

# 小分子探针 2-叠氮乙酰氨基-1,3,4,6- 四乙酰基葡萄糖的合成

王淳滨<sup>1,2</sup>, 楚 俏<sup>1,2</sup>, 刘 康<sup>1,2</sup>, 郝梦林<sup>1,2</sup>, 张茹梦<sup>3</sup>, 马 静<sup>3</sup>, 王佳佳<sup>1</sup>

(1.河南大学 第一附属医院, 抗体药物开发技术国家与地方联合工程实验室 河南, 开封, 475001;

2.河南大学 临床学院 河南, 开封, 475001; 3.河南大学 药学院, 河南, 开封, 475001)

**摘 要** 实验以氨基葡萄糖盐酸盐为起始原料, 经过一系列反应(共5步)得到目标产物6, 其可作为非天然小分子探针代谢标记 O-GlcNAc 糖基化蛋白。在步骤3的丙酮、浓盐酸、50 °C 条件下分离得到一种具有荧光性能的中间体7, 并通过核磁、质谱等检测方法确定其结构, 同时探讨了其生成机理。

**关键词** 分子探针; O-GlcNAc; 糖基化; 代谢标记

**中图分类号** Q532

**文献标识码** A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



## Total Synthesis of 1,3,4,6-tetra-acetyl-2- deoxy-2-azide-Glucosamine

WANG Chunbin<sup>1,2</sup>, CHU Qiao<sup>1,2</sup>, LIU Kang<sup>1,2</sup>, HAO Menglin<sup>1,2</sup>,  
ZHANG Rumeng<sup>3</sup>, MA Jing<sup>3</sup>, WANG Jiajia<sup>1</sup>

(1.The First Affiliated Hospital, National Laboratory for Antibody Drug Engineering, Henan University,

Kaifeng 475004, China; 2.School of Clinical Medicine, Henan University, Kaifeng 475004, China;

3.School of Pharmacy, Henan University, Kaifeng 475004, China)

**Abstract** In this paper, we used the commercially available Glucosamine hydrochloride as starting material, totally five steps, to synthesize target product 6, which can be used as unnatural small molecular probe for metabolically labeling O-GlcNAc modified proteins in mammal cells. In the condition of acetone, concentrated HCl at 50 °C in step 3, we discovered an interesting byproduct 7 with strong fluorescence, the structure of which was further confirmed with NMR and MS, and the plausible mechanism was also explored.

**Key words** molecular probe; O-GlcNAcylation; glycosylation; metabolic labeling

## 0 引言

在真核生物中, 翻译产生的蛋白质通常需要被进一步加工修饰, 以满足其结构、活性、功能的需求。据报道, 蛋白质翻译后修饰包括糖基化、乙酰化、磷酸化、甲基化等<sup>[1-5]</sup>。其中蛋白质的糖基化修饰在维持细胞正常生理功能以及参与病理变化过程中起着至关重要的作用<sup>[6]</sup>。蛋白质的糖基化修饰是将低聚糖与蛋白质上

收稿日期: 2020-11-07

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(21907022); 河南省高等学校重点科研项目计划(20A350001); 河南大学本科教育教学改革研究与实践项目(HDXJG2019-54); 河南省大学生创新创业训练计划项目(S202010475085)资助

通讯作者: 王佳佳, 男, 汉族, 博士, 讲师, 研究方向: 糖化学生物学, E-mail: jwang77@vip.henu.edu.cn.

