

单次给予氟西汀诱导小鼠肝脏甘油三酯积累的作用机制

冯学敏,熊晶,刘妮,桂海燕,彭妍,陈瑞妮,胡刚,杨俭*

(南京医科大学药理学系,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:研究氟西汀对小鼠肝脏脂质代谢的影响。方法:小鼠腹腔注射 10 mg/kg 或 25 mg/kg 氟西汀,对照组给予生理盐水,以 25 mg/kg 氯氮平作为阳性对照,注射 6 h 或 24 h 后处死小鼠,取肝脏组织。用油红 O 染色观察肝脏中性脂肪积累;用试剂盒测定肝脏甘油三酯和总胆固醇含量;用 Western blot 技术测定小鼠肝脏固醇调节元件结合蛋白 1c(SREBP1c)、乙酰辅酶 A 羧化酶(ACC1)和脂肪酸合成酶(FAS)以及羧酸酯酶 1 和 3(CES1 和 CES3)的蛋白表达水平。结果:氟西汀诱导小鼠肝脏脂质积累,增加肝脏甘油三酯含量;氟西汀显著增加小鼠肝脏 SREBP1c、ACC1 和 FAS 的蛋白表达,同时小鼠肝脏 CES1 和 CES3 的蛋白表达水平显著减少。结论:氟西汀可能通过增加脂质合成基因的表达及减少脂质分解基因的表达从而诱导小鼠肝脏的脂质积累。

[关键词] 氟西汀;脂质积累;甘油三酯;羧酸酯酶;肝脏;小鼠

[中图分类号] R966

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)06-733-06

A single administration of fluoxetine induces lipid accumulation in mouse liver

FENG Xue-min, XIONG Jing, LIU Wei, GUI Hai-yan, PENG Yan, CHEN Rui-ni, HU Gang, YANG Jang*

(Department of Pharmacology, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of fluoxetine on the lipid metabolism in mouse liver and investigate the mechanisms. **Methods:** All mice received an intraperitoneal injection of saline (control), fluoxetine (10 mg/kg or 25 mg/kg) or clozapine (25 mg/kg). The mice were sacrificed at 6h or 24h after injection, and the livers were collected. Liver neutral lipid was determined by oil red O staining. Liver triglyceride and total cholesterol were measured by test kits. Liver sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP1c), acetyl-CoA carboxylase 1 (ACC1) and fatty acid synthase (FAS) as well as carboxylesterase 1 (CES1) and carboxylesterase 3 (CES3) protein levels were determined by Western Blot. **Results:** Acute fluoxetine treatment induced hepatic lipid accumulation in mouse liver. Furthermore, the expression of ACC1 and FAS was evidently elevated while the expression of triacylglycerol hydrolases, CES1 and CES3 was suppressed by fluoxetine. Meanwhile, the expression of SREBP1c, a lipid-modulating transcription factor, was also stimulated by fluoxetine. **Conclusion:** These data suggest that fluoxetine may upregulate lipogenesis via SREBP1c, as well as downregulate lipolysis in mouse liver, resulting in hepatic lipid accumulation.

[Key words] fluoxetine; lipid accumulation; triglyceride; carboxylesterase.; liver; mouse

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(6): 733-738]

抑郁症是一种全球性公共健康问题,患者以显著而持久的心境低落为特征,具有高发病率和高病死率^[1-3],预计至 2020 年将成为第二大全球疾病负担^[4]。选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂(SSRIs)是治疗抑郁症的主要药物,其中以氟西汀应用最为广泛^[5]。临床上在氟西汀等 SSRIs 的应用过程中发现其可导

