

2011년 2월
박사학위논문

고지방식이를 섭취한 흰쥐에서
시상하부 Neuropeptide Y-
면역반응 신경세포와 장내 Cajal
세포의 변화

조선대학교 대학원

의학과

문지영

고지방식을 섭취한 흰쥐에서
시상하부 Neuropeptide Y-
면역반응 신경세포와 장내 Cajal
세포의 변화

Changes in neuropeptide Y-immunoreactive cells in the
hypothalamus and in interstitial cells of Cajal in the small
intestine of the rat with high-fat diet

2011年 2月 25日

조 선 대 학 교 대 학 원

의 학 과

문 지 영

고지방식이를 섭취한 흰쥐에서
시상하부 Neuropeptide Y-
면역반응 신경세포와 장내 Cajal
세포의 변화

지도교수 박 상 기

이 논문을 의학박사학위신청 논문으로 제출함.

2010년 10월

조 선 대 학 교 대 학 원

의 학 과

문 지 영

문지영의 박사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 양 은 석 印

위 원 조선대학교 교수 문 경 래 印

위 원 조선대학교 교수 정 윤 영 印

위 원 조선대학교 부교수 김 은 영 印

위 원 조선대학교 교수 박 상 기 印

2010년 12월 일

조 선 대 학 교 대 학 원

목 차

표목차	ii
도목차	iii
초 록	1
I. 서론	3
II. 연구재료 및 방법	5
III. 결과	9
IV. 고찰	11
V. 결론	15
참고문헌	16

표 목 차

Table 1. Body Weights and Blood Glucose Levels in the Control and the High-fat Diet Group after Feeding for 6 Weeks

도 목 차

Fig. 1. NPY immunoreactivity from a control and a high fat-diet group in the rat hypothalamus.

Fig. 2. Representative photomicrographs of the NPY immunoreactivity from a control and a HFD group in the PVH and difference of the numbers of NPY-IR cells in the PVH between the control and the HFD group.

Fig. 3. Representative photomicrographs of the NPY immunoreactivity from a control and a HFD group in the Arc and difference of the numbers of NPY-IR cells in the Arc between the control and the HFD group.

Fig. 4. Representative photomicrographs of the c-Kit immunoreactivity from the control and the HFD group In the region of Auerbach's plexus (AP) of the small intestine.

Fig. 5. Representative photomicrographs of the c-Kit immunoreactivity from the control and the HFD group in the whole musculature of small intestine and quantification of the c-kit-IR cell proportions in the small intestine from the controls and the HFD groups.

ABSTRACT

Changes in neuropeptide Y-immunoreactive cells in the hypothalamus and in interstitial cells of Cajal in the small intestine of the rat with high-fat diet

Moon Ji Young

Advisor : Prof. Park Sang Kee, M.D., Ph.D.

Department of Medicine,

Graduate School of Chosun University

Neuropeptide Y (NPY) is a potent orexigenic neurotransmitter in the hypothalamus and induces hyperphagic response. Several antagonists of NPY have been developed, but their effects on suppression of food intake are limited. The interstitial cells of Cajal (ICC) are involved in the regulation of gastrointestinal motility.

The aim of the study was to assess the changes in NPY immunoreactivity in the hypothalamus and the changes in ICC in the small intestine of the rats fed high-fat diets (HFD). Male Sprague-Dawley rats (200~250g body weight) were randomly divided into two groups: control group (normal chow diet for 6 weeks), and HFD group (rodent Diet with 60%kcal fat for 6 weeks). The immunoreactivities of NPY in the hypothalamus and ICC in the small intestine were evaluated after every feed for 6 weeks.

NPY immunoreactivity was observed strongly in the hypothalamic nuclei in the HFD group compared to the control group. The numbers of NPY-immunoreactive (IR) cells were significantly higher in the paraventricular

hypothalamic nucleus in the HFD group than in the control group. In the region of Auerbach's plexus (AP) of small intestine, the staining intensity of the ICC-IR cells was reduced in the HFD group compared to the control group. The numbers of the ICC in the small intestine with HFD, including ICC in the inner circular and outer longitudinal muscle were significantly lower than in the control group.

Based on the results, it can be suggested that the action of NPY in the hypothalamus may become resistant after a HFD, and the loss of ICC in the small intestine after a HFD is probably functionally significant in gastrointestinal motility.

Key Words: High-fat diet, Neuropeptide Y, Interstitial cells of Cajal

I. 서 론

현대 사회에서 비만 환자의 증가에 대한 심신의 건강과 경제적 면에서의 심각성과 더불어 비만의 병태 생리에 대한 이해가 필요하다. Neuropeptide Y (NPY)는 뇌와 자율신경계에 있는 36개의 아미노산 펩티드 신경전달물질이며, 시상하부에서 분비되는 여러 신경전달 물질 중 가장 강력한 식욕자극제로 알려져 있다(1). NPY는 시상하부의 paraventricular hypothalamic nucleus (PVN), ventromedial hypothalamic nucleus (VMN)와 arcuate nucleus (ARC)에서 주로 분비된다. 주된 역할은 음식 섭취를 증가시키기 위한 호르몬과 대사 변화를 유발하고 신체 활동을 감소시키며, 지방을 축적하려는 작용을 통해 에너지 항상성을 유지한다(2-4). 식이와 운동 등 다양한 방법으로 체중을 감소시킨 비만 환자들에서 감소된 체중을 유지하기 어려운데, 이는 감소된 체중을 회복하기 위해 식욕을 증가시키려는 NPY의 작용에 의한 것으로 알려져 있다(5,6). 이에 비만 환자에서 NPY 수용체 길항제를 이용하여 NPY의 작용을 저해하는 식욕 억제제가 개발되어 사용되고 있지만, 기대한 만큼의 식욕 억제 효과는 보이지 않고 있다(7). 그러므로 정상과 비교하여 비만에서 시상하부의 NPY의 변화를 관찰할 필요가 있다.

