

奥氮平诱导C57BL/6J雄性小鼠能量失衡和糖代谢紊乱的机制

徐劲节 彭延敏 崔东红

【摘要】 目的 观察奥氮平对雄性小鼠能量消耗和糖代谢的影响及可能机制。方法 将10只C57BL/6J雄性小鼠随机分为两组,分别奥氮平及其溶剂灌胃2周,观察小鼠摄食、体质量、空腹血糖、糖耐量和胰岛素耐量的变化,监测24 h能量代谢,并比较肝脏糖代谢相关基因的表达。结果 小鼠奥氮平给药后出现胰岛素抵抗和高血糖;白天能量消耗明显下降,呼吸商趋势性下降,氧化底物由葡萄糖向脂肪转移;肝内糖异生关键酶磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(PEPCK)和葡萄糖-6-磷酸酶(G-6-pase)的基因表达明显升高。结论 奥氮平诱导的高血糖可不依赖于摄食和体质量增加;奥氮平可直接诱导胰岛素抵抗并促进肝糖异生。

【关键词】 奥氮平; 雄性; 能量消耗; 糖代谢

doi: 10.3969/j.issn.1009-6574.2017.03.002

Mechanism of olanzapine-induced energy imbalance and glucose metabolism disorder in C57BL/6J male mice XU Jin-jie, PENG Yan-min, CUI Dong-hong. Shanghai Mental Health Center, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 201100, China

【Abstract】 Objective To study the effects and mechanism of olanzapine on energy consumption and glucose metabolism in male mice. **Methods** Ten C57BL/6J male mice were randomly divided into two groups. The mice in two groups were given olanzapine or its solvent by gavage separately for 2 weeks. Food intake, body weight, fasting blood glucose, glucose tolerance and insulin tolerance were recorded. Energy consumption of 24 h was monitored. And expressions of hepatic glucose metabolism related genes were compared. **Results** After administration of olanzapine for two weeks, insulin resistance and hyperglycemia were observed, oxygen and energy consumptions were significantly decreased during the daytime, and respiratory exchange ratio showed a downward trend which indicated that the oxidized substrates were transferred from glucose to fat. And mRNA levels of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) and glucose-6-phosphatase (G-6-pase) were significantly increased. **Conclusions** Olanzapine-induced hyperglycemia may not dependent on hyperphagia and weight gain. Olanzapine can directly induce insulin resistance and promote hepatic gluconeogenesis.

【Key words】 Olanzapine; Male; Energy consumption; Glucose metabolism

抗精神病药物是治疗精神分裂症及其他精神病性障碍的最主要手段。以奥氮平为代表的第二代抗精神病药具有疗效显著和锥体外系不良反应少的优点,但奥氮平能够引起不同程度的代谢紊乱,包括体质量增加、胰岛素抵抗、高血糖和高血脂等^[1-2]。有关奥氮平诱导代谢紊乱的机制研究较多,但大多数

动物实验围绕其对雌性大鼠/小鼠中枢神经系统的调节作用,并由此解释摄食和体质量增加^[3-6]。然而,奥氮平诱导摄食和体质量增加是否存在性别差异,糖脂代谢紊乱是否依赖于体质量增加,这些问题尚无定论。Albaugh等^[7]发现喂食奥氮平2周后雌性大鼠体质量明显增加,但这一变化并未出现在雄性大鼠上。Choi等^[8]也发现类似现象。提示女性可能对奥氮平诱导的体重增加更易感。Teff等^[9]发现健康受试者服用奥氮平9 d后,餐后胰岛素、胰高血糖素样肽-1和胰高血糖素水平均明显升高,并发生胰岛素抵抗,但进食和体质量均未增加。提示奥氮平可能直接影响胰岛素信号传导和相关激素的合成

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81671336, 81271481); 上海市重性精神病重点实验室(13dz2260500); 上海市科技创新计划(11140900400); 上海市青年科技英才扬帆计划(14YF14131500)

作者单位: 201100 上海交通大学医学院附属精神卫生中心(徐劲节、彭延敏、崔东红); 上海市重性精神病重点实验室(彭延敏、崔东红); 上海交通大学脑科学与技术研究中心(崔东红)

通讯作者: 崔东红 Email: manyucc@126.com

与分泌。因此,本研究将以能量和糖代谢为切入点,重点探讨奥氮平对雄性小鼠外周代谢的影响及可能机制。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物 10只雄性C57BL/6JSPF级小鼠由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,平均周龄8周,平均体质量(21.5±1.35)g,饲养于恒温恒湿的独立通气系统中,光照循环周期12 h光照/12 h黑暗(光照7:00~19:00),室温(24±1)℃,湿度45%~55%,自由饮食和饮水。

