

• 综 述 •

腺苷酸活化蛋白激酶激活剂的研究进展

赵力挥^{1,2}, 刘文丽¹, 王国成¹, 冯福德²

1. 江苏天士力帝益药业有限公司, 江苏 淮安 223003

2. 南京大学 化学化工学院, 江苏 南京 210046

摘 要: 腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) 在真核细胞的能量感受与调节中起关键作用, 被 AMP 等其他因素激活后具有加速分解代谢、降低合成代谢的功能, 从而稳定人体糖代谢与脂代谢。AMPK 激活剂在 2 型糖尿病等代谢异常的动物模型中体现出较好的治疗效果。对近年来 AMPK 激活剂的研究进展进行综述, 期望对该类药物的研发提供参考。

关键词: 腺苷酸活化蛋白激酶; 激活剂; 药物; 研究进展

中图分类号: R977 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2017)05-0946-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2017.05.044

Research progress on adenosine monophosphate-activated protein kinase activators

ZHAO Li-hui^{1,2}, LIU Wen-li¹, WANG Guo-cheng¹, Feng Fu-de²

1. Jiangsu Tasly Diyi Pharmaceutical Co., Ltd, Huaian 223003, China

2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Nanjing University, Nanjing 210046, China

Abstract: Adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) plays a key role in the regulation of energy and acts as an energy sensor in eukaryotic cells. It is activated by AMP or other factors, which can accelerate the catabolism and reduce the anabolism. AMPK activator has a favourable therapeutic effect on animals with metabolic disorders such as type 2 diabetes. Research progress on AMPK activators in recent years are reviewed in this paper, and in order to provide reference for the research and development of the enzyme activator drugs.

Key words: AMP-activated protein kinase; activator; drug; research progress

腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) 由 Sim 等^[1]于 1987 年发现并命名。该酶存在于大多数真核细胞, 被称为“能量感受器”, 是一种遗传保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 结构上包括 α 、 β 和 γ 3 个亚基^[2]。AMPK 在细胞水平和整体水平均具有调节代谢和平衡能量的作用^[3]。AMPK 被 AMP 激活后, 通过磷酸化下游的一系列酶类底物, 增强机体的分解代谢同时减少合成代谢^[4]。因此, AMPK 是能量代谢相关的疾病如糖尿病和肿瘤等药物研发的重要靶点^[5]。

AMPK 的相对分子质量大约为 1.45×10^5 。从结构上看, AMPK 包括一个催化亚基 α (分为 α_1 和 α_2) 和两个调节亚基 β (分为 β_1 和 β_2) 和 γ (至少 3 种

亚型 γ_1 、 γ_2 和 γ_3)^[3], 各个亚基中的结构域分布见图 1。理论上, AMPK 具有 12 种亚型结构。目前已有多个亚型的空间结构通过蛋白质晶体解析得到^[6-7]。其中, $\alpha_1\beta_1\gamma_1$ 亚型的空间结构及激活剂的结合位点见图 2。

α 亚基的结构域从 N-端开始依次为激酶域 (KD)、自抑制域 (AID)、两个 α -调节亚基相互作用模体 (α -RIM1 和 α -RIM2) 以及位于 C-端的 β -亚基结合域 (β -BD)^[8]。KD 中苏氨酸 (α_1 为 Thr172, α_2 为 Thr174) 磷酸化是保持激酶活性所必需的。AID 通过与 KD 相互作用可以保持 KD 的非活性构象, 因而抑制 α 亚基的 AID 是激活 AMPK 的一种策略。

