



Original Article / 원저

비파엽의 핵수용체 관련 신규 약물 작용점 연구 : 만성 질환 치료 가능성

김민진, 김영우*, 박선동*

동국대학교 한의학과 방제학교실

Eriobotrya japonica inhibits the transactivation of nuclear orphan receptor : the possibility to treat the chronic diseases

Min-Jin Kim, Young Woo Kim*, Sun-Dong Park*

School of Korean Medicine, Dongguk University

ABSTRACT

Objectives : Oxidative damage has a variety of mechanism in the human organs including brain and liver. The purpose of this study is to examine the prevention against cellular damage, and the inhibitory effect on lipogenesis of the water extract of *Eriobotrya japonica* (EJE).

Methods : The effect of EJE on cell viability was assessed using the MTT assay. To investigate the mechanism of EJE's inhibition of lipogenesis, we analyzed the relevant proteins using immunoblot analysis.

Results : Induction of T0901317, a LXR agonist, significantly increased SREBP-1c expression, which was blocked by the pretreatment of EJE in the dose-dependent manners. This beneficial herb also regulated the genes related with SREBP-1c such as the acetyl-CoA carboxylase.

Conclusion : These results suggested that EJE might have a possibility of the treatment of chronic diseases as mediated with the inhibition of LXR α /SREBP-1c pathway.

Key words : *Eriobotrya japonica*, SREBP-1c, LXR α , Chronic disease.

I. Introduction

간 질환은 간의 기능 장애, 약물, 독소, 음주 등의 다양한 원인으로 인해 신체의 변화를 일으켜 여러 가지 질환을 함께 일으킨다. 특히, 간 독성을 일으키는 약물이나 독소에 의한 간 질환은 담즙 정체부터 시작해서 악성종양의 발생에 이르기까지 다양한 질환으로 나타날 수 있으며, 이들을 유형별로 구분하면 간세포 손상, 혈관 손상, 간염 및 섬유화, 담즙 정체로 5가지 양상으로 나타낼 수 있다¹⁾. 이 중에서 지방 간은 지방침윤에서 시작해 지방간염 및 간경변증에 이르는 일련의 과정으로 설명할 수 있으며, 최근 발생 기전과 예방 및 치료에 관한 많은 연구가 진행되고 있다²⁾.

지방간은 지방합성이 증가하거나 배출이 감소된 상태를 말하며, 주로 비만, 음주, 인슐린 비의존성 당뇨병, 고지혈증, 약물, 감염성 질환 등으로 인해 발병한다³⁾. 지방간은 크게 알코올성 지방간과 비알코올성 지방간으로 나눌 수 있으며, 두 질환의 원인이 명확히 다른 만큼 다양한 연구가 이루어지고 있다³⁾. 알코올성 지방간이 비알코올성 지방간에 비해 심혈관 대사성 증후군 및 심혈관 질환과 같은 성인병에 노출될 가능성이 높다⁴⁾는 연구 결과와 함께 이러한 결과는 오늘날 지방간이 단순한 조직학적 이상으로 무시할 수 없으며, 오히려 현재 진행되는 간 질환에 대한 중요한 발견이 될 수 있다는 것을 시사한다⁵⁾.

유전자 발현조절 방법 중, 핵 수용체(nuclear receptor)에 의한 조절방법은 스테로이드계 호르몬 작용의 핵심기전으로, 다양한 유전자 발현을 조절한다⁶⁾. 고아 핵 수용체(orphan nuclear receptor)는 아직 리간드(ligand)가 밝혀져 있지 않은 핵 수용체를 말하며, DNA 결합 부위가 없는 변형된 형태이다⁶⁾. 이것은 RAR, TR, ER, AR, GR, PPAR, LXR, CAR 등과 같은 다양한 핵 수용체를 포함해 다양한 전사인자들과도 밀접한 연관이 있으며⁷⁾, 핵 수용체 그룹이 조절하는 주된 표적 유전자들은 콜레스테롤 대사(CYP7A1, CYP8B1), 약물대사(CYP2A, 2B), 지질 대사(FAS, apolipoprotein) 및 당 대사(PEPCK, G6Pase) 관련 유전자 등

이 있다^{6,7)}. 핵 수용체를 향한 관심은 지질 항상성을 제어할 수 있는 잠재력을 가진 신약에 대한 치료 표적으로 사용될 가능성이 있다.

