

절식시킨 생쥐와 식욕부진 돌연변이 생쥐의 시상하부에서 Vasoactive Intestinal Peptide의 발현

김미자·김영옥[†]·김혜경*·정주호**

동덕여자대학교 식품영양학과

*한서대학교 식품생명공학과

**경희대학교 의과대학 약리학교실

Expression of Vasoactive Intestinal Peptide in the Hypothalamus of Fasting and Anorexia Mutant Mice (*anx/anx*)

Mi-Ja Kim, Youngok Kim[†], Hye-Kyung Kim* and Joo-Ho Chung**

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

*Dept. of Food and Biotechnology, Hanseo University, Seosan 356-820, Korea

**Dept. of Pharmacology, College of Medicine, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

Abstract

The present study was conducted to identify the mechanism about the regulation of appetite by examining the expression patterns of vasoactive intestinal peptide in the hypothalamus of either fasted for 24 hours or anorexia mutant mouse. In order to investigate expression pattern of the vasoactive intestinal peptide, immunohistochemistry was employed along with reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and dot blotting. Immunohistochemistry has shown that level of expression of vasoactive intestinal peptide, an appetite-suppressing neuropeptide, was lower in the suprachiasmatic nucleus (SCN) and higher in the paraventricular nucleus (PVN) of the anorexia mutant group than in the comparable regions in the control group. This pattern was repeated in the fasting group, which also showed lower and higher levels of vasoactive intestinal peptide expression in the SCN and PVN, respectively. In contrast, the vasoactive intestinal peptide mRNA level in the entire hypothalamus via RT-PCR and dot blotting was similar in the fasting and control groups, while it was significantly increased in the anorexia mutant group.

Key words: anorexia, fasting, vasoactive intestinal peptide, RT-PCR, dot-blotting

서 론

음식 섭취와 에너지 소비의 불균형에 의해 나타나는 현상인 비만은 현대 사회의 중요한 건강문제로 대두되고 있다. 음식섭취 과정은 관점에 따라 말초적 조절 과정과 중추적 조절 과정으로 나누어 볼 수도 있고, 음식섭취 시작과 종료로 나누어 생각할 수도 있다. 식욕의 말초적 조절 과정은 위장계에 존재하는 화학적 기계적 수용체가 영양소의 내용을 인식하여 미주신경(vagus nerve)을 통하여 뇌의 중추신경계로 섭식과 포만의 신호를 전달하면 뇌에서는 그 신호를 받아 다음 식사행동을 어떻게 할 것인지를 결정하는 일련의 과정을 의미하며, 식욕의 중추적 조절 과정은 동물과 사람의 식욕을 조절하는 센터가 존재하여 이러한 조절센터에 의해서 음식섭취 과정이 조절된다는 것이다. 일반적으로 중추적 조절과정에서 조절 센터로 알려진 부위는 시상하부(hypothalamus)와

뇌간(brain stem)이며(1), 시상하부는 뇌와 말초신경계를 연결해주는 주요한 영역으로(2) 자율신경계와 내분비계의 항상성조절에 중요한 역할을 한다(3). 또한 시상하부는 여러 신경영역으로 구성되어있으며 각각의 신경영역에서 서로 다른 신경전달물질들이 서로 상호작용하여 음식섭취를 조절한다(4,5).

Vasoactive intestinal peptide는 식욕감소물질로써 28개의 아미노산으로 구성되어있고, 위장계와 중추신경계에 널리 퍼져있는 gut/brain 펩타이드이다. 또한 뇌의 대뇌피질(cerebral cortex), 해마(hippocampus), 시상하부(hypothalamus)에 존재하는 것으로 알려져 있고(6), 시상하부 중에서는 특히 paraventricular nucleus(PVN)과 suprachiasmatic nucleus(SCN)영역에 발현되는 것으로 알려져 있다(7). 이외에도 vasoactive intestinal peptide는 신경세포의 사멸과 발달과정에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 또한 이러한 gut/brain

