랫트의 측뇌실핵에서 섭식상황에 따른 nNOS 발현 조절

연세대학교 대학원
의 과 학 과
김 윤 미

랫트의 측뇌실핵에서 섭식상황에 따른 nNOS 발현 조절

연세대학교 대학원
의 과 학 과
김 윤 미

랫트의 측뇌실핵에서 섭식상황에 따른 nNOS 발현 조절

지도교수 장 정 원

이 논문을 석사학위논문으로 제출함

2003 년 12 월 일

연세대학교 대학원
의 과 학 과
김 윤 미

김윤미의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2003 년 12 월 일

감사의 글

늦게 시작한 공부였기에 더욱 열심히 배우고, 노력하겠다 굳게 먹은 마음가짐으로 제가 처음 약리학교실에 들어선 것이 벌써 2 년 6 개월이 되었습니다. 지난 시간은 역시나 아쉬움을 남깁니다. 깊게 발을 들여 놓지 못했지만 과학도의 길은 너무 욕심을 부려도, 부리지 않아도 안 되는 것인 것 같습니다. 그런 분이 저의 지도 교수님이셨고, 그 분 지도아래 너무도 부족했던 제가 졸업을 한다고 논문을 완성할 수 있었습니다. 실컷 실험을 할 수 있도록 아낌없이 배려해 주시고 가르쳐 주신 장정원 교수님께 먼저 깊은 감사를 드립니다. 너그러운 마음으로 격려해 주신 김동구 교수님께 감사드립니다. 그리고 김경환 교수님, 안영수 교수님, 김혜영 교수님, 이민구 교수님께 감사드립니다. 물론 가족이나 다름없던 약리학 교실원 모두에게도 고맙습니다. 이주영 선생님, 이서울 선생님, 김건태 선생님, 시호, 형진, 재구, 민수, 재우, 희정, 미주, 남열이 실험실 식구에게 특히 고마움을 표합니다.

바쁘다고 잘 챙겨주지 못했던 사랑하는 여보-병렬과 뱃속에 5 개월 된 우리 아가한테도 너무 미안한 마음과 고마운 마음을 전하고 싶습니다. 존경하고 사랑하는 아빠-김경환사장님, 엄마-안부순여사님, 시어머니-김순자여사님께 감사드립니다. 윤옥이, 제부, 기춘이, 도련님도 감사합니다. 앞으로 저에게 주어질 자리에서 최선을 다하고, 좀더 가정을 돌보는 아내와 며느리, 딸, 형수, 언니, 누나가 되고 싶습니다.

차 례

국문요약 ····· 1

Ⅰ. 서 론 ····· 3

Ⅱ. 재료 및 방법 ····· 6

1. 실험동물 및 약물 ····· 6

2. 혈장 코르티코스테론 농도 측정 ····· 7

3. nNOS 및 pCREB 면역조직화학법 ····· 7

4. 정량화 및 통계처리 ····· 8

Ⅲ. 결 과 ····· 9

1. 혈장 코르티코스테론 농도 ····· 9

2. 금식 및 재급식시 nNOS 발현 ····· 10

3. 금식시 코르티코스테론 수용체 봉쇄효과 ····· 12

(1) 체중 변동 ····· 12

(2) 혈장 코르티코스테론 농도 ····· 13

(3) nNOS 발현 ····· 14

(4) CREB 인산화 ····· 14

4. 재급식시 열량의 효과 ····· 17

(1) 혈장 코르티코스테론 농도 ····· 17

(2) nNOS 발현 ····· 18

(3) CREB 인산화 ····· 19

Ⅳ. 고 찰 ····· 20

Ⅴ. 결 론 ····· 23

참고문헌 ····· 24

영문요약 ····· 30

그림 차례

그림 1. 금식 및 재급식시 혈장 코르티코스테론 농도 변화·····9

그림 2. 금식 및 재급식시 측뇌실핵에서 nNOS 면역조직화학상 ···11

그림 3. 48 시간 동안의 체중 변동 ·····12

그림 4. 금식시 혈장 코르티코스테론 농도 변화·····13

그림 5. 측뇌실핵의 nNOS 면역조직화학상····· ···15

그림 6. 측뇌실핵의 pCREB 면역조직화학상 ····· ··16

그림 7. 재급식시 혈장 코르티코스테론 농도 변화·····17

그림 8. 재급식시 측뇌실핵에서 nNOS 발현 ····· 18

그림 9. 재급식시 측뇌실핵에서 CREB 인산화····· 19

국문요약

랫트의 측뇌실핵에서 섭식상황에 따른 nNOS 발현 조절

본 연구에서는, 섭식상황에 따른 뇌시상하부 측뇌실핵에서의 nNOS 유전자 발현 조절의 분자기전을 추구하였다. 이를 위해, 금식 및 재급식시 측뇌실핵의 CREB 인산화 및 nNOS 발현 수준변화를 면역조직화학적 방법으로 조사하여, 이들과 당질코르티코이드 혈중 농도 변화 사이의 관련성을 검토하였다. 또한, 금식시 RU486 투여에 의한 당질코르티코이드 수용체 봉쇄효과 및 재급식시 열량 배제효과를 조사함으로써, 측뇌실핵의 nNOS 유전자 발현 조절 기전에서 당질코르티코이드의 역할 및 열량의 효과를 규명하고자 하였다. 결과에서 혈장 코르티코스테론 수준은 48 시간 금식시 유의하게 증가하였고, 재급식 5 시간 후 다시 감소하는 것으로 관찰되었다. 한편 금식에 의해 감소되었던 nNOS 유전자 발현은 재급식 후 다시 증가하였다. 당질코르티코이드 수용체의 길항제인 RU486 처치는 금식에 의한 nNOS 발현 및 CREB 인산화 감소를 봉쇄하였다. 재급식시, 정상 사료 공급군에서는 nNOS 발현 및 pCREB 수준이 증가하였으나, 열량이 배제된 혼합사료 공급군의 측뇌실핵에서는 nNOS 발현 및 pCREB 수준이 증가하지 않았다. 반면, 금식으로 증가했던 혈장 코르티코스테론 수준은 재급식시 열량의 유무에 관계없이 감소하였다. 이상의 결과로부터, 금식 또는 재급식시 혈장 당질코르티코이드는 그의 수용체를 매개로 하여 nNOS 발현의 변화를 억제적으로 조절하며, 이 과정에 CREB 인산화가 수반될 것임을 알 수 있었다. 또한, 측뇌실핵의 nNOS 유전자 발현 조절기전에서 음식으로부터 공급되는 열량이 유도 인자로 관여될 것이라 사료되었다. 아울러, 섭식상황에 따른 혈장 당질코르티코이드 수준 변화에는 열량 이외의 섭식 행동 인자가 관여할 것임을 알 수 있었다.

핵심 되는 말: 신경형 일산화질소 합성효소(nNOS), phospho cyclic AMP responsive element binding protein(pCREB), 당질코르티코이드, RU486, 금식, 재급식

랫트의 측뇌실핵에서 섭식상황에 따른 nNOS 발현 조절

<지도교수 **장정원**>
연세대학교 대학원 의과학과
김 윤 미

Ⅰ. 서 론

뇌 시상하부는 섭식행동 및 스트레스반응과 관련된 신경내분비계의 통합조절이 이루어지는 부위이다.[1-2] 최근 연구들에 의하면 지방조직 및 위 등의 말초신경 조직에서 합성 분비되어 섭식행동을 조절하는 호르몬들의 수용체가 뇌 시상하부에 존재하는 것으로 밝혀졌다.[3] 예로서, 지방조직에서 합성 분비되는 비만 억제 호르몬인 렙틴은 뇌 시상하부의 궁상핵(arcuate nucleus)에 있는 렙틴 수용체를 통해 섭식조절 유전자들의 발현정도를 조절하는 것으로 알려져 있다.[3-4] 자율신경계와 내분비계의 소우주로 불리는 측뇌실핵(paraventricular nucleus)은 뇌 시상하부 궁상핵을 이루는 신경세포들의 신경말단이 풍부하게 분포되어 있어서, 궁상핵으로부터 전달되는 내장계의 감각정보를 통합하여 섭식행동을 조절하게 된다.[4] 측뇌실핵은 거대세포부(magnocellular subdivision)와 소세포부(parvocellular subdivision)으로 구분된다.[5] 거대세포부는 뇌하수체, 척수, 뇌간으로 신호를 전달하며, 주로 옥시토신과 바소프레신 신경세포가 분포되어있다.[6] 소세포부에는 부신피질 자극 호르몬(Corticotropin-Releasing Hormone) 및 갑상선 자극 호르몬(Thyrotropin-Releasing Hormone)을 분비하는 신경세포들이 주로 분포하며, 이들 호르몬에 대한 음성적 되 먹임 작용이 일어나는 부위이다.[7-8]