비파엽(*Eriobotrya japonica*, E)은 장미과에 속하는 비파나무의 잎으로, 예로부터 민간요법으로 기관지염, 부종, 진해, 거담, 이뇨, 갈증, 구토, 습진, 및 피부염 등에 효능이 있다고 알려져있어 잎을 달여 마신다⁸⁾. 비파엽 추출물 중 높은 함량을 가진 Kaempferol 및 quercetin은 항산화 효과를 보였으며⁹⁾, 비파엽과 관련된 생리활성 연구로는 산화질소(Nitric oxide, NO) 생성 억제 능력 측정을 통한 항염증 효과가 있으며¹⁰⁾, 항암 효과¹¹⁾, 항바이러스효과¹²⁾에 대한 연구가 보고되었다. 이처럼 비파엽은 다양한 약리적인 효과를 가지고 있어 염증이나 종양 등의 치료에 주로 사용된다⁸⁾. 특히, 비파엽 추출물은 지방분해효소인 lipase의 분비를 촉진하여, HFD 마우스에 지방분해 효과가 있다고 보고 되었으며¹³⁾, 간 손상 방지에 효과가 있는 것으로 알려져있다⁸⁻¹³⁾.

본 연구는 비파엽 추출물이 생리활성 성분과 화합물이 다량 함유되어 있어 새로운 기능성 소재로의 개발 잠재성이 높다고 판단하여 비파엽 추출물의 간 손상 방지 효과에 중점을 두고, 지방 생성에 대한 억제 효과를 세포실험으로 살펴보고자 한다.

II. Materials and Methods

1. Reagents

Cell Signalling Technology (Beverly, MA, USA)에서 anti-phospho-LKB1, anti-phospho-AMPKα, anti-phospho-acetyl-CoA carboxylase (ACC)와 HRP-conjugated anti-rabbit IgG, HRP-conjugated anti-mouse IgG antibodies를 구입하였다. anti-β-actin는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였으며, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구매하였다. Dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Junsei Chemical (Tokyo, Japan)에서 구입

*Corresponding author : Young Woo Kim, School of Korean Medicine, Dongguk University, 123 Dongdae-ro, Gyeongju-si, Gyeongsangbuk-do, 38066, Republic of Korea.

Tel : +82-31-961-5823, Fax : +82-31-961-5835, E-mail : ywk@dongguk.ac.kr

*Corresponding author : Sun-Dong Park, School of Korean Medicine, Dongguk University, 123 Dongdae-ro, Gyeongju-si, Gyeongsangbuk-do, 38066, Republic of Korea.

Tel : +82-31-961-5825, Fax : +82-31-961-5835, E-mail : sundong@dongguk.ac.kr

•Received : August 10, 2022 / Revised : August 16, 2022 / Accepted : August 31, 2022

하였다.

2. Preparation of *Eriobotrya japonica* water extracts (EJE)

*Eriobotrya japonica*는 열수 추출한 후, 추출물을 거름로 1차 여과한 후, 0.22 μm filter로 2차 여과하여 사용하였다.

3. Cell culture

인간 유래 간 실질 세포주인 HepG2 cell과 Huh7 cell은 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD)에서 구입하였으며, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 또는 RPMI 1640에 10% fetal bovine serum (FBS), 100 unit/mL penicillin 및 100 $\mu\text{g/mL}$ streptomycin (P/S) 을 혼합한 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. HepG2 cell과 huh7 cell은 100 mm culture dish에 80% confluency에 도달하도록 배양하였다¹⁴⁾.

4. MTT assay

HepG2 cell은 48 well plate에 5×10^4 cell/well 로 분주한 뒤, 24시간 후에 FBS가 없는 배지로 교환하여 4-6시간 동안 배양하였다. *Eriobotrya japonica* 의 최종농도(0, 3, 10, 30, 100, 300 $\mu\text{g/ml}$)로 분주하고 24 시간 동안 incubation을 진행하였다. 배지를 제거하고 생성된 formazan crystals을 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 ELISA microplate reader instrument를 사용해 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 control cell에 대한 백분율로 나타내었다¹⁴⁾.

