

Neuropeptide Y에 의한 식욕조절 관찰연구

김미자 · 김영옥[§] · 김혜경¹⁾ · 정주호²⁾

동덕여자대학교 자연과학대학 식품영양학과, 한서대학교 식품생물공학과¹⁾
경희대학교 의과대학 약리학교실²⁾

Differential Expression of Neuropeptide Y in the Hypothalamic Areas of Fasting and Anorexia Mutant Mice

Kim, Mi Ja · Kim, Youngok[§] · Kim, Hye Kyung¹⁾ · Chung, Joo Ho²⁾

Department of Food and Nutrition, Dongduk Women's University, Seoul 136-714, Korea

Department of Food and Biotechnology,¹⁾ Hanseo University, Seosan 356-820, Korea

Department of Pharmacology,²⁾ College of Medicine, Kyung Hee University, Seoul 136-71, Korea

ABSTRACT

The present study was conducted to identify the mechanism about the regulation of appetite by examining the expression patterns of neuropeptide Y in the hypothalamus of mice either fasting mouse for 24 hours or with anorexia mutant mouse. In order to investigate the patterns of expression of neuropeptide Y, immunohistochemistry was employed for measurements at the tissue level, along with the molecular biological techniques of reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR) and dot blotting. The results of this study are as follows. The level of expression of neuropeptide Y, a neuropeptide known to enhance appetite, was shown to be lowered in the arcuate nucleus(ARC), paraventricular nucleus(PVN), lateral hypothalamic area(LHA), and dorsomedial hypothalamic nucleus(DMN) in both the fasting and anorexia mutant groups when measured via immunohistochemistry, a tissue-level method. RT-PCR and dot blotting, the molecular biological methods employed in this study, revealed that the level of neuropeptide Y mRNA in the entire hypothalamus was similar in the control and fasting groups and lower in the anorexia mutant group. The results of the present study showed that while the levels of expression of the neuropeptide Y in the various hypothalamic regions studied did not exhibit regular increases or decreases when measured immunohistochemically. But the entire hypothalamus via molecular biological methods showed that the changes in these levels were more definite in the anorexia mutant group than in the fasting group. (*Korean J Nutrition* 34(7) : 727~733, 2001)

KEY WORDS: anorexia, fasting, neuropeptide Y, RT-PCR, dot blotting.

서 론

식욕은 크게 말초 신경 조절과 중추 신경 조절 그리고 이들의 복합적 상호작용에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다.¹⁾ 식욕의 말초 신경조절 과정은 위장계에 존재하는 화학적 기계적 수용체가 영양소의 내용을 인식하여 미주신경(vagus nerve)을 통하여 뇌의 중추신경계로 섭취와 포만의 신호를 전달하면 뇌에서는 그 신호를 받아 다음의 식사행동을 어떻게 할 것인지를 결정하는 일련의 과정이다. 이러한 섭취와 포만의 신호를 일으키는 요소는 위장내의 영양소의 내용, 크기,

식사량 외에도 빛, 냄새, 맛, 질감들이 관여하여 식욕 조절 이전에 관여한다고 알려지고 있다. 식욕의 중추신경조절은 동물과 사람의 경우 식욕조절센터로 시상하부(hypothalamus)와 뇌간(brain stem)이 관여한다.²⁾ 시상하부는 뇌와 말초신경계를 연결해주는 주요 영역으로³⁾ 자율신경계와 내분비계의 항상성조절에 중요한 역할을 한다.⁴⁾ 시상하부 주요 영역으로 arcuate nucleus(ARC), ventromedial nucleus(VMN), dorsomedial hypothalamic nucleus(DMN), paraventricular nucleus(PVN), lateral hypothalamic area(LHA), suprachiasmatic nucleus(SCN) 등이 있고 부수적인 영역으로 perifornical area(PFA), preoptic area(POA) 등이 있다.^{5,6)}

식욕과 관련된 시상하부의 다른 신경영역에 관한 많은 연구가 수행되었고 그 결과 시상하부의 신경영역들은 서로 다

접수일 : 2001년 4월 12일

채택일 : 2001년 10월 4일

[§]To whom correspondence should be addressed.

른 역할을 담당하여 ARC와 LHA 영역은 주로 섭식과 포만의 신호를 생성하고, VMN, DMN, SCN 영역은 생성되거나 분비된 신호를 적절하게 조절하며, PVN 영역은 섭식과 포만의 신호가 작용하는 영역인 것이 밝혀졌다.⁷⁾

이들 중 식욕증진 기전에 관여하는 대표적인 물질은 neuropeptide Y로써 36개의 아미노산으로 구성되어 있고, 말초신경계와 중추신경계 모두에 발현하여 식욕 및 체중 조절에 중요한 역할을 하며 특히 뇌의 시상하부에 가장 많이 분포되어 있다.⁸⁾ 기존의 연구들에 의하면 4일간 절식하였을 때, 시상하부의 neuropeptide Y 발현이 증가하고 절식 후 다시 음식섭취를 하면 neuropeptide Y의 수준이 정상으로 회복되는 것이 보고되었다.^{9,10)}

