



Original Article / 원저

## LXR 고아핵수용체 관련 신호 억제를 통한 연교의 sterol regulatory element-binding protein-1c 조절

김영은, 박선동\*, 김영우\*

동국대학교 한의학과 방제학교실

### *Forsythiae suspensa* regulates SREBP-1c signaling pathway as mediated with LXR alpha nuclear orphan receptor

Young-Eun Kim, Sun-Dong Park\*, Young Woo Kim\*

School of Korean Medicine, Dongguk University

#### ABSTRACT

**Objectives** : Brain-Liver axis is an important target of the chronic human diseases. Hepatic steatosis is one of the most famous disorders in the chronic diseases. This study investigated the moderating effect of beneficial herbs on the fat accumulation, which is mediated by the LXR alpha-SREBP-1c signaling pathway.

**Methods** : In order to confirm the SREBP-1c inhibitory effect, we performed immunoblotting analysis using HepG2 cells and Huh 7 cells treated by T0901317, the ligand of LXR $\alpha$ .

**Results** : *Forsythiae suspensa* water extract (FSE) was not cytotoxicity in cell lines. FSE inhibited SREBP-1c protein expression in HepG2 and Huh7 cells induced by T0901317. In addition, FSE increased the phosphorylation of LKB1, which is associated with LXR-related pathway in HepG2 and Huh 7 cells.

**Conclusions** : These results showed that FSE activated LKB1 to suppress SREBP-1c, which protects the cells against oxidative stress.

**Key words** : LXR, SREBP-1c, *Forsythiae suspensa*, oxidative stress.

## I. 서론

임상적으로 흔히 발견되는 질환인 지방간(fatty liver)은 간 조직 내에 지방이 축적된 병리적 상황(지방증, steatosis)이다<sup>1)</sup>. 비만, 인슐린 비의존성 당뇨병, 고지혈증 등의 원인과 연관된다<sup>1)</sup>. 지방간염(steatohepatitis)은 지방증에 간세포 괴사와 염증반응이 동반된 상태를 말하는데, 알코올성 지방간염과 비알코올성 지방간염(Non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)으로 구분된다<sup>1)</sup>. 알코올성 지방간염은 알코올이 원인이며 비알코올성 지방간염은 알코올과 관련이 없지만 알코올성 간염과 유사한 증상을 나타낸다. 비알코올성 지방간 질환은 병리학적으로 지방간(steatosis)과 지방간염(steatohepatitis)으로 나뉘는데 그 발생기전은 아직 불분명하고 알코올성 지방간염과 유사하게 간 섬유화와 일부에서 간경변증으로 진행할 수 있어 단순 지방증과는 구별이 필요하다<sup>1)</sup>.

비알코올성 지방간 질환은 만성 간 질환 등 가장 흔한 질환으로, 간에 과다한 지방산의 축적으로 의한 대사증후군이며 비만과 당뇨병 등에 의해 발생하는 질환이다<sup>2)</sup>. 비알코올성 지방간 질환의 병인으로는 인슐린 저항성으로 인하여 지방산 유입과 간세포로의 포도당 유입이 증가되어 간 내 지방 축적을 증가시킨다<sup>2)</sup>. 또한, 산화 스트레스로 인한 지방의 과산화, adipokine들의 과도한 간문맥으로 유입, 미토콘드리아 구조 및 기능장애 유발로 인한 간세포 손상, apoptosis가 증가하여 간 내 정상세포를 활성화하여 간섬유화 유도 등으로 인하여 비알코올성 지방간염을 유발할 가능성이 있다고 알려져 있다<sup>3)</sup>.

핵 호르몬 수용체(Nuclear Hormone Receptor)는 전사조절인자로 유전자들의 발현을 조절한다<sup>4)</sup>. 핵 호르몬 수용체 중 고아 핵 수용체(orphan Nuclear Receptor)는 아직까지도 정확한 리간드가 알려지지 않은 수용체이다<sup>5)</sup>. 고아 핵 수용체는 ER, CAR, RXR, HNF4, LRH-1, AR, LXR, ERR 등이 있다<sup>6-9)</sup>. 본 연구에서는 Liver X receptor (LXR)에 의해 유도된 지방간의 억제효과를

관찰할 예정이다.