致患者出现药源性肥胖或血脂异常等不良反应,从而增加患者患糖尿病、高血压或冠心病等肥胖相关代谢性疾病的风险^[6-9]。

氟西汀等 SSRIs 治疗导致肥胖或血脂异常不良反应的原因或机制尚未完全明确,且前期研究多集中于其对中枢神经系统的作用,认为可能是多重因素导致的结果。例如多种血清素受体、组胺-1 受体、阿片受体的激活调控摄食中枢导致摄入增加等中枢机制^[10-11]。进一步的机制研究并不明确,而对这些代谢性不良反应产生的外周机制更是知之甚少。

[基金项目] 国家自然科学基金资助(30772616,81173128,81102457);国家重点基础研究发展计划(2009CB521906)

*通讯作者, E-mail: jianyang@njmu.edu.cn

肝脏是机体脂质合成及分解的主要器官。在众多脂质合成基因中,脂肪酸合成酶(FAS)是甘油三酯(TG)合成中的关键合成酶^[12]。同样地,脂质合成关键底物乙酰辅酶A的催化酶乙酰辅酶A羧化酶1(ACC1)在TG的生物合成中具有重要地位,且ACC1主要表达于脂代谢相关组织,如肝脏和脂肪^[13]。在肝脏中,固醇调节元件结合蛋白1(SREBP1)是脂质合成基因的重要转录因子^[14]。SREBP1c是SREBP1的两个变异体之一,在肝脏中表达最丰富,是肝脏中调节脂质合成基因表达的关键转录因子^[15]。

另一方面,脂质分解基因在脂质代谢过程中也必不可少。尽管激素敏感性脂酶(HSL)和脂肪甘油三酯脂酶(ATGL)在脂肪组织中的重要性已经被阐明^[16],但是这些基因在肝脏中的表达甚微^[17]。羧酸酯酶是一类 α 、 β -丝氨酸水解酶家族,在各类组织中均广泛表达^[18]。研究表明,小鼠羧酸酯酶3作为一种肝脏TG水解酶,参与肝脏TG的分解^[19]。小鼠羧酸酯酶1是羧酸酯酶3的同系物,含有一个保守的酯酶/脂酶的活性基序,在肝脏TG代谢中也具有重要的作用^[20]。

本实验单次给予氟西汀后,观察其对小鼠肝脏脂肪代谢的影响,并探讨其对脂代谢相关基因的调节,阐明氟西汀调节脂肪代谢的分子靶点,为进一步研究SSRIs等抗抑郁药致肥胖和脂代谢紊乱等不良反应的外周机制提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

实验使用ICR小鼠48只,体重约20g,由南京医科大学实验动物中心提供。氟西汀、氯氮平和油红O(Sigma公司,美国);TRIzol和Taq DNA聚合酶(Invitrogen公司,美国);MLV反转录酶和RNA酶抑制剂(Promega公司,美国);CES1和ACC1抗体(Abcam公司,美国);CES3抗体(Abgent公司,美国);SREBP1c抗体(常州Anbo公司);FAS和 β -actin抗体(Bioworld公司,美国);TG、总胆固醇(TC)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组及给药

雄性ICR小鼠(8~10周龄,20~22g),实验前动物适应性饲养1周,自由饮食,维持12h光照和12h黑暗的昼夜节律,温度:20~25℃,湿度:50%±5%。将小鼠随机分为4组,每组6只。处理组小鼠经腹腔注射10mg/kg或25mg/kg的氟西汀,对照组给予生

理盐水,并以25mg/kg氯氮平作为阳性对照。注射后6h或24h处死小鼠。

1.2.2 组织切片和油红O染色

小鼠麻醉后用冰冷的无菌生理盐水进行肝脏灌流清除血液,取肝脏组织,用4%的多聚甲醛固定并用蔗糖脱水后进行冰冻切片(切片厚度10 μ m)。切片用新鲜配制的油红O染液(0.5%油红O溶于异丙醇:去离子水=3:2)染色15min,以苏木素复染30s,PBS洗涤3次。贴片,以甘油:PBS=1:1液使组织贴附于载玻片上,盖好盖玻片后用透明指甲油将盖玻片边缘封住。观察并拍照。

