

研究简报

miR-378转基因小鼠骨骼肌组织的代谢表型分析

梁娜¹ 宋懿朋² 李常银¹ 李虎¹ 贾海雪¹ 韩婉红¹ 赵一霞¹ 唐惠儒^{3*} 张勇^{1*}¹中国医学科学院基础医学研究所, 医学分子生物学国家重点实验室, 北京 100005;²中国科学院武汉物理与数学研究所, 武汉 430071;³遗传工程国家重点实验室, 复旦大学附属中山医院, 复旦大学生命科学学院, 人类表型组研究院, 上海 200433)

摘要 骨骼肌是机体最大的代谢器官, 对机体代谢稳态有重要调控功能。该课题组前期工作发现miR-378可以调控机体能量代谢稳态, 为探究过表达miR-378对骨骼肌组织代谢的影响, 该研究利用核磁共振技术系统分析了miR-378转基因小鼠及同窝的野生型对照小鼠骨骼肌组织的代谢谱差异。研究结果显示, miR-378对骨骼肌代谢有重要调控功能, 过表达miR-378使骨骼肌组织肌酸、氨基酸代谢物(谷氨酸、谷氨酰胺)及核酸代谢物(次黄嘌呤)增多, 而乳酸、磷酸肌酸、甘油等代谢产物明显减少, 提示miR-378转基因小鼠骨骼肌处于能量匮乏状态。进一步对AMPK信号通路相关蛋白的分析表明, miR-378转基因小鼠骨骼肌组织AMPK α 及ACC磷酸化水平增加, AMPK α 的激活进一步支持miR-378过表达导致骨骼肌组织能量不足。以上结果提示, miR-378对骨骼肌组织代谢有重要调控功能。

关键词 miR-378; 转基因小鼠; 骨骼肌; 代谢组学; 核磁共振

Metabolomics Phenotypes of the Skeletal Muscle Tissues from miR-378 Transgenic Mice

Liang Na¹, Song Yipeng², Li Changyin¹, Li Hu¹, Jia Haixue¹, Han Wanhong¹, Zhao Yixia¹, Tang Huiru^{3*}, Zhang Yong^{1*}¹The state Key Laboratory of Medical Molecular Biology, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100005, China; ²Wuhan Institute of Physics and Mathematics, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China;³State Key Laboratory of Genetic Engineering, Zhongshan Hospital and School of Life Sciences, Human Phenome Institute, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract Skeletal muscle is the biggest metabolic organ in the body, playing an important role in regulating whole body energy homeostasis. Our group have previously reported that miR-378 can mediate systemic energy homeostasis in mice. In order to investigate the functions of miR-378 in skeletal muscle metabolism, we applied nuclear magnetic resonance (NMR) technology to systemically study the metabolomic difference of the skeletal muscle from miR-378 transgenic (Tg) mice and its wild type (Wt) littermates. Our results demonstrate that miR-378 plays pivotal roles in regulating skeletal muscle metabolism. The content of creatine, amino acid species (glutamine, glutamate) and nucleic acid metabolic products (inosine) are significantly increased in the skeletal muscle of miR-378 Tg mice compared to its Wt littermates, whereas the content of lactate, phosphocreatine (PCr) and glyc-

收稿日期: 2019-02-27 接受日期: 2019-04-11

国家重点基础研究发展计划(973计划)(批准号: 2015CB943103)资助的课题

*通讯作者: Tel: 010-65105081, E-mail: huiru_tang@fudan.edu.cn; yongzhang@ibms.pumc.edu.cn

Received: February 27, 2019

Accepted: April 11, 2019

This work was supported by the National Basic Research Program of China (Grant No.2015CB943103)

*Corresponding author: Tel: +86-10-65105081, E-mail: huiru_tang@fudan.edu.cn; yongzhang@ibms.pumc.edu.cn

网络出版时间: 2019-07-16 16:57:33

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190716.1657.030.html>

erol are significantly decreased in miR-378 Tg mice. This suggests energy deficiency in skeletal muscle of miR-378 Tg mice. We further examined possible activation of AMPK signaling pathway. Our result demonstrates the phosphorylated form of AMPK and ACC (pAMPK α and pACC) are remarkably increased in skeletal muscle of miR-378 Tg mice. The activation of AMPK α further supports the result that the overexpression of miR-378 leads to energy deficiency in skeletal muscle. Together, we provide experimental data to support the notion that miR-378 plays important role in regulating skeletal muscle metabolism.

