

불규칙 수면으로 인한 일주기 리듬의
교란이 성장기 쥐의 생체 말초 조직에
미치는 영향

연세대학교 대학원

의공학과

서 동 현

불규칙 수면으로 인한 일주기 리듬의
교란이 성장기 쥐의 생체 말초 조직에
미치는 영향

지도 김 한 성 교수

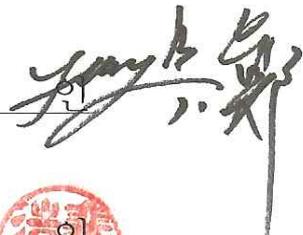
이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2010년 12월

연세대학교 대학원
의공학과
서 동 현

서동현의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 김한성 

심사위원 김병조 

심사위원 배기호 

연세대학교 대학원

2010년 12월

감 사 의 글

“결과의 좋고 나쁨 보다는 그 과정에 얼마나 충실하였는지가 더욱 중요하다”

- 서용원 -

기억도 잘 나지 않는 어린 시절 아버지께서 전해주신 가훈입니다. 이 짧은 문장하나를 기억하고 실천하기에는 너무 철없던 시절이 길었던 것 같습니다. 이제야 비로소 이 말씀을 다시 되새기며 조그마한 결과물을 얻게 되었습니다. 너무도 부족했던 저 혼자서는 이룰 수 없었던 꿈이기에 짧은 문장으로나마 하해와 같은 도움을 주신 분들께 감사의 인사를 드립니다.

어느 것 하나 제대로 갖추지 못하고 맨몸으로 찾아뵈음에도 열심히 하겠다는 각오하나만을 믿고 여기까지 믿고 가르쳐 주신 김한성 지도교수님, 철없는 학사생활 크나큰 절망의 시기에 한줄기 희망과 큰 가르침을 주신 윤영로 교수님, 석사졸업논문의 논문심사 위원직을 기꺼이 맡아 주시며 부족한 연구에 언제나 많은 관심과 가르침을 주신 배기호, 정병조 두 분 교수님. 교수님들께 정말 크게 감사드립니다.

아직까지도 어리고, 철없게 받을 줄만 아는 저를 위해 어떠한 고통과 노력을 감수하시며 끝없는 사랑을 주시는 우리 가족 분들. 할아버지, 할머니, 아버지, 어머니, 누님, 매형, 그리고 아껴주시는 많은 친지 분들께 말로 다할 수 없는 큰 감사를 드립니다. 언제까지나 건강하고 즐겁게 오래오래 함께 해주시기를 빌고 또 빌겠습니다.

언제나 함께 울고 웃는 연구실 생활의 동반자이며, 이곳 연구생활의 전부라고도 할 수 있는 우리 CABB 랩실 식구 분들. 창용이 형, 승관이 형, 태우, 영근이, 지형이, 치훈이, 영균이, 주형이, 영진이. 그리고 자랑스러운 졸업생 선배님들. 창수형, 대곤이형, 성식이형, 은정누님, 현호형, 원필이형, 범석이형, 현동이, 효선이, 선욱이.

특히 부족한 저를 힘겨우심에도 꺾이지 않고 끝어주신 창용 형과 모든 분들께 감사드립니다.

마지막으로 제 인생의 전환점이 되어준 사랑하는 아내 선영에게 언제나 믿고 지지해줘서 고맙고 사랑한다는 말을 전합니다.

그 외 미처 언급 드리지 못한 수많은 분들께 죄송한 마음과 함께 큰 감사의 인사를 드립니다.

이 많은 분들의 노고와 사랑은 앞으로 더욱 좋은 연구와 행복한 인생으로 보답하겠습니다. 정말 감사드리고, 사랑합니다.

2010 12월

서동현 올림

차 례

그림 차례	1
표 차례	3
국문 요약	4
제 1 장 서 론	5
제 2 장 생체 내 미세 단층 촬영 장치를 이용한 복부 지방 측정 방법 정립	8
2.1 서론	8
2.2 재료 및 방법	10
2.2.1 실험 동물 및 생체 내 미세 단층 촬영	10
2.2.2 복부 지방의 부피 및 면적 측정	11
2.2.3 통계적 분석	13
2.3 결과	14
2.3.1 몸무게 vs. 복부 지방 부피	14
2.3.2 복부 전체 지방 부피 vs. 복부 내장 지방 부피, 복부 전체 지방 부피 vs. 복부 피하 지방 부피	15
2.3.3 복부 전체 지방 부피 vs. 복부 전체 지방의 단면적	16
2.3.4 복부 내장 지방 부피 vs. 복부 내장 지방의 단면적	18
2.3.5 복부 피하 지방 부피 vs. 복부 피하 지방의 단면적	20
2.3.6 척추 부위 (L1~L6) vs. 복부 지방의 종류(복부 전체 지방, 복부 피하 지방, 복부 내장 지방) vs. 측정부위 (P, D, I)에 따른 단면적 비교	22
2.4 고찰	24
2.5 결론	27
제 3 장 일주기 리듬의 교란이 성장기 쥐의 지방 축적과 뼈에 미치는 영향 분석	28
3.1 서론	28
3.2 실험동물 준비 (불규칙 수면 유발 동물 모델)	29
3.3 생체 내 미세 단층촬영 장치	30

3.3.1 복부지방 촬영	30
3.3.2 정강뼈 촬영	30
3.4 복부 지방 평가	31
3.5 BMD 및 구조적 파라미터 분석	32
3.5.1 해면골과 피질골의 BMD	32
3.5.2 해면골의 구조적 파라미터	33
3.5.3 피질골의 구조적 파라미터	34
3.6 길이 및 성장판 분석	35
3.6.1 길이	35
3.6.2 성장판	36
3.7 통계 처리	37
제 4 장 결 과	38
4.1 몸무게 비교	39
4.2 복부 지방 비교	19
4.3 BMD 및 구조적 파라미터 비교	41
4.3.1 해면골의 BMD 및 구조적 파라미터	41
4.3.2 피질골의 BMD 및 구조적 파라미터	43
4.4 길이 및 성장판 비교	45
4.4.1 길이	45
4.4.2 성장판	46
제 5 장 고 찰 및 결 론	48
5.1 고찰	48
참고 문헌	51
영문 요약	54

그림 차례

그림 2.1 : 경계치 기법 (Threshold method)을 이용한 생체 조직 구분	11
그림 2.2 : 3차원으로 재구성한 복부 전체 지방의 영상과 각 부위별(Intermediate region) 2차원 단면 영상 (백색 : 복부 내장 지방, 황색 : 복부 피하 지방)	12
그림 2.3 : 무게와 복부 전체, 내장, 피하 지방 부피의 상관관계 (Total adipose : 복부 전체 지방, Visceral adipose : 복부 내장 지방, Subcutaneous adipose : 복부 피하 지방)	14
그림 2.4 : 복부 전체 지방 부피와 복부 내장, 피하 지방 부피의 상관 관계	15
그림 2.5 : 복부 전체 지방 부피와 복부 전체 지방의 부위별 단면적과의 상관관계 (A) L1, (B) L2, (C) L3, (D) L4, (E) L5, (F) L6	17
그림 2.6 : 복부 내장 지방 부피와 복부 내장 지방의 부위별 단면적과의 상관관계 (A) L1, (B) L2, (C) L3, (D) L4, (E) L5, (F) L6	19
그림 2.7 : 복부 피하 지방 부피와 복부 피하 지방의 부위별 단면적과의 상관관계 (A) L1, (B) L2, (C) L3, (D) L4, (E) L5, (F) L6	21
그림 2.8 : 복부 지방 단면적 (a: 복부 피하 지방 vs. 복부 내장 지방, b: 복부 피하 지방 vs. 복부 전체 지방)($p < 0.05$), (c: vs. L4의 복부 피하 지방, d: vs. L4의 복부 내장 지방, e: vs. L4의 복부 전체 지방, f: vs. L5의 복부 피하 지방, g: vs. L5의 복부 내장 지방, h: vs. L5의 복부 전체 지방)($p < 0.01$), (A) P, (B)I, (C)D	23
그림 3.1 : 생체 내 미세단층 촬영 장치	30
그림 3.2 : 해면골의 구조적 파라미터	33
그림 3.3 : 피질골의 구조적 파라미터	34
그림 3.4 : 정강이뼈의 길이 측정	35
그림 3.5 : 정강이뼈 성장판의 부피와 두께 측정	36
그림 4.1 : 6주간의 몸무게의 변화 (MEAN \pm SE, NS vs. NOR at 0-6 weeks, $p > 0.05$)	38

그림 4.2 : 6주간의 복부 지방 부피의 변화 (TV : 복부 전체 지방의 부피, VV : 복부 내장 지방의 부피, SV : 복부 피하 지방의 부피), (MEAN±SE, * : NS vs. NOR at 0-6 weeks, p<0.05)	39
그림 4.3 : 0주와 6주 후 복부 지방 부피의 변화 (황색 : 복부 피하 지방, 백색 : 복부 내장 지방)	40
그림 4.4 : 6주간의 해면골의 BMD 및 구조적 파라미터의 변화 (MEAN±SE, NS vs. NOR at 0-6 weeks, p>0.05)	42
그림 4.5 : 6주간의 피질골의 BMD 및 구조적 파라미터의 변화 (MEAN±SE, * : NS vs. NOR at 0-6 weeks, p<0.05)	43
그림 4.6 : 0주와 6주 후 피질골의 3차원 영상	44
그림 4.7 : 6주간의 정강뼈의 길이 변화 (MEAN±SE, NS vs. NOR at 0-6 weeks, p>0.05)	45
그림 4.8 : 6주간의 정강뼈 성장판의 변화 (MEAN±SE, * :NS vs. NOR at 0-6 weeks, p<0.05)	46
그림 4.9 : 0주와 6주 후 성장판 부피의 변화	47
그림 4.10 : 0주와 6주 후 성장판 두께의 변화	47

표 차례

표 2.1 : 몸무게와 복부 전체, 내장, 피하 지방 부피	14
표 2.2 : 각 요추뼈의 부위별 복부 전체 지방 면적 (Visceral : 복부 내장 지방, Subcutaneous, Total : 복부 전체 지방, : 복부 피하 지방), (L: lumbar vertebra, P : proximal region, I : intermediate region, D : distal region)	16
표 3.1 : LD phase의 조절 시간표 (L : Light(07:00~19:00), D : Dark(19:00~07:00))	29

국 문 요 약

불규칙 수면으로 인한 일주기 리듬의 교란이 성장기 쥐의 생체 말초 조직에 미치는 영향

본 연구에서는 129/SV 수컷 쥐 (5주령, 18.5 ~ 22.5 g)를 대상으로 빛의 조절을 통해 불규칙 수면을 모방하여 생체시계를 교란하였으며 이에 따른 쥐의 생체 말초 조직의 형태학적 특성의 변화를 평가하기 위해 정강뼈의 골밀도(bone mineral density, BMD)와 구조적 파라미터, 길이와 성장판의 부피와 두께 그리고 복부지방의 부피를 추적 관찰 하였다.

정강뼈의 경우 6주 후 피질골에서 불규칙 수면군(night-shift, NS)은 정상수면군(normal, NOR)보다 유의하게 작음을 확인하였으나($p < 0.05$), 해면골에서는 유의한 차이를 보이지 않았다($p > 0.05$). 또한 6주 후 NS의 성장판 부피와 두께가 모두 유의하게 작음을 확인하였으나($p < 0.05$), 길이는 유의한 차이를 보이지 않았다($p > 0.05$).

복부지방의 경우 6주 후 NOR군보다 NS군에서 복부 전체 지방과 내장 지방의 부피가 유의하게 증가하였다. 이로써 성장기의 쥐에서 불규칙 수면으로 인한 생체시계의 교란은 복부 내장 지방의 부피 증가에 영향을 미칠 수 있음을 확인하였다.

이를 통해 불규칙한 수면주기로 인한 생체시계의 교란은 성장기 피질골의 형태학적 특성과 성장, 복부지방의 축척에 영향을 미칠 수 있음을 확인하였다.

핵심되는 말 : 불규칙 수면, 일주기 리듬 교란, 성장기, 생체 말초조직, 생체 내 미세단층촬영 장치, 형태학적 특성, 구조적 특성, 복부 지방, 정강뼈, 성장판

제 1 장 서 론

지구는 자전과 공전에 의한 계절의 변화 및 낮과 밤의 변화 등 일정한 주기를 가지고 반복적으로 변화하는 환경이다. 이러한 지구 환경에 적응하기 위하여 지구상의 생명체들은 체내외의 환경적 단서에 반응하여 일정한 주기성을 가지며 진화해왔다. 이러한 대표적인 적응행동이 바로 생물학적 리듬(biological rhythms)이며, 이 생물학적 리듬이 생명체의 행동과 주변의 환경을 일치시키게 된다[1]. 이중 하루 24시간의 주기성을 가지는 생물학적 리듬을 일주기 리듬(circadian rhythm)이라고 하며, 일주기 리듬은 동, 식물의 수면 주기 및 생체 활동과 밀접한 연관이 있다[1]. 생체 내부에서 일주기 리듬을 조절하는 주요 기관은 뇌하수체 시상하부 복부측(ventral hypothalamus)에 위치하는 시신경 교차 상핵(Suprachiasmatic, SCN)이며 이를 통해 신경-내분비계 활동, 체온조절, 에너지 대사율, 수면-각성주기, 운동들 대부분의 생체 활동이 일주기 리듬에 따라 진행된다[2-5]. 이러한 일주기 리듬은 빛, 온도, 섭식 등의 외인성 요인(Zeitgeber)에 의해 조절되며 이중 가장 핵심적인 조절 기전은 빛이다. 빛은 망막을 통해 SCN으로 전달되며 생체 내 일주기 리듬의 조절에 크게 관여한다[2].

또한 인체 내 간, 신장, 심장 등 말초 조직에서도 각 조직별 국부리듬을 유지하고 조절하는 말초시계(peripheral clock)가 발견되었으며, 이는 SCN이 제거된 상태에서도 각 조직의 생체리듬을 조절하는 것으로 밝혀졌다[6]. SCN은 이러한 말초시계의 조절에 관여하며, 외부 빛에 민감하게 반응하여 생체시계 관련 유전자들을 재설정 시키는 중추시계(central clock)로써 기능한다[4,6]. 이러한 내인성, 외인성 요인들로 인해 인체는 낮과 밤 등 주위 환경에 적응하여 일주기 리듬을 조절하며 생활하게 된다[3-5].

