

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00621

## 二甲双胍对糖尿病大鼠脂肪组织 AMPK $\alpha$ 2 及氧化应激水平的影响

宋玉萍, 韩冲, 史婧丽, 吴莹, 刘志民\*

第二军医大学长征医院内分泌科, 上海 200003

**[摘要]** **目的** 观察二甲双胍对 2 型糖尿病大鼠脂肪组织中腺苷酸活化蛋白激酶  $\alpha$ 2 (AMPK $\alpha$ 2) 表达及对氧化应激水平的影响, 探讨其改善血糖、氧化应激及胰岛素抵抗的可能机制。 **方法** 32 只雄性 SD 大鼠随机分为正常对照组 (NC,  $n=12$ )、糖尿病模型组 (DM,  $n=10$ )、二甲双胍治疗组 (MT,  $n=10$ ); 后两组高脂饮食 1 个月后腹腔注射链脲佐菌素 (STZ) 30 mg/kg 制备 2 型糖尿病大鼠模型。造模成功后, MT 组给予二甲双胍 50 mg/(kg·d) 灌胃, NC 组、DM 组给予同剂量 0.5% 羟甲基纤维素钠溶液。测定大鼠治疗前后的体质量, 并检测各组空腹血糖 (FBG)、空腹胰岛素 (FINS)、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽 (GSH)、 $\beta$ -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶 (NAG)、髓过氧化物酶 (MPO)、丙二醛 (MDA)、单胺氧化酶 (MAO)、总胆固醇 (TC)、三酰甘油 (TG)、高密度脂蛋白 (HDL)、低密度脂蛋白 (LDL) 水平, 计算大鼠脂体比、胰岛素敏感指数 (ISI)。同时以半定量 RT-PCR 检测脂肪组织 AMPK $\alpha$ 2 mRNA 的表达。 **结果** 与 DM 组比较, MT 组脂肪组织 AMPK $\alpha$ 2 mRNA 的表达及血清 GSH、SOD、ISI、HDL 增高, FINS、FBG、NAG、MDA、MPO、MAO、TC、TG、LDL 降低, 差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ )。 **结论** 二甲双胍调节 2 型糖尿病大鼠, 糖脂代谢, 改善胰岛素敏感性及氧化应激可能与脂肪组织 AMPK $\alpha$ 2 的表达增加有关。

**[关键词]** 二甲双胍; 腺苷酸活化蛋白激酶  $\alpha$ 2; 氧化性应激; 2 型糖尿病

**[中图分类号]** R 587.1

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 0258-879X(2012)06-0621-04

### Influence of metformin on adipose AMPK $\alpha$ 2 expression and oxidative stress level in diabetic rats

SONG Yu-ping, HAN Chong, SHI Jing-li, WU Ying, LIU Zhi-min\*

Department of Endocrinology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the influence of metformin on AMP-activated Protein Kinase $\alpha$ 2 (AMPK  $\alpha$ 2) expression in adipose tissue and oxidative stress indices in diabetic rats, so as to understand the possible mechanism of metformin in improving blood glucose control, oxidative stress and insulin-resistance. **Methods** Totally 32 male SD rats were randomly divided into normal control (NC) group ( $n=12$ ), model (T2DM) group ( $n=10$ ) and metformin group ( $n=10$ ). Rat model of T2DM was established by high fat/high glucose diet (one month) and intraperitoneal injection of streptozotocin (30 mg/kg). Animals in the metformin group were given 50 mg/(kg·d) (i. g.), and those in the other two groups were given same dose of 0.5% HPMC solution. The body masses of rats were determined before and after treatment. The fasting blood glucose (FBG), fasting insulin (FINS), superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH), N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG), malonaldehyde (MDA), myeloperoxidase (MPO), monoamine oxidase (MAO), total cholesterol (TC), triacylglycerol (TG), low-density lipoprotein cholesterol (LDL) and high-density lipoprotein cholesterol (HDL) levels were measured by ELISA and Biochemical Analyzer; the ratio of fat to body weight and insulin sensitivity index (ISI) were calculated. RT-PCR was used to evaluate the expression of AMPK  $\alpha$ 2 mRNA in the adipose tissues. **Results** Compared with DM group, metformin group had significantly higher AMPK  $\alpha$ 2 mRNA expression, serum GSH, SOD, ISI and HDL, and significantly lower serum FINS, FBG, NAG, MDA, MPO, MAO, TC, TG and LDL ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Metformin can increase AMPK  $\alpha$ 2 expression in the adipose tissue of diabetic rats, regulate glucose metabolism, and improve insulin sensitivity and oxidative stress.

