

O-N-乙酰葡萄糖胺糖基化水平正调控 促血管生成素-2表达从而促进小鼠 肝癌中肿瘤新生血管形成

王爱红¹, 王明全², 杜娟¹

(1. 延安大学医学院及延安市肿瘤防治研究重点实验室, 延安 716000;

2. 延安大学附属医院介入放射科, 延安 716000)

[摘要] 目的 探索在肝癌的发生发展过程中, O-N-乙酰葡萄糖胺(O-GlcNAc)糖基化水平与促血管生成素-2(Ang-2)表达的关系。方法 采用二乙基硝胺(DEN)诱导 C57BL/6 小鼠肝癌模型, 检测 O-GlcNAc 糖基化、Ang-2 及内皮细胞黏附分子(CD31)在肝癌中表达; 采用 N-乙酰氨基葡萄糖转移酶(OGT)抑制剂及 N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(OGA)抑制剂干预 HepG2 细胞, 检测 Ang-2 的表达是否随 O-GlcNAc 糖基化水平的变化而改变; 采用 MTT 检测 O-GlcNAc 糖基化的水平与肝癌细胞增殖的关系; 采用 Transwell 法检测 HUVEC 细胞中 O-GlcNAc 糖基化水平与细胞迁移侵袭能力的关系。结果 在 DEN 诱导的肝癌模型中, 小鼠肝脏体积明显增大, 肝脏上可见大小不一的肿瘤。免疫组织化学结果显示, 与对照组相比, O-GlcNAc 糖基化水平与 Ang-2 的表达在模型组小鼠肝脏中均明显上升($P<0.05$), 且肝癌组织中 CD31 染色的微血管密度明显上升($P<0.01$); qRT-PCR 检测结果显示, 通过检测 OGT、OGA、Ang-2 mRNA 水平, 得出 O-GlcNAc 糖基化水平影响 Ang-2 的表达水平; Western blotting 结果显示, 采用 OGT 抑制剂干预 HepG2 细胞后, Ang-2 的表达随着 O-GlcNAc 糖基化水平的降低而下调; 采用 OGA 抑制剂干预 HepG2 细胞后, Ang-2 的表达随着 O-GlcNAc 糖基化水平的上升而升高。MTT 结果显示, O-GlcNAc 糖基化水平与肝癌细胞的增殖有密切关系, 当 O-GlcNAc 糖基化水平高时, 肝癌细胞增殖能力较强, 当 O-GlcNAc 糖基化水平较低时, 肝癌细胞的增殖能力明显受到抑制。Transwell 结果显示, HUVEC 细胞迁移侵袭能力与 O-GlcNAc 糖基化水平呈正相关。结论 在肝癌的发生发展过程中, O-GlcNAc 糖基化水平逐渐上升, 且 Ang-2 的表达水平受到 O-GlcNAc 糖基化的正调控, 从而促进肿瘤新生血管的生成。

[关键词] 肝癌; O-N-乙酰葡萄糖胺(O-GlcNAc); 糖基化; HepG2 细胞; 促血管生成素-2(Ang-2); 肿瘤新生血管

[中图分类号] Q95-33 [文献标志码] A [文章编号] 1674-5817(2020)01-0039-08

[收稿日期] 2019-06-28

[基金项目] 延安市科技局项目(2017KS-19)

[作者简介] 王爱红(1973-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 营养与肿瘤。E-mail: wwahong1267@yeah.net

[通信作者] 王明全(1972-), 男, 硕士, 主任医师, 研究方向: 介入治疗与肿瘤。E-mail: wwahong1267@yeah.net

据美国癌症学会在2018年发表的全球癌症统计^[1], 肝癌在2018年将成为世界上第六大最常见的癌症, 也是全球癌症死亡的第四大原因, 每年约有841 000例新病例和782 000例死亡。因此, 肝癌在全球病例数量排名第五。原发性肝癌包括肝细胞癌(HCC)(含75%~85%的病例)和肝内胆管

细胞癌(包括10%~15%的病例)以及其它罕见类型。HCC的主要发病因素与慢性感染乙型肝炎病毒(HBV)或丙型肝炎病毒(HCV),重度酒精摄入、肥胖、吸烟及2型糖尿病等密切相关^[2]。

