

## O-GlcNAc糖基化对转录因子 CREB 活性和心肌细胞形态的影响

施林生<sup>1</sup>, 黄建飞<sup>1</sup>, 卢辉和<sup>1</sup>, 陈小丽<sup>1</sup>, 郑扣龙<sup>1</sup>, 林刚<sup>1</sup>, 于彬<sup>2</sup>, 周艳<sup>3\*</sup>

(<sup>1</sup>南通市第一人民医院心内科, 江苏 南通 226000; <sup>2</sup>江苏省神经再生重点实验室, <sup>3</sup>南通大学医学院生化教研室, 江苏 南通 226000)

**[摘要]** 目的:研究心肌缺血早期升高的 O-GlcNAc 糖基化是否通过促进转录因子 CAMP 反应元件结合蛋白(CREB)的活性而引起心肌细胞形态变化。方法:在 HEK-293T 细胞内过表达调控 O-GlcNAc 糖基化的酶 O-连接 N-乙酰氨基葡萄糖转移酶(OGT)和 O-连接 N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(OGA), Western blot 检测细胞内的 O-GlcNAc 糖基化水平和 CREB 的磷酸化。原代培养大鼠心肌细胞, 药物 DON 和 PUGNAc 改变细胞内的 O-GlcNAc 糖基化水平, 光镜下观察细胞形态, Western blot 检测细胞内的 O-GlcNAc 糖基化水平和 CREB 的磷酸化。结果:在 HEK-293T 细胞和原代培养的大鼠心肌细胞中改变 O-GlcNAc 糖基化水平, CREB 磷酸化也随之改变, 两者呈正相关。升高原代大鼠心肌细胞内的 O-GlcNAc 糖基化水平, 心肌细胞数目减少, 形态增大。结论:O-GlcNAc 糖基化调节 CREB 的活性, 两者呈正相关。心肌缺血早期升高的 O-GlcNAc 糖基化很可能通过促进 CREB 的活性而引起心肌细胞体积增大密度下降, 可能是导致心肌重构的重要原因。

**[关键词]** O-GlcNAc 糖基化; CREB; 心肌缺血

**[中图分类号]** R329.26

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2013)12-1658-06

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20131203

## Regulation of CREB activity and morphology of myocardial cells by O-GlcNAcylation

Shi Linsheng<sup>1</sup>, Huang Jianfei<sup>1</sup>, Lu Huihe<sup>1</sup>, Chen Xiaoli<sup>1</sup>, Zheng Koulong<sup>1</sup>, Lin Gang<sup>1</sup>, Yu Bin<sup>2</sup>, Zhou Yan<sup>3\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Cardiology, Nantong First People's Hospital, Nantong 226000; <sup>2</sup>Jiangsu Key Laboratory of Neuroregeneration, <sup>3</sup>Department of Biochemistry, Medical School, Nantong University, Nantong 226000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study whether increase of O-GlcNAcylation in acute myocardial ischemia causes morphology change of myocardial cells by promoting activity of transcriptional factor CREB. **Methods:** HEK-293T cells were overexpressed with enzymes OGT and OGA, which regulate O-GlcNAcylation. Total O-GlcNAcylation levels and CREB phosphorylation were detected by Western-blot. Primary cultured rat myocardial cells were treated with drugs DON and PUGNAc to regulate intracellular O-GlcNAcylation levels. Cells morphology was observed by light microscope, and O-GlcNAcylation levels and phosphorylation of CREB were detected by Western-blot. **Results:** In HEK-293T cells and primary cultured rat myocardial cells, the CREB phosphorylation was positively correlated to the O-GlcNAcylation level. The elevation of O-GlcNAcylation in primary rat myocardial cells reduced the number of cells, but increased size of the cells. **Conclusion:** O-GlcNAcylation regulates the activity of CREB positively. The elevated O-GlcNAcylation in acute myocardial ischemia is likely to cause the increase of myocardial cell size and the decrease of cell density by promoting the activity of CREB, which may be one of the most important factors leading to myocardial remodeling.