1.1.2 药品和仪器 奥氮平(美国Santa Cruz公司),RNA提取试剂盒(Qiagen公司),反转录酶试剂盒(Takara公司),SYBR Green Master(Roche公司),引物(上海生工公司),血糖仪(Roche公司),血糖试纸(拜耳公司),Oxymax/CLAMS动物代谢系统(Columbus公司),Nano drop 2000分光光度仪(Thermo公司),LightCycler 480实时荧光定量PCR仪(Roche公司)。

1.2 方 法

1.2.1 动物分组及处理 动物适应1周后,采用随机数字表法将小鼠分为奥氮平组和对照组,每组5只。将奥氮平溶于0.1 mol/L盐酸中,再用0.01 mol/L氢氧化钠调节pH值到5.5。奥氮平组灌胃奥氮平6 mg/(kg·d),对照组灌胃奥氮平溶剂,每天1次,持续两周。每天称量小鼠体质量和摄食量,于基线和每周末测量空腹血糖(Fasting Blood Glucose, FBG),于第2周末进行能量代谢监测、腹腔注射葡萄糖耐量试验(IPGTT)和胰岛素耐量试验(IPITT)。

1.2.2 FBG测定 小鼠禁食6 h,不禁水,采用血糖仪和血糖试纸检测其血糖值。

1.2.3 能量代谢监测 利用Oxymax/CLAMS动物代谢系统监测小鼠24 h内的氧气消耗量(VO_2)和二氧化碳生成量(VCO_2),间接评价小鼠的呼吸商(Respiratory Exchange Ratio, RER)和能量消耗(Energy Expenditure, EE)。打开仪器,预热10 min后打开操作程序和混合气瓶,按操作程序对机器进行定标和校验。将每只动物单独放入代谢笼扩张单元盒中,确定动物盒盖密闭好。中途密切观察小鼠状态和数据稳定性。适应24 h后监测24 h,其中光照循环周期与饲养环境保持一致。

1.2.4 IPGTT 小鼠禁食6 h,不禁水,按2 g/kg体质量腹腔注射20%的葡萄糖。分别于空腹和糖负荷后15, 30, 60, 90和120 min时间点测定血糖数值。

1.2.5 IPITT 小鼠禁食4.5 h,不禁水,按0.75 U/kg体质量腹腔注射胰岛素。分别于空腹和注射胰岛素后15, 30和60 min时间点测定血糖数值。

1.2.6 实时荧光定量PCR 肝脏是体内糖代谢的核心场所,也是胰岛素外周作用的重要靶器官。本研究通过检测肝糖转运体和糖异生关键酶的mRNA水平来研究奥氮平对肝糖代谢的影响,包括葡萄糖转运体2(Glucose Transporter 2, GLUT2)、磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(Phosphoenolpyruvate Carboxykinase, PEPCK)和葡萄糖-6-磷酸酶(Glucose-6-phosphatase, G-6-pase)。第2周末,用异氟烷吸入性麻醉小鼠,然后迅速开腹取出肝脏,液氮速冻后-80℃冰箱长期保存,最后用颈椎脱臼法处死小鼠。先采用Mini RNeasy Kit Qiagen抽提肝脏组织总RNA,再根据Takara反转录试剂盒的操作步骤合成cDNA,最后采用实时荧光法检测目的基因的mRNA水平。反应体系20 μ l: cDNA作为模板10 μ l, 2×SYBR Green Master 10 μ l, 上下游引物各0.5 μ l(10 μ mol/L), dH₂O 6 μ l。反应条件为:95℃变性10 s, 60℃退火20 s, 72℃延伸20 s, 40~45个循环。目的基因mRNA水平采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。引物序列见表1。

表1 实时荧光定量PCR引物序列(小鼠)

基因	引物序列(5' -3')
PEPCK-F	GAGAAAGCATTCAACGCCAGG
PEPCK-R	CACAGATATGCCCATCCGAGTC
G-6-pase-F	AGCTCCGTGCCTATAATAAAGCAG
G-6-pase-R	CATACGTTGGCTTTTTCTTTCCTC
GLUT2-F	GCCTGTGTATGCAACCAATTC
GLUT2-R	GAAGATGGCAGCTCATGCTCA
β -Actin-F	CCTTCTACAATGAGCTGCGTGC
β -Actin-R	ACAGCCTGGATAGCAACGTC