Keywords miR-378; transgenic mice; skeletal muscle; metabolomics; nuclear magnetic

microRNAs是一类约含22个核苷酸的非编码RNA, 可通过促进靶mRNA的降解或抑制靶mRNA翻译参与转录后基因表达调控, 另外, microRNAs还是能量代谢稳态的重要调控因子^[1]。例如let-7通过调控Insulin-PI3K-mTOR信号通路调控机体葡萄糖代谢及胰岛素敏感性^[2-3]; miR-103/miR-107通过直接调控其靶基因*Cav1*的表达来调控肝脏及脂肪组织胰岛素敏感性, 进而介导系统能量代谢稳态^[4]。miR-378编码基因位于*Ppargc1 β* 基因的第三个内含子, 该基因编码的PGC-1 β 是线粒体生成、产热、糖脂代谢的重要调控因子^[1,5]。miR-378在骨骼肌和棕色脂肪组织等线粒体含量丰富的组织中有较高的表达水平。研究表明, miR-378在代谢调控中发挥重要作用, 例如miR-378通过调控靶基因肉碱乙酰转移酶(carnitine acetyltransferase CRAT)的表达调控肝脏线粒体脂肪酸代谢^[6], 通过靶向CASP9和PDK1调控骨骼肌凋亡和自噬^[7], 通过调控p110 α 的表达调控肝脏糖脂代谢等^[8]。此外, 本研究组前期工作发现, miR-378可以介导系统能量代谢稳态, miR-378转基因小鼠与同窝野生型对照小鼠相比机体代谢率显著提高、体重减轻、脂肪量减少、糖耐受及胰岛素敏感性改善。进一步研究发现, 此现象是由于miR-378通过调控骨骼肌组织Akt-FOXO1-PEPCK通路激活丙酮酸-磷酸烯醇式丙酮酸无效循环导致的, 即miR-378转基因小鼠骨骼肌糖代谢获取的能量不足诱发脂肪组织脂解提供能量^[9]。但miR-378转基因小鼠骨骼肌组织自身代谢谱的变化还不清楚, 本实验拟通过核磁共振(nuclear magnetic, NMR)技术研究过表达miR-378后骨骼肌组织代谢谱的变化。AMPK α 是能量代谢调节的关键分子, 当细胞处于能量供应不足状态时, AMPK α 发生磷酸化修饰而被激活^[10]; 乙酰辅酶A羧化酶(ACC)是脂肪酸代谢的限速酶, 参与脂肪酸的氧化及合成, 且是AMPK α 的下游靶点, 激活的AMPK α 可使ACC发生磷酸化修饰使脂肪

酸氧化增强^[10], 即AMPK-ACC信号通路与能量代谢密切相关。据此, 本研究也检测了miR-378转基因小鼠骨骼肌组织AMPK及ACC磷酸化水平的变化, 并以此佐证代谢组学结果。

小鼠饲养与样品收集

本研究所有动物实验程序均获得北京协和医学院动物伦理委员会的批准, 所有实验用小鼠均在SPF级动物房中饲养、繁殖, 室内温度控制在19~24 °C, 湿度为50%~60%, 12 h明暗交替, 小鼠可自由获取食物和水。miR-378转基因小鼠由南京模式动物中心构建, 遗传背景是C57BL/6^[9], 所有实验均以性别、年龄相匹配的同窝野生型小鼠作为对照组。周龄为8周的9只miR-378转基因小鼠及11只野生型同窝对照, 小鼠断颈处死, 小心剥取腓肠肌后立即用液氮快速冷冻, 然后储存于-80 °C冰箱待测。