**[Key words]** metformin; adenosine acid amp-activated protein kinase  $\alpha$ 2; oxidative stress; type 2 diabetes

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(6): 621-624]

二甲双胍是治疗 2 型糖尿病的基础用药, 在糖尿病治疗中占据重要地位。近年研究显示, 二甲双

胍具有独立于降糖作用之外的调节血脂作用, 还具有抗氧化、减轻过氧化氢对内皮细胞的氧化损伤作

**[收稿日期]** 2011-11-10

**[接受日期]** 2011-12-15

**[作者简介]** 宋玉萍, 博士生. E-mail: syp811121@gmail.com

\* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81885371, E-mail: zmliu\_cz@hotmail.com

用,能够改善糖尿病患者的氧化应激指标水平,但具体机制还有待于进一步研究<sup>[1]</sup>。

磷酸腺苷激活的蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)是由  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\gamma$  3 个亚单位组成的异源三聚体蛋白,在细胞内行使能量代谢调节作用。众多研究已证实 AMPK 在糖尿病及肥胖症等人类代谢性疾病的发病中发挥至关重要的作用<sup>[2-4]</sup>。以往对 AMPK 的研究多集中在肝脏、骨骼肌方面<sup>[5]</sup>,在脂肪组织中的研究不多,结论亦不一致<sup>[6-7]</sup>。本研究旨在通过动物实验观察二甲双胍对糖尿病大鼠脂肪组织 AMPK $\alpha$ 2 表达以及对糖、脂代谢和氧化应激指标的影响,探讨其可能的分子机制。

## 1 材料和方法

1.1 主要试剂及来源 羧甲基纤维素钠、链脲佐菌素(STZ)、柠檬酸及柠檬酸钠购于美国 Sigma 公司,高脂饲料购于中国科学院,普通饲料购于第二军医大学实验动物中心。旋涡振荡器(Vortex)XW-80A(上海青浦沪西仪器厂),Real-time 检测仪(7500 Sequence Detection System)ABI-7500(美国),低温冷冻离心机 1-15K3K15Sigma(美国),各种标本检测试剂盒购于南京建成生物工程研究所。

1.2 动物分组及模型制备 雄性 SD 大鼠 32 只,体重 180~200 g,由第二军医大学实验动物中心提供,生产许可证号:SCXK(沪)2007-0003;使用许可证号:SYXK(沪)2007-0003。SPF 环境饲养,温度 20~25℃,湿度 56%,自由饮水,12/12 h 昼夜规律,喂食时间为每日下午 5:00 至次日早上 8:00。大鼠适应性饲养 2 d 后随机分组,正常对照组(NC)12 只给予普通饲料,糖尿病组 20 只给予高脂饲料,均喂养 4 周。诱发出胰岛素抵抗模型后一次性腹腔注射 STZ(溶于 pH 4.3,0.1 mol/L 的柠檬酸缓冲液)30 mg/kg;NC 组腹腔注射同剂量的柠檬酸缓冲液(pH 4.3,0.1 mol/L)。模型验证:造模组继续高脂饮食、对照组普食喂养 2 周(期间未给予药物干预)后禁食 8 h,按 2 g/kg 灌服 20% D-葡萄糖溶液,0 min 和 120 min 血糖分别大于 7.0 mmol/L 和 11.0 mmol/L 者视为 2 型糖尿病造模成功。将成模大鼠随机分为糖尿病模型组(DM)和二甲双胍治疗组(MT),各 10 只。MT 组给予二甲双胍(溶于 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液)50 mg/(kg·d)灌胃,NC 组及 DM 组给予同剂量 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液,持续 4 周后处死。

