

甘草查尔酮A缓解2型糖尿病所致异常糖异生及内质网应激分子机制研究

许文锴^{1#}, 张佳瑜^{1#}, 汪逗逗¹, 丁文文¹, 陈姿伊¹, 肖瑶^{2*}, 刘颖^{1*}

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

摘要: 本文旨在探讨甘草查尔酮A (licochalcone A, LCA) 缓解2型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 引起的异常糖异生及内质网应激的分子机制。体内研究采用8周龄雄性C57BL/6J小鼠, 高脂高糖饲料喂养结合腹腔注射链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 构建T2DM动物模型。腹腔注射LCA (5、10 mg·kg⁻¹) 治疗, 以二甲双胍 (metformin, MET) (200 mg·kg⁻¹) 为阳性对照, 间隔3天给药, 持续3周, 动物实验方案经北京中医药大学实验动物伦理委员会审核并批准 (批准号: BUCM-4-2021061701-2060)。体外实验以人肝癌细胞HepG2为实验细胞系, 采用棕榈酸钠 (sodium palmitate, SP) 诱导胰岛素抵抗细胞模型, 采用衣霉素 (tunicamycin, TM) 诱导内质网应激细胞模型。采用实时荧光定量PCR法 (real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)、酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 和蛋白质印迹法 (Western blot, WB) 检测糖异生和内质网应激相关靶点的转录和蛋白水平; 利用分子对接和分子动力学模拟对LCA和关键靶点的相互作用进行验证。结果表明, LCA可通过抑制磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 (phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK) 和葡萄糖-6-磷酸酶 (glucose-6-phosphatase, G6P) 的转录和酶活, 抑制丙酮酸羧化酶 (pyruvate carboxylase, PC) 的酶活, 提高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) 的转录和蛋白水平, 抑制糖异生。同时, LCA可通过下调真核翻译起始因子2 α (eukaryotic initiation factor 2 subunit α , eIF2 α)、肌醇依赖酶1 α (inositol-requiring enzyme 1 α , IRE1 α)、X-框结合蛋白1 (X-box binding protein 1, XBP1)、c-Jun氨基末端激酶1 (c-Jun N-terminal kinase 1, JNK1) 和活化转录因子6 α (activating transcription factor 6 α , ATF6 α) 的转录水平, 降低葡萄糖调节蛋白78 (glucose-regulated protein 78, GRP78) 的转录和蛋白水平, 抑制蛋白质激酶RNA样端激活因子 (protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase, PERK) 的转录和磷酸化, 抑制内质网应激。综上, LCA可缓解T2DM所致异常糖异生和内质网应激, 从而改善代谢紊乱。

关键词: 甘草查尔酮A; 2型糖尿病; 糖异生; 内质网应激; 代谢紊乱

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)12-3291-13

Molecular mechanism underlying the effects of licochalcone A on abnormal gluconeogenesis and endoplasmic reticulum stress induced by type 2 diabetes mellitus

XU Wen-pu^{1#}, ZHANG Jia-yu^{1#}, WANG Dou-dou¹, DING Wen-wen¹, CHEN Zi-yi¹, 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: The aim of this study is to investigate the molecular mechanism of licochalcone A (LCA) in alleviating abnormal gluconeogenesis and endoplasmic reticulum (ER) stress caused by type 2 diabetes mellitus

收稿日期: 2024-08-20; 修回日期: 2024-09-27.

[#]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.0513-4870.2024-0809

(T2DM). In the *in vivo* study, 8-week-old male C57BL/6J mice were fed with a high-fat and high-sugar diet and injected intraperitoneally with streptozotocin (STZ) to establish a T2DM model. LCA (5 and 10 mg·kg⁻¹) was administered at an interval of 3 days for 3 weeks with metformin (MET, 200 mg·kg⁻¹) as a positive control drug. The animal experiment protocol was reviewed and approved by the Experimental Animal Ethics Committee of Beijing University of Chinese Medicine (approval number: BUCM-4-2021061701-2060). Human hepatoma cell line HepG2 was used as the experimental cell line for *in vitro* experiments. Sodium palmitate (SP) was used to induce the insulin resistance cell model and tunicamycin (TM) was applied to establish the ER stress cell model. Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Western blot (WB) were used to detect the mRNA and protein levels of gluconeogenesis and ER stress-related targets, respectively. Molecular docking and dynamics simulations were used to verify the interaction between LCA and key targets. The results showed that LCA inhibits gluconeogenesis by reducing phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) and glucose-6-phosphatase (G6P) and increasing 6-phosphofructokinase-2/fructose-2,6-bisphosphatase 3 (PFKFB3) at both the mRNA and protein levels, as well as suppressing the activity of pyruvate carboxylase (PC). Additionally, LCA alleviates ER stress by downregulating the transcription of eukaryotic initiation factor 2 subunit α (eIF2 α), inositol-requiring enzyme 1 α (IRE1 α), X-box binding protein 1 (XBP1), c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1), and activating transcription factor 6 α (ATF6 α), inhibiting the transcription and protein expression of glucose-regulated protein 78 (GRP78), and suppressing the phosphorylation of protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase (PERK). In conclusion, LCA alleviates abnormal gluconeogenesis and ER stress, thereby ameliorating the abnormal metabolism induced by T2DM.

Key words: licochalcone A; type 2 diabetes mellitus; gluconeogenesis; endoplasmic reticulum stress; metabolic disorder

糖尿病是一种在世界范围内对人类健康造成巨大威胁的疾病,其中,2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)发病人数约占全球糖尿病患病总人数的90%^[1]。T2DM的典型特征是由胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)引起的高血糖,会产生葡萄糖摄取紊乱、代谢紊乱等一系列不良反应^[2]。我国的T2DM患病率呈逐年上升趋势,2002年成人患病率为2.6%^[3],至2023年已达到11.9%,超1.25亿人^[4],严重威胁公共健康。

甘草性甘,味平,归心、肺、脾、胃经,可用于改善脾胃虚弱、倦怠乏力、心悸气短等症状,同时可调和诸药,缓解其他药物的烈性^[5]。甘草中含有种类丰富、结构多样的黄酮类化合物,二氢黄酮类和查尔酮类是最具代表性的类型,如甘草苷(liquiritin)、甘草素(liquiritigenin)、异甘草苷(isoliquiritin)、异甘草素(isoliquiritigenin)和甘草查尔酮A(licochalcone A, LCA)等。本课题组近年来一直致力于甘草黄酮类化合物的生物活性研究,尤其关注其抗T2DM的效果^[6-9]。本课题组的前期研究发现,LCA可显著降低高糖高脂饮食诱导的T2DM小鼠的空腹血糖水平,改善其葡萄糖耐量,并通过激活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靶标蛋白复合体1(mammalian target of rapamycin complex 1, mTORC1),提高胰岛素敏感性,表现出改善T2DM糖脂代谢紊乱

的良好潜力。

糖异生是一种由非糖化合物转变为葡萄糖或糖原的过程,是机体在饥饿状态下血糖的主要来源之一,主要在肝脏进行,是调节葡萄糖代谢平衡的关键^[10]。肝脏糖异生占空腹状态下产生葡萄糖总量的一半,是T2DM患者血糖升高的主要原因^[11]。临床常用药二甲双胍(metformin, MET)的作用机制就包括降低患者糖异生水平^[12]。内质网(endoplasmic reticulum, ER)是蛋白质折叠加工与脂类合成与分泌的主要场所,其稳态平衡与细胞功能的维持密不可分^[13]。长期高血糖状态会引起细胞内质网扩张,导致内质网应激,激活未折叠蛋白响应(unfolded protein response, UPR),是引起胰岛 β 细胞损伤、代谢稳态破坏的重要原因^[14]。因此,本文拟在前期研究的基础上,以糖异生和内质网应激为出发点,补充完善LCA改善T2DM异常代谢的分子机制,为其应用提供理论依据。

材料与amp;方法

实验动物 SPF级C57BL/6J小鼠(8周龄,雄性),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;实验动物使用许可证号:SYXK(京)2020-0033;实验动物质量合格证编号:No.110324211104663385。

