论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201411039

二甲双胍刺激肝脏瘦素受体基因表达上调血浆可溶性瘦素受体水平

唐雪梅[1,2],李婧雯[3],甘立霞[3],徐梓辉[1,2] (400037 重庆,第三军医大学新桥医院内分泌科[1],中西医结合科[2];400038 重庆,第三军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室[3])

[摘要] **目的** 探讨二甲双胍上调血浆可溶性瘦素受体(soluble leptin receptor, sOB-R)的可能机制。**方法** 42只6~8周龄健康雄性C57BL/6小鼠,按随机数字表法分为正常饮食(CD)组($n=21$)及高脂饮食(HF)组($n=21$)。喂养5月后,CD组及HF组分别再随机分为3个亚组,每组7只,分别予蒸馏水(不用药对照组),二甲双胍50、200 mg/(kg·d)灌胃,灌胃15 d后取其血浆及肝、肾组织。ELISA法检测小鼠血浆可溶性瘦素受体(soluble leptin receptor,sOB-R)水平,Real-time PCR检测肝、肾脏组织中瘦素受体基因(OB-Rt、OB-Ra、OB-Rb、OB-Rc、OB-Rd)及解聚素样金属蛋白酶10(a disintegrin and metalloproteinase 10, ADAM10)、ADAM17基因的表达,Western blot检测肝、肾脏组织中ADAM10、ADAM17蛋白的表达。**结果** 与不用药对照组比较,给予不同剂量的二甲双胍后均能升高CD组和HF组小鼠血浆sOB-R,CD组中二甲双胍200 mg/(kg·d)组与其他2组比较,HF组中二甲双胍50、200 mg/(kg·d)组与不用药对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$,$P<0.01$);sOB-R水平升高具有二甲双胍剂量依赖性效应。二甲双胍能上调肝脏瘦素受体基因OB-Rt mRNA的表达,并呈剂量依赖性升高,HF组瘦素受体上升更为明显;瘦素受体亚型OB-Ra、OB-Rc、OB-Rd的上升趋势与OB-Rt趋势一致。肾脏组织中,瘦素受体基因OB-Rt、OB-Ra、OB-Rb、OB-Rc、OB-Rd的表达水平在二甲双胍用药组及不用药对照组相比没有显著变化,CD组与HF组之间也没有显著差异。肝脏和肾脏组织中ADAM10、ADAM17表达量在CD组与HF组、二甲双胍用药组及不用药对照组之间均无显著改变。**结论** 二甲双胍能显著上调血浆sOB-R水平,该作用主要是通过刺激肝脏瘦素受体基因表达实现的,最主要的来源是肝脏的短型瘦素受体。

[关键词] 二甲双胍;瘦素受体;可溶性瘦素受体;解聚素样金属蛋白酶10;解聚素样金属蛋白酶17

[中图法分类号] R331.1;R966;R977.15 [文献标志码] A

Metformin upregulates serum soluble leptin receptor by stimulating hepatic leptin receptor gene expression

Tang Xuemei[1,2], Li Jingwen[3], Gan Lixia[3], Xu Zihui[1,2] ([1]Department of Endocrinology, [2]Department of Integrative Western and Traditional Chinese Medicine, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037; [3]Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the possible mechanism of metformin in up-regulation of serum soluble leptin receptor (sOB-R) in mice. **Methods** Forty-two C57BL/6 mice, aged from 6 to 8 weeks, with normal body weight (17.02 ± 1.91 g) were randomly divided into 2 groups, which were fed with standard chow diet (CD) ($n=21$) and high-fat diet (HF) ($n=21$), respectively, for 5 months. The mice in each group were then divided into 3 subgroups ($n=7$) and administrated with water, metformin 50 mg/(kg·d)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30971082, 81270482)