하지만, 최근 교대근무나 과도한 학업 등으로 인하여 불규칙한 수면이 증가하는 추세이다[7,8]. 불규칙 수면은 수면의 질과 양을 감소시켜 실제로 수면 부족을 일으킬 뿐만 아니라, 일주기 리듬에 큰 혼란을 야기하게 된다[8]. 특히 장기적인 불규칙 수면은 일주기 리듬의 혼란을 가중시킨다[7,8]. 불규칙 수면에 의한 일주기 리듬의

교란으로 인하여 인체는 각종 생리학적, 내분비계 기능의 장애가 유발되어 업무의 비효율성은 물론 수면, 신경, 소화기관, 심혈관 장애를 일으키게 되고 평균 수명 또한 줄어들게 된다[7,8]. 특히 성장기 청소년의 경우 일주기 리듬의 교란은 학습 부진, 정서 장애를 유발하며 성장 억제, 청소년 비만 등의 성장 불균형 또한 유발할 수 있다[5].

이에 따라 불규칙한 수면으로 인한 일주기 리듬의 교란이 인체에 미치는 영향에 관한 연구들이 국내외적으로 진행되고 있다. 그 중 인체를 대상으로 하는 실험의 경우 많은 개체를 실험하기 어렵고, 장기간의 연구가 불가능하다[9]. 또한 엄격한 실험 환경의 제한이 어려움에 따라 불규칙한 수면 외에 빛, 섭식, 기상시간 등 다른 요인들에 의해 일주기 리듬의 변화가 발생할 수 있어 정확한 결과를 얻기가 힘들다[9]. 따라서 본 연구에서는 불규칙 수면을 유발하여 일주기 리듬을 교란하는 동물 실험 모델을 사용하여, 그 영향에 대한 정확한 결과를 얻고자 한다.

또한, 기존의 인체 혹은 동물 실험 모델을 사용한 연구를 통해 일주기 리듬의 교란으로 인한 수면의 질이나 생리학적, 내분비계의 평가, 혹은 동물의 행동학적 관찰을 통한 연구 등이 수행되었으나[7-9], 생체 말초 조직에 관한 정량적 표현형(phenotype)에 관한 연구는 부족한 실정이다.

생체 내 미세 단층 촬영 장치는 각 생체조직의 x-ray 흡수율의 차이에 따라 영상을 획득할 수 있다. 따라서 주변의 생체 조직에 비해 x-ray 흡수율의 차이가 큰 생체 내 경조직의 경우 조영제 없이 단층 영상을 획득할 수 있으며 특히 뼈는 가장 활발히 연구되고 있는 조직이며 다양한 평가 방법이 정립되고 있다[10,11]. 연조직의 경우 간이나 혈관과 같은 연조직들은 주변조직과 x-ray 흡수율의 차이가 적어 주변조직과의 구별을 위하여 조영제를 투여해야 한다[12]. 하지만 지방조직의 경우 주변조직 (뼈, 피부, 제지방 조직 등)과의 x-ray 흡수율의 차이가 커서 조영제 없이 단면영상을 획득할 수 있다. 이에 따라 지방조직의 정량적인 평가를 위한 방법으로 생체 내 미세 단층 촬영 장치를 이용한 방법이 제안되고 있다[13].

따라서 본 연구에서는 우선 생체 내 미세 단층 촬영 장치를 이용하여 복부지방의 축적을 평가하는 방법을 정립하며, 이를 이용하여 성장기의 수컷 쥐의 불규칙한 수면 유도로 인한 일주기 리듬의 교란이 복부 지방과 뼈의 표현형에 미치는 영향

을 평가하고자 한다.

제 2 장 생체 내 미세 단층 촬영 장치를 이용한 복부 지방 측정 방법 정립

2.1 서론

비만은 심혈관 및 뇌혈관 질환이나 당뇨병과 같은 여러 질환과 관련되어 있다. 특히 국소적인 지방 분포에 따라 관련된 질환이 다르다고 보고되고 있으며, 복부 내장 지방의 축적이 과도할 경우 대사 증후군과 심혈관계 질환의 발병률이 높아진다고 알려져 있다[14-17]. 또한 복부 피하 지방은 인슐린 민감도와 높은 상관관계를 보인다[18,19]. 이에 따라 복부 지방의 해부학적, 국소적 분포에 대한 관심이 증가하고 있다[20].

인체의 복부 지방 평가 시에는 컴퓨터 단층 촬영 시스템 (computerized tomography, CT)과 자기 공명 영상시스템 (magnetic resonance imaging, MRI) 등의 영상장치를 이용하여 복부 지방을 촬영 후 일부 영역(등뼈 2번~3번)의 단면적 넓이를 측정하는 방법이 사용되고 있다[13,21]. 소동물(쥐)을 이용한 연구에서는 지방을 직접 적출하여 무게를 측정하거나, 이중에너지 x-선 흡수검사 (dual energy x-ray absorptiometry)와 양적 핵 자기 공명 시스템 (quantitative nuclear magnetic resonance), 미세 자기 공명 영상 시스템 (micro magnetic resonance imaging)등과 같은 영상장치를 사용하여 복부 지방의 양을 측정하는 방법들이 주로 사용되었다[13]. 그러나 지방을 직접 적출하여 무게를 측정하는 방법은 시기별로 동물을 희생시켜야 하며, 이에 따라 장기간의 실험 시 많은 동물이 필요하다. 또한 실험동물 개개인의 차가 있는 개체 특이성을 고려하기 힘들다는 단점이 있다. 영상장치를 이용한 방법은 실험동물을 희생하지 않고 복부를 촬영하여 복부 지방을 평가할 수 있다. 그러나 낮은 해상도로 인하여 소동물의 복부 지방을 측정 시 내장 지방과 복부 지방을 구분하기 힘들어 국소적 지방 조직의 분포를 정확히 파악하기에는 부족하거나, 높은 비용 등으로 대부분의 연구자들이 쉽게 사용하기 어

럽다는 단점이 있다[13].

생체 내 미세단층촬영 시스템 (in-vivo micro-computed tomography) 은 높은 해상도로 동물의 단면 영상을 촬영할 수 있으며, 이에 따라 해면골과 같은 미세구조 및 동물 내부 장기 평가 시에 활용되고 있다[10-12]. 생체 내 미세단층촬영 시스템은 미소량의 조직 판별이 가능하고, 획득한 영상으로부터 3차원적인 조직 구조를 재구성할 수 있기에 조직의 해부학적 구조를 명확하게 확인할 수 있다. 또한 생체 내 미세단층촬영 시스템은 비 침습적인 방법으로 소동물의 단면 영상을 촬영할 수 있으므로 소동물의 희생을 최소한으로 줄일 수 있으며, 반복적인 측정이 가능하므로 동일 개체의 조직 변화를 추적 관찰하는데 용이하다 [10,22,23]. 따라서 최근 소동물의 복부 지방 연구 시 생체 내 미세단층촬영 시스템을 이용한 방법이 제안되고 있다[13]. 그러나 인체의 복부 지방 평가와 같이 일정부분의 단면적을 이용하여 소동물의 복부 지방을 평가하는 방법에 대한 연구는 거의 없는 실정이다.

이에 본 연구에서는 생체 내 미세단층촬영 시스템을 이용하여 C57BL/6 암컷 쥐의 복부 지방을 평가하는 방법을 소개하고자 하며, 또한 복부 단면 영상으로부터 복부 지방의 부피를 예측할 수 있는 개선된 방법을 제안하고자 한다.

2.2 재료 및 방법

2.2.1 실험 동물 및 생체 내 미세 단층 촬영

본 실험에서의 동물 실험은 연세대학교 동물 보호 및 사용에 관한 가이드 라인과 법규를 준수하였다 (YWC-090907-3).

아무런 처치도 가하지 않은 15주령의 암컷 C57BL/6 쥐 8마리(21.5 ± 1.3 g)를 사용하였고, 생체 내 미세 단층 촬영 장치 (Skyscan 1076, SKYSCAN N.V., Belgium)을 이용하여 등뼈 (lumbar vertebrae) 1번부터 6번 (L1~L6)까지 촬영하였다. 촬영 시 복셀 크기는 $35 \mu\text{m}$, 필터는 알루미늄 1.0 mm, 노출시간은 790 ms, 전압은 100 kV, 전류는 $100 \mu\text{A}$, 회전각은 1.2° (deg)로 설정하였다. 촬영 동안 케타민 (Ketamine, Huons, 1.5 ml/kg)과 자일라진 (Xylazine, Bayer, 0.5 ml/kg)를 복강 투여하여 마취시켰다.

2.2.2 복부 지방의 부피 및 면적 측정

생체 내 미세 단층 촬영 장치 촬영에서 획득한 영상에서 암컷 C57BL/6 쥐 복부 내부의 각 조직들에 해당되는 그레이 값 (gray value)을 구하였다. 이를 기반으로 경계치 기법 (threshold method)을 이용하여 영상 내에서 등뼈 (lumbar vertebra), 제지방 조직 (lean tissue), 지방 (adipose tissue), 피부 (skin)로 각 영역을 구분하였다(그림 2.1). 이때 Mimics 13.0 (materialise N.V., Belgium) 프로그램을 이용하여 추출한 복부 지방 조직을 3차원 구조로 재구성하고 이로부터 부피를 측정하였다. 복부 지방 조직의 3차원적 전체 부피는 요추뼈(lumbar vertebra, L) 1번에서 6번까지 복부 전체 지방의 부피 (volume of total adipose tissue)를 구하였다. 또한 각 요추뼈 (L1~L6)들의 근위부 (proximal region, P), 원위부 (distal region, D), 근위부와 원위부의 중간 단면 (intermediate region, I)의 각각 세 부분에서의 복부 전체 지방의 단면적을 측정하였다(그림 2.2). 그 후 복부 전체 지방을 복부 내장 지방과 복부 피하 지방으로 구분하여 동일한 과정을 수행하여 복부 내장 지방(volume of visceral adipose tissue)과 복부 피하 지방의 부피(volume of subcutaneous adipose tissue)를 구하였고 각 부분의 단면적을 측정하였다.

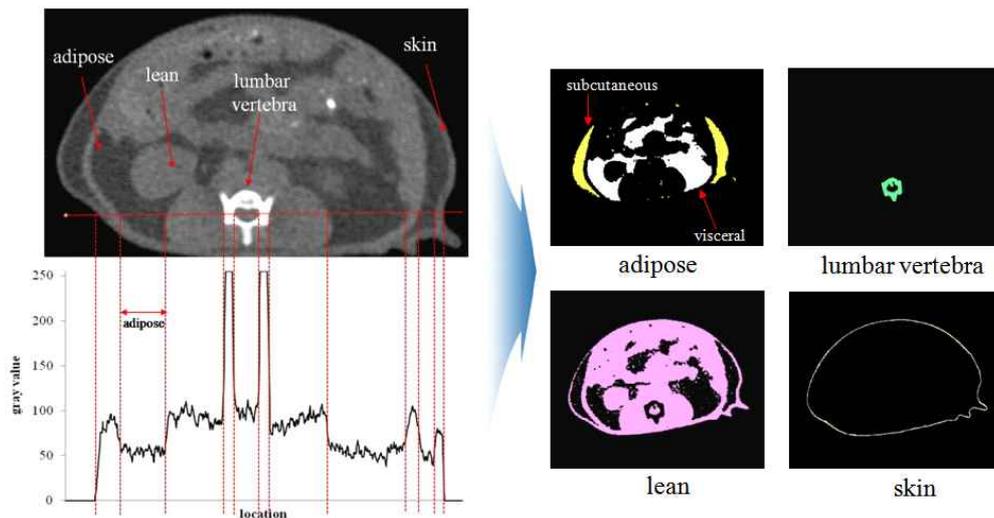


그림 2.1 : 경계치 기법 (Threshold method)을 이용한 생체 조직 구분

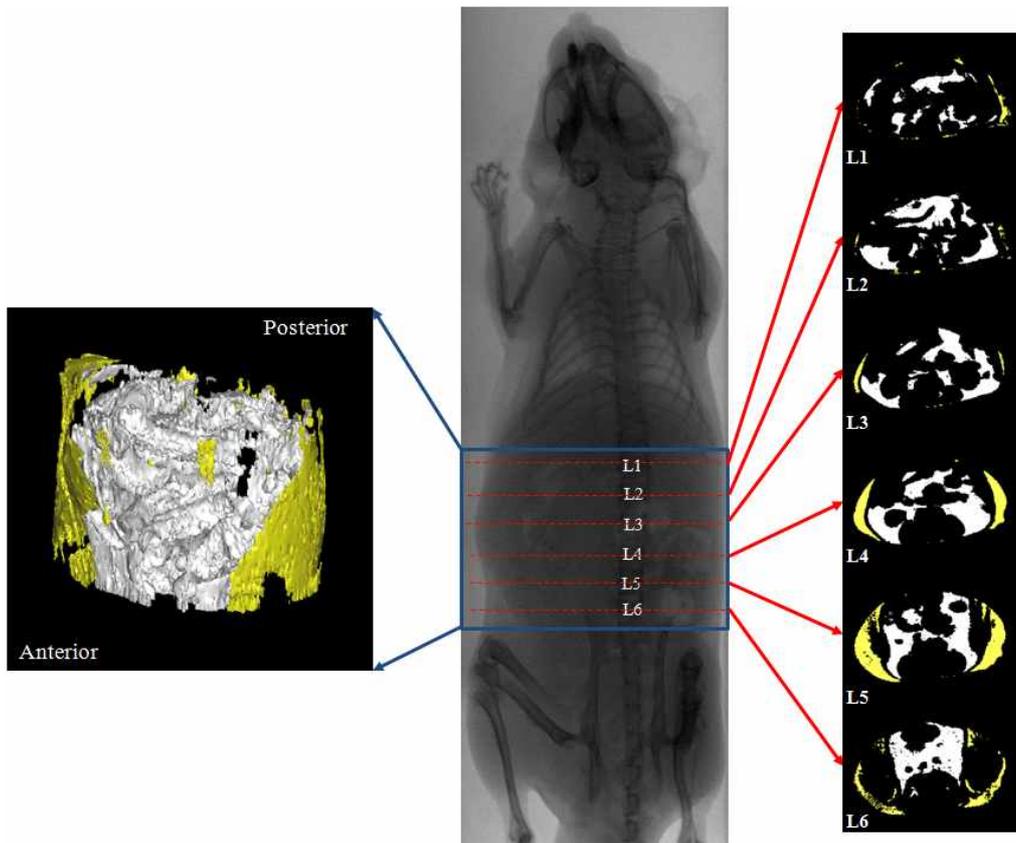


그림 2.2 : 3차원으로 재구성한 복부 전체 지방의 영상과 각 부위별 (Intermediate region) 2차원 단면 영상 (백색 : 복부 내장 지방, 황색 : 복부 피하 지방)

2.2.3 통계적 분석

각 결과 값의 상관관계를 Spearman 검정을 통하여 분석하였다 (복부 전체지방 부피 vs. 복부 전체 지방 단면적, 복부 전체 지방 부피 vs. 복부 내장 지방 부피, 복부 전체 지방 부피 vs. 복부 피하 지방 부피, 복부 내장 지방 부피 vs. 복부 내장 지방 단면적, 복부 피하 지방 부피 vs. 복부 피하 지방 단면적). 또한 척추 부위 (L1~L6), 복부 지방의 종류(복부 전체 지방, 복부 피하 지방, 복부 내장 지방), 측정부위 (P, D, I)간의 차이를 구하기 위하여 다변량 분산분석 (3-way factorial ANOVA)을 수행하였다. 이와 같은 통계적 분석을 위해 SPSS 12.0 (SPSS Inc., US)을 사용하였다 ($p < 0.05$).

