랫트 측뇌실핵에서 섭식 관련 extracellular signal - regulated kinase1/2 활성화의 조절 기전

연세대학교 대학원

의 과 학 과

차 미 주

랫트 측뇌실핵에서 섭식 관련 extracellular signal-regulated kinase1/2 활성화의 조절 기전

연세대학교 대학원

의 과 학 과

차 미 주

랫트 측뇌실핵에서 섭식 관련 extracellular signal - regulated kinase1/2 활성화의 조절 기전

지도교수 장 정 원

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2004년 12월 일

연세대학교 대학원

의 과 학 과

차 미 주

차미주의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

연세대학교 대학원

12월 일

감사의 글

먼저 하나님께 감사와 영광을 돌립니다. 힘든 시기가 있을 때 마다 그것은 시련이 아니라 주신 기회였음을 깨닫게 해 주심을 감사 드립니다. 26년의 삶 동안 사랑과 기도로 키워 주시고 교육자로서 훈계하는 교육이 아니라 삶 자체에서 본보기를 보여주신 아버지, 어머니께 끝없는 존경과 감사를 전해 드립니다. 또한 항상 곁에서 묵묵히 도와 주고 큰 힘이 되어준 오빠에게 고마움을 전합니다.

석사과정 동안 저에게 가장 큰 깨달음이 된 것은 배운 지식과 기술 보다도 과학자로서 진실한 마음가짐으로 문제를 탐구해 나가는 자세입니다. 이를 몸소 깨닫게 해주시고 열정적인 지도로 이끌어 주신 장정원 교수님께 감사드립니다. 모든 것에 있어서 기초가 가장 중요한 것임을 깨닫게 해주신 김동구 교수님께 감사드립니다. 석사과정에 들어가기 전부터 사소한 부분도 일일이 신경 써주시고 격려해 주신 서울치대 이종호 교수님께 감사드립니다. 대학원 생활 동안 관심과 격려로 지도해 주신 의대학장 김경환 교수님을 비롯하여 안영수 교수님, 김혜영 교수님, 이민구 교수님, 박경수 교수님께 깊이 감사 드립니다.

연세의대 약리학교실에서의 2년 반동안 저에게 많은 도움을 주셨던 연구선생님, 선후배님들께 감사드립니다. 특히 랩3에서 생활하면서 도움주신 랩식구들, 항상 의문하는 자세를 갖게 해주신 지금은 원광의대 교수님이신 이서울 선생님, 모든 면에서 자상하게 설명해 주시던 이주영 선생님, 사수이자 지금은 미국에 유학중인 닮고싶은 시호오빠, 항상 해맑았던 졸업한 큰언니 윤미언니, 도움 많이 받았던 착한 민수오빠, 진국이란 말을 깨닫게 해준 재구오빠, 자유분방한 재우오빠, 정신적 지주였던 졸업한 희정언니, 랩짱으로 항상 든든했던 형진언니, 곁에서 늘 묵묵히 도움을 주던 남열오빠, 항상 웃음으로 반겨주시던 유상배 선생님, 재치와 따뜻함이 공존하시는 비탈리 선생님, 착하고 순수한 영혼을 소유한 친구 영민이(joseph), 든든한 버팀목이 되주신 김건태 선생님 모두에게 아쉬움과 고마움을 전합니다.

공부하는 동안 따뜻한 관심과 사랑으로 격려해 주신 친가 외가 친지 분들께도 깊이 감사드리며 곁에 있는것 만으로도 큰 힘이 되어 주었던 소중한 친구들, 선후배에게도 고마움의 마음을 전합니다. 앞으로도 주어질 자리에서 최선을 다하고 발전하는 모습 보여드리겠습니다.

車 美 珠

차 례

그림 차례

국문요약

랫트 측뇌실핵에서 섭식 관련 extracellular signal-regulated kinase1/2 활성화의 조절 기전

랫트의 측뇌실핵에서 금식 동안 관찰되는 extracellular signal-regulated kinase1/2(ERK1/2) 활성화의 조절 기전을 조사하였다. 코르티코스테론이 투여된 랫트와 금식 동안 RU486 이 투여된 랫트의 측뇌실핵에서 mitogen-activated protein kinase phosphatase-1(MAPKP-1) 및 pERK1/2 의 수준을 면역조직화학법과 western blot 으로 조사한 결과, 대조군에 비해 차이를 나타내지 않았다. 뇌실에 NPY 를 주사한 결과, 섭식량이 뚜렷하게 증가되었음에도 불구하고 측뇌실핵에서 ERK1/2 인산화 수준은 대조군에 비해 차이가 없었다. 금식 동안 뇌실에 leptin 을 주사한 결과, 궁상핵의 NPY mRNA 수준 및 측뇌실핵의 NPY 면역염색상 뿐만 아니라 측뇌실핵의 pERK1/2 면역염색상도 자유 급식 대조군에서와 같은 수준으로 유지된 것을 알 수 있었다. 이상의 결과로부터, 금식 동안 혈장 당질코르티코이드 및 뇌시상하부의 NPY 증가는 측뇌실핵에서의 ERK1/2 인산화에 영향을 미치지 못할 것이며, 금식 동안 혈장 leptin 수준 변화가 측뇌실핵에서의 ERK1/2 인산화 조절 기전에 관여될 것이라 사료되었다.

……

핵심되는 말: phospho extracellular signal-regulated kinase1/2(pERK1/2), mitogen-activated protein kinase phosphatase-1(MAPKP-1), Neuropeptide Y(NPY), Leptin, 당질코르티코이드, 금식

랫트 측뇌실핵에서 섭식 관련 extracellular signal-regulated kinase1/2 활성화의 조절 기전

<지도교수 **장 정 원**>
연세대학교 대학원 의과학과
차 미 주

Ⅰ. 서 론

금식은 보상성 과식증상과 같은 섭식행동 변화뿐만 아니라, 혈압 및 맥박 감소, 인슐린 및 렙틴 혈중 농도 감소 등 여러 가지 생리적 변화를 수반한다고 보고 되었다.[1-7] 뇌의 시상하부 중 특히 측뇌실핵은 금식 동안 체내에서 형성된 대사 및 감각 신호들이 일산화질소합성효소(NOS) 발현의 감소와 같은 신경 화학적 변화로 전환되어 금식 상황에 대처하기 위한 통합적 반응을 유도하게 되는 뇌 부위인 것으로 짐작되고 있다.[8,9] 랫트의 경우, 금식 동안 관찰되는 측뇌실핵에서의 NOS 발현의 감소는 혈중 코르티코스테론 증가에 의해 유도된다고 보고 되었다.[10-13] 또한, 금식 동안 혈중 코르티코스테론 증가는 측뇌실핵에서 cAMP responsive element-binding protein(CREB)의 인산화를 억제함으로 NOS 발현의 감소를 유도하는 것으로 보고 되었다.[14-16] 그러나 금식 시 코르티코스테론에 의한 CREB인산화 감소의 분자 조절 기전은 아직 규명되지 않았다. 세포주를 이용한 연구에서, 당질코르티코이드에 의해 mitogen-activated protein kinase phosphatase-1(MAPKP-1)의 유전자 발현이 증가됨으로써 세포내의 extracellular signal-regulated kinase1/2(ERK1/2) 인산화 수준이 감소되며,[17-23] 이어서 MAP kinase 신호경로에서 ERK1/2 하위 조절분자인 CREB의 인산화 수준 역시 감소될 것이라 보고된 바 있다.[24-28] 그러나 금식 동안 랫트의 측뇌실핵에서는 CREB 인산화는 감소되나 그 상위 조절분자인 ERK1/2 인산화는 증가된다는 사실이 보고 되었고 예비 실험의 결과를 통해 확인 하였다.[29] 이러한 결과는 랫트 측뇌실핵에서 금식에 의한 MAPK 신호계 변화에는 코르티코스테론 이외에도 여러 가지 조절물질이 관여될 것임을 짐작하게 하였다.

금식 동안 측뇌실핵에서의 유전자 발현은 혈중 당질코르티코이드 및 leptin 수준의 변화, 측뇌실핵으로의 neuropeptide Y(NPY) 분비 증가 등에 의해서 조절되는 것으로 알려져 있다.[30] 금식 동안 시상하부의 궁상핵에서는 섭식촉진 펩타이드인 NPY와 agouti-related polypeptide(AgRP)의 발현이 증가되며 섭식억제 펩타이드인 pro-opiomelanocortin(POMC) 발현은 감소하는 것으로 보고되었다.[31,32] NPY는 이제껏 밝혀진 신경 펩타이드 중 가장 강력한 섭식촉진 작용을 나타내는 것으로 알려져 있는데, 금식

동안 뇌 시상하부 궁상핵에서 그 유전자 발현이 증가되고, 상당량의 NPY가 측뇌실핵으로 분비된다.[33-37] 측뇌실핵에서 NPY 분비량 증가는 보상성 과식증상을 유도하여,[38,39] 금식으로 인한 체내 에너지 수준 감소를 회복시키는 것으로 알려져 있다. 세포주를 이용한 실험에서 NPY가 세포내의 ERK1/2 인산화 수준을 증가시킨다는 보고는,[40-43] 금식 동안 측뇌실핵으로 분비된 과량의 NPY가 측뇌실핵의 시냅스 후신경세포들을 활성화시키는 과정에서 ERK1/2 인산화를 유도할 수 있을 것이라 짐작하게 하였다. 한편, 금식 동안 혈액중에 증가된 당질코르티코이드는 궁상핵에서 섭식 유전자들의 발현 조절에 관여할 것으로 보고되었으며,[44] 지방조직에서 합성, 분비되는 섭식억제 호르몬인 leptin 역시 섭식 상황에 따라 그 혈중 수준이 변화되고 궁상핵에서 NPY를 비롯한 섭식조절 분자들의 유전자 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다.[45-53] 또한, leptin 역시 세포주를 이용한 실험에서 ERK1/2 인산화에 관여할 것이라고 보고되었고,[54-58] 측뇌실핵에는 당질코르티코이드 수용체 및 leptin 수용체가 풍부하게 분포되어있는 것으로 보고되었다.[54-62] 이상의 사실들은 금식 동안 관찰되는 측뇌실핵에서의 ERK1/2 인산화가, NPY, 당질코르티코이드 및 leptin 등에 의해 측뇌실핵 신경세포에서 유도되는 신호전달계 활성화의 일부일 가능성을 시사한다.

