

# 丙二酰辅酶A抑制PI3K/Akt通路加剧高糖诱导的 IR-HepG2细胞胰岛素抵抗

张鑫<sup>1</sup> 张烽<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>江南大学生物工程学院, 无锡 214000; <sup>2</sup>江南大学附属医院营养科, 无锡 214122)

**摘要** 该研究探讨丙二酰辅酶A(malonyl-CoA)影响高糖诱导的胰岛素抵抗HepG2(IR-HepG2)细胞的潜在机制。采用高糖联合高浓度胰岛素诱导HepG2细胞胰岛素抵抗模型, 给予不同浓度(0 μmol/L、20 μmol/L、50 μmol/L、100 μmol/L)的丙二酰辅酶A进行干预。该研究评估了IR-HepG2细胞的葡萄糖消耗量、葡萄糖摄入量、脂肪酸代谢变化、细胞凋亡情况; 通过WB(Western blot)检测胰岛素抵抗相关蛋白PI3K/Akt通路、AMPKα/p-AMPKα蛋白、凋亡相关蛋白Bcl-2等的表达情况。结果显示, 丙二酰辅酶A干预显著减少了IR-HepG2细胞葡萄糖消耗( $P<0.0001$ )、葡萄糖摄入量( $P<0.01$ ), 促进了细胞甘油三酯(TG)积累( $P<0.05$ ), 导致了IR-HepG2细胞糖脂代谢紊乱。在分子机制上, 丙二酰辅酶A干预能够提高IR-HepG2细胞蛋白质赖氨酸丙二酰化水平, 下调AMPKα及p-AMPKα的表达, 并抑制PI3K/Akt信号通路; 抑制抗凋亡蛋白Bcl-2( $P<0.01$ )表达, 促进细胞凋亡, 从而加剧IR-HepG2细胞胰岛素抵抗。综上所述, 丙二酰辅酶A可以引起IR-HepG2细胞糖脂代谢紊乱, 影响细胞凋亡, 上调丙二酰化水平, 抑制PI3K/Akt通路并诱导细胞凋亡, 进而加剧IR-HepG2细胞胰岛素抵抗。

**关键词** 丙二酰辅酶A; IR-HepG2; 胰岛素抵抗; 糖代谢; 脂肪酸代谢; PI3K/Akt

## Malonyl-CoA Exacerbates High Glucose-Induced Insulin Resistance in IR-HepG2 Cells by Inhibiting the PI3K/Akt Pathway

ZHANG Xin<sup>1</sup>, ZHANG Feng<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214000, China;<sup>2</sup>Department of Nutrition, Affiliated Hospital of Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract** This study explores the potential mechanism of the effect of malonyl-CoA on insulin resistance in high glucose-induced IR-HepG2 (insulin resistance HepG2) cells. The insulin resistance model of HepG2 cells was induced by high glucose combined with a high concentration of insulin, and interventions were carried out with different concentrations of malonyl-CoA (0 μmol/L, 20 μmol/L, 50 μmol/L, 100 μmol/L). This study evaluated glucose consumption, glucose uptake, fatty acid metabolism changes, and apoptosis of IR-HepG2 cells. The expression of proteins related to insulin resistance, such as the PI3K/Akt pathway, AMPKα/p-AMPKα protein, and the apoptosis-related protein Bcl-2, was detected by Western blot. The results showed that malonyl-CoA intervention significantly reduced glucose consumption ( $P<0.0001$ ) and glucose uptake ( $P<0.01$ ) in IR-HepG2 cells, promoted the accumulation of cellular TG (triglyceride) ( $P<0.05$ ), and led to disorders of glucose and lipid metabolism in IR-

收稿日期: 2025-12-28 接受日期: 2026-03-17

国家重点研发计划(批准号: 2022YFF1100601、2023YFF1104301、2023YFF1104305)和国家自然科学基金(批准号: 82370809)资助的课题

\*通信作者。Tel: 15301516836, E-mail: fengzhang@jiangnan.edu.cn

Received: December 28, 2025 Accepted: March 17, 2026

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (Grant No.2022YFF1100601, 2023YFF1104301, 2023YFF1104305) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82370809)

\*Corresponding author. Tel: +86-15301516836, E-mail: fengzhang@jiangnan.edu.cn

HepG2 cells. At the molecular mechanism level, malonyl-CoA intervention could increase the level of protein Kmal (lysine malonylation) in IR-HepG2 cells, downregulate the expression of AMPK $\alpha$  protein and p-AMPK $\alpha$ , and inhibit the PI3K/Akt signaling pathway; inhibit the expression of the anti-apoptotic protein Bcl-2 ( $P < 0.01$ ), and promote cell apoptosis, thereby exacerbating insulin resistance in IR-HepG2 cells. In conclusion, malonyl-CoA can cause disorders of glucose and lipid metabolism in IR-HepG2 cells, affect cell apoptosis, increase the level of protein Kmal, inhibit the PI3K/Akt pathway, and induce cell apoptosis, thus exacerbating IR-HepG2 cells insulin resistance.

**Keywords** malonyl-CoA; IR-HepG2; insulin resistance; glucose metabolism; fatty acid metabolism; PI3K/Akt

糖尿病是一种以长期血糖升高为特征的慢性代谢性疾病<sup>[1]</sup>。最新统计数据显示,2023年我国年龄标准化糖尿病总体患病率达13.7%,患病人数约2.33亿。相比2005年,患病人数增幅达163%<sup>[2-3]</sup>。该病的核心病理机制为胰岛素抵抗,即机体细胞(尤其是肌肉、脂肪和肝脏细胞)对胰岛素信号敏感性下降,导致胰岛素相对不足,从而引起葡萄糖利用障碍<sup>[4]</sup>。近年来,蛋白质翻译后修饰及其底物在糖尿病发生发展中的作用日益受到关注。研究表明,在2型糖尿病小鼠肝脏中,赖氨酸丙二酰化水平普遍升高,并涉及多种关键代谢酶(包括G6PI、LDHA、FBP1、10-FTHFDH以及GSTs家族蛋白)的功能改变<sup>[5]</sup>;在*Sirt5*基因敲除小鼠肝脏中,糖酵解关键酶GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)的丙二酰化水平显著升高,酶活性受到抑制,进而导致糖酵解通量下降<sup>[6]</sup>。作为丙二酰化修饰的丙二酰化供体,丙二酰辅酶A(malonyl-CoA)可能在这一过程中扮演重要角色。