1.2.3 脂质提取和TG、TC测定

准确称取肝脏组织100mg,加入200 μ l生理盐水,冰上超声破碎组织直至无明显团块。加入800 μ l氯仿:甲醇(2:1)液,充分混匀,静置24h。3000r/min冷冻离心10min,取下层液体300 μ l,室温下挥发溶剂后加入100 μ l无水乙醇溶解。取制备的小鼠肝脏脂质样品,分别用TG、TC试剂盒测定TG、TC含量。按试剂盒方法加入相关试剂和样品,混匀,37℃水浴反应5min,以空白管校零,在酶标仪546nm波长处读数,求得TG、TC含量。

1.2.4 组织总蛋白的提取和Western blot

小鼠麻醉后用冰冷的无菌生理盐水进行肝脏灌流清除血液,取肝脏组织。称重后加入RIPA裂解液超声破碎提取肝脏组织总蛋白。4℃12000r/min离心15min后取上清,BCA法进行蛋白质定量。取20 μ g肝脏组织蛋白样品7.5%SDS-PAGE胶电泳分离。将蛋白电转至PVDF膜上,5%脱脂奶粉封闭1h,加稀释的一抗室温孵育2h。TBST洗膜3次,每次10min。加二抗室温孵育1h,TBST洗膜3次,每次10min,加入ECL化学发光液检测目的蛋白条带。

1.3 统计学方法

所有计量资料试验结果均用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用SPSS19.0软件处理实验数据,组间比较采用Dunnett多重比较的单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 氟西汀增加小鼠肝脏组织中中性脂肪的积累

给予ICR小鼠氟西汀(10或25mg/kg)后,分别于给药后6h和24h观察小鼠肝脏切片中性脂肪积累程度。与对照生理盐水组相比,氟西汀处理组小鼠肝脏细胞中被油红O染液染成红色的中性脂肪颗粒明显增多,且同一时间点观察到的氟西

汀高剂量组(25 mg/kg)中性脂肪比低剂量组(10 mg/kg)增加更为显著(图 1)。与对照组不同,所有药物处理组在 24 h 观察到的中性脂肪积累均较 6 h 处理组增多。作为阳性对照组,氯氮平处理组

