

二甲双胍对非酒精性脂肪性肝炎大鼠肝脏抵抗素表达的影响

姚俊娜 陈芝芸 严茂祥 吴黎艳 黄志群

摘要 目的 观察二甲双胍对非酒精性脂肪性肝炎大鼠肝脏 Resistin、NF- κ B、TNF- α 表达的影响,探讨二甲双胍防治 NASH 的作用机制。方法 随机将 24 只大鼠分为正常组、NASH 组和二甲双胍组,每组 8 只,以高脂饮食 12 周建立大鼠 NASH 模型,同时每天以 60mg/(kg·d) 的二甲双胍混悬液灌胃干预 12 周;观察大鼠体重及肝指数变化,油红 O 和 HE 染色观察肝脏组织病理学改变;Real time-PCR 法检测肝组织 Resistin、NF- κ B、TNF- α 等基因 mRNA 的表达,ELIAS 法检测血清 Resistin、TNF- α 水平,免疫组化观察肝组织 NF- κ B 核表达定位。结果 NASH 组大鼠体重和肝指数较正常组明显增加($P < 0.01$),二甲双胍组大鼠体重和肝指数较 NASH 组显著降低($P < 0.01$);NASH 组大鼠肝组织大量脂质沉积,明显肝细胞气球样变和小叶内炎症坏死灶等病理表现,二甲双胍组大鼠肝组织脂质沉积和炎症程度则有明显减轻;NASH 组大鼠肝组织 Resistin、NF- κ B、TNF- α 等基因 mRNA 表达较正常组显著增强($P < 0.01$),同时肝组织出现大量 NF- κ B p65 蛋白阳性的核表达,血清 Resistin、TNF- α 水平也较正常组明显增高($P < 0.01$),应用二甲双胍干预后,大鼠肝组织 Resistin、NF- κ B、TNF- α 等基因 mRNA 表达较 NASH 组显著减少($P < 0.05$),血清 Resistin、TNF- α 水平较 NASH 组明显降低,肝组织 NF- κ B p65 蛋白阳性的核表达也明显的减少。结论 二甲双胍能一定程度抑制高脂诱导的 NASH 大鼠抵抗素及相关炎性因子的表达,从而减轻 NASH 大鼠肝组织脂肪变程度和炎症损伤,防治 NASH 的进一步发展。

关键词 非酒精性脂肪肝炎 抵抗素 炎性因子 盐酸二甲双胍

中图分类号 R5

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.11.018

Effects of Metformin on Liver Resistin Expression in Rats with NASH. Yao Junna, Chen Zhiyun, Yan Maoxiang, et al. Shaoying Shangyu Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhejiang 310006, China

Abstract Objective To observe the effect of metformin on Resistin, NF- κ B, TNF- α expression in the rats with non-alcoholic steatohepatitis (NASH) induced by fat-rich diet; to explore the possible mechanism of Metformin in preventing and treating NASH. **Methods** Totally 24 male rats were randomly divided into the normal group (8 rats), NASH group (8 rats) and Metformin group (8 rats). With high fat diet for 12 weeks to establish a rat model of NASH, at the time of model-making, the rats in the Metformin group were fed with Metformin liquid extract by daily gavage at the dosage of 60mg/(kg·d). To observe the change of body weight and hepatic index in rats, the liver pathological change was evaluated under light microscope after HE staining and Oil red O. Liver Resistin, NF- κ B, TNF- α gene mRNA expression was detected with Real-time-PCR, serum Resistin, TNF- α levels were detected with ELISA, liver tissue NF- κ B nuclear expression was expressed by immunohistochemical staining. **Results** Body weight and liver index of rats in the NASH group was significantly higher than that in the normal group ($P < 0.01$), body weight and liver index of metformin group rats were significantly lower than those of NASH group ($P < 0.01$). There were a lot of lipid deposition in liver tissue of rats in the NASH group, and obvious ballooning degeneration of liver cells and small lobe not leaf necrosis and inflammatory pathology in Metformin group. Rats liver lipid deposition and inflammation were significantly reduced. Resistin, NF- κ B, TNF- α gene mRNA expression in NASH rats of Liver tissue was higher than that in control group ($P < 0.01$). At the same time, the emergence of liver tissue have large number of nuclearexpression of NF- κ B p65 protein positive. Serum Resistin, TNF- α levels was significantly higher than that in the normal group ($P < 0.01$). When metformin intervention, the expression of Resistin, NF- κ B, TNF- α gene mRNA in the liver tissue of rats was less than that in NASH group ($P < 0.05$). Serum Resistin, TNF- α levels were significantly lower than those in NASH group, nuclear expression of NF- κ B p65 protein positive in liver tissue was significantly reduced. **Conclusion** Metformin can to some extent restrain the expression of