在HCC患者的癌组织中O-N-乙酰葡萄糖胺(O-GlcNAc)糖基化水平表达上调,且其与肿瘤的发生发展以及肝移植后的肿瘤复发密切相关^[3,4]。O-GlcNAc糖基化水平的升高与多种代谢异常相关,如糖尿病、肥胖以及肿瘤相关的代谢^[5]。O-GlcNAc糖基化是O-GlcNAc单糖修饰,不存在糖链的延伸。O-GlcNAc糖基化也是一种动态的蛋白质修饰过程。O-GlcNAc修饰基团的添加和去除分别是由O-GlcNAc糖基转移酶(O-GlcNAc transferase, OGT)和N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(O-GlcNAcase, OGA)来完成^[6]。肝癌的形成需要充足的血液供应,新血管的形成对肝癌的进展、侵袭和转移至关重要^[7],因此,血管生成是肝癌研究和治疗中的一个重要过程。血管生成素包括血管生成素1(angiotensin-1, Ang-1)和血管生成素2(angiotensin-2, Ang-2),Ang-1能够促进血管的稳定生成,而Ang-2则作为Ang-1的竞争拮抗剂发挥作用,降低血管生成的稳定性^[8,9]。有研究表明,Ang-2的表达在肝癌和肝硬化患者中升高^[10],并且Ang-2高表达与预后不良显著相关^[11]。因此,Ang-2与肝癌的发生发展密切相关。在肝癌的发生发展过程中,O-GlcNAc糖基化水平升高,Ang-2表达水平也明显上升,但二者之间是否有相互促进或抑制的关系尚不明确。因此,本课题组拟初步探讨在肝癌发生发展过程中,O-GlcNAc糖基化水平升高与Ang-2表达上升是否有明确关系。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级雄性C57BL/6小鼠,2周龄,购自第三军医大学大坪医院实验动物中心[SCXK(渝)2012-0001]。饲养于第四军医大学实验动物中心SPF动物室,光照-黑暗12 h交替,自由饮水进食,室温维持在20℃左右。

1.2 实验细胞

人肝癌细胞HepG2,购自上海细胞库;人

脐静脉内皮细胞(HUVEC),购自协和医院基础医学研究所细胞中心。

1.3 主要试剂、抗体及仪器

二乙基亚硝胺(DEN)购自美国Sigma公司;OGA抑制剂(Thiamet, ThG)购自美国Tim Tec公司;四氧嘧啶(Alloxan) OGT抑制剂购自江苏恒瑞医药公司;Western blotting O-GlcNAc抗体,购自美国Santa Cruz公司;sc-59623和免疫组织化学O-GlcNAc抗体均购自美国Pierce Biotechnology公司;Ang-2抗体(ab155106);CD31抗体(ab28364)购自美国Abcam公司;Transwell小室购自美国Coming-Constar公司。

Mini-protein Tetra System电泳仪,Trans-Blot®SD Cell转印系统,Imark酶标仪购自Bio-Rad公司。

1.4 实验方法

1.4.1 动物模型建立 肝癌小鼠模型的构建及样品采集:小鼠适应性喂养3 d后,将小鼠随机分为正常对照组与模型组,每组20只。于实验第1日,模型组小鼠腹腔注射给予二乙基亚硝胺(DEN)溶液,给药剂量为20 mg/kg,对照组小鼠给予等体积生理盐水。实验第5周,模型组小鼠的饮水中添加浓度为10 mg/L的DEN溶液,至实验第9周改为正常饮水。对照组小鼠在实验过程中正常饮水^[12]。每2 d监测一次体质量和观察精神状态。于实验11个月时处死各组小鼠,质量分数4%多聚甲醛溶液固定部分肝脏组织或肝癌组织用于病理观察,剩余肝脏组织保存于-80℃备用。

1.4.2 免疫组织化学分析肝癌模型小鼠中Ang-2、O-GlcNAc糖基化及CD31的表达水平 将组织切片置于室温30 min后,4℃丙酮溶液中固定10 min, PBS洗涤2次(每次洗涤5 min)。然后,内源性过氧化物过氧化氢(H₂O₂)孵育10 min,37℃下正常山羊血清封闭20 min,5% BSA稀释抗体(Ang-2, 1:500; O-GlcNAc, 1:200, CD31, 1:50),4℃过夜。第2日, PBS冲洗3次,每次5 min。滴加生物素标记二抗工作液及辣根酶标记链霉卵白素工作液,各37℃孵育30 min。最后,滴加DAB显色液显色。自来水冲洗,苏木素复染,封片,用光学显微镜拍片。使用Image Pro Plus软件进行分析。黄色的区域反映