也观察到明显的中性脂肪增加,这与前人文献结果相一致^[21]。本组实验说明,氟西汀增加小鼠肝脏组织中性脂肪积累,并具有浓度和时间依赖性。

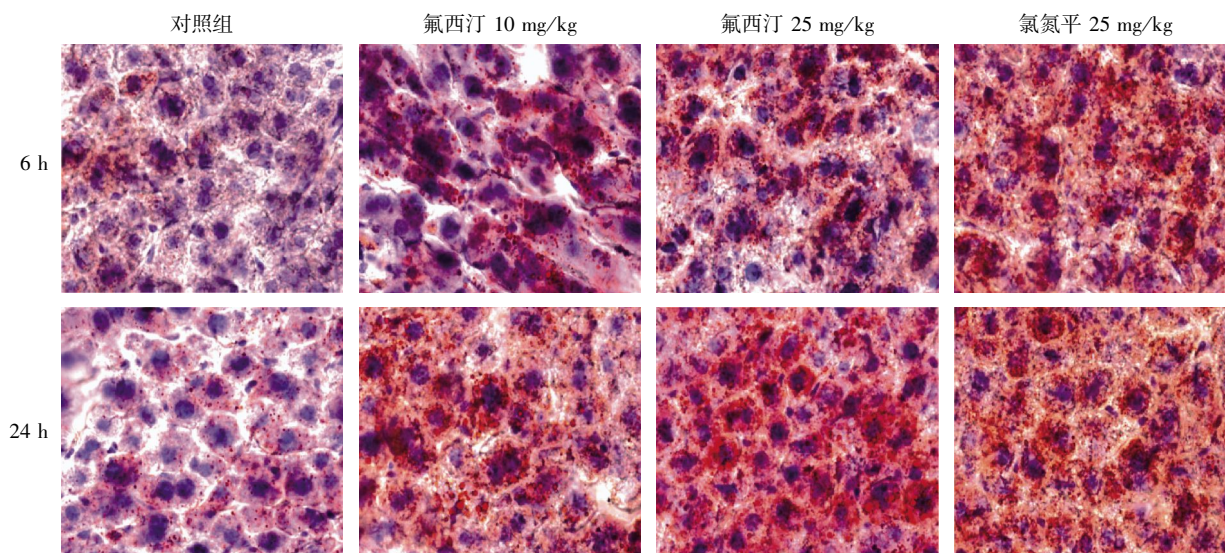


图 1 氟西汀诱导小鼠肝脏中性脂肪积累($\times 200$)

Figure 1 Fluoxetine induces neutral lipid accumulation in mouse liver tissue($\times 200$)

2.2 氟西汀增加小鼠肝脏组织 TG 而非 TC 的积累

为了验证和支持上述结果,进一步确定肝脏中脂质积累的程度,利用 TG 和 TC 检测试剂盒测定氟西汀处理后小鼠肝脏和血清中 TG 和 TC 的含量。如图 2 所示,给予 ICR 小鼠低剂量氟西汀(10 mg/kg) 6 h 和 24 h 后测得小鼠肝脏组织中 TG 含量较对照组升高[6 h (25.4 ± 5.7)%; 24 h (37.1 ± 5.9)%, $P < 0.05$], 肝脏中 TC 含量的增加无统计学意义 [6 h (3.8 ± 4.1)%; 24 h (6.3 ± 6.1)%, $P > 0.05$]; 给予高剂量氟西汀 (25 mg/kg) 6 h 和 24 h 后测得小鼠肝脏组织中 TG 含量也较对照组明显升高 [6 h (43.0 ± 3.1)%; 24 h (58.3 ± 6.6)%, $P < 0.05$], 肝脏中 TC 含量的增加无统计学意义 [6 h (8.1 ± 11.8)%; 24 h (10.2 ± 8.1)%, $P > 0.05$]。小鼠血清中 TG 和 TC 的含量也未发现变化(数据未显示)。本实验发现氟西汀在作用于小鼠 6 h 和 24 h 只引起肝脏组织中 TG 的升高,而并不引起 TC 以及血清中的脂质升高。结果说明,单次给药,氟西汀只诱导肝脏 TG 增加,而并不引起肝脏 TC 的增加。

2.3 氟西汀增加小鼠肝脏组织脂质合成酶的表达

如图 3 所示,Western blot 测定小鼠肝脏 ACC1 和 FAS 蛋白表达水平。给予 ICR 小鼠氟西汀(10 mg/kg)24 h 后,小鼠肝脏 ACC1 和 FAS 的蛋白表达水平较生理盐水组显著增加,且给予氟西汀(25

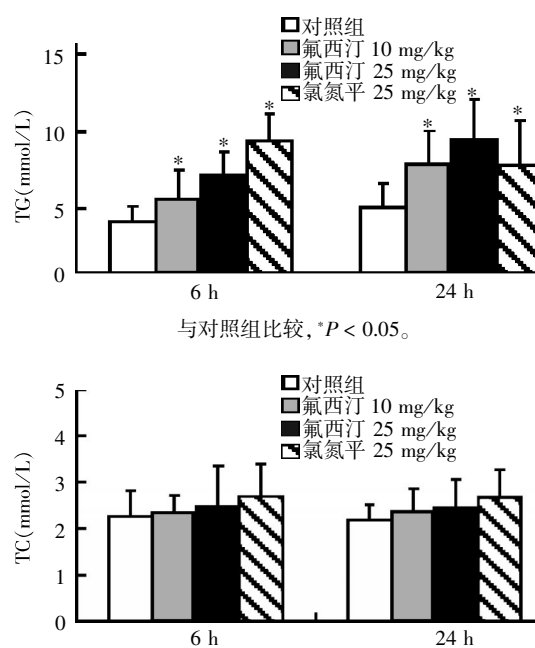


图 2 单次给予氟西汀对小鼠肝脏组织中 TG 和 TC 的影响
Figure 2 The effects of fluoxetine on the amount of TG and TC in the liver tissue