일산화질소(NO)는 신경계 및 내분비계에서 여러 가지 기능을 조절하는 중요한 생물학적인 전달자(messenger)로 알려져 있다.[9-11] 일산화질소는 아르기닌으로부터 일산화질소 합성효소(nitric oxide synthase; NOS)에 의해 합성된다. NOS 는 신경형(neuronal NOS), 상피형(epithelial NOS), 유도형(inducible NOS)의 3 가지 종류로 구분되며, 신경형 NOS(nNOS)는 주로 뇌의 신경세포에 분포한다.[12-14] 일산화질소는 기체형태로 생성된 후 짧은 시간 안에 그의 역할을 수행하고 사라지므로 일산화질소 합성효소(NOS)의 유전자발현 정도로 일산화질소의 생성수준을 판단하기도 한다.[15] 뇌 시상하부의 측뇌실핵에는 신경형 일산화질소 합성효소(nNOS)가 풍부하게 분포하며, 생성되는 일산화질소는 측뇌실핵을 구성하는 신경세포의 활성화에 기여한다.[16-17] 뇌 시상하부의 일산화질소 조절계는 중추신경계의 식욕 및 섭식행동 조절기전에 관여하는 것으로 보고되고 있다.[18-23] 랫트를 48 시간 금식 시킬 경우 측뇌실핵에서 nNOS 유전자 발현이 40%정도 감소하는 것으로 보고되었다.[24] 한편, 48 시간 금식 시킨 랫트의 혈장 내 코르티코스테론 농도는 약 5-6 배 증가하며,[25-27] 부신이 적출된 랫트에서는 48 시간 금식 후에도 측뇌실핵에서 nNOS 유전자 발현이 감소되지 않고, 또한 합성 당질코르티코이드인 덱사메타손은 자유급식군의 측뇌실핵에서 nNOS 유전자 발현을 억제한다고 보고되었다.[28-29] 이상의 사실들은 금식시 측뇌실핵의 nNOS 발현감소와 혈중 코르티코스테론 증가 사이의 관련성을 시사하는 것으로 사료된다.

스트레스 대응축인 시상하부-뇌하수체-부신축(hypothalamus-pituitary-adrenal gland axis-HPA axis)활성화의 최종산물인 당질코르티코이드(랫트의 경우, 코르티코스테론)는 부신피질에서 합성되어 혈중으로 분비되는 스테로이드계 호르몬으로, 혈중 코르티코스테론 수준은 스트레스 반응의 지표가 되기도 한다.[30] 코르티코스테론은 중추신경계와 말초신경계에 모두 영향력을 미치며 신체의 에너지 균형 및 항상성 유지에 기여한다. 섭식행동 조절과 관련하여서는, 랫트의 경우 금식시 혈장 코르티코스테론의 농도가 증가하며,[25-27] 혈장 내 코르티코스테론 농도의 증가는 먹이 섭취량을 증가시킨다고 보고되었다.[31] 또한, 부신피질로부터 코르티코스테론의 과다 분비는 비만과 관련성을 보이며, 부신 적출 시술(adrenalectomy)은

비만증상을 완화시킨다고 보고되었다.[32-33] 혈장 내 코르티코스테론은 다양한 조직에 존재하는 수용체에 결합하여 활성화된다. 코르티코스테론은 당질코르티코이드 (glucocorticoid) 수용체와 무기질코르티코이드 (mineralocorticoid) 수용체에 모두 결합할 수 있으나, 당질코르티코이드 수용체에 상대적으로 더 높은 친화도를 나타낸다. 뇌의 시상하부에는 당질코르티코이드 수용체가 주로 분포하는 것으로 보고되었다.[34-36] RU486(mifepristone)은 합성 스테로이드계 제재로서 당질코르티코이드 수용체에 대한 길항제이다. RU486 은 생체 내에서 높은 친화도와 긴 반감기를 가지고 있어서 코르티코스테론 수용체 봉쇄에 효과적으로 사용된다.[37-38]

금식시 관찰되는 측뇌실핵의 nNOS 유전자 발현감소 조절기전에 혈중 당질코르티코이드의 관련성이 시사되었으나, 조절의 분자기전은 아직 밝혀지지 않았다. 더욱이, nNOS 유전자의 전사조절 유전자 (promoter)부위에는 당질코르티코이드 수용체에 대한 결합부위가 없는 것으로 보고되었다.[39] 최근, nNOS 유전자의 전사조절 유전자 부위에 CRE(cyclic AMP response element)서열이 있고, nNOS 유전자 발현과정에 CREB(CRE-binding protein)의 인산화가 수반된다고 보고된 바 있다.[40-41] 또한, 당질코르티코이드에 의한 nNOS 유전자 발현 억제과정에, CREB 인산화의 억제도 수반된다는 사실이 세포주를 이용한 실험으로부터 보고된 바 있다.[42]

본 연구에서는, nNOS 유전자 발현 조절의 분자기전을 랫트를 실험동물로 하여 생체 수준에서 추구하였다. 이를 위해, 금식 및 재급식시 측뇌실핵의 CREB 인산화 및 nNOS 발현 수준변화를 면역조직화학적 방법으로 조사하여, 이들과 당질코르티코이드 혈중 농도 변화 사이의 관련성을 검토하였다. 또한, 금식시 RU486 투여에 의한 당질코르티코이드 수용체 봉쇄효과 및 재급식시 열량 배제효과를 조사함으로써, 뇌시상하부 측뇌실핵에서 nNOS 유전자 발현 조절 기전에서 당질코르티코이드 수용체의 관련 여부 및 열량의 효과를 밝히고자 하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 실험동물 및 약물

Sprague-Dawley 종 수컷 랫트(무게 320±50 g)를 구입하여 사용하였다(Daehan Biolink Co., LTD., Korea). 랫트는 실험에 들어가기 전 1 주일 동안 물과 먹이를 자유롭게 공급하면서 실험실 환경에 적응시켰다.

(1) 금식 및 재급식 실험 (n=6) : 랫트를 자유급식 대조군(Fed), 48 시간 금식군(Deprived) 및 48 시간 금식 후 5 시간 재급식군(Refed)으로 나누었다.

(2) 금식시 RU486 의 효과 (n=6) : 랫트를 자유급식 대조군(Fed), 48 시간 금식 대조군(Deprived/Veh) 및 48 시간 금식기간 동안 RU486 투여군(Deprived/RU)으로 구분하였다. RU486 투여군에게는 polyethyleneglycol(Sigma, USA)에 부유시킨 RU486(mifepristone, Sigma, USA)을 매회 20 mg/kg의 용량으로 48 시간 금식 동안 12 시간 간격으로 4 회에 걸쳐 피하 주사하였다. 금식 대조군에는 polyethyleneglycol 을 RU486 투여군과 동일 시간대에 피하 주사하였다.

(3) 재급식시 열량의 효과 (n=6) : 랫트를 자유급식 대조군(Fed), 48 시간 금식군(Deprived), 48 시간 금식 후 5 시간 재급식군(Chow/R) 및 48 시간 금식 후 5 시간 재급식시 열량이 배제된 혼합사료 공급군(Non-caloric/R)으로 나누었다. 혼합사료(Non-caloric food) 는 2.5% α-cellulose(Sigma, USA), 0.1% saccharin(Sigma, USA), 1% mineral oil(Sigma, USA), 0.5% vanilla extract(McCormick, USA)의 구성으로 조성하였다.

2. 혈장 코르티코스테론 농도 측정

랫트 복강에 pentobarbital 과 chloral hydrate 혼합액을 과용량으로 투여하여 급속 마취 유도 시킨 후 흉강을 열고 심이를 통해 혈액을 채취하여 헤파린-나트륨 함유 진공 혈청 분리 관에 넣어 20 분간 실온에서 방치하고 2000 rpm 에서 20 분 동안 원심 분리한 후, 혈장만을 수집하여 분석 할 때까지 -70℃ 극저온 냉동고에 보관하였다. 혈장 내 코르티코스테론 농도는 방사능 I^{125} 으로 표지 된 Rat Corticosterone Radioimmunoassay Kit(DPC, CA, USA)를 이용하여 측정하였다.