靶蛋白的阳性表达。以积分吸光度 SUM/Area 的比值对 Ang-2、O-GlcNAc 糖基化的表达进行定量。通过 CD31 阳性染色确定的血管数量,并在 8 个视野中计数取微血管密度平均值。

1.4.3 细胞培养和转染 人HUVEC细胞及HepG2细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养,并放置于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中,并使用 5 mmol/L 的 Alloxan 与 ThG 分别干预 HUVEC 细胞及 HepG2 细胞。以不含 Alloxan 药物或 ThG 培养基常规培养的 HUVEC 细胞及 HepG2 细胞作为各自的对照组。

1.4.4 qRT-PCR 和 Western blotting 检测 O-GlcNAc 糖基化及 Ang-2 的 mRNA 和蛋白水平 qRT-PCR: 取手术切除的肝癌组织,采用 TRIzol 法提取组织总 RNA,在 37 °C, 30 min, 85 °C, 5 s 的条件下进行反转录,获得 cDNA,采用 SYBR green 实时定量 PCR 法进行扩增和检测。

Western blotting: 将收集的细胞采用全蛋白提取试剂盒提取蛋白,BCA 蛋白含量检测试剂盒测蛋白浓度。用 10% SDS-PAGE 凝胶分离蛋白样品,转移到 PVDF 膜上,一抗孵育 4 °C 过夜(一抗浓度, O-GlcNAc: 1 : 500, Ang-2, 1 : 2000)。二抗在室温下孵育 1.5 h(浓度均为 1 : 2 000),ECL 显影后, Bio-RAD 仪器扫描, Image Lab 进行条带分析,目的蛋白灰度值 / GAPDH 灰度值为目的蛋白的相对表达量。

1.4.5 MTT 法检测 O-GlcNAc 糖基化水平对 HepG2 细胞增殖的影响 细胞长满至 80% 时消化并计数,将每种细胞分别接种 200 μ L 混悬液约 3 000 个于 96 孔板,每组细胞做 5 个复孔,共 2 块板,分别培养 24 h, 48 h。待细胞贴壁后,把配好的 OGT 抑制剂及 OGA 抑制剂分别加入到不同的培养孔中,开始对细胞培养时间计时,等到各个时间点依次收板,避光条件下加入 MTT 试剂 20 μ L 于每孔中,此时设置调零孔,继续放入培养箱中孵育 4 h 后避光取出,去培养基和 MTT 试剂混合液,加入 DMSO 150 μ L 于每孔中,置于室温摇床上混匀 10 min,用酶标仪 490 nm 检测吸光度 (A) 值。

1.4.6 Transwell 检测 O-GlcNAc 糖基化水平对 HUVEC 细胞迁移侵袭能力的影响 HUVEC 细胞消化后,置于 0.1% BSA 的培养基中,并计数,

取 1×10^5 /L 细胞 100 μ L 加入 Transwell 小室中的上室,并分别加入 5 mmol/L 的 OGT 抑制剂及 OGA 抑制剂,下室中加入 400 μ L 0.1% 小牛血清培养基, 37 °C, 5% CO₂ 条件下培养 24 h 后,去除上层细胞,下层细胞用 95% 乙醇溶液固定,并用台盼蓝染色。于镜下计数,以迁移细胞数目表示细胞的迁移能力。

1.5 统计方法

采用 SPSS 19.0 分析,所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,单因素方差分析用于多组之间的比较,两组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 模型小鼠大体表现

在造模过程中,观察到模型组小鼠饮食量减少、行动缓慢、精神萎靡、且体质量明显下降。造模 11 个月时脱颈处死小鼠,取肝脏拍照(图 1)并称重。对照组小鼠肝脏表面光滑,色泽暗红且有光泽,而使用 DEN 干预的模型组小鼠的肝脏体积明显增大,表面粗糙,显示出许多大小不同的肿瘤,颜色暗淡成淡黄色,且在大部分肝脏区域可见。模型组小鼠肝脏重量(2.78 ± 1.25 g)约为正常组小鼠(0.92 ± 0.19 g)的 3 倍($P < 0.05$)。模型组最终发生肝癌的小鼠有 17 只,肝癌发生率为 85%。



图 1 各组小鼠肝组织形态

2.2 小鼠肝脏病理形态变化及 Ang-2、O-GlcNAc 糖基化蛋白表达水平

HE 染色结果显示,对照组肝细胞排列整齐且有规则,肝细胞大小均匀。而模型组小鼠肝细胞变大,大小不一,有炎细胞浸润,细胞核变大,肝细胞形态结构不清晰且排列紊乱(图 2)。免疫组织化学结果显示,与对照组中 Ang-2 蛋白表达水平(0.15 ± 0.05)和 O-GlcNAc 蛋白表达水平(0.13 ± 0.05)相比,模型组中 Ang-2 在细胞质中