丙二酰辅酶A是细胞代谢中的关键中间产物,尤其在脂肪酸代谢中处于核心地位。它主要由乙酰辅酶A在乙酰辅酶A羧化酶的催化下羧化生成,是长链脂肪酸合成所必需的直接二碳单位供体。此外,丙二酰辅酶A还是肉碱脂酰转移酶I的强效抑制剂,能阻止脂肪酸进入线粒体发生 $\beta$ -氧化,从而在能量充足条件下促进脂肪酸合成,同时抑制其 $\beta$ -氧化,使脂肪酸代谢偏向合成方向。然而,现有研究多聚焦于丙二酰化修饰本身,对丙二酰辅酶A的直接作用尚未充分探讨。

基于以上背景,本研究提出假设:过量的丙二酰辅酶A可能通过影响细胞糖代谢与脂质代谢、调控相关信号通路以及诱导细胞凋亡等过程,进而加剧细胞胰岛素抵抗。为验证这一假说,本研究采用高糖联合高浓度胰岛素建立胰岛素抵抗细胞模型,并使用不同浓度丙二酰辅酶A进行干预。通过整体

表型及转录组分析评估其干预效果,进一步运用分子生物学技术检测AMPK通路、PI3K/Akt通路及细胞凋亡相关蛋白的表达变化。本研究旨在阐明丙二酰辅酶A对胰岛素抵抗的影响机制,为糖尿病治疗提供新的见解。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验细胞

人肝母细胞瘤细胞(HepG2)购自武汉普诺赛生命科技有限公司(货号:CL-0103)。

### 1.2 主要试剂

丙二酰辅酶A锂盐(货号:M4263-5MG)购自德国Merck公司;pan-Akt(货号:ab8805)购自英国Abcam公司;p-Akt(Thr308)、p-Akt(Ser473)、PI3K、p-AMPK $\alpha$ (Thr172)(货号:13038、9271、4292、2535S)购自美国Cell Signaling Technology公司;AMPK $\alpha$ 、B细胞淋巴瘤因子2(B-cell lymphoma 2, Bcl-2)、胰岛素受体底物1(insulin receptor substrate 1, IRS-1)、胰岛素受体(insulin receptor, INSR)、葡萄糖转运蛋白4(glucose transporter type 4, GLUT4)、 $\beta$ -actin(货号:10929-2-AP、26593-1-AP、17509-1-AP、84467-2-RR、66846-1-Ig、66009-1-Ig)购自武汉三鹰生物技术有限公司;NF- $\kappa$ B(货号:AF1234)购自上海碧云天生物技术股份有限公司;HRP标记的二抗(货号:AS115)购自武汉爱博泰克生物科技有限公司;Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒(货号:E-CK-A211)购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;葡萄糖测定试剂盒、甘油三酯(triglyceride, TG)测定试剂盒(货号:A154-1-1、A110-1-1)购自南京建成生物工程研究所。

### 1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养与胰岛素抵抗细胞模型建立 细胞常规培养于含4.5 g/L葡萄糖的高糖DMEM完全培养基(含10%胎牛血清及1%青霉素-链霉素双抗溶液)

中。细胞置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中孵育, 每2 d更换1次新鲜完全培养基。当细胞融合度达80%~90%时, 以1:3的比例进行消化传代。所有实验均选用处于对数生长期的细胞进行。

为构建胰岛素抵抗细胞模型(IR-HepG2), 采用高糖培养基联合高浓度胰岛素长期处理的诱导策略<sup>[7]</sup>。该模型通过持续高浓度胰岛素暴露, 引发胰岛素信号通路的负反馈调节, 从而模拟下游信号转导障碍的病理状态。具体步骤如下: 将HepG2细胞以 $1 \times 10^5$ /孔的密度接种于12孔板中, 培养24 h待细胞贴壁并进入生长稳定期后, 更换为无血清培养基进行同步化处理。随后, 分别加入终浓度为 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-9}$  mol/L的胰岛素溶液, 继续培养48 h。诱导结束后, 收集各孔细胞培养上清, 采用葡萄糖氧化酶法测定上清中葡萄糖残留量, 以评估细胞对葡萄糖的消耗能力, 从而验证胰岛素抵抗模型的建立。

将HepG2细胞分别使用含不同浓度 malonyl-CoA的培养基进行干预。具体分组为: 0  $\mu$ mol/L(对照组)、20  $\mu$ mol/L、50  $\mu$ mol/L、100  $\mu$ mol/L<sup>[8]</sup>。每组分别处理24 h和48 h。待IR-HepG2细胞模型成功建立后, 弃去上清, 进行与正常HepG2细胞相同的分组干预。即IR-HepG2细胞分为: 0  $\mu$ mol/L(模型对照组)、20  $\mu$ mol/L、50  $\mu$ mol/L、100  $\mu$ mol/L malonyl-CoA组。每组同样分别处理24 h和48 h。

**1.3.2 细胞活力测定** 将细胞以 $4 \times 10^4$ /孔的密度均匀接种于96孔板各孔中, 置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>细胞培养箱内常规培养24 h, 使细胞充分贴壁生长。随后弃去原培养液, 每孔加入100  $\mu$ L含10% CCK-8试剂的新鲜完全培养基。将96孔板置于培养箱中避光孵育1 h, 随后使用酶标仪于450 nm波长下测定各孔的吸光度(D)值, 以评估细胞活力。

**1.3.3 葡萄糖摄入量测定** 将细胞以 $1 \times 10^5$ /孔的密度接种于12孔板中, 置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱内常规培养。待细胞充分贴壁后, 继续培养至融合度达70%~80%。弃去原培养基, 使用预温的PBS轻柔清洗细胞2次, 随后更换为无血清培养基, 继续培养2 h以同步化细胞并降低基础代谢干扰。饥饿处理后, 弃去无血清培养基, 加入含100  $\mu$ mol/L 2-NBDG的无血清无糖培养基, 于37 °C避光孵育30 min。孵育结束后, 弃去含2-NBDG的培养基, 用预冷PBS洗涤细胞3次以去除未摄取的探针。最后, 使用倒置荧光显微镜观察并拍摄各组细胞荧光图像, 通过图像分析软

件比较各孔的平均荧光强度, 以评估细胞对葡萄糖的摄取能力。

**1.3.4 甘油三酯测定** 收集各组细胞, 经预冷的PBS洗涤后, 加入适量细胞裂解液于冰上裂解30 min。将裂解液移至离心管中, 4 °C、1 000 r/min离心10 min, 取上清液作为待测样本。随后, 在微孔板中依次加入样本、标准品及试剂盒工作液, 充分混匀后, 于37 °C条件下避光孵育10 min。最后, 使用酶标仪测定各孔吸光度(D)值, 并根据标准曲线计算细胞内甘油三酯含量。

