韓國營養學會誌 33(1) : 5~12, 2000

절식시킨 생쥐와 식욕부진 돌연변이 생쥐의 시상하부와 해마에서의 Tryptophan Hydroxylase의 발현

김미자 · 김영옥 · 정주호*

동덕여자대학교 자연과학대학 식품영양학과, 경희대학교 의과대학 약리학교실*

Expression of Tryptophan Hydroxylase in the Hypothalamus and Hippocampus of Fasting and Anorexia Mutant Mice

Kim, Mi Ja · Kim, Young Ok · Chung, Joo Ho*

Department of Food and Nutrition, Dongduk Women's University, Seoul 136-714, Korea
Department of Pharmacology, College of Medicine, Kyung Hee University, Seoul 136-701, Korea*

ABSTRACT

The control of food intake is a complex phenomenon caused by interactions between central and peripheral control mechanisms. The hypothalamic and brain stem regions have been identified as centers for food intake and energy expenditure in animals and humans. Of these, the ventromedial and lateral hypothalamic areas are involved in the control of food intake. Also, large amounts of neurotransmitters known to be involved in feeding are present in the hippocampus. Particularly, tryptophan hydroxylase(TPH), known as a factor in the control of food intake, is present in high levels in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and the hippocampus. In this study, TPH expression levels in the hypothalamic and hippocampal regions of fasting, anorexia mutant, and control mice were compared using RT-PCR and immunohistochemical methods. Differences in body weight among the fasting, anorexia mutant, and control groups were observed. No statistical significance was noted in the number of TPH-immunoactivity in the hypothalamic nuclei, but relatively higher populations of such fibers were observed in the fasting group; the control group yielded samples with an overall value of 170.3 ± 3.5 in terms of immunoreactivity-induced optical density, whereas the fasting group yielded a value of 168.3 ± 2.6, and the anorexia mutant group 171.3 ± 0.8(lower values represent higher immunoreactivity). In fasting mice, stained neuronal bodies were observed in the CA3 and dentate gyrus regions of the hippocampus, which was different from the hippocampal regions of the control and anorexia mutant mice. The RT-PCR procedures were performed using whole brains, precluding any statistically noticeable findings in relation to specific regions, although the fasting and anorexia mutant groups showed 123.3% and 102.9%, respectively, of the TPH mRNA level in the control. The overall results present evidences of the role of TPH in the decrease in food intake during fasting caused by exogenic factors and in genetically acquired anorexia. (*Korean J Nutrition* 33(1) : 5~12, 2000)

KEY WORDS: food intake, hypothalamus, hippocampus, TPH, immunohistochemistry, RT-PCR, anorexia mutant mouse.

서 론

최근 체중문제는 전문가뿐만 아니라 일반인에게도 관심의 대상이 되고 있다. 체중의 과도한 증가는 건강의 적신호로 여겨지며, 사회적인 인식이 마른 체형을 선호하기 때문에 청소년기에 무리한 식사조절이 국민건강의 한 문제로 대두되고 있다. 식사조절을 위한 음식섭취는 말초적 조절과정과 중추적인 조절과정사이의 연속적인 상호작용에 의해 나타나는 복잡한 현상으로 알려져 있다.[1] 말초적인 조절과정을 담당하는 위장관은 미주신경(vagus nerve)을 통하여 뇌에 영양성분에 대한 정보를 공급할 수 있는 화학적, 기계적인 수용체를 가지고 있다. 또한 위장관 내에는 포만 신호의 중요한 조절자인 cholecystokinin(CCK),[2] bombesin, glucagon 및 glucagon-like peptide(GLP-1)[3]를 포함한 소장관내의 포만 호르몬이 있으며, 이러한 위장관내의 포만 호르몬은 소장 안에 수용체와 영양성분의 상호작용에 의해서 방출된다. 이에 반해, 중추적인 조절과정은 뇌내의 음식섭취를 조절하는 수많은 신경전달물질에 의해서 영향을 받는다. 중추신경계에서 전통적으로 음식섭취 조절에 관여한다고 알려진 부위로는 시상하부와 뇌간 등이 있다. 시상하

채택일 : 1999년 11월 26일

© 2000 The Korean Nutrition Society

부는 자율적인 항상성 유지와 내분비적인 항상성 유지를 위한 조절중추이며,[4] 중추신경계에서 음식섭취를 조절하는 중요한 부위로 알려져 있다. 시상하부에서의 기능은 두 부위의 음식섭취 중추가 존재해서 음식섭취를 조절한다는 dual center에 의한 이원적 조절가설이 있다.[5] 이원적 조절 중추에 해당하는 부위는 시상하부의 배내측핵(ventromedial nucleus)과 외측시상하부(lateral hypothalamus area)로써, 배내측핵의 병변은 음식의 과다섭취와 비만증을 유발한다고 알려져 있고, 외측시상하부의 병변은 음식섭취의 감소와 식욕부진을 일으킨다고 알려져 있다. 따라서 배내측핵에는 포만중추가 있고, 외측시상하부에는 섭식중추가 존재한다고 생각하고 있다.[6][7] 특히 시상하부는 뇌와 말초기관들 사이의 연결 부위로 신경전달물질이 풍부하게 존재하며 말초의 공복 체계로부터 신경전달과 호르몬을 통한 정보를 전달받아 섭식행동을 조절하고 통제한다고 한다.[8] 중추적으로 작용하는 이러한 신경전달물질로서 모노아민계 신경전달물질과 신경펩타이드들이 있고 이들의 균형에 의하여 섭식행동이 조절되는 것으로 알려져 있다.[1] 이외에도 음식섭취와 관계되는 뇌의 영역으로 Grill과 Kaplan[9]이 미측뇌간(caudal brainstem) 부위가 중요한 역할을 한다고 하였고, Hoebel[10]은 외부자극에 관련되는 청반(locus ceruleus), 전두피질(frontal cortex), 해마(hippocampus), 시각피질(optic cortex) 그리고 음식을 보고 인지하는 것과 관련된 편도(amygdala), 대뇌피질(cerebral cortex), 측좌핵(nucleus accumbens), 스트레스나 새로운 것에 대한 반응과 관련되는 흑색질(substance nigra), 미상핵(caudal nucleus), 피각(putamen)등의 부위가 음식섭취 행동과 관련된다고 하였다. 이중에서도 기억과 관계되는 것으로 알려진 해마는 세로토닌, CCK 및 vasoactive intestinal peptide(VIP)가 풍부하며 음식섭취를 증가시키는 신경전달물질인 orexin의 신경섬유가 존재한다는 연구가 최근 음식섭취와 관련하여 활발히 연구되고 있다.[11-13]

