

GOVP 12017223

619.93

73730

98-N1-02-04-A-03

백서에서 시상하부 먹이섭취 조절인자
발현에 관한 연구

A study on the expressions of hypothalamic
regulators of food intake in rats

울산대학교 의과대학

과 학 기 술 부

제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “ 백서에서 시상하부 먹이섭취 조절인자 발현에 관한 연구”과제 의 보고서로 제출합니다.

2000 . 10 . 17

주관연구기관명 : 울산대학교 의과대학

주관연구책임자 : 홍 성 관

연 구 원 : 류 재 원

“ : 나 도 선

“ : 박 형 섭

요 약 문

I. 제 목 : 백서에서 시상하부 먹이섭취 조절인자 발현에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

비만은 서구화된 구미 선진국에서는 물론이고 우리나라에서도 성인병 질환의 가장 중요한 원인으로 인식되고 있다. 비만은 단순히 뚱뚱한 상태가 아니라 당뇨병, 고혈압, 심혈관 질환을 유발하면서 이환률 및 사망률을 증가시키는 질병으로 비만 및 관련 성인병은 개인, 가정의 불행은 물론 의료비의 상승, 노동력의 감소 등으로 사회, 국가 경제적으로도 심각한 손실을 가져온다.

최근에 선진 제약사들이 적극적으로 개발하고자 하는 대표적 약물들 중 하나가 바로 비만조절 약물인데 이는 비만이라는 시장이 무궁무진하기 때문이다. 한편 비만 치료약물로 소개되고 있는 일부 약물들은 심각한 부작용을 나타내기도 하는데 ¹⁾날씬한 것을 맹목적으로 추구하는 청소년 및 젊은 여성들에 의한 약물남용도 우려되는 상황이다. 이상으로부터 효과적이면서 부작용이 적은 새로운 비만치료제의 개발은 국민보건, 산업적인 면에서 매우 중요한 과제가 될 것이다. 이와 같은 새로운 약물을 개발하기 위하여는 우선적으로 비만의 원인을 정확히 규명하는 것이 필요하나 이제까지의 수많은 연구에도 불구하고 비만의 원인은 확실히 규명되지 않은 상태이다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

본 연구에서는 먹이섭취에 영향을 주는 다양한 자극들이 뇌 시상하부 먹이섭취조절인자 발현에 미치는 영향을 규명함으로써 비만증을 근원적으로 치료·예방할 수 있는 새로운 기법의 이론적 근거를 찾고자 한다. 구체적인 구체적목표로서 1. 뇌 시상하부에서 NPY²⁾³⁾ 및 melanocortin의 mRNA 발현과 serotonin, dopamine 등의 neurotransmitter 농도를 측정하는 기법을 확립하고, 이를 통하여 metformin, nicotine, DHEA 등이 먹이섭취를 변화시키는 기전을 규명하고자 하였다. 2. 렙틴 저항성 발현에 Glucocorticoid가 미치는 영향⁴⁻⁶⁾을 조사하였다. 3. DHEA의 먹이감소 이외에 체중 감소 효과가 나타나는 기전으로서 조직에서의 UCP 발현 변화를 확인하였다.

IV. 연구개발결과

시상하부 신경전달물질인 NPY, CRH, MSH⁷⁾⁸⁾

mRNA 측정 방법 확립하였으며, 뇌실내 metformin 투여도 직접적으로 먹이섭취 감소 효과 있음을 규명하였고, nicotine 투여는 시상하부에서 CRH mRNA 발현 증가, NPY mRNA 발현을 감소시키며 먹이섭취 및 체중 감소 유발하였다. 고지방식이 모델에서 당코르티코이드 수용체를 이용해 차단해도 렙틴저항성은 변화 없어 당코르티코이드를 통한 기전은 아니었으며, DHEA 투여는 brown adipose tissue의 UCP1 mRNA 발현을 증가시켜 열량소모를 증가시키므로써 체중

을 감소시키는 효과가 있음을 증명하였다.

V. 연구개발결과의 활용계획

현재까지 확립된 시상하부 먹이섭취 조절인자 및 열량소모인자 조절 과정을 이용하여 metformin, nicotine, DHEA 의 작용기전을 일부 규명하였는데, 향후 이러한 약물의 유도체 개발이나, 시상하부 작용물질에 작용하는 약물 개발 및 평가의 기초 기술 및 자료로 활용될 수 있을 것이다. 특히 DHEA 투여가 먹이섭취 감소 및 열량 소모 증가를 이루어 체중을 감소시키는 기전이 확인되었는데, 고령화에 의해 나타나는 체중 증가 및 성인병 발현이 고령화에 의한 인체 내 DHEA 감소와 밀접히 관련되어 있을 가능성에 기초해 DHEA 농도가 현저히 감소되어있는 환자 (뇌하수체 기능저하증, 부신피질호르몬 결핍증 등)를 대상으로한 효과를 검증하는 과정이 필요하다.