化学试剂与实验材料

本研究采用离心管购自AXYGEN公司。 β -Actin抗体、AMPK抗体及p-AMPK α 抗体均购自Sigma公司。ACC抗体及p-ACC抗体购自abcam公司。PVDF膜与ECL检测试剂盒购自Thermo公司。X光片及显影定影浓缩液购自Fuji公司。其他生化试剂购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

样品前处理

取出50 mg骨骼肌样品, 用600 μ L的冰甲醇/水(V/V=2/1)溶液和组织破碎仪(QIAGEN TissueLyser II, 德国)提取。组织破碎仪的频率设置为20 Hz, 时间为90 s; 经过组织破碎仪处理后的样品冰浴超声(超声时间1 min、间隔1 min, 重复3次)后离心(10 000 $\times$ g, 4 °C) 10 min取上清; 重复上述过程2次, 将3次样品提取的上清液混合。使用旋转蒸发仪去除甲醇后再用冷冻干燥机去除水获得冻干粉末。将得到的冻干

粉末溶于600 μL 磷酸盐缓冲溶液[0.1 mol/L, pH=7.4, ($\text{K}_2\text{HPO}_4\text{:NaH}_2\text{PO}_4=4\text{:}1$ 、0.1% NaN_3 、0.005% TSP、100% D_2O)], 离心(10 000 $\times g$ 、4 $^\circ\text{C}$) 10 min后取550 μL 上清至直径为5 mm的NMR样品管中待检。

核磁共振分析检测

骨骼肌的一维氢谱(^1H NMR)在配备5 mm TCI超低温探头的Bruker Avance III 600型NMR谱仪(Bruker, 德国)上采集。采样温度为298 K, 使用NOESY序列在延迟等待时间(2 s)和混合时间(100 ms)期间使用预饱和压水技术压制水峰, 谱宽为12 000 Hz, 累加128次, 采样点数为64 k(1 k代表1 024个点)。

为了归属 ^1H NMR谱峰信号, 我们使用有代表性的骨骼肌样品采集一系列 ^2D NMR谱图, 包括J分解谱(^1H J-Resolved spectroscopy, J-R es)、氢氢相关谱(^1H - ^1H correlation spectroscopy, COSY)、氢氢全相关谱(^1H - ^1H total correlation spectroscopy, TOCSY)、氢碳异核单量子相关谱(^1H - ^{13}C heteronuclear single quantum correlation spectroscopy, ^1H - ^{13}C HSQC)和氢碳异核多键相关谱(^1H - ^{13}C heteronuclear multiple bond correlation spectroscopy, ^1H - ^{13}C HMBC)等, 所有 ^2D NMR谱图均参照文献[11]采集和处理。

NMR谱图处理和多重单变量统计分析

对得到的自由感应衰减信号(Freeinduced decay, FID)添加1 Hz的线宽因子进行傅里叶变换后得到

NMR谱图。然后使用Topspin V 3.0软件(Bruker, 德国)对谱图进行相位和基线校正后以TSP定标($\delta 0.00$)。使用AMIX软件(Bruker, 德国)对谱图进行分段积分(积分的区间为 $\delta 0.50\sim 9.80$, 积分段宽为1.2 Hz)。删除 $\delta 4.70\sim 5.12$ 区域以消除残留水峰的影响。使用水相提取物干重对上述所得数据集进行归一化。