实验细胞系 人肝癌细胞HepG2,北京协和医学

院细胞资源中心。

试剂 LCA (纯度: 99.92%, 批号: 151015, 成都曼思特生物科技有限公司); 4-苯丁酸 (4-phenyl butyrate acid, 4-PBA, 纯度 $\geq 99\%$, 批号: P132032, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ, 色谱纯, 批号: BN30130, 北京百瑞极生物科技有限公司); MET (纯度: 98%, 批号: S30880)、衣霉素 (tunicamycin, TM, 纯度 $\geq 98\%$, 批号: S17119) 购自上海源叶生物科技有限公司; DMEM 高糖培养基、青霉素-链霉素双抗和胰酶为美国 Gibco 产品; 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 为美国 Corning 产品; 一站式 DNA/RNA/蛋白提取试剂盒购自中国生工生物工程 (上海) 股份有限公司; NovoScript[®] Plus All-in-one 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix (gDNA Purge) 试剂盒和 NovoStrat[®] SYBR qPCR SuperMix Plus 试剂盒购自中国近岸蛋白科技有限公司; 葡萄糖含量 (葡萄糖氧化酶法) 检测试剂盒购于南京建成生物工程研究所; 2-NBDG 葡萄糖摄取检测试剂盒为美国 APEX-BIO 公司产品; 磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 (phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK)、丙酮酸羧化酶 (pyruvate carboxylase, PC)、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) 活性检测试剂盒以及 BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒和 PVDF 膜购自中国北京索莱宝科技有限公司; 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)、葡萄糖调节蛋白 78 (glucose-regulated protein 78, GRP78) 和 C/EPB 同源蛋白 (C/EBP homologous protein, CHOP) 酶联免疫试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司; 超敏 ECL 化学发光试剂盒购自北京永泰兴成商贸有限公司; β -actin、蛋白质激酶 RNA 样端激活因子 (protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase, PERK) 和 phospho-PERK (Thr980) 对应一抗购自美国 Cell Signalling Technology 公司; GRP78/BIP 对应一抗购自美国 Proteintech 公司。

仪器 酶标仪 (EPOCH, 美国 Biotek Epoch 公司); RT-qPCR 仪 (QuantStudio[™] 6 Flex, 美国 Applied Biosystems 公司); 低温高速离心机 (Centrifuge 5424 R, 德国 Eppendorf 公司); CO₂ 恒温培养箱 (MCO-18AIC, 日本 SANYO 公司); Mini-PROTEAN[®] Tetra 电泳槽 (1658004)、PowerPac 基础电泳仪 (1645050)、多功能分子成像系统 (ChemiDocmp), 美国 Bio-Rad 公司。

T2DM 小鼠模型构建、分组给药、取材 经北京中医药大学动物伦理委员会批准 (批准号: BUCM-4-

2021061701-2060), 于大学屏障环境动物室 ($22 \pm 2^\circ\text{C}$, $60\% \pm 10\%$ 相对湿度, 12 h/12 h 光暗循环) 饲养实验动物并开展相关研究。适应喂养 1 周后, 将小鼠随机分为两组, 分别采取高脂高糖饮食 (high-fat-high-sugar diet, HFD) 和普通维持饲料 (normal diet, ND) 喂养, 持续 3 周。禁食 12 h, HFD 组小鼠腹腔注射 STZ 溶液 ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), ND 组小鼠则注射等体积溶媒 (柠檬酸盐缓冲液, pH = 4.5), 持续 5 天。检测空腹 7 h 血糖水平, 连续 3 次 $\geq 11.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 即为造模成功。如表 1 所示, 将造模成功的 HFD 组小鼠随机分为模型组 (T2DM-vehicle)、LCA 治疗组 (T2DM-LCA-L 和 T2DM-LCA-H) 和阳性药组 (T2DM-MET)^[6-9]; 将 ND 组小鼠随机分为空白组 (CTRL-vehicle) 和空白给药组 (CTRL-LCA-L)。给药结束后, 摘眼球处死, 分离肝脏, 于 -80°C 保存备用。

Table 1 Grouping and administration of experimental animals ($n = 6$). T2DM: Type 2 diabetes mellitus; LCA: Licochalcone A; MET: Metformin; ND: Normal diet; HFD: High-fat-high-sugar diet

Group	Diet	Drug	Dose/mg·kg ⁻¹
CTRL-vehicle	ND	/	/
CTRL-LCA-L		LCA	5
T2DM-vehicle	HFD	/	/
T2DM-LCA-L		LCA	5
T2DM-LCA-H			10
T2DM-MET		MET	200

细胞培养及分组给药 采用 DMEM 培养基+10% FBS+1% 青霉素-链霉素双抗培养 HepG2 细胞 (37°C , 5% CO₂)。将状态良好的细胞接种于 6 孔板 (3.5×10^5 个/孔), 当细胞融合率达到 80% 进行分组给药, 设置 LCA 浓度梯度为 0、5、10、20、40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 以 MET ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 作为检测糖异生相关指标的阳性药对照^[7,15], 以 4-PBA ($1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 作为检测内质网应激相关指标的阳性药对照^[16,17]。

胰岛素抵抗模型构建 采用棕榈酸钠 (sodium palmitate, SP) 诱导 IR 模型, 采用噻唑蓝 (methylthiazolotetrazolium, MTT) 比色法进行 SP 剂量范围筛选, 设置 SP 浓度梯度为 0、0.125、0.25、0.5、1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 每组 6 个平行。

细胞葡萄糖消耗测定 采用 $0.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SP 溶液孵育 HepG2 细胞 24 h, 以构建 IR 细胞模型; 给予 LCA (0、5、10、20、40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 MET ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理 24 h, 加入终浓度为 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 胰岛素溶液, 孵育 0.5 h, 每组 3 个平行; 取上清, 采用葡萄糖含量检测试剂盒检测各组培养基中的葡萄糖水平, 以反映细胞的葡萄糖消耗情况。

细胞葡萄糖摄取测定 采用上述相同方法构建 IR 细胞模型; 其后改用无糖 DMEM 培养基给予 LCA (0.5、10、20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 MET (10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理 18 h, 加入终浓度为 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 胰岛素溶液, 孵育 0.5 h, 每组 3 个平行; 弃上清, 加入适量 2-NBDG, 37 °C 避光孵育 20 min, 采用荧光酶标仪检测各组细胞样品在 $Ex/Em = 485/535$ nm 的吸收值, 以反映细胞的葡萄糖摄取能力。

细胞葡萄糖输出测定 采用上述相同方法构建 IR 细胞模型; 其后改用无血清无糖 DMEM 培养基给予 LCA (0.5、10、20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 MET (10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理 18 h, 加入终浓度为 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 胰高血糖素和 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 丙酮酸钠溶液, 孵育 4 h, 每组 3 个平行; 取上清, 采用葡萄糖含量检测试剂盒检测各组培养基中的葡萄糖水平, 以反映细胞的葡萄糖输出能力。

细胞内质网应激模型构建 将 HepG2 细胞接种于 6 孔板 (密度: 3.5×10^5 个/孔), 采用含 10% FBS 的高糖 DMEM 培养, 当细胞融合率达到 80% 时, 改用含 2% FBS 的高糖 DMEM 孵育, 设置空白组、模型组、LCA 给药组 (5、10、20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 以及阳性药 4-PBA 组 (1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 孵育 24 h 后, 加入终浓度为 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ TM, 孵育 4 h, 诱导内质网应激^[18]。

转录水平检测 收集各组细胞样品, 提取样品总 RNA, 逆转录为 cDNA。以 β -actin 为内参基因, 进行 RT-qPCR 分析, 检测糖异生相关基因 *G6P*、*PC*、*PEPCK*、*PFKFB3*、*FBP* 和内质网应激相关基因 *GRP78*、*CHOP*、c-Jun 氨基末端激酶 1 (c-Jun N-terminal kinase 1, *JNK1*)、X-框结合蛋白 1 (X-box binding protein 1, *XBPI*)、活化转录因子 6 α (activating transcription factor 6 α , *ATF6 α*)、*PERK*、真核翻译起始因子 2 α (eukaryotic initiation factor 2 subunit α , *eIF2 α*)、肌醇依赖酶 1 α (inositol-requiring enzyme 1 α , *IRE1 α*) 的转录水平, 引物序列见表 2, 反应程序: 95 °C 1 min, 95 °C 20 s, 60 °C 1 min (40 个循环)。

ELISA 检测 采用 ELISA 试剂盒测定小鼠肝脏和 HepG2 细胞样品中 PFKFB3、GRP78 和 CHOP 的蛋白含量。

酶活检测 采用酶活性检测试剂盒检测小鼠肝脏和 HepG2 细胞样品中 PC、PEPCK、FBP 和 G6P 的活性。

蛋白质印迹法 (Western blot, WB) 检测 收集各组细胞样品, 提取细胞蛋白, BCA 法测定总蛋白浓度。各孔取 20 μg 蛋白上样, 通过 SDS-PAGE 凝胶电泳进行蛋白分离, 再将蛋白电转至 PVDF 膜。用 5% 脱脂奶粉/5% 牛血清白蛋白溶液封闭, 与相应一抗 4 °C 下孵育过夜; 次日, 将蛋白带与二抗孵育, 彻底洗涤后按 ECL 试剂盒说明进行曝光显影。以内参蛋白 β -actin 为