1.3 统计学方法 采用GraphPad Prism 6软件进行统计分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用独立样本t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组小鼠摄食量和体质量的比较 见图1。结果显示,给药2周内,各时间点两组小鼠的摄食量和体质量差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 两组小鼠FBG、IPGTT和ITT的比较 见图2。结果显示,实验前两组小鼠的FBG差异无统计学意义($P > 0.05$),给药后奥氮平组FBG随时间推移逐渐升高,在第2周末明显升高($P < 0.05$)。IPGTT中奥氮平组0, 30, 60, 90, 120 min时间点的血糖值均明显升高($P < 0.05$),曲线下面积也明显升高[(1 234.7±68.5)比(1 643.0±96.2), $P < 0.05$]。IPITT中,对照组血糖在胰岛素负荷30 min时降到最低值,之后逐渐上升;但奥氮平组30 min时仅降低30.49%,且曲线下面积明显升高[(189.6±3.4)比

(422.4±20.1), $P < 0.05$]

2.3 两组小鼠能量代谢的比较 见表1。结果显示, 给药2周后, 奥氮平组白天VO₂和EE明显下降($P < 0.05$)。

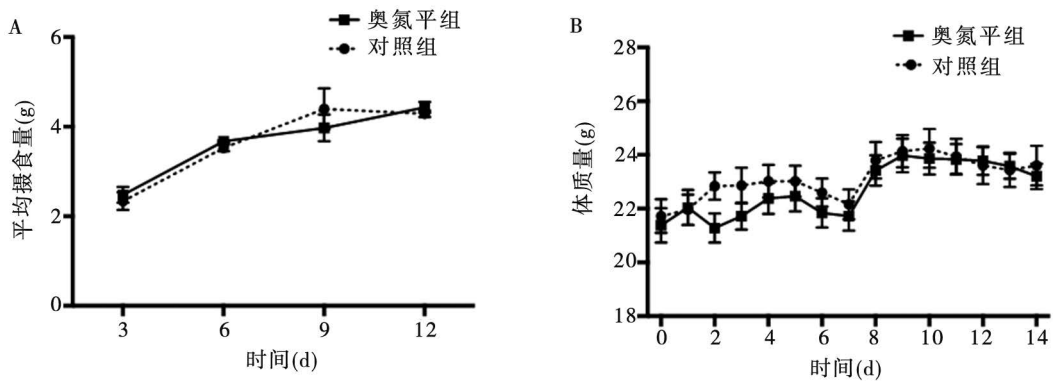
2.4 两组小鼠基因的mRNA表达比较 见图3。结果显示, 奥氮平组较对照组肝内PEPCK和G-6-pase的mRNA表达明显升高($P < 0.05$), GLUT2表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论

奥氮平作为目前临床广泛使用的抗精神病药物, 其突出的代谢不良反应一直备受关注。本研究重点探讨奥氮平对雄性小鼠外周能量代谢和糖代谢的影响。实验结果表明小鼠奥氮平给药后出现胰岛素抵抗和高血糖; 白天能量消耗明显下降, 呼吸商趋势性下降, 氧化底物由葡萄糖向脂肪转移, 糖利用减

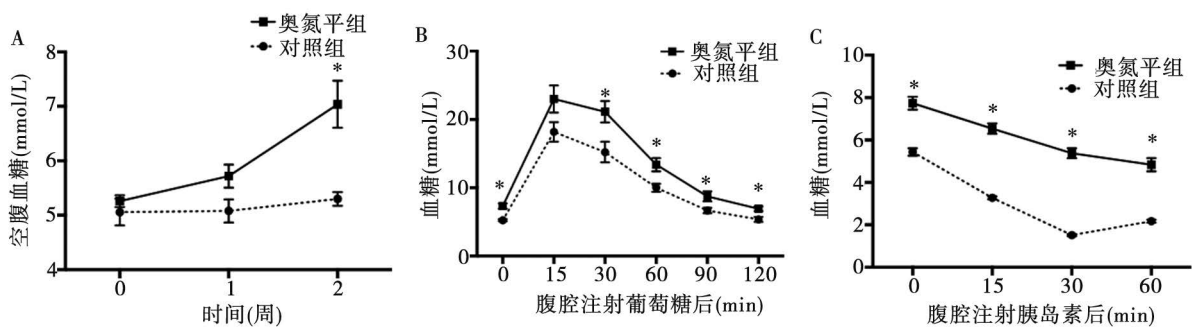
少; 肝内糖异生关键酶PEPCK和G-6-pase的基因表达失去正常调控而持续性表达增高, 酶活性增强, 肝糖原大量分解输出增加。