mg/kg)24 h 后 ACC1 和 FAS 的蛋白水平进一步升高,差异均具有统计学意义。

2.4 氟西汀降低小鼠肝脏组织羧酸酯酶的表达

如图 4 所示,Western blot 测定小鼠肝脏 CES1 和 CES3 蛋白表达水平。给予 ICR 小鼠氟西汀(10

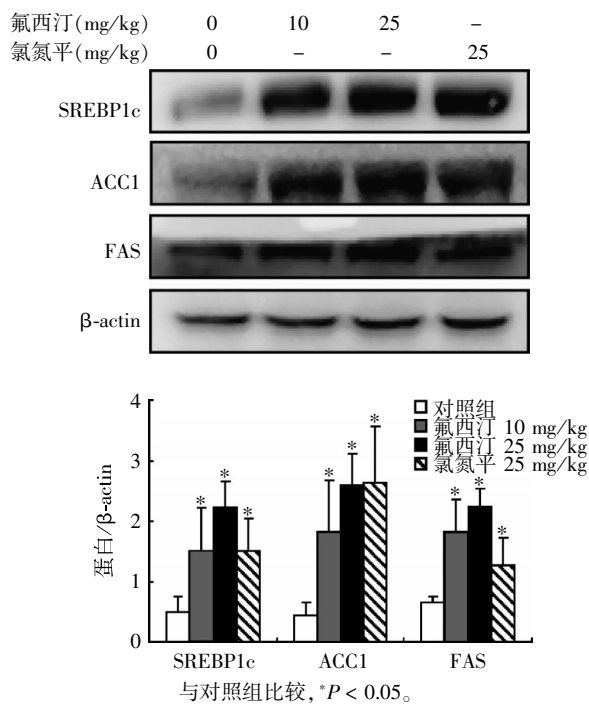


图 3 氟西汀对 SREBP1c、ACC1 和 FAS 蛋白表达的影响

Figure 3 The effects of fluoxetine on the expression levels of SREBP1c, ACC1 and FAS in the liver tissue

或 25 mg/kg)24 h 后,小鼠肝脏 CES1 和 CES3 的蛋白表达水平较生理盐水组显著降低,且给予氟西汀(25 mg/kg)24 h 后,CES1 和 CES3 的蛋白水平进一步减少,差异均具有统计学意义。

3 讨论

氟西汀(又名百忧解)是 SSRI 类抗抑郁药中临床应用最广泛的药物。尽管近年来出现了各种新型药物,但由于高知名度及售价的低廉性,使得氟西汀仍然是广大抑郁症患者的首选用药^[5]。2009 年美国一项患者用药安全检测机构名为 iGuard.org 监测结果表明,在调查的 700 余名服用 SSRI 的患者中,伴有体重增加不良反应的患者比率高达 49%^[10]。这一药源性体重增加的不良反应增加了患者其他代谢性疾病如高血压、糖尿病发生的风险。

目前对于体重增加这一不良反应的研究多数集中在中枢神经系统,而很少针对外周代谢器官展开研究。因此本研究着眼于氟西汀对机体主要的脂质代谢器官——肝脏的影响。本研究发现,氟西汀单次给药增加小鼠肝脏甘油三酯的积累,而对总胆固醇没有影响,表明氟西汀对小鼠肝脏脂质代谢的影响可能与甘油三酯关系更为密切。而目前针对其他抗精神病药氯氮平或奥氮平的不良反应的研究也发现其引起甘油三酯增加的程度大于胆固醇的