따라서 본 연구에서는, 랫트의 뇌실에 NPY 및 leptin을 주입한 후 측뇌실핵에서 ERK1/2 인산화 수준을 검색하였고, 또한 당질코르티코이드 수용체 억제제 처리가 금식에 의한 ERK1/2 인산화 수준 증가를 억제하는지 조사하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 실험동물 및 약물처치

연세의대 실험 동물부에서 Sprague-Dawley 종 수컷 랫트(무게 320 ± 50 g)를 구입 및 사육하면서 실험에 사용하였고, 실험기간 동안 SPF(Specific pathogen free) 환경에서 동물을 유지시켰다. 랫트를 구입하고 실험에 들어가기 전 1 주일 동안 물과 먹이를 자유롭게 공급하면서 실험실 환경에 적응시켰다.

가. 금식 및 코르티코스테론 투여 효과(n=6):

랫트를 대조군(Free fed control: FC/Veh), 코르티코스테론 투여군(FC/CORT) 및 48 시간 금식군(Food Deprived: FD)으로 구분하였다. 코르티코스테론 투여군에게는 vehicle(polyethyleneglycol, Sigma, St. Louis, MO, USA: saline = 7:3)에 부유시킨 corticosterone(Sigma, St. Louis, MO, USA)을 매회 40 mg/kg의 용량으로 48 시간 동안 12 시간 간격으로 4 회에 걸쳐 피하 주사하였다. 대조군에는 vehicle을 코르티코스테론 투여군과 동일 시간대에 피하 주사하였다.

나. 금식 동안 RU486 투여 효과(n=6):

랫트를 자유급식 대조군(FC), 48 시간 금식 대조군(FD/Veh) 및 금식 동안 RU486 투여군(FD/RU486)으로 구분하였다. RU486(mifepristone, Sigma, St. Louis, MO, USA)은 polyethyleneglycol과 saline을 7:3으로 혼합한 vehicle에 부유시켜 매회 20 mg/kg의 용량으로 48 시간 금식 동안 12 시간 간격으로 4 회에 걸쳐 피하 주사하였다. 금식 대조군에는 vehicle을 RU486 투여군과 동일 시간대에 피하 주사하였다.

다. NPY 뇌실 주사 효과(n=7):

랫트를 대조군(FC/Veh)과 NPY 투여군(FC/NPY)으로 구분하였다. NPY 투여군에는 생리염수에 녹인 NPY(Peninsula Laboratories, Belmont, CA, USA)를 미리 설치된 뇌실 도관을 통해 5 μg/5 μℓ 용량으로 micro injection하였다. 대조군에는 NPY를 녹이지 않은 생리염수 5 μℓ를 동일한 방법으로 뇌실에 주사하였다. NPY 뇌실 주사는 오전 9 시에 실시하였으며, 주사 후 2 시간 동안 사료 섭취량을 기록하였다.

라. 금식 동안 leptin 뇌실 주사 효과(n=6):

랫트를 자유급식 대조군(FC/Veh), 48 시간 금식 대조군(FD/Veh), 금식 동안 leptin 투여군(FD/leptin)으로 구분하였다. Leptin(Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA)은 생리염수에 녹여 미리 설치된 뇌실 도관을 통해 3.5 μg/5 μℓ 용량으로 micro injection하였다. 자유급식 대조군과 금식 대조군에는 생

리염수 5 μℓ를 동일한 방법으로 뇌실 주사하였다. 뇌실 주사는 48 시간에 걸쳐 오전 9 시 및 오후 5 시에 각각 실시하였다.

2. 뇌실 도관 설치 시술

랫트 복강에 pentobarbital과 chloralhydrate 혼합액을 주사하여 마취시킨 후, 랫트의 양쪽 귀를 ear bar로 고정하고 동물의 앞니를 stereotaxic head holder 고정걸이 전방의 전구에 걸고, 측두골 고정용 전구를 좌우 균등하게 조였다. 고정 후 수술을 위해 머리 쪽의 수술부위를 소독 후 scalpels(No.3), blade(No.10)로 두중부를 절개하고 bregma point를 찾은 뒤, target point(lateral ventricle)를 찾아서 1 mm drill로 뚫은 후 지지대를 위한 구멍을 뚫었다. 나사를 지지용으로 구멍에 세운 후 dental cement가 흘러내리지 않게 지름 1 cm의 관을 수술부위에 두르고 target point에 probe를 좌표만큼(가로: ±1.2, 세로: -1.5, 깊이: -4 (mm)) 삽입하고 dental cement powder mix를 지지대와 probe 주위를 감싸게 잘 발라주었다. 수술 후 일주일의 회복기를 가진 다음, probe의 끝이 뇌실에 위치되었는지 확인하기 위해 뇌실 도관을 통해 angiotensinⅡ(Sigma, St. Louis, MO, USA)을 10 ng/μℓ 용량으로 투여하였다. 약물 투여 후 2 분 이내에 상당량의 물을 마신 랫트만을 실험에 포함시켰으며, 실험 후 probe의 위치는 뇌조직 검색 시 다시 확인하였다.

3. 조직검색

가. MAPKP-1, pERK1/2 및 NPY 면역조직화학법

랫트의 뇌를 적출하여 MAPKP-1, pERK1/2 또는 NPY 의 면역조직화학법을 실시하였다. 이를 위해 랫트의 복강에 pentobarbital 과 chloralhydrate 혼합액을 주사하여 마취시킨 후, 심장 관류법을 이용하여 헤파린이 첨가된 0.9% saline 용액으로 혈액을 제거하고, 냉각시킨 4% paraformaldehyde 를 주입하여 조직을 고정시킨 후 뇌를 적출하여 동일한

고정액으로 2-3 시간 동안 4℃에서 후고정을 하였다. 뇌조직의 냉동절편 제작시 조직의 손상을 방지할 목적으로 30% sucrose 용액에 24 시간 동안 처리한 다음, sliding microtome(Microm, Zeiss, Germany)을 이용하여 조직을 40 ㎛ 냉동 박절한 후 0.1 M PBS 에 넣었다. Triton 용액에 30 분간 처리 후, polyclonal anti-rabbit MAPKP-1(Santa Cruz Biotechnology Inc, Delaware Avenue, CA, USA 1:1000)항체, polyclonal anti-rabbit pERK1/2(Cell signaling, Beverly, MA, USA 1:300) 항체, polyclonal anti-rabbit NPY(Diasorin, Stillwater, MN, USA 1:20000)항체로 상온에서 16 시간 동안 반응시킨 후, PBS-BSA 로 조직을 세척하고 biotinylated anti-rabbit IgG(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA 1:200)로 1 시간 동안 반응 시켰다. 다시 PBS-BSA로 조직을 세척한 다음 avidin-biotin complex(ABC Elite kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA 1:50)에 1 시간 반응시키고 0.1 M PB로 조직 세척을 한 후 DAB(0.05% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride), H_2O_2(0.0036%)를 이용하여 5 분 동안 발색 시켰다. 0.1 M PB로 조직을 세척을 한 후, 0.05 M PB에서 젤라틴으로 입힌 슬라이드(gelatin-subbed slide glass)에 얹어 공기 중에서 건조 시켰다. 슬라이드에 부착된 염색된 뇌조직은 일반적인 탈수(dehydration)와 청명(cleaning)과정을 거친 후 Permount(Fisher, Fairlawn, NJ, USA)를 이용하여 덮개유리(cover glass)를 씌웠다.

나. Western Blot

랫트의 뇌를 적출하여 MAPKP-1, pERK1/2 의 western blot 을 실시하였다. 신속하게 뇌를 적출, 얼음 위에서 시상하부 부위를 적출하여 sucrose, $NaHCO_3$, $MgCl_2$, $CaCl_2$ 등이 들어있는 lysis buffer 에서 분쇄하여 4℃에서 1,4000 rpm 로 20 분간 원심분리 후 침전물을 Tris buffer(10 mM Tris, 0.1 M NaCl, 5% TritonX-100, 100 uM phenylmethylsulfonyl fluoride, 2 ㎍/㎕ leuoeotin, 1 mM EDTA)에 녹인 후 Protein Assay(Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, USA)로 정량한다. SDS polyacrylamide(12%) 젤에서 전기영동 후, transfer system 을 이용하여 nitrocellulose membranes (Hybond-C, Amersham, Bucks, UK)에 옮겨 PBS-T blocking buffer (5% nonfat dry milk in 1×phosphate buffered saline-Tween)로 membrane 을 반응시킨 후, polyclonal anti-rabbit pERK1/2(Cell signaling, Beverly, MA, USA 1:1000), polyclonal anti-rabbit MAPKP-1(Santa Cruz Biotechnology Inc, Delaware Avenue, CA, USA 1:1000)을 넣어 4℃에서 16 시간 동안 반응시켰다. PBS-T buffer 로 씻은 후, HRP anti-rabbit(Zymed Laboratories Inc, San Francisco, CA, USA 1:10000)로 1 시간 동안 반응시켰고, 다시 씻은 후 The Western Lightning™ Chemiluminescence

Reagent(Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA)의 A, B 용액 1:1 혼합액에 실온에서 5 분간 반응시켰다. Membrane 을 3 M paper 에 얹어 말린 후, 암실에서 X-ray film 에 노출하였다. 다시 membrane 을 PBS-T buffer 로 씻은 후 55℃, Stripping buffer(0.5 M Tris-HCl, 10% SDS, Merchaptoethanol)에서 30 분간 반응시킨 후 polyclonal anti-rabbit ERK1/2(Cell signaling, Beverly, MA, USA 1:1000), monoclonal anti-mouse β-actin(Oncogene, Boston, MA, USA 1:20000)를 넣어 4℃에서 16 시간 동안 반응시키고 PBS-T buffer 로 씻은 후, HRP anti-rabbit(1:10000), HRP anti-mouse(Zymed Laboratories Inc, San Francisco, CA, USA 1:4000)반응 과정을 거쳐 X –ray film에 노출하였다.