Neuropeptide Y는 시상하부 영역 중 ARC 영역에서 생성되어 PVN을 포함한 다른 시상하부 영역을 통해 확산하는 것으로 보고되고 있다.¹¹⁾ 이러한 현상을 확인하기 위해서 Billington 등¹²⁾은 쥐의 PVN 영역에 neuropeptide Y를 주사하여 신경섬유가 확산되는 현상을 조사하였고 결과적으로 식욕이 증가함을 관찰하였다. 또한 Williams 등¹³⁾과 Wilding 등¹⁴⁾은 정상 쥐보다 과다 섭취를 하는 당뇨 쥐와 유전적 비만 생쥐(*ob/ob* mouse)에서 neuropeptide Y mRNA의 양이 증가되어 있음을 보고하였다. 이러한 결과로 neuropeptide Y가 식욕증가와 관련성이 있음이 mRNA 수준에서 확인되었다.

본 연구는 neuropeptide Y의 식욕증가 기능에 의한 식욕조절 기전을 관찰하여 보고자한다. 특히 절식이라는 식이조절과 식욕감퇴라는 유전적 소인 중 어느 것이 neuropeptide Y에 더 영향을 미칠 것인가를 관찰하고자 한다. 이를 위해 24시간 절식시킨 정상 생쥐와 유전적으로 식욕부진증을 가지고 태어난 돌연변이 생쥐를 대상으로 그들의 시상하부에서 neuropeptide Y의 발현정도를 조직수준에서의 관찰과 분자생물학적 수준에서의 관찰인 역전사 중합효소 반응 및 닷 블롯팅을 이용하여 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 사육환경

본 실험에 이용한 식욕부진 돌연변이 생쥐는 2번 염색체 agouti locus 20cM의 돌연변이 생쥐로,¹⁵⁾ Jackson Laboratory(USA)로부터 구입한 한 쌍의 heterozygous breeder(B6C3Fe-a/a-anx A⁺ a, anx/)를 교배시켜 출생한 homozygous 식욕부진(*anx/anx*) 생쥐이다. 식욕부진 돌연변이 생쥐는 출생 7일 후부터 현저하게 성장이 저하되고 16일 경부터 비정상적인 행동인 신체진전, 과다행동, 비

협조적 보행 등이 뚜렷하게 나타나면서 식욕이 감소하고 체중이 같은 자손인 wild type과 heterozygous type의 반 이하로 되어 결국 출생 후 19일에서 26일 사이에 기아상태가 되어 죽는다.¹⁵⁾ 이러한 특징들을 기준으로 생후 3주된 이유기의 생쥐(anorexia) 중 실험군을 선별하였다. 면역조직화학법 실험에서는 식욕부진 돌연변이군 8마리, wild type을 24시간 절식시킨 군(fasting) 8마리, wild type 대조군(control) 8마리로 하여 이들 세 군에 대한 비교실험을 하였고, RNA 분리를 위해서 각 그룹별로 4마리씩의 동물을 배정하였다.

2. 조직처리

Ether로 마취한 실험동물의 흉강을 열고 심장의 좌심실을 통하여 0.05M 인산염 완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)를 1cc 주사기로 1분간 주입하여, 혈액이 완전히 제거된 후 0.1M 인산염 완충용액(phosphate buffer, PB)에 녹인 4% paraformaldehyde(PFA) 용액을 10분간 관류하였고, 관류속도는 50~60ml/min으로 하였다. 적출한 뇌를 4% PFA에 담가서 4°C에서 12~16시간 결과 후 고정하였다. 고정된 뇌 조직은 조직내 결정화를 막기 위해서 30% sucrose 용액에 2~5일간 침전시킨 후 microtome(Leica, Nußloch, Germany)을 이용하여 40µm 두께로 잘라 저장액(30% glycerin, 30% ethylene glycol, 10% 0.2M PB)에 10장씩을 냉장보관하여 사용하였다.

3. 면역조직화학법(IHC)

면역조직화학법은 이전에 보고된 방법인 자유부유법(free-floating method)을 이용하였다.^{16,17)} 관찰하고자하는 부위의 조직절편을 0.05M PBS로 세척한 후 1% H₂O₂로 반응시켜 내재성 peroxidase를 비활성화시키고 다시 0.05M PBS로 세척하였다. 10% goat serum, 1% bovine serum albumin(BSA) 용액과 반응시켜 비특이적 결합을 제거한 후 neuropeptide Y 1차 항체 용액(DiaSorin, cat. No. 22940, USA)을 상온에서 24시간 반응시켰다. PBS로 세척 후 2차 항체 용액(Vector Lab. Inc., USA)에서 1시간(실온) 반응시키고 avidin-biotin peroxidase complex (Vectastain-Elite ABC kit, Vector Laboratories, Inc., USA) 용액으로 실온에서 1시간 반응 후 PBS로 세척하고 발색제 3,3'-diaminobenzidine(DAB)으로 상온에서 5분간 발색한 후 PBS로 세척하여 발색반응을 중지시켰다. 발색이 끝난 조직은 gelatin-coated slide에 ethanol의 농도를 점차적으로 증가시켜(70~100%) 탈수하였고, xylene으로 투명화시켜 polymount로 봉입하였다. Neuropeptide Y의 항체와 면역반응을 보인 신경세포나 신경섬유들은 발

