

N-乙酰半胱氨酸对 2 型糖尿病大鼠肝氧化应激及 FoxO1 活性的影响

雷少青, 王雅枫, 周璐, 张元, 夏中元, 苏娃婷*

(武汉大学人民医院麻醉科, 武汉 430060)

【摘要】 目的 探讨抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)对 2 型糖尿病大鼠肝氧化应激及 FoxO1 活性的影响。**方法** 24 只雄性 SD 大鼠随机分为正常对照组(C)、糖尿病非治疗组(D)及 NAC 治疗组(D + NAC)($n=8$)。通过小剂量腹腔注射链脲佐菌素(STZ)及高脂饮食建立 2 型糖尿病大鼠模型。D + NAC 组每天灌胃给予 NAC 1.5 g/kg 治疗, C 与 D 组灌胃给予同体积生理盐水。8 周后, 全自动生化分析仪检测血浆三酰甘油(TG)、游离脂肪酸(FFA)、谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)水平, 试剂盒检测肝组织超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、三磷酸腺苷(ATP)水平及血浆与肝组织脂质过氧化物丙二醛(MDA)含量; Western blot 分析肝组织 Caspase-3 表达水平, 并分析细胞质与细胞核中 FoxO1 蛋白表达水平, 从而间接反映 FoxO1 活性水平。**结果** 与 C 组相比, D 组大鼠血浆 TG、FFA、AST、ALT、MDA 及肝组织 MDA 含量、Caspase-3 表达水平、FoxO1 活性水平均明显增加, 而肝组织中的 SOD、CAT、ATP 水平及 GSH-Px 活性均显著降低; NAC 治疗 8 周后均可以抑制糖尿病大鼠中上述指标的变化, 差异具有统计学意义。**结论** 抗氧化剂 NAC 可以减轻糖尿病相关肝功能损害, 其机制可能与其抑制糖尿病氧化应激水平、减轻线粒体功能紊乱及 FoxO1 过度活化有关。

【关键词】 糖尿病; 氧化应激; FoxO1; N-乙酰半胱氨酸

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2018) 06-0734-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2018.06.010

Effects of N-acetylcysteine on oxidative stress and FoxO1 activity of the liver in type 2 diabetic rats

LEI Shaoqing, WANG Yafeng, ZHOU Lu, ZHANG Yuan, XIA Zhongyuan, SU Wating*

(Department of Anesthesiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China)

Corresponding author: SU Wating. E-mail: suwating@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of antioxidant N-acetylcysteine (NAC) on oxidative stress and FoxO1 activity of the liver in type 2 diabetic rats. **Methods** Twenty-four male SD rats were randomly divided into control (C), diabetes without treatment (D), and NAC-treated diabetic groups (D + NAC) ($n=8$). A model of type 2 diabetes was established by feeding on a high-fat diet and the intraperitoneal injection of low-dose streptozotocin (STZ). NAC was given at a dose of 1.5 (kg·d), and groups C and D were given an equal volume of normal saline by gavage for 8 weeks. The levels of plasma triglyceride (TG), free fatty acid (FFA), glutamic oxalane aminotransferase (AST), and alanine transaminase (ALT) were measured by an automatic biochemical analyzer, and the levels of dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px), and adenosine 5'-triphosphate (ATP) in liver tissues and malondialdehyde (MDA) in plasma and liver tissues were detected by commercial kits. Caspase-3 expression and FoxO1 activity in liver were analyzed by Western blot. **Results** The plasma levels of TG, FFA, AST, ALT, and MDA, and hepatic MDA production, caspase-3 expression, and FoxO1 activity in D group were significantly increased as compared with those in C

【基金项目】 国家自然科学基金(81700733)。

Founded by the National Natural Science Fund (81700733).

【作者简介】 雷少青(1982—), 男, 副主任医师, 博士, 研究方向: 围术期多器官保护。Email: leishaoqing@163.com.

【通信作者】 苏娃婷(1986—), 女, 博士, 医师, 研究方向: 糖尿病并发症的防治研究。Email: suwating@163.com

group, while the hepatic activities of SOD, CAT, and GSH-Px, as well as ATP levels were significantly decreased. All of these changes in diabetic rats were significantly attenuated by NAC treatment for 8 weeks. **Conclusion** Antioxidant NAC attenuates diabetes-related liver dysfunction, partially as a result of reducing oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and FoxO1 activation.