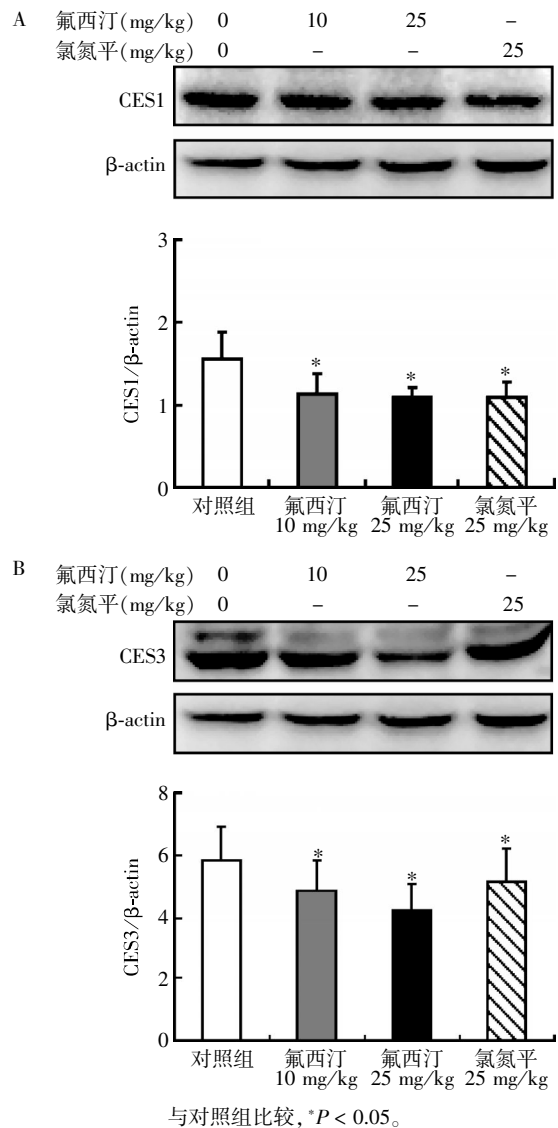


图 4 氟西汀对小鼠肝脏 CES1(A)和 CES3(B)蛋白表达水平的影响

Figure 4 The effects of fluoxetine on the expression levels of CES1 (A) and CES3 (B) in the liver tissue

增加。这些结果指出甘油三酯的积累在抗精神药物的代谢性不良反应的发生中可能具有关键的作用。不过在本研究中由于仅研究氟西汀单次给药的影响,因此不能排除氟西汀影响肝脏总胆固醇代谢的可能性。

SREBP1c 属于高度保守的“碱性螺旋-环-螺旋-亮氨酸拉链”(bHLH-Zip)转录因子家族,以发夹的结构定位于内质网和核包被上,在调控脂肪酸合成基因的表达中具有关键的转录调控作用^[22]。为了解释上述氟西汀导致甘油三酯积累增加的机制,进一步研究了氟西汀作用后 SREBP1c 及其下游关键基因的表达水平。结果表明,氟西汀刺激后小鼠肝脏 SREBP1c 及其下游基因 ACC1 和 FAS 的蛋白表

达水平高于生理盐水组,并随着氟西汀剂量的增加蛋白表达量进一步升高。Yang 等^[23]报道在奥氮平刺激的 3T3-L1 细胞中 SREBP1 被激活并过表达; Raeder 等^[24]报道抗抑郁药氟西汀等增加星形胶质细胞 SREBP1c 及其下游基因的活化,导致胶质细胞脂质代谢异常。这些结果提示抗精神病和抗抑郁药对脂质代谢的影响可能与 SREBP1c 有密切联系。

