

OLETF 쥐에서 Rosiglitazone에 의한 AMPK의 활성화 및 비알콜성 지방간질환의 호전 효과

울산대학교 의과대학 서울아산병원 내분비내과

조은희 · 이기업

Rosiglitazone Activates AMPK and Improves Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in OLETF Rats

Eun-Hee Cho, Ki-Up Lee

Division of Endocrinology and Metabolism, Department of Internal Medicine, Asan Medical Center, University of Ulsan College of Medicine

Abstract

Background: Insulin resistance is very common in patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). Glitazones improve insulin sensitivity by acting as a selective agonist of the peroxisome proliferators-activated receptor gamma (PPAR γ), and were shown to activate AMP-activated protein kinase (AMPK) in skeletal muscle and the liver. Glitazones were also shown to reduce hepatic lipogenesis. The aim of this study was to investigate whether the protective mechanism of rosiglitazone on NAFLD is associated with AMPK activation.

Methods: Twelve OLETF rats were divided into 2 groups (control, treatment, n = 6 each). LETO rats served as controls. At 35 weeks of age, treatment group received rosiglitazone 4 mg/kg daily for 3 days. Fasting plasma glucose, insulin, free fatty acid, lactate and triglycerides were measured. Liver tissues from each group were processed for histological and hepatic triglyceride content analysis and western blotting.

Results: Fasting plasma glucose, insulin and triglycerides levels were significantly lower in treatment group than in control group. Histologic examination disclosed decreased hepatic steatosis in treatment group. Hepatic triglyceride content was also decreased in treatment group. Sterol regulatory binding protein-1c (SREBP-1c) and fatty acid synthase (FAS) expression were increased and AMPK phosphorylation was reduced in OLETF rats compared with LETO rats, and these changes were reversed by rosiglitazone treatment.

Conclusion: Rosiglitazone reduced hepatic steatosis in OLETF rats, and activated AMPK in the liver. These results suggest the role of AMPK activation in the protective action of rosiglitazone on NAFLD. (KOREAN DIABETES J 32:141~148, 2008)

Key Words: AMP-activated protein kinase, Nonalcoholic fatty liver disease, Rosiglitazone, Triglyceride

서 론

비알콜성 지방간질환(nonalcoholic fatty liver disease,

NAFLD)은 단순한 지방간으로부터 간경화를 일으키는 비알콜성 지방간염(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)에 이르는 다양한 스펙트럼의 비알콜성 간질환을 대표한다¹⁾. 비

알콜성 지방간질환의 발병 기전에 대해서는 이제까지 많은 연구가 있었으며 대사증후군이나 당뇨병환자에서 그 발생빈도가 증가하는 것으로 보아 인슐린저항성이 중요한 역할을 하리라 생각된다²⁾.

글리타존 계열의 약물은 peroxisome proliferators-activated receptor gamma (PPAR γ)에 선택적으로 작용하는 혈당강하제로 인슐린감수성을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 이 약물 중의 하나인 rosiglitazone은 NAFLD에서 염증을 줄이고, 조직학적인 지방 축적을 감소시킨다고 보고되었다³⁻⁶⁾.

AMP-activated protein kinase (AMPK)는 serine/threonine kinase의 일종으로 세포 내 에너지(ATP)가 결핍될 때 활성화되어 세포 내 에너지 생산을 증가시키는 효소이다⁷⁾. 활성화된 AMPK는 세포 내에서 acetyl-CoA carboxylase (ACC) 활성을 억제하여 malonyl-CoA 농도를 감소시킨다. Malonyl-CoA는 지방산이 미토콘드리아로 유입하는데 있어 rate limiting enzyme인 carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT-1)을 억제하는 물질로 AMPK 활성화를 통해 malonyl-CoA의 농도가 감소하면 CPT-1에 대한 억제 효과가 감소되어 지방산 산화가 증가하게 된다. 공복 상태에서 AMPK의 활성화는 간에서 중성지방의 합성에 관여하는 유전자를 주로 조절하는 sterol regulatory binding protein-1c (SREBP-1c)를 억제함으로써 지방 합성을 감소시킨다⁸⁾.