**[Key words]** O-GlcNAcylation; CREB; myocardial ischemia

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(12): 1658-1663]

O-GlcNAc 糖基化是广泛发生在细胞质和细胞核内的、动态的蛋白质翻译后修饰方式,它是在多肽

链的丝氨酸或苏氨酸残基上接有一个 N-乙酰氨基葡萄糖(N-acetylglucosamine, GlcNAc)<sup>[1]</sup>。它与磷酸化修饰相同或相邻的位点, 到目前为止, 所有能被 O-GlcNAc 的蛋白质都是可以被磷酸化的蛋白<sup>[2]</sup>。磷酸化和 O-GlcNAc 糖基化是信号转导途径中的两种调控方式, 它们既相互竞争又相互补充, 从而使得整

**[基金项目]** 国家自然科学基金(31100761);南通市科技计划项目(BK2011057)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: ntzhou@ntu.edu.cn

个控制更精密、准确。由于其独特的细胞定位、糖链连接方式以及重要的生物学调控作用,而日益成为生命科学领域研究的热点。到目前为止,O-GlcNAc 糖基化涉及包括转录、RNA 剪接、蛋白质合成、细胞骨架的维持、应激、泛素-蛋白酶体和癌基因的激活等多种细胞功能活动的调节<sup>[2]</sup>。O-GlcNAc 糖基化由 O-连接 N-乙酰氨基葡萄糖转移酶(O- $\beta$ -N-acetylglucosaminyltransferase, OGT)和 O-连接 N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(O-GlcNAcase, OGA)协同完成。前者以 UDP-GlcNAc 为供体底物,催化其连接到底物蛋白质丝氨酸或苏氨酸的羟基上,而後者的作用则是将 GlcNAc 从蛋白质骨架上水解去除。UDP-GlcNAc 含量受到己糖胺通路(hexosamine biosynthesis pathway, HBP)流量的影响。己糖胺通路是机体正常的糖代谢途径之一,正常情况下进入细胞的葡萄糖有 2%~5% 进入己糖胺通路进行代谢。除了作为供体底物外,UDP-GlcNAc 还通过控制 OGT 和 OGA 与受体底物的亲和性,调节蛋白质 O-GlcNAc 糖基化<sup>[3]</sup>。因此蛋白质 O-GlcNAc 糖基化水平不仅受 OGT 和 OGA 两种酶的直接调控,同时也与己糖胺通路的流量密切相关。近年来研究表明,蛋白质 O-GlcNAc 糖基化参与信号转导、应激反应以及糖尿病、神经退行性疾病和缺血性心肌病等生理病理事件<sup>[3-4]</sup>。心肌细胞和离体心脏均证实钙超载、钙反常、缺血再灌注等刺激后,蛋白质的 O-GlcNAc 糖基化修饰增加<sup>[5-7]</sup>。

本研究利用培养的细胞系和原代培养的心肌细胞为模型,采用分子生物学和药物干预的方法改变细胞内 O-GlcNAc 糖基化水平,研究了其对转录因子 cAMP 反应元件结合蛋白(cAMP response element-binding protein, CREB)活性的调节。此研究对于揭示心肌重构的发病机制提供了新的分子理论,并可能为心肌重构和心力衰竭的预防和治疗提供有价值的基础研究依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

HEK-293T 细胞(ATCC 公司,美国)。pCI-neo/HA-OGA、pCI-neo/Flag-OGT 由本实验室构建。

抗 OGT 抗体、抗 OGA 抗体和抗  $\alpha$ -Tubulin 抗体 DM1A(Sigma 公司,美国);抗 O-GlcNAc 糖基化抗体 RL2 (Pierce 公司,美国);抗磷酸化的 CREB 和总 CREB(Cell Signaling Technology,美国);抗 GAPDH (Santa Cruz 公司,美国)。辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠、羊抗兔 IgG 抗体 (Jackson Immuno Research

Laboratories, 美国)。UDP-GlcNAc 合成抑制剂 6-diazo-5-oxo-L-norleucine (DON) 和 OGA 抑制剂 PUGNAc(Sigma 公司,美国);HBSS、胰蛋白酶、胎牛血清和 DMEM 培养基(Invitrogen 公司,美国);FuGene6、蛋白酶抑制剂 Cocktail(Roche 公司,美国);ECL 化学发光试剂盒(Pierce 公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养