2.3 결과

2.3.1 몸무게 vs. 복부 지방 부피

모든 복부 지방의 부피와 몸무게 사이에는 유의한 상관관계를 보이지 않았다 (그림 2.3, $p > 0.05$). 또한 각 개체의 몸무게 (20.00 g ~ 23.00 g) 사이에는 큰 편차가 없었지만 복부 전체 지방 부피는 $118.27 \text{ mm}^3 \sim 1805.04 \text{ mm}^3$, 복부 내장 지방 부피는 $82.75 \text{ mm}^3 \sim 1372.62 \text{ mm}^3$, 복부 피하 지방 부피는 $25.68 \text{ mm}^3 \sim 432.21 \text{ mm}^3$ 로 복부 지방의 부피는 큰 편차를 보임을 확인 할 수 있었다 (표 2.1).

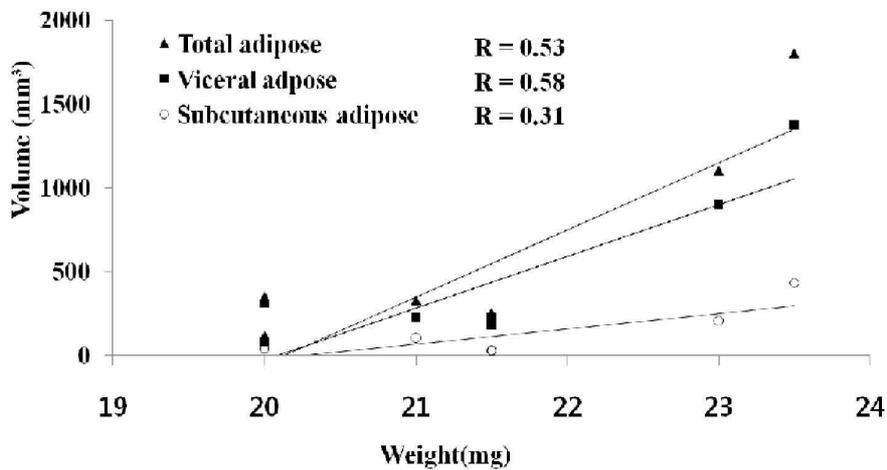


그림 2.3 : 무게와 복부 전체, 내장, 피하 지방 부피의 상관관계 (Total adipose : 복부 전체 지방, Visceral adipose : 복부 내장 지방, Subcutaneous adipose : 복부 피하 지방)

Weight (g)	Total (mm ³)	Visceral (mm ³)	Subcutaneous (mm ³)
21.50±1.30	547.30±594.90	434.70±435.20	112.50±143.30

표 2.1 : 몸무게와 복부 전체, 내장, 피하 지방 부피

2.3.2 복부 전체 지방 부피 vs. 복부 내장 지방 부피, 복부 전체 지방 부피 vs. 복부 피하 지방 부피

복부 내장 지방 부피와 복부 전체 지방 부피와의 상관계수는 0.97, 복부 피하 지방 부피와 복부 전체 지방 부피와의 상관계수는 0.83이며 통계적으로 유의한 상관관계를 보였다 (그림 2.4, $p < 0.05$).

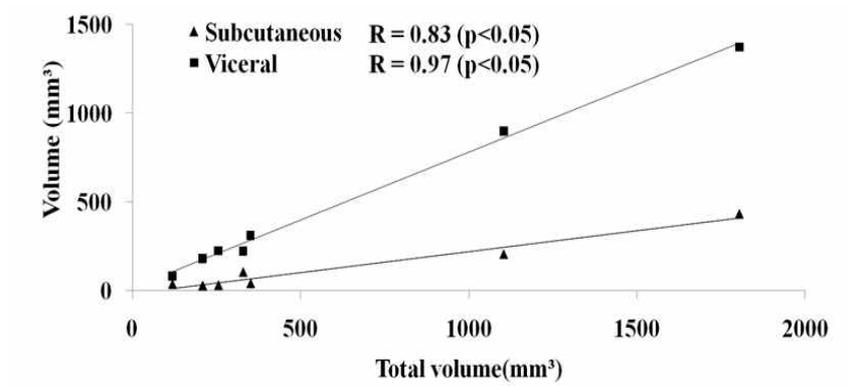


그림 2.4 : 복부 전체 지방 부피와 복부 내장, 피하 지방 부피의 상관 관계

2.3.3 복부 전체 지방 부피 vs. 복부 전체 지방의 단면적

복부 전체 지방 단면적, 복부 피하 지방 단면적, 복부 내장 지방 단면적을 표 2.2 에 나타냈다. 복부 전체 지방 부피와 복부 전체 지방 단면적과의 상관계수는 각각 L1의 근위부에서 0.90, 중간 단면에서 0.95, 원위부 에서 0.86, L2의 근위부에서 0.86, 원위부에서 0.81, L3의 근위부에서 0.81, 중간 단면에서 0.90, 원위부에서 0.90, L4의 근위부에서 0.90, 중간 단면에서 0.98, 원위 부에서 0.98, L5의 근위부에서 0.98, 중간 단면에서 0.88, 원위부에서 0.98, L6의 근위부에서 1.00, 중간 단면에서 0.98, 원위부에서 0.83으로 통계적으로 유의한 상관관계를 보였다(그림 2.5, $p < 0.05$). 하지만 L2의 중간 단면에서의 상관계수는 0.67로 통계적으로 유의하지 않았다(그림 2.5, $p > 0.05$).

L	Visceral Area			Subcutaneous Area			Total Area		
	P	I	D	P	I	D	P	I	D
L1	0.21	0.29	0.47	0.25	0.13	0.07	0.46	0.42	0.53
(mm ²)	±0.12	±0.36	±0.70	±0.26	±0.10	±0.05	±0.36	±0.43	±0.78
L2	0.49	0.60	0.64	0.07	0.03	0.02	0.57	0.63	0.66
(mm ²)	±0.69	±0.87	±0.88	±0.05	±0.03	±0.03	±0.78	±0.97	±0.97
L3	0.64	0.74	0.91	0.02	0.04	0.10	0.66	0.78	1.02
(mm ²)	±0.87	±0.70	±0.75	±0.03	±0.06	±0.15	±0.96	±0.81	±0.94
L4	0.92	0.98	1.01	0.10	0.25	0.39	1.02	1.23	1.4
(mm ²)	±0.75	±0.82	±0.92	±0.15	±0.35	±0.55	±0.94	±1.17	±1.49
L5	1.01	0.86	0.88	0.39	0.42	0.31	1.40	1.30	1.19
(mm ²)	±0.92	±0.83	±0.93	±0.55	±0.63	±0.49	±1.49	±1.54	±1.50
L6	0.88	0.75	0.74	0.31	0.25	0.19	1.19	1.01	0.94
(mm ²)	±0.93	±0.92	±0.81	±0.49	±0.30	±0.16	±1.50	±1.32	±1.01

표 2.2 : 각 요추뼈의 부위별 복부 전체 지방 면적 (Visceral : 복부 내장 지방, Subcutaneous, Total : 복부 전체 지방, : 복부 피하 지방), (L: lumbar vertebra, P : proximal region, I : intermediate region, D : distal region)

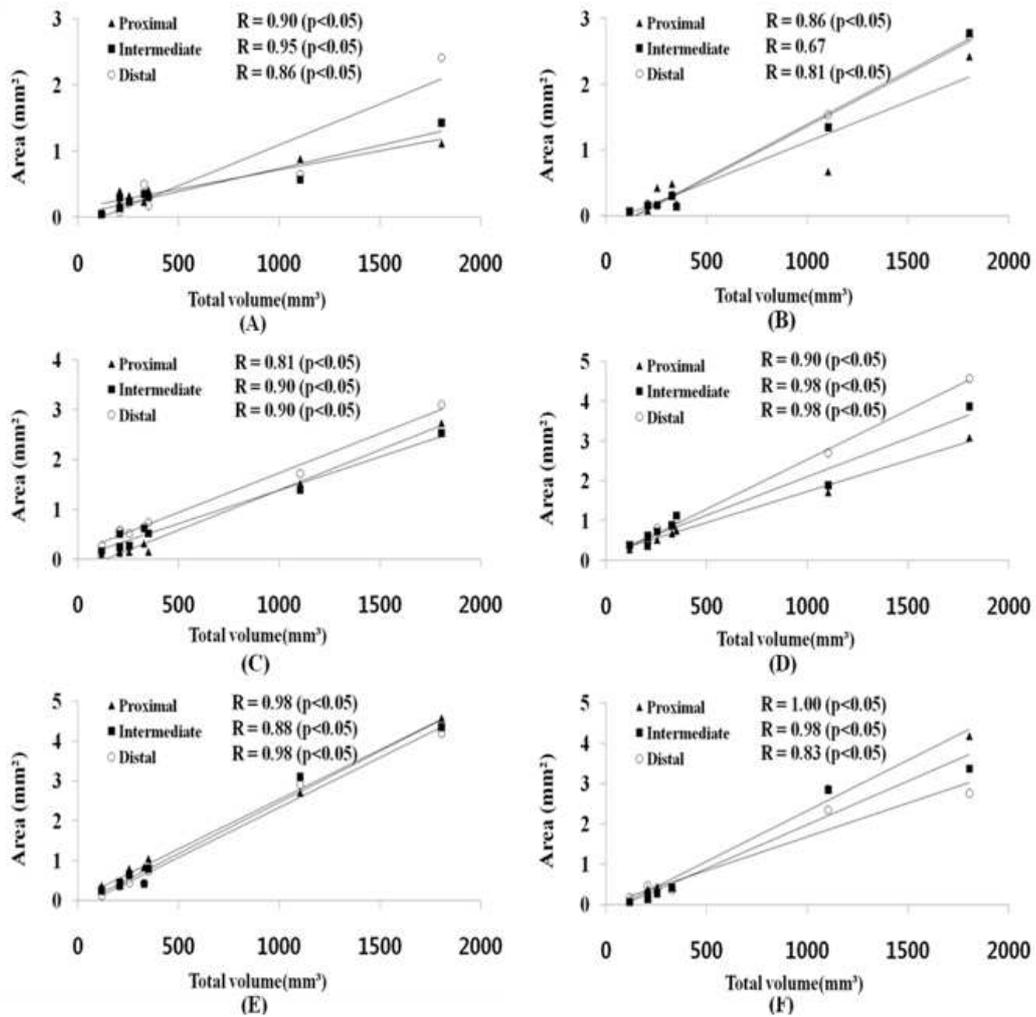


그림 2.5 : 복부 전체 지방 부피와 복부 전체 지방의 부위별 단면적과의 상관관계 (A) L1, (B) L2, (C) L3, (D) L4, (E) L5, (F) L6

2.3.4 복부 내장 지방 부피 vs. 복부 내장 지방 단면적

복부 내장 지방 부피와 복부 내장 지방 단면적과의 상관계수는 각각 L1의 중간 단면에서 0.86, 원위부에서 0.90, L2의 중간 단면에서 0.71, 원위부에서 0.74, L3의 근위부에서 0.74, 중간 단면에서 0.83, 원위부에서 0.82, L4의 근위부에서 0.81, 중간 단면에서 0.98, 원위부에서 0.90, L5의 근위부에서 0.90, 중간 단면에서 0.90, 원위부에서 0.98, L6의 근위부에서 0.98, 중간 단면에서 0.98 원위부에서 0.86으로 통계적으로 유의한 상관관계를 보였다 (그림 2.6, $p < 0.05$). L1의 근위부에서 0.43, L2의 근위부에서 0.62로 통계적으로 유의하지 않았다(그림 2.6, $p > 0.05$).