【**Keywords**】 diabetes; oxidative stress; FoxO1; N-acetylcysteine

Conflict of interest statement: We declare that we have no conflict of interest statement.

糖尿病是一种以持续高血糖为主要特征的代谢紊乱性疾病,其控制不良往往会导致心脏、脑、肾、眼、周围神经等多种组织器官功能损害,因而被社会广泛关注。流行病学资料显示:近 70% 的 2 型糖尿病患者存在慢性肝损害,其中最为常见的是非酒精性脂肪肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)^[1-2],但由于肝具有较强的代偿功能且早期肝损伤不明显,因而糖尿病所导致的肝病未引起临床医师及患者重视。研究显示,NAFLD 与糖尿病可相互促进,并形成恶性循环,从而加速疾病进展^[3-4]。尽管糖尿病患者易发生肝损害的具体机制不详,但已有证据表明高血糖所导致的氧化应激是其发生发展的重要始发因素^[5]。叉头状转录因子 O 亚型 1(forkhead transcription factor of class O1)是机体调控代谢的重要因子,其活性受胰岛素负性调控^[6]。在糖尿病状态下,FoxO1 过度活化可增加脂肪酸的摄取及氧化,同时抑制葡萄糖氧化利用率,当脂肪酸摄入量超过细胞的代谢能力时,将导致细胞线粒体功能紊乱而产生过量 ROS(reactive oxygen species)致细胞损伤^[7-8]。由此可见,FoxO1 过度活化也可能是糖尿病氧化应激的重要机制。尽管如此,目前关于氧化应激与 FoxO1 过度活化在糖尿病肝损害中的具体作用关系仍然不明。N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)是一种含巯基的自由基清除剂,并是抗氧化剂谷胱甘肽的前体,因此被广泛用来去除氧化应激所产生的 ROS^[9]。本研究旨在观察 2 型糖尿病大鼠肝组织的抗氧化状态及 FoxO1 的活性,并观察抗氧化剂 NAC 干预对其的影响,以探究糖尿病相关肝损害的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

24 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,7~8 周龄,180~220 g,由湖北省实验动物研究中心提供【SCXK(鄂)2015-0018】,饲养于武汉大学人民医院动物实验中心【SYXK(鄂)2015-0027】。

1.1.2 主要试剂与仪器

链脲佐菌素与 N-乙酰半胱氨酸(NAC)购自美国 Sigma 公司;超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶、丙二醛和三磷酸腺苷(比色法)含量测定试剂盒均购自南京建成生物科技有限公司;一抗 FoxO1 购自美国 Santa Cruz 公司;预染 Marker、GAPDH、H3、Caspase-3 与二抗购自美国 Cell Signaling 公司;全自动生化分析仪(日本东芝公司);美国强生血糖分析仪。

1.2 方法

1.2.1 模型制作

SD 大鼠以标准饮食适应性喂养 1 周后,按计算机产生的随机数列将大鼠分为正常对照组(C)、糖尿病组(D)及 NAC 治疗组(D+NAC)。D 组与 D+NAC 组给予高脂饮食喂养 4 周后开始造糖尿病模型。造模前禁食 12 h,腹腔注射小剂量 STZ(25 mg/kg),连续 3 d 血糖值超过 11.1 mmol/L 为 2 型糖尿病成功模型。D+NAC 组大鼠灌胃给予 NAC 1.5 g/(kg·d)^[9],C 组与 D 组大鼠给予同体积生理盐水。C 组大鼠给予标准饮食,D 组与 D+NAC 组大鼠继续给予高脂饮食,持续 8 周。

1.2.2 标本收集与指标检测

(1)一般指标

试验期间,每周监测大鼠血糖、体重一次,NAC 治疗后第 4 周与第 8 周分别记录 24 h 进食量与饮水量。实验结束时,记录体重、肝重,并计算肝重指数=肝重/体重×100%。

(2)样本收集

实验结束后,大鼠经戊巴比妥钠(65 mg/kg)麻醉及肝素抗凝后,处死大鼠,从下腔静脉收集血液,随后获取肝组织,所有标本(血浆与肝组织)于-80℃冰箱保存。

(3)血浆指标检测

全自动生化分析仪检测三酰甘油(triglyceride, TG)、血浆游离脂肪酸(free fat acid, FFA)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)水平;应用试剂盒检测血浆 MDA 水平,所有操作严格按