HEK-293T 细胞培养在含 10%胎牛血清的常规 DMEM 培养基中,每 2 d 换液 1 次。

大鼠原代心肌细胞的培养:取出生 1 d 龄 SD 大鼠 12 只,用 75%酒精棉球消毒皮肤。在无菌条件下剪开胸骨剑突下稍左侧的皮肤,在胸骨剑突下稍左侧打开胸腔,用眼科剪剪取心脏心尖部,置于预冷的 HBSS 液中,剪除结缔组织,并剪成约 1 mm<sup>3</sup> 的小块,用 HBSS 液漂洗 3 次后,向剩余的心肌组织中加入 0.125%胰蛋白酶溶液,转入锥形瓶里并置 37℃磁力搅拌器搅拌 10 min,弃去首次消化悬液,加入胰蛋白酶消化 10 min,如此重复,直至组织块消失。分别收集每次消化悬液,加等量含 10%小牛血清 DMEM 培养液终止消化,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清,再加入含 10%小牛血清 DMEM 培养液,用吸管轻轻吹散沉淀细胞,同条件下再次离心,将每次离心后沉淀细胞合并,加适量完全培养液将各管底沉淀吹打,经 200 目孔径的不锈钢网过筛以去除组织块,制成心肌细胞悬液,通过差速贴壁分离法尽量除去成纤维细胞。成纤维细胞贴壁迅速,静置 1~2 h 即基本贴壁,而心肌细胞通常在 4 h 后才开始贴壁。在 37℃和含 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中放置 1.5 h,收获细胞,加入 Brdu 使其终浓度为 0.1 mmol/L,以一定的心肌细胞密度分种于玻璃培养皿,每 2~3 d 换液。7 d 后,用终浓度为 50  $\mu$ mol/L 的 DON 或者 100  $\mu$ mol/L 的 PUGNAc 分别处理细胞 24 h,倒置显微镜下观察细胞的状态并拍摄照片后,裂解细胞,进行蛋白质免疫印迹实验。

#### 1.2.2 真核细胞转染

转染前 1 d 将 HEK-293T 以 0.25%胰蛋白酶消化,用不含抗生素的完全培养液终止反应,以 70%接种于 12 孔培养板,每组 3 个孔,使转染当天细胞覆盖达 90%~95%。按照 FuGene 6 操作说明进行转染,转染 48 h 后,裂解细胞。

#### 1.2.3 蛋白质免疫印迹

培养的细胞直接用 Laemmli buffer (125 mmol/L Tris-HCl, pH6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 2%  $\beta$ -mer-

captoethanol 和 0.005% bromophenol blue) 裂解,煮沸 5 min,采用 RC-DC 试剂盒进行蛋白浓度测定。蛋白质经 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,通过电转至 PVDF 膜上,然后用 5%脱脂奶粉封闭 30 min,一抗室温孵育过夜,经含 0.5% Tween-20 的 TBS(TB-ST)洗涤后,与辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 2 h,再经 TBST 洗涤后,用 ECL 化学发光试剂盒按照说明书方法检测。

1.3 统计学方法

采用标准 Stata8.0 统计学软件进行统计分析,所得结果表示为均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ ),两样本均数比较采用 *t* 检验, $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 过表达 OGT 和 OGA 对细胞内 O-GlcNAc 糖基化水平的影响

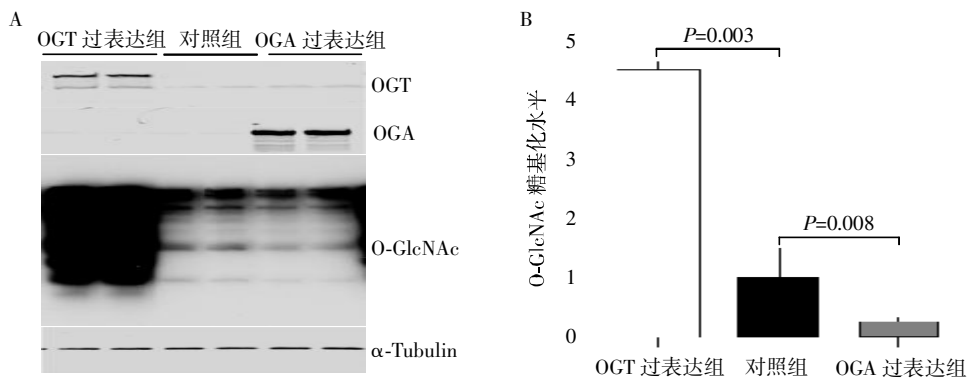
细胞内蛋白质的 O-GlcNAc 糖基化修饰由 OGT 和 OGA 两种酶催化生成。OGT 以 UDP-GlcNAc 为供体,催化其连接到目标蛋白质丝氨酸或苏氨酸的羟基上,OGA 的作用则是将 GlcNAc 从蛋白质骨架上水解去除。首先在转染效率较高的 HEK-293T 细胞内过表达 OGT 和 OGA,48 h 后裂解细胞,用抗 OGT 和 OGA 的抗体 Western blot 检测其在细胞内的表达(图 1A),OGT 和 OGA 均高表达,用识别 O-GlcNAc 糖基化的抗体 RL2 检测到过表达 OGT 促进了细胞内 O-GlcNAc 糖基化的水平,而过表达 OGA 后,细胞内的 O-GlcNAc 糖基化水平则下降(图 1A)。将图 1A 的结果进行灰度扫描,以  $\alpha$ -Tubulin 为内参进行统计学分析,OGT 过表达组与对照组比较  $P = 0.003$ ,OGA 过表达组和对照组比较  $P = 0.008$ ,细胞内 O-GlcNAc 糖基化水平的变化具有统计学意义。