1.3 检测指标及方法 测定大鼠治疗前后的体质量。实验末各组大鼠腹腔麻醉,迅速行腹主动脉采血 6~8 ml,将血液标本送上海达为生物科技有限

公司,进行空腹血糖(FBG)、空腹胰岛素(FINS),总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、高密度脂蛋白(HDL)、低密度脂蛋白(LDL),超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)、N-乙酰- $\beta$ -D-氨基葡萄糖苷酶(NAG)、髓过氧化物酶(MPO)、丙二醛(MDA)、单胺氧化酶(MAO)的检测。检测分别采用优越型血糖仪(罗氏公司)、生化分析仪(Biochemical Analyzer)及酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immuno sorbent assay, ELISA)法。采血后,快速取出大鼠肾周及睾周脂肪组织,标记后立即置于液氮中,于-80℃冰箱中保存。并计算胰岛素敏感指数(insulin sensitivity index, ISI),ISI 为空腹血糖值与空腹血胰岛素值乘积的倒数,呈非正态分布,分析时取其自然对数值。

1.4 半定量 RT-PCR 测定大鼠脂肪组织 AMPK $\alpha$ 2 mRNA 表达 AMPK $\alpha$ 2 上游引物:5'-GGT GTT ATC CTG TAT GCC CTT CT-3',AMPK $\alpha$ 2 下游引物:5'-TGT CTT TGA TAG TT2 GCT CGC TTC-3',GADPH 上游引物:5'-ATG ACG ACA TCA AAA GGT GG-3',GAPDH 下游引物:5'-GGG ATG GAA ACT GTG AAG AGG-3'。采用两步法进行 RT-PCR。PCR 反应条件:96℃ 变性 15 s,60℃ 退火 20 s,72℃ 延伸 20 s,共 49 个循环,反应结束后确认 Real-Time PCR 的扩增曲线和融解曲线,进行 PCR 半定量时制作标准曲线,分析结果:mRNA 相对表达量 =  $2^{-\Delta Ct} \times 100\%$ , $\Delta Ct$  = 目标基因 Ct 值 - 内参 Ct 值。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析,计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 *t* 检验和方差分析。检验水平( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

2.1 大鼠一般情况 NC 组大鼠一般状态良好,实验过程中饮食、饮水、尿量无明显变化。DM 组大鼠消瘦,毛色杂乱无光泽,精神萎靡,行动迟缓,反应迟钝,出现不同程度的多饮、多食、多尿症状。MT 组与 DM 组相比较,大鼠多饮、多食、多尿、消瘦症状在治疗后明显减轻。由表 1 可见,与 NC 组比较,DM 组大鼠体质量显著降低,MT 组大鼠体质量显著升高,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );MT 组与 DM 组比较,MT 组大鼠体质量明显升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),说明二甲双胍可以改善糖尿病大鼠的消瘦症状。

2.2 各组指标比较 结果(表 2)显示:与 NC 组相比,DM 组及 MT 组大鼠 FBG、FINS、TG、TC、LDL 水平均升高,HDL 水平均降低,差异均有统计学意

义 ( $P < 0.05$ ); MT 组与 DM 组比较, MT 组大鼠 FBG、FINS、TG、TC、LDL 水平降低, HDL 升高, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。表 3 列出了各组氧化应激等相关指标的水平, 结果显示: 与 NC 组相比, DM 组及 MT 组大鼠 SOD、GSH 水平均降低 ( $P < 0.05$ ), NAG、MPO、MDA 及 MAO 水平均升高 ( $P < 0.05$ ); MT 组与 DM 组比较, MT 组大鼠 SOD 及 GSH 水平升高 ( $P < 0.05$ ), NAG、MPO、MDA 及 MAO 水平均降低 ( $P < 0.05$ )。