收稿日期: 2017-02-26

作者简介: 赵力挥 (1984—), 男, 博士, 主要从事基于结构的药物发现。E-mail: zlhpmc@hotmail.com

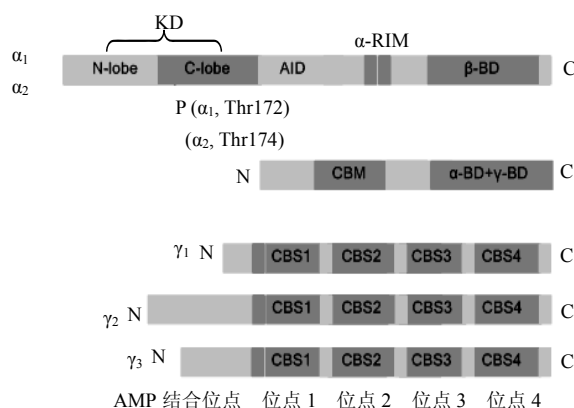


图 1 AMPK 亚型中的结构域分布
Fig. 1 Domain distribution in AMPK subunits

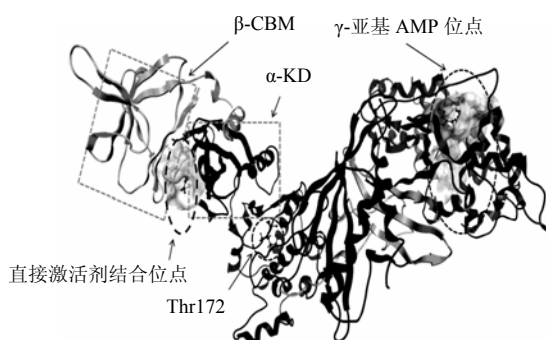


图 2 AMPK 亚型 $\alpha_1\beta_1\gamma_1$ 空间结构示意图及激活剂结合位点
Fig. 2 Structure of AMPK isoform $\alpha_1\beta_1\gamma_1$ and its activator binding sites

α -RIM 介导 AMP 结合到 γ 亚基后的构象变化，可能与激活剂对 α 亚基的选择性有关^[8-9]。

β 调节亚基 N-端有一个碳水化合物结合模块 (CBM)，体外实验显示对多糖并没有催化作用^[10]。两个磷酸化位点 Ser108 和 Thr148 位于 CBM 中，两者保持磷酸化状态对一些 AMPK 直接激活剂发挥作用至关重要^[11]。目前已知，CBM 与 α -KD 的间隙形成的结合口袋是众多化学合成的 AMPK 直接激活剂的结合位点^[12-13]，基于该位点的激活剂在体内和体外实验中都显示出 AMPK 激活活性及相应的生理功能。该结合位点的确定为基于结构的激活剂设计提供了可靠的思路。位于 β 亚基 C-端的是 α 和 γ 亚基结合域 (α -BD 和 γ -BD)，其作用是将两个亚基组装到 β 亚基之上以保持激酶整体构象。

γ 亚基中都包含 β -亚基结合域 (β -BD) 和由 4 个胱硫醚- β -合酶 (CBS) 形成的两个 Bateman 域。4 个 CBS 在空间形成 4 个腺苷酸结合位点 (位点 1~位点 4)，其中位点 2 由于空间关系并不与腺苷酸结

合，位点 4 一直牢固的结合着 AMP。因此只有位点 1 和位点 3 竞争性的结合 ATP、ADP 和 AMP，参与 AMPK 的变构调节，是 AMP 类似物类激活剂的结合位点^[14]。

参与 AMPK 激活的上游蛋白主要包括肝激酶 B1 (LKB1)^[15]、钙离子/钙调素依赖的蛋白激酶激酶 β (CaMKK β)^[16]、转化生长因子- β 激活激酶 1 (TAK1)^[17]。AMPK 被激活后，通过磷酸化下游的蛋白分子从而调节脂代谢、糖代谢、蛋白质合成和氧化还原等过程，参与机体热量限制、肥胖、运动、炎症、和衰老等生理和病理活动。AMPK 激活剂按照作用方式可分为间接激活剂和直接激活剂。

1 AMPK 间接激活剂

AMPK 间接激活剂作用位点并不在 AMPK 蛋白结构本身，但能通过各种途径最终激活 AMPK，主要分为以下几类。

1.1 提高细胞内 AMP/ATP 比值激活 AMPK

大部分 AMPK 间接激活剂被证明通过该种方式发挥作用。一些天然多酚类化合物，如白藜芦醇、姜黄素、槲皮素和表没食子儿茶素没食子酸酯，通过抑制线粒体 ATP 合酶抑制 ATP 生成^[18-19]，提高 AMP/ATP 比值从而间接激活 AMPK。一些生物碱如小檗碱^[20]、双胍类降糖药物如苯乙双胍、二甲双胍通过抑制线粒体复合物 I 抑制线粒体 ATP 的生成，体外和体内试验中均可以激活 AMPK^[21]。Poxel 公司的双胍类似物 imeglimin 作为口服治疗 2 型糖尿病的药物已经进入 II 期临床研究^[22]，该药物通过抑制线粒体 ATP 生成间接激活 AMPK，在临床实验中显示具有抑制肝糖异生，促进骨骼肌葡萄糖摄取和促进胰岛素分泌的功效，并且具有良好的安全性。胰岛素增敏剂噻唑烷二酮类药物如吡格列酮等可以激活过氧化物酶体增殖物激活受体发挥降糖作用，同时被证明也可以通过抑制线粒体复合物 I 增加细胞内 AMP/ATP 比值，间接激活 AMPK^[23]。Rigel 公司的化合物 R419 也被证明通过抑制线粒体复合物 I 间接发挥 AMPK 激活作用，在 Hep G2 和 C2C12 细胞实验中对 AMPK 的 EC₅₀ 值分别为 0.03 μ mol/L、0.23 μ mol/L；该化合物通过快速激活 AMPK，加速糖尿病小鼠肝脏、骨骼肌和脂肪中葡萄糖与脂肪酸的氧化利用，缓解小鼠糖尿病及并发症^[24]。Huang 等^[25]报道，牛蒡苷元通过抑制呼吸链复合物 I 增加 L6 细胞和离体骨骼肌中 AMPK 磷酸化水平，单剂量口服牛蒡子苷元可以降低 C57BL/6J 小鼠的糖异