Table 2 The primers used for RT-qPCR analyses. *GRP78*: Glucose-regulated protein 78; *CHOP*: C/EBP homologous protein; *JNK1*: C-Jun N-terminal kinase 1; *XBPI*: X-box binding protein 1; *ATF6 α* : Activating transcription factor 6 α ; *PERK*: Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase; *eIF2 α* : Eukaryotic initiation factor 2 subunit α ; *IRE1 α* : Inositol-requiring enzyme 1 α ; *PEPCK*: Phosphoenolpyruvate carboxykinase; *PC*: Pyruvate carboxylase; *FBP*: Fructose-1,6-bisphosphatase; *PFKFB3*: 6-Phosphofructokinase-2/fructose-2,6-bisphosphatase 3; *G6P*: Glucose-6-phosphatase

Gene	Sequences (5'-3')
<i>GRP78</i>	F: GCACAGACGGGTCATTCCAC R: CAACGATGGAAGGATGCTGG
<i>CHOP</i>	F: TTGCCTTTCTCCTTCGGGAC R: CAGTCAGCCAAGCCAGAGAA
<i>JNK1</i>	F: ACACCACAGAAATCCCTAGAAG R: CACAGCATCTGATAGAGAAGGT
<i>XBPI</i>	F: ATGGATTCTGGCGGTATTGAC R: GAGAAAGGGAGGCTGGTAAGG
<i>ATF6α</i>	F: AGCAGACCCAAGACTCAAAC R: GCATAAGCGTTGGTACTGTCTGA
<i>PERK</i>	F: CTCGGGAAAAGGTAATGCG R: ATCCATCTTTCTTGCACCTTC
<i>eIF2α</i>	F: TAGCCTTGTCATTAAGGAAGGA R: TTTGGCTTCCATTCTTCTGCG
<i>IRE1α</i>	F: AGAGAAGCAGCAGACTTTGTC R: GTTTTGGTGTGCTACATGGTGA
<i>PEPCK</i>	F: AGTAGAGAGCAAGACGGTGAT R: TGCTGAATGGAAGCACATACAT
<i>PC</i>	F: GATGCAGGGGTCCGGTTTATT R: GAAGCCGTAGGTGTTGGAGA
<i>FBP</i>	F: CGCGCACCTCTATGGCATT R: TTCTTCTGACACGAGAACACAC
<i>PFKFB3</i>	F: ATTGCGGTTTTTCGATGCCAC R: GCCACAACCTGTAGGGTCTGT
<i>G6P</i>	F: GGATCTACCTTGCGGCTCACT R: TGTAGATGCCCGGATGTG
β -actin	F: GAGAAAATCTGGCACCACACC R: GATAGCACAGCCTGGATAGCAA

参照, 检测 GRP78 和 PERK 的蛋白水平以及 PERK 的磷酸化水平, 用 Image J 软件分析条带灰度。

分子对接 在 PubChem 数据库下载 LCA (PubChem CID: 5318998) 的 2D 结构, 使用 AVOGADR 1.2.0 对其进行 3D 建模, 并在 MMFF94 力场下进行能量最小化; 在 RCSB 数据库下载 PEPCK、G6P、GRP78 和 PERK 的 3D 结构; 采用 AutoDock Vina 1.1.2 软件进行分子对接, 通过分子与蛋白质之间的相互作用分析, 鉴定关键蛋白与 LCA 之间的结合能力。

分子动力学模拟 使用分子动力学软件 gromacs 2021.6 进行模拟, 利用 Multiwfn 计算复合物小分子的 RESP2 电荷, 在 GAFF 力场生成拓扑文件, 在 AMBER14SB_PARMBS1 力场生成相应参数化文件; 以复合物为中心, 添加 SPC/E 水模型分子, 生成立方体水盒子, 向复合物水盒子里添加相应离子保持模拟体

系的电中性;使用共轭梯度法进行能量最小化,使体系充分稳定;采用正则系综(NVT),Berendsen热浴法控制温度为298.15 K,模拟50 000步,步长2 fs;采用等温等压系综(NPT),Parrinello-Rahman控压,1个大气压,模拟50 000步,步长2 fs;进行mdrun,步长2 fs,模拟25 000 000步,进行总计50 ns的分子动力学模拟。

统计学分析 采用IBM SPSS statistic 26.0统计分析软件,进行单因素方差分析(ANOVA),以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示数据。组间比较 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结果

1 LCA提高HepG2细胞糖摄取水平并抑制其糖异生水平

不同浓度LCA对HepG2细胞活力的影响如图1A所示:80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 及以上浓度的LCA对HepG2细胞具有细胞毒性。结合文献^[19]报道,后续细胞实验设置

LCA梯度浓度为5、10、20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。SP工作浓度筛选结果如图1B所示:0.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 及以上浓度的SP对HepG2细胞具有细胞毒性。结合文献^[20,21]报道,最终选取0.25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 为SP造模剂量。

胰岛素刺激的细胞葡萄糖消耗检测结果如图1C所示:相较于正常细胞,IR模型组细胞培养基上清中葡萄糖水平显著升高,表明IR导致HepG2细胞的糖消耗减少。LCA和MET处理后正常组及IR模型组细胞培养基上清中葡萄糖水平均显著降低,表明LCA和MET可提高细胞的葡萄糖消耗能力。

胰岛素刺激的细胞葡萄糖摄取检测结果如图1D所示:相较于正常细胞,IR模型组细胞对2-NBDG的吸收值显著下降,表明IR导致HepG2细胞的糖摄取能力下降。LCA和MET处理后正常组及模型组细胞对2-NBDG的吸收值均显著升高,表明LCA和MET可提高细胞的葡萄糖摄取能力,改善其胰岛素敏感性。

细胞葡萄糖输出检测结果如图1E所示:相较于正

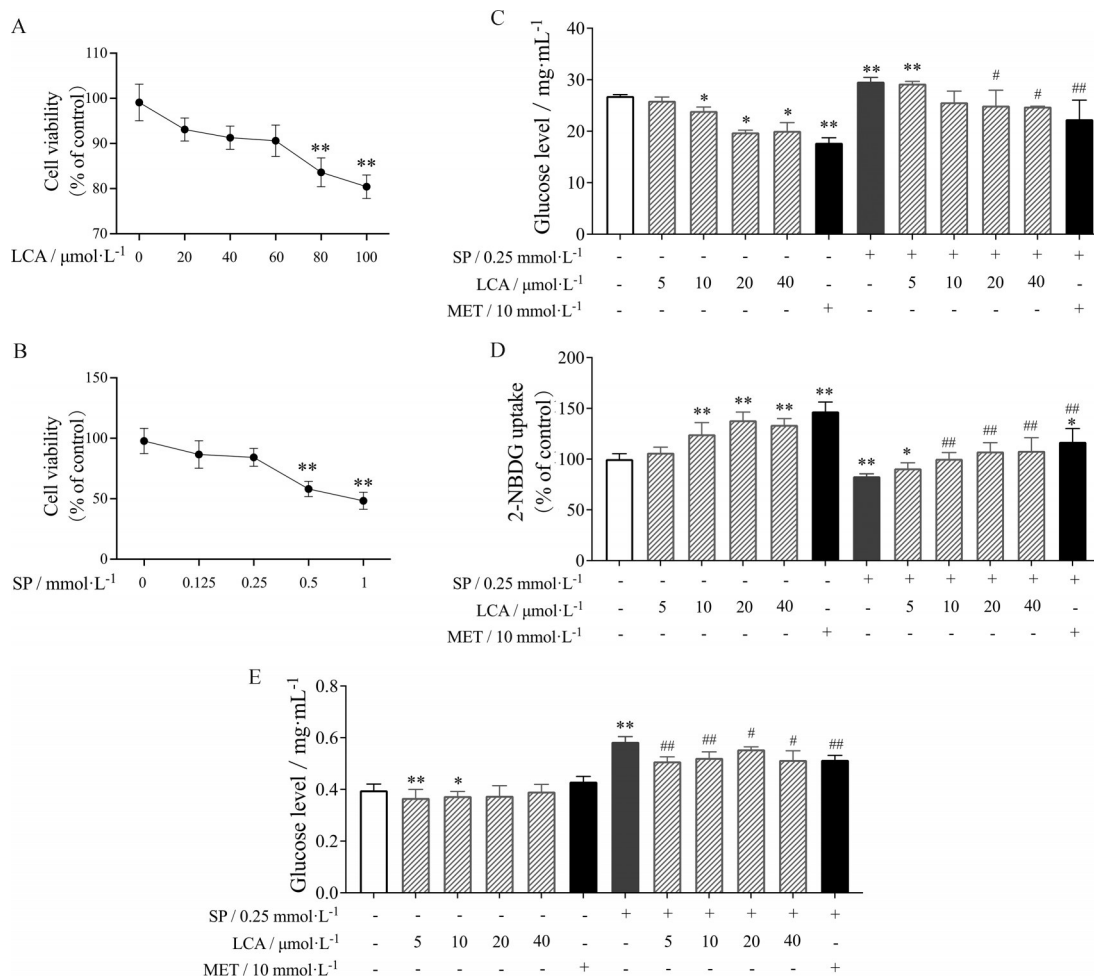


Figure 1 LCA stimulates insulin sensitivity and inhibits gluconeogenesis in HepG2 cells. A: Cell viability with LCA treatment; B: Cell viability with sodium palmitate (SP) treatment; C: Insulin-induced glucose consumption of normal and insulin resistance (IR) model HepG2 cells; D: Insulin-induced glucose uptake of normal and IR model HepG2 cells; E: Glucagon-induced glucose production of normal and IR model HepG2 cells. $n = 3-6$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs CTRL group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs model group