高表达水平为 0.36 ± 0.17 , O-GlcNAc 在细胞核中高表达水平为 0.28 ± 0.14 , 组间差异具有统计学意义($P<0.01$), 即肝癌模型组中, Ang-2 与 O-GlcNAc 的表达均是上调的。与对照组 CD31 阳性染色的

微血管密度(43 ± 16)相比, 模型组 CD31 阳性染色的微血管密度为 107 ± 23 , 其差异具有统计学意义($P<0.01$), 表明模型组小鼠肝脏组织中血管数量明显上升。

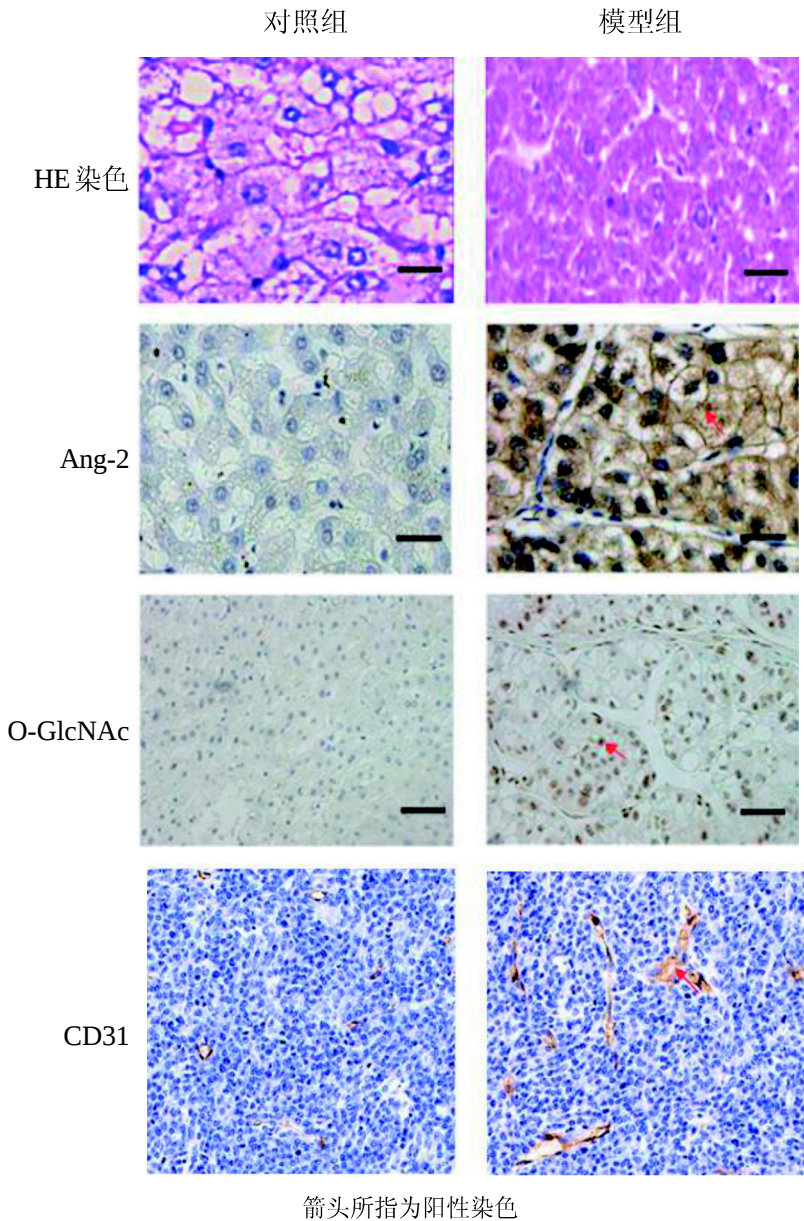


图 2 小鼠肝癌模型病理变化及免疫组织化学结果 (× 400)