生, 长期口服牛蒡子苷元对 ob/ob 小鼠具有降血糖和改善脂代谢的作用。

1.2 通过 AMPK 上游激酶介导 AMPK 激活

LKB1 与 CaMKK 是位于 AMPK 信号通路上游主要的蛋白激酶。Lee 等^[26]研究显示, 金雀异黄酮可以通过激活 LKB1-AMPK-mTOR 通路诱导血管平滑肌细胞发生自噬, 作用呈时间和剂量相关性。 α -硫辛酸是广泛存在于动植物线粒体中的一种辅酶。Shen 等^[27]研究表明, α -硫辛酸在 C2C12 细胞中通过增加胞内钙离子浓度激活上游 CaMKK β , 从而间接激活 AMPK。牛蒡子苷元也被证明通过 LKB1 与 CaMKK 磷酸化作用激活 AMPK, 可以提高小鼠的疲劳耐受性^[28]。

1.3 激活细胞内活性氧簇(ROS)间接激活 AMPK

增加细胞内 ROS, 往往会消耗 ATP, 因此可以间接激活 AMPK。Kim 等^[29]报道, 辣椒素在 C2C12 肌细胞中诱导 ROS 间接激活 AMPK 和 p38 丝裂原活化蛋白激酶, 显示出非胰岛素相关性地促进葡萄糖的摄取。Yi 等^[30]研究显示, 高浓度的川芎嗪在人胃癌细胞 SGC7901 中通过激活 ROS 从而激活 AMPK, 诱导 Bax 从细胞质向线粒体的转位, 进而引发线粒体途径的细胞凋亡。

1.4 提高 AMPK 磷酸化状态/抑制去磷酸化

α 亚基中的苏氨酸磷酸化是 AMPK 激活所必需的, 保持磷酸化状态和抑制磷酸酶的去磷酸化作用有助于提高 AMPK 活性。脂联素和瘦素是由脂肪细胞分泌的细胞因子, 两者均能在体内增加 AMPK 磷酸化从而激活 AMPK。脂联素通过激动脂联素受体而激活 AMPK, 在骨骼肌、肝脏和下丘脑中发挥不同的生理功能^[31-32]。瘦素可以选择性提高骨骼肌中含有 α_2 亚基的 AMPK 磷酸化水平, 从而调节脂肪的酸代谢^[33]。Choi 等^[34]报道, 胡椒碱可以激活高脂饲养小鼠肝脏中的脂联素-AMPK 通路, 从而加速脂肪酸氧化并改善胰岛素抵抗。

1.5 增加内源性 AMP 类似物浓度

AMP 类似物可以结合到 γ 亚基的腺苷酸结合位点变构激活 AMPK。研究表明, 甲氨蝶呤可以抑制嘌呤从头合成过程中 ZMP 转化为次黄嘌呤的关键酶 - 氨基咪唑甲酰胺核苷酸转甲酰胺酶 (AICART), 从而使 ZMP 产生蓄积, 模拟 AMP 间接激活 AMPK, 实验表明甲氨蝶呤具有增加骨骼肌细胞葡萄糖摄取和加速脂肪酸的氧化利用的作用^[35-36]。化合物 Cpd 14 通过抑制 AICART 同源二聚化从而间接激活

AMPK, 该化合物在小鼠的代谢紊乱模型中显示出一定的治疗价值^[37]。

2 AMPK 直接激活剂

AMPK 直接激活剂直接作用于各亚基之上, 激活 AMPK。按照激活剂在亚基上的结合位点, 主要分为以下几类。

2.1 作用于 γ 亚基的 AMPK 直接激活剂

该类直接激活剂可作用于 AMPK γ 亚基中的腺苷酸结合位点, 变构激活 AMPK。5-氨基-4-甲酰胺咪唑核糖是嘌呤从头合成的中间体, 在腺苷激酶的作用下磷酸化成为 ZMP, 模拟 AMP 结合到 γ 亚基的 AMP 位点 1 和 3, 变构激活 AMPK, 整个过程 AMP/ATP 比值并没有变化。研究显示, 虽然 ZMP 比 AMP 活性更弱, 但是由于 ZMP 在细胞内代谢缓慢, 具有一定蓄积性, 甚至达到毫摩尔浓度, 因此 5-氨基-4-甲酰胺咪唑核糖是一种 AMPK 直接激活剂^[38-39]。