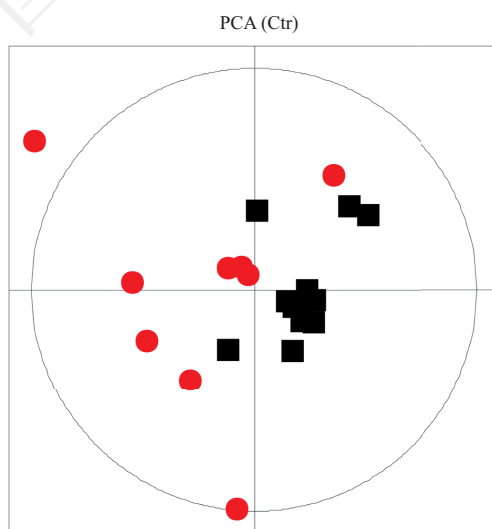
使用SIMICA-P+V 12.0软件(Umetrics, 瑞典)和MATLAB对归一化后的数据集进行多变量以及单变量统计学分析。对上述数据进行中心化(mean-center, Ctr)处理后再进行主成分分析(principal component analysis, PCA)。PCA分析能够提供不同组织中不同样品代谢组的轮廓协助发现潜在的异常点。去除异常点后, 对归一化数据集进行多重单变量数据分析(multiple univariate data analysis, MUDA)^[12]。对数据集进行(auto scaling, mean-centering and scaled to unit variance, UV)标准化处理后使用OPLSDA方法分析建模, 寻找样品组间的差异代谢物。

统计学方法

采用SPSS 17.0统计软件进行分析, 对组间代谢物的归一化数据集做独立样本 t 检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