5. Immunoblot analysis

HepG2 cell과 Huh7 cell을 6 well plate에 8×10^5 cells/well로 분주한 다음 24시간 후에 FBS가 없는 배지로 교환하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 12시간 동안 배양하였다. 시간별 (0, 10', 30', 1h, 3h, 6h)로 비파엽을 300 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리하였으며, 단백질의 발현량을 평가하기 위하여 Chemi-luminescence Bioimaging program을 이용하여 Quantification analysis를 실시하였다¹⁴⁾.

6. Statistical analysis

실험 결과는 mean \pm SD로 나타내었으며, 통계 분석을

위해 t-test를 사용하여 통계적 유의성을 나타내었다¹⁴⁾.

III. Results

1. The effects of EJE on HepG2 cell viability.

EJE의 처리가 세포생존율에 미치는 영향을 확인하기 위해 MTT assay를 진행하였다. EJE의 농도를 각각 3, 10, 30, 100, 300 $\mu\text{g/mL}$ 로 24시간 처리한 결과, 대조군과 비교하였을 때 EJE 처리군이 통계적으로 유의한 차이가 없음을 확인하였다 (Fig. 1). 이 결과는 EJE는 각 농도에서 세포 독성을 나타내지 않는다는 것을 알 수 있다.

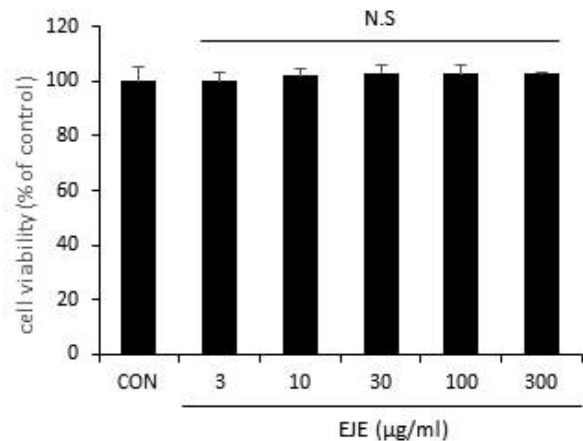


Fig. 1. Cell viability was assessed by the MTT assay. HepG2 cells were treated with EJE (3, 10, 30, 100 and 300 $\mu\text{g/mL}$) for 24h. There was no significant difference between the control group and the EJE treatment group. (N.S; not significant)

2. Evaluation of T090-induced SREBP-1c activation by EJE.

HepG2 세포에서 T090 유도인 SREBP-1c 활성화가 유의하게 증가한다는 이전 보고서와 일치하는지 확인하기 위해 Immunoblot assay를 진행하였다. 본 결과는 T090 유도인 지방 생성 마커인 SREBP-1c의 활성화가 유의하게 증가함을 보여주었다. 그러나 비파엽 추출물 처리는 T090에 의해 유도된 SREBP-1c 단백질의 상향조절을 농도 의존적인 억제물 확인하였다 (Fig. 2A and B). 이러한 결과는 비파엽 추출물은 간세포에서 T090-induced SREBP-1c 매개 지방 생성 유전

자의 유도를 억제할 수 있음을 보여주었다.