Cajal 간질 세포 (Interstitial cells of Cajal, ICC)는 위장관에서 발견되는 간질세포의 일종으로, 평활근의 수축을 유발하는 pacemaker로써 역할을 한다. 당뇨병환자에서 소화불량, 복통, 오심, 구토, 복부 팽만 및 포만감 등의 위장관 증상들의 호소가 많지만 정확한 기전은 알려져 있지 않다. 최근 연구들에서 1형이나 2형 당뇨병을 유발 동물 실험에서 위장관의 Cajal 간질 세포의 발현 감소 등이 보고되고 있다(8). 대사증후군의 주요한 병인으로써 비알코올성 지방간질환(non alcoholic fatty liver disease, NAFLD)은 간에 과잉의 중성 지방이 축적되어 발생하며, 단순한 지방간에서 비알코올성 지방간염(nonalcoholic seatohepatitis, NASH)을 초래할 수 있고, 내장 비만, 2형 당뇨병, 지질 대사 이상

및 심혈관 질환과 흔히 동반된다(9). 성장과 발달시기 동안, 탄수화물이나 고지방식으로 인한 에너지 과잉상태는 지방세포에서의 지방생합성의 증가와 지방 산화의 감소를 초래할 뿐만 아니라, 지방 이외의 조직에 지방을 침착 시켜 지방 대사의 장애 및 인슐린 저항성을 초래할 수 있다. 이런 점에서 고지방식이에 의해 당뇨병이나 위장관 운동의 장애가 유발된다면, 소화기능의 장애뿐만 아니라 지방대사의 이상 발생과 함께 대사의 악순환이 초래될 수 있다.

본 연구는 고지방식이를 섭취한 흰쥐에서 식이조절 인자인 시상하부 NPY의 변화를 관찰하고, 소장 및 췌장의 Cajal 간질 세포의 변화를 관찰하고자 한다.

II. 연구재료 및 방법

A. 실험동물과 실험군

동일 연령의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐 14마리를 임의로 대조군 7마리(평균 체중; $283.3 \pm 7.5\text{g}$)와 고지방식이군 7마리(평균체중; $240.4 \pm 14.3\text{g}$)로 분류하였다 ($P=0.382$). 각 cage 별로 2-3마리씩 사육하였고, 21°C 의 실내온도와 12시간 씩 명암조절을 해주었다. 대조군에는 일반 흰쥐 사료를 충분히 섭취시켰으며, 고지방식이군에게는 60% Kcal 지방이 포함된 사료를 6주 동안 물과 함께 충분히 섭취하도록 하였다.

B. 연구 방법

1. 조직처리 및 표본제작

각 군의 실험동물은 6주간의 사료 섭취 후 ketamine ($5-10\text{mg/Kg}$, 유한양행)을 근육 주사하여 마취시켰다. 모든 실험동물은 고정하기 바로 직전 가슴을 열고 심장 채혈을 통해 혈당을 측정하였다. 심장 채혈 직후 좌심실에 관류용 도관을 삽입한 후, 헤파린 (250 unit/ml , 녹십자)을 함유한 생리식염수로 관류세척하고, 0.1M phosphate buffer (PB, $\text{pH}7.4$)에 녹인 4% paraformaldehyde 용액이나 Zamboni 고정액으로 관류 고정한 다음 시상하부를 포함한 뇌, 소장 및 췌장을 즉시 적출하여 동일한 고정액에 담가 4°C 에서 12시간 동안 후고정하였다. Free-floating 방법으로 면역조직화학염색을 시행하기 위해 고정된 뇌 조직은 후고정 후 30% sucrose에 넣고 24시간 이상 침적시킨 후 꺼내어 동결 절편기를 이용하여 $35 \mu\text{m}$ 두께의 연속관상 동결 절편을 제작하여 glycerol과 ethylene glycol이 함유된 저장용액에 담가 4°C 에

보관하였다. 후고정한 소장과 채장은 에탄올 탈수과정과 xylene을 거쳐 파라핀에 포매하여 8-12 μm 두께의 연속 절편을 제작하여 X-tra 슬라이드 (Surgipath, Richmond, U.S.A.)에 부착하였다. 탈파라핀 및 함수과정을 거쳐 첫 번째와 열 번째 절편은 hematoxylin과 eosin (H-E) 염색을 시행하였다. 이들 염색 표본에서 소장과 채장의 조직학적 특징을 광학현미경으로 확인하였다.

2. 면역조직화학 염색

1) NPY 면역조직화학 염색

저장용액에 보관한 조직절편을 매 5 장마다 1 장씩 취하여 0.1M PB로 옮겨서 여러 번 수세한 후 1% 과산화수소(H_2O_2)를 처리하여 내인성 과산화효소의 활성을 억제하였으며, 다시 0.1M PB로 세척한 후 면역조직화학반응을 실시하였다.