常细胞, IR 模型组细胞培养基上清中葡萄糖水平显著升高, 表明 IR 导致细胞的糖异生水平升高, 有更多葡萄糖释放入培养基。LCA 和 MET 处理后正常组及模型组细胞培养基上清中葡萄糖水平均显著降低, 表明 LCA 和 MET 可降低细胞的葡萄糖输出水平, 缓解糖异生。

2 LCA 可显著抑制 T2DM 小鼠肝脏和 HepG2 细胞糖异生

PEPCK 可催化草酰乙酸转变为磷酸烯醇式丙酮酸, G6P 可催化 6-磷酸葡萄糖水解为葡萄糖, 此两步反应为糖异生途径的关键限速步骤^[22,23]。本课题组前期研究发现, LCA 治疗可显著降低 T2DM 小鼠肝脏 PEPCK 和 G6P 的酶活^[7]。本文进一步开展了 PEPCK 和 G6P 的体外转录水平和酶活检测, 结果分别如图 2A、B 所示: 与空白对照组相比, LCA 处理显著下调 HepG2 细胞内 PEPCK 的转录水平, 并剂量依赖性抑制 PEPCK 酶活性; 同时, LCA 可显著抑制 HepG2 细胞内 G6P 的转录水平和酶活性; 阳性药 MET 也表现出对二者的抑制效果。此结果与前期体内研究相吻合。

PC 是一种生物素依赖性多功能酶, 位于丙酮酸代谢途径的分支点上, 可催化丙酮酸转化为草酰乙酸, 为糖异生途径的限速步骤^[24,25]。如图 2C 所示: 与空白组相比, 模型组小鼠肝脏 PC 的酶活显著升高, 而 LCA 和 MET 给药治疗均可显著降低 T2DM 小鼠肝脏中 PC 的活性。体外检测结果如图 2D 所示: 与空白组相比, 各浓度 LCA 对 HepG2 细胞内 PC 的转录水平均不产生影响, 但可显著抑制 PC 酶活; 而 MET 干预 HepG2 细胞后细胞内 PC 的转录水平及酶活性均无显著变化。此结果提示 LCA 可抑制 PC 活性, 但其调控并不通过转录来实现。

FBP 存在于细胞质中, 可将果糖-1,6-二磷酸转变成果糖-6-磷酸, 是糖异生途径的关键酶^[26]。PFKFB3 可促进 2,6-二磷酸果糖 (fructose 2,6 diphosphate, 2,6-FD) 的生成, 2,6-FD 为 FBP 的变构抑制剂^[27], 可抑制 FBP 的酶活性^[28]。本文首先检测了 PFKFB3 的转录和蛋白水平, 发现低、高剂量 LCA 治疗和阳性药 MET 治疗均可显著提高 T2DM 小鼠肝脏中 PFKFB3 的蛋白含量 (图 2E); 同时, 与空白组相比, LCA 可提高 HepG2 细胞中 PFKFB3 的转录和蛋白水平 (图 2F), 体内外结果相吻合。进一步检测了 FBP 的转录水平和酶活, 体内检测结果如图 2G 所示: 与空白组相比, 模型组小鼠肝脏 FBP 的酶活性显著升高, 而 LCA 低、高剂量组虽在一定程度上降低了小鼠肝脏中 FBP 的酶活性, 但无显著性差异; 体外检测结果如图 2H 所示: 不同浓度 LCA 可显著抑制 HepG2 细胞内 FBP 的转录水平, 但对其酶活不产生影响。综合上述 PFKFB3 和 FBP 的检测结

果, LCA 对 PFKFB3 转录及蛋白水平具有上调作用, 但未能引起 FBP 酶活的显著变化。

3 LCA 对 HepG2 细胞内质网应激的调控作用

GRP78 可促进蛋白质的折叠和组装, 控制蛋白质的质量, 并通过 Ca^{2+} 与 ER 结合来调节 ER 应激信号^[29]。与空白组相比, 模型组小鼠肝脏 GRP78 的蛋白含量显著升高, 而 LCA 和 MET 给药治疗均可显著降低 T2DM 小鼠肝脏中 GRP78 的蛋白水平 (图 3A); 体外转录水平检测结果显示: TM 处理细胞 4 h 后, 内质网应激模型组细胞中 GRP78 的转录水平显著上升, $5\sim 40\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LCA 预处理可显著抑制其转录; 体外 ELISA 蛋白水平检测结果显示: 内质网应激模型组细胞中 GRP78 的蛋白水平显著上升, $10\sim 40\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LCA 预处理可显著降低其蛋白水平 (图 3B); WB 检测结果 (图 3C) 与 ELISA 检测结果一致。

CHOP 在内质网应激诱导的细胞凋亡中发挥着重要的作用, 其上调会引发细胞凋亡^[30]。如图 3D 所示, 各组别小鼠肝脏中的 CHOP 含量无显著差异, 表明 LCA 和 MET 治疗对 CHOP 水平不产生显著影响; 体外检测结果如图 3E 所示: 内质网应激模型组细胞中 CHOP 的转录与蛋白水平显著升高, 各剂量组 LCA 和 MET 对 CHOP 的转录和蛋白水平均无显著影响。

PERK 是一种内质网应激传感器, 一旦被激活, 可对错误折叠蛋白质的积累做出反应^[31]; eIF2 α 可导致整体 mRNA 翻译减弱, 同时选择性增强转录因子 ATF4 的翻译^[32]; IRE1 α 是一个关键的内质网应激传感器和信号传感器^[33]; XBP1 可促进内质网相关蛋白降解和磷脂生物合成通路成分的转录^[34]; JNK1 是 ER 胞质信号传导介质^[35]; ATF6 α 可以在细胞核内与内质网应激响应元件 (ER stress response element, ERSE) 结合, 启动下游负责蛋白质折叠或降解的基因的转录^[36]。上述基因的转录水平检测结果如图 3F 所示: 与空白组相比, 内质网应激模型组细胞中的 PERK、eIF2 α 、IRE1 α 、XBP1、JNK1、ATF6 α 的转录水平均显著上升, LCA 可显著下调这些基因的转录水平。

本研究进一步对 PERK 的蛋白水平和磷酸化水平进行 WB 检测, 结果如图 3G 所示: 在内质网应激状态下, HepG2 细胞中 PERK 的蛋白水平显著上升, 而 LCA 给药后可显著降低其蛋白水平, 在 $20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时达到最大抑制效果; 同时, LCA 可剂量依赖性抑制 PERK 的磷酸化, 进而抑制其活性。

以上结果表明, LCA 可下调内质网应激关键基因的转录水平, 降低 GRP78 的蛋白水平, 抑制 PERK 的活性, 从而缓解细胞内质网应激压力, 恢复细胞内质网稳态。