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(Y2100170)

作者单位:312300 绍兴市上虞中医医院(姚俊娜);310006 杭州,浙江省中医院(陈芝芸、严茂祥、吴黎艳、黄志群)

通讯作者:陈芝芸,电子邮箱:zhich123@163.com

NASH in rat resistin and inflammatory factors induced by high lipid diet, which can reduce the rats with non-alcoholic steatohepatitis (NASH) of hepatic steatosis and inflammatory injury, and further development of prevention and control of NASH.

Key words Non-alcoholic steatohepatitis; Inflammatory factor; Resistin; Metformin

非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是脂质代谢紊乱导致肝细胞内脂质过度蓄积的临床病理状态, 其发生与胰岛素抵抗及其相关的代谢紊乱症候群, 如 2 型糖尿病、肥胖、高血脂、高血压、动脉粥样硬化等密切相关, 是胰岛素抵抗综合症的肝脏组分。一般认为单纯性脂肪肝进展缓慢, 预后相对比较好, 但脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH) 可进展成肝纤维化和肝硬化, 甚至发展为肝癌; 有效地阻断这 NASH 的发生、发展, 有十分重要的临床意义。盐酸二甲双胍是临床常用口服降糖药, 为胰岛素增敏剂, 可提高胰岛素敏感性, 并对肝脏脂肪沉积有明显的改善作用^[1-3]。项目组前期研究也发现, 盐酸二甲双胍能改善高脂饮食诱导的 NASH 大鼠脂质代谢紊乱, 降低血清 CHOL、LDL-C、FAA 含量, 增强肝脏 AMPK α mRNA 表达, 从而减少脂质在肝脏积聚, 改善肝脏炎症程度^[4]。

近年来研究发现, 脂肪细胞因子抵抗素 (Resistin) 是脂源性多肽类激素, 可诱导肝脏胰岛素抵抗, 调节糖脂代谢, 促进多种炎性因子的释放与合成, 参与炎症的级联反应, 与 NASH 的发生、发展关系密切^[5,6]。为进一步探讨二甲双胍防治 NASH 进展的作用机制, 本研究观察二甲双胍对高脂诱导的 NASH 大鼠 Resistin、NF- κ B、TNF- α 表达的影响。

材料与方 法

1. 实验动物: 雄性 Sprague Dawley 大鼠 24 只, SPF 级, 体重 190 ± 10 g, 购自上海西普尔-必凯实验动物中心, 实验动物许可证号: SCXK(沪)2008-0016。

2. 主要药与物试剂: 盐酸二甲双胍上海信仪药片有限公司产品, 0.25 克/片, 批号 091112B; 胆固醇上海伯奥生物科技有限公司产品, 批号: 10020, 3 号胆盐杭州微生物试剂有限公司产品, 批号: 20100125-0; Trizol 由生工生物工程(上海)股份有限公司提供, 批号: 131209328; RT 试剂盒(批号: BK1301)和荧光定量 PCR 试剂盒(批号: B9704-1)为 TaKaRa 产品; 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, Resistin 上游引物: 5'-GTCGCCAGTTTCCTAATTCCTC-3', 下游引物: 5'-ACCCAGTGACAGCAAAGCCT-3', 扩增片段 112bp; NF- κ B 上游引物: 5'-CGACGTATTGCTGTGCCTTC-3', 下游引物: 5'-TGAGATCTGCCCAGGTGGTAA-3', 扩增片段: 133bp; TNF- α 上游引物: 5'-GAGATGTGGAAGTGGCAGAGGA-3' 下游引物: 5'-CGATCACCCGAAGTTCAGTAG-3', 扩增片段: 147bp; 内参 GAPDH 上游引物: 5'-GACAACCTTTC-