通过对大约 1 200 个 AMP 类似物筛选得到了 AMPK 直接激活剂 C2 和其前药 C13, C2 模拟 AMP 结合到 γ 亚基上, 激活 AMPK, 活性比 AMP 高 2~3 个数量级; C2 对含有 α_1 亚基的 AMPK 亚型具有一定选择性, 该选择性与 α -RIM2 结构有关^[40-41]。这个发现为寻找亚型选择性的 AMPK 激活剂提供了思路。

朱海波等^[42]将虫草素进行结构优化, 得到在体内具有 AMPK 激活活性的虫草素衍生物 IMM-H007, 体内研究结果表明 IMM-H007 通过代谢转化为磷酸化物 M1, 与 AMPK γ 亚基的腺苷酸结合位点直接结合, 变构激活 AMPK, 激活作用与其上游调控元件 LKB1、CaMKK 及细胞 AMP/ATP 比值无关; 同时发现 IMM-H007 抑制磷酸酶对 α 亚基 Thr172 的去磷酸化, 从而以另一种途径增强 AMPK 活性。

2.2 作用于 α -KD 与 β -CBM 之间的 AMPK 直接激活剂

该类直接激活剂作用于 α -KD 与 β -CBM 形成的间隙, AMPK 与激活剂的共结晶结构可以看出, α 亚基的 Lys29、Lys31、Arg83, β 亚基的 Asp88 氨基酸残基与激活剂之间形成氢键或 π -阳离子相互作用^[43]。这一结论为基于结构的 AMPK 激活剂的发现提供了可靠的依据。该类 AMPK 直接激活剂从化学结构上主要分为以下几类。

2.2.1 噻吩并吡啶类直接激活剂 2006 年雅培公

司的 Cool 等^[44]通过对 700 000 个化合物的高通量筛选,发现了对 AMPK 具有一定激活活性的苗头化合物 A-592107(大鼠肝脏 AMPK EC_{50} 值为 38 $\mu\text{mol/L}$, AMP EC_{50} 值为 56 $\mu\text{mol/L}$),通过后期的优化得到了含有噻吩并吡啶母核的先导化合物 A-769662(重组人 AMPK $\alpha_1\beta_1\gamma_1$ EC_{50} 值为 0.8 $\mu\text{mol/L}$),并证实 A-769662 是一种可逆性的激活剂,对来源于心脏、骨骼肌和人胚肾细胞的 AMPK EC_{50} 值分别为 2.2、1.9、1.1 $\mu\text{mol/L}$ 。每日两次 30 mg/kg 剂量的 A-769662,可以使 ob/ob 小鼠血糖降低 40%,并显著降低血液和肝脏中的三酰甘油水平^[44]。后续的研究表明, A-769662 通过变构激活和阻止 Thr172 的去磷酸化过程激活 AMPK,并且只对含有 β_1 亚单位的 AMPK 亚型具有激活作用^[45]。

然而,后期的研究发现 A-769662 同时具有某些 AMPK 非依赖性的活性。2008 年,Moreno 等^[46]报道, A-769662 通过抑制 26S 蛋白酶体活性导致细胞周期阻滞,对 MEF 小鼠胚胎成纤维细胞具有细胞毒性;2009 年, Benziane 等^[47]报道, A-769662 可以直接抑制骨骼肌 L6 细胞中钠钾 ATP 酶活性,减少钠泵在细胞表面的数量。这些“脱靶效应”表明 A-769662 并不是一个“单纯的” AMPK 激活剂,阻碍了它后期作为候选化合物的开发。2012 年 Poxel 公司报道了另一类噻吩并吡啶酮类化合物,与 AMP 相比,在蛋白水平活性测试中显现出较好的 AMPK 激活活性^[48]。

2.2.2 苯并咪唑/吡啶并咪唑类直接激活剂 2010 年,默沙东公司通过高通量筛选发现了苯并咪唑母核的 AMPK 变构激活剂,对 $\alpha_1\beta_1\gamma_1$ 亚型活性十分优异,对含有 β_2 的亚型也具有一定活性,代表化合物 991 对 $\alpha_1\beta_1\gamma_1$ 亚型的 EC_{50} 值为 3.0 nmol/L^[43]。2013 年 Shionogi 公司利用电子等排原理设计并合成了大量苯并咪唑($\alpha_1\beta_1\gamma_1$ EC_{150} 值为 3.5 nmol/L, $\alpha_2\beta_2\gamma_1$ EC_{150} 值为 54 nmol/L)和吡啶并咪唑类化合物($\alpha_1\beta_1\gamma_1$ EC_{150} 值为 0.42 nmol/L, $\alpha_2\beta_2\gamma_1$ EC_{150} 值为 4.3 nmol/L),对 β_1 和 β_2 亚型的 AMPK 均具有一定活性^[49];2012 年,默沙东公司对吡啶并咪唑类化合物在相应亲水结合部位引入天然产物结构,使得化合物的活性进一步提高,蛋白水平 EC_{50} ($\alpha_1\beta_1\gamma_1$) 达到 0.3 nmol/L^[50]。