3. nNOS 및 pCREB 면역조직화학법

랫트 복강에 pentobarbital 과 chloral hydrate 혼합액을 주사하여 신속하게 마취시킨 후, 심장 관류 법을 이용하여 헤파린이 첨가된 0.9% saline 용액으로 혈액을 제거하고, 냉각 시킨 고정액(4% paraformaldehyde, 0.1M sodium phosphate dibasic, 0.1M sodium phosphate monobasic)을 350 - 400 ml 주입하여 조직을 고정시켰다. 뇌를 적출하여 동일한 고정액으로 2-3 시간 동안 4℃에서 후고정시킨 후, 냉동절편 제작시 조직의 손상을 방지할 목적으로 30% sucrose 용액에 넣어 24 시간 동안 보관하였다. Sliding microtome (Microme, Zeiss, Germany)을 이용하여 조직을 40 ㎛ 두께로 냉동 박절한 후 0.1M phosphate buffered salts(PBS, pH7.4))에 넣었다. Triton 용액[0.2% Triton X-100, 1% bovine serum albumin (BSA), 0.1M PBS]에 30 분간 처리 후, polyclonal anti-rabbit anti-nNOS(1:2000, Zymed Laboratories Inc., USA)항체 또는 polyclonal anti-rabbit anti-pCREB(1:1000, Upstate biotechnology, USA)항체로 상온에서 16 시간 동안 반응시켰다. PBS-BSA(0.5% BSA, 0.1M PBS)로 조직을 세척하고 biotinylated anti-rabbit IgG(1:200, Vector Laboratories, CA, USA)로 1 시간 동안 반응시켰다. 다시 PBS-BSA 로 조직을 세척한 다음 avidin-biotin complex(1:50, ABC Elite kit, Vector Laboratories, CA, USA)에 1 시간 반응시켰다. 0.1M phosphate

buffer(PB, 0.1M sodium phosphate dibasic, 0.1M sodium phosphate monobasic, pH7.4)로 조직을 세척한 후, DAB(0.05% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, Sigma, USA)을 이용하여 5 분 동안 발색시켰다. 0.1M PB 로 조직을 세척을 한 후, 0.05M PB 에서 젤라틴으로 입힌 슬라이드(gelatin-subbed slide glass)에 얹어 공기 중에서 건조시켰다. 조직이 부착된 슬라이드는 일반적인 탈수와 청명과정을 거친 후 Permount(Fisher, NJ, USA)를 이용하여 덮개유리를 씌웠다.

4. 정량화 및 통계처리

nNOS 항체로 면역 염색된 세포의 수는 광학현미경하에서 세었다. pCREB 면역 염색된 세포핵 수는 MCID Image Analyzer(Imaging Research Inc, Ontario, Canada)를 이용하여 화상분석 하였다. Paxinos & Watson[43] 책을 참고로 하여 각 마리 당 해부학적으로 동일한 위치(bregma: -1.80 ~ -2.00)의 3 section 들을 선택하여 nNOS 양성 세포 또는 pCREB 양성핵들을 센 후, section 당 평균을 계산하였다. 이 값들을 각 군 간 분류하여 one-way ANOVA 로 분석하고 post-hoc comparisions 으로 각 군 간의 통계적 유의성을 검색하였다. 모든 실험 결과는 mean±SEM 으로 나타내었다.

Ⅲ. 결 과

1. 혈장 코르티코스테론 농도.

48 시간 금식군의 혈장 코르티코스테론 수준은 자유급식 대조군에 비해 현저하게 증가하였으며($p<0.001$), 48 시간 금식 후 5 시간 동안 다시 먹이가 공급된 재급식군에서는 혈장 코르티코스테론 수준이 자유급식 대조군의 수준으로 회복되는 것으로 나타났다(그림 1).

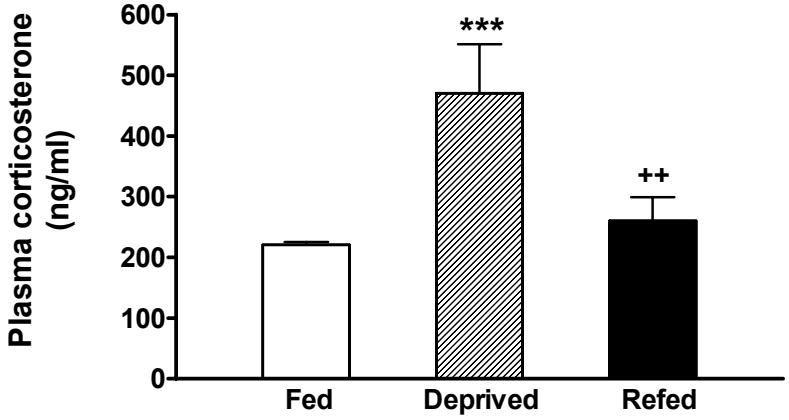


그림 1. 금식 및 재급식시 혈장 코르티코스테론의 농도변화. 48 시간 금식 후 (Deprived), 또는 5 시간 동안 재급식(Refed) 후 채취된 혈액으로부터 혈장 코르티코스테론의 농도를 측정하여, 자유급식 대조군(Fed)의 것과 비교하였다. 혈장 코르티코스테론 수준은 금식군에서 통계적으로 유의하게 증가된 것으로 나타났다(***$p<0.001$ vs. Fed). 5 시간 동안의 재급식은 금식시 증가된 혈장 코르티코스테론 수준을 통계적으로 유의하게 감소시켰다(++$p<0.01$ vs. Deprived). n=6

2. 금식 및 재급식시 nNOS 발현

금식군의 측뇌실핵에서는 자유급식 대조군에 비해 nNOS 면역 염색 정도가 현저히 감소하였으며, 재급식군에서는 이러한 감소가 다시 회복되는 것으로 관찰되었다(그림 2A). 각 군의 측뇌실핵에서 nNOS 양성세포수를 센 결과, 자유급식 대조군에 비해 금식군에서 35～40% 정도 감소되었고($p<0.05$), 재급식군에서는 다시 자유급식 대조군의 수준으로 회복된 것으로 나타났다(그림 2B).

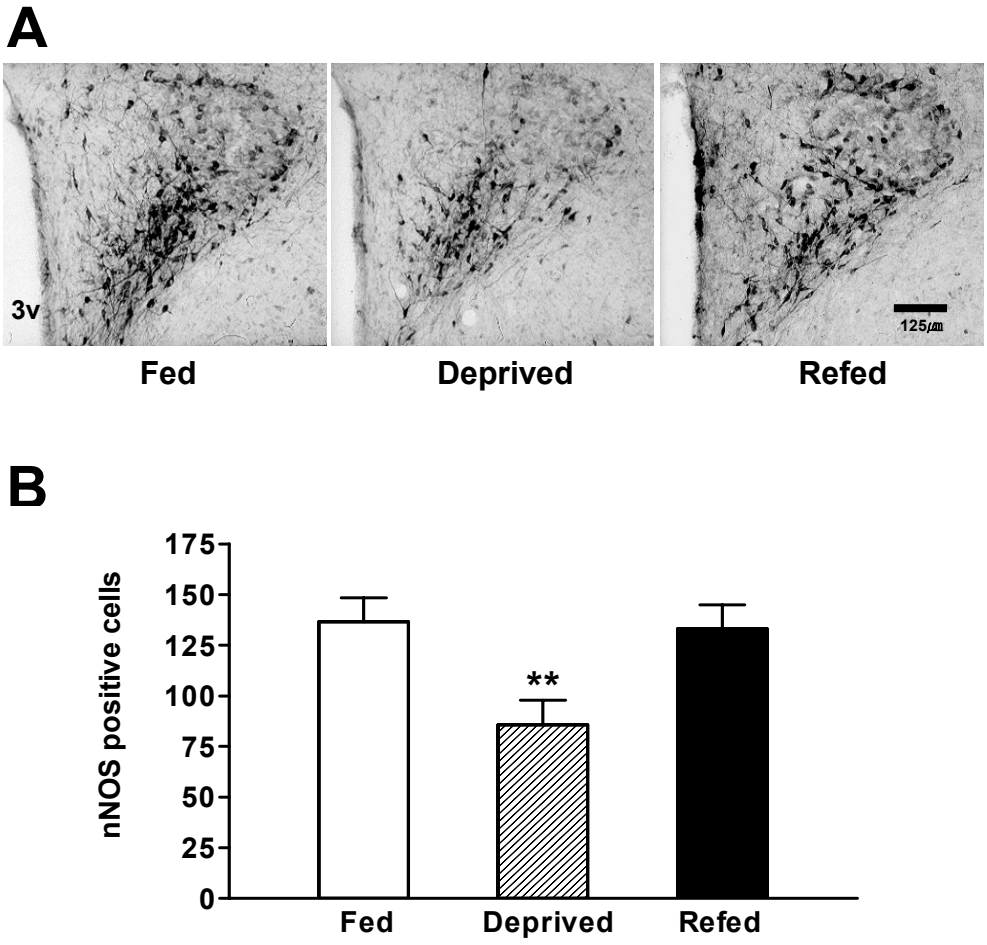


그림 2. 금식 및 재급식시 측뇌실핵에서 nNOS 면역조직화학상. 48 시간 금식 (Deprived) 또는 5 시간 재급식(Refed) 후, 고정시켜 준비한 뇌조직 절편을 면역조직화학법을 이용하여 nNOS 항체로 반응시켰다. (A) 측뇌실핵의 nNOS 면역염색 정도는 자유급식 대조군에 비해 금식군에서 감소되었으며, 재급식군에서는 다시 회복된 것으로 관찰되었다. (B) nNOS 면역염색 양성세포수는 금식군에서 유의하게 감소되었으며 (**$p<0.05$ vs. Fed), 재급식군에서는 대조군과 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다. n=6.