GCATCGTGGA-3', 下游引物: 5'-ATGCAGGGATGATGTTCTCGG-3', 扩增片段 133bp; Resistin(批号: CK-E30593R)和 TNF- α (批号: CK-E90339R)ELISA 试剂盒由上海原叶生物科技有限公司提供; NF- κ B p65 兔多克隆抗体(批号: GR51446-2)美国 Abcam 公司产品, GTVisionTM III 抗鼠/兔通用型免疫组化检测试剂盒(批号: 16F1778A)为基因科技(上海)有限产品。

3. 实验方法: 24 只大鼠随机分为正常组、NASH 组 and 二甲双胍组, 每组 8 只; 正常组喂养普通大鼠饲料, 其他两组每天喂养高脂饲料建立 NASH 模型^[4], 连续 12 周, 均自由饮水。同时二甲双胍组每天灌服予 60mg/(kg·d)的盐酸二甲双胍灌胃, 正常组、NASH 组每天灌胃等容量的蒸馏水, 共 12 周。末次给药后次日上午空腹麻醉下处死大鼠, 取肝脏称重, 计算肝指数, 部分冷冻切片油红 O 染色观察肝细胞脂肪沉积, 部分中性甲醛固定, 常规 HE 染色观察肝组织病理变化, 免疫组化观察肝组织 NF- κ B 蛋白核定位^[7]。剩余肝组织 -70°C 保存用于提取肝组织总 RNA, 肝组织的抵抗素、NF- κ B、TNF- α 基因 mRNA 表达采用实时荧光定量 PCR, GAPDH 为内参, 相对表达量 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) 表示目的基因 mRNA 的表达水平。血清抵抗素、TNF- α 水平采用 ELISA 法测定。

4. 统计学方法: 采用 SPSS 17.0 软件统计, 数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 应用 One-Way ANOVA 进行分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 盐酸二甲双胍对 NASH 大鼠体重及肝指数的影响: 实验过程中 NASH 组大鼠体重增长较正常组快, 尤其在前 6 周增长迅速, 各组大鼠均无死亡。实验结束时 NASH 组大鼠体重及肝指数(肝湿重/体重 $\times 100\%$) 较正常组明显增高 ($P < 0.01$), 二甲双胍组大鼠体重及肝指数均较 NASH 显著降低 ($P < 0.01$), 详见表 1。

表 1 二甲双胍对 NASH 大鼠体重及肝指数的影响 ($\bar{x} \pm s$)

分组	n	体重(g)	肝指数
正常组	8	449.87 \pm 33.46	2.29 \pm 0.23
NASH 组	8	502.25 \pm 27.57*	5.41 \pm 0.49*
二甲双胍组	8	438.25 \pm 42.65#	4.82 \pm 0.46*#