음식섭취를 억제하는 대표적인 신경전달 중의 하나인 세로토닌(serotonin, 5-HT)의 생합성은 속도제한효소인 tryptophan hydroxylase(TPH)에 의해서 조절을 받으며,[14] 봉선핵(raphe nucleus)에서 방출되는 세로토닌 신경섬유는 시상하부와 해마 및 대뇌피질에까지 연결이 되어 있다.[15] 시상하부의 뇌실주위 핵과 배내측핵에 많은 세로토닌 수용체가 있기 때문에 시상하부는 세로토닌계의 중요한 작용 부위이고, 소위 포만중추라고 알려진 시상하부의 배내측핵은 세로토닌에 의해 조절이 되며 이 부위의 세로토닌 증가는 음식섭취와 식욕의 조절에 관여된다고 한다.[16] 해마는 학습과 기억에 있어 중요한 역할을 담당하고, 또한 음식섭취 기전에서도 그 역할을 담당하는 것으로 알려져 있으며,[10] 다양한 세로토닌계 수용체가 분포되어 있어 세로토닌이 풍부하게 존재하고 있다.[17][18]

중추신경계의 세로토닌은 필수 아미노산인 트립토판으로부터 생합성 된다. 세포질에서 트립토판은 TPH에 의해서 5-hydroxytryptophan(5-HTP)으로 가수분해되며, 5-HTP는 aromatic acid decarboxylase에 의해서 탈탄산화되어 단계적으로 세로토닌을 생성한다. 약 20년 전부터 세로토닌은 식욕을 지배한다는 가설이 정립되어있다.[17] 중추신경계에서 증가된 세로토닌은 음식섭취와 식사행동에 극적인 영향을 미친다고 하였고, 세로토닌의 파괴가 저지되거나 과다 생성되거나 또는 직접적으로 세로토닌 수용체를 자극하면, 식욕부진 반응이 일어난다고 하였다.[19-21] Bray와 York[22]의 연구에 의하면, 마른 집쥐와 비만인 집쥐의 중추신경계에 직접적으로 투여하였더니, 두 집쥐 모두 음식섭취율과 식사량이 감소하였다고 하였다. 트립토판은 식사섭취율을 감소시키고, 식사량, 음식섭취빈도를 감소시키며, 5-HTP는 식사량, 음식섭취빈도를 감소시킨다. 반대로 세로토닌 생성을 방해하는 물질인 p-chlorophenylalanine는 음식섭취를 증가시킨다고 하였다.[23]

식욕부진증은 섭식장애의 하나로 식품섭취를 거부하는 특징을 갖고 있는 심각한 질환이며, 유별율이 높은 시기인 후기 청소년기 또는 조기성인기여성의 약 0.5~1.0%에서 유병율을 보이나, 비전형적인 형까지 포함하면 상당히 높은 유병율을 나타낼 것으로 추정되고 있다.[24] 음식섭취에 관한 생물학적 연구들이 진행되어 왔지만, 음식섭취의 기전이 다양한 기전들의 상호작용에 의하여 매우 복잡하게 조절되기에, 아직까지 음식섭취 및 섭식장애인 신경성 식욕부진증의 기전은 정확하게 밝혀지지 않고 있다.

이에 본 연구는 식욕부진증의 기전에 있어 중추적 조절과 관련된 물질인 TPH의 발현변화 현상을 인위적으로 절식시킨 생쥐와 유전적 식욕부진 돌연변이생쥐의 시상하부와 해마에서 비교 관찰하여 봄으로써 인간의 섭식조절에 관여하는 유전적 소인과 인위적 식욕조절의 이해에 도움이 되는 기초자료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 사육환경

식욕부진 돌연변이 생쥐군은 Jackson Laboratory(USA)로부터 구입한 한 쌍의 heterozygous breeder(B6C3Fe-a/a-anx A/+ a, anx/-)를 교배시켜 출생한 homozygous 식욕부진(anx/anx) 생쥐를 이용하였다. 출생된 생쥐들

은 12시간 간격으로 밤과 낮이 교대되면서 온도가 22~25℃가 유지되는 동물실에서 사육하였으며, 물과 사료는 충분히 공급하였다. 식욕부진 돌연변이 생쥐는 출생 후부터 쇠약한 모습을 보이고, 점차 음식섭취가 감소하며 출생 7일후부터 현저하게 성장이 저하되고 출생후 16일 경부터 신체진전(tremor), 과다행동(hyperactivity), 비협조성 보행(uncoordinated gait)등의 비정상적인 행동을 뚜렷하게 나타나면서 음식섭취가 감소하고 체중이 같은 자손인 wild type과 heterozygous type의 반 이하로 되어 결국 출생후 19일에서 26일 사이에 기아상태가 되어 죽게된다.[25] 이러한 특징들을 기준으로 출생 후 3주된 이유기에 있는 생쥐중 실험군을 선별하여, 식욕부진 돌연변이 생쥐군 8마리, wild type을 24시간 절식시킨 생쥐군 8마리, wild type 8마리를 정상군으로 하여 이들 3군에 대한 비교실험을 하였다. 실험동물의 배정은 면역조직화학법에 각군에 4마리와 RNA 분리 방법에 각군 4마리를 사용하였으며, 체중은 조직처리 전에 측정하였다.

