

奥氮平对小鼠白色脂肪米色化的抑制作用及其机制

张学丽^{1*}, 郑 啸², 柳亚敏¹, 邵 华^{1**}(¹东南大学附属中大医院药学部, 南京 210009; ²南京中医药大学附属医院药学部, 南京 210029)

摘 要 从奥氮平(olanzapine, OLA)对白色脂肪米色化(beiging)的调节作用探讨其引起代谢紊乱的可能机制。C57BL6/J小鼠连续28 d灌胃给予高、低剂量(4, 8 mg/kg)OLA, 隔天记录体重及摄食变化; 通过糖耐量实验和冷应激考察小鼠血糖调控和产热能力的变化。分离小鼠肾周(pWAT)、附睾(eWAT)及腹股沟(iWAT)处白色脂肪, 通过解偶联蛋白-1(UCP-1)免疫组化技术和苏木精-伊红染色确证米色化程度的改变; 通过Western blot考察奥氮平对米色脂肪分化关键调控蛋白哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)活化和Notch1胞内结构域(NIICD)表达的影响。实验结果表明: OLA可致小鼠基础产热明显降低, 并可抑制环境适应性产热和葡萄糖利用。OLA引起腹股沟处米色脂肪分化异常, 抑制冷应激诱导的白色脂肪米色化及UCP-1激活, 并显著上调磷酸化mTOR(p-mTOR)与NIICD的表达。以上结果提示, 白色脂肪米色化的抑制作用参与到OLA诱导的代谢紊乱, mTOR-Notch信号通路的激活可能是其中的关键分子事件。

关键词 奥氮平; 米色化; 白色脂肪; 代谢紊乱; mTOR-Notch通路

中图分类号 R965 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2015)06-0724-06

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20150615

Inhibition and mechanism of olanzapine on white adipose tissue beiging in mice

ZHANG Xueli^{1*}, ZHENG Xiao², LIU Yamin¹, SHAO Hua^{1**}

¹Department of Pharmacy, Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing 210009;

²Department of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine Affiliated Hospital, Nanjing 210029, China

Abstract As one of the first-line antipsychotic drugs, olanzapine (OLA) inducing insulin resistance and metabolic disorder has become a serious clinical concern. This study aimed at investigating the effect of OLA on white adipose tissue (WAT) beiging as a potential mechanism behind its metabolism-disturbing effects. C57BL6/J mice were orally administered with low and high-dose OLA (4, 8 mg/kg, once daily) for 28 consecutive days; body weight and food intake were recorded every other day. Mice were subjected to glucose-tolerance test (GTT) and a cohort from each group was challenged with cold stress for 36 h before sacrifice. The perirenal, epididymal and inguinal WAT were carefully dissected, weighed and processed separately for hematoxylin-eosin staining, UCP-1 immunohistochemical and Western blot analysis. The results showed that OLA induced significant impairment in basal heat generation and glucose regulation. There were fewer beige adipocytes in the inguinal WAT after OLA treatment. The beiging of inguinal WAT in response to cold stress was significantly inhibited in OLA-treated mice. Mechanistically, OLA induced the activation of mTOR-Notch pathway, as evidenced by a significant increase in phosphorylated mammalian target of rapamycin (p-mTOR) and intracellular domain of Notch1 (NIICD) expression. Together, our study reveals that the inhibitory effects on WAT beiging may explain the propensity of OLA to induce metabolic disturbance, and mTOR-Notch pathway activation could play key roles in this effect. Future validation and elucidation of these novel findings are expected to provide novel insights into the metabolic risks of OLA and related second generation antipsychotics, which may lead to innovative intervention strategies in the clinic.

收稿日期 2015-09-25 通信作者 * Tel: 025-83262639 E-mail: xlzhang1225@126.com

** Tel: 025-83262632 E-mail: gyesh@163.com

基金项目 江苏省自然科学基金资助项目(No. BK20150644, No. BK20141035)

Key words olanzapine; beiging; white adipose tissue; metabolic disturbance; mTOR-Notch pathway

This study was supported by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK20150644; No. BK20141035)

