

## • 研究论文 •

## 异甘草素改善 2 型糖尿病异常糖脂代谢机制研究

陈姿伊<sup>#</sup>, 杨晓雪<sup>#</sup>, 丁文文, 汪逗逗, 何平\*, 刘颖\*

(北京中医药大学生命科学院, 北京 102488)

**摘要:** 异甘草素 (isoliquiritigenin, ISL) 是甘草中的一种查尔酮类化合物, 具有良好的抗炎和抗氧化等药理活性。课题组前期研究发现, ISL 具有改善 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 糖脂代谢紊乱的潜力, 因此本文拟解析其作用机制。体内实验采用高脂高糖饮食结合腹腔注射链脲佐菌素的方法处理 C57BL/6J 小鼠, 构建 T2DM 小鼠模型, 动物福利和实验过程均遵循北京中医药大学实验动物伦理委员会的规定; 体外实验以人肝癌 HepG2 细胞作为实验细胞系, 采用棕榈酸钠 (sodium palmitate, SP) 诱导构建胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 细胞模型。考察 ISL 对小鼠体重、空腹血糖、肝脏组织病理变化的作用效果, 同时利用酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immune sorbent assay, ELISA) 及实时荧光定量 PCR 法 (real-time quantitative PCR, RT-qPCR) 等检测 ISL 对糖脂代谢关键靶点的调控作用, 并利用分子对接和分子动力学模拟对 ISL 与关键靶点的相互作用进行检验。结果显示: ISL 可显著降低 T2DM 小鼠空腹血糖水平, 降低糖异生途径关键酶丙酮酸羧化酶 (pyruvate carboxylase, PC)、磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK) 和果糖-1,6-二磷酸酶 (fructose-1,6-bisphosphatase, FBP) 的转录水平和蛋白活性, 下调转录因子肝细胞核因子 4 $\alpha$  (hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$ , HNF4 $\alpha$ ) 与 cAMP 反应元件结合蛋白 (cAMP response element binding protein, CREB) 的转录和蛋白水平, 从而抑制 T2DM 小鼠肝脏糖异生; ISL 可降低肝脏总胆固醇 (total cholesterol, TC) 和甘油三酯 (triglycerides, TG) 含量, 上调脂质摄取、脂肪酸氧化和脂质输出相关基因的转录水平, 下调脂质合成相关基因的转录水平。综上, ISL 可抑制 T2DM 小鼠肝脏糖异生, 促进脂质分解, 抑制脂质合成, 改善 T2DM 引起的糖脂代谢紊乱。

**关键词:** 异甘草素; 2 型糖尿病; 糖脂代谢紊乱; 糖异生; 脂代谢

中图分类号: R966

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2024)01-0105-14

## Mechanism studies underlying the alleviatory effects of isoliquiritigenin on abnormal glucolipid metabolism triggered by type 2 diabetes

CHEN Zi-yi<sup>#</sup>, YANG Xiao-xue<sup>#</sup>, DING Wen-wen, WANG Dou-dou, HE Ping\*, LIU Ying\*

(School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China)

**Abstract:** Isoliquiritigenin (ISL) is an active chalcone compound isolated from licorice. It possesses anti-inflammatory and anti-oxidative activities. In our previous study, we uncovered a great potential of ISL in treatment of type 2 diabetes mellitus (T2DM). Therefore, this study aims to reveal the mechanism underlying the alleviatory effects of ISL on T2DM-induced glycolipid metabolism disorder. High-fat-high-sugar diet (HFD) combined with intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) were used to establish T2DM mice model. All animal experiments were carried out with approval of the Committee of Ethics at Beijing University of Chinese

收稿日期: 2023-04-27; 修回日期: 2023-09-05.

基金项目: 北京中医药大学研究生自主科研课题 (90011461220416).

<sup>#</sup>共同第一作者.

\*通讯作者 Tel: 86-10-53912163, E-mail: liuyliwd@bucm.edu.cn; heping225@bucm.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0520

Medicine. HepG2 cells were used in *in vitro* experiments, and sodium palmitate (SP) was applied to establish insulin resistance (IR) model cells. The effects of ISL on body weight, fasting blood glucose levels, and pathological changes in the livers of mice were examined. Enzyme-linked immune sorbent assay (ELISA) and real-time quantitative PCR (RT-qPCR) were applied to detect the regulatory effects of ISL on key targets involved in glucolipid metabolism. Additionally, molecular docking and analytical dynamics simulation methods were used to analyze the interaction between ISL and key target protein. The results indicate that ISL significantly downregulates the transcriptional levels and inhibits the activities of key enzymes involved in gluconeogenesis, including pyruvate carboxylase (PC), phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), and fructose-1,6-bisphosphatase (FBP). It also downregulates the transcriptional and protein levels of hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  (HNF4 $\alpha$ ) and cAMP response element binding protein (CREB), the two transcriptional factors involved in gluconeogenesis. Thus, ISL inhibits hepatic gluconeogenesis in T2DM mice. In addition, ISL reduces total cholesterol (TC) and triglyceride (TG) levels in the livers of T2DM mice. Moreover, ISL downregulates the mRNA levels of lipogenesis genes and upregulates those of genes involved in fatty acid oxidation, lipid uptake, and lipid export. In conclusion, ISL suppresses hepatic gluconeogenesis, promotes lipolysis, and restrains lipogenesis in T2DM mice, thereby improving the abnormal glycolipid metabolism caused by T2DM.

**Key words:** isoliquiritigenin; type 2 diabetes mellitus; glucose and lipid metabolism disorder; gluconeogenesis; lipid metabolism

糖尿病是一种复杂的慢性非传染性疾病,常以机体血糖升高和胰岛素分泌不足为特征<sup>[1]</sup>。2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)作为糖尿病最主要的类型,患者通常存在高血糖、高甘油三酯血症等代谢紊乱<sup>[2]</sup>,且T2DM病程中常伴随多种血管与非血管并发症<sup>[3]</sup>,包括糖尿病视网膜病变、肾病、神经病变和多种心脑血管疾病。根据国际糖尿病联盟发布的糖尿病地图(第10版),2021年全球成年人中约有5.37亿糖尿病患者,与2019年报告数据相比较,糖尿病患病率提高了12.9%<sup>[4]</sup>。目前,伴随着快速城市化以及国民饮食结构与生活方式的改变,我国糖尿病发病率逐年上升,2021年成年糖尿病患者已达1.4亿,约占成年人口的10.2%<sup>[5]</sup>,已成为国民健康的巨大威胁。

异甘草素(isoliquiritigenin, ISL)是从中药甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.; *Glycyrrhiza inflata* Bat.; *Glycyrrhiza glabra* L.)中分离得到的查尔酮类化合物,具有多种药理活性<sup>[6]</sup>,如抗氧化、抗炎和抗癌等。课题组前期研究证实在高脂高糖饮食(high-fat-high-sugar diet, HFD)诱导的糖尿病小鼠中,ISL可缓解胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)和恢复糖脂代谢稳态<sup>[7]</sup>,但对ISL调控糖异生途径与脂质代谢的机制尚缺乏系统研究。

糖异生是由非碳水化合物合成葡萄糖的代谢过程,可参与维持机体血糖平衡。糖异生与胰岛素抵抗密切相关,T2DM患者机体血糖水平较高,但肝脏仍可通过糖异生生成葡萄糖,进一步加剧了胰岛素抵抗,促进了T2DM病程进展<sup>[8]</sup>。肝脏糖异生受多个限速酶调控<sup>[9]</sup>,包括丙酮酸羧化酶(pyruvate carboxylase,

PC)、磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK)、果糖-1,6-二磷酸酶(fructose-1,6-bisphosphatase, FBP)和葡萄糖-6-磷酸酶(glucose-6-phosphatase, G6P)等。除此之外,6-磷酸果糖激酶-2/果糖-2,6-二磷酸酶3(6-phosphofructokinase-2/fructose-2,6-bisphosphatase 3, PFKFB3)可催化FBP变构抑制剂的生成,从而间接抑制糖异生途径。同时,转录因子肝细胞核因子4 $\alpha$ (hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$ , HNF4 $\alpha$ )与cAMP反应元件结合蛋白(cAMP response element binding protein, CREB)可调控糖异生关键酶的表达水平,从而影响糖异生途径。

T2DM的发生发展还伴随着机体脂代谢紊乱,肥胖症患者糖尿病患病率明显高于正常人,其肝脏脂肪堆积和胰岛素分泌受阻是产生T2DM的主要因素<sup>[10]</sup>。T2DM引发的脂代谢紊乱受脂质摄取、分解、生成和输出等多个过程同时影响<sup>[11]</sup>。甘油三酯脂肪酶(adipose triglyceride lipase, ATGL)可将甘油三酯(triglycerides, TG)分解生成游离脂肪酸(free fatty acids, FFA),通过分化抗原簇36(cluster of differentiation 36, CD36)进入胞质,并在酰基辅酶A合成酶(acyl CoA synthetase, ACOS)与肉碱棕榈酰转移酶1(carnitine palmitoyl transferases 1, CPT1)的作用下转生成酰基辅酶A。随后,酰基辅酶A进入线粒体基质,在长链酰基辅酶A脱氢酶(long-chain acyl CoA dehydrogenase, LCAD)催化下进行脂肪酸 $\beta$ 氧化生成乙酰辅酶A;同时,酰基辅酶A也可在过氧化物酶体中经酰基辅酶A氧化酶1(acyl CoA oxidase 1, ACOX1)催化进行脂肪酸 $\beta$ 氧化,从而参与后续脂肪酸合成、胆固醇合成及脂质输出。