2.2 O-GlcNAc 糖基化的改变对转录因子 CREB 活性的影响

在心肌肥厚的组织中,转录因子 CREB 的磷酸化增加使其活性升高,进而激活心肌肥厚相关因子的表达。在心肌细胞缺血的早期,O-GlcNAc 糖基化水平增加,我们进一步研究升高的 O-GlcNAc 糖基化水平是否会引起 CREB 的激活。因为 CREB 的激活与 133 位丝氨酸位点的磷酸化水平呈正相关,接下来检测 O-GlcNAc 糖基化改变对 CREB 133 位的丝氨酸磷酸化的影响,采用抗 CREB 133 位丝氨酸位点磷酸化的抗体和抗总 CREB 的抗体进行 Western blot,当过表达 OGT 时,细胞内 O-GlcNAc 糖基化水平增加,CREB 的磷酸水平升高,而过表达 OGA 时,细胞内 O-GlcNAc 糖基化水平下降,CREB 的磷酸化水平下降(图 2)。将蛋白免疫印迹的结果进行灰度扫描,计算各组磷酸化 CREB 和总 CREB 的相对量,进行统计学分析,OGT 组和 OGA 组分别与对照组进行 *t* 检验,OGT 组与对照组的  $P = 0.006$ ,OGA 组与对照组的  $P = 0.003$ ,均有统计学意义。

2.3 DON 和 PUGNAc 处理大鼠原代心肌细胞对 O-GlcNAc 糖基化的影响

OGT 以 UDP-GlcNAc 为供体底物,催化其连接到目标蛋白质丝氨酸或苏氨酸的羟基上,DON 是 UDP-GlcNAc 合成的抑制剂,因此 DON 降低 O-GlcNAc 糖基化水平,而药物 PUGNAc 可以抑制 OGA 酶的活性,使 O-GlcNAc 糖基化水平升高。原代培养的心肌细胞转染效率比较低,因此原代培养大鼠心肌细胞 1 周后,分别用这两种药物处理细胞,以改变细胞内的 O-GlcNAc 糖基化水平。药物作用 24 h 后裂解细胞,用 RL2 抗体检测 O-GlcNAc 糖基化水平,药物 DON 抑制了细胞的 O-GlcNAc 糖基化水平,而



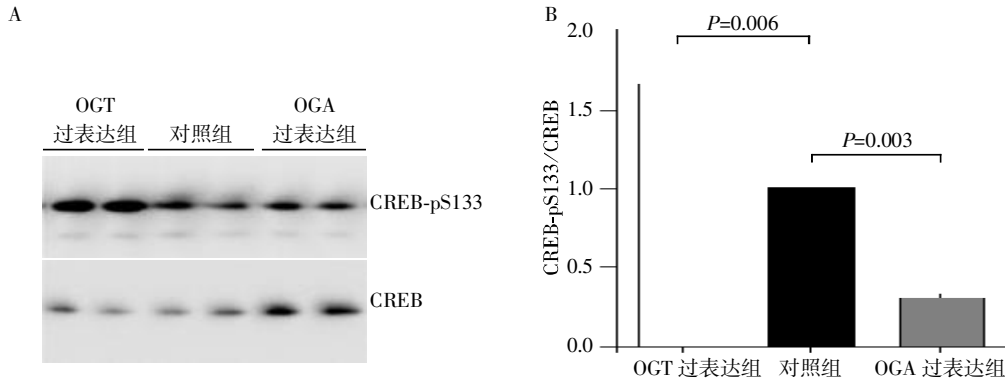
A: 蛋白质免疫印迹分析 OGT、OGA 和 O-GlcNAc 糖基化的蛋白水平; B: 以  $\alpha$ -Tubulin 为内参, O-GlcNAc 糖基化蛋白相对水平的定量分析。与对照组相比, \*\* $P < 0.01$  ( $n = 4$ )。