S U M M A R Y

A study on the expressions of hypothalamic regulators of food intake in rats

Obesity is known to be the most important factor in the development of adult-onset diseases in Korea as well as in the westernized countries. Obesity does not mean simply the state of excess fat, but is the disease state inducing diabetes, hypertension, cardiovascular diseases, which are resulting in severe morbidity and mortality. Nowadays there were great improvement in understanding the mechanisms of food intake and energy expenditure. On these basis, many pharmaceutical companies are trying to develop new drugs having effect on obesity, which should be a huge market. On the other hand, many peoples especially young women and adolescent are abusing many anti-obesity drugs which have critical side effects. So in this study we tried to identify the mechanisms of food intake and energy expenditure, action mechanisms of the agents which are known to have anti-obesity effects.

First of all, we set up the techniques to measure mRNAs of the neurotransmitters in the hypothalamus such as neuropeptide Y (NPY), CRH (corticotropin releasing hormone), pro-opiomelanocortin (POMC), melanin concentrating hormone (MCH), orexin and dopamine, serotonin which are known th have effects on food intake and energy expenditure. And expression of uncoupling proteins (UCPs) was measured as a marker of energy expenditure in the various tissues. Metformin medicated per oral for 14 days decreased food intake and weigt gain in rats, but there were no influences on the hypothalamic neurotransmitters. Short-term (5 hours) effects of Intraventricular metformin injection on hypothalamic neurotransmitters were increasing POMC, CRH, MCH, NPY, and decreasing orexin. which suggests the major role of POMC, CRH in the effects of metformin. Nicotine injection decreased NPY, but increased POMC and CRH mRNA expressions, which mean synergistic effects of nicotine on the suppression of food intake. DHEA decreased food intake and increased energy expenditure in rats. CRH, NPY, MCH, orexin were increased, but POMC was decreased, which suggests that change of CRH do the major role on food intake suppression. UCP-1 mRNA expression was increased in brown and white adipose tissue of the DHEA treated rats, which seems to be mechanism of energy expenditure.

This study proves that mechanisms of food intake suppression is different depend on drugs or reagents. And DHEA which is known to be the hormone changing dramatically in aging have strong effects on food intake and energy expenditure. This findings might be the clues to the aging process which have been a unsolved problem for a long time.

C O N T E N T S

(영 문 목 차)

	Pages
Chapter 1. Introduction	7
Chapter 2. State of the Art	8
Chapter 3. Methods and Results	10
Chapter 4. Achievement and Contribution	14
Chapter 5. Plan of Application	16
Chapter 6. References	17

목 차

	쪽 번호
제 1 장 서론	7
제 2 장 국내외 기술개발 현황	8
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	10
제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도	14
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	16
제 6 장 참고문헌	17

제 1 장 : 서론

비만은 서구화된 구미 선진국에서는 물론이고 우리나라에서도 성인병 질환의 가장 중요한 원인으로 인식되고 있다. 비만은 단순히 뚱뚱한 상태가 아니라 당뇨병, 고혈압, 심혈관 질환을 유발하면서 이환률 및 사망률을 증가시키는 질병으로 비만 및 관련 성인병은 개인, 가정의 불행은 물론 의료비의 상승, 노동력의 감소 등으로 사회, 국가 경제적으로도 심각한 손실을 가져온다.

최근에 선진 제약사들이 적극적으로 개발하고자 하는 대표적 약물들 중 하나가 바로 비만조절 약물인데 이는 비만이라는 시장이 무궁무진하기 때문이다. 한편 비만 치료약물로 소개되고 있는 일부 약물들은 심각한 부작용을 나타내기도 하는데⁹⁾ 날씬한 것을 맹목적으로 추구하는 청소년 및 젊은 여성들에 의한 약물남용도 우려되는 상황이다.

에너지 대사 조절은 칼로리 섭취와 에너지 소모에 따라 결정되는데, 중추신경계에서의 칼로리 섭취 조절에 대한 괄목한 만한 성과가 있었는데 비해¹⁰⁾ 에너지 소모 조절에 대한 이해는 매우 부족하다. 그러나, 최근 사람과 쥐에서 uncoupling protein 2와 3이 각각 발견되면서 큰 관심을 모으고 있다¹¹⁻¹⁴⁾.

한편 포유류 세포의 미토콘드리아에서는 연합호흡 (coupling respiration)에 의한 ATP 에너지를 합성하는 이외에도 비연합호흡(uncoupling respiration)에 의해 ATP생성 없이 열 발산으로 체온을 유지하거나 불필요한 과다 열량을 소모시키는 작용이 있다. 미토콘드리아에 존재하는 uncoupling protein (UCP)이 바로 이러한 비연합호흡을 담당하고 있는데 최근까지 3가지 형태의 UCP, 즉 UCP-1, 2, 3가 알려져있다. UCP1은 사람 성인에는 존재하지 않고 설치류에만 존재하는 갈색지방조직에 주로 분포하며서, 열발산 및 에너지 소모를 유발하는데, UCP-1 유전자를 제거시킨 일부 동물모델에서 비만 발생이 보고되었으나, 다른 생쥐모델에서의 비만 발생은 발견되지 않고있으며, 사람 성인에서는 갈색지방조직이 없어 에너지 대사에서의 UCP1 역할은 의문시 되고있다.