骨骼肌组织代谢组学数据的聚类分析

分析结果如图1所示, 对miR-378转基因小鼠与同窝野生型对照小鼠骨骼肌样本所获的核磁谱

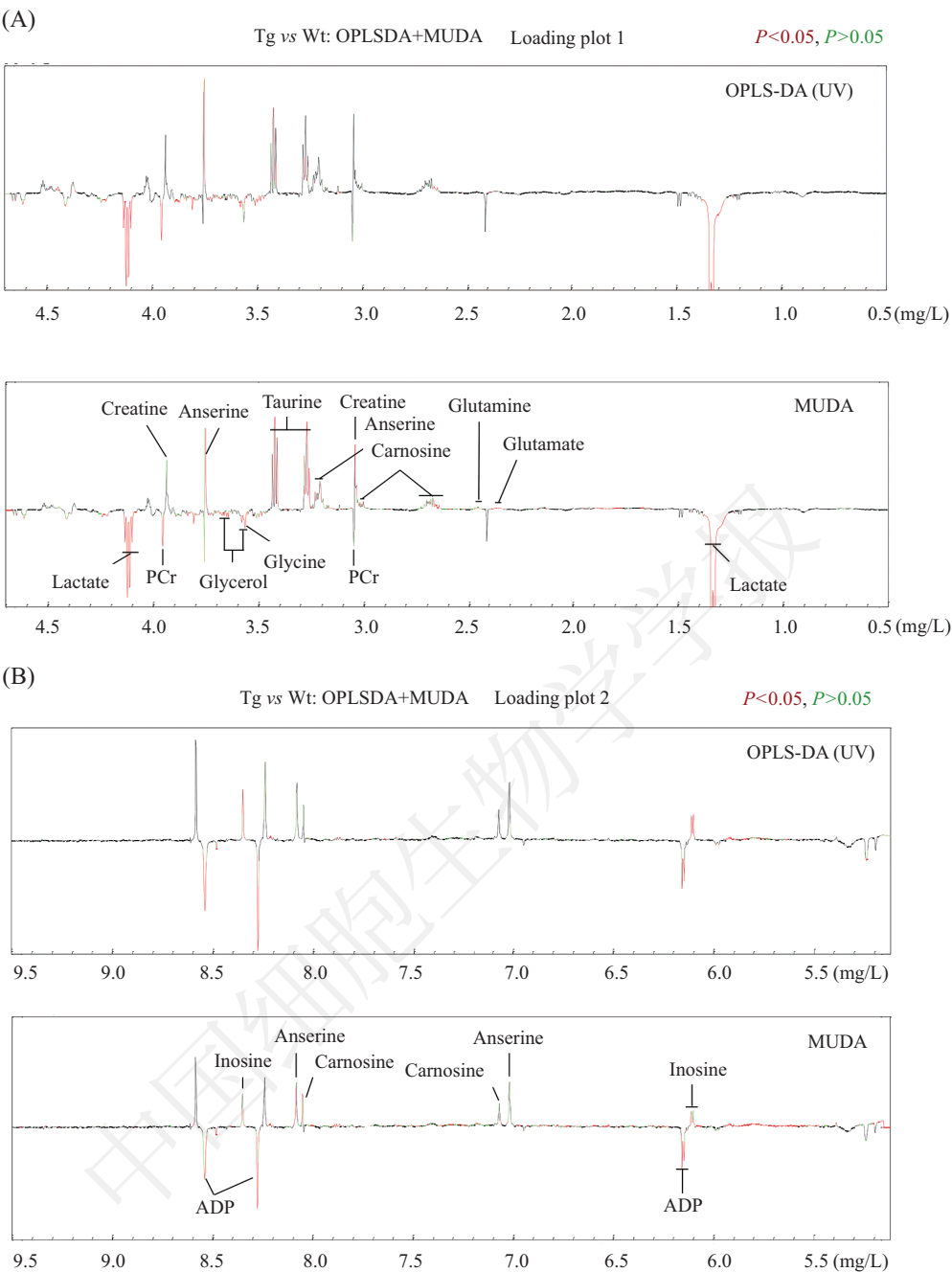


红色圆圈代表Tg小鼠, 黑色方框代表Wt小鼠。

Red circles represent Tg mice and black boxes represent Wt mice.

图1 miR-378转基因小鼠(Tg)与野生型同窝对照小鼠(Wt)骨骼肌组织代谢组数据主成分(PCA)分析得分图

Fig.1 PCA score plot of metabolomics data from skeletal muscle tissues of miR-378 transgenic mice (Tg) and wild type littermates (Wt)



峰图向上表示代谢物在miR-378转基因小鼠骨骼肌组织中比同窝野生型对照小鼠骨骼肌组织含量高, 峰图向下表示代谢物在miR-378转基因小鼠骨骼肌组织中比同窝野生型对照小鼠骨骼肌组织含量低, 红色代表 $P<0.05$, 绿色表示 $P>0.05$, 黑色表示 $P>0.1$ 。

Up indicates the metabolites in the skeletal muscle from miR-378 Tg mice is higher than that of Wt littermates, down represents lower in Tg mice than that of Wt ones. Red indicates P value is less than 0.05, green indicates that P value is greater than 0.05, whereas black indicates P value is greater than 0.1.

图2 miR-378转基因小鼠(Tg)与野生型同窝对照小鼠(Wt)骨骼肌组织的代谢差异谱

Fig.2 Differential NMR spectra for the aqueous skeletal muscle tissues extracts from miR-378 transgenic mice (Tg) and its wild type littermates (Wt)

数据进行了主成分分析(PCA)。PCA分析结果显示, miR-378转基因小鼠与同窝野生型对照小鼠骨骼肌样本的代谢组特征可分为两群, 说明miR-378转基因小鼠与野生型对照小鼠骨骼肌代谢物组成有一定区别。

骨骼肌组织的代谢组差异分析结果

对所获的载荷图(即NMR差异谱)进行详细分析而得到组间差异代谢物(图2)。如表1所示, miR-378转基因小鼠与其同窝野生型对照小鼠骨骼肌组织共有12个差异代谢物($P<0.05$), 其中miR-378转基

表1 miR-378转基因小鼠(Tg)与野生型同窝对照小鼠(Wt)骨骼肌组织主要差异代谢物
Table 1 Significantly differential metabolites in skeletal muscle tissues between
miR-378 transgenic mice (Tg) and its wild type littermates (Wt)