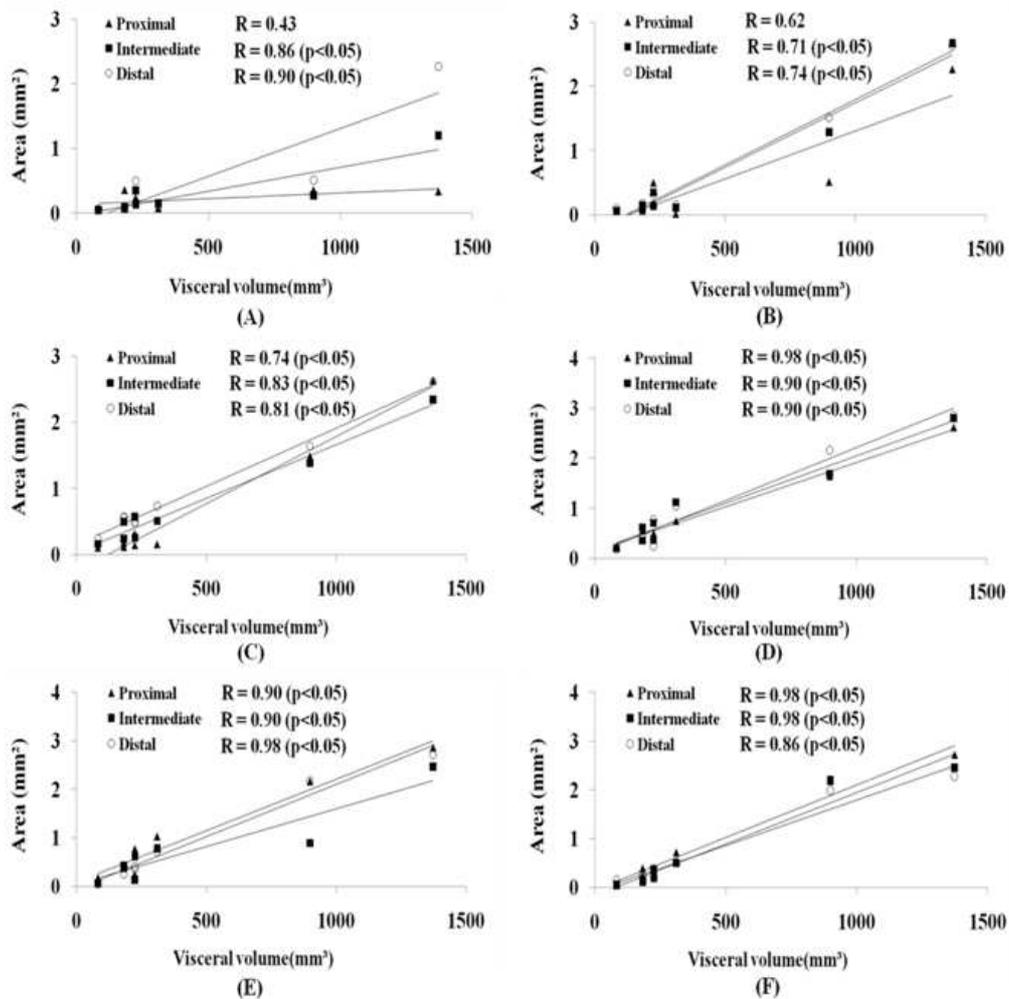


그림 2.6 : 복부 내장 지방 부피와 복부 내장 지방의 부위별 단면적과의 상관관계 (A) L1, (B) L2, (C) L3, (D) L4, (E) L5, (F) L6

2.3.5 복부 피하 지방 부피 vs. 복부 피하 지방 단면적

복부 피하 지방 부피와 복부 피하 지방 단면적과의 상관계수는 각각 L3의 원위부에서 0.71, L4의 중간단면에서 0.88, 원위부에서 0.88, L5의 근위부에서 0.88, 중간단면에서 0.81로 통계적으로 유의한 상관관계를 보였다(그림 2.7, $p < 0.05$). L1의 근위부에서 0.43, 중간 단면에서 0.41, 원위부에서 0.43, L2의 근위부에서 0.43, 중간 단면에서 0.49, 원위부에서 0.55, L3의 근위부에서 0.54, 중간 단면에서 0.60, L4의 근위부에서 0.71, L5의 원위부에서 0.57, L6의 근위부에서 0.57, 중간 단면에서 0.62 원위부에서 0.48로 통계적으로 유의하지 않았다(그림 2.7, $p > 0.05$).

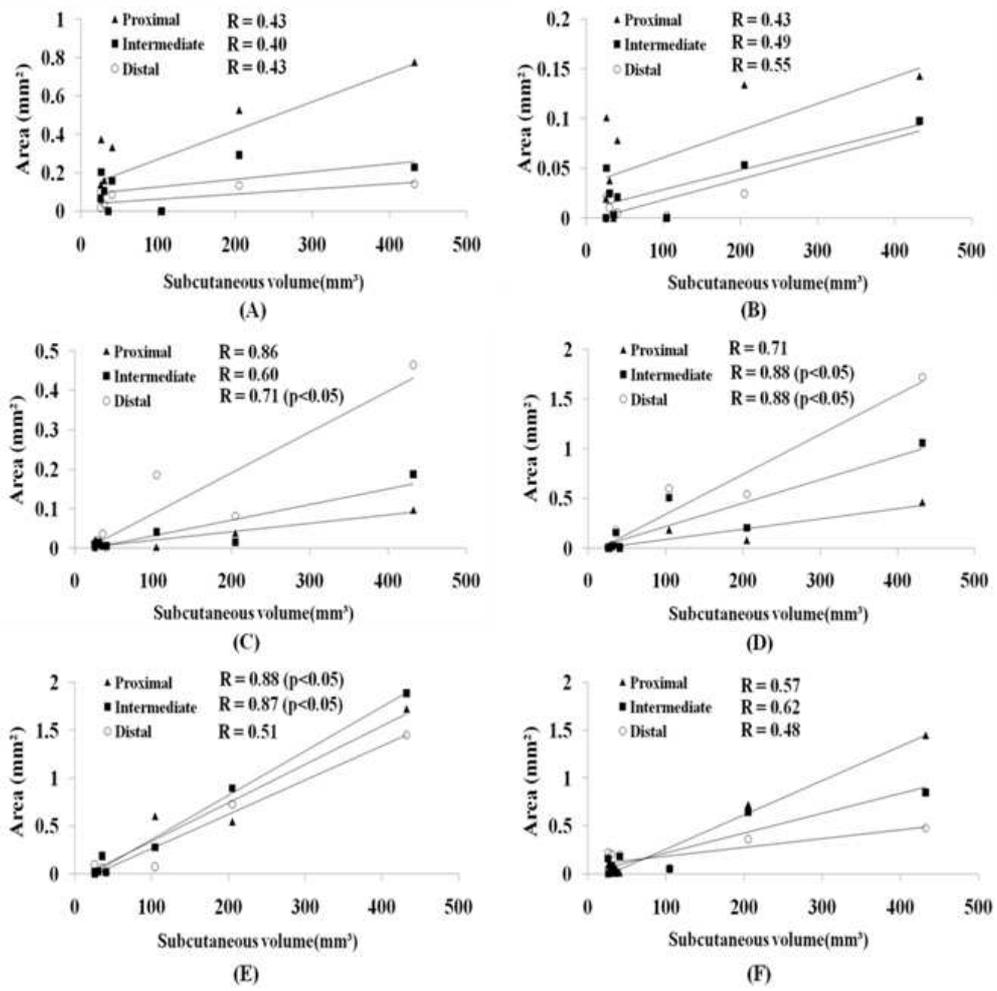
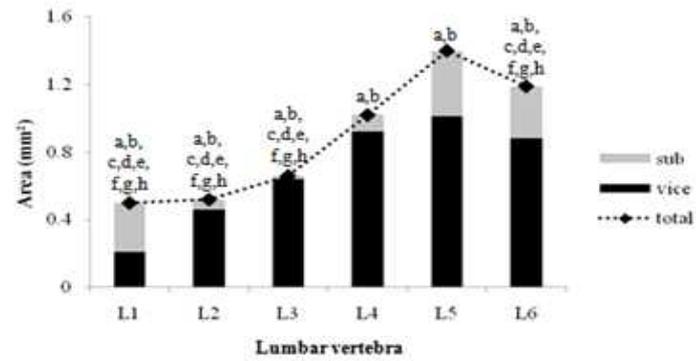


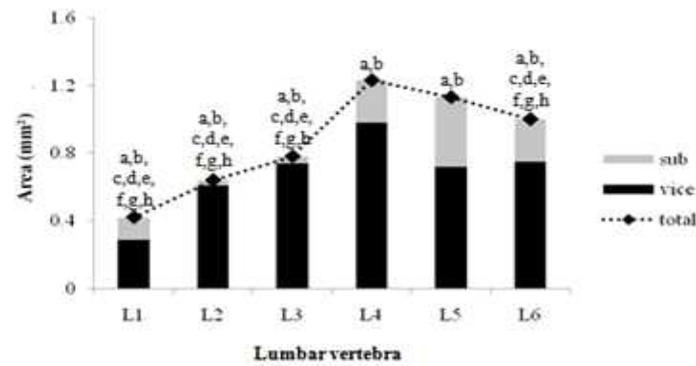
그림 2.7 : 복부 피하 지방 부피와 복부 피하 지방의 부위별 단면적과의 상관관계 (A) L1, (B) L2, (C) L3, (D) L4, (E) L5, (F) L6

2.3.6 척추 부위 (L1~L6) vs. 복부 지방의 종류(복부 전체 지방, 복부 피하 지방, 복부 내장 지방) vs. 측정부위 (P, D, I)에 따른 단면적 비교

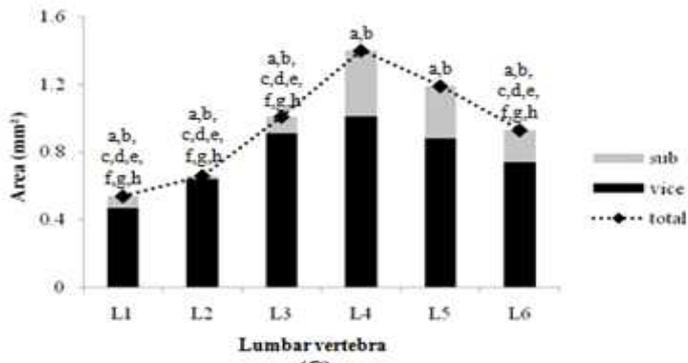
동일 종류의 복부 지방과 측정부위에서는 척추 부위에 따라 유의한 차이를 보였다(그림 2.8, $p < 0.05$). L1, L2, L3, L6에서는 큰 차이가 없었으며, L4, L5에서도 유의한 차이가 없었다(Fig. 8, $p > 0.05$). L1, L2, L3, L6와 L4, L5 사이에는 유의한 차이를 보였다(Fig. 8, $p < 0.05$). 또한 척추 부위와 측정부위에서는 복부 지방의 종류에 따라 유의한 차이를 보였다(그림 2.8, $p < 0.05$). 특히 복부 피하 지방은 복부 내장 지방과 복부 전체 지방에 비하여 유의하게 작았다. 하지만 동일 복부 지방과 복부 지방의 종류에서는 측정부위에 따라 유의한 차이가 없었다(그림 2.8, $p > 0.05$).



(A)



(B)



(C)

그림 2.8 : 복부 지방 단면적 (a: 복부 피하 지방 vs. 복부 내장 지방, b: 복부 피하 지방 vs. 복부 전체 지방)($p < 0.05$), (c: vs. L4의 복부 피하 지방, d: vs. L4의 복부 내장 지방, e: vs. L4의 복부 전체 지방, f: vs. L5의 복부 피하 지방, g: vs. L5의 복부 내장 지방, h: vs. L5의 복부 전체 지방)($p < 0.01$), (A) P, (B) I,

(C)D

2.4 고찰

본 연구에서 사용한 C57BL/6 암컷 쥐의 몸무게 사이에는 큰 편차가 없었지만 복부 지방의 부피는 큰 편차를 나타냈고, 이에 따라 복부 지방은 동일 연령, 성별, 종이지만 개개인의 차가 있는 개체 특이성을 보임을 확인 할 수 있었다. 이로써 소동물을 이용한 복부 지방 연구 시 동일 개체의 복부 지방량의 시간의 흐름에 따른 변화량을 측정하는 것이 유용하며 좀 더 정확한 결과를 얻을 수 있을 것이다.

복부 내장 지방 부피와 복부 전체 지방 부피, 복부 피하 지방 부피와 복부 전체 지방 부피 사이에는 유의한 상관관계를 보였으며, 이는 Luu등의 연구와 유사하다 [13]. 이로써 복부 전체 지방 부피를 측정하여 복부 내장 지방 부피와 복부 피하 지방 부피를 예측할 수도 있음을 확인하였다.

본 연구에서는 임상적으로 주로 사용하고 있는 복부 전체 지방 단면적을 측정하는 방법을 소동물의 복부 지방 측정에 적용시킬 수 있는지에 대하여 평가하였다. 이를 위하여 복부 전체 지방 부피와 복부 전체 지방 단면적과의 상관관계를 분석했을 때, L2의 중간단면을 제외한 모든 부위에서 상관관계가 통계적으로 유의하였다($p < 0.05$). 이를 통해 복부 전체 지방 단면적을 이용하여 복부 전체 지방 부피를 예측하는데 적용할 수 있음을 확인하였다.

복부 내장 지방은 대사 증후군과 심혈관계 질환등과 밀접한 관련이 있으며 [15-17], 복부 피하 지방은 인슐린 민감도와 높은 상관관계를 보인다[18,19]. 이에 따라 복부 지방 연구에서는 복부 전체 지방에 대한 연구보다는 복부 내장 지방과 복부 피하 지방을 따로 측정하는 것이 더 효율적이다. 본 연구에서는 복부 내장 지방과 복부 전체 지방의 부피와 각 단면의 면적을 구하였고, 각 복부 지방의 부피와 단면적 사이의 상관관계를 분석하였다. 복부 내장 지방의 경우는 L1의 근위부, L2의 근위부를 제외하고는 높은 상관관계를 보였다. 이에 반하여 복부 피하 지방의 경우는 L3의 원위부, L4의 원위부, 중심부, L5의 근위부, 중심부에서만 높은 상관관계를 보였다. 이에 따라 복부 내장 지방은 단일면적을 이용하여 복부 내장 지방의 부피를 예측할 수 있음을 알 수 있다. 하지만 복부 피하 지방은 단일 면적을 이

용하여 복부 피하 지방의 부피를 예측하기 힘들다는 것을 알 수 있다.

L4, L5의 복부 전체 지방, 복부 내장 지방, 복부 피하 지방은 다른 부위에 비하여 유의하게 컸으며, L4, L5 사이에는 큰 차이가 없음을 확인 할 수 있었다. 또한 모든 영역에서 구한 복부 피하 지방의 단면적은 복부 내장 지방의 단면적 보다 유의하게 작았으며, 복부 내장 지방과 복부 전체 지방 사이에는 유의한 차이가 없음을 확인 할 수 있었다.

위와 같은 결과로부터 복부 전체 지방과 복부 내장 지방 측정 연구 시 L3 ~ L6의 복부 지방 단면적을 측정함으로써 복부 전체 지방 부피를 예측할 수 있음을 나타낸다. 하지만 복부 피하 지방은 측정 영역에 따라 상관성이 많은 차이를 보이므로 복부 피하 지방 측정 연구 시 단면적을 이용하여 복부 피하 지방 부피를 예측하기는 힘들 것으로 사료된다.