최근 그, 존재가 확인된 UCP-2, 3는 설치류, 사람 모두에 유사한 형태로 존재하며, 일부 비만 동물모델에서 원인 유전자로 추정할 수 있는 근거가 제시되면서 큰 관심을 끌고있다. UCP-2는 거의 모든 장기에 골고루 존재하나 UCP-3는 근육 조직, 갈색 지방에 주로 분포하며, 당류 코르티코이드, leptin, 기아 등에 의해 발현이 변화하는데 기아 시에 갈색지방조직의 UCP-3는 감소하는데 비해 근육조직의 UCP-3 발현은 증가하는 등 발현에 있어 동일한 자극에 대한 조직 특이성도 보이고 있다.

이상 UCP를 통한 에너지 소모 기전 변화에 의한 비만 유발 및 인슐린 저항성 발현을 시사하는 최근의 보고들은, 관련된 대사 이상의 원인 규명 그리고 그 해결책을 추구할 수 있는 중요한 단서로 생각되고 있다.

이상으로부터 효과적이면서 부작용이 적은 새로운 비만치료제의 개발은 국민보건, 산업적인 면에서 매우 중요한 과제가 될 것이다. 이와 같은 새로운 약물을 개발하기 위하여는 우선적으로 비만의 원인을 정확히 규명하는 것이 필요하나 이제까지의 수많은 연구에도 불구하고 비만의 원인은 확실히 규명되지 않은 상태이다. 이에 본 연구에서는 비만의 발생에 있어 가장 중요한 요소일 것으로 생각되는 먹이섭취 및 열량 소모 조절기전의 일단을 새로운 시각에서 규명하고자 한다.

제 2 장 : 국내의 기술개발 현황

시상하부 먹이섭취 조절인자에 관한 연구는 비만의 임상적 중요성 때문에 세계적으로도 가장 활발한 연구 및 기술개발이 이루어지고 있는 분야이다. 외국의 많은 연구팀에서 지방조직에서의 leptin 생산과 이로 부터 시상하부로 전달되는 신호에 따른 NPY발현이 음식섭취를 결정하는데 있어 가장 중요한 중심축이 된다는데 대해 의견을 같이 하고 있다¹⁵⁾¹⁶⁾. 그러나 한편으로는 NPY knock-out model에서도 먹이섭취가 변하지 않는 점으로 보아¹⁷⁾¹⁸⁾ leptin에 의한 신호전달에 있어 NPY 이외의 다른 기전이 있음이 시사되고 있다²⁰⁾²¹⁾.

본 연구팀의 예비연구결과 식욕에 현저한 변화를 초래하는 여러 가지 자극을 알게 되었으나 그 각각의 기전은 모르고 있는 상태이다. 시상하부 NPY 표현은 당뇨병이나 인슐린투여 이외의 경우에는 변화를 보이지 않고 있어 이와 같은 자극들이 melanocortin/MCR-4에 변화를 주던지 아니면 이제까지 알려진 다른 기전 즉 serotonin계나 dopamine계의 변화를 매개하여 식욕을 변화시킬 가능성이 높다.

Melanocortin이 작용하는 receptor의 subtype이나 receptor의 분포는 비교적 잘 알려져있으나 melanocortin 자체의 합성 위치, 분비 장소 등에 대해서는 아직 분명히 밝혀져 있지 않다. 1997년 Shutter등은 ob/ob mice, db/db mice의 시상하부 arcuate nucleus에서 melanocortin 발현이 매우 증가되어 있음을 보고하였지만, mutation model이 아닌 정상 실험동물에서의 표현 장소, 생리적 조절인자는 전혀 보고된 바 없다.

에너지 대사 조절은 칼로리 섭취와 에너지 소모에 따라 결정되는데, 중추신경계에서의 칼로리 섭취 조절에 대한 괄목한 만한 성과가 있었는데 비해 에너지 소모 조절에 대한 이해는 매우 부족하다. 그러나, 최근 사람과 쥐에서 uncoupling protein 2와 3이 각각 발견되면서 큰 관심을 모으고 있다. 포유류 세포의 미토콘드리아에서는 연합호흡 (coupling respiration)에 의한 ATP 에너지를 합성하는 이외에도 비연합호흡(uncoupling respiration)에 의해 ATP생성 없이 열 발산으로 체온을 유지하거나 불필요한 과다 열량을 소모시키는 작용이 있다. 미토콘드리아에 존재하는 uncoupling protein (UCP)이 바로 이러한 비연합호흡을 담당하고 있는데 최근까지 3가지 형태의 UCP, 즉 UCP-1, 2, 3가 알려져있다. UCP1은 사람 성인에는 존재하지 않고 설치류에만 존재하는 갈색지방조직에 주로 분포하며서, 열발산 및 에너지 소모를 유발하는데, UCP-1 유전자를 제거시킨 일부 동물모델에서 비만 발생이 보고되었으나, 다른 생쥐모델에서의 비만 발생은 발견되지 않고있으며, 사람 성인에서는 갈색지방조직이 없어 에너지 대사에서의 UCP1 역할은 의문시 되고 있다²²⁻²⁴⁾.