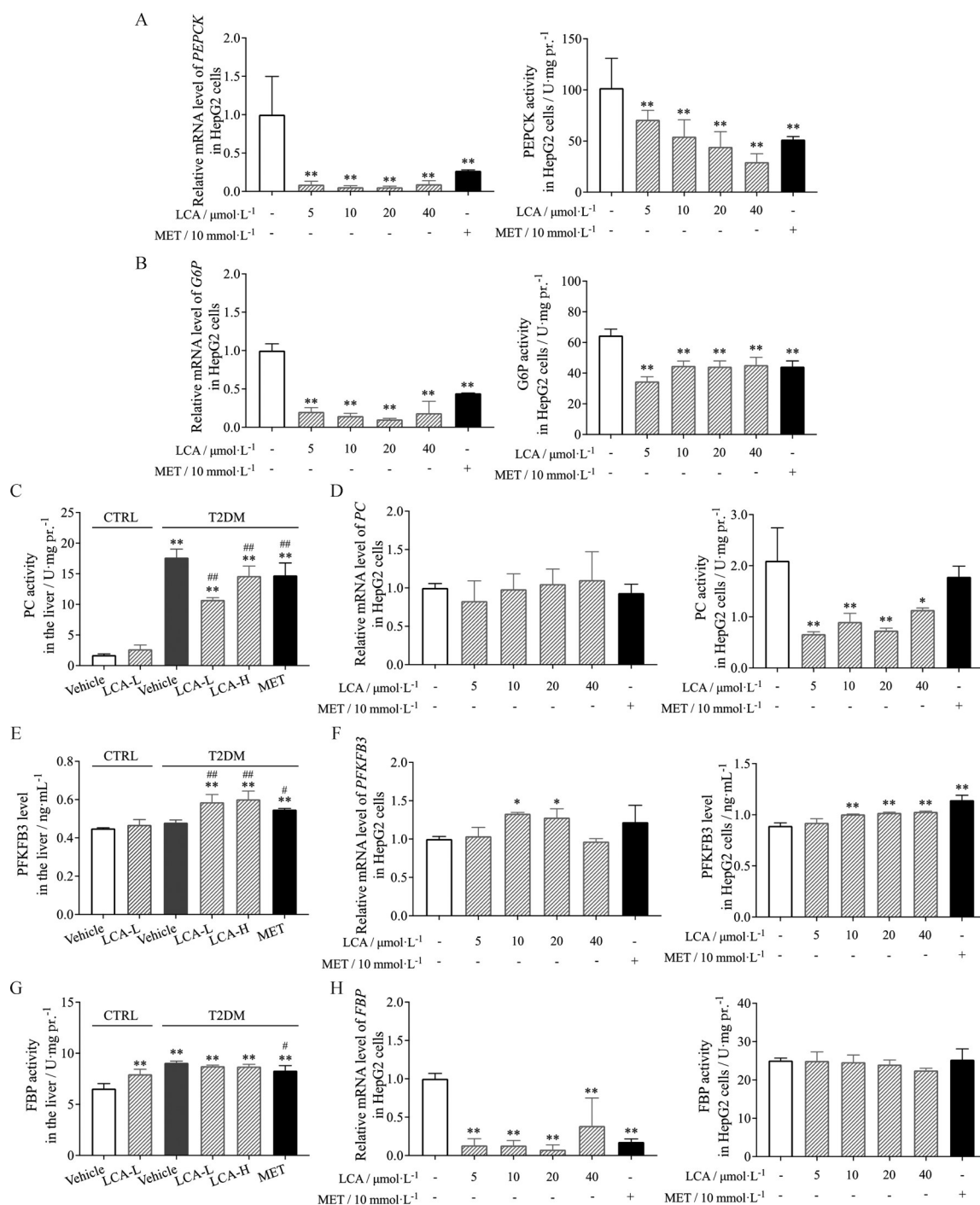


Figure 2 LCA inhibits gluconeogenesis in the livers of T2DM mice and cultured HepG2 cells. A: Relative mRNA levels and enzyme activities of PEPCK in HepG2 cells; B: Relative mRNA levels and enzyme activities of G6P in HepG2 cells; C: Enzyme activities of PC in mice livers; D: Relative mRNA levels and enzyme activities of PC in HepG2 cells; E: Protein levels of PFKFB3 in mice livers; F: Relative mRNA and protein levels of PFKFB3 in HepG2 cells; G: Enzyme activities of FBP in mice livers; H: Relative mRNA levels and enzyme activities of FBP in HepG2 cells. $n = 6$ (*in vivo*), $n = 3$ (*in vitro*), $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs CTRL group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs model group

4 LCA与糖异生关键调控靶点的分子对接及分子动力学模拟

根据上述糖异生相关靶点检测结果, 选择PEPCK和G6P 2个关键蛋白, 通过分子对接进一步验证LCA

与其相互作用。结果显示: LCA与PEPCK和G6P蛋白的结合亲和能分别为 -7.0 和 $-7.2\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, 均低于 $-5\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, 提示LCA与PEPCK和G6P蛋白均具备较为理想的结合效果。

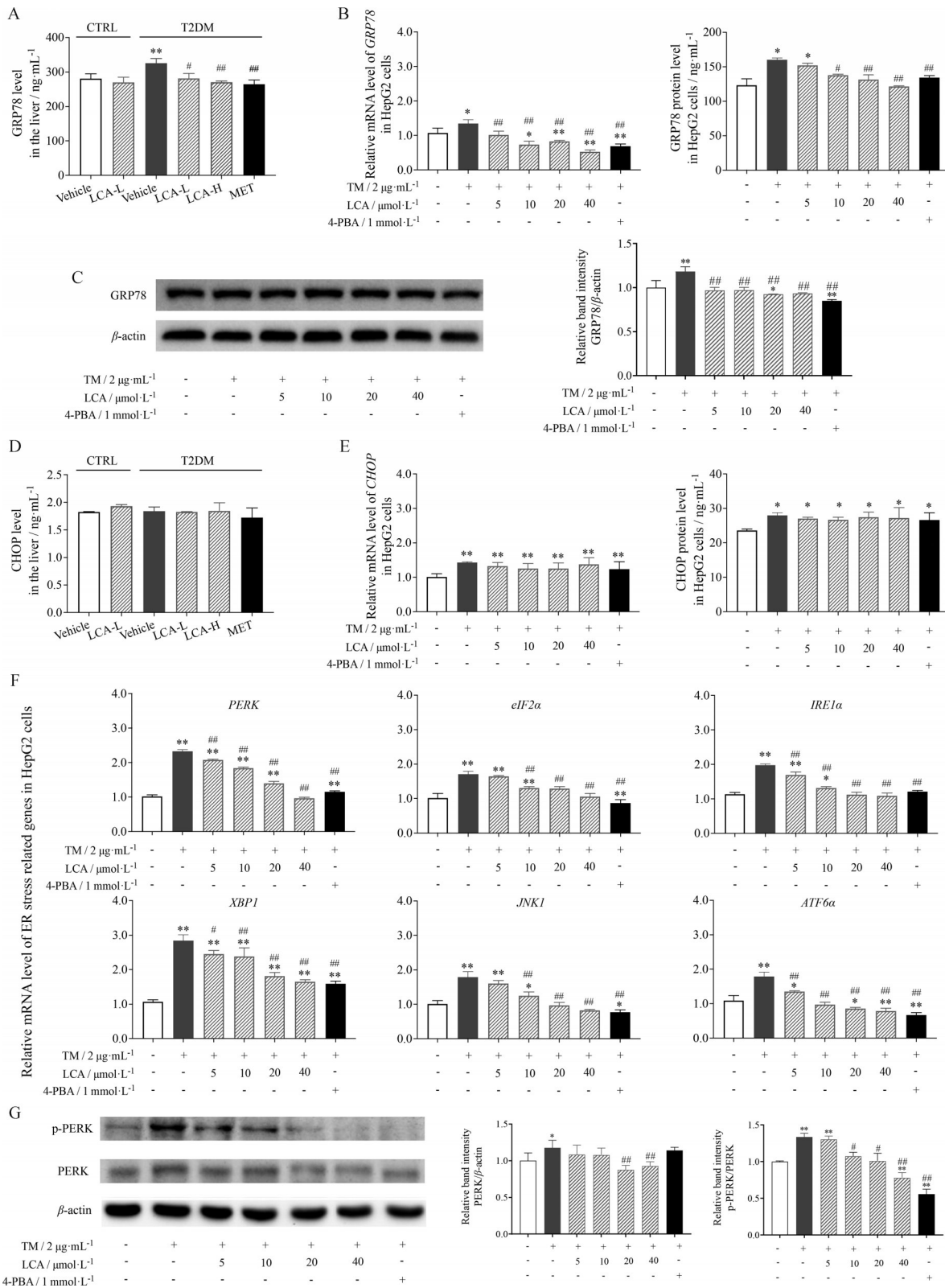


Figure 3 LCA inhibits endoplasmic reticulum (ER) stress in the livers of T2DM mice and cultured HepG2 cells. A: Protein levels of GRP78 in mice livers; B: Relative mRNA and protein levels of GRP78 in HepG2 cells; C: The protein expression of GRP78 in HepG2 cells analyzed by Western blot (WB); D: Protein levels of CHOP in mice livers; E: Relative mRNA and protein levels of CHOP in HepG2 cells; F: Relative mRNA levels of ER stress-related genes, including *PERK*, *eIF2α*, *IRE1α*, *XBP1*, *JNK1* and *ATF6α*; G: The protein expression and phosphorylation of PERK in HepG2 cells analyzed by WB. $n = 6$ (*in vivo*), $n = 3$ (*in vitro*), $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs CTRL group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs model group. TM: Tunicamycin; 4-PBA: 4-Phenyl butyrate acid

PEPCK-LCA复合物的蛋白小分子3D、2D相互作用结果分别如图4A、B所示,在复合物PEPCK-LCA中,LCA结合在PEPCK蛋白上由ALA506、LEU508、LYS507、ILE544、LYS510、PRO509、SER449、GLU446、ALA447、ILE511和TRP450围绕而成的口袋中,其中与ALA447、ILE511和TRP450形成氢键作用,与ALA506、LEU508、LYS507、ILE544、LYS510、

PRO509、SER449和GLU446形成疏水作用。LCA与PEPCK的分子动力学模拟如图4C所示:在PEPCK-LCA复合物中,PEPCK相对于LCA的位置在25 ns后趋于稳定,体系的RMSD值全程趋于稳定,PEPCK-LCA复合物模拟可达到平衡。PEPCK蛋白467~471号氨基酸区域柔性大,PEPCK-LCA复合物虽有波动,但总体不大。在模拟过程中,PEPCK-LCA在模拟的