特殊的氨基酸以共价结合的方式组合到一起,包括 N-连接的糖蛋白,O-连接的糖蛋白等。其中 O 连接的 N-乙酰葡萄糖胺(O-linked  $\beta$ -N-acetyl glucosamine,O-GlcNAc)糖基化是一类特殊的 O-糖基化修饰<sup>[7-10]</sup>,主要发生在苏氨酸和丝氨酸残基。O-GlcNAc 糖基化在肿瘤<sup>[11,12]</sup>、糖尿病<sup>[13,14]</sup>等慢性疾病发生时,常常伴随着 O-GlcNAc 糖基化异常激活或沉默,故探究不同疾病中 O-GlcNAc 糖基化水平的变化对进一步明确发病机制具有重要意义。此外,O-GlcNAc 糖基化与磷酸化修饰相似,可在环境因素的刺激下通过酶的调节作用进行糖基化与去糖基化,从而调控复杂的生命活动<sup>[15-17]</sup>,但与磷酸化修饰不同的是,参与调节糖基化与去糖基化的酶只有 O-GlcNAc 转移酶(O-GlcNAc transferase,OGT)和 O-GlcNAc 水解酶(O-GlcNAcase,OGA)<sup>[18]</sup>。氨基己糖生物合成途径可以将葡萄糖转化为 UDP-N-乙酰葡萄糖(UDP-N-acetylglucosamine,UDP-GlcNAc),从而被 OGT 识别并与目的蛋白连接,研究发现经叠氮或者炔基官能团修饰的非天然糖可以经由相应的补救途径转变为 UDP 形式的糖,进而被 OGT 识别并利用<sup>[19-24]</sup>,随后利用叠氮-炔基环加成反应可以对 O-GlcNAc 糖基化的蛋白定位或者对靶蛋白富集,为 O-GlcNAc 糖基化异常相关疾病的研究提供新的途径。目前已报道多种叠氮或者炔基修饰的非天然小分子探针用于研究 O-GlcNAc 糖基化蛋白种类和位点鉴定(图 1)<sup>[19,21,24]</sup>。其中 2-脱氧-N-叠氮乙酰氨基全乙酰化葡萄糖  $Ac_4GlcNAz$  和相应的半乳糖构型  $Ac_4GalNAz$  是两种经典探针,其合成方法一般是以氨基葡萄糖或者氨基半乳糖为起始原料,在甲醇、金属钠条件下与氯乙酸酐反应生成 2-脱氧-N-氯乙酰基取代的裸糖中间体,通过叠氮化和全乙酰化得到目标产物。虽然该方法步骤简短,但是反应中所需的金属钠存在一定的安全隐患<sup>[19]</sup>。此外,某些课题组将葡萄糖氨基盐酸盐与叠氮乙酸直接偶连,再进行全乙酰化,该方法中所需的叠氮乙酸价格较高<sup>[25]</sup>。因此,开发安全、高效、经济的方法用于合成该类探针,对推动 O-GlcNAc 相关领域的科学研究具有重要的意义。

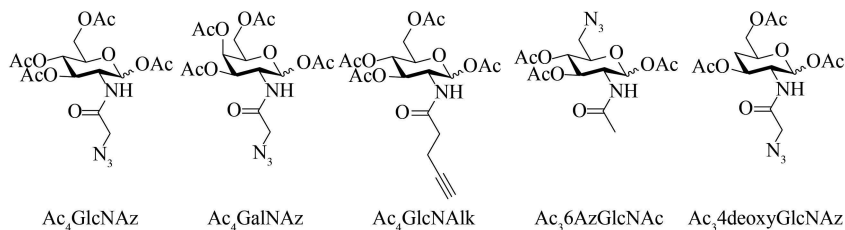


图 1 已报道的 O-GlcNAc 糖基化小分子探针

本文以氨基葡萄糖盐酸盐为起始原料,经过一系列反应得到小分子探针6,总收率 44%,经 Western blot 检测发现6 具有高效的糖基化标记效率,为后续 O-GlcNAc 糖基化等相关研究提供基础。此外,在步骤 3 中化合物4 在丙酮、浓盐酸、50 °C 的条件下得到中间体7,该中间体在 365 nm 下具有很强的吸收,本文通过核磁质谱等方法进一步确定其结构,结果表明中间体7 是一种与查耳酮以及姜黄素结构类似的化合物,在抗癌和抗氧化活性方面具有重要的生物学意义<sup>[26-28]</sup>。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

葡萄糖氨基盐酸盐购买自北京凯森莱科技有限公司;茴香醛,氯乙酰氯购买于百灵威试剂有限公司;核磁检测采用 Bruker 300 M 和 400 M 核磁共振,LC-MS 分析仪器采用 Waters 3100。