2.2.3 吡咯并吡啶酮/吡咯并嘧啶酮类直接激活剂 2011 年以来,葛兰素史克公司发现了吡咯并吡啶酮/吡咯并嘧啶酮类化合物,该类化合物对含有 β_1 亚型具有良好活性,给予 C57Bl6/J 小鼠腹腔注射 3~30

mg/kg 剂量的这些化合物,可以快速激活肝脏内的 AMPK^[51]。

2.2.4 吡啶酸/吡啶酮类直接激活剂 最近辉瑞公司借助计算机辅助的方法设计并合成了一系列吡啶酸类化合物^[52],从结构上来看,这些吡啶酸类化合物简化了结构,但是保留了与 A-769662 结合位点相同的作用模式,酶活性测试显示对 $\alpha_1\beta_1\gamma_1$ 亚型的 EC_{50} 值在 nmol/L 水平,这些化合物已经在动物实验中显现出较好的活性。其中化合物 PF-06409577 (EC_{50} 值为 7 nmol/L)进入临床研究,但可能由于耐受性或药动学性质不佳,于 2015 年 6 月终止了临床研究^[53]。2011 年以来^[54-55],罗氏公司报道了多个吡啶酮类 AMPK 激活剂,采用临近闪烁分析技术测试得化合物 EC_{50} 值在 $\mu\text{mol/L}$ 水平,适应症为肥胖、高脂血症以及糖尿病。

2.2.5 四氢喹啉类直接激活剂 2013 年,罗氏公司报道了四氢喹啉类 AMPK 激活剂,与化合物 PF-06409577 具有类似的药效团,体外活性试验中对 AMPK 蛋白的 EC_{50} 为 1.24 $\mu\text{mol/L}$ ^[56]。

2.3 作用于 α 亚基的 AMPK 直接激活剂

该类化合物报道较少。Zhang 等^[57]发现,化合物 ZLN024 可以诱导 AMPK α_1 亚基的构象变化从而解除 AID 结构域对 KD 的抑制,并且具有抑制磷酸酶 PP2Ca 的活性,两者的共同作用导致 AMPK 被激活,同时发现 ADP/ATP 并未增加。在原代肝细胞中该化合物具有降低脂酸合成和减少葡萄糖输出的作用;每天给予 db/db 小鼠 15 mg/kg 该化合物,可以改善动物的糖耐量,降低三酰甘油和总胆固醇,在治疗 2 型糖尿病方面具有潜在价值。Pang 等^[58]和 Li 等^[59]研究表明化合物 PT1 通过干扰 α -AID 而激活 AMPK,并不影响 AMP/ATP 比值,对 AMPK 亚型 $\alpha_1\beta_1\gamma_1$ 的 EC_{50} 为 8 $\mu\text{mol/L}$,为改善生物利用度进而优化得到化合物 C24,活性有所提升 (EC_{50} 值为 2.1 $\mu\text{mol/L}$);Jensen 等^[60]研究表明,化合物 PT1 在小鼠骨骼肌细胞可以激活含有 γ_1 亚基的 AMPK,而在人胚肾细胞 HEK-293 中可以通过抑制线粒体氧化呼吸链间接激活 AMPK。该化合物的作用机制值得深入研究。

2.4 结合位点未知的 AMPK 激活剂

一些已报到的 AMPK 激活剂与酶的结合位点并不清楚。其中有一些已经进入不同的药物开发阶段^[53]。有处于临床前研究阶段的来源于天然产物的 BK-302,以及用于治疗 2 型糖尿病的 AMPK 激活

剂 TMPA。Terra Biological 公司的草酰乙酸作为 AMPK 激活剂治疗帕金森症进入 III 期临床研究阶段; Esperion Therapeutics 公司的用于治疗高脂血症的 AMPK 激活剂/ATP 柠檬酸裂解酶抑制 ETC-1002 进入 III 期临床研究; KT&G Life Sciences 公司的来源于丹参中的二萜化合物隐丹参酮在不依赖 ATP 消耗的情况下激活 AMPK^[61], 发挥减肥和抗糖尿病的作用, 目前处在 II 二期临床研究。来自于风车子属非洲灌木矮柳树树皮中的 Combretastatin A4 衍生物康布瑞汀磷酸二钠处于 II 期临床研究, 适应症为眼病。这些药物的作用方式有待进一步研究确证。