照试剂盒说明书进行。

(4) 肝组织氧化应激指标检测

将部分肝组织进行匀浆,提出上清液及 BCA 法测定蛋白浓度后,检测肝组织标本中的 SOD、CAT、GSH-Px 和 MDA 水平,所有操作按试剂盒说明书进行。

(5) 肝组织 ATP 含量测定

ATP 水平可以直接反映线粒体功能。将上述的肝组织上清液经 BCA 法测定蛋白浓度后,用试剂盒检测肝组织标本中的 ATP 水平,操作按试剂盒说明书进行。

(6) Western blot 分析肝组织总蛋白中的 Caspase-3 及细胞质与细胞核中 FoxO1 蛋白表达水平

严格按照碧云天生物蛋白提取试剂盒说明书提取肝组织总蛋白及细胞质与细胞核蛋白,BCA 法测定其蛋白浓度。上样量为 50 ~ 100 μg,10% ~ 12.5% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白后转到 PVDF 膜;常温封闭 2 h 后,加入一抗 Caspase-3 (1: 1000, Cell Signaling), FoxO1 (1: 500, Santa Cruz Biotechnology), GAPDH (1: 2000, Cell Signaling), H3 (1: 1000, Cell Signaling), 4℃ 孵育过夜;再次洗膜后加入二抗 (anti-rabbit IgG, 1: 10 000, Cell Signaling) 中室温孵育 2 h;按奥德赛 (Gene Company Limited) 操作人员手册扫描条带,分析并导出蛋白条带,计算目标条带灰度值。

1.3 统计学方法

所有计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 Graph Pad Prism 软件对数据进行统计学处理,组间比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具

有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况比较

如表 1 所示,在实验结束阶段,与 C 组相比,D 组大鼠 24 h 进食量与饮水量、血糖水平及肝重指数明显增加,而体重明显减轻 ($P < 0.01$)。与 D 组比较,D + NAC 组大鼠 24 h 进食量与饮水量均有减少 ($P < 0.05$),但血糖水平、体重及肝重指数未有统计学改变。值得注意的是,在本实验的前期研究中,我们未发现 NAC 干预对正常大鼠的一般情况有显著影响 (结果未显示),因此在后续实验中未检测 C + NAC 组大鼠相关指标的变化。

2.2 各组大鼠血浆 TG、FFA、ALT、AST 及 MDA 水平

如表 2 所示,与 C 组相比,D 组大鼠血浆中 TG、FFA、ALT、AST 及 MDA 水平均显著增加 ($P < 0.01$);与 D 组比较,D + NAC 组大鼠血浆 TG、FFA、ALT、AST 与 MDA 水平均明显降低 ($P < 0.05$),但仍明显高于 C 组 ($P < 0.05$)。

2.3 各组大鼠肝组织 SOD、CAT、GSH-Px、MDA 及 ATP 水平

如表 3 所示,与 C 组比较,D 组大鼠肝组织中 SOD、CAT 与 GSH-Px 活性及 ATP 含量均显著降低 ($P < 0.05$),而脂质过氧化物 MDA 含量明显增加 ($P < 0.01$);与 D 组比较,D + NAC 组大鼠 SOD、CAT 与 GSH-Px 活性及 ATP 含量均明显增加 ($P < 0.05$),MDA 含量尽管仍高于 C 组但显著低于 D 组 ($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠一般情况 ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

Table 1 General characteristics of rats at the end of the study ($n = 8, \bar{x} \pm s$)					
组别 Groups	食物摄入量 Food intake g/(kg·d)	饮水量 Water intake mL/(kg·d)	体重 Body weight (g)	肝重指数 Liver weight index (%)	血糖 Blood glucose (mmol/L)
C	62.4 ± 8.5	108.4 ± 18.5	468.2 ± 36.6	2.4 ± 0.3	6.5 ± 0.8
D	110.7 ± 15.4 **	278.6 ± 23.5 **	286.4 ± 31.3 **	5.5 ± 0.6 **	26.4 ± 3.7 **
D + NAC	85.2 ± 9.3 **	187.7 ± 20.6 **	270.8 ± 33.5 **	5.2 ± 0.5 **	25.2 ± 3.1 **

注:与 C 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 D 组比较, # $P < 0.05$ 。C: 正常对照组;D: 糖尿病组;D + NAC: 糖尿病 + N-乙酰半胱氨酸治疗组。(下表和图同)。

Note. Compared with group C, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with group D, # $P < 0.05$. C: control group; D: diabetic group; D + NAC: diabetes with N-acetylcysteine (NAC) treated group. (The same in the following Figures and Tables).