색제인 DAB에 의해 갈색으로 나타났으며, 이런 반응을 나타낸 신경세포나 신경섬유와 뇌 조직의 각 부위의 염색성을 광학현미경으로 관찰하여 사진을 촬영하였다. 뇌의 각 부위의 위치와 명칭은 Franklin과 Paxinos¹⁶⁾의 부도를 참고로 하였다. NPY 면역반응도는 영상분석기(image analyser)를 이용하여 동일 부위에서 일정하게 나타난 염색성의 정도를 명도에 따른 gray scale 값을 측정하였고 밝기의 변화를 적절하게 측정할 수 있는 전압을 5volt로 정하여 이후 모든 그룹의 측정하고자 하는 부위의 영상분석을 하였다. 측정된 염색성의 정도는 0에서 255의 수치로 표현하였다.

4. 역전사 중합 효소 연쇄반응(RT-PCR)

1) 총 RNA 분리

RNA 분리는 시상하부를 각 그룹별로 모아서 RNAzol B(TEL-TEST, Inc., USA)를 첨가하여 균질화하였다. 균질액에 클로로포름을 첨가하고, 얼음에 5분간 방치한 후 12,000 × g에서 15분간 원심분리 후 상층액을 취하여 동량의 이소프로판올을 가한 후, 4°C에서 15분간 방치하였다. 다시 12,000 × g에서 15분간 원심분리한 후, 총 RNA를 추출하였다. RNA의 농도는 분광광도계로 260nm에서 측정하였다.^{16,17)}

2) 역전사중합연쇄반응

분리한 총 RNA에 역전사효소를 넣어 cDNA를 만든 후 neuropeptide Y 유전자 cDNA의 일부분을 증폭하기 위해 primer를 이용하여 PCR을 시행하여 대량으로 증폭하였다.¹⁶⁾ 총 RNA용액과 oligodT primer를, 65°C에서 10분간 반응시킨 후에 avian myeloblastosis virus(AMV) 역전사효소, RNAasin 1μl, 10mM dNTP, 5 × buffer를 첨가하여 42°C에서 1시간 반응시켜 cDNA를 얻었다.

PCR은 PCR 자동화기계(Perkin Elmer 9600, USA)에서 template로 cDNA, Taq polymerase, dNTP, sense primer, antisense primer, 10 × buffer 및 탈이온수를 첨가하여, 총 반응용액을 30μl로 하였다. neuropeptide Y는 94°C에서 5분간 1회, 94°C에서 30초, 58°C에서 30초, 72°C에서 30초씩 40회 반응시키고, 72°C에서 5분간 1회 시행한 후, 1.2% 한천 겔에서 전기영동하였다. 내부 표준물질로는 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 유전자 cDNA의 일부를 같은 방법으로 24회 증폭하여 neuropeptide Y 유전자 발현정도를 보정하였다. GAPDH와 neuropeptide Y의 primer는 Genbank에 등록된 염기서열을 참고하여 제작하였다.^{16,17)} RT-PCR을 정량하기 위하여 각 cycle별로 증폭하여(21, 24, 27, 30, 33,

36, 39, 42) 유효농도 곡선에 해당하는 cycle을 관찰하여 결정하였다.¹⁶⁾

5. 닷 블롯팅(Dot blotting)

분리한 총 RNA에서 GAPDH와 neuropeptide Y 유전자를 probe로 만들어 이들의 발현을 관찰하였다. 모든 과정에 이용되는 시약 조제 시에 탈이온수 대신에 RNase free water인 0.1% diethyl pyrocarbonate(DEPC) water로 사용하였다.

1) 표지된 probe 준비

GAPDH, neuropeptide Y 유전자를 형광물질로 표지된 probe로 만들기 위해 각각의 cDNA로부터 일부분을 증폭하여 얻은 유전자(GAPDH 324bp, neuropeptide Y 146bp)를 gel에 걸어 Gel 추출 kit(QIAEX II, Cat. No. 20051, Germany)를 이용하여 분리정제하였다. 이와 같이 분리정제한 유전자를 희석하여 5분간 가열하여 변성시킨 후, 얼음에 방치하였다. Nucleotide mix 10μl, random primer 5μl, 변성된 DNA 50ng, Klenow enzyme solution 5 units/μl를 첨가하여 총 부피가 50μl로 만들어 37°C에서 1시간동안 반응시켰다(Gene Images random prime labelling module, Cat. No. RPN 3540, Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA).

2) RNA 처리

총 RNA는 10 × MEA(0.2M MOPS, 50mM sodium acetate pH 7.0, 10mM EDTA): formaldehyde: formamide = 1 : 1.8 : 5로 이루어진 buffer로 RNA를 5배로 희석하여 65°C에서 15분간 가열하여 얼음에 방치하였다. 위와 같이 준비한 RNA를 적당한 크기로 자른 흡착지(nylon membrane)에 떨어뜨렸다.