[†]Corresponding author. E-mail: yok@dongduk.ac.kr
Phone: 82-2-940-4463. Fax: 82-2-940-4193

펩타이드가 영양학적으로 중요한 이유는 사람이나 동물이나 음식을 섭취하여 소화하는 과정이 hypothalamic-pituitary-adrenal(HPA) axial 호르몬분비의 증가에 의해서 이루어지는데, 이때 gut/brain 펩타이드가 분비되어 음식물 소화를 돕는 HPA 호르몬 분비에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(8). 또한 본 연구에 이용된 식욕부진 돌연변이 생쥐는 태어나서 3~4주내에 음식섭취 감소에 의해 죽는 동물로 알려져 있으며(9), 선행된 연구에 의하면 식욕부진 돌연변이 생쥐의 뇌 내에 식욕을 억제하는 것으로 알려진 신경전달물질인 serotonin이 증가되어 있고(10), 대표적인 식욕증가 펩타이드인 neuropeptide Y가 뇌의 arcuate nucleus에서는 증가되어 있으나, 다른 작용영역에서는 감소되어 있음이 밝혀져 있다(11). 그러나 아직까지도 식욕부진 돌연변이 생쥐 뇌 내의 음식섭취 조절기전에 대한 연구가 미비한 실정이다.

이에 본 연구는 vasoactive intestinal peptide의 식욕감소 기능에 의한 식욕조절 기전을 관찰하여 보고자 하였다. 특히 절식이라는 식생활 조절과 식욕감퇴라는 유전적 소인 중 어느 것에 vasoactive intestinal peptide가 더 민감하게 반응하는지 관찰하고자 하였다. 이를 위해 24시간 절식시킨 정상 생쥐와 유전적 식욕부진증 돌연변이 생쥐의 시상하부에서 vasoactive intestinal peptide 발현정도들 면역조직화학법과 RT-PCR, dot-blotting을 이용하여 관찰하였다.

재료 및 방법

실험동물 및 사육환경

식욕부진 돌연변이 생쥐는 2번 염색체 agouti locus 20 cM의 돌연변이 생쥐로(8), Jackson Laboratory(USA)로부터 구입한 한 쌍의 heterozygous breeder(B6C3Fe-a/a-anx A/a, anx/-)를 교배시켜 출생한 homozygous이다. 식욕부진 돌연변이 생쥐는 출생 7일 후부터 현저하게 성장이 저하되고 16일 경부터 비정상적인 행동인 신체진전(body tremors), 과다행동(hyperactivity), 비협조적 보행(uncoordinated gait) 등이 뚜렷하게 나타나면서 식욕이 감소하고 체중이 같은 자손인 wild type과 heterozygous type의 반 이하로 되어 결국 출생 후 19일에서 26일 사이에 기아상태가 되어 죽는 특징을 보인다(9). 이러한 특징들을 기준으로 생후 3주된 이유기의 생쥐(anorexia) 중 실험군을 선별하였다. 면역조직화학법에는 식욕부진 돌연변이군 8마리, wild type을 24시간 절식시킨군(fasting) 8마리, wild type 대조군(control) 8마리로 하여 이들 세 군에 대한 비교실험을 하였고, RNA 준비를 위해서 각 그룹별로 4마리씩의 동물을 배정하였다.

조직처리

에테르로 마취한 실험동물의 흉강을 열고 심장의 좌심실을 통하여 0.05 M 인산염 완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)를 1 cc 주사기로 1분간 주입하여, 혈액이 완전히 제거된 후 0.1 M 인산염 완충용액(phosphate buffer, PB)에

녹인 4% paraformaldehyde(PFA)용액을 10분간 관류하였고, 관류속도는 50~60 mL/min으로 하였다. 적출한 뇌를 4% PFA에 담가서 4°C에서 12~16시간 후 고정하였다. 고정된 뇌 조직은 조직내 결정화를 막기 위해서 30% sucrose 용액에 2~5일간 침전시킨 후 microtome(Leica, Nußloch, Germany)을 이용하여 40 µm 두께로 잘라 저장액(30% glycerin, 30% ethylene glycol, 10% 0.2 M PB)에 10장씩을 냉장 보관하여 사용하였다.

