online © ML Comm
ORIGINAL ARTICLE
ISSN 1225-8709 / eISSN 2005-7571
Korean J Biol Psychiatry 2012;19:187-192

항정신병약물 클로자핀이 흰쥐 뇌실로 주입한 인슐린의 반응에 미치는 영향

서울대학교 의학연구원 인간행동의학연구소,[1] 서울대학교병원 의생명연구원,[2]
서울대학교 의과대학 의과학과,[3] 동국대학교 의과대학 일산병원 정신건강의학과[4]
김세현[1,2] · 유현숙[2,3] · 박소영[2] · 김민경[3] · 박홍근[2,3] · 김용식[4]

The Effect of Clozapine on Central Insulin Response in Rats

Se Hyun Kim, MD,[1,2] Hyun Sook Yu, MS,[2,3] So Young Park, MS,[2]
Min Kyung Kim, MS,[3] Hong Geun Park, PhD,[2,3] Yong Sik Kim, MD[4]

[1]Institute of Human Behavioral Medicine, Medical Research Center, Seoul National University, Seoul, Korea
[2]Biomedical Research Institute, Seoul National University Hospital, Seoul, Korea
[3]Department of Biomedical Sciences, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea
[4]Department of Neuropsychiatry, Dongguk University Ilsan Hospital, Goyang, Korea

Objectives Although antipsychotic drug clozapine has superior efficacy, this is hampered by metabolic side effects such as weight gain and diabetes. Recent studies demonstrate that clozapine induces insulin resistance. However, the identity and location of insulin resistance induced by clozapine has not been clarified. In this study, the effect of clozapine on central insulin response was investigated in rats.

Methods Male Sprague-Dawley rats received intraperitoneal injection of clozapine or vehicle, which was followed by intracerebroventricular injection of insulin or its vehicle. The effects of clozapine on insulin-induced changes in blood glucose level and Akt phosphorylation in hypothalamus were investigated.

Results Intraperitoneal injection of clozapine (20 mg/kg) increased blood glucose in rats. Intracerebroventricular injection of insulin reduced blood glucose in rats, which was blunted by pretreatment of clozapine. Accompanied with the antagonistic effect of clozapine to central insulin action in terms of blood glucose, clozapine inhibited the insulin-induced phosphorylation of Akt at Ser473 in rat hypothalamus.

Conclusion Administration of clozapine inhibited the central insulin-induced changes in blood glucose and Akt phosphorylation in rat hypothalamus. These findings suggest that hypothalamus could be the site of action for the clozapine-induced insulin resistance.

Key Words Atypical antipsychotics · Insulin resistance · Blood glucose · Hypothalamus · Akt.

Received: July 10, 2012 / **Revised:** July 13, 2012 / **Accepted:** July 16, 2012
Address for correspondence: Se Hyun Kim, MD
Institute of Human Behavioral Medicine, Medical Research Center, Seoul National University, 101 Daehak-ro, Jongno-gu, Seoul 110-744, Korea
Tel: +82-2-2072-2457, **Fax:** +82-2-744-7241, **E-mail:** sh3491@snu.ac.kr

서 론

비정형 항정신병약물은 기존의 정형 항정신병약물과 비교하여 추체외로 증상과 지연성 운동장애를 포함한 운동 부작용을 적게 유발하고, 음성 증상, 인지장애, 기분 증상 등에 치료 효과를 보이는 등 장점을 지니고 있다. 그러나 비정형 항정신병약물은 체중 증가, 지질 및 당 조절 이상과 같은 대사 부작용을 유발하며, 이는 장기 유지 치료의 큰 장애물로 작용한다.[1)] 대사 부작용의 하나로서 비정형 항정신병약물은 제2형 당뇨병 발병의 위험을 증가시킨다.[1-5)] 비정형 항정신병약물은 정형 항정신병약물에 비하여 유의하게 당뇨병의 유병률을 증가시켰으며,[5)] 클로자핀 투여 중인 조현병 및 조현정동장애 환자를 10년간 추적한 결과, 43%의 환자에서 새롭게 당뇨병이 발생하였다.[4)]