다. pERK1/2 및 pCREB 이중면역조직화학염색법

정상의 일반 랫트의 뇌를 적출하여 pERK1/2와 pCREB의 이중 면역조직화학법을 실시하였다. 적출한 뇌는 4℃에서 2-3 시간 후고정 하여 30% sucrose 용액에 24 시간 처리를 거쳐, 조직을 40 ㎛로 냉동 박절한 후 0.1 M PBS에 넣었다. Triton용액에 30 분간 처리 후, PBS-BSA buffer에 polyclonal anti-rabbit pCREB(Upstate biotechnology Inc, Waltham, MA, USA 1:1000) 항체로 상온에서 16 시간 동안 반응시킨 후, PBS-BSA로 조직을 세척하고 biotinylated anti-rabbit IgG(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA 1: 200)로 1 시간 동안 반응 시켰다. 다시 PBS-BSA로 조직을 세척한 다음 avidin-biotin complex(ABC Elite kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA 1:50)에 1 시간 반응시키고 TB(0.05 M Tris-HCl, pH 7.8)로 조직 세척을 한 후 Nickel ammonium sulfate(0.06%), DAB(0.025%, 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride), H_2O_2(0.0027%)를 이용하여 4 분 동안 발색 시켰다. 0.05 M TB(pH 7.6)로 조직을 세척을 한 후, TBS-BSA(0.05 M Tris-HCl+0.9%NaCl+0.5%BSA, pH7.8)에 polyclonal anti-rabbit pERK1/2 (Cell signaling, Beverly, MA, USA 1:300) 항체로 상온에서 16 시간 동안 반응시킨 후 TBS-BSA로 조직을 세척하고 biotinylated anti-rabbit IgG(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA 1:200)로 1 시간 동안 반응 시켰다. 다시 TBS-BSA로 조직을 세척한 다음 avidin-biotin complex(ABC Elite kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA 1:50)에 1 시간 반응 시켰다. 0.05 M TB(pH 7.8)로 조직 세척을 한 후 DAB(0.025%, 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride), H_2O_2 (0.0036%)를 이용하여 5 분 동안 발색 시켰다. 0.05 M TB(pH 7.6)로 조직을 세척 한 후 0.05 M TB에서 젤라틴으로 입힌 슬라이드(gelatin-subbed slide glass)에 얹어 공기 중에서 건조 시켰다. 슬라이드에 부착된 염색된 뇌 조직은 일반적인 탈수(dehydration)와 청명(cleaning)과정을 거친 후 Permount(Fisher, Fairlawn, NJ, USA)를 이용하여 덮개유리(cover

glass)를 씌웠다.

라. NPY *in situ* hybridization

랫트의 뇌를 적출하여 NPY *in situ* hybridization을 실시하였다. 적출한 뇌는 4℃에서 2-3 시간 후고정 하여 30% Sucrose (0.1% DEPC) 용액에 24 시간 처리를 거쳐, 조직을 40 ㎛ 냉동 박절한 후 차가운 2 X SSC(0.1% DEPC) 가 담긴 vial에 그룹별 조직을 12 장 씩 총 36 장을 넣었다. Pre-hybridization buffer는 뇌를 냉동 박절하기 전에 미리 만들어 48℃ water bath 에 넣어 slowly shaking해 놓고 냉동 박절이 끝나면 조직이 담긴 vial에서 2 X SSC buffer를 제거한 후 pre-hybridizaion buffer를 vial당 1 ml씩 천천히 분주한 후 48℃ water bath에서 2 시간 이상 slowly shaking incubation 한다. Vial당 ^{35}S-α-dATP labeled NPY(511 bp SmaI restriction fragment) cDNA probe (1 X 10^7 cpm)를 조직에 직접 닿지 않도록 넣고 16 시간 동안 48℃ water bath에서 slowly shaking incubation 하였다. Washing은 48℃ 에서 15 분 간격으로 7 번 시행하였다(Sections을 담고 있는 vials을 2 X SSC로 가득 채워 48℃에서 15 분간 incubation 하였다: SSC 2 X → SSC 2 X → SSC 1 X → SSC 0.5 X → SSC 0.25 X → SSC 0.125 X → 0.1 M PB (ice-cold) → 종료). Washing이 끝나면 tissue sections은 젤라틴으로 입힌 슬라이드(gelatin-subbed slide glass)에 얹어 공기 중에서 건조시킨 후 슬라이드를 실온에서 autoradiographic film(Kodak)에 최초 12 시간 동안 노출 시킨 후 현상하여 관찰하였다.

4. 정량화 및 통계처리

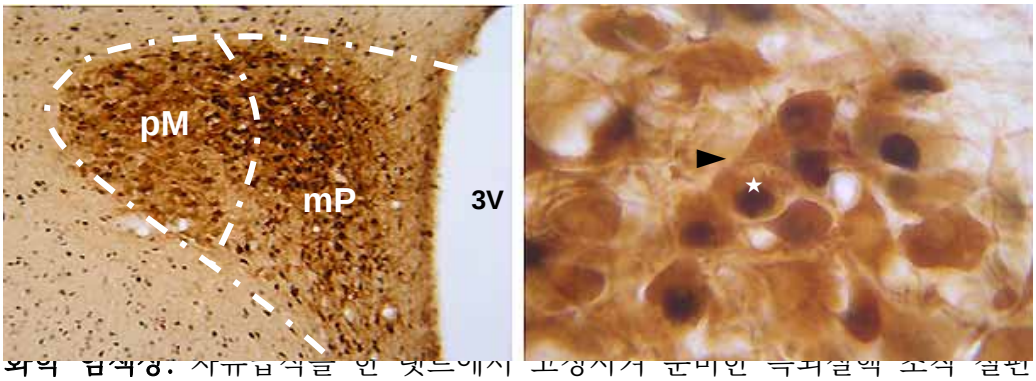
항체로 면역 염색된 세포의 수와 film에 감광된 mRNA 수준은 Zeiss Stemi-2000 stereoscope가 달린 Dage-MTI CCD 72 카메라로

디지털화하여 MCID Image Analyze System(Imaging Research Inc, Ontario, Canada)를 이용하여 화상분석 하였다. 실험결과는 평균 ± 표준오차로 나타내었으며, 통계분석을 위하여 Statview(version 5.01, The SAS Institute, CA, USA) 프로그램을 사용하였다. Paxinos & Watson[63] 책을 참고하여 각 마리 당 해부학적으로 동일한 위치의 4 section을 선택하여 section 당 평균값을 계산하였다. 이 값들을 각 군 간 분류하여 unpaired - *t* - test와 일원분산분석(One - way ANOVA) 방법을 사용하였다. 실험군간 분산분석 결과에서 유의한 차이는 집단의 표본수에 의거하여 최소 유의차검정법(Fisher's protectd least significance difference: PLSD)으로 사후검정법(post - hoc text)을 수행하여 차이를 규명하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 뇌 시상하부 측뇌실핵에서의 pERK1/2 및 pCREB colocalization.

랫트의 뇌 시상하부 측뇌실핵 조직에서 pERK1/2와 pCREB 이중면역조직화학 염색을 실시하였다. 측뇌실핵의 세포들 중 일부가 pERK1/2와 pCREB 항체에 동시에 반응을 하는 것으로 나타났으며, pERK1/2와 pCREB을 모두 함유하고 있는 세포들은 대개가 소핵세포부 (parvocellular subdivision)에서 발견되었다(그림 1).



화학 염색상: 자유급식을 한 랫트에서 고정시켜 준비한 측뇌실핵 조직 절편으로 pCREB 및 pERK1/2 항체를 사용하여 이중면역조직화학 염색을 실시하였다. 측뇌실핵에서 pCREB과 pERK1/2을 모두 함유하는 세포들은 대개가 소핵세포부 (mP)에 존재하는 것으로 관찰되었다. 3V; 3rd ventricle, mP; medial parvocellular subdivision, pM; posterior magnocellular subdivision.★: pCREB, ►: pERK1/2

2. ERK1/2 인산화에 대한 당질코르티코이드 효과.

가. MAPKP - 1 면역조직화학상

랫트의 뇌 시상하부 측뇌실핵에서 ERK1/2 인산화 수준이 당질코르티코이드에 의한 MAPKP - 1 발현 변화에 의해 조절되는지 알아보기 위해, 자유급식 랫트의 측뇌실핵 조직 절편으로 MAPKP - 1 면역조직화학법을 실시하였다. MAPKP - 1의 면역양성세포는, 당질코르티코이드 수용체의 존재가 거의 보고된 바 없는 거대세포부(pM)에서만 확인되었다(그림 2).

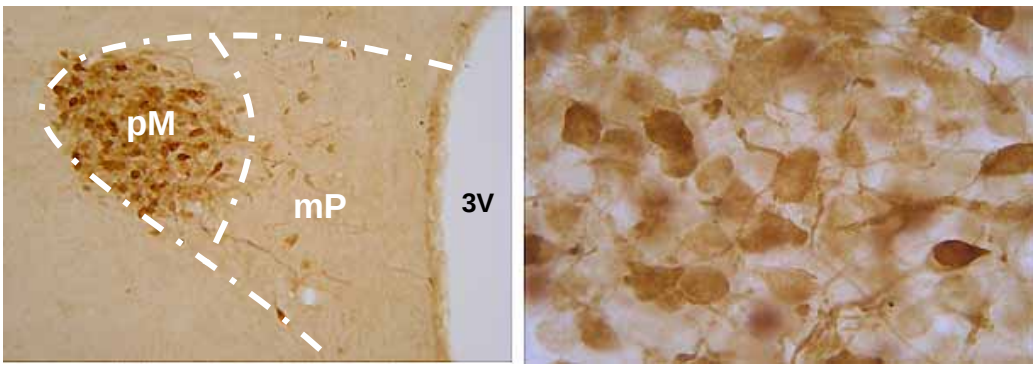
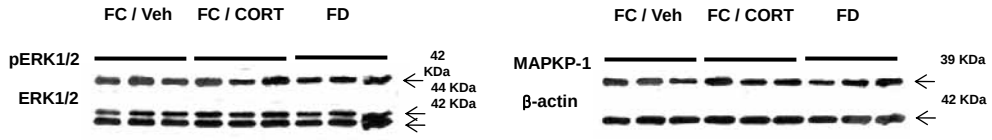


그림 2. 랫트 측뇌실핵에서 MAPKP-1 면역조직화학상. MAPKP-1의 면역양성세포는, 당질코르티코이드 수용체의 존재가 거의 보고된 바 없는 거대세포부(pM)에서만 관찰되었다.

나. pERK1/2, MAPKP-1 western blot

랫트의 뇌 시상하부 측뇌실핵에서 ERK1/2 인산화 수준이 금식 및 코르티코스테론 투여에 의해 조절되는지 알아보기 위해 랫트를 흡입마취 시킨 후, 시상하부 조직을 dissection하여 pERK1/2와 MAPKP-1의 양적 변화를 western blot으로 관찰하였다. 그 결과, 시상하부 조직에서 pERK1/2, MAPKP-1의 단백발현은 대조군과 차이를 보이지 않는 것으로 관찰되었다(그림 3A). 각 군의 시상하부에서 pERK1/2, MAPKP-1의 단백발현 강도를 정량 분석한 결과 실험 군 간에 차이가 없는 것으로 나타났다(그림 3B).