최근 그, 존재가 확인된 UCP-2, 3는 설치류, 사람 모두에 유사한 형태로 존재하며, 일부 비만 동물모델에서 원인 유전자로 추정할 수 있는 근거가 제시되면서 큰 관심을 끌고있다. UCP-2는 거의 모든 장기에 골고루 존재하나 UCP-3는 근육 조직, 갈색 지방에 주로 분포하며, 당류코르티코이드, leptin, 기아 등에 의해 발현이 변화하는데 기아 시에 갈색지방조직의 UCP-3는 감소하는데 비해 근육조직의 UCP-3 발현은 증가하는 등 발현에 있어 동일한 자극에 대한 조직 특이성도 보이고 있다. 이상 UCP를 통한 에너지 소모 기전 변화에 의한 비만 유발 및 인슐린 저항성 발현을 시사하는 최근의 보고들은, 관련된 대사 이상의 원인 규명 그리고 그 해결책을 추구할 수 있는 중요한 단서로 생각되고 있다²⁵⁻²⁸⁾

비록 우리나라 연구소에서 외국 연구자들이 연구하지 않은 새로운 먹이섭취 조절 기전을 규

명하는 것은 어려울지라도, 현재까지 먹이섭취 및 체중조절에 작용하는 것으로 알려진 일부 약제들이 최근 알려진 먹이섭취 조절기전에 어떻게 작용하는지를 규명하는 것은 가능할 것이다. 이와 같은 연구는 현실적으로 매우 유용하며, 이러한 자료에 의거하여 기존 물질을 변형시키거나 구조를 변화시켜 새로운 물질, 약제를 개발하고, 이들 약제들이 먹이섭취 조절인자에 미치는 영향을 평가하는 방법을 개발, 보유하는 것은 앞으로의 도약을 위해 필수적인 것으로 본 연구를 통하여 이와 같은 시도의 이론적, 실험적 기초를 다질 수 있을 것이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 : 내용

1. 연구 대상

체중 280 - 320 gm 의 male Sprague-Dawley 백서를 대상으로 하였다.

2. Metformin, DHEA, nicotine 투여

Metformin³³⁾, DHEA는 먹이에 섞어 투여하고, nicotine은 피하에 주사로 투여하였다.

3. 뇌실내로의 metformin 투여

David Kopf stereotaxic surgery instrument를 이용하여 백서 뇌실에 brain injection cannula (Plastic One, Roanoke, VA, USA)을 장착한다. 약물투여 3일 전부터 생리식염수를 반복적으로 주입하는 방법으로 adaptation 시켜서 실험물질 투여시 stress 효과를 방지한다. 자유롭게 움직이는 상태에서 Dummy cannula를 빼내고 PE tube를 Hamilton syringe에 연결하고, 실험 물질을 1-2 ul/ 1회 2-3분간에 걸쳐 서서히 주입한다.

실험기간 동안 먹이섭취량을 측정하며 마지막 희생시에 trunk blood, adipose tissue, fresh brain을 추출하여 분석한다.

4. in situ hybridization을 이용한 시상하부 NPY, MCH, POMC, orexin, CRH mRNA 정량

실험을 통하여 추출된 뇌 조직에서 시상하부 부위별로 (ventromedial area, dorsolateral area, paraventricular area, arcuate nucleus area 등) frozen section을 취한다.

MCH(melanocortin)²⁹⁾ oligonucleotide probe (48 nucleotide : CGATGACAAG ACCACAAAGA ACACAGGCTC CAAGCAGAAT CTCGTAAC) 를 이용하여 in situ hybridization을 시행한다.

5. film을 exposure 시킨 후 densitometer를 이용하여 mRNA expression을 분석한다. Density 양이 충분치 않을 경우 emulsion coating 방법을 시행하여, expression cell을 count한다.

6. serum insulin, leptin 정량

serum leptin치는 ELISA kit를 이용하여 측정하고 insulin 치는 RIA kit를 이용해 정량한다.

7. HPLC에 의한 dopamine, serotonin neurotransmitter 측정

가. fresh frozen brain을 cryocut을 이용하여 목표부위에서 2 mm 두께의 slice를 취한다.

나. 유리 slide 위에 slice를 놓고 arcuate nucleus, PVN 부위에서 직경 1.5 mm needle을 이용

punch out 한다.

다. punch out Brain tissue를 0.1 M perchloric acid를 이용하여 extraction 한다.

라. ODS C18 column을 이용한 HPLC 시행하며, standard와 비교, 정량한다.

8. 비만발생에 따른 렙틴 저항성 발생에 glucocorticoid가 미치는 영향 ³⁰⁾³¹⁾

9) DHEA 투여가 체중, 먹이섭취 및 각 조직 UCP mRNA 발현에 미치는 영향

연구자는 DHEA 투여가 백서에서 먹이섭취 억제효과 이외에도 직접적인 열량소모효과가 있음을 새로 발견하였는데 이를 바탕으로 DHEA가 조직내에서 UCP 발현에 변화를 주므로써 항비만효과를 나타낼 가능성에 대한 연구를 추가로 수행하였다.