### 1.2 实验方法

1.2.1 化合物3 的合成。将化合物1(10 g,46 mmol)溶解在 10.2 mL 的 5 mol/L 氢氧化钠溶液中,在冰浴条件下搅拌,随后加入茴香醛(5.64 mL,46 mmol,1 eq),待反应凝成固体在 4 °C 保存过夜。次日将混合物用水,乙醇,石油醚:乙酸乙酯 10:1 冲洗抽滤,干燥,得到化合物 12.6 g 2,产率 88%,不需纯化,直接用于下一步合成;取部分化合物2(3.97 g,13.8 mmol)溶解在 20 mL 的吡啶溶液中,在冰浴条件下搅拌,随后逐滴加入乙酸酐(7.84 mL,83 mmol,6 eq),在冰浴条件下逐渐恢复室温,搅拌过夜。次日用二氯甲烷与稀盐酸萃取,干燥,得到化合物3(5.8 g),产率 91%。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz,CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.21 (s,1H),7.67 (d, $J$  = 8.4 Hz,1H),6.92 (d, $J$  = 8.4 Hz,1H),5.94 (d, $J$  = 8.0 Hz,1H),5.46 (d, $J$  = 3.2 Hz,1H),5.26 (dd, $J$  = 10.4,3.0 Hz,1H),4.27-4.07 (m,3H),3.84 (s,3H),3.68-3.53 (m,1H),2.17 (s,3H),2.06 (s,3H),2.03 (s,3H),1.89 (s,3H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz,CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  170.40,170.09,169.63,168.69,164.47,162.32,130.27,114.07,

93.52, 71.78, 71.56, 68.76, 65.98, 61.33, 55.42, 20.77, 20.68, 20.51. HRMS (ESI):  $m/z$   $[M+NH_4]^+$  calculated for  $C_{22}H_{27}NO_{10}$ : 465.1635, found: 465.1637.

1.2.2 化合物4和7的合成。将化合物3(5 g, 10.7 mmol)溶解在适量的丙酮中,放上冷凝管,升高温度至 50 °C,搅拌 10 min,迅速加入 2.5 mL 浓盐酸,立即生成大量固体,待其冷却至室温,加入适量的乙醚,出现颗粒状悬浮,用纸盖住烧杯口,放入冰水等待 2-3 h。加入石油醚:乙酸乙酯 10:1 冲洗抽滤,干燥,得到化合物4(3.5 g),产率 85%,直接用于下一步的合成;中间体7的核磁数据: $^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7.72 (d,  $J$  = 15.6 Hz, 2H), 7.62 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 4H), 7.03-6.96 (m, 6H), 3.89 (s, 6H);  $^{13}C$  NMR (75 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  188.90, 161.59, 142.71, 130.11, 127.68, 123.54, 114.45, 55.44.

1.2.3 化合物5的合成。将化合物4(3 g, 7.8 mmol)在真空条件下溶解在 20 mL 二氯甲烷中,插上气球,随后加入 5 mL 吡啶,将反应处于冰浴条件下,持续搅拌,随后逐滴加入氯乙酰氯(1.22 mL, 15 mmol, 2 eq),过夜,加入适量的甲醇淬灭反应,搅拌 10 min,浓缩后用稀盐酸与二氯甲烷萃取,干燥,得到化合物5(3.3 g),产率 89%。 $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  6.42 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1H), 6.19 (d,  $J$  = 3.6 Hz, 1H), 5.31-5.17 (m, 2H), 4.46-4.40 (m, 1H), 4.25 (dd,  $J$  = 12.4, 4.0 Hz, 1H), 4.07-3.90 (m, 2H), 3.92 (s, 2H), 2.19 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 2.03 (s, 3H);  $^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  170.47, 170.16, 169.37, 166.73, 92.46, 71.85, 69.85, 66.37, 61.28, 50.36, 42.44, 20.89, 20.69, 20.62. HRMS (ESI):  $m/z$   $[M+NH_4]^+$  calculated for  $C_{16}H_{22}ClNO_{10}$ : 423.0932, found: 423.0935.

1.2.4 化合物6的合成。将化合物5(1.8 g, 4.2 mmol)与  $NaN_3$  (0.54 g, 8 mmol, 2 eq)混合,加入 10 mL DMF 溶解,搅拌,升温至 70 °C,反应过夜。次日,旋蒸将 DMF 旋出,经硅胶层析柱分离纯化(石油醚:乙酸乙酯=3:1),得到 1.3 g 目标化合物6,产率 72%。 $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  6.42 (d,  $J$  = 8.8 Hz), 6.19 (d,  $J$  = 3.6 Hz), 5.31-5.17 (m, 2H), 4.46-4.40 (m, 1H), 4.25 (dd,  $J$  = 12.4, 4.0 Hz, 1H), 4.07-3.90 (m, 2H), 3.92 (s, 2H), 2.19 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 2.03 (s, 3H).  $^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  171.51, 170.64, 169.13, 168.65, 166.87, 90.26, 70.34, 69.81, 67.43, 61.49, 52.43, 51.24, 20.66. HRMS (ESI):  $m/z$   $[M+NH_4]^+$  calculated for  $C_{16}H_{22}N_4O_{10}$ : 448.1680, found: 448.1677.