A.



B.

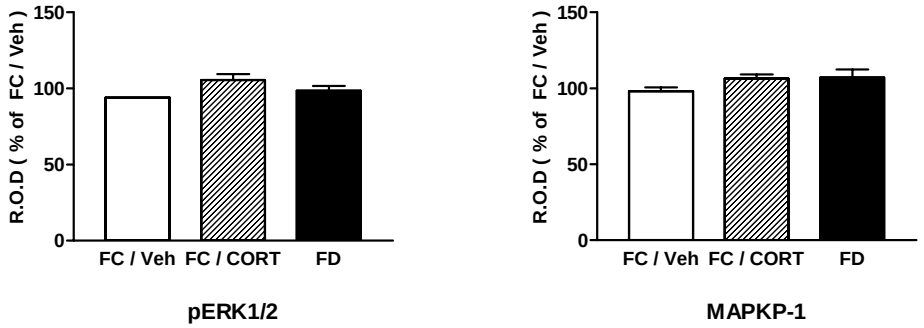


그림 3. ERK1/2 인산화에 대한 금식 및 코르티코스테론 투여 효과. 48 시간 금식 및 코르티코스테론 투여 후 시상하부에서의 pERK1/2, MAPKP-1 단백발현을 검색하였다. **A.** 금식군, 코르티코스테론 투여군 및 대조군 시상하부의 pERK1/2, MAPKP-1 단백발현. **B.** 각 실험군 시상하부에서 pERK1/2, MAPKP-1 단백발현 강도의 정량 분석. 금식 및 코르티코스테론 투여는 시상하부의 pERK1/2, MAPKP-1 수준에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 자유급식 대조군: Free fed control(FC/Veh), 코르티코스테론 투여군: FC/CORT, 48 시간 금식군: Food Deprived(FD), n=6.

다. pERK1/2 면역조직화학상

48 시간 금식 동안 분비되는 당질코르티코이드가 ERK1/2 인산화에 관여하는지 알아보기 위해 당질코르티코이드 수용체 길항제인 RU486을 피하주사 후 심장 관류법으로 뇌조직을 고정시켰고, 측뇌실핵 조직 절편을 준비하여 pERK1/2 면역조직화학법을 수행하였다. 금식군의 측뇌실핵에서

pERK1/2 면역염색상은 대조군에 비해 증가하였고, RU486 투여군 역시 대조군에 비해 증가하였다(그림 4A). 각 군의 측뇌실핵에서 pERK1/2 양성 세포 염색 강도를 정량 분석한 결과 금식군에서 대조군에 비해 유의하게 증가되었고($p < 0.01$) RU486 투여군도 대조군에 비해 유의하게 증가됨으로써($p < 0.001$) 금식군과 차이가 없는 것으로 나타났다(그림 4B).

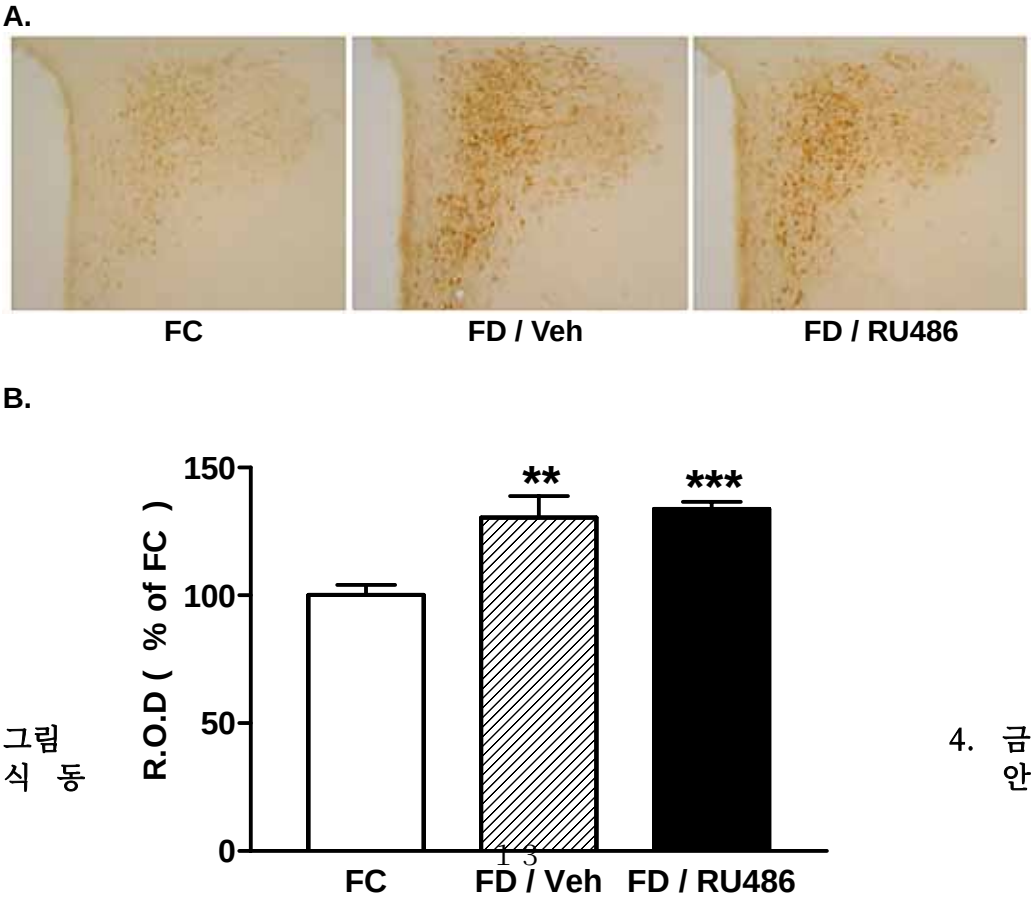


그림 4. 금식 동안

ERK1/2 인산화에 RU486 투여 효과. 48 시간 금식 및 금식 동안 RU486 투여군에서 측뇌실핵의 pERK1/2 면역조직화학상을 검색하였다. **A.** 금식군, RU486 투여군 및 대조군 측뇌실핵의 pERK1/2 면역조직화학상. **B.** 각 실험군 측뇌실핵에서 pERK1/2의 양성 세포 염색 강도의 정량 분석. 금식 동안 RU486 투여가 측뇌실핵의 pERK1/2 수준에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. FC: 자유급식 대조군, FD/Veh: 48 시간 금식 대조군, FD/RU486: 48 시간 금식하는 동안 RU486 투여군. ** $p < 0.01$ vs. FC, *** $p < 0.001$ vs. FC. n=6.

3. NPY 뇌실 주사 효과.

가. 2 시간 동안의 사료 섭취량.

뇌실에 주입된 NPY의 생리적 활성을 검증하기 위해, NPY(5 μg/5 μℓ) 또는 vehicle을 랫트의 뇌실에 주사한 후 2 시간 동안의 사료 섭취량을 조사하였다. NPY 투여군의 사료 섭취량을 vehicle 투여 대조군과 비교하여 정량 분석한 결과 현저히 증가한 것을 알 수 있었다($p < 0.01$)(그림 5).

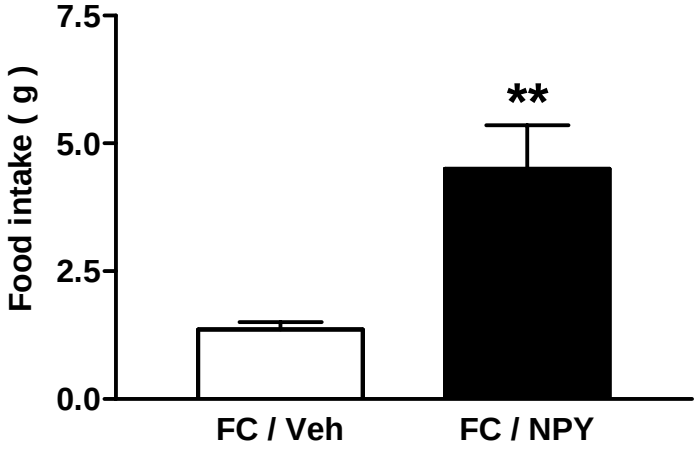


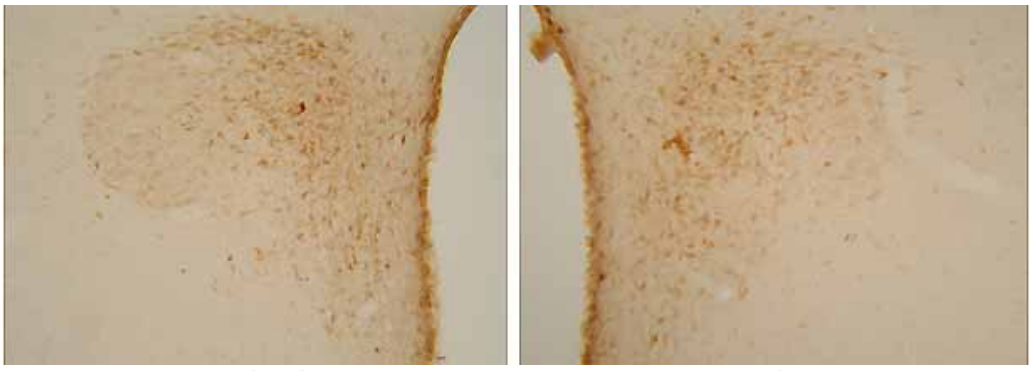
그림 5. NPY 뇌실 주사 후 2 시간 동안의 사료 섭취량. 생리염수에 녹인 NPY를 오전 9 시에 랫트의 뇌실에 미리 설치된 도관을 통해 5 μg/5 μℓ 용량으로 2 분 동안 micro injection한 후, 오전 11 시까지 2 시간 동안 섭취한 사료의 양을 측정하였다. 대조군에는 5 μℓ의 생리염수를 동일한 방법으로 투여하였다. NPY 투여군의 사료 섭취량이 대조군에 비해 현저히 증가되었다. FC/Veh: Vehicle 투여 대조군, FC/NPY: NPY 투여군. ** $p < 0.01$ vs. FC/Veh. n=7.

나. pERK1/2 면역조직 염색상.