본 논문에서는 생체 내 미세단층촬영 시스템을 이용하여 소동물의 복부 지방을 효율적으로 측정할 수 있는 개선된 방법을 소개하고자 하였다. 특히 분석의 용이성을 위하여 복부의 부분적 단면적을 이용하여 복부의 전체적 부피를 예측하는 것이 가능한지에 대하여 연구하였으며, 그 결과 복부 전체 지방과 복부 내장 지방은 단면적을 이용하여 부피를 예측할 수 있음을 확인 하였다. 특히 L3 ~ L6의 단면적을 측정하는 것이 유용하다는 것을 확인 할 수 있었다. 하지만 복부 피하 지방은 각 단면의 단면적 측정정보보다는 복부 피하 지방의 전체적 부피를 구하는 것이 더 유용하다는 것을 확인 할 수 있었다. 본 연구에서 사용한 생체 내 미세단층촬영 시스템은 고 해상도와 세밀한 3차원 구조의 영상을 제공함으로써 기존 장비에서 측정하기 어려운 미소량의 복부 지방 조직 및 국소적인 복부 지방 분포의 측정이 가능하다. 또한 간과 같은 생체 내 연조직은 주로 조영제를 사용해야만 영상을 획득할 수 있으나[12,22-25], 지방은 다른 연조직과의 x-ray 흡수율이 다르기 때문에 조영제 없이도 다른 조직과의 구분이 명확하였다. 이에 본 연구에서는 소동물의 지방 분포를 연구하는데 생체 내 미세단층촬영 시스템이 유용하다는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 실험에 사용된 동물이 동일 연령, 성별, 중임에도 불구하고 각 개체의 부피가 큰 차이가 있음을 확인하였다. 이로써 복부 지방 연구 시 동일 개체의 변화를 보는 것이 더 유용하고 정확한 결과를 얻을 수 있음을 확인 할 수 있었다. 본 논문

에서 제안한 방법은 비 침습적인 방법으로 소동물 각 개체의 지방 변화를 추적 관찰하는 것이 가능할 것이며, 이로써 더 정확한 결과를 얻을 수 있을 것이다. 또한 연구에 사용되는 소동물의 개체 수를 줄일 수 있을 것으로 기대된다.

하지만 본 연구에서는 정상의 C57BL/6, 15주령 암컷 쥐의 복부 지방만을 측정하였다는 점에서는 한계를 가지고 있다. 추후 다양한 종, 연령, 성별에 따라 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다. 하지만 생체 내 미세단층촬영 시스템을 이용하여 소동물의 복부 지방 측정에 대한 연구를 소개하는데 그 의의를 두고자 한다. 또한 기존의 소동물의 지방 평가에 관한 연구에서는 복부 전체 부피를 모두 측정하였다. 이와 같은 복부 전체 부피 측정 시 획득한 영상을 3차원으로 재구성해야 한다. 이에 따라 시간이 오래 걸리는 단점이 있다. 본 연구에서는 복부 지방의 부피를 직접적으로 측정하지 않고 단면적을 이용하여 복부 전체 지방 부피와 복부 내장 지방 부피의 예측이 가능함을 보임에 그 의의를 두고자 한다. 본 연구에서 소개한 방법을 통하여 추후 다양한 복부 지방과 관련된 연구에 적용할 수 있을 것이다.

2.5 결론

본 논문에서는 생체 내 미세단층촬영 시스템을 이용하여 소동물의 복부 지방을 평가하는 방법에 대하여 제안하였다. 이를 통하여 소동물 (C57BL/6, 15주령, 암컷)의 복부 지방 측정 시 복부 전체 지방 부피와 복부 내장 지방 부피는 L3~L6의 단면적을 이용하여 예측할 수 있음을 보였다. 그러나 복부 피하 지방의 경우 전체 복부 피하 지방 부피를 측정해야 함을 확인 할 수 있었다. 본 연구에서 제안한 방법은 소동물의 희생 없이 복부 지방의 부피 변화를 시간의 흐름에 따라 평가할 수 있다. 또한 조영제 투여가 필요 없으며, 고해상도의 영상을 획득할 수 있으므로 복부 지방 분포를 확인 할 수 있었다. 이를 통하여 생체 내 미세단층촬영 시스템을 이용하면 소동물의 복부 지방을 효율적으로 평가할 수 있음을 확인하였다.

제 3 장 일주기 리듬의 교란이 성장기 쥐의 지방 축적과 뼈에 미치는 영향 분석

3.1 서론

일주기 리듬은 생체 활동과 밀접하게 연관되어 매우 중요한 역할을 수행한다. 이러한 일주기 리듬이 불규칙 수면 등에 의하여 교란되면 생체 활동에 큰 장애를 일으키게 된다. 이에 관한 많은 연구들이 수행 중이지만 생체 말초 조직의 정량적인 표현형에 관한 연구는 부족하다

따라서 본 연구에서는 성장기 쥐를 이용, 빛을 조절하여 불규칙 수면을 유발함으로써 일주기 리듬을 교란하였고, 이에 따른 생체 말초조직의 구조적, 형태학적 변화를 추적 관찰하였다.

3.2 실험동물 준비 (불규칙 수면 유발 동물 모델)

본 연구에서의 동물 실험은 연세대학교 동물 보호 및 사용에 관한 가이드라인과 법규에 따라 수행되었다.(YWC-100303-1)

실험을 위해 5주령의 129/SV 수컷 쥐 14마리를 사용 하였으며 정상 수면군(Normal, NOR) 7마리, 불규칙 수면군(Night Shift, NS) 7마리로 구분하였다.

NOR은 6주 동안 LD phase (L : Light(07:00~19:00), D : Dark(19:00~07:00))의 적용으로 정상 수면 생활을 유지하며 사육하였다. NS는 6주 동안 0~2주간 LD phase, 2~4주간 DL phase (D(19:00~07:00), L(07:00~19:00)), 4~6주간 LD phase의 적용으로 6주간 2주 간격으로 총 두 번의 수면주기의 반전을 일으킴으로써 불규칙한 수면 생활을 유지하며 사육하였다(표 2.1). 수면 주기의 조절은 빛을 이용하였으며, 이를 위해 외부의 빛과 완벽히 차단된 사육실 내에서 타이머 조절이 가능한 사육실 자체 조명만을 사용하였다. 섭식으로 인한 생체 리듬의 변화를 방지 하기 위해 모든 그룹은 24시간 자유롭게 섭식, 음용 하였다.

	0~2주		2~4주		4~6주	
	07:00~19:00~07:00		07:00~19:00~07:00		07:00~19:00~07:00	
NOR	L	D	L	D	L	D
NS	L	D	D	L	L	D

표 3.1 : L-D phase의 조절 시간표 (L : Light(07:00~19:00), D : Dark(19:00~07:00))

3.3 생체 내 미세 단층촬영 장치

생체 내 미세단층촬영 시스템 (In-vivo micro-CT, Skyscan 1076, Skyscan N.V., Belgium)을 이용하여 0주와 6주에 각각 복부 지방과 정강뼈를 촬영하였다. 촬영 시 움직임을 최소화 하기위해 케타민 (Huons, 1.5 ml/kg)와 자일라진 (Bayer, 0.5 ml/kg)의 혼합물을 복강 투여하여 마취시킨 후 촬영하였다. 촬영 시 빛에 노출됨을 고려하여 모든 촬영은 각 그룹의 낮 주기(L phase) 동안 시행되었다.

3.3.1 정강뼈 촬영복부지방 촬영

복부지방 촬영 시 복셀 크기는 $35\ \mu\text{m}$, 필터는 알루미늄 1.0 mm, 노출시간은 790 ms, 관전압은 100 kV, 관전류는 $100\ \mu\text{A}$, 회전각은 1.2° (deg)로 설정하였고, 등뼈 (lumbar vertebrae) 2번부터 5번 (L2~L5)까지 촬영하였다.

3.3.2 정강뼈 촬영

정강뼈 촬영 시 복셀 크기는 $18\ \mu\text{m}$, 필터는 알루미늄 1.0 mm, 노출시간은 2065 ms, 관전압은 85 kV, 관전류는 $118\ \mu\text{A}$, 회전각은 0.7° (deg)로 설정하였다.



그림 3.1 : 생체 내 미세단층 촬영 장치

3.4 복부 지방 평가

복부로부터 획득한 영상에서 2장에서 정립된 복부지방 측정 방법을 사용하여 복부 지방 조직만을 추출하였다. 추출한 복부 지방 조직 영상을 3차원으로 재구성하여 그 부피를 측정 하였다. 이때 측정된 부피는 등뼈 2번에서 5번(L2~L5)까지 복부 전체 지방의 부피 (volume of total abdominal adipose tissue)이다. 또한 복부 전체 지방을 분포 지역별로 복부 내장 지방 (volume of visceral abdominal adipose tissue)과 복부 피하 지방 (volume of subcutaneous abdominal adipose tissue)으로 구분하여 각각의 부피를 구하였다.

3.5 골밀도 및 구조적 파라미터 분석

획득한 정강뼈의 영상으로부터 CT-AN 1.10 (Skyscan N.V., Belgium) 프로그램을 이용하여 해면골과 피질골의 골밀도 (bone mineral density, BMD)와 구조적 파라미터 (structural parameter)를 구하였다.

3.5.1 해면골과 피질골의 BMD

해면골과 피질골의 BMD를 구하기 위해, BMD 값이 고정된 팬텀 (0.25 g/cm^3 , 0.75 g/cm^3)을 이용하여 획득한 영상의 BMD를 교정하였다. 이를 통해 해면골과 피질골의 BMD를 구하였다.

3.5.2 해면골의 구조적 파라미터

해면골의 구조적 파라미터는 뼈 체적비 (bone volume fraction, BV/TV , %), 뼈 잔 기둥의 두께 (trabecular thickness, $Tb.Th$, mm), 뼈 잔 기둥간 거리 (trabecular separation, $Tb.Sp$, mm^{-1}), 뼈 잔 기둥의 개수 (trabecular number, $Tb.N$, mm), 해면골 패턴 요소 (trabecular bone pattern factor, $Tb.Pf$, mm^{-1}), 구조적 모델지수 (structure model index, SMI)를 구하였다. BV/TV 는 관심 부피 안에서 해면 뼈의 부피 비를 의미한다. $Tb.Th$ 는 뼈 잔 기둥의 평균 두께를 의미한다. $Tb.Sp$ 는 뼈 잔 기둥간의 평균 거리를 의미한다. $Tb.N$ 는 단위길이 당 뼈 잔 기둥의 개수를 의미한다. $Tb.Pf$ 는 해면 뼈의 연결성을 나타내는 값으로 낮은 값일수록 연결성이 높음을 의미한다. SMI는 뼈 잔 기둥의 형태학적 특성을 나타내는 값으로 0이면 이상적인 판 형태의 구조를, 3이면 막대 형태의 구조, 4이면 구 형태의 구조를 의미한다.

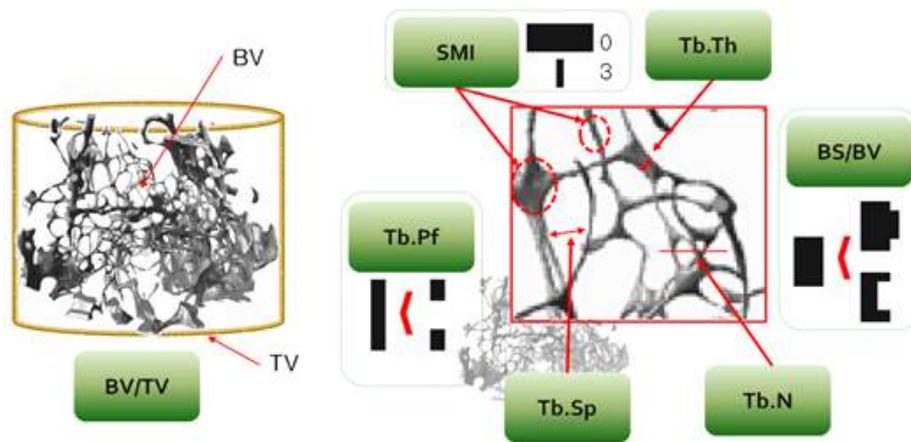


그림 3.2 : 해면골의 구조적 파라미터

3.5.3 피질골의 구조적 파라미터

피질골의 구조적 파라미터는 뼈 부피 (bone volume, BV, mm^3), 극 관성 모멘트 (mean polar moment of inertia, MMI, mm^4), 뼈 단면 두께 (cross section thickness, Cs.Th, mm)를 구하였다. BV는 피질골의 부피를 의미한다. MMI는 피질골이 비틀림에 저항 하는 능력을 의미한다. Cs.Th는 피질골 단면의 두께를 의미한다.

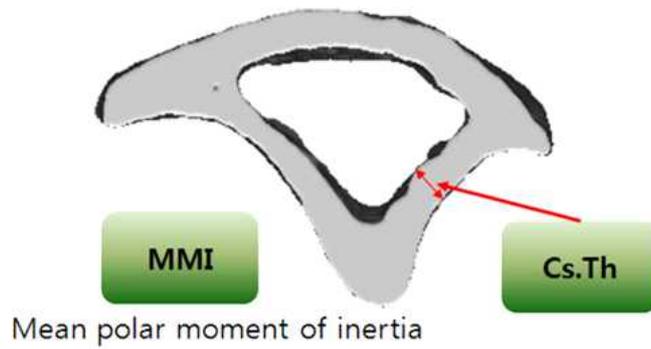


그림 3.3 ∴ 피질골의 구조적 파라미터

3.6 길이 및 성장판 분석

3.6.1 길이

영상으로부터 정강뼈의 길이(length of tibia, mm)를 측정하기 위해 Mimics 13.1 (Materialise N.V., Belgium) 프로그램을 이용해 정강뼈의 근위부 말단 (tibia proximal end)에서 종아리뼈 원위부 말단 (fibula distal end)까지의 길이를 측정하였다.