表 2 各组大鼠血糖、ISI、血脂等指标检测结果

Tab 2 FBG, ISI and serum lipids in each group

Group	n	$\bar{x} \pm s$						
		FBG $c_B/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	FINS $\rho_B/\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$	ISI	TC $c_B/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	TG $c_B/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	HDL-C $c_B/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	LDL-C $c_B/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
NC	12	5.64 ± 0.31	21.82 ± 2.78	-5.15 ± 0.29	2.22 ± 0.41	0.63 ± 0.58	1.70 ± 0.11	0.31 ± 0.27
DM	10	33.89 ± 5.71*	33.01 ± 4.10*	-8.52 ± 0.43*	9.37 ± 0.31*	4.01 ± 0.34*	0.68 ± 0.15*	4.89 ± 0.15*
MT	10	7.34 ± 1.38* $\Delta$	25.32 ± 2.86* $\Delta$	-5.75 ± 0.37* $\Delta$	5.76 ± 0.21* $\Delta$	2.12 ± 0.61* $\Delta$	1.53 ± 0.16* $\Delta$	2.56 ± 0.17* $\Delta$

NC: Normal control; DM: Diabetics mellitus; MT: Metformin. FBG: Fasting blood glucose; FINS: Fasting insulin; ISI: Insulin sensitivity index; TC: Total cholesterol; TG: Triacylglycerol; HDL-C: High-density lipoprotein cholesterol; LDL-C: Lipoprotein cholesterol. \*  $P < 0.05$  vs NC group;  $\Delta P < 0.05$  vs DM group

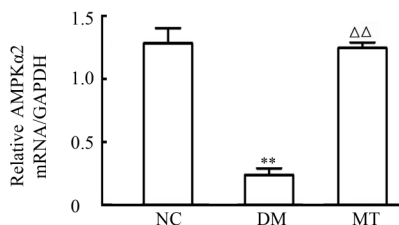
表 3 各组大鼠氧化应激等相关指标比较

Tab 3 Comparison of oxidative stress indices in each group

Group	n	$\bar{x} \pm s$					
		SOD $z_B/\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$	GSH $\rho_B/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	MDA $c_B/\text{nmol} \cdot \text{ml}^{-1}$	NAG $c_B/\text{nmol} \cdot \text{ml}^{-1}$	MPO $z_B/\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	MAO $z_B/\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$
NC	12	43.24 ± 2.12	21.78 ± 2.26	1.36 ± 0.22	12.74 ± 1.72	26.98 ± 8.89	3.33 ± 1.05
DM	10	7.88 ± 1.86*	6.56 ± 1.00*	6.32 ± 0.66*	47.20 ± 1.80*	165.40 ± 18.80*	10.12 ± 1.75*
MT	10	19.93 ± 3.25* $\Delta$	13.32 ± 1.79* $\Delta$	3.89 ± 0.72* $\Delta$	30.94 ± 5.72* $\Delta$	100.14 ± 19.59* $\Delta$	7.22 ± 2.07* $\Delta$

NC: Normal control; DM: Diabetes mellitus; MT: Metformin. SOD: Superoxide dismutase; GSH: Glutathione; MDA: Malonaldehyde; NAG: N-acetyl-beta-D-glucosaminidase; MPO: Myeloperoxidase; MAO: Monoamine oxidase. \*  $P < 0.05$  vs NC group;  $\Delta P < 0.05$  vs DM group

2.3 大鼠脂肪组织 AMPK $\alpha$ 2 mRNA 的表达 结果(图 1)表明: DM 组大鼠脂肪组织中 AMPK $\alpha$ 2 mRNA 水平显著低于 NC 组和 MT 组, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), NC 组与 MT 组之间差异则无统计学意义。

图 1 脂肪组织 AMPK $\alpha$ 2 mRNA 的表达Fig 1 AMPK $\alpha$ 2 mRNA expression in adipose tissue

NC: Normal control; DM: Diabetes mellitus; MT: Metformin.

