

백서에서 음식으로 인한 스트레스 대응축 활성화의 회복조절기전에서 구강인두로부터 입수되는 다양한 맛 자극의 효과

유상배¹ · 이종호¹ · 류비탈리² · 장정원¹

¹서울대학교 치의학대학원 구강악안면외과학교실 및 치학연구소

²Program in Neuroscience, Department of Veterinary and Comparative Anatomy, Pharmacology and Physiology, Washington State University

Abstract (J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg 2011;37:195-204)

Effects of oropharyngeal taste stimuli in the restoration of the fasting-induced activation of the HPA axis in rats

Sang-Bae Yoo¹, Jong-Ho Lee¹, Vitaly Ryu², Jeong-Won Jahng¹

¹Dental Research Institute, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Seoul National University School of Dentistry, Seoul, Korea

²Program in Neuroscience, Department of Veterinary and Comparative Anatomy, Pharmacology and Physiology, Washington State University, Pullman, WA, United States

Introduction: This study examined the regulatory mechanism underlying the meal-induced changes in the hypothalamic-pituitary-adrenal gland (HPA) axis activity.

Materials and Methods: Male Sprague-Dawley rats (250-300 g) were hired for two different experiments as follows; 1) rats received either 8% sucrose or 0.2% saccharin *ad libitum* after 48 h of food deprivation with the gastric fistula closed (real feeding) or opened (sham feeding). 2) rats received 5 ml of intra-oral infusion with 0.2% saccharin or distilled water after 48 h of food deprivation. One hour after food access, all rats were sacrificed by a transcardiac perfusion with 4% paraformaldehyde. The brains were processed for c-Fos immunohistochemistry and the cardiac blood was collected for the plasma corticosterone assay.

Results: Real feedings with sucrose or saccharin and sham feeding saccharin but not sucrose, following food deprivation decreased the plasma corticosterone level. c-Fos expression in the nucleus tractus of solitarius (NTS) of the fasted rats was increased by the consumption of sucrose but not saccharin, regardless of the feeding method. On the other hand, the consumption of sucrose or saccharin with real feeding but not the sham, induced c-Fos expression in the paraventricular nucleus (PVN) of the fasted rats. The intra-oral infusion with saccharin or water decreased the plasma corticosterone level of the fasted rats. Intra-oral water infusion increased c-Fos expression in both the PVN and NTS, but saccharin only in the NTS in the fasted rats.

Conclusion: Neither restoration of the fasting-induced elevation of plasma corticosterone nor the activation of neurons in the PVN and NTS after refeeding requires the palatability of food or the post-ingestive satiety and caloric load. In addition, neuronal activation in the hypothalamic PVN may not be an implication in the restoration of the fasting-induced elevation of the plasma corticosterone by oropharyngeal stimuli of palatable food.

Key words: Hypothalamic-pituitary-adrenal gland axis, Oropharyngeal food stimuli, Paraventricular nucleus, Nucleus tractus Solitarii

[paper submitted 2011. 2. 19 / revised 2011. 5. 30 / accepted 2011. 6. 7]

I. 서 론

뇌시상하부(hypothalamus)는 섭식행동 및 스트레스반응과 관련된 신경내분비계의 통합조절 작용이 이루어지는 부위이다^{1,2}. 뇌시상하부의 측뇌실핵(paraventricular nucle-

us)은 궁상핵(arcuate nucleus)의 신경세포들로부터 신경말단이 풍부하게 사출되어 있어, 궁상핵을 통해 전달되는 내장계의 감각정보를 통합 조절하여 섭식행동을 제어하게 하는 뇌부위이다³. 한편, 스트레스 대응축(hypothalamus-pituitary-adrenal gland axis; HPA axis)의 중심에 위치한 측뇌실핵은, 개체가 스트레스에 노출될 경우 부신피질 자극 호르몬 분비촉진 호르몬(corticotropin-releasing hormone)을 합성하여, 뇌하수체에서 부신피질자극호르몬(adrenocorticotrophic hormone)의 합성과 분비를 촉진시킨다. 부신피질자극호르몬은 부신피질로부터 스트레스 대응축 활성화의 최종산물인 당질코르티코이드(설치류의 경우, 코르티코스테론) 합성과 분비를 촉진시킨다^{4,5}. 생리적 스트레스