1.2.5 细胞的培养和代谢标记。将 HEK293T 细胞培养在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,在温度为 37 °C 和 5.0% 二氧化碳的培养箱中。待细胞长至 80%-85% 密度,向细胞中加入终浓度为 200  $\mu$ mol/L  $Ac_4GlcNAz$  或相应体积的 DMSO 作为对照,于培养箱中继续培养 24 h。

1.2.6 Western blot 检测探针6标记效率。将细胞转移至 1.5 mL 离心管,500 r/min 离心 5 min,去除培养基后,用无菌 PBS 清洗两遍;在每个小皿中加入 200  $\mu$ L 细胞裂解液(1 $\times$  lysis buffer、PMSF, 25 倍蛋白酶抑制剂、10 倍磷酸酶抑制剂),于 4 °C 层析柜中,裂解 30 min;裂解结束后,12000 r/min、4 °C 离心 10 min;离心结束后,将含有蛋白的上清液取出到新的 EP 管中并进行 BCA 蛋白定量;取 200  $\mu$ g 体积蛋白,另取一支 1.5 mL 离心管依次加入 170  $\mu$ L 裂解液,0.2  $\mu$ L 100 mmol/L  $CuSO_4$  (终浓度 100  $\mu$ mol/L), 0.4  $\mu$ L 100 mmol/L THPTA ( $CuSO_4$ :THPTA=1:2, 摩尔数比), 0.2  $\mu$ L 100 mmol/L Biotin-PEG-Alkyne (终浓度 100  $\mu$ mol/L), 室温反应 2 h,在蛋白样品中加入 1 mL 冰甲醇,于 -80 °C 静止 2 h,取出后于 10000 g, 4 °C 离心 10 min;加入 500  $\mu$ L 冰甲醇,吹洗蛋白,再次离心,弃掉上清液,蛋白于室温晾干 15 min;每管加入 80  $\mu$ L 4% SDS buffer (4% SDS, 150 mmol/L, 50 mmol/L TEA pH7.4),另加 20  $\mu$ L 5 $\times$  loading buffer,煮沸 10 min;配胶,每孔上样 30  $\mu$ L 蛋白,进行电泳分析;电泳结束后,以 280 mA、180 min 进行转膜(NC 膜, GE 公司);将转好的膜在 TBST 配置的 5% 脱脂牛奶中在室温下进行封闭;孵育 HRP-Streptavidin (1:10000 稀释), 1 h 后, PBST 清洗 3 $\times$ 10 min;)对清洗过后的膜加入化学发光液爆片分析。

## 2 结果与讨论

本课题以商品化的葡萄糖糖氨基盐酸盐为起始原料,在 5 M 氢氧化钠作用下与对甲氧基苯甲醛作用生成亚胺结构,对葡萄糖的二位氨基进行临时保护;随后在吡啶和醋酸酐的作用下进行全乙酰化保护得到中间体 3;接着在滴加少量浓盐酸的热丙酮溶液中脱除二位保护基,静置冷却至室温,加入乙醚混匀并抽滤,得到关键中间体4;最后在吡啶溶液中与氯乙酰氯反应在二位引入氯乙酰基,并发生叠氮化,最终顺利得到目标产物 2-叠氮乙酰氨基-1,3,4,6-四乙酰基葡萄糖6(图 2),并通过核磁、验证其结构确实为理想产物。我们将

200  $\mu\text{mol/L}$  探针6 与 Hek293T 细胞孵育 24 h, 设置空白对照组, 收集细胞并裂解提取蛋白, 通过与 Biotin-PEG<sub>4</sub>-Alkyne 发生 click 反应, 最终经由 western blot 检测发现我们合成的探针6 与对照组相比具有很高的标记效率(图 3), 与之前报道的文献一致<sup>[19]</sup>。