\*  $P < 0.01$  vs NC group;  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs DM group

表 1 大鼠造模前后及治疗后体质量的比较

Tab 1 Body mass of rats in each group

Group	n	$\bar{x} \pm s$		
		Before modeling	After modeling	After treatment with metformin
NC	12	189.08 ± 5.65	259.38 ± 6.45	385.78 ± 6.85
DM	10	188.58 ± 6.13	534.96 ± 8.19	308.53 ± 9.02*
MT	10	190.96 ± 5.99	535.26 ± 8.51	452.03 ± 9.32* $\Delta$

NC: Normal control; DM: Diabetes mellitus; MT: Metformin.

\*  $P < 0.05$  vs NC group;  $\Delta P < 0.05$  vs DM group

$\bar{x} \pm s$

Group	n	$\bar{x} \pm s$						
		TC $c_B/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	TG $c_B/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	HDL-C $c_B/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	LDL-C $c_B/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$			
NC	12	2.22 ± 0.41	0.63 ± 0.58	1.70 ± 0.11	0.31 ± 0.27			
DM	10	9.37 ± 0.31*	4.01 ± 0.34*	0.68 ± 0.15*	4.89 ± 0.15*			
MT	10	5.76 ± 0.21* $\Delta$	2.12 ± 0.61* $\Delta$	1.53 ± 0.16* $\Delta$	2.56 ± 0.17* $\Delta$			

NC: Normal control; DM: Diabetics mellitus; MT: Metformin. FGB: Fasting blood glucose; FINS: Fasting insulin; ISI: Insulin sensitivity index; TC: Total cholesterol; TG: Triacylglycerol; HDL-C: High-density lipoprotein cholesterol; LDL-C: Lipoprotein cholesterol. \*  $P < 0.05$  vs NC group;  $\Delta P < 0.05$  vs DM group

表 3 各组大鼠氧化应激等相关指标比较

Tab 3 Comparison of oxidative stress indices in each group

Group	n	$\bar{x} \pm s$					
		SOD $z_B/\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$	GSH $\rho_B/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	MDA $c_B/\text{nmol} \cdot \text{ml}^{-1}$	NAG $c_B/\text{nmol} \cdot \text{ml}^{-1}$	MPO $z_B/\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	MAO $z_B/\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$
NC	12	43.24 ± 2.12	21.78 ± 2.26	1.36 ± 0.22	12.74 ± 1.72	26.98 ± 8.89	3.33 ± 1.05
DM	10	7.88 ± 1.86*	6.56 ± 1.00*	6.32 ± 0.66*	47.20 ± 1.80*	165.40 ± 18.80*	10.12 ± 1.75*
MT	10	19.93 ± 3.25* $\Delta$	13.32 ± 1.79* $\Delta$	3.89 ± 0.72* $\Delta$	30.94 ± 5.72* $\Delta$	100.14 ± 19.59* $\Delta$	7.22 ± 2.07* $\Delta$

NC: Normal control; DM: Diabetes mellitus; MT: Metformin. SOD: Superoxide dismutase; GSH: Glutathione; MDA: Malonaldehyde; NAG: N-acetyl-beta-D-glucosaminidase; MPO: Myeloperoxidase; MAO: Monoamine oxidase. \*  $P < 0.05$  vs NC group;  $\Delta P < 0.05$  vs DM group

### 3 讨论

本研究发现, 糖尿病组大鼠出现多饮、多食、多尿、消瘦症状, FBG、FINS、TG、TC、LDL 水平升高, HDL 水平降低, 而经用二甲双胍治疗后上述症状及指标均明显改善, 表明二甲双胍能够调节糖、脂代谢平衡, 改善胰岛素敏感性。