第 2 代抗精神病药物是精神分裂症和情感障碍性疾病治疗的重要药物。然而,该类药物的代谢风险已成为影响精神疾病患者生存率的重要问题,其中以临床应用广泛的奥氮平(olanzapine, OLA)最为突出^[1]。在服用 OLA 的患者中可明显观察到体重增加、糖脂代谢异常、胰岛素抵抗及高脂血症等现象,这些不良反应可显著增加糖尿病、心脑血管疾病的风险,严重影响精神病患者的预后和生存率^[2-3]。目前,OLA 代谢风险的临床干预主要以中枢调节为导向,虽然部分药物可减缓早期体重的增加,但对代谢紊乱却无长期受益,且不良反应明显^[4-5]。因此,寻找其中的核心环节及机制已成为亟需解决的科学问题。

有关 OLA 诱发代谢综合征的机制研究较多,但大多围绕其对中枢神经系统的调节作用^[6-7],并由此解释摄食和体重的增加,尚缺乏对糖、脂代谢紊乱中外周调控环节的深入解析。近来研究指出:在白色脂肪组织(white adipose tissue, WAT)中,存在着一种可由白色脂肪细胞或其前体分化产生的米色脂肪细胞(beige adipocytes)。白色脂肪的米色化(beiging),即白色脂肪细胞向米色脂肪细胞的表现型转变,被证明对于机体能量平衡和代谢的影响更为显著,该过程的异常参与到糖脂代谢紊乱和胰岛素抵抗^[8]。因此,本研究以 OLA 对白色脂肪米色化的调节作用和关键信号为切入点,探讨其诱导糖脂代谢紊乱的外周作用环节和初步机制。

1 材 料

1.1 药品与试剂

奥氮平片(江苏豪森药业股份有限公司,批号:140405);葡萄糖注射液(中国大冢制药有限公司);解偶联蛋白-1(UCP-1),哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)及 β -actin 抗体(美国 Proteintech 公司);磷酸化 mTOR(p-mTOR)及 Notch1 胞内结构域(NICD)抗体(美国 Abcam 公司);蛋白裂解液及电泳上样缓冲液(海门碧云天生物技术公司);电泳蛋白 Marker(美国 Thermo 公司);其他试剂均为市售分析纯。

1.2 仪 器

Optium Xceed 型血糖测试仪及试纸(美国雅培

公司);MC-341 电子体温计(日本欧姆龙公司);水平电泳仪及化学发光成像系统(美国伯乐公司);组织切片染色机(德国徕卡公司)。

1.3 动 物

C57BL6/J 小鼠,雄性,体重(20 ± 2) g,清洁级,由扬州大学比较医学中心提供,合格证号:SCXK(苏)2012-0004。全价营养颗粒饲料由江苏省协同医药生物技术有限公司提供。饲养条件:室温(23 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,湿度 55% ~ 65%,明暗交替,光照适度,通风洁净良好。动物实验操作严格参照动物伦理规范执行。

2 方 法

2.1 分组及给药

C57BL6/J 小鼠,适应环境 1 周后随机分为对照组及高、低剂量给药组,每组 10 只,正常进食普通全价小鼠饲料。根据临床给药剂量(成人每天 10 ~ 20 mg)折算,给药组小鼠每天灌胃给予 OLA(*po*, 4, 8 mg/kg) 1 次,连续 28 d,隔天记录摄食及体重变化;对照组灌胃给予等体积溶剂(0.5% 羧甲基纤维素钠)。后续采样及指标测定实验流程如图 1 所示。

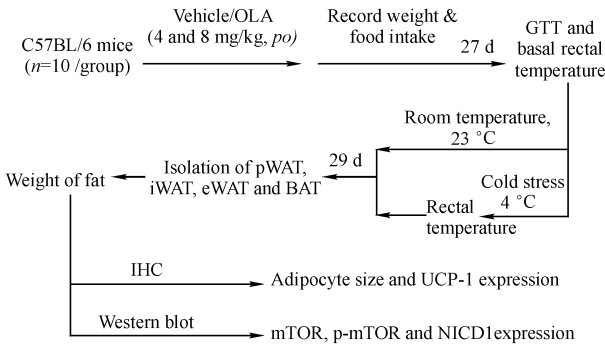


Figure 1 Schematic illustration of the experimental workflow
OLA: olanzapine; GTT: glucose-tolerance test; pWAT: perirenal white adipose tissue; iWAT: inguinal white adipose tissue; eWAT: epididymal white adipose tissue; BAT: brown adipose tissue; IHC: immunohistochemistry