장 정 원

110-768 서울특별시 중로구 연건동 28

서울대학교 치의학대학원 치의학과 구강악안면외과학교실

Jeong Won Jahng

Dental Research Institute, Seoul National University School of Dentistry

28, Yeongeong-dong, Jongno-gu, Seoul, 110-768, Korea

TEL: +82-2-2072-0739 FAX: +82-2-766-4948

E-mail: jwjahng@snu.ac.kr

상황인 금식은 백서의 혈장 코르티코스테론 수준을 현저히 증가시키고^{6,9}, 재금식에 의해 혈장 코르티코스테론 수준은 빠른 시간 내에 정상 수준으로 회복된다^{10,11}.

구강을 통한 음식물의 섭취는 뇌간(brain stem)의 신경세포들을 활성화시킨다. 백서의 구강에 설치된 도관을 통해 열량이 있는 액상의 먹이를 주입할 경우, 미주신경 등쪽핵(dorsal motor nucleus of vagus), 고립로핵(nucleus tractus of solitarius; NTS) 및 최하구역(area postrema)에서 c-Fos 발현이 유도된다고 보고되었다¹². 구강을 통한 일반 사료의 섭취도 백서의 고립로핵에서 c-Fos 발현을 유도하는데, 절식 또는 금식시킨 백서의 고립로핵에서 c-Fos 발현 양상은 자유 금식 대조군에 비해 차이를 보이지 않는 것으로 보고되었다¹³. 위장도관 설치 시술 후 액상의 먹이를 섭취한 백서의 고립로핵에서 c-Fos 발현은 일반 사료 섭취 대조군의 경우와 비슷한 정도로 유도되며, 위장도관이 열린 상태에서 구강을 통한 액상 먹이의 섭취(sham feeding)는 특히 고립로핵의 전두부(rostral-NTS)에서 c-Fos 발현을 위장도관이 닫힌 액상 먹이 섭취 대조군(real feeding)의 경우와 유사한 정도로 유도한다고 보고되었다¹⁴. 음식물 섭취로 인한 위팽창(gastric distension)은 식사 시 포만감을 증진시키는데¹⁵, 위장의 기계적 팽창은 미주신경 등쪽핵, 고립로핵 및 최하구역으로 구성된 등 쪽 미주신경 집합체(dorsal vagal complex)에서 흥분성 시냅스 정보를 지닌 기계적 자극 수용체(vagal mechanoreceptor)를 활성화시킨다^{16,17}. 사후 위장 내용물(gastric content)의 무게와 고립로핵의 카테콜아민(catecholamine) 뉴런에서 c-Fos 발현 정도 사이에는 양성적인 상관관계(positive correlation)가 있다고 보고되었다¹³.