이전의 연구에서 글리타존이나 metformin같은 약물의 혈당강하 효과가 AMPK활성을 통한다는 학설이 제시된 바 있다⁹⁾. Rosiglitazone은 골격근에서 AMPK를 활성화시키고, 지방산 산화를 촉진하며^{10,11)}, pioglitazone은 간 조직에서 AMPK를 활성화시키는 것으로 보고되었다¹²⁾. 한편 metformin과 글리타존은 간에서 SREBP-1을 감소시키고, fatty acid synthase (FAS)를 감소시킨다^{13,14)}. AMPK활성화가 간조직에서도 지방산의 산화를 촉진하기 때문에¹⁵⁾, rosiglitazone의 NAFLD 호전 효과가 AMPK에 의한 가능성이 많으나 아직 이에 대한 연구 보고는 없는 상태이다. 이에 본 연구에서는 rosiglitazone투여가 비만 동물에서 나타나는 NAFLD 발생과 AMPK 활성화도에 미치는 영향을 조사하였다.

대상 및 방법

1. 실험동물

실험동물로는 당뇨병, 비만 모델인 Otsuka Long Evans Tokushima Fatty (OLETF)쥐와 그 대조군으로 Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO)쥐를 오츠카 제약회사(Tokushima, Japan)에서 제공받아 사용하였다. 이들 동물은 아산생명과학

연구소에서 SPF (specific pathogen free)상태로 양육되었으며, 일반 쥐 사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다. 생후 35주된 6마리의 LETO쥐와 총 12마리의 OLETF쥐를 무작위로 두 군으로 나누어 실험을 진행하였다. Rosiglitazone 투여 전 OLETF 양 군 간의 체중은 비슷하였으며(치료군 OLETF, 672 ± 20 g; 대조군, 660 ± 18 g), LETO쥐군과 OLETF 대조군은 일반 쥐사료를 투여하였고, OLETF 치료군은 rosiglitazone (GlaxoSmithKline Pharmaceuticals, Philadelphia, PA)을 하루 4 mg/kg 추가한 일반 쥐사료를 3일간 투여하였다. 모든 동물을 케타민으로 마취한 후 혈액채취를 하였고, 이어서 희생시킨 다음 간 조직을 적출하였다.

2. 혈중 포도당, 인슐린, 유산, 중성지방, 유리지방산의 측정

혈중 포도당 및 유산 농도는 YSI glucose and lactate analyzer (YSI 2300: Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, OH)를 이용하여 효소법에 의해 측정하였다. 혈장 인슐린은 면역효소법(Linco, St. Louis, MO)을 이용하였고, 중성지방 및 유리지방산은 효소처리법(Sigma triglyceride GPO-trinder, St. Louis, MO; Wako Chemical, Osaka, Japan)으로 측정하였다.

3. 간 조직의 중성지방 함량의 측정

간조직의 중성지방 측정은 Sigma Triglyceride (GPO-Trinder) kit를 이용하여 측정하였다.

4. 조직학적 분석

적출된 간 조직은 4% 포르말린으로 고정시킨 다음 파라핀에 포매시켰다. 절편은 hematoxylin and eosin (H & E) 염색을 시행하여 광학현미경으로 분석하였다. 또한 간 조직 내 지질은 oil red염색을 시행하여 Olympus BX60 camera (Tokyo, Japan)를 이용해 사진을 얻었다.

5. Western Blot 분석

간 조직을 lysis buffer (20 mM Tris, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 50 mM NaF)에서 30분간 용해시킨 뒤 단백질 정량을 시행하였다. 이중 50 μg 단백질을 8% SDS PAGE gel에서 전기영동한 뒤 nitrocellulose membrane에 2시간 동안 전이시켰다. Blocking buffer에 membrane을 1시간 동안 담가 두었다가 phosphoAMPK (Thr172, Cell Signalling, Beverly, MA)나 total AMPK에 대한 일차 항체와 4°C에서 밤 동안 반응시켰다. 수 차례의 세척

과정을 거친 후 Horseradish peroxidase가 붙은 anti-rabbit 항체(GIBCOBRL, Gaithersburg, MD)와 chemiluminescent detection reagents (New England Biolabs, Beverly, MA)에 차례로 반응시켜 반응을 유발하였다.

SREBP-1c 항체는 BD Biosciences (San Jose, CA)에서, actin에 대한 항체는 Sigma에서, 그리고 phospho-AMPK와 total AMPK항체는 Cell Signaling Technology (Danvers, MA)를 이용하였다.