2.2 冷应激实验

采用电子体温计测量基础肛温后,将小鼠从正常饲养环境中迅速转移,放置于 4 ~ 6 $^{\circ}\text{C}$ 冷应激环境下,记录肛温动态变化(6 h, 36 h)。

2.3 糖耐量实验

实验前,小鼠禁食过夜,于第 2 天实验前腹腔注射 10% D-葡萄糖溶液(1 g/kg),从尾尖端取血约 5 μ L,立刻通过血糖测试盒进行读数记录血糖值。

2.4 能量摄取计算

隔天记录小鼠的摄食重量,能量摄取通过总摄入食物能量数折算为每天每克体重对应能量 Kcal/(g/d)求得。

2.5 苏木精-伊红染色

小鼠麻醉处死后,小心分离肾周(pWAT)、腹股沟(iWAT)及附睾(eWAT)白色脂肪及肩胛处棕色脂肪(BAT),称重。脂肪组织用 10% 福尔马林固定、按常规方法包被、切片(5 μ m)、脱蜡后进行苏木精-伊红染色,在显微镜下观察脂肪细胞的形态(大小)与数目。

2.6 免疫组化实验

脂肪组织用 10% 福尔马林固定、按常规方法包被、切片(5 μ m),脱蜡后用新鲜配置的 0.3% H_2O_2 封闭内源性过氧化物酶(室温孵育 5 ~ 10 min),抗原修复及血清封闭后,用 anti-UCP-1 抗

体(1:50)进行室温孵育 60 min 后,PBS 洗涤 3 次,加入二抗孵育,滴加亲和素-生物素-过氧化物酶复合物,室温作用 30 min,PBS 洗涤 3 次;DAB 显色后自来水洗净,苏木精-伊红染核,常规脱水、透明、封固、镜检。

2.7 数据处理与统计分析

采用 Graphpad Prism 5 软件进行数据处理与分析,所有计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间均数比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

3 结果

3.1 OLA 对小鼠能量摄入与基础产热能力的影响

OLA 对小鼠体重及摄食影响如图 2 所示。实验结果表明,仅高剂量组(8 mg/kg)在给药早期表现出体重的快速增加($P < 0.001$),实验终点时各组小鼠的体重无差异。然而,OLA 可明显引起小鼠能量摄取增加,且与剂量成正相关。小鼠肛温测定结果进一步表明奥氮平给药组小鼠基础体温较对照组明显下降(约 1 $^{\circ}C$, $P < 0.001$),提示 OLA 可显著抑制小鼠的基础产热能力(图 2)。

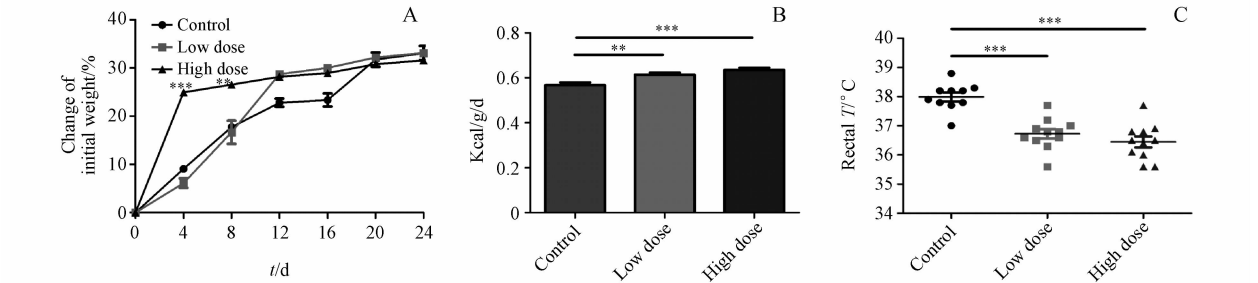


Figure 2 Effects of OLA on body weight and temperature A: Body weight changes compared to initial weight ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$); B: Energy intake unified to Kcal/(g/d) ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$); C: Basal rectal temperature at room temperature
** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group

3.2 OLA 对小鼠葡萄糖利用率的影响

通过糖耐量实验考察 OLA 对小鼠葡萄糖代谢的影响(图 3)。结果表明,虽然各组小鼠间空腹血糖无差异,但经腹腔注射葡萄糖溶液后,OLA 给药组小鼠对高血糖的耐受力明显下降。