表 2 各组大鼠血浆 TG、FFA、ALT、AST 及 MDA 水平 ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

Table 2 Plasma levels of TG, ALT, AST and MDA in rats of each group ($n = 8, \bar{x} \pm s$)					
组别 Groups	TG (mmol/L)	FFA (mmol/L)	ALT (U/L)	AST (U/L)	MDA (mmol/L)
C	0.8 ± 0.2	0.6 ± 0.1	86.3 ± 8.4	42.5 ± 6.6	15.4 ± 3.1
D	7.1 ± 2.6 **	1.3 ± 0.2 **	196.8 ± 18.5 **	107.5 ± 11.6 **	54.6 ± 6.9 **
D + NAC	3.8 ± 1.5 **	0.9 ± 0.1 **	127.9 ± 14.7 **	75.3 ± 8.7 **	32.7 ± 5.3 **

表 3 各组大鼠肝组织 SOD、CAT、GSH-Px 及 MDA 水平($n=8, \bar{x} \pm s$)

Table 3 The levels of SOD, CAT, GSH-Px and MDA in liver tissues of rats in each group($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别 Groups	SOD (U/mg protein)	CAT (U/g protein)	GSH-Px (U/mg protein)	MDA ($\mu\text{mol/g protein}$)	ATP ($\mu\text{mol/g protein}$)
C	8.5 $\pm$ 0.7	1.3 $\pm$ 0.2	42.6 $\pm$ 9.2	1.8 $\pm$ 0.3	67.4 $\pm$ 8.6
D	6.0 $\pm$ 0.4 *	0.8 $\pm$ 0.1 *	23.7 $\pm$ 7.9 *	16.4 $\pm$ 1.3 **	48.7 $\pm$ 5.8 *
D + NAC	7.9 $\pm$ 0.6 #	1.2 $\pm$ 0.2 #	38.5 $\pm$ 7.6 #	4.1 $\pm$ 0.8 **	60.6 $\pm$ 7.1 #

2.4 各组大鼠肝组织 Caspase-3 表达水平

如图 1 所示,与 C 组比较,D 组大鼠肝组织 Caspase-3 表达水平显著降低($P < 0.01$),提示糖尿病肝组织凋亡水平增加;抗氧化剂 NAC 治疗后显著降低 Caspase-3 表达水平。

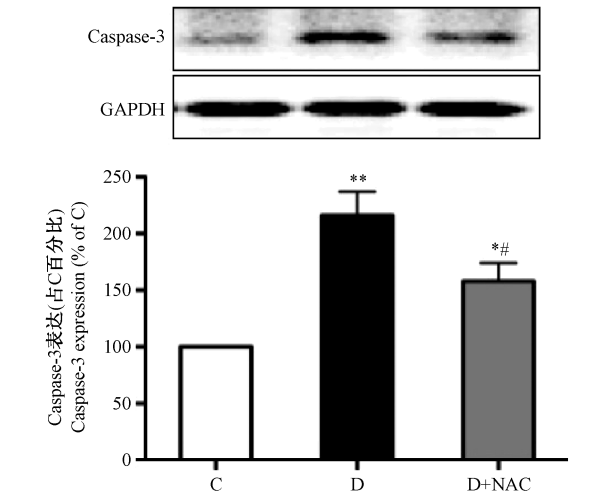


图 1 各组大鼠肝组织 Caspase-3 蛋白表达水平

Figure 1 Caspase-3 expression in liver tissues of rats in each group

2.5 各组大鼠肝组织 FoxO1 活性水平

如图 2 所示,与 C 组比较,D 组大鼠肝组织细胞质成分中 FoxO1 表达显著降低,而细胞核中 FoxO1 表达显著增加($P < 0.01$),提示糖尿病肝组织 FoxO1 活性显著增强;抗氧化剂 NAC 治疗后显著降低 FoxO1 活性水平。

3 讨论

现代生活方式和饮食习惯使得糖尿病及肥胖人群不断增多,临床上糖尿病相关的肝损害也越来越常见^[10]。糖尿病状态下糖利用障碍,而脂肪动员代偿性增加,使得血浆游离脂肪酸增多,从而对机体产生毒性作用。肝能通过促进脂肪酸氧化和转化为甘油三酯储存在肝细胞内,从而适应糖尿病高脂质环境,这一方面导致肝组织氧化应激增强,另一方面致使肝细胞甘油三酯堆积而产生脂肪变性^[11]。随着糖尿病的进展,肝功能逐渐受损,导致