[通信作者] 徐梓辉,E-mail: zihuixu@yeah.net.
甘立霞,E-mail: ganlixia@yahoo.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150312.1036.011.html (2015-03-12)

and metformin 200 mg/(kg·d), respectively, *via* gastric lavage once a day for 15 d. Serum sOB-R was determined by ELISA. Expressions of total leptin receptor (OB-Rt) and major membrane-bound leptin receptor isoforms (OB-Ra, OB-Rb, OB-Rc, and OB-Rd) in liver and kidney of the mice were determined by real-time PCR. The expression of A Disintegrin And Metalloproteinase 10 (ADAM10) and ADAM17, which participated in ectodomain shedding of leptin receptor, was detected by real-time PCR and Western blotting. **Results** After metformin treatment, serum sOB-R levels were increased in both CD group and HF group in a dose-dependent manner, for a more detailed, serum sOB-R levels were increased in metformin 200 mg/(kg·d) subgroup compared with the other 2 subgroups in CD group ($P < 0.05$), while they were increased significantly in 2 metformin treatment subgroups compared to non-treatment subgroup in HF group ($P < 0.01$). Moreover, compared with the non-treatment mice, the expression of OB-Rt mRNA in the liver was dose-dependently up-regulated in the metformine-treated mice of the CD group as well as the HF group, and the expression in the HF group was increased more significantly, by the way, the trend was very similar to the level of sOB-R. The OB-Ra, OB-Rc and OB-Rd had the same increase trend as OB-Rt in the liver, but not in kidney. Meanwhile, Adam10 and Adam17 mRNA and protein levels were not significantly changed in both liver and kidney tissues of the CD and HF groups with metformin treatment. **Conclusion** Metformin up-regulates serum sOB-R through increasing the expression of leptin receptors, especially short leptin receptor isoforms, in the liver.

[**Key words**] metformin; leptin receptor; serum soluble leptin receptor; ADAM10; ADAM17

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30971082, 81270482). Corresponding author: Xu Zihui, E-mail: zihuixu@yeah.net; Gan Lixia, E-mail: ganlixia@yahoo.com

糖尿病是威胁人类健康的重要的慢性非传染性疾病之一,其中2型糖尿病(T2DM)约占90%。胰岛素抵抗是T2DM主要机制之一,也是T2DM的主要特征之一[1-2]。二甲双胍是肥胖T2DM患者的一线治疗药物,能有效控制血糖,改善胰岛素抵抗,降低体重[3-4]。

可溶性瘦素受体(soluble leptin receptor, sOB-R)是人体血液循环中最主要的瘦素结合蛋白[5],调节瘦素的生物利用度及其生理功能。它们从细胞表面瘦素受体(OB-R)的胞外区水解脱落产生,4种亚型(OB-Ra, OB-Rb, OB-Rc, OB-Rd)均可作为生成sOB-R的底物。解聚素样金属蛋白酶10(a disintegrin and metalloproteinase 10, ADAM10)、ADAM17参与了OB-R的水解脱落过程,其中ADAM10起主要作用[6]。本课题组前期研究表明,二甲双胍干预后,小鼠糖代谢的功能改善,小鼠血浆的sOB-R水平呈剂量依赖性升高[7],但机制尚不清楚。

鉴于瘦素具有广泛的生物学功能,瘦素受体广泛表达于体内多种组织,其中肝脏和肾脏组织中表达丰富[8]。为此,本研究通过观察二甲双胍灌胃的正常饮食(CD)组及高脂饮食(HF)组小鼠肝肾组织中的瘦素受体(OB-Rt, OB-Ra, OB-Rb, OB-Rc, OB-Rd)、ADAM10及ADAM17的基因及蛋白水平的改变,拟进一步探讨二甲双胍上调可溶性瘦素受体的可能机制。