첫 단계로 비특이적 반응을 줄이기 위해 염소혈청(normal goat serum)을 실온에서 30분간 반응시켰다. 1차 항체는 rabbit polyclonal NPY (1:1000, Abcam)을 사용하였고, 4°C에서 24-48시간 동안 진동시키면서 반응시켰다. 이후 0.1M PB로 10분씩 3회 세척하였으며, 2차 항체는 biotinylated goat anti-rabbit IgG (Vector)를 실온에서 90분간 반응시켰다. 0.1M PB로 10분씩 3회 세척한 후 peroxidase가 표지된 avidin-biotin complex (ABC, Vector)를 1: 100으로 희석하여 실온에서 90분간 반응시켰다. 0.1M PB로 10분간 3회 세척한 후 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Vector)를 PB에 섞어 기질용액으로 사용하였는데, 반응 직전에 H_2O_2 를 0.003%가 되도록 첨가하였으며, 실온에서 5-10분간 반응시킨 후 현미경하에서 발색 정도를 확인하였다. 0.1M PB로 2-3회 세척한 후 염색한 조직절편들을 젤라틴이 피막된 슬라이드에 부착하여 실온에서 12시간 이상 건조한 다음, 일반적인 조직처리 과정을 거쳐 polymount (Polyscience)로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

2) ICC (C-kit) 면역조직화학 염색

소장과 췌장의 파라핀 포매 조직 절편은 파라핀 제거와 에탄올 함수과정을 거친 후 증류수로 세척하였다. 항원성 회복을 위해 citrate 완충용액 (10mM, pH 6.0)에 슬라이드를 담근 뒤 전자오븐을 이용하여 99°C에서 15분 동안 끓였다. 실온에서 20분간 식힌 다음 tris 완충용액에 세척하고 내인성 과산화효소의 활성을 억제시키기 위해 0.3% 과산화수소를 사용하여 20분 동안 처리하였다.

비특이적 반응을 줄이기 위해 염소혈청(normal goat serum)을 실온에서 30분간 반응시켰다. 1차 항체는 rabbit polyclonal c-kit (1:400, Neuromics)을 사용하였고, 4°C에서 24시간 동안 반응시켰다. 이후 0.1M PB로 10분씩 3회 세척하였으며, 2차 항체는 biotinylated goat anti-rabbit IgG (Vector)를 실온에서 90분간 반응시켰다. 0.1M PB로 10분씩 3회 세척한 후 peroxidase가 표지된 avidin-biotin complex (ABC, Vector)를 1: 100으로 희석하여 실온에서 90분간 반응시켰다. 0.1M PB로 10분간 3회 세척한 후 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Vector)를 PB에 섞어 기질용액으로 사용하였는데, 반응 직전에 H₂O₂를 0.003%가 되도록 첨가하였으며, 실온에서 5-10분간 반응시킨 후 현미경하에서 발색 정도를 확인하였다. 증류수로 세척하여 Mayer's hematoxylin으로 대조염색 후 일반적인 조직처리 과정을 거쳐 polymount (polyscience)로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다. 음성대조로는 1차 항체 대신에 정상 혈청을 1:10으로 희석하여 반응 시킨 후 그 결과가 음성인가를 확인하였다.

3. 통계학적 분석

6주간의 일반식이와 고지방식을 섭취한 두 군 간의 체중, 혈당 차이 및 두 군간 시상하부의 단위 면적당 NPY 면역반응 신경세포의 수와 소장에서 단위 면적당 면역반응 양성 ICC 즉 c-kit 양성 세포 수의 비교는 *t*-test를 이용하였다. 시상하

부에서는 통계처리의 정확성을 위해 NPY 면역반응 신경세포의 세포체에 확실히 염색된 경우만을 계수하였으며 한 개체 당 해당 핵을 포함하는 가장 앞쪽과 뒤쪽의 중간 위치에 해당하는 절편 두 장을 선택하였다. 따라서 각 군 별로 모두 12개 이상의 절편에서 각 시상하부핵을 대상으로 x 100 배에서 단위 면적당 NPY 면역반응 양성 세포 수를 계수하였다. C-kit 면역반응 양성 세포 수는 한 개체 당 2 장의 절편에서 각각 서로 다른 부위 5 곳을 선택하여 계수하였다. 따라서 각 군별로 개체 당 10개 부위의 소장 근육층을 대상으로 x 400 배에서 단위면적당 전체 세포 수에서 c-kit 면역반응 양성 세포 수의 비율을 %로 표시하여 값을 구하였다. 각 군별로 모든 값은 mean±SD로 표시하였다. 통계 검증은 *P* 값이 0.05 이하일 때 통계학적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였으며, SPSS 프로그램(version 17.0)을 사용하였다.

III. 결 과

A. 체중과 혈당의 비교

6주간의 일반 식이와 고지방식이 섭취 후 고지방식이군의 체중이 374.8 ± 46.1 g으로 대조군의 체중 324.5 ± 58.5 g보다 많았으나 유의한 차이는 보이지 않았다 ($P=0.07$). 혈당수치를 비교하였더니 고지방식이군 256.2 ± 25.2 mg/dL, 대조군 173.5 ± 35.8 mg/dL로 고지방식이군의 혈당이 유의하게 높았다($P=0.0009$, Table 1).

B. 시상하부에서 NPY 면역반응 양상의 비교

면역조직화학 염색을 통해 시상하부의 PVH, VMH과 Arc에서 NPY의 면역 반응 정도를 비교했을 때, 고지방식이군의 시상하부 핵들에서 대조군에 비해 NPY 면역 반응 양성 신경돌기들이 많아 전반적으로 면역반응이 더 강하게 나타났다(Fig. 1).

C. 시상하부 PVH에서 NPY 면역반응과 세포 수의 비교

두 군 모두 PVH내에서 많은 수의 NPY 면역반응 양성 세포체와 신경돌기들이 관찰되었다. 특히 고지방식이군에서 대조군에 비해 염색이 강하게 나타났다 (Fig. 2A). NPY 면역반응 양성 세포 수를 비교했을 때, 고지방식이군의 NPY 면역반응 양성 세포 수(86.8 ± 1.8)가 대조군(62.6 ± 1.5)에 비해 유의하게 증가하였다($P < 0.05$, Fig. 2B).