3. 금식시 코르티코스테론 수용체 봉쇄효과

(1) 체중 변동

48 시간 금식으로 인한 체중 변동에 대한 RU486 의 영향을 알아보기 위해 각 실험군의 체중을 측정하였다. 자유급식 대조군에서는 48 시간 동안 15 g 정도의 체중 증가가 관찰되었으며, 금식기간 동안 RU486 투여는 금식으로 인한 체중 감소의 폭을 유의하게 변화시키지 않았다 (그림 3).

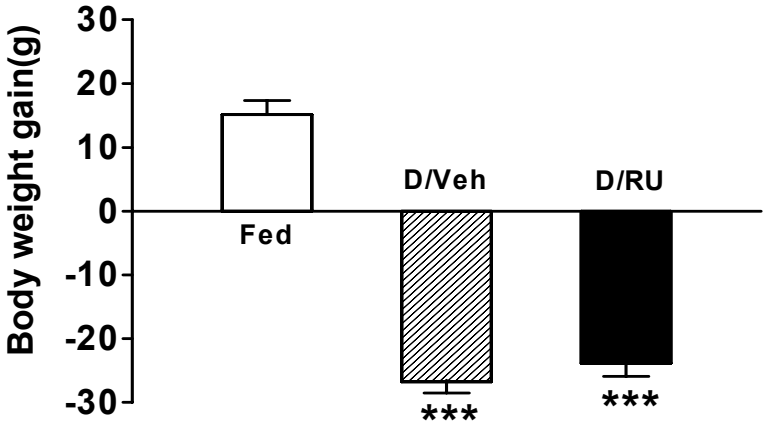


그림 3. 48 시간 동안의 체중 변동. 48 시간의 금식 기간 동안 12 시간 간격으로 4 회에 걸쳐 RU486(20 mg/kg) 또는 같은 체적의 Vehicle 을 피하 주사하였다. 자유급식 대조군(Fed)에 비해, RU486 투여군(D/RU) 과 Vehicle 투여군(D/Veh)에서 모두 유사한 정도의 체중 감소가 관찰되었다. ***p<0.001 vs. Fed. n=6.

(2) 혈장 코르티코스테론 농도

48 시간 금식 후 혈장 코르티코스테론 수준이 유의하게 증가하였으며($p<0.05$), RU486 투여군에서도 유사한 정도로 증가 하였다($p<0.01$)(그림 4). 이상의 결과에서, RU486 처치는 금식시 코르티코스테론 혈중농도 증가에 영향이 없음을 알 수 있었다.

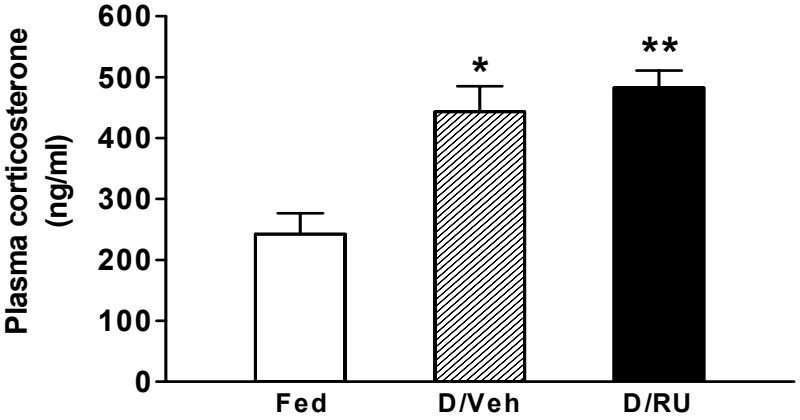


그림 4. 금식시 혈장 코르티코스테론 농도 변화. 48시간의 금식 기간 동안 12 시간 간격으로 4회에 걸쳐 RU486(20mg/kg) 또는 같은 체적의 Vehicle 을 피하 주사하였다. 혈액을 채취하여 혈장을 분리한 후 방사능으로 표지 된 Rat Corticosterone RIA Kit를 이용하여 혈장 코르티코스테론 수준을 분석하였다. 혈장 코르티코스테론 수준은 자유급식 대조군(Fed) 에 비해 금식군(D/Veh)에서 유의하게 증가되었으며, RU486 투여(D/RU)는 금식에 의한 혈장 코르티코스테론 증가에 유의한 영향을 미치지 않았다. *$p<0.05$, **$p<0.01$ vs. Fed. n=6.

(3) nNOS 발현

측뇌실핵의 nNOS 면역조직화학상을 관찰한 결과, 자유급식 대조군에 비해 48 시간 금식군에서 nNOS 면역염색 정도가 감소되었으며, 이러한 감소는 금식 동안 RU486 투여에 의해 억제된 것으로 보였다(그림 5A). 측뇌실핵(PVN)의 nNOS 면역 양성세포수를 정량 분석한 결과, 금식군에서는 35～40% 정도 감소 되었고($p<0.001$), RU486 투여군은 자유급식군과 유의한 차이를 보이지 않았다(그림 5B, PVN). 이는 금식에 의한 nNOS 발현 감소가 RU486 투여에 의해 억제된 것으로 사료되었다. 측뇌실핵을 거대세포부(magnocellular subdivision)와 소세포부(parvocellular subdivision)로 구분하여 분석한 결과에서는, RU486 의 억제효과가 소세포부에서만 나타났다는 것을 알 수 있었다(그림 5B, mP, pM). 한편, 금식에 의한 nNOS 발현 감소는 소세포부 및 거대세포부 모두에서 관찰되었다(그림 5A, B).

(4) CREB 인산화

측뇌실핵의 pCREB 면역염색 정도는 48 시간의 금식기간 동안 감소된 것으로 보였으며, 금식시 투여된 RU48 은 이를 억제하는 것으로 사료되었다(그림 6A). pCREB 항체에 대해 면역 염색된 핵의 수를 정량화하기 위한 화상분석 결과, 48 시간 금식에 의해 pCREB 면역 양성핵수가 유의하게 감소되었으며($p<0.01$), RU486 투여가 이러한 감소를 억제하였음을 알 수 있었다(그림 6B, PVN). 측뇌실핵에서 금식에 의한 pCREB 감소효과는 소핵세포부에만 한정되었고($p<0.001$), RU486 은 이를 효과적으로 억제하였다(그림 6B, mP, pM).