图 1 HEK-293T 细胞中过表达 OGT 和 OGA 时 OGT、OGA 和 O-GlcNAc 糖基化的水平

Figure 1 Overexpressing of OGT and OGA in HEK-293T cells

PUGNAc 处理的细胞,O-GlcNAc 糖基化水平则明显增高(图 3)。将蛋白免疫印迹的结果进行灰度扫描,以 GAPDH 为内参进行统计学分析,DON 组和

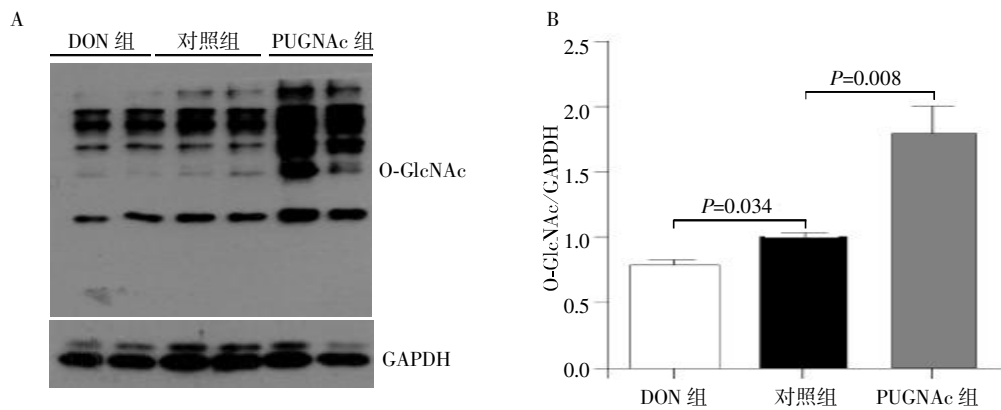
PUGNAc 组分别与对照组进行 *t* 检验,DON 组与对照组的  $P = 0.034$ ,PUGNAc 组与对照组的  $P = 0.008$ ,均有统计学意义。



A:蛋白质免疫印迹分析 CREB 总蛋白水平和磷酸化水平;B:CREB 磷酸化相对水平的定量分析。与对照组相比,\*\* $P < 0.01$  ( $n = 4$ )。

图 2 HEK-293T 细胞中过表达 OGT 和 OGA 对 CREB 磷酸化水平的影响

Figure 2 Phosphorylation levels of CREB when overexpressing OGT and OGA in HEK-293T cells



A:蛋白质免疫印迹分析药物 DON 和 PUGNAc 处理原代培养的心肌细胞,O-GlcNAc 糖基化蛋白水平;B:GAPDH 为内参,O-GlcNAc 糖基化蛋白相对水平的定量分析。与对照组相比,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$  ( $n = 4$ )。

图 3 药物 DON 和 PUGNAc 对原代培养的心肌细胞 O-GlcNAc 糖基化的影响

Figure 3 Then regulation of O-GlcNAcylation level in primary cardiac cells with DON and PUGNAc

#### 2.4 O-GlcNAc 糖基化改变对原代心肌细胞形态的影响

原代心肌细胞培养 4~24 h 后,在倒置显微镜下可观察到心肌细胞开始贴壁生长,初为圆形,后为梭形,偶见单个细胞开始搏动,继而细胞逐渐在瓶壁表面铺展;随后细胞不断分裂、增殖,数量逐渐增多,形成不规则的星形,细胞铺展状况更加明显,并伸出伪足;在培养第 3~4 天,伪足可相互接触交织成网,形成细胞单层或细胞簇,呈放射状排列的同心圆状,其搏动同步化,形成所谓功能性合体细胞。7 d 后,UDP-GlcNAc 合成抑制剂 DON 和 OGA 抑制剂 PUGNAc 处理大鼠原代心肌细胞 24 h,在倒置光学显微镜下观察心肌细胞的形态,PUGNAc 处理细胞后,细胞密度明显下降,细胞体积增大,而 DON