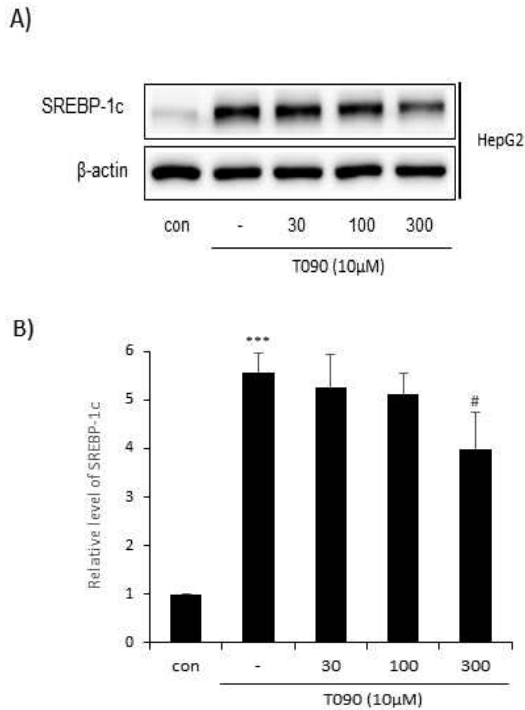


Fig. 2. Inhibition of T090-induced SREBP-1c activation by *Eriobotrya japonica* in HepG2 cells. (A) Immunoblotting for SREBP-1c. HepG2 cells were starvation 6h, and pre-treated with *Eriobotrya japonica* for 1h, and then further treatment with 10 μM T090 for 12h. (B) Relative level of SREBP-1c. The data represent the means ± S.D. of replicate experiments at least three times. Significance of statistical differences between each treatment group and the vehicle-treated control group (***, $p < 0.001$) and T090-treated control group (#, $p < 0.05$) were verified.

3. AMPK-SREBP-1c signaling pathway in HepG2 cell.

AMPK가 간에서 세포 에너지 상태와 지방산 β 산화 조절에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 이전 연구에 따르면 AMPK 활성화는 지방 생성을 조절하고 산화 스트레스로부터 세포보호 효과가 있는 것으로 보고되고 있다. 따라서 본 연구에서는 HepG2 세포에서 AMPK 매개 신호 경로에 대한 비파엽 추출물의 효과를

확인하기 위해 Immunoblot assay를 진행하였다. EJE를 300 μg/mL으로 처리한 결과, 3h, 6h에서 p-AMPK와 p-ACC의 활성화가 유도되었다는 것을 확인하였다 (Fig. 3). 이 결과는 이전 연구와 일치하게 AMPK 활성화가 LKB1에 의해 유도되고 다운스트림인 ACC가 뒤따르는 것으로 확인하였다.

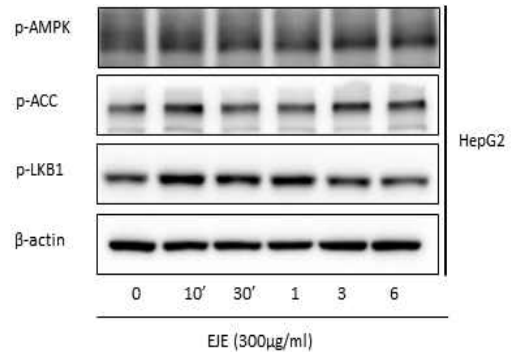
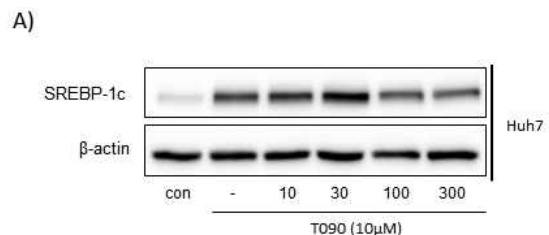


Fig. 3. AMPK activation by EJE in HepG2 cells. Immunoblot analysis for p-AMPK, p-ACC and p-LKB1. HepG2 cells were starvation 6h, and treated with 300 μg/ml EJE for the indicated times.

4. Evaluation of T090-induced SREBP-1c activation and AMPK-SREBP-1c signaling pathway by EJE in Huh7 cells.

Huh7 cells은 HepG2 cell과 유사한 인간 간세포 유래 암종 세포주로, T090 유도로 인한 SREBP-1c 활성화가 유의하게 증가하는지 확인하기 위해 Immunoblot assay를 진행하였다. 본 연구에서 Huh7 cells에서 T090의 유도로 인해 지방 생성 마커인 SREBP-1c의 활성화가 유의하게 증가하였으며, EJE 처리로 인해 농도 의존적으로 억제되었다 (Fig. 4).



B)

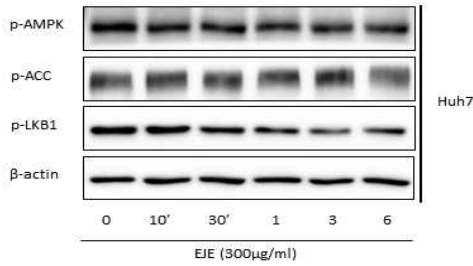


Fig. 4. (A) Inhibition of T090-induced SREBP-1c activation by EJE in Huh7 cells. Immunoblotting for SREBP-1c. Huh7 cells were starved 6h, and pre-treated with EJE for 1h, and then further treatment with 10 μM T090 for 12h. (B) p-AMPK activation by EJE in Huh7 cells. Immunoblot analysis for p-AMPK, p-ACC and p-LKB1. HepG2 cells were treated with 300 μg/ml EJE for the indicated times.