**1.3.5 细胞凋亡测定** 采用Annexin V-FITC/PI双染流式细胞术定量检测细胞凋亡。将经干预处理的细胞用不含EDTA的胰酶于37 °C消化5 min, 收集细胞并将其转移至离心管中, 4 °C、1 000 r/min离心10 min, 弃上清后用PBS洗涤, 重复2次, 最后将细胞转移至流式管中。设置空白管、单染管及双染管, 分别加入相应量的Annexin V-FITC及PI染料, 轻轻混匀, 室温避光孵育15 min, 并于1 h内用流式细胞仪进行检测。

**1.3.6 GO富集分析和KEGG通路富集分析** 收集IR-HepG2干预48 h的细胞, 使用TransZol up试剂盒(北京全式金生物有限公司)提取样本总RNA, 通过1.5%琼脂糖凝胶电泳检测RNA完整性, NanoDrop检测其浓度及纯度。利用带有Oligo(dT)的磁珠富集mRNA。采用VAHTS Universal V8 RNA-seq Library Prep Kit for Illumina试剂盒构建转录组文库, 操作步骤包括: RNA片段化、第一链cDNA合成、第二链cDNA合成、末端补平加A、连接Y形接头、磁珠纯化及PCR富集。文库经Qubit 4.0定量后, 在Illumina NovaSeq平台进行PE150测序。对IR-HepG2细胞(0  $\mu$ mol/L、100  $\mu$ mol/L处理)的转录组数据进行GO富集分析与KEGG通路富集分析。GO富集分析基于差异表达基因, 使用clusterProfiler软件进行, 覆盖生物过程(biological process, BP)、细胞组分(cellular component, CC)和分子功能(molecular function, MF)三大类别, 以FDR(false discovery rate)<0.05为显著富集阈值。KEGG通路富集分析采用clusterProfiler工具, 将差异基因映射至KEGG数据库, 筛选显著富集的代谢与信号通路(FDR<0.05)。

**1.3.7 细胞蛋白质免疫印迹(Western blot, WB)** 收集IR-HepG2干预48 h的细胞, 使用含有磷酸酶抑制剂及苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)的RIPA裂解液在冰上裂解30 min。裂解后

4 °C、12 000 r/min离心20 min收集上清。采用BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度,并以5×上样缓冲液混匀蛋白样品,在95 °C金属浴中孵育10 min,使蛋白样本完全变性。取等质量蛋白经SDS-PAGE电泳将蛋白分离,然后转膜至PVDF膜上,5%脱脂牛奶室温封闭2 h,分别加入pan-Akt(1:1 000)、p-Akt(Thr308)(1:1 000)、p-Akt(Ser473)(1:1 000)、PI3K(1:1 000)、AMPK $\alpha$ (1:1 000)、p-AMPK $\alpha$ (Thr172)(1:1 000)、Bcl-2(1:1 000)、IRS-1(1:20 000)、INSR(1:1 000)、GLUT4(1:1 000)、NF- $\kappa$ B(1:1 000)及内参 $\beta$ -actin(1:8 000)一抗4 °C孵育过夜,加HRP标记的二抗(1:10 000)室温孵育2 h,ECL化学发光显影。

#### 1.4 统计学分析

所有实验数据均以均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示。采用适当的统计软件进行数据分析。两组间比较使用独立样本 $t$ 检验;多组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 HepG2细胞胰岛素抵抗模型建立

与对照组相比,处理细胞48 h后,4.5 g/L的葡萄糖

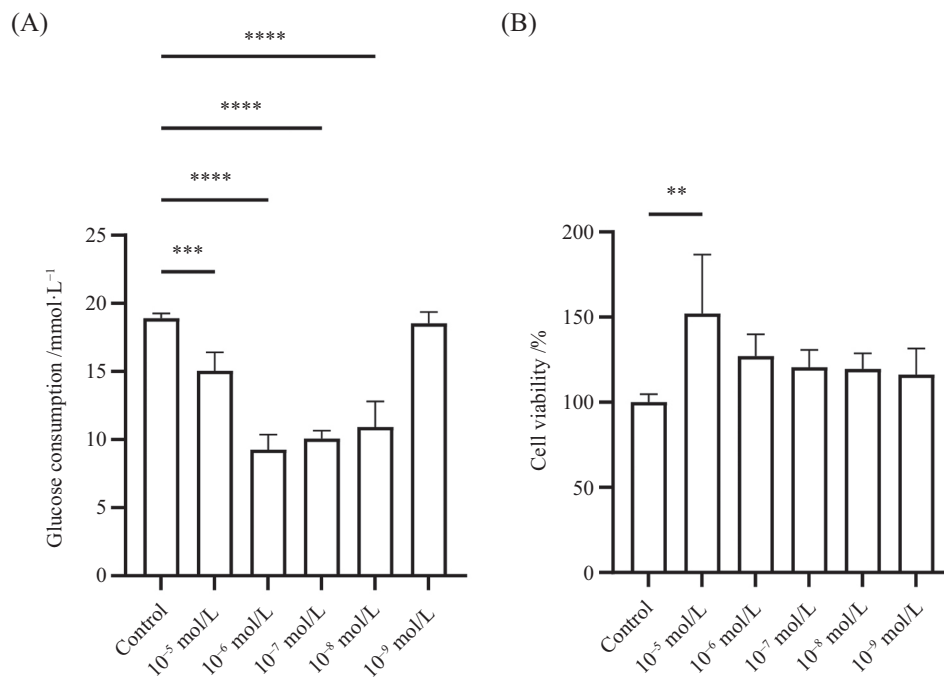
培养基联合 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$  mol/L胰岛素可以显著降低HepG2细胞的葡萄糖消耗量,其中 $10^{-6}$  mol/L胰岛素造模效果最明显(图1A),且对细胞活性没有影响(图1B)。因此,以4.5 g/L的葡萄糖培养基联合 $10^{-6}$  mol/L胰岛素造模48 h可以成功建立HepG2细胞胰岛素抵抗模型(IR-HepG2)。

### 2.2 丙二酰辅酶A对HepG2细胞活力的影响

评估不同浓度丙二酰辅酶A(0  $\mu$ mol/L、20  $\mu$ mol/L、50  $\mu$ mol/L、100  $\mu$ mol/L)和处理时间(24 h、48 h)对HepG2细胞活力的影响(图2)。结果表明,所选浓度(0、20、50、100  $\mu$ mol/L)和干预时间(24、48 h)对细胞活力均无显著影响,可用于后续实验。