2.3 O-GlcNAc 糖基化及 Ang-2 mRNA 表达水平
结果表明, Ang-2 表达水平受到 O-GlcNAc 糖基化表达水平的影响(表 1)。

2.4 O-GlcNAc 糖基化和 Ang-2 的蛋白表达水平
如图 3 所示, 使用 OGT 抑制剂感染 HepG2

表 1 两组小鼠 OGA、OGT、Ang-2 mRNA 相对表达量				
组别	n	OGA	OGT	Ang2
对照组	20	0.12 ± 0.05	0.15 ± 0.11	0.15 ± 0.09
模型组	17	$0.73 \pm 0.07^*$	$0.86 \pm 0.14^*$	$0.96 \pm 0.17^*$

注: 与对照组比较, $^*P<0.05$

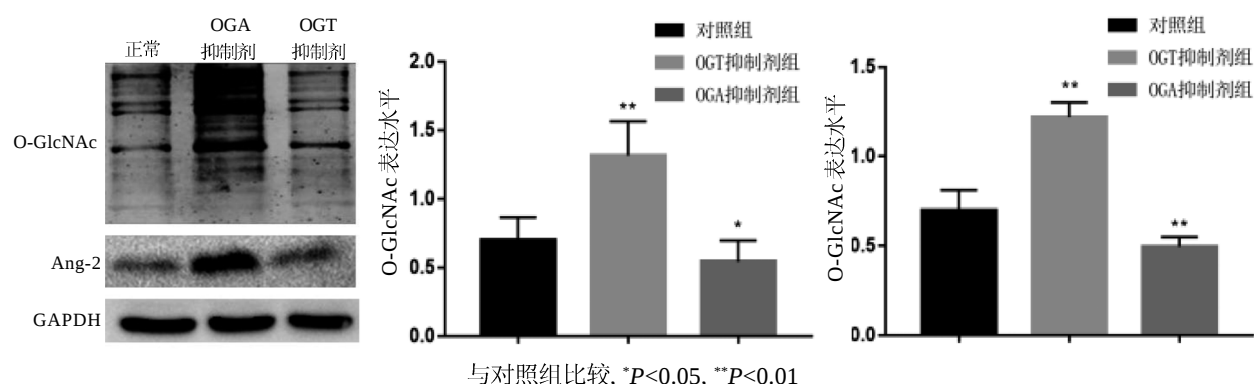


图3 HepG2细胞分别添加OGT抑制剂及OGA抑制剂后O-GlcNAc及Ang-2蛋白表达

细胞抑制O-GlcNAc的表达后, Ang-2的表达也随之降低; 而使用OGA抑制剂感染HepG2细胞使O-GlcNAc高表达后, Ang-2的表达水平也明显上升。以上结果显示, 在肝癌细胞中, O-GlcNAc可能是Ang-2的上游蛋白, 其表达的变化能引起Ang-2的变化。

2.5 O-GlcNAc糖基化水平能促进肝癌细胞增殖

在添加OGT抑制剂24 h后, 与对照组相比, 细胞的增殖能力明显受到抑制($P<0.05$)。而添加OGA抑制剂24 h后, 肝癌细胞增殖能力有所增加($P<0.05$)。48 h时, 添加了OGT抑制剂组较24 h对肝癌细胞增殖抑制效果明显增强($P<0.01$), 而OGA抑制剂组能够明显提高细胞的增殖能力($P<0.01$)(图4)。这些结果说明, O-GlcNAc糖基化水平增高可以促进肝癌细胞的增殖能力。

2.6 O-GlcNAc糖基化水平对HUVEC细胞和HepG2细胞迁移侵袭能力的影响

Transwell结果显示(图5~8), 经5 mmol/L的Alloxan干预HUVEC细胞和HepG2细胞24 h后, 干预组穿膜细胞数与对照组相比明显减少($P<0.01$); 而经5 mmol/L的ThG干预HUVEC细胞

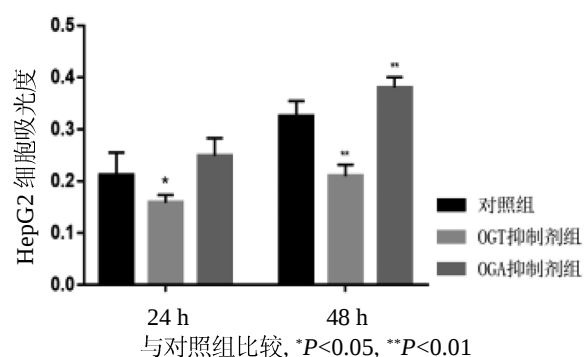


图4 O-GlcNAc表达的变化对肝癌细胞HepG2增殖影响

和HepG2细胞24 h后, 干预组穿膜细胞数较对照组显著增加($P<0.01$)。结果说明, HUVEC细胞及HepG2细胞迁移侵袭能力明显受到O-GlcNAc糖基化水平影响, 且与O-GlcNAc糖基化水平呈正相关。

