

蛋白质的氧连-N-乙酰葡萄糖胺修饰在心血管疾病中的保护作用

陈明星 龚开政 张振刚

【摘要】 蛋白质的氧连-N-乙酰葡萄糖胺(O-GlcNAc)修饰作为一种重要的蛋白质翻译后修饰方式,参与调控细胞的多种生物学功能,如增殖、分化、迁移、黏附及凋亡。近来研究表明,快速调节细胞内蛋白质 O-GlcNAc 修饰水平可通过抑制炎症反应、减少细胞凋亡以及诱导热休克蛋白的表达等途径,参与调节心血管损伤早期的局部炎症以及抑制损伤后期的心肌及血管重构,从而发挥心血管保护作用。此文主要就 O-GlcNAc 修饰的动态调节过程及其机制、生物学功能及其与动脉粥样硬化、心肌缺血再灌注损伤、心律失常、心力衰竭等心血管疾病的关联方面作一综述。

【关键词】 氧连-N-乙酰葡萄糖胺修饰;动脉粥样硬化;心肌缺血再灌注损伤

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2014.03.012

蛋白质的氧连-N-乙酰葡萄糖胺(O-GlcNAc)修饰是指单个 GlcNAc 以 O-糖苷键连接到底物蛋白质丝/苏氨酸羟基上的一种蛋白质翻译后修饰,是细胞内调控多种重要蛋白生物活性的一种重要方式,如内皮型一氧化氮合酶(eNOS)、蛋白激酶 C(PKC)、肌内质网 Ca^{2+} -ATP 酶(SERCA)、磷脂肌醇特异性磷脂酶 C(PLC)、磷脂酰肌醇-3 激酶(PI3K)等^[1]。研究发现,细胞内 O-GlcNAc 修饰在体内处于一种动态平衡的状态,可参与调节多种蛋白质之间的相互作用、细胞内信号转导、下游基因的转录、翻译及翻译后修饰,因此在多种生物学功能,如细胞增殖、分化、迁移、黏附及凋亡中发挥重要作用^[2-4]。

1 O-GlcNAc 修饰调节酶及其修饰过程

O-GlcNAc 修饰类似于磷酸化修饰,是发生在丝/苏氨酸残基上的动态过程,与磷酸化存在直接或间接的相互影响,参与基因转录调控、信号转导、蛋白酶解等多种重要保守的生命活动。但与磷酸化修饰显著不同的是,细胞内调节磷酸化修饰的蛋白激酶以及磷酸酶有很多种,而调节 O-GlcNAc 修饰的酶目前仅发现有 2 种:一种是催化蛋白质 O-GlcNAc 修饰反应的 O-GlcNAc 糖基转移酶(OGT);另一种是水

解 O-糖苷键的 O-GlcNAc 糖苷酶(OGA)。修饰过程中,单糖的 β -N-乙酰氨基葡萄糖在 OGT 的催化下,经由 O-糖苷键从尿苷二磷酸 N-乙酰氨基葡萄糖(UDP-GlcNAc)供体转移并连接至蛋白质的丝氨酸或苏氨酸残基的羟基上,从而增加 O-GlcNAc 修饰水平;相反,OGA 的功能则是将 O-GlcNAc 从蛋白质丝氨酸或苏氨酸残基的羟基上去除,水解 GlcNAc,使蛋白质脱去 GlcNAc,从而降低蛋白质的 O-GlcNAc 修饰水平^[4]。近来研究证实,OGT 及 OGA 本身也是 O-GlcNAc 修饰的底物,表明 O-GlcNAc 修饰的过程可能存在某种反馈机制^[5]。虽然只有 OGT 及 OGA 参与调节 O-GlcNAc 修饰,但两者在特定的条件下却可对其靶蛋白进行特异性的瞬时修饰,从而产生不同的生物学效应^[6]。