1 材料与方法

1.1 动物分组及肝肾组织

健康雄性C57BL/6小鼠42只,体质量(17.02±1.91)g,6~8周龄,由第三军医大学实验动物中心提供。将小鼠按随机数字表法随机分为正常饮食(CD)组($n=21$)及高脂饮食(HF)组($n=21$)。喂养5月后,CD组及HF组分别再随机分为3个亚组,每组7只,分别予蒸馏水,二甲双胍50、200 mg/(kg·d)灌胃,连续灌胃15 d,1次/d。剔除死亡小鼠后,CD组21只,HF组18只。眼球取血后,处死小鼠,取出肝、肾组织,储存于-80℃冰箱。血浆及肝、肾组织分组与小鼠分组一致,共分为6个亚组:①正常饮食+蒸馏水组($n=7$),②正常饮食+二甲双胍50 mg/(kg·d)组($n=7$),③正常饮食+二甲双胍200 mg/(kg·d)组($n=7$),④高脂饮食+蒸馏水组($n=5$),⑤高脂饮食+二甲双胍50 mg/(kg·d)组($n=6$),⑥高脂饮食+二甲双胍200 mg/(kg·d)组($n=7$)。

1.2 主要试剂

小鼠sOB-R酶联免疫分析试剂盒(慧嘉生物公司),动物RNA提取试剂(RNAout Tiandz公司),M-MLV反转录试剂盒(美国Invitrogen公司),SYBR® Premix Ex*Taq*™ Ⅱ(TaKaRa公司),OB-Rt、OB-Rb、OB-Rc、OB-Rd引物由生工生物工程(上海)有限公司合成,OB-Ra、ADAM10、ADAM17引物由百力格(上海)公司合成。Page Ruler™ Prestained Protein ladder

(Thermo 公司),Bio-Rad Protein Assay(Beyotime 公司),兔抗 Adam17 多克隆抗体(美国 Abcam 公司),兔抗Adam10 多克隆抗体(Biorbyt 公司)。

1.3 酶联免疫吸附法(ELISA)检测小鼠血浆 sOB-R 水平

小鼠血浆每孔加样小鼠 sOB-R 酶联免疫分析试剂 50 μL,每份样品均设置复孔。严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.4 实时荧光定量 PCR

严格按照动物 RNA 提取试剂和 M-MLV 逆转录试剂盒说明书操作步骤完成肝肾组织总 RNA 提取及 cDNA 合成。荧光定量 PCR 采用 SYBR® Premix Ex*Taq*™ Ⅱ,按说明书完成。检测小鼠肝、肾组织 OB-Rt、OB-Ra、OB-Rb、OB-Rc、OB-Rd、ADAM10、ADAM17 的 mRNA 表达,引物见表 1。反应条件为 95 ℃ 30 s 1 个循环,95 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,40 个循环。

1.5 Western blot 检测小鼠肝、肾组织 ADAM10、ADAM17 的表达

采用组织裂解液裂解组织,采集蛋白,蛋白浓度检测用 BCA(Beyotime 公司)法,经 Loadding Buffer 混匀后煮沸 10 min,变性后储存于 -20 ℃ 冰箱。SDS-PAGE 蛋白电泳后,电转移至 PVDF 膜上,封闭(博士德 5% 封闭奶粉)4℃封闭过夜,加入抗体,抗体浓度分别为:兔抗 ADAM10 多克隆抗体(1∶500),Adam17 (1∶500,Abcam),单克隆小鼠 B-actin IgG1(1∶500,Santa Cruz Biotechnology);4 ℃摇床孵育过夜,加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 及羊抗小鼠 IgG(1∶5 000,中杉金桥公司)室温孵育 2 h,运用化学发光剂孵育 3 ~ 5 min 后显影(Bio-Rad 蛋白化学发光仪)。采用 Image Lab 软件分析图像。

1.6 统计学分析

采用SPSS 13.0 统计软件,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,以 Excel 制图。