正常情况下体内氧气充足, 葡萄糖可完全氧化成CO₂和H₂O, 同时释放能量。当机体以糖代谢为主要供能物质时, RER接近1; 脂肪时, RER接近0.70; 混合食物时, RER在0.85左右^[10-11]。据此, 本研究中对对照组小鼠始终以混合代谢为主, 奥氮平组白天能量消耗减少, 能量来源向脂肪转移。这与Candice等^[12]研究结果相似, 其实验发现奥氮平急性给药后4 h内VO₂下降最明显, 8 h内RER持续低于0.7, 之后开始恢复。肝脏是机体调节血糖水平的关键器官, 主要通过糖原合成和糖异生途径实现。当血糖升高时, 肝脏利用血糖合成糖原从而降低血糖。GLUT2



注: A 摄食量比较; B 体质量比较

图1 两组小鼠摄食量和体质量的比较



注: A 各时间点FBG比较; B 第2周末时IPGTT结果比较; C 第2周末时IPITT结果比较; 两组间比较* $P < 0.05$

图2 两组小鼠糖代谢情况比较

表1 两组小鼠24 h能量代谢监测结果($\bar{x} \pm s$)

组别	VO ₂ [ml/(kg·h)]			EE [kcal/(kg·h)]			REP		
	24 h	白天	晚上	24 h	白天	晚上	24 h	白天	晚上
对照组	3 765 ± 127.5	3 532 ± 128.6	3 991 ± 178.4	0.405 ± 0.005	0.374 ± 0.008	0.435 ± 0.014	0.805 ± 0.006	0.756 ± 0.013	0.853 ± 0.016
奥氮平组	3 539 ± 61.9	3 111 ± 68.9	3 954 ± 104.9	0.391 ± 0.012	0.333 ± 0.011	0.442 ± 0.012	0.791 ± 0.007	0.732 ± 0.008	0.847 ± 0.010
t值	1.598	2.889	0.179	1.051	3.121	0.392	1.506	1.543	0.290
P值	0.149	0.020	0.862	0.324	0.014	0.705	0.170	0.161	0.779

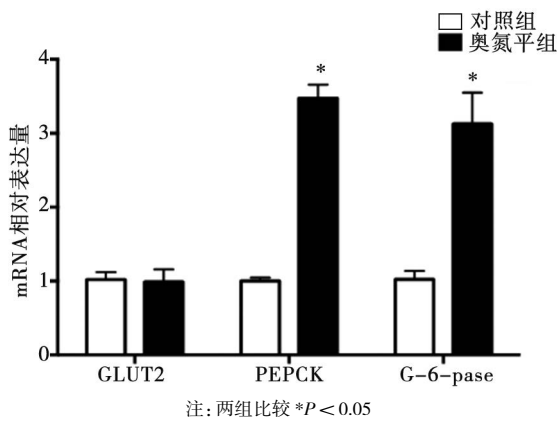


图3 两组小鼠基因的mRNA表达比较

在此过程中发挥重要调节作用,其表达升高可促进肝脏葡萄糖转运并调节葡萄糖敏感基因表达,为肝糖原含量增加提供条件^[13-14]。相反,当血糖降低时,肝糖原分解及糖异生作用加强,更多葡萄糖输入血中从而升高血糖。PEPCK和G-6-pase是此过程的关键酶,其表达升高导致糖异生增强从而升高血糖^[15-17]。本次研究发现,奥氮平能够显著增加PEPCK和G-6-pase基因的mRNA水平,但不改变GLUT2表达。提示奥氮平诱导高血糖主要通过促进肝糖异生过程,并不影响肝糖摄取。Martins等^[18]也发现SD大鼠侧脑室注射奥氮平能够诱导肝脏胰岛素抵抗并升高PEPCK和G-6-pase基因的mRNA水平。本次实验中,奥氮平持续给药2周并未对雄性小鼠摄食量和体质量产生明显影响,分析可能有3方面原因:(1)奥氮平所致摄食量和体质量改变具有性别差异,奥氮平可能影响雌激素和雌激素受体使得女性更易感;(2)大剂量[6 mg/(kg·d)]奥氮平具有较强镇静作用,降低了小鼠的摄食行为;(3)给药2周时间较短,需要延长给药时间以观察其对体质量的影响。