연교(*Forsythiae suspensa*, FS)는 물푸레나무과(Oleaceae)에 속하는 의성 개나리(*Forsythia viridissima* Liddle)의 열매로 한의학에서 널리 이용되고 있다<sup>10)</sup>. 연교 물추출물(*Forsythiae suspensa* water extract, FSE)은 멜라닌 생성 억제 효과가 있으며 항균활성, 항산화 및 미백효과, 항염증 등의 효과가 있다<sup>11-14)</sup>. 그럼에도 불구하고 이러한 연교의 효과들을 연구한 실험들이 있지만, 연교의 간 질환 치료에 대한 효능 및 그 기전에 대한 연구가 부족하다.

그러므로, 본 연구에서는 LXR의 리간드인 T090에 의해 처리된 사람의 간세포를 사용하여 간에서 지방산 합성에서의 FSE의 역할에 대해 연구하였다. FSE의 간 지방산 합성 억제 및 그 작용기전에 대해 규명하기 위한 실험을 수행하였다.

## II. 실험 방법 및 재료

### 1. Materials

연교 물추출물(FSE)은 연교 100g을 물 1L에 넣고 100°C에서 3시간 동안 가열하였다. 전탕액을 filter paper로 여과한 후, 감압농축하고 동결건조한 후 분말화하여 물에 녹여 여과한 다음, 실험에 사용하였다. Anti-phospho-LKB1, anti-phospho-AMPK $\alpha$ , anti-phospho-acetyl-CoA carboxylase (ACC)와 HRP-conjugated anti-rabbit IgG, HRP-conjugated anti-mouse IgG antibodies는 Cell Signalling Technology (Beverly, MA, USA)에서 구입하였다. anti- $\beta$ -actin과 T0901317은 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazoleum bromide (MTT)는 Sigma-aldrich Co. (St.Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM), Penicillin Streptomycin, Fetal bovine serum (FBS)는 WELGENE (Daegu, Korea)에서 구입하였다.

\*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

\*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

•Received : August 10, 2022 / Revised : August 16, 2022 / Accepted : August 25, 2022

## 2. 세포배양 및 처리

실험에 사용한 인체 유래 간 세포주인 HepG2 세포는 ATCC (Rockville, MD, USA), Huh7 세포는 한국 세포주은행 (Seoul, Korea)에서 구입하였고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 의 incubator에서 배양하였다. FSE를 세포에 농도별로 처리하여 실험 결과를 확인하였다.

## 3. MTT assay

FSE에 의한 세포 생존율을 측정하기 위해 MTT assay를 하였다<sup>15)</sup>. HepG2 세포를 48 well plate에  $5 \times 10^4$  cells/well로 분주하여 12시간 배양한 후 serum free 배지로 교체하여 12시간 더 배양하였다. 이후에 10, 30, 100, 300, 1000 µg/mL로 처리하고 24시간 배양시킨 뒤, 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazoleum bromide (MTT) 시약을 처리한 후에 생성된 formazan crystal을 DMSO에 녹여 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 4. Immunoblot analysis

HepG2 세포를 6 well plate에 배양한 후, FSE를 농도별로 세포에 전 처리한 후에 1시간 뒤에 T0901317 10 µM을 처리하여 12시간 동안 배양하였다<sup>15)</sup>. 이후 이전 연구에서와 같이 ECL chemiluminescence detection reagents (Advensta, Menlo Park, CA, USA)을 이용하여 단백질 발현을 확인하였다<sup>15)</sup>.

## 5. 통계처리

실험 결과는 mean ± S.D. 값으로 표시하였고 t-test로 통계처리하여 통계적 유의성을 확인하였다<sup>15)</sup>.