NPY 뇌실 주사 2 시간 후 심장 관류법으로 뇌조직을 고정시켰고, 측

뇌실핵 조직 절편을 준비하여 pERK1/2 면역조직화학법을 수행하였다. NPY 투여 군의 측뇌실핵에서 pERK1/2 면역 염색상은 대조 군과 차이를 보이지 않는 것으로 관찰되었다(그림 6A). 각 군의 측뇌실핵에서 pERK1/2 양성 세포 염색 강도를 정량 분석한 결과 실험 군 간에 차이가 없는 것으로 나타났다(그림 6B).

A.



FC/ Veh FC / NPY

B.

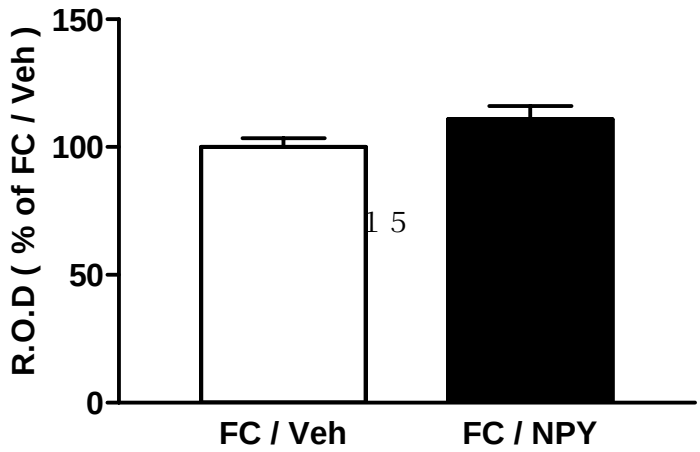


그림 6. NPY 뇌실 주사 후 측뇌실핵에서 pERK1/2의 면역조직화학상. NPY 뇌실 주사 2 시간 후, 측뇌실핵의 pERK1/2 면역조직화학상을 검색하였다. **A.** NPY 및 대조군 측뇌실핵의 pERK1/2 면역조직 염색상. **B.** 각 실험 군 측뇌실핵에서 pERK1/2 면역조직염색 강도의 정량 분석. NPY 뇌실 주사는 측뇌실핵의 pERK1/2 수준에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. FC/Veh: Vehicle 투여 대조군, FC/NPY: NPY 투여군. n=7.

4. 금식 동안 leptin 뇌실 주사 효과

가. pERK1/2 면역조직염색상

48 시간 금식 동안 하루에 한 번씩 12시간 간격으로 총 4회 leptin 투여 후 뇌실 주사 후 심장 관류법으로 뇌조직을 고정시켰고, 측뇌실핵의 pERK1/2 면역조직화학상을 관찰한 결과, 자유급식 대조군에 비해 48 시간 금식군에서 pERK1/2 면역염색 정도가 증가되었으며, 이러한 증가는 금식 동안 leptin 투여에 의해 억제된 것으로 보였다(그림 7A). 측뇌실핵의 pERK1/2 면역 양성 세포수를 정량 분석한 결과, 금식군에서 증가 하였고 ($p < 0.01$), leptin 투여군은 금식군에 비해 자유급식 대조군 수준으로 감소되었다($p < 0.01$). 이는 금식에 의해 증가된 pERK1/2 면역염색 정도가 leptin에 의해 억제 된 것이라고 사료되었다(그림 7B).

A.

B.

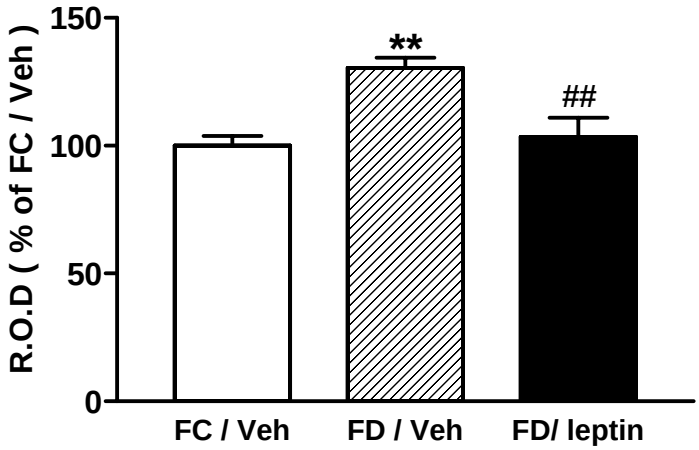


그림 7. 금식 및 leptin 주사 뇌실 후 측 뇌실 핵에서 pERK1/2의 면역조직화학상. 48 시간 금식 및 leptin 뇌실 주사 후 측뇌실핵에서 pERK1/2의 면역조직화학상을 검색하였다. **A.** 금식 대조군, leptin 투여군 및 대조군 측뇌실핵의 pERK1/2 면역조직 염색상. **B.** 각 실험 군 측뇌실핵에서 pERK1/2 면역조직염색 강도의 정량 분석. FC/Veh: 자유급식 대조군, FD/Veh: 48 시간 금식 대조군, FD/leptin: 48 시간 금식하는 동안 leptin 투여군. ** $p < 0.01$ vs. FC/Veh, # # $p < 0.01$ vs. FD/Veh. n=6

나. NPY 발현

(1) 측뇌실핵에서 NPY 면역조직화학염색상

48 시간 금식 동안 하루에 한 번씩 12시간 간격으로 총 4회 leptin 뇌실 주사 후 심장 관류법으로 뇌조직을 고정시켰고, 측뇌실핵의 NPY 면역조직화학상을 관찰한 결과, 자유급식 대조군에 비해 48 시간 금식군에서 NPY 면역염색 정도가 증가되었으며, 이러한 증가는 금식 동안 leptin 투여에 의해 억제된 것으로 보였다(그림 8A). 측뇌실핵의 NPY 면역 양성 세포수를 정량 분석한 결과, 금식군에서 증가 하였고($p < 0.05$), leptin 투여군

은 금식군에 비해 자유급식 대조군 수준으로 감소되었다($p < 0.01$). 이는 금식에 의해 증가된 NPY 발현 증가가 leptin에 의해 억제 된 것이라고 사료되었다(그림 8B).

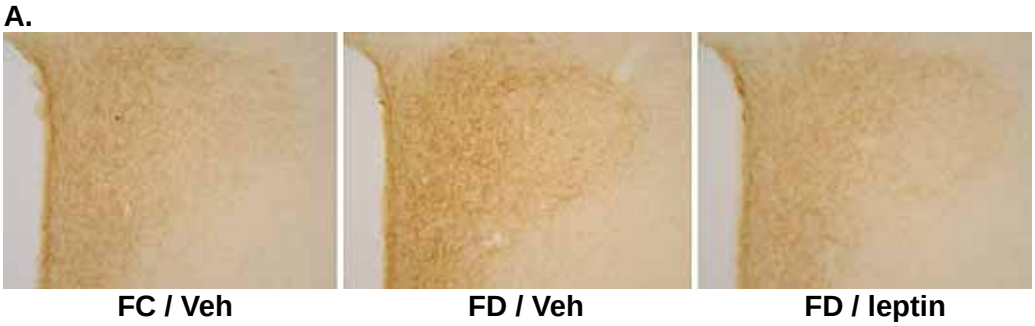


그림 8. 금식 및 leptin 주사 뇌실 후 측뇌실핵에서 NPY의 면역조직화학상. 48 시간 금식 및 leptin 뇌실 주사 후 측뇌실핵에

서 NPY의 면역조직화학상을 검색하였다. A. 금식 대조군, leptin 투여군 및 대조군 측뇌실핵의 NPY 면역조직 염색상. B. 각 실험군 측뇌실핵에서 NPY 면역조직염색 강도의 정량 분석. FC/Veh: 자유급식 대조군, FD/Veh: 48 시간 금식 대조군, FD/leptin: 48 시간 금식하는 동안 leptin 투여군. * $p < 0.05$ vs. FC/Veh, # # $p < 0.01$ vs. FD/Veh. n=6

(2) 궁상핵에서 NPY mRNA 발현

48 시간 금식 동안 하루에 한 번씩 leptin 뇌실 주사 후 심장 관류법으로 뇌조직을 고정시켰고, 궁상핵의 NPY mRNA 수준을 관찰한 결과, 자유급식 대조군에 비해 48 시간 금식군에서 NPY mRNA 발현이 증가되었으며, 이러한 증가는 금식 동안 leptin 투여에 의해 억제된 것으로 보였다(그림 9A). 궁상핵의 NPY의 autoradioactivity를 정량 분석한 결과, 금식군에서 증가 하였고($p < 0.001$), leptin 투여군은 금식군에 비해 자유급식 대조군 수준으로 감소되었다($p < 0.001$). 이는 금식에 의해 증가된 NPY mRNA 발현 증가가 leptin에 의해 억제 된 것이라고 사료되었다(그림 9B).

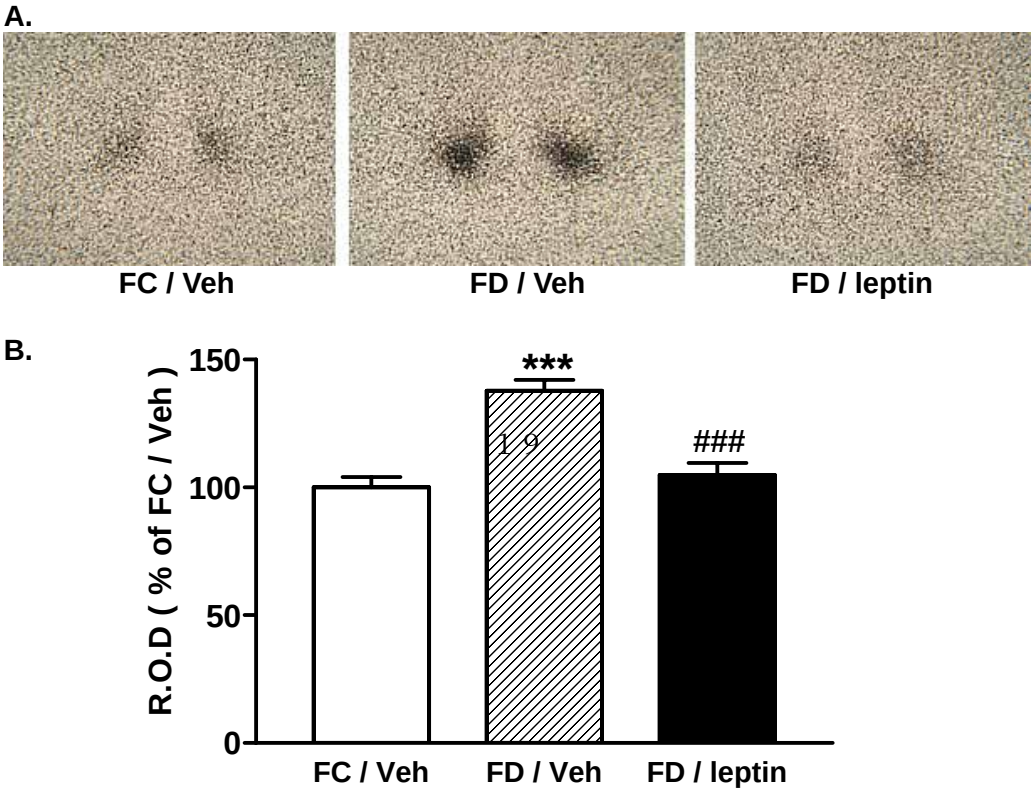


그림 9. 금식 및 leptin 뇌실 주사 후 궁상핵에서 NPY mRNA 발현. 48 시간 금식 및 leptin 뇌실 주사 후 궁상핵에서 NPY mRNA의 발현을 검색하였다 **A**. 금식 대조군, leptin 투여군 및 대조군 궁상핵의 NPY mRNA 발현. **B**. 각 실험 군 궁상핵에서 NPY mRNA 발현 강도의 정량 분석. FC/Veh: 자유급식 대조군, FD/Veh: 48 시간 금식 대조군, FD/leptin: 48 시간 금식하는 동안 leptin 투여군. *** $p < 0.001$ vs. FC/Veh, ### $p < 0.001$ vs. FD/Veh. n=6