그러나 비정형 항정신병약물에 의해 유발되는 당뇨병의 원인

Copyright © 2012 Korean Society of Biological Psychiatry

기전은 아직 잘 알려져 있지 않다. 비정형 항정신병약물은 인슐린 분비 저하보다는 인슐린 저항성 유발을 통해 당뇨병을 유발하는 것으로 생각되고 있다.[3)6)] 세로토닌, 노르아드레날린 수용체 등에 대한 작용이 인슐린 저항성을 유발하는 것으로 보고되기도 하였으며,[7)] 약물 치료에 따른 체중 증가 및 복부 비만이 이차적으로 인슐린 저항성을 유발하는 것으로 생각되기도 하였다.[1)8)] 하지만 최근 보고에 따르면 비정형 항정신병약물에 의한 인슐린 저항성 유발은 체중이나 비만도 증가와는 독립적인 현상으로 보인다.[3)9)]

클로자핀이 세포 분자 수준에서 직접 인슐린 저항성을 유발함이 알려졌다. 인슐린은 인슐린 수용체를 통해 Akt를 포함한 하위 인산화 효소의 활성 변화를 유발하며, glucose transporter(이하 GLUT)의 세포막 이동을 유발하여 세포 내로 당 유입을 증가시킨다.[10)] 클로자핀은 인슐린에 의한 세포의 당 유입을 억제하였다.[11)12)] 또한 클로자핀은 인슐린에 의한 Akt 및 인슐린 수용체의 주요 하위 조절자인 insulin receptor substrate(이하 IRS)의 인산화 변화에 영향을 주며, GLUT 발현 변화를 유발한다고 보고되기도 하였다.[12)13)]

동물 실험을 통해 생체 수준에서도 클로자핀이 인슐린 저항성을 유발함이 보고되었다.[6)] 그러나 이와 관련된 표적 부위 및 기전은 아직 잘 알려져 있지 않다. 생체 내에서 인슐린 및 당의 조절은 다양한 기관의 상호작용을 통해 이루어진다. 췌장, 간, 근육 등의 기관은 당 및 인슐린의 합성을 조절하고 인슐린의 일차 표적 기관으로 작동한다. 한편, 뇌 시상하부(hypothalamus)는 전체 개체 수준의 당 및 에너지 상태에 대한 중심 조절자의 역할을 한다.[14-16)] 비정형 항정신병약물에 의한 인슐린 저항성 유발에 있어서 뇌 및 시상하부의 관련 가능성이 보고되었다. 클로자핀에 의한 당 대사 이상과 시상하부-뇌하수체-부신 축 이상의 관련성이 보고되었으며,[17)] 올란자핀을 뇌로만 주입한 경우에도 간에서 인슐린 저항성이 유발되었다.[18)] 이는 비정형 항정신병약물에 의한 인슐린 저항성 유발에 있어서 시상하부를 포함한 뇌내 작용의 중요성을 시사한다.

본 연구에서는 흰쥐 뇌실로 주입한 인슐린에 의한 혈당 및 시상하부 Akt 인산화 변화에 클로자핀 처치가 미치는 영향을 분석하였다. 이를 통해 클로자핀이 뇌 인슐린 작용에 미치는 영향을 조사하였다.

방 법

실험동물

동일한 실험 조건에서 사육한 체중 200~250 g의 Sprague-Dawley 수컷 흰쥐를 사용하였다. 실험동물은 사육실에 반입된 후 1주일의 적응 기간을 가졌으며, 12/12시간 명암주기 하에서 먹이와 물을 자유롭게 섭취하였다. National Institute of Health 실험 동물 윤리 지침에 기반하여 실험을 수행하였다.

약물 처치 및 혈당 측정

약물 처치 30분 전부터 흰쥐의 먹이 및 물 섭취를 제한하였다. 클로자핀(Tocris, St. Louis, MO, USA)은 0.3% tartaric acid 용매에 녹인 후 페하를 6.0으로 조정하였다. 클로자핀 10 또는 20 mg/kg을 흰쥐의 복강 내로 주사하였다. 인슐린 (100 mU, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)은 인공뇌척수액(Harvard Apparatus, S. Natick, MA, USA)에 녹여, 마이크로 펌프(KD Scientific, Holliston, MA, USA)를 이용하여 5 μL의 부피로 1분동안 도관을 통해 측뇌실로 주입하였다. 인슐린 뇌실 주사 농도는 뇌 인슐린 작용 관련 문헌의 실험 조건에 근거하여 결정하였다.[19)]

클로자핀 또는 0.3% tartaric acid를 복강 주사하고 1시간 30분 후에 인슐린 또는 인공뇌척수액을 뇌실 주입하였으며, 그로부터 30분 후 흰쥐를 단두 희생하여 뇌를 적출하고, 몸체의 혈액을 받아 혈당 측정기(CONTOUR TS Blood Glucose Meter, Bayer, Seoul, Korea)를 이용하여 혈당을 측정하였다(Fig. 1).