2 结果

2.1 二甲双胍剂量依赖性上调小鼠血浆 sOB-R 水平

在 CD 组和 HF 组中,二甲双胍用药组的血浆 sOB-R 水平与蒸馏水组比较均升高,呈剂量依赖性。CD 组中二甲双胍低剂量组[(28.83 ± 5.46) ng/mL]与蒸馏水组[(18.60 ± 1.65) ng/mL]相比升高不显著($P > 0.05$),高剂量组[(42.65 ± 2.65) ng/mL]与其他 2 组比较升高显著($P < 0.05$);HF 组中二甲双胍低剂量、高剂量组与蒸馏水组比较均显著升高[(46.67 ± 6.86) *vs* (72.10 ± 8.49) *vs* (27.52 ± 2.60) ng/mL,$P < 0.01$]。

2.2 二甲双胍上调肝脏组织中瘦素受体基因表达水平

在 CD 组和 HF 组中,二甲双胍用药组小鼠肝组织 OB-Rt mRNA 表达与蒸馏水组相比较均有不同程度升高。CD 组中二甲双胍 50 mg/(kg · d)组的肝组织 OB-Rt mRNA 表达升高不显著,二甲双胍 200 mg/(kg · d)组表达明显升高($P < 0.01$)。HF 组中与蒸馏水组比较,二甲双胍 50、200 mg/(kg · d)组的肝组织 OB-Rt mRNA 表达显著升高($P < 0.01$),且呈剂量依赖。在各亚型中,OB-Ra、OB-Rc、OB-Rd 的 mRNA 表达与 OB-Rt mRNA 表达变化趋势一致(表 2),OB-Rb 在 CD 组无明显变化,而在 HF 组二甲双胍 200 g/(kg · d)组显著升高($P < 0.01$)。

2.3 二甲双胍对肝脏组织中 Adam10、Adam17 表达的

在 CD 组及 HF 组中,二甲双胍用药组与蒸馏水组比较,ADAM10 及 ADAM17 的 mRNA 水平无显著改变(表 3)。Western blot 检测结果显示,ADAM10 及 ADAM17 的蛋白水平改变也不显著(图 1)。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物的序列

基因名称	GenBank 登录号	引物序列(5'→3')	扩增片段长度(bp)
Mice-OB-Rt	NM_001032819.1	上游:CAACACTGAAGGGAAGACACT 下游:CACTCTGTCCCAGTTTACA	79
Mice-OB-Ra	U49106.1	上游:AATGACGCAGGGCTGTATGT 下游:ATGGACTGTTGGGAAGTTGG	194
Mice-OB-Rb	U49107.1	上游:TGCTTTTGACTGGTGAGGCA 下游:CTGTGCGTGGAACAGGTTTG	138
Mice-OB-Rc	U49108.1	上游:CAAGCAGCAGAATGACGCAG 下游:GTGACCTTTTGGAAATTCAGTCCT	133
Mice-OB-Rd	U49109.1	上游:ACGCAGGGCTGTATGTCATT 下游:TCCTTTTGGAAATTCAGTCCTTG	117
Mice-Adam10	NM_007399.3	上游:TGGAGTAGAGGAAGGAGCCC 下游:CTTTCAGCCAGAGTTGTGCG	96
Mice-Adam17	NM_009615.6	上游:GTGCTGGGAAGATCACCTCC 下游:CACCACCTCTCTGGGAAACC	81
Mice-β-actin	NM_007393.3	上游:CTGTCCCTGTATGCCTCTG 下游:ATGTCACGCACGATTTCC	218