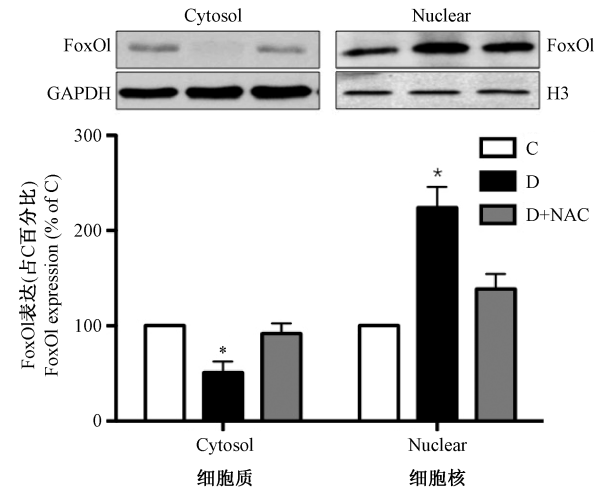


图 2 各组大鼠肝组织细胞质与细胞核中的 FoxO1 蛋白表达水平

Figure 2 FoxO1 expression in cytoplasm and nucleus of liver tissues of rats in each group

胰高血糖素等激素灭活减少、胰岛素抵抗加重、白蛋白合成障碍等一系列病理变化,从而形成恶性循环,最终加速了糖尿病及肝病变的进展^[12]。本研究采用高脂饮食与小剂量 STZ 腹腔注射诱导 2 型糖尿病大鼠模型,实验中糖尿病大鼠出现典型的“三高一少”临床症状,同时大鼠还表现为肝功能、线粒体功能与血脂异常,具体表现为 ALT、AST、ATP、FFA 及 TG 水平均明显增加。此外,糖尿病大鼠肝组织 caspase-3 表达水平增高,进一步发现血浆和肝组织中脂质过氧化产物 MDA 浓度显著上升,这提示肝凋亡及氧化应激水平增加。NAC 是目前较为常用的一种抗氧化剂,在我们前期研究中,其灌胃剂量在每日 1.5 g/kg 持续 4 周时可有效降低机体的氧化应激水平^[9],并能减轻糖尿病心肌功能紊乱及缺血后再灌注损伤^[13]。在本研究中,我们应用 NAC 治疗 8 周后,ALT、AST、FFA、TG、ATP 及凋亡水平均显著降低。这表明抗氧化剂 NAC 可部分抑制 2 型糖尿病大鼠肝组织氧化损伤、线粒体与肝功能减退及脂质异常代谢。目前关于糖尿病导致肝损害的具体机制尚未完全阐明,但大量临床研究发现活性氧自由基

(ROS)增多被认为是 NAFLD 的始发因素和中心环节^[5, 14]。SOD、CAT 及 GSH-Px 是机体最为重要的内源性抗氧化酶,其活性能反映机体的抗氧化能力。本研究发现 2 型糖尿病大鼠肝组织中 SOD、CAT 及 GSH-Px 活性均显著降低, NAC 干预明显升高了这三种抗氧化酶的活性。这提示 NAC 具有增强 2 型糖尿病大鼠肝组织内源性抗氧化能力的作用,这可能是其减轻糖尿病肝损害的有关机制。

FoxO 家族是近年研究的一个热点,其在调控细胞周期、氧化应激、能量代谢等方面具有重要作用。目前已发现四种 FoxO 家族成员: FoxO1、FoxO3、FoxO4 及 FoxO6。其中, FoxO1 在调节代谢方面尤为重要,其活性受胰岛素负性调节^[6]。在糖尿病状态下,胰岛素绝对或相对不足均会导致 FoxO1 活性增强,从而增加脂肪动员,致使 FFA 浓度显著增加,过量的 FFA 进入肝并超过肝的氧化能力,造成大量 TG 在肝中蓄积形成脂肪肝。此外,过量的 FFA 也会抑制胰岛素的释放、干扰胰岛素的功能^[15],这会加重糖尿病,因而形成恶性循环。这提示糖尿病相关肝损害的发生和发展与 FoxO1 活性显著增加密切相关。由于高血糖与高血脂均可以引起机体氧化应激的增强,因而在本实验中我们特别检测了抗氧化剂 NAC 对肝 FoxO1 活性的影响。我们发现 2 型糖尿病肝组织 FoxO1 活性显著增强,而抗氧化剂 NAC 可以显著抑制其活性。这表明糖尿病肝 FoxO1 活性增强与氧化应激有关,通过减轻糖尿病氧化应激从而抑制 FoxO1 活化的措施或许是减轻糖尿病肝损害的重要途径。