뇌실내 삽관(Intracerebroventricular cannula placement)

뇌실내 삽관은 본 연구진의 이전 논문에 기술된 방법에 의거하여 수행하였다.[20)21)] 케타민(40 mg/kg, Yuhan, Seoul, Korea) 및 자일라진(xylazine 18.64 mg/kg, Bayer, Seoul, Korea)을 주사하여 흰쥐를 마취하고 정위 기구(Narishige, Tokyo, Japan)에 고정하였다. 두피를 절개하고 드릴을 통해 두개골의 구멍을 뚫고, 측뇌실 정위 좌표(Bregma coordinates : AP -1 mm, ML 2.5 mm, DV 3.5 mm)에 맞추어 제작한 도관(Plastics One, Roanoke, VA, USA)을 삽입하였다. 흰쥐는 수술 후 1주일간 회복 기간을 가진 후 실험에 사용되었다.

뇌조직 적출

단두 희생한 흰쥐에서 즉시 뇌를 꺼내고, 얼음 평판 위에서 시상하부를 분리하였다. 분리한 조직은 즉시 균질완충액(10

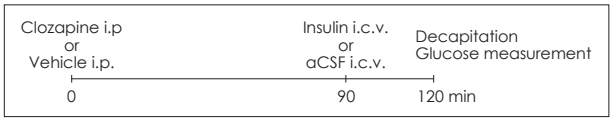

Fig. 1. Time schedule of drug treatment and glucose measurement. At 90 min after intraperitoneal (i.p.) injection of clozapine (CZP) or vehicle (VEH), insulin (INS) or artificial cerebrospinal fluid (aCSF) was injected through intracerebroventricular (i.c.v.) cannula. At 30 min after injection of insulin or aCSF, rats were decapitated and blood glucose level was measured with a glucometer.

mM EGTA, 5 mM MgCl2, 1 mM DTT, 10 g/mL leupeptin, 20 g/mL aprotinin, 1 mM APMSF, 0.1 mM NaF, 1 mM sodium orthovanadate, 20 mM Tris/HCl at pH 7.5)을 가한 후 유리-테플론 균질기로 균질화하였다. 이 균질액을 12000×g (4℃)에서 10분간 원침하여 얻은 상청액을 시료로 사용하였다. 모든 조작은 얼음 위에서 시행하였다.

전기영동 및 면역블롯

전기영동 및 면역블롯은 본 연구진의 이전 논문에 기술된 방법에 의거하여 수행하였다.[20)21)] 10% polyacrylamide 젤을 사용하였으며, 각 lane당 총 단백질 양으로 50 μg의 시료를 사용하였다. 1 : 2000으로 희석한 phospho-Akt(Ser473)(Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), Akt, β-actin(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) 항체 및 1 : 1000으로 희석한 horseradish peroxidase 결합 2차 항체를 이용하였으며, ECL-detection reagent(Amersham, Bucks, UK)로 발광하게 한 후 X-ray 필름에 감광시켜 현상하였다. 면역블롯 신호는 TINA program version 2.10 G(Raytest, Straubenhardt, Germany)을 이용하여 정량화하였으며, Akt 인산화 값은 Akt 전체 단백질 값에 대한 비율을 구하여 통계 분석에 사용하였다.

통계분석

혈당 수치 및 정량화된 면역 블롯 신호 값을 이용하여 통계분석을 수행하였다. 일원분산분석을 수행하고, Tukey 사후분석을 통해 각 군 간의 차이를 분석하였다. 통계분석은 SPSS for Windows version 19.0(IBM SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하였으며, 유의수준을 $p < 0.05$로 하였다.

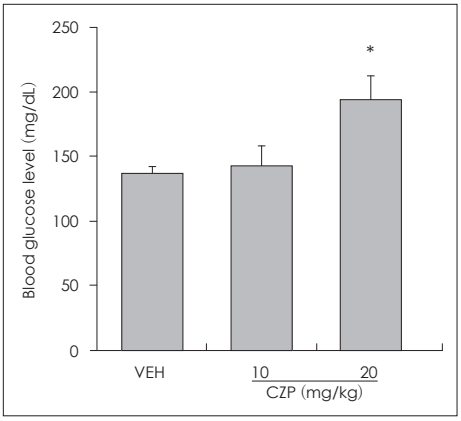

Fig. 2. The effect of clozapine on blood glucose level in rats. At 2 h after intraperitoneal injection of vehicle (VEH) or clozapine (CZP : 10 and 20 mg/kg), blood glucose level was measured with a glucometer. Presented values are blood glucose levels and given as the average values and standard errors (n = 5–8 for each treatment group). Statistically significant differences ($p < 0.05$) were indicated as * : compared to vehicle control group.