3.3 OLA 对小鼠白色脂肪的影响

在明确 OLA 可诱导小鼠代谢异常的基础上,本实验通过进一步考察 OLA 对白色脂肪重量和细胞形态的影响发现(图 4)。相对于正常组小鼠,高、低剂量 OLA 对于 BAT 的质量无明显影响低剂量,而 OLA 给药组小鼠中可观察到不同部位 WAT

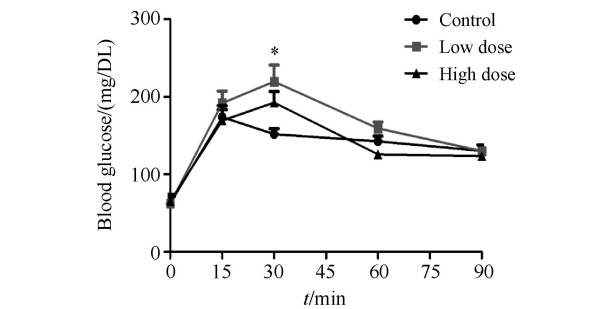


Figure 3 Blood glucose concentrations during intraperitoneal glucose tolerance test (IP-GTT) ($\bar{x} \pm s$, $n = 8-10$)
* $P < 0.05$ vs control group

质量的增加,尤其以 iWAT 的改变最为明显(图 4-A)。IHC 结果(图 4-C)表明,各组间 BAT 的形态学并无显著差异;然而,OLA 给药组小鼠白色脂肪

组织质量增加的同时,伴随着其 iWAT 的形态由小体积多腔结构转变为大体积单腔结构,反映出白色脂肪细胞向米色脂肪细胞转变的减弱。

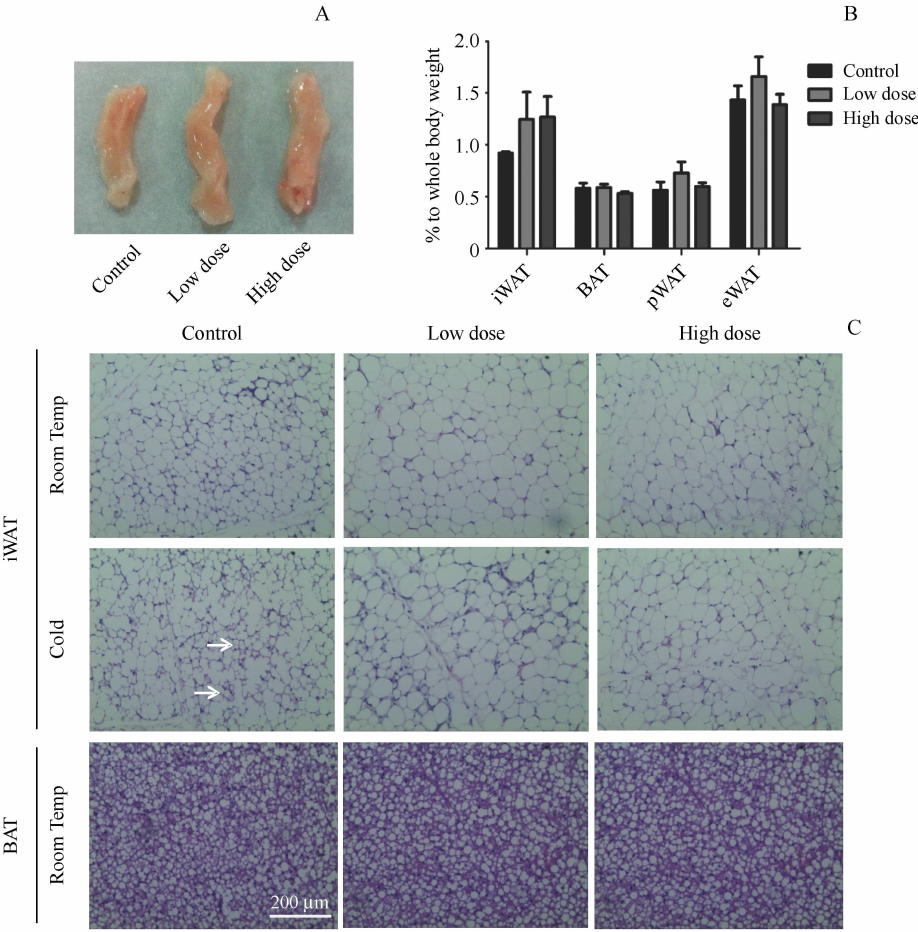


Figure 4 Effects of OLA on white adipose tissue (WAT) A: Representative inguinal fat from each group; B: Each fat pad to body weight ratio at room temperature ($\bar{x} \pm s, n = 4$); C: Representative morphological analysis of iWAT for room temperature or cold treated and brown adipose tissue (BAT) (HE, $\times 10$)