6. 통계분석

모든 자료는 평균 \pm 표준오차로 표시하였으며, 통계 분석은 Statistical Package for Social Science (SPSS), version 15.0 (SPSS Inc, Chicago, IL) computer program을 사용하였다. 두 군 간의 비교는 Mann-Whitney test를 시행하였고, 세 군 간의 비교는 one-way ANOVA (analysis of variance) 및 Duncan's multiple range test를 사용하였고, $P < 0.05$ 인 경우를 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

결 과

1. OLETF쥐에서 Rosiglitazone투여에 따른 혈중 포도당, 인슐린, 유산, 중성지방에 대한 효과

OLETF쥐는 LETO쥐에 비해 통계적으로 유의한 체중, 혈당, 인슐린과 중성지방의 증가를 보였으나, 유산과 유리지방산은 통계적으로 유의한 차이는 없었다. Rosiglitazone 치료군에서 혈중 포도당은 대조군 OLETF 쥐에 비해 유의하게 감소하였고(치료군, 230.8 ± 27.8 mg/dL; 대조군, 322.0 ± 77.2 mg/dL, $P < 0.05$), 혈중 중성지방도 대조군인 OLETF쥐에 비해 유의하게 감소하였으나(치료군, 50.9 ± 12.3 mg/dL; 대조군, 111.1 ± 40.8 mg/dL, $P < 0.05$), 유산과 유리지방산의 농도는 두 군 간 유의한 변화가 없었다

(Table 1).

2. OLETF쥐에서 Rosiglitazone 투여에 따른 간 조직의 중성지방 함량에 대한 효과

OLETF쥐는 LETO군에 비해 간 조직의 중성지방이 통계적으로 유의하게 높았으며(LETO, 27.6 ± 13.6 mg/dL; OLETF, 171.3 ± 65.2 mg/dL, $P < 0.05$), rosiglitazone을 투여한 OLETF쥐에서 대조군인 OLETF쥐에 비해 간 조직의 중성 지방 함량이 통계학적으로 유의하게 감소하였다(치료군, 51.7 ± 31.4 mg/dL; 대조군, 171.3 ± 65.2 mg/dL, $P < 0.05$) (Fig. 1).

3. OLETF쥐에서 Rosiglitazone투여에 따른 간의 조직학적 변화 분석

OLETF쥐의 간 조직을 LETO 쥐와 비교 시 현저한 지방의 축적이 관찰되며, rosiglitazone을 투여 시 OLETF쥐의 간 조직 내 지방의 축적이 유의하게 감소함이 관찰되었다(Fig. 2).

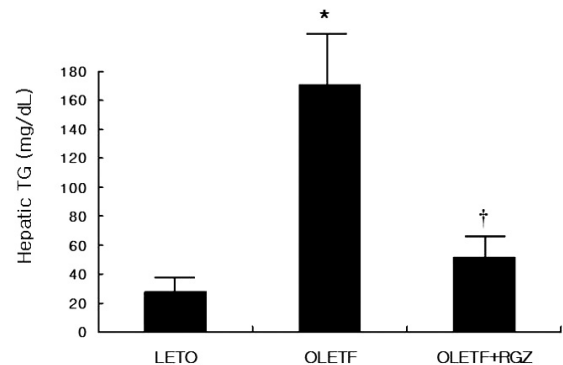


Fig. 1. Effects of rosiglitazone (RGZ) on hepatic triglyceride (TG) content. * $P < 0.05$ vs. LETO rat. † $P < 0.05$ vs. OLETF rat.

Table 1. Effects of rosiglitazone on plasma glucose, lactate, free fatty acid and triglyceride levels

	LETO	Untreated OLETF	OLETF + RGZ
Mean food intake (g/day)	25 \pm 0.4	33 \pm 0.6	33 \pm 0.4
Body weight (g)	530 \pm 10	670 \pm 21*	667 \pm 18*
Plasma glucose (mg/dL)	159.2 \pm 10.8	322.0 \pm 77.2*	230.8 \pm 27.8†
Plasma lactate (mg/dL)	16.8 \pm 3.6	31.7 \pm 21.7	28.9 \pm 20.1
Plasma insulin (ng/mL)	64.8 \pm 6.0	142.2 \pm 10.7*	79.6 \pm 15.5†
Free fatty acid (μ E/L)	455.3 \pm 109.7	560.3 \pm 173.8	503.9 \pm 214.6
Triglycerides (mg/dL)	26.5 \pm 10.1	111.1 \pm 40.8*	50.9 \pm 12.8†

All data are expressed as means \pm SEM; RGZ, rosiglitazone. * $P < 0.05$ vs. LETO rat. † $P < 0.05$ vs. untreated OLETF rat.