3) RNA 고정

RNA를 nylon 흡착지에 고정하기 위해서 UV cross-linker를 이용하여 2분간 반응시켰다.

4) 보합결합

RNA가 고정된 흡착지와 probe와의 보합결합을 위해 Hybrisol I(Oncor, Cat. No. S4040, MD, USA: 50% formamide, 10% dextran sulfate, 1% SDS, blocking reagents) 5ml을 65°C에서 예열시켜 준비하고, probe는 100°C에서 10분간 끓여 변성시킨 후 얼음에 넣었다가 준비된 Hybrisol I 5ml에 probe 10μl를 넣고 RNA가 고정된 흡착지를 핀셋으로 옮겨 65°C hybridization oven에 하룻밤 반응시켰다. Hybridization 반응이 끝난 흡착지를 미리

예열시킨 1 × SSC/0.1% SDS용액, 0.2 × SSC/0.1% SDS 용액 순으로 15분간 65°C에서 세척하였다.

5) 검출(Detection)

세척이 끝난 후, liquid blocking agent를 1 : 10으로 희석한 용액에서 1시간동안 진탕하였다. Buffer A에 0.5% BSA가 되게 첨가하여 anti-fluorescein-AP conjugate(5000배)를 1μl/ml로 희석하여(희석용액 + 0.5% BSA) 상온에서 1시간동안 반응하였다. 결합되지 않은 conjugate를 제거하기 위해서, 희석용액 + 0.3% Tween 20의 용액으로 세척하였다. 세척이 끝나면, 흡착지에 남아있는 세척액을 최대한 없애고 비닐백 위에 흡착지를 올려놓고 detection agent를 흡착지위에 1ml정도 넣고 2~5분간 반응시킨다. 5분 후에 다시 흡착지에 남아 있는 detection agent를 제거하고 흡착지가 마른 후에 비닐 백을 열로 봉한다. Sealing된 비닐 백을 카세트에 붙이고 X-선 필름을 2장 넣어 상온에서 15~30분간 autoradiograph를 하였다. 15분 후에 필름 한 장을 현상하여 감광정도를 확인하고 적절한 감광시간을 결정하여 현상하였다(Gene Images CDP-star detection module, Cat. No. RPN 3510, NJ, USA).

6. 통계분석

통계처리는 SAS(Statistic Analysis System) program을 이용하여, one-way ANOVA로 검증하였고 유의성은 Tu-

key's multiple range test로 검정하였으며, 실험군중 두 군간의 차이는 Student's t-test로 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 면역조직화학법

면역조직화학법을 이용하여 대조군, 절식군, 식욕부진 돌연변이군의 시상하부 여러 영역에서 neuropeptide Y 발현 정도를 측정된 결과는 Fig. 1, 2에서 보는 바와 같이 대조군에 비해 두 군 모두 neuropeptide Y의 발현이 낮은 경향을 보였다. ARC 영역의 neuropeptide Y 발현은 대조군이 94.1, 절식군은 72.7, 식욕부진 돌연변이군은 79.6으로, 대조군에 비해 두 군 모두 발현정도가 유의적으로 낮았다(p < 0.05, Table 1). 또한 절식군의 경우 식욕부진 돌연변이군보다 neuropeptide Y 발현이 통계적 유의성은 없으나 더 낮은 경향을 보였다. PVN 영역에서는 실험군간의 차이를 나타내지 않았다. LHA영역 및 DMN영역의 경우 실험군간의 유의적 차이는 없었지만 절식군의 경우 다른 군보다 낮은 경향이였다.

이와 같이 면역조직화학법으로 시상하부의 여러 부위에서의 발현은 대조군과 비교하여 절식군, 식욕부진 돌연변이군 모두 각 영역에서의 발현의 차이가 일정한 양상을 보이지 않았다.