### 2.3 丙二酰辅酶A降低IR-HepG2细胞葡萄糖消耗

用不同浓度(0、20、50、100  $\mu$ mol/L)丙二酰辅酶A分别处理HepG2细胞和IR-HepG2细胞24 h及48 h,检测葡萄糖消耗与摄取水平。结果显示,在HepG2细胞中,丙二酰辅酶A干预24 h即可显著增加葡萄糖消耗;干预48 h时,20  $\mu$ mol/L处理组仍能维持这一效应,但随着浓度升高(50  $\mu$ mol/L、100  $\mu$ mol/L),该促进作用逐渐减弱乃至消失(图3A)。在IR-HepG2细胞中,丙二酰辅酶A则始终显著降低葡萄糖消耗,



A: 不同浓度胰岛素造模的HepG2细胞的葡萄糖消耗量。B: 不同浓度胰岛素造模的HepG2细胞的细胞活力。\*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ , \*\*\*\* $P<0.0001$ 。

A: glucose consumption of HepG2 cells modeled with different concentrations of insulin. B: cell viability of HepG2 cells modeled with different concentrations of insulin. \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ , \*\*\*\* $P<0.0001$ 。

图1 IR-HepG2细胞模型的建立  
Fig.1 Establishment of the IR-HepG2 cell model

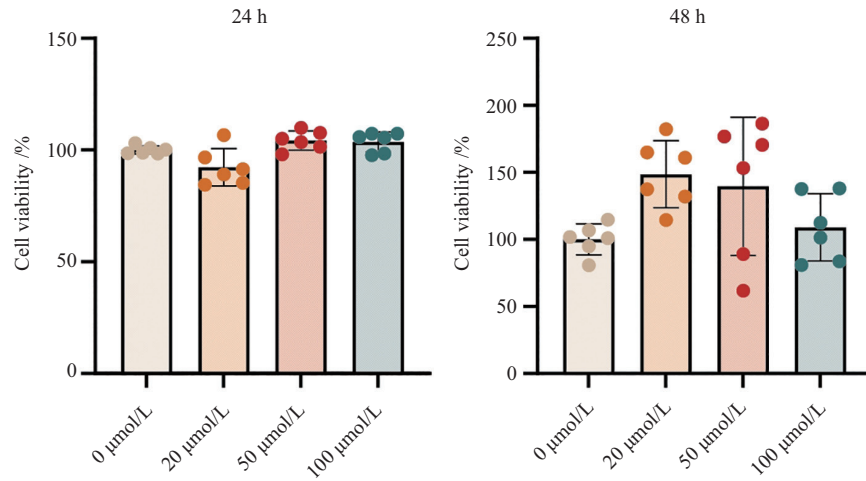
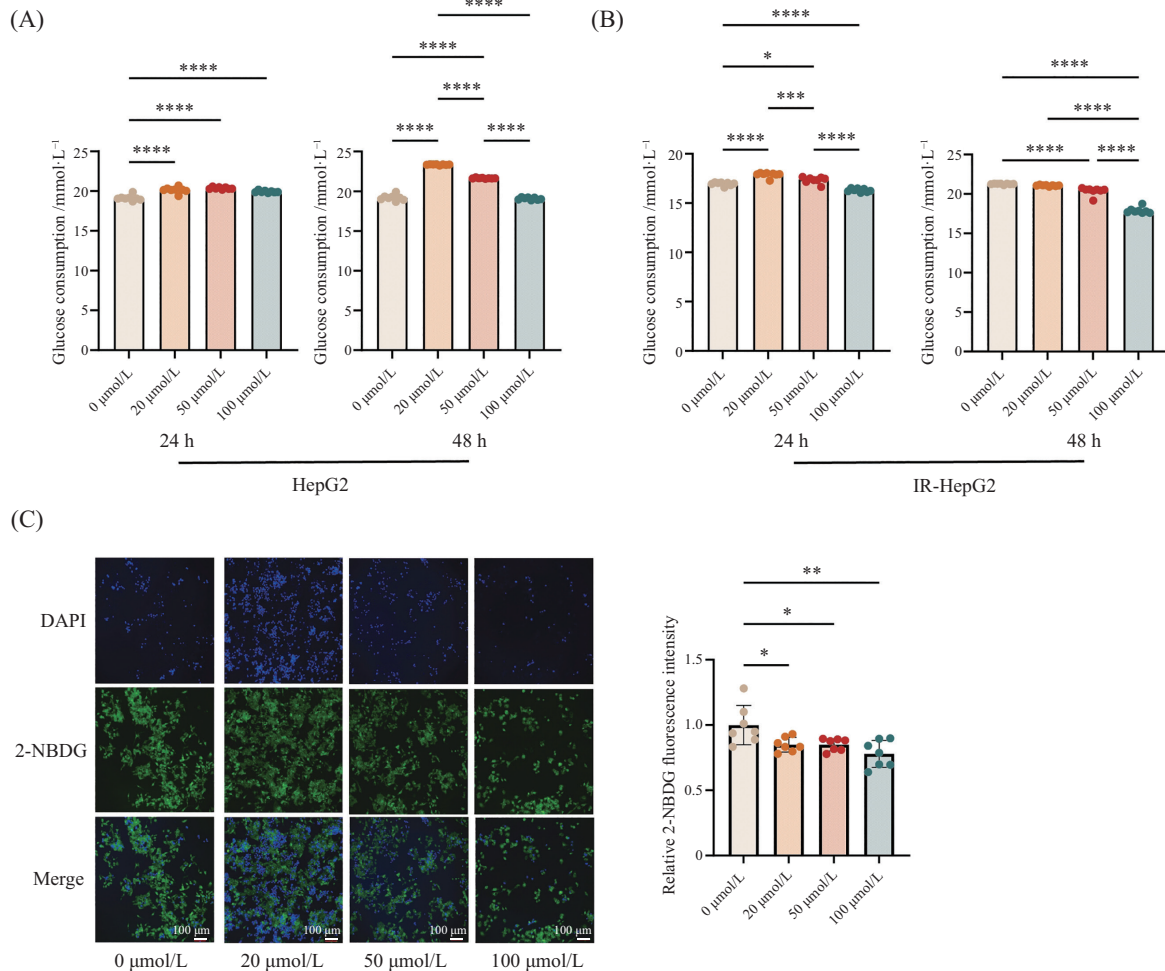


图2 丙二酰辅酶A对HepG2细胞活力的影响  
Fig.2 Effect of malonyl-CoA on the viability of HepG2 cells