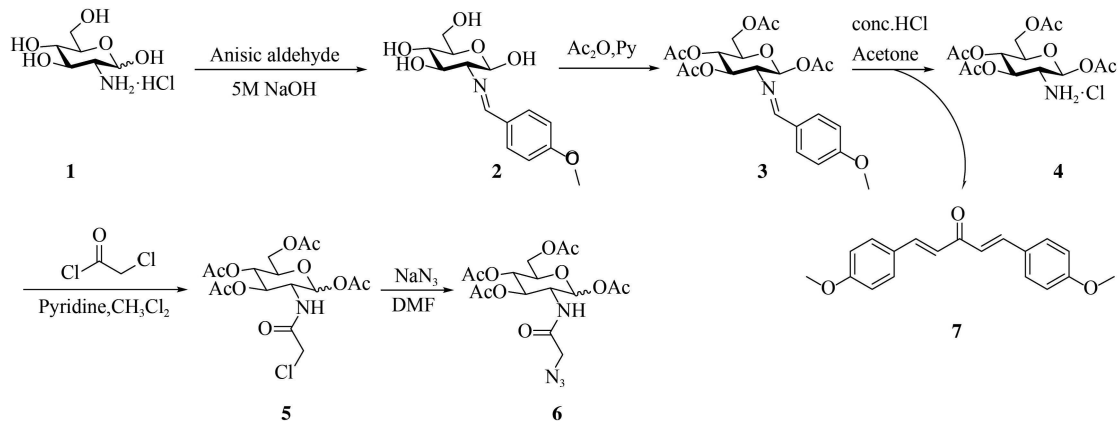


图 2 糖代谢分子探针6 的合成路线

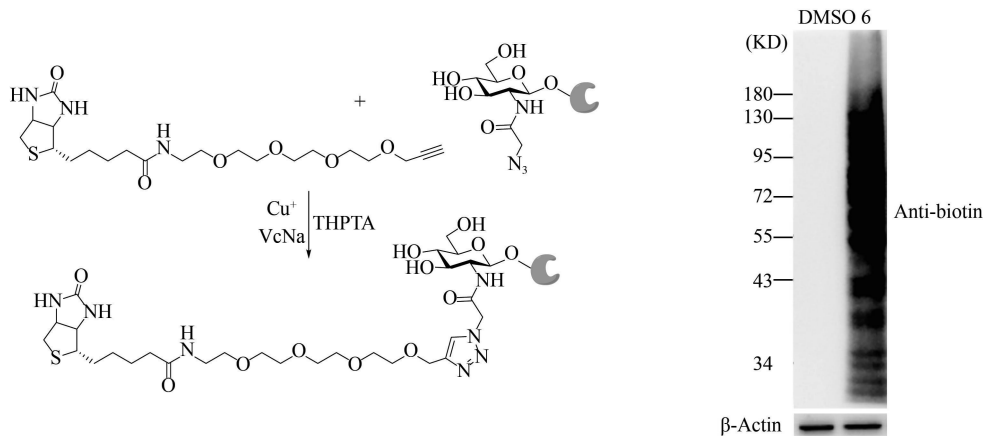


图 3 化合物6 在 293T 细胞进行糖基化标记的机制和结果

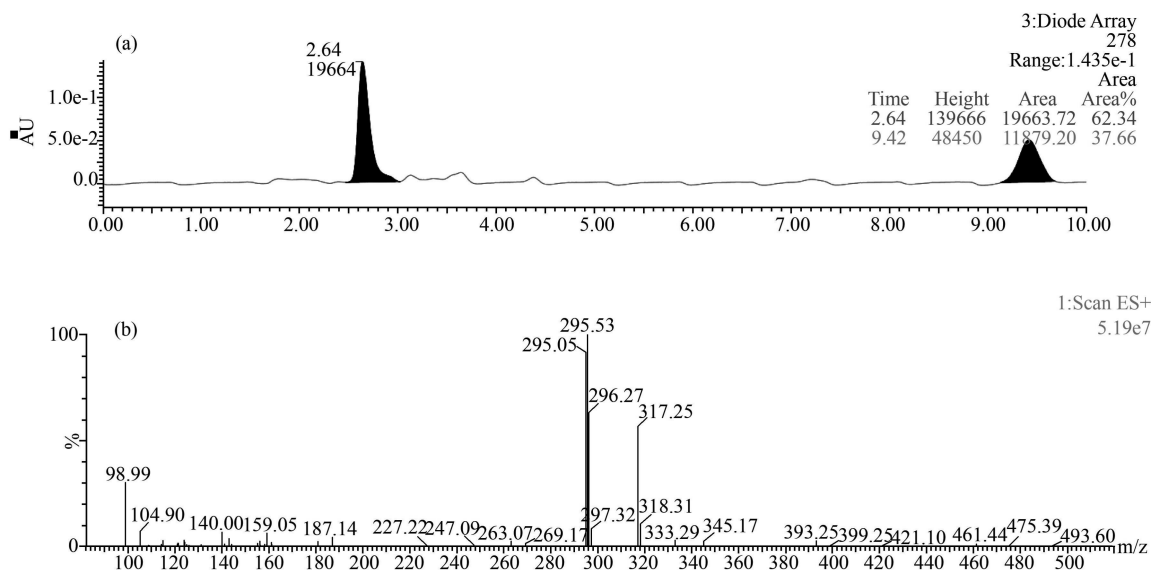


图 4 通过 LC-MS 分析化合物7 的结构

此外, 在合成目标化合物6 的过程中, 我们发现步骤3 即浓盐酸和 50  $^{\circ}\text{C}$  丙酮的条件下, 生成了一种在 365 nm 紫外灯照射下具有强烈吸收, 且极性偏小的副产物, 具备一般荧光探针的特性。为探究其具体结构, 首先我们将反应液混合物进行液质联用分析, 结果如图 4 所示, 液相中保留时间为 2.64 与 9.42 min 位置呈现两组峰(图 4(a)), 根据化合物的极性分析, 保留时间 9.42 min 为我们重点研究的荧光化合物, 其对应的质

谱图发现对应的分子离子峰的分子量为 295.5  $m/z$ (图 4(b)),与理论计算值 295.3 相符;为进一步确定中间产物 7 的结构,我们将其经柱层析纯化,通过核磁氢谱和质谱确定其结构如图 2 所示,为一种具有对称结构的  $\alpha,\beta$  不饱和酮,是一种与查耳酮以及姜黄素结构类似的化合物。