Ⅶ. 고 찰

스트레스 대응축인 시상하부-뇌하수체-부신축(HPA axis) 활성화의 최종산물인 당질코르티코이드(랫트의 경우 코르티코스테론)는 부신피질에서 합성되어 혈중으로 분비되는 스테로이드계 호르몬으로, 혈중 코르티코스테론 수준은 스트레스 반응의 지표가 되기도 한다.[44] 코르티코스테론은 중추신경계와 말초신경계에 모두 영향을 미치며, 신체의 에너지 균형 및 항상성 유지에 기여한다.[61,62] 랫트의 경우 금식 동안 혈중 코르티코스테론 수준은 현저히 증가하며, 재 급식 후 단 시간 내에 급격히 감소 되는 것으로 보고되었다.[4-6,44] 이전의 연구에서, 금식 및 재 급식과 같은 섭식 상황 변화에 따른 측뇌실핵에서의 nNOS 발현 조절 기전에는 CREB 인산화가 수반될 것이며, 이 조절 경로에서 혈장 코르티코스테론이 억제 인자로서 관련될 것이라고 보고된 바 있으나 코르티코스테론에 의한 CREB 인산화 억제 기전이 명확하게 밝혀지지 않았다.[23-25] 세포주를 이용한 실험에서, MAP Kinase 신호 전달계의 조절분자인 ERK1/2의 인산화가 당질 코르티코이드에 의해 억제 됨으로써 그 하위 조절분자인 CREB의 인산화가 억제 될 것이라 보고된 바 있다.[26] 본 실험에서, 랫트 뇌의 측뇌실핵에서 pCREB과 pERK1/2의 co-localization을 조사한 결과, 측뇌실핵의 세포들 중 일부가 pERK1/2 와 pCREB 항체에 동시에 반응을 하는 것으로 나타났으며, pERK1/2와 pCREB를 모두 함유하고 있는 세포들은 대개가 소핵세포부(parvocellular subdivision)에서 발견되었다. 측뇌실핵의 소핵세포부에는 당질 코르티코이드 수용체가 풍부하게 분포되어 있는 것으로 보고 되었으므로,[9,44,61,62,68-70] 이러한 결과는 섭식 상황 변화에 따른 측뇌실핵에서

CREB 인산화 수준 변화가 혈장 당질 코르티코이드에 의한 ERK1/2 인산화 수준 조절을 통해 이루어질 가능성을 시사하였다. 또한, 세포주를 이용한 실험에서 합성 당질 코르티코이드인 dexamethasone을 처리 시 세포내의 ERK1/2 인산화 수준이 감소되며 이 때 MAP Kinase Phosphatase-1(MAPKP-1)의 발현은 증가된다고 보고 된 바 있다.[16-22,28] 이상의 보고들을 종합하여 볼 때, 랫트의 경우 금식 동안 증가된 혈장 당질 코르티코이드가 측뇌실핵에서 MAPKP-1 유전자 발현을 유도함으로써 ERK1/2 인산화 수준을 감소시키고 이어서 CREB 인산화 수준의 감소가 수반될 것이라 짐작하게 되었다. 그러나, 본 연구에서 MAPKP-1 항체에 반응하는 측뇌실핵의 세포들은 거대 세포부에서만 발견 되었다. 측뇌실핵의 거대세포부에는 소핵세포부와는 달리 당질 코르티코이드 수용체가 거의 발견되지 않는 것으로 보고되었다.[44,61,62] 더욱이, 금식 동안 랫트의 측뇌실핵에서 ERK1/2 인산화 수준은 생쥐의 경우에서 보고된 바와 같이[29] 오히려 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 결과들은 금식 동안 랫트의 측뇌실핵에서 혈장 당질 코르티코이드에 의한 CREB 인산화 감소 조절 기전에는 MAPKP-1 유전자 발현의 증가 및 ERK1/2 인산화 수준 변화는 관여되지 않을 것이라 짐작하게 하였다.

측뇌실핵 조직의 western blot 분석에서, pERK1/2 및 MAPKP-1 수준은 코르티코스테론 투여에 의해 증가하지 않았으며, 당질 코르티코이드 수용체의 길항제인 RU486은 금식에 의한 pERK1/2 수준 증가를 봉쇄하지 못한 것으로 나타났다. 이러한 결과는 랫트의 측뇌실핵에서 금식 동안 관찰되는 pERK1/2 수준 증가에 혈장 코르티코스테론이 관여하지 않을 것임을 뒷받침하는 것으로 사료되었다.

NPY 및 leptin은 섭식, 몸무게 및 에너지 균형을 조절하는 중요한 인자로 잘 알려져 있다.[45-47,61,62,64] NPY는 중추신경계에서 강력한 섭식 촉진 작용을 나타내는 펩타이드로 HPA axis를 자극하며, 에너지 소비를 증가시키는 인자로 알려져 있다.[30,64] NPY는 궁상핵에서 합성 및 분비되며, 측뇌실핵, 배측뇌측핵(DMN), 복내측핵(VMN)으로 그 신경 말단이 뻗어 있으며 특히, 측뇌실핵으로 분비된 NPY는 섭식 행동조절에 직접 관여하는 것으로 알려져 있다.[38,39,64-66,76] 금식 동안 궁상핵에서 NPY의 유전자 발현은 현저히 증가되며, 측뇌실핵으로 NPY의 분비량도 증가하는 것으로 보고되었다.[32,33,37,48-50] Leptin은 지방조직에서 합성 및 분비되는 섭식억제 호르몬으로서, 시상하부에서 섭식 조절분자들의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다.[30,46-49,71] Leptin은 궁상핵에서 NPY의 유전자 발현을 억제하며, 금식 동안 혈중 leptin 농도는 감소되는 것으로 보고되고 있다.[51,59,60,72,73] Leptin의 작용은 대부분 중추신경계에 분포하고 있는 leptin 수용체를 통하여 일어나며, 활성이 큰 수용체들은 주로 시상하부의 궁상핵, 배내측핵, 복내측핵 그리고 측뇌실핵에 분포되는 것으로 보고되었다.[58,67,74,75,77-85] 세포주를 이용한 실험에서, NPY 및 leptin이 세포내의 ERK1/2 인산화 수준을 조절한다고 보고된 바 있다.[40-43,54-57,74,75] 따라서 본 실험에서는, 랫트의 측뇌실핵

에서 금식 동안 관찰되는 ERK1/2 인산화 수준 증가에 NPY 및 leptin이 관여하는지 조사하였다. NPY를 랫트의 뇌실에 주사하고 2 시간 후 측뇌실핵에서 pERK1/2 수준을 면역조직화학법으로 검색한 결과, 측뇌실핵에서 pERK1/2 수준은 NPY 투여에 의해 증가하지 않는 것으로 나타났다. NPY 투여 군에서 섭식량은 대조군에 비해 현저히 증가한 것으로 보아, 본 연구에서 뇌실에 투여된 NPY가 측뇌실핵 신경세포들을 활성화시켰다는 사실은 짐작할 수 있었다. 이러한 결과로부터, NPY에 의한 측뇌실핵 세포들의 활성화에는 ERK1/2의 인산화가 수반되지 않을 것이라 사료되었다. 한편, 금식 동안 뇌실에 주사된 leptin은 궁상핵 및 측뇌실핵에서 금식에 의한 NPY 증가뿐만 아니라 측뇌실핵에서 pERK1/2 수준 증가도 효과적으로 봉쇄한 것을 알 수 있었다. 이 결과는 금식 동안 혈중 leptin 농도의 감소와 측뇌실핵에서 ERK1/2의 인산화 수준 증가 사이의 연관성을 시사하였다. 한편, 금식 동안 leptin 뇌실 주사가 pERK1/2 수준뿐만 아니라 궁상핵에서 NPY 유전자 발현 증가까지도 봉쇄하였으므로, 측뇌실핵에서 ERK1/2 인산화 억제가 leptin에 의한 NPY유전자 발현 억제를 통해 이루어졌을 것으로 짐작할 수도 있다. 그러나, NPY 뇌실 주사가 측뇌실핵에서 ERK1/2 인산화에 영향을 미치지 못한 사실은 이러한 가능성을 희석시킨다. 즉, leptin에 의한 측뇌실핵에서의 ERK1/2 인산화 조절 기전에 NPY가 개입될 가능성은 낮으며, 측뇌실핵 신경세포들에 분포된 leptin 수용체를 통한 조절 기전의 가능성을 짐작할 수 있다.

Ⅴ. 결 론

1. 랫트의 측뇌실핵에서 MAPKP-1 면역양성세포는 거대세포부에서만 관찰되었다.

2. 랫트의 시상하부에서 MAPKP-1 및 pERK1/2 수준은 코르티코스테론 투여에 의해 변화되지 않았으며, 당질코르티코이드 수용체 길항제인 RU486은 금식에 의한 측뇌실핵 ERK1/2 인산화 증가를 봉쇄하는데 실패하였다.