3 讨论

HCC是多中心、多阶段、多病因以及连续的发展过程^[13]。在化学因素诱导肝癌动物模型的

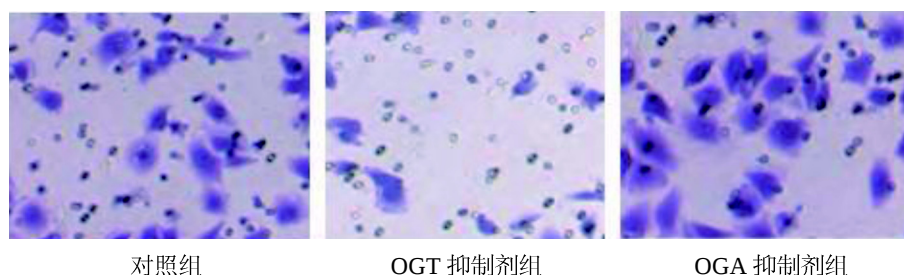


图5 三组HUVEC细胞迁移侵袭能力比较

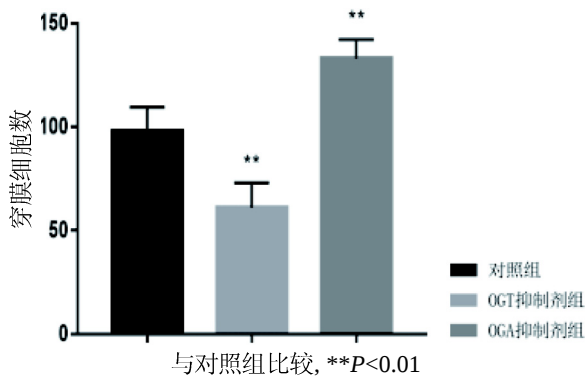


图6 O-GlcNAc糖基化水平对HUVEC细胞迁移侵袭能力的影响

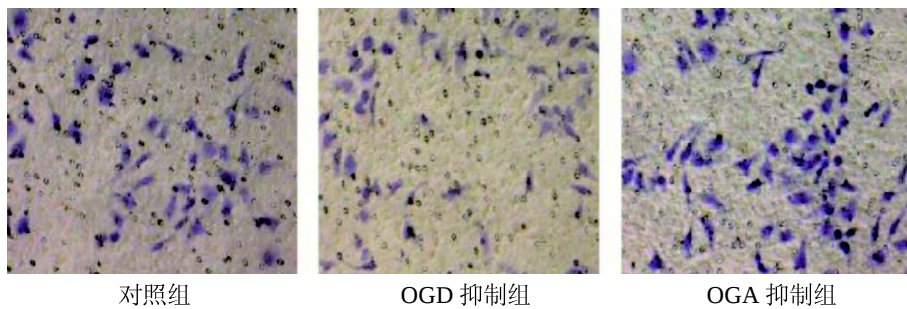


图7 三组HepG2细胞迁移侵袭能力比较

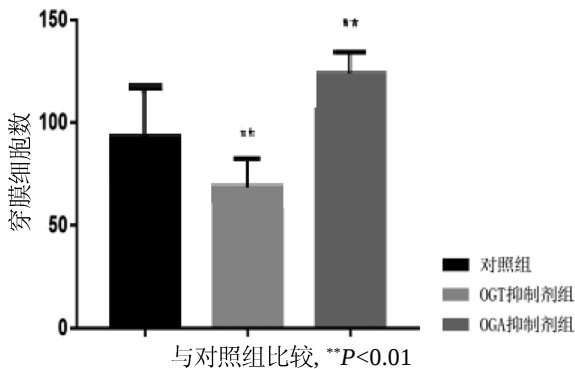


图8 O-GlcNAc糖基化水平对HepG2细胞迁移侵袭能力的影响

在HCC患者肝癌组织中,蛋白质O-GlcNAc糖基化可促进肝癌细胞的增殖和转移。肝癌患者肝脏移植后,肝癌复发的组织中蛋白质O-GlcNAc糖基化水平显著高于肝脏移植后肝癌未复发的组织,而肝癌复发的组织中OGA蛋白表达水平显著低于肝癌未复发的组织,OGT的表达水平在肝癌复发和未复发患者之间没有差异。Ang-2参与肝