# III. 결과

## 1. HepG2 세포에서의 세포생존

FSE의 세포독성을 확인하기 위해서 MTT assay를 수행하였다. FSE의 단독 처리가 세포생존율에 미치는 영향을 확인하기 위해 FSE의 농도를 10, 30, 100, 300, 1000 µg/mL로 24시간 처리하였다. 그 결과, 대조군과 비교하였을 때, 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 이는 FSE가 10, 30, 100, 300, 1000 µg/mL의 농도에서는 세포독성을 나타내지 않았다 (Fig. 1).

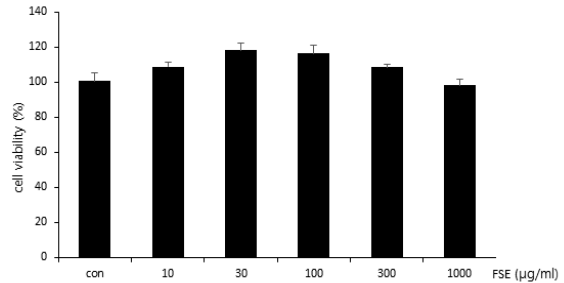
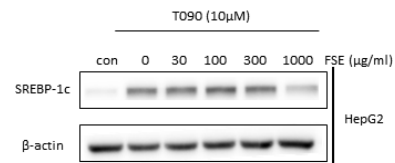


Fig 1. Cytotoxicity of FSE on HepG2 cells. Cell viability was assessed by the MTT assay. HepG2 cells were treated with FSE (10, 30, 100, 300, 1000 µg/mL) for 24h.

## 2. FSE에 의한 SREBP-1c 발현 억제

T090을 처리한 HepG2 세포에서 SREBP-1c 발현에 대한 FSE의 영향을 조사하였다. 12시간동안 1µM T090을 처리하여 HepG2 세포에서 SREBP-1c의 단백질 발현을 유도하였다. 이는 FSE 30-1000 µg/mL을 처리하여 SREBP-1c의 단백질 발현이 1000 µg/mL에서 현저히 억제되었다 (Fig. 2).

A)



B)

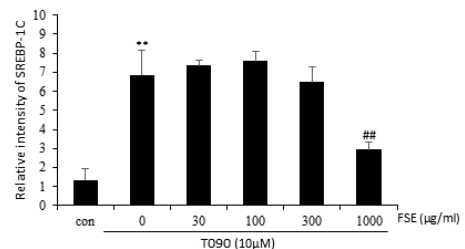
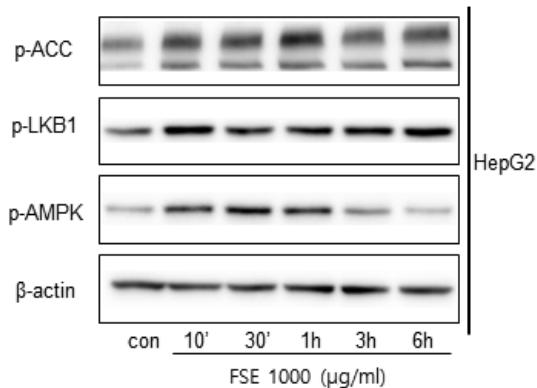


Fig 2. Inhibition of T0901317-induced SREBP-1C activation by FSE. (A) Immunoblotting for SREBP-1C. HepG2 cells were pretreated with FSE for 1 h, and then further treatment with 10 µM T0901317 (T090) for 12h. Western blot analysis was assessed in the lysates of

the cells. (B) Relative band intensity of SREBP-1C. The data represent the means  $\pm$  S.D. of replicate experiments at least three times. Significance of the statistical differences between each treatment group and the vehicle-treated control group (\*\*P < 0.01) or T090-treated group (##p < 0.01) was verified.