与正常组比较, * $P < 0.01$; 与 NASH 比较, # $P < 0.01$

2. 盐酸二甲双胍对 NASH 大鼠肝组织病理的影响: 油红 O 染色光镜观察正常组大鼠肝细胞内少量红染的脂滴沉积模型组大鼠肝组织内大量红染的脂

肪沉积;HE 染色发现正常组大鼠肝组织结构未见明显异常,模型组大鼠见有小叶炎症坏死灶明显,汇管区炎性细胞浸润,肝细胞气球样变,但肝纤维化不明

显;二甲双胍组大鼠肝组织也可见脂质沉积、炎性坏死灶及肝细胞气球样变,但程度明显减轻(图 1、图 2)。

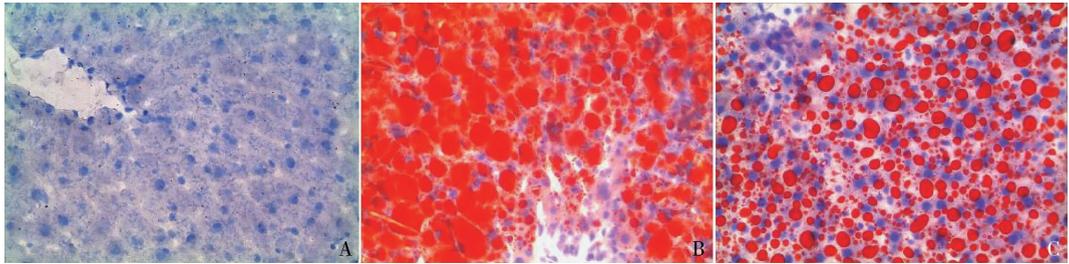


图 1 盐酸二甲双胍对 NASH 大鼠肝细胞脂肪沉积的影响(油红 O, ×200)
A. 正常组;B. NASH 组;C. 二甲双胍组

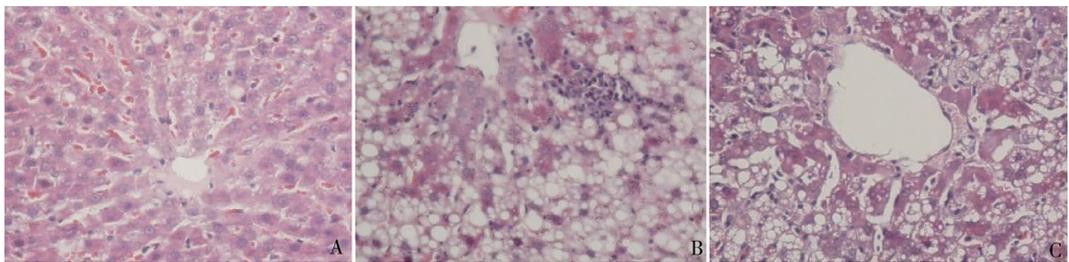


图 2 盐酸二甲双胍对 NASH 大鼠肝组织病理的影响(HE, ×200)
A. 正常组;B. NASH 组;C. 二甲双胍组

3. 盐酸二甲双胍对 NASH 大鼠肝组织 Resistin、NF-κB、TNF-α mRNA 表达的影响:NASH 组大鼠肝组织 Resistin、NF-κB、TNF-α 基因的 mRNA 表达较正常组明显增强($P < 0.01$),二甲双胍组大鼠肝组织 Resistin、NF-κB、TNF-α 基因的 mRNA 表达则较模型组显著降低($P < 0.05$),详见表 2。

表 3 二甲双胍对 NASH 大鼠血清 Resistin、TNF-α 含量的影响($\bar{x} \pm s$)

分组	n	Resistin(μg/L)	TNF-α (ng/L)
正常组	10	78.54 ± 4.08	151.38 ± 25.28
NASH 组	10	121.71 ± 25.86*	202.15 ± 18.67*
二甲双胍组	10	91.07 ± 12.17#	181.02 ± 13.03*#

与正常组比较,* $P < 0.01$;与 NASH 组比较,# $P < 0.05$

表 2 二甲双胍对 NASH 大鼠肝脏 Resistin、NF-κB、TNF-α mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

分组	n	Resistin mRNA	NF-κB mRNA	TNF-α mRNA
正常组	8	1.05 ± 0.25	1.16 ± 0.48	0.99 ± 0.15
NASH 组	8	2.86 ± 0.78**	3.06 ± 1.24**	3.23 ± 1.36**
二甲双胍组	8	1.87 ± 0.43*#	1.81 ± 0.63*#	1.64 ± 0.60*#

与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 NASH 组比较,# $P < 0.05$

4. 盐酸二甲双胍对 NASH 大鼠血清抵抗素、TNF-α 含量的影响:NASH 组大鼠血清 Resistin 和 TNF-α 含量较正常组显著增高($P < 0.01$),二甲双胍组大鼠血清 Resistin 和 TNF-α 含量则较模型组明显减少($P < 0.05$),详见表 3。

5. 盐酸二甲双胍对 NASH 大鼠肝组织 NF-κB p65 蛋白核转移的影响:NF-κB p65 蛋白在正常组大鼠肝组织见少量棕黄色染色阳性细胞表达,以胞质为主,个别细胞核和胞质同染,染色较浅;NASH 组大鼠肝组织大量细胞核染色阳性表达,颜色深染;二甲双胍组大鼠肝组织也可见部分细胞核染色阳性表达,但范围及程度均较模型组明显减轻(图 3)。

讨 论

Resistin 是一种多肽类激素,因其是由脂肪细胞特异性分泌的小分子蛋白,故又被称作脂肪组织特异性分泌因子(adipo-tissue specificity factor, ADSF)。最初 Stepan 等^[8]研究发现 Resistin 能对抗胰岛素,导致机体胰岛素抵抗,而胰岛素增敏剂则可使该激素水平降低。Resistin 参与机体的代谢调节和免疫调