제 2절 : 결과

1. Metformin 경구 투여 시 3일경부터 유의한 먹이섭취 감소 효과가 관찰되었고, 연구종료 시 (4일 째) 유의한 체중 감소를 관찰하였다. 이들 백서의 시상하부 먹이섭취 전달물질 측정에서는 대조군과 metformin 투여군간에 NPY, MCH, CRH mRNA 발현 차이를 관찰할 수 없었다³²⁾

2. 그러나 acute response를 측정된 실험 (뇌실 내 metformin 투여 5시간 후에 시상하부 신경전달 물질 발현 측정)에서는 metformin 투여군에서 NPY, MCH, POMC, CRH mRNA 발현이 증가하고 orexin mRNA 발현이 감소하였다. 이러한 결과는 POMC 발현 감소에 의한 식욕억제가 주도적인 역할을 하고, 다른 신경전달 물질은 이차적인 변화를 나타내는 것으로 추정된다. 식욕조절에서 가장 중요한 역할을 하는 것으로 생각되는 NPY, POMC 인자 중 Metformin 투여에 의한 먹이섭취 감소는 POMC 변화가 주된 매개물로 추정된다.

3. 본 연구를 통하여 백서에서 nicotin 투여가 투여량에 비례하여 먹이섭취 및 체중 감소 효과가 있음을 확인 하였다. 먹이섭취 억제효과는 특히 투여초기에 급격히 나타나고 시간이 지남에 따라 먹이 섭취는 감소 되었다. 먹이 섭취 조절 인자로 알려진 시상하부 NPY, CRH, POMC mRNA 표현 측정에서 nicotine 투여량에 비례해서 NPY는 감소, CRH는 증가하였고, POMC는 증가하는 경향만을 나타냈다.

시상하부 NPY가 강력한 먹이섭취 자극 인자임을 감안할 때 nicotine투여에 의한 먹이 섭취억제는 시상하부NPY mRNA 발현을 억제하여 나타남을 시사한다. 한편, 시상하부 CRH 발현은 투여량에 비례하여 증가하는 소견을 보이는데, 동물실험에서 CRH 뇌실내 투여가 먹이 섭취억제효과가 있음을 고려할 때 이 또한 nicotine에 의한 먹이 섭취 억제 효과의 한 기전으로 이해된다.

CRH는 또한 시상하부-뇌하수체-부신피질 축을 자극하는 대표적 물질로서 CRH 발현증가는 곧 교감신경계 자극을 의미하는데, 교감신경계 자극은 바로 에너지 소비증가를 초래하므로

로 이또한 체중감소를 유발하는 또 다른 기전으로 추정된다.

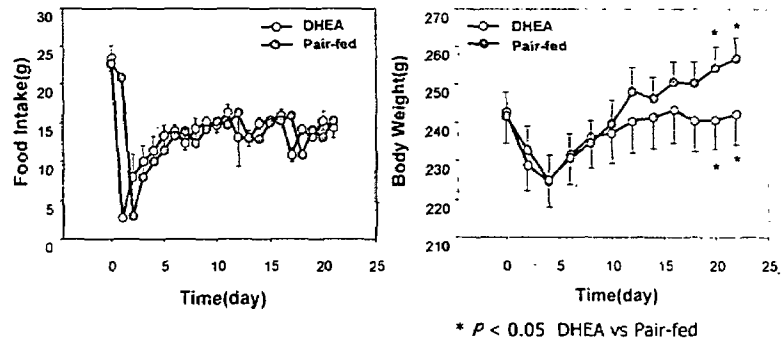
α -MSH 전구물질인 POMC mRNA 발현은 통계적으로 유의하지는 않았지만 nicotine 투여량에 비례하여 증가하는 소견을 보였다. α -MSH증가가 식욕억제 및 먹이섭취 억제효과가 있음을 고려할 때 의미있는 소견으로 여겨지며 앞서 언급한 NPY, CRH 발현변화와 함께 고려할 때 관찰된 먹이섭취, 체중변화와 부합되는 결과들이다.

한편 nicotine투여의 시상하부 에너지 조절물질에 대한 변화가 이들 물질에 대한 중요 조절물질로 알려진 leptin이나 insulin에 영향을 미치고 시상하부에너지 조절물질 변화가 이차적인 소견으로 나타날수도 있겠으나 측정된 혈중 leptin은 nicotine 투여 농도에 비례하여 감소하는 소견을 보였다. 이러한 결과는 먹이섭취 및 체중 감소에 따른 지방량 감소가 나타나고 결과적으로 leptin 감소로 이어지는 소견으로 추정되어 nicotine의 효과는 시상하부에 대한 직접적 영향으로 추론된다. 혈중 insulin 치도 nicotine 투여량에 비례하여 감소하는 경향을 나타내는데 이들 역시 먹이섭취감소 및 체중감소에 따른 이차적 소견에 부합된다.