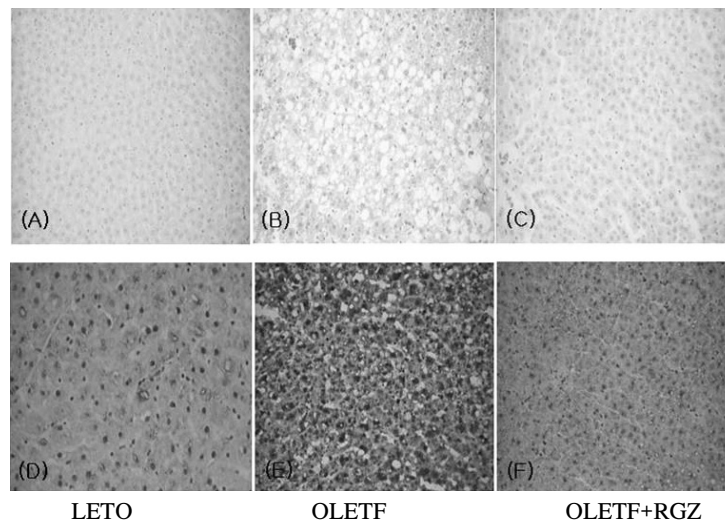


Fig. 2. Effects of rosiglitazone (RGZ) on liver histology of OLETF rats. Liver histology of LETO rats (A, D), untreated OLETF rats (B, E), and OLETF rats treated with rosiglitazone (C, F), stained by hematoxylin-eosin staining ($\times 400$; A, B, C). and oil-red staining (D, E, F), respectively.

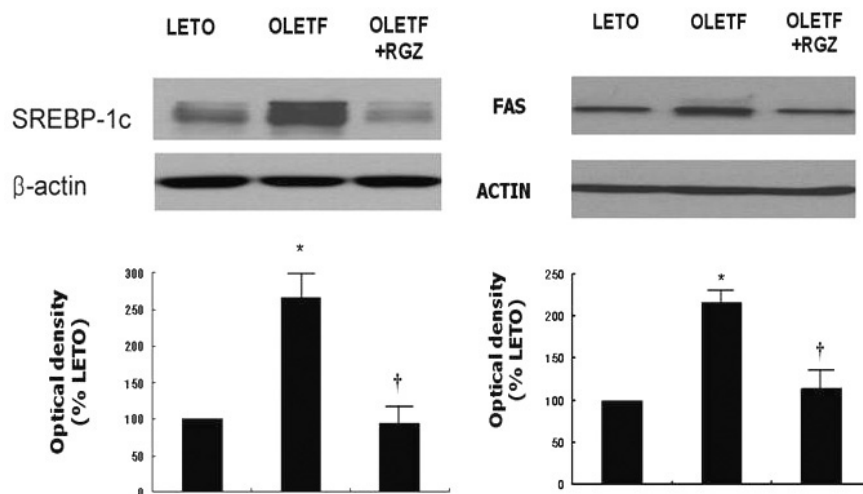


Fig. 3. Effects of rosiglitazone (RGZ) treatment on sterol regulatory binding protein-1c and fatty acid synthase expression in the liver tissue of OLETF rat. * $P < 0.05$ vs. LETO rat; † $P < 0.05$ vs. OLETF rat.

4. OLETF쥐에서 Rosiglitazone 투여에 따른 SREBP-1c, FAS, AMPK 활성도 변화

OLETF쥐는 LETO쥐에 비해 유의한 SREBP-1c과 FAS의 발현의 증가를 보였고, AMPK 활성의 지표인 AMPK인산화가 유의하게 감소하였다. Rosiglitazone을 투여 시 OLETF쥐의 간 조직 내 지방합성에 관여하는 SREBP-1c과 FAS의 억제에 관찰되었고(Fig. 3), AMPK의 활성화 지표인 AMPK인산화가 유의하게 증가함이 관찰되었다(Fig. 4).

고 찰

이미 보고된 바와 같이 당뇨병 및 비만 쥐 모델인 OLETF쥐에서 LETO쥐에 비해 혈중 포도당과 중성지방 농도 및 간 조직 내 중성지방의 함량이 증가하였으며 지방간이 발생하였다^{16,17}. Rosiglitazone 투여군에서는 이들 모든 지표의 개선이 확인되었다⁸. Rosiglitazone에 의한 지방간 호전의 기전을 파악하기 위해 간 조직의 AMPK 활성화를 조사 하였을 때, 치료군에서 AMPK 활성화의 지표인