### 3. FSE에 의한 AMP-activated protein kinase (AMPK) 활성화

FSE가 HepG2 세포에서 p-AMPK의 활성화에 미치는 영향을 확인했다. HepG2 세포에 1000  $\mu$ g/mL FSE를 시간 의존적으로 10분에서 6시간까지 처리한 결과, AMPK와 ACC의 인산화가 10분, 30분, 1시간에서 증가하였다. AMPK의 상위 인산화효소 중 하나인 p-LKB1의 인산화에 대한 FS의 영향을 확인하였다. FSE의 처리는 HepG2 세포에서 또한 p-LKB1의 인산화가 10분, 30분, 1시간에서 증가하였다 (Fig. 3). 따라서 FSE에 의한 p-AMPK의 활성화가 p-LKB1 경로와 관련이 있음을 의미한다.

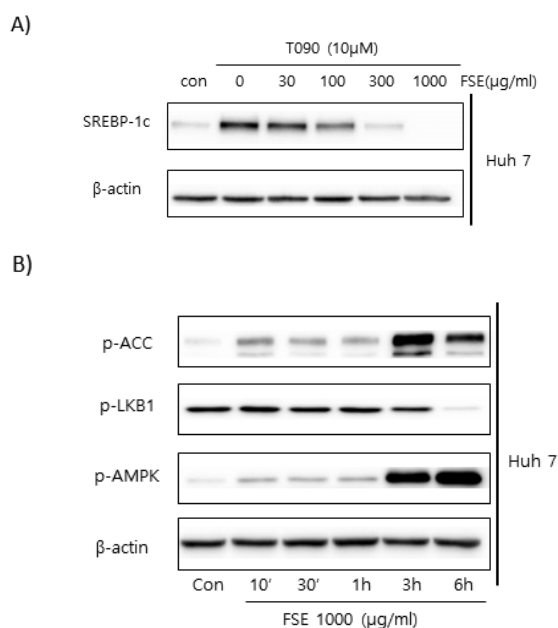


**Fig 3.** AMPK activation by FSE. HepG2 cells were incubated in serum free media for 12h, and then treated with 1000  $\mu$ g/ml FSE for indicated time periods. (A) Immunoblot analysis of p-ACC, p-AMPK, p-LKB1 and  $\beta$ -actin.

### 4. Huh7 세포에서 FSE에 의한 AMPK 활성화

HepG2 세포에서 확인된 FSE에 의한 SREBP-1c 발현과 AMPK의 활성화를 사람 간세포주인 Huh 7 세포에서도 확인하기 위해 Immunoblot analysis를 수행하였다. Huh7 세포에 12시간동안 1 $\mu$ M T090을 처리한 결

과, Huh7 세포에 FSE 30-1000  $\mu$ g/mL 처리는 SREBP-1c의 단백질 발현을 억제하였다 (Fig. 4A). 하지만, HepG2 세포와는 달리 FSE 농도 100  $\mu$ g/mL부터 SREBP-1c의 단백질 발현을 억제하였다 (Fig. 4A). 다음, Huh7 세포에 1000  $\mu$ g/mL FSE를 시간 의존적으로 10분에서 6시간까지 처리한 결과, HepG2 세포와 마찬가지로 AMPK와 ACC의 인산화를 유의하게 유도하였다 (Fig 4B). 또한, AMPK의 상위 인산화효소인 p-LKB1의 인산화에 대한 FSE의 영향을 확인한 결과, Huh7 세포에서 p-LKB1의 인산화를 유도하였다 (Fig. 4B). 하지만 HepG2 세포에서는 달리 p-ACC, p-AMPK의 인산화가 3시간, 6시간에서 증가하였다 (Fig. 4B).



**Fig 4.** Inhibition of T0901317-induced SREBP-1C activation by FSE and effect of FSE on AMPK activation. (A) Immunoblotting for SREBP-1C. Huh7 cells were pretreated with FSE for 1h, and then further treatment with 10  $\mu$ M T0901317 (T090) for 12h. Western blot analysis was assessed in the lysates of the cells. (B) Immunoblot analysis of phosphorylation of AMPK signaling pathway. Huh7 cells were incubated with FSE (1000  $\mu$ g/ml) for 10 min-6h.