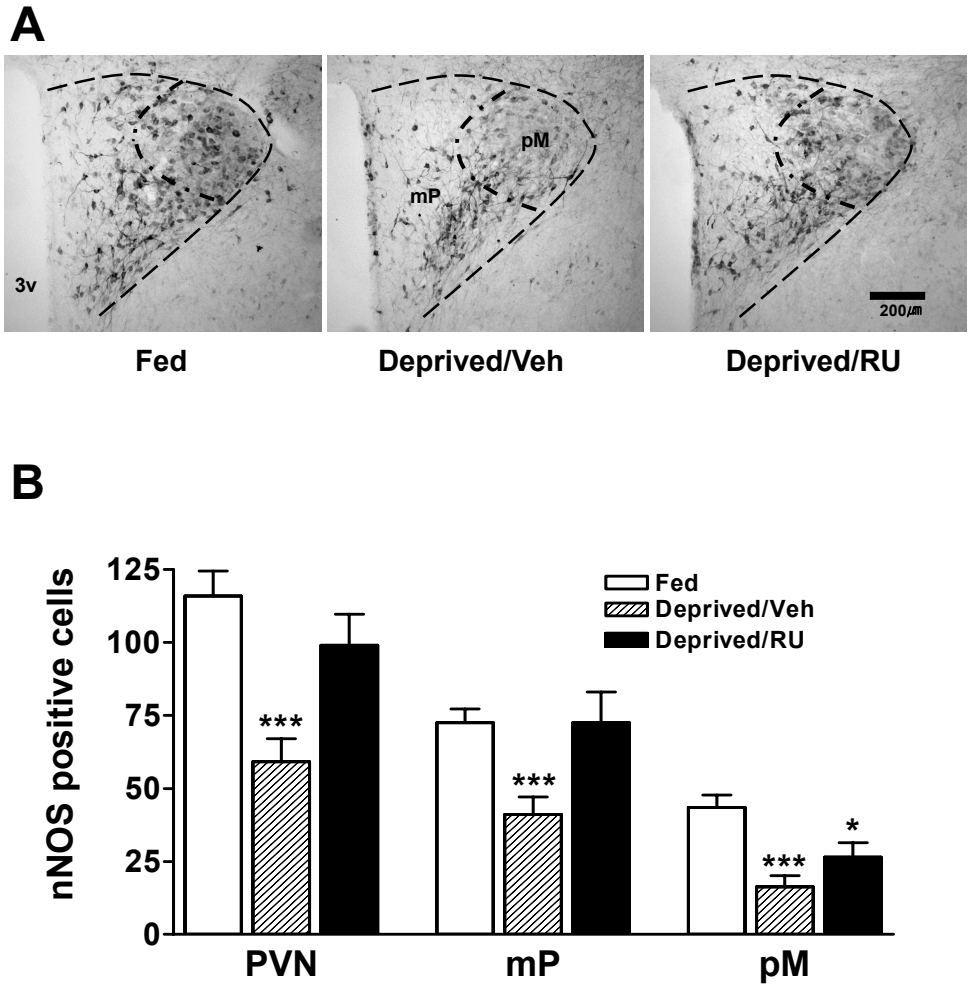
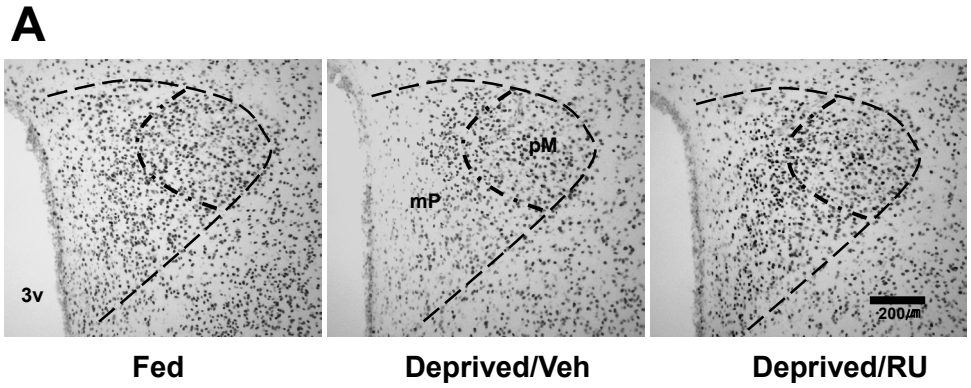


그림 5. 측뇌실핵의 nNOS 면역조직화학상. (A) 48 시간 금식군(Deprived/Veh)의 측뇌실핵(PVN)에서 nNOS 면역염색정도가 자유급식 대조군(Fed)에 비해 감소되었으며, 이러한 감소는 금식 기간 동안의 RU486 투여(Deprived/RU)에 의해 억제되는 것으로 관찰되었다. (B) 측뇌실핵의 nNOS 면역염색 양성세포수를 정량화한 결과, 금식에 의한 nNOS 양성세포수 감소는 소세포부(mP)와 거대세포부(pM) 모두에서 있었으나, RU486 의 억제효과는 소세포부에서만 유의하게 나타난 것을 알 수 있었다. *$p<0.05$, ***$p<0.001$ vs. Fed. n=6.



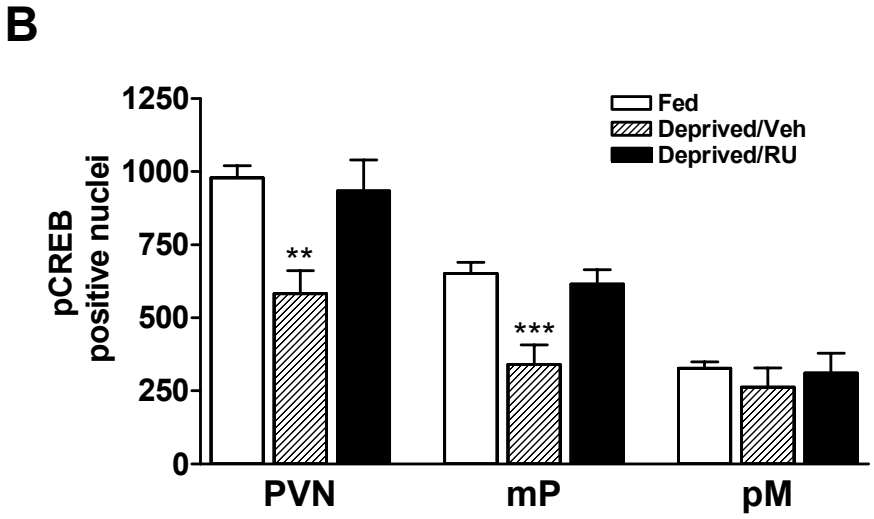


그림 6. **측뇌실핵의 pCREB 면역조직화학상.** (A) 48 시간 금식군(Deprived/Veh)의 측뇌실핵(PVN)에서 pCREB 면역염색 정도가 자유급식 대조군(Fed)에 비해 감소되었으며, 이러한 감소는 금식 기간 동안의 RU486 투여(Deprived/RU)에 의해 억제되는 것으로 관찰되었다. (B) 측뇌실핵의 pCREB 면역염색 양성핵수를 정량화한 결과, 금식에 의한 pCREB 양성핵수 감소는 소세포부(mP)에서만 나타났으며, RU486 이 이를 유의하게 억제한 것을 알 수 있었다. **$p<0.01$, ***$p<0.001$ vs. Fed. n=6.

4. 재급식시 열량의 효과.

(1) 혈장 코르티코스테론 농도

랫트를 자유급식 대조군(Fed), 48 시간 금식군(Deprived), 48 시간 금식 후 5 시간 재급식군(Refed)으로 나누었으며, 재급식 군에는 정상사료(Chow) 또는 열량이 배제된 혼합사료(Non-caloric food)를 공급하였다. 각 실험군의 혈장 코르티코스테론 수준을 검색한 결과, 자유급식 대조군에 비하여 유의하게 증가되었던 금식군의 혈장 코르티코스테론 수준($p<0.05$)이 재급식 후 5 시간에는 정상 사료 재급식군(Chow/R)과 혼합사료 재급식군(Non-caloric/R) 모두에서 자유급식 대조군의 수준으로 회복된 것을 알 수 있었다(그림 7).

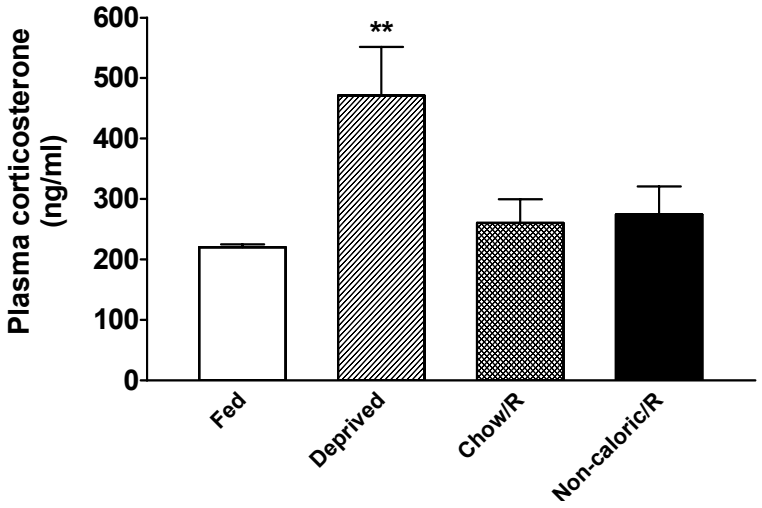


그림 7. 재급식시 혈장 코르티코스테론 농도 변화. 48시간 금식 또는 5시간 재급식 후, 신속히 마취된 랫트의 심이로부터 혈액을 채취하여 방사능 면역분석법으로 혈장 코르티코스테론 농도를 측정하였다. 금식시(Deprived) 증가된 혈장 코르티코스테론 수준이 5 시간 재급식 후, 정상사료 재급식군(Chow/R) 과 혼합사료 재급식군(Non-caloric/R) 모두에서 자유급식 대조군(Fed) 의 수준으로 회복되었다. $**p<0.05$ vs. Fed. n=6.