면역조직화학법(IHC)

면역조직화학법은 이전에 보고된 방법인 자유부유법(free-floating method)을 이용하였다(12,13). 관찰하고자 하는 부위의 조직절편을 0.05 M PBS로 세척한 후 1% H₂O₂로 반응시켜 내재성 peroxidase를 비활성화시키고, 10% goat serum, 1% bovine serum albumin(BSA) 용액과 반응시켜 비특이적 결합을 제거한 후 vasoactive intestinal peptide 1차 항체 용액(DiaSorin, cat. No. 20077, USA)을 상온에서 24시간 반응시켰다. PBS로 세척 후 2차 항체 용액(Vector Lab. Inc., USA)에서 1시간 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. Vasoactive intestinal peptide의 항체와 면역반응을 보인 신경세포나 신경섬유들은 발색제인 DAB에 의해 갈색으로 나타났으며, 이런 반응을 나타낸 신경세포나 신경섬유와 뇌 조직의 각 부위의 염색성을 광학현미경으로 관찰하여 사진을 촬영하였다. 뇌의 각 부위의 위치와 명칭은 Franklin과 Paxinos(14)의 부도를 참고로 하였다.

역전사 증합효소 연쇄반응

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 원심분리하고 상층액을 취하여 동량의 이소프로판올을 가한 후, 4°C에서 15분간 방치하였다. 다시 12,000×g에서 15분간 원심분리한 후, 총 RNA를 추출하였다. RNA의 농도는 분광광도계로 260 nm에서 측정하였다(12,13).

역전사증합연쇄반응(RT-PCR) : 총 RNA에 역전사효소를 넣어 cDNA를 만든 후 vasoactive intestinal peptide 유전자 cDNA의 일부분을 증폭하기 위해 primer를 이용하여 PCR을 시행하여 대량으로 증폭하였다. 총 RNA용액과 oligo dT primer를, 65°C에서 10분간 반응시킨 후에 avian myeloblastosis virus(AMV) 역전사효소, RNAasin, 10 mM dNTP, 5× buffer를 첨가하여 42°C에서 1시간 반응시켜 cDNA를 얻었

다. PCR은 PCR 자동화기계(Perkin Elmer 9600, USA)에서 template로 cDNA, *Taq* polymerase, dNTP, sense primer, antisense primer, 10×buffer 및 탈이온수를 첨가하여, 총 반응용액을 30 μL로 하였다. vasoactive intestinal peptide는 94°C 5분간 1회, 94°C에서 30초, 58°C에서 30초, 72°C에서 30초씩 40회 반응시키고, 72°C에서 5분간 1회 시행한 후, 1.2% 한천 겔에서 전기영동하였다. RT-PCR을 정량하기 위하여 각 cycle별로 증폭하여(21,24,27,30,33,36,39,42) 유효농도 곡선에 해당하는 cycle을 관찰하여 결정하였다. 내부 표준물질로는 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase(GAPDH) 유전자 cDNA의 일부를 같은 방법으로 24회 증폭하여 vasoactive intestinal peptide 유전자 발현정도를 보정하였다. Vasoactive intestinal peptide와 GAPDH의 primer는 Genbank에 등록된 염기서열을 참고하여 제작하여 vasoactive intestinal peptide의 sense primer는 5'-CAGCTTGGACAGCAGAGCAC-3' (20 mer), antisense primer는 5'-CACACTACAGAAGGTGGTCC-3' (20mer)로, GAPDH 유전자의 sense primer는 5'-ATCACCATCTTCCAGGAGCG-3' (20 mer), antisense primer는 5'-GATGGCATGGACTGTGGTCA-3' (20mer)로 하였다.