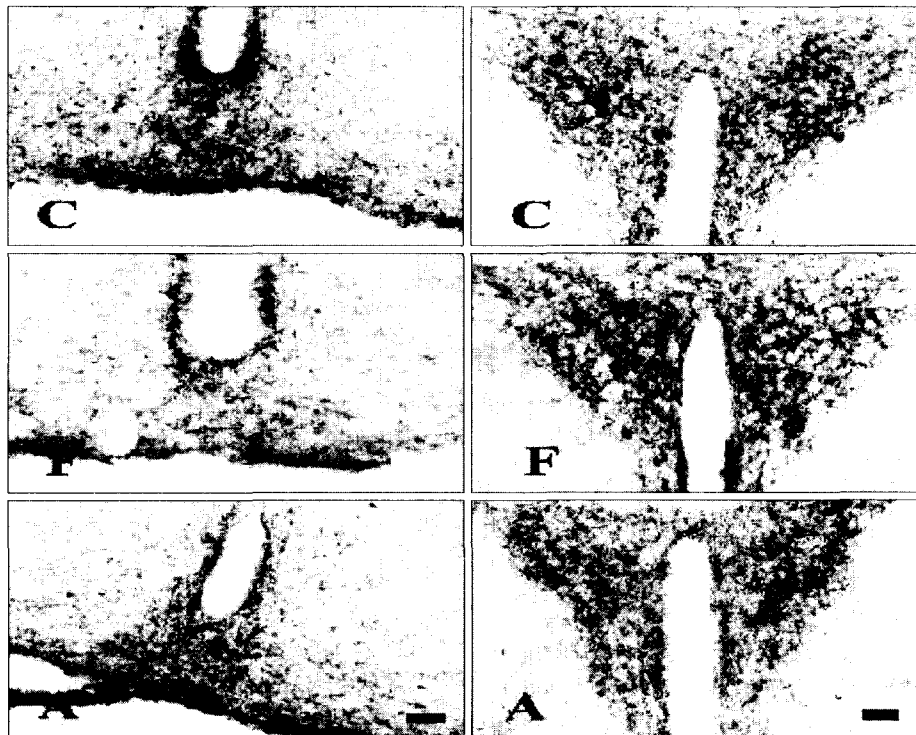


Fig. 1. Neuropeptide Y-like immunoreactivity in the ARC and PVN of hypothalamus. Scale bars = 100 μm, ARC: arcuate nucleus, PVN: paraventricular nucleus, C: control, F: fasting, A: anorexia mutant mice.

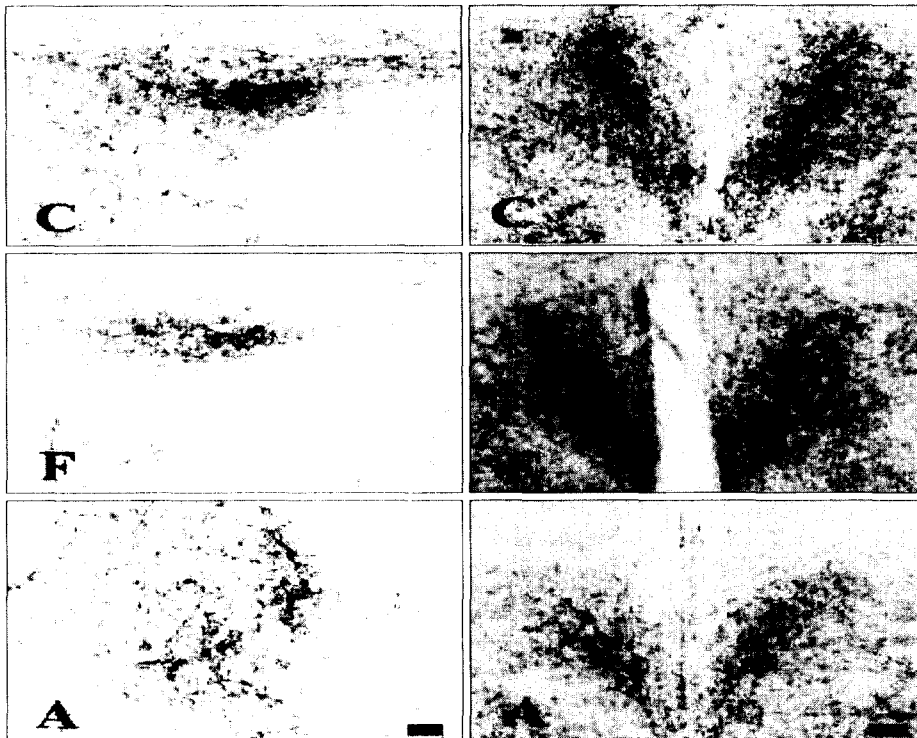


Fig. 2. Neuropeptide Y-like immunoreactivity in the LHA and DMN of hypothalamus. Scale bars = 100µm, LHA: lateral hypothalamic nucleus, DMN: dorsomedial hypothalamic nucleus, C: control, F: fasting, A: anorexia mutant mice.

Table 1. Mean values of neuropeptide Y-like immunoreactivity at the various regions of hypothalamus in experimental groups

Regions	Study groups	Control (n = 8)	Fasting (n = 8)	Anorexia (n = 8)
ARC		94.1 ± 0.8 ^a	72.7 ± 2.0 ^b	79.6 ± 4.1 ^b
PVN		72.7 ± 1.9	71.1 ± 1.0	70.6 ± 3.1
LHA		58.8 ± 4.8	50.8 ± 2.3	56.8 ± 1.7
DMN		92.3 ± 5.8	82.3 ± 5.6	90.3 ± 6.7

Data are represented as mean ± standard error
 ARC: arcuate nucleus, PVN: paraventricular nucleus, LHA: lateral hypothalamic area, DMN: dorsomedial hypothalamic nucleus
 a,b: means followed by the same letter in line are not significantly different at the p < 0.05 using Tukey's multiple range test

2. 역전사 중합 효소 연쇄반응

면역조직화학법에 의한 조직학적인 관찰 외에 mRNA 수준에서 관찰하기 위하여 RT-PCR 법을 이용하여 시상하부 전체의 mRNA의 양을 정량하였다. Fig. 3과 같이, 대조군과 절식군은 비슷한 발현 정도를 보였고, 식욕부진 돌연변이군은 약간 낮은 발현을 보였다. 또한 상대적인 발현 정도를 측정하기 위하여 내부 표준물질인 GAPDH로 보정하여 대조군을 100%로 하였을 때 neuropeptide Y의 경우, 절식군은 96%, 식욕부진 돌연변이군은 78%로 식욕부진 돌연변이군의 감소량이 뚜렷하였다(Table 2).