D. 시상하부 Arc에서의 NPY 면역반응과 세포 수의 비교

대조군과 고지방식이군 모두에서 시상하부 Arc에서의 NPY 면역반응 세포들이 강하게 염색된 것을 관찰할 수 있었으며 전반적으로 두 군 간의 면역 반응 양상에는 큰 차이가 없었다(Fig. 3A). 고지방식이군의 NPY 면역반응 양성 세포 수 (92.7 ± 1.9)가 대조군(84.7 ± 1.7)에 비해 증가하는 양상을 나타냈으나 통계학적으로 유의한 차이는 보이지 않았다(Fig. 3B).

E. 소장의 Auerbach's plexus 부위에서 c-kit 면역반응의 비교

대조군에서 소장의 Auerbach's plexus 부위의 c-kit 면역반응 강도가 높고, 양성 세포 수도 많이 관찰되었으나, 고지방식이군에서는 소장의 Auerbach's plexus 부위의 c-kit 면역반응 정도가 대조군에 비해 현저히 감소되었다(Fig. 4).

F. 소장의 근육층에서 c-kit 면역반응과 양성 세포 수 비율의 비교

고지방식이군에서 소장의 환상근(circular muscle)과 종주근(longitudinal muscle) 부위에서 c-kit 면역반응 강도가 대조군에 비해 약하게 나타났다(Fig. 5 A). 단위면적 당 c-kit 면역반응 양성 세포 수를 근육층 전체 세포 수에 대한 비율로 나타냈을 때, 고지방식이군의 c-kit 면역반응 양성 세포 수 비율(24.8 ± 3.9)이 대조군(44.9 ± 4.1)에 비해 유의하게 높았다($P < 0.05$, Fig. 5B).

IV. 고 찰

식생활 변화와 운동 부족에 따른 비만 급증과 더불어 인슐린 저항성 및 인슐린 분비 장애에 의한 2형 당뇨병이 증가하고 있다. 발생 기전으로 과잉의 지방이 비지방조직인 근육이나 간에 침착 되어 미토콘드리아의 산화성 대사 장애를 초래함으로써 인슐린 저항성 및 당뇨병이 유발될 수 있다는 연구들이 알려져 있다(10-13). 비만 환자에서 인슐린 저항성과 지방대사 이상을 포함하는 대사 증후군의 예방 및 치료를 위해 식이와 운동 요법이외에 식욕 조절 약제들이 투여되고 있다.

NPY는 뇌와 자율신경계에 있는 36개의 아미노산 펩티드 신경전달물질이며, 에너지 균형, 기억, 학습, 간질 조절 등을 포함한 뇌의 수많은 생리적인 과정과 관련되어 있다(14). 주된 역할은 음식 섭취를 증가시키고 신체 활동을 감소시키는 것이다. NPY는 시상하부에서 분비되고, 음식 섭취를 증가시킬 뿐만 아니라, 에너지를 지방으로 저장하는 비율을 증가시키고, 뇌로 가는 손상 신호를 막는다(15). NPY는 또한 노르아드레날린 신경세포의 혈관 수축 효과를 증대 시킨다. NPY는 시상하부에 위치하는데, 이런 NPY 신경세포 종말이 시상하부의 PVH 에 위치하고 있으며, NPY의 면역반응성이 시상하부의 PVH에서 가장 높은 수준으로 발견된다(16). 또 시상하부의 Arc에서 NPY mRNA의 발현이 높았다(17). 외부에서 NPY를 투여하거나 텍사메타손과 같은 NPY agonist를 시상하부에 주입해 음식 섭취가 늘어남을 확인한 연구가 있었다(18,19). 또한 음식 섭취에 대한 NPY 역할은 특정 NPY 수용체를 차단시켜, NPY 활동을 억제하고, 음식 섭취를 감소시키게 하는 것이다. 그러나 NPY 자율 수용체 Y2의 활동성이 오히려 NPY의 분비를 억제하고, 그것의 활동성에 따라 음식 섭취를 조절하게 된다는 연구 발표가 있었다(20). 이 연구에 따르면, Arc에 선택적 NPY 길항제를 주입 후 NPY가 의미 있게 증가하였다. 또 동물 실험에서 고지방 식이, 고당 식이 후 NPY의 억제보다는 NPY의 분비가 촉진되고 복부

의 지방 축적을 야기한다는 보고도 있다(21).

본 연구에서는 면역조직화학 염색을 통해 고지방식이를 섭취한 흰쥐 시상하부 PVH, Arc, VMH에서 NPY 면역반응의 변화를 대조군과 비교 관찰하였다. 고지방식이군의 PVH에서 NPY 면역반응의 강도가 대조군에 비하여 강하게 나타났으며, NPY 면역반응 세포 수도 고지방식이군에서 더 증가하였다. 또한 고지방식이군의 시상하부에서는 대뇌피질에서 흔히 관찰되는 전형적인 신경돌기를 가진 NPY 면역반응 신경세포를 볼 수 있었으며, 이는 고지방식이군의 각각의 시상하부 핵군에서 축삭을 포함한 신경돌기들의 증가로 NPY의 면역반응성이 더 증가한 것으로 생각할 수 있다. Arc에서는 고지방식이군과 대조군의 NPY 면역반응 강도는 큰 차이가 없었으며, NPY 면역반응 세포의 수도 고지방식이군에서 많았으나 대조군과 통계적학적으로 유의한 차이는 없었다. 이와 같은 결과는 고지방식이를 섭취한 경우 체중 증가가 있음에도 시상하부에서 식욕을 증가시키는 NPY의 증가 즉 NPY의 저항성이 나타남을 유추할 수 있다.

한편, Cajal 간질 세포는 위장관에서 발견되는 간질세포의 일종으로, 평활근의 수축을 유발하는 pacemaker로써 역할을 하며 특히 위의 연동운동에 결정적인 역할을 한다. Cajal 간질 세포는 전기적인 pacemaker 역할을 하고, 위장관에 자발적 전기 서파를 만들어낸다. Cajal 간질 세포에서 나온 이 느린 전기파는 평활근에서 탈분극을 통해 칼슘 이온 수축을 일으킨다. 이 서파는 장 수축을 유발하고, 연동운동과 분절 운동의 기초가 된다.