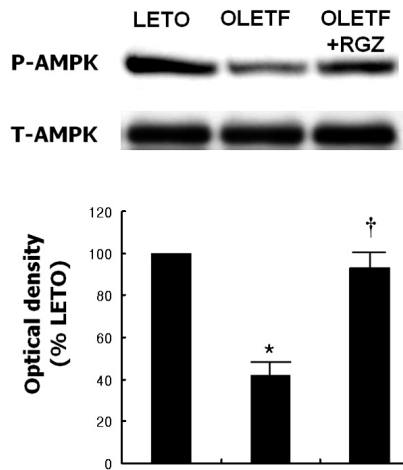


Fig. 4. Effects of rosiglitazone (RGZ) treatment on AMPK phosphorylation in the liver tissue of OLETF rat. * $P < 0.05$ vs. LETO rat; † $P < 0.05$ vs. OLETF rat.

AMPK 인산화가 유의하게 증가됨을 알 수 있었다.

본 연구에서는 이전의 연구들^{17,18,40)} 과는 달리 rosiglitazone을 비교적 단기간인 3일간 투여하였다. 본 연구의 결과와는 달리 Hockings 등¹⁹⁾은 Zucker fatty rat에서 3일간 rosiglitazone을 투여했을 때 지방간의 호전을 보이지 않았다고 보고하였다. 이와 같은 차이가 난 이유는 현재 명확하지 않다.

비알콜성 지방간질환은 알콜성 간질환과 임상적으로 유사하나 과다한 알코올 섭취 없이 발생한다. 비만과 제2형 당뇨병은 비알콜성 간질환의 가장 흔한 위험인자이다²⁰⁾. AMPK는 세포 내 에너지 상태를 감지하는 효소로서 ATP에 비하여 AMP가 증가하는 스트레스 상황에서 활성화한다. 최근 연구들은 비만이나 제2형 당뇨병에서 조직 내 AMPK 활성화도가 감소됨을 보고하였고^{11,21)}, rosiglitazone, metformin, alpha-lipoic acid와 같은 약물이나 adiponectin, leptin과 같은 호르몬들이 AMPK를 활성화시킴을 보고하였다²²⁻²⁴⁾.

간에서의 AMPK활성은 ACC를 불활성화시키고²⁵⁾, malonyl CoA의 합성을 감소시켜 지방산 산화를 증가시킨다. 또한 AMPK는 SREBP-1c를 감소시켜 지방간 발생을 억제하고²⁶⁾, phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK)의 전사를 억제하여 포도당의 신합성을 저해한다²⁷⁾. 이외에도 AMPK 활성화는 HMG CoA reductase를 억제함으로써 콜레스테롤 생산을 저해한다²⁸⁾.

글리타존은 PPAR γ 에 선택적으로 작용하여 인슐린감수성을 증가시키는 약제로, PPAR γ 는 주로 지방조직과 췌장의 베타세포, 혈관의 내피세포, 대식세포 그리고 간의 stellate 세포에 많이 존재한다. 글리타존은 주로 지방조직에

서 지방산의 섭취와 저장을 증가시켜 혈액 내 유리지방산 농도를 낮추고 결과적으로 간이나 골격근으로 유리지방산 유입을 감소시키는 것으로 알려져 왔다²⁹⁾. 그러나 최근의 연구들은 글리타존이 골격근 AMPK를 활성화하고¹⁰⁾, 골격근에서의 지방산 산화를 직접 증가시킴을 보고하고 있다^{10,30)}. 또한 글리타존은 지방조직에서 adiponectin의 합성 증가를 통해 간접적으로 인슐린감수성을 개선시킨다³¹⁾. Adiponectin은 간에서 AMPK를 활성화시킴이 보고되어 있기 때문에³²⁾ 본 연구에서 관찰한 글리타존의 AMPK 활성화 직접적인 효과인지 간접적인 효과인지는 확실치 않다.