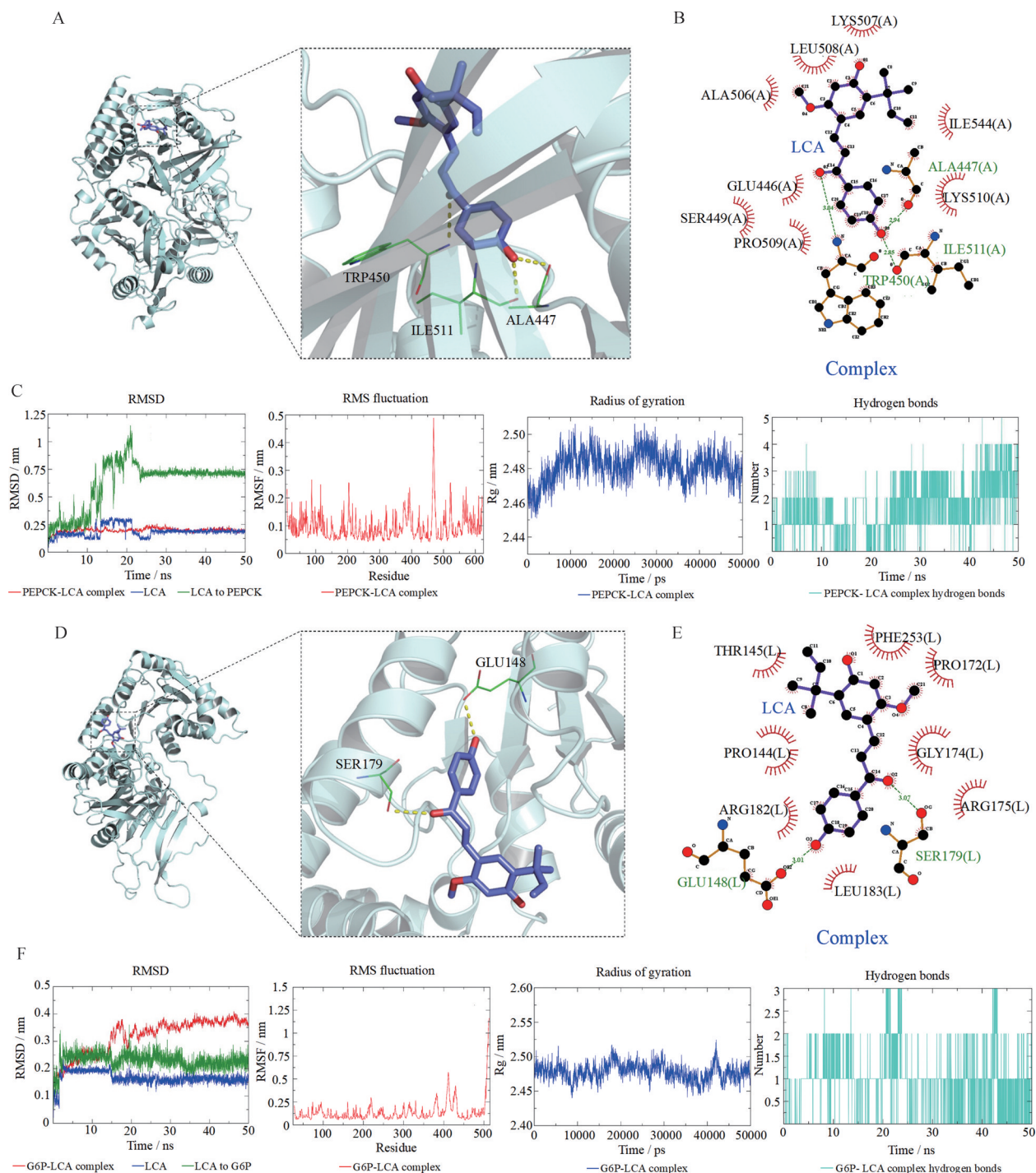


Figure 4 Molecular docking and dynamics simulation of LCA vs PEPCK and LCA vs G6P. A: 3D molecular docking of LCA-PEPCK; B: 2D molecular docking of LCA-PEPCK; C: Molecular dynamics results of LCA-PEPCK; D: 3D molecular docking of LCA-G6P; E: 2D molecular docking of LCA-G6P; F: Molecular dynamics results of LCA-G6P

大部分时间保留着2个以上的氢键。

G6P-LCA复合物的蛋白小分子3D、2D相互作用图分别如图4D、E所示,在复合物G6P-LCA中,小分子LCA结合在G6P蛋白上由THR145、PHE253、PRO172、GLY174、ARG175、LEU183、ARG182、PRO144、GLU148、SER179氨基酸围绕而成的口袋中,其中与GLU148、SER179形成氢键作用,与THR145、PHE253、PRO172、GLY174、ARG175、LEU183、ARG182、PRO144形成疏水作用。LCA与G6P的分子动力学模拟如图4F所示:在LCA-G6P复合物中,G6P相对于LCA的位置在5 ns后趋于稳定,且在模拟进行到30 ns后,体系RMSD值相对平稳,G6P-LCA复合物模拟可达到平衡。G6P蛋白在末端loop区506~513号氨基酸附近波动大、柔性高,G6P-LCA复合物虽有波动,但总体不大。G6P-LCA在模拟的大部分时间,保留着1个以上的氢键。

5 LCA与内质网应激关键调控靶点的分子对接及分子动力学模拟

根据上述内质网应激相关靶点检测结果,选择关键蛋白GRP78和PERK,通过分子对接进一步验证LCA与其相互作用,基于AutoDock Vina对接获得LCA-蛋白结合亲和力评估,LCA与GRP78和PERK蛋白的结合亲和能分别为-6.6和-8.4 kcal·mol⁻¹,提示LCA与GRP78和PERK均具备较为理想的结合效果。

GRP78-LCA复合物的蛋白小分子3D、2D相互作用图分别见图5A、B,在复合物GRP78-LCA中,小分子LCA结合在GRP78蛋白上由LEU474、ASN472、HIS473、GLU463、THR251、ARG101、PHE176、ASP471、TYR175、HIS252、GLN180、ASN177氨基酸围绕而成的口袋中,其中与ASP471、TYR175、HIS252、GLN180、ASN177形成氢键作用,与LEU474、ASN472、HIS473、GLU463、THR251、ARG101、PHE176形成疏水作用。LCA与GRP78的分子动力学模拟如图5C所示:在GRP78-LCA复合物中,复合物体系在20 ns后趋于稳定,观察LCA相对于蛋白GRP78的位置也可发现,二者结合状态在15 ns后趋于稳定,复合物模拟可达到平衡。GRP78蛋白两端区域24~25号、569~629号氨基酸附近柔性大。Rg考察主要选择平衡时状态进行,因此主要选择后10 ns进行分析,GRP78-LCA的Rg数值则在18 ns后趋于稳定,结构致密。模拟过程中,GRP78-LCA在模拟的大部分时间,保留着2个以上的氢键。

PERK-LCA复合物的蛋白小分子3D、2D相互作用图分别见图5D、E,在复合物PERK-LCA中,小分子LCA结合在PERK蛋白上由PHE956、ALA620、

ILE651、LEU646、LEU643、VAL652、ILE886、ASP955、LYS622、MET888、GLU639氨基酸围绕而成的口袋中,其中与GLU639形成氢键作用,与PHE956、ALA620、ILE651、LEU646、LEU643、VAL652、ILE886、ASP955、LYS622、MET888形成疏水作用。LCA与PERK的分子动力学模拟如图5F所示:在PERK-LCA复合物中,复合物体系在30 ns后趋于稳定,观察LCA相对于蛋白PERK的位置也可发现,二者结合状态在20 ns后趋于稳定,复合物模拟可达到平衡。PERK蛋白585~600号、628~645号、956~960号、1 078~1 087号氨基酸附近柔性大。主要选择后10 ns进行Rg分析,可看出PERK-LCA复合物虽有动态波动,但变动范围小,趋于稳定,结构致密。模拟过程中,PERK-LCA在模拟的大部分时间,保留着2个以上的氢键。