2. 조직처리

실험동물은 ether로 전신마취시킨 후 흉강을 열고 좌심실을 통하여 0.05M 인산염 완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)를 1분간 주입하고, 0.1M 인산염 완충액(phosphate buffer)에 녹인 4% paraformaldehyde 용액(PFA)을 4℃에서 10분간 관류시켰으며, 관류속도는 50~60ml/min으로 하였다. 관류고정후 뇌를 적출하여 4% PFA에 담가서 4℃에서 12~16시간 경과 후 고정하였다. 고정된 뇌조직은 30% sucrose용액에서 2~5일간 침전시킨 후 Cryostate(American Optical)를 이용하여 40㎛ 두께의 연속관상절편을 제작하였고, 자른 조직은 그룹별로 시상하부와 해마부분의 조직을 취하여 염색을 시행하였다.

3. 면역조직화학법

면역조직화학법은 자유부유(free-floating)법을 이용하였다.[26] 조직절편은 먼저 조직내에 존재하는 내재성 peroxidase를 비활성화시키기 위해서 0.05M PBS에 1%로 희석된 과산화수소(H_2O_2)에 15분간 반응시킨 후, 10분 간격으로 3회 0.05M PBS로 세척한 후, mouse monoclonal TPH antibody(Calbiochem, USA)를 0.05% bovine serum albumin(BSA), 1.5% goat serum, 0.3% Triton X-100의 희석용액에 1 : 4000으로 희석하여, 24시간동안 상온에서 반응시켰다. 1차 항체용액에서의 반응이 끝나면, 조직을 0.05M PBS로 10분간 3번씩 세척한 후 2차 항체용액(Vecta Laboratories, Inc., USA)의 biotinylated anti-mouse IgG를 1 : 200으로 희석하여 1시간동안 실온에서 반응시켰다. 2차 항체 용액과 반응 후에 0.05M PBS로 10분간 3번씩 세척한 후, avidine-biotin-peroxidase complex(Vectastain-Elite ABC kit, Vector Laboratories, Inc., USA)에서 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 발색제로는 3,3′-diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB)을 0.05M Tris 완충용액에 0.02%로 하였으며, 0.003%의 H_2O_2를 첨가하였다. 발색반응은 상온에서 4분간 발색시켰으며, 반응이 끝난 후, 조직을 0.05M PBS로 10분간 3번씩 세척하였다. 발색이 끝난 조직은 gelatin-coated slide에 얹어서 2시간 동안 실온에서 건조시킨 후 ethanol의 농도를 70%, 80%, 90%, 95%, 100%로 높여가며 탈수시키고, xylene으로 투명화시켜 polymount로 봉입하였다.

4. 조직관찰 및 영상분석법(Image analysis)

TPH와 면역반응된 신경세포나 부위들은 발색제인 DAB에 의해 갈색으로 나타났으며, 이런 반응을 나타낸 세포체나 신경섬유와 뇌 조직의 각 부위의 염색성등을 광학현미경으로 관찰하여 사진을 촬영하였다. 뇌의 각 부위의 위치와 명칭은 Franklin과 Paxinos[27]의 부도를 참고로 하였다. 뇌의 시상하부와 해마의 TPH의 면역반응도는 영상분석기(IBAS, Kontron)를 이용하여 동일 부위에서 일정한 영역의 TPH에 의해 반응되어 나타난 염색성의 정도를 명도에 따른 gray scale값으로 측정하였다. 먼저 기준이 되는 조직을 전압에 따른 gray scale값을 측정하여 밝기의 변화를 적절하게 측정할 수 있는 전압으로 5volt를 정하였고 이후 모든 그룹의 측정하고자하는 부위의 영상분석은 현미경의 전압을 5volt로 일정하게 고정한 후 측정하였다. 측정된 gray scale값은 가장 어두운 값을 0으로, 가장 밝기가 밝은 값을 255로 측정하여 밝기의 변화에 따라 일정한 값으로 나타나는 optical density(OD)로 하였다.

5. RNA 분리 및 역전사 중합연쇄반응(reverse transcription-polymerase chain reaction: RT-PCR)

각 개체마다 뇌를 적출하여 균질기(homogenizer)를 이용하여 조직 50mg에 1ml의 RNAzol B(TEL-TEST, Inc., USA)를 첨가하여 균질화하였다. 크로로포름을 균질액에 1/10되게 가하고, 15초간 잘 혼합한 다음 얼음에 5분간 방치하였다. 12,000 × g에서 15분간 원심분리하고 상층액을 취하여 동량의 이소프로파놀(isopropanol)을 가한 후, 4℃에서 15분간 방치하였다. 15분 후에 다시 12,000 × g에서 15분간 원심분리한 후, 총 RNA를 추출하였다. RNA의 농도는 분광광도계로 260/280nm에서 측정하였다. DNA를

제거하기 위하여 필요한 경우 DNase-1을 처리하였다. 분리한 총 RNA에 역전사효소를 넣어 cDNA를 만든 후, TPH 유전자 cDNA의 일부분을 증폭하기 위해 primer를 이용하여 PCR을 시행하여 cDNA의 일부를 대량으로 증폭하였다. Total RNA 1㎍에 oligo dT primer 또는 random hexamer를 2㎕ 넣어, 65℃에서 10분간 반응시킨 후에, AMV 역전사효소 1㎕, RNasin 1ul, 10mM dNTP 5㎕, 10 × buffer 5㎕, 50mM $MgCl_2$ 및 탈이온수를 첨가하여 총 용량을 50㎕로 하여 42℃에서 1시간 반응시켜 cDNA를 얻었다. RT-PCR을 정량하기 위하여 각 cycle 별로 증폭하여(21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42) 유효 농도 곡선에 해당하는 cycle을 관찰하여 결정하였다.