A: 不同浓度丙二酰辅酶A处理24 h和48 h对HepG2细胞的葡萄糖消耗量的影响。B: 不同浓度丙二酰辅酶A处理24 h和48 h对IR-HepG2细胞的葡萄糖消耗量的影响。C: 不同浓度丙二酰辅酶A处理48 h对IR-HepG2细胞的葡萄糖摄入量的影响。 $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ ,  $***P<0.001$ ,  $****P<0.0001$ 。

A: the effects of different concentrations of malonyl-CoA on glucose consumption of HepG2 cells treated for 24 h and 48 h. B: the effects of different concentrations of malonyl-CoA on glucose consumption of IR-HepG2 cells treated for 24 h and 48 h. C: the effects of different concentrations of malonyl-CoA on glucose intake of IR-HepG2 cells treated for 48 h.  $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ ,  $***P<0.001$ ,  $****P<0.0001$ 。

图3 丙二酰辅酶A对HepG2和IR-HepG2细胞葡萄糖消耗与摄入的影响  
Fig.3 Effect of malonyl-CoA on glucose consumption and intake in HepG2 and IR-HepG2 cells

其中以干预48 h的100  $\mu\text{mol/L}$ 处理组变化最为明显(图3B)。葡萄糖摄取水平(以2-NBDG相对荧光强度反映)的变化趋势与葡萄糖消耗基本一致(图3C)。葡萄糖消耗与摄取是评估细胞胰岛素抵抗程度的关键指标。综上,丙二酰辅酶A作为葡萄糖代谢下游及脂质合成通路的起始分子,短期(24 h)干预可促进HepG2细胞对葡萄糖的利用;但长期(48 h)干预时,仅较低浓度(20  $\mu\text{mol/L}$ )仍维持促进效应,高浓度则无促进作用。而在IR-HepG2细胞中,无论干预时间长短或剂量高低,丙二酰辅酶A均能抑制葡萄糖的消耗与摄取,从而加剧细胞的胰岛素抵抗。

#### 2.4 丙二酰辅酶A促进IR-HepG2细胞甘油三酯积累

在HepG2细胞中,丙二酰辅酶A处理24 h可促进甘油三酯积累,但在48 h时这一效应发生逆转(图4A)。与之相反,在IR-HepG2细胞中,经丙二酰辅酶A处理24 h后,甘油三酯含量减少,而至48 h时则出现升高(图4B)。在正常细胞中,长期丙二酰辅酶A积累可能激活AMPK,从而磷酸化并抑制ACC(acetyl-coa carboxylase),减少丙二酰辅酶A生成,形成负反馈。IR-HepG2细胞中AMPK活性可能已受损,导致其负反馈调节失效,因此长期药物处理反而持续促进脂质合成。上述结果表明,在胰岛素抵抗状态下,丙二酰辅酶A可能通过升高甘油三酯水平进而促进

脂质积累,从而加剧胰岛素抵抗。

#### 2.5 丙二酰辅酶A促进IR-HepG2细胞凋亡

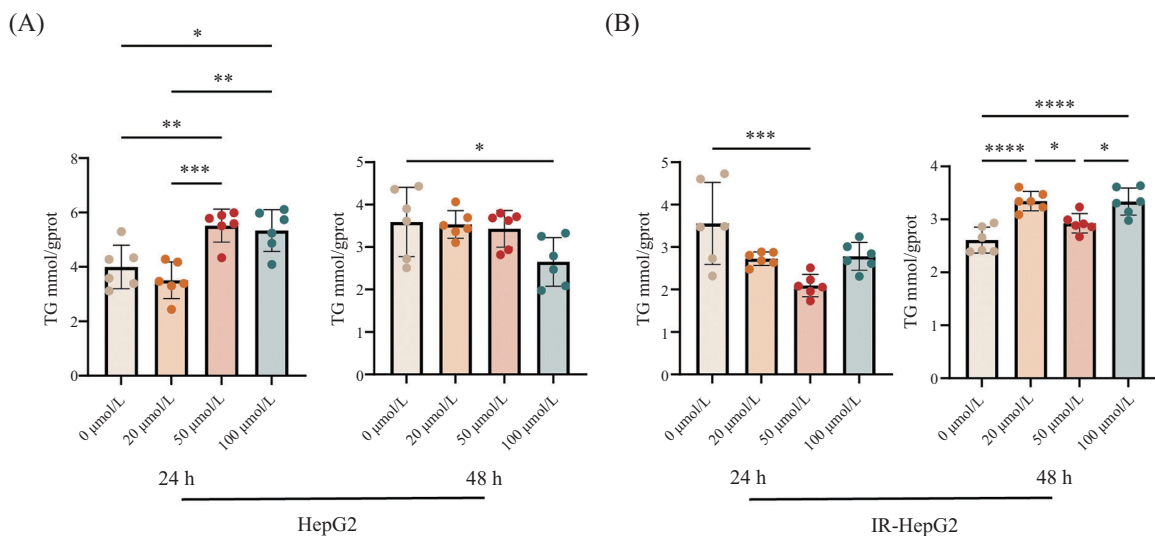
对HepG2细胞和IR-HepG2细胞进行丙二酰辅酶A干预24 h可显著抑制细胞凋亡(图5A);而干预48 h对HepG2细胞的凋亡无明显影响,但在IR-HepG2细胞中,细胞凋亡水平则有上升的趋势(图5B)。

#### 2.6 GO功能富集分析和KEGG通路富集分析

对IR-HepG2细胞给予100  $\mu\text{mol/L}$ 丙二酰辅酶A干预48 h后,以该处理组的细胞进行GO功能富集分析与KEGG通路富集分析。其中BP主要与肌动蛋白结合、离子通道活性、信号受体激活剂活性、G蛋白偶联受体结合、受体配体活性主动跨膜转运蛋白活性等相关,CC主要与膜筏、突触膜、细胞膜、细胞质等相关,MF主要与细胞阳离子稳态、炎症反应的调节、细胞间黏附的调节、细胞因子生成的正向调节等相关(图6A)。KEGG通路富集分析主要涉及神经活性配体-受体相互作用、钙信号通路、胰液分泌通路、癌细胞中的蛋白聚糖信号通路、I型糖尿病通路等(图6B)。