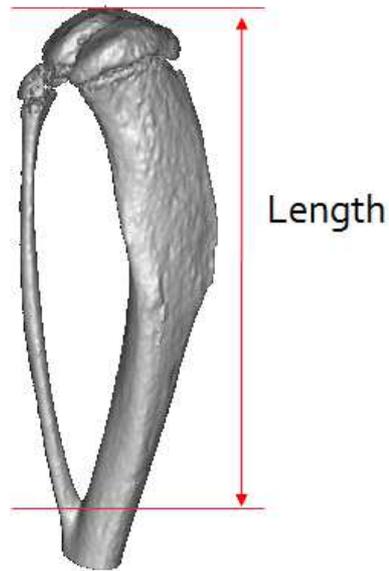


그림 3.4 : 정강이뼈의 길이 측정

3.6.2 성장판

정강뼈 영상에서 뼈 조직과 성장판 (growth-plate)을 분리하여 3차원으로 재구성한 후 성장판의 부피 (total volume of growth-plate, GV, mm³)를 측정하였다. 성장판에서 가장 용기가 크게 일어난 부위의 단면에서 두 개의 최대 용기 부분의 두께를 각각 측정하였다 (thickness I, II of growth-plate, Gp.Th I, II)

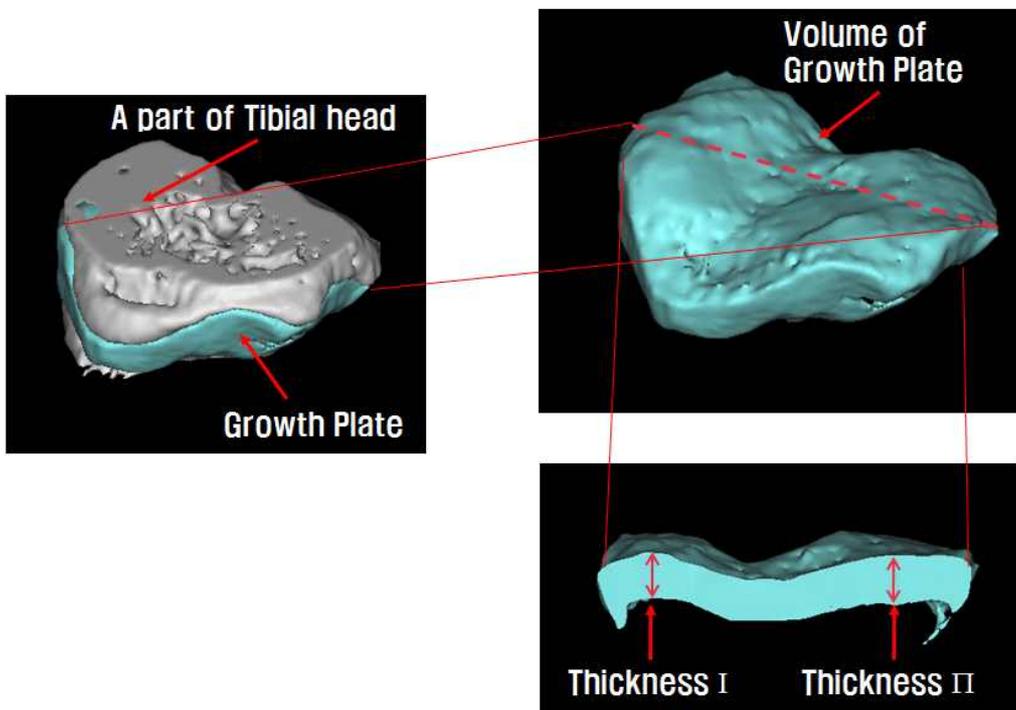


그림 3.5 : 정강이뼈 성장판의 부피와 두께 측정

3.7 통계 처리

0주와 6주 후 각 그룹 간 복부 전체, 복부 내장, 복부 피하 지방 그리고 정강뼈의 BMD와 구조적 파라미터, 길이, GV와 G.Th I, G.ThII의 통계적 유의함을 평가하기 위해 SPSS 12.0 프로그램을 이용하여 공분산분석(ANCOVA)을 시행하였다 (SPSS Inc., USA)($p < 0.05$). 모든 값은 평균 \pm 표준오차 (MEAN \pm SE)로 나타냈다.

제 4 장 결 과

0주와 6주에 생체 내 미세단층 촬영 장치를 통해 획득한 영상으로부터 6주 후 두 그룹의 생체말초조직의 구조적, 형태학적 변화를 비교하고 이를 그림과 그래프를 통해 정량적으로 나타냈다.

4.1 몸무게 비교

6주 동안 두 그룹의 몸무게는 모두 증가하였지만, 유의한 차이를 보이지 않았다

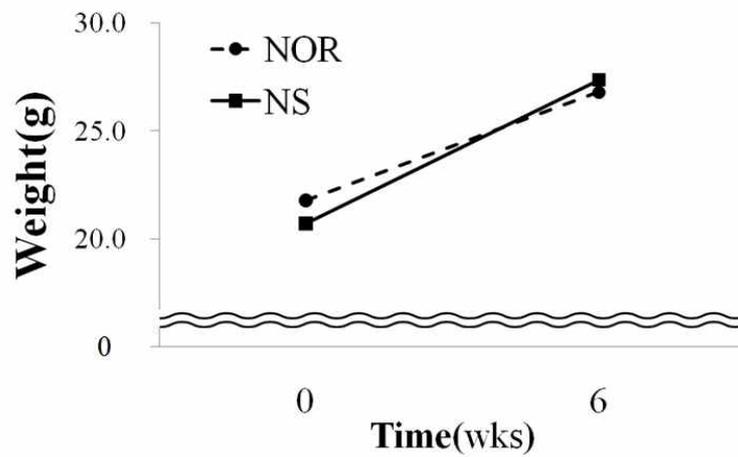


그림 4.1 : 6주간의 몸무게의 변화 (MEAN±SE, NS vs. NOR at 0-6 weeks, $p>0.05$)

4.2 복부 지방 비교

복부지방 부피의 차이는 그림 3.2에서 나타냈다

6주후 복부 지방의 부피는 NS가 NOR에 비해 복부 전체 지방이 69%, 복부 내장 지방이 92% 유의 하게 큼을 확인하였다($p < 0.05$). 복부 피하 지방의 부피는 23% 큼을 확인할 수 있었지만 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았다($p > 0.05$).

이와 같은 형태학적 차이는 그림 3.3에서 3차원 형태로 확인 할 수 있다.

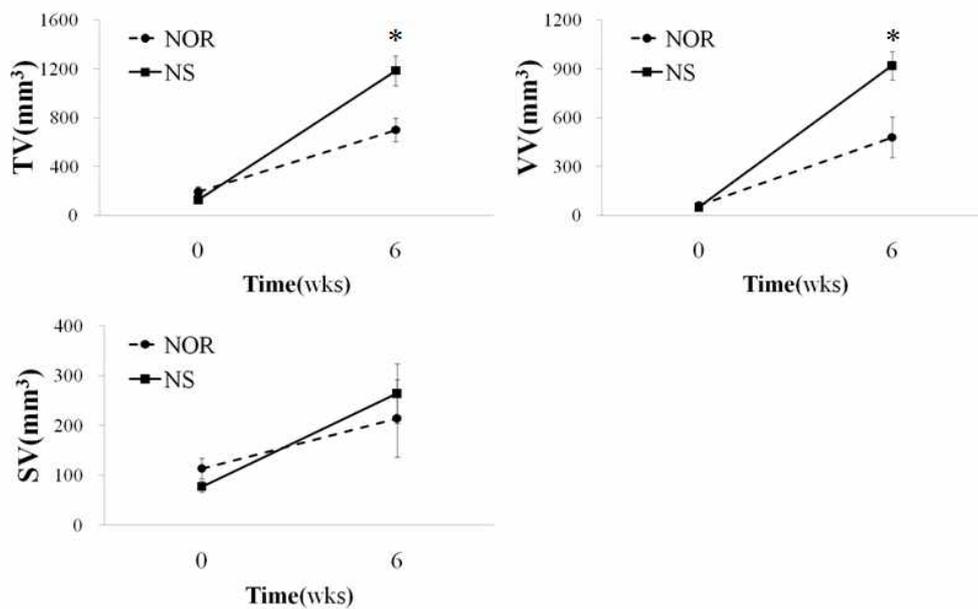


그림 4.2 : 6주간의 복부 지방 부피의 변화 (TV : 복부 전체 지방의 부피, VV : 복부 내장 지방의 부피, SV : 복부 피하 지방의 부피), (MEAN±SE, * : NS vs. NOR at 0-6 weeks, $p < 0.05$)

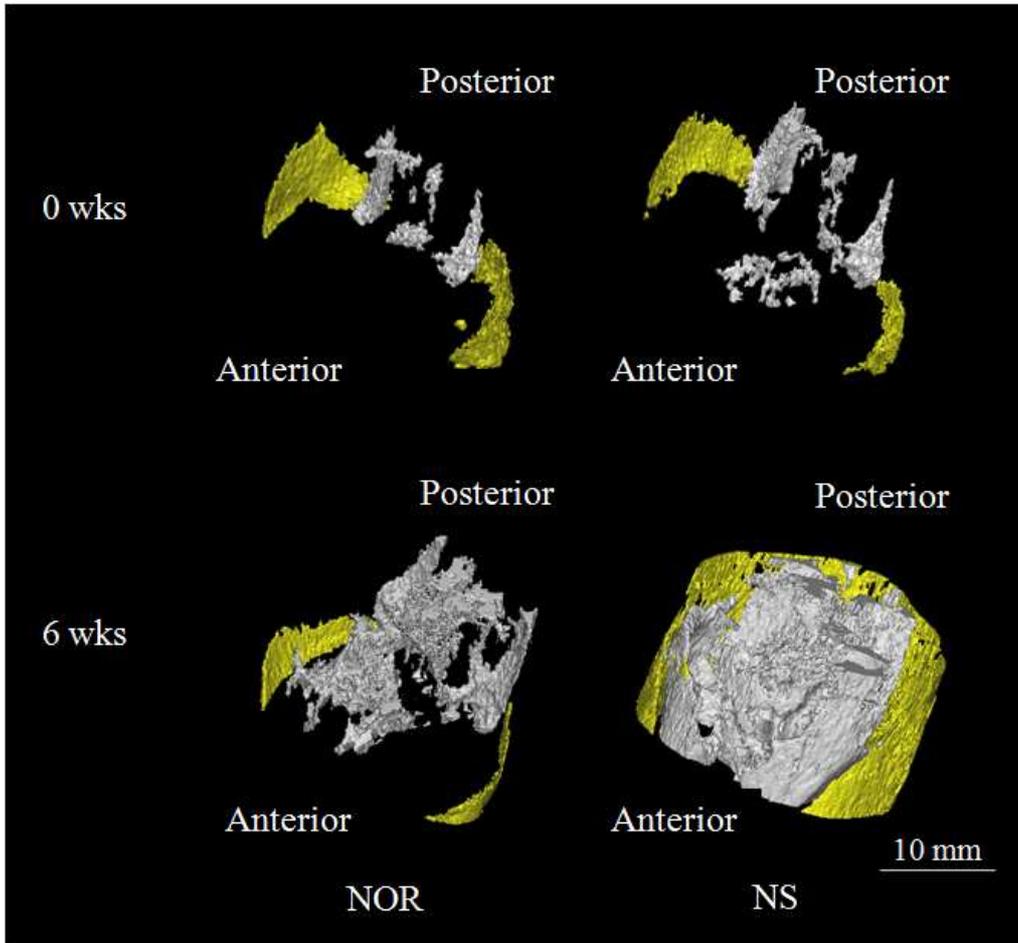


그림 4.3 : 0주와 6주 후 복부 지방 부피의 변화 (황색 : 복부 피하 지방, 백색 : 복부 내장 지방)

4.3 BMD 및 구조적 파라미터 비교

4.3.1 해면골의 BMD 및 구조적 파라미터

정강뼈의 해면골의 BMD 및 구조적 파라미터의 차이는 그림 3.4에서 확인 할 수 있다.

6주후 정강뼈의 해면골에서는 NS가 NOR에 비해 BMD는 7%, BV/TV는 45%, Tb.Th는 4%, Tb.Sp는 3%, Tb.N는 43% 작음을 확인하였고, Tb.Pf는 12%, SMI는 3% 큼을 확인하였으나, 통계적으로는 유의한 차이를 보이지 않았다($p>0.05$).

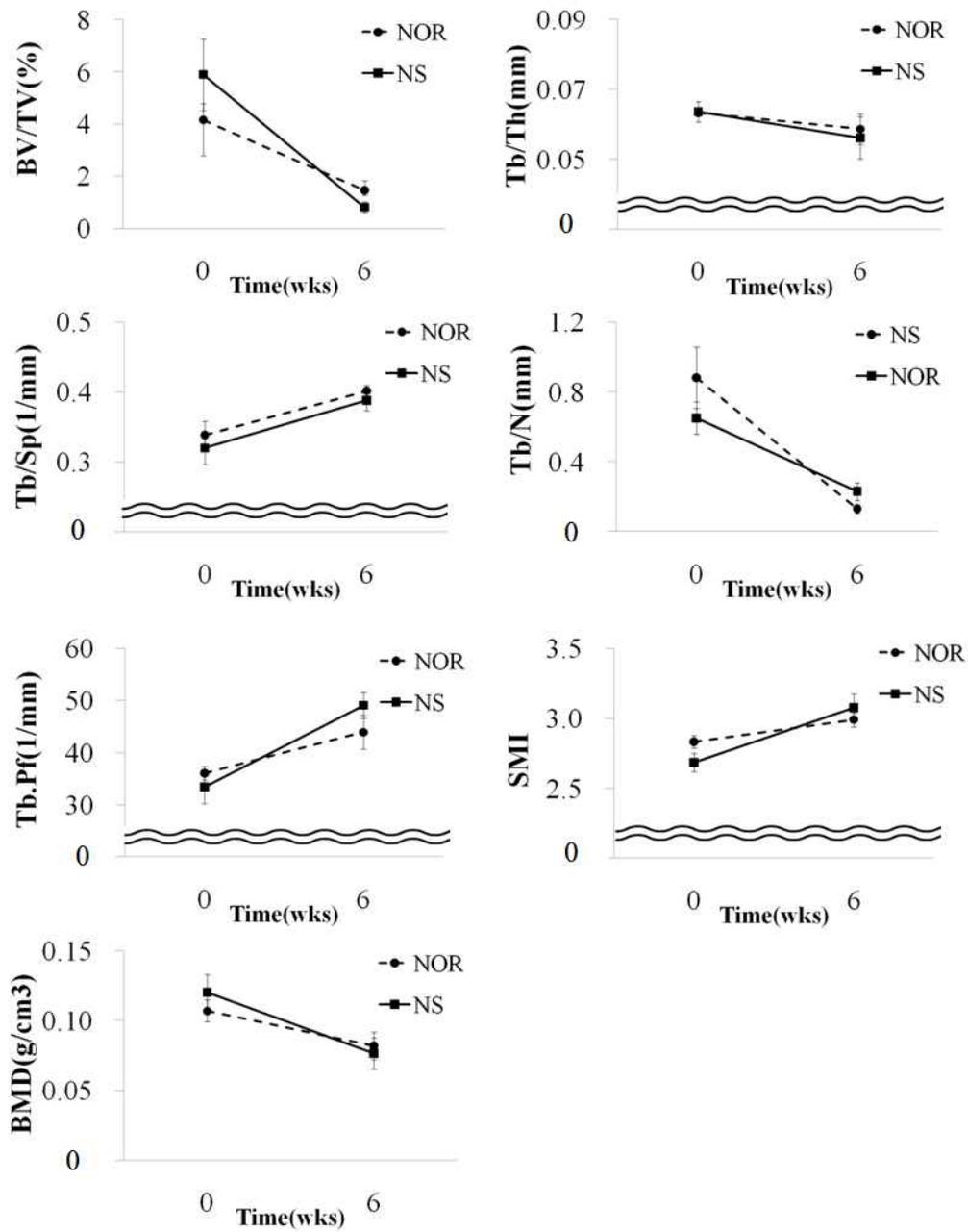


그림 4.4 : 6주간의 해면골의 BMD 및 구조적 파라미터의 변화 (MEAN±SE, NS vs. NOR at 0-6 weeks, $p>0.05$)

4.3.2 피질골의 BMD 및 구조적 파라미터

정강뼈의 피질골의 BMD 및 구조적 파라미터는 그림 3.5에서 확인 할 수 있다. 6주후 정강뼈의 피질골에서는 NS가 NOR에 비해 BMD는 3%, BV는 7%, MMI는 13%, Cs.Th는 5% 유의하게 작음을 확인하였다($p < 0.05$). 이와 같은 형태학적 차이는 그림 3.6에서 3차원 형태로 확인할 수 있다.