결 과

클로자핀 처치 후 흰쥐에서 혈당의 변화

흰쥐에 클로자핀 (10, 20 mg/kg) 또는 tartaric acid를 복강 내로 주사하고 2시간 후 혈당을 측정하였다. 측정된 혈당 (평균 ± 표준편차)은 다음과 같다. 대조군 혈당은 136.58 ± 20.65 mg/dL, 클로자핀 10 mg/kg 군은 142.60 ± 33.95 mg/dL, 20 mg/kg 군은 193.80 ± 40.75 mg/dL이었다. 클로자핀은 유의한 혈당 변화를 유발하였다($F = 7.127$, $p = 0.005$). 사후 분석 결과, 클로자핀 20 mg/kg 군에서 대조군에 비해 유의하게 혈당이 높았다($p = 0.002$)(Fig. 2).

클로자핀이 뇌실로 주사한 인슐린의 혈당 변화에 미치는 영향

클로자핀 (20 mg/kg)은 복강 주사하였으며, 인슐린(100 mU)은 뇌실 도관을 통해 주입하였다. 대조군 평균 혈당은 138.40 ± 10.36 mg/dL, 클로자핀 단독 처치 군은 188.80 ± 20.07 mg/dL, 인슐린 단독 처치군은 111.40 ± 6.88 mg/dL, 클로자핀 및 인슐린 처치 군에서는 150.20 ± 21.65 mg/dL이었다. 클로자핀 및 인슐린 처치에 의해 혈당이 유의하게 변화하였다($F = 9.173$, $p = 0.002$). 인슐린 뇌실 주입은 대조군에 비해 유의하게 혈당을 감소시켰으며($p = 0.018$), 클로자핀을 주사한 후 인슐린을 뇌실로 주입한 경우, 인슐린 단독 처치 군에 비하여 유의

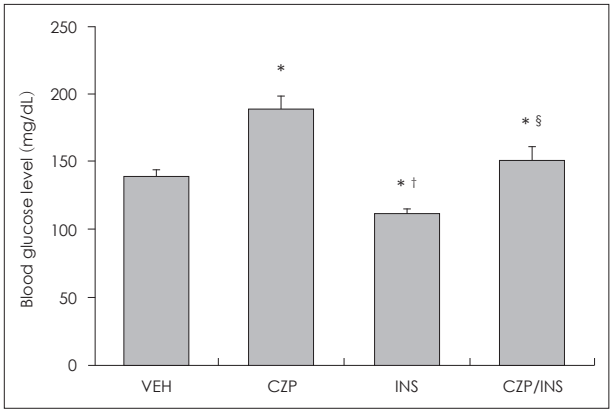

Fig. 3. The effect of clozapine on the changes in blood glucose level in response to intracerebroventricular injection of insulin in rats. Clozapine (CZP) and/or insulin (INS) were administered to rats followed by glucose measurements as presented in Fig. 1. Vehicle (VEH) indicates vehicle control group. Presented values are blood glucose levels and given as the average values and standard errors (n = 4–6 for each treatment group). Statistically significant differences ($p < 0.05$) were indicated as * : compared to vehicle control group, † : compared to clozapine group, and § : compared to insulin group, respectively.

하게 혈당이 높았다(p = 0.024)(Fig. 3).

클로자핀이 뇌실로 주사한 인슐린의 시상하부 Akt 인산화 변화에 미치는 영향

클로자핀의 뇌 인슐린 작용에 대한 영향과 시상하부의 관련성을 조사하기 위해 Akt 인산화를 조사하였다. Akt의 Ser473 잔기 인산화는 인슐린에 의한 Akt 효소 활성을 반영한다.[22] 클로자핀 및 인슐린 처치에 의해 Akt 인산화는 유의하게 변화하였으며(F = 10.811, p = 0.001), Akt 전체 단백질의 변화는 없었다. 클로자핀(p = 0.021) 및 인슐린 뇌실 주입(p < 0.001)은 각각 시상하부에서 Akt Ser473 잔기 인산화의 유의한 증가를 유발하였다. 클로자핀을 주사한 후 인슐린을 뇌실 주입한 군의 Akt 인산화 수준은 인슐린 뇌실 단독 처치 군에서의 Akt 인산화 수준에 비해서 유의하게 낮았다(p = 0.010)(Fig. 4).