编号 Number	代谢物 Metabolite	代谢途径 Metabolic pathway	变化(Tg vs Wt) Change (Tg vs Wt)
1	Creatine	Creatine metabolism	Up
2	Anserine	Small peptide metabolism	Up
3	Taurine	Amino acid metabolism	Up
4	Glutamine	Amino acid metabolism	Up
5	Glutamate	Amino acid metabolism	Up
6	Inosine	Nucleic acid metabolism	Up
7	Carnosine	Small peptide metabolism	Up
8	Lactate	Glucose metabolism	Down
9	Phosphocreatine	Creatine metabolism	Down
10	Glycerol	Lipid metabolism	Down
11	Glycine	Amino acid metabolism	Down
12	ADP	Nucleotide metabolism	Down

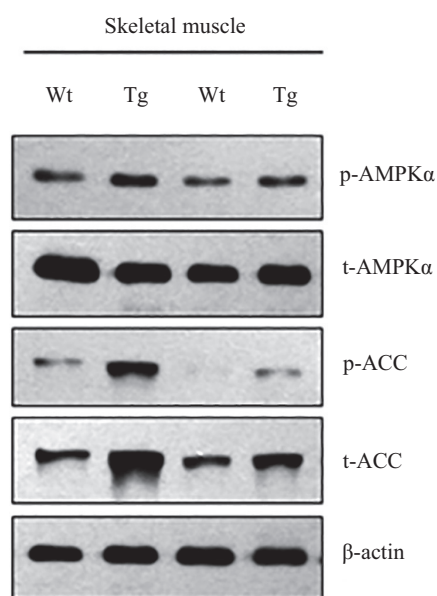
因小鼠骨骼肌组织中肌酸、鹅肌肽、牛磺酸、谷氨酰胺、谷氨酸、次黄嘌呤、肌肽的含量高于野生型同窝对照小鼠,而乳酸、磷酸肌酸、甘油、甘氨酸、腺苷二磷酸(ADP)的含量低于对照小鼠。在这些差异代谢物中,肌酸的增多与磷酸肌酸的减少提示能量代谢不足;乳酸减少可能与miR-378通过靶向Akt/FOXO1激活丙酮酸-磷酸烯醇式丙酮酸无效循环进而影响糖代谢有关。

过表达miR-378使骨骼肌组织AMPK和ACC磷酸化水平增加

分析差异代谢物发现,miR-378转基因小鼠骨骼肌组织中腺苷二磷酸(ADP)的含量显著降低,提示miR-378转基因小鼠骨骼肌组织中AMP/ADP比例上升,AMPK被激活。为验证此假设是否成立,我们检测了AMPK的磷酸化水平,Western blot检测结果发现,miR-378转基因小鼠骨骼肌中AMPK磷酸化水平明显高于野生型同窝对照小鼠(图3),此结果支持代谢组学测得的腺苷二磷酸(ADP)的含量显著降低。由于过表达miR-378使得骨骼肌糖代谢获取能量不足,于是我们进一步检测了AMPK下游靶点乙酰辅酶A羧化酶(ACC)的磷酸化水平,结果显示,转基因小鼠骨骼肌中ACC磷酸化水平明显高于野生型对照小鼠(图3),提示miR-378转基因小鼠骨骼肌利用脂肪酸氧化能力增强。