处理的细胞,细胞虽然有死亡,但无体积增大现象(图 4)。

#### 2.5 心肌细胞内 O-GlcNAc 糖基化的改变对 CREB 磷酸化的影响

利用 CREB 的磷酸化抗体和总 CREB 抗体,Western blot 检测 DON 和 PUGNAc 处理原代心肌细胞后 CREB 活性的改变。当用 PUGNAc 处理细胞后,细胞内的 O-GlcNAc 糖基化水平升高,CREB 的相对磷酸化水平升高,而 DON 处理细胞后,细胞内的 O-GlcNAc 糖基化水平下降,CREB 的相对磷酸化水平下降(图 5)。将蛋白免疫印迹的结果进行灰度扫描,计算各组的 CREB 的磷酸水平和总 CREB 的相对量,进行统计学分析,DON 组和 PUGNAc 组分别与对照组进行 *t* 检验,DON 组与对照组的  $P =$

0.008, PUGNAc 组与对照组的  $P = 0.042$ , 均有统计学意义。

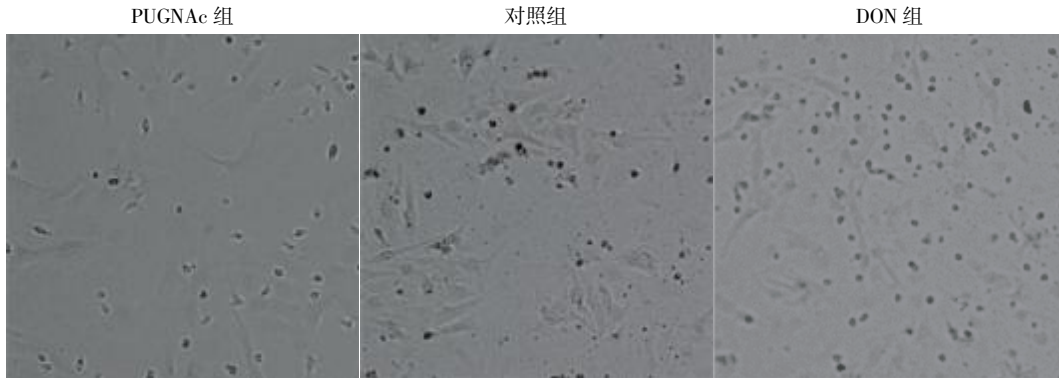
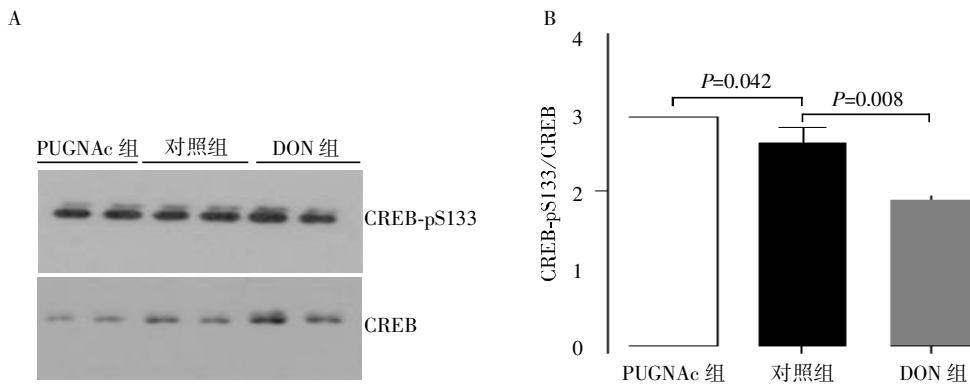


图4 药物 DON 和 PUGNAc 处理原代培养的心肌细胞 24 h 后其形态的变化( $\times 10$ )

Figure 4 The morphology of primary cardiac cells after the treatment of DON and PUGNAc for 24 h( $\times 10$ )