2 O-GlcNAc 修饰与磷酸化修饰的关系

蛋白质的 O-GlcNAc 修饰与磷酸化修饰的关系密切,虽然都属于蛋白质翻译后修饰,蛋白质的 O-GlcNAc 修饰与磷酸化修饰之间的关系却十分复杂。两种修饰均可发生在蛋白质的同一丝/苏氨酸残基位点或是邻近位点上,即可表现出竞争抑制,也可表现为协同甚至相互独立进行的关系^[7]。此外,这两种修饰之间存在酶依赖的空间竞争机制。在不同的蛋白质,这种竞争机制可发生在不同位点的苏氨酸或丝氨酸残基。因此,两者对底物蛋白修饰的绝对水平对该蛋白生物学功能具有决定性作用。细胞内总的 O-GlcNAc 修饰水平的改变根据其影响的靶蛋白不同,最后表现出的生物学效应也极为复杂^[8]。

基金项目:国家自然科学基金(81070096、81141043、81270198);江苏省第四期科教兴卫工程项目基金(RC2011045)

作者单位:225001 江苏,扬州大学第二临床医学院心血管内科

通信作者:张振刚, Email:yungkzh@163.com

在同一细胞内信号转导通路中,不同信号分子的 O-GlcNAc 修饰对其自身功能既可抑制也可增强,整个信号通路最终的生物学效应取决于这些信号分子相互作用的净效应。此外,糖基化修饰也受磷酸化修饰的调节,共同参与蛋白与蛋白之间的相互作用,从而调控细胞多种生物学功能^[9]。

3 O-GlcNAc 修饰与心血管疾病

OGT 和 OGA 对 O-GlcNAc 水平的影响显示:敲除 OGT 可降低蛋白质 O-GlcNAc 修饰水平,引起细胞对应激耐受能力显著下降而死亡;给予 OGA 抑制剂 PUGNAc 会阻断蛋白质去 O-GlcNAc 修饰而增加细胞内 O-GlcNAc 修饰水平,可提高细胞对应激的耐受力并改善细胞存活。在整体动物研究中发现,增加 O-GlcNAc 修饰水平有利于严重创伤后的失血性休克大鼠心脏的复苏。越来越多的研究发现,O-GlcNAc 修饰参与了动脉粥样硬化、心肌再灌注损伤、心律失常、心力衰竭等心血管疾病的病理生理过程。

3.1 动脉粥样硬化

细胞内 O-GlcNAc 水平上调所持续的时间,即急性/短期或慢性/长期,是决定 O-GlcNAc 修饰生物学效应的关键因素^[5, 7]。在血管损伤早期,局部蛋白质总的 O-GlcNAc 修饰水平明显下降。然而,于术前 2 h 腹腔注射葡萄糖胺(GlcN)或 PUGNAc 可以增加受损血管 O-GlcNAc 修饰水平,并可显著减轻损伤早期血管内的炎性介质表达以及炎症细胞对血管外膜的浸润。在不升高血糖及胰岛素的情况下,连续腹腔注射 GlcN 14 d 可显著降低损伤晚期新生内膜形成达 50%^[2]。无论是给予 GlcN 还是 PUGNAc 预处理来增加细胞内 O-GlcNAc 水平,均可有效抑制大鼠血管平滑肌细胞内肿瘤坏死因子- α (TNF- α)诱导的多种炎症介质表达,随后的染色质免疫共沉淀研究证实,这种抗炎效应主要是通过抑制核因子(NF)- κ B 的 p65 与炎症因子基因启动子的结合来抑制靶基因转录^[10]。这些结果提示,短期内升高细胞内 O-GlcNAc 修饰水平可发挥显著的细胞保护作用,有效抑制多种病理损害。在体动物实验表明,增加糖基化修饰的水平也可抑制血管内膜损伤的急性炎症和新生内膜的形成。例如,在颈动脉损伤模型中,增加糖基化修饰的水平可显著抑制炎症介质的表达和白细胞的渗出^[11]。此外,Jones 等^[12]在小鼠心肌梗死模型中也观察到,PUGNAc 通过增加小鼠心脏内蛋白质 O-GlcNAc 修饰水平,减少梗死面积。