3.4 OLA 对冷应激诱导白色脂肪米色化的影响

冷应激是诱导白色脂肪米色化的常用方法,被广泛用于考察米色化程度的改变^[9-10]。因此,本实验将小鼠置于 4℃ 环境中,进一步考察 OLA 对冷应激条件下白色脂肪米色化的影响(图 5)。从图 5-A 可发现,在短时间的冷应激下,各组小鼠肛温迅速下降约 2℃;然而,经过较长时间的诱导,对照组小鼠通过自身产热抵抗体温进一步降低,而给药组小鼠由于白色脂肪米色化过程受到抑制,体温出现进一步下降(约 4℃),该现象进一步证实 OLA 给药组小鼠适应性产热能力异常。进一步对米色化过程中产热特征性因子 UCP-1 的表达进行了考察,由图 5-B 可见,OLA 不仅可显著抑制冷应

激诱导下 UCP-1 的表达,基础 UCP-1 的表达也受到一定程度的抑制,该结果与各组小鼠基础肛温测试结果一致,进一步证实了 OLA 对白色脂肪米色化的抑制作用。

3.5 OLA 对白色脂肪 mTOR-Notch 信号通路的调节作用

文献报道哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)与 Notch 异常活化与胰岛素抵抗等代谢性疾病密切相关^[11-12],而抑制 Notch 信号被发现可以诱导白色脂肪米色化而改善胰岛素抵抗^[13]。因此,本实验进一步对 mTOR-Notch 通路关键蛋白的表达进行了比较分析。通过 Western blot 实验发现,OLA 可诱导该信号通路

中的关键分子 mTOR 与 Notch 的异常活化,其活化形式磷酸化 mTOR (p-mTOR) 与 NIICD 的表达均高于对照组,提示 OLA 可能通过激活该信号通路从而抑制白色脂肪的米色化。

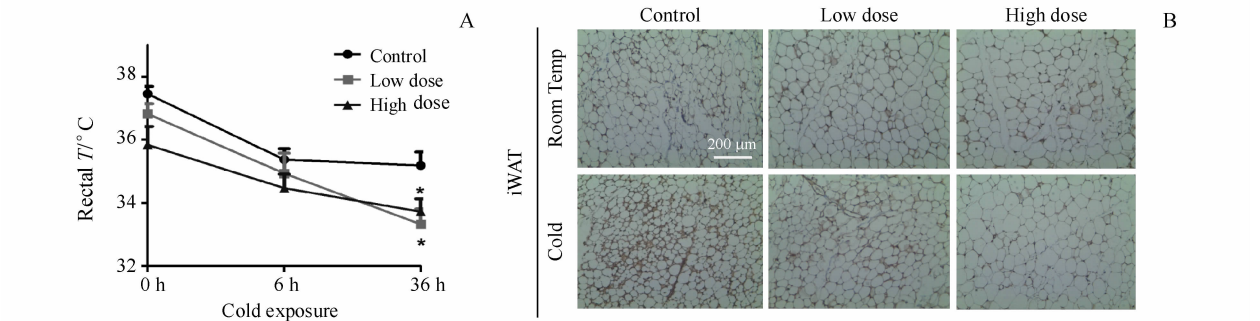


Figure 5 Effects of OLA on cold induced WAT beiging
A: Body temperature during cold treatment ($\bar{x} \pm s, n=6$); B: Representative immunohistochemical analysis of UCP-1 in the inguinal WAT from mice under room temperature or cold challenge ($\times 10$). * $P < 0.05$ vs control group