根据中间体 7 的结构,本文推测了其生成的可能机理(图 5)。首先,在酸性条件下丙酮的羰基氧被质子化,通过异构共振形成具有亲核性能的碳负离子中间体 d;其次,从糖环上脱下来的保护基对甲氧基苯甲醛在酸性条件下被质子化,与 d 发生亲核加成生成  $\beta$ -羟基酮 f,中间体 f 在加热条件下失去一分子水,生成  $\alpha,\beta$ -不饱和醛 h;随后, h 再次或者同时发生类似的过程即可得到中间体 7。

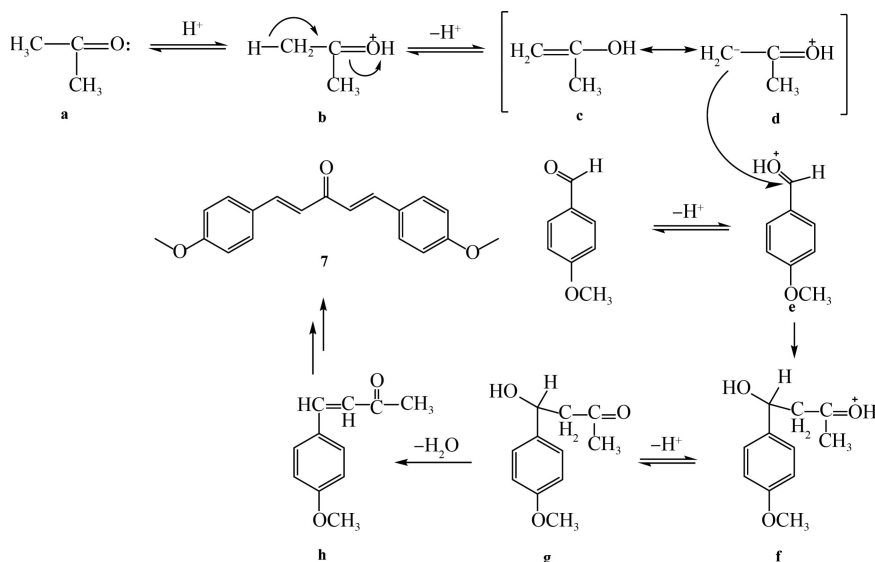


图 5 中间体 7 生成的可能机理

为进一步分析中间体 7 的荧光性能,我们首先对中间体 7 进行了全波长扫描,结果发现其最大吸收波长为 362 nm(图 6(a)),与姜黄素的吸收波长为 425 nm 相比较短,其原因是 7 结构中苯环上的甲氧基的供电效应不如羟基高,致使吸收波长的差异。随后,我们配制了化合物 7 的系列浓度梯度,并在 362 nm 下检测吸收与浓度的依赖性(图 6(b)),结果表明,在固定波长下,中间体 7 展现了良好的浓度依赖性。