3. NPY 뇌실 투여는 섭식량을 현저히 증가 시켰으나, 측뇌실핵에서 ERK1/2 인산화에는 영향을 미치지 못했다.

4. 금식 동안 leptin을 뇌실에 투여한 결과, 금식에 의한 궁상핵 및 측뇌실핵에서 NPY 증가가 관찰되지 않았으며, ERK1/2 인산화 증가도 효과적으로 봉쇄되었다.

이상의 결과로부터, 랫트의 측뇌실핵에서 ERK1/2 인산화 수준 조절에는 혈장 leptin 수준 변화가 관련될 것이며, 혈장 당질 코르티코이드 및 시상하부의 NPY는 그 조절 기전에 관여되지 않을 것으로 사료되었다.

참고문헌

1. 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(2):183 - 188.

2. Mitome M. The central mechanism of feeding - associated circadian corticosterone rhythm in rats: analyses of paraventricular noradrenaline by in vivo microdialysis. Hokkaido Igaku Zasshi 1994;69(1):120 - 135.

3. VanNess JM, Casto RM, DeMaria JE, Overton JM. Food restriction attenuates the blood pressure response to paraventricular hypothalamic nuclei lesions in aortic coarctation hypertension. Brain Res 1998;792(2):237 - 245.

4. Kubasik - Juraniec J, Kmiec Z, Tukaj C, Rudzinska - Kisiel T, Kotlarz G, Pokrywka L, Mysliwski A. The effect of fasting and refeeding on the ultrastructure of the hypothalamic paraventricular nucleus in young and old rats. Folia Morphol (Warsz) 2004;63(1):25 - 35.

5. Kiss A, Jezova D, Aguilera G. Activity of the hypothalamic pituitary adrenal axis and sympathoadrenal system during food and water deprivation in the rat. Brain Res 1994;663(1):84 - 92.

6. Sebaai N, Lesage J, Vieau D, Alaoui A, Dupouy JP, Deloof S. Altered control of the hypothalamo - pituitary - adrenal axis in adult male rats exposed perinatally to food deprivation and/or dehydration. Neuroendocrinology 2002;76(4):243 - 253.

7. Rivier C. Role of nitric oxide in regulating the rat hypothalamic - pituitary - adrenal axis response to endotoxemia. Ann N Y Acad Sci 2003;992:72 - 85.

8. Nelson RJ, Kriegsfeld LJ, Dawson VL, Dawson TM. Effects of nitric oxide on neuroendocrine function and behavior. Front Neuroendocrinol 1997;18(4):463 - 491

9. van Rossum EF, Lamberts SW. Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and their associations with metabolic parameters and body composition. Recent Prog Horm Res 2004;59:333 - 357.

10. 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.

11. Uribe RM, Lee S, Rivier C. Endotoxin stimulates nitric oxide production in the paraventricular nucleus of the hypothalamus through nitric oxide synthase I: correlation with hypothalamic - pituitary - adrenal axis activation. Endocrinology 1999;140(12):5971 - 5981.
12. 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(6):417 - 425.

13. Lee JY, Lee JH, Kim DG, Jahng JW. Dexamethasone blocks the refeeding - induced phosphorylation of cAMP response element - binding protein in the rat hypothalamus. Neurosci Lett 2003;26;344(2):107 - 111.

14. Legradi G, Holzer D, Kapcala LP, Lechan RM. Glucocorticoids inhibit stress - induced phosphorylation of CREB in corticotropin - releasing hormone neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. Neuroendocrinology 1997;66(2):86 - 97.

15. Eberhardt W, Engels C, Muller R, Pfeilschifter J. Mechanisms of dexamethasone - mediated inhibition of cAMP - induced tPA expression in rat mesangial cells. Kidney Int 2002;62(3):809 - 821.

16. Sgambato V, Pages C, Rogard M, Besson MJ, Caboche J. Extracellular signal - regulated kinase (ERK) controls immediate early gene induction on corticostriatal stimulation. J Neurosci 1998;18(21):8814 - 8825.

17. Engelbrecht Y, de Wet H, Horsch K, Langeveldt CR, Hough FS, Hulley PA. Glucocorticoids induce rapid up - regulation of mitogen - activated protein kinase phosphatase - 1 and dephosphorylation of extracellular signal - regulated kinase and impair proliferation in human and mouse osteoblast cell lines. Endocrinology 2003;144(2):412 - 422.

18. Clark AR.MAP kinase phosphatase 1: a novel mediator of biological

effects of glucocorticoids? J Endocrinol 2003;178(1):5 - 12.

19. Kassel O, Sancono A, Kratzschmar J, Kreft B, Stassen M, Cato AC. Glucocorticoids inhibit MAP kinase via increased expression and decreased degradation of MKP - 1. EMBO J 2001;20(24):7108 - 7116.

20. Johnson GL, Lapadat R. Mitogen - activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. Science 2002;298(5600):1911 - 1912.

21. Lasa M, Abraham SM, Boucheron C, Saklatvala J, Clark AR. Dexamethasone causes sustained expression of mitogen - activated protein kinase (MAPK) phosphatase 1 and phosphatase - mediated inhibition of MAPK p38. Mol Cell Biol. 2002;22(22):7802 - 7811.

22. Imasato A, Desbois - Mouthon C, Han J, Kai H, Cato AC, Akira S, Li JD. Inhibition of p38 MAPK by glucocorticoids via induction of MAPK phosphatase - 1 enhances nontypeable Haemophilus influenzae - induced expression of toll - like receptor 2. J Biol Chem 2002;277(49):47444 - 47450.

23. Pozzi L, Hakansson K, Usiello A, Borgkvist A, Lindskog M, Greengard P, Fisone G. Opposite regulation by typical and atypical anti - psychotics of ERK1/2, CREB and Elk - 1 phosphorylation in mouse dorsal striatum. J Neurochem 2003;86(2):451 - 459.

24. Wang Z, Zhang B, Wang M, Carr BI. Persistent ERK phosphorylation negatively regulates cAMP response element - binding protein (CREB) activity via recruitment of CREB - binding protein to pp90RSK. J Biol Chem 2003;278(13):11138 - 11144.

25. Zhang JJ, Okutani F, Inoue S, Kaba H. Activation of the mitogen - activated protein kinase/extracellular signal - regulated kinase signaling pathway leading to cyclic AMP response element - binding protein phosphorylation is required for the long - term facilitation process of aversive olfactory learning in young rats. Neuroscience 2003;121(1):9 - 16.

26. Son GH, Geum D, Jung H, Kim K. Glucocorticoid inhibits growth factor - induced differentiation of hippocampal progenitor HiB5 cells. J

Neurochem 2001;79(5):1013 - 1021.

27. Sutton GM, Patterson LM, Berthoud HR. Extracellular signal - regulated kinase 1/2 signaling pathway in solitary nucleus mediates cholecystokinin - induced suppression of food intake in rats. J Neurosci 2004;24(45):10240 - 10247.

28. Jeong HJ, Na HJ, Hong SH, Kim HM. Inhibition of the stem cell factor - induced migration of mast cells by dexamethasone. Endocrinology 2003;144(9):4080 - 4086.

29. Morikawa Y, Ueyama E, Senba E. Fasting - induced activation of mitogen - activated protein kinases (ERK/p38) in the mouse hypothalamus. J Neuroendocrinol 2004;16(2):105 - 112.

30. Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. Nature 2000;404(6778) :661 - 671.

31. Savontaus E, Conwell IM, Wardlaw SL. Effects of adrenalectomy on AGRP, POMC, NPY and CART gene expression in the basal hypothalamus of fed and fasted rats. Brain Res 2002;958(1):130 - 138.

32. Mizuno TM, Makimura H, Silverstein J, Roberts JL, Lopingco T, Mobbs CV. Fasting regulates hypothalamic neuropeptide Y, agouti - related peptide, and proopiomelanocortin in diabetic mice independent of changes in leptin or insulin. Endocrinology 1999;140(10):4551 - 4557.

33. Currie PJ. Integration of hypothalamic feeding and metabolic signals: focus on neuropeptide Y. Appetite. 2003;41(3):335 - 337.

34. Billington CJ, Briggs JE, Grace M, Levine AS. Effects of intracerebroventricular injection of neuropeptide Y on energy metabolism. Am J Physiol 1991;260(2 Pt 2):321 - 327.

35. Catzeflis C, Pierroz DD, Rohner - Jeanrenaud F, Rivier JE, Sizonenko PC, Aubert ML. Neuropeptide Y administered chronically into the lateral ventricle profoundly inhibits both the gonadotropic and the somatotropic axis in intact adult female rats. Endocrinology

1993;132(1):224 - 234.

36. Raposinho PD, Pierroz DD, Broqua P, White RB, Pedrazzini T, Aubert ML. Chronic administration of neuropeptide Y into the lateral ventricle of C57BL/6J male mice produces an obesity syndrome including hyperphagia, hyperleptinemia, insulin resistance, and hypogonadism. Mol Cell Endocrinol 2001;185(1 - 2):195 - 204.

37. Sahu A, Kalra PS, Kalra SP. Food deprivation and ingestion induce reciprocal changes in neuropeptide Y concentrations in the paraventricular nucleus. Peptides 1988;9(1):83 - 86.

38. Sindelar DK, Ste Marie L, Miura GI, Palmiter RD, McMinn JE, Morton GJ, Schwartz MW. Neuropeptide Y is required for hyperphagic feeding in response to neuroglucopenia. Endocrinology 2004;145(7):3363 - 3368.

39. Jain MR, Dube MG, Kalra SP, Kalra PS. Neuropeptide Y release in the paraventricular nucleus is decreased during transient hyperphagia induced by microinjection of colchicine into the ventromedial nucleus of rats. Neurosci Lett 1998;256(1):21 - 24.

40. Cho YR, Kim CW. Neuropeptide Y promotes beta - cell replication via extracellular signal - regulated kinase activation. Biochem Biophys Res Commun 2004;314(3):773 - 780.

41 Mullins DE, Zhang X, Hawes BE. Activation of extracellular signal regulated protein kinase by neuropeptide Y and pancreatic polypeptide in CHO cells expressing the NPY Y(1), Y(2), Y(4) and Y(5) receptor subtypes. Regul Pept 2002;105(1):65 - 73.

42. Barnea A, Roberts J. Induction of functional and morphological expression of neuropeptide Y (NPY) in cortical cultures by brain - derived neurotrophic factor (BDNF): evidence for a requirement for extracellular - regulated kinase (ERK) - dependent and ERK - independent mechanisms. Brain Res 2001;919(1):57 - 69.

43. Keffel S, Schmidt M, Bischoff A, Michel MC. Neuropeptide - Y stimulation of extracellular signal - regulated kinases in human erythroleukemia cells. J Pharmacol Exp Ther 1999;291(3):1172 - 1178.