NAG 是溶酶体中的一种酸性水解酶, 研究发现 2 型糖尿病患者中 NAG 浓度升高, 而且其浓度的升高可以早期预测患者存在肾脏损害<sup>[8]</sup>。MAO 广泛分布于体内各组织器官, 其活性高低能反映肝纤维化的程度, 糖尿病可因合并脂肪肝、充血性心力衰竭, 或因肝淤血而继发肝硬化时, 导致血 MAO 活性升高。另有研究发现 MAO 抑制剂可以拮抗缺血引起的氧化应激<sup>[9]</sup>。MPO 是中性粒细胞的功能标志

和激活标志,主要功能是在吞噬细胞内杀灭微生物,利用过氧化氢和氯离子产生次氯酸盐,并形成具有氧化能力的自由基,研究发现其基因多态性与氧化应激相关<sup>[10-11]</sup>。本研究发现,糖尿病大鼠血 NAG、MAO 和 MPO 水平均升高,提示糖尿病大鼠组织器官发生了一定程度的损伤。经二甲双胍治疗后,上述指标均明显改善,提示二甲双胍具有广泛的药理作用。

近年研究证实氧化应激参与了糖尿病的发生和发展<sup>[12]</sup>。胰岛素抵抗源于氧化应激,高游离脂肪酸(FFA)刺激的后果是高活性反应分子活性氧簇(ROS)和活性氮簇(RNS)生成增多,从而启动了氧化应激机制<sup>[13]</sup>。本研究发现,与正常对照组相比,糖尿病大鼠抗氧化酶 SOD、GSH 水平均降低( $P < 0.05$ ),氧化损伤标志物 MDA 水平升高( $P < 0.05$ ),证实氧化应激确实在糖尿病病理过程中起着重要作用。经二甲双胍治疗后,SOD、GSH 水平升高,MDA 水平降低,说明二甲双胍减轻了糖尿病大鼠的氧化应激反应。

AMPK 是新近发现的一种细胞内能量代谢的重要调节因子,其可感受胞质内 ATP 水平的下降来激活产能通路而抑制能量的消耗。除调节机体能量代谢<sup>[14]</sup>外,AMPK 也参与机体胰岛素敏感型的调节<sup>[15]</sup>。胰岛素在人体内发挥作用的通路主要有两条,一条通过磷酸肌醇 3 激酶(PI3K)通路,可以发挥降糖和激活一氧化氮合酶的作用;另一条通过丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路,可以增加细胞生长、增殖和分化,促进动脉粥样硬化。除传统的胰岛素信号转导通路外,AMPK 表达和活性的变化可能是胰岛素抵抗发生的上游机制<sup>[16]</sup>。AMPK 在脂肪组织中的研究很少,并且存在争议<sup>[6-7]</sup>。本研究发现,DM 组大鼠脂肪组织 AMPK $\alpha_2$  mRNA 表达较 NC 组明显降低。应用二甲双胍治疗后,AMPK $\alpha_2$  mRNA 表达较 DM 组明显升高,说明二甲双胍能够上调糖尿病大鼠脂肪组织中 AMPK $\alpha_2$  的表达。提示二甲双胍可能通过增加脂肪组织 AMPK $\alpha_2$  mRNA 含量来调节糖、脂代谢平衡,改善胰岛素敏感性,抵抗氧化应激作用,但尚需进一步证实。

#### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

#### [参考文献]

[1] Chakraborty A,Chowdhury S,Bhattacharyya M. Effect of metformin on oxidative stress,nitrosative stress and inflammatory biomarkers in type 2 diabetes patients[J]. *Diabetes Res Clin*