4. DHEA 투여

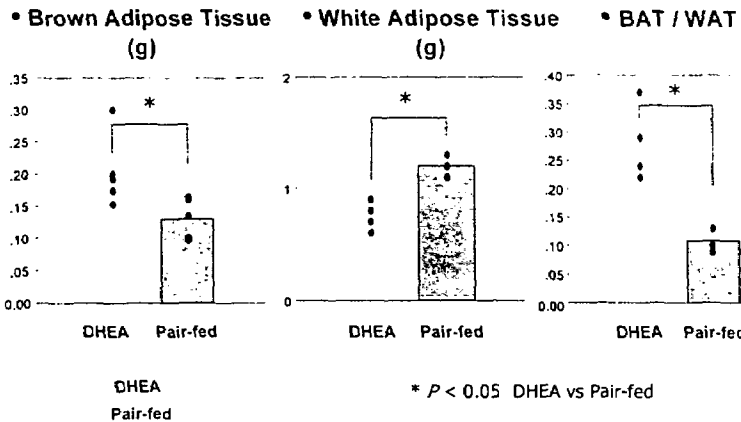
DHEA 투여는 먹이섭취를 감소시키고 이와는 별도로 열량소모를 증가시켜 체중을 감소시키는 효과를 나타냈다.

• Change of food intake and body weight



* $P < 0.05$ DHEA vs Pair-fed

DHEA투여가 먹이섭취 억제 이외에 열량소모를 촉진하는 기전을 규명하기위하여 각 조직에서의 UCP mRNA 발현을 측정하였을 때 brown adipose tissue, white adipose tissue 모두에서 UCP 1 mRNA 발현이 증가하여, DHEA 투여가 열량소모 촉진 효과가 있음을 확인하였다.



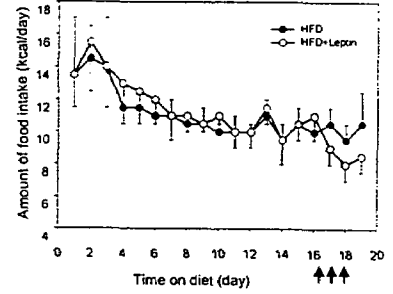
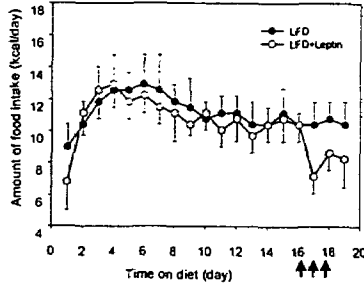
* $P < 0.05$ DHEA vs Pair-fed

5. glucocorticoid가 Leptin resistance 발현에 미치는 효과

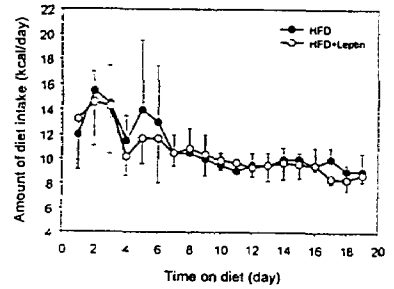
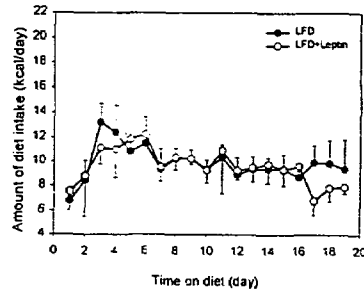
비만의 발병 원인 인자 자체, 혹은 렙틴 저항성 유발인자로서의 역할을 규명하기 위하여 glucocorticoid antagonist인 RU486을 이용하여 실험을 진행하였다.

렙틴 투여에 의한 먹이섭취 감소 효과가 고지방식에 의한 비만 군에서 감소하였음을 관찰하였다.

• Changes of food intake



• Changes of food intake (RU486+)



RU486 투여로 glucocorticoid 효과 차단 후 고지방식이 백서에서 렙틴저항성 개선 효과를 관찰하였을 때 렙틴저항성 개선 효과를 관찰할 수 없어 렙틴저항성 발현에 glucocorticoid가 중요한 역할을 할 것으로는 생각되지 않는다.

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

제 1 절 : 1차 연도

1. MCH mRNA 측정을 위한 in situ hybridization을 정립했는가 ? (30 %)

probe labelling, tissue preparation, hybridization, exposure & detection 전 과정을 계획대로 시행하여 측정방법을 확립하였고, 실제로 실험조직에 적용하여 data를 얻었다. 이를 분석하여 제11차 대한당뇨병학회 춘계학회에서 이미 발표하였으며 현재 논문을 작성하여 대한당뇨병학회지에 제출한 상태로 본 목표 항목에 대하여는 100% 달성한 상태이다.

2. leptin mRNA 측정을 위한 RPA 방법을 정립하였는가 ? (25 %)

앞에서 자세히 기술한바와 같이
본 목표 항목에 대하여도 100% 달성한 상태이다.

3. 뇌조직 dopamine, serotonin의 HPLC 측정 방법을 정립하였는가 ? (10 %)

뇌조직에서의 HPLC 방법을 이용한 dopamine, serotonin 측정은 회생시의 조직추출 방법과 추출 후의 substrate 추출방법에 따라서 변동이 매우 많았다. 이에 연구자는 이들 물질들의 측정보다는 최근에 새로이 먹이섭취 조절인자로 알려진 시상하부 Orexin, POMC 물질을 in situ hybridization 방법을 이용한 측정법 개발을 시도하여 성공하였고, 이 방법을 이용하여 약제나 stress에 의한 이들 신경전달물질의 변화를 측정하고 있다.