PCR은 PCR 자동화기계(Perkin Elmer 9600, USA)에서 template로 cDNA 5㎕, ***Taq*** polymerase 2unit, 2.5mM dNTP 1㎕, sense primer 10pmole 1㎕, antisense primer 10pmole 1㎕, 10 × buffer 3㎕ 및 탈이온수를 첨가하여 총 30㎕로 하였으며, 94℃에서 5분간 1회, 94℃에서 30초, 58℃에서 30초, 72℃에서 30초씩 30회 반응시키고, 72℃에서 5분간 1회 시행한 후 1.2% 내외의 한천 겔에서 전기영동하였다. 내인성 표준물질(internal standard)로는 glycelaldehyde 3-phosphate dehydrogenase(GAPDH) 유전자 cDNA의 일부를 같은 방법으로 증폭하여 TPH 유전자 발현정도를 보정하였다. 또한 필요한 경우 RNA만 반응하는 온도인 85℃에서 반응하는 원리를 이용한 mRNA Selective PCR kit(TaKaRa, Japan)을 사용하였다. 각각의 primer는 Genbank에 등록된 염기서열을 참고하여 제작하였으며, TPH 유전자의 크기는 390bp으로 하였고, sense primer는 5′-CACGGAAGAAGAGATTAAGACCT-3′(23mer)와 antisense primer는 5′-GCCAGGCCAATTTCTTGGGAGAA-3′(23mer)로 합성하였다. House keeping 유전자인 GAPDH 유전자는 189 bp로 하였으며, sense primer는 5′-GTCATCATCTCCGCCCCTTC-3′(20mer)와 antisense primer 5′-GATGGCATGGACTGTGGTCA-3′(20mer)로 하였다. Genomic DNA나 다른 spliced mRNA가 증폭되는 현상을 방지하기 위하여 적어도 1개의 intron이 포함하게 하였다.

6. 통계처리

실험결과의 통계처리는 SPSS Window program을 이용하였으며, 모든 측정값은 평균값 ± 표준오차(mean ± standard error)로 나타내었고, 유의성은 $p < 0.05$로 하였다. 각 실험군간의 통계학적 분석은 ANOVA와 Student's t-test 및 Mann-Whitney 검정을 실시하였다.

결과 및 고찰

체중측정 결과, 정상군의 체중이 8.96 ± 0.18g이었고, 절식시킨 생쥐군은 6.86 ± 0.15g이었으며, 식욕부진 돌연변이 생쥐군은 3.88 ± 0.25g이었다. 식욕부진 돌연변이 생쥐군 및 절식시킨 생쥐군은 정상군의 체중과 비교하여 각각 약 43.30% 및 76.56% 정도로 나타났다. 통계검증 결과 정상군과 비교하여 절식시킨 생쥐군과 식욕부진 돌연변이 생쥐군의 체중이 유의적으로 낮게 나타났으며, 식욕부진 돌연변이 생쥐군이 절식시킨 생쥐군보다 체중이 상당히 낮았다(Fig. 1).

해마부위는 일반적으로 CA1, CA2, CA3(CA3와 CA4)로 나눈다. CA1과 CA3는 해마의 대부분을 차지하고 있고, CA2영역은 해마의 적은부분을 차지 한다. 또한 dentate gyrus와 CA3영역 사이를 hilus라고 명명한다. Dentate gyrus는 polymorphic layer, granular layer, molecular layer의 3개 겉질층으로 나눌 수 있고, 이외의 해마지역은 polymorphic layer(stratum oriens), pyramidal layer, molecular layer가 존재한다(Fig. 2).[28]

본 연구결과 해마에서의 TPH의 면역반응도는 정상군에서 CA1, CA2, CA3 및 dentate gyrus 영역의 granular layer에서는 거의 발현되지 않았으나, oriens layer, molecular layer 및 hilus 영역에서는 중등도의 발현 양상을 보였다. 24시간 절식시킨 생쥐군에서는 정상군과 비교하여, molecular layer와 hilus 영역에서 다수의 TPH를 함유하는 신경세포를 관찰할 수 있었으며, 특히 CA3 영역과 de-

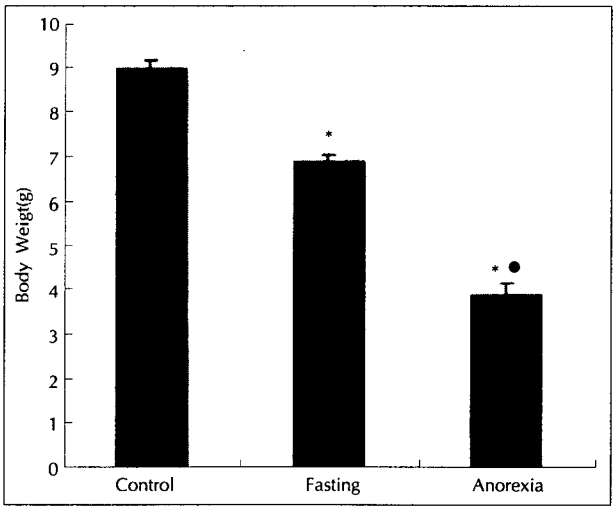

Fig. 1. Comparison of body weight between control, fasting, and anorexia mutant mice. Values are mean ± standard error(bars) for eight mice. Data were analysed by a Student's t-test. *$p < 0.01$ campared with control, ● $p < 0.01$ compared with fasting.