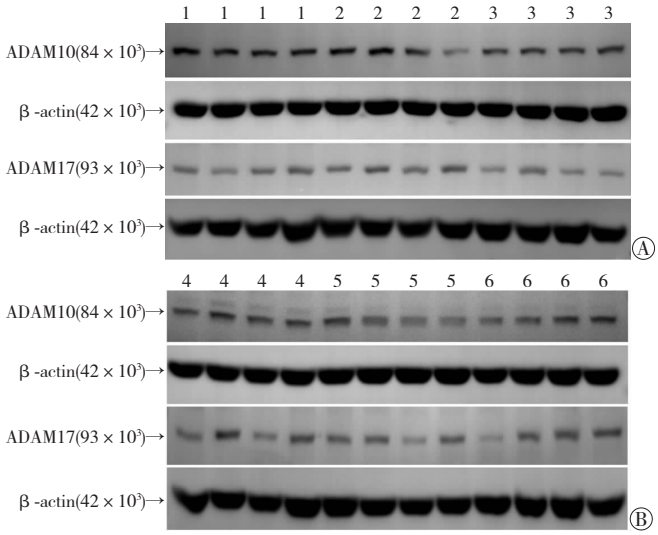
表 2　实时荧光定量 PCR 检测各组小鼠肝组织中 OB-Rt、OB-Ra、OB-Rb、OB-Rc、OB-Rd 基因 mRNA 的相对表达水平（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	OB-Rt	OB-Ra	OB-Rb	OB-Rc	OB-Rd
正常饮食＋蒸馏水组	7	1.03 ± 0.34	1.02 ± 0.23	1.02 ± 0.30	1.00 ± 0.06	1.02 ± 0.25
正常饮食＋二甲双胍 50 mg/(kg·d)组	7	1.63 ± 0.18	1.71 ± 0.16	0.69 ± 0.16	1.02 ± 0.13	0.69 ± 0.27
正常饮食＋二甲双胍 200 mg/(kg·d)组	7	5.26 ± 0.89^{bd}	3.01 ± 0.60^{ac}	0.32 ± 0.09	1.97 ± 0.25^{bd}	2.48 ± 0.15^{bd}
高脂饮食＋蒸馏水组	5	2.68 ± 0.096	1.08 ± 0.73	0.69 ± 0.26	0.97 ± 0.12	1.22 ± 0.23
高脂饮食＋二甲双胍 50 mg/(kg·d)组	6	4.96 ± 0.88^{e}	2.84 ± 0.18^{e}	0.77 ± 0.15	2.60 ± 0.18^{f}	2.55 ± 0.16^{f}
高脂饮食＋二甲双胍 200 mg/(kg·d)组	7	9.11 ± 1.33^{fg}	6.13 ± 1.02^{fg}	2.39 ± 0.59^{fg}	4.58 ± 0.11^{fg}	4.82 ± 0.03^{fg}

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与正常饮食＋蒸馏水组比较；c：$P<0.05$，d：$P<0.01$，与正常饮食＋二甲双胍 50 mg/(kg·d)组比较；e：$P<0.05$，f：$P<0.01$，与高脂饮食＋蒸馏水组比较；g：$P<0.01$，与高脂饮食＋二甲双胍 50 mg/(kg·d)组比较

表 3　实时荧光定量 PCR 检测各组小鼠肝组织中 ADAM10、ADAM17 基因 mRNA 的相对表达水平（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	Adam10	Adam17
正常饮食＋蒸馏水组	7	1.02 ± 0.22	1.00 ± 0.01
正常饮食＋二甲双胍 50 mg/(kg·d)组	7	1.06 ± 0.14	1.07 ± 0.07
正常饮食＋二甲双胍 200 mg/(kg·d)组	7	0.76 ± 0.10	0.85 ± 0.10
高脂饮食＋蒸馏水组	5	0.79 ± 0.14	0.81 ± 0.02
高脂饮食＋二甲双胍 50 mg/(kg·d)组	6	0.82 ± 0.75	0.82 ± 0.06
高脂饮食＋二甲双胍 200 mg/(kg·d)组	7	0.88 ± 0.05	0.84 ± 0.09



1：正常饮食＋蒸馏水组；2：正常饮食＋二甲双胍 50 mg/(kg·d)组；3：正常饮食＋二甲双胍 200 mg/(kg·d)组；4：高脂饮食＋蒸馏水组；5：高脂饮食＋二甲双胍 50 mg/(kg·d)组；6、高脂饮食＋二甲双胍 200 mg/(kg·d)组
A：正常饮食组；B：高脂饮食组