另一方面,本研究还观察了氟西汀刺激对肝脏脂解途径的影响。羧酸酯酶是多基因调控的 α/β 折叠蛋白水解酶超家族的成员,广泛表达于哺乳动物的肝脏、小肠、肾、肺、胃、结肠、睾丸组织中,且肝脏中表达水平最高。羧酸酯酶可水解催化众多内源性化合物如短链和长链酰基甘油、长链酰基肉毒碱及长链碱基辅酶 A 酯等以及许多药物。目前研究已经表明羧酸酯酶在脂质代谢过程中发挥重要作用,并可能作为治疗靶标参与代谢性疾病如糖尿病或动脉粥样硬化的治疗^[16,19]。本研究首次发现给予小鼠氟西汀 24 h 后肝脏 CES1 和 CES3 的表达较对照组明显减少,且氟西汀剂量增加时进一步降低。Wei 等^[25]报道在 McArdle-RH7777 细胞中稳定转染小鼠 CES1 的 cDNA 引起甘油三酯的积累显著减少。结果表明氟西汀可能通过下调小鼠 CES1 和 CES3 表达,减少甘油三酯的分解,促进肝脏甘油三酯的积累。目前关于羧酸酯酶的调节机制尚未充分了解,氟西汀调节 CES 表达的机制将在后续的研究中进一步深入。有趣的是,Geshi 等^[26]研究发现小鼠 CES1 启动子上可能含有 SREBP1 结合位点,提示羧酸酯酶的调控可能也与转录因子 SREBP1 有关,但是确切的证据还需要进一步研究。

总之,本研究发现单次给予氟西汀刺激诱导小鼠肝脏甘油三酯积累,可能与 SREBP1c 及其下游脂质合成基因 ACC1 和 FAS 的调控有关,且小鼠肝脏中 CES1 和 CES3 的下调可能也参与了氟西汀对甘油三酯积累的影响。结果提示氟西汀所致代谢性不良反应如体重增加和脂代谢紊乱除了通过中枢机制外,还可能通过直接干扰肝脏脂质代谢而产生。本研究发现氟西汀对肝脏脂代谢的调节作用将促进抗抑郁药致代谢性不良反应的机制研究,并为其预防和干预提供新的靶标和方法。

[参考文献]

[1] Insel TR, Charney DS. Research on major depression: strategies and priorities [J]. *JAMA*, 2003, 289(23): 3167-3168
[2] Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, et al. Global and re-

gional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data [J]. *Lancet*, 2006, 367(9524): 1747-1757
[3] Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030 [J]. *PLoS Med*, 2006, 3(11): e442
[4] Freeborough A, Kimpton J. Discovering new genetic and psychosocial pathways in major depressive disorder: the New Mood project [J]. *Psychiatr Danub*, 2011, 23 (Suppl 1): S138-S141
[5] Wong DT, Perry KW, Bymaster FP. Case history: the discovery of fluoxetine hydrochloride (Prozac) [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2005, 4(9): 764-774
[6] Mastronardi C, Paz-Filho GJ, Valdez E, et al. Long-term body weight outcomes of antidepressant-environment interactions [J]. *Mol Psychiatry*, 2011, 16(3): 265-272
[7] Jazayeri S, Tehrani-Doost M, Keshavarz SA, et al. Comparison of therapeutic effects of omega-3 fatty acid eicosapentaenoic acid and fluoxetine, separately and in combination, in major depressive disorder [J]. *Aust N Z J Psychiatry*, 2008, 42(3): 192-198
[8] Masand PS, Gupta S. Long-term side effects of newer-generation antidepressants: SSRIS, venlafaxine, nefazodone, bupropion, and mirtazapine [J]. *Ann Clin Psychiatry*, 2002, 14(3): 175-182
[9] Kivimäki M, Hamer M, Batty GD, et al. Antidepressant medication use, weight gain, and risk of type 2 diabetes [J]. *Diabetes Care*, 2010, 33(12): 2611-2616
[10] Cascade E, Kalali AH, Kennedy SH. Real-World data on SSRI antidepressant side effects [J]. *Psychiatry (Edgmont)*, 2009, 6(2): 16-18
[11] Warden D, Trivedi MH, Wisniewski SR, et al. Early adverse events and attrition in selective serotonin reuptake inhibitor treatment: a suicide assessment methodology study report [J]. *J Clin Psychopharmacol*, 2010, 30(3): 259-266
[12] Menendez JA, Vazquez-Martin A, Ortega FJ, et al. Fatty acid synthase: association with insulin resistance, type 2 diabetes, and cancer [J]. *Clin Chem*, 2009, 55(3): 425-438
[13] Cheng D, Chu CH, Chen L, et al. Expression, purification, and characterization of human and rat acetyl coenzyme A carboxylase (ACC) isozymes [J]. *Protein Expr Purif*, 2007, 51(1): 11-21
[14] Ferre P, Foufelle F. Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2010, 12(Suppl 2): 83-92
[15] Raeder MB, Ferno J, Vik-Mo AO, et al. SREBP activation by antipsychotic- and antidepressant-drugs in cultured