综上所述,抗氧化剂 NAC 可以减轻实验性 2 型糖尿病相关肝损害,其机制可能与其增强机体抗氧化能力、减少血脂代谢与线粒体功能异常并抑制 FoxO1 过度活化有关。本研究初步探讨了抗氧化剂对 2 型糖尿病相关肝损害中氧化应激及 FoxO1 的影响,以为糖尿病相关肝损害临床药物的研发提供理论依据。

参 考 文 献(References)

- [1] Silva Figueiredo P, Inada AC, Ribeiro Fernandes M, et al. An overview of novel dietary supplements and food ingredients in patients with metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Molecules*, 2018, 23(4): E877.
- [2] 黄晓慈, 蒋树林, 刘复娜. 替米沙坦对非酒精性脂肪肝大鼠肝组织 PPARs 及脂联素受体 2 表达的影响[J]. *中国实验动物学报*, 2017, 25(03): 289–294.
- Huang XC, Jiang SL, Liu FN. Effects of telmisartan on the expression of PPARs and adiponectin receptor 2 in the liver tissue of rat with nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Acta Lab Anim Sci*

- Sin*, 2017, 25(3): 289–294.
- [3] Mantovani A, Byrne CD, Bonora E, et al. Nonalcoholic fatty liver disease and risk of incident type 2 diabetes: a meta-analysis [J]. *Diabetes Care*, 2018, 41(2): 372–382.
- [4] Mantovani A, Targher G. Type 2 diabetes mellitus and risk of hepatocellular carcinoma: spotlight on nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Ann Transl Med*, 2017, 5(13): 270.
- [5] Vanjiappan S, Hamide A, Ananthakrishnan R, et al. Nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes mellitus and its association with cardiovascular disease [J]. *Diabetes Metab Syndr*, 2018, 12(4): 479–482.
- [6] Xing YQ, Li A, Yang Y, et al. The regulation of FOXO1 and its role in disease progression [J]. *Life Sci*, 2018, 193: 124–131.
- [7] Nagai S, Matsumoto C, Shibano M, et al. Suppression of fatty acid and triglyceride synthesis by the flavonoid orientin through decrease of C/EBPdelta expression and inhibition of PI3K/Akt-FOXO1 signaling in adipocytes [J]. *Nutrients*, 2018, 10(2): E130.
- [8] Puthanveetil P, Wang Y, Zhang D, et al. Cardiac triglyceride accumulation following acute lipid excess occurs through activation of a FoxO1-iNOS-CD36 pathway [J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 51(2): 352–363.
- [9] Lei S, Liu Y, Liu H, et al. Effects of N-acetylcysteine on nicotinamide dinucleotide phosphate oxidase activation and antioxidant status in heart, lung, liver and kidney in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Yonsei Med J*, 2012, 53(2): 294–303.
- [10] Tziomalos K, Athyros VG, Karagiannis A. Non-alcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes: pathogenesis and treatment options [J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2012, 10(2): 162–172.
- [11] Koliaki C, Roden M. Hepatic energy metabolism in human diabetes mellitus, obesity and non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2013, 379(1–2): 35–42.
- [12] Fruci B, Giuliano S, Mazza A, et al. Nonalcoholic Fatty liver: a possible new target for type 2 diabetes prevention and treatment [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(11): 22933–22966.
- [13] Su W, Zhang Y, Zhang Q, et al. N-acetylcysteine attenuates myocardial dysfunction and postischemic injury by restoring caveolin–3/eNOS signaling in diabetic rats [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2016, 15(1): 146.
- [14] Lucchesi AN, Freitas NT, Cassettari LL, et al. Diabetes mellitus triggers oxidative stress in the liver of alloxan-treated rats; a mechanism for diabetic chronic liver disease[J]. *Acta Cir Bras*, 2013, 28(7): 502–508.
- [15] Khaleel EF, Abdel-Aleem GA, Mostafa DG. Resveratrol improves high-fat diet induced fatty liver and insulin resistance by concomitantly inhibiting proteolytic cleavage of sterol regulatory element-binding proteins, free fatty acid oxidation, and intestinal triglyceride absorption [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2018, 96(2): 145–157.