당뇨병 환자에서 소화불량, 복통, 오심, 구토, 복부 팽만 및 포만감 등의 위장관 증상들의 호소가 많다. 10년 이상 된 1형 및 2형 당뇨 환자의 30~50%에서 위장관의 신경 근육 기능 이상이 있으며, 경한 소화불량에서, 구역, 잦은 구토, 복통, 위장 마비까지 당뇨 위장병의 증상은 다양하다(18). 그러나 당뇨병과 이런 위장병의 관련성과의 정확한 기전은 알려져 있지 않다.

최근 위장 근육의 서파를 발생시키는 Cajal 세포에 대한 연구는 1형과 2형 당뇨병에서 장내 Cajal 세포의 소실이 당뇨병 환자에서 위장 운동의 장애를 초래한다고 보고하고 있으며(22, 23), 고지방식을 먹인 guinea pig의 담낭에서 Cajal 세포의 증식 및 생존에 관여하는 c-kit mRNA 발현이 감소한다는 연구가 있다(24). Wang 등은 streptozotocin을 투여하여 당뇨를 유도한 쥐의 위에서 Cajal 간질 세포가 감소하였으며, 이것이 당뇨 환자에서 위 배출을 감소시켜, 위장 마비와 관련이 있음을 보고하였다(25).

이에 따라 본 연구에서는 고지방식을 섭취한 흰쥐에서 소장의 Auerbach's plexus (myenteric plexus), 환상근, 종주근과 점막하 부위에서의 Cajal 간질 세포 면역반응성을 각 대조군과 비교 관찰하였다. 더불어 당뇨병에서 Cajal 간질 세포의 변화를 관찰하고자 streptozotocin을 투여하여 당뇨병을 유도한 흰쥐에서 Cajal 간질 세포의 변화를 관찰하였다. 흰쥐의 소장 중 공장에서 Cajal 간질 세포의 면역반응을 관찰 한 결과, 대조군에서는 염색 양상이 전반적으로 모든 단면에서 강하게 관찰된 반면, 고지방식이군에서는 가장 강하게 염색된 단면을 찾았음에도 불구하고, Auerbach's plexus, 환상근, 종주근과 점막하층 등 모든 층에서 대조군보다 염색 양상이 확연히 감소하였고, Cajal 간질 세포의 수도 유의하게 감소되어 있었다. 현재 진행 중인 췌장에서의 c-kit 면역조직화학 염색에서 고지방식이군의 Cajal 간질 세포가 대조군에 비해 더 많이 관찰되었으며, 이는 고지방식에 의한 혈당 증가를 보상하기 위하여 췌장에서의 인슐린 분비를 증가시키기 위한 보상 기전으로 생각되지만, 추후 더 많은 췌장 단면의 관찰과 전기적 실험이 동반되어야 할 것으로 사료된다. 또한 저자는 이전에 발표된 여러 연구자들의 보고에서와 같이 streptozotocin을 투여하여 당뇨병을 유도한 흰쥐를 대상으로 면역조직화학 염색을 시행한 결과, 대조군보다 streptozotocin을 투여한 흰쥐의 Cajal 간질 세포 면역반응성이 현저히 감소함을 알 수 있었다. 이는 당뇨병과 위장관 증상들에서 Cajal 간질 세포의 역할이 매우 중요함을 시사하는

소견이다. 향후 혈액 내 지방 대사산물들과 담낭을 포함한 위장관에서 Cajal 간질 세포의 면역반응 및 mRNA 발현에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

고지방식이에 의한 비만 쥐에서 시상하부 NPY 면역반응 신경세포의 증가가 관찰되었는데 이는 NPY 저항성을 나타내며, 소장에서 Cajal 간질 세포의 감소는 장운동의 이상을 초래할 것으로 사료된다. 향후 Cajal 간질 세포의 감소 기전을 밝히기 위하여 지방 대사와의 연관성에 대한 연구 및 위장관 전체를 대상으로 한 연구가 추가로 필요할 것으로 생각된다. 또한 본 연구에서 streptozotocin에 의해 유발된 당뇨병에서 소장의 Cajal 간질 세포의 변화도 관찰되어, 당뇨병과 전 위장관계 Cajal 간질 세포의 변화에 대해서도 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature*. 2000;404:661–71.
2. Stanley BG, Anderson KC, Grayson MH, Leibowitz SF. Repeated hypothalamic stimulation with neuropeptide Y increases daily carbohydrate and fat intake and body weight gain in female rats. *Physiol Behav* 1989; 46:173–7.
3. Kotz CM, Briggs JE, Grace MK, Levine AS, Billington CJ. Divergence of the feeding and thermogenic pathways influenced by NPY in the hypothalamic PVN of the rat. *Am J Physiol* 1998; 275 (2 Pt 2):R471–7.
4. Lin EJ, Sainsbury A, Lee NJ, Boey D, Couzens M, Enriquez R, et al. Combined deletion of Y1, Y2, and Y4 receptors prevents hypothalamic neuropeptide Y overexpression–induced hyperinsulinemia despite persistence of hyperphagia and obesity. *Endocrinology* 2006;147:5094–101.
5. MacLean PS, Higgins JA, Johnson GC, Fleming–Elder BK, Peters JC, Hill JO. Metabolic adjustments with the development, treatment, and recurrence of obesity in obesity–prone rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;287:R288–97.