3. 닷 블롯팅

RT-PCR 방법 외에 닷 블롯팅법에 의한 발현을 측정하

였다(Fig. 3). 대조군과 절식군은 비슷한 발현을 보였고, 식욕부진 돌연변이군은 약간 낮은 발현을 보였다. 또한 상대적인 발현 정도를 측정하기 위해서 GAPDH로 보정하여 대조군을 100%로 하였을 때, 절식군은 91%, 식욕부진 돌연변이군은 88%로, RT-PCR 결과와 비슷하게 식욕부진 돌연변이군이 다른 군에 비하여 낮은 경향을 보여주고 있다(Table 2).

Broberger 등¹⁸⁾은 식욕부진돌연변이 생쥐의 ARC 영역에서 neuropeptide Y의 신경세포가 증가하였고, ARC 영역 내에서도 신경섬유의 발현이나 다른 영역(PVN, LHA, DMH 영역)에서 neuropeptide Y 발현이 감소하였다고 보고하였다. 또한 Jahng 등²¹⁾도 식욕부진돌연변이 생쥐의 ARC 영역에서 neuropeptide Y 발현이 감소하였다고 보고하였다. 본 연구도 다른 연구들과 비슷한 경향으로 나타났다. 이러한 결과들로 미루어 볼 때, 식욕부진 돌연변이 생쥐군에서 neuropeptide Y 발현 감소가 유전적으로 식욕부진증을 나타내는 원인이 되는 것으로 사료된다. 식욕부진 돌연변이 생쥐의 mRNA 수준을 RT-PCR법이나 닷 블롯팅법을 이용하여 양적으로 측정할 연구는 없었으므로 본 연구가 식욕부진 돌연변이 생쥐에서 neuropeptide Y mRNA의 관련여부를 더 정확히 추정할 수 있었다.

또한 절식과 neuropeptide Y에 대한 연구는 절식의 기간에 따라서 나타나는 양상을 연구한 결과들이 많은데, 2일을 절식시킨 경우에 ARC 영역에서 50%가 증가되었다는

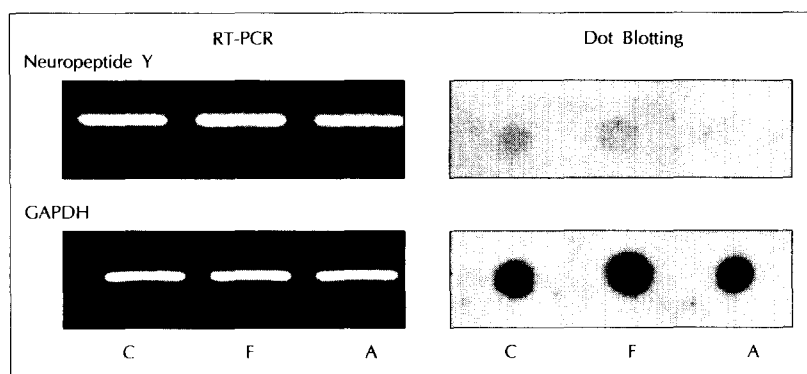


Fig. 3. Expression of neuropeptide Y mRNA in the hypothalamus was analyzed by RT-PCR and dot blotting. GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, C: control, F: fasting, A: anorexia mutant mice.

Table 2. Relative values of neuropeptide Y mRNA determined by RT-PCR and dot-blotting

	Control (n = 4)	Fasting (n = 4)	Anorexia (n = 4)
RT-PCR	100	96.7 ± 6.1	78.1 ± 4.0*
Dot-blotting	100	92.0 ± 0.7	88.3 ± 0.2*

Values from the control group are used as the reference(100%), and relative values of the fasting and anorexia mutant mice are significantly different from each other, with *p < 0.05 as determined by Student's t-test

연구가 있고,²¹⁾ 72시간을 절식시켰더니 뇌의 striatum 영역을 제외하고 다른 영역에서 neuropeptide Y의 수준이 증가되었다는 보고도 있다.²²⁾ Pages 등²³⁾은 48시간, 72시간을 절식시킨 후에 뇌의 cortex, hippocampus, striatum 세부분의 neuropeptide Y 수준을 조사한 결과 48시간 절식시킨 군에서 cortex에서 증가하였고, striatum에서는 감소하였으며, 72시간 절식시킨 군에서는 그 증가율이 더 유의적이었다고 보고하고 있다. 이러한 연구결과로 볼 때, 본 연구에서 절식시킨 생쥐의 조직학적 관찰에서 neuropeptide Y가 증가되지 않고 분자생물학적 관찰에서도 대조군과 비슷한 경향을 보인 이유는 본 연구에 이용된 식욕부진 돌연변이 생쥐의 유전적인 특성상 4주내에 죽기 때문에 절식시킨 생쥐의 절식기간을 24시간으로 제한한 결과로 사료된다.