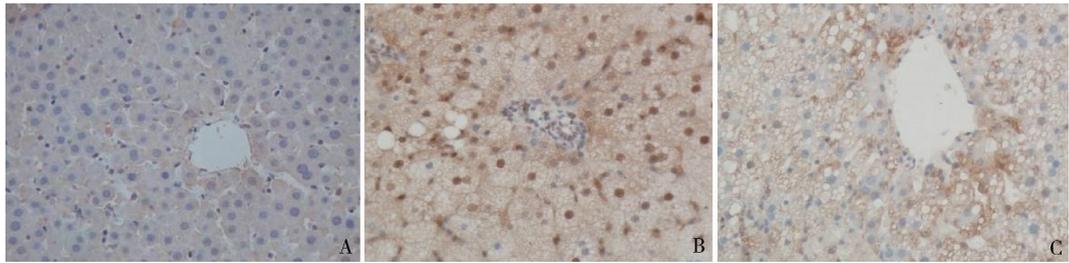


图 3 盐酸二甲双胍对 NASH 大鼠肝组织 NF- κ B 蛋白核定位的影响(免疫组化, $\times 200$)

A. 正常组; B. NASH 组; C. 二甲双胍组

节,具潜在炎症因子活性,可能作为促炎症反应的标志物^[9]。研究发现,Resistin 可通过激活 NF- κ B 信号途径刺激人巨噬细胞 TNF- α 、IL-12 等炎症因子的合成和释放,NF- κ B 抑制剂可抑制上述促炎症特性^[10,11]。Resistin 还可诱导 IL-1、IL-6 和 MCP-1 等炎症因子产生释放增加,引起炎症反应和脂质过氧化,加重肝脏受损及纤维化的发生,进而促进了 NASH 进展^[12-14]。同时炎症因子如 TNF- α 、IL-6 以及外源性的脂多糖等又能显著增加抵抗素的表达^[15]。研究显示,在正常肝组织中 Resistin 仅有少量表达,但在慢性肝损伤组织中 Resistin 表达增加^[16]。抵抗素在 NASH 的发生、发展中发挥了重要作用。本研究发现高脂饮食诱导的 NASH 大鼠肝组织 Resistin、NF- κ B、TNF- α mRNA 表达增强,血清 Resistin、TNF- α 水平增高,肝脏 NF- κ B 大量向核转移;推测长期高脂饮食,大量脂质在肝组织中沉积,诱导分泌抵抗素,后者进一步刺激 NF- κ B 信号通路,促进肝组织合成和释放 TNF- α 等炎症因子,加重肝脏的炎症,促进 NASH 的发生、发展。

盐酸二甲双胍属双胍类胰岛素增敏剂类降糖药,它的作用部位主要在线粒体刺激丙酮酸激酶、脂肪氧化、无氧呼吸(产生乳酸),也可以抑制脂肪生成酶的表达,改善胰岛素抵抗等。这些作用在治疗 NAFLD 中同样可能发挥良好的效果,荟萃分析表明二甲双胍对改善肝组织炎症有一定的作用;其可能机制包括:抑制肝内 TNF- α 等多种炎症细胞因子的表达、降低血清瘦素水平、激活肝脏 AMPK α 活性、抑制肝内的成脂过程和促进脂肪酸氧化、降低甘油三酯在肝脏中过度沉积所引起的脂毒性等^[17-19]。本研究发现,二甲双胍能显著减轻高脂饮食诱导的 NASH 大鼠体重及肝指数,减少脂质在肝脏沉积,改善肝组织炎症,同时能明显抑制肝组织 Resistin、NF- κ B、TNF- α mRNA 等的过表达,抑制 NF- κ B 的活性,降低血