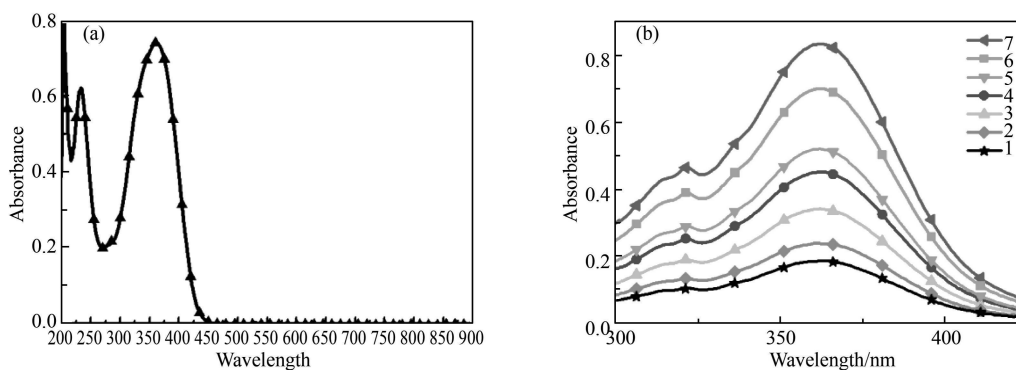


图 6 中间体 7 的全波长扫描及浓度与波长的关系

### 3 结论

本文以氨基葡萄糖盐酸盐为原料,通过 5 步反应得到目标产物 6,通过 western blot 实验表明化合物 6 可以高效标记 *O*-GlcNAc 糖基化蛋白。因化合物 6 结构中含有叠氮官能团,可利用叠氮-炔基环加成反应进行荧光标记和目标蛋白富集,对 *O*-GlcNAc 糖基化蛋白质的标记及其相关研究有重要的细胞生物学意义。此外,实验中还发现了一种有趣的中间体 7,并通过 NMR 和 HRMS 等确定其结构,结果表明中间体 7 是一种与姜黄素结构类似的化合物,具有较强的荧光性能。因此,我们推测中间体 7 将来可用于开发一种高效、低毒的新型光敏剂,其次可能在诱导细胞凋亡、活血止痛具有重要的生物学意义<sup>[25-27]</sup>。