이외에도 neuropeptide Y 신경펩타이드는 여러 관점에서 많은 연구들이 진행되고 있다. Sahu 등⁹⁾은 neuropeptide Y가 음식섭취를 하기 전에 PVN에서 많이 증가되고 증가된 neuropeptide Y의 발현은 음식을 섭취하면 감소된다고 하였고, 이는 neuropeptide Y가 에너지의 결핍상태에서 음식섭취 행동을 내재적으로 자극하는 물질임을 사하고 있다. 또한 유전적으로 비만한 동물의 경우 neuropeptide Y가 증가되어, 갈색지방조직(brown adipose tissue)의 활성을 감소시키고 인슐린의 분비를 증가한다고 하였다.²⁴⁾ Dryden 등²⁵⁾은 serotonin의 reuptake 저해 약물 (serotonin selective reuptake inhibitor: SSRI)인 flu-

oxetine을 이용하여 유전적 비만쥐(*fa/fa*)에서 급성 및 만성으로 약물을 투여하여 음식섭취를 비교하고, 시상하부의 각 부위에서 neuropeptide Y의 농도를 측정하였다. *fa/fa*와 *fa/-* 쥐 모두 fluoxetine을 만성 또는 급성으로 투여한 경우 모두 식욕이 감소되었고, 시상하부에서 특히 PVN영역에서 *fa/fa*와 *fa/-* 쥐 모두 neuropeptide Y 농도감소가 관찰되었다. 이 실험 결과 식욕억제 신경전달물질인 serotonin과 neuropeptide Y 신경세포가 시상하부에서 상호 작용하여 식욕기전을 에너지의 항상성유지에 기여한다는 것을 증명하였다.

이와 같이 neuropeptide Y 신경펩타이드는 식욕 기전에 대한 연구에서, 기본적으로 조사되는 물질로써 최근에는 더 세분화되어 neuropeptide Y 수용체의 연구로 발전하고 있다. 특히 수용체인 Y1과 Y5가 활성화되면 식욕을 자극한다는 연구들이 보고되었다.^{26,27)} 식욕과 관련된 ARC 영역의 ventromedial 부분에 neuropeptide Y 수용체인 Y2가 많이 존재하여 식욕과 몸무게를 조절하는 것으로 밝혀졌다. Neuropeptide Y의 연구는 최근에 수용체의 역할을 규명하며 이들 수용체와 시상하부 각각의 부위와의 관계, 최근에 알려지고 있는 다른 식욕 기전과 관계되는 신경전달물질들과의 상호관계에 대한 연구들이 진행되고 있다.

요약 및 결론

본 연구는 신경 peptide 중 식욕증가 욕구에 관여한다고 알려진 neuropeptide Y의 식욕조절 기전을 관찰하기 위해 시도되었다. 연구방법으로는 환경적으로 24시간 절식시킨 생쥐와 유전적으로 식욕부진증을 가지고 태어난 생쥐를 대상으로 이들의 시상하부에서 neuropeptide Y 신경전달물질의 발현 양상을 조직학적 수준에서의 관찰인 면역조직화학법과 분자생물학적 수준에서의 관찰인 역전사연쇄중합반응(RT-PCR), 닷 블롯팅을 통해 관찰하였다. 연구 결과는 다음과 같다.

1) 조직학적 수준에서의 관찰인 면역조직화학법에 의한 관찰 결과 neuropeptide Y 신경펩타이드의 발현 정도는, 대조군과 비교하였을 때 절식군과 식욕부진 돌연변이군 모두 ARC, PVN, LHA, DMH 영역에서 발현 정도가 낮았으나 통계적 유의성은 두 군 모두 ARC 영역만이 있었다.

2) 분자생물학적 방법인 RT-PCR과 dot-blotting에 의해 전체 시상하부에 존재하는 neuropeptide Y mRNA를 측정 한 결과, 절식군은 대조군과 비슷한 발현 정도를 보였고, 식욕부진 돌연변이군은 대조군에 비해 감소하는 경향을 보였다.

이상의 결과를 요약하면 시상하부 여러 영역에서의 neuropeptide Y 발현은 부위에 따라 다양하게 나타났으며, 대조군에 비해 식욕부진 돌연변이 생쥐에서 neuropeptide Y mRNA 발현이 감소된 것으로 미루어 보아 식욕부진 돌연변이 생쥐의 식욕 조절에 영향을 미칠 것으로 사료된다.