清 Resistin、TNF- α 水平,表明盐酸二甲双胍可通过调节 Resistin,抑制肝脏炎症,防治 NASH 的进展。

参考文献

- 1 Lavine JE, Schwimmer JB, Molleston JP, *et al.* Treatment of nonalcoholic fatty liver disease in children: TONIC trial design [J]. *Contemp Clin Trials*, 2010, 31(1): 62-70
- 2 Idilman R, Mizrak D, Corapcioglu D, *et al.* Clinical trial: insulin-sensitizing agents may reduce consequences of insulin resistance in individuals with non-alcoholic steatohepatitis [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2008, 28(2): 200-208
- 3 Mazza A, Fruci B, Garinis GA, *et al.* The role of metformin in the management of NAFLD [J]. *Exp Diabetes Res*, 2012, 2012: 716404
- 4 陈芝芸,严茂祥,姚俊娜,等不同中医治法方药对非酒精性脂肪性肝炎大鼠肝脏 AMPK mRNA 表达的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2014, 29(1): 29-33
- 5 Filkov M, Haluzik M, Gay S, *et al.* The role of resistin as a regulator of inflammation: implications for various human pathologies [J]. *Clin Immunol*, 2009, 133(2): 157-170
- 6 Shen C, Zhao CY, Wang W, *et al.* The relationship between hepatic resistin overexpression and inflammation in patients with nonalcoholic steatohepatitis [J]. *BMC Gastroenterol*, 2014, 14: 39
- 7 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学组“非酒精性脂肪性肝病诊疗指南(2010年修订版)” [J]. *中华肝脏病杂志*, 2010, 18(3): 167-168
- 8 Stepan CM, Bailey ST, Bhat S, *et al.* The hormone resistin links obesity to diabetes [J]. *Nature*, 2001, 409(6818): 307-312
- 9 Curat CA, Wegner V, Sengenès C, *et al.* Macrophages in human visceral Adipose tissue: increased accumulation in obesity and a source of resistin and visfatin [J]. *Diabetologia*, 2006, 49(4): 744-747
- 10 Bokarewa M, Nagaev I, Dahlberg L, *et al.* Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties [J]. *J Immunol*, 2005, 174(9): 5789-5795
- 11 Silswal N, Singh AK, Aruna B, *et al.* Human resistin stimulates the pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-12 in macrophages by NF- κ B-dependent pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 334(4): 1092-1101
- 12 Zhao CY, Yan L, Wang YD, *et al.* Role of resistin in inflammation of hepatocytes in nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*, 2009, 17(9): 683-687

(下转第 70 页)

最有益的菌群,其数量变化是人体健康的晴雨表,随着年龄及身体状况的变化而变化。本组研究中作为肠道微生物定植抗力指标的双歧杆菌显著降低,提示肝性脑病及非肝性脑病组患者肠道有益菌减少,肠道定植抗力下降,其机制可能与患者肠-肝轴破坏相关,患者胃肠道黏膜受损,减慢了蠕动速度,导致肠道出现明显的淤血水肿、缺氧及缺血,肠黏膜 pH 值出现异常,且体内毒素增多,胆汁分泌不足^[8]。大肠杆菌抗原成分较复杂,其表面抗原及鞭毛抗原可具有抗补体及抗机体吞噬的能力,一般不致病,在一定条件下可能引起肠道外感染,但对某些血清型菌株的致病性较强,属机会致病菌。本组研究中肝性脑病患者体内大肠杆菌数量显著增多,提示致病的可能性较大。在临床治疗肝性脑病的过程中,可根据患者病情合理使用微生态制剂,抑制肠道潜在致病菌的繁殖,扶持有益菌的生长,以改善肠道菌群失调的状况,减少对患者产生更严重的肝损害^[9]。

因此,调整肠道菌群平衡可有减少血氨的产生和吸收,减少肝性脑病的发生。清洁肠道可快速、彻底减少如大肠杆菌、肠球菌属和酵母样真菌属等不利菌群。降低肠道 pH 值,抑制肠道细菌生长,益生菌制剂的应用,如含双歧杆菌、乳酸杆菌的微生态制剂可调整肠道菌群结构,抑制产氨、产尿素酶细菌的生长。