Pract,2011,93:56-62.  
 [2] Andreassen A S,Kelly M,Berg R M,Møller K,Pedersen B K. Type 2 diabetes is associated with altered NF- $\kappa$ B DNA binding activity,JNK phosphorylation,and AMPK phosphorylation in skeletal muscle after LPS[J]. *PLoS One*,2011,6:e23999.  
 [3] Kraegen E W,Bruce C,Hegarty B D,Ye J M,Turner N,Cooney G. AMP activated protein kinase and muscle insulin resistance[J]. *Front Biosci*,2009,14:4658-4672.  
 [4] Foretz M,Ancellin N,Andreelli F,Saintillan Y,Grondin P,Kahn A,et al. Short term over expression of a constitutively active form of AMP-activated protein kinase in the liver leads to mild hypoglycemia and fatty liver[J]. *Diabetes*,2005,54:1331-1339.  
 [5] Folmes C D,Lopaschuk G D. Role of malonyl-CoA in heart disease and the hypothalamic control of obesity[J]. *Cardiovasc Res*,2007,73:278-287.  
 [6] Maarbjerg S J,Jørgensen S B,Rose A J,Jeppesen J,Jensen T E,Trebbak J T,et al. Genetic impairment of AMPK $\alpha$ 2 signaling does not reduce muscle glucose uptake during treadmill exercise in mice[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*,2009,297:924-934.  
 [7] Martínez-Agustín O,Hernández-Morante J J,Martínez-Plata E,Sánchez de Medina F,Garaulet M. Differences in AMPK expression between subcutaneous and visceral adipose tissue in morbid obesity[J]. *Regul Pept*,2010,163:31-36.  
 [8] Vlastimir V,Stojimirović B,Obrenović R. Damage of tubule cells in diabetic nephropathy type 2: urinary N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase and  $\gamma$ -glutamyl-transferase[J]. *Vojnosanit Pregl*,2007,64:123-127.  
 [9] Seif-El-Nasr M,Atia A S,Abdelsalam R M. Effect of MAO-B inhibition against ischemia-induced oxidative stress in the rat brain. Comparison with a rational antioxidation[J]. *Arzneimittelforschung*,2008,58:160-167.  
 [10] Funke S,Risch A,Nieters A,Hoffmeister M,Stegmaier C,Seiler C M,et al. Genetic polymorphisms in genes related to oxidative stress (GSTP1, GSTM1, GSTT1, CAT, MnSOD, MPO, eNOS) and survival of rectal cancer patients after radiotherapy [J]. *J Cancer Epidemiol*,2009,2009:302047.  
 [11] Choi J Y,Neuhouser M L,Barnett M J,Hong C C,Kristal A R,Thornquist M D,et al. Iron intake oxidative stress-related genes (MnSOD and MPO) and prostate cancer risk in CARET cohort[J]. *Carcinogenesis*,2008,29:964-970.  
 [12] Gao D,Nong S,Huang X,Lu Y,Zhao H,Lin Y,et al. The effects of palmitate on hepatic insulin resistance are mediated by NADPH oxidase 3-derived reactive oxygen species through JNK and p38/MAPK pathways[J]. *J Biol Chem*,2010,285:29965-29973.  
 [13] Caimi G,Carollo C,Presti R L. Diabetes mellitus; oxidative stress and wine[J]. *Curr Med Res Opin*,2003,19:581-586.  
 [14] Sanders M J,Grondin P O,Hegarty B D,Snowden M A,Carling D. Investigation the mechanism for AMPK activation of the AMPK-activated protein kinase[J]. *Biochem J*,2007,403:139-148.  
 [15] Xiao B,Sanders M J,Underwood E,Heath R,Mayer F V,Carmena D,et al. Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP[J]. *Nature*,2011,472:230-233.  
 [16] Lee E S,Uhm K O,Lee Y M,Han M,Lee M,Park J M,et al. CAPE (caffeic acid phenethyl ester) stimulates glucose uptake through AMPK (AMP-activated protein kinase) activation in skeletal muscle cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2007,361:854-858.