고 찰

본 연구에서 클로자핀은 뇌실로 주입한 인슐린에 의한 흰쥐의 혈당 저하를 억제하였다. 또한 뇌실로 주입한 인슐린은 시상하부에서 Akt 인산화 증가를 유발하였으며, 이 역시 클로자핀 전처치가 억제하였다. 이를 통해 클로자핀의 뇌 인슐린 반응에 대한 길항 작용을 확인하였다.

뇌실로 주입한 인슐린은 혈당을 감소시켰으며, 이는 시상하부를 통한 작용으로 잘 알려져 있다.[23] 시상하부는 에너지 조절 체계의 중심 역할을 하여, 당뇨병, 비만, 고지혈증 등의 병리에 관여한다.[24-26] 혈중 호르몬 및 영양분은 시상하부의 궁상핵(arcuate nucleus)에 작용하여 당 대사에 영향을 준다.[27] 궁상핵에는 세포토닌 및 도파민 수용체 등의 다양한 신경전달물질 수용체가 충분히 발현되고 있어서 비정형 항정신병약물 유발성 대사 부작용의 중심 표적이 될 수 있다.[28] 클로자핀 처치는 뇌실로 주입한 인슐린에 의한 혈당 강하 작용을 억제하였으며, 이는 클로자핀이 시상하부에서 인슐린 작용을 억제함을 시사한다.

인슐린 수용체는 phosphoinositide 3-kinase(이하 PI3K)를 매개로 Akt 활성화를 유발하여 관련 인슐린의 작용을 조절한다.[10][29] 특히 시상하부에서 인슐린에 의한 PI3K-Akt 신호전달계 활성화는 식욕 저하를 유발하며, 해당 분자 기전의 장애는 비만을 유발한다.[22][23] 클로자핀은 시상하부에서 인슐린에 의해 유발된 Akt 인산화를 감소시켰다. 향후 클로자핀에 의한 식욕 및 체중 증가 등에 대한 영향에 있어서도 시상하부 인슐린 억제 작용의 관련성 분석이 필요할 것으로 생각된다. 한편, 클로자핀의 흰쥐 뇌 및 다양한 세포주에서 Akt 활성화가 보고되었다.[30-34] 클로자핀은 시상하부에서도 Akt 활성화를 유발하였으나, 인슐린에 의한 Akt 활성화는 억제하였다. 클로자핀에 의한 Akt 활성화는 인슐린에 의한 작용과는 차별적인 기전을 갖거나, 동반된 다른 분자 기전이 인슐린에 의한 Akt 활성화 억제에 관여할 것으로 생각된다. 이에 대한 향후 연구가 요구되는 바이다.

한편, 클로자핀 및 올란자핀이 시상하부에서 당 대사 및 간 인슐린 작용의 민감성 조절 중요한 역할을 하는 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase(이하 AMPK)에도 영향을 주는 것으로 보고되었다.[18][35] 본 연구 결과와 함께 시상하부 AMPK 활성화 결과는 비정형 항정신병약물의 대사 부작용의 표적 부위로서 시상하부의 중요성을 시사한다.

실험 동물에서 비정형 항정신병약물에 의한 대사 지표 변화 여부는 실험 조건에 따라서 그 결과가 다양하였다.[36] 흰쥐의 성별에 따른 클로자핀의 혈당 증가 효과가 차이가 있다는 보고가 있었다. 클로자핀 7.5 mg/kg 주사 1시간 후 여자 흰쥐에서는 혈당이 유의하게 증가하였지만, 남자 흰쥐에서는 그렇지 않았다.[17] 이와 관련하여 여자 흰쥐가 더 유용한 실험 조건으로 시사되기도 하였다.[37] 본 실험에서는 남자 흰쥐를 사용하였다. 본 연구