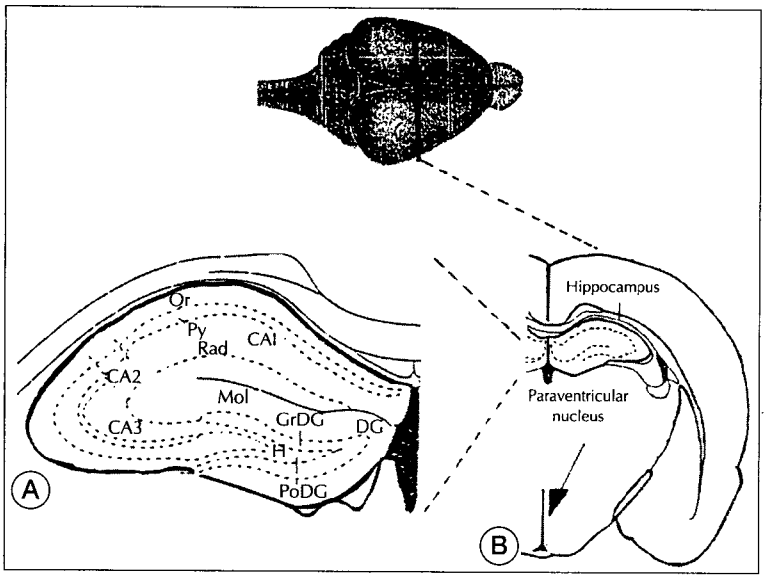

Fig. 2. The position of the hippocampal formation in the mouse brain. Panel A shows the position of the hippocampus. Panel B shows the hippocampus and hypothalamus(PVN) in mid-forebrain. CA = corn ammon, DG = dentate gyrus, H = hilus, Or = oriens layer, Py = pyramidal layer, Mol = molecular layer dentate gyrus, Rad = stratum radiatum(molecular layer), GrDG = granular dentate gyrus, PoDG = polymorphic layer dentate gyrus.

ntate gyrus 영역에서는 이러한 TPH 신경세포가 증가하였다. 그러나 유전적 식욕부진 생쥐에서는 해마의 각부위가 정상군에 비해 약간 증가하였다(Fig. 3). 이는 기존에 Son 등[25]이 식욕부진 돌연변이 생쥐를 이용한 연구에서 세로토닌 신경섬유가 해마, 피질, olfactory bulb, cerebellum에서 과발현되었다는 연구와는 차이점이 있었다. 이러한 차이점은 개체간의 발현 정도와 서로 다른 항체 사용에 의한 것으로 생각된다. 또한 절식 중 해마영역의 TPH 발현은 Tsujii 등[29]이 액체크로마토그래프로 측정하였을 시에 절식한 군에서 증가되었다고 보고하였다. 본 실험에서는 면역조직화학법을 이용하여 해마 각 부위에서의 TPH의 발현을 비교하였으며, 절식시킨 생쥐군에서 특히 CA3 영역과 dentate gyrus 영역에서 TPH를 발현하는 다수의 신경세포가 발견되었으며 이러한 현상은 아직까지 보고되지 않은 결과로, 음식섭취에 있어 절식시 생리적으로 나타나는 현상으로 생각되며, 음식섭취 조절 기전에 관련이 있을 것으로 추측된다. 식욕부진 돌연변이 생쥐의 해마에서의 TPH 발현은 정상군에 비해 약간 증가하였으나, 절식시킨 생쥐와는 현저한 차이를 나타내었다. 따라서 유전적인 영향으로 인한 해마에서의 TPH 변화는 식욕부진 자체의 병인 중 하나일 것으로 생각된다.

시상하부에서 세로토닌의 주된 작용부위인 paraventricular hypothalamus nucleus(PVN)의 TPH 면역반응도를 광학현미경으로 관찰해 본 결과 정상군과 비교하여, 절식시킨 생쥐군 및 돌연변이 생쥐에서 다소간의 발현양상의 차이가 있는 것으로 보였다(Fig. 3). 그러나 신경세포의 발현을 찾아보기 어려웠으며, 통계적인 의미를 알아보고자 영상분석을 시도하였다.

PVN에서의 세로토닌의 증가는 음식섭취를 억제한다고 알려져 있으며, 세로토닌이 작용하는 시상하부 부위에 대하여는 여러 실험적인 연구들이 있다. PVN에 세로토닌 투여시, 음식섭취를 증가시킨다고 알려진 노에피네프린에 의한 현상이 감소되었다는 보고가 있으며,[30] 이러한 경우에 식사횟수보다는 식사량이 선택적으로 감소되었다는 보고도 있다. 또한 PVN이 파괴되는 경우에 세로토닌으로 인하여 야기된 식욕부진이 완화되었다고 한다. PVN에서 음식섭취를 증가시킨다고 알려진 neuropeptide Y(NPY)와 길항작용을 하여 음식섭취를 억제하는 역할을 한다고도 한다.[17] Nishimura 등[31]은 48시간 절식시킨 후 흰쥐의 배내측 신경세포의 세로토닌에 대한 전기생리학적인 반응도가 변화한다고 보고하였다.

본 실험에 PVN에서의 세로토닌 발현 변화는 절식시킨 생쥐군 및 식욕부진 돌연변이 생쥐군 모두에서 특별한 변화가 없었다. 이러한 실험결과는 PVN에서는 절식시의 생리적 작용이나 식욕부진증의 병인에서, 세로토닌에 의한 단독작용보다는 다른 신경전달물질과의 상호작용이나, 전기생리학적인 작용기전 등의 다른 기전이 작용하리라 추측된다. 면역반응도가 높을수록 OD 값은 낮게 나타나고, 면역반응도가 낮을수록 OD 값은 높게 나타나게 하였다. Fig. 4는 시상하부에서의 TPH의 면역정도를 영상분석기로 분석한 것으로 정상군의 OD 값은 170.3 ± 3.5, 절식시킨 생쥐군은 168.3 ± 2.6, 식욕부진 돌연변이 생쥐군은 171.3 ± 0.8 이었다. 정상군과 비교하여 절식시킨 생쥐군에서 면역반응도가 약간 증가하는 경향을 보였으나 통계적인 유의성은 없었다. 식욕부진 돌연변이 생쥐군도 정상군과 비교하여 통계적인 차이점이 없었다.