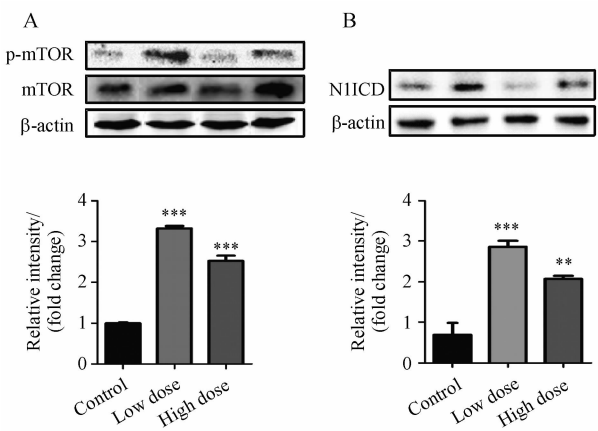


Figure 6 Representative Western blots for mTOR-Notch pathway activation in the inguinal WAT from mice ($\bar{x} \pm s, n=3$)
A: Western blots for p-mTOR and mTOR and the statistical analysis of the relative intensity of p-mTOR/mTOR; B: Western blots for NIICD (marker protein of Notch activation) and the statistical analysis of the relative intensity. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group. mTOR: mammalian target of rapamycin; p-mTOR: phosphorylated mammalian target of rapamycin; NIICD: intracellular domain of Notch 1

4 讨论

OLA 的代谢风险已成为重要的临床问题,然而其机制未明,临床上缺乏行之有效的干预方法。与中枢作用相比,目前探讨 OLA 的外周作用及与代谢综合征的相关性研究较为缺乏。近年研究发现,白色脂肪米色化失调与胰岛素抵抗、糖脂代谢异常等病理过程密切相关。本研究首次在 OLA 诱导的代谢异常小鼠模型中证实 OLA 可以显著抑制正常及冷应激刺激下白色脂肪米色化的过程,并且

这一作用伴随着对 mTOR-Notch 米色化关键信号通路的激活。

本实验中,OLA 持续给药 28 d 并未对棕色脂肪产生明显影响,而腹股沟处的白色脂肪出现了质量和构成的明显变化,进一步支持了白色脂肪功能异常与 OLA 的致代谢紊乱作用密切相关。事实上,近年来的研究也指出,与固有的棕色脂肪相比,在对环境因素的应答方面,米色脂肪细胞的适应性分化与功能活化(白色脂肪米色化)对于机体能量平衡和代谢的影响更为显著^[14]。本实验中观察到小剂量(4 mg/kg)OLA 在诱导糖代谢调控异常方面的作用较大剂量(8 mg/kg)更为显著,其可能的原因是大剂量 OLA 长期给药后的镇静作用减轻了糖耐量实验中小鼠的应激状态,具体机制有待进一步研究。为了进一步确证 OLA 对于米色化过程的影响,后续体外实验可在分离培养原代脂肪细胞的基础上,从细胞耗氧量和米色化特征基因等方面具体考察 OLA 对其向米色化脂肪细胞转变的影响以及其中的关键信号通路。考虑到调控白色脂肪米色化在干预代谢性疾病中的潜在价值,本研究结果提示改善白色脂肪米色化可能是干预 OLA 相关代谢紊乱的有效途径。

mTOR 信号通路是细胞对环境刺激(如生长因子、应激)和能量状态(营养)做出应答的重要生物学机制,该信号通路的异常活化与胰岛素抵抗密切相关^[11]。此外,作为组织发育和免疫调节的重要分子之一,Notch 的活化已被证明与肝脏脂肪性病变^[15]、动脉粥样硬化、胰岛素抵抗中的代谢性炎症

发生密切相关^[12,16],而抑制 Notch 信号被发现可以诱导米色化并改善胰岛素抵抗^[13]。本实验结果发现,正常饮食条件下,OLA 可促进米色脂肪中 mTOR 和 Notch 的活化,提示 OLA 诱导的米色脂肪细胞 mTOR-Notch 信号通路激活可能是其引起米色脂肪功能失调的重要途径。有趣的是,低剂量 OLA 对于该通路的活化作用更为明显,相关机制有待深入研究。基于以上结果,后续实验可以通过特异性调控白色脂肪 mTOR-Notch 信号通路确证该通路在 OLA 诱导米色化障碍中的作用,在此基础上进一步探讨相关化学抑制剂在改善 OLA 致代谢异常中的作用。