여러 임상 연구에서 글리타존이 조직학적으로 확진된 NASH환자에서 인슐린저항성을 개선시키고, ALT수치를 호전시키며, 간의 조직학적 소견을 개선시킴을 보고하고 있다^{6,33,34)}. 그러나 이와 같은 기전은 아직까지 확정되지 않았다. 서 등¹⁸⁾은 rosiglitazone을 28주간 투여한 OLETF쥐에서 지방산 산화에 관련된 효소인 fatty-acid transport protein (FATP), medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD)의 발현이 증가하고, TNF- α 가 감소함을 보고하였다. 최근의 연구들이 mitochondria biogenesis에 AMPK가 관여함을 보고³⁵⁻³⁸⁾하는 것과 같이 생각할 때 이 연구 결과는 본 연구 결과와 상응하는 결과라 생각된다. 한편 NASH 환자에서 간 세포 내의 미토콘드리아 DNA량이 감소하거나 미토콘드리아와 연관된 여러 단백질의 발현이 감소되는 등 간세포의 미토콘드리아의 기능 이상이 NASH의 발생에 관여한다는 보고가 있었으나³⁹⁾, Caldwell 등⁴⁰⁾은 rosiglitazone 투여가 간에서 미토콘드리아의 크리스탈 봉입체(crystalline inclusions)를 증가시키는 것 외에 다른 미토콘드리아와 관련된 변화를 유발하지 못함을 보고하였다.

저자들은 글리타존이 에너지 센서인 AMPK의 활성화를 통해 비알콜성 간질환을 개선시킴을 보이고자 하였으며, OLETF 쥐에 rosiglitazone을 투여했을 때 AMPK 활성화가 증가함을 보였고, 간의 조직학적 소견 및 간의 지방함량이 개선됨을 밝혀냈다. 그러나 rosiglitazone 투여 후 간이나 지방에서 PPAR- γ 발현, adiponectin의 혈중 농도 및 발현, adiponectin 수용체의 발현의 변화나 인슐린감수성의 변화 등을 측정하지 못한 제한점이 있다. 또한, 본 연구에서는 rosiglitazone에 의한 지방간질환의 호전과 AMPK활성화가 나타난다는 것만을 밝혀낸 것으로 rosiglitazone에 의한 AMPK 활성화가 지방간 호전을 가져왔다는 것을 확정적으로 밝히기 위해서는 향후 AMPK에 대한 dominant-negative나 siRNA를 이용해 AMPK 활성을 억제했을 때 이와 같은 효과가 상쇄 되는지에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

연구배경: 인슐린저항성은 비알콜성 지방간질환 환자의 대부분에서 나타나며 비알콜성 지방간질환의 발생에 중요한 역할을 한다. 글리타존은 peroxisome proliferators-activated receptor gamma (PPAR γ)에 선택적으로 작용하여 인슐린 감수성을 증가시키는 약물로 비알콜성 지방간질환의 치료제로 주목 받고 있다. AMPK는 세포 내 에너지 상태를 감지하는 효소로서 ATP에 비하여 AMP가 증가하는 스트레스 상황에서 활성화된다. 최근의 다수의 연구들은 AMPK가 제 2형 당뇨병과 비만의 병인에 관여함을 제시하고 있고, adiponectin이나 metformin 등이 간에서의 AMPK를 활성화함을 보고하였다. 본 연구는 rosiglitazone이 간 조직에서 AMPK를 활성화시키는지를 규명하기 위하여 시행되었다.

방법: 생후 35주된 6마리의 LETO쥐와 각각 6마리의 대조군 및 치료군(rosiglitazone을 하루에 4 mg/kg 3일간 투여) OLETF쥐를 대상으로 혈액검사와 간 조직 검사를 실시하였다. 또한 대조군 및 치료군의 간 조직 내 SREBP-1c와 FAS의 발현, 그리고 AMPK 인산화를 western blotting으로 측정하였다.

결과: Rosiglitazone을 투여한 OLETF쥐 군은 대조군 OLETF 쥐에 비해 공복 혈당과 인슐린 그리고 중성지방 농도가 유의하게 낮았으며, 조직학적 검사상 지방간의 소견이 현저히 호전되었고, 간 내 중성지방의 함량 또한 유의하게 감소하였다. Rosiglitazone 치료군에서 대조군에 비해 간 조직 내 SREBP-1과 FAS의 발현이 유의하게 감소하였고, AMPK 활성의 지표인 AMPK 인산화는 유의하게 증가하였다.

결론: Rosiglitazone 투여는 OLETF쥐에서 비알콜성 지방간질환의 조직학적 호전을 보였으며, AMPK 활성화를 유의하게 증가시키는 것이 관찰되었다. 향후 rosiglitazone의 지방간질환의 호전에 대한 더 구체적인 기전연구가 요구된다.