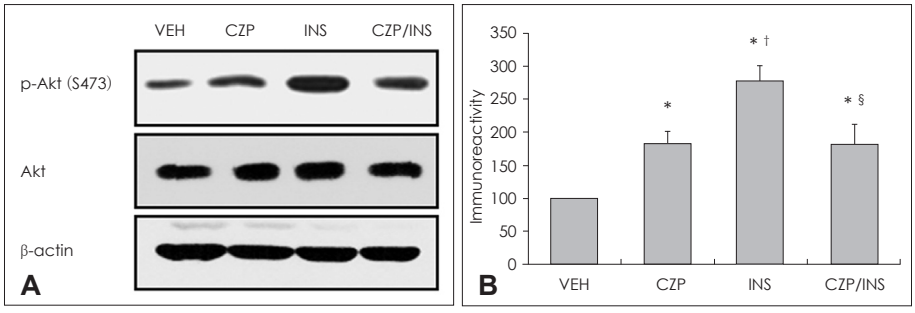

Fig. 4. The effect of clozapine on the changes in Akt phosphorylation in response to intracerebroventricular injection of insulin in rat hypothalamus. A : Representative immunoblots of p-Akt (Ser473), Akt, and β-actin in rat hypothalamus after intraperitoneal injection of clozapine (CZP) and/or intracerebroventricular injection of insulin (INS) as presented Fig. 1. Vehicle (VEH) indicates vehicle control group. β-actin was demonstrated as a loading control. B : Quantification of the immunoblot data using a densitometric analysis of band intensity. Data are expressed as the relative optical density (OD) and given as average values and standard errors (n = 4–6 for each treatment group). The relative ODs are percentages of the OD of each vehicle control. Statistically significant differences (p < 0.05) were indicated as * : compared to vehicle control group, † : compared to clozapine group, and § : compared to insulin group, respectively.

에서도 클로자핀 10 mg/kg은 혈당의 증가를 유발하지 않았지만, 20 mg/kg 주사 2시간 후 유의한 혈당 증가를 확인할 수 있었다. 본 연구와 동일한 Sprague-Dawley 남자 흰쥐에서 20 mg/kg에 의한 급성 혈당 증가가 보고되기도 하여서,[38] 이는 클로자핀의 혈당 증가 기전 연구를 위한 유효한 실험 조건으로 생각된다. 비정형 항정신병약물에 의한 대사 부작용의 기전 규명을 위해서는 세포주 실험을 넘어서 생체 내에서의 작용을 확인할 수 있는 동물 연구가 필요하다. 따라서 관련 실험 조건의 확립은 매우 중요하다.

비정형 항정신병약물의 인슐린 신호전달계에 대한 영향은 대사 부작용뿐 아니라 치료 작용에 관련되어 있을 수도 있다.[39] Akt 및 그 하위의 glycogen synthase kinase-3β는 치료 표적 분자로서의 가능성을 지니며, insulin-like growth factor(이하 IGF) 및 leptin, ghrelin 등의 adipokine들 역시 대사 조절 기능뿐 아니라 기분, 인지 등에 영향을 준다.[39] 한편 조현병 환자의 대사 부작용에는 약물 복용뿐 아니라 다양한 환경적 요인 및 유전적 요인이 함께 관여하는 것으로 보인다.[1)40-42] 따라서 항정신병약물에 의한 대사 부작용 유발 기전에 대한 연구는 새로운 치료 작용 기전 및 조현병 병태생리 이해 증진에도 도움이 될 것이다.

본 연구에서는 클로자핀이 뇌 인슐린 작용을 억제함을 확인하였다. 클로자핀은 개별 세포 수준에서의 작용을 넘어서 뇌를 통해 전체 생체 수준에서 인슐린 저항성을 유발할 수 있음이 시사된다. 향후 세부 분자 기전 및 비정형 항정신병약물의 시상하부를 통한 다양한 대사 지표 이상 기전에 대한 확장 연구가 필요할 것으로 생각된다.

중심 단어: 비정형 항정신병약물·인슐린 저항성·혈당·시상하부·Akt.

Acknowledgments

본 연구는 보건복지가족부 보건의료연구개발사업(A101507) 지원에 의하여 이루어진 것임.

Conflicts of interest

The authors have no financial conflicts of interest.