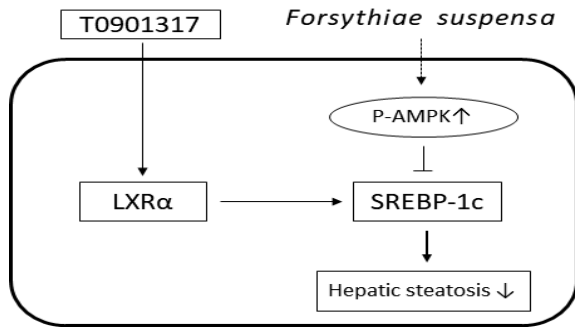


Fig. 5. Scheme of the action mechanism of the FSE's inhibition on the hepatic steatosis as mediated with LXR alpha

#### IV. 토론

지방간은 간세포 내에 지방이 축적되는 질환이고 원인으로서는 음주, 비만, 인슐린 비의존성 당뇨병, 고지혈증 등이다. 지방간염은 알코올성 지방간염과 비알코올성 지방간염으로 구분된다. 본 연구에서는 비알코올성 지방간염에 대한 연구를 수행하였다. 핵 호르몬 수용체 중 고아 핵 수용체인 LXR은 T0901317 (T090)에 의해 활성화된다. T090은 SREBP-1c를 상향조절하여 hepatic steatosis를 유발한다. 하지만 연교 물 추출물이 간 지방생성을 조절하는데 중요한 역할을 하는 AMPK의 인산화를 유도하여 SREBP-1c의 활성을 감소시켰다. 따라서 연교는 SREBP-1c 활성을 억제하는 AMPK를 활성화하고 LXRα의 결핍을 유도하여 Hepatic steatosis를 억제하는 것으로 나타났다 (Fig. 5).

Liver X receptor α (LXRα)는 ligand-activated transcription factors(핵 수용체)이며, 콜레스테롤 합성 경로의 oxysterol 및 중간체에 의해 활성화 된다<sup>16</sup>. LXR 관련 연구에서 LXRα가 지방산에 반응하고 대사 조직에서 발현된다는 것을 확인하여 LXRα가 지질 대사에도 역할을 한다는 것을 나타낸다<sup>16</sup>. LXRα가 결핍되면 콜레스테롤 조절 능력 상실과 함께 지방산과 triglyceride (TG) 분비의 장애가 관찰되었다<sup>16</sup>. 이것은 sterol-regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c), fatty acid synthase (FAS), stearyl-CoA desaturase-1 (SCD-1) 과 acetyl-CoA carboxylase-α (ACC-α)와 같은 여러 가지 유전자에 발현에 의해 결핍된 것으로 나타난다<sup>16</sup>.

SREBP1-c는 지방산과 중성지방을 합성하기 위한 지방산 대사에서 가장 중요한 효소이다<sup>16</sup>. FAS, SCD-1, ACC-α 유전자들은 SREBP-1c에 의해 조절되는 것으로 나타났다<sup>16</sup>. LXR을 작용시키는 작용제인 T090은 콜레스테롤 수송과 지방 형성의 조절에 중요한 역할을 나타낸다<sup>17</sup>. 그리고, T090은 ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) 및 HDL level을 상향시키고 SREBP-1c의 상향 조절을 통해 지방 형성을 유발한다는 연구결과가 있다<sup>18</sup>. 본 실험에서 FSE 30-1000 μg/mL을 HepG2 세포에 처리하여 SREBP-1c의 단백질 발현이 1000 μg/mL에서 현저히 억제되었다.

여러 연구에서 AMPK는 지방생성을 조절하는데 중요한 역할을 한다고 확인하였다<sup>19</sup>. 간에서 threonine 172의 인산화로 인한 AMPK 활성화는 acetyl-CoA carboxylase (ACC)의 인산화 및 불활성화를 유도하여 지방산 합성을 억제한다<sup>19</sup>. 또한, AMPK 인산화는 SREBP-1c의 활성을 감소시킨다<sup>19</sup>. 따라서 ACC 및 SREBP-1c 활성을 억제하는 AMPK 활성화는 LXRα가 결핍되면 일어나는 TG의 간 축적을 완화시킬 수 있다<sup>19</sup>. 따라서, 실험을 통해 FSE가 AMPK를 인산화 하였고 SREBP-1c 활성을 감소시킬 수 있다는 것을 확인하였다.