6. Klem ML, Wing RR, Lang W, McGuire MT, Hill JO. Does weight loss maintenance become easier over time? *Obes Res* 2000;8:438–44.
7. Julan L, Guan H, van Beek JP, Yang K. Peroxisome proliferator-activated receptor delta suppresses 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 gene expression in human placental trophoblast cells. *Endocrinology*. 2005;146:1482–90.
8. Ordög T, Hayashi Y, Gibbons SJ. Cellular pathogenesis of diabetic gastroenteropathy. *Minerva Gastroenterol Dietol*. 2009;55:315–43.
9. Bugianesi E, Vanni E, Marchesini G. NASH and the risk of cirrhosis and hepatocellular carcinoma in type 2 diabetes. *Curr Diab Rep* 2007;7:175–80.
10. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes* 2001;50:1844–50.
11. Krssak M, Falk Petersen K, Dresner A, DiPietro L, Vogel SM, Rothman DL, et al. Intramyocellular lipid concentrations are correlated with insulin sensitivity in humans: a ¹H NMR spectroscopy study. *Diabetologia* 1999;42:113–6.
12. Lara-Castro C, Garvey WT. Intracellular lipid accumulation in liver and muscle and the insulin resistance syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am*

2008;37:841–56.

13. Petersen KF, Dufour S, Shulman GI. Decreased insulin-stimulated ATP synthesis and phosphate transport in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents. *PLoS Med* 2005;2:e233.

14. Colmers WF, El Bahh B. Neuropeptide Y and epilepsy. *Epilepsy Currents*. 2003;3(2):53–8.

15. Kimball J. Neuropeptide Y (NYP). *Kimball's Biology Pages: Hormones of the Gut*; 2008.

16. Allen YS, Adrian TE, Allen JM, Tatemoto K, Crow TJ, Bloom SR, et al. Neuropeptide Y distribution in the rat brain. *Science*. 1983;221:877–9.

17. Morris BJ. Neuronal localisation of neuropeptide Y gene expression in rat brain. *J Comp Neurol*. 1989;290:358–68.

18. Hanson ES, Dallman MF. Neuropeptide Y (NPY) may integrate responses of hypothalamic feeding systems and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *J Neuroendocrinol*. 1995;7:273–9.

19. White BD, Dean RG, Edwards GL, Martin RJ. Type II corticosteroid receptor stimulation increases NPY gene expression in basomedial hypothalamus of rats. *Am J Physiol*. 1994;266(5 Pt 2):R1523–9.

20. King PJ, Widdowson PS, Doods HN, Williams G. Regulation of neuropeptide Y release by neuropeptide Y receptor ligands and calcium channel antagonists in hypothalamic slices. *J Neurochem.* 1999;73:641–6.
21. Kuo LE, Czarnecka M, Kitlinska JB, Tilan JU, Kvetňanský R, Zukowskaa Z. Chronic stress, combined with a high-fat/high-sugar diet, shifts sympathetic signaling toward neuropeptide Y and leads to obesity and the metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1148:232–7.
22. Ordog T, Takayama I, Cheung WK, Ward SM, Sanders KM. Remodeling of networks of interstitial cells of Cajal in a murine model of diabetic gastroparesis. *Diabetes* 2000;49:1731–9.
23. Yamamoto T, Watabe K, Nakahara M, Ogiyama H, Kiyohara T, Tsutsui S, et al. Disturbed gastrointestinal motility and decreased interstitial cells of Cajal in diabetic db/db mice. *J Gastroenterol Hepatol* 2008;23:660–7.
24. Hu WM, Luo HS, Ding XW, Wang L. 2009 Expression of C-kit messenger ribonucleic acid and C-kit protein in the gallbladders in guinea pigs of high cholesterol diet. *Dig Dis Sci* 54:1651–5.
25. Wang XY, Huizinga JD, Diamond J, Liu LW. Loss of intramuscular and submuscular interstitial cells of Cajal and associated enteric nerves is related to decreased gastric emptying in streptozotocin-induced diabetes.

Neurogastroenterol Motil. 2009;21(10):1095–e92.

Table 1. Body Weights and Blood Glucose Levels in Control and High-fat diet Group after Feeding for 6 Weeks

	Control	High-fat diet	<i>P</i> value
Body weight (g)	324.5±58.5	374.8±46.1	0.07
Glucose (mg/dL)	173.5±35.8	256.2±25.2	0.0009