구강을 통한 음식물 섭취 시 고립로핵에 입수된 미각 및 위내장계의 정보는 뇌시상하부의 측뇌실핵으로 전달되어 스트레스 대응 축의 활성화 정도를 변화시키는 것으로 생각되고 있다. 신경세포 활성화의 인덱스로 사용되는 c-Fos 면역조직 염색법을 통한 연구로부터, 미각정보는 고립로핵, 그물형성체(reticular formation), 부완핵 및 편도체(amygdala) 등의 뇌영역에서 신경세포 활성을 유도한다는 사실이 알려졌다¹⁸. 혀와 입으로부터의 미각경로는 안면신경(VII), 설인신경(IX) 및 미주신경(X)을 통해 후두와 인두로부터 고립로핵의 전두부(rostral-NTS) 및 중간부(intermediate-NTS)에 도달한다¹⁸⁻²⁰. 고립로핵으로부터의 미각 정보는 초기 미각과 내장 신호의 통합이 일어나는 교뇌의 부완핵(parabrachial nucleus)에 투사되고^{19,20}, 그 신경원으로부터의 축삭은 시상의 배쪽후내측핵(ventral posteromedial nucleus)으로 사출된다^{19,21}. 시상핵으로부터 미각 정보는 뇌섬엽피질(insular cortex)이라 불리는 미각 신피질(neocortex)에 도달한다²¹⁻²⁴. 위내장계 자극경로는 미주신경을 거쳐 최하구역(area postrema)에 도달 후 고립로핵의 후두부(caudal-NTS)에 도달한다^{20,25}. 고립로핵에 전달된 위내장계 정보는 교뇌의 부완핵, 중앙 편도체(central amygdala) 및 뇌시상하부 측뇌실핵에 투사되고^{20,26}, 시상의 배쪽후핵(ventral

posterior lateral thalamus)의 소세포부로 전달되는 것으로 알려져 있다²⁷.

본 연구진은 이전 연구에서, 백서의 금식 동안 증가되었던 혈장 코르티코스테론 수준은 열량이 함유되지 않은 먹이 섭취에 의해서도 빠르게 회복되는 것을 보고하였다²⁸. 본 연구에서는, 백서의 금식 동안 증가된 혈장 코르티코스테론 수준의 회복 조절기전에서 구강 내의 다양한 맛 자극의 효과를 검색하였다.

Ⅱ. 연구 대상 및 방법

1. 실험동물

Sprague-Dawley 중 250-300 g의 수컷 백서를 구입(Koatech, Pyeongtaek, Korea)하여 서울대학교 치학연구소 실험동물실에서 사육 유지시켰고(서울대학교 실험동물 자원관리원 실험동물위원회 승인번호, SNU-070522-6), 실험 기간동안 온도($22 \pm 1^\circ\text{C}$)와 습도(55%)가 12시간 명암주기(명주기: 7:00-19:00)로 일정하게 유지되는 specific pathogen free (SPF) 환경에서 동물을 유지시켰다. 백서는 단독 cage에 유지시키며 물과 먹이를 자유롭게 섭취할 수 있도록 공급하였다. 실험시작 전 1주일간은 매일 체중을 측정하면서 실험실 환경과 실험자에게 익숙해지도록 적응시켰다. 실험군 간의 체중차이를 최소화하기 위해, 백서의 체중을 정렬(latin-square design)하여 실험군을 분류하였다.

- 실험 1. 위장계의 팽만감이 배제된 상태에서 구강을 통한 음식물의 자발적 섭취가 혈장 코르티코스테론 수준 및 뇌조직 뉴런 활성화에 미치는 효과 검색

위 도관이 설치 시술된 백서에게 위도관이 닫힌 상태(real feeding) 또는 열린 상태(sham feeding)에서 액상의 먹이를 자발적으로 섭취하도록 하였다. Real feeding을 통해서 음식물의 섭취와 소화과정에서 형성되는 구강 및 위내장계의 자극이 뇌로 전달될 수 있다^{29,32}. Sham feeding은 구강을 통해 섭취된 액상의 음식물이 위도관을 통해 누출되므로 위내장계의 자극이 배제된다³³.

실험군은 금식(food deprivation, FD)군, 설탕용액 real feeding (R/Suc) 또는 sham feeding (S/Suc)군, 사카린용액 real feeding (R/Sac) 또는 sham feeding (S/Sac)군으로 나누어 설정하였다. FD군은 48시간 동안 사료 공급을 중단하였고 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다. R/Suc군 또는 S/Suc군은 48시간 동안의 사료공급 중단 후 8% 설탕용액을 1시간 동안 자유로이 섭취하도록 하였다. R/Sac군 또는 S/Sac군은 48시간 동안의 사료공급 중단 후 0.2% 사카린용액을 1시간 동안 자유로이 섭취하도록 하였다.