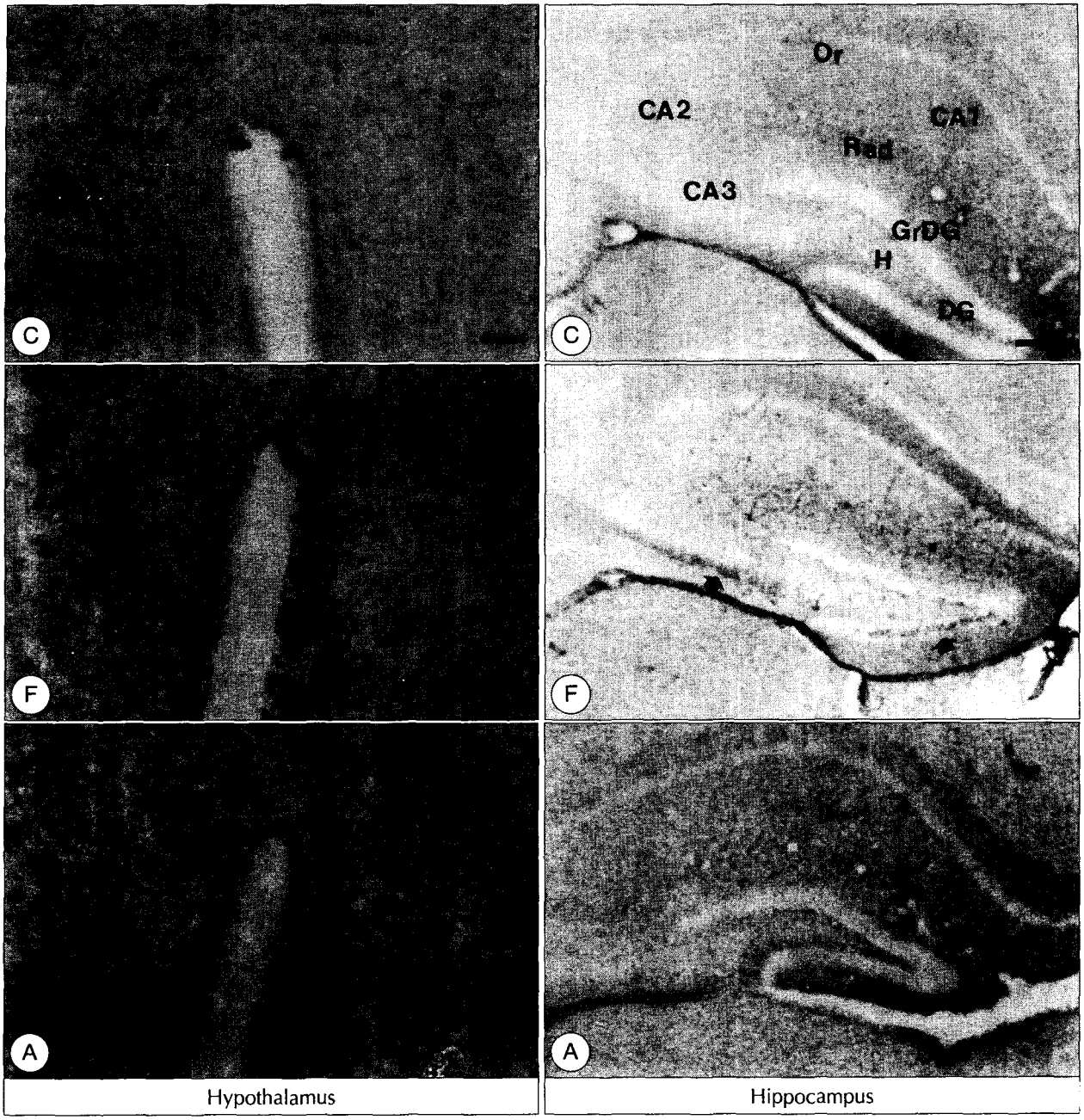

Fig. 3. TPH-like immunoreactivity in the hypothalamus and hippocampus. C: control mice, F: fasting mice, A: anorexia mutant mice, DG: dentate gyrus, PVN: paraventricular nucleus, Scale bars: Hypothalamus(80μm), Hippocampus(200μm). CA = corn ammon, DG = dentate gyrus, H = hilus, Or = oriens layer, Rad = stratum radiatum(molecular layer), GrDG = granular dentate gyrus.

유전자 발현은 laser densitometry와 Gelscan software program(Pharmacia, USA)을 이용하여 측정하였으며, GAPDH 발현에 대한 상대 비교를 하였다. 정상군(100%)과 비교하면 절식시킨 생쥐군에서는 123.3%으로 증가한 경향을 보였으나 통계적인 유의성은 없었으며, 식욕부진 돌연변이 생쥐군에서는 102.9%로 역시 정상군과 별다른 차이가 없었다(Fig. 5). 이런 결과는 절식 시와 식욕부진 돌연변이 생쥐의 전체 뇌에서의 TPH mRNA의 변화가 적음을 시사하고 있다.

임상치료에서는 세로토닌이 체중이나 식사행동에 대해 미치는 영향에 대한 연구들이 많이 이루어지고 있으며, 식욕감퇴를 유발하는 fenfluramine이 포만감을 주므로써 식사량을 감소시킨다는 보고[32]가 있고, 폭식증 환자에서 세로토닌대사의 장애가 있다는 연구[33]도 있으며, 비만증이 있는 당뇨병 환자들에 있어 세로토닌계 기능이 감소되어 과식증, 특히 탄수화물의 과다 섭취가 일어난다는 보고들이 있다.