Dot blotting

분리한 총 RNA에서 관찰하고자 하는 신경펩타이드의 발현은 dot blotting으로 관찰하였다(15).

표지된 probe 준비 : GAPDH, vasoactive intestinal peptide 유전자를 형광물질로 표지된 probe로 만들기 위해 각각의 cDNA로부터 일부분을 증폭하여 얻은 유전자(GAPDH 324 bp, vasoactive intestinal peptide 272 bp)를 gel에 걸어 Gel 추출 kit(QIAEX II, Cat. No. 20051, Germany)를 이용하여 분리 정제하였다. 이와 같이 분리정제한 유전자를 희석하여 5분간 가열하여 변성시킨 후, 얼음에 방치하였다. Nucleotide mix 10 μL, random primer 5 μL, 변성된 DNA 50 ng, Klenow enzyme solution 5 units/μL를 첨가하여 총 부피가 50 μL로 만들어 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다(Gene Images random prime labelling module, Cat. No. RPN 3540, Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA).

RNA 처리 : 총 RNA는 10×MEA(0.2 M MOPS, 50 mM sodium acetate pH 7.0, 10 mM 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. RNA를 nylon 흡착지에 고정하기 위해서 UV cross-linker를 이용하여 2분간 반응시켰다.

보합결합 : RNA가 고정된 흡착지와 probe와의 보합결합을 위해 Hybrisol I(Oncor, Cat. No. S4040, MD, USA : 50% formamide, 10% dextran sulfate, 1% SDS, blocking reagents) 5 mL을 65°C에서 예열시켜 준비하고, probe는 100°C에서 10분간 끓여 변성시킨 후 얼음에 넣었다가 준비된 Hybrisol I

5 mL에 probe 10 μL를 넣고 RNA가 고정된 흡착지를 펀셋으로 옮겨 65°C hybridization oven에 하룻밤 반응시켰다. 반응이 끝난 흡착지를 미리 예열시킨 1×SSC/0.1% SDS용액, 0.2×SSC/0.1% SDS용액 순으로 15분간 65°C에서 세척하였다.

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 1 μL/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 1 mL정도 넣고 2~5분간 반응시킨다. 5분 후에 다시 흡착지에 남아 있는 detection agent를 제거하고 흡착지가 마른 후에 비닐 백을 열고 봉입한다. 봉입한 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).

통계분석

통계처리는 SAS(Statistic Analysis System) program을 이용하여, one-way ANOVA로 유의성을 검정하였고 각 군간의 차이는 Tukey's test로 평가하였고, 실험군중 두 군간의 비교는 Student's t-test로 검증하였다.

결과 및 고찰

면역조직화학법

면역조직화학법을 이용하여 대조군, 절식군, 식욕부진 돌연변이군에서 시상하부의 여러 영역에서 vasoactive intestinal peptide의 발현 정도를 측정된 결과는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 시상하부내의 영역별로 절식시킨 군과 식욕부진 돌연변이군의 vasoactive intestinal peptide 발현의 정도에서 차이가 있었다. Table 1에서 보는 바와 같이, SCN 영역에서는 대조군 109.9, 절식군 83.5, 식욕부진 돌연변이군은 105.8로, 대조군에 비해 절식군은 유의적인 수준으로 낮았으나, 식욕

Table 1. Mean values of vasoactive intestinal peptide-like immunoreactivity at the various regions of hypothalamus in experimental groups

Regions ¹⁾	Study groups	Control (n=8)	Fasting (n=8)	Anorexia (n=8)
SCN		109.9±0.6 ²⁾³⁾	83.5±4.6 ^c	105.8±2.0 ^b
PVN		56.3±0.7 ^c	68.7±2.4 ^a	64.0±0.5 ^b

¹⁾SCN: suprachiasmatic nucleus, PVN: paraventricular nucleus.

²⁾Data are represented as mean±standard error.

³⁾Values with different superscript are significantly different at the p<0.05 using Tukey's test.