讨论

IR是T2DM的主要特征之一,在此条件下机体胰岛素敏感性降低,引起T2DM患者糖异生水平显著升高^[37,38]。糖异生途径是非糖类化合物(如乳酸、甘油、生糖氨基酸等)转化为葡萄糖的过程,受多个关键酶调控,包括PC、PEPCK、FBP和G6P等。糖异生是内源性葡萄糖的主要来源,而过度糖异生是T2DM患者空腹异常血糖升高的主要原因^[39]。临床上可通过抑制T2DM患者的肝脏糖异生来达到降血糖的效果^[40],如一线抗糖尿病药物MET可下调G6P和PEPCK的转录水平,抑制糖异生,从而缓解T2DM引起的糖代谢紊乱^[41]。此外,在高脂饮食诱导的T2DM大鼠中,梓醇和小檗碱可以抑制肝脏PEPCK和G6P的表达,减少葡萄糖生成,从而降低T2DM大鼠的血糖水平^[42,43];在高脂饮食诱导的T2DM小鼠中,靶向抑制PC的表达可减轻小鼠的肥胖症状并提高其胰岛素敏感性^[44]。同时,大量研究表明PFKFB3可以通过催化FBP的变构抑制剂2,6-FD的生成来抑制FBP的活性^[26,45],而抑制FBP的活性则可改善高脂饮食诱导的肥胖小鼠的全身性胰岛素抵抗^[46,47]。以上研究证实了PC、PEPCK、G6P、FBP和PFKFB3等关键酶在缓解T2DM导致的异常糖异生及胰岛素抵抗中的重要作用。因此,本文在前期研究的基础上,进一步分析了LCA对以上关键酶的调控作用,结果显示:LCA可下调PEPCK和G6P的转录水平,并抑制其酶活性,同时对PC的酶活也表现出显著的抑制效果。此外,LCA还可提高PFKFB3的转录和蛋白水平,从而间接抑制糖异生。综上,LCA可通过抑制糖异生来改善T2DM引起的糖代谢紊乱。

T2DM的发病机制与内质网应激密切相关,在代谢紊乱的条件下,内质网的折叠能力不足以应对未折

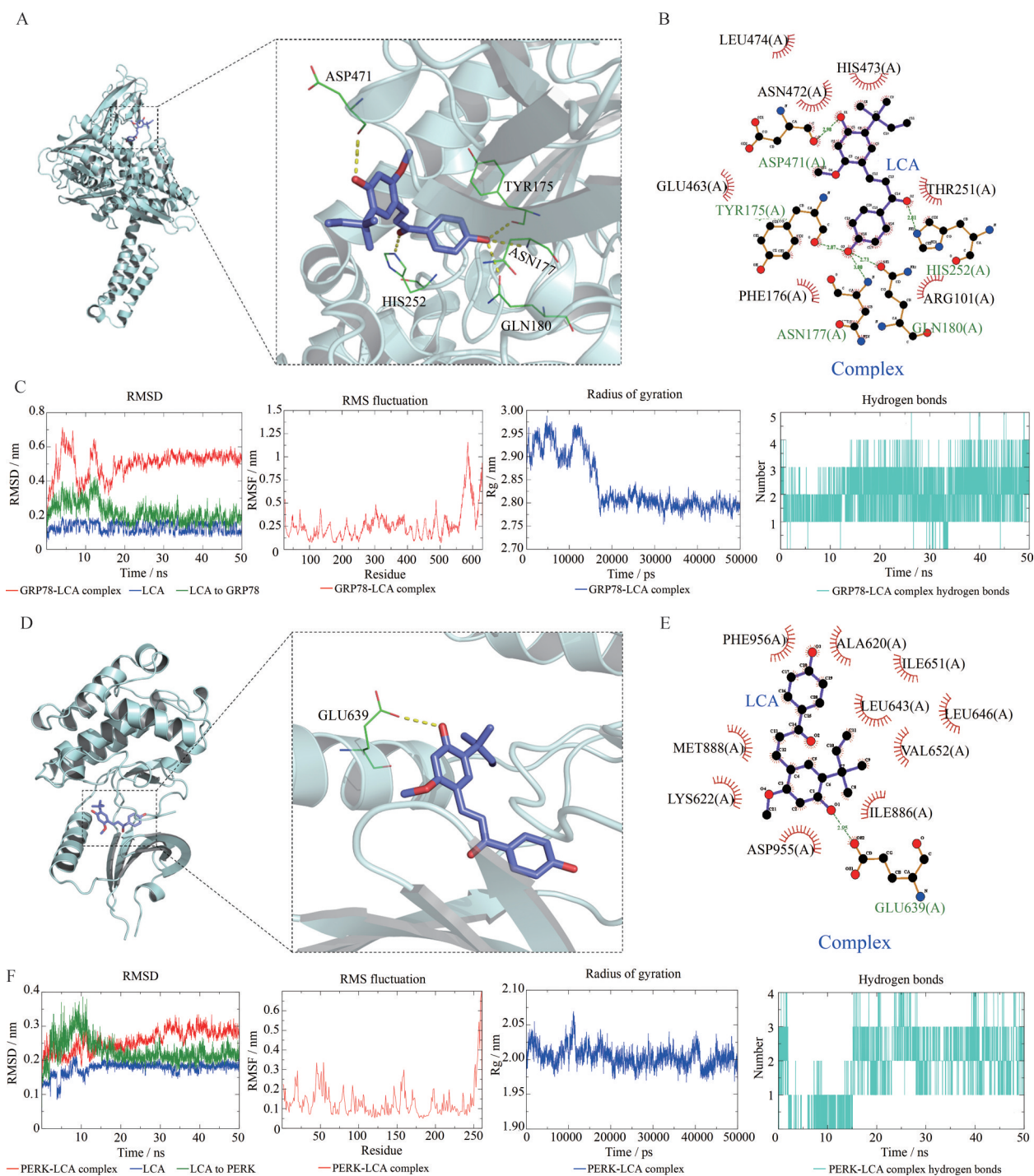


Figure 5 Molecular docking and dynamics simulation of LCA vs GRP78 and LCA vs PERK. A: 3D molecular docking of LCA-GRP78; B: 2D molecular docking of LCA-GRP78; C: Molecular dynamics results of LCA-GRP78; D: 3D molecular docking of LCA-PERK; E: 2D molecular docking of LCA-PERK; F: Molecular dynamics results of LCA-PERK

叠和错误折叠蛋白产生的高负荷, 为确保正确的蛋白质折叠而激活UPR反应, 导致内质网应激^[48]。同时, 由于胰岛素的天然结构是在内质网形成的, 长期的内质网应激会导致胰岛β细胞损伤, 进而引起胰岛素抵抗, 因此维持内质网内稳态也是维持胰岛β细胞正常代谢功能的必要条件^[49-51]。发生内质网应激时, IRE1、

PERK和ATF6通路被激活^[52], 在T2DM患者中可观察到GRP78、CHOP、PERK、XBP1、IRE1α和ATF6的转录与蛋白水平显著高于对照组健康受试者^[53]。前人研究发现, 连续4周灌胃石榴花多酚提取物(50和100 mg·kg⁻¹)可以下调PERK、ATF6、IRE1α、XBP1和CHOP的转录水平, 抑制IRE1α-XBP1通路, 缓解内质网应激, 改善

胰岛素抵抗,从而降低高脂饮食和STZ联合诱导的T2DM大鼠空腹血糖和血脂水平^[54]。因此,本文也针对以上内质网应激相关通路,进一步分析了LCA对T2DM引起的内质网应激的调控作用,研究发现:LCA可下调PERK、eIF2 α 、IRE1 α 、XBPI、JNK1、ATF6 α 、GRP78的转录水平,降低内质网应激标志蛋白GRP78的转录及蛋白水平,抑制PERK的蛋白表达和磷酸化,从而缓解内质网应激压力,恢复内质网稳态。

课题组前期研究已观察到LCA可显著降低高糖高脂饮食诱导的T2DM小鼠的空腹血糖水平,促进其肝糖原合成,缓解肝脏脂肪变性,并恢复线粒体稳态^[7],本文是前期工作的延续,评价了LCA对T2DM引起的异常糖异生和内质网应激的缓解效果,进一步完善了LCA改善代谢的分子机制,为LCA治疗T2DM的应用奠定了理论基础。

作者贡献: 许文锴和张佳瑜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;汪逗逗、丁文文和陈姿伊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。