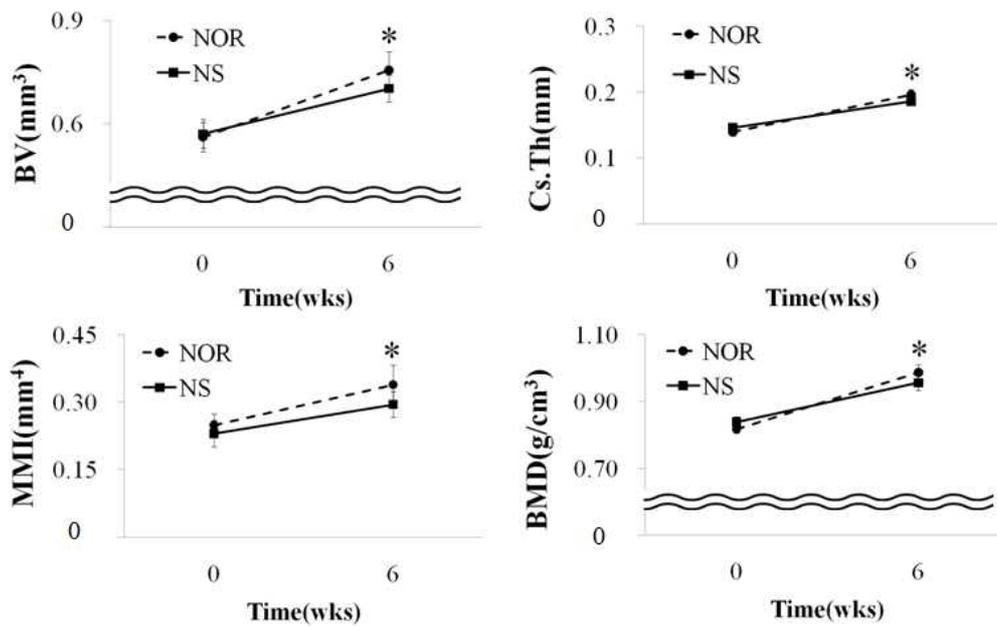


그림 4.5 : 6주간의 피질골의 BMD 및 구조적 파라미터의 변화 (MEAN \pm SE, * : NS vs. NOR at 0-6 weeks, $p < 0.05$)

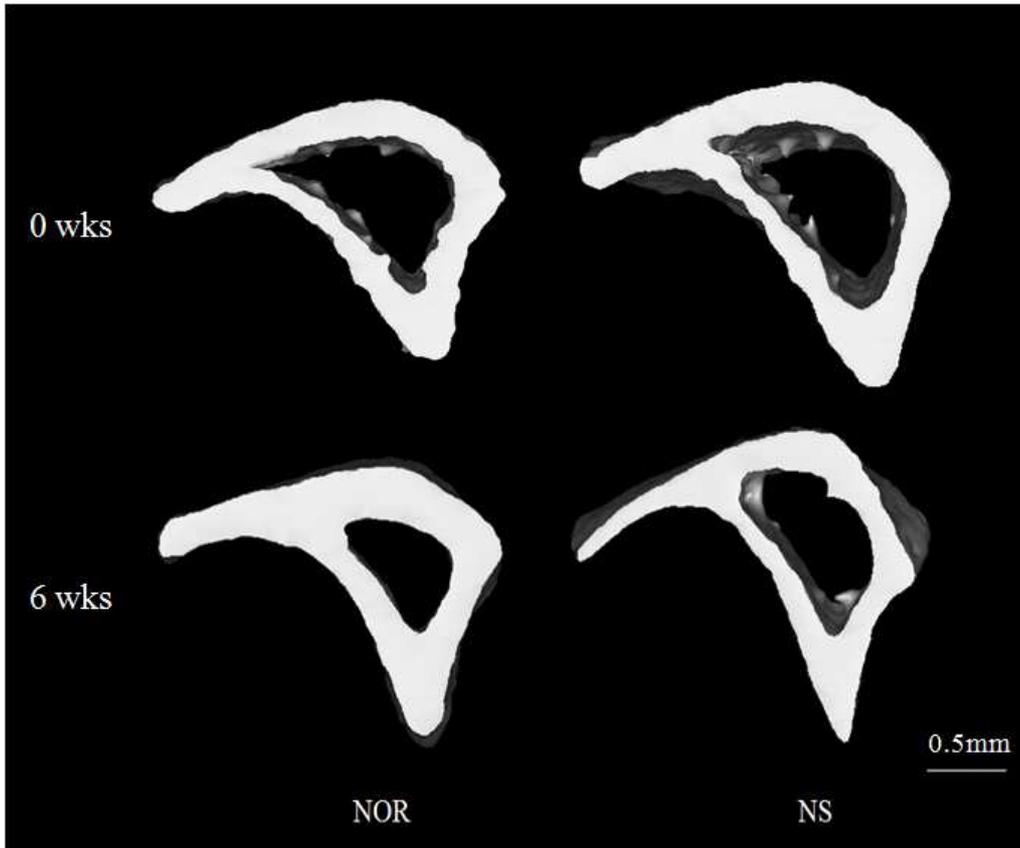


그림 4.6 : 0주와 6주 후 피질골의 3차원 영상

4.4 길이 및 성장판 비교

4.4.1 길이

정강뼈 길이는 그림 3.7에서 확인 할 수 있다.

6주후 정강뼈의 길이는 NS가 NOR에 비해 1% 작음을 확인 하였으나 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았다($p>0.05$).

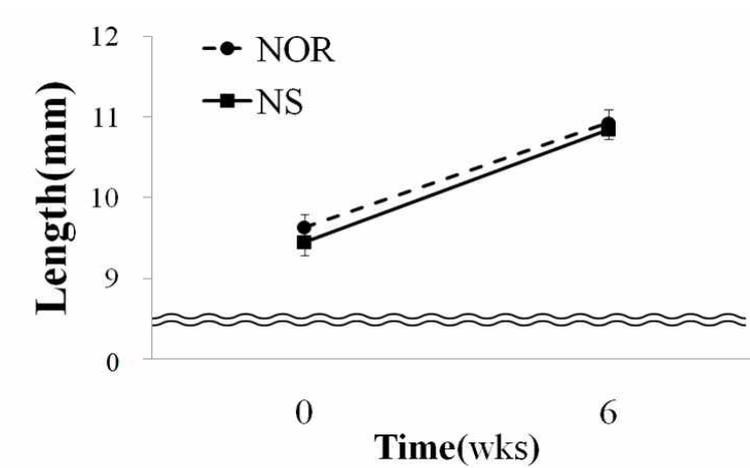


그림 4.7 : 6주간의 정강뼈의 길이 변화 (MEAN±SE, NS vs. NOR at 0-6 weeks, $p>0.05$)

4.4.2 성장판

정강뼈의 성장판의 부피와 두께의 차이는 그림 3.8에서 확인 할 수 있다.

6주후 정강뼈의 성장판에서는 NS가 NOR에 비해 GV는 22%, Gp.Th I 는 20%, Gp.Th II 는 20% 유의하게 작음을 확인하였다($p < 0.05$).

이와 같은 형태학적 차이는 그림 3.9, 3.10에서 3차원 형태로 확인 할 수 있다.

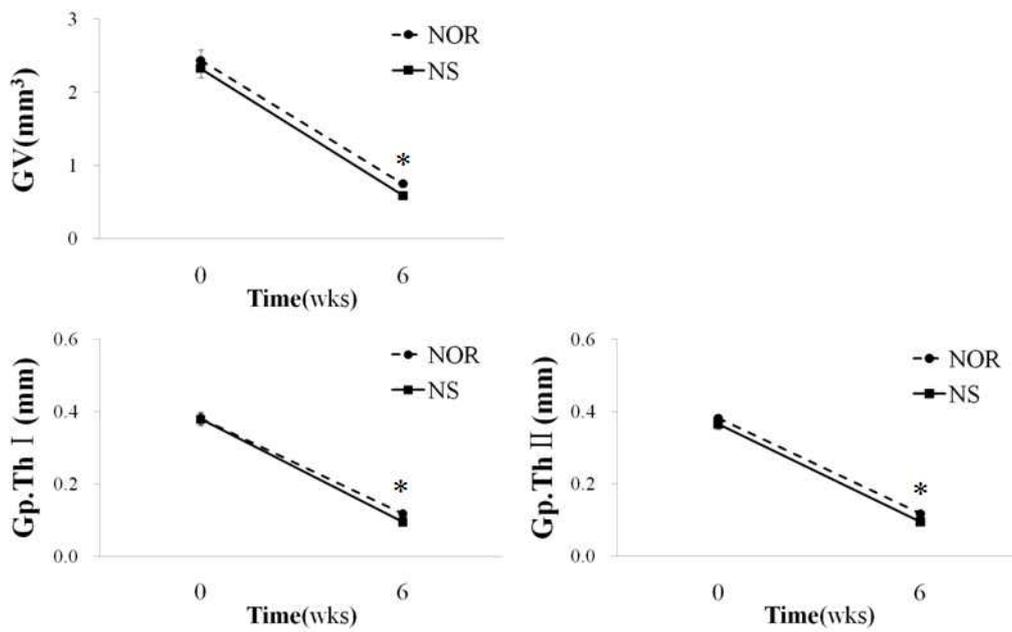


그림 4.8 : 6주간의 정강뼈 성장판의 변화 (MEAN±SE, * :NS vs. NOR at 0-6 weeks, $p < 0.05$)

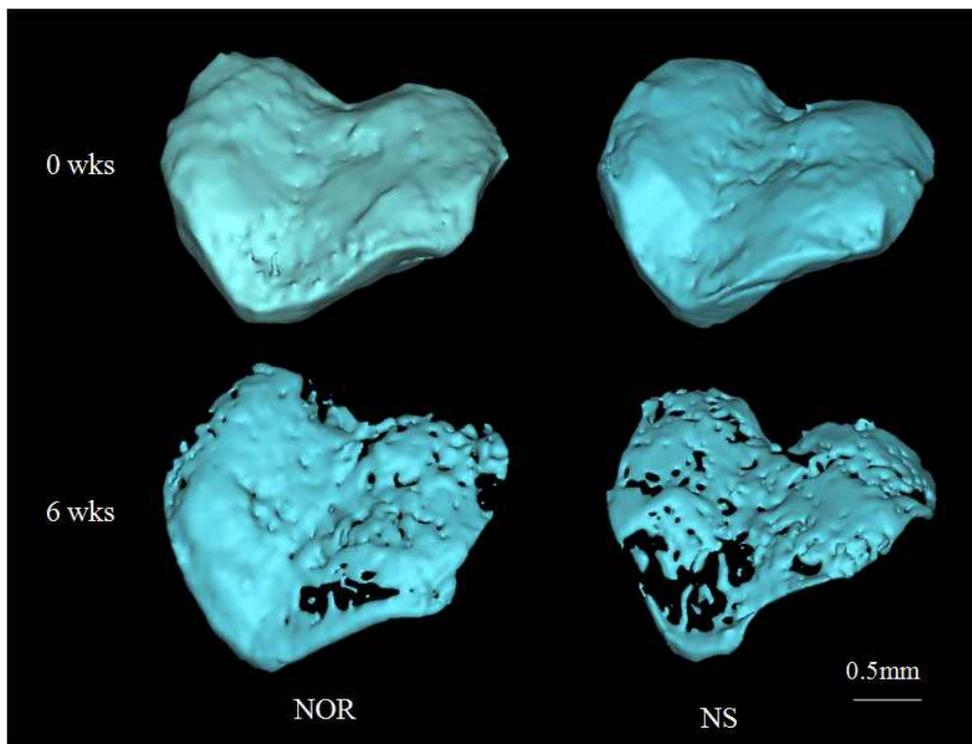


그림 4.9 : 0주와 6주 후 성장판 부피의 변화

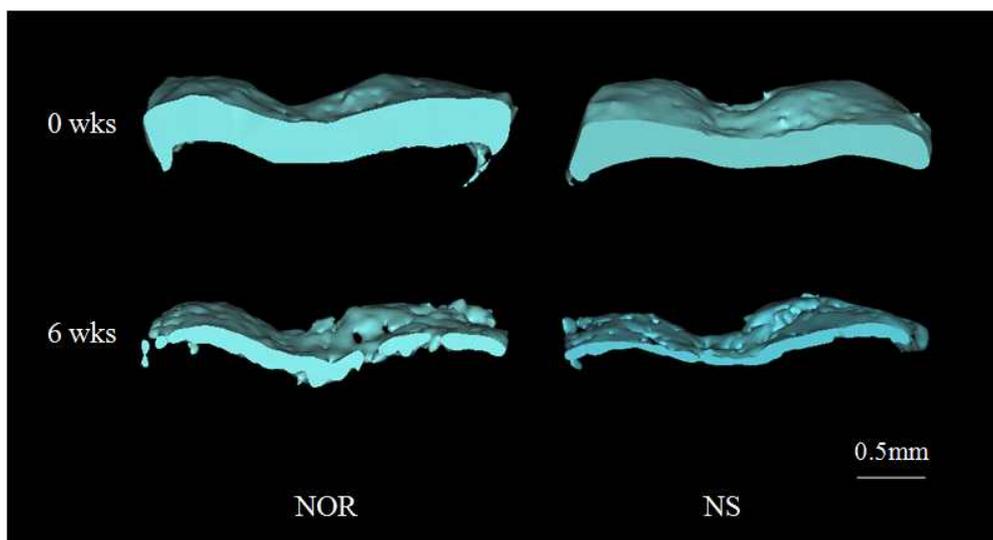


그림 4.10 : 0주와 6주 후 성장판 두께의 변화

제 5 장 고찰 및 결론

5.1 고찰

본 연구에선 성장기의 129/SV 수컷 쥐를 사용하여 빛을 이용한 불규칙 수면을 유발하였고, 이를 통해 일주기 리듬을 교란 시켰다. 일주기 리듬과 관련한 생화학적 마커들은 비교적 빠른 시간 안에 그 변화를 관찰 할 수 있으나, 생체 조직의 유의한 변화를 관찰하기 위해서는 장기간의 연구가 필요하다[3,5,9]. 이에 따라 본 연구는 2주 간격으로 수면 주기의 변화를 주어 총 6주 동안 생체 말초 조직의 표현형에 미치는 영향을 평가하였다. 이를 위해 복부 전체, 내장, 피하 지방의 각 부피, 정강뼈 해면골과 피질골의 BMD와 구조적 파라미터 그리고 정강뼈의 길이와 성장판의 부피와 두께를 측정하였다.