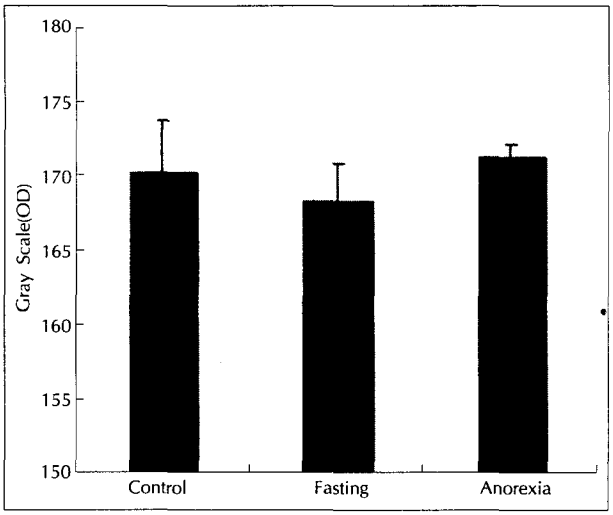

Fig. 4. TPH-like immunoreactivity in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. Data are represented as mean ± standard error (bars). Data were analysed by a Mann-Whitney test.

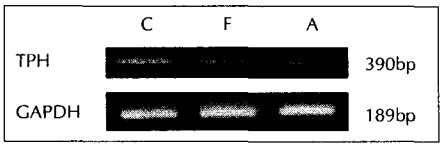

Fig. 5. TPH mRNA level in the whole brain. Expression of TPH mRNA in the whole brain was analyzed by RT-PCR. Expression levels of GAPDH mRNA were used as an endogenous standard for quantitation. TPH: tryptophan hydroxylase, GAPDH: glycelaldehyde 3-phosphate dehydrogenase, C: control mice, F: fasting mice, A: anorexia mutant mice.

세로토닌계 약물인 fluoxetine의 경우, 우울증의 치료제로 개발되었으나 치료중 일부환자에서 체중감소가 관찰되면서 비만치료제로 이용되고 있으며, 특히 우울증이 동반된 비만환자에게 유용하게 쓸수 있다[34]고 한다.

비만유전자에서 만들어진 leptin이라는 물질이 음식섭취의 신호전달과 체중조절에 있어 중요한 생리적 기능이 있다고 밝혀지면서 이와 관련된 많은 연구들이 진행되고 있다. 생쥐를 이용한 연구에서는 지방세포뿐만 아니라 뇌의 arcuate nuclei, ventromedial dorsomedial hypothalamus nuclei에서도 작용하는 것으로 보고되고 있으며,[35] 사람을 대상으로 한 연구에서는 시상하부와 소뇌에서 leptin 수용체가 발견되었다.[36]

음식섭취와 관련된 다양하고 복잡한 생리 기전과 섭식장애의 병인을 규명하기 위해서는 기존에 알려져 있는 생리학적 물질뿐만 아니라, 최근 음식섭취와 관련이 있다고 알려지고 있는 agouti-related protein, mahogany protein, neurotensin, β-endorphin, leptin receptor(Ob-R), amylin, adrenomedullin, oxytocin, anorecin, adenylatecyclase activating polypeptide, interleukin 1-β, growth-hormone-releasing factor, melanin-concentrating hormones, orexin A와 B, cocaine and amphetamine regulated transcript(CART) 등에 관한 심층연구의 필요성을 본 연구결과는 시사하고 있다. 이와 같이 식욕부진 돌연변이 생쥐의 음식섭취 조절기전에 관여하는 중추신경내의 시상하부에 존재하는 신경전달물질의 변화를 관찰함은, 섭식장애의 병인을 규명하는데 유용한 정보를 제공할수 있을 것이다.

요약 및 결론

본 연구에서는 인위적으로 절식시킨 생쥐와 유전적으로 식욕부진증을 가지고 태어난 식욕부진 돌연변이 생쥐를 이용하여, 식욕을 억제하는 대표적 신경전달물질 중의 하나인 세로토닌의 속도제한효소(rate-limiting enzyme)인 tryptophan hydroxylase(TPH)의 발현을 면역조직화학법과 영상분석법, RT-PCR을 이용하여 관찰하였다. 연구결과는 다음과 같다.

1) 해마에서의 TPH는 정상군과 비교하였을 때, 인위적으로 절식시킨 생쥐군의 CA3와 dentate gyrus 영역에서 다수의 신경세포가 발견되었다. 그러나 식욕부진 돌연변이 생쥐군은 정상군과 차이가 없었다. 이러한 결과는 인위적 절식시 해마에서 나타나는 생리적 현상으로 TPH의 발현이 음식섭취 조절에 관련되었을 것으로 추측된다. 또한 식욕부진 돌연변이 생쥐의 해마에서 TPH 변화는 식욕부진 자체의 병인 중 하나일 것으로 생각된다.

2) 시상하부에서의 TPH 면역반응도는 정상군과 비교하였을 때, 인위적으로 절식시킨 생쥐군과 식욕부진 돌연변이 생쥐군의 두 군간에 통계학적으로 유의한 차이가 없었다.

3) 뇌 전체의 TPH mRNA를 측정하기 위한 RT-PCR 결과에서는 정상군(100%)과 비교하였을 때, 인위적으로 절식시킨 생쥐에서 123.3%, 식욕부진 돌연변이 생쥐에서 102.9%이었으며, 각군간에 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

위와 같은 결과들은, 인위적으로 절식한 경우는 해마에서 TPH 신경세포의 발현이 관찰되었고, 식욕부진 돌연변이 생쥐의 경우는 유의적인 변화가 관찰되지 않아, 유전적 식욕부진증생쥐의 병인에 해마에서의 TPH 변화가 일부 관여할수 있음을 시사한다.