- human liver cells;relevance for metabolic side-effects? [J]. Mol Cell Biochem,2006,289(1-2):167-173
- [16] Quiroga AD,Lehner R. Liver triacylglycerol lipases [J]. Biochim Biophys Acta,2012,1821(5):762-769
- [17] Reid BN,Ables GP,Otlivanchik OA,et al. Hepatic over-expression of hormone-sensitive lipase and adipose triglyceride lipase promotes fatty acid oxidation,stimulates direct release of free fatty acids,and ameliorates steatosis [J]. J Biol Chem,2008,283(19):13087-13099
- [18] Cygler M,Schrag JD,Sussman JL,et al. Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases,lipases,and related proteins [J]. Protein Science,1993,2(3):366-382
- [19] Dolinsky VW,Gilham D,Alam M,et al. Triacylglycerol hydrolase:role in intracellular lipid metabolism [J]. Cell Mol Life Sci,2004,61(13):1633-1651
- [20] Ko KW,Erickson B,Lehner R. Es-x/Ces1 prevents triacylglycerol accumulation in McArdle-RH7777 hepatocytes[J]. Biochim Biophys Acta,2009,1791(12):1133-1143
- [21] Ferno J,Vik-Mo AO,Jassim G,et al. Acute clozapine exposure in vivo induces lipid accumulation and marked sequential changes in the expression of SREBP,PPAR,and LXR target genes in rat liver [J]. Psychopharmacology (Berl),2009,203(1):73-84
- [22] Sato R. SREBPs:protein interaction and SREBPs [J]. FEBS J,2009,276(3):622-627
- [23] Yang LH,Chen TM,Yu ST,et al. Olanzapine induces SREBP-1-related adipogenesis in 3T3-L1 cells [J]. Pharmacol Res,2007,56(3):202-208
- [24] Raeder MB,Ferno J,Glambek M,et al. Antidepressant drugs activate SREBP and up-regulate cholesterol and fatty acid biosynthesis in human glial cells [J]. Neurosci Lett,2006,395(3):185-190
- [25] Wei E,Ben AY,Lyon J,et al. Loss of TGH/Ces3 in mice decreases blood lipids,improves glucose tolerance,and increases energy expenditure [J]. Cell Metab,2010,11(3):183-193
- [26] Geshi E,Kimura T,Yoshimura M,et al. A single nucleotide polymorphism in the carboxylesterase gene is associated with the responsiveness to imidapril medication and the promoter activity [J]. Hypertens Res,2005,28(9):719-725

[收稿日期] 2011-04-13

喜 讯

本刊再次入编《中文核心期刊要目总览》2011年版(第6版)之综合医药卫生类核心期刊,这是本刊连续4届被确定为中文核心期刊。