5. Mechanism of the regulation of SREBP-1c by EJE.

본 연구에서 도출된 결과를 바탕으로 도식화하였다. T090의 유도는 지방산 조절자인 LXR 매개 SREBP-1c 생성을 증가하였으며, 비파엽은 AMPK의 활성화를 매개하여 SREBP-1c의 상향조절을 억제하였다 (Fig. 5).

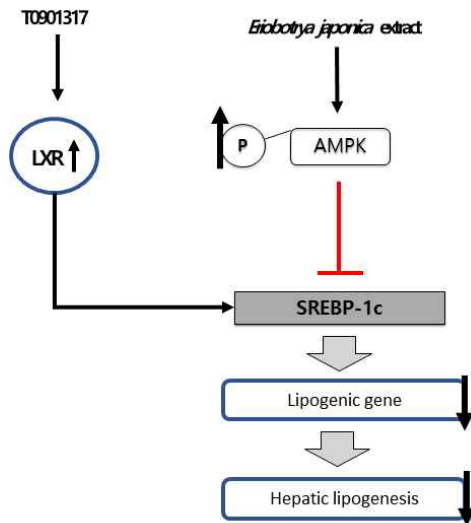


Fig. 5. Schematic diagram for the EJE's inhibition of SREBP-1c.

IV. Discussion

간 X 수용체 (Liver X Receptor, LXR)는 ligand 결합 시 표적 유전자의 발현을 자극하는 핵 수용체 중 하나로서¹⁵⁾, 이화작용과 수송을 통해 세포 내에 콜레스테롤, 지방산 및 포도당 항상성을 조절하는 유전자 산물의 전사를 조절한다¹⁶⁾. LXR은 레티노이드 X 수용체 (Retinoid X Receptor, RXR)와 함께 이종이량체를 형성하며, LXR α와 LXR β로 나눌 수 있다¹⁵⁾. LXR α의 발현은 주로 간, 신장, 대식세포, 소장, 비장 및 지방 조직과 같은 지질 대사에서 중요한 역할을 하며¹⁷⁾, LXR β는 모든 조직에서 발현된다¹⁸⁾. 지방산 합성 효소 및 스테롤 조절 결합 단백질과 유사한 LXR α의 발현은 리간드인 T090의 유도로 활성화되어 세포 내 지질 축적을 담당하는 SREBP-1c의 발현을 증가시킨다¹⁹⁾. 특히, 간에서 LXR 매개 간 지방 생성을 담당하는 메커니즘은 다양한 동물실험을 통해 Sterol Regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c)의 발현의 증가로 나타난다고 알려져 있다¹⁶⁾. 본 연구는 T090 유도로 인한 SREBP-1c의 상향조절이 유의하게 증가하였으며, 비파엽 추출물을 긴 시간 처치한 경우 유의하게 감소함을 보였다.

SREBP-1c는 지질 합성을 조절하는 전사인자로, 지방산 생합성에 관여하는 유전자의 전사를 제어하여 포도당, 콜레스테롤과 지방산 대사 사이의 독특한 상호작용을 나타낸다¹⁹⁾. 특히, SREBP-1c는 간에서 인슐린 신호를 변환하여 신호전달이 SREBP-1c의 발현을 증가시켜 간세포에 의한 지방산 합성을 증가시킨다는 것을 나타낸다²⁰⁾. 이와 같이 hepatocyte에서 LXR 매개 SREBP-1c의 발현을 억제한다는 연구가 보고되었으며²¹⁾, SREBP-1c와 관련된 지방 생성 유전자의 메커니즘에 대해 꾸준히 연구되고 있다²²⁾. 본 연구에서 T090의 유도로 인한 지방 생성 유전자(SREBP-1c)의 발현의 증가를 확인하기 위해 hepatocyte (HepG2, Huh7)에 immunoblot assay를 진행하였다. EJE를 농도별로 처치하였을 때 300 μg/mL에서 SREBP-1c의 수준 감소로 보아 농도 의존적으로 SREBP-1c의 발현의 억제를 확인하였다.