참 고 문 헌

1. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ: *Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. Gastroenterology* 116:1413-9, 1999
2. Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell GC, Holmes-Walker J, Hui JM, Fung C, Karim R, Lin R, Samarasinghe D, Liddle C, Weltman M, George J: *NASH and insulin*

resistance: Insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. Hepatology 35:373-9, 2002

3. Akyuz F, Demir K, Ozdil S, Aksoy N, Poturoglu S, Ibrisim D, Kaymakoglu S, Besisik F, Boztas G, Cakaloglu Y, Mungan Z, Cevikbas U, Okten A: *The effects of rosiglitazone, metformin, and diet with exercise in nonalcoholic fatty liver disease. Dig Dis Sci* 52:2359-67, 2007
4. Khashab M, Chalasani N: *Use of insulin sensitizers in NASH. Endocrinol Metab Clin North Am* 36:1067-87, 2007
5. Tahan V, Eren F, Avsar E, Yavuz D, Yuksel M, Emekli E, Imeryuz N, Celikel C, Uzun H, Haklar G, Tozun N: *Rosiglitazone attenuates liver inflammation in a rat model of nonalcoholic steatohepatitis. Dig Dis Sci* 52:3465-72, 2007
6. Neuschwander-Tetri BA, Brunt EM, Wehmeier KR, Oliver D, Bacon BR: *Improved nonalcoholic steatohepatitis after 48 weeks of treatment with the PPAR-gamma ligand rosiglitazone. Hepatology* 38:1008-17, 2003
7. Winder WW, Hardie DG: *AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes. Am J Physiol* 277:E1-10, 1999
8. Foretz M, Ancellin N, Andreelli F, Saintillan Y, Grondin P, Kahn A, Thorens B, Vaulont S, Viollet B: *Short-term overexpression of a constitutively active form of AMP-activated protein kinase in the liver leads to mild hypoglycemia and fatty liver. Diabetes* 54:1331-9, 2005
9. Fryer LG, Parbu-Patel A, Carling D: *The Anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways. J Biol Chem* 277:25226-32, 2002
10. Bandyopadhyay GK, Yu JG, Ofrecio J, Olefsky JM: *Increased malonyl-CoA levels in muscle from obese and type 2 diabetic subjects lead to decreased fatty acid oxidation and increased lipogenesis; thiazolidinedione treatment reverses these defects. Diabetes* 55:2277-85, 2006
11. Lessard SJ, Chen ZP, Watt MJ, Hashem M, Reid JJ,

- Febbraio MA, Kemp BE, Hawley JA: *Chronic rosiglitazone treatment restores AMPK α 2 activity in insulin-resistant rat skeletal muscle. Am J Physiol Endocrinol Metab* 290:E251-7, 2006
12. Saha AK, Avilucea PR, Ye JM, Assifi MM, Kraegen EW, Ruderman NB: *Pioglitazone treatment activates AMP-activated protein kinase in rat liver and adipose tissue in vivo. Biochem Biophys Res Commun.* 6;314: 580-5, 2004
13. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE: *Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. J Clin Invest* 108:1167-74, 2001
14. Kakuma T, Lee Y, Higa M, Wang Z, Pan W, Shimomura I, Unger RH: *Leptin, troglitazone, and the expression of sterol regulatory element binding proteins in liver and pancreatic islets. Proc Natl Acad Sci U S A* 97:8536-41, 2000
15. Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Muller C, Carling D, Kahn BB: *Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. Nature* 415:339-43, 2002
16. Kawano K, Hirashima T, Mori S, Saitoh Y, Kurosumi M, Natori T: *Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications. Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) strain. Diabetes* 41:1422-8, 1992
17. Man ZW, Hirashima T, Mori S, Kawano K: *Decrease in triglyceride accumulation in tissues by restricted diet and improvement of diabetes in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats, a non-insulin-dependent diabetes model. Metabolism* 49:108-14, 2000
18. Seo YS, Kim JH, Jo NY, Choi KM, Baik SH, Park JJ, Kim JS, Byun KS, Bak YT, Lee CH, Kim A, Yeon JE: *PPAR agonists treatment is effective in a nonalcoholic fatty liver disease animal model by modulating fatty-acid metabolic enzymes. J Gastroenterol Hepatol* 23:102-9, 2008
19. Hockings PD, Changan KK, Saeed N, Reid DG, Birmingham J, O'Brien P, Osborne J, Toseland CN, Buckingham RE: *Rapid reversal of hepatic steatosis, and reduction of muscle triglyceride, by rosiglitazone: MRI/S studies in Zucker fatty rats. Diabetes Obes Metab* 5:234-43, 2003
20. Saadeh S, Younossi ZM: *The spectrum of nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to nonalcoholic steatohepatitis. Cleve Clin J Med* 67:96-7, 101-4, 2000
21. Chen MB, McAinch AJ, Macaulay SL, Castelli LA, O'Brien PE, Dixon JB, Cameron-Smith D, Kemp BE, Steinberg GR: *Impaired activation of AMP-kinase and fatty acid oxidation by globular adiponectin in cultured human skeletal muscle of obese type 2 diabetics. J Clin Endocrinol Metab* 90:3665-72, 2005
22. Misra P, Chakrabarti R: *The role of AMP kinase in diabetes. Indian J Med Res* 125:389-98, 2007
23. Musi N: *AMP-activated protein kinase and type 2 diabetes. Curr Med Chem* 13:583-9, 2006
24. Misra P: *AMP activated protein kinase: a next generation target for total metabolic control. Expert Opin Ther Targets* 12:91-100, 2008
25. Davies SP, Carling D, Munday MR, Hardie DG: *Diurnal rhythm of phosphorylation of rat liver acetyl-CoA carboxylase by the AMP-activated protein kinase, demonstrated using freeze-clamping. Effects of high fat diets. Eur J Biochem* 203:615-23, 1992
26. Yang J, Maika S, Craddock L, King JA, Liu ZM: *Chronic activation of AMP-activated protein kinase - α 1 in liver leads to decreased adiposity in mice. Biochem Biophys Res Commun*, 2008 (in press)
27. Hubert A, Husson A, Chedeville A, Lavoine A: *AMP-activated protein kinase counteracted the inhibitory effect of glucose on the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression in rat hepatocytes. FEBS Lett* 481:209-12, 2000
28. Corton JM, Gillespie JG, Hawley SA, Hardie DG: *5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? Eur J Biochem* 229: 558-65, 1995
29. Yki-Jarvinen H: *Thiazolidinediones. N Engl J Med* 351:1106-18, 2004
30. Koh EH, Kim MS, Park JY, Kim HS, Youn JY, Park