따라서 본 목표항목 자체에 대한 달성도는 감소하였으나 새로운 신경전달물질 측정법을 개발하였고, 이를 이용한 결과를 분석중에 있다.

4. metformine 뇌실내 투여 실험 및 분석이 적절했나 ? (35 %)

sterotaxic surgery를 이용한 뇌실내 cannula 설치를 angiotensin II 에 대한 반응(compulsive ater drinking)으로 확인하여 sterotaxic surgery가 적절히 이루어짐을 확인하였다. 한편 적절히 설치된 canula를 통하여 metformin 투여시 먹이섭취 및 체중 증가가 감소함을 확인하였다. 이들 뇌에서 CRH, NPY, MCH 측정 및 분석을 완료하였다.

본 목표 항목에 대하여도 100% 달성한 상태이다.

제 2 절 : 2차 연도

1. nicotine, metformin, DHEA 투여가 먹이섭취 및 시상하부 신경전달물질 발현에 미치는 영향 (40 %)

약제 투여, 무게 및 먹이섭취 변화 평가, 신경전달물질 (NPY, CRH, MSH, orexin, MCH mRNA) 발현 측정 및 분석이 적절히 시행되었고, 결과를 논문 발표, 학회 발표되어 계획대로 연구가 이루어졌음

2. DHEA가 열량 소모 및 대사에 미치는 영향 (40 %)

DHEA의 열량 소모 증가에 의한 체중 감소가 나타남을 확인하였고, 가능한 기전으로 근육조직 UCP-3 mRNA 발현을 측정하여 학회에 보고하여 계획대로 이루어 졌음

3. 고지방식이에 의한 렙틴 저항성에 당코르티코이드 수용체 차단제의 효과

고지방 식이에 의한 비만, 당코르티코이드 증가 때 렙틴 저항성이 발현됨을 확인하였고, 당코르티코이드 차단에 의한 먹이섭취 변화를 계획대로 관찰하였음.

제 3 절 : 3차 연도

1. DHEA 투여가 에너지 소비 조절인자 발현에 미치는 효과

DHEA 투여는 brown adipose tissue의 UCP1 mRNA 발현을 증가시켜 열량소모를 증가시키므로써 체중을 감소시키는 효과가 있음을 확인하였고 이를 현재 논문작성중에 있음

2. 뇌실 내 lipocortin-1 antibody 투여가 glucocorticoid 작용에 미치는 효과

다양한 농도의 glucocorticoid를 백서에 투여 시 인체에서 보이는 식욕증가 및 체중 증가 현상을 관찰할 수 없었다. 결과적으로 glucocorticoid의 lipocortin-1 매개를 관찰하고자 하는 기본 설정을 확인하기 어려워 고지방식이에 의한 렙틴 저항성에 당코르티코이드 수용체 차단제의 효과를 관찰하였으며 고지방식이 모델에서 당코르티코이드 수용체를 이용해 차단해도 렙틴저항성은 변화 없어 당코르티코이드를 통한 기전은 아님을 확인하였다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

이상의 연구로 비만 유발 및 유지에 있어 중심축인 먹이섭취 및 에너지 소모 조절의 기전을 규명하는 기법을 확립하였고, 일부 약물들이 이들 인자에 영향을 미쳐 먹이섭취 및 열량소모를 변화시킴으로써 체중변화 유발하는 과정을 확인하였다. 이러한 방법 및 약제의 효과를 이용하여 향후 항비만약제의 작용기전 규명 방법 및 새로운 약제 개발 시에 유용한 방법으로 이용될 수 있을 것이다.

백서에서 DHEA의 먹이섭취 조절 및 열량소모에 대한 효과는 이러한 호르몬의 부족을 나타내고 있는 많은 환자 (뇌하수체 기능부전, 부신피질 질환)에 대하여 임상적으로 검증할만한 가치가 있는 결과로 여겨져서 지속적으로 밝혀야할 사안으로 생각된다.