(2) nNOS 발현

각 실험군의 측뇌실핵에서 nNOS 면역 양성세포수를 정량한 결과, 금식에 의한 nNOS 발현세포 감소(Deprived)는 5 시간 동안의 정상사료 공급(Chow/R)에 의해 자유급식 대조군(Fed)의 수준으로 회복되었다 (그림 8). 그러나, 혼합사료 재급식군(Non-caloric/R)에서는 측뇌실핵의 nNOS 면역 양성세포수가 여전히 자유급식 대조군에 비해 유의하게 감소되어있는 것으로 나타났다.

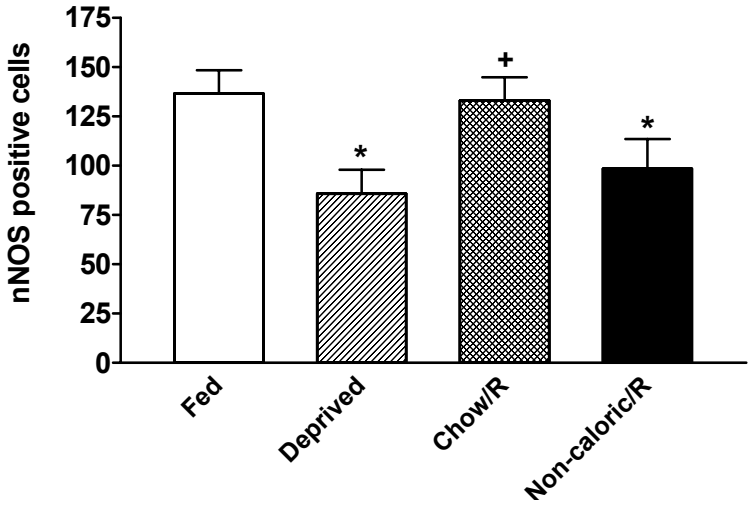


그림 8. 재급식시 측뇌실핵에서 nNOS 발현. 48 시간 금식 또는 5 시간 재급식 후, 각 실험군의 뇌 조직 절편을 준비하여 측뇌실핵에서 nNOS 면역조직화학법을 수행하였다. 측뇌실핵의 nNOS 면역 양성세포수는 48 시간 금식(Deprived)에 의해 유의하게 감소되었으며, 5 시간의 정상사료 재급식(Chow/R)에 의해 다시 자유급식 대조군(Fed)의 수준으로 회복된 것을 알 수 있었다. 혼합사료 재급식군(Non-caloric/R)에서는 이와 같은 회복이 관찰되지 않았다. *$p < 0.05$ vs. Fed, +$p < 0.05$ vs. Deprived. n=6.

(3) CREB 인산화

각 실험군의 측뇌실핵에서 pCREB 면역 양성핵수를 정량한 결과, 금식에 의한 pCREB 발현세포 감소(Deprived)는 5 시간 동안의 정상사료 공급(Chow/R)에 의해 자유급식 대조군(Fed)의 수준으로 회복되었다 (그림 9). 혼합사료 재급식군(Non-caloric/R)에서는 측뇌실핵의 pCREB 면역 양성세포수가 여전히 자유급식 대조군에 비해 유의하게 감소되어있는 것으로 나타났다.

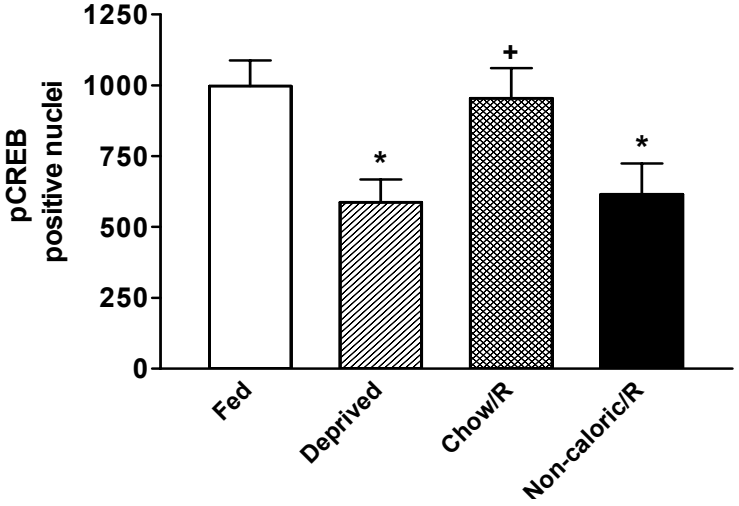


그림 9. 재급식시 측뇌실핵에서 CREB 인산화. 48 시간 금식 또는 5 시간 재급식 후, 각 실험군의 뇌 조직 절편을 준비하여 측뇌실핵에서 pCREB 면역조직화학법을 수행하였다. 측뇌실핵의 pCREB 면역 양성핵수는 48 시간 금식(Deprived)에 의해 유의하게 감소되었으며, 5 시간의 정상사료 재급식 (Chow/R)에 의해 다시 자유급식 대조군(Fed)의 수준으로 회복된 것을 알 수 있었다. 혼합사료 재급식군(Non-caloric/R)에서는 이와 같은 회복이 관찰되지 않았다. *p< 0.05 vs. Fed, +p< 0.05 vs. Deprived. n=6.

Ⅳ. 고 찰

랫트의 측뇌실핵에서 신경형 일산화질소 합성효소 (nNOS) 의 유전자 발현은 금식시 억제되며, 이 과정에 부신에서 분비되는 당질코르티코이드가 관련될 것이라 보고된 바 있다.[24-27] 즉, 금식 시 측뇌실핵의 nNOS 유전자 발현이 40% 정도 감소되고,[23] 이때 혈장 내 코르티코스테론 수준은 5-6 배 증가되어 있다고 보고되었다.[25-27] 본 연구의 결과에서도, 금식시 혈장 코르티코스테론 수준이 증가한 반면, 측뇌실핵의 nNOS 발현은 감소하였다. 또한 재급식 후 혈장 코르티코스테론 수준과 측뇌실핵 nNOS 발현 정도는 다시 자유급식 대조군 수준으로 회복되었다. 즉, 재급식에 의해 혈장 코르티코스테론은 감소하였고 nNOS 발현은 증가되었다. 이러한 결과는 이전의 보고들과 함께, 혈장 코르티코스테론 수준이 섭식 상황에 따라 측뇌실핵에서의 nNOS 발현과 반대방향으로 조절됨을 나타내는 것이라 사료되었다.

세포주를 이용한 생체외 실험으로부터, nNOS 유전자 발현이 당질코르티코이드에 의해 억제된다고 보고되었으며,[24] 뇌조직에서도 당질코르티코이드에 의한 nNOS 발현 억제효과가 보고된 바 있다.[22] 또한, 재급식시 유도되는 측뇌실핵의 nNOS 발현 증가는 합성 당질 코르티코이드 전처치에 의해 봉쇄된다고 보고되었다.[43] 그러나 당질코르티코이드에 의한 nNOS 발현 억제의 분자 기전은 아직 명확히 밝혀지지 않았다. 더욱이, nNOS 유전자의 전사조절 유전자에는 GRE (Glucocorticoid response element)서열이 존재하지 않는다.[39] 최근, nNOS 유전자의 전사조절 유전자에 CRE(cyclic AMP responsive element) 서열이 있으며,[39,41] CREB(CRE binding protein)-의존적 Ca^{++} 유입 현상에 의해 nNOS 유전자 발현이 촉진된다고 보고되었다.[40] 본 연구실에서는, 금식 또는 재급식시 측뇌실핵에서 관찰되는 대다수의 nNOS 신경세포 핵 부위에서 phospho-CREB(pCREB) 역시 관찰된다는 사실을 NADPH-d 염색법과 pCREB 면역조직화학법을 이용해 보고한 바 있다.[43] 이상의 보고들로부터, 금식시 관찰되는 측뇌실핵의 nNOS 발현 억제 조절 기전에 CREB 인산화의 감소가 수반될 것이라

판단되었다. 본 연구의 결과에서, 금식시 측뇌실핵에서 nNOS 감소와 함께 pCREB 수준 역시 감소되었으며, 이러한 감소현상은 당질코르티코이드 수용체의 길항제인 RU486 에 의해 봉쇄되는 것으로 나타났다. 이로부터, 금식시 측뇌실핵의 nNOS 발현 감소는 당질코르티코이드 수용체를 매개로 하여 이루어지며, 이 조절 기전에 CREB 인산화가 관여될 것 임을 알 수 있었다. 더욱이, RU486 에 의한 봉쇄 효과는 당질코르티코이드 수용체가 풍부하게 분포되어 있는 소세포부(parvocellular subdivision)에서만 관찰되었으며,[44-45] 거대세포부(magnocellular subdivision)에서는 관찰되지 않았다는 사실은 상기의 결론을 더욱 뒷받침해 주는 것으로 사료되었다.