#### 2.7 丙二酰辅酶A通过抑制PI3K/Akt信号通路加剧IR-HepG2细胞胰岛素抵抗

基于上述结果,丙二酰辅酶A干预48 h对IR-HepG2细胞的影响最为显著,因此选取该条件进行后续WB。与对照组相比,丙二酰辅酶A干预显著提高了

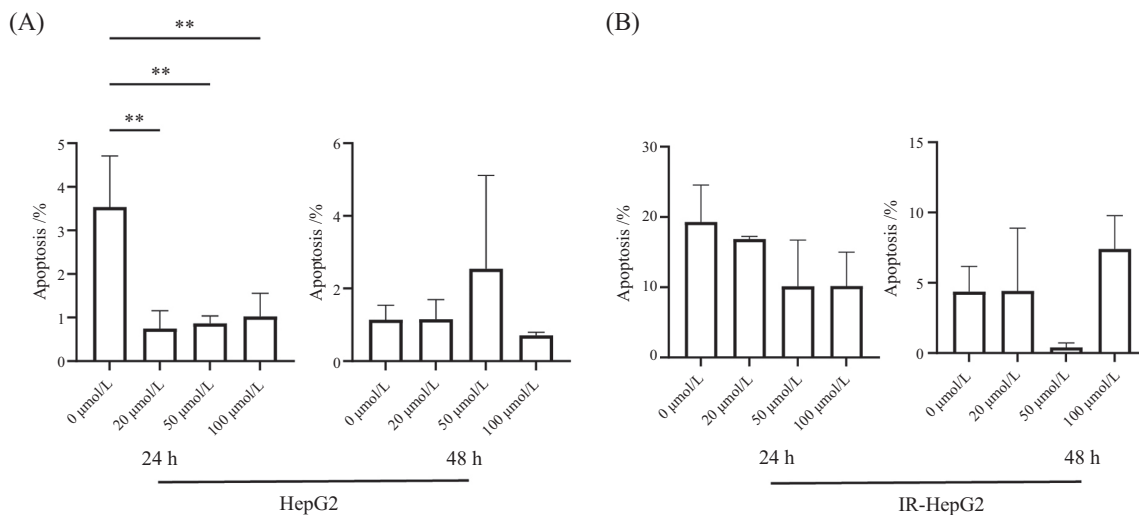


A: 不同浓度丙二酰辅酶A处理24 h和48 h对HepG2细胞的甘油三酯含量的影响。B: 不同浓度丙二酰辅酶A处理24 h和48 h对IR-HepG2细胞的甘油三酯的含量的影响。\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ , \*\*\*\* $P<0.0001$ 。

A: the effects of different concentrations of malonyl-CoA on TG contents in HepG2 cells treated for 24 h and 48 h. B: the effects of different concentrations of malonyl-CoA on TG contents in IR-HepG2 cells treated for 24 h and 48 h. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ , \*\*\*\* $P<0.0001$ 。

图4 丙二酰辅酶A对HepG2细胞和IR-HepG2细胞TG含量的影响

Fig.4 Effects of malonyl-CoA on TG contents in HepG2 cells and IR-HepG2 cells



A: 不同浓度丙二酰辅酶A处理24 h和48 h对HepG2细胞凋亡影响。B: 不同浓度丙二酰辅酶A处理24 h和48 h对IR-HepG2细胞凋亡影响。  
\*\* $P < 0.01$ 。

A: the effects of different concentrations of malonyl-CoA on apoptosis in HepG2 cells treated for 24 h and 48 h. B: the effects of different concentrations of malonyl-CoA on apoptosis in IR-HepG2 cells treated for 24 h and 48 h. \*\* $P < 0.01$ .

图5 各组细胞凋亡的情况

Fig.5 Apoptosis of cells in each group

蛋白质丙二酰化(Kmal)水平(图7A)。在100 μmol/L丙二酰辅酶A处理下,虽然总AMPK蛋白表达无显著变化,但p-AMPKα(Ser172)的蛋白表达水平明显降低( $P < 0.01$ )。Akt总蛋白及其磷酸化形式p-Akt(Thr473与Ser308)的表达水平均受到显著抑制( $P < 0.01$ ),且PI3K蛋白表达水平也随丙二酰辅酶A浓度升高而下降,表明PI3K/Akt信号通路受到抑制。与此同时,丙二酰辅酶A还抑制了该通路上游的INSR、IRS-1以及下游的GLUT4的表达。此外,抗凋亡蛋白Bcl-2的表达也显著下调( $P < 0.01$ )(图7B)。以上结果提示,丙二酰辅酶A可能通过抑制PI3K/Akt信号通路的活性,并下调该通路中相关蛋白的表达,促进细胞凋亡,进而加剧IR-HepG2细胞的胰岛素抵抗。

### 3 讨论

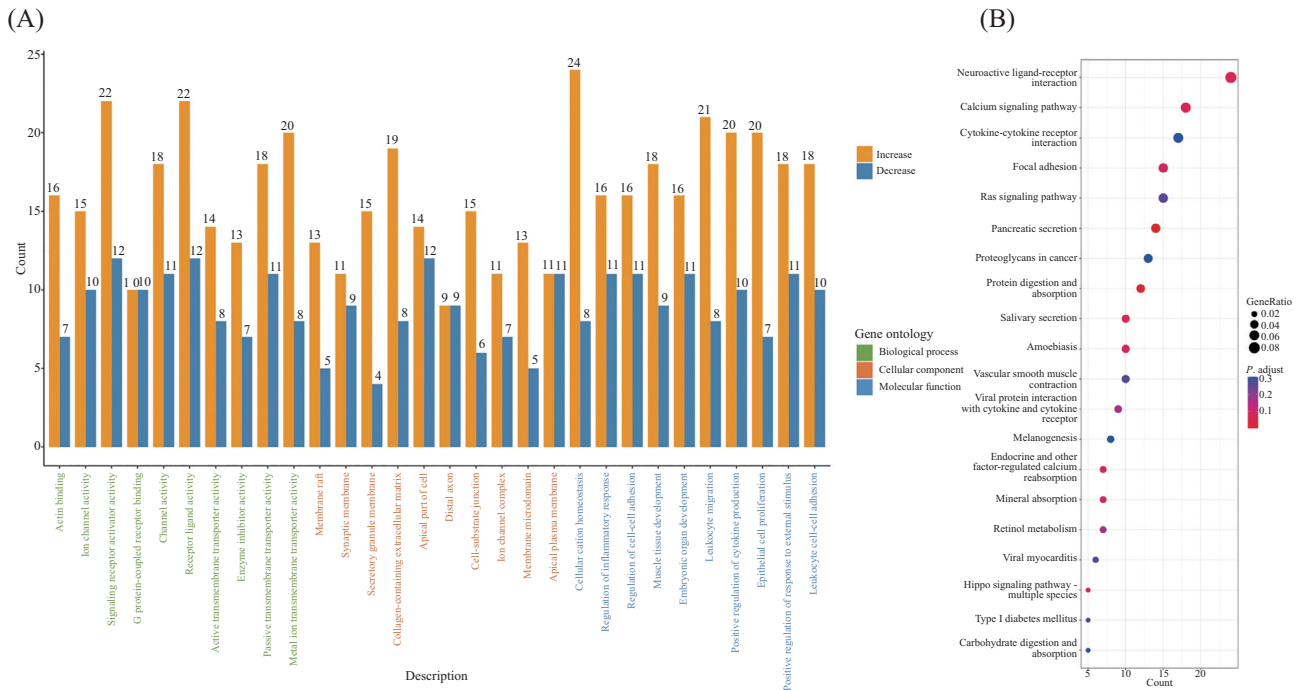
本研究系统探讨了丙二酰辅酶A对高糖联合高胰岛素诱导的IR-HepG2细胞胰岛素抵抗的影响及其潜在分子机制。结果显示,外源性丙二酰辅酶A干预可显著降低IR-HepG2细胞的葡萄糖消耗与摄取,促进细胞内甘油三酯积累,并抑制关键的胰岛素信号通路相关蛋白表达,提示丙二酰辅酶A在胰岛素抵抗的发生发展中具有促进作用。