利益冲突: 本文作者均没有利益冲突。

References

- 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.
- Bao H, Liu YM, Zhang MG, et al. Increased β -site APP cleaving enzyme 1-mediated insulin receptor cleavage in type 2 diabetes mellitus with cognitive impairment [J]. *Alzheimers Dement*, 2021, 17: 1097-1108.
- Li LM, Rao KQ, Kong LZ, et al. A description on the Chinese national nutrition and healthy survey in 2002 [J]. *Chin J Epidemiol* (中华流行病学杂志), 2005, 26: 478-484.
- Chinese Diabetes Society, National Office of Basic Public Health Service Program for Primary Diabetes Care. National technical guidelines for the prevention and treatment of diabetic kidney disease in primary care (2023) [J]. *Chin J Intern Med* (中华内科杂志), 2023, 62: 1394-1405.
- Wang LQ, Yang R, Yuan BC, et al. The antiviral and antimicrobial activities of licorice, a widely-used Chinese herb [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2015, 5: 310-315.
- 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.
- Wang DD, Yang L, Ding WW, et al. Licochalcone A alleviates abnormal glucolipid metabolism and restores energy homeostasis in diet-induced diabetic mice [J]. *Phytother Res*, 2024, 38: 196-213.
- 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 mellitus [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2024, 59: 105-118.
- 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.
- Legouis D, Faivre A, Cippà PE, et al. Renal gluconeogenesis: an underestimated role of the kidney in systemic glucose metabolism [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2022, 37: 1417-1425.
- Liu Y, Deng JJ, Fan D. Ginsenoside Rk3 ameliorates high-fat-diet/streptozocin induced type 2 diabetes mellitus in mice via the AMPK/Akt signaling pathway [J]. *Food Funct*, 2019, 10: 2538-2551.
- Madiraju AK, Qiu Y, Perry RJ, et al. Metformin inhibits gluconeogenesis via a redox-dependent mechanism *in vivo* [J]. *Nat Med*, 2018, 24: 1384-1394.
- Marchi S, Patergnani S, Missiroli S, et al. Mitochondrial and endoplasmic reticulum calcium homeostasis and cell death [J]. *Cell Calcium*, 2018, 69: 62-72.
- Liu M, Weiss MA, Arunagiri A, et al. Biosynthesis, structure, and folding of the insulin precursor protein [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2018, 20 Suppl 2: 28-50.
- Yoo J, Park JE, Han JS. HMC ameliorates hyperglycemia via acting PI3K/AKT pathway and improving FOXO1 pathway in *ob/ob* mice [J]. *Nutrients*, 2023, 15: 2023.
- Feng WJ, Lv CH, Cheng L, et al. Targeting ERS-mitophagy in hippocampal neurons to explore the improvement of memory by tea polyphenols in aged type 2 diabetic rats [J]. *Free Radic Biol Med*, 2024, 213: 293-308.
- Yi HH, Gu CJ, Li M, et al. PERK/eIF2 α contributes to changes of insulin signaling in HepG2 cell induced by intermittent hypoxia [J]. *Life Sci*, 2017, 181: 17-22.
- Wu ZM, Wang HE, Fang SY, et al. Roles of endoplasmic reticulum stress and autophagy on H₂O₂-induced oxidative stress injury in HepG2 cells [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18: 4163-4174.
- Si HF, Xu CY, Zhang JL, et al. Licochalcone A: an effective and low-toxicity compound against *Toxoplasma gondii* *in vitro* and *in vivo* [J]. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, 2018, 8: 238-245.
- Zhang Y, Yan LS, Ding Y, et al. *Edgeworthia gardneri* (Wall.) Meisn. water extract ameliorates palmitate induced insulin resistance by regulating IRS1/GSK3 β /FoxO1 signaling pathway in human HepG2 hepatocytes [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 10: 1666.
- Zang YF, Fan L, Chen JH, et al. Improvement of lipid and glucose metabolism by capsate in palmitic acid-treated HepG2 cells via activation of the AMPK/SIRT1 signaling pathway [J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66: 6772-6781.
- Onken B, Kalinava N, Driscoll M. Gluconeogenesis and PEPCK are critical components of healthy aging and dietary restriction life extension [J]. *PLoS Genet*, 2020, 16: e1008982.

- [23] Chen Y, Cheng FB, Wu XR, et al. Flavonoid derivatives synthesis and anti-diabetic activities [J]. *Bioorg Chem*, 2020, 95: 103501.
- [24] Kerr AG, Wang ZN, Wang N, et al. The long noncoding RNA ADIPINT regulates human adipocyte metabolism *via* pyruvate carboxylase [J]. *Nat Commun*, 2022, 13: 2958.
- [25] Cappel DA, Deja S, Duarte JAG, et al. Pyruvate-carboxylase-mediated anaplerosis promotes antioxidant capacity by sustaining TCA cycle and redox metabolism in liver [J]. *Cell Metab*, 2019, 29: 1291-1305.e8.
- [26] Huidekoper HH, Visser G, Ackermans MT, et al. A potential role for muscle in glucose homeostasis: *in vivo* kinetic studies in glycogen storage disease type 1a and fructose-1,6-bisphosphatase deficiency [J]. *J Inher Metab Dis*, 2010, 33: 25-31.
- [27] Jones BC, Pohlmann PR, Clarke R, et al. Treatment against glucose-dependent cancers through metabolic PFKFB3 targeting of glycolytic flux [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2022, 41: 447-458.
- [28] Droppelmann CA, Sáez DE, Asenjo JL, et al. A new level of regulation in gluconeogenesis: metabolic state modulates the intracellular localization of aldolase B and its interaction with liver fructose-1, 6-bisphosphatase [J]. *Biochem J*, 2015, 472: 225-237.
- [29] Xia SK, Duan WZ, Liu WW, et al. GRP78 in lung cancer [J]. *J Transl Med*, 2021, 19: 118.
- [30] Lei Y, Wang SL, Ren BS, et al. CHOP favors endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells *via* inhibition of autophagy [J]. *PLoS One*, 2017, 12: e0183680.
- [31] Almeida LM, Pinho BR, Duchon MR, et al. The PERKs of mitochondria protection during stress: insights for PERK modulation in neurodegenerative and metabolic diseases [J]. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 2022, 97: 1737-1748.
- [32] Malhi H, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress in liver disease [J]. *J Hepatol*, 2011, 54: 795-809.
- [33] Chen Y, Wu ZY, Huang SJ, et al. Adipocyte IRE1alpha promotes PGC1alpha mRNA decay and restrains adaptive thermogenesis [J]. *Nat Metab*, 2022, 4: 1166-1184.
- [34] Lin JH, Li H, Yasumura D, et al. IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response [J]. *Science*, 2007, 318: 944-949.
- [35] Lumley EC, Osborn AR, Scott JE, et al. Moderate endoplasmic reticulum stress activates a PERK and p38-dependent apoptosis [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2017, 22: 43-54.
- [36] Cheng YH, Zhou JP, Zhang HB, et al. Activating transcription factor 6: a new potential target against type 2 diabetes [J]. *Prog Pharm Sci (药理学进展)*, 2014, 38: 349-354.
- [37] Sharma R, Tiwari S. Renal gluconeogenesis in insulin resistance: a culprit for hyperglycemia in diabetes [J]. *World J Diabetes*, 2021, 12: 556-568.
- [38] Petersen MC, Vatner DF, Shulman GI. Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2017, 13: 572-587.
- [39] Guo X, Jiang X, Chen K, et al. The role of palmitoleic acid in regulating hepatic gluconeogenesis through SIRT3 in obese mice [J]. *Nutrients*, 2022, 14: 1482.
- [40] Madiraju AK, Erion DM, Rahimi Y, et al. Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase [J]. *Nature*, 2014, 510: 542-546.
- [41] LaMoia TE, Shulman GI. Cellular and molecular mechanisms of metformin action [J]. *Endocr Rev*, 2021, 42: 77-96.
- [42] Bhattamisra SK, Koh HM, Lim SY, et al. Molecular and biochemical pathways of catalpol in alleviating diabetes mellitus and its complications [J]. *Biomolecules*, 2021, 11: 323-349.
- [43] Ilyas Z, Perna S, Al-Thawadi S, et al. The effect of berberine on weight loss in order to prevent obesity: a systematic review [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 127: 110137.
- [44] Lao-On U, Attwood PV, Jitrapakdee S. Roles of pyruvate carboxylase in human diseases: from diabetes to cancers and infection [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2018, 96: 237-247.
- [45] Novellademunt L, Bultot L, Manzano A, et al. PFKFB3 activation in cancer cells by the p38/MK2 pathway in response to stress stimuli [J]. *Biochem J*, 2013, 452: 531-543.
- [46] Li P, Li K, Yuan WH, et al. $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ameliorates insulin resistance by alleviating gammadelta T cell inflammation *via* enhancing fructose-1, 6-bisphosphatase 1 expression [J]. *Theranostics*, 2023, 13: 5290-5304.
- [47] Zhang CS, Li MQ, Wang Y, et al. The aldolase inhibitor aldometanib mimics glucose starvation to activate lysosomal AMPK [J]. *Nat Metab*, 2022, 4: 1369-1401.
- [48] Salvado L, Palomer X, Barroso E, et al. Targeting endoplasmic reticulum stress in insulin resistance [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2015, 26: 438-448.
- [49] Li J, Inoue R, Togashi Y, et al. Imeglimin ameliorates beta-cell apoptosis by modulating the endoplasmic reticulum homeostasis pathway [J]. *Diabetes*, 2022, 71: 424-439.
- [50] Xourafa G, Korbmacher M, Roden M. Inter-organ crosstalk during development and progression of type 2 diabetes mellitus [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2024, 20: 27-49.
- [51] 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.
- [52] Ji C, Kaplowitz N. ER stress: can the liver cope? [J]. *J Hepatol*, 2006, 45: 321-333.
- [53] 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.
- [54] Tang D, Liu L, Ajiakber D, et al. Anti-diabetic effect of punica granatum flower polyphenols extract in type 2 diabetic rats: activation of Akt/GSK-3beta and inhibition of IRE1alpha-XBP1 pathways [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2018, 9: 586.