제 6 장 참고문헌

- 1) Connolly HM, Crary JL, McGoon MD, et al., Valvular heart disease associated with fenfluramine-phentermine. *NEJM* 337:581-8,1997
- 2) 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
- 3) Clark JT, Kalra PS, Crowley WR, and Kalra SP: *Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats. Endocrinology* 115:427-429, 1984
- 4) Freedman MR, Horwitz BA, Stern JS. Effect of adrenalectomy and glucocorticoid replacement on development of obesity. *Am J Physiol* 250:R595-607, 1986
- 5) Loxley HD. Cowell AM. Flower RJ. Buckingham JC. Effects of lipocortin 1 and dexamethasone on the secretion of corticotrophin-releasing factors in the rat: in vitro and in vivo studies. *Journal of Neuroendocrinology*. 5:51-61,1993
- 6) Chen HL, Romsos DR: Dexamethasone rapidly increase hypothalamic neuropeptide Y secretion in adrenalectomized ob/ob mice. *Am J Physiol* 271:E151-158, 1996
- 7) Huszar D. Lynch CA. Fairchild-Huntress V. Dunmore JH. Fang Q. Berkemeier LR. Gu W. Kesterson RA. Boston BA. Cone RD. Smith FJ. Campfield LA. Burn P. Lee F: Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell*. 88:131-41, 1997
- 8) Fan W. Boston BA. Kesterson RA. Hruby VJ. Cone RD: Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature*. 385:165-8, 1997
- 9) Mark EJ, Patalus ED, Chang HT, et al., Fatal pulmonary hypertension associated with short-term use of fenfluramine and phentermine. *NEJM* 337:602-606, 1997 Kim KM, Kim DK, Park YM, Kim JK, Na DS: Annexin-I inhibits phospholipase A2 by specific interaction, not by substrate depletion. *FEBS* 343:251-255, 1994
- 10) Pelleymounter MA: *Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. Science* 269:540-543, 1995
- 11) Adams SH: Uncoupling protein homologs: Emerging views of physiological function. *J Nutr* 130:711-714,2000
- 12) Lowell BB, Spiegelman BM: Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature* 404:652 - 660, 2000
- 13) Leibel RL, Rosenbaum M. Hirsch J: Changes in energy expenditure resulting from altered body weight. *N. Engl. J. Med.* 332: 621-628,1995
- 14) Shibata H. Bukowiecki, LJ: Regulatory alterations of daily energy expenditure induced by fasting or overfeeding in unrestrained rats. *J Appl Physiol* 63: 465-47,1987
- 15) Flier JS: *The adipocyte: storage depot or node on the energy information superhighway? Cell* 80:15-18, 1995
- 16) Le Magnen: 1992 Neurobiology of feeding and nutrition. Academic press. San Diego,

CA

- 18) Erickson JC. Clegg KE. Palmiter RD. Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking neuropeptide Y. *Nature* 381:415-21, 1996
- 19) Erickson JC. Hollopeter G. Palmiter RD. Attenuation of the obesity syndrome of ob/ob mice by the loss of neuropeptide Y. *Science* 274:1704-7, 1996
- 20) Shutter JR. Graham M. Kinsey AC. Scully S. Luthy R. Stark KL. Hypothalamic expression of ART, a novel gene related to agouti, is up-regulated in obese and diabetic mutant mice. *Genes & Development*. 11:593-602, 1997
- 21) Lu D. Willard D. Patel IR. Kadwell S. Overton L. Kost T. Luther M. Chen W. Woychik RP. Wilkison WO. et al. Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. *Nature* 371:799-802, 1994
- 22) Klingenberg M. Huang SG. Structure and function of the uncoupling protein from brown adipose tissue. *Biochim Biophys Acta* 1415:271-296, 1999
- 23) Enerback S, et al: Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature* 387: 90-94,1997
- 24) Boss O. et al: Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS Lett*. 408:39-42, 1997
- 25) Vidal-Puig, A., Solanes, G., Grujic, D., Flier, J. S. & Lowell, B. B. UCP3: an uncoupling protein homologue expressed preferentially and abundantly in skeletal muscle and brown adipose tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 235, 79-82,1997
- 26) Gong, D. W., He, Y., Karas, M. & Reitman, M. Uncoupling protein-3 is a mediator of thermogenesis regulated by thyroid hormone, beta3-adrenergic agonists, and leptin. *J. Biol. Chem*. 272, 24129-24132,1997
- 27) Hinz, W., Faller, B., Gruninger, S., Gazzotti, P. & Chiesi, M. Recombinant human uncoupling protein-3 increases thermogenesis in yeast cells. *FEBS Lett*. 448, 57-61,1999
Zhang, C. Y., Hagen, T., Mootha, V. K., Sliker, L. J. & Lowell, B. B. Assessment of uncoupling activity of uncoupling protein 3 using a yeast heterologous expression system. *FEBS Lett*. 449, 129-134 ,1999
- 28) Jaburek, M. et al. Transport function and regulation of mitochondrial uncoupling proteins 2 and 3. *J. Biol. Chem*. 274, 26003-26007,1999
- 29) Qu D. Ludwig DS. Gammeltoft S. Piper M. Pelleymounter MA. Cullen MJ. Mathes WF. Przypek R. Kanarek R. Maratos-Flier E. A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature*. 380:243-7, 1996
- 30) Loxley HD. Cowell AM. Flower RJ. Buckingham JC. Modulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical responses to cytokines in the rat by lipocortin 1 and glucocorticoids: a role for lipocortin 1 in the feedback inhibition of CRF-41 release?. *Neuroendocrinology*. 57:801-14, 1993
- 31) Flower RJ, Rothwell NJ. Lipocortin-1, cellular mechanisms and clinical relevance. *Tips* 15:71-76, 1994
- 32) 김은숙, 김진엽, 김상욱, 박중열, 이기업, 홍성관: 쥐에서 metformin의 뇌실내 투여가 먹이섭취 및 시상하부 신경전달물질의 발현에 미치는 효과. *당뇨병* 22:475-481, 1988

33) 홍성관, 박중열, 김철희, 최철수, 이기업: Streptozotocin 당뇨유발 백서에서 인슐린 주사 및 metformin투여가 먹이섭취 및 시상하부 Neuropeptide Y mRNA 발현에 미치는 효과. 당뇨병 20:243-251, 1996