丙二酰辅酶A作为脂肪酸合成的关键前体和能量代谢调节分子,其水平的异常升高已被报道与代

谢紊乱相关。有报道称丙二酰辅酶A可以调控山羊肌内前体脂肪细胞脂质沉积<sup>[8]</sup>。本研究发现,丙二酰辅酶A处理显著提升了IR-HepG2细胞中蛋白质赖氨酸丙二酰化水平,这可能是其调节细胞代谢与信号转导的重要机制之一。蛋白质赖氨酸丙二酰化作为一种新兴的翻译后修饰<sup>[9]</sup>,在糖脂代谢、胰岛素信号等生理与病理过程中发挥调控作用。本研究首次在IR-HepG2细胞中证实丙二酰辅酶A可通过促进该修饰,进而干扰胰岛素信号转导。

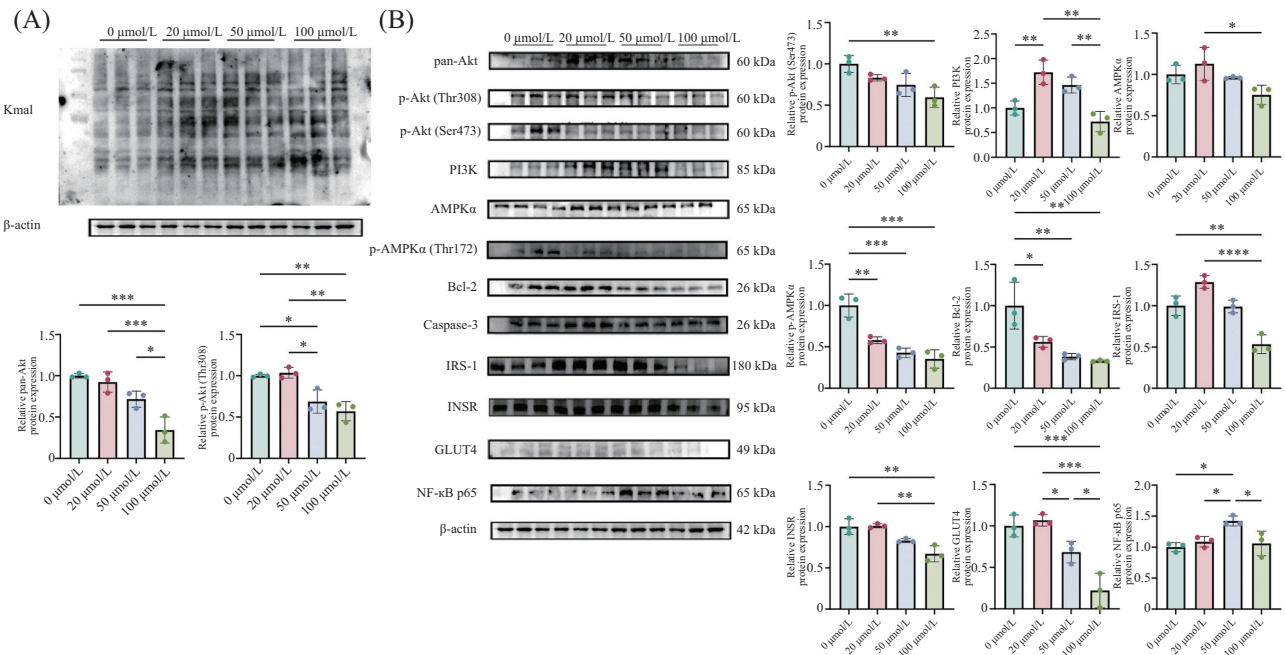
在分子机制层面,丙二酰辅酶A显著抑制了PI3K/Akt信号通路的活性,表现为Akt总蛋白及其磷酸化形式(Thr308、Ser473)以及PI3K蛋白表达的下调。PI3K/Akt通路是胰岛素信号转导的核心途径<sup>[10]</sup>,其抑制直接导致下游GLUT4表达水平降低<sup>[11]</sup>,葡萄糖转运能力减弱,从而解释了我们观察到的葡萄糖摄取与消耗下降。同时,上游信号分子INSR与IRS-1的表达也受到抑制,进一步降低了胰岛素信号的转导效率<sup>[12]</sup>。此外,丙二酰辅酶A还降低了p-AMPKα(Thr172)水平,提示其可能干扰细胞的能量感受与代谢平衡机制。AMPK作为细胞能量状态的关键调节因子,其活性下降可能导致脂肪酸氧化抑制与合成增强<sup>[13]</sup>,与本研究中观察到的甘油三酯积累现象一致。

值得注意的是,丙二酰辅酶A在正常HepG2细



A: GO功能富集分析柱状图。B: KEGG功能富集分析气泡图。  
A: bar plot of GO functional enrichment analysis. B: bubble plot of KEGG functional enrichment analysis.