사실, AMPK는 세포에너지 센서로서 영양결핍, 저산소증, 미토콘드리아 호흡 사슬 복합체를 억제하는 독소의 노출과 같은 세포에너지 수준을 고갈시키는 다양한 조건에 반응하여 활성화 된다<sup>20</sup>. AMPK는 catalytic α-subunit(α1 및 α2), scaffolding β-subunit 및 regulatory γ-subunit (γ1, γ2 및 γ3)으로 이루어진 serine/threonine 단백질인산화효소복합체이다<sup>20</sup>. 생리학적 AMPK 활성화는 AMPKα 촉매 서브유닛에서 Thr-172의 인산화와 관련이 있다<sup>21</sup>. AMPK의 상위 인산화 효소에는 liver kinase B1 (LKB1)과 Ca<sup>2+</sup> /calmodulin-dependent protein kinase kinase β (CaMKKβ) 등이 있다<sup>22</sup>. 이중 LKB1은 α 서브유닛의 특정 threonine 잔기인 Thr-172를 촉매하여 AMPK복합체를 인산화한다<sup>22</sup>. LKB1은 구성적으로 활성 상태이며, AMPK가 세포의 에너지 상태를 감지하는 메커니즘의 핵심 구성 요소이다<sup>22,23</sup>. LKB1을 통한 AMPK의 에너지 스트레스 매개 활성화 외에도, AMPK는 세포내 Ca<sup>2+</sup> 증가를 유발하는 신호 전달 메커니즘에 의해

인산화되고 활성화된다<sup>24-26</sup>. 이 경우, AMPK는  $Ca^{2+}$  /calmodulin-dependent protein kinase kinase 2 (CaMKK2)에 의해 직접 인산화된다<sup>26</sup>.

## V. 결론

본 연구에서는 FSE의 간의 지방산 합성 억제 및 그 작용기전에 대해 규명하기 위한 실험을 수행하였다. 간 세포주인 HepG2 세포를 이용하여 MTT assay를 통해 FSE의 세포독성을 확인하였다. FSE가 간 지방 형성을 유발하는 SREBP-1c 억제 효과를 확인하기 위해 immunoblot analysis를 수행하였으며, SREBP-1c 활성을 억제시키는 LKB1-AMPK pathway의 활성화를 확인하였다.

그 결과, FSE는 MTT assay를 수행한 결과, HepG2 세포에서 세포독성을 나타내지 않음을 확인하였다. HepG2 세포와 Huh7 세포에 T090을 처리하여 immunoblot assay를 수행한 결과, FSE는 SREBP-1c 단백질 발현을 억제시켰다. 또한, FSE는 AMPK와 그 상위 인산화 효소인 LKB1의 단백질 발현을 활성화하였다. 따라서, FSE는 AMPK를 활성화하여 hepatic steatosis를 유도하는 SREBP-1c를 억제하였다.

## 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: HF21C0061) and (HF20C0212).

## References

1. Kim SJ, Park JW, Kim MG, Kim HJ, Hong YH, Han SH, Kim JG, et al. Clinical Predictors Reflecting the Pathologic Severity of Nonalcoholic Steatohepatitis in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver. *The Korean Journal of Gastroenterology*. 2000;36(6):782-792.
2. Jeon JH, Park KG. Definition, pathogenesis, and natural progress of non-alcoholic fatty liver disease.