Values are expressed as Mean±SD

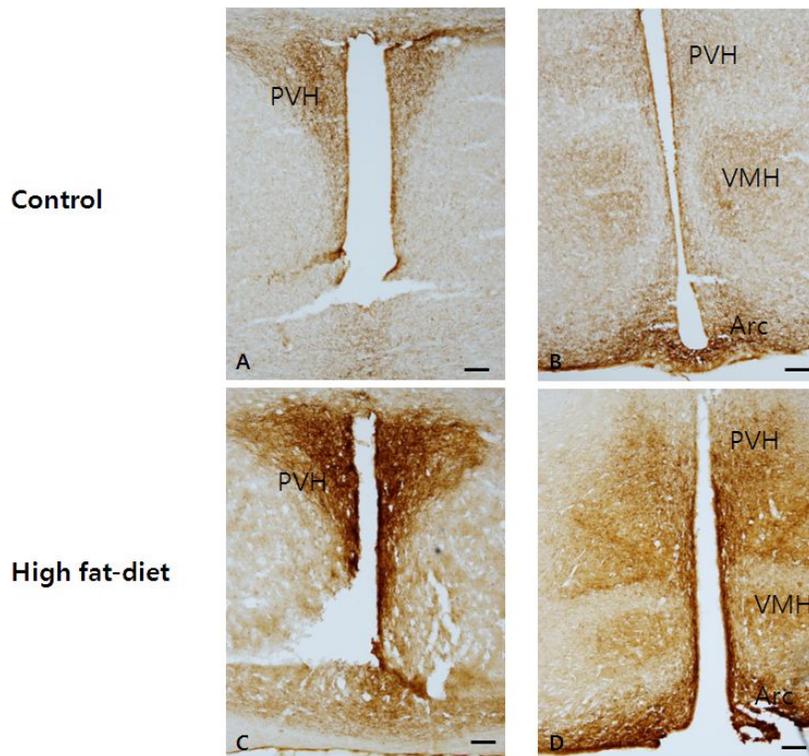
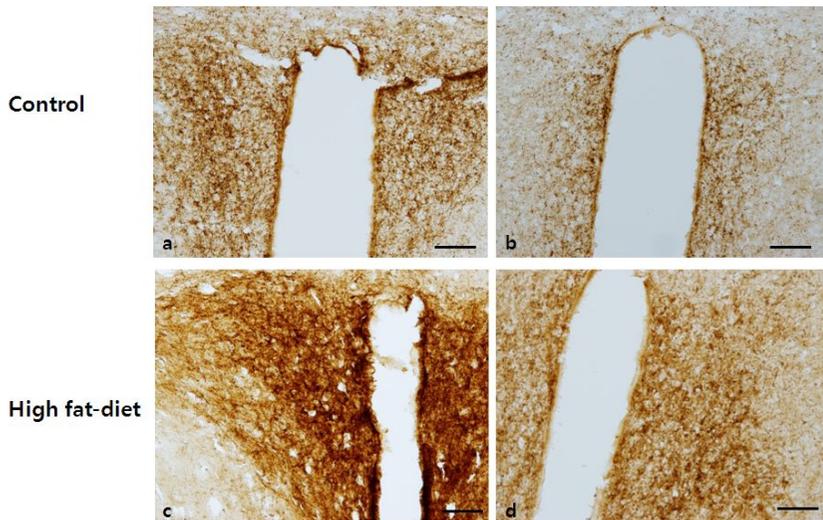


Fig. 1. NPY immunoreactivity from a control (A, B) and a high fat-diet (HFD; C, D) group in the rat hypothalamus. NPY immunoreactivity was observed in the PVH, VMH and Arc in both groups. NPY immunoreactivity was strongly detected in these hypothalamic nuclei from the HFD compared to the control group. Arc: arcuate nucleus; PVH: paraventricular hypothalamic nucleus; VMH: ventromedial hypothalamic nucleus; HFD: high-fat diet. Scale bars = 100 μ m

A.



B.

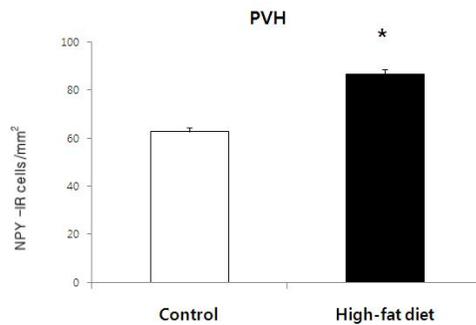
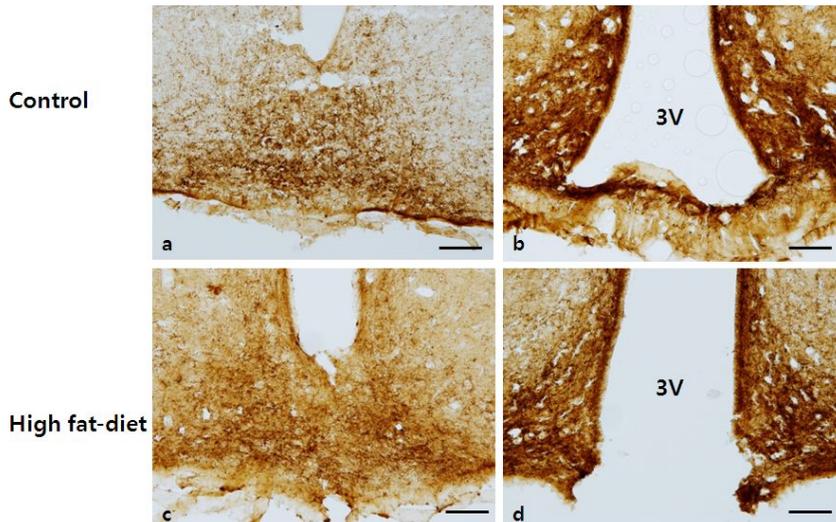


Fig. 2. A: Representative photomicrographs of the NPY immunoreactivity from a control (a, b) and a HFD (c, d) group in the PVH. The PVH contained large numbers of NPY-IR cell bodies and axon terminals in both groups. The staining intensity of NPY-IR cells was increased in the HFD group compared to the control group. Scale bars = 100 μ m. B: The numbers of NPY-IR cells in the PVH of the control and the HFD group. PVH: paraventricular hypothalamic nucleus; HFD: high-fat diet.

A.



B.

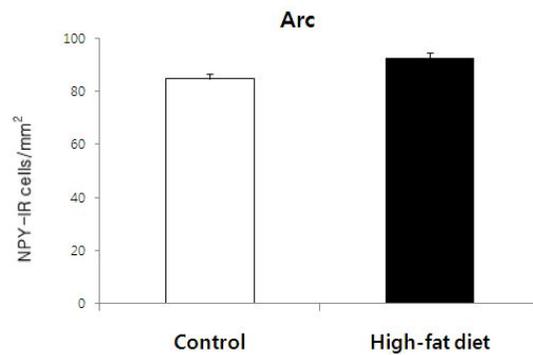
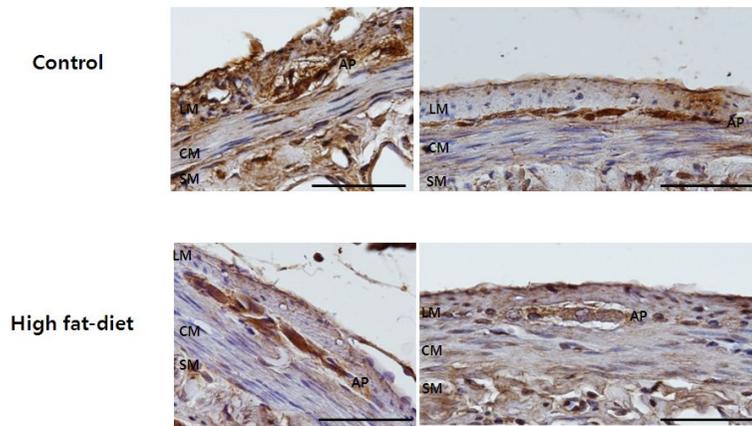


