without diabetes. *Exp Eye Res*, 2020,200:108230.
- [5] Chatham JC, Zhang JH, Wende AR. Role of O-linked N-acetylglucosamine protein modification in cellular (patho) physiology. *Physiol Rev*, 2021,101(2):427-493.
- [6] Yang XY, Qian K. Protein O-GlcNAcylation: emerging mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017,18(7):452-465.
- [7] Shi QZ, Shen QC, Liu YF, et al. Increased glucose metabolism in TAMs fuels O-GlcNAcylation of lysosomal Cathepsin B to promote cancer metastasis and chemoresistance. *Cancer Cell*, 2022,40(10):1207-1222.e10.
- [8] Peterson SB, Hart GW. New insights: a role for O-GlcNAcylation in diabetic complications. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2016,51(3):150-161.
- [9] Akan I, Olivier-van Stichelen S, Bond MR, et al. Nutrient-driven O-GlcNAc in proteostasis and neurodegeneration. *J Neurochem*, 2018,144(1):7-34.
- [10] Banerjee PS, Lagerlöf O, Hart GW. Roles of O-GlcNAc in chronic diseases of aging. *Mol Aspects Med*, 2016,51:1-15.
- [11] Ryan P, Xu MM, Davey AK, et al. O-GlcNAc modification protects against protein misfolding and aggregation in neurodegenerative disease. *ACS Chem Neurosci*, 2019,10(5):2209-2221.
- [12] Nie H, Yi W. O-GlcNAcylation, a sweet link to the pathology of diseases. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2019,20(5):437-448.
- [13] Wang K, Ho SR, Mao WM, et al. Increased O-GlcNAc causes disrupted lens fiber cell differentiation and cataracts. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009,387(1):70-76.
- [14] 刘玉梅兰, 杜珊珊, 邵敬芝, 等. 晚期糖基化终末产物受体 (RAGE) 在糖尿病性白内障和年龄相关性白内障患者前囊膜及人晶状体上皮细胞中的表达. *眼科新进展*, 2020,40(11):1015-1019.
- [15] Nandi SK, Nahomi RB, Rankenberg J, et al. Glycation-mediated inter-protein cross-linking is promoted by chaperone-client complexes of  $\alpha$ -crystallin; implications for lens aging and presbyopia. *J Biol Chem*, 2020,295(17):5701-5716.
- [16] Ramos-Martínez I, Vivanco-Rojas O, Juárez-Domínguez B, et al. Abnormal N-glycosylation of human lens epithelial cells in type-2 diabetes may contribute to cataract progression. *Clin Ophthalmol*, 2021,15:1365-1373.
- [17] Kim SJ, Kim MJ, Choi MY, et al. *Aralia elata* inhibits neurodegeneration by downregulating O-GlcNAcylation of NF- $\kappa$ B in diabetic mice. *Int J Ophthalmol*, 2017,10(8):1203-1211.
- [18] Yu L, Chen Y, Tooze SA. Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms. *Autophagy*, 2018,14(2):207-215.
- [19] Li X, Yue XJ, Sepulveda H, et al. OGT controls mammalian cell viability by regulating the proteasome/mTOR/mitochondrial axis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2023,120(3):e2218332120.
- [20] Smathers RL, Petersen DR. The human fatty acid-binding protein

family: evolutionary divergences and functions. *Hum Genomics*, 2011,5(3):170–191.

[21] Maeda K, Uysal KT, Makowski L, et al. Role of the fatty acid binding protein mall in obesity and insulin resistance. *Diabetes*, 2003,52(2):300–307.

[22] Furuhashi M, Ogura M, Matsumoto M, et al. Serum FABP5 concentration is a potential biomarker for residual risk of atherosclerosis in relation to cholesterol efflux from macrophages. *Sci Rep*, 2017,7:217.

[23] George Warren W, Osborn M, Yates A, et al. The emerging role of fatty acid binding protein 5 (FABP5) in cancers. *Drug Discov Today*, 2023,28(7):103628.

[24] Guaita-Esteruelas S, Gumà J, Masana L, et al. The peritumoural adipose tissue microenvironment and cancer. The roles of fatty acid binding protein 4 and fatty acid binding protein 5. *Mol Cell Endocrinol*, 2018,462:107–118.

[25] Higashide M, Furuhashi M, Watanabe M, et al. Fatty acid-binding proteins 4 and 5 are involved in the pathogenesis of retinal vascular diseases in different manners. *Life*, 2022,12(4):467.

[26] Yoon S, Leube RE. Keratin intermediate filaments: intermediaries of epithelial cell migration. *Essays Biochem*, 2019,63(5):521–533.

[27] Elazezy M, Schwentesius S, Stegat L, et al. Emerging insights into keratin 16 expression during metastatic progression of breast cancer.

*Cancers*, 2021,13(15):3869.

[28] Jia J, Wang WG, Kuang DX, et al. mRNA profiling reveals response regulators of decreased fungal keratitis symptoms in a tree shrew model. *Gene*, 2020,737:144450.

[29] Jia J, Han Y, Jin L, et al. miR-204-3p downregulates KRT16 and promotes corneal repair in tree shrew fungal keratitis model. *Am J Transl Res*, 2022,14(10):7336–7349.

[30] Nie H, Ju HX, Fan JY, et al. O-GlcNAcylation of PGK1 coordinates glycolysis and TCA cycle to promote tumor growth. *Nat Commun*, 2020,11(1):36.

[31] Hu HL, Zhu WW, Qin J, et al. Acetylation of PGK1 promotes liver cancer cell proliferation and tumorigenesis. *Hepatology*, 2017,65(2):515–528.

[32] Li XJ, Jiang YH, Meisenhelder J, et al. Mitochondria-translocated PGK1 functions as a protein kinase to coordinate glycolysis and the TCA cycle in tumorigenesis. *Mol Cell*, 2016,61(5):705–719.

[33] Dolinska MB, Wingfield PT, Sergeev YV.  $\beta$ B1 – crystallin: thermodynamic profiles of molecular interactions. *PLoS One*, 2012,7(1):e29227.

[34] Zhang WS, Tang ZM, Fan SP, et al. Protein tyrosine phosphatase receptor-type Q: structure, activity, and implications in human disease. *Protein Pept Lett*, 2022,29(7):567–573.