AMPK(AMP-activated protein kinase)는 AMP/ATP의 비율에 따라 생체 내에서 반응하여 그 활성이 조절되는 인산화 효소로 에너지 대사 과정에 중요한 역할을 하는 세포 에너지 센서로 알려져 있다²³⁾. 선행 연구에

서 AMPK는 생체 내의 에너지 인식 및 성장조절과 당과 지방의 대사를 조절하는 데에 중요한 역할을 하여²⁴⁾, 이러한 에너지 센서의 이상은 비만과 당뇨와 같은 대사성 질환을 포함한 심혈관계 질환, 암 발생과 연관성이 높다는 연구 결과가 나타난다²⁵⁾. AMPK의 활성화는 주로 에너지 대사 조절과 밀접하게 연관되어있는 표적 장기(간, 근육, 지방)에 효과적이다²³⁾.

LKB1(Liver Kinase B1)은 AMPK의 활성화보다 선행되는 kinase로 알려져있어 LKB1/AMPK 신호전달경로라고도 하며, 세포 대사를 성장조절 및 새로운 신호전달 경로와 관련된 연구에서 중요하게 쓰인다²⁷⁾. LKB1과 AMPK는 함께 환경 변화에 대한 반응으로 세포 성장을 조절하며, 특히 AMPK의 활성이 이미 사용 중인 약물로 표적화될 수 있다는 사실로 인해 잠재적으로 암 치료를 위한 새로운 표적 및 약물을 식별하는데 LKB1/AMPK 신호전달경로가 사용되기도 한다²⁷⁾. LKB1의 활성화는 인산화를 통한 구조적 변화와 같은 효소 활성화에 직접적인 영향을 주는 경우 또는 단백질을 상이한 세포 내 구획으로 표적화하는 경우에 조절된다²⁷⁾.

본 연구는 비파엽 추출물이 LKB1/AMPK Pathway에 영향을 미치는지 확인하기 위해 immunoblot assay를 진행하였다. Hepatocyte에 비파엽 추출물을 시간별(10', 30', 1h, 3h, 6h)로 처치한 결과 인산화된 LKB1에 의해 AMPK 활성화가 유도되었으며, 이후 하위 인자인 ACC가 뒤따르는 것으로 확인하였다.

V. Conclusion

본 논문에서 T090의 유도로 지방산 조절자인 LXR 매개 SREBP-1c 증가를 확인하였으며, EJE는 AMPK의 활성화를 매개하여 SREBP-1c의 상향조절을 억제하여 SREBP-1c를 억제할 수 있음을 나타내었다. 이러한 결과는 EJE가 LXR α /SREBP-1c 경로의 억제를 통해 지방간에 보호 효과를 시사한다.

Acknowledgments

This research was supported by a grant of the Korea Health Technology R&D Project through the Korea Health Industry Development Institute (KHIDI), funded by the Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (number: HF20C0212) and (number: HF21C0061).

References

1. Park YC, Park HM, Lee SD. Inducible Mechanisms for Hepatotoxicity caused by Traditional Korean Medicines in a view of Toxicology. *Journal of Korean Medicine*. 2011;32(4):48-67.
2. Chung KW. Ultrastructure of chronic liver diseases: From light to electron microscopy. *Clinical and Molecular Hepatology*. 2002;8(1):112-123.
3. Yoon SK. Diagnosis and treatment of fatty liver. *Korean Journal of Medicine*. 2009;76(6):677-679.
4. Kim CY, Moon SM, Hyun KY, Kim DS, Choi SC. Difference in Serum Iron, Cardiac, and Biochemical Indices between Alcoholic and Non-alcoholic Fatty Liver. *Journal of Life Science*. 2009;19(2):185-191.
5. Brunt EM. Pathology of fatty liver disease. *Modern Pathology*. 2007;20(1):S40S48.
6. Choi HS, The Steroid Receptors: Molecular Mechanism of Action. *Korean Endocrine Society*. 2000;15(3).
7. Lee EK, Park YJ. Metabolic regulation of nuclear receptors. *Journal of Korean Endocrine Society*. 2008;23(3):155-164.
8. Bae YI, Seo KI, Park SK, Shim KH. Loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) Leaf Tea Processing and Its Physicochemical Properties. *Korean J. Postharvest Sci Technol*. 1998;5(3):262-269.
9. Kim SJ, Park JO, Park SN. Antioxidative Effect and Component Analysis of *Eriobotrya japonica* Leaf Extracts. *J Soc. Cosmet. Sci. Korea*. 2012;38(1): 57-65.
10. Kim SM, Kim AY, Lee KI. Nitric Oxide Production Inhibitory Effects of Three Caffeoylquinic Acids Isolated from Hot Water Extract of *Eriobotrya japonica* L. Leaves. *Korean J. Medicinal Crop Sci*. 2020;28(4):245-253.
11. Lee H, Kim YK, Lee HJ, Lee JJ. Effects of Loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) Ethanol Extracts of Different Aerial Parts on Antioxidant Activity and Antiproliferation of Human Cancer Cells. *Korean J Community Living Sci*. 2016;27(2):211-220.