3 结语

AMPK 直接激活剂与间接激活剂相比, 具有优势。(1) 直接激活剂具有一定的亚型选择性。现阶段直接激活剂对亚型的选择性不强, 但最新出现的直接激活剂对含有 β_1 和 β_2 亚基的亚型显现出一定的选择性, 为今后亚型与功能之间相互关联研究翻开了新的一页。(2) 直接激活剂不依赖于 AMPK 信号通路上游蛋白的存在, 与间接激活剂相比, 具有直接、强效的特点。(3) 直接激活剂不干扰 ATP 的生理功能, 不影响人体正常的能量供给, 可预期的副作用较少。因此, 直接激活剂可能是今后 AMPK 激活剂药物研发的主要方向。

AMPK 亚型分布具有组织和器官特异性, 不同结构的激活剂由于药动学性质不同亦存在组织与器官分布的特异性, 因而不同类型的 AMPK 激活剂可能体现出不同的药理活性。因此, 开发具有特定适应症的激活剂药物需要研究激活剂结构及其 AMPK 亚型选择性。

AMPK 与诸多生理功能相互关联, 但随着对 AMPK 蛋白结构尤其是亚型与功能研究逐渐深入, AMPK 激活剂的研究开发也成为药物研究的热点之一。可以看出, 天然产物结构修饰和基于结构的药物发现是 AMPK 激活剂类药物研发的主要方法。本文综述了近年来 AMPK 激活剂的研究开发状况, 以期后续 AMPK 激活剂类药物的开发提供有益参考。

参考文献

[1] Sim A T, Hardie D G. The low activity of acetyl-CoA carboxylase in basal and glucagon-stimulated hepatocytes is due to phosphorylation by the AMP-activated protein kinase and not cyclic AMP-dependent protein kinase [J].

FEBS Lett, 1988, 233(2): 294-298.

- [2] Carling D. The AMP-activated protein kinase cascade-a unifying system for energy control [J]. *Trends Biochem Sci*, 2004, 29(1): 18-24.
- [3] Hardie D G. AMP-activated protein kinase: maintaining energy homeostasis at the cellular and whole-body levels [J]. *Annu Rev Nutr*, 2014, 34: 31-55.
- [4] Hardie D G, Ross F A, Hawley S A. AMP-activated protein kinase: a target for drugs both ancient and modern [J]. *Chem Biol*, 2012, 19(10): 1222-1236.
- [5] Hardie D G. AMPK: a target for drugs and natural products with effects on both diabetes and cancer [J]. *Diabetes*, 2013, 62(7): 2164-2172.
- [6] Miglianico M, Nicolaes G A, Neumann D. Pharmacological targeting of AMP-activated protein kinase and opportunities for computer-aided drug design [J]. *J Med Chem*, 2016, 59(7): 2879-2893.
- [7] Langendorf C G, Ngoei K R, Scott J W, et al. Structural basis of allosteric and synergistic activation of AMPK by furan-2-phosphonic derivative C2 binding [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 10912.
- [8] Chen L, Xin F J, Wang J, et al. Conserved regulatory elements in AMPK [J]. *Nature*, 2013, 498(7453): E8-E10.
- [9] Grahame Hardie D. Regulation of AMP-activated protein kinase by natural and synthetic activators [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2016, 6(1): 1-19.
- [10] Hudson E R, Pan D A, James J, et al. A novel domain in AMP-activated protein kinase causes glycogen storage bodies similar to those seen in hereditary cardiac arrhythmias [J]. *Curr Biol*, 2003, 13(10): 861-866.
- [11] Scott J W, Ling N, Issa S M, et al. Small molecule drug A-769662 and amp synergistically activate naive ampk independent of upstream kinase signaling [J]. *Chem Biol*, 2014, 21(5): 619-627.
- [12] Xiao B, Heath R, Saiu P, et al. Structural basis for AMP binding to mammalian AMP-activated protein kinase [J]. *Nature*, 2007, 449(7161): 496-500.
- [13] Calabrese M F, Rajamohan F, Harris M S, et al. Structural basis for AMPK activation: natural and synthetic ligands regulate kinase activity from opposite poles by different