实验中,其中以DEN诱发肝癌模型为最常见,DEN是一种化学致癌物质,由细胞色素P450生物活化(CYP)酶存在于肝脏中,导致DNA化合物通过烷基化机制形成。DEN诱发的肝癌体现了类似于人类HCC的基因表达谱^[14],其最经典的方法是“饮水法”建立肝癌动物模型。成功建模后的肿瘤特点兼具肝炎、肝硬化的背景,与人类肝癌形成过程十分类似,为肝癌的研究提供了很好的借鉴方法^[15]。本文以DEN诱导的小鼠肝癌模型和人肝癌细胞HepG2作为研究对象,研究肝癌中O-GlcNAc糖基化水平与Ang-2的关系。

癌发生发展过程,其通过破坏血管的稳定性,增强血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达,促使新生血管的生成。Ang-2与肿瘤血管形成的数目以及肿瘤的预后关系密切^[16]。有研究^[17]表明,Ang-2的表达不仅在肝癌组织上调,且在肝癌患者血清中其浓度也明显上升,以Ang-2作为靶点的药物治疗可明显抑制人肝癌细胞的生长。

在本研究中,我们在DEN诱导的动物模型中观察到,O-GlcNAc糖基化水平与Ang-2在肝癌肿瘤组织中表达均明显上升,且微血管密度也显著上升。通过OGA、OGT、Ang2 mRNA的检测,结果显示,O-GlcNAc糖基化水平变化影响Ang2 mRNA的表达水平;而且O-GlcNAc糖基化和Ang-2的蛋白表达水平之间也呈现相关关系,当使用OGT抑制剂后,O-GlcNAc糖基化水平明显下降,HepG2细胞的增殖受到抑制,Ang-2的表达水平也随之下降;使用OGA抑制剂后,Ang-2的表达水平随着O-GlcNAc糖基化水

平上升也明显升高,且HepG2细胞的增殖能力明显增强;最后,我们使用Transwell法检测发现,HUVEC细胞的迁移侵袭能力明显受到O-GlcNAc糖基化水平的调控。这些结果说明,在肝癌的发生发展过程中,O-GlcNAc糖基化水平逐渐上升,且Ang-2的表达水平可能受到O-GlcNAc糖基化的正调控,从而促进肿瘤新生血管的生成。本研究提示,在肝癌进展中,Ang-2受到O-GlcNAc糖基化正调控,可为未来肝癌的预防及治疗提供新的思路。但是,本研究中O-GlcNAc糖基化调控Ang-2的具体机制仍未清楚,有待继续深入探讨。

参考文献:

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6):394-424.
- [2] McGlynn KA, Petrick JL, London WT. Global epidemiology of hepatocellular carcinoma: an emphasis on demographic and regional variability[J]. Clin Liver Dis, 2015, 19(2):223-238.
- [3] Xu W, Zhang X, Wu JL, et al. O-GlcNAc transferase promotes fatty liver-associated liver cancer through inducing palmitic acid and activating endoplasmic reticulum stress [J]. J Hepatol, 2017, 67(2):310-320.
- [4] Zhu Q, Zhou L, Yang Z, et al. O-GlcNAcylation plays a role in tumor recurrence of hepatocellular carcinoma following liver transplantation[J]. Med Oncol, 2012, 29(2): 985-993.
- [5] Ma Z, Vosseller K. Cancer metabolism and elevated O-GlcNAc in oncogenic signaling[J]. J Biol Chem, 2014, 289(50):34457-34465.
- [6] 张肖冰, 师以康. 蛋白质O-GlcNAc糖基化与肿瘤[J]. 肿瘤, 2013, 33(11):1027-1032.
- [7] Bupathi M, Kaseb A, Janku F. Angiopoietin 2 as a therapeutic target in hepatocellular carcinoma treatment: current perspectives[J]. Onco Targets Ther, 2014, 7:1927-1932.
- [8] Fodor D, Jung I, Turdean S, et al. Angiogenesis of hepatocellular carcinoma: An immunohistochemistry study[J]. World J Hepatol, 2019, 11(3):294-304.
- [9] Yoshiji H, Kuriyama S, Noguchi R, et al. Angiopoietin 2 displays a vascular endothelial growth factor dependent synergistic effect in hepatocellular carcinoma development in mice[J]. Gut, 2005, 54(12):1768-1775.
- [10] Scholz A, Rehm VA, Rieke S, et al. Angiopoietin-2 serum levels are elevated in patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma[J]. Am J Gastroenterol, 2007, 102(11): 2471-2481.
- [11] Mitsuhashi N, Shimizu H, Ohtsuka M, et al. Angiopoietins and Tie-2 expression in angiogenesis and proliferation of human hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2003, 37(5): 1105-1113.
- [12] 张舒曼, 王源, 李淑莲. 间断低剂量二乙基亚硝胺诱导C57BL/6J小鼠肝癌模型[J]. 河南大学学报: 医学版, 2019, 38(2):110-112.
- [13] Chaparro M, Sanz-Cameno P, Trapero-Marugan M, et al. Mechanisms of angiogenesis in chronic inflammatory liver disease[J]. Ann Hepatol, 2007, 6(4):208-213.
- [14] Verna L, Whysner J, Williams GM. N-nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: bioactivation, DNA-adduct formation, mutagenicity, and tumor initiation[J]. Pharmacol Ther, 1996, 71(1-2):57-81.
- [15] 李果, 朱柱, 戴小明, 等. 肝癌动物模型建立的研究进展[J]. 医学综述, 2018, 24(2):285-289.
- [16] 赛文莉, 姚登福, 邵伯军. 血管生成素2对肝癌的发生和发展及治疗的研究进展[J]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2010, 4(4):471-473.
- [17] Wada H, Nagano H, Yamamoto H, et al. Combination therapy of interferon-alpha and 5-fluorouracil inhibits tumor angiogenesis in human hepatocellular carcinoma cells by regulating vascular endothelial growth factor and angiopoietins[J]. Oncol Rep, 2007, 18(4):801-809.