利用基于NMR的代谢组学分析,我们发现,

miR-378对骨骼肌组织代谢有重要调控功能,具体表现为:过表达miR-378使得骨骼肌组织中肌酸、鹅肌肽、牛磺酸、谷氨酰胺、谷氨酸、次黄嘌呤、肌肽显著增多,而乳酸、磷酸肌酸、甘油、甘氨酸、腺苷二磷酸(ADP)显著减少。肌酸为一种有机酸,能辅助为细胞供能,肌酸增多提示细胞储能不足;磷酸肌酸是能源物质,是肌酸代谢的逆反应产物,磷酸肌酸减少提示细胞储能不足^[13];乳酸参与糖代谢过程,乳酸减少表示糖酵解产生的丙酮酸不足^[14];甘油参与脂代谢过程,甘油减少提示脂分解减弱,猜想是由于miR-378转基因小鼠较野生型同窝对照小鼠瘦弱,所以骨骼肌组织含脂量少,导致脂分解产生的甘油较少^[9,15-16]。此研究结果与本研究组此前报道的miR-378通过调控Akt-FOXO1-PEPCK通路从而激活丙酮酸-磷酸烯醇式丙酮酸无效循环导致miR-378转基因小鼠脂肪组织脂解增强的现象是一致的,miR-378转基因小鼠骨骼肌由于丙酮酸-磷酸烯醇式丙酮酸无效循环导致葡萄糖产能减少、乳酸减少、磷酸肌酸减少、肌酸增多^[9]。miR-378转基因小鼠骨骼肌组织中腺苷二磷酸(ADP)的含量显著降低,提示miR-378转基因小鼠骨骼肌组织中AMP/ADP比例上升,AMPK被激活,于是我们检测了AMPK磷酸化水平,结果发现,miR-378转基因小鼠骨骼肌中AMPK磷酸化水平明显高于野生型同窝对照小鼠。由于过表达miR-378使得骨骼肌糖代谢获取能量不足,为满足细胞正常生命活动能量所需,miR-378转基因小鼠



β-actin作为内参。

β-actin serves as equal loading control.

图3 Western blot检测miR-378转基因小鼠(Tg)与野生型同窝对照小鼠(Wt)骨骼肌组织AMPKα及ACC表达水平及其磷酸化水平

Fig.3 Phosphorylated (p-) and total (t-) level of AMPKα and ACC in skeletal muscle of miR-378 Tg and Wt littermates determined by Western blot

骨骼肌组织需利用其他能源物质供能。本研究组此前报道, miR-378转基因小鼠脂肪组织脂解增强, 据此我们猜想, miR-378转基因小鼠骨骼肌组织利用脂肪组织脂解产生的脂肪酸供能, 即脂肪酸代谢增强。ACC是AMPKα的下游靶点, 参与调控脂肪酸氧化^[10,17], 检测ACC的磷酸化修饰发现, 与野生型对照小鼠骨骼肌组织相比, miR-378转基因小鼠骨骼肌中ACC磷酸化水平明显增加, 说明miR-378转基因小鼠骨骼肌脂肪酸氧化能力增强。AMPKα-ACC信号通路的激活印证了代谢组学得到的miR-378转基因小鼠骨骼肌组织糖代谢供能受损, 骨骼肌储能不足的结论。

近年来关于microRNAs调控机体能量代谢的研究报道非常多, 如let-7调控机体葡萄糖代谢及胰岛素敏感性, miR-103/miR-107调控肝脏及脂肪组织胰岛素敏感性等^[2-4], 但大多数研究侧重于干扰(敲低或过表达) microRNAs后观察动物或细胞代谢表型并进一步探究相关分子机制, 鲜有系统研究microRNAs对机体或组织器官代谢谱的调控的报道。本研究利用核磁共振技术系统分析了过表达miR-378后骨骼肌组织代谢谱的改变, 并得到了过表达miR-378使得骨骼肌组织中肌酸、鹅肌肽、牛磺酸、谷氨酰胺、谷氨酸、次黄嘌呤、肌肽显著增多, 而乳酸、磷酸

肌酸、甘油、甘氨酸、腺苷二磷酸(ADP)显著减少的发现, 说明miR-378对骨骼肌组织代谢具有重要的调控功能。

综上, 本研究利用核磁共振技术对miR-378转基因小鼠骨骼肌组织及野生型同窝对照小鼠骨骼肌组织进行代谢组学分析, 研究结果显示, miR-378对骨骼肌代谢有重要调控功能, 过表达miR-378使得骨骼肌组织糖代谢功能不足, 并且处于能量匮乏状态, AMPKα-ACC信号通路被激活, 脂肪酸氧化能力增强。但miR-378增强脂肪酸氧化的机制还需进一步研究。