비록, 당질코르티코이드가 CREB 인산화를 억제함으로써 nNOS 유전자 발현이 억제될 것이라 짐작되기는 하나, 여전히 당질코르티코이드에 의한 CREB 인산화 억제의 분자 기전은 명확하지 않다. 세포주를 이용한 실험에서, 당질코르티코이드에 의한 CREB 인산화 억제 효과가 MAPK(mitogen-activated protein kinases) 조절경로에서 CREB 의 상위 조절인자인 ERK(extracellular signal-regulated protein kinases)의 활성화 억제를 통해 가능할 것이라 제시 되었다.[42] 또한, 당질코르티코이드가 MAPK phosphatase-1 의 합성을 촉진시킨 결과 pERK 의 분해가 유도되어 ERK 활성이 억제될 것이라는 보고가 있었다.[46] 이상의 보고들을 근거로 하여, 금식시 증가된 혈장 당질코르티코이드가 측뇌실핵에서 그 표적 유전자인 MAPK phophatase-1 발현을 유도한 결과 ERK 인산화가 억제되고, 그에 이은 CREB 인산화 억제에 의해 nNOS 유전자 발현이 억제 될 것이라는 잠정적 조절 경로가 제시될 수 있다. 또한, 본 연구 결과에서 나타난 바와 같이 재급식시에는 혈장 코르티코스테론 수준이 감소함으로서 MAPK phosphatase-1 발현이 억제되고, 그 결과로 nNOS 유전자 발현이 다시 증가하는 것으로 짐작할 수 있다. 그러나, 이와 같은 조절 경로가 섭식 상황에 따라 변하는 nNOS 발현 조절을 위한 유일한 경로 일지는 추가 연구를 통하여 확인 되어야 할 것으로 사료되는 바이다.

더불어 본 연구에서는, 섭식 상황에 따른 혈장 코르티코스테론 및 측뇌실핵 nNOS 유전자 발현 변화에 대한 상위 조절인자로서, 먹이로부터 공급되는 열량의 효과를 알아보기 위해 재급식시 열량이

배제된 먹이를 공급하였다. 결과에서, 열량이 배제된 혼합사료를 공급한 재급식군에서는, 정상 먹이 공급 재급식군과는 다르게 측뇌실핵의 pCREB 수준 및 nNOS 발현이 증가되지 않았다. 반면, 혈장 코르티코스테론 수준은 혼합 사료 재급식군에서도 정상 먹이 공급 재급식군에서와 같이 금식 이전의 수준으로 회복된 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는, 섭식 상황에 따른 측뇌실핵의 nNOS 유전자 발현 조절 기전에 있어서, 혈장 코르티코스테론이 유일한 상위 조절 인자가 아님을 나타내는 것으로 사료되었다. 즉, 혈장 코르티코스테론에 의한 nNOS 유전자 발현 억제 효과가 해소되더라도, nNOS 유전자 발현 유도 인자로서 열량이 공급되지 않는 한, 측뇌실핵의 nNOS 발현은 유도되지 않는다고 해석될 수 있다. 한편, 측뇌실핵의 nNOS 유전자 발현은 먹이로부터 얻는 열량이 그 주요 유도 인자로 작용을 하나, 혈장 코르티코스테론 수준 변화에는 열량 이외의 섭식 행동 인자들이 관여할 것임을 짐작할 수 있다.

Ⅴ. 결 론

1. 혈장 코르티코스테론 수준과 뇌시상하부 측뇌실핵의 nNOS 유전자 발현은 금식 및 재급식 등의 섭식 상황에 따라 서로 반대 방향으로 조절되었다.

2. 당질코르티코이드 수용체 길항제인 RU486 은 금식에 의한 측뇌실핵의 pCREB 수준 및 nNOS 발현 감소를 봉쇄하였다.

3. 재급식 시 열량이 배제된 먹이 공급군에서, 혈장 코르티코스테론 수준은 감소되었음에도 불구하고 측뇌실핵의 nNOS 발현 및 pCREB 수준이 증가되지 않았다.

이상의 결과로부터, 섭식 상황에 따른 측뇌실핵에서의 nNOS 발현 조절 기전에는 CREB 인산화가 수반될 것이며, 이 조절 경로에서, 혈장 코르티코스테론이 억제 인자로서, 먹이로부터 공급되는 열량은 유도 인자로 각기 관여할 것임을 알 수 있었다. 한편, 섭식 상황에 따른 혈장 코르티코스테론 수준 변화에는 열량 이외의 섭식행동 인자가 관여될 것이라 사료되었다.

참고문헌

1. Isse T, Ueta Y, Serino R, Shibuya I, Lightman SL, Yamashita H. Effects of leptin on fasting-induced inhibition of neuronal nitric oxide synthase mRNA in the paraventricular and supraoptic nuclei of rats. Brain Reseach. 1999;846:229-235.

2. Nelson RJ, Kriegsfeld LJ, Dawson VL, Dawson TM. Effects of nitric oxide on neuroendocrine function and behavior. Front Neuroendocrinol. 1997;18:463-491.

3. Funahashi H, Takenoya F, Guan JL, Kageyama H, Yada T, Shioda S. Hypothalamic neuronal networks and feeding-related peptides involved in the regulation of feeding. Anat Sci Int. 2003;78(3):123-38

4. Watts AG. Unterstanding the Neural Control of ingestive Behaviors: Helping to Separate Cause from Effect with Dehydration-Associated Anorexia. Horm Behav. 2000;37:261-283.

5. Swanson LW, Sawchenko PE. Hypothalamic integration: Organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. Annu Rev Neurosci. 1983;6: 269-324.

6. Nylen A, Skagerberg G, Alm P, Larsson B, Holmqvist B, Andersson KE. Nitric oxide synthase in the hypothalamic paraventricular nucleus of the female rat; organization of spinal projections and coexistence with oxytocin or vasopressin. Brain Res. 2001;20:908(1):10-24.

7. Segerson TP, Kauer J, Wolfe HC, Mobtaker H, Wu P, Jackson IM, Lechan RM. Thyroid hormone regulates TRH biosynthesis in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. Science 1987;238:78-80.

8. Blake NG, Johnson MR, Eckland DJ, Foster OJ, Lightman SL. Effect of food deprivation and altered thyroid status on the

hypothalamic- pituitary- thyroid axis in the rat. J Endocrinol. 1992;133:183-188.

9. Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. Annu Rev Biochem. 1994;63:175-195.

10. Amir S. Nitric oxide signalling in the hypothalamus. In: Nitric Oxide in the Nervous System. Academic Press New York. 1995;151-162.

11. Brann D, Bhat G, Lamar CA, Mahesh V. Gaseous transmitters and neuroendocrine regulation. Neuroendocrinology. 1997;65:385-395.

12. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. Biochem J. 1994;298:249-258.

13. Nathan C, Xie Q-W. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. Cell. 1994;78:915-918.

14. Dawson TM, Dawson VL. Nitric oxide synthase: role as a transmitter/mediator in the brain and endocrine system. Annu Rev Med 1996;47:219-227.

15. Garthwaite J, Boulton CL. Nitric Oxide Signaling in the Central Nervous System. Annu Rev Physiol. 1995;57:683-706.

16. McCann SM, Karanth S, Kimura M, Yu WH, Rettori V. The role of nitric oxide (NO) in control of hypothalamic- pituitary function. Rev Bras Biol. 1996;56(1):105-112.

17. Szabó C, Thiermermann C. Regulation of the expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase. nitric oxide. In: Ignarro I, Murad F, Editors. Biochemistry, Molecular Biology, and Therapeutic Implications Advances in Psychopharmacology. 1995;34:113-153.

18. Morley JE, Flood JF. Evidence that nitric oxide modulates food intake in mice. Life Sci. 1991;49:707-711.

19. Squadrito F, Calapai G, Cucinotta D, Altavilla D, Zingarelli B, Ioculano M. Food deprivation increases brain nitric oxide synthase and depresses brain serotonin levels in rats. Neuropharmacology. 1994;33:83-86.