Literature cited

1) Jquier E, Tappy L. Regulation of body weight in humans. *Physiol Rev* 79: 451-480, 1999

2) Lavin JH, Wittert G, Sun WM, Horowitz M, Morley JE, Read NW. Appetite regulation by carbohydrate: Role of blood glucose and gastrointestinal hormones. *Am J Physiol* 271: E209-214, 1996
3) Silver AJ, Flood JF, Morley JE. Effect of gastrointestinal peptides on ingestion in old and young mice. *Peptides* 9: 221-225, 1988
4) De Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao XB, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg ELF, Gautvik VT, Bartlett FS, Frankel WN, van den Pol AN, Bloom FE, Elmquist JK, Ahima RS, Maratos-Filter E, Flier JS, Saper CB. Leptin activates neurons in ventrobasal hypothalamus and brain stem. *Endocrinology* 138: 839-842, 1996
5) Stellar E. The physiology of motivation. *Psychol Med* 61: 5-22, 1954
6) Bray GA, Imoue S, Nishizawa Y. Hypothalamic obesity. The autonomic hypothesis and the lateral hypothalamus. *Diabetologia* 20: 366-377, 1981
7) Brown FD, Fessler RG, Rachlin JR, Mullan S. Changes in food intake with electrical stimulation of the ventromedial hypothalaus in dogs. *J Neurosurg* 60: 1253-1257, 1984
8) Leibowitz SF. Brain monoamines and peptides: Role in the control of eating behavior. *Federation Proc* 45: 1396-1403, 1986
9) Grill HJ, Kaplan JM. Caudal brainstem participants in the distributed neural control of feeding. In Stricker EM. ed. Handbook of behavioral neurobiolog, vol 10. pp.125-149, Plenum. New York, 1990
10) Hoebel BG. Brain neurotransmitters in food and drug reward. *Am J Clin Nutr* 42: 149-172, 1985
11) Kim YH, Shim JC. Neuropeptides in clinical psychiatric research:endorphins and cholecystokinins. *Biological Psychiatry* 5: 34-45, 1998
12) Nambu T, Sakurai T, Mizukami K, Hosoya Y, Yanagisawa, Goto K. Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Res* 827: 243-260, 1999
13) Trivedi P, Yu H, Macneil DJ, Van der, Ploeg LH, Guan XM. Distribution of orexin receptor mRNA in the rat brain. *FEBS Lett* 438: 715, 1998
14) Joh TH, Shikimi T, Pickel VM, Reis DJ. Brain tryptophan hydroxylase: Purification of production of antibodies to, and cellular and ultrastructural localization in serotonergic neurons of rat midbrain. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 3575-3579, 1975
15) Jacobs BL, Azmitia EC. Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev* 72: 165-229, 1992
16) Strubbe JH. Neuroendocrine factors. In: Food intake and energy expenditure, In Westerterp-Plantenga MS, Fredrix EWHM, Steffens AB, eds. pp.175-182, CRC Press, Baca Ranton, 1994
17) Blundell JE, Halford JCG. Serotonin and appetite regulation. *CNS Drugs* 9: 473-495, 1998
18) Fuller RW. Neural functions of serotonin. *Sci Am* July/August: 48-57, 1995
19) Barrett AM, McSherry L. Inhibition of drug-induced anorexia in rats by methysergide. *J Pharm Pharmacol* 27: 889-895, 1975
20) Jesperson S, Scheel-Kruger. Evidence for a difference in mechanism of the action between fenfluramine and amphetamine induced anorexia. *J Pharmacol* 22: 637-638, 1973
21) Pinder BM, Brogden RN, Sawyer PR. Fenfluramine: a review of the pharmacological properties and therapeutic efficacy in obesity. *Drugs* 10: 241-323, 1975
22) Bray GA, York DA. Studies on food intake of genetically obese rats. *Am J Physiol* 223: 176-179, 1972
23) Mackenzie RG, Hoebel BG, Ducret RP. Hyperphagia following intraventricular p-chlorophenylalanine-, leucine- or tryptophan-methyl esters: lack of correlation with whole brain serotonin level. *Pharmacol Biochem Behav* 10: 951-955, 1979
24) Cho SC. Biology and pharmacotherapy in eating disorders. *Korean J Psychopharmacol* 8: 3-22, 1997
25) Son JH, Baker H, Park DH, Joh TH. Drastic and selective hyperinnervation of central serotonergic neurons on a lethal neurodevelopmental mouse mutant, *Anorexia(anx)*. *Mol Brain Res* 25: 129-134 , 1994
26) Kim YS, Huh YB, Ahn HK. Immunohistochemical study on the distribution of neuropeptide Y and NADPH-diaphorase positive neurons in the cerebral cortex of mice. *Korean J Phys Anthrop* 11: 61-71, 1998
27) Franklin KBJ, Paxinos G. The mouse brain in stereotaxic coordination, Academic Press, San Diego, 1997
28) Brown TH, Zador AM. The synaptic organization of the brain. In: Shepherd GM, ed. pp.346-388, Oxford University Press, 1990
29) Tsujii S, Nakai Y, Fukata J, Nakaishi S, Takahashi H, Usui T, Imura H, Ikeda H, Matsuo T. Monoamine metabolism and its responses to food deprivation in the brain of Zucker rats. *Physiol Behav* 44: 495-500, 1988
30) Leibowitz SF, Papadakos PJ. Serotonin-norepinephrine inteactions in the PVN. *Soc Neurosci Abstr* 4: 542, 1982
31) Nishimura F, Nishihara M, Torii K, Takahashi M. Changes in responsiveness to serotonin on rat ventromedial hypothalamic neurons after food deprivation. *Physiol Behav* 60: 7-12, 1996
32) Blundell JE, Hill AJ, Kirkman TC. Dextrofenfluramine and eating behavior in animals. In Human Body weight, Bender A, ed. pp.233-239, Pitman Publishing, London, 1986
33) Kaye WH, Ebert MH, Gwirstman HE. Differences in brain serotonergic metabolism between nonbulimic and bulimic patients with anorexia nervosa. *Am J Psychiatry* 141: 1598-1601, 1984
34) Blackburn GL, Kanders BS. Obesity-pathophysiology, psychology, and treatment, 1st ed. pp.283-299, Chapman & Hall, Inc., New York, 1994
35) Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muirc, Sanjer S, Mariarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Woolf EA, Monroe CA, Tepper RI. Identification and expression cloning of a leptin receptor OB-R. *Cell* 83: 1263-1271, 1995
36) Cource ME, Burguera B, Parisi JE, Jensen MD, Lloyd RV. Localization of leptin receptor in the human brain. *Neuroendocrinology* 66: 145-150, 1997