각 실험군의 뇌 조직 시료는 심장 관류 법으로 고정된 후 채취하여 c-Fos 면역 염색법으로 분석하였으며, 혈액 시료

는 심장으로부터 채취하여 혈장 코르티코스테론 분석에 사용되었다.

- 실험 2. 음식물의 자발적 섭취행동, 위내장계의 포만감 및 흡수된 열량의 효과가 배제된 상황에서 구강 내의 음식물 자극이 혈장 코르티코스테론 수준 및 뇌조직 뉴런 활성화에 미치는 효과 검색

백서의 구강에 설치된 도관을 통해 액상의 먹이를 주입하였다. 실험군은 FD군, 증류수 주입(DW)군, 사카린용액 주입(Sac)군으로 나누었다. FD군은 뇌조직 및 혈액 시료 채취 전 48시간 동안 사료공급을 중단하였고 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다. DW군 및 Sac군은 48시간 동안의 사료공급 중단 후 구강도관을 통해 증류수 또는 0.2%의 사카린용액을 5 mL 씩 syringe infusion pump 를 사용하여 1분당 0.5 mL 의 속도로 서서히 주입하였다. 증류수 또는 사카린용액을 주입하고 1시간 후에 뇌조직 및 혈액시료를 채취하였다.

뇌조직 시료는 심장 관류법으로 고정된 후 채취하여 c-Fos 면역 염색법으로 분석하였으며, 혈액 시료는 심장으로부터 채취하여 혈장 코르티코스테론 분석에 사용되었다.

2. c-Fos 면역조직화학 염색법

백서의 복강에 pentobarbital (120 mg/kg)과 chloral hydrate 혼합액을 과용량 복강 내 주사하여 신속히 마취시킨 후, 심장 관류법(transcardiac perfusion)을 이용하여 헤파린(JW-pharma.co., Seoul, Korea)이 첨가된 0.9% 생리염수를 혈관에 흘려보내어 혈액을 제거하고, 이어서 냉각시킨 고정액(4% paraformaldehyde, 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.2)을 주입하여 조직을 고정시켰다. 생리염수와 고정액은 매 개체 당 각기 100 g당 50 mL 및 100 mL를 소모하였으며, peristaltic pump 를 사용하여 매 분당 4.5 mL의 속도로 서서히 주입하였다. 뇌를 신속히 적출하여 동일한 고정액으로 2시간 동안 4°C 에서 후고정시킨 후, 냉동절편 제작시 조직의 손상을 방지할 목적으로 30% sucrose 용액에 24시간 동안 보관하였다. Sliding microtome (Microm, Zeiss, Germany)을 이용하여 측뇌실험(bregma -1.3 mm와 -2.1 mm 사이)과 고립로핵(bregma -13.2 mm와 -14.3 mm 사이)³⁴ 조직을 40 µm 두께로 냉동박절하였다. 조직을 0.1 M PBS (phosphate buffered saline, pH 7.2)에 모았다. Triton 용액(1% bovine serum albumin, 0.2% Triton X-100, 0.1 M PBS)에 30분간 처리 후, polyclonal anti-rabbit c-Fos antibody (Calbiochem, CA, USA)로 상온에서 16시간 반응시켰다. PBS-BSA (0.5% BSA, 0.1 M PBS)로 조직을 세척하고, biotinylated anti-rabbit IgG (1:200, Vector Laboratories, CA, USA)로 1시간 동안 반응시켰다. 다시 PBS-BSA로 조직을 세척한 다음, avidin-biotin complex (ABC Elite kit, Vector Laboratories, CA, USA)에 1시간 반응시켰다. 0.1 M phosphate buffer로 조직을 세

척한 후, DAB (0.05% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, 0.003% hydrogen peroxide, 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2)를 이용하여 5분 동안 발색시켰다. 슬라이드에 부착된 염색된 뇌 조직은 일반적인 탈수(dehydration)와 청명(cleaning)과정을 거친 후, Permout (Fisher, CA, USA)를 이용하여 덮개 유리를 씌웠다.