图 1　Western blot 测各组肝组织 Adam10、Adam17 蛋白表达

3　讨论

sOB-R 是人体血液循环中最主要的瘦素结合蛋白，通过结合瘦素，调节血浆中游离型/结合型瘦素的比值，从而调节瘦素的功能[9]。近期多项研究显示，sOB-R 的水平与 T2DM、肥胖、结肠癌的发生呈显著负相关[10-14]。肥胖者体内 sOB-R 水平降低，进行低热量饮食减肥后，体内 sOB-R 水平升高[15-17]。我们前期研究显示，二甲双胍能上调小鼠血浆 sOB-R 水平，该作用与糖代谢功能的改善相关[7]。上述结果提示，sOB-R 水平升高不仅可能作为肥胖、T2DM 患者代谢状态改善的生化指征，可能参与了二甲双胍的降糖作用。

已有研究显示，肝脏瘦素受体是血浆 sOB-R 的主要来源[18]，本研究结果显示，二甲双胍能显著上调肝脏瘦素受体的基因表达，但对肾脏瘦素受体的表达没有显著影响。已经鉴定的瘦素受体有 6 种亚型（OB-Ra，-Rb，-Rc，-Rd，-Re 和 Rf），它们均由同一基因（db）编码，经不同的转录后加工过程形成。人体中只表达四种亚型，包括短型（OB-Ra，-Rc，Rd）及长型（OB-Rb），短型受体的表达量更为丰富[19]。为此，我们首先测定了瘦素受体基因表达的总量（OB-Rt），并进一步观察了二甲双胍对瘦素受体各亚型表达的影响，结果表明，二甲双胍主要是上调短型受体（OB-Ra、OB-Rc、OB-Rd），对肾脏中各瘦素受体亚型没有显著影响。同时，对肝、肾组织中参与瘦素受体胞外水解脱落的基质金属蛋白酶 ADAM10 及 ADAM17 表达的检测结果显示，二甲双胍并未显著影响其表达水平。综上提示，二甲双胍升高血浆 sOB-R 的水平主要是通过刺激肝脏组织短型瘦素受体基因表达来实现的。该作用涉及二甲双胍上调 db 基因转录及转录后加工过程，详细机制有待进一步阐明。

肝脏是二甲双胍降糖作用的主要靶点，目前已知的该药物的降糖机制主要包括：抑制肝糖异生从而减少肝糖输出[20-21]；抑制胰高血糖素的升糖作用[22]。新近报道，二甲双胍抑制二肽基肽酶Ⅳ（DPP-4），从而

增加 GLP-1 的浓度,达到降糖作用[23]。本研究发现,二甲双胍能显著上调肝脏中的短型瘦素受体及血浆中 sOB-R 水平,同时也能显著上调具有信号转导作用的 OB－Rb 表达,这些结果提示二甲双胍对肝脏的瘦素信号具有调节作用。其降糖作用可能与调节肝脏瘦素信号功能有关。进一步深入研究肝脏瘦素信号在血糖调节中的作用,将拓展对二甲双胍降糖作用机制的认识。

参考文献:

[1] 甘立霞. 2型糖尿病基础研究中的难题与突破[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(15): 1543－1547.

[2] 郭绍东. 组织特异性胰岛素抵抗及其代谢综合征的机制探讨[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(15): 1535－1542.

[3] Miller R A, Birnbaum M J. An energetic tale of AMPK-independent effects of metformin[J]. J Clin Invest, 2010, 120(7): 2267－2270.

[4] Foretz M, Guigas B, Bertrand L, *et al*. Metformin: from mechanisms of action to therapies[J]. Cell Metab, 2014, 20(6): 953－966.

[5] Gorska E, Popko K, Stelmaszczyk-Emmel A, *et al*. Leptin receptors[J]. Eur J Med Res, 2010, 15 Suppl 2: 50－54.

[6] Schaab M, Kausch H, Klammt J, *et al*. Novel regulatory mechanisms for generation of the soluble leptin receptor: implications for leptin action[J]. PLoS One, 2012, 7(4): e34787.