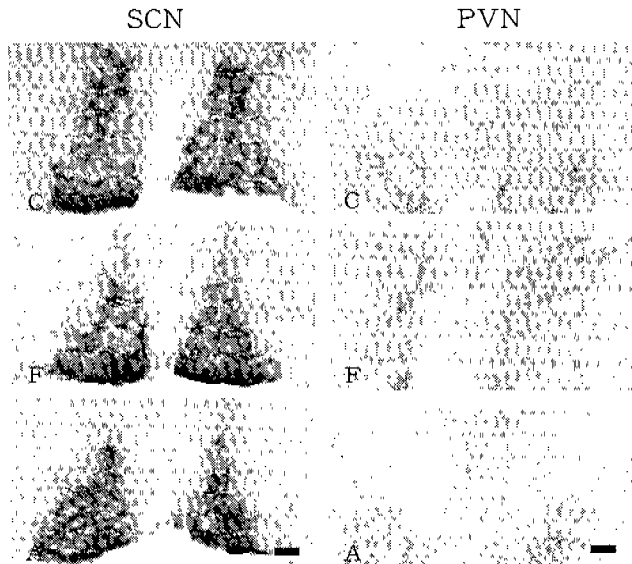


Fig 1. Vasoactive intestinal peptide-like immunoreactivity in the SCN and PVN of hypothalamus.

Scale bars = 100 μ m.

SCN: suprachiasmatic nucleus.

PVN: paraventricular nucleus.

C: control, F: fasting, A: anorexia mutant mice.

부진 돌연변이군은 유의적 차이가 없었다. PVN 영역에서는 대조군 56.3, 절식군 68.7, 식욕부진 돌연변이군 64.0으로, 대조군에 비해 절식군과 식욕부진 돌연변이군 모두 발현이 유의적으로 높았다($p < 0.05$). 그리고 대조군과 비교한 증가량의 차이는 절식군이 식욕부진 돌연변이군보다 더 크게 나타났다. 이러한 세 군과의 차이는 통계적으로 유의하였다.

역전사 중합효소 연쇄반응

mRNA 수준에서 관찰하기 위해서 RT-PCR을 이용하여 시상하부 전체의 VIP mRNA의 양을 정량해 보았다. Fig. 2에서 나타난 바와 같이, 대조군과 절식군은 비슷한 발현정도를 보였고, 식욕부진 돌연변이군은 높은 발현을 보였다. 또한 상대적인 발현의 정도를 측정하기 위해서 내부 표준물질인 GA

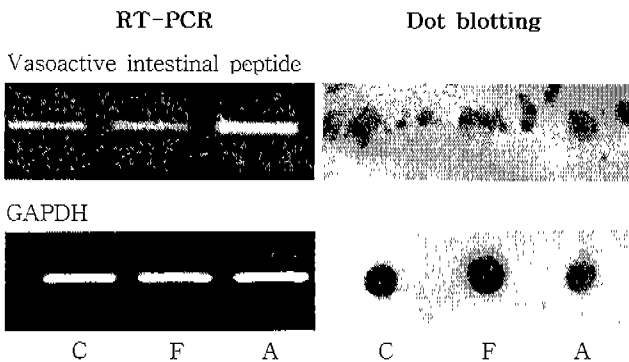


Fig. 2. Expression vasoactive intestinal peptide mRNA in the hypothalamus was analyzed by RT-PCR and dot blotting.

GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

C: control, F: fasting, A: anorexia mutant mice.

PDH로 보정한 결과 대조군을 100%로 하였을 때 절식군은 109%이었고, 식욕부진 돌연변이군은 160%로, 식욕부진 돌연변이군의 증가량이 뚜렷하였다(Table 2).