- molecular mechanisms [J]. *Structure*, 2014, 22(8): 1161-1172.
- [14] Kemp B E, Oakhill J S, Scott J W. AMPK structure and regulation from three angles [J]. *Structure*, 2007, 15(10): 1161-1163.
- [15] Woods A, Johnstone S R, Dickerson K, *et al.* LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade [J]. *Curr Biol*, 2003, 13(22): 2004-2008.
- [16] Hawley S A, Pan D A, Mustard K J, *et al.* Calmodulin-dependent protein kinase kinase- β is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase [J]. *Cell Metab*, 2005, 2(1): 9-19.
- [17] Momcilovic M, Hong S P, Carlson M. Mammalian TAK1 activates Snf1 protein kinase in yeast and phosphorylates AMP-activated protein kinase *in vitro* [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(35): 25336-25343.
- [18] Gledhill J R, Montgomery M G, Leslie A G W, *et al.* Mechanism of inhibition of bovine F1-ATPase by resveratrol and related polyphenols [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(34): 13632-13637.
- [19] Zheng J, Ramirez V D. Inhibition of mitochondrial proton F0F1-ATPase/ATP synthase by polyphenolic phytochemicals [J]. *Br J Pharmacol*, 2000, 130(5): 1115-1123.
- [20] Turner N, Li J Y, Gosby A, *et al.* Berberine and its more biologically available derivative, dihydroberberine, inhibit mitochondrial respiratory complex I: a mechanism for the action of berberine to activate AMP-activated protein kinase and improve insulin action [J]. *Diabetes*, 2008, 57(5): 1414-1418.
- [21] Owen M R, Doran E, Halestrap A P. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain [J]. *Biochem J*, 2000, 348(Pt 3): 607-614.
- [22] Pirags V, Lebovitz H, Fouqueray P. Imeglimin, a novel glimin oral antidiabetic, exhibits a good efficacy and safety profile in type 2 diabetic patients [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2012, 14(9): 852-858.
- [23] Brunmair B, Staniek K, Gras F, *et al.* Thiazolidinediones, like metformin, inhibit respiratory complex I: a common mechanism contributing to their antidiabetic actions? [J]. *Diabetes*, 2004, 53(4): 1052-1059.
- [24] Jenkins Y, Sun T Q, Markovtsov V, *et al.* AMPK activation through mitochondrial regulation results in increased substrate oxidation and improved metabolic parameters in models of diabetes [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e81870.
- [25] Huang S L, Yu R T, Gong J, *et al.* Arctigenin, a natural compound, activates AMP-activated protein kinase via inhibition of mitochondria complex I and ameliorates metabolic disorders in ob/ob mice [J]. *Diabetologia*, 2012, 55(5): 1469-1481.
- [26] Lee K Y, Kim J R, Choi H C. Genistein-induced LKB1-AMPK activation inhibits senescence of VSMC through autophagy induction [J]. *Vascul Pharmacol*, 2016, 81: 75-82.
- [27] Shen Q W, Zhu M J, Tong J, *et al.* Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase is involved in AMP-activated protein kinase activation by alpha-lipoic acid in C2C12 myotubes [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007, 293(4): 1395-1403.
- [28] Tang X, Zhuang J, Chen J, *et al.* Arctigenin efficiently enhanced sedentary mice treadmill endurance [J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e24224.
- [29] Kim S H, Hwang J T, Park H S, *et al.* Capsaicin stimulates glucose uptake in C2C12 muscle cells via the reactive oxygen species (ROS)/AMPK/p38 MAPK pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 439(1): 66-70.
- [30] Yi B, Liu D, He M, *et al.* Role of the ROS/AMPK signaling pathway in tetramethylpyrazine-induced apoptosis in gastric cancer cells [J]. *Oncol Lett*, 2013, 6(2): 583-589.
- [31] Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, *et al.* Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase [J]. *Nat Med*, 2002, 8(11): 1288-1295.
- [32] Kubota N, Yano W, Kubota T, *et al.* Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake [J]. *Cell Metab*, 2007, 6(1): 55-68.
- [33] Minokoshi Y, Kim Y B, Peroni O D, *et al.* Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase [J]. *Nature*, 2002, 415(6869): 796-801.