REFERENCES

1) **Newcomer JW.** Metabolic considerations in the use of antipsychotic medications: a review of recent evidence. J Clin Psychiatry 2007;68 Suppl 1:20-27.
2) **Henderson DC, Cagliero E, Gray C, Nasrallah RA, Hayden DL, Schoenfeld DA, et al.** Clozapine, diabetes mellitus, weight gain, and lipid abnormalities: a five-year naturalistic study. Am J Psychiatry 2000;157:975-981.
3) **Henderson DC, Copeland PM, Borba CP, Daley TB, Nguyen DD, Cagliero E, et al.** Glucose metabolism in patients with schizophrenia treated with olanzapine or quetiapine: a frequently sampled intravenous glucose tolerance test and minimal model analysis. J Clin Psychiatry 2006;67:789-797.
4) **Henderson DC, Nguyen DD, Copeland PM, Hayden DL, Borba CP, Louie PM, et al.** Clozapine, diabetes mellitus, hyperlipidemia, and cardiovascular risks and mortality: results of a 10-year naturalistic study. J Clin Psychiatry 2005;66:1116-1121.
5) **Sernyak MJ, Leslie DL, Alarcon RD, Losonczy MF, Rosenheck R.** Association of diabetes mellitus with use of atypical neuroleptics in the treatment of schizophrenia. Am J Psychiatry 2002;159:561-566.
6) **Houseknecht KL, Robertson AS, Zavadoski W, Gibbs EM, Johnson DE, Rollema H.** Acute effects of atypical antipsychotics on whole-body insulin resistance in rats: implications for adverse metabolic effects. Neuropsychopharmacology 2007;32:289-297.
7) **Nasrallah HA.** Atypical antipsychotic-induced metabolic side effects: insights from receptor-binding profiles. Mol Psychiatry 2008; 13:27-35.
8) **American Diabetes Association; American Psychiatric Association; American Association of Clinical Endocrinologists; North American Association for the Study of Obesity.** Consensus development conference on antipsychotic drugs and obesity and diabetes. Diabetes Care 2004;27:596-601.
9) **Kim SH, Nikolics L, Abbasi F, Lamendola C, Link J, Reaven GM, et al.** Relationship between body mass index and insulin resistance in patients treated with second generation antipsychotic agents. J Psychiatr Res 2010;44:493-498.
10) **Hou JC, Pessin JE.** Ins (endocytosis) and outs (exocytosis) of GLUT4 trafficking. Curr Opin Cell Biol 2007;19:466-473.
11) **Ardizzone TD, Bradley RJ, Freeman AM 3rd, Dwyer DS.** Inhibition of glucose transport in PC12 cells by the atypical antipsychotic drugs risperidone and clozapine, and structural analogs of clozapine. Brain Res 2001;923:82-90.
12) **Panariello F, Perruolo G, Cassese A, Giacco F, Botta G, Barbagallo AP, et al.** Clozapine impairs insulin action by up-regulating Akt phosphorylation and Ped/Pea-15 protein abundance. J Cell Physiol 2012;227:1485-1492.
13) **Dwyer DS, Pinkofsky HB, Liu Y, Bradley RJ.** Antipsychotic drugs affect glucose uptake and the expression of glucose transporters in PC12 cells. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 1999;23: 69-80.
14) **Hill JW, Elmquist JK, Elias CF.** Hypothalamic pathways linking energy balance and reproduction. Am J Physiol Endocrinol Metab 2008;294:E827-E832.
15) **Levin BE, Magnan C, Dunn-Meynell A, Le Foll C.** Metabolic sensing and the brain: who, what, where, and how? Endocrinology 2011; 152:2552-2557.
16) **Routh VH.** Glucose sensing neurons in the ventromedial hypothalamus. Sensors (Basel) 2010;10:9002-9025.
17) **Tulipano G, Rizzetti C, Bianchi I, Fanzani A, Spano P, Cocchi D.** Clozapine-induced alteration of glucose homeostasis in the rat: the contribution of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation. Neuroendocrinology 2007;85:61-70.
18) **Martins PJ, Haas M, Obici S.** Central nervous system delivery of the antipsychotic olanzapine induces hepatic insulin resistance. Diabetes 2010;59:2418-2425.
19) **García-San Frutos M, Fernández-Agulló T, De Solís AJ, Andrés A, Arribas C, Carrascosa JM, et al.** Impaired central insulin response in aged Wistar rats: role of adiposity. Endocrinology 2007;148: 5238-5247.
20) **Kim SH, Yu HS, Park HG, Jeon WJ, Song JY, Kang UG, et al.** Dose-dependent effect of intracerebroventricular injection of ouabain on the phosphorylation of the MEK1/2-ERK1/2-p90RSK pathway in the rat brain related to locomotor activity. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 2008;32:1637-1642.
21) **Yu HS, Kim SH, Park HG, Kim YS, Ahn YM.** Intracerebroventricular administration of ouabain, a Na/K-ATPase inhibitor, activates tyro-