Dot-blotting

RT-PCR 방법 이외에 또 다른 분자생물학적인 방법인 dot blotting에 의한 발현을 측정해 본 결과, Fig. 2에서와 같이 대조군과 절식군은 비슷한 발현을 보였고, 식욕부진 돌연변이군은 높은 발현을 보였다. 또한 상대적인 발현의 정도를 측정하기 위해서 GAPDH로 보정한 결과 대조군을 100%로 하였을 때, 절식군은 88%였고 식욕부진 돌연변이군은 103%로 RT-PCR 결과와 비슷한 경향을 나타내었다(Fig. 2).

식욕을 감소시키는 물질로 알려진 vasoactive intestinal peptide의 경우는 처음에는 위장에서만 분비되는 물질인 것으로 알려졌으나, 신경조직 즉 뇌의 시상하부내의 PVN(16)과 SCN에서 발현되어 식욕 기전을 조절하는 신경전달물질로서의 역할을 한다는 것을 알게 되었다. 이전에 vasoactive intestinal peptide에 대한 연구들은 Quik 등(17)이 쥐의 뇌에서 vasoactive intestinal peptide가 cAMP의 수준을 증가시키므로써 중추신경계에서 신경조절자로서 작용한다는 사실을 확인하였고, 또한 cerebral cortex에서 포도당분해를 촉진한다는 사실이 밝혀져 포만 신호를 내는 것으로 알려지게 되었다(18). 한편 vasoactive intestinal peptide가 세포의 사멸과 retinal ganglion cell과 sympathetic neuroblasts의 세포분화에까지 관여한다는 사실이 알려지게 되었다(19,20).

Williams 등(21)의 연구에 의하면, 4주 6주 28주로 연령이 서로 다른 *ob/ob* 생쥐에서 vasoactive intestinal peptide의 변화를 측정하였는데, 28주령에서만 *ob/ob* 생쥐의 central hypothalamus에서 vasoactive intestinal peptide의 양이 유의적으로 증가되었음을 보고하였다. 이들은 음식섭취를 감소하는 물질인 vasoactive intestinal peptide가 28주령의 *ob/ob* 생쥐에서 증가되는 현상으로는 이 동물모델의 비만 현상을 설명할 수 없는데, 이에 대한 해석을 4주, 6주령의 *ob/ob* 생쥐에서는 vasoactive intestinal peptide변화가 관찰되지 않는 것이 이 동물에서 비만을 일으키는데 작용한 것으로 결론을 지었으며, vasoactive intestinal peptide의 발현이 동물의 발달과정에 따라 다름을 관찰하였다. 그러나 *db/db* 생쥐의 경우는 유전적으로 비만과 당뇨가 유발되는 동물로, *ob/ob* 생쥐와는 달리 연령에 관계없이 vasoactive intestinal peptide

Table 2. Relative quantity of vasoactive intestinal peptide mRNA by RT-PCR and dot blotting

	Control (n=4)	Fasting (n=4)	Anorexia (n=4)
RT-PCR	100	109.5 \pm 0.7	160.6 \pm 8.9 ¹
Dot-blotting	100	88.4 \pm 0.5	102.9 \pm 0.3 ¹

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, as determined by Student's *t*-test ($p < 0.05$).

immunoreactivity가 amygdala 영역에서 감소되는 것을 관찰하였다(22). 이러한 결과는 *ob/ob* 생쥐과 *db/db* 생쥐가 유전적으로는 비슷한 증상 즉, 과부신피질호르몬증, 비임증, 비만, 고인슐린혈증을 나타내지만, 이러한 기전에 관여하는 여러 가지 신경전달물질들의 발현 양상은 다름을 보여주고 있다. 비만쥐(*fa/fa*)의 경우도 vasoactive intestinal peptide의 수준이 감소되어 있음이 알려져 있다(23). 또한 절식과 vasoactive intestinal peptide의 변화에 대한 Zheng 등(24)의 연구에 의하면, 5일간 절식하여도 vasoactive intestinal peptide의 뇌내의 변화가 없었다고 보고하였다. 이러한 선행 연구결과로 본 연구에서 절식시에 vasoactive intestinal peptide mRNA의 변화가 없었던 것은 실험동물의 연령을 3주로 제한하다 보니 절식기간을 24시간 이상으로 할 수 없어 절식기간의 부족으로 변화를 관찰하지 못한 것으로 생각된다.