[7] 李婧雯, 徐梓辉, 甘立霞. 二甲双胍上调小鼠血清可溶性瘦素受体水平的实验观察[J]. 中国糖尿病杂志, 2014, 22(5): 459－463.

[8] Brabant G, Nave H, Horn R, *et al*. *In vivo* and *in vitro* evidence for a hepatic modulation of the leptin signal in rats[J]. Eur J Clin Invest, 2004, 34(12): 831－837.

[9] Zhang J, Scarpace P J. The soluble leptin receptor neutralizes leptin-mediated STAT3 signalling and anorexic responses in vivo[J]. Br J Pharmacol, 2009, 158(2): 475－482.

[10] Sun Q, van-Dam R M, Meigs J B, *et al*. Leptin and soluble leptin receptor levels in plasma and risk of type 2 diabetes in U. S. women: a prospective study[J]. Diabetes, 2010, 59(3): 611－618.

[11] Catli G, Anik A, Tuhan H U, *et al*. The relation of leptin and soluble leptin receptor levels with metabolic and clinical parameters in obese and healthy children[J]. Peptides, 2014, 56: 72－76.

[12] Owecki M, Nikisch E, Miczke A, *et al*. Leptin, soluble leptin receptors, free leptin index, and their relationship with insulin resistance and BMI: high normal BMI is the threshold for serum leptin increase in humans[J]. Horm Metab Res, 2010, 42(8): 585－589.

[13] Aleksandrova K, Boeing H, Jenab M, *et al*. Leptin and soluble leptin receptor in risk of colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition cohort[J]. Cancer Res, 2012, 72(20): 5328－5337.

[14] Song M, Zhang X, Wu K, *et al*. Plasma adiponectin and soluble leptin receptor and risk of colorectal cancer: a prospective study[J]. Cancer Prev Res (Phila), 2013, 6(9): 875－885.

[15] Iepsen E W, Lundgren J, Dirksen C, *et al*. Treatment with a GLP-1 receptor agonist diminishes the decrease in free plasma leptin during maintenance of weight loss[J]. Int J Obes (Lond), 2014, [Epub ahead of print].

[16] Gajewska J, Weker H, Ambroszkiewicz J, *et al*. Alterations in markers of bone metabolism and adipokines following a 3-month lifestyle intervention induced weight loss in obese prepubertal children[J]. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2013, 121(8): 498－504.

[17] Arnold T, Brandlhofer S, Vrtikapa K, *et al*. Effect of obesity on plasma clusterin, [corrected] a proposed modulator of leptin action[J]. Pediatr Res, 2011, 69(3): 237－242.

[18] Cohen P, Yang G, Yu X, *et al*. Induction of leptin receptor expression in the liver by leptin and food deprivation[J]. J Biol Chem, 2005, 280(11): 10034－10039.

[19] 甘立霞. 瘦蛋白信号转导及瘦蛋白抵抗机制[J]. 生命的化学, 2011, 31(5): 656－661.

[20] Jitrapakdee S. Transcription factors and coactivators controlling nutrient and hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2012, 44(1): 33－45.

[21] Foretz M, Hebrard S, Leclerc J, *et al*. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state[J]. J Clin Invest, 2010, 120(7): 2355－2369.

[22] Miller R A, Chu Q, Xie J, *et al*. Biguanides suppress hepatic glucagon signalling by decreasing production of cyclic AMP[J]. Nature, 2013, 494(7436): 256－260.

[23] Cuthbertson J, Patterson S, O'Harte F P, *et al*. Addition of metformin to exogenous glucagon-like peptide-1 results in increased serum glucagon-like peptide-1 concentrations and greater glucose lowering in type 2 diabetes mellitus[J]. Metabolism, 2011, 60(1): 52－56.

(收稿:2014-11-12;修回:2014-12-23)

(编辑 栾 嘉)