3. 혈장 코르티코스테론 농도 측정

백서를 2항에서와 동일한 방법으로 마취한 후 흉강을 열고 심이를 통해 혈액을 채취하였다. 헤파린-나트륨 함유 진공 혈청 분리관(BD Vacutainer, NJ, USA)에 넣어 20분간 실온 방치하였다. 2,000 rpm에서 20분 동안 원심분리한 후, 혈장만을 수집하여 분석할 때까지 -70°C 극저온 냉동고에 보관하였다. 혈장 내 코르티코스테론 농도는 방사능 ¹²⁵I 으로 표지된 Rat Corticosterone Kit (DPC, CA, USA)를 이용하여 측정하였다.

4. 위장 도관 설치 시술(Gastric cannulation)

수술 전 위장을 완전히 비우기 위해 백서를 24시간 동안 금식시켰고, pentobarbital (70 mg/kg)과 chloral hydrate 혼합액(3 mL/kg)으로 마취시켰다. 수술을 위해 배쪽의 털을 면도하고 베타딘(Sung Kwang Pharm. co., Cheonan, Korea)으로 소독하였다. 복부 중심선에서 4-5 mm 측면에서 시작하여 1-1.5 cm의 복부절개를 실시하였다. 절개를 통해 위장이 노출되면 복강 밖으로 forcep으로 부드럽게 잡아 당겨 멸균 거즈 위에 놓았다. 위 앞쪽벽을 2-3 mm 절개해 스테인레스 스틸 재질의 도관(cannula)을 삽입후 이음새를 6번 실크를 사용하여 찜지 봉합(purse-string suture)하였다. 상처난 조직을 아물게 하고 위 주변에서 액이 새어나오지 못하도록 망상 직물(mesh)을 도관에 끼워 넣어 위 바깥 표면에 놓았다. 위를 원래 위치에 놓고 복부 근육과 피부를 3번 실크를 사용하여 단속적 봉합(interrupted suture)으로 절개 부위를 봉합하였다. 스테인레스 스틸 재질의 washer를 도관에 돌려서 끼워 넣고 나사를 도관안에 끼워 놓았다. 감염을 최소화하기 위하여 수술 후 4-5일 동안 항생제 trimethoprim sulfate (0.5 mL/kg)를 근육주사 하였다. 도관 설치 시술 후 7-10일간의 회복기 동안 영양이 배려된 유동식을 공급한 후 실험에 사용하였다.

5. 구강내 도관 설치 시술(Intraoral cannulation)

백서를 pentobarbital (45 mg/kg)과 chloral hydrate 혼합액(2 mL/kg)으로 마취시킨 후 턱밑의 피부를 2 mm 정도 절개하였다. 중간부위를 30도 정도로 구부린 20 게이지 스테인레스 스틸 바늘(길이: 1.5 inch)을 턱밑의 절개된 부위로부터 구강 안쪽으로 찔러 넣고, 한 쪽 끝에 지지대를 가진 20 cm

길이의 주입관(polyethylene tubing, PE 90, Clay Adams, MD, USA)의 반대쪽을 바늘 끝에 끼워서 턱밑으로 빼내었다. 두 귀와 앞다리의 중간쯤에 위치하는 등쪽 피부를 2 cm 정도 절개하고 철사를 넣어 피부 밑을 통과하여 턱밑 피부 절개 부위로 나오게 하였다. 턱밑으로 나와 있는 주입관을 철사에 끼우고, 철사를 잡아당겨서 주입관이 등쪽 절개부위로 끌려나오게 하였다. 주