图6 差异表达基因的功能富集分析  
Fig.6 Functional enrichment analysis of differentially expressed genes



A: 蛋白质赖氨酸丙二酰化的蛋白条带。B: pan-Akt、p-Akt(Thr308)、p-Akt(Ser473)、PI3K、AMPKα、p-AMPKα、Bcl-2、Caspase-3、IRS-1、INSR、GLUT4、NF-κB蛋白条带及表达的定量分析,以β-actin为内参蛋白。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ 。  
A: protein bands of protein lysine malonylation. B: protein bands and quantitative analysis of pan-Akt, p-Akt (Thr308), p-Akt (Ser473), PI3K, AMPKα, p-AMPKα, Bcl-2, Caspase-3, IRS-1, INSR, GLUT4, and NF-κB expression, with β-actin as the internal reference protein. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ 。

图7 胰岛素抵抗相关蛋白的表达  
Fig.7 Expression of insulin resistance-related proteins

胞与IR-HepG2细胞中表现出时间依赖性的差异效应。在正常细胞中,短期(24 h)处理可增加葡萄糖消耗,而长期(48 h)则呈现抑制作用,这可能反映了细胞在代谢压力下的适应性调节。相比之下,在IR-HepG2细胞中,丙二酰辅酶A始终表现为抑制葡萄糖代谢并促进脂质堆积,提示胰岛素抵抗状态下细胞对丙二酰辅酶A的代谢响应机制发生紊乱,AMPK介导的负反馈调节可能失效。

此外,本研究还发现丙二酰辅酶A可显著下调抗凋亡蛋白Bcl-2的表达,提示其可能通过诱导细胞凋亡,进一步加剧胰岛素抵抗状态下的肝细胞功能损伤<sup>[14]</sup>。在胰岛素抵抗背景下,肝细胞已处于代谢应激状态,对外源性刺激更为敏感;丙二酰辅酶A作为脂质合成通路的起始代谢物,其在细胞内的异常积累可能通过诱导脂毒性、氧化应激及内质网应激等多重机制,进一步激活凋亡信号通路。因此,丙二酰辅酶A不仅可通过降低葡萄糖摄取与消耗直接加剧胰岛素抵抗,还可通过下调Bcl-2间接削弱肝细胞的功能储备与代谢适应性。这一发现将胰岛素抵抗状态下代谢中间产物积累与细胞存活调控机制相联结,提示丙二酰辅酶A可能在肝细胞代谢功能障碍进程中扮演双重调控角色。未来研究可进一步探讨丙二酰辅酶A调控Bcl-2表达的具体分子机制,以及阻断凋亡通路是否能够逆转其对胰岛素抵抗的恶化效应。综上,本研究为理解胰岛素抵抗与肝细胞代谢功能障碍之间的复杂关联提供了新的视角,也为靶向代谢-凋亡交叉通路干预非酒精性脂肪性肝病及2型糖尿病等相关代谢疾病提供了潜在思路。

本研究也存在一定局限性。首先,所有实验均在细胞模型中进行,其结果仍需在动物模型及临床样本中进一步验证。其次,丙二酰辅酶A影响蛋白质丙二酰化的具体靶点及其功能后果尚未被完全阐明,未来可通过蛋白质组学技术筛选关键修饰蛋白并进行功能验证。此外,丙二酰辅酶A是否可通过其他信号通路(如mTOR等)参与胰岛素抵抗的调控亦值得深入探讨。

综上所述,本研究表明丙二酰辅酶A可通过增强蛋白质赖氨酸丙二酰化、抑制PI3K/Akt信号通路、干扰AMPK活性及促进细胞凋亡等多种机制,加剧IR-HepG2细胞的胰岛素抵抗。这些发现不仅深化了对丙二酰辅酶A代谢调控功能的理解,也为胰岛

素抵抗及相关代谢性疾病的干预提供了潜在的分子靶点。未来研究可围绕丙二酰辅酶A代谢调控网络及其在肝脏胰岛素抵抗中的作用展开,为糖尿病及其并发症的防治提供新思路。

## 参考文献 (References)

- [1] 中国2型糖尿病防治指南(2010年版)[J]. 中国糖尿病杂志(Chinese guidelines for the prevention and treatment of type 2 diabetes (2010 edition) [J]. Chinese Journal of Diabetes), 2012, 20(1): 81-117.
- [2] ZHOU Y C, LIU J M, ZHAO Z P, et al. The national and provincial prevalence and non-fatal burdens of diabetes in China from 2005 to 2023 with projections of prevalence to 2050 [J]. *Mil Med Res*, 2025, 12(1): 28.
- [3] XU Y, LU J L, LI M, et al. Diabetes in China part 1: epidemiology and risk factors [J]. *Lancet Public Health*, 2024, 9(12): e1089-e1097.
- [4] 金成, 赵瑛, 张颖, 等. 胰岛素抵抗与糖脂代谢[J]. 中西医结合心脑血管病杂志(JIN C, ZHAO Y, ZHANG Y, et al. Insulin resistance and metabolism of glucose and lipid [J]. Chinese Journal of Integrative Medicine on Cardio-Cerebrovascular Disease), 2004(9): 537-40.
- [5] DU Y P, CAI T X, LI T T, et al. Lysine malonylation is elevated in type 2 diabetic mouse models and enriched in metabolic associated proteins [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2015, 14(1): 227-36.
- [6] NISHIDA Y, RARDIN M J, CARRICO C, et al. SIRT5 regulates both cytosolic and mitochondrial protein malonylation with glycolysis as a major target [J]. *Mol Cell*, 2015, 59(2): 321-32.
- [7] 覃川, 侯成香, 王鋆柯, 等. 基于Nrf2信号通路探讨 $\alpha$ -硫辛酸减轻IR-HepG2细胞氧化应激改善胰岛素抵抗[J]. 贵州医科大学学报(QIN C, HOU C X, WANG J K, et al. Exploring the alleviation of oxidative stress and improvement of insulinresistance in IR-HepG2 cells by  $\alpha$ -lipoic acid via the Nrf2 signaling pathway [J]. *Journal of Guizhou Medical University*), 2025, 50(8): 1132-43.
- [8] 黄维. 丙二酰辅酶A对山羊肌内脂肪沉积的调控作用研究[D]. 成都: 西南民族大学, 2021.
- [9] PENG C, LU Z K, XIE Z Y, et al. The first identification of lysine malonylation substrates and its regulatory enzyme [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2011, 10(12): M111.012658.
- [10] BURGERING B M, COFFER P J. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction [J]. *Nature*, 1995, 376(6541): 599-602.
- [11] 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.
- [12] SALTIEL A R, KAHN C R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism [J]. *Nature*, 2001, 414(6865): 799-806.
- [13] HARDIE D G. AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function [J]. *Genes Dev*, 2011, 25(18): 1895-908.
- [14] HOTAMISLIGIL G S. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease [J]. *Cell*, 2010, 140(6): 900-17.