O-GlcNAc Glycosylation Level Positively Regulates Ang-2 Expression and Promotes Tumor Angiogenesis in Mice with Liver Cancer

WANG Aihong¹, WANG Mingquan², DU Juan¹

(1. Key Laboratory of Cancer Prevention and Treatment Research,
Yan'an University Medical College, Yan'an 716000, China;

2. Department of Interventional Radiology, Yan'an University
Affiliated Hospital, Yan'an 716000, China)

[Abstract] Objective To explore the relationship between O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) glycosylation and Angiopoietin-2(Ang-2) expression in the development of hepatocellular carcinoma. **Methods** C57BL/6 mice model of hepatocellular carcinoma was induced by Diethylnitrosamine (DEN) to detect the changes of O-GlcNAc glycosylation, Ang-2 and cell adhesion molecule-1 (CD31) expression in hepatocellular carcinoma. HepG2 cells were intervened with O-linked GlcNAc-transferase (OGT) inhibitors and O-GlcNAcase (OGA) inhibitors to detect whether the expression of Ang-2 changed with the changes of O-GlcNAc glycosylation level. MTT was used to detect the relationship between O-GlcNAc glycosylation level and proliferation of hepatocellular carcinoma cells. Transwell method was used to detect relationship between the level of O-GlcNAc glycosylation and cell migration and invasion in HUVEC cells. **Results** In the DEN-induced hepatocarcinoma model, the liver volume of mice increased significantly, and tumors of different sizes could be seen in the liver. The results of immunohistochemistry showed that the glycosylation level of O-GlcNAc and the expression of Ang-2 increased significantly in the liver of the model group compared with the control group ($P<0.05$). The results of qRT-PCR showed that the level of O-GlcNAc glycosylation affected the expression of Ang-2 by detecting the levels of OGT, OGA and Ang-2. Western blotting showed that the expression of Ang-2 decreased with the decrease of the glycosylation level of O-GlcNAc after the intervention of OGT inhibitors on HepG2 cells. After the intervention of HepG2 cells with OGA inhibitors, the expression of Ang-2 increased with the decrease of the glycosylation level of O-GlcNAc. MTT results showed that the glycosylation level of O-GlcNAc was closely related to the proliferation of hepatocellular carcinoma cells. The proliferation ability of hepatocellular carcinoma cells was stronger when the glycosylation level of O-GlcNAc was higher,. The proliferation ability of hepatocellular carcinoma cells was significantly inhibited, when the glycosylation level of O-GlcNAc was low,. Transwell results showed that HUVEC cell migration and invasion ability was positively correlated with O-GlcNAc glycosylation level. **Conclusion** During the development of hepatocellular carcinoma, the glycosylation level of O-GlcNAc increases gradually, and the expression level of Ang-2 positively regulated by the glycosylation of O-GlcNAc, thus promoting neovascularization.

[Key words] Hepatocellular carcinoma; O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc); Glycosylation ; HepG2 cell; Angiopoietin-2(Ang-2); Neovascularization of tumors