sine hydroxylase through extracellular signal-regulated kinase in rat striatum. Neurochem Int 2011;59:779-786.
22) **Niswender KD, Morrison CD, Clegg DJ, Olson R, Baskin DG, Myers MG Jr, et al.** Insulin activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the hypothalamic arcuate nucleus: a key mediator of insulin-induced anorexia. Diabetes 2003;52:227-231.
23) **Gerozissis K.** Brain insulin, energy and glucose homeostasis; genes, environment and metabolic pathologies. Eur J Pharmacol 2008;585: 38-49.
24) **Kalra SP.** Pivotal role of leptin-hypothalamus signaling in the etiology of diabetes uncovered by gene therapy: a new therapeutic intervention? Gene Ther 2011;18:319-325.
25) **Prodi E, Obici S.** Minireview: the brain as a molecular target for diabetic therapy. Endocrinology 2006;147:2664-2669.
26) **Sánchez-Lasheras C, Könner AC, Brüning JC.** Integrative neurobiology of energy homeostasis-neurocircuits, signals and mediators. Front Neuroendocrinol 2010;31:14-15.
27) **Cone RD, Cowley MA, Butler AA, Fan W, Marks DL, Low MJ.** The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. Int J Obes Relat Metab Disord 2001;25 Suppl 5:S63-S67.
28) **Lin JY, Li CS, Pan JT.** Effects of various neuroactive substances on single-unit activities of hypothalamic arcuate neurons in brain slices. Brain Res Bull 1993;31:587-594.
29) **Boura-Halfon S, Zick Y.** Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. Am J Physiol Endocrinol Metab 2009;296:E581-E591.
30) **Aubry JM, Schwald M, Ballmann E, Karege F.** Early effects of mood stabilizers on the Akt/GSK-3beta signaling pathway and on cell survival and proliferation. Psychopharmacology (Berl) 2009;205:419-429.
31) **Kang UG, Seo MS, Roh MS, Kim Y, Yoon SC, Kim YS.** The effects of clozapine on the GSK-3-mediated signaling pathway. FEBS Lett 2004; 560:115-119.
32) **Lu XH, Dwyer DS.** Second-generation antipsychotic drugs, olanzapine, quetiapine, and clozapine enhance neurite outgrowth in PC12 cells via PI3K/AKT, ERK, and pertussis toxin-sensitive pathways. J Mol Neurosci 2005;27:43-64.
33) **Olianas MC, Dedoni S, Onali P.** Regulation of PI3K/Akt signaling by N-desmethylclozapine through activation of δ-opioid receptor. Eur J Pharmacol 2011;660:341-350.
34) **Roh MS, Seo MS, Kim Y, Kim SH, Jeon WJ, Ahn YM, et al.** Haloperidol and clozapine differentially regulate signals upstream of glycogen synthase kinase 3 in the rat frontal cortex. Exp Mol Med 2007; 39:353-360.
35) **Kim SF, Huang AS, Snowman AM, Teuscher C, Snyder SH.** From the Cover: Antipsychotic drug-induced weight gain mediated by histamine H1 receptor-linked activation of hypothalamic AMP-kinase. Proc Natl Acad Sci U S A 2007;104:3456-3459.
36) **Boyda HN, Tse L, Procyshyn RM, Honer WG, Barr AM.** Preclinical models of antipsychotic drug-induced metabolic side effects. Trends Pharmacol Sci 2010;31:484-497.
37) **Boyda HN, Tse L, Procyshyn RM, Wong D, Wu TK, Pang CC, et al.** A parametric study of the acute effects of antipsychotic drugs on glucose sensitivity in an animal model. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 2010;34:945-954.
38) **Murashita M, Kusumi I, Hosoda H, Kangawa K, Koyama T.** Acute administration of clozapine concurrently increases blood glucose and circulating plasma ghrelin levels in rats. Psychoneuroendocrinology 2007;32:777-784.
39) **Girgis RR, Javitch JA, Lieberman JA.** Antipsychotic drug mechanisms: links between therapeutic effects, metabolic side effects and the insulin signaling pathway. Mol Psychiatry 2008;13:918-929.
40) **Citrome L, Volavka J.** Consensus development conference on antipsychotic drugs and obesity and diabetes: response to consensus statement. Diabetes Care 2004;27:2087-2088; author reply 2089-2090.
41) **Jin H, Meyer JM, Jeste DV.** Atypical antipsychotics and glucose dysregulation: a systematic review. Schizophr Res 2004;71:195-212.
42) **Mukherjee S, Schnur DB, Reddy R.** Family history of type 2 diabetes in schizophrenic patients. Lancet 1989;1:495.