综上所述,本次研究发现奥氮平诱导血糖升高不依赖于摄食和体质量增加,奥氮平可直接诱导胰岛素抵抗,减少能量消耗和糖利用,升高PEPCK和G-6-pase的基因表达促进糖异生。后续实验将采用不同剂量的奥氮平给药、延长给药时间并深入研究造成奥氮平性别差异的分子机制。

参考文献

- [1] Rojo LE, Gaspar PA, Silva H, et al. Metabolic syndrome and obesity among users of second generation antipsychotics: A global challenge for modern psychopharmacology[J]. *Pharmacol Res*, 2015, 101: 74-85.
- [2] De Hert M, Detraux J, van Winkel R, et al. Metabolic and cardiovascular adverse effects associated with antipsychotic drugs[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2011, 8(2): 114-126.
- [3] Huang XF, Han M, Huang X, et al. Olanzapine differentially affects 5-HT_{2A} and 2C receptor mRNA expression in the rat brain[J]. *Behav Brain Res*, 2006, 171(2): 355-362.
- [4] Kirk SL, Glazebrook J, Grayson B, et al. Olanzapine-induced weight gain in the rat: role of 5-HT_{2C} and histamine H₁ receptors[J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2009, 207(1): 119-125.
- [5] He M, Zhang Q, Deng C, et al. Hypothalamic histamine H₁ receptor-AMPK signaling time-dependently mediates olanzapine-induced hyperphagia and weight gain in female rats[J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2014, 42: 153-164.
- [6] Sejima E, Yamauchi A, Nishioku T, et al. A role for hypothalamic AMP-activated protein kinase in the mediation of hyperphagia and weight gain induced by chronic treatment with olanzapine in female rats[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2011, 31(7): 985-989.
- [7] Albaugh VL, Henry CR, Bello NT, et al. Hormonal and metabolic effects of olanzapine and clozapine related to body weight in rodents[J]. *Obesity (Silver Spring)*, 2006, 14(1): 36-51.
- [8] Choi S, DiSilvio B, Unangst J, et al. Effect of chronic infusion of olanzapine and clozapine on food intake and body weight gain in male and female rats[J]. *Life Sci*, 2007, 81(12): 1 024-1 030.
- [9] Teff KL, Rickels MR, Grudziak J, et al. Antipsychotic-induced insulin resistance and postprandial hormonal dysregulation independent of weight gain or psychiatric disease[J]. *Diabetes*, 2013, 62(9): 3 232-3 240.
- [10] Kuo CD, Shiao GM, Lee JD. The effects of high-fat and high-carbohydrate diet loads on gas exchange and ventilation in COPD patients and normal subjects[J]. *Chest*, 1993, 104(1): 189-196.
- [11] Solon-Biet SM, Mitchell SJ, Coogan SC, et al. Dietary Protein to Carbohydrate Ratio and Caloric Restriction: Comparing Metabolic Outcomes in Mice[J]. *Cell Rep*, 2015, 11(10): 1 529-1 534.
- [12] Klingerman CM, Stipanovic ME, Bader M, et al. Second-generation antipsychotics cause a rapid switch to fat oxidation that is required for survival in C57BL/6J mice[J]. *Schizophr Bull*, 2014, 40(2): 327-340.
- [13] Thorens B. GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis[J]. *Diabetologia*, 2015, 58(2): 221-232.
- [14] Gould GW, Thomas HM, Jess TJ, et al. Expression of human glucose transporters in *Xenopus* oocytes: kinetic characterization and substrate specificities of the erythrocyte, liver, and brain isoforms[J]. *Biochemistry*, 1991, 30(21): 5 139-5 145.
- [15] Méndez-Lucas A, Hyroššová P, Novellasdemunt L, et al. Mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK-M) is a pro-survival, endoplasmic reticulum (ER) stress response gene involved in tumor cell adaptation to nutrient availability[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(32): 22 090-22 102.
- [16] Méndez-Lucas A, Duarte JA, Sunny NE, et al. PEPCK-M expression in mouse liver potentiates, not replaces, PEPCK-C mediated gluconeogenesis[J]. *J Hepatol*, 2013, 59(1): 105-113.
- [17] van Schaftingen E, Gerin I. The glucose-6-phosphatase system[J]. *Biochem J*, 2002, 362(Pt 3): 513-532.
- [18] Martins PJ, Haas M, Obici S. Central nervous system delivery of the antipsychotic olanzapine induces hepatic insulin resistance[J]. *Diabetes*, 2010, 59(10): 2 418-2 425.

(收稿日期: 2017-01-22)