이와 같이 vasoactive intestinal peptide의 중추신경계에서의 역할 연구는 식욕과 관련된 연구들로 진행되고 왔고, 본 연구에서도 식욕부진 돌연변이군에서 분자생물학적인 관찰을 통해 vasoactive intestinal peptide mRNA가 증가되어 있음을 확인할 수 있어, 이러한 결과가 이 동물 모델이 식욕부진을 일으키는 원인으로 작용할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 아직까지 식욕부진 돌연변이 생쥐의 vasoactive intestinal peptide 신경펩타이드 발현 연구가 없었기 때문에 본 실험의 결과가 식욕부진 돌연변이 생쥐의 식욕조절 기전을 이해하는데 도움이 되리라 생각한다.

요 약

본 연구는 신경 peptide 중 식욕감소 기능에 관여한다고 알려진 vasoactive intestinal peptide의 식욕조절 기전을 관찰하기 위해 시도되었다. 연구방법으로는 환경적으로 24시간 절식시킨 생쥐와 유전적으로 식욕부진증을 가지고 태어난 생쥐의 시상하부에서 vasoactive intestinal peptide의 발현양상을 조직수준의 관찰인 면역조직화학법과 분자생물학적 수준에서의 관찰인 역전사연쇄증합반응(RT-PCR)과 dot-blotting을 이용하여 관찰하였다. 연구결과는 다음과 같다. 조직학적 수준에서의 관찰인 면역조직화학법에 의한 vasoactive intestinal peptide의 발현정도는 절식군의 경우, SCN 영역에서 발현정도가 낮았고 PVN 영역에서는 높게 나타났다. 식욕부진 돌연변이군의 경우도 SCN 영역에서 발현정도가 낮았고 PVN 영역에서는 발현정도가 높게 나타났다. 분자생물학적 방법인 RT-PCR과 dot-blotting으로 전체 시상하부의 vasoactive intestinal peptide mRNA를 측정 한 결과, 절식군은 대조군과 비슷하였고 식욕부진 돌연변이군에서 vasoactive intestinal peptide mRNA 발현은 현저하게 증가됨을 관찰할 수 있었다. 이상의 실험결과로 미루어 보아, vasoactive intestinal peptide에 의한 식욕조절은 절식이라는 식이조절보다는 유전적 소인을 지닌 식욕부진 돌연변이 생쥐의 식욕감소 조절

에 더욱 민감하게 반응한 것으로 사료된다.