参考文献 (References)

- 1 Lee I, Ajay SS, Yook JI, Kim HS, Hong HS, Kim NH, *et al.* New class of microRNA targets containing simultaneous 5'-UTR and 3'-UTR interaction sites. *Genome Res* 2009; 19(7): 1175-83.
- 2 Zhu H, Shyh-Chang N, Segrè AV, Shinoda G, Shah SP, Einhorn WS, *et al.* The Lin28/let-7 axis regulates glucose metabolism. *Cell* 2011; 147(1): 81-94.
- 3 Frost RJ and Olson EN. Control of glucose homeostasis and insulin sensitivity by the Let-7 family of microRNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(52): 21075-80.
- 4 Trajkovski M, Hausser J, Soutschek J, Bhat B, Akin A, Zavolan M, *et al.* MicroRNAs 103 and 107 regulate insulin sensitivity. *Nature* 2011; 474(7353): 649-53.
- 5 Vats D, Mukundan L, Odegaard JI, Zhang L, Smith KL, Morel

- CR, *et al.* Oxidative metabolism and PGC-1 β attenuate macrophage-mediated inflammation. *Cell Metab* 2006; 4(1): 13-24.
- 6 Carrer M, Liu N, Grueter CE, Williams AH, Frisard MI, Hulver MW, *et al.* Control of mitochondrial metabolism and systemic energy homeostasis by microRNAs 378 and 378*. *Proc Natl Acad Sci UAS* 2012; 109(38): 15330-5.
- 7 Li Y, Jiang J, Liu W, Wang H, Zhao L, Liu S, *et al.* microRNA-378 promotes autophagy and inhibits apoptosis in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 2018; 115(46): 10849-58.
- 8 Liu W, Cao H, Ye C, Chang C, Lu M, Jing Y, *et al.* Hepatic miR-378 targets p110 α and controls glucose and lipid homeostasis by modulating hepatic insulin signalling. *Nat Commun* 2014; 5: 5684-97.
- 9 Zhang Y, Li C, Li H, Song Y, Zhao Y, Zhai L, *et al.* miR-378 activates the pyruvate-PEP futile cycle and enhances lipolysis to ameliorate obesity in mice. *EBio Medicine* 2016; 5: 93-104.
- 10 Green DR, Galluzzi L, Kroemer G. Cell biology. Metabolic control of cell death. *Science* 2014; 345(6203): 1250256-81.
- 11 Lee P, Zhao JT, Swarbrick MM, Gracie G, Bova R, Greenfield JR, *et al.* High prevalence of brown adipose tissue in adult humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96(8): 2450-5.
- 12 Duan Y, An Y, Li N, Liu B, Wang Y, Tang H. Multiple univariate data analysis reveals the inulin effects on the high-fat-diet induced metabolic alterations in rat myocardium and testicles in the preobesity state. *J Proteome Res* 2013; 12(7): 3480-95.
- 13 Lanhers C, Pereira B, Naughton G, Trousselard M, Lesage FX, Dutheil F. Creatine supplementation and upper Limb strength performance: a systematic review and meta-analysis. *Sports Med* 2017; 47(1): 163-73.
- 14 Cameron ME, Yakovenko A, Trevino JG. Glucose and lactate transport in pancreatic cancer: glycolytic metabolism revisited. *J Oncol* 2018; 2018: 6214838-44.
- 15 Xue LL, Chen HH, Jiang JG. Implications of glycerol metabolism for lipid production. *Prog Lipid Res* 2017; 68: 12-25.
- 16 Hardie DG. The AMP-activated protein kinase pathway: new players upstream and downstream. *J Cell Sci* 2004; 117(23): 5479-87.
- 17 Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa N, Kim YB, Lee A, Xue B, *et al.* AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 2004; 428(6982): 569-74.