- Journal of Korean Diabetes. 2014;15(2), 65.
3. Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science*. 2011;332:1519-23.
4. O'MALLEY, Bert W. BULLER, Richard E. Mechanisms of steroid hormone action. *Journal of Investigative Dermatology*, 1977;68(1):1-4.
5. LEE EK, PARK YJ. Metabolic regulation of nuclear receptors. *Journal of Korean Endocrine Society*. 2008;23(3):155-164.
6. Lai K, Harnish DC, Evans MJ. Estrogen receptor alpha regulates expression of the orphan receptor small heterodimer partner. *J Biol Chem*. 2003; 278:36418-36429
7. Lee YK, Parker KL, Choi HS, et al. Activation of the promoter of the orphan receptor SHP by orphan receptors that bind DNA as monomers. *J Biol Chem*. 1999;274:20869-20873.
8. GOODWIN, Bryan, et al. A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. *Molecular cell*, 2000, 6,3: 517-526.
9. Sinal, Christopher J., et al. Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. *Cell*. 2000;102(6):731-744.
10. Kim MJ, Im KR, Yoon KS. Anti-inflammatory effects of prescription extracts containing *Forsythia viridissima* L. *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*. 2009;35(4),277-285.
11. Jo MG, An BS, Mun YJ, Woo WH. Inhibitory effect of the methanol extract of *Fructus Forsythiae* on the melanogenesis. *Korean Journal of Korean Medical Institute of Dermatology and Aesthetics*. 2005;1(1),41-52.
12. Bae, JH, Kim HY, Jang JY. Antimicrobial effect of *Forsythiae fructus* extracts on several food-borne pathogens. *Korean journal of food and cookery science*. 2005;21(3),319-325.
13. Kim MJ, Kim JY, Jung TK, Choi SW, Yoon KS. Skin Anti-aging Effect of *Forsythia viridissima* L. Extract. *KSBB journal*. 2006;21(6),444-450.

14. Yang SJ, Choe TB. Antioxidant activity and whitening effect of forsythiae fructus extracts. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 2011; 19(6),472–477.
15. 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.
16. Ulven SM, Dalen KT, Gustafsson JÅ, Nebb HI. LXR is crucial in lipid metabolism, Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids. 2005; 73(1),59–63.
17. Houck KA, Borchert KM, Hepler CD, Thomas JS, Bramlett KS, Michael LF, Burris TP. T0901317 is a dual LXR/FXR agonist. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2004;83(1–2),184–187.
18. Chisholm JW, Hong J, Mills SA, Lawn RM. The LXR ligand T0901317 induces severe lipogenesis in the db/db diabetic mouse. *The Journal of Lipid Research*. 2003;44(11),2039–2048.
19. Cheng S, Liang S, Liu Q, Deng Z, Zhang Y, Du J, et al. Diosgenin prevents high-fat diet-induced rat non-alcoholic fatty liver disease through the AMPK and LXR signaling pathways. *International Journal of Molecular Medicine*. 2017;41(2), 1089–1095.
20. Kim J, Yang G, Kim Y, Kim, J, Ha J. AMPK activators: mechanisms of action and physiological activities. *Experimental & molecular medicine*. 2016;48(4),e224–e224.
21. Hardie DG. New roles for the LKB1→AMPK pathway. *Current Opinion in Cell Biology*, 2005;17(2),167–173.
22. Woods A, Johnstone SR, Dickerson K, Leiper FC, Wallimann T, Neumann D, et al. LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Current Biology: CB*. 2003;13(22), 2004–2008.
23. Rodríguez C, Muñoz M, Contreras C, Prieto D. AMPK, metabolism, and vascular function. *The FEBS Journal*, 2021;288(12),3746–3771.
24. Woods A, Dickerson K, Heath R, Hong SP, Momcilovic M, Johnstone SR, Carling D. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase-β acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell metabolism*. 2005;2.1: 21–33.
25. Hawley SA, Pan DA, Mustard KJ, Ross L, Bain J, Edelman AM, et al. Calmodulin-dependent protein kinase kinase-β is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell metabolism*, 2005;2(1),9–19.
26. Fogarty S, Hawley SA, Green, KA, Saner N, Mustard KJ, Hardie DG. Calmodulin-dependent protein kinase kinase-β activates AMPK without forming a stable complex: synergistic effects of Ca<sup>2+</sup> and AMP. *Biochemical Journal*. 2010; 426(1),109–118.