此外, Watson 等^[13]近来通过结扎左侧冠状动脉建立梗死相关的心力衰竭模型。在心肌梗死后 5 d,总的 O-GlcNAc 修饰水平增加了,相应的 OGT 也明显增加,并维持 4 周左右。为了证明 OGT 在心力衰竭中的作用,实验使用了心肌细胞特异性 OGT 基因敲除的小鼠。与对照组比较 OGT 敲除小鼠梗死后 4 周心脏收缩和舒张期的直径延长,左室射血分数下降,同时有更多的小鼠死亡,表明 OGT 敲除可加重心肌梗死后的心力衰竭的程度和增加死亡率,是通过增加梗死后心肌细胞的凋亡和促进心肌纤维化,增加心肌重构等共同作用的结果,而 OGT 敲除对正常小鼠的心功能没有明显影响。

3.2 心肌再灌注损伤

Chatham 等^[14-15]证实,缺血缺氧会导致乳鼠心肌细胞、离体灌注的心肌组织内蛋白质 O-GlcNAc 修饰水平升高;给予 GlcN 增加 O-GlcNAc 修饰反应底物 UDP-GlcNAc 或者使用 OGA 抑制剂 PUGNAc 来上调细胞内蛋白质 O-GlcNAc 修饰水平,可显著保护缺氧及再灌注引起的心肌细胞损伤,减少心肌细胞凋亡,改善心功能。相比之下,OGT 抑制剂 alloxan 则可废除该保护作用。这种保护作用看来与稳定线粒体跨膜电位,阻止线粒体膜通透性改变有关。相似的是,在离体的胚胎心肌,缺血再灌注可增加细胞内的 O-GlcNAc 水平,从而增加细胞的存活率。而离体的细胞在经过 GlcN、高浓度的葡萄糖或者 PUGNAc 处理后,细胞内糖基化水平显著增加,最终可明显增加细胞存活率,降低细胞坏死和凋亡^[15]。Ngoh 等^[16]用离体的新生小鼠心肌细胞缺氧预处理 3 h 后,再充氧后观察活性氧的水平,发现缺氧可导致活性氧水平明显增加和钙超载,而 O-GlcNAc 修饰可通过降低钙超载和抑制活性氧的产生来抑制线粒体膜通透性孔转换信号,减少下游线粒体膜蛋白的损耗,减少细胞凋亡,而 OGT 和 OGA 可阻止这种保护作用。

3.3 心脏节律的调控

Kim 等^[17]发现在施奈德 2(S2)细胞中 OGT 可对抗倍增时间介导的中枢节律蛋白二磷酸吡啶核苷酸(dPER)的降解,增加后者的稳定性,并促使其更多地入核。O-GlcNAc 修饰水平下降可使得生物昼夜节律破坏,表明蛋白质的 O-GlcNAc 修饰参与调控生物昼夜节律。生物昼夜节律可通过神经、内分泌、血液等因素调控心律失常的易感性。目前发

现,一些心血管系统的生理学指标如心率、血压、血管张力、QT 间期及心肌有效不应期都表现出昼夜节律性。心肌梗死、猝死等心血管恶性事件的发生都呈现清晨起床后数小时的高峰现象,这很可能和 O-GlcNAc 修饰水平的快速改变有关。

3.4 心血管的其他有益作用

此外,龚俊松等^[18]也在乳鼠心肌细胞观察到,上调细胞内 O-GlcNAc 修饰水平可以诱导热休克蛋白表达,减轻脂多糖刺激诱导的细胞损伤。热休克蛋白在细胞中执行重要的功能,如蛋白质的折叠、伸展、转运、寡聚体的形成和解聚等,维持细胞的生存和功能。在应激条件下,它们能提高细胞的抵抗力,起到应激保护作用。细胞在热负荷情况下, O-GlcNAc 修饰水平的升高可增加细胞的存活能力,反之当 O-GlcNAc 修饰被 GFAT 抑制而下降时,细胞的存活能力也下降。

4 总结

虽然已有大量实验表明,长期慢性的升高 O-GlcNAc 修饰水平与糖尿病及其并发症相关。但也有大量研究证实短期急性升高 O-GlcNAc 修饰水平在心血管系统疾病如动脉粥样硬化、心肌再灌注损伤和心律失常等方面发挥保护作用。然而,蛋白质的 O-GlcNAc 修饰是如何特异性地调控细胞内的相应分子靶标,目前还不是很清楚。阐明这些机制有利于实现对细胞内 O-GlcNAc 修饰的精细调控,从而使 O-GlcNAc 修饰发展成为一种新型的心血管治疗策略。