문 헌

- Jéquier, E. and Tappy, L. : Regulation of body weight in humans. *Physiol. Rev.*, **79**, 451-480 (1999)
- Leibowitz, S.F. : Brain monoamines and peptides: role in the control of eating behavior. *Fed. Proc.*, **45**, 1396-1403 (1986)
- de Lecea, L., Kilduff, T.S., Peyron, C., Gao, X., Foye, P.E., Danielson, P.E., Fukuhara, C., Battenberg, E.L., Gautvik, V. T., Bartlett, F.S. Jr., Frankel, W.N., van den Pol, A.N., Bloom, F.E., Gautvik, K.M. and Sutcliffe, J.G. : The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **95**, 322-327 (1998)
- Kalra, S.P., Dube, M.G., Sahu, A., Phelps, C.P. and Kalra, P. S. : Neuropeptide Y secretion increases in the paraventricular nucleus in association with increased appetite for food. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **88**, 10931-10935 (1991)
- Elmquist, J., Elias, C. and Saper, C. : From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron.*, **22**, 221-232 (1999)
- Vertongen, P., Schiffmann, S.N., Gourlet, P. and Robberecht, P. : Autoradiographic visualization of the receptor subclasses for vasoactive intestinal peptide (VIP) in rat brain. *Peptides*, **18**, 1547-1554 (1997)
- Alexander, L.D., Evans, K. and Sander, L.D. : A possible involvement of VIP in feeding-induced secretion of ACTH and corticosterone in the rat. *Physiol. Behav.*, **58**, 409-413 (1995)
- Follenius, M. and Brandenberger, G. : Evidence of a delayed feedback effect on the mid-day plasma cortisol peak in man. *Horm. Metab.*, **12**, 638-639 (1980)
- Maltais, L.J., Lane, P.W. and Beamer, W.G. : Anorexia, a recessive mutation causing starvation in preweaning mice. *J. Hered.*, **75**, 468-472 (1984)
- Jahng, J.W., Houpt, T.A., Kim, S.J., Joh, T.H. and Son, J.H. : Neuropeptide Y mRNA and serotonin innervation in the arcuate nucleus of anorexia mutant mice. *Brain Res.*, **790**, 67-73 (1998)
- Broberger, C., Johansen, J., Schalling, M. and Hökfelt, 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)
- Sahu, A., Kalra, P.S. and Kalra, S.P. : Food deprivation and ingestion induce reciprocal changes in neuropeptide Y concentrations in the paraventricular nucleus. *Peptides*, **9**, 83-86 (1988)
- Chua, S.C. 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)
- Franklin, K.B.J. and Paxinos, G. : *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. Academic press, San Diego (1997)
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. : *Molecular cloning : a laboratory manual*. 2nd edition, Cold Spring, Harbor Laboratory (1989)
- Marshall, J.F. and Teitelbaum, P. : A comparison of the eating in response to hypothermic and glucoprivic challenges after nigral 6-hydroxydopamine and lateral hypothalamic electrolytic lesions in rats. *Brain Res.*, **55**, 229-233 (1973)
- Quik, M., Iversen, L.L. and Bloom, S.R. : Effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) and other peptides on cAMP accumulation in rat brain. *Biochem. Pharmacol.*, **18**, 2209-2213 (1978)
- Magistretti, P.J., Morrison, J.H., Shoemaker, W.J., Sapin, V.

- and Bloom, F.E. : Vasoactive intestinal peptide induces glycogenolysis in mouse cortical slices; a possible regulatory mechanism for the local control of energy metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **78**, 6535-6539 (1981)
19. Kaiser, P.K. and Lipton, S.A. : VIP-mediated increase in cAMP prevents tetrodotoxin-induced retinal ganglion cell death *in vitro*. *Neuron*, **5**, 373-381 (1990)
20. Picus, D.W., DiCicco-Bloom, E.M. and Black, I.B. : Vasoactive intestinal peptide regulates mitosis, differentiation and survival of cultured sympathetic neuroblasts. *Nature*, **343**, 564-567 (1990)
21. Williams, G., Cardoso, H., Lee, Y.C., Ghatei, M.A., Flatt, P. R., Bailey, C.J. and Bloom, S.R. : Reduced hypothalamic neurotensin concentrations in the genetically obese diabetic (*ob/ob*) mouse; possible relationship to obesity. *Metabolism*, **40**, 1112-1116 (1991)
22. Timmers, K.I., Palkovits, M. and Coleman, D.L. : Unique alterations of neuropeptide content in median eminence, amygdala, and dorsal vagal complex of 3- and 6-week-old diabetes mutant mice. *Metabolism*, **39**, 1158-1166 (1990)
23. Chatelain, P., Robberecht, P., de Neef, P., Camus, J.C., Poloczek, P. and Christophe, J. : Impairment of hormone-stimulated cardiac adenylated cyclase activity in the genetically obese (*fa/fa*) Zucker rat. *Pflugers. Arch.*, **390**, 10-16 (1981)
24. Zheng, B., Eng, J. and Yalow, R.S. : Brain/gut peptides in fed and fasted rats. *Endocrinology*, **120**, 714-717 (1987)

(2001년 4월 4일 접수)