综上所述,肝功能异常可造成肠道菌群失调,使肠源性毒物增多,且菌群失调可破坏肠黏膜的屏障作

用,肠道渗透性增加,促进了毒物的吸收,肝功能受损无法及时代谢毒物,进一步加重了肝损害,形成肝性脑病。调节肠道菌群,使肠道微生态平衡是治疗肝性脑病的重要策略。

参考文献

- 1 陈萌萌,周翔天,刘艳艳,等. 肠道微生物与肝肠疾病研究进展[J]. 中华肝病杂志,2014,22(10):795-797
- 2 沈哲,马良,章文华. 微生态制剂对肝性脑病患者肠道菌群及血氨的影响[J]. 中华医院感染学杂志,2014,24(10):2505-2507
- 3 翟慧勤,范红,耿嘉蔚,等. 轻微型肝性脑病患者的肠道微生物群和血浆内毒素水平[J]. 中华肝病杂志,2014,22(2):104-107
- 4 李永涛,杨益大. 肠道菌群失衡对重型肝炎的影响[J]. 中华肝病杂志,2013,21(1):7-8
- 5 李兰娟. 肠道微生态改变对肝脏疾病的影响[J]. 中华肝病杂志,2013,21(1):2-4
- 6 Dagvadorj J, Tumurkhuu G, Naiki Y, *et al.* Endotoxin-induced lung injury in α -galactosylceramide-sensitized mice is caused by failure of interleukin-4 production in lung natural killer T cells[J]. *Clinical and Experimental Immunology*, 2010, 162(1):169-177
- 7 黄培宁,邓有辉. 微生态制剂对慢性肝衰竭患者肠道菌群、血浆内毒素及细胞因子的影响[J]. 中华医院感染学杂志,2011,21(18):3798-3800
- 8 蒋伟伟,刘玉兰. 肠道菌群与常见肝病[J]. 中华肝病杂志,2013,21(1):5-6
- 9 Qin J, Li R, Raes J, *et al.* A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing[J]. *Nature*, 2010, 464(7285):59-65
- 10 Bertolani C, Sancho-Bru P, Failli P, *et al.* Resistin as an intrahepatic cytokine: overexpression during chronic injury and induction of proinflammatory actions in hepatic stellate cells[J]. *Am J Pathol* 2006, 169:2042-2053
- 11 Guha IN, Parkes J, Roderick P, *et al.* Noninvasive markers of fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease: validating the european liver fibrosis panel and exploring simple markers[J]. *Hepatology*, 2008, 47(2):455-460
- 12 Kaser S, Kaser A, Sandhofer A, *et al.* Resistin messenger-RNA expression is increased by proinflammatory cytokines *in vivo*[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 309(2):286-290
- 13 Szalowska E, Elferink MG, Hoek A, *et al.* Resistin is more abundant in liver than adipose tissue and is not up-regulated by lipopolysaccharide[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009, 94(8):3051-3057
- 14 Lin HZ, Yang SQ, Chuckaree C, *et al.* Metformin reverses fatty liver disease in obese, leptin deficient mice[J]. *Nat Med*, 2000, 6(9):998-1003
- 15 Fruehwald-Schultes B, Oltmanns KM, Toschek B, *et al.* Short-term treatment with metformin decreases serum leptin concentration without affecting body weight and body fat content in normal-weight healthy men[J]. *Metabolism*, 2002, 51(4):531-536
- 16 Liu Y, Wan Q, Guan QB, *et al.* High-fat diet feeding impairs both the expression and activity of AMPK in rats' skeletal muscle[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 339(2):701-707

(收稿日期:2015-03-27)

(修回日期:2015-04-02)

(上接第 67 页)

- 13 Bertolani C, Sancho-Bru P, Failli P, *et al.* Resistin as an intrahepatic cytokine: overexpression during chronic injury and induction of proinflammatory actions in hepatic stellate cells[J]. *Am J Pathol* 2006, 169:2042-2053
- 14 Guha IN, Parkes J, Roderick P, *et al.* Noninvasive markers of fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease: validating the european liver fibrosis panel and exploring simple markers[J]. *Hepatology*, 2008, 47(2):455-460
- 15 Kaser S, Kaser A, Sandhofer A, *et al.* Resistin messenger-RNA expression is increased by proinflammatory cytokines *in vivo*[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 309(2):286-290
- 16 Szalowska E, Elferink MG, Hoek A, *et al.* Resistin is more abundant in liver than adipose tissue and is not up-regulated by lipopolysaccharide[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009, 94(8):3051-3057
- 17 Lin HZ, Yang SQ, Chuckaree C, *et al.* Metformin reverses fatty liver disease in obese, leptin deficient mice[J]. *Nat Med*, 2000, 6(9):998-1003
- 18 Fruehwald-Schultes B, Oltmanns KM, Toschek B, *et al.* Short-term treatment with metformin decreases serum leptin concentration without affecting body weight and body fat content in normal-weight healthy men[J]. *Metabolism*, 2002, 51(4):531-536
- 19 Liu Y, Wan Q, Guan QB, *et al.* High-fat diet feeding impairs both the expression and activity of AMPK in rats' skeletal muscle[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 339(2):701-707

(收稿日期:2014-07-24)

(修回日期:2014-08-04)