## 参 考 文 献

- [1] CATTANEO A, CHIRICHELLA M. Targeting the post-translational proteome with intrabodies[J]. *Trends Biotechnol*, 2019, 37(6): 578-591.
- [2] TORRES M P, DEWHURST H, SUNDARARAMAN N. Proteome-wide structural analysis of PTM hotspots reveals regulatory elements predicted to impact biological function and disease[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2016, 15(11): 3513-3528.
- [3] HEATH J M, SUN Y, YUAN K, et al. Activation of AKT by O-linked N-acetylglucosamine induces vascular calcification in diabetes mellitus[J]. *Circulation Research*, 2014, 114(7): 1094-1102.
- [4] PENG C, ZHU Y, ZHANG W, et al. Regulation of the hippo-YAP Pathway by glucose sensor O-GlcNAcylation[J]. *Molecular Cell*, 2017, 68(3): 591-604.
- [5] YANG W H, KIM J E, NAM H W, et al. Modification of p53 with O-linked N-acetylglucosamine regulates p53 activity and stability[J]. *Nature Cell Biology*, 2006, 8(10): 1074-1083.
- [6] MOREMEN K W, TIEMEYER M, NAIRN A V. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2012, 13(7): 448-462.
- [7] 施杰. 蛋白质 O-GlcNAc 糖基化的探针[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2020, 6: 609-616.
- [8] 邓瑞萍, 郭书娟, 陶生策. O-GlcNAc 糖基化功能研究最新进展[J]. *生命科学*, 2013, 05: 495-503.
- [9] 李楠, 李忻琳, 韦立红, 林忠. 蛋白质 O-GlcNAc 糖基化修饰的生物合成途径与检测方法[J]. *中华妇幼临床医学杂志(电子版)*, 2018, 06: 736-739.
- [10] 张炜琳, 王鑫怡, 严方. 蛋白质 O-GlcNAc 修饰与肿瘤糖代谢关系的研究进展[J]. *中国药科大学学报*, 2019, 50: 127-134.
- [11] CHAIYAWAT P, NETSIRISAWAN P, SVASTI J, et al. Aberrant O-GlcNAcylated proteins: new perspectives in breast and colorectal cancer[J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2014, 5(2): 193.
- [12] MIR A M, BOUREME D, BUZY A, et al. O-GlcNAcylation stabilizes  $\beta$ -catenin through direct competition with phosphorylation at threonine 41[J]. *Faseb Journal Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2014, 28(8): 3325-3338.
- [13] BANERJEE P S, MA J, HART G W. Diabetes-associated dysregulation of O-GlcNAcylation in rat cardiac mitochondria[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(19): 6050-6055.
- [14] VAIDYANATHAN K, WELLS L. Multiple tissue-specific roles for the O-GlcNAc post-translational modification in the induction of and complications arising from type II diabetes[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(50): 34466-34471.
- [15] HART G W, HOUSLEY M P, SLAWSON C. Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins[J]. *Nature*, 2007, 446(7139): 1017-1022.
- [16] BANERJEE P S, LAGERLF O, and Hart G W. Roles of O-GlcNAc in chronic diseases of aging[J]. *Molecular Aspects of Medicine*, 2016, 51: 1-15.
- [17] HANOVER J A, CHEN W, BOND M R. O-GlcNAc in cancer: an oncometabolism-fueled vicious cycle[J]. *Journal of Bioenergetics*, 2018, 50(3): 155-173.
- [18] BRAIDMAN I, CARROLL M, DANCE N, et al. Characterisation of human N-acetyl-beta-hexosaminidase C. [J]. *Febs Letters*, 1974, 41(2): 181-184.
- [19] VOCADLO D J, HANG H C, KIM E J, et al. A chemical approach for identifying O-GlcNAc-modified proteins in cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(16): 9116-9121.
- [20] 韩小见, 温银行, 郑路, 等. 代谢标记小分子探针 6-炔基-2 乙酰氨基半乳糖的合成[J]. *化学研究与应用*, 2020, 32: 442-446.
- [21] DARABEDIAN N, GAO J, Chuh K N, et al. The metabolic chemical reporter 6-Azido-6-deoxy-glucose further reveals the substrate promiscuity of O-GlcNAc transferase and catalyzes the discovery of intracellular protein modification by O-Glucose[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2018, 140(23): 7092-7100.
- [22] GUO J, ZHANG G, MA J, et al. Detection and identification of O-GlcNAc-modified proteins using 6-azido-6-deoxy-N-acetyl-galactosamine [J]. *Organic & biomolecular chemistry*, 2019, 17(17): 4325-4334.
- [23] HAO Y, FAN X, SHI Y, et al. Next-generation unnatural monosaccharides reveal that ESRRB O-GlcNAcylation regulates pluripotency of mouse embryonic stem cells[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 4065.
- [24] LI J, WANG J, WEN L, et al. An OGA-resistant probe allows specific visualization and accurate identification of O-GlcNAc-modified proteins in cells[J]. *Acs Chemical Biology*, 2016, 11: 3002-3006.
- [25] TOMASZEWSKA J, KOWALSKA K, KORONIAK S K. Glucosamine- and galactosamine-based monosaccharides with highly fluorinated motifs[J]. *Journal of Fluorine Chemistry*, 2016, 191: 1-13.
- [26] MAGINI A, POLCHI A, DI M D, et al. Curcumin analogue C1 promotes hex and gal recruitment to the plasma membrane via mTORC1-independent TFEB activation[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(6): 1363.
- [27] HAI X, GE L, et al. Inhibitory effect of curcumin analogs on tissue factor procoagulant activity and their preliminary structure-activity relationships[J]. *Medicinal chemistry research: an international journal for rapid communications on design and mechanisms of action of biologically active agents*, 2013, 22(7): 3242-3246.
- [28] ANTO R J, SUKUMARAN K, KUTTAN G, et al. Anticancer and antioxidant activity of synthetic chalcones and related compounds[J]. *Cancer Letters*, 1995, 97(1): 33-37.