参 考 文 献

- [1] Fülop N, Marchase RB, Chatham JC. Role of protein O-linked N-acetyl-glucosamine in mediating cell function and survival in the cardiovascular system[J]. Cardiovasc Res, 2007, 73(2): 288-297.
- [2] Laczky B, Hill BG, Wang K, et al. Protein O-GlcNAcylation: a new signaling paradigm for the cardiovascular system[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009, 296(1): H13-H28.
- [3] Hart GW, Housley MP, Slawson C. Cycling of O-linked β -N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins [J]. Nature, 2007, 446(7139): 1017-1022.
- [4] 杨新颖,李 静,耿美玉. 蛋白质 O-GlcNAc 糖基化及其细胞生物学功能[J]. 细胞生物学杂志, 2007, 29(5): 682-686.
- [5] Zeidan Q, Hart GW. The intersections between O-GlcNAcylation and phosphorylation: implications for multiple signaling pathways[J]. J Cell Sci, 2010, 123(Pt1): 13-22.
- [6] Cheung WD, Sakabe K, Housley MP, et al. O-linked β -N-acetylglucosaminyltransferase substrate specificity is regulated by myosin phosphatase targeting and other interacting proteins [J]. J Biol Chem, 2008, 283(49): 33935-33941.
- [7] Hu P, Shimoji S, Hart GW. Site-specific interplay between O-GlcNAcylation and phosphorylation in cellular regulation [J]. FEBS Lett, 2010, 584(12): 2526-2538.
- [8] Copeland RJ, Bullen JW, Hart GW. Cross-talk between GlcNAcylation and phosphorylation: roles in insulin resistance and glucose toxicity[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008, 295(1): E17-E28.
- [9] Wang Z, Gucuk M, Hart GW. Cross-talk between GlcNAcylation and phosphorylation: site-specific phosphorylation dynamics in response to globally elevated O-GlcNAc [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(37): 13793-13798.
- [10] Xia Y, Gong KZ, Xu M, et al. Regulation of gap-junction protein connexin 43 by β -adrenergic receptor stimulation in rat cardiomyocytes[J]. Acta pharmacol Sin, 2009, 30(7): 928-934.
- [11] Zou L, Yang S, Champattanachai V, et al. Glucosamine improves cardiac function following trauma-hemorrhage by increased protein O-GlcNAcylation and attenuation of NF- κ B signaling[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009, 296(2): H515-H523.
- [12] Jones SP, Zachara NE, Ngho GA, et al. Cardioprotection by N-acetylglucosamine linkage to cellular proteins [J]. Circulation, 2008, 117(9): 1172-1182.
- [13] Watson LJ, Facundo HT, Ngho GA, et al. O-linked β -N-acetylglucosamine transferase is indispensable in the failing heart [J]. Proc Natl Acad Sci, 2010, 107(41): 17797-17802.
- [14] Liu J, Marchase RB, Chatham JC. Glutamine-induced protection of isolated rat heart from ischemia/reperfusion injury is mediated via the hexosamine biosynthesis pathway and increased protein O-GlcNAc levels[J]. J Mol Cell Cardiol, 2007, 42(1): 177-185.
- [15] 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-C187.
- [16] Ngho GA, Watson LJ, Facundo HT, et al. Augmented O-GlcNAc signaling attenuates oxidative stress and calcium overload in cardiomyocytes[J]. Amino acids, 2011, 40(3): 895-911.
- [17] Kim EY, Jeong EH, Park S, et al. A role for O-GlcNAcylation in setting circadian clock speed [J]. Genes Dev, 2012, 26(5): 490-502.
- [18] 龚俊松,景 亮. O-GlcNAc 修饰在谷氨酰胺诱导 LPS 干预的大鼠心肌细胞 HSP70 表达中的作用[J]. 中华麻醉学杂志, 2010, (4): 500-503.

(收稿: 2013-10-09 修回: 2014-03-27)

(本文编辑: 金谷英)