Fig. 3. A. Representative photomicrographs of the NPY immunoreactivity from a control (a, b) and a HFD (c, d) group in the Arc. Strong stained NPY-IR cells were observed in the Arc in both groups. Scale bars = 100 μ m. B: The numbers of NPY-IR cells in the Arc of the control and the HFD group. Arc: arcuate nucleus; HFD: high-fat diet.

A.



B.

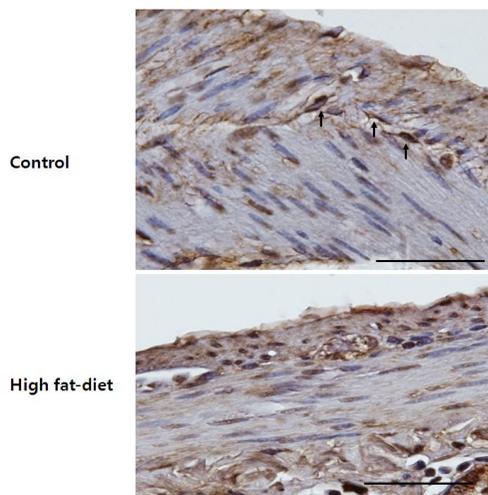
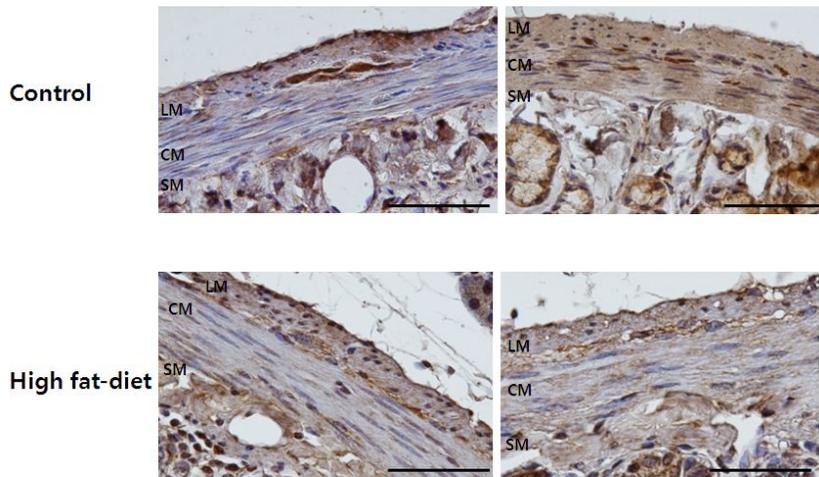


Fig. 4. A: Representative photomicrographs of the c-Kit immunoreactivity from the control and the HFD group in the small intestine. In the region of Auerbach's plexus (AP), the staining intensity of the c-Kit IR cells was reduced in the HFD group compared to the control group. B: Small arrows indicate c-Kit IR cells within the AP in the control group. AP: Auerbach's (myenteric) plexus; CM: circular muscle layer; LM: longitudinal muscle layer; SM: submucosa; HFD: high-fat diet. Scale bars = 100 μ m.

A.



B.

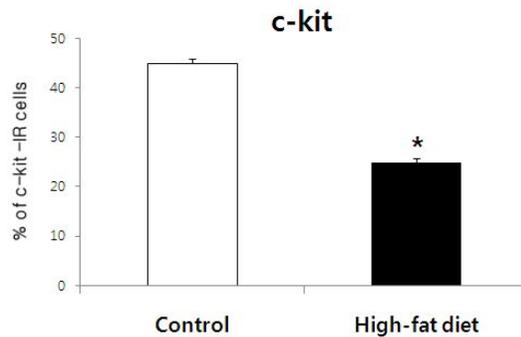


Fig. 5. A: Representative photomicrographs of the c-Kit immunoreactivity from the control and the HFD group in the whole musculature of small intestine. In the inner CM and outer LM, the staining intensity of the c-Kit IR cells was reduced in the HFD group compared to the control group. Scale bars = 100 μ m. B: Quantification of the c-kit-IR cell proportions in the small intestine from the controls and the HFD groups. * $P < 0.05$. AP: Auerbach's (myenteric) plexus; CM: circular muscle layer; LM: longitudinal muscle layer; SM: submucosa; HFD: high-fat diet.

저작물 이용 허락서

학 과	의학과	학 번	20087406	과 정	석사, <u>박사</u>
성 명	한글: 문 지 영 한문 : 文 智 英 영문 : Moon Ji Young				
주 소	광주광역시 동명동 73-22 동명뜨레빌				
연락처	e-mail : patchmjy@naver.com				
논문제목	한글 : 고지방식을 섭취한 흰쥐에서 시상하부 Neuropeptide Y-면역반응 신경세포와 장내 Cajal 세포의 변화 영문 : Changes in neuropeptide Y-immunoreactive cells in the hypothalamus and in interstitial cells of Cajal in the small intestine of the rat with high-fat diet				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의(0) 조건부 동의() 반대()

2011년 2 월 일

저작자: 문 지 영 (서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하