A: 蛋白质免疫印迹分析 CREB 总蛋白水平和磷酸化水平; B: CREB 磷酸化相对水平的定量分析; 与对照组相比,  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$  ( $n = 4$ )。

图5 药物 DON 和 PUGNAc 处理原代培养的心肌细胞 24 h 后 CREB 磷酸化的变化

Figure 5 Phosphorylation levels of CREB in primary cardiac cells treated with DON and PUGNAc for 24 h

### 3 讨论

心肌重构是心脏对血流动力学压力超负荷的一种适应性反应,以心肌细胞内蛋白质合成增加和细胞体积增大为主要特征,其发生涉及多种不同的因素和机制。已有报道发现,急性压力超负荷可迅速诱导大鼠心肌 cAMP 含量升高,转录因子 CREB 激活,启动蛋白质的表达<sup>[8]</sup>;离体灌注心脏可刺激心肌 cAMP 升高和蛋白质合成,抑制蛋白激酶 A(cyclin AMP-dependent protein kinase, PKA) 就抑制了心肌蛋白质合成<sup>[9-10]</sup>。这些报道提示,心肌细胞内 cAMP 浓度升高引起蛋白激酶磷酸化级联反应,转录因子 CREB 激活,启动肥大基因表达,形成心肌重构<sup>[11]</sup>。

CREB 是位于细胞核内的转录因子,以二聚体的形式与真核基因的 CRE 启动子结合,其转录活性依赖于其自身的磷酸化程度,其中 133 位的丝氨酸对其激活最为重要。CREB 的经典调节通路是 G 蛋白偶联受体的活化导致细胞内 cAMP 升高,激活

PKA, PKA 催化亚基转位入细胞核,催化 CREB 磷酸化,促使其与辅助转录因子结合,引发基因转录过程。目前认为,CREB 不仅介导胞内 cAMP 的转录信息, CaMK 家族也参与了 CREB 的活化,其中 CaMK I、CaMK II 和 CaMK IV 均能使 CREB 磷酸化而活化。磷酸化的 CREB 激活相关基因的转录,调节 c-fos、jun-b、Bcl-2 等心肌肥厚相关基因的表达。

Cheung 等<sup>[12]</sup>发现在 N2a 细胞中剥夺葡萄糖,随着时间的延长,细胞内 O-GlcNAc 糖基化并没有下降,反而增加; Taylor 等<sup>[13-14]</sup>也发现在 HepG2 细胞中给予无糖培养基培养, O-GlcNAc 糖基化的水平也随着时间的延长而增加,糖基化的增加主要与 OGT 的表达增加有关<sup>[12-14]</sup>。在大鼠的心肌缺血再灌注模型中, Boglarka 等<sup>[15]</sup>也发现 O-GlcNAc 糖基化水平增加。升高的 O-GlcNAc 糖基化是否与心肌重构有关呢? 由于 CREB 的激活在心肌重构的发生和发展过程中起了非常重要的作用,因此本课题研究了它们两者的关系。实验证实 O-GlcNAc 糖基化确实可以调

节 CREB 的活性,而且两者呈正相关。

O-GlcNAc 糖基化如何引起 CREB 的磷酸化增加? 这有两种可能性,一种是 CREB 自身受到 O-GlcNAc 糖基化的调控<sup>[16-17]</sup>,升高的糖基化促进了 CREB 的磷酸化。但考虑到 O-GlcNAc 糖基化修饰的方式与磷酸化类似,都是作用于底物的丝氨酸或者苏氨酸的羟基,所以从理论上讲,如果 CREB 自身受到 O-GlcNAc 糖基化的修饰,则会竞争相同位点的磷酸化,因此 O-GlcNAc 糖基化的升高应该抑制 CREB 的磷酸化而使其活性降低,这与本实验结果正好相反,因此这种可能性比较小。另外一种可能就是升高的 O-GlcNAc 糖基化,促进了磷酸化 CREB 的激酶的活性,使 CREB 的磷酸化水平增加。在心肌组织,催化 CREB 在丝氨酸 133 位发生磷酸化的可能是蛋白激酶 A 或者 CaMK II delta。这两种激酶中的一种或者两者都有可能受到 O-GlcNAc 糖基化的调控,使其活性增加。但此假说还有待进一步的实验证明。