44. Makimura H, Mizuno TM, Isoda F, Beasley J, Silverstein JH, Mobbs CV. Role of glucocorticoids in mediating effects of fasting and diabetes on hypothalamic gene expression. BMC Physiol 2003;3(1):5.

45. Schwartz GJ, Moran TH. Leptin and neuropeptide y have opposing modulatory effects on nucleus of the solitary tract neurophysiological responses to gastric loads: implications for the control of food intake. Endocrinology 2002;143(10):3779 - 3384.

46. Ahima RS, Osei SY. Leptin signaling. Physiol Behav 2004;81(2): 223 - 241.

47. Sahu A. Leptin signaling in the hypothalamus: emphasis on energy homeostasis and leptin resistance. Front Neuroendocrinol 2003;24(4):225 - 253.

48. Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos - Flier E, Flier JS. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. Nature 1996;382(6588):250 - 252.

49. Inui A. Feeding and body - weight regulation by hypothalamic neuropeptides - mediation of the actions of leptin. Trends Neurosci. 1999;22(2):62 - 67.

50. Li H, Matheny M, Tumer N, Scarpace PJ. Aging and fasting regulation of leptin and hypothalamic neuropeptide Y gene expression. Am J Physiol 1998;275(3 Pt 1):405 - 411.

51. Korner J, Savontaus E, Chua SC Jr, Leibel RL, Wardlaw SL. Leptin regulation of Agrp and Npy mRNA in the rat hypothalamus. J Neuroendocrinol 2001;13(11):959 - 966.

52. Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P, Baskin DG. Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. J Clin Invest 1996;98(5):1101 - 1106.

53. Isse T, Ueta Y, Serino R, Noguchi J, Yamamoto Y, Nomura M, 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 Res

1999;846(2):229 - 235.

54. O'Rourke L, Shepherd PR. Biphasic regulation of extracellular - signal - regulated protein kinase by leptin in macrophages: role in regulating STAT3 Ser727 phosphorylation and DNA binding. Biochem J 2002;364(Pt 3):875 - 879.

55. Goetze S et al. Leptin induces endothelial cell migration through Akt, which is inhibited by PPARgamma - ligands. Hypertension 2002;40(5):748 - 754

56. Saxena NK, Titus MA, Ding X, Floyd J, Srinivasan S, Sitaraman SV, Anania FA. Leptin as a novel profibrogenic cytokine in hepatic stellate cells: mitogenesis and inhibition of apoptosis mediated by extracellular regulated kinase (Erk) and Akt phosphorylation. FASEB J 2004;18(13):1612 - 1614.

57. Zayzafoon M, Gathings WE, McDonald JM. Modeled microgravity inhibits osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells and increases adipogenesis. Endocrinology 2004;145(5):2421 - 2432.

58. Banks AS, Davis SM, Bates SH, Myers MG Jr. Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. J Biol Chem 2000;275(19):14563 - 14572.

59. Shih CD, Au LC, Chan JY. Differential role of leptin receptors at the hypothalamic paraventricular nucleus in tonic regulation of food intake and cardiovascular functions. J Biomed Sci 2003;10(4):367 - 378.

60. Ur E, Wilkinson DA, Morash BA, Wilkinson M. Leptin immunoreactivity is localized to neurons in rat brain. Neuroendocrinology 2002;75(4):264 - 272.

61. Makino S, Smith MA, Gold PW. Regulatory role of glucocorticoids and glucocorticoid receptor mRNA levels on tyrosine hydroxylase gene expression in the locus coeruleus during repeated immobilization stress. Brain Res 2002;943(2):216 - 223.

62. Roy A, Mittal N, Zhang H, Pandey SC. Modulation of cellular expression of glucocorticoid receptor and glucocorticoid response

element - DNA binding in rat brain during alcohol drinking and withdrawal. J Pharmacol Exp Ther 2002;301(2):774 - 784.

63. Paxinos G, Watson CR. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 2nd ed. San Diego(CA):Academic Press;1982

64. Hillebrand JJ, de Wied D, Adan RA. Neuropeptides, food intake and body weight regulation: a hypothalamic focus. Peptides 2002;23(12): 2283 - 2306.

65. Stanley BG, Kyrkouli SE, Lampert S, Leibowitz SF. Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. Peptides 1986;7(6):1189 - 1192.

66. Billington CJ, Briggs JE, Levine AS. Effects of intracerebroventricular injection of neuropeptide Y on energy metabolism. Am J Phy Reg Int Com Phy 1991;260(2):321 - 327

67. Baskin DG, Seeley RJ, Kuijper JL, Lok S, Weigle DS, Erickson JC, Palmiter RD, Schwartz MW. Increased expression of mRNA for the long form of the leptin receptor in the hypothalamus is associated with leptin hypersensitivity and fasting. Diabetes 1998;47(4):538 - 543.

68. Aronsson M, Fuxe K, Dong Y, Agnati LF, Okret S, Gustafsson JA. Localization of glucocorticoid receptor mRNA in the male rat brain by in situ hybridization. Proc Natl Acad Sci USA 1988;85(23):9331 - 9335.

69. Liposits Z, Uht RM, Harrison RW, Gibbs FP, Paull WK, Bohn MC. Ultrastructural localization of glucocorticoid receptor (GR) in hypothalamic paraventricular neurons synthesizing corticotropin releasing factor (CRF). Histochemistry 1987;87(5):407 - 412

70. Uht RM, McKelvy JF, Harrison RW, Bohn MC. Demonstration of glucocorticoid receptor - like immunoreactivity in glucocorticoid - sensitive vasopressin and corticotropin - releasing factor neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. J Neurosci Res 1988;19(4):405 - 411, 468 - 469.

71. Glaum SR, Hara M, Bindokas VP, Lee CC, Polonsky KS, Bell GI, Miller RJ. Leptin, the obese gene product, rapidly modulates synaptic

transmission in the hypothalamus. Mol Pharmacol 1996;50(2):230 - 235.

72. Elmquist JK, Elias CF, Saper CB. From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. Neuron 1999;22(2):221 - 232.

73. Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos - Flier E, Flier JS. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. Nature 1996;382(6588):250 - 252.

74. Bjorbaek C, Buchholz RM, Davis SM, Bates SH, Pierroz DD, Gu H, Neel BG, Myers MG Jr, Flier JS. Divergent roles of SHP - 2 in ERK activation by leptin receptors. J Biol Chem 2001;276(7):4747 - 4755.

75. Ghilardi N, Ziegler S, Wiestner A, Stoffel R, Heim MH, Skoda RC. Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93(13):6231 - 6235.

76. Naveilhan P, Hassani H, Canals JM, Ekstrand AJ, Larefalk A, Chhajlani V, Arenas E, Gedda K, Svensson L, Thoren P, Ernfors P. Normal feeding behavior, body weight and leptin response require the neuropeptide Y Y2 receptor. Nat Med 1999;5(10):1188 - 1193.

77. Elmquist JK. Hypothalamic pathways underlying the endocrine, autonomic, and behavioral effects of leptin. Int J Obes Relat Metab Disord 2001;25(5):78 - 82.

78. Porte D Jr, Baskin DG, Schwartz MW. Leptin and insulin action in the central nervous system. Nutr Rev 2002;60(10 Pt 2):20 - 29

79. Van Dijk G, Donahey JC, Thiele TE, Scheurink AJ, Steffens AB, Wilkinson CW, Tenenbaum R, Campfield LA, Burn P, Seeley RJ, Woods SC. Central leptin stimulates corticosterone secretion at the onset of the dark phase. Diabetes 1997;46(11):1911 - 1914.

80. Barash IA, Cheung CC, Weigle DS, Ren H, Kabigting EB, Kuijper JL, Clifton DK, Steiner RA. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. Endocrinology 1996;137(7):3144 - 3147.

81. Cheung CC, Thornton JE, Kuijper JL, Weigle DS, Clifton DK, Steiner RA. Leptin is a metabolic gate for the onset of puberty in the female rat. Endocrinology 1997;138(2):855 - 858.

82. Clement K, Vaisse C, Lahlou N, Cabrol S, Pelloux V, Cassuto D, Gourmelen M, Dina C, Chambaz J, Lacorte JM, Basdevant A, Bougneres P, Lebouc Y, Froguel P, Guy - Grand B. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. Nature 1998;392(6674):398 - 401.

83. Mercer JG, Hoggard N, Williams LM, Lawrence CB, Hannah LT, Trayhurn P. Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob - Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. FEBS Lett 1996;387(2 - 3):113 - 116.
84. Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ, Lakey ND, Culpepper J, Moore KJ, Breitbart RE, Duyk GM, Tepper RI, Morgenstern JP. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. Cell 1996;84(3):491 - 495.

85. Baskin DG, Breininger JF, Bonigut S, Miller MA. Leptin binding in the arcuate nucleus is increased during fasting. Brain Res 1999;828(1 - 2):154 - 158.

Abstract

Feeding related extracellular signal - regulated kinase1/2 phosphorylation in the rat paraventricular nucleus

Mi Joo Cha

Department of Medical Science

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Jeong Won Jahng)

Immunoreactivity of the activated form of extracellular signal regulated kinases1/2(pERK1/2) is markedly increased in the hypothalamic paraventricular nucleus(PVN) during food deprivation. NPY release to the PVN and plasma glucocorticoid level is increased, but plasma leptin level decreased, during food deprivation. *In vitro* studies have shown that NPY or leptin modulates cellular level of pERK1/2, and suggested that glucocorticoids may regulate pERK1/2 levels, via increasing gene expression of mitogen activated phosphatase kinase phosphatase-1(MAPKP-1). We examined if pERK1/2 levels in the rat PVN is modulated by corticosterone, NPY or leptin treatment. MAPKP-1 immuno-positive neurons were detected only in the magnocellular PVN, where existence of glucocorticoids receptors has been hardly reported. Corticosterone did not increase pERK1/2 in the PVN, and RU486 failed to inhibit fasting-induced increase of the PVN-pERK1/2. Intracerebroventricular NPY increased food intake, but not the PVN-pERK1/2 level. Fasting-induced increase of the PVN-pERK1/2 was blocked by leptin administration. These results suggest that the increase in pERK1/2 in the PVN during food deprivation may not be associated with increased NPY or plasma glucocorticoids. However, decrease in plasma leptin level appears to be required for fasting-induced increase of the PVN-pERK1/2.

Key Words: pERK1/2, MAPKP-1, NPY, Leptin, Corticosterone,

Food deprivation.