일주기 리듬의 교란으로 인한 생체 말초 조직의 변화를 평가하기 위해 생체 내 미세 단층 촬영 장치를 사용하였다. 생체 내 미세 단층 촬영 장치는 높은 해상도의 영상의 획득이 가능하며, 획득한 영상으로부터 3차원적인 조직 구조를 재구성할 수 있으므로 미소량의 조직 관별이 가능하다[10-13]. 따라서 해면골과 같은 경조직은 물론 지방과 같은 연조직의 미세구조 및 단면 영상을 촬영하고 분석하는데 매우 적합하다[10-13]. 또한 비 침습적인 방법으로 소동물의 단면 영상을 촬영할 수 있으므로 반복적인 측정이 가능하여 동일 개체의 조직 변화를 추적 관찰 하는데 용이하다.

이에 따라 생체 내 미세 단층 촬영 장치를 이용하여 생체 말초 조직 중 지방과 뼈를 측정하고 분석 하였다. 지방은 각종 성인 질환에 연관되어 있으며, 뼈는 생체 내에서 신체 구조의 지지와 운동을 가능하게 하고 외부의 자극으로부터 신체를 보호하는 등의 기능을 수행한다[5,10]. 이와 같은 두 생체 조직의 변화는 건강상의 문제뿐만 아니라 삶의 질에도 큰 영향을 끼친다.

6주 후 복부 지방의 경우 NS의 복부 전체 지방과 복부 내장 지방의 부피가 NOR에 비해 유의하게 큼을 확인 할 수 있었으나, 복부 피하 지방의 부피는 유의

한 차이를 보이지 않았다. 복부 지방의 축적은 심혈관, 뇌혈관 질환, 당뇨병 등의 중증 질환과 관련되어 있으며, 국소적인 지방 분포에 따라 관련된 질환이 다르다고 보고되고 있다[15-19]. 복부 내장 지방의 축적은 대사 증후군과 심혈관계 질환과 밀접한 연관이 있고[15-17], 복부 피하 지방은 인슐린 민감도와 높은 상관관계를 보인다[18,19]. 이에 따라 일주기 리듬의 교란으로 인하여 복부 지방, 특히 대사 증후군 혹은 심혈관계 질환의 원인을 제공 할 수 있는 복부 내장 지방의 축적이 크게 증가 한 사실을 확인 할 수 있었다.

6주 후 정강뼈의 해면골에서는 NS가 NOR에 비해 BV/TV, Tb.Th, Tb.Sp, Tb.N, BMD가 작고, Tb.Pf, SMI 큼을 확인하였으나, 통계적으로는 유의한 차이를 보이지 않았다. 하지만 피질골에서는 BV, MMI, Cs.Th, BMD 모두 NS가 NOR에 비해 유의하게 작음을 확인 할 수 있었다. 이는 6주 후 NS의 피질골이 NOR에 비해 구조적으로 뼈의 부피가 작고, 단면의 두께가 얇다는 것을 의미한다. 또한 MMI 감소로부터 비틀림에 저항하는 능력이 약해졌음을 확인할 수 있었다. 이를 통해 일주기 리듬의 교란이 정강뼈의 해면골에는 유의한 영향을 미치지 않았지만, 피질골의 형태학적 특성을 악화시킬 수 있다는 사실을 확인 할 수 있었다. 피질골은 뼈의 강도와 매우 밀접한 관련이 있다[10]. 따라서 일주기 리듬의 교란으로 인한 피질골의 형태학적 특성의 약화는 뼈의 강도를 약화 시키며, 이에 따라 골절 위험성이 증가할 수 있다는 사실을 확인 하였다.

또한 일주기 리듬의 교란이 뼈의 성장정도에 미치는 영향을 평가하기 위하여 정강뼈의 길이, 성장판의 부피와 두께를 측정하여 분석하였다. 6주 후 정강뼈의 길이는 두 그룹 간에 유의한 차이를 보이지 않았으나, 성장판에서는 NS의 GV, Gp.Th I, Gp.Th II가 NOR에 비해 유의하게 작게 나타남을 확인하였다. 이를 통해 본 연구 기간 동안 일주기 리듬의 교란이 정강뼈의 성장정도에는 큰 영향을 미치지 못했지만, 성장의 잠재적 요인인 성장판에 유의한 영향을 미침으로써 성장을 억제 할 수 있다는 사실을 확인 할 수 있었다.

이로써 불규칙 수면으로 인한 일주기 리듬의 교란은 복부 지방의 축적 증가로 인한 비만을 유발할 수 있고, 피질골의 형태학적 특성을 악화시킴으로써 골절 위험성을 증가시킬 수 있으며, 성장판의 감소로 인해 뼈의 성장을 억제 할 수 있음을

확인 하였다. 특히 본 연구에서는 성장기 동물을 대상으로 수행하였으며, 이는 유, 청소년들의 성장을 억제하여 발육 장애를 초래 하거나, 체지방의 증가, 특히 내장 지방의 증가로 인한 소아 비만이나 청소년 비만 등으로 이어져 각종 대사 질환 혹은 심혈관계 질환의 원인을 제공할 수 있다고 사료된다.

본 연구에서 수행된 뼈와 복부 지방의 변화에 관한 정량적인 분석은 불규칙 수면으로 인한 일주기 리듬의 교란이 생체 말초 조직의 표현형에 미치는 영향을 평가하는데 크게 기여 할 것으로 사료되며, 향후 일주기 리듬과 관련한 실험뿐만 아니라 다른 요인으로 인한 생체 말초 조직의 평가에 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

- [1] Y. Robert, M.D. Moore, CIRCADIAN RHYTHMS: Basic Neurobiology and Clin App, Annual Rev of Med, 48, 253 (1997)
- [2] EY. Joo, Circadian Neurobiology, Kor J Sleep Soc, 1, 1 (2006)
- [3] M. Akiyama, Y. Kouzu, S. Takahashi, H. Wakamatsu, T. Moriya, M. Maetani, S. Watabe, H. Tei, Y. Sakaki, and S. Shibata, Inhibition of Light- or Glutamate-Induced mPer1 Expression Represses the Phase Shifts into the Mouse Circadian Locomotor and Suprachiasmatic Firing Rhythms, J Neuroscience, 19(3), 1115 (1999)
- [4] OJ. Francine, N. Cermakian, DB. Boivin, Circadian Rhythms of Melatonin, Cortisol, and Clock Gene Expression During Simulated night Shift Work, SLEEP, 30, 1427 (2007)
- [5] S. Zvonic, AA. Ptitsyn, SA. Conrad, LK. Scott, ZE. Floyd, G. Kilroy, X. Wu, BC. Goh, RL. Mynatt, and JM. Gimble, Characterization of Peripheral Circadian Clocks in Adipose Tissues, Diabetes, 55, 962 (2006)
- [6] RA. Akhtar, AB. Reddy, ES. Maywood, JD. Clayton1, VM. King, AG. Smith4 TW. Gant, MH. Hastings and CP. Kyriacoul, Circadian Cycling of the Mouse Liver Transcriptome, as Revealed by cDNA Microarray, Is Driven by the Suprachiasmatic Nucleus, Cur Biol, 12(7), 540 (2002)
- [7] KH. Sun, SP. Kim, SH. Cho, SJ. Kim, NS. Cho, DH. Kim, JR. Son, Effect of sleep quality and Health in Emergency Medical Doctors on Duty at Night, J Kor Emerg med Soc, 20, 138 (2009)
- [8] SS Lee, CY Kang, DH Kim, An Evaluation of Shift-workers' Sleep and Social Life for the Hospital Workers, J Kor soc Ind Sys Eng, 30(2), 58 (2007)
- [9] FO. James, N Cermakian, DB. Boivin, Circadian Rhythms of Melatonin, Cortisol, and Clock Gene Expression During Simulated Night Shift Work,

- Sleep, 30, 1427 (2007)
- [10] CY Ko, YH Ryu, D Kang, et al., Effects of minimally invasive laser therapy system for treatment of bone loss, *Tissue Eng Regen Med*, 6, 1304 (2009)
- [11] BG Kim, JH Kwag, HS Kim, et al., Bone cell response to fluid shear stress and cyclic compressive strain in 3D trabecular bone, *Tissue Eng Regen Med*, 6, 540 (2009)
- [12] IC Sun, DK Eun, JH Na, et al., Heparin-coated gold nano particles for liver-specific CT imaging, *Chemistry*, 15, 13341 (2009)
- [13] YK Luu, S Lublinsky, E Ozcivici ,et al., In vivo quantification of subcutaneous and visceral adiposity by micro-computed tomography in a small animal model, *Med Eng Phys*, 31, 34 (2009)
- [14] G Enzi, M Gasparo, PR Biondetti, et al., Subcutaneous and visceral fat distribution according to sex, age, and overweight, evaluated by computed tomography, *Am J Clin Nutr*, 44, 739 (1986)
- [15] SK Kim, SH Kim, YM Lee, et al.,The comparison of intra-abdominal fatd istance (I-A Fat Distance) and visceral adipose tissue area (VAT) or visceral fat to skeletal muscle area ratio (VMR) measured by computed tomography (CT), *Kor JMed*, 64, 49 (2003)
- [16] JW Lee, HR Lee, J Shim, et al., Visceral abdominal fat as a determinant of arterial stiffness in overweight and obese women, *Kor J Acad Fam Med*, 27, 815 (2006)
- [17] SK Park, EH Kim, The effects of aerobic exercise on abdominal fat and leptin in obese adolescents, *Kor J Orien Assoc Study Obes*, 12, 173 (2003)
- [18] YS Kang, JH Kang, MC Kim, et al.,Cut off of percent body fat to predict obesity and metabolic risk in children and adolescents: 2007 children and adolescent physical growth standard, *Korean J Fam Med*, 30, 887 (2009)
- [19] BL Wajchenberg, Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation

- to the metabolic syndrome, *Endocr Rev*, 21, 697 (2000)
- [20] JM Oppert, MA Charles, N Thibault, et al., Anthropometric estimates of muscle and fat mass in relation to cardiac and cancer mortality in men : the Paris Prospective Study, *Am J Clin Nutr*, 75, 1107 (2002)
- [21] JC Seidell, Imaging techniques for measuring adipose-tissue distribution--a comparison between computed tomography and 1.5-T magnetic resonance, *Am J Clin Nutr*, 51, 953 (1990)
- [22] SH Bartling, J Kuntz, W Semmler, Gating in small-animal cardio-thoracic CT, *Methods*,50,42(2010)
- [23] BY Durkee, JP Weichert, RB Halberg, Small animal micro-CT colonography, *Methods*,50,36(2010)
- [24] L Martiniova, D Schimel, EW Lai ,et al., In vivo micro-CT imaging of liver lesions in small animal models, *Methods*, 50, 20 (2010)
- [25] SJ Schambach, S Bag, C Groden, et al., Vascular imaging in small rodents using micro-CT, *Methods*, 50, 26 (2010)

ABSTRACT

The effects of disturbance in circadian rhythms induced by night-shift on phenotype of peripheral tissues of growing mouse

Seo Dong-hyun

Dept. of Biomedical Engineering

The Graduate School

Yonsei University

The aim of this study/thesis is to evaluate the effects of disturbance in circadian rhythms induced by night-shift on phenotype of peripheral tissues ; tibiae and abdominal adipose tissues. In the present study, 14 growing 129/SV mice (5 wks, 18.5 ~ 22.5 g) were used and randomly allocated into two groups; normal (NOR) and night shift (NS). The tibiae and the torsos (the 2nd ~ 5th lumbar vertabrae) of mice were scanned at 0 and 6 weeks by using in-vivo micro computed tomography. The morphological characteristics of tibiae, the volume and thickness of growth-plates, and the volume of abdominal adipose tissues are measured and evaluated. Cs.Th, MMI and BMD on cortical bone in NS were significantly smaller than those in NOR ($p < 0.05$). However, there were no significant differences in the structural parameters and BMD on the trabecular bone between groups ($p > 0.05$). The volume and thickness of growth-plates of tibiae in NS were significantly smaller than those in NOR ($p < 0.05$). The volume of total and visceral abdominal adipose tissues in NS was significant bigger than that in NOR ($p < 0.05$). However, there were no significant differences of the volume of subcutaneous

abdominal adipose tissues in NS was significant bigger than that in NOR ($p < 0.05$). These results indicated that the disturbance in circadian rhythms induced by night-shift might affect on the morphology characteristic of cortical bone, the volume and thickness of growth-plate and the volume of abdominal adipose tissue.

Key words : night-shift, disturbance in circadian rhythms, peripheral tissue, in-vivo micro CT, morphological characteristics, structural characteristics, adipose abdominal tissue, tibia, growth plate