总而言之,本研究通过细胞水平的研究,发现心肌细胞内,由于糖代谢紊乱,引起 O-GlcNAc 糖基化调节失衡,过高的 O-GlcNAc 糖基化修饰会促进 CREB 的磷酸化,造成心肌肥厚,因此在高危因素的条件下,通过干预措施降低细胞内的 O-GlcNAc 糖基化水平,很可能成为将来心肌重构和心力衰竭的预防和治疗重要的潜在靶点。

#### [参考文献]

- [1] Hart GW. Dynamic O-linked glycosylation of nuclear and cytoskeletal proteins [J]. *Annu Rev Biochem*,1997,66: 315-335
- [2] Hart GW,Slawson C,Ramirez-Correa G,et al. Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation;roles in signaling,transcription,and chronic disease [J]. *Annu Rev Biochem*,2011,80:825-858
- [3] Wells L,Vosseller K,Hart GW. Glycosylation of nucleocytoplasmic proteins;signal transduction and O-GlcNAc [J]. *Science*,2001,291(5512):2376-2378
- [4] Hart GW,Housley MP,Slawson C. Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins [J]. *Nature*,2007,446(7139):1017-1022
- [5] Liu J,Pang Y,Chang T,et al. Increased hexosamine biosynthesis and protein O-GlcNAc levels associated with myocardial protection against calcium paradox and ischemia[J]. *J Mol Cell Cardiol*,2006,40(2):303-312
- [6] Liu J,Marchase RB,Chatham JC. Increased O-GlcNAc levels during reperfusion lead to improved functional recovery and reduced calpain proteolysis [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*,2007,293(3):H1391-1399
- [7] Champattanachai V,Marchase RB,Chatham JC. Glucosamine protects neonatal cardiomyocytes from ischemia-reperfusion injury via increased protein-associated O-GlcNAc[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*,2007,292(1):C178-187
- [8] Feng B,Chen YS,Hw ZY,et al. Relation between myocardial cAMP and rennin-angiotensin system activation after acute pressure overload[J]. *Acta Physiol Sin*,2000,52(1): 39-44
- [9] Yamazaki T,Komuro I,Zou Y,et al. Protein kinase A and protein kinase C synergistically activate the Raf 1 kinase/mitogen-activated protein kinase cascade in neonatal rat cardiomyocytes [J]. *J Mol Cell Cardiol*,1997,29(9): 2491-2501
- [10] Osaki J,Haneda T,Kashiwagi Y,et al. Pressure-induced expression of heat shock protein 70 mRNA in adult heart is coupled both to protein kinase A-dependent and protein kinase C-dependent systems [J]. *J Hypertens*,1998, 16(8):1193-1200
- [11] Jose PA,Eisner GM,Felder RA. Regulation of blood pressure by dopamine receptors[J]. *Nephron Physiol*,2003,95 (2):19-27
- [12] Cheung WD,Hart GW.AMP-activated protein kinase and p38 MAPK activate O-GlcNAcylation of neuronal proteins during glucose deprivation [J]. *J Biol Chem*,2008,283 (19):13009-13020
- [13] Taylor RP,Geisler TS,Chamber JH,et al. Up-regulation of O-GlcNAc transferase with glucose deprivation in HepG2 cells is mediated by decreased hexosamine pathway flux [J]. *J Biol Chem*,2009,284(6):3425-3432
- [14] Taylor RP,Parker GJ,Hazel MW,et al. Glucose deprivation stimulates O-GlcNAc modification of proteins through up-regulation of O-linked N-acetylglucosaminyltransferase [J]. *J Biol Chem*,2008,283(10): 6050-6057
- [15] Laczy B,Fülöp N,Onay-Besikci A,et al. Acute regulation of cardiac metabolism by the hexosamine biosynthesis pathway and protein O-GlcNAcylation [J]. *PLoS One*, 2011,6(4):e18417
- [16] Lamarre-Vincent N,Hsieh-Wilson LC. Dynamic glycosylation of the transcription factor CREB;a potential role in gene regulation [J]. *J Am Chem Soc*,2003,125(22): 6612-6613
- [17] Rexach JE,Clark PM,Mason DE,et al. Dynamic O-GlcNAc modification regulates CREB-mediated gene expression and memory formation [J]. *Nat Chem Biol*,2012,8 (3):253-261