- 339-343.
- [34] Choi S, Choi Y, Choi Y, *et al.* Piperine reverses high fat diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance in mice [J]. *Food Chem*, 2013, 141(4): 3627-3635.
- [35] Rothbart S B, Racanelli A C, Moran R G. Pemetrexed indirectly activates the metabolic kinase AMPK in human carcinomas [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(24): 10299-10309.
- [36] Pirkmajer S, Kulkarni S S, Tom R Z, *et al.* Methotrexate promotes glucose uptake and lipid oxidation in skeletal muscle via AMPK activation [J]. *Diabetes*, 2015, 64(2): 360-369.
- [37] Asby D J, Cuda F, Beyaert M, *et al.* AMPK activation via modulation of de novo purine biosynthesis with an inhibitor of ATIC homodimerization [J]. *Chem Biol*, 2015, 22(7): 838-848.
- [38] Suter M, Riek U, Tuerk R, *et al.* Dissecting the role of 5'-AMP for allosteric stimulation, activation, and deactivation of amp-activated protein kinase [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(43): 32207-32216.
- [39] Day P, Sharff A, Parra L, *et al.* Structure of a CBS-domain pair from the regulatory gamma1 subunit of human AMPK in complex with AMP and ZMP [J]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2007, 63(Pt 5): 587-596.
- [40] Hunter R W, Foretz M, Bultot L, *et al.* Mechanism of action of compound-13: an alpha1-selective small molecule activator of AMPK [J]. *Chem Biol*, 2014, 21(7): 866-879.
- [41] Gómez-Galeno J E, Dang Q, Nguyen T H, *et al.* A potent and selective AMPK activator that inhibits de novo lipogenesis [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2010, 1(9): 478-482.
- [42] 朱海波. 调血脂创新药物 IMM-H007 临床前开发研究 [C]. 天津: 中国药学会中药与天然药物专业委员会, 2015.
- [43] Xiao B, Sanders M J, Carmena D, *et al.* Structural basis of AMPK regulation by small molecule activators [J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 3017.
- [44] Cool B, Zinker B, Chiou W, *et al.* Identification and characterization of a small molecule AMPK activator that treats key components of type 2 diabetes and the metabolic syndrome [J]. *Cell Metab*, 2006, 3(6): 403-416.
- [45] Sanders M J, Ali Z S, Hegarty B D, *et al.* Defining the mechanism of activation of amp-activated protein kinase by the small molecule A-769662, a member of the thienopyridone family [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(45): 32539-32548.
- [46] Moreno D, Knecht E, Viollet B, *et al.* A769662, a novel activator of AMP-activated protein kinase, inhibits non-proteolytic components of the 26S proteasome by an AMPK-independent mechanism [J]. *FEBS Lett*, 2008, 582(17): 2650-2654.
- [47] Benziane B, Björholm M, Lantier L, *et al.* AMP-activated protein kinase activator A-769662 is an inhibitor of the Na⁺-K⁺-ATPase [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009, 297(6): C1554-C1566.
- [48] Cravo D, Hallakou-Bozec S, Bolze S, *et al.* Thieno [2,3-B] pyridinedione activators of AMPK and therapeutic uses thereof [P]. US: 9365584. 2016-06-14.
- [49] Tonogaki K, Ino A, Kojima E, *et al.* Hetero ring-fused imidazole derivative having AMPK activating effect [P]. WO: 2012033149, 2012-03-15.
- [50] Anand R, Apgar J M, Biftu T, *et al.* Novel cyclic azabenzimidazole derivatives useful as anti-diabetic agents [P]. US: 20120749051, 2014-01-01.
- [51] Mirguet O, Sautet S, Clément C A, *et al.* Discovery of pyridones as oral AMPK direct activators [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2013, 4(7): 632-636.
- [52] Cameron K O, Kung D W, Kalgutkar A S, *et al.* Discovery and Preclinical characterization of 6-chloro-5-[4-(1-hydroxycyclobutyl)phenyl]-1h-indole-3-carboxylic acid (PF-06409577), a direct activator of adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK), for the potential treatment of diabetic nephropathy [J]. *J Med Chem*, 2016, 59(17): 8068-8081.
- [53] Thomson reuters Cortellis. [DB/OL]. (2016-07-10) [2017-02-20]. <https://cortellis.thomsonreuterslifesciences.com/>.
- [54] Hoffmann L F, Roche A G. Novel alkene oxindole derivatives [P]. WO: 2011032320, 2011-03-24.
- [55] Hoffmann L F, Roche A G. Spiro indole-cyclopropane indolinones useful as ampk modulators [P]. WO: 2011070039,

- 2011-06-16.
- [56] Feng L, Huang M, Liu Y, *et al.* Tetrahydroquinoline derivatives used as AMPK activators [P]. EP: 2630124, 2014-11-09.
- [57] Zhang L N, Xu L, Zhou H Y, *et al.* Novel small-molecule AMP-activated protein kinase allosteric activator with beneficial effects in db/db mice [J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e72092.
- [58] Pang T, Zhang Z S, Gu M, *et al.* Small molecule antagonizes autoinhibition and activates AMP-activated protein kinase in cells [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(23): 16051-16060.
- [59] Li Y Y, Yu L F, Zhang L N, *et al.* Novel small-molecule AMPK activator orally exerts beneficial effects on diabetic db/db mice [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013, 273(2): 325-334.
- [60] Jensen T E, Ross F A, Kleinert M, *et al.* PT-1 selectively activates AMPK- γ_1 complexes in mouse skeletal muscle, but activates all three γ subunit complexes in cultured human cells by inhibiting the respiratory chain [J]. *Biochem J*, 2015, 467(3): 461-472.
- [61] Kim E J, Jung S N, Son K H, *et al.* Antidiabetes and antiobesity effect of cryptotanshinone via activation of AMP-activated protein kinase [J]. *Mol Pharmacol*, 2007, 72(1): 62-72.