20. Morley JE, Farr SA, Suarez MD, Flood JF. Nitric oxide synthase inhibition and food intake: effects on motivation to eat and in female mice. Pharmacol Biochem Behav. 1995;50:369-373.

21. Morley JE, Kumar VB, Mattammal MB, Farr S, Morley PM, Flood JF. Inhibition of feeding by a nitric oxide synthase inhibitor: effects of aging. Eur J Pharmacol. 1996;311:15-19.

22. Ueta Y, Levy A, Chowdrey HS, Lightman SL. Inhibition of hypothalamic nitric oxide synthase gene expression in the rat paraventricular nucleus by food deprivation is independent of serotonin depletion. J Neuroendocrinol. 1995;7:861-865.

23. Garthwaite J, Boulton CL. Nitric Oxide Signaling in the Central Nervous System. Annu Rev Physiol. 1995;57:683-706.

24. O'Shea RD, Gundlach AL. Food or water deprivation modulate nitric oxide synthase (NOS) activity and gene expression in rat hypothalamic neurones: correlation with neurosecretory activity? J Neuroendocrinol. 1996;8:417-425.

25. Pirke KM, Spyra B. Catecholamine turnover in the brain and the regulation of leuteinizing hormone and corticosterone in starved male rats. Acta Endocrinol. 1982;100:168-176.

26. Garcia-Belenguer S, Oliver C, Mormede P. Facilitation and feedback in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis during food restriction in rats. J Neuroendocrinol. 1993;5:663-668.

27. Hanson ES, Levin N, Dallman MF. Elevated corticosterone is not required for the rapid induction of neuropeptide Y gene expression by an overnight fast. Endocrinol. 1997;138:1041-1047.

28. Van Rossum EF, Koper JW, Huizenga NA, Uitterlinden AG, Janssen JA, Lamberts SW. A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene, which decreases sensitivity to glucocorticoids in vivo, is associated with low insulin and cholesterol levels. Diabetes. 2002;51(10):3128-3134.

29. Elimam A, Marcus C. Meal timing, fasting and glucocorticoids interplay in serum leptin concentrations and diurnal profile. Eur J Endocrinol. 2002;147(2):181-188.

30. Kim CK, Rivier CL. Nitric Oxide and Carbon Monoxide Have a Stimulatory Role in the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Response to Physico-Emotional Stressors in Rats. Endocrinology. 2000;141:2244-2253.

31. Peeke PM, Chrousos GP. Hypercortisolism and obesity. Ann NY Acad Sci. 1995;771:665-676.

32. Dallman MF, Strack AM, Akana SF, Bradbury MJ, Hanson ES, Scribner KA, Smith M. Feast and Famine: Critical Role of Glucocorticoids with Insulin in Daily Energy Flow. Frontiers in Neuroendocrinology. 1993;14:303-347.

33. Jeanrenaud B. Central nervous system and peripheral abnormalities: clues to the understanding of obesity and NIDDM. Diabetologia. 1994;37:S169-S178.

34. Bizon JL, Helm KA, Han JS, Chun HJ, Pucilowska J, Lund PK, Gallagher M. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and corticosterone receptor expression in behaviourally characterized young and aged Long-Evans rats. Eur J Neurosci. 2001;14(10)1739-1751.

35. Proulx K, Clavel S, Nault G, Richard D, Walker CD. High neonatal leptin exposure enhances brain GR expression and feedback efficacy on the adrenocortical axis of developing rats. Endocrinology. 2001;142(11):4607-4016.

36. Gur E, Dremencov E, Van De Kar LD, Lerer B, Newman ME. Effects of chronically administered venlafaxine on 5-HT receptor activity in rat hippocampus and hypothalamus. Eur J Pharmacol. 2002;436(1-2):57-65.

37. Kim PJ, Cole MA, Kalman BA, Spencer RL. Evaluation of RU28318 and RU40555 as selective mineralocorticoid receptor and glucocorticoid receptor antagonists, respectively: receptor measures and functional studies. J Steroid Biochem Mol Biol. 1998;67(3):213-222.

38. Douma BR, Korte SM, Buwalda B, la Fleur SE, Bohus B, Luiten PG. Repeated blockade of mineralocorticoid receptors, but not of glucocorticoid receptors impairs food rewarded spatial learning. Psychoneuroendocrinology. 1998;23(1):33-44.

39. Jeong Y, Won J, Kim C, Yim J. 5'-Flanking sequence and promoter activity of the rabbit neuronal nitric oxide synthase (nNOS) gene. Mol Cells. 2000;10:566-574.

40. Sasaki M, Gonzalez-Zulueta M, Huang H, Herring WJ, Ahn S, Ginty DD, Dawson VL, Dawson TM. Dynamic regulation of neuronal NO synthase transcription by calcium influx through a CREB family transcription factor-dependent mechanism. Proc Natl Acad Sci USA. 2000;97:8617-8622.

41. Rife TK, Xie J, Redman C, Young AP. The 5’2 promoter of the neuronal nitric oxide synthase dual promoter complex mediates inducibility by nerve growth factor. Mol Brain Res. 2000;75:225-236.

42. Son GH, Geum D, Jung H, Kim K. Glucocorticoid inhibits growth factor-induced differentiation of hippocampal progenitor HiB5 cells. J Neurochemistry. 2001;79:1013-1021.

43. Lee JY, Lee JH, Kim DG, Jahng JW. Dexamathasone blocks the refeeding-induced phosphorylation of cAMP response element-binding protein in the rat hypothalamus. Neuroscience Letters. 2003;344:107-111.

44. Liposits Z, Uht RM, Harrison RW, Gibbs FP, Paul WK, Bohn MC. Ultrastructural localization of glucocorticoid receptor (GR) in the hypothalamic paraventricular neurons synthesizing corticotrophin releasing factor (CRF). Histochemistry. 1987;87:407-412.

45. Uht RM, McKelvy JF, Harrison RW, Bohn MC. Demonstration of glucocorticoid receptor-like immunoreactivity in glucocorticoid-sensitive vasopressin and corticotrophin-releasing factor neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. J Neurosci Res. 1988;19:405-411.

46. Kassel O, Sancono A, Kratzchmar J, Kreft B, Stassen M, Cato ACB. Glucocorticoids inhibit MAP kinase via increased expression and decreased degradation of MKP-1. The EMBO Journal. 2001;20:7108-7116.

Abstract

Nutritional directed regulation of nNOS expression in the rat paraventricular nucleus.

Yun Mi Kim

Department of Medical Science

The graduate school, Yonsei University

(Directed by Professor Jeong Won Jahng)

Nitric oxide (NO) is an important biological messenger, especially in the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) of the brain, NO modulates a large number of neuronal, autonomic, and endocrine functions. nNOS expression in the rat PVN is decreased by food deprivation, increased by refeeding. The plasma level of glucocorticoids increases during food deprivation and decreases shortly after refeeding. Also it was reported that adrenalectomy abolishes fasting-induced down-regulation of PVN-nNOS and dexamethasone, a synthetic glucocorticoid, down-regulates the PVN-nNOS in intact rats. It is hypothesized that glucocorticoids may negatively regulate nNOS expression depending on the feeding conditions. However, its molecular mechanism is not known yet. Recently, *in vitro* experiments revealed that the nNOS promoter carries cAMP response element (CRE) in its upstream and nNOS expression is mediated by a CRE-binding protein (CREB) -dependent mechanism.

In this study, we firstly examined if the fasting-induced nNOS down-regulationis is mediated by glucocorticoid receptors, and then if CREB phosphorylation is implicated in this regulatory pathway, and lastly, if changes in plasma glucocorticoids level and the PVN-nNOS expression is a nutritional-

directed event. In the result, nNOS positive cells and pCREB positive nucleus in the PVN significantly decreased by 48 h food deprivation, and RU486, glucocorticoid receptor antagonist, prevented this reduction. This supports the idea that the elevated level of plasma glucocorticoids during food deprivation may exert an inhibitory role in the PVN-nNOS expression, and suggests that the fasting-induced nNOS down-regulation in this brain region is mediated by glucocorticoids receptor, and furthermore, CREB phosphorylation may be implicated in the regulatory pathway of nNOS expression. Additionally, 5 h of non-caloric refeeding following after 48 h food deprivation failed to increase nNOS expression and pCREB level, which increased by 5 h of chow refeeding. However, non-caloric refeeding decreased the plasma corticosterone level, so as chow refeeding did. These results indicate that calori supplement is required to induce nNOS expression in the PVN, and suggest that plasma glucocorticoid level may be influenced by post-ingestive factors, at least, other than calori.

Key Words: nNOS, pCREB, Glucocorticoid, RU486, Food deprivation, Refeeding,