有文献指出,解决 OLA 等新型抗精神病药物的代谢紊乱所造成的不良反应是改善其临床疗效和患者受益的前提条件^[2]。然而,目前从抗精神病药效作用出发的思路对于全面认识和干预 OLA 的代谢风险存在一定的局限性,例如中枢的局部调节作用难以充分说明机体代谢网络的系统性紊乱和胰岛素抵抗等重要病理特征。本研究的发现提示 OLA 引起的代谢综合征还涉及到外周多重因素的参与,其中白色脂肪米色化的异常可能是相关代谢紊乱发生、发展中的重要外周环节之一。因此,后续研究需要综合围绕机体能量和代谢调控的关键环节,从白色脂肪等重要代谢组织中深入揭示 OLA 相关代谢综合征的机制,从而为相关临床干预策略的转化提供新的理论依据。

参考文献

- [1] Correll CU, Robinson DG, Schooler NR, et al. Cardiometabolic risk in patients with first-episode schizophrenia spectrum disorders: baseline results from the RAISE-ETP study[J]. *JAMA Psychiatry*, 2014, **71**(12): 1350 – 1363.
- [2] Tiihonen J, Lonnqvist J, Wahlbeck K, et al. No mental health without physical health[J]. *Lancet*, 2011, **377**(9766): 611.
- [3] Samaras K, Correll CU, Mitchell AJ, et al. Diabetes risk potentially underestimated in youth and children receiving antipsychotics[J]. *JAMA Psychiatry*, 2014, **71**(2): 209 – 210.
- [4] Mizuno Y, Suzuki T, Nakagawa A, et al. Pharmacological strategies to counteract antipsychotic-induced weight gain and metabolic adverse effects in schizophrenia: a systematic review and meta-analysis[J]. *Schizophr Bull*, 2014, **40**(6): 1385 – 1403.
- [5] Maayan L, Vakhrusheva J, Correll CU. Effectiveness of medications used to attenuate antipsychotic-related weight gain and metabolic abnormalities: a systematic review and meta-analysis[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2010, **35**(7): 1520 – 1530.
- [6] Ikegami M, Ikeda H, Ohashi T, et al. Olanzapine-induced hyperglycemia: possible involvement of histaminergic, dopaminergic and adrenergic functions in the central nervous system[J]. *Neuroendocrinology*, 2013, **98**(3): 224 – 232.
- [7] Volpato AM, Zugno AI, Quevedo J. Recent evidence and potential mechanisms underlying weight gain and insulin resistance due to atypical antipsychotics[J]. *Rev Bras Psiquiatr*, 2013, **35**(3): 295 – 304.
- [8] Cohen P, Levy JD, Zhang Y, et al. Ablation of PRDM16 and beige adipose causes metabolic dysfunction and a subcutaneous to visceral fat switch[J]. *Cell*, 2014, **156**(1/2): 304 – 316.
- [9] Rosenwald M, Perdikari A, Rulicic T, et al. Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes[J]. *Nat Cell Biol*, 2013, **15**(6): 659 – 667.
- [10] Dempersmier J, Sambeat A, Gulyaeva O, et al. Cold-inducible Zfp516 activates UCP1 transcription to promote browning of white fat and development of brown fat[J]. *Mol Cell*, 2015, **57**(2): 235 – 246.
- [11] Blagosklonny MV. TOR-centric view on insulin resistance and diabetic complications: perspective for endocrinologists and gerontologists[J]. *Cell Death Dis*, 2013, **4**: e964.
- [12] Fukuda D, Aikawa E, Swirski FK, et al. Notch ligand delta-like 4 blockade attenuates atherosclerosis and metabolic disorders[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, **109**(27): E1868 – 1877.
- [13] Bi P, Shan T, Liu W, et al. Inhibition of Notch signaling promotes browning of white adipose tissue and ameliorates obesity[J]. *Nat Med*, 2014, **20**(8): 911 – 918.
- [14] Bartelt A, Heeren J. Adipose tissue browning and metabolic health[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2014, **10**(1): 24 – 36.
- [15] Pajvani UB, Qiang L, Kangsamaksin T, et al. Inhibition of Notch uncouples Akt activation from hepatic lipid accumulation by decreasing mTORc1 stability[J]. *Nat Med*, 2013, **19**(8): 1054 – 1060.
- [16] Pajvani UB, Shawber CJ, Samuel VT, et al. Inhibition of Notch signaling ameliorates insulin resistance in a FoxO1-dependent manner[J]. *Nat Med*, 2011, **17**(8): 961 – 967.