

· 论著 ·

巨噬细胞迁移抑制因子在利培酮引起的代谢紊乱中的作用

施凯 彭延敏 崔东红

201108 上海交通大学医学院附属精神卫生中心 上海市重性精神病重点实验室

通信作者: 崔东红, Email: manyucc@126.com

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2019.02.002

【摘要】 目的 观察利培酮(RIS)对雌性小鼠代谢紊乱的影响及巨噬细胞迁移抑制因子(MIF)在其中的作用。方法 将24只C57BL/6雌性小鼠随机分成3组,分别用不含RIS的缓冲液,2 mg/kg、4 mg/kg RIS进行灌胃给药4周,观察小鼠体重、摄食量、糖耐量的变化,并比较各组小鼠肝脏的质量,采用ELISA试剂盒检测各组小鼠血清中的MIF含量(实验1)。为进一步验证MIF的作用,我们又采取MIF^{-/-}小鼠和野生型小鼠(WT),将实验小鼠分为4组,每组8只,分别为WT+Vehicle组、WT+RIS组、MIF^{-/-}+Vehicle组、MIF^{-/-}+RIS组。分别给予不含RIS的缓冲液和4 mg/kg RIS持续药6周,观察各组体重摄食量的变化(实验2)。结果 (1)4 mg/kg RIS给药组小鼠的体重、摄食量和肝脏质量明显高于对照组,并出现糖耐量升高。其中,给药第4周,4 mg/kg RIS给药组小鼠的体重、摄食量、肝脏质量分别为(19.54 ± 0.22)g、(3.76 ± 0.06)g/d、(0.85 ± 0.01)g,对照组各项分别为(18.17 ± 0.21)g、(2.56 ± 0.04)g/d、(0.68 ± 0.03)g;同时,4 mg/kg RIS给药组血清MIF浓度(33.13 ± 1.44)ng/ml也高于对照组(19.6 ± 1.06)ng/ml。(2)给药第6周,野生型组小鼠相比MIF^{-/-}组小鼠在给RIS后出现明显的体重[(21.68 ± 0.21)g比(20.44 ± 0.17)g]和摄食增加[(3.12 ± 0.02)g/d比(2.62 ± 0.03)g/d],而MIF^{-/-}+RIS组没有发现体重和摄食增加。结论 4 mg/kg RIS持续灌胃4周能引起雌性小鼠代谢紊乱,MIF可能在其中起到了重要作用。

【关键词】 利培酮; 代谢紊乱; 巨噬细胞迁移抑制因子

基金项目:“精准医学研究”国家重点专项(2017YFC0909200);国家自然科学基金项目(81671336)

Role of macrophage migration inhibitory factor in risperidone induced metabolic dysfunction

Shi Kai, Peng Yanmin, Cui Donghong

Shanghai Mental Health Center, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai Key Laboratory of Psychotic Disorders, Shanghai 201108, China

Corresponding author: Cui Donghong, Email: manyucc@126.com

【Abstract】 Objective To evaluate of risperidone (RIS) on metabolic dysfunction of female mice, and the role of macrophage migration inhibitory factor (MIF). **Methods** A total of 24 C57BL/6 female mice are randomly divided into 3 groups, and treated with vehicle, 2 mg/kg RIS, 4 mg/kg RIS for 4 weeks by intragastric administration. Then the body weight, food intake, glucose tolerance and liver weight were compared. MIF was assessed by ELISA (Experiment 1). To further evaluate the role of MIF in risperidone induced metabolic dysfunction, we performed experiment with MIF knockout (MIF^{-/-}) and wide type (WT) mice. Mice were randomly assigned to WT+Vehicle, WT+RIS, MIF^{-/-}+Vehicle, MIF^{-/-}+RIS group. All groups were treated for six weeks. The body weight and food intake were compared (Experiment 2). **Results** Experiment 1: Body weight and food intake were increased most obviously after 4 mg/kg RIS treatment. A corresponding glucose resistance and elevated liver weight were observed in 4 mg/kg RIS group. Four weeks later, the body weight, food intake and the weight of liver of the 4 mg/kg RIS group were (19.54 ± 0.22) g, (3.76 ± 0.06) g/d, (0.85 ± 0.01) g, while those of the control group were (18.17 ± 0.21) g, (2.56 ± 0.04) g/d, (0.68 ± 0.03) g. Furthermore, the amount of MIF in 4 mg/kg RIS group was (33.13 ± 1.44) ng/ml, which was higher than that of the control group (19.6 ± 1.06) ng/ml. Experiment 2: On the 6th week of treatment, compared with MIF^{-/-} mice, wild-type mice showed significant increase in body weight [(21.68 ± 0.21) g vs (20.44 ± 0.17) g] and food intake [(3.12 ± 0.02) g/d vs (2.62 ± 0.03) g/d] after risperidone administration. There was no weight gain or food intake in MIF^{-/-} + RIS