- HS, Youn JH, Lee KU: *Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-alpha activation prevents diabetes in OLETF rats: comparison with PPAR-gamma activation. Diabetes* 52:2331-7, 2003
31. Miyazaki Y, Mahankali A, Wajsborg E, Bajaj M, Mandarino LJ, DeFronzo RA: *Effect of pioglitazone on circulating adipocytokine levels and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. J Clin Endocrinol Metab* 89:4312-9, 2004
32. Andreelli F, Foretz M, Knauf C, Cani PD, Perrin C, Iglesias MA, Pillot B, Bado A, Tronche F, Mithieux G, Vaulont S, Burcelin R, Viollet B: *Liver adenosine monophosphate-activated kinase-alpha2 catalytic subunit is a key target for the control of hepatic glucose production by adiponectin and leptin but not insulin. Endocrinology* 147:2432-41, 2006
33. Belfort R, Harrison SA, Brown K, Darland C, Finch J, Hardies J, Balas B, Gastaldelli A, Tio F, Pulcini J, Berria R, Ma JZ, Dwivedi S, Havranek R, Fincke C, DeFronzo R, Bannayan GA, Schenker S, Cusi K: *A placebo-controlled trial of pioglitazone in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. N Engl J Med* 355:2297-307, 2006
34. Promrat K, Lutchman G, Uwaifo GI, Freedman RJ, Soza A, Heller T, Doo E, Ghany M, Premkumar A, Park Y, Liang TJ, Yanovski JA, Kleiner DE, Hoofnagle JH: *A pilot study of pioglitazone treatment for nonalcoholic steatohepatitis. Hepatology* 39:188-96, 2004
35. Hardie DG: *AMP-activated protein kinase: a key system mediating metabolic responses to exercise. Med Sci Sports Exerc* 36:28-34, 2004
36. Hardie DG, Sakamoto K: *AMPK: a key sensor of fuel and energy status in skeletal muscle. Physiology (Bethesda)* 21:48-60, 2006
37. Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG: *AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. Cell Metab* 1:15-25, 2005
38. Zong H, Ren JM, Young LH, Pypaert M, Mu J, Birnbaum MJ, Shulman GI: *AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation. Proc Natl Acad Sci U S A* 99:15983-7, 2002
39. Pessayre D, Fromenty B: *NASH: a mitochondrial disease. J Hepatol* 42:928-40, 2005
40. Caldwell SH, Patrie JT, Brunt EM, Redick JA, Davis CA, Park SH, Neuschwander-Tetri BA: *The effects of 48 weeks of rosiglitazone on hepatocyte mitochondria in human nonalcoholic steatohepatitis. Hepatology* 46:1101-7, 2007