12. De Tommasi N, De Simone F, Pizza C, Mahmood N, Moore PS, Conti C et al. Constituents of *Eriobotrya japonica*. A Study of Their Antiviral Properties. *J. Nat. Prod.* 1992;55(8):1067–1073.
13. Lee WK, Choi YY, Yang WM. Effect of *Eriobotrya folium* on Local Fat via Regulation of Lipase Secretion. *Journal of Korean Medicine for Obesity Research.* 2017;17(2):101–110.
14. Yun UJ, Bae SJ, Song YR, Kim YW. A Critical YAP in Malignancy of HCC Is Regulated by Evodiamine. *Int J Mol Sci.* 2022 Feb 6;23(3):1855.
15. Bełtowski J. Liver X receptors (LXR) as therapeutic targets in dyslipidemia. *Cardiovasc Ther.* 2008;26(4):297–316.
16. Repa JJ, Liang G, Ou J, Bashmakov Y, Lobaccaro JMA, Shimomura I, et al. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXR α and LXR β . *Genes & Dev.* 2000;14(22):2819–2830.
17. Apfel R, Benbrook D, Lernhardt E, Ortiz MA, Salbert G, Pfahl M. A Novel Orphan Receptor Specific for a Subset of Thyroid Hormone-Responsive Elements and Its Interaction with the Retinoid/Thyroid Hormone Receptor Subfamily. *Molecular and cellular biology.* 1994;14(10):7025–7035.
18. Song C, Kokontis JM, Hiipakka RA, Liao S. Ubiquitous receptor: A receptor that modulates gene activation by retinoic acid and thyroid hormone receptors. *Proc. Nati. Acad. Sci.* 1994; 91(23):10809–10813.
19. Ferré P, Foufelle F. Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. *Diabetes, Obesity and Metabolism.* 2010;12(s2):83–92.
20. Kohjima M, Higuchi N, Kato M, Kotoh K, Yoshimoto T, Fujino T. SREBP-1c, regulated by the insulin and AMPK signaling pathways, plays a role in nonalcoholic fatty liver disease. In *J. Molecular Medicine.* 2008;21(4):507–511.
21. Yap F, Craddock L, Yang J. Mechanism of AMPK Suppression of LXR-dependent Srebp-1c transcription. *Int J Biol Sci.* 2011;7(5):645–650.
22. Ferré P, Phan F, Foufelle F. SREBP-1c and lipogenesis in the liver: an update. *Biochem J.* 2021;478(20):3723–3739.
23. Yin W, Mu J, Morris JB. Role of AMP-activated Protein Kinase in Cyclic AMP-dependent Lipolysis In 3T3-L1 Adipocytes. *Journal of Biological Chemistry.* 2003;278(44):43074–43080.
24. Shackelford DB, Shaw RJ. The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumor suppression. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(8):563–575.
25. Mhairsi C, Towler, D, Grahame Hardie. AMP-Activated Protein Kinase in Metabolic Control and Insulin Signaling. *Circ. Res.* 2007;100(3):328–341.
26. Hardie DG. The AMP-activated protein kinase pathway – New players upstream and downstream. *Journal of Cell Science.* 2004;117(23):5479–5487.
27. Dogliotti G, Kullmann L, Dhumale P, Thiele C, Panichkina O, Mendl G, et al. Membrane-binding and activation of LKB1 by phosphatidic acid is essential for development and tumour suppression. *Nature Communications.* 2017;8(1):1–12.