Literature cited

- 1) Schwartz MW, Woods SC, Porte Jr D, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature* 404: 661-671, 2000
- 2) Jquier E, Tappy L. Regulation of body weight in humans. *Physiol Rev* 79: 451-480, 1999
- 3) Leibowitz SF. Brain monoamines and peptides: role in the control of eating behavior. *Fed Proc* 45: 1396-1403, 1986
- 4) de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett FS Jr, Frankel WN, van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 322-327, 1998
- 5) Kalra SP, Dube MG, Sahu A, Phelps CP, Kalra PS. Neuropeptide Y secretion increases in the paraventricular nucleus in association with increased appetite for food. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 10931-10935, 1991
- 6) Elmquist J, Elias C, Saper C. From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron* 22: 221-232, 1999
- 7) Kalra SP, Dube MG, Pu S, Xu B, Horvath TL, Kalra PS. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr Rev* 20: 68-100, 1999
- 8) Allen YS, Adrian TE, Allen JM, Tatemoto K, Crow TJ, Bloom SR, Polak JM. Neuropeptide Y distribution in the rat brain. *Science* 221: 877-879, 1983
- 9) Sahu A, Kalra PS, Kalra SP. Food deprivation and ingestion induce reciprocal changes in neuropeptide Y concentrations in the paraventricular nucleus. *Peptides* 9: 83-86, 1988
- 10) Chua SC Jr. Food deprivation and hypothalamic neuropeptide gene expression: effects of strain background and the diabetes mutant.

Brain Res Mol Brain Res 11: 291-299, 1991

- 11) O'Donohue TL, Chronwall BM, Pruss RM, Mezey E, Kiss JZ, Eiden LE, Massari VJ, Tessel RE, Pickel VM, DiMaggio DA. Neuropeptide Y and peptide YY neuronal and endocrine systems. *Peptides* 6: 755-768, 1985
- 12) Billington CJ, Briggs JE, Harker S, Gace M, Levine AS. Neuropeptide Y in hypothalamic paraventricular nucleus: a center coordinating energy metabolism. *Am J Physiol* 266: R1765-R1770, 1994
- 13) Williams G, Lee YC, Ghatei MA, Cardoso HM, Ball JA, Bone AJ, Baird JD, Bloom SR. Elevated neuropeptide Y concentrations in the central hypothalamus of the spontaneously diabetic BB/E Wistar rat. *Diabet Med* 6: 601-607, 1989
- 14) Wilding JP, Gilbey SG, Bailey CJ, Batt RA, Williams G, Ghatei MA, Bloom SR. Increased neuropeptide-Y messenger ribonucleic acid (mRNA) and decreased neurotensin mRNA in the hypothalamus of the obese(*ob/ob*) mouse. *Endocrinology* 132: 1939-1944, 1993
- 15) Maltais LJ, Lane PW, Beamer WG. Anorexia, a recessive mutant causing starvation in preweaning mice. *J Hered* 75: 468-472, 1984
- 16) Kim MJ, Kim YO, Chung JH. Expression of tryptophan hydroxylase in the hypothalamus and hippocampus of fasting and anorexia mutant mice. *Korean J Nutrition* 33: 5-12, 2000
- 17) Kim YO, Kim MJ, Chung JH. Expression of Neuropeptide Y(neuropeptide Y) and NADPH-diaphorase Neurons in the hypothalamus and cerebral cortex of fasting and anorexia mutant mice(*anx/anx*). *Korean J Nutrition* 33: 491-496, 2000
- 18) Franklin KBJ, Paxinos G. The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. Academic Press. San Diego, 1997
- 19) Broberger C, Johansen J, Schalling M, Hkfelt T. Hypothalamic neurohistochemistry of the murine anorexia(*anx/anx*) mutation: altered processing of neuropeptide Y in the arcuate nucleus. *J Comp Neurol* 387: 124-135, 1997
- 20) Jahng JW, Haupt TA, Kim SJ, Joh TH, Son JH. Neuropeptide Y mRNA and serotonin innervation in the arcuate nucleus of anorexia mutant mice. *Brain Res* 790: 67-73, 1998
- 21) Baskin DG, Breininger JF, Schwartz MW. Leptin receptor mRNA identifies in rat hypothalamus. *Diabetes* 48: 828-833, 1999
- 22) Pages N, Orosco M, Rouch C, Yao O, Jacquot C, Bohuon C. Re-feeding after 72 hour fasting alters neuropeptide Y and monoamines in various cerebral areas in the rat. *Comp Biochem Physiol* 106: 845-849 1993
- 23) Pages N, Orosco M, Rouch C, Yao O, Jacquot C, Bohuon C. Fasting affects more markedly neuropeptide Y than monoamines in the rat brain. *Pharmacol Biochem Behav* 44: 71-75, 1993
- 24) Bray GA. Genetic and hypothalamic mechanisms for obesity-finding the needle in the haystack. *Am J Clin Nutr* 50: 791-802, 1989
- 25) Dryden S, Frankish HM, Wang Q, Pickavance L, Williams G. The serotonergic agent fluoxetine reduces neuropeptide Y levels and neuropeptide Y secretion in the hypothalamus of lean and obese rats. *Neuroscience* 72: 557-566, 1996
- 26) Marsh DJ, Hollopeter G, Kafer KE, Palmiter RD. Role of the Y5 neuropeptide Y receptor in feeding and obesity. *Nat Med* 4: 718-721, 1998
- 27) Kushi A, Sasai H, Koizumi H, Takeda N, Yokoyama M, Nakamura M. Obesity and mild hyperinsulinemia found in neuropeptide Y-Y1 receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 15659-15664, 1998