乙酰辅酶A羧化酶1 (acetyl CoA carboxylase 1, ACC1) 和脂肪酸合酶 (fatty acid synthase, FAS) 是脂肪酸合成途径的关键酶; HMG-CoA 合成酶 (3-hydroxy-3-methyl glutaryl-CoA synthase, HMGS) 和 HMG-CoA 还原酶 (3-hydroxy-3-methyl glutaryl-CoA reductase, HMGR) 是胆固醇合成途径的关键酶; 微粒体三酰甘油转移蛋白 (microsomal triglyceride transfer protein, MTP) 和载脂蛋白 B (apolipoprotein B, APOB) 则参与脂质输出过程<sup>[12]</sup>。除此之外, 关键转录因子过氧化物酶体增殖物激活受体  $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ , PPAR $\alpha$ ) 可调控脂肪酸分解相关基因 *CPT1*、*ACOX1*、*LCAD* 的表达; 甾醇调节元件结合蛋白 1c (sterol regulatory element binding protein-1c, SREBP1c) 和碳水化合物反应元件结合蛋白 (carbohydrate response element binding protein, chREBP) 则可调控脂肪酸合成相关基因 *FAS*、*ACC1* 的表达<sup>[13]</sup>。因此, 本论文将对以上糖异生与脂代谢关键靶点进行检测, 解析 ISL 缓解 T2DM 引发的糖脂代谢紊乱的作用机制。

## 材料与方 法

**实验动物** SPF 级 C57BL/6J 小鼠, 雄性, 8 周龄, 购于斯贝福 (北京) 生物技术有限公司。饲养条件: SPF 级屏障环境动物房, 温度: 22~25 °C, 相对湿度: 50%~60%, 光照: 12 h/12 h 光暗交替。小鼠维持饲料 (normal fat diet, NFD) 和 HFD (货号: D12451) 均购自斯贝福 (北京) 生物技术有限公司。实验动物生产许可证号: SCXK (京) 2019-0010; 实验动物质量合格证编号: 110324211104663385。实验方案经北京中医药大学动物伦理委员会批准 (批准号: BUCM-2022021503-1134)。

**药品和试剂盒** ISL (批号: B21525, 纯度  $\geq 98\%$ , 结构式如图 1A 所示)、阳性药二甲双胍 (metformin, MET, 批号: S30880, 纯度  $\geq 98\%$ , 结构式如图 1B 所示)、棕榈酸钠 (sodium palmitate, SP, 批号: S31807, 纯度: 97%) 和胰高血糖素 (批号: S81391, 纯度: 95%) 购于上海源叶生物科技有限公司; 链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ, 批号: BN30130, 纯度  $\geq 98\%$ )、噻唑兰 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT, 批号: BN30793, 纯度  $\geq 98\%$ )、牛胰岛素 (批号: BN20285, 纯度  $\geq 27$  USP units $\cdot$ mg<sup>-1</sup>) 和丙酮酸钠 (批号: BN30342, 纯度  $\geq 99\%$ ) 购于北京百瑞极生物科技有限公司; 高糖 DMEM 培养基和胰酶为美国 Gibco 公司产品; 胎牛血清和青霉素-链霉素双抗为美国 Corning 公司产品; 一站式 DNA/RNA/蛋白提取试剂盒购于上海生工生物工

程股份有限公司; SYBR qPCR SuperMix Plus 和 All-in-one 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix 为上海近岸科技有限公司产品; 葡萄糖 (GLU) 测试盒购于南京建成生物工程研究所; PC、PEPCK、FBP 活性检测试剂盒购于北京索莱宝科技有限公司; 总胆固醇 (total cholesterol, TC) 含量测定试剂盒、TG 含量测定试剂盒和 PFKFB3、HNF4 $\alpha$ 、CREB、p-CREB 酶联免疫吸附试剂盒均为上海酶联生物科技有限公司产品。

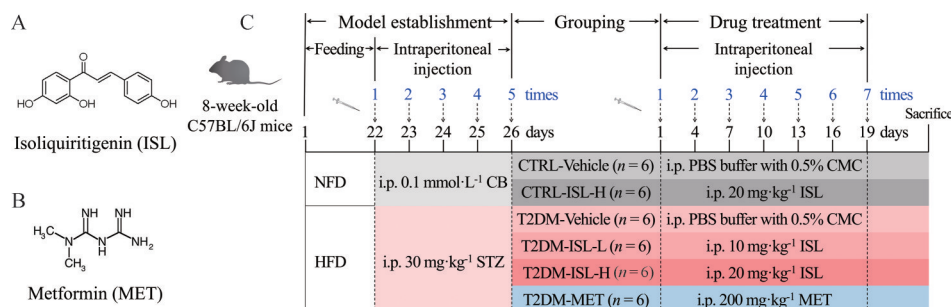
**仪器** CO<sub>2</sub> 恒温培养箱 (MCO-18AIC, 日本 SANYO 公司); 高速离心机 (Centrifuge 5418, 德国 Eppendorf 公司); 荧光酶标仪 (EPOCH, 美国 Biotek Epoch 公司); PCR 基因扩增仪 (A300, 杭州朗基科学仪器有限公司); qPCR 仪 (QuantStudio™ 6 Flex, 美国 Applied Biosystems 公司)。

**T2DM 小鼠模型构建及分组给药** 8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠经 7 天适应性饲养后, 模型构建及分组给药实验方案如图 1C 所示: 将小鼠随机分为两大组, 分别采用 NFD 和 HFD 饲料喂养 3 周, 其后 HFD 饲养小鼠连续 5 天于禁食 12 h 后腹腔注射 STZ (30 mg $\cdot$ kg<sup>-1</sup>), NFD 饲养小鼠则腹腔注射相同体积的柠檬酸盐缓冲液 (pH 为 4.5)。检测 HFD 饲养小鼠的空腹血糖水平,  $\geq 11.1$  mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 为造模成功的 T2DM 小鼠。按照图 1C 所示方法将小鼠分为 6 组 ( $n = 6$ ), 腹腔注射给药, 每 3 天 1 次, 持续 3 周。给药期间监测小鼠体重, 并通过尾静脉取血检测小鼠 7 h 空腹血糖水平。

**小鼠肝脏组织病理学检测** 处死小鼠后, 留取肝脏称重拍照, 部分肝脏立即置于通用型组织固定液中, 送武汉百仟度生物科技有限公司, 采用 OCT (optimal cutting temperature compound) 包埋并进行冷冻切片油红 O 染色, 扫描组织切片并收集图片, 采用 Case-Viewer 2.4 软件观察 (20 倍放大率); 其余肝脏样品保存于 -80 °C 备用。

**细胞活力测定** 以人肝癌细胞 HepG2 为实验细胞系 (购于北京协和医学院细胞资源中心), 采用高糖 DMEM 培养基+10% 胎牛血清, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养。将 HepG2 细胞以  $2.0 \times 10^3 \sim 2.5 \times 10^3$  个/孔的密度接种于 96 孔板, 当细胞融合率达到 80% 时, 分别给药 ISL (0、5、10、20、40、80、100  $\mu$ mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>) 与 MET (0、1.25、2.5、5、10、20、40 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup>) 处理, 每组 5 个重复, 孵育 24 h 后采用 MTT 比色法, 通过测定 570 nm 的吸光度对细胞活力进行检测。

**胰岛素抵抗细胞模型构建** 由 0.25 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> SP 诱导 IR 模型<sup>[14]</sup>: 将 HepG2 细胞以  $3.5 \times 10^5 \sim 4.0 \times 10^5$  个/孔的密度接种于 6 孔板, 采用含 10% 胎牛血清高糖 DMEM 培养基培养, 待细胞融合率为 80% 时, 更换为



**Figure 1** The scheme of animal experiments. A: The chemical structure of isoliquiritigenin (ISL); B: The chemical structure of metformin (MET), the positive drug; C: The scheme of animal model establishment, grouping, and administration. NFD: Normal fat diet; HFD: High-fat-high-sugar diet; i.p.: Intraperitoneal injection; CB: Citrate buffer; STZ: Streptozotocin; CMC: Carboxymethyl cellulose

无血清高糖DMEM培养基并补充 $0.25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  SP, 孵育24 h以构建IR细胞模型。

**细胞培养及给药处理** 对IR模型细胞及正常HepG2细胞均给药ISL ( $0$ 、 $5$ 、 $10$ 、 $20$ 、 $40\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 与MET ( $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 处理, 每组3个重复, 24 h后收集各组细胞样品, 进行后续检测。

**细胞葡萄糖消耗测定** 给药处理24 h后, 加入终浓度为 $1\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的胰岛素溶液, 孵育0.5 h后取上清, GLU测试盒测定培养基中葡萄糖含量。

**细胞葡萄糖输出测定** 采用无血清无糖DMEM培养基给药处理18 h后, 加入终浓度为 $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的胰高血糖素和 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的丙酮酸钠溶液, 孵育4 h后取上清, 采用GLU测试盒测定培养基中葡萄糖含量。

**TG和TC检测** 采用TG和TC含量测定试剂盒检测小鼠肝脏样品与HepG2细胞样品中TG与TC含量。

**糖异生相关指标检测** 采用PC、PEPCK、FBP活性检测试剂盒与PFKFB3、HNF4 $\alpha$ 、CREB、p-CREB ELISA检测试剂盒, 检测小鼠肝脏样品和HepG2细胞样品中糖异生相关蛋白活性或含量。

**RT-qPCR分析** 收集各组小鼠肝脏与细胞样品, 提取RNA, 逆转录成cDNA。检测糖异生、脂质摄取、分解、合成和输出关键基因的转录水平。扩增条件:  $95\text{ }^{\circ}\text{C}\ 1\text{ min}$ ,  $95\text{ }^{\circ}\text{C}\ 20\text{ s}$ 、 $60\text{ }^{\circ}\text{C}\ 1\text{ min}$  (40个循环)。以*Gapdh*作为小鼠肝脏样品分析的内参基因, 以 $\beta$ -actin作为HepG2细胞样品分析的内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算目标基因的相对表达量, 引物序列如表1所示。

**分子对接及分子动力学模拟** 由RCSB PDB (<https://www.rcsb.org/>) 数据库获取PEPCK蛋白三维结构, 导入Discovery Studio 2019软件, 设计均方根偏差 (root mean square deviation, RMSD) 值小于2.0的活性口袋, 与ISL进行分子对接, 选取打分值最高的构象,

分析配体与蛋白之间的相互作用, 并与原配体进行比较。采用GROMACS-2021.2进行分子动力学模拟, 蛋白质拓扑文件由AMBER99SB-ILDN力场生成, 配体拓扑文件由ACPYPE脚本使用Amber前场生成。模拟蛋白均处于填充TIP3P水模型的立方体盒子中, 加入 $\text{Na}^+$ 作为抗衡离子中和体系。在模拟之前, 复合物被最小化1 000步, 并通过运行等温等容 (NVT系综) 条件进行100 ps实现平衡, 在优化过程后, 在310 K温度和1.0 bar压力下采用等温等压 (NPT系综) 条件进行100 ns时长的分子动力学模拟。

**统计学分析** 采用GraphPad Prism 8.0软件进行图表绘制, 实验结果以均值 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示, 采用IBM SPSS Statistic 26.0软件, 进行单因素方差分析 (ANOVA), 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 结果

### 1 ISL对T2DM小鼠异常糖脂代谢的改善

ISL治疗期间各组小鼠体重变化情况较为一致, 均呈缓慢上升趋势 (图2A), 空白组、空白给药组、模型组、低、高剂量给药组、阳性药组小鼠体重分别增长 $5.63\% \pm 2.33\%$ 、 $4.86\% \pm 2.32\%$ 、 $4.20\% \pm 1.73\%$ 、 $3.65\% \pm 1.44\%$ 、 $6.17\% \pm 1.25\%$ 、 $5.20\% \pm 1.30\%$  ( $P < 0.05$ ), 各组增长幅度较为一致, 表明腹腔注射ISL与MET未对小鼠正常生活带来不良影响。ISL治疗期间小鼠空腹血糖变化情况如图2B所示: 经过连续7次治疗, ISL低/高剂量治疗组及阳性药组小鼠空腹血糖分别降低 $33.08\% \pm 5.19\%$ 、 $27.52\% \pm 2.76\%$ 及 $23.34\% \pm 3.34\%$  ( $P < 0.001$ ), 表明ISL治疗可显著降低T2DM小鼠空腹血糖水平。

图2C所示为各组小鼠肝脏照片, 可见治疗前后外观形态无显著变化。然而, 小鼠肝脏切片油红O染色结果 (图2D) 显示: 与空白组小鼠相比, T2DM小鼠肝脏脂滴大量聚集, 经ISL和MET治疗后脂滴积累明显

**Table 1** The primers used for RT-qPCR analyses. *Pcx*: Pyruvate carboxylase; *Pck1*: Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1; *Fbp1*: Fructose-1,6-bisphosphatase 1; *Pfkfb3*: Phosphofructokinase-2/fructose-2,6-bisphosphatase 3; *Hnf4a*: Hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$ ; *Creb1*: cAMP response element binding protein 1; *Gapdh*: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *PPAR $\alpha$* : Peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 $\alpha$ ; *ACOX1*: Acyl-CoA oxidase 1; *LCAD*: Long-chain acyl-CoA dehydrogenase; *ATGL*: Adipose triglyceride lipase; *ACOS*: Acyl-CoA synthetase; *CPT1*: Carnitine palmitoyl transferases 1; *SREBP1c*: Sterol regulatory element binding protein 1c; *chREBP*: Carbohydrate response element binding protein; *ACCl*: Acetyl CoA carboxylase 1; *FAS*: Fatty acid synthase; *HMGR*: 3-Hydroxy-3-methyl glutaryl-CoA reductase; *HMGS*: 3-Hydroxy-3-methyl glutaryl-CoA synthase; *CD36*: Cluster of differentiation 36; *MTTP*: Microsomal triglyceride transfer protein; *APOB*: Apolipoprotein B

Sample	Gene	Forward primer 5'-3'	Reverse primer 5'-3'
Mice liver	<i>Pcx</i>	GCCCAGAAGTTGCTACATTACCT	CTCACATTGACAGGGATTGGA
	<i>Pck1</i>	CACCATCACCTCTGGAAGA	GGGTGCAGAATCTCGAGTTG
	<i>Fbp1</i>	GTGTCAACTGCTTCATGCTG	GAGATACTCATTGATGGCAGGG
	<i>Pfkfb3</i>	CAACTCCCCAACCGTGATTGT	TGAGGTAGCGAGTCAGCTTCT
	<i>Hnf4a</i>	ATGCGACTCTCTAAAACCTTG	ACCTTCAGATGGGGACGTGT
	<i>Creb1</i>	CAGGGGTGCCAAGGATTGAAG	ACTGCTAGTTGGTAAATGGGG
	<i>Gapdh</i>	TGGGCATGAACCATGAGAAG	CCACGATGCCGAAGTTGTC
	<i>PC</i>	GATGCAGGGGTCCGGTTATT	GAAGCCGTAGGTGTTGGAGA
Human HepG2 cell	<i>PEPCK</i>	AGTAGAGAGCAAGACGGTGAT	TGCTGAATGGAAGCACATACAT
	<i>FBP</i>	CGCGCACCTCTATGGCATT	TTCTTCTGACACGAGAACACAC
	<i>PFKFB3</i>	ATTGCGGTTTTCGATGCCAC	GCCACAACGTAGGGTCTGT
	<i>HNF4<math>\alpha</math></i>	CGAAGGTCAAGCTATGAGGACA	ATCTGCGATGCTGGCAATCT
	<i>CREB</i>	CCACTGTAACGGTGCCAACCT	GCTGCATTGGTCTGGTAAATGT
	<i>PPAR<math>\alpha</math></i>	CCTGCAAGAAATGGGAAACATC	GCCAGGACAGCTTCTAAAT
	<i>ACOX1</i>	TGTCCTATTTGAACGACCTGCCCA	AGGTTCCAAGCTACCTCCTTGCTT
	<i>LCAD</i>	GATAAAAGCCCAGGATACCGC	AGGTGAGCAACTGTTTTGCCA
	<i>ATGL</i>	GAGATGTGCAAGCAGGGATAC	CTGCGAGTAATCCTCCGCT
	<i>ACOS</i>	CGACGAGCCCTTGGTGTATTT	GGTTTCCGAGAGCCTAAACAA
	<i>CPT1</i>	ATCAATCGGACTCTGGAAACGG	TCAGGGAGTAGCCGATGGT
	<i>SREBP1c</i>	ATCGGCGCGGAAGCTGTCCGGGGTAG	ACTGTCTTGGTTGTTGATGAGCTGGA
	<i>chREBP</i>	AAGATCCGCCTGAACAACG	CACTTGTGGTATTTCCCGCATC
	<i>ACCl</i>	GCCTTCTCTGACAAAACGAG	TGACTGCCGAAAACATCTCTGT
	<i>FAS</i>	CCCTTGATGAAGAGGGATCA	ACTCCACAGTGGGAACAAG
	<i>HMGR</i>	TGATTGACCTTTCCAGAGCAAG	CTAAAATGGCATTCCACAGAGC
	<i>HMGS</i>	CATTAGACCGCTGCTATTCTGTC	TTCAGCAACATCCGAGCTAGA
	<i>CD36</i>	CTTTGGCTTAATGAGACTGGGAC	GCAACAAACATCACCACACCA
	<i>MTTP</i>	ACAAGCTCACGTACTCCACTG	TCCTCCATAGTAAGGCCACATC
	<i>APOB</i>	TGCTCCACTCACTTACCCTGTC	TAGCGTCCAGTGTGTACTGAC
	<i><math>\beta</math>-Actin</i>	GAGAAAATCTGGCACCACACC	GATAGCACAGCCTGGATAGCAA

减少。进一步检测小鼠肝脏 TC 和 TG 含量, 结果如图 2E 所示: 与空白组相比, T2DM 小鼠肝脏中 TC 和 TG 的含量显著升高, ISL 治疗则可显著降低 T2DM 小鼠肝脏 TC 和 TG 的含量, 阳性药 MET 具有相似的作用效果, 此结果与小鼠肝脏切片油红 O 染色结果相吻合。综上, ISL 可降低 T2DM 小鼠空腹血糖水平, 抑制肝脏脂肪积累, 缓解肝脏脂肪变性。

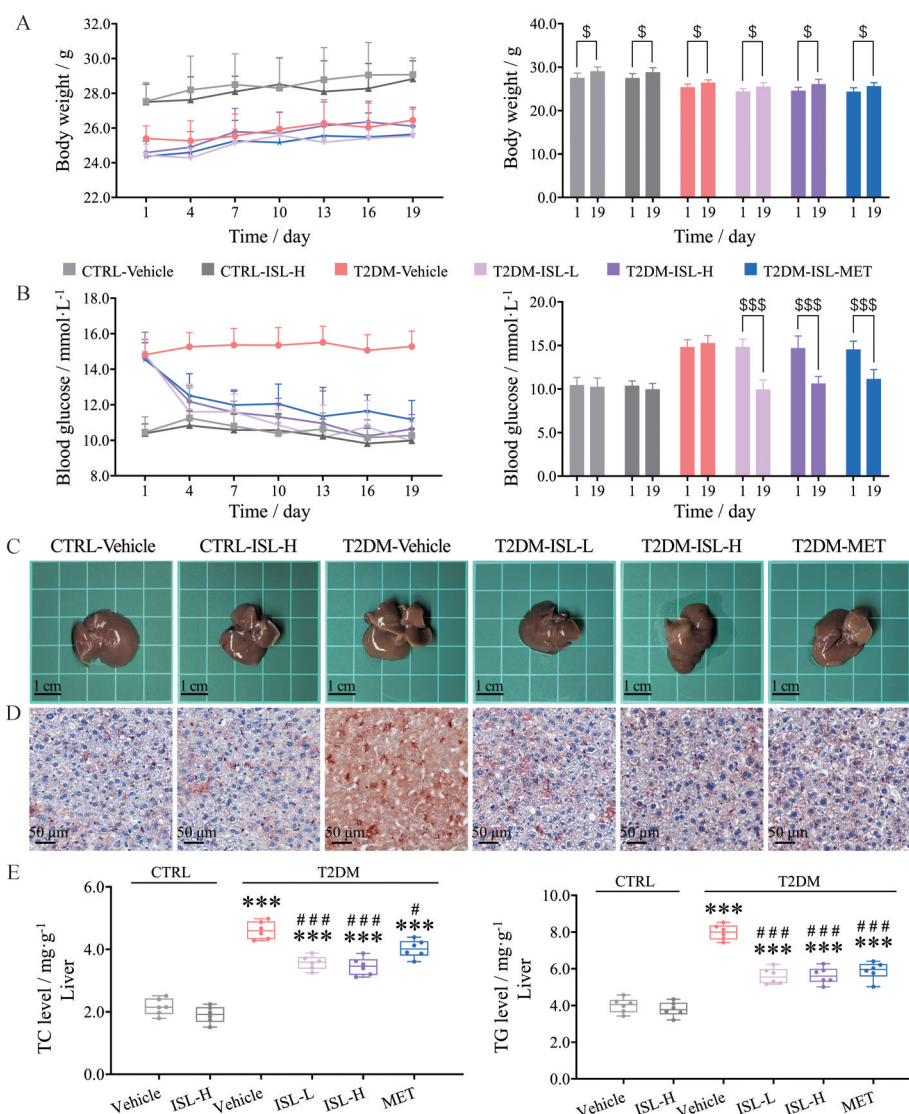
## 2 ISL 对 HepG2 细胞异常糖脂代谢的改善

不同浓度 ISL 处理后 HepG2 细胞活力检测结果如图 3A 所示: ISL 在 5~40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度范围内对 HepG2 细胞活力无显著影响, 而高于 80  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ISL 则显著抑制细胞活力, 故采用 5~40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  梯度浓度作为 ISL 后续实验的工作浓度。同时, 本研究检测了不同浓度阳性药 MET 处理后 HepG2 细胞活力的变化, 结果如图 3B 所示: 20  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  及以上浓度水平的

MET 对细胞活力出现抑制作用, 故采用 10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  作为 MET 后续实验的工作浓度。以上浓度的使用均与文献<sup>[7,15,16]</sup>报道相符。

ISL 处理后正常细胞与 IR 模型细胞的葡萄糖消耗情况如图 3C 所示: 与正常细胞相比, IR 模型细胞培养液上清中葡萄糖含量显著上升 ( $P < 0.01$ ), 表明在发生胰岛素抵抗的情况下, HepG2 细胞的糖摄取能力明显减弱; 同时, ISL 与 MET 处理可显著降低正常细胞与 IR 模型细胞培养液上清中葡萄糖含量, 表明 ISL 与 MET 处理均可增强 HepG2 细胞的糖摄取能力, 从而改善胰岛素抵抗引起的异常糖代谢。

ISL 处理后正常细胞与 IR 模型细胞的葡萄糖输出情况如图 3D 所示: 与正常组细胞相比, IR 模型细胞培养液上清中的葡萄糖含量显著升高 ( $P < 0.001$ ), 表明在发生胰岛素抵抗后, HepG2 细胞经糖异生途径产生



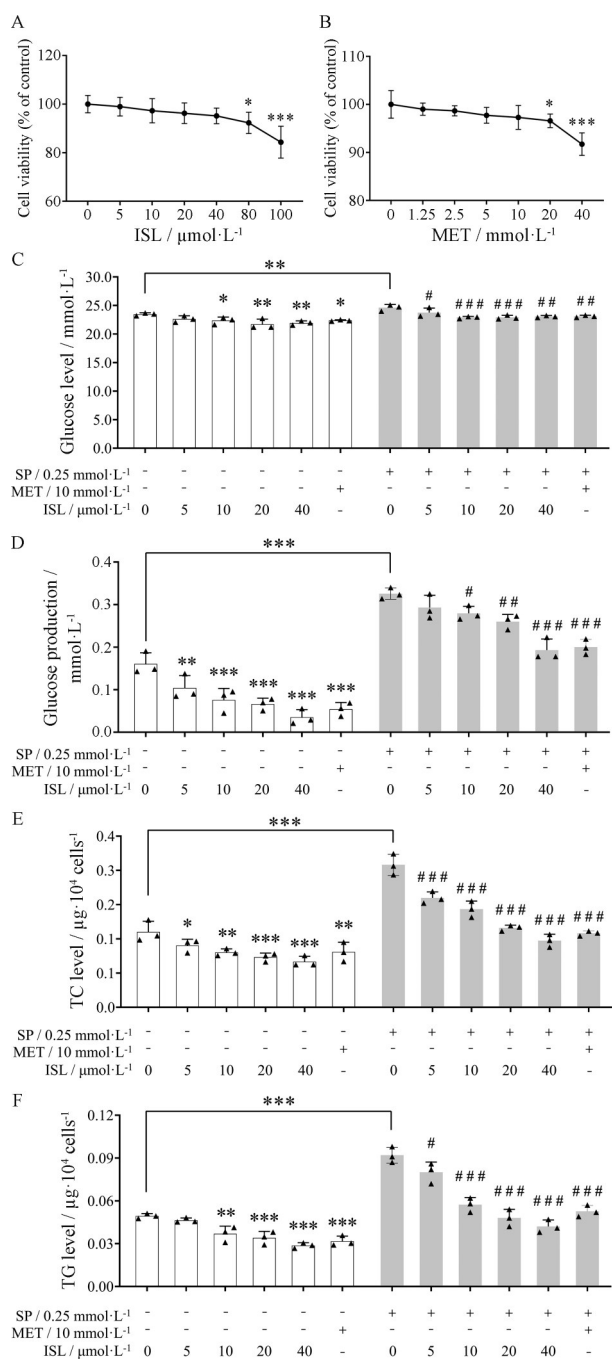
**Figure 2** ISL alleviates abnormal glucolipid metabolism in T2DM mice. A: The body weight changes during drug administration; B: The fasting blood glucose level changes during drug administration; C: Histological features of the livers, the scale bar stands for 1 cm; D: Oil red O-stained liver sections (20 $\times$ ), the scale bar stands for 50  $\mu$ m; E: TC and TG levels in the livers.  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$ .  $^{\$}P < 0.05$ ,  $^{SSS}P < 0.001$ ;  $^{***}P < 0.001$  vs CTRL-Vehicle;  $^{\#}P < 0.05$ ,  $^{###}P < 0.001$  vs T2DM-Vehicle. T2DM: Type 2 diabetes mellitus; TC: Total cholesterol; TG: Triglycerides

的葡萄糖量明显增多;同时, ISL 处理可剂量依赖性降低正常细胞与 IR 模型细胞的葡萄糖输出水平, MET 也具有相似的作用。以上结果表明, ISL 可降低细胞的糖异生水平。

ISL 处理后正常细胞与 IR 模型细胞中 TC 与 TG 含量的检测结果如图 3E 和 3F 所示: 与正常细胞相比, IR 模型细胞中 TC 和 TG 含量均显著增加 ( $P < 0.001$ ), 表明发生胰岛素抵抗后细胞的脂质水平显著提高; 同时, ISL 处理可剂量依赖性降低正常细胞与 IR 模型细胞中 TC 与 TG 的含量, 阳性药 MET 也表现出相似的效果。以上结果提示 ISL 可改善胰岛素抵抗模式下细胞的异常脂代谢。

### 3 ISL 显著抑制 T2DM 小鼠肝脏和 HepG2 细胞糖异生水平

PC 为糖异生初始步骤的关键酶<sup>[17]</sup>, 其转录水平检测结果如图 4A 所示: ISL 及 MET 治疗均可显著下调 T2DM 小鼠肝脏中 *Pcx* 的转录水平, 且在 ISL 高剂量给药组 ( $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 达到最大抑制效果; 同时, ISL 处理可下调 HepG2 细胞中 *PC* 的转录水平, 且  $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ISL 抑制效果最好。PC 酶活检测结果如图 4B 所示: 与空白组相比, T2DM 模型组小鼠肝脏中 PC 活性显著增强, 低剂量 ISL 和 MET 治疗则可显著降低 T2DM 小鼠肝脏中 PC 活性; 在体外, ISL 和 MET 均可显著抑制 HepG2 细胞中 PC 活性, ISL 在  $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  抑制效果



**Figure 3** ISL alleviates abnormal glucolipid metabolism in HepG2 cells. A: Cell viability with ISL treatment; B: Cell viability with MET treatment; C: The glucose levels in the medium culturing normal or IR model HepG2 cells; D: The glucose production of normal or IR model HepG2 cells; E, F: the TC and TG levels in the normal or IR model HepG2 cells.  $n = 3-5$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs CTRL group; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$  vs IR model group. SP: Sodium palmitate

最佳。

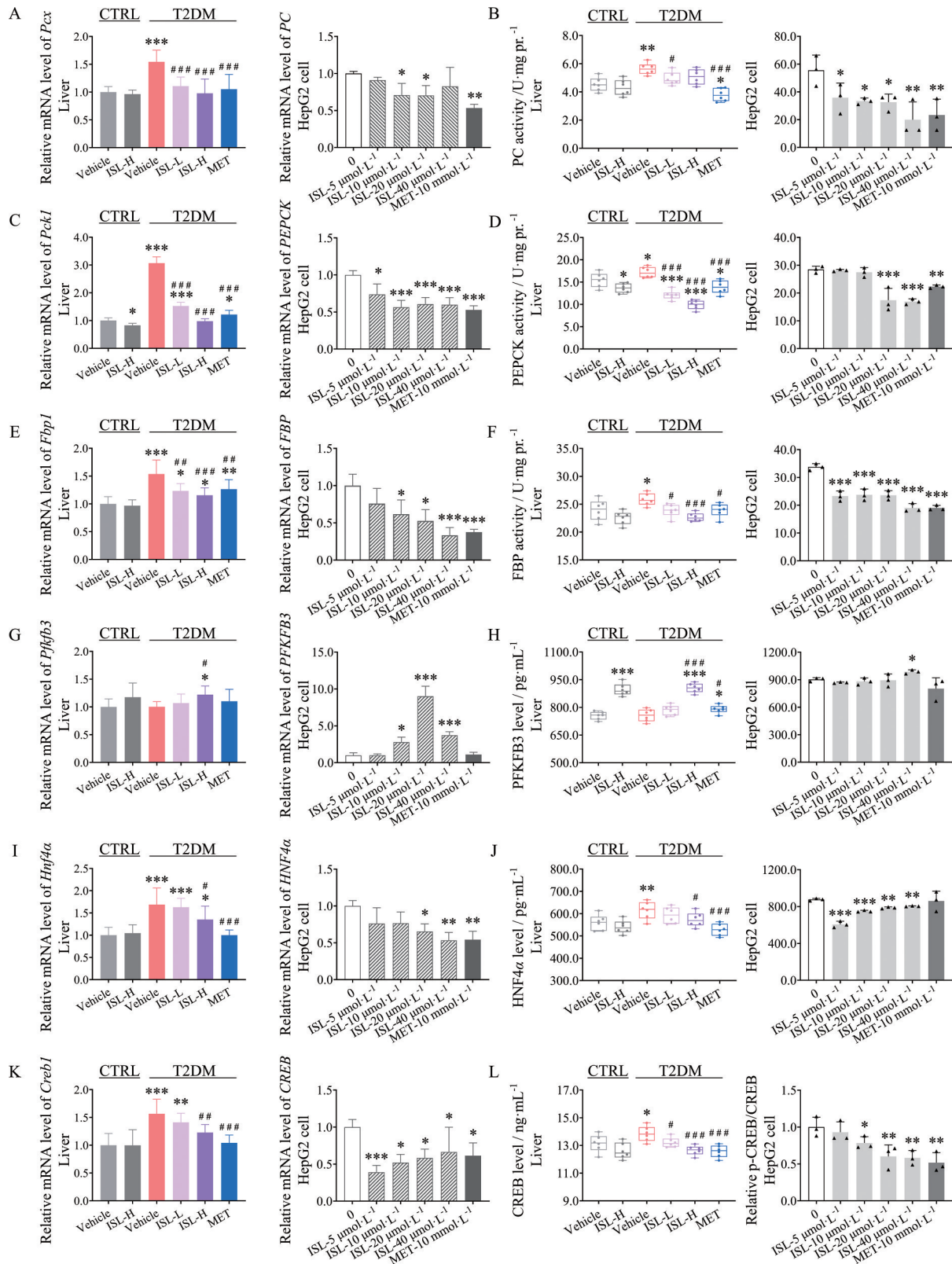
PEPCK可催化线粒体中草酰乙酸转化生成磷酸烯醇式丙酮酸<sup>[18]</sup>,其转录水平检测结果如图4C所示:ISL和MET均可显著下调T2DM小鼠肝脏中*Pck1*的

转录水平,且ISL高剂量给药组( $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )作用效果最好;同时,在体外ISL与MET均可显著下调HepG2细胞中*PEPCK*的转录水平,且ISL在 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作用效果最为显著。*PEPCK*酶活检测结果如图4D所示:与空白组相比,T2DM模型组小鼠肝脏*PEPCK*活性显著升高,经ISL和MET治疗后*PEPCK*活性被显著抑制,ISL高剂量给药组( $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )达到最大抑制效果;在体外,ISL( $20$ 和 $40\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )与MET亦可显著抑制HepG2细胞中*PEPCK*活性。

FBP可催化1,6-二磷酸果糖转化生成6-磷酸果糖<sup>[19]</sup>,其转录水平检测结果如图4E所示:ISL治疗可显著下调T2DM小鼠肝脏中*Fbp1*的转录水平,ISL高剂量给药组( $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )达到最佳治疗效果;体外检测结果与体内相符,且 $40\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ISL下调作用最为显著。*FBP*酶活性检测结果如图4F所示:与空白组相比,T2DM模型组小鼠肝脏*FBP*活性显著增强,ISL治疗可显著抑制*FBP*活性,ISL高剂量给药组( $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )抑制效果最为显著,阳性药MET亦可抑制*FBP*活性;体外检测结果与体内相符,且ISL在 $40\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 发挥最大抑制效果。

PFKFB3可催化生成2,6-二磷酸果糖,其可变构抑制*FBP*,从而影响肝脏糖异生<sup>[20]</sup>。对其转录水平进行检测(图4G),与空白组相比,T2DM模型组小鼠肝脏*Pfkfb3*转录水平无显著变化,且仅在ISL高剂量给药组( $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )中观察到*Pfkfb3*转录水平的显著上调;在体外, $10\sim 40\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ISL均可显著上调HepG2细胞中*PFKFB3*的转录水平,且在 $20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 达到最佳效果。对*PFKFB3*蛋白含量进行检测,结果如图4H所示,ISL高剂量给药组( $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )和阳性药组中均可观察到*PFKFB3*蛋白含量的显著提高;在体外, $40\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ISL可显著提高HepG2细胞中*PFKFB3*的蛋白含量。

糖异生关键转录因子*HNF4 $\alpha$* 可调控糖异生限速酶在细胞核内的表达<sup>[21]</sup>,对*HNF4 $\alpha$* 的转录水平进行检测(图4I):ISL治疗可下调T2DM小鼠肝脏中*Hnf4 $\alpha$* 的转录水平,且高ISL剂量治疗组( $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )具有显著性差异,MET同样具有下调作用;体外检测结果与体内相符,ISL可浓度依赖性下调HepG2细胞中*HNF4 $\alpha$* 的转录水平,且在 $20\sim 40\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 具有显著性,  $40\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 达到最大抑制效果。对*HNF4 $\alpha$* 蛋白含量进行检测(图4J):与空白组相比,T2DM模型组小鼠肝脏*HNF4 $\alpha$* 蛋白含量显著增加,高剂量ISL( $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )和MET治疗均可显著降低其蛋白含量;在体外,ISL( $5\sim 40\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )亦可显著降低HepG2细胞中*HNF4 $\alpha$* 的蛋白含量,且 $5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ISL达到最大抑制效果。



**Figure 4** ISL inhibits gluconeogenesis in the livers of T2DM mice and cultured HepG2 cells without SP stimulation. A: Relative mRNA levels of *Pcx* and *PC*; B: Protein activities of *PC*; C: Relative mRNA levels of *Pck1* and *PEPCK*; D: Protein activities of *PEPCK*; E: Relative mRNA levels of *Fbp1* and *FBP*; F: Protein activities of *FBP*; G: Relative mRNA levels of *Pfkfb3* and *PFKFB3*; H: Protein levels of *PFKFB3*; I: Relative mRNA levels of *Hnf4a* and *HNF4α*; J: Protein levels of *HNF4α*; K: Relative mRNA levels of *Creb1* and *CREB*; L: Protein levels of *CREB* in the livers of mice and the relative p-CREB/CREB in cultured HepG2 cells.  $n = 6$  (*in vivo* data),  $n = 3$  (*in vitro* data),  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs CTRL-Vehicle; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$  vs T2DM-Vehicle

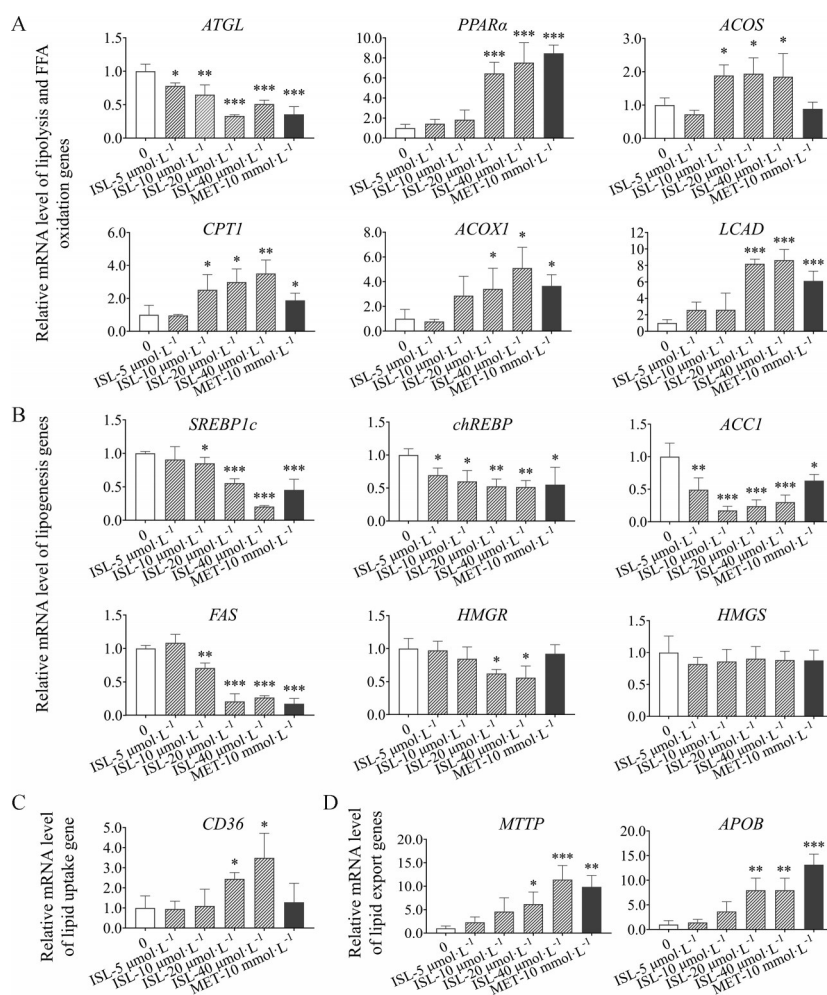
对转录增强因子CREB进行检测,其转录水平如图4K所示: ISL治疗可下调T2DM小鼠肝脏中*Creb1*的转录水平,且ISL高剂量给药组(20 mg·kg<sup>-1</sup>)具有显著性差异, MET作用效果相似;在体外, ISL和MET亦可显著下调HepG2细胞中*CREB*的转录水平,且ISL在5 μmol·L<sup>-1</sup>达到最佳抑制效果。对CREB蛋白含量进行检测(图4L): ISL和MET治疗均可显著降低T2DM小鼠肝脏中CREB的蛋白含量,且ISL高剂量给药组(20 mg·kg<sup>-1</sup>)表现出更好的抑制效果;在体外, 10~40 μmol·L<sup>-1</sup> ISL可显著降低HepG2细胞中CREB的磷酸化水平,其中40 μmol·L<sup>-1</sup>抑制效果最为显著。

综上, ISL主要通过抑制糖异生关键酶PC、PEPCK和FBP的转录和酶活,并下调转录因子HNF4α和CREB的转录及蛋白水平来抑制糖异生途径,进而缓解T2DM造成的糖代谢紊乱。

#### 4 ISL对脂质代谢关键基因的调控

ISL处理后HepG2细胞脂质分解及脂肪酸氧化相关基因的表达情况如图5A所示: ISL可显著下调*ATGL*的转录水平,从而抑制肝细胞内TG转化为FFA的速率。ISL可浓度依赖性上调脂肪酸氧化关键转录因子*PPARα*的转录水平,并在20和40 μmol·L<sup>-1</sup>浓度达到显著性差异,从而调控参与脂肪酸分解系列酶的基因表达。ISL(10~40 μmol·L<sup>-1</sup>)可促进脂质跨线粒体膜运输相关基因*ACOS*和*CPT1*的表达,加快细胞内脂肪酸参与后续氧化分解过程的速率。ISL可上调细胞内脂肪酸β氧化关键基因*ACO1*和*LCAD*的mRNA水平,从而促进细胞内脂肪酸的分解速率。以上结果表明, ISL可以通过促进脂肪酸氧化,降低HepG2细胞中脂质积累水平。

对HepG2细胞中脂质合成相关基因的表达情况



**Figure 5** ISL enhances the mRNA levels of lipolysis and FFA oxidation genes, inhibits those of lipogenesis genes, and increases those of lipid uptake and export genes in HepG2 cells. A: Relative mRNA levels of lipolysis gene (*ATGL*) and FFA oxidation genes (*PPARα*, *ACOS*, *CPT1*, *ACO1*, and *LCAD*); B: Relative mRNA levels of lipogenesis genes (*SREBP1c*, *chREBP*, *ACCI*, *FAS*, *HMGR*, and *HMGs*); C: Relative mRNA levels of lipid uptake gene (*CD36*); D: Relative mRNA levels of lipid export genes (*MTTP* and *APOB*).  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs CTRL group

进行检测(图5B): ISL可浓度依赖性下调脂肪酸合成关键转录因子 *SREBP1c* 和 *chREBP* 的转录水平, MET表现出相似的抑制效果; ISL和MET均可显著下调脂肪酸合成关键基因 *ACCI* 和 *FAS* 的 mRNA 水平; 同时, ISL可在  $20\sim 40\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  范围内显著降低胆固醇合成关键基因 *HMGR* 的表达水平, 但对 *HMGs* 无显著影响, MET ( $10\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 对 *HMGR* 和 *HMGs* 的转录均无明显抑制作用。以上结果表明, ISL可抑制脂质合成关键转录因子和基因的表达水平, 从而降低 HepG2 细胞内脂质生成速率。

对 HepG2 细胞中脂质摄取与输出相关基因的转录水平进行检测(图5C、D): ISL可浓度依赖性提高脂肪酸摄取关键基因 *CD36* 的 mRNA 水平, 并在  $20$  和  $40\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  达到显著性差异, 阳性药  $10\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  MET 未观察到明显变化。  $20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  及以上浓度的 ISL 和 MET ( $10\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 可显著提高脂质输出相关基因 *MTP* 与 *APOB* 的 mRNA 水平, 从而加快新生成脂质输出细胞的速率, 减少细胞内的脂质含量。

综上, ISL可促进脂质摄取、分解和输出, 抑制脂质合成, 从而降低脂质积累水平, 改善 T2DM 导致的脂代谢紊乱。

## 5 分子对接与分子动力学模拟验证 ISL 与 PEPCK 蛋白的结合能力

糖异生关键限速酶 PEPCK 可调控体内葡萄糖稳态, 是目前研究最为深入的糖异生关键靶点之一<sup>[22]</sup>。本文发现 ISL 治疗可显著抑制 T2DM 小鼠肝脏和 HepG2 细胞中 PEPCK 的转录和酶活(图4C、D), 因此利用分子对接与分子动力学模拟进一步检验了 ISL 与 PEPCK 蛋白间的相互作用。分子对接三维及二维结构模式分别如图6A~C所示, ISL 在 MET-A296、TRP-A516、PHE-A525、PHE-A530、ASN-A533 与原配体的作用位点相同, 表明 ISL 与 PEPCK 可有效结合。对上述分子对接所得 PEPCK-ISL 蛋白复合物与 PEPCK 蛋白进行分子动力学模拟分析, 图6D所示为二者的 RMSD 值 ( $P < 0.000\ 1$ ), 与 PEPCK 蛋白相比, PEPCK-ISL 复合物的 RMSD 曲线整体水平较低, 且在模拟过程中整体保持稳定, 仅略有波动, 表明与 ISL 结合可在一定程度上阻止 PEPCK 构象改变, 从而抑制 PEPCK 蛋白的生理功能。图6E所示为回旋半径 (Rg) ( $P < 0.000\ 1$ ), 与 PEPCK 蛋白相比, PEPCK-ISL 复合物的 Rg 值更低, 表明 ISL 结合后 PEPCK 蛋白结构更为稳定。图6F为溶液可及表面积 (SASA), 与 PEPCK 蛋白相比, PEPCK-ISL 的 SASA 曲线无明显差异, 表明 ISL 结合后 PEPCK 蛋白的疏水性无明显改变。图6G为均方根波动 (RMSF) 值, 可见随模拟时间变化, ASN-

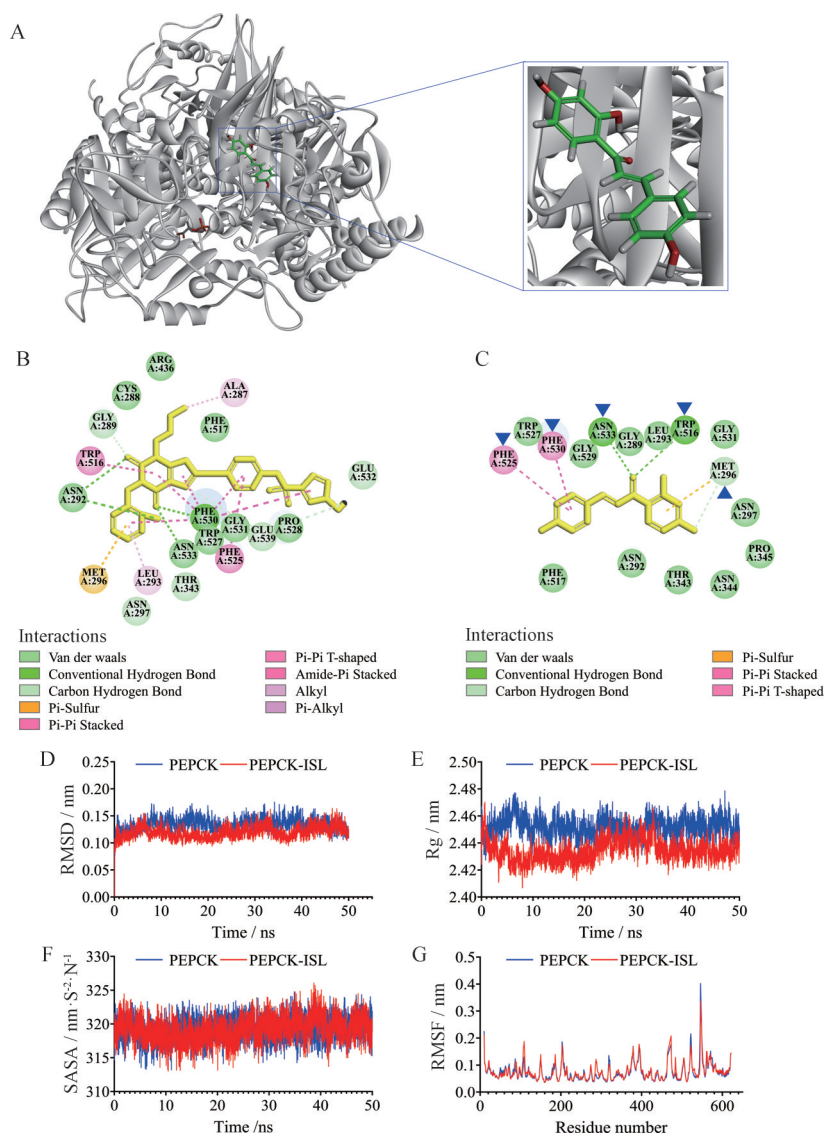
A533 和 PHE-A525 氨基酸残基表现出较高的氨基酸灵活性。以上研究结果表明, PEPCK 是 ISL 调控糖异生的潜在作用靶点。

## 讨论

机体异常糖脂代谢是 T2DM 的主要特征, 同时也是治疗 T2DM 的重要作用靶点<sup>[23]</sup>。多项研究表明, 一线抗糖尿病药物 MET 可通过抑制糖异生和调控脂代谢发挥抗糖尿病效果<sup>[24]</sup>。本课题组前期研究也表明 ISL 可缓解 T2DM 小鼠糖脂代谢紊乱<sup>[7]</sup>。因此, 本文针对糖异生通路与脂代谢相关途径开展 ISL 缓解糖脂代谢紊乱的作用机制研究。研究发现 ISL 可抑制 T2DM 小鼠肝脏糖异生, 缓解肝脏脂肪变性, 上调脂质摄取、脂肪酸氧化和脂质输出关键基因表达, 下调脂质合成关键基因表达, 从而改善 T2DM 引起的异常糖脂代谢。

由于胰岛素抵抗和胰岛  $\beta$  细胞功能障碍等多种原因, T2DM 患者机体各组织器官葡萄糖利用效率下降, 肝糖原合成量下降, 肝脏利用非糖物质生产葡萄糖速率上升, 导致过量葡萄糖释放入血, 血糖升高<sup>[25]</sup>。因此, 抑制肝脏糖异生是药物改善 T2DM 异常糖代谢的主要研究方向。前人研究发现: 靶向抑制 PC 蛋白可显著降低糖尿病肥胖大鼠的血糖浓度和内源性葡萄糖产生速率<sup>[26]</sup>; 通过施用 FBP 选择性抑制剂, 可降低糖尿病肥胖大鼠 70% 的糖异生和 46% 的内源性葡萄糖生成, 从而降低血糖水平, 缓解糖代谢紊乱<sup>[27]</sup>。此外, 刺蒺藜中分离的黄嘌呤核苷可下调糖异生关键酶 G6P 和 PEPCK 的蛋白表达水平, 从而降低糖尿病大鼠的血糖水平<sup>[28]</sup>; 穿心莲内酯<sup>[29]</sup>、18 $\beta$ -甘草次酸<sup>[30]</sup>和青钱柳三萜酸<sup>[31]</sup>可通过下调糖异生关键转录因子 *Hnf4a* 和 *Creb1* 的转录水平, 抑制其靶基因 *Pck1* 和 *G6pc* 的表达, 从而降低肥胖小鼠肝脏的糖异生水平。因此, 以上靶点是药物调控糖异生的重要靶点。本论文研究发现 ISL 可抑制 T2DM 小鼠肝脏中 PC、PEPCK 和 FBP 的活性, 下调关键转录因子 HNF4 $\alpha$  与 CREB 的表达, 从而抑制糖异生途径的多个限速步骤, 改善 T2DM 小鼠糖代谢紊乱。

药物对于脂代谢的调控, 主要可通过脂质分解、合成和运输途径发挥作用<sup>[32]</sup>。研究发现特异性敲除 *ATGL* 基因可降低小鼠肝脏 FFA 通量, 进而缓解其脂肪性肝炎<sup>[33]</sup>; 上调脂肪酸  $\beta$  氧化关键转录因子 *PPAR $\alpha$*  的表达, 可提高其靶基因 *CPT1*、*ACOX1* 和 *LCAD* 的转录水平, 从而促进肥胖大鼠肝脏脂肪分解<sup>[34]</sup>; 此外, *ACOS* 的表达上调亦可促进脂肪酸分解, 改善高脂血症小鼠机体脂质紊乱<sup>[35]</sup>。本文研究发现 ISL 可下调 *ATGL* 的转录水平, 提高转录因子 *PPAR $\alpha$*  的 mRNA 水平, 上调



**Figure 6** Molecular docking and molecular dynamics simulation of ISL and PEPCK. A: Three-dimensional structure diagram of ISL and PEPCK protein molecule docking (PDB ID: 2gmv); B, C: Two-dimensional structure diagrams of the protoligand/ISL and PEPCK protein molecule docking, respectively; D–G: The RMSD values, Rg, SASA, and RMSF values of the PEPCK protein and PEPCK-ISL complexes, respectively. ▲/▼ represents amino acid residues with the same effect in the protoligand and ISL. RMSD: Root mean square deviation; Rg: Radius of gyration; SASA: Solvent accessible surface area; RMSF: Root mean square fluctuation

FFA 转运相关基因 *ACOS* 和 *CPT1* 的表达, 同时促进脂肪酸  $\beta$  氧化相关基因 *ACOX1* 和 *LCAD* 的表达, 从而促进细胞脂解。在脂质合成过程中, 转录因子 *SREBP1c* 和 *chREBP* 可调控脂质合成<sup>[36]</sup>, 其表达下调可抑制 *FAS* 和 *ACCI* 的转录水平, 改善肥胖小鼠肝脏脂肪变性, 降低其血浆甘油三酯和非酯化脂肪酸水平<sup>[37]</sup>。决明子花乙醇提取物可降低高脂血症大鼠肝脏中 *SREBP1c*、*ACCI*、*HMGR* 和 *HMGS* 的表达, 从而抑制脂肪酸和胆固醇生成, 缓解高脂血症<sup>[38]</sup>。本文研究发现 ISL 可抑制 *SREBP1c* 和 *chREBP* 的表达, 降低 *ACCI*、*FAS*、*HMGR* 的转录水平, 从而减少细胞脂质合成。同时, 本

文发现 ISL 可上调细胞膜上参与 FFA 摄取的关键蛋白 *CD36* 的转录水平, 这与其他文献报道的结果相符<sup>[39]</sup>。通过上调 *CD36*, ISL 加快了肝细胞的 FFA 摄取速率, 从而降低组织与血液中的 FFA 含量。目前, 也有其他药物通过上调 *CD36* 以发挥降脂作用的相关报道, 如吡格列酮<sup>[40]</sup>、芒果苷<sup>[41]</sup> 和甘草查尔酮 A<sup>[41]</sup>。此外, *MTTP* 和 *APOB* 可调控脂质输出速率<sup>[12]</sup>, ISL 可通过上调 *MTTP* 和 *APOB* 的基因表达水平, 促进脂质输出, 从而降低肝细胞内脂质水平。

本课题组在前期研究中发现 ISL 主要通过激活 AMPK 和抑制 mTORC1 发挥抗糖尿病活性<sup>[7]</sup>。本文是

前期研究工作的延续,观察到的ISL对糖异生和脂代谢相关靶点的调控作用也与AMPK和mTORC1信号通路的活性密切相关。大量研究表明AMPK对糖异生具有抑制作用,它可通过抑制转录因子HNF4 $\alpha$ 和CREB的表达抑制糖异生关键酶G6P和PEPCK的表达<sup>[31,42]</sup>;还可通过降低PC和FBP的蛋白水平抑制糖异生<sup>[43,44]</sup>。而mTORC1则与此相反,它可上调PEPCK和CREB的表达,从而促进糖异生,引起葡萄糖耐受不良<sup>[45]</sup>。因此,ISL对AMPK的激活和对mTORC1的抑制均可抑制糖异生。对于脂代谢,AMPK可激活PPAR $\alpha$ 和CPT1的表达<sup>[46]</sup>,促进脂肪酸分解;可直接磷酸化转录因子SREBP1c<sup>[47,48]</sup>,抑制脂质合成;还可抑制脂质合成的多个关键酶,如FAS、ACC1、HMGR和HMGs<sup>[49-51]</sup>的活性。而抑制mTORC1则可下调脂质合成基因FAS和ACC1的表达<sup>[52]</sup>;可抑制关键转录因子SREBP1c的表达和活化<sup>[53]</sup>,从而减少肝脏脂肪生成。综上,ISL对糖脂代谢转录因子及关键蛋白的调控作用也可能是通过激活AMPK和抑制mTORC1来实现的。

**作者贡献:** 陈姿伊和杨晓雪负责实验研究过程并撰写论文,二人同等贡献;刘颖和何平提出实验思路、设计研究方案并修改论文;丁文文和汪逗逗协助进行实验数据采集与分析;所有作者均阅读并参与修改了本论文。

**利益冲突:** 本文作者均声明没有利益冲突。

## References

- [1] Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy [J]. *Lancet*, 2005, 365: 1333-1346.
- [2] Cheung N, Mitchell P, Wong TY. Diabetic retinopathy [J]. *Lancet*, 2010, 376: 124-136.
- [3] Zheng Y, Ley SH, Hu FB. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2018, 14: 88-98.
- [4] Teo ZL, Tham YC, Yu M, et al. Global prevalence of diabetic retinopathy and projection of burden through 2045: systematic review and meta-analysis [J]. *Ophthalmology*, 2021, 128: 1580-1591.
- [5] Sun H, Saedi P, Karuranga S, et al. IDF diabetes atlas: global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045 [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2022, 183: 109119.
- [6] Wang C, Yang L, Hu Y, et al. Isoliquiritigenin as an antioxidant phytochemical ameliorates the developmental anomalies of zebrafish induced by 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether [J]. *Sci Total Environ*, 2019, 666: 390-398.
- [7] Yang L, Wang DD, Zhang ZX, et al. Isoliquiritigenin alleviates diabetic symptoms via activating AMPK and inhibiting mTORC1 signaling in diet-induced diabetic mice [J]. *Phytomedicine*, 2022, 98: 153950.
- [8] Wang JL, Yao JH, Ning Q, et al. Beneficial effects of nanosuspensions of honokiol in mice on high fat diet through suppression of hepatic gluconeogenesis [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 288-293.
- [9] Burgess SC, Hausler N, Merritt M, et al. Impaired tricarboxylic acid cycle activity in mouse livers lacking cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279: 48941-48949.
- [10] Kaze AD, Santhanam P, Musani SK, et al. Metabolic dyslipidemia and cardiovascular outcomes in type 2 diabetes mellitus: findings from the look AHEAD study [J]. *J Am Heart Assoc*, 2021, 10: e016947.
- [11] Grabner GF, Xie H, Schweiger M, et al. Lipolysis: cellular mechanisms for lipid mobilization from fat stores [J]. *Nat Metab*, 2021, 3: 1445-1465.
- [12] Stieger B, Steiger J, Locher KP. Membrane lipids and transporter function [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2021, 1867: 166079.
- [13] Wu CM, Luan H, Wang S, et al. *Pandanus tectorius* derived caffeoylquinic acids inhibit lipid accumulation in HepG2 hepatoma cells through regulation of gene expression involved in lipid metabolism [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2015, 50: 278-283.
- [14] Zhang Q, Kong XJ, Yuan H, et al. Mangiferin improved palmitate-induced-insulin resistance by promoting free fatty acid metabolism in HepG2 and C2C12 cells via PPAR $\alpha$ : mangiferin improved insulin resistance [J]. *J Diabetes Res*, 2019, 2019: 2052675.
- [15] Kim TS, Lee M, Park M, et al. Metformin and dichloroacetate suppress proliferation of liver cancer cells by inhibiting mTOR complex 1 [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 10027.
- [16] Yokoyama Y, Kubota M, Iguchi K, et al. Regulation of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase expression by metformin in HepG2 cells [J]. *Biol Pharm Bull*, 2009, 32: 1160-1165.
- [17] Hughey CC, Crawford PA. Pyruvate carboxylase wields a double-edged metabolic sword [J]. *Cell Metab*, 2019, 29: 1236-1238.
- [18] Hakimi P, Johnson MT, Yang J, et al. Phosphoenolpyruvate carboxykinase and the critical role of cataplerosis in the control of hepatic metabolism [J]. *Nutr Metab*, 2005, 2: 33.
- [19] Vincent MF, Marangos PJ, Gruber HE, et al. Inhibition by AICA riboside of gluconeogenesis in isolated rat hepatocytes [J]. *Diabetes*, 1991, 40: 1259-1266.
- [20] Van Schaftingen E, Hers HG. Inhibition of fructose-1,6-bisphosphatase by fructose 2,6-bisphosphate [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1981, 78: 2861-2863.

- [21] Rhee J, Inoue Y, Yoon JC, et al. Regulation of hepatic fasting response by PPAR $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1): requirement for hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  in gluconeogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100: 4012-4017.
- [22] Sudhakaran G, Rajesh R, Guru A, et al. Deacetylated nimbin analog N2 fortifies alloxan-induced pancreatic beta-cell damage in insulin-resistant zebrafish larvae by upregulating phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPCK) and insulin levels [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2022, 454: 116229.
- [23] Xu LN, Li Y, Dai Y, et al. Natural products for the treatment of type 2 diabetes mellitus: pharmacology and mechanisms [J]. *Pharmacol Res*, 2018, 130: 451-465.
- [24] LaMoia TE, Shulman GI. Cellular and molecular mechanisms of metformin action [J]. *Endocr Rev*, 2021, 42: 77-96.
- [25] DeFronzo RA, Ferrannini E, Groop L, et al. Type 2 diabetes mellitus [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2015, 1: 15019.
- [26] Kumashiro N, Beddow SA, Vatner DF, et al. Targeting pyruvate carboxylase reduces gluconeogenesis and adiposity and improves insulin resistance [J]. *Diabetes*, 2013, 62: 2183-2194.
- [27] van Poelje PD, Potter SC, Chandramouli VC, et al. Inhibition of fructose 1,6-bisphosphatase reduces excessive endogenous glucose production and attenuates hyperglycemia in Zucker diabetic fatty rats [J]. *Diabetes*, 2006, 55: 1747-1754.
- [28] Ahmed SA, Sarma P, Barge SR, et al. Xanthosine, a purine glycoside mediates hepatic glucose homeostasis through inhibition of gluconeogenesis and activation of glycogenesis *via* regulating the AMPK/FoxO1/AKT/GSK3 $\beta$  signaling cascade [J]. *Chem Biol Interact*, 2023, 371: 110347.
- [29] Zhang M, Yang M, Wang N, et al. Andrographolide modulates HNF4 $\alpha$  activity imparting on hepatic metabolism [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2020, 513: 110867.
- [30] Yang M, Zhang M, Liu Q, et al. 18 $\beta$ -Glycyrrhetic acid acts through hepatocyte nuclear factor 4 alpha to modulate lipid and carbohydrate metabolism [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 157: 104840.
- [31] Cao JJ, Zheng RD, Chang XY, et al. Cyclocarya paliurus triterpenoids suppress hepatic gluconeogenesis *via* AMPK-mediated cAMP/PKA/CREB pathway [J]. *Phytomedicine*, 2022, 102: 154175.
- [32] Yoon H, Shaw JL, Haigis MC, et al. Lipid metabolism in sickness and in health: emerging regulators of lipotoxicity [J]. *Mol Cell*, 2021, 81: 3708-3730.
- [33] Fuchs CD, Radun R, Dixon ED, et al. Hepatocyte-specific deletion of adipose triglyceride lipase (adipose triglyceride lipase/patatin-like phospholipase domain containing 2) ameliorates dietary induced steatohepatitis in mice [J]. *Hepatology*, 2022, 75: 125-139.
- [34] Hai Y, Zuo L, Wang M, et al. Icariin alleviates nonalcoholic fatty liver disease in polycystic ovary syndrome by improving liver fatty acid oxidation and inhibiting lipid accumulation [J]. *Molecules*, 2023, 28: 517.
- [35] Li S, Li J, Mao G, et al. Fucosylated chondroitin sulfate oligosaccharides from *isostichopus badiionotus* regulates lipid disorder in C57BL/6 mice fed a high-fat diet [J]. *Carbohydr Polym*, 2018, 201: 634-642.
- [36] Gu YQ, Duan S, Ding MN, et al. Saikosaponin D attenuates metabolic associated fatty liver disease by coordinately tuning PPAR $\alpha$  and INSIG/SREBP1c pathway [J]. *Phytomedicine*, 2022, 103: 154219.
- [37] Wang J, Suo Y, Zhang JL, et al. Lycopene supplementation attenuates western diet-induced body weight gain through increasing the expressions of thermogenic/mitochondrial functional genes and improving insulin resistance in the adipose tissue of obese mice [J]. *J Nutr Biochem*, 2019, 69: 63-72.
- [38] Vijayakumar R, Nachiappan V. Cassia auriculata flower extract attenuates hyperlipidemia in male wistar rats by regulating the hepatic cholesterol metabolism [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 95: 394-401.
- [39] Du F, Gesang QZ, Cao J, et al. Isoliquiritigenin attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17: 1932.
- [40] Kanoke A, Nishijima Y, Ljungberg M, et al. The effect of type 2 diabetes on CD36 expression and the uptake of oxLDL: diabetes affects CD36 and oxLDL uptake [J]. *Exp Neurol*, 2020, 334: 113461.
- [41] Quan HY, Kim SJ, Kim DY, et al. Licochalcone A regulates hepatic lipid metabolism through activation of AMP-activated protein kinase [J]. *Fitoterapia*, 2013, 86: 208-216.
- [42] Zhang Y, Chen JC, Zeng YM, et al. Involvement of AMPK activation in the inhibition of hepatic gluconeogenesis by *Ficus carica* leaf extract in diabetic mice and HepG2 cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 188-194.
- [43] Chen Y, Cheng FB, Wu XR, et al. Flavonoid derivatives synthesis and anti-diabetic activities [J]. *Bioorg Chem*, 2020, 95: 103501.
- [44] Gurumayum S, Bharadwaj S, Sheikh Y, et al. Taxifolin-3-O-glucoside from *Osbeckia nepalensis* Hook. mediates antihyperglycemic activity in CC1 hepatocytes and in diabetic Wistar rats *via* regulating AMPK/G6Pase/PEPCK signaling axis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 303: 115936.
- [45] Houde VP, Brule S, Festuccia WT, et al. Chronic rapamycin treatment causes glucose intolerance and hyperlipidemia by upregulating hepatic gluconeogenesis and impairing lipid deposition in adipose tissue [J]. *Diabetes*, 2010, 59: 1338-1348.
- [46] Wu L, Liu C, Chang DY, et al. The attenuation of diabetic nephropathy by annexin A1 *via* regulation of lipid metabolism through the AMPK/PPAR $\alpha$ /CPT1b pathway [J]. *Diabetes*, 2021, 70: 2192-2203.
- [47] Li Y, Xu S, Mihaylova MM, et al. AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice [J]. *Cell*

- Metab, 2011, 13: 376-388.
- [48] Sheng DD, Zhao SM, Gao L, et al. BabaoDan attenuates high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease *via* activation of AMPK signaling [J]. Cell Biosci, 2019, 9: 77.
- [49] Huang H, Lee SH, Sousa-Lima I, et al. Rho-kinase/AMPK axis regulates hepatic lipogenesis during overnutrition [J]. J Clin Invest, 2018, 128: 5335-5350.
- [50] Kepchia D, Huang L, Currais A, et al. The Alzheimer's disease drug candidate J147 decreases blood plasma fatty acid levels *via* modulation of AMPK/ACC1 signaling in the liver [J]. Biomed Pharmacother, 2022, 147: 112648.
- [51] Yu JW, Sun LJ, Liu W, et al. Hepatitis C virus core protein induces hepatic metabolism disorders through down-regulation of the SIRT1-AMPK signaling pathway [J]. Int J Infect Dis, 2013, 17: e539-e545.
- [52] Guo ZX, Cheng XO, Feng X, et al. The mTORC1/4EBP1/PPAR $\gamma$  axis mediates insulin-induced lipogenesis by regulating lipogenic gene expression in bovine mammary epithelial cells [J]. J Agric Food Chem, 2019, 67: 6007-6018.
- [53] Gosis BS, Wada S, Thorsheim C, et al. Inhibition of nonalcoholic fatty liver disease in mice by selective inhibition of mTORC1 [J]. Science, 2022, 376: eabf8271.