group. **Conclusions** 4 mg/kg RIS could induce metabolic dysfunction in female C57BL/6 mice. MIF may play an important role in RIS induced metabolic dysfunction.

【Key words】 Risperidone; Metabolic dysfunction; Macrophage migration inhibitory factor

Fund programs: "Precision Medical Research" of China and National Key Research and Development Program (2017YFC0909200); National Natural Science Foundation of China (81671336)

精神分裂症是一种严重的精神疾病,其全球范围内人口患病率高达1%^[1]。我国目前每年新增病例30多万,发病率呈上升趋势^[2]。临床药物治疗是精神分裂症目前最主要的治疗方法。以利培酮、奥氮平等为代表的第二代抗精神病药物的治疗效果要优于第一代抗精神病药物,因其对精神分裂症的幻觉、妄想等阳性症状有很好的疗效,对阴性症状和认知损害均有一定的作用,却无或很少发生锥体外系不良反应,故在临床上得到广泛应用^[3]。然而,越来越多的报道表明第二代抗精神病药物与机体的体重增加、高脂血症、胰岛素抵抗、糖尿病、高泌乳素血症等代谢疾病联系密切^[4],这些代谢紊乱疾病增加了心脑血管疾病如冠心病、脑梗死的患病风险,然而它们引起以上代谢紊乱的具体发病机制目前还不明确。

巨噬细胞迁移抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)是一种促炎因子,它广泛表达于机体各大免疫细胞(单核/巨噬细胞)、平滑肌、心脏等多种组织器官中,具有多种生物学效应^[5-7]。研究发现, MIF可调节机体免疫反应,进而参与败血症、动脉粥样硬化、类风湿性关节炎等疾病的发生^[8-9]。另外也有研究指出 MIF与机体的代谢调节密切相关^[10]。MIF可促进肌肉糖酵解和糖利用^[11]。在肥胖患者的单核细胞和脂肪组织中, MIF长期高表达,干扰胰岛素信号的传导从而导致胰岛素抵抗^[12]。在缺血再灌注的心脏中, MIF与受体CD74的结合可以激活能量调节酶腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK),参与心脏代谢^[13]。大量研究结果表明, MIF在糖、脂代谢紊乱和胰岛素抵抗的发生、发展中起了重要作用。我们最近的研究表明 MIF参与调节奥氮平诱导的代谢及肥胖不良反应^[14],因此,本研究将以 MIF为切入点,探讨其是否在利培酮引起的代谢紊乱中起到一定的作用。

材料与方法

1. 材料: (1) 实验动物。24只雌性C57BL/6J SPF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,平均体重18 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(光照时间7:00—19:00),室温(24±1)℃,湿度45%~55%,自由摄食和饮水。16只MIF基因敲除(MIF^{-/-})小鼠,由美国合作者赠送,饲养繁育于上海交通大学医学院实验动物科学部IVC房,SPF级。为排除不同遗传背景对研究结果的干扰,野生型小鼠为同品系小鼠,16只。(2) 药品和仪器。利培酮(Sigma公司), NaOH(河北万晔科技发展有限公司),冰醋酸(丰泰冰醋酸有限公司),血糖仪,血糖试纸(拜耳公司), MIF ELISA试剂盒(武昊公司),灌胃针(北京合力科创科技发展有限公司)。

2. 方法: (1) 动物分组及处理。动物适应1周后,将小鼠随机分成3组,每组8只。将利培酮先溶于1 μl/ml的冰醋酸,后用1 mol/ml的NaOH调节pH至6.0,后按照小鼠体重配置2 mg/kg和4 mg/kg浓度的利培酮溶液。给予对照组小鼠灌胃利培酮溶剂,另外两组小鼠分别灌胃2 mg/kg和4 mg/kg的利培酮液,每天1次,持续4周。每天测试小鼠体重和摄食量,于第4周末进行腹腔注射葡萄糖耐量测试(interperitoneal glucose tolerance test, IPGTT)。(2) IPGTT。小鼠禁食6 h,不禁水,按2 g/kg剂量腹腔注射葡萄糖。分别于空腹和糖负荷后15、30、60、90、120 min时间点测定血糖数值。(3) 取材:做完IPGTT的2 d后,用异氟烷吸入性麻醉小鼠,然后迅速切开腹腔取出肝脏,快速称量肝脏质量,采用眼球取血法提取小鼠血清,置于-80℃保存。(4) 为进一步验证MIF的作用,我们又采用MIF^{-/-}小鼠和野生型小鼠进行实验,根据是否给予利培酮(RIS),将实验小鼠分为4组,每组8只,分别为WT+Vehicle组、WT+RIS组、MIF^{-/-}+Vehicle组、MIF^{-/-}+RIS组。对WT+RIS和MIF^{-/-}+RIS两组进行利培酮灌胃给药,对WT+Vehicle和MIF^{-/-}+Vehicle两组进行利培酮溶剂灌胃给药,持续给药两个月,每天记录各组小鼠的体重和摄食。(5) MIF检测方法:将准备好的血清样本依次加入待测样品孔中,另设标准孔7孔,依次加入标准品。空白孔加入标准品稀释液,酶标板上覆膜,温育1h,甩干,加入检测溶液A 1 000 μl,孵育1h,洗板3次,加入检测液B 1 000 μl,温育30 min,洗板5次,加入TMB底物90 μl,温育10~20 min,

加入终止液 50 μ l, 立即于 450 nm 读数。TNF- α 检测方法同上。

3. 统计学方法: 采用 Graph Pad Prism 6 软件进行统计学分析, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用独立样本 *t* 检验和双因素重复测量方差分析方法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 利培酮不同剂量组间小鼠摄食量和体重的比较: 见图 1。采用双因素重复测量方差分析方法比较各组摄食量和体重。结果显示, 与对照组比较, 利培酮不同剂量给药组 (2 mg/kg 和 4 mg/kg) 在不同时间点 (3w, 4w) 的体重明显升高 ($F=11.67, P < 0.05$; $F=52.14, P < 0.05$)。其中 4 mg/kg 利培酮给药组较对照组的体重升高更为显著。相比对照组, 利培酮不同剂量给药组 (2 mg/kg 和 4 mg/kg) 的摄食量明显升高 ($F=68.66, P < 0.05$)。

2. 利培酮不同剂量组间小鼠腹腔注射葡萄糖后血糖浓度和肝脏质量的比较: 见图 2。结果显示, 与对照组比较, 利培酮不同剂量给药组 (2 mg/kg 和 4 mg/kg) 在注射葡萄糖后不同时间点 (15 min, 30 min) 的血糖浓度明显升高 ($F=17.87, P < 0.05$; $F=269.5, P < 0.05$)。利培酮 4 mg/kg 给药组小鼠的肝脏质量明显高于对

照组 ($F=4.76, P < 0.05$)。

3. 利培酮不同剂量组间小鼠血清 MIF 因子和 TNF- α 含量的比较: 见图 3。结果显示, 在灌胃 4 周后, 利培酮 4 mg/kg 给药组小鼠血清 MIF 相比于对照组小鼠明显升高, 为 (33.13 ± 1.44) ng/ml 比 (19.67 ± 1.06) ng/ml ($t=7.53, P < 0.05$)。利培酮 4 mg/kg 给药组小鼠血清 TNF- α 相比于对照组有升高的趋势, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

4. 利培酮给药后 MIF^{-/-}+RIS 与 WT+RIS 小鼠组间体重和摄食量的比较: 见图 4。采用双因素重复测量方差分析方法比较各组摄食量和体质量。结果显示, 与 WT+RIS 组小鼠比较, MIF^{-/-}+RIS 小鼠在不同时间点 (3 周, 4 周, 5 周, 6 周) 的体重明显升高 ($F=7.16, P < 0.05$; $F=5.14, P < 0.05$)。与 WT+RIS 组小鼠比较, MIF^{-/-}+RIS 小鼠在不同时间点 (3 周, 4 周, 5 周, 6 周) 的摄食量明显升高 ($F=7.21, P < 0.05$; $F=6.36, P < 0.05$)。

讨 论

利培酮作为目前广泛应用的第二代抗精神病药物, 其突出的代谢不良反应一直备受关注。对于利培酮引起代谢紊乱的具体机制目前尚不清楚, 本文研究着重建立利培酮引起的代谢紊乱的动物模型及探讨 MIF 是否在其中发挥了一定的作用。肥胖和

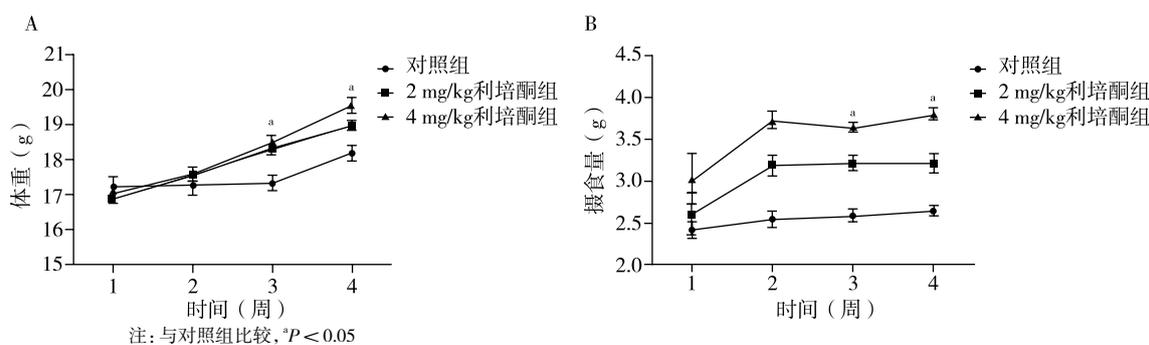


图 1 利培酮不同剂量组小鼠体重和摄食量的变化情况

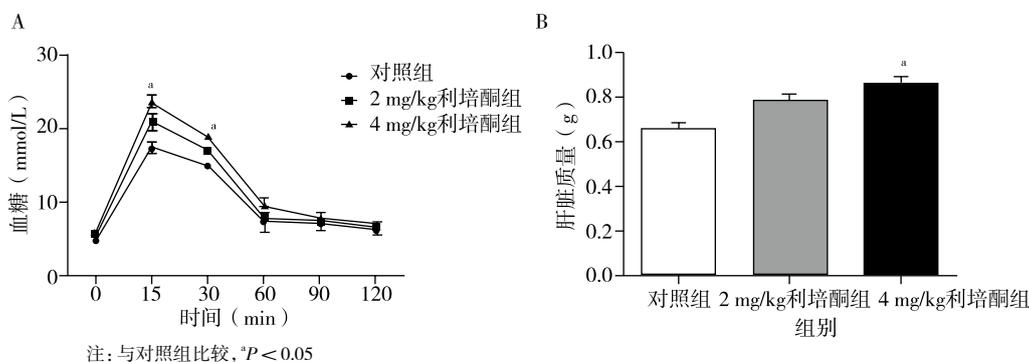


图 2 利培酮不同剂量组间注射葡萄糖后血糖和组间肝脏质量的比较

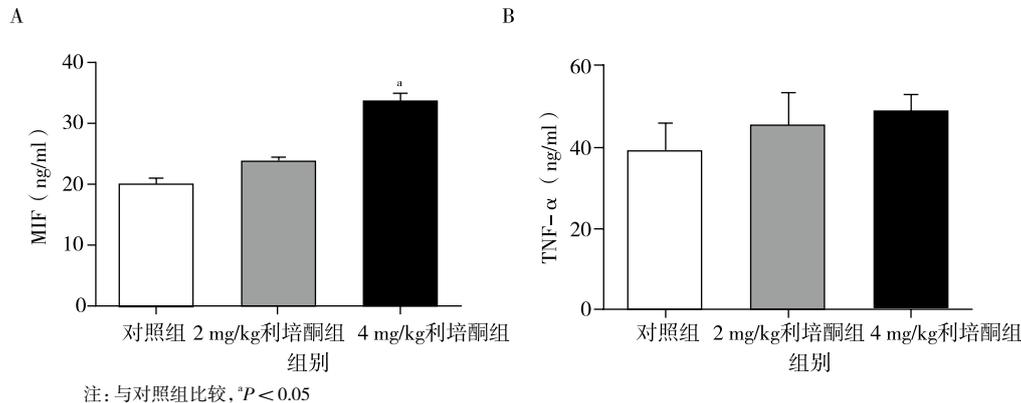


图3 利培酮不同剂量组间血清MIF和血清TNF-α水平的比较

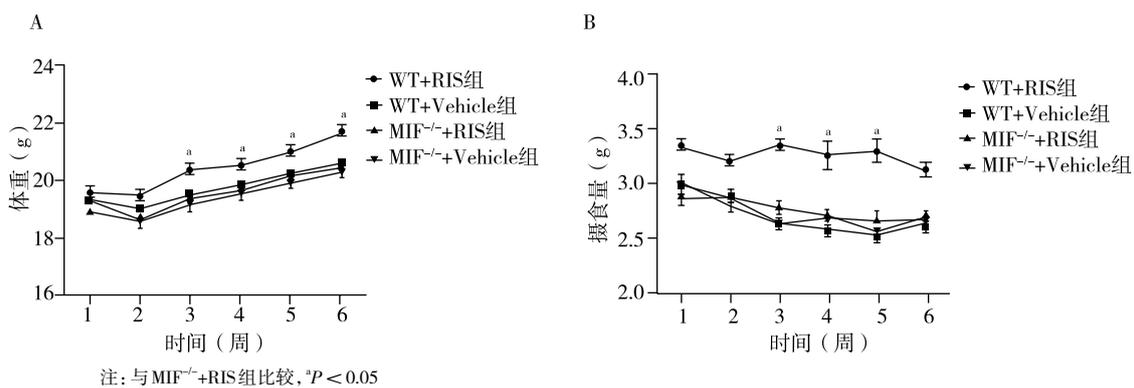


图4 利培酮给药后MIF基因敲除与野生型小鼠体重和摄食量的比较

胰岛素抵抗是代谢紊乱中的两大核心症状。目前研究认为肥胖是一种低程度的炎症反应^[15]。MIF是由多种细胞分泌的促炎性因子,具有趋化因子样的特点。在免疫细胞,分泌的MIF调节了多种免疫因子如IL-2、IL-6、TNF-α、IFN-γ的表达和作用,是炎症反应的中心调节点^[16]。也有研究指明MIF调节了骨骼肌的糖摄取和利用。另外,MIF也广泛表达于胰岛细胞,胰岛细胞MIF的释放刺激了胰岛素的分泌。基础和临床研究均表明MIF在胰岛素抵抗发生的中心网络调节中起了重要的作用,参与了1型、2型糖尿病的发生^[15]。

实验结果,表明在利培酮灌胃给药3周之后,4 mg/kg的利培酮液给药组的小鼠体重和摄食量明显高于利培酮溶剂组,血糖升高,肝脏的质量和血清中MIF水平较利培酮溶剂组有明显提高。我们的研究认为MIF水平可能在一定程度上导致了实验中小鼠体重和摄食量的增加、糖耐量受损以及肝脏体重的增加。临床流行病学研究表明BMI 37.5 kg/m²相比于22.6 kg/m²的人血清中具有更高的MIF水平,高达60%的肥胖患者其外周血循环血细胞中MIF是上调的。我们的研究在动物模型上进一步说明了

MIF确实是在肥胖中起到了一定的作用^[17]。小鼠在利培酮灌胃给药后10 d内,给药组小鼠的摄食量和体重较之于对照组有一定程度的下降,其中可能的原因是利培酮作为一种第二代抗精神病药物,小鼠在服药后可能会出现药物不良反应或不耐受,从而导致其体内出现一些不适症状。第10天后,由于小鼠慢慢适应了药物,给药组其摄食量和体重均出现了较大的提高。我们猜测,利培酮给药后,小鼠体内产生了一系列的炎症反应,与此同时,MIF作为常见的炎症因子在血清中亦逐渐升高,MIF的升高作用于下丘脑摄食调节中枢,从而引起了小鼠摄食行为的增加及体重增加。MIF的升高亦可以作用于肝脏、肌肉等组织中的脂肪细胞,正常情况下,血糖升高能引起胰岛细胞分泌胰岛素,胰岛素作用于脂肪细胞后加快脂肪细胞将血糖转化为脂肪的能力,MIF水平的升高可以阻止脂肪细胞摄取将血糖转化为脂肪的能力,从而引起葡萄糖不耐受。利培酮持续灌胃给药引起的摄食量增加,血糖不耐受,能引起血清中血脂的升高,血清中血脂过度堆积进一步可引起肝脏中脂肪堆积,这在一定程度上揭示了为什么给药组肝脏质量较对照组要高。

为了进一步验证MIF是否在利培酮给药的代谢紊乱中起作用,我们又采用MIF^{-/-}和野生型小鼠进行利培酮给药实验,结果发现野生型小鼠利培酮给药后其体重和摄食量较MIF^{-/-}小鼠有明显提高,说明MIF可能在利培酮给药的代谢紊乱中起到了重要作用,这个结果与我们最近发表的MIF参与奥氮平诱导的代谢紊乱类似^[14],提示MIF可能对第二代抗精神病药物诱导的肥胖和代谢不良反应有共同的作用机制,MIF很可能是对抗二代抗精神病药代谢不良反应的治疗靶点和预测不良反应的生物标记物。

本研究也有一些不足之处,首先,我们只采用了C57BL/6雌鼠,没有将雌激素对代谢的影响考虑在内,亦不知在雄鼠身上是否有类似于雌鼠身上出现的代谢不良反应。其次,利培酮给药时间较短,本实验中持续给药时间是4~6周,而代谢不良反应往往是长期慢性的过程,故延长给药时间可能会有不一样的结果。

综上所述,本次研究发现C57BL/6雌鼠经利培酮持续灌胃给药4~6周后,其摄食和体重均有一定程度的提高,其次,利培酮给药后其血糖调节能力亦受损以及肝脏体重增加。我们认为,利培酮给药导致的以上变化可能是由血清MIF水平升高引起的。对于MIF如何引起的上述一系列的变化更深层次的作用机制有待今后进一步研究其中的具体分子机制。

利益冲突 文章所有作者共同认可文章无相关利益冲突

作者贡献声明 试验设计为崔东红,研究实施、资料收集、论文撰写、数据整理与分析为施凯,论文修改为崔东红、彭延敏

参 考 文 献

- [1] Van OJ, Kapur S. Schizophrenia[J]. Lancet, 2009, 374(9690): 359-372. DOI: 10.1016/S0140-6736(09)60995-8.
- [2] Long J, Huang G, Liang W, et al. The prevalence of schizophrenia in mainland China: evidence from epidemiological surveys[J]. Acta Psychiatr Scand, 2015, 130(4): 244-256. DOI: 10.1111/acps.12296.
- [3] De MH, Schreurs V, Sweers K, et al. Typical and atypical antipsychotics differentially affect long-term incidence rates of the metabolic syndrome in first-episode patients with schizophrenia: a retrospective chart review[J]. Schiz Res, 2008, 101(1/3): 295-303. DOI: 10.1016/j.schres.2008.01.028.
- [4] Li Z, Kelly L, Heiman M, et al. Hypothalamic Amylin Acts in Concert with Leptin to Regulate Food Intake[J]. Cell Metabolism, 2015, 22(6): 1059-1067. DOI: 10.1016/j.cmet.2015.10.012.
- [5] Calandra T, Bernhagen J, Metz CN, et al. MIF as a

glucocorticoid-induced modulator of cytokine production[J]. Nature, 1995, 377(6544): 68-71. DOI: 10.1038/377068a0.

- [6] Burger-Kentischer A, Goebel H, Seiler R, et al. Expression of macrophage migration inhibitory factor in different stages of human atherosclerosis[J]. Circulation, 2002, 105(13): 1561-1566. DOI: 10.1161/01.CIR.0000012942.49244.82.
- [7] Willis MS, Carlson DL, Dimaio JM, et al. Macrophage migration inhibitory factor mediates late cardiac dysfunction after burn injury[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005, 288(2): H795. DOI: 10.1152/ajpheart.00189.2004.
- [8] Baugh JA, Chitnis S, Donnelly SC, et al. A functional promoter polymorphism in the macrophage migration inhibitory factor(MIF) gene associated with disease severity in rheumatoid arthritis[J]. Genes Immun, 2002, 3(3): 170. DOI: 10.1038/sj.gene.6363867.
- [9] Alabed Y, Dabideen D, Aljabari B, et al. ISO-1 Binding to the Tautomerase Active Site of MIF Inhibits Its Pro-inflammatory Activity and Increases Survival in Severe Sepsis[J]. J Biol Chem, 2005, 280(44): 36541-36544. DOI: 10.1074/jbc.C500243200.
- [10] Matia-García I, de la Cruz-Mosso U, Muñoz-Valle JF, et al. Macrophage migration inhibitory factor and its relationship with obesity and diabetes[J]. Invest Clin, 2014, 55(3): 266-277. DOI: 10.1038/gt.2014.59.
- [11] Atsumi T, Cho YR, Leng L, et al. The proinflammatory cytokine macrophage migration inhibitory factor regulates glucose metabolism during systemic inflammation[J]. J Immunol, 2007, 179(8): 5399-5406. DOI: 10.4049/jimmunol.179.8.5399.
- [12] Dandona P, Aliada A, Ghanim H. Increased plasma concentration of macrophage migration inhibitory factor(MIF) and MIF mRNA in mononuclear cells in the obese and the suppressive action of metformin[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2004, 89(10): 5043-5047. DOI: 10.1210/jc.2004-0436.
- [13] Miller EJ, Li J, Leng L. Macrophage migration inhibitory factor stimulates AMP-activated protein kinase in the ischaemic heart[J]. Nature, 2008, 451(7178): 578-582. DOI: 10.1038/nature06504.
- [14] Cui D, Peng Y, Zhang C, et al. Macrophage migration inhibitory factor(MIF) mediates the adverse metabolic action of the atypical antipsychotic, olanzapine[J]. J Clin Invest, 2018.
- [15] Kleemann R, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor: critical role in obesity, insulin resistance, and associated comorbidities[J]. Mediators Inflamm, 2010. DOI: 10.1155/2010/610479.
- [16] Grieb G, Merk M, Bernhagen J, et al. Macrophage migration inhibitory factor(MIF): a promising biomarker[J]. Drug News Perspect, 2010, 23(4): 257-264. DOI: 10.1358/dnp.2010.23.4.1453629.
- [17] Finucane OM, Reynolds CM, Megillicuddy FC, et al. Macrophage migration inhibitory factor deficiency ameliorates high-fat diet induced insulin resistance in mice with reduced adipose inflammation and hepatic steatosis[J]. PLoS One, 2014, 9(11): e113369. DOI: 10.1017/s0029665112000730.

(收稿日期: 2018-11-12)

(本文编辑: 赵金鑫)