

• 药理与临床 •

光甘草定通过调节 ERK/IRS-1 和 PI3K/Akt 信号通路改善 HepG2 细胞的胰岛素抵抗

李德锋, 樊金玲*, 杜琳, 任国艳

河南科技大学食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471023

摘要: **目的** 探索光甘草定改善肝细胞胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 的作用和机制。**方法** 通过高胰岛素诱导人肝癌 HepG2 细胞建立 IR 模型, 采用葡萄糖氧化酶法检测细胞的葡萄糖消耗量及生成; 荧光标记法检测葡萄糖摄取量; 蒽酮法检测糖原含量; ELISA 检测葡萄糖代谢关键酶的活性; Western blotting 检测磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B, PI3K/Akt)、细胞外调节蛋白激酶/胰岛素受体底物-1 (extracellular regulated protein kinase/insulin receptor substrate-1, ERK/IRS-1) 信号通路相关蛋白以及葡萄糖转运蛋白 4 (glucose transporter 4, GLUT4) 的表达。采用分子对接技术研究光甘草定和 ERK 分子间的相互作用。**结果** 光甘草定显著增加 IR-HepG2 细胞的葡萄糖消耗和摄取 ($P < 0.05$); 通过显著提高糖原合成酶 (glycogen synthase, GS)、葡萄糖激酶 (glucokinase, GCK) 和丙酮酸激酶 (pyruvate kinase, PK) 活性 ($P < 0.05$ 、 0.01), 促进 IR-HepG2 细胞的糖原合成和糖酵解; 通过显著减弱磷酸烯醇丙酮酸羧激酶 (phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK) 和葡萄糖-6-磷酸酶 (glucose-6-phosphatase, G6Pase) 的活性 ($P < 0.05$), 抑制 IR-HepG2 细胞的糖异生。IR-HepG2 细胞经光甘草定处理后, Akt、糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β) 和叉头框蛋白 O1 (forkhead boxing protein O1, FOXO1) 的磷酸化水平得到显著恢复 ($P < 0.01$), 而这种作用被 PI3K 的抑制剂 LY294002 所逆转 ($P < 0.01$)。同时, 光甘草定显著促进 GLUT4 向质膜的易位 ($P < 0.01$)。光甘草定显著降低 IR-HepG2 细胞的 ERK 和 IRS 的磷酸化水平 ($P < 0.01$), 还可作为 ERK 的 I^{1/2} 型抑制剂。**结论** 光甘草定通过抑制 ERK/IRS-1 通路, 激活 PI3K/Akt 信号通路, 修复 IR-HepG2 细胞的糖代谢紊乱, 缓解 IR 症状。

关键词: 胰岛素抵抗; ERK/IRS-1; PI3K/Akt; 光甘草定; HepG2 细胞; 糖代谢; 葡萄糖摄取

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)24-7751-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.24.013

Glabridin ameliorates insulin resistance by regulating ERK/IRS-1 and PI3K/Akt signaling pathways in HepG2 cells

LI De-feng, FAN Jin-ling, DU Lin, REN Guo-yan

College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, China

Abstract: Objective To explore the effect and mechanism of glabridin on ameliorating insulin resistance (IR) in hepatocytes. **Methods** IR model was established by high insulin-induced HepG2 cells. The cells were evaluated for glucose consumption and production by glucose oxidase assay; The glucose consumption and production of cells were detected by glucose oxidase method; Glucose uptake was detected by fluorescence method; The content of glycogen was detected by anthrone method; The activities of key enzymes in glucose metabolism was detected by ELISA; Western blotting was used to detect phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt), extracellular regulated protein kinase/insulin receptor substrate-1 (ERK/IRS-1) signaling pathway related protein and glucose transporter 4 (GLUT4) expressions. Molecular docking technique was used to study the interaction between glabridin and ERK molecules. **Results** Glabridin significantly increased the glucose consumption and uptake of IR-HepG2 cells ($P < 0.05$); Glycogen synthesis and glycolysis of IR-HepG2 cells were promoted by significantly increasing the activities of glycogen synthase

收稿日期: 2022-10-08

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31571800)

作者简介: 李德锋 (1997—), 男, 硕士研究生, 研究方向为天然产物组分与功能食品。E-mail: 1659628204@qq.com

*通信作者: 樊金玲 (1973—), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向为天然产物组分与功能食品。E-mail: fanjinling@haust.edu.cn

(GS), glucokinase (GCK) and pyruvate kinase (PK) ($P < 0.05, 0.01$); The activities of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) and glucose-6-phosphatase (G6Pase) were significantly decreased ($P < 0.05$), and gluconeogenesis of IR-HepG2 cells was inhibited. After IR-HepG2 cells were treated with glabridin, phosphorylation levels of Akt, glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) and forkhead boxing protein O1 (FOXO1) were significantly restored ($P < 0.01$), and this effect was reversed by PI3K inhibitor LY294002 ($P < 0.01$). Meanwhile, glabridin significantly promoted the translocation of GLUT4 to plasma membrane ($P < 0.01$). Glabridin significantly reduced the phosphorylation levels of ERK and IRS in IR-HepG2 cells ($P < 0.01$), and could be used as I^{1/2} inhibitor of ERK.

Conclusion Glabridin can repair the sugar metabolism disorder of IR-HepG2 cells and relieve IR symptoms by inhibiting ERK/IRS-1 pathway and activating PI3K/Akt signaling pathway.

Key words: insulin resistance; ERK/IRS-1; PI3K/Akt; glabridin; HepG2 cells; glucose metabolism; glucose uptake

2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 是一种慢性疾病, 以糖脂代谢紊乱为特征^[1]。胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 是导致 T2DM 的主要诱因。IR 发生时, 肝脏相对其他靶器官更早呈现 IR 症状^[2], 是受 IR 影响最严重的组织之一, 表现为胰岛素信号转导受损 [主要是磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B (phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B, PI3K/Akt) 通路异常, PI3K/Akt 途径是介导胰岛素刺激细胞摄取利用葡萄糖的主要途径^[3]], 一方面导致肝脏的葡萄糖摄取减少, 另一方面导致糖酵解和糖原合成能力减弱、肝糖原的分解和糖异生加强, 使得肝糖原输出增加; 最终造成肝脏调节血糖的能力减弱, 血糖代谢出现紊乱。

光甘草定是光果甘草 *Glycyrrhiza glabra* L. 中特有的疏水性异黄酮, 具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤、抗动脉粥样硬化、神经保护等多种生物活性^[4]。研究发现, 光甘草定对动物模型表现出显著的降血糖和抗糖尿病活性^[5-6], 能够促进正常大鼠 L6 骨骼肌细胞对葡萄糖的摄取, 预防骨骼肌细胞的葡萄糖不耐受^[7]。研究者先后采用 MC3T3-E1 成骨细胞^[8]、J774A.1 小鼠巨噬细胞^[9]、THP-1 人类白血病单核细胞^[10]、3T3-L1 前脂肪细胞^[11]等探索了光甘草定抗糖尿病的作用机制, 目前还未发现关于光甘草定对肝细胞糖代谢的影响及机制的报道。

细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinase, ERK) 是丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 家族最主要的成员, 主要调节细胞凋亡、增殖和分化^[12]。研究表明 ERK 信号通路与胰岛素信号级联和 T2DM 的发展密切相关^[13-14]。过度激活的 ERK 可以诱导胰岛素受体底物-1 (insulin receptor substrate-1, IRS-1) 在 Ser307/612/632/636 处发生丝氨酸磷酸化^[15-16], 抑制其酪氨酸磷酸化, 降低 IRS-1 的活性, 阻断胰岛素信号的转导, 引起 IR 的发生^[17]。ERK 信号通

路是胰岛素信号转导的途径之一。正常生理条件下, 胰岛素刺激可激活 PI3K/Akt 通路和 ERK 通路^[18], 前者调节葡萄糖代谢, 包括葡萄糖摄取和糖生成^[19]; 后者主要调节细胞的增殖和分化^[20], 同时对胰岛素激活 PI3K/Akt 途径起到负反馈调节的作用。ERK 途径还受胰岛素以外的信号激活, 如生长因子、细胞因子、病毒、G-蛋白偶联受体配体、致癌物等^[21], 这些刺激物在病理条件下会使 ERK 过度激活, 从而损害胰岛素信号的转导。因此, PI3K/Akt 和 ERK 这 2 种信号途径的平衡被认为是胰岛素敏感性的关键调控器^[14,21]。本课题组前期采用网络药理学研究了光甘草定改善 T2DM 潜在的作用机制, 通过对“疾病-靶点-通路”网络的拓扑分析筛选出 ERK2 是光甘草定潜在的作用靶点之一。

本研究通过高胰岛素诱导人肝癌 HepG2 细胞建立 IR 模型, 通过测定光甘草定对 HepG2 细胞胰岛素抵抗 (IR-HepG2) 模型葡萄糖消耗和摄取、糖酵解、糖原合成、糖异生以及糖代谢途径中关键酶的活性, 探讨光甘草定对肝细胞葡萄糖代谢紊乱的修复作用; 通过测定光甘草定对 ERK/IRS-1 和 PI3K/Akt 通路的关键信号节点和下游底物蛋白的表达及磷酸化水平, 探讨光甘草定修复肝细胞葡萄糖代谢紊乱的调控途径; 并采用分子对接技术研究光甘草定与 ERK 的分子间相互作用, 旨在从分子水平揭示 ERK 作为光甘草定作用靶点的可能性。为进一步推动光甘草定作为功能性降糖活性成分在功能食品、膳食补充剂和药品中的应用提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞

HepG2 细胞由陕西师范大学赠送。

1.2 药品与试剂

光甘草定 (质量分数为 90%, 批号 GF2020071501) 购自洛阳蓝斯利科技有限公司; DMEM 高糖培养基 (25 mmol/L, 批号

AG29714104)、DMEM 低糖培养基 (5.5 mmol/L, 批号 AG29694193) 购自美国 Hyclone 公司; DMEM 无糖培养基 (批号 PM150270) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司; 南美胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS, 批号 CCS30009) 购自上海迪奥生物有限公司; MTT (批号 298-93-1) 购自上海蓝季生物公司; 胰岛素 (批号 11061-68-0) 购自美国 Sigma 公司; 盐酸二甲双胍 (批号 1115-7-4) 购自上海施贵宝制药有限公司; 荧光 *D*-葡萄糖类似物 2-NBDG (批号 M6327) 购自美国 Abmole 公司; 葡萄糖检测试剂盒 (批号 A154-1-1)、磷酸烯醇丙酮酸羧激酶 (phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCCK) 测定试剂盒 (批号 A131-1-1)、丙酮酸激酶 (pyruvate kinase, PK) 测定试剂盒 (批号 A076-1-1) 购自南京建成生物工程研究所有限公司; 糖原合成酶 (glycogen synthase, GS) ELISA 试剂盒 (批号 YB-GS-Hu)、葡萄糖激酶 (glucokinase, GCK) ELISA 试剂盒 (批号 YB-GCK-Hu)、葡萄糖-6-磷酸酶 (glucose-6-phosphatase, G6Pase) ELISA 试剂盒 (批号 YB-G6Pase-Hu) 购自上海钰博生物技术有限公司; 糖原测定试剂盒 (批号 BC0345) 购自北京索乐博科技有限公司; BCA 蛋白定量试剂盒 (批号 E-BC-K318-M) 购自武汉精英生物科技有限公司; 细胞膜和细胞质蛋白提取试剂盒 (批号 P0033) 购自上海碧云天生物技术有限公司; IRS-1 抗体 (批号 AP70586)、Akt 抗体 (批号 AP7028B)、磷酸化 Akt (Ser473, phosphorylated Akt, p-Akt) 抗体 (批号 AP3434a)、糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β) 抗体 (批号 AP60301)、磷酸化 GSK-3 β (Ser9, phosphorylated GSK-3 β , p-GSK-3 β) 抗体 (批号 AP67217)、叉头框蛋白 O1 (forkhead boxing protein O1, FOXO1) 抗体 (批号 AP60814)、磷酸化 FOXO1 (Ser256, phosphorylated FOXO1, p-FOXO1) 抗体 (批号 Ap67045)、葡萄糖转运蛋白 4 (glucose transporter 4, GLUT4) 抗体 (批号 AP60050)、ERK 抗体 (批号 AM2189b) 购自美国 Abcepta 公司; 磷酸化 IRS-1 (Ser307, phosphorylated IRS-1, p-IRS-1) 抗体 (批号 Ab5599) 购自英国 Abcam 公司; 磷酸化 ERK (Thr202/Tyr204, phosphorylated ERK, p-ERK) 抗体 (批号 AF1015) 购自美国 Affinity 公司; β -actin 抗体 (批号 66009-1-Ig) 购自美国 Proteintech 公司; Na⁺, K⁺-ATPase 抗体 (批号 ABL1141) 购自美国 Abbinne 公司; ERK 途径抑制

剂 PD98059 (批号 HY-12028)、PI3K 抑制剂 LY294002 (批号 HY-10108) 购自 Med Chem Express 公司; 山羊抗小鼠二抗 (批号 CW0102S)、山羊抗兔二抗 (批号 CW0103S) 购自康为世纪生物科技股份有限公司。

1.3 仪器

SW-CJ-2FD 型双人单面净化工作台 (苏州净化设备有限公司); CO₂ 培养箱 (金西盟人工智能有限责任公司); UV-4800 型紫外可见分光光度计 (上海尤尼柯仪器有限公司); 倒置荧光显微镜 (日本 Olympus 公司); 多功能酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司); DYY-6C 型稳压稳流电泳仪 (北京六一仪器厂); 5200 型 Multi 全自动化学发光成像分析系统 (上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 细胞培养和 IR-HepG2 模型的建立

HepG2 细胞用含 10% FBS 和 1% 双抗的 DMEM 低糖培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养; 用 0.25% 胰蛋白酶进行消化、传代。取对数生长期的细胞以 5 × 10⁴ 个/mL 接种于 96 孔板中, 每孔 200 μ L, 继续培养 24 h; 用无血清的 DMEM 高糖培养基替换 DMEM 低糖培养基再培养 12 h; 弃去旧培养基, 用 PBS 冲洗细胞 3 次, 然后用含有 5 × 10⁻⁶ mol/L 胰岛素的 DMEM 高糖培养基 (含 10% FBS) 培养 36 h; 检测各孔细胞培养基上清液中葡萄糖含量, 计算葡萄糖消耗量。造模细胞的葡萄糖消耗量显著低于正常细胞, 则表明 IR 模型建立成功。

2.2 IR-HepG2 模型的稳定时间

模型建立成功后, 将正常细胞组和模型组同时置于不含胰岛素的 DMEM 高糖培养基中继续培养 24、36、48 h; 检测各孔细胞培养基上清液中葡萄糖含量, 计算葡萄糖的消耗量。模型组细胞的葡萄糖消耗量显著低于正常细胞, 则表明 IR 模型在相应的时间内保持稳定。

2.3 细胞活力的测定

取 HepG2 细胞和建模成功的 IR-HepG2 细胞, 用 PBS 清洗 1~2 次, 然后每孔加入 200 μ L 由 DMEM 高糖培养基 (含 10% FBS) 配成的不同质量浓度的光甘草定 (0、0.1、0.5、1.0、5.0、10.0、15.0 μ g/mL), 于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中孵育 24 h 后, 用 PBS 冲洗细胞 1~2 次, 采用 MTT 法测定细胞活性。

2.4 糖代谢相关实验

2.4.1 分组及处理 设置对照组、模型组及光甘草

定低、中、高剂量 (0.1、1.0、10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 组和二甲双胍 (0.5 mmol/L) 组。对照组细胞用不含胰岛素的 DMEM 高糖培养基培养; 模型组、光甘草定各剂量组和二甲双胍组均按“2.1”项下方法诱导 IR。细胞用 PBS 冲洗 3 次后, 对照组和模型组加入 DMEM 高糖培养基, 光甘草定各剂量组加入 DMEM 高糖培养基配制的不同质量浓度的光甘草定溶液; 二甲双胍 (0.5 mmol/L) 组加入由 DMEM 高糖培养基配制的二甲双胍溶液。各组均在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱中继续培养 24 h。

2.4.2 葡萄糖消耗测定 96 孔板中 (HepG2 细胞 5×10^4 个/mL) 进行“2.4.1”项下实验分组及处理, 并设置空白孔。处理结束后, 收集每孔的培养液, 用葡萄糖检测试剂盒 (葡萄糖氧化酶法) 检测培养液中的葡萄糖含量, 计算各孔的葡萄糖消耗量。

葡萄糖消耗量 = 空白孔葡萄糖含量 - 每孔葡萄糖含量

2.4.3 葡萄糖摄取测定 24 孔板中 (HepG2 细胞 1×10^5 个/mL) 进行“2.4.1”项下实验分组及处理, 其中光甘草定处理组只选取高剂量组。处理结束后, 弃去培养基, 用 PBS 洗板 2 次; 然后加入 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 2-NBDG 溶液, 并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱中孵育 30 min; 弃去 2-NBDG 溶液, 用冷 PBS 清洗 2~3 次; 在倒置荧光显微镜下观察, 获得荧光图像, 并利用 Image J 软件对荧光强度进行定量分析。

2.4.4 糖原含量测定 6 孔板中 (HepG2 细胞 5×10^5 个/mL) 进行“2.4.1”项下实验分组及处理, 其中光甘草定处理组只选取高剂量组。处理结束后, 收集细胞, 然后按照糖原测定试剂盒 (蒽酮法) 中的操作方法测定各组细胞中的糖原含量。

2.4.5 葡萄糖生成测定 6 孔板中进行“2.4.1”项下实验分组及处理, 其中光甘草定处理组只选取高剂量组。处理结束后, 弃去培养基, 用 PBS 洗板 2 次; 加入含 2 mmol/L 丙酮酸钠和 20 mmol/L 乳酸钠的无糖 DMEM 培养基, 培养 4 h。然后收集各孔的培养基和细胞, 按照葡萄糖测定试剂盒 (葡萄糖氧化酶法) 中的步骤检测各组葡萄糖含量, 并将葡萄糖含量标准化为细胞蛋白浓度。

2.4.6 糖代谢关键酶活性测定 6 孔板中进行“2.4.1”项下实验分组及处理, 其中光甘草定处理组只选取高剂量组。处理结束后, 弃去培养基, 用 PBS 洗板 2 次, 收集细胞。按照 ELISA 试剂盒说明书分别测定 GCK、GS 和 G6Pase 的活性, 按照 PK 和 PEPCK 检测试剂盒说明书分别测定 PK 和 PEPCK

的活性。

2.5 PI3K/Akt 和 ERK/IRS-1 途径中蛋白表达及磷酸化的检测

2.5.1 分组及处理 在 6 孔板中 (HepG2 细胞 1×10^6 个/mL) 进行分组及处理。设置对照组、模型组、光甘草定高剂量组、高剂量光甘草定 + LY294002 组和 PD98059 抑制剂组。对照组用不含胰岛素的 DMEM 高糖培养基培养; 模型组、光甘草定高剂量组、高剂量光甘草定 + LY294002 组、PD98059 组均按“2.1”项下方法诱导 IR。细胞用 PBS 冲洗 3 次后, 对照组、模型组、光甘草定高剂量组细胞的处理方法同“2.4.1”项; 高剂量光甘草定 + LY294002 组和 PD98059 组先用 DMEM 高糖培养基配成的 LY294002 (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 或 PD98059 (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 溶液预处理细胞 1 h, 然后加入 DMEM 高糖培养基配成的光甘草定 + LY294002 样品液或 PD98059 溶液处理 24 h。处理结束后, 弃去培养基; 各组均加入含 100 nmol/L 胰岛素的 DMEM 高糖培养基, 并在培养箱中刺激 20 min; 弃去培养基, 然后用冷 PBS 洗板 1~2 次, 收集细胞。

2.5.2 PI3K/Akt 途径中蛋白表达及其磷酸化的检测 对照组、模型组、光甘草定高剂量组和高剂量光甘草定 + LY294002 组收集细胞后, 通过 Western blotting 法检测 PI3K/Akt 信号通路中 Akt、GSK-3 β 和 FOXO1 蛋白的表达及其磷酸化。

2.5.3 GLUT4 易位的检测 对照组、模型组、光甘草定高剂量组收集细胞后, 根据细胞膜和细胞质蛋白提取试剂盒中的步骤提取细胞膜蛋白和细胞质蛋白, 然后通过 Western blotting 法分别检测细胞膜和细胞质中 GLUT4 的表达。

2.5.4 ERK/IRS-1 途径中蛋白表达及其磷酸化的检测 对照组、模型组、光甘草定高剂量组和 PD98059 抑制剂组收集细胞后, 通过 Western blotting 法检测 ERK 和 IRS-1 蛋白表达及其磷酸化。

2.5.5 Western blotting 分析 收集细胞后, 用 RIPA 缓冲液裂解细胞, 离心后取上清液, 用 BCA 蛋白定量试剂盒测量蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 用脱脂牛奶封闭 1.5 h, 加入一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; 用 TBST 缓冲液洗涤后, 加入二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, 使用全自动化学发光成像分析系统进行化学发光成像, 使用成像仪自带图像分析软件 GIS 1D 对曝光结果进行分析。

2.6 分子对接

分别从 PDB 蛋白质结构数据库和 PubChem 数据库中下载受体的晶体结构和配体的化学结构, ERK2 对应的 PDB ID 为 4ZZN, 采用 AutoDock Tools 工具对上述蛋白受体和配体进行常规处理, 再用其 Autogrid 模块得到对接活性位点, 运行程序进行分子对接, 并利用 Pymol 软件绘制光甘草定与 ERK2 分子对接图。

2.7 数据统计分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 所有数据均采用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析。

3 结果

3.1 光甘草定对 IR-HepG2 细胞葡萄糖消耗的影响

葡萄糖的消耗是细胞摄取葡萄糖和外排葡萄糖的净结果, 直接反映细胞对外源葡萄糖的利用情况。首先在 IR-HepG2 细胞模型建立并可在 48 h 内保持稳定的基础上, 分析光甘草定的细胞毒作用, 测定了光甘草定对 IR-HepG2 细胞葡萄糖消耗量的影响, 如图 1-A 所示, 当光甘草定质量浓度为 0.1~10.0

$\mu\text{g/mL}$ 时, HepG2 细胞和 IR-HepG2 细胞的存活率均在 90% 以上, 表明光甘草定在此质量浓度范围内对 HepG2 细胞和 IR-HepG2 细胞没有细胞毒性。选取 0.1、1.0 和 10.0 $\mu\text{g/mL}$ 光甘草定分别孵育 IR-HepG2 细胞 24 h, 如图 1-B 所示, 3 个剂量的光甘草定均不同程度地增加 IR-HepG2 细胞的葡萄糖消耗, 且呈剂量相关性, 其中, 光甘草定高剂量组的细胞葡萄糖消耗量显著高于模型组 ($P < 0.05$), 与二甲双胍阳性对照组 (0.5 mmol/L) 无显著差异, 表明 10 $\mu\text{g/mL}$ 的光甘草定可有效改善 IR-HepG2 细胞对外源葡萄糖的利用。后续实验的光甘草定质量浓度均选取 10 $\mu\text{g/mL}$ 。

3.2 光甘草定对 IR-HepG2 细胞葡萄糖摄取的影响

采用 2-NBDG 荧光标记物检测光甘草定对 IR-HepG2 细胞摄取葡萄糖的影响, 如图 2 所示, 与对照组比较, 模型组 2-NBDG 摄取量显著降低 ($P < 0.01$); 光甘草定处理显著提高了 IR-HepG2 细胞的葡萄糖摄取量 ($P < 0.05$), 效果与二甲双胍阳性对照组 (0.5 mmol/L) 无显著差异。

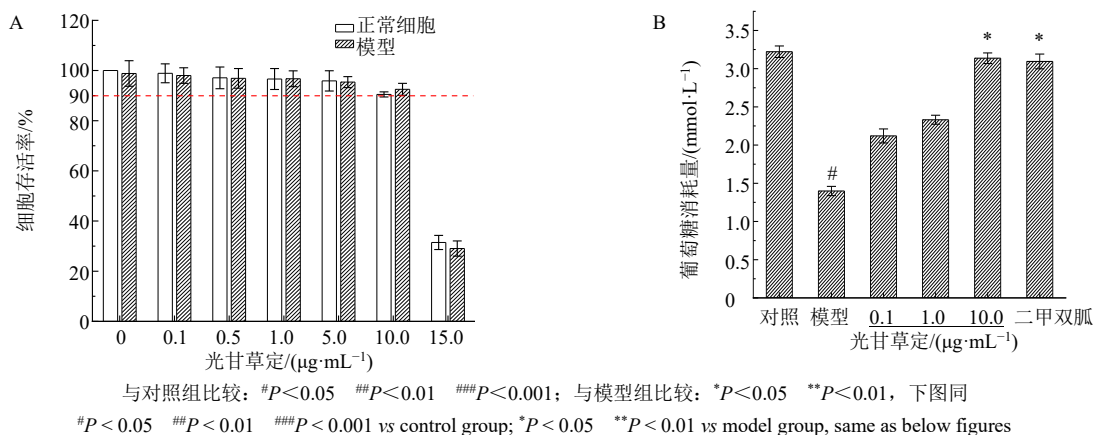


图 1 光甘草定对 IR-HepG2 细胞活力 (A) 和葡萄糖消耗 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Effect of glabridin on cell viability (A) and glucose consumption (B) in IR-HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

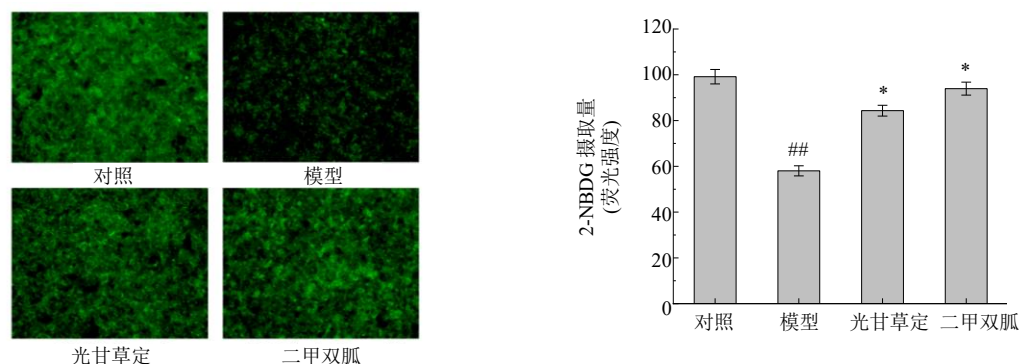


图 2 光甘草定对 IR-HepG2 细胞葡萄糖摄取的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of glabridin on glucose uptake in IR-HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.3 光甘草定对 IR-HepG2 细胞葡萄糖代谢的影响

通过测定光甘草定对 IR-HepG2 细胞的糖原合成量、葡萄糖生成量以及关键酶活性的影响, 研究光甘草定对发生 IR 的肝细胞中葡萄糖代谢的调节作用。

3.3.1 光甘草定促进 IR-HepG2 细胞的糖酵解 PK 和 GCK 是糖酵解途径中的 2 个关键限速酶。如图 3 所示, 模型组 PK 和 GCK 的活性与对照组相比均显著降低 ($P < 0.01$); 而光甘草定处理显著提高了 IR 细胞的 PK 和 GCK 活性 ($P < 0.05$ 、 0.01), 提示光甘草定可以通过上调 IR-HepG2 细胞中 PK 和 GCK 的活性促进糖酵解。

3.3.2 光甘草定提高 IR-HepG2 细胞的糖原合成 IR 发生时, 肝细胞的肝糖原合成受阻、而糖原分解加快, 是造成肝脏葡萄糖生成量增加的一个重要原因。GS 是糖原合成的关键酶。如图 4 所示, 模型组的 GS 活性和糖原含量均显著低于对照组 ($P < 0.01$); 经光甘草定处理后, GS 活性和糖原含量均显著提高 ($P < 0.05$), 表明光甘草定可以通过上调 IR-HepG2 细胞中 GS 的活性促进糖原合成。

3.3.3 光甘草定抑制 IR-HepG2 细胞的糖异生 糖

异生是 T2DM 患者空腹肝葡萄糖生成增加的主要原因^[22]。PEPCK、G6Pase 是糖异生途径中的关键限速酶。如图 5 所示, 模型组 PEPCK、G6Pase 的活性和葡萄糖的生成量均显著高于对照组 ($P < 0.05$ 、 0.01); 而在光甘草定作用下, 这种增加被显著抑制 ($P < 0.05$)。表明光甘草定可以通过下调 IR-HepG2 细胞的 G6Pase 和 PEPCK 的活性来抑制糖异生。

3.4 光甘草定通过激活 PI3K/Akt 信号通路调节 IR-HepG2 细胞的葡萄糖代谢

胰岛素信号转导受损, 即 PI3K/Akt 通路异常是肝脏发生 IR 导致葡萄糖代谢失衡的主要原因。通过测定光甘草定对该通路的关键信号节点 Akt 以及 Akt 的下游底物 GSK-3 β 和 FOXO1 的表达及磷酸化水平, 探讨光甘草定对 PI3K/Akt 通路的修复作用以及调节糖原合成、葡萄糖生成的机制。如图 6 所示, 与对照组比较, 模型组 Akt、GSK-3 β 和 FOXO1 的磷酸化被显著抑制 ($P < 0.001$), 光甘草定处理则显著提高了三者的磷酸化水平 ($P < 0.01$), 但这种作用被 PI3K 抑制剂 LY294002 显著逆转 ($P < 0.01$)。表明光甘草定对 IR-HepG2 细胞葡萄糖代谢紊乱的修复作用是由 PI3K 介导的, 通过激活肝细胞中

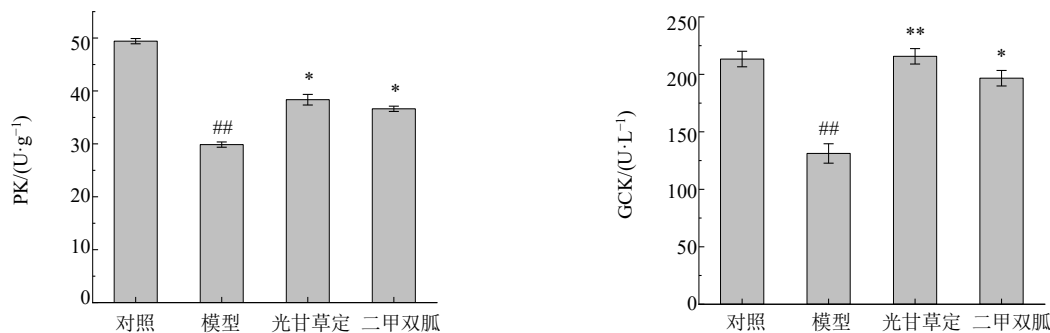


图 3 光甘草定对 IR-HepG2 细胞 PK 和 GCK 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of glabridin on activities of PK and GCK in IR-HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

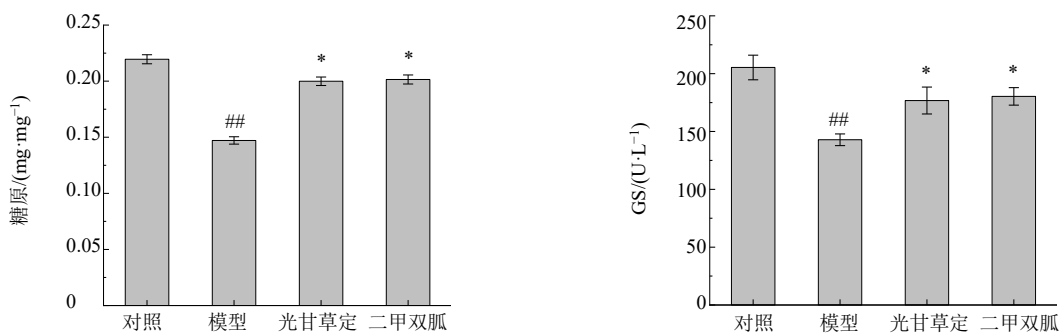


图 4 光甘草定对 IR-HepG2 细胞糖原合成和 GS 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of glabridin on glycogen synthesis and GS activity in IR-HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

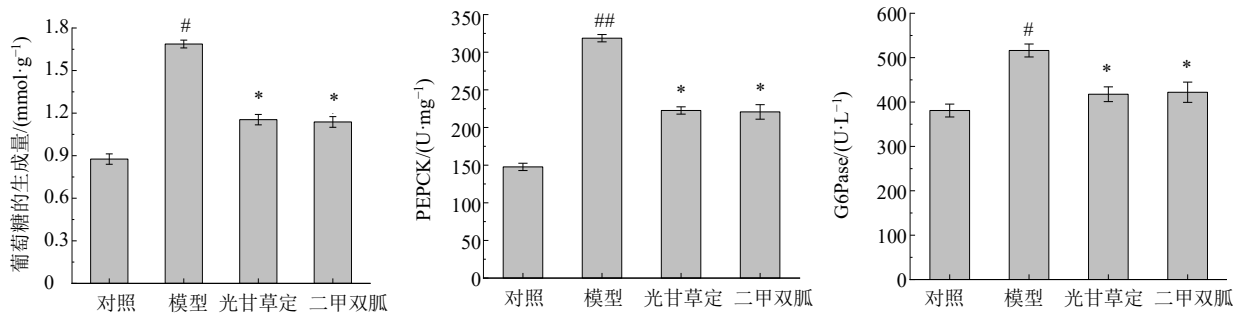


图 5 光甘草定对 IR-HepG2 细胞糖异生的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of glabridin on gluconeogenesis in IR-HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

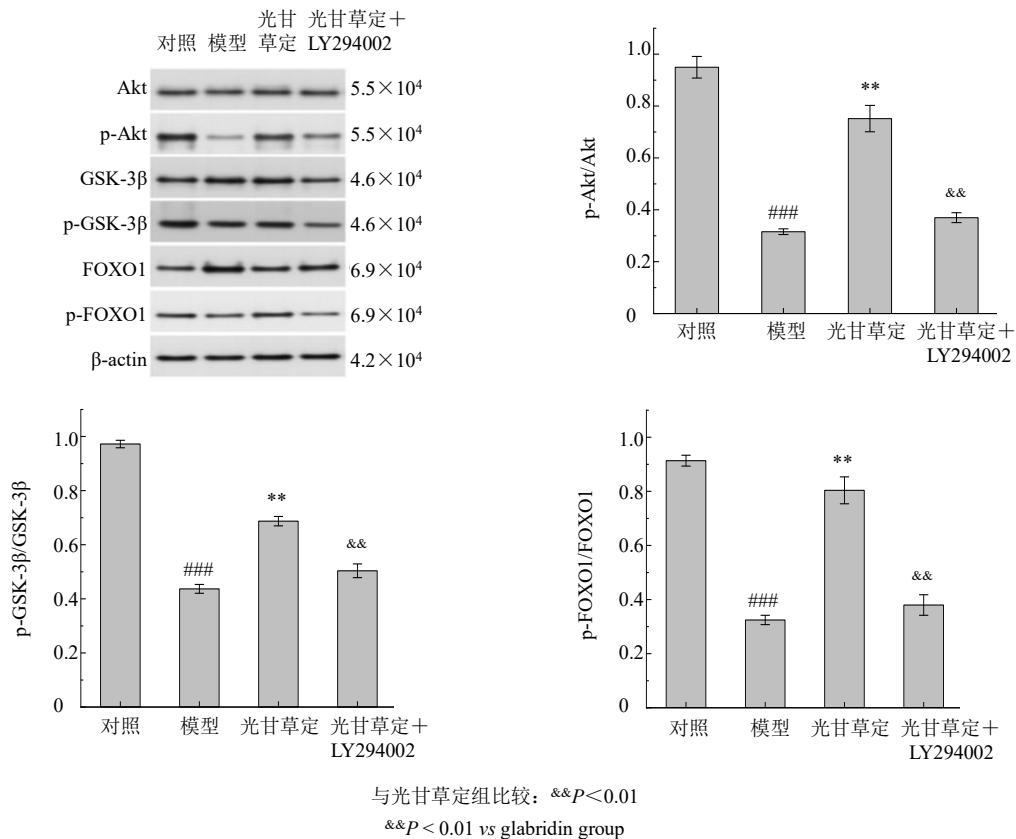


图 6 光甘草定对 IR-HepG2 细胞中 PI3K/Akt 通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of glabridin on PI3K/Akt pathway related protein expressions in IR-HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

PI3K/Akt 信号通路，一方面促进了 GSK-3β 的磷酸化从而促进了糖原合成，另一方面增强了 FOXO1 的磷酸化从而抑制了糖异生。

3.5 光甘草定促进 IR-HepG2 细胞 GLUT4 的质膜易位

胰岛素通过增加 GLUT4 从细胞内的储存囊泡到质膜的易位来促进葡萄糖摄取，是降低血糖水平的主要机制之一^[23]。为了确定光甘草定对 GLUT4 易位的影响，对光甘草定处理后的 IR-HepG2 细胞

进行质、膜组分的 Western blotting 检测，如图 7 所示，β-actin 和 Na⁺, K⁺-ATPase 分别在质膜和细胞质中几乎检测不到，表明质膜和细胞质成分分离较好。与对照组比较，模型组细胞质膜上的 GLUT4 表达显著降低 ($P < 0.001$)，而细胞质中 GLUT4 的表达显著升高 ($P < 0.001$)；光甘草定处理则显著提高了 GLUT4 在 IR-HepG2 细胞质膜中的表达 ($P < 0.01$)，显著降低其在细胞质中的表达 ($P < 0.01$)。表明光甘草定可以显著促进细胞内储存 GLUT4 的囊泡向质

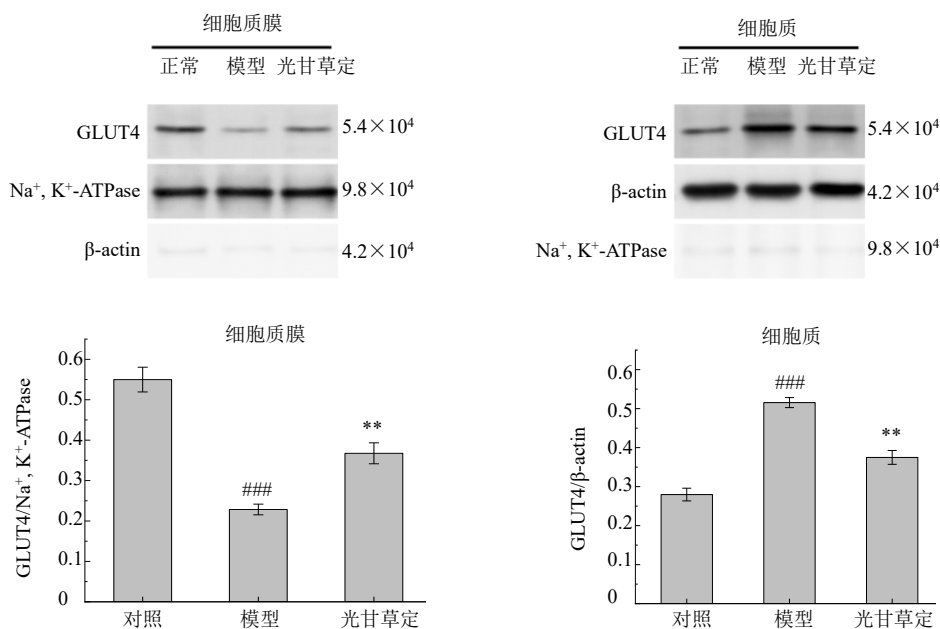


图 7 光甘草定对 IR-HepG2 细胞中 GLUT4 易位的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of glabridin on GLUT4 translocation in IR-HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

膜的易位, 从而刺激 IR-HepG2 细胞的葡萄糖摄取。

3.6 光甘草定对 IR-HepG2 细胞 ERK/IRS-1 信号通路的影响

过度激活的 ERK 可以诱导 IRS-1 在 Ser307/612/632/636 处发生丝氨酸磷酸化^[15-16], 阻断胰岛素信号的转导。通过测定光甘草定对 ERK 和 IRS-1 的表达及磷酸化水平, 进一步探讨了光甘草定修复 PI3K/Akt 通路的途径, 如图 8 所示, 与对照组比较, 模型组 ERK 和 IRS-1 的磷酸化水平均显著升高 ($P < 0.001$); PD98059 处理有效阻断了 ERK 的磷酸化 ($P < 0.01$), 同时显著抑制了 IRS-1 的磷酸化 ($P < 0.01$); 与 PD98059 处理相类似, 光甘草定处理同样显著降低了 IR-HepG2 细胞中 ERK 和 IRS-1 的磷酸

化 ($P < 0.01$)。表明在肝细胞发生 IR 时, 光甘草定可以通过抑制 ERK/IRS-1 通路的激活, 修复 PI3K/Akt 途径的损伤, 促进胰岛素信号的转导。

3.7 光甘草定与 ERK2 的分子对接结果

本课题组前期的网络药理学研究结果表明 ERK2 是光甘草定潜在的作用靶点之一。采用分子对接技术研究光甘草定与 ERK 之间的分子相互作用, 旨在从分子水平揭示光甘草定作为 ERK 抑制剂的可能性。

ERK2 具有由 N 端和 C 端卷曲形成的双叶结构。N 端主要由 5 个 β 折叠 (β1~β5)、1 个 αC 螺旋和 1 个甘氨酸富集环结构组成, 它们对 ATP 的定位具有重要作用。其中, β1 和 β2-折叠占据了部分

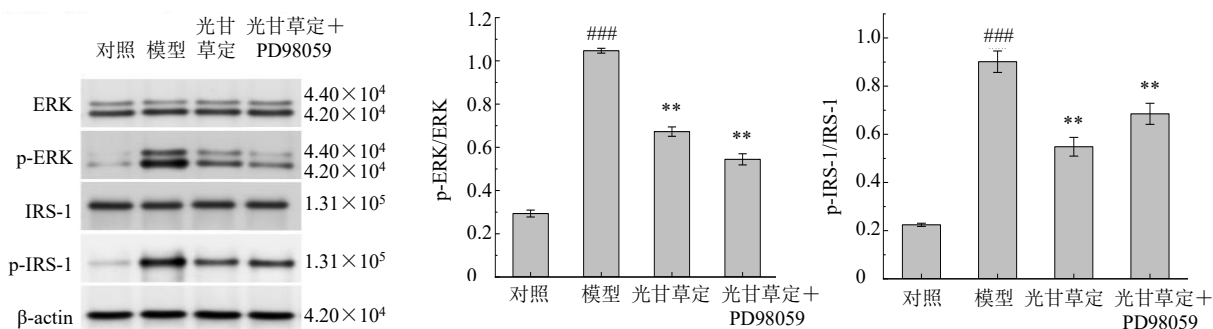


图 8 光甘草定对 IR-HepG2 细胞中 ERK/IRS-1 通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Effect of glabridin on ERK/IRS-1 pathway related protein expressions in IR-HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

腺嘌呤结合口袋;β3 折叠通常包含 1 个保守的 AXK 序列,其赖氨酸(Lys)将 ATP 的 α-和 β-磷酸盐耦合到 αC-螺旋上;甘氨酸富集环位于 β1、β2-折叠之间,是 N 端中最灵活的部分,有助于定位 ATP 的 β-和 γ-磷酸盐以进行催化作用。β3-Lys 和 αC-谷氨酸(Glu)之间形成的 1 个盐桥是激酶处于活性状态的先决条件,称为 αC_{in} 构象;如果这种盐桥缺失,则表明该激酶是非活性的,称为 αC_{out} 构象。C 端主要由 6 个 α 螺旋和 4 股较短的 β 折叠(β6~β9)组成,在 β6~β9 折叠中包含了与 ATP 向 ERK1/2 底物磷酸化转移有关的大部分催化残基。N 端和 C 端通过一段柔性的铰链区连接,该铰链区域与 ATP 结合位点部分重叠,也被称为“活化 loop”。“活化 loop”一般由 20~30 个氨基酸残基组成,从保守的 DFG 基序(Asp-Phe-Gly)开始,以保守的 APE 序列(Ala-Pro-Glu)结束。在活性蛋白激酶中,DFG-天冬氨酸(Asp)侧链(ERK2 Asp165)靠近 ATP 结合位点,称为 DFG-in 构象;在非活性蛋白激酶中,DFG-Asp 侧链远离 ATP 结合位点,称为 DFG-out 构象^[24]。DFG-in/αC_{in} 表示活性蛋白激酶;DFG-in/αC_{out}、DFG-out/αC_{in} 和 DFG-out/αC_{out} 表示非活性蛋白激酶^[25]。依据蛋白激酶的构象,将其抑制剂分为 I、II、I^{1/2} 和 III 型^[26-27]。I 型抑制剂与活性蛋白激酶的 DFG-in 构象结合,可逆的结合到 ATP 结合位点;II 型抑制剂与非活性的蛋白激酶的 DFG-out 构象结合;I^{1/2} 型抑制剂与非活性蛋白激酶的 DFG-in 构象结合(与 II

型抑制剂的 DFG-out 构象相反),占据了 ATP 部分结合位点;III 型抑制剂与蛋白激酶的变构位点结合,不影响 ATP 的结合。Liao^[28]和 van Linden 等^[29]将蛋白激酶 N 端和 C 端之间的区域划分为“Front cleft”“Gate area”和“Back cleft”。“Front cleft”包括铰链区部分残基、腺嘌呤结合口袋和甘氨酸富集环;“Gate area”包括 N 端叶的 β3 折叠和“活化 loop”的近端部分。

光甘草定与 ERK2 的结合能为-27.78 kJ/mol,说明光甘草定与 ERK2 能自发且稳定地结合,具有较好的亲和力。光甘草定结合在了 ERK2 的“Front cleft”和“Gate area”处。从图 9-A 中可以观察到 DFG-Asp165 靠近 ATP 结合位点;β3-Lys52 和 αC-Glu69 之间没有形成盐桥,这表明与光甘草定结合的 ERK2 具有 DFG-in/αC_{out} 构象。因此,该激酶是非活性状态。光甘草定的羟基分别与甘氨酸富集环上 Ala33、αC 螺旋上 Tyr62 形成了氢键;与甘氨酸富集环上 Tyr34、αC 螺旋上 Thr66 形成了极性键;光甘草定还与 ERK2 中 β1 折叠上 Glu31、β2 折叠上 Gly35、β3-折叠和 αC 螺旋之间的无规则卷曲区域的 Ser55、Ile54 和 Pro56、αC 螺旋上的 Arg65、β2L0 上的 Gln15 有许多疏水作用(图 9-B)。光甘草定与 ERK2 的 β-折叠(β1~β3)、αC 螺旋及甘氨酸富集环上氨基酸残基的相互作用在空间上阻止了 ATP 与激酶的结合。因此,光甘草定可以被归类为 ERK2 的一种 I^{1/2} 型抑制剂。

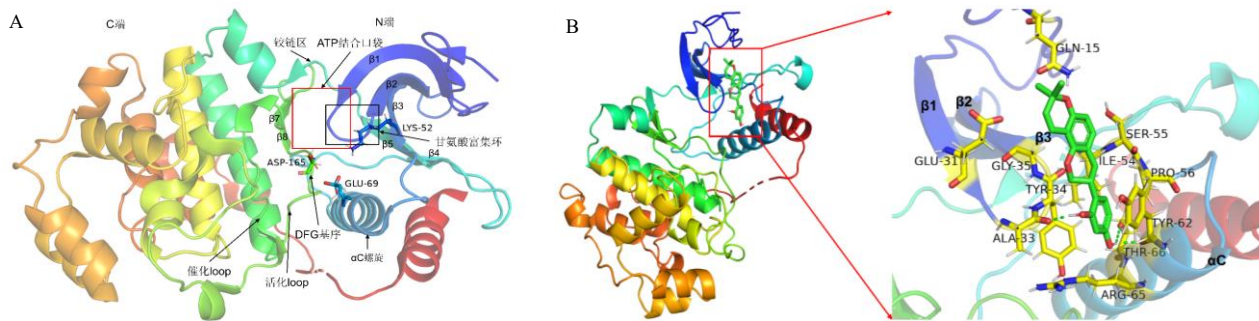


图9 ERK2 结构图 (A) 及光甘草定与 ERK2 的分子对接图 (B)

Fig. 9 Structure diagram of ERK2 (A) and molecular docking diagram of glabridin and ERK2 (B)

4 讨论

光甘草定具有显著降低 IR-HepG2 细胞肝糖产生的能力。肝糖的产生是糖酵解、糖原合成与分解、糖异生过程的等过程的净结果,对血糖调节起着重要作用。糖原在进食条件下是肝脏中葡萄糖的一种重要储存形式;在禁食条件下,肝糖原分解产生的

游离葡萄糖释放到血液循环中,可随时为大脑和其他神经组织提供葡萄糖。伴随禁食时间的延长,糖异生逐渐取代糖原分解,成为肝脏葡萄糖生成的主途径。例如在禁食 10 h 后,糖原分解只占肝脏葡萄糖总产量的 30%,糖异生占肝脏葡萄糖总产量的 70%。糖异生也是 T2DM 患者空腹肝葡萄糖生成增

加的主要原因^[22]。发生 IR 时,肝脏的葡萄糖代谢失衡,包括糖酵解和糖原合成能力减弱、肝糖原的分解和糖异生加强,使得肝糖输出增加,最终造成肝脏调节血糖的能力减弱,血糖代谢出现紊乱。本研究表明,光甘草定通过上调 PK、GCK 和 GS 的活性,使细胞的糖酵解和糖原合成能力显著增强;通过下调 PEPCK 和 G6Pase 的活性,显著减弱了细胞内糖异生的能力,降低肝糖的产生,进而减少肝糖的输出。

光甘草定显著提高了 IR-HepG2 细胞的葡萄糖摄取能力。GLUT4 是葡萄糖转运蛋白中独特的亚型,在介导胰岛素依赖性葡萄糖摄取和维持葡萄糖平衡方面发挥着重要作用^[30]。GLUT4 主要在脂肪细胞、骨骼肌和心肌细胞中表达,当摄入碳水化合物食物后,血液循环中的胰岛素水平上升;在胰岛素作用下,细胞内的 GLUT4 转位到质膜上,从而增加这些细胞的葡萄糖摄取和代谢,防止血糖水平的长期升高。GLUT4 向质膜转移的缺陷被称为外周胰岛素抵抗。虽然目前认为 GLUT2 是肝细胞中主要的葡萄糖转运体,分别在进食和禁食状态下参与肝细胞葡萄糖的摄取和释放^[31]。但是, GLUT4 也在肝脏中表达^[31],而且越来越多的体内外研究^[17,32-35]表明,肝脏中的 GLUT4 通过与脂肪细胞、骨骼肌和心肌细胞中的 GLUT4 相同的机制,即通过胰岛素调节的转位参与肝细胞对血液中的葡萄糖的摄取。而当肝脏发生 IR 时, GLUT4 也同样表现出易位损伤。GLUT4 的易位损伤或修复与肝细胞摄取葡萄糖的能力密切相关。本研究结果显示,在高胰岛素诱导的 IR-HepG2 细胞中, GLUT4 从细胞质向细胞膜的迁移受到了显著抑制,而光甘草定处理后质膜中 GLUT4 的表达显著提高,而细胞质中 GLUT4 的表达显著降低,表明光甘草定较好修复了 IR-HepG2 细胞的 GLUT4 的易位损伤。GLUT4 在肝脏中的表达和功能以及对调节全身代谢方面的作用仍需进一步深入探讨。

PI3K/Akt 途径是胰岛素信号转导的主要途径,在胰岛素的靶器官中负责调节葡萄糖摄取和代谢, Akt 是该途径中的关键信号节点之一。在肝细胞中,胰岛素与细胞表面胰岛素受体特异性结合后,使 IRS 活化,接着 IRS 通过 SH2 结构域招募 PI3K 的 p85 调节亚基促使 PI3K 的激活,然后 PI3K 磷酸化脂质磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 (phosphati-dylinositol-4,5-bisphosphate, PIP2) 产生磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷

酸 (phosphati-dylinositol-3,4,5-bisphosphate, PIP3); Akt 通过其 PH 结构域与 PIP3 结合,促进上游激酶激活 Akt。GSK-3 β 、FOXO1 是 Akt 下游直接作用的 2 个靶点。GSK3 β 被 Akt 磷酸化而降低活性,致使 GSK-3 β 的下游蛋白 GS 磷酸化水平下降而激活,进而促进糖原合成^[36]。Akt 使 FOXO1 发生磷酸化后,诱导 FOXO1 与 14-3-3 蛋白相互作用,使其发生核外排,致使 FOXO1 失去 DNA 结合能力和转录活性^[37],导致 PEPCK 和 G6Pase 的表达降低,从而抑制糖异生^[38]。当肝脏发生 IR 时, PI3K/Akt 途径受损, Akt 的激活受到了抑制,使其对 GSK3 β 磷酸化的能力减弱,致使 GSK3 β 通过磷酸化 GS 使其失活,减少了糖原的合成^[39]。同时, Akt 对 FOXO1 磷酸化能力也被削弱, FOXO1 直接与 PEPCK 和 G6Pase 靶 DNA 序列结合,增加它们在肝脏中的表达^[40],促进了肝糖异生。在本研究中,光甘草定显著上调了 Akt 的磷酸化水平,致使 GSK3 β 和 FOXO1 的磷酸化水平也显著提高。前者导致 GS 的活性提高, IR-HepG2 细胞的糖原含量也因此显著增加;后者导致 PEPCK 和 G6Pase 的活性显著降低, IR-HepG2 细胞的葡萄糖生成量也因此显著下降。当加入 PI3K 抑制剂 LY294002 后,光甘草定对 Akt、GSK3 β 和 FOXO1 磷酸化水平的上调作用被显著逆转。上述研究结果表明光甘草定改善 IR 的能力是 PI3K/Akt 途径依赖性的。

几个关键的丝氨酸/苏氨酸激酶通过靶向胰岛素信号传导 PI3K/Akt 途径的关键成分而成为重要的负向调节因子^[15,41]。其中, ERK 对 IRS 的丝氨酸磷酸化与 IR 密切相关^[17]。过度激活的 ERK 信号通路对 PI3K/Akt 通路起负调节作用。在 IR 状态下, ERK 激活后可以使 IRS-1 在 Ser307 等多个位点发生磷酸化^[15],致使 IRS-1 与胰岛素受体的结合受到抑制^[42],从而导致 PI3K/Akt 信号通路损伤和胰岛素刺激的葡萄糖利用受损。因此,抑制 ERK 途径可能成为治疗糖尿病的又一有效手段。在 db/db 小鼠^[21,43]、KKAy 小鼠^[44]等动物模型和 3T3-L1 脂肪细胞^[21,43]、骨骼肌细胞^[16]中发现,使用抑制剂 (PD184352、U0126、PD98059) 或早期反应转录因子-1 (early growth response-1, Egr-1) 抑制 ERK 途径后,可改善小鼠和细胞的胰岛素敏感性及 IR 症状。近年来的研究表明, HepG2 细胞的 IR 可通过核桃衍生肽^[17]、姜黄素及其代谢产物^[45]抑制 ERK 途径得到显著改善。本研究发现,高胰岛素诱导的 IR-

HepG2 细胞的 ERK 和 IRS-1 的磷酸化水平显著升高,而这种升高分别被 ERK 通路的专一性抑制剂 PD98059 和光甘草定显著抑制。光甘草定与 ERK2 分子对接的结果进一步表明,光甘草定通过氢键、极性键、疏水相互作用等作用力稳定结合在非活性状态且具有 DFG-in 构象的 ERK2 的“Front cleft”和“Gate area”位点,在空间上阻止了 ATP 与 ERK2 的结合。上述结果表明,光甘草定可作为 ERK2 的一种 I^{1/2}型抑制剂,通过抑制 IR-HepG2 细胞中 ERK/IRS-1 途径的激活,修复 PI3K/Akt 途径的损伤。

综上所述,光甘草定可作为 ERK 的 I^{1/2}型抑制剂,通过抑制 IR-HepG2 细胞的 ERK/IRS-1 通路、激活 PI3K/Akt 信号通路,促进 GLUT4 向质膜的易位,提高 IR-HepG2 细胞对葡萄糖的摄取量;增强或抑制葡萄糖代谢关键酶的活性,促进 IR-HepG2 细胞的糖原合成和糖酵解,抑制糖异生;进而提高 IR-HepG2 细胞对外源葡萄糖的利用、减少肝糖的产生和外排,修复葡萄糖的代谢紊乱,缓解 IR 症状。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Virally M, Blicklé J F, Girard J, *et al.* Type 2 diabetes mellitus: Epidemiology, pathophysiology, unmet needs and therapeutical perspectives [J]. *Diabetes Metab*, 2007, 33(4): 231-244.
- [2] Dongiovanni P, Rametta R, Meroni M, *et al.* The role of insulin resistance in nonalcoholic steatohepatitis and liver disease development: A potential therapeutic target? [J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2016, 10(2): 229-242.
- [3] Das S K, Elbein S C. The genetic basis of type 2 diabetes [J]. *Cellscience*, 2006, 2(4): 100-131.
- [4] Simmler C, Pauli G F, Chen S N. Phytochemistry and biological properties of glabridin [J]. *Fitoterapia*, 2013, 90: 160-184.
- [5] Yehuda I, Madar Z, Leikin-Frenkel A, *et al.* Glabridin, an isoflavan from licorice root, upregulates paraoxonase 2 expression under hyperglycemia and protects it from oxidation [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2016, 60(2): 287-299.
- [6] Wu F H, Jin Z G, Jin J. Hypoglycemic effects of glabridin, a polyphenolic flavonoid from licorice, in an animal model of diabetes mellitus [J]. *Mol Med Rep*, 2013, 7(4): 1278-1282.
- [7] Sawada K, Yamashita Y, Zhang T S, *et al.* Glabridin induces glucose uptake via the AMP-activated protein kinase pathway in muscle cells [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2014, 393(1/2): 99-108.
- [8] Choi E M, Suh K S, Kim Y J, *et al.* Glabridin alleviates the toxic effects of methylglyoxal on osteoblastic MC3T3-E1 cells by increasing expression of the glyoxalase system and Nrf2/HO-1 signaling and protecting mitochondrial function [J]. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(1): 226-235.
- [9] Yehuda I, Madar Z, Szuchman-Sapir A, *et al.* Glabridin, a phytoestrogen from licorice root, up-regulates manganese superoxide dismutase, catalase and paraoxonase 2 under glucose stress [J]. *Phytother Res*, 2011, 25(5): 659-667.
- [10] Yehuda I, Madar Z, Leikin-Frenkel A, *et al.* Glabridin, an isoflavan from licorice root, downregulates iNOS expression and activity under high-glucose stress and inflammation [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2015, 59(6): 1041-1052.
- [11] Choi E M, Suh K S, Jung W W, *et al.* Glabridin attenuates antiadipogenic activity induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in murine 3T3-L1 adipocytes [J]. *J Appl Toxicol*, 2018, 38(11): 1426-1436.
- [12] Guo Y J, Pan W W, Liu S B, *et al.* ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 19(3): 1997-2007.
- [13] Lawan A, Bennett A M. Mitogen-activated protein kinase regulation in hepatic metabolism [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2017, 28(12): 868-878.
- [14] Schultze S M, Hemmings B A, Niessen M, *et al.* PI3K/AKT, MAPK and AMPK signalling: Protein kinases in glucose homeostasis [J]. *Expert Rev Mol Med*, 2012, 14: e1.
- [15] Tanti J F, Jager J. Cellular mechanisms of insulin resistance: Role of stress-regulated serine kinases and insulin receptor substrates (IRS) serine phosphorylation [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2009, 9(6): 753-762.
- [16] Bouzakri K, Roques M, Gual P, *et al.* Reduced activation of phosphatidylinositol-3 kinase and increased serine 636 phosphorylation of insulin receptor substrate-1 in primary culture of skeletal muscle cells from patients with type 2 diabetes [J]. *Diabetes*, 2003, 52(6): 1319-1325.
- [17] Wang J, Wu T, Fang L, *et al.* Peptides from walnut (*Juglans mandshurica* Maxim.) protect hepatic HepG2 cells from high glucose-induced insulin resistance and oxidative stress [J]. *Food Funct*, 2020, 11(9): 8112-8121.
- [18] Artunc F, Schleicher E, Weigert C, *et al.* The impact of insulin resistance on the kidney and vasculature [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2016, 12(12): 721-737.
- [19] Biddinger S B, Kahn C R. From mice to men: Insights into the insulin resistance syndromes [J]. *Annu Rev Physiol*, 2006, 68: 123-158.
- [20] Cargnello M, Roux P P. Activation and function of the

- MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2011, 75(1): 50-83.
- [21] Yu X, Shen N, Zhang M L, *et al.* Egr-1 decreases adipocyte insulin sensitivity by tilting PI3K/Akt and MAPK signal balance in mice [J]. *EMBO J*, 2011, 30(18): 3754-3765.
- [22] Magnusson I, Rothman D L, Katz L D, *et al.* Increased rate of gluconeogenesis in type II diabetes mellitus. A ¹³C nuclear magnetic resonance study [J]. *J Clin Invest*, 1992, 90(4): 1323-1327.
- [23] Huang S H, Czech M P. The GLUT4 glucose transporter [J]. *Cell Metab*, 2007, 5(4): 237-252.
- [24] Roskoski R Jr. Targeting ERK1/2 protein-serine/threonine kinases in human cancers [J]. *Pharmacol Res*, 2019, 142: 151-168.
- [25] Roskoski R Jr. ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation [J]. *Pharmacol Res*, 2012, 66(2): 105-143.
- [26] Dar A C, Shokat K M. The evolution of protein kinase inhibitors from antagonists to agonists of cellular signaling [J]. *Annu Rev Biochem*, 2011, 80: 769-795.
- [27] Zuccotto F, Ardini E, Casale E, *et al.* Through the “gatekeeper door”: Exploiting the active kinase conformation [J]. *J Med Chem*, 2010, 53(7): 2681-2694.
- [28] Liao J J L. Molecular recognition of protein kinase binding pockets for design of potent and selective kinase inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2007, 50(3): 409-424.
- [29] van Linden O P J, Kooistra A J, Leurs R, *et al.* KLIFS: A knowledge-based structural database to navigate kinase-ligand interaction space [J]. *J Med Chem*, 2014, 57(2): 249-277.
- [30] Harriet Wallberg-Henriksson. GLUT4: A key player regulating glucose homeostasis? Insights from transgenic and knockout mice [J]. *Mol Membr Biol*, 2001, 18(3): 205-211.
- [31] Karim S, Adams D H, Lalor P F. Hepatic expression and cellular distribution of the glucose transporter family [J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(46): 6771-6781.
- [32] Zhang Y, Yan L S, 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.
- [33] Garabadu D, Krishnamurthy S. Metformin attenuates hepatic insulin resistance in type-2 diabetic rats through PI3K/Akt/GLUT-4 signalling independent to bicuculline-sensitive GABAA receptor stimulation [J]. *Pharm Biol*, 2017, 55(1): 722-728.
- [34] Li W Q, Wu L, Sun Q, *et al.* MicroRNA-191 blocking the translocation of GLUT4 is involved in arsenite-induced hepatic insulin resistance through inhibiting the IRS1/AKT pathway [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2021, 215: 112130.
- [35] Zhang W N, Su R N, Gong L L, *et al.* Structural characterization and *in vitro* hypoglycemic activity of a glucan from *Euryale ferox* Salisb. seeds [J]. *Carbohydr Polym*, 2019, 209: 363-371.
- [36] Samuel V T, Shulman G I. Mechanisms for insulin resistance: Common threads and missing links [J]. *Cell*, 2012, 148(5): 852-871.
- [37] Brownawell A M, Kops G J, Macara I G, *et al.* Inhibition of nuclear import by protein kinase B (Akt) regulates the subcellular distribution and activity of the forkhead transcription factor AFX [J]. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(10): 3534-3546.
- [38] Klover P J, Mooney R A. Hepatocytes: Critical for glucose homeostasis [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36(5): 753-758.
- [39] Srivastava A K, Pandey S K. Potential mechanism(s) involved in the regulation of glycogen synthesis by insulin [J]. *Mol Cell Biochem*, 1998, 182(1/2): 135-141.
- [40] Sekine K, Chen Y R, Kojima N, *et al.* Foxo1 links insulin signaling to C/EBP α and regulates gluconeogenesis during liver development [J]. *EMBO J*, 2007, 26(15): 3607-3615.
- [41] Taniguchi C M, Emanuelli B, Kahn C R. Critical nodes in signalling pathways: Insights into insulin action [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7(2): 85-96.
- [42] Eck M J, Dhe-Paganon S, Trüb T, *et al.* Structure of the IRS-1 PTB domain bound to the juxtamembrane region of the insulin receptor [J]. *Cell*, 1996, 85(5): 695-705.
- [43] Jager J, Grémeaux T, Cormont M, *et al.* Interleukin-1 β -induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression [J]. *Endocrinology*, 2007, 148(1): 241-251.
- [44] Ozaki K I, Awazu M, Tamiya M, *et al.* Targeting the ERK signaling pathway as a potential treatment for insulin resistance and type 2 diabetes [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2016, 310(8): E643-E651.
- [45] Li P, Ding L Q, Cao S J, *et al.* Curcumin metabolites contribute to the effect of curcumin on ameliorating insulin sensitivity in high-glucose-induced insulin-resistant HepG2 cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 259: 113015.