

异甘草素改善2型糖尿病所致异常内质网应激机制研究

赖恺怡^{1#}, 丁文文^{1#}, 张佳瑜¹, 杨晓雪¹, 高文博¹, 肖瑶^{2*}, 刘颖^{1*}

(1. 北京中医药大学生命科学学院, 北京 102488; 2. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488)

摘要: 异甘草素 (isoliquiritigenin, ISL) 是甘草中提取的查尔酮类化合物, 具有抗糖尿病、抗癌及抗氧化等多种生物活性。课题组前期研究发现, ISL可降低2型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 小鼠的血糖水平, 改善T2DM引起的糖脂代谢和能量代谢紊乱, 本文拟进一步探究ISL缓解T2DM所致异常内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ERS) 的效果并解析其分子机制。体内实验采用8周龄SPF级雄性C57BL/6J小鼠, 通过饲喂高脂高糖饮食结合腹腔注射链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 构建T2DM动物模型, 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规定 (批准号: BUCM-2022021503-1134); 体外实验采用人肝癌HepG2细胞, 以衣霉素 (tunicamycin, TM) 诱导ERS细胞模型。利用转录组测序分析ISL对T2DM小鼠肝脏基因转录水平的影响; 采用实时荧光定量PCR (real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 检测ISL对ERS关键基因的调控作用; 采用酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、蛋白质印迹法 (Western blot, WB) 以及免疫荧光技术检测ISL对ERS关键蛋白的调控作用。实验结果表明: ISL可显著下调ERS关键基因的表达, 降低葡萄糖调节蛋白78 (glucose-regulated protein 78, GRP78) 的水平, 并抑制蛋白激酶R样内质网激酶 (protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase, PERK) 的磷酸化, 从而缓解T2DM所致异常ERS; 同时, ISL可提高胰岛素受体底物 (insulin receptor substrate, IRS) 1和IRS2的蛋白水平, 促进蛋白激酶B (protein kinase B, Akt) 的磷酸化, 改善胰岛素敏感性。综上, ISL可通过改善ERS和胰岛素敏感性, 缓解T2DM相关症状。

关键词: 异甘草素; 2型糖尿病; 内质网应激; 胰岛素敏感性; 糖代谢

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2025)01-0130-11

Isoliquiritigenin alleviates abnormal endoplasmic reticulum stress induced by type 2 diabetes mellitus

LAI Kai-yi^{1#}, DING Wen-wen^{1#}, ZHANG Jia-yu¹, YANG Xiao-xue¹, GAO Wen-bo¹,
XIAO Yao^{2*}, LIU Ying^{1*}

(1. School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China;

2. School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China)

Abstract: Isoliquiritigenin (ISL) is a chalcone compound isolated from licorice, known for its anti-diabetic, anti-cancer, and antioxidant properties. Our previous study has demonstrated that ISL effectively lowers blood glucose levels in type 2 diabetes mellitus (T2DM) mice and improves disturbances in glucolipid and energy metabolism induced by T2DM. This study aims to further investigate the effects of ISL on alleviating abnormal endoplasmic reticulum stress (ERS) caused by T2DM and to elucidate its molecular mechanisms. *In vivo* experiments were conducted using 8-week-old SPF male C57BL/6J mice. The T2DM animal model was established by high-fat and high-sugar diet combined with intraperitoneal injections of streptozotocin (STZ), in

收稿日期: 2024-09-05; 修回日期: 2024-10-28.

[#]共同第一作者.

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

Tel: 86-10-53912136, E-mail: xiaoyao9510@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0867

compliance with the ethical guidelines set by the Animal Welfare Committee of Beijing University of Chinese Medicine (approval number: BUCM-2022021503-1134). *In vitro* experiments employed human liver cancer HepG2 cells, which were induced with tunicamycin (TM) to establish the ERS cell model. Transcriptomic sequencing was used to analyze changes in gene expression in the liver samples of T2DM mice following ISL treatment. Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was employed to assess the regulatory effects of ISL on key ERS genes. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Western blot (WB), and immunofluorescence techniques were used to evaluate ISL's effects on ERS-related proteins. Results indicate that ISL significantly downregulates the expression of ERS-related genes, reduces the level of glucose-regulated protein 78 (GRP78), and inhibits the phosphorylation of protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase (PERK), thereby alleviating abnormal ERS induced by T2DM. Additionally, ISL increases the protein levels of insulin receptor substrate (IRS) 1 and IRS2 and enhances the phosphorylation of protein kinase B (Akt), thereby improving insulin sensitivity. In conclusion, ISL is able to alleviate T2DM associated symptoms by improving abnormal ERS and enhancing insulin sensitivity.

Key words: isoliquiritigenin; type 2 diabetes mellitus; endoplasmic reticulum stress; insulin sensitivity; glucose metabolism

糖尿病及其并发症已成为重大的全球健康威胁,城市化的发展也进一步提高了糖尿病的发病率^[1,2]。根据国际糖尿病联合会报告,目前全球有5.37亿的成年人(20~79岁)确诊糖尿病,预计到2030年患者人数将增至6.43亿,到2045年进一步增至7.43亿,发病情况日益严峻^[3]。全球范围内最常见的糖尿病类型是2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM),其患者数量占糖尿病病例的90%以上^[4]。T2DM以胰岛素抵抗和胰岛素分泌受损为主要特点^[5],随着病情的发展,可导致患者的视网膜^[6]、肾脏^[7]、心血管系统^[8]、骨骼系统^[9]和神经系统^[10]产生各种并发症,严重威胁健康。

甘草作为世界上最古老的草药之一,在全球范围内被广泛使用^[11]。我国药典规定甘草为三基原中药材,基原植物分别是乌拉尔甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)、光果甘草(*Glycyrrhiza glabra* L.)和胀果甘草(*Glycyrrhiza inflata* Bat.)^[12-14]。甘草富含三萜类和黄酮类活性成分^[12,15],异甘草素(isoliquiritigenin, ISL)即4,2',4'-三羟基查尔酮,是一种具有查尔酮结构的类黄酮化合物。近年来,大量研究显示ISL具有抗糖尿病^[16]、抗炎^[17]和抗癌^[18]等多种生物活性。本课题组前期针对ISL的抗T2DM活性开展了系统研究^[19-21],证实了在高脂高糖饮食(high-fat-high-sugar diet, HFD)诱导的糖尿病小鼠中,腹腔注射ISL可有效降低血糖水平,抑制肝脏糖异生,改善肝脏脂质代谢,促进线粒体生物发生和自噬,从而缓解T2DM引起的糖脂和能量代谢紊乱,表现出改善T2DM的良好潜力。

当机体处于营养过剩状态时,内质网中未折叠或错误折叠的蛋白质会异常蓄积,引发内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)^[22]。长期的ERS会干扰胰岛素的生产、折叠和运输,加剧肝脏、骨骼肌和

脂肪组织的胰岛素抵抗^[23]。因此,ERS是肥胖^[24]和糖尿病^[25]的常见特征之一。本论文将在前期研究的基础上进一步探究ISL缓解T2DM所致异常ERS的效果并解析其分子机制,补充完善ISL改善T2DM的机制。

材料与amp;方法

实验动物 SPF级雄性C57BL/6J小鼠(8周龄),购于斯贝福(北京)生物技术有限公司,饲养于北京中医药大学实验动物中心(20~24℃,50%~70%相对湿度,12h/12h光暗交替)。实验方案经北京中医药大学动物伦理委员会批准: BUCM-2022021503-1134; 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。

试剂和试剂盒 ISL(纯度≥98%,批号: B21525)、二甲双胍(metformin, MET, 纯度: 98%, 批号: S30880)和衣霉素(tunicamycin, TM, 纯度≥98%, 批号: S17119)均购自上海源叶生物科技有限公司; 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ, 纯度≥98%, 色谱纯, 批号: BN30130)购自北京百瑞极生物科技有限公司; 4-苯基丁酸(4-phenylmethylbutyric acid, 4-PBA, 纯度≥99%, 批号: P132032)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自美国Corning公司; DMEM高糖培养基购自美国Gibco公司; 葡萄糖调节蛋白78(glucose-regulated protein 78, GRP78)、C/EBP同源蛋白(C/EBP homologous protein, CHOP)和人肝糖原酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒均购自上海酶联生物科技有限公司; 葡萄糖含量(葡萄糖氧化酶法)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所; 一站式DNA/RNA/蛋白提取试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司;

NovoScript® Plus All-in-one 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix (gDNA Purge) 和 NovoStart® SYBR qPCR SuperMix Plus 购于苏州近岸蛋白质科技股份有限公司; 糖原过碘酸-雪夫 (periodic acid-Schiff, PAS) 染色试剂盒以及 BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司; 胰岛素受体底物 (insulin receptor substrate, IRS) 1、IRS2、蛋白激酶 RNA 样内质网激酶 (protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase, PERK)、p-PERK (Thr980)、蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 和 p-Akt (Ser473) 一抗均购自美国 Cell Signaling Technology 公司; GRP78 一抗购自美国 Proteintech 公司。

仪器 CO₂ 恒温培养箱 (MCO-18AIC, 日本 SANYO 公司); PCR 仪 (QuantStudio™ 6 Flex, 美国 Applied Biosystems 公司); 酶标仪 (EPOCH, 美国 Biotek Epoch 公司); 低温高速离心机 (Centrifuge 5424 R, 德国 Eppendorf 公司); 激光共聚焦扫描显微镜 (FV3000, 日本 Olympus Corporation 公司); PowerPac 基础电泳仪 (1645050, 美国 Bio-Rad 公司)。

T2DM 小鼠模型构建及分组给药 小鼠适应性饲养 1 周后, 采取本课题组前期方法^[20,21]构建 T2DM 小鼠模型, 以 MET 作为阳性药对照, 分组包括: 空白组 (CTRL-Vehicle)、空白给药组 (CTRL-ISL-H)、模型组 (T2DM-Vehicle)、低剂量治疗组 (T2DM-ISL-L)、高剂量治疗组 (T2DM-ISL-H) 和阳性药组 (T2DM-MET), 每组 6 只。每 3 天腹腔注射给药 1 次, 其中空白给药组和高剂量治疗组给予 ISL (20 mg·kg⁻¹), 低剂量治疗组给予 ISL (10 mg·kg⁻¹), 阳性药组给予 MET (200 mg·kg⁻¹), 持续 3 周。给药结束后, 摘眼球处死小鼠, 留取肝脏组织并保存于 -80 °C。

小鼠肝脏转录组分析 随机挑选 ISL 治疗组和 T2DM 模型组小鼠各 3 只, 对其肝脏样品进行转录组测序分析, 由上海欧易生物医学科技有限公司提供检测。

TM 和 4-PBA 浓度筛选 人肝癌 HepG2 细胞购自北京协和医学院细胞资源中心。依据文献, 选择 TM 作为构建 ERS 细胞模型的诱导试剂^[26,27], 4-PBA 作为改善 ERS 的阳性药对照^[28,29]。将 HepG2 细胞培养于 DMEM+10% FBS (37 °C, 5% CO₂), 当融合率达到 80% 时, 进行噻唑蓝 [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT] 比色法检测, 以确定 TM 和 4-PBA 的安全给药范围。TM 给药浓度为 1、2、5、10 μg·mL⁻¹, 孵育 4、8 和 24 h; 4-PBA 的给药浓度为 1、5、10、20 mmol·L⁻¹, 孵育 24 和 48 h。细胞实验均设置 3 次重复。

ERS 模型构建及分组给药 采用上述相同条件培养 HepG2 细胞, 当融合率达到 80% 时, 更换为含 2%

FBS 的 DMEM 培养基并分组给药, 设置空白组、模型组、ISL 给药组 (5、10、20、40 μmol·L⁻¹)^[20,21] 和阳性药 4-PBA 组 (1 mmol·L⁻¹), 孵育 24 h; 除空白组外, 其他各组加入 TM (2.0 μg·mL⁻¹), 孵育 4 h, 以诱导 ERS。

RT-qPCR 分析 提取以上各组细胞样品总 RNA, 以 β-actin 作为内参, 进行实时荧光定量 PCR (real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 分析, 检测 ERS 相关基因 *GRP78*、*CHOP*、*PERK*、肌醇依赖酶 1α (inositol-requiring enzyme 1α, *IRE1α*)、激活转录因子 6α (activating transcription factor 6α, *ATF6α*)、真核翻译起始因子 2α (eukaryotic initiation factor 2α, *eIF2α*)、X-框结合蛋白 1 (recombinant X-Box binding protein 1, *XBPI*) 和 c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase 1, *JNK*) 的转录水平, 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 序列信息见表 1, 扩增程序: 95 °C 1 min、95 °C 20 s、60 °C 1 min, 40 个循环。

Table 1 Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) primers. *GRP78*: Glucose-regulated protein 78; *CHOP*: C/EBP homologous protein; *PERK*: Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase; *eIF2α*: Eukaryotic initiation factor 2α; *IRE1α*: Inositol-requiring enzyme 1α; *XBPI*: Recombinant X-box binding protein 1; *JNK*: C-Jun N-terminal kinase; *ATF6α*: Activating transcription factor 6α

Gene	Sequence (5'-3')
<i>β-actin</i>	GAGAAAATCTGGCACCACACC GATAGCACAGCCTGGATAGCAA
<i>GRP78</i>	GCACAGACGGGTCATTCCAC CAACGATGGAAGGATGCTGG
<i>CHOP</i>	TTGCCCTTTCCTTCGGGAC CAGTCAGCCAAGCAGAGAA
<i>PERK</i>	CTCGGGAAAAGGTAATGCG ATCCATCTTTTCTTGCCACTTC
<i>eIF2α</i>	TAGCCTTGTCAGATAAGGAAGGA TTGGCTTCCATTTCTCTGC
<i>IRE1α</i>	AGAGAAGCAGCAGACTTTGTC GTTTTGGTGTGCTACATGGTGA
<i>XBPI</i>	ATGGATTCTGGCGGTATTGAC GAGAAAGGGAGGCTGGTAAGG
<i>JNK</i>	ACACCACAGAAATCCCTAGAAG CACAGCATCTGATAGAGAAGGT
<i>ATF6α</i>	AGCAGCACCCAAGACTCAAAC GCATAAGCGTTGGTACTGTCTGA

ELISA 分析 体内研究取小鼠肝脏, 称重, 按 1:9 加入 PBS (pH 7.4), 研磨匀浆; 体外研究取各组 1 mL 细胞培养液置于 1.5 mL 离心管; 对体内外样品离心并收集上清, 通过 ELISA 试剂盒测定各组样品中 GRP78 和 CHOP 的蛋白含量。

蛋白质印迹法 (Western blot, WB) 检测 裂解细胞, 95 °C 加热 5 min 制备蛋白样品; 配制 SDS-PAGE 凝

胶, 10 μL 蛋白样品上样, 电泳 60 min, 电压 120 V; 转膜 75 min, 电流 220 mA; 5% 脱脂奶粉或 5% 牛血清白蛋白室温封闭 1.5 h; 4 $^{\circ}\text{C}$ 一抗孵育过夜; 室温二抗孵育 2 h; ECL 显色。使用 Image J 软件对目标蛋白 IRS1、IRS2、PERK、p-PERK、Akt、p-Akt 和 GRP78 进行分析。

免疫荧光分析 将圆盖玻片置于 24 孔板中, 每孔接种 50% HepG2 细胞, 采用上述相同条件分组给药并构建 ERS 细胞模型。以 4% 多聚甲醛固定液室温固定 1 h; 0.2% Triton X-100 通透 20 min; 10% 山羊血清室温封闭 1 h; 4 $^{\circ}\text{C}$ 一抗孵育过夜; 室温二抗孵育 1 h。采用激光共聚焦扫描显微镜观察 GRP78 的蛋白表达。

细胞糖原染色观察及糖原含量测定 按照糖原 PAS 染色试剂说明书处理各组细胞, 加入染料孵育, 于一体化荧光显微成像系统上观察细胞的糖原染色情况。收集各组细胞于 1.5 mL 离心管中, PBS 清洗后超声破碎 1 min, 按照人肝糖原 ELISA 试剂盒说明书测定各组样品中的糖原含量。

胰岛素刺激的细胞葡萄糖摄取测定 将各组细胞改为无血清 DMEM 培养基孵育并加入胰岛素 (100 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 刺激 30 min, 取细胞培养液, 采用葡萄糖含量检测试剂盒检测各组培养液样品中的葡萄糖含量, 以反映细胞的葡萄糖摄取水平。

统计学分析 采用软件 IBM SPSS Statistic 26.0, 对数据进行单因素方差分析 (ANOVA), 以平均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

结果

1 T2DM 小鼠肝脏转录组分析

由图 1A 可知, 与模型组 (T2DM-Vehicle) 相比, ISL 治疗引起了小鼠肝脏转录组的变化, 共有差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs) 180 个, 包括 70 个显著上调 DEGs 和 110 个显著下调 DEGs。

DEGs 的 KEGG 通路分类汇总如图 1B 所示: ISL 治疗引起了 T2DM 小鼠各主要代谢过程的变化, 包括碳水化合物代谢、多糖的生物合成与代谢、脂代谢、能量代谢、氨基酸代谢等。

DEGs 的 KEGG 富集分析结果如图 1C 所示: 排名前 20 的上调信号通路包括了碳水化合物代谢、磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K)-Akt 信号通路和内质网中的蛋白质加工等, 提示 ISL 可能改善 T2DM 小鼠的胰岛素信号和 ERS。

DEGs 的 GO 富集分析结果如图 1D 所示: 在排名前 30 的上调信号通路中, ISL 上调了蛋白质重折叠、蛋白质折叠伴侣、组蛋白去乙酰化酶结合和错误蛋白的结合, 下调了晚期糖基化终产物受体结合, 提示 ISL 可

抑制 ERS 的进展。

2 TM 与 4-PBA 工作浓度的确定

不同浓度 TM 给药 4、8 和 24 h 后 HepG2 细胞活力检测结果如图 2A 所示: 与空白组相比, 1 和 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ TM 对细胞的活力无显著影响, 5 和 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ TM 可显著降低细胞活力。根据上述实验结果及相关文献^[30]报道, 确定 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ TM 给药 4 h 以构建 HepG2 细胞 ERS 模型。

不同浓度 4-PBA 给药 24 和 48 h 后 HepG2 细胞活力检测结果如图 2B 所示: 与空白组相比, 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 及以下浓度的 4-PBA 对细胞的活力无显著影响, 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 及以上浓度的 4-PBA 会显著降低细胞活力。根据上述实验结果及相关文献^[31]报道, 选择 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作为 4-PBA 的给药浓度。

3 ISL 可抑制 ERS 相关基因的转录

本文检测了 ISL 对 HepG2 细胞 ERS 相关基因的调控作用, 结果如图 3 所示: 与空白组相比, 在 ERS 状态下, 模型组中 *GRP78*、*CHOP*、*PERK*、*eIF2 α* 、*IRE1 α* 、*XBPI*、*JNK* 和 *ATF6 α* 的 mRNA 水平均显著升高; ISL 治疗可显著降低这些基因的 mRNA 水平, 且 ISL 对 *CHOP*、*eIF2 α* 、*JNK* 和 *ATF6 α* 的下调效果具有浓度依赖性。阳性药 4-PBA 也表现出对以上基因的转录抑制效果。以上结果与肝脏转录组分析结果相吻合, 提示 ISL 可能通过下调 ERS 相关基因的转录, 缓解 HepG2 细胞的 ERS 压力, 恢复内质网的正常功能。

4 ISL 可抑制 ERS 关键蛋白的表达

本文采用 ELISA 法检测了小鼠肝脏和 HepG2 细胞中 GRP78 的蛋白水平, 如图 4A 所示: 在小鼠肝脏中, 与空白组相比, 模型组的 GRP78 蛋白水平显著升高, ISL 治疗可显著降低 GRP78 的蛋白水平; 在 HepG2 细胞中, ERS 模型组的 GRP78 蛋白水平相较于空白组显著升高, 经过 ISL 给药后显著降低, 并在 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 达到最大抑制效果, 阳性药 4-PBA 也表现出对 GRP78 的抑制效果。WB 实验结果 (图 4B) 和免疫荧光观察结果 (图 4C) 也进一步验证了 ISL 对 GRP78 的抑制作用。

CHOP 蛋白水平的检测结果如图 4D 所示: 各组小鼠肝脏的 CHOP 蛋白含量均无显著性差异; 在 HepG2 细胞中, 与空白组相比, 模型组 CHOP 的蛋白水平显著升高, 当 ISL 的浓度达到 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 则可显著降低 CHOP 的蛋白水平。

PERK 蛋白及其磷酸化水平的 WB 检测结果如图 4E 所示: 相较于空白组, ERS 模型组中 PERK 的蛋白水平及其磷酸化水平均显著升高, 而 ISL 治疗则显著抑制了 PERK 蛋白的表达及其磷酸化, 阳性药 4-PBA 也表现出相似的效果。

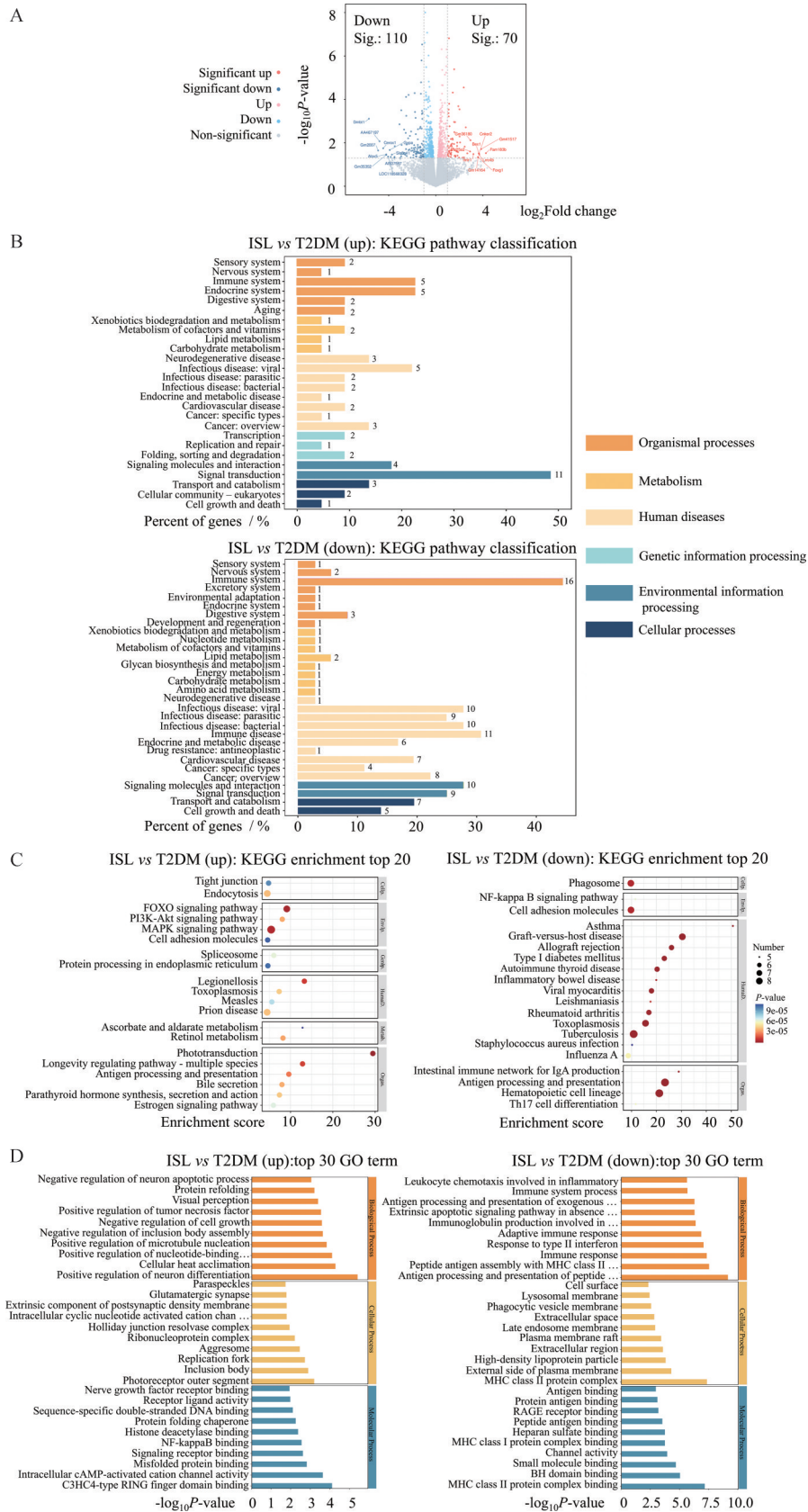


Figure 1 RNA-sequence analysis results. A: Volcano plot of differentially expressed genes (DEGs); B: KEGG enrichment analysis at the primary level; C: Top 20 terms of KEGG enrichment analysis; D: Top 30 terms of GO enrichment analysis. DEGs were identified by $P < 0.05$ and $|\log_2FC| > 1$. T2DM: Type 2 diabetes mellitus; ISL: Isoliquiritigenin; GO: Gene ontology; KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes

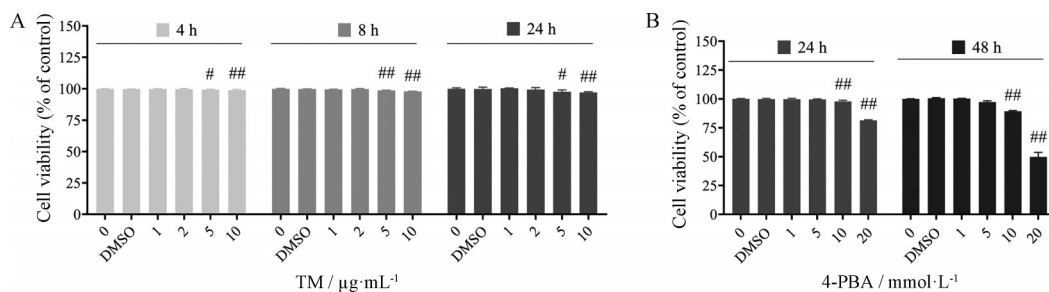


Figure 2 Determination of working concentrations of tunicamycin (TM) and 4-phenyl butyrate acid (4-PBA). A: Cell viability with TM treatment; B: Cell viability with 4-PBA treatment. $n = 3, \bar{x} \pm s$. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs CTRL group

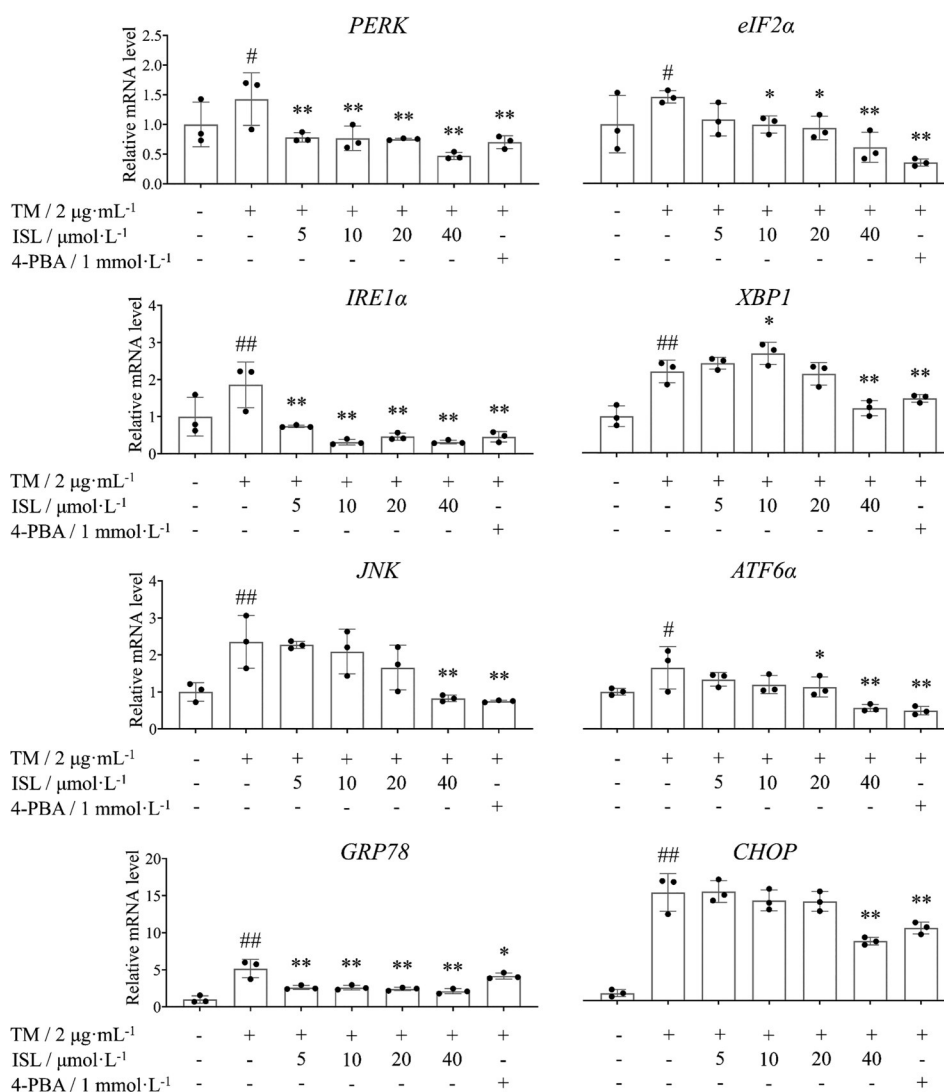


Figure 3 ISL downregulates the mRNA levels of endoplasmic reticulum stress (ERS)-related genes, including *GRP78*, *CHOP*, *PERK*, *eIF2α*, *IRE1α*, *XBP1*, *JNK*, and *ATF6α* in HepG2 cells. $n = 3, \bar{x} \pm s$. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs CTRL group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs ERS model group

以上实验结果表明: ISL 可通过降低 GRP78 和 PERK 的蛋白水平来抑制过度的 ERS 过程, 从而恢复内质网稳态。

5 ISL 可改善 ERS 状态下的细胞糖代谢

本文检测了 ISL 对 ERS 状态下细胞糖原水平的影

响, 结果如图 5A 所示: 与空白组相比, ERS 模型组细胞糖原染色减弱, 表明其糖原水平下降; 与模型组相比, ISL 给药组和阳性药 4-PBA 组糖原染色均增强, 表明 ISL 可促进 HepG2 细胞糖原合成。本研究进一步检测了细胞的糖原水平, 结果如图 5B 所示: 与空白组相比,

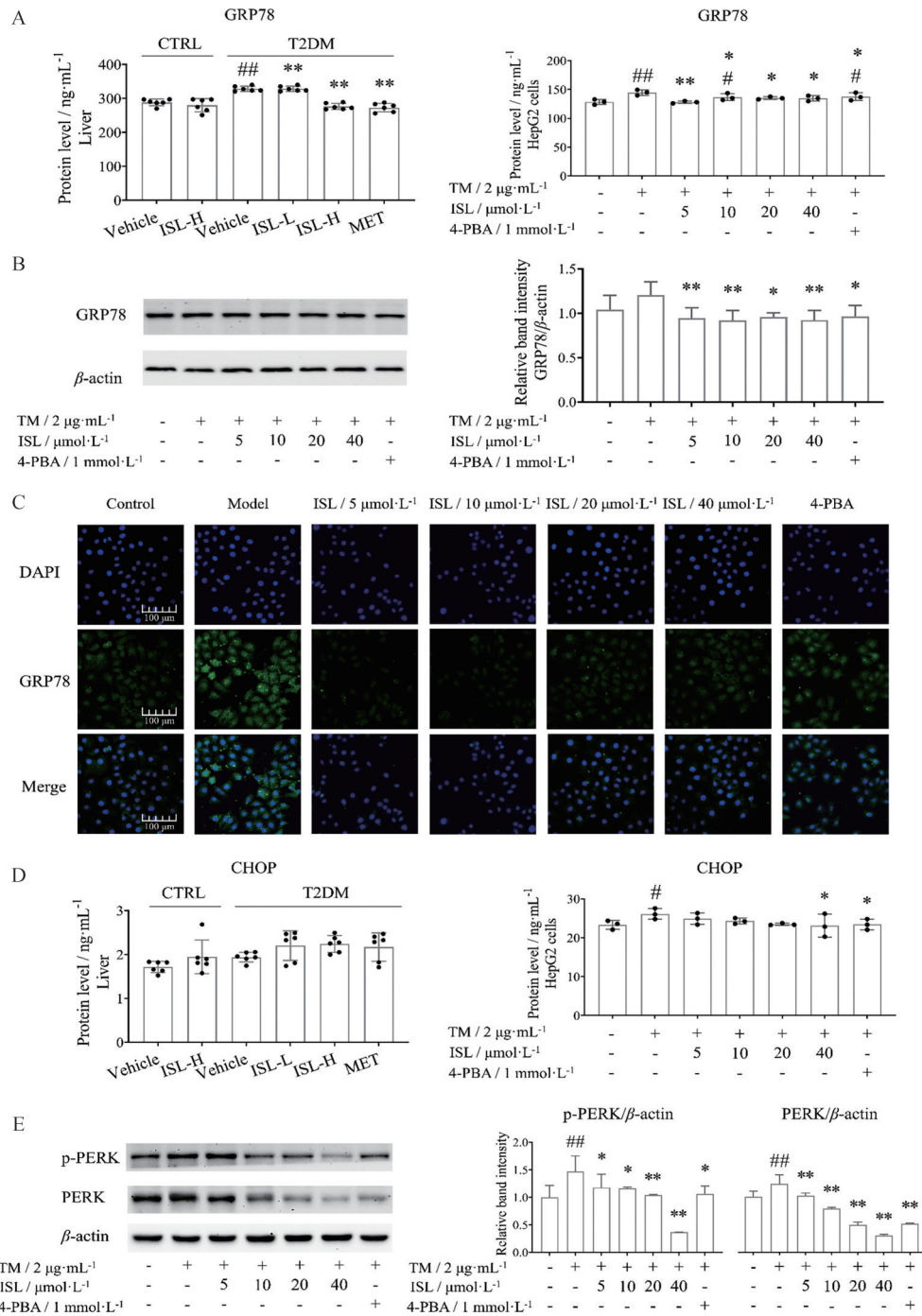


Figure 4 ISL downregulates the levels of key proteins involved in ERS in mice livers and HepG2 cells. A: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) analysis results of GRP78 in mice livers and HepG2 cells; B: Western blot (WB) analysis results of GRP78 in HepG2 cells; C: Immunofluorescence observation of GRP78 in HepG2 cells (40× magnification), the scale bar stands for 100 μm; D: ELISA analysis results of CHOP in mice livers and HepG2 cells; E: WB analysis results of PERK and p-PERK in HepG2 cells. $n = 6$ (*in vivo* experiments) or $n = 3$ (*in vitro* experiments), $\bar{x} \pm s$. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs CTRL group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs ERS model group

ERS 模型组细胞中的糖原含量显著降低 ($P < 0.05$), 表明在发生 ERS 的情况下, HepG2 细胞的糖原合成能力明显减弱; 同时, 10 和 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ISL 可显著提高细胞的糖原合成能力 ($P < 0.01$), 阳性药 4-PBA 也有相似的作用效果, 此结果与糖原染色结果 (图 5A) 相吻合, 表

明在 ERS 状态下 ISL 可促进细胞糖原合成。

胰岛素刺激的葡萄糖摄取检测结果如图 5C 所示: 与空白组相比, 模型组培养基上清中的葡萄糖含量显著升高, 10 和 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ISL 处理则可显著降低培养基中的葡萄糖含量, 阳性药 4-PBA 也表现出相似的效果。

果。以上结果表明在ERS状态下, ISL可提高HepG2细胞的胰岛素敏感性。因此, 本研究进一步检测了ERS状态下HepG2细胞中IRS1和IRS2的蛋白水平(图5D), 结果显示: 与空白组相比, 模型组的IRS1蛋白水平显著降低, 10和20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ISL处理可显著提高IRS1的蛋白水平; 与模型组相比, 5~40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ISL处理则可显著提高IRS2的蛋白水平。此结果与上述糖摄取检测结果(图5C)相吻合。

Akt在胰岛素敏感性和糖脂代谢的调节中发挥着关键作用, 已有研究表明, ERS会抑制Akt的磷酸化^[32], 加剧T2DM的进程^[19]。因此, 本文检测了ERS状态下ISL对Akt蛋白水平及其磷酸化的影响, 结果如图5E所示: 相较于空白组, 模型组的p-Akt/Akt显著降低, 而ISL给药则显著促进了Akt的磷酸化, 阳性药

4-PBA也表现出相似的效果。

以上实验结果表明: ISL可促进蛋白IRS1和IRS2的表达并激活Akt, 从而提升HepG2细胞的胰岛素敏感性, 增强其糖摄取能力, 并促进糖原合成。

讨论

本课题组前期研究已证实ISL可改善T2DM引起的糖脂和能量代谢紊乱^[19-21], 本研究进一步评估了ISL对于缓解T2DM所致异常ERS的效果, 如图6所示: ISL可抑制ERS关键靶点GRP78和PERK的蛋白表达, 并抑制PERK的磷酸化, 下调折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)3条信号通路相关基因的转录水平, 从而缓解ERS压力, 恢复内质网功能。内质网蛋白稳态对于胰岛 β 细胞在生理和病理条件下

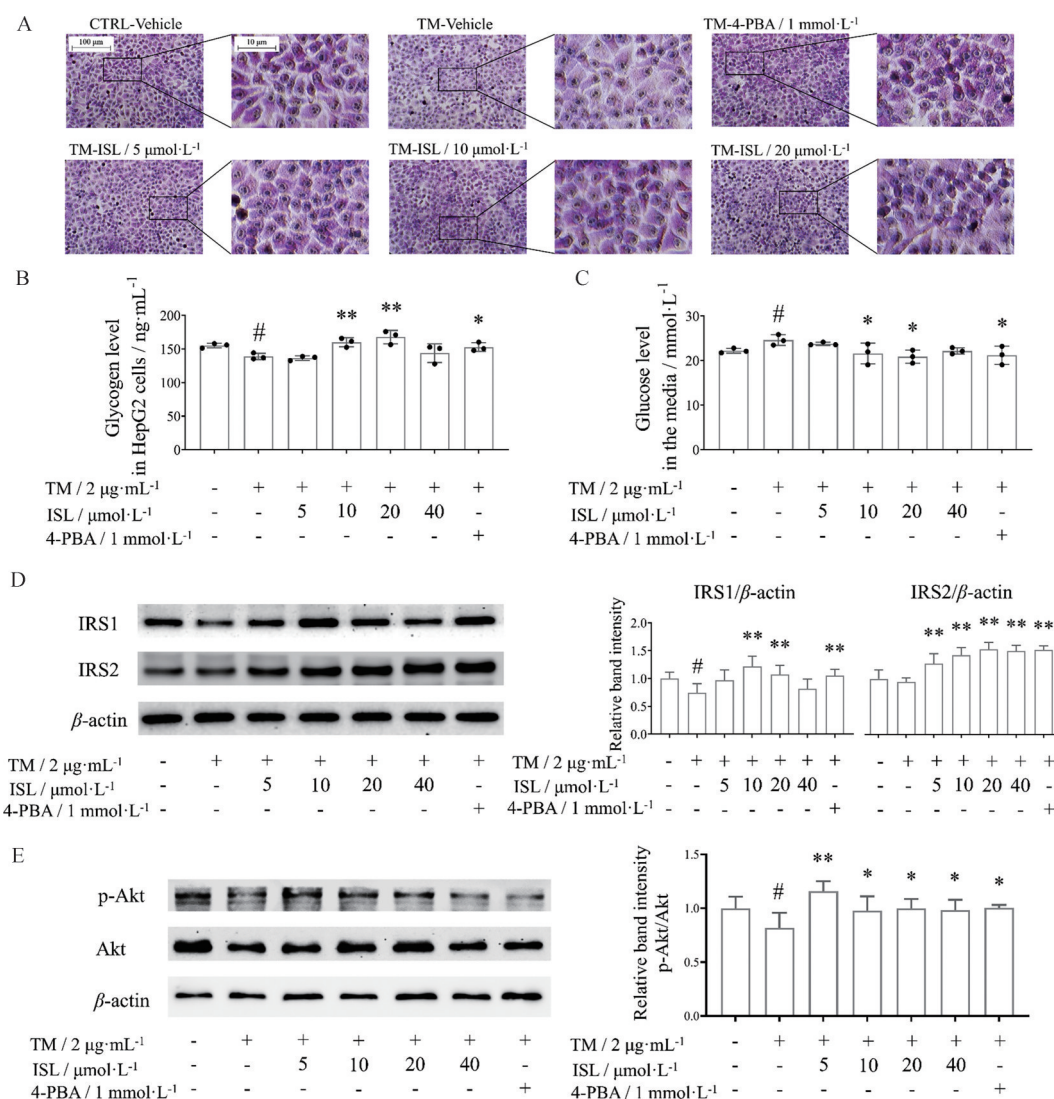


Figure 5 The effects of ISL on glycogen synthesis and insulin sensitivity in HepG2 cells. A: Periodic acid-Schiff stained HepG2 cells (40 \times magnification), the scale bar stands for 100 μm or 10 μm ; B: Glycogen levels in HepG2 cells; C: Glucose levels in media; D: WB analysis results of insulin receptor substrate 1 (IRS1) and IRS2; E: WB analysis results of protein kinase B (Akt) and p-Akt. $n = 3, \bar{x} \pm s$. [#] $P < 0.05$ vs CTRL group; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs ERS model group

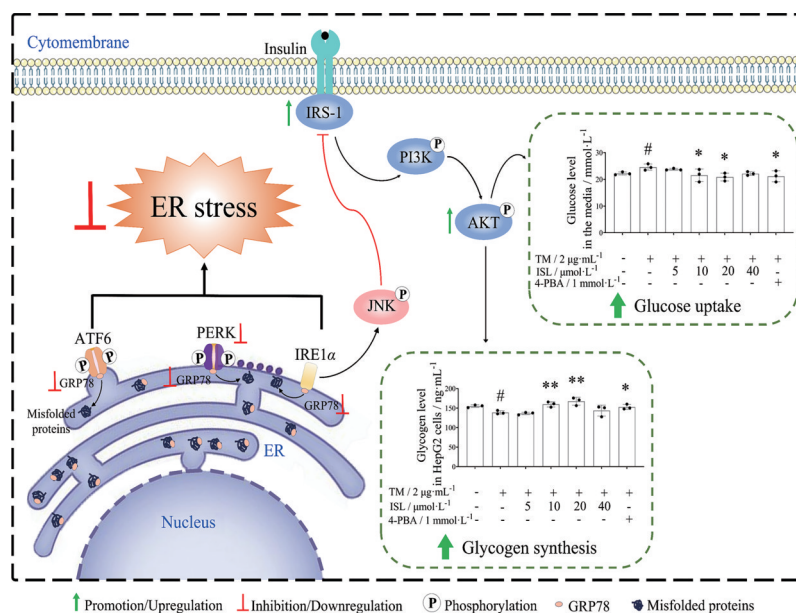


Figure 6 Molecular mechanism underlying the effects of ISL alleviating T2DM-induced abnormal ERS

的存活均至关重要^[33]。T2DM患者的UPR反应通常被持续激活,导致GRP78、CHOP和PERK等相关蛋白水平显著高于健康受试者^[34-36]。因此,改善T2DM患者体内的ERS状态有利于控制糖尿病病程进展。

本文还探讨了ISL在缓解ERS的同时对胰岛素信号的调节作用。前人研究^[37]表明,ERS会激活JNK,并通过IRS1的抑制性磷酸化干扰PI3K-Akt信号通路,导致糖原合成受阻和糖异生增强;高能磷酸化合物磷酸肌酸可下调ERS标志蛋白GRP78、CHOP的水平,抑制IRS1的磷酸化,促进Akt的磷酸化,从而改善胰岛素抵抗^[38]。本文的研究结果显示,ISL显著提高了HepG2细胞中IRS1/2的蛋白水平,并促进了Akt的磷酸化,从而在一定程度上恢复了胰岛素信号传导,提升了HepG2细胞的糖摄取能力,并促进了糖原合成(图5)。这一结果也与本课题组前期的研究结果^[19]相吻合。前期研究发现,ISL主要通过激活5'-磷酸腺苷活化蛋白激酶(adenosine 5'-monophosphate activated protein kinase, AMPK)和抑制哺乳动物雷帕霉素复合物1(mechanistic target of rapamycin complex 1, mTORC1)发挥其抗T2DM活性。AMPK是真核生物中参与代谢的中枢调节因子,是临床抗T2DM药物发挥药效的最重要靶点^[39],如MET可通过激活AMPK增加糖摄取^[40]和促进糖原合成^[41],从而改善异常糖代谢。在本论文中,ISL促进HepG2细胞糖摄取和糖原合成的效果与其对AMPK的激活效果相吻合。mTORC1是胰岛素信号通路下游的细胞营养传感器,是调节生物体内糖脂代谢、蛋白质合成及自噬的重要靶点^[42,43],在肥胖和T2DM哺乳动物体内mTORC1普遍表现为异常活

化^[44]。mTORC1对胰岛素激活的Akt起负反馈调节作用,进而降低细胞对胰岛素的敏感性^[45]。在本论文中,ISL对Akt的激活效果与其对mTORC1的抑制效果相吻合。

慢性高血糖会降低内质网的蛋白折叠能力,破坏内质网稳态,诱导无法恢复的UPR激活,进而加速胰岛β细胞衰竭^[46]。T2DM和ERS之间密切相关,本文显示ISL可缓解T2DM状态下的异常ERS,同时可提高细胞胰岛素敏感性,但二者间是否存在因果关系尚未可知。未来本课题组将进一步探讨ISL缓解异常ERS与改善胰岛素抵抗之间的相关性,为ISL在T2DM临床治疗中的进一步应用提供理论基础和实验依据。

作者贡献: 赖恺怡和丁文文负责实验研究过程并撰写论文,二人同等贡献;刘颖和肖瑶提出实验思路、设计研究方案并修改论文;张佳瑜、杨晓雪和高文博协助进行实验数据采集与分析;所有作者均阅读并参与了修改了本论文。

利益冲突: 本文作者均没有利益冲突。

References

- Gassasse Z, Smith D, Finer S, et al. Association between urbanisation and type 2 diabetes: an ecological study [J]. *BMJ Glob Health*, 2017, 2: e000473.
- Thanikachalam M, Fuller CH, Lane KJ, et al. Urban environment as an independent predictor of insulin resistance in a South Asian population [J]. *Int J Health Geogr*, 2019, 18: 5.
- Wnuk K, Switalski J, Tatara T, et al. Workplace interventions for type 2 diabetes mellitus prevention-an umbrella review [J]. *Curr*

- Diab Rep, 2023, 23: 293-304.
- [4] Valabhji J, Kar P. Rise in type 2 diabetes shows that prevention is more important than ever [J]. *BMJ*, 2023, 381: 910.
- [5] Roden M, Shulman GI. The integrative biology of type 2 diabetes [J]. *Nature*, 2019, 576: 51-60.
- [6] Wu JH, Li YN, Chen AQ, et al. Inhibition of Sema4D/PlexinB1 signaling alleviates vascular dysfunction in diabetic retinopathy [J]. *EMBO Mol Med*, 2020, 12: e10154.
- [7] Norgaard SA, Briand F, Sand FW, et al. Nephropathy in diabetic *db/db* mice is accelerated by high protein diet and improved by the SGLT2 inhibitor dapagliflozin [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 860: 172537.
- [8] Dillmann WH. Diabetic cardiomyopathy [J]. *Circ Res*, 2019, 124: 1160-1162.
- [9] Shanbhogue VV, Mitchell DM, Rosen CJ, et al. Type 2 diabetes and the skeleton: new insights into sweet bones [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2016, 4: 159-173.
- [10] Wang L, Chopp M, Szalad A, et al. Exosomes derived from Schwann cells ameliorate peripheral neuropathy in type 2 Diabetic mice [J]. *Diabetes*, 2020, 69: 749-759.
- [11] Shang Z, Liu C, Qiao X, et al. Chemical analysis of the Chinese herbal medicine licorice (Gan-Cao): an update review [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 299: 115686.
- [12] Kang MH, Jang GY, Ji YJ, et al. Antioxidant and anti-melanogenic activities of heat-treated licorice (*Wongam, Glycyrrhiza glabra* x *G. uralensis*) extract [J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2021, 43: 1171-1187.
- [13] Ding Y, Brand E, Wang W, et al. Licorice: resources, applications in ancient and modern times [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 298: 115594.
- [14] Ciganovic P, Jakimiuk K, Tomczyk M, et al. Glycerolic licorice extracts as active cosmeceutical ingredients: extraction optimization, chemical characterization, and biological activity [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2019, 8: 445.
- [15] Jiang M, Zhao S, Yang S, et al. An "essential herbal medicine"-licorice: a review of phytochemicals and its effects in combination preparations [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 249: 112439.
- [16] Aida K, Tawata M, Shindo H, et al. Isoliquiritigenin: a new aldose reductase inhibitor from glycyrrhizae radix [J]. *Planta Med*, 1990, 56: 254-258.
- [17] Liu QM, Lv HM, Wen ZM, et al. Isoliquiritigenin activates nuclear factor erythroid-2 related factor 2 to suppress the NOD-like receptor protein 3 inflammasome and inhibits the NF-kappaB pathway in macrophages and in acute lung injury [J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 1518.
- [18] Yu MZ, Pan QL, Li WB, et al. Isoliquiritigenin inhibits gastric cancer growth through suppressing GLUT4 mediated glucose uptake and inducing PDHK1/PGC-1alpha mediated energy metabolic collapse [J]. *Phytomedicine*, 2023, 121: 155045.
- [19] 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.
- [20] Ding WW, Yang XX, Chen ZY, et al. Isoliquiritigenin alleviates energy metabolism imbalance in type 2 diabetic mice [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2023, 58: 3339-3348.
- [21] Chen ZY, Yang XX, Ding WW, et al. Mechanism studies underlying the alleviatory effects of isoliquiritigenin on abnormal glucolipid metabolism triggered by type 2 diabetes [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2024, 59: 105-118.
- [22] Cnop M, Foufelle F, Velloso LA. Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes [J]. *Trends Mol Med*, 2012, 18: 59-68.
- [23] Flamment M, Hajduch E, Ferre P, et al. New insights into ER stress-induced insulin resistance [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2012, 23: 381-390.
- [24] Yamamoto K, Takahara K, Oyadomari S, et al. Induction of liver steatosis and lipid droplet formation in ATF6alpha-knockout mice burdened with pharmacological endoplasmic reticulum stress [J]. *Mol Biol Cell*, 2010, 21: 2975-2986.
- [25] Lipson KL, Fonseca SG, Ishigaki S, et al. Regulation of insulin biosynthesis in pancreatic beta cells by an endoplasmic reticulum-resident protein kinase IRE1 [J]. *Cell Metab*, 2006, 4: 245-254.
- [26] Liu H, Dai L, Wang M, et al. Tunicamycin induces hepatic stellate cell apoptosis through calpain-2/Ca²⁺-dependent endoplasmic reticulum stress pathway [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 684857.
- [27] Chen H, Sun HM, Wu B, et al. Artesunate delays the dysfunction of age-related intestinal epithelial barrier by mitigating endoplasmic reticulum stress/unfolded protein response [J]. *Mech Ageing Dev*, 2023, 210: 111760.
- [28] Yin M, Li ZH, Wang C, et al. Stellate ganglion blockade repairs intestinal mucosal barrier through suppression of endoplasmic reticulum stress following hemorrhagic shock [J]. *Int J Med Sci*, 2020, 17: 2147-2154.
- [29] Liu Y, Pan X, Li S, et al. Endoplasmic reticulum stress restrains hepatocyte growth factor expression in hepatic stellate cells and rat acute liver failure model [J]. *Chem Biol Interact*, 2017, 277: 43-54.
- [30] Giordano E, Davalos A, Nicod N, et al. Hydroxytyrosol attenuates tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress in human hepatocarcinoma cells [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2014, 58: 954-962.
- [31] Lu IT, Lin SC, Chu YC, et al. (-)-Agelasidine a induces endoplasmic reticulum stress-dependent apoptosis in human hepatocellular carcinoma [J]. *Mar Drugs*, 2022, 20: 109.
- [32] Feng B, Huang X, Jiang D, et al. Endoplasmic reticulum stress inducer tunicamycin alters hepatic energy homeostasis in mice [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18: 1710.
- [33] Yong J, Johnson JD, Arvan P, et al. Therapeutic opportunities for

- pancreatic beta-cell ER stress in diabetes mellitus [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2021, 17: 455-467.
- [34] Nourbakhsh M, Sharifi R, Heydari N, et al. Circulating TRB3 and GRP78 levels in type 2 diabetes patients: crosstalk between glucose homeostasis and endoplasmic reticulum stress [J]. *J Endocrinol Invest*, 2022, 45: 649-655.
- [35] Boden G, Cheung P, Kresge K, et al. Insulin resistance is associated with diminished endoplasmic reticulum stress responses in adipose tissue of healthy and diabetic subjects [J]. *Diabetes*, 2014, 63: 2977-2983.
- [36] Lenin R, Sankaramoorthy A, Mohan V, et al. Altered immunometabolism at the interface of increased endoplasmic reticulum (ER) stress in patients with type 2 diabetes [J]. *J Leukoc Biol*, 2015, 98: 615-622.
- [37] Malik SA, Acharya JD, Mehendale NK, et al. Pterostilbene reverses palmitic acid mediated insulin resistance in HepG2 cells by reducing oxidative stress and triglyceride accumulation [J]. *Free Radic Res*, 2019, 53: 815-827.
- [38] Jamal Y, Gamallat Y, Jaceline Gislaine PS, et al. Phosphocreatine attenuates endoplasmic reticulum stress-mediated hepatocellular apoptosis ameliorates insulin resistance in diabetes model [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 506: 611-618.
- [39] Grahame Hardie D. AMP-activated protein kinase: a key regulator of energy balance with many roles in human disease [J]. *J Intern Med*, 2014, 276: 543-559.
- [40] Brietzke SA. Oral antihyperglycemic treatment options for type 2 diabetes mellitus [J]. *Med Clin North Am*, 2015, 99: 87-106.
- [41] Tian Y, Shi D, Liao H, et al. The role of Huidouba in regulating skeletal muscle metabolic disorders in prediabetic mice through AMPK/PGC-1alpha/PPARalpha pathway [J]. *Diabetol Metab Syndr*, 2023, 15: 145.
- [42] Ardestani A, Maedler K. mTORC1 and IRS1: another deadly kiss [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2018, 29: 737-739.
- [43] Israeli T, Riahi Y, Garzon P, et al. Nutrient sensor mTORC1 regulates insulin secretion by modulating beta-cell autophagy [J]. *Diabetes*, 2022, 71: 453-469.
- [44] Mao Z, Zhang W. Role of mTOR in glucose and lipid metabolism [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19: 2043.
- [45] Shum M, Bellmann K, St-Pierre P, et al. Pharmacological inhibition of S6K1 increases glucose metabolism and Akt signalling *in vitro* and in diet-induced obese mice [J]. *Diabetologia*, 2016, 59: 592-603.
- [46] Back SH, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and type 2 diabetes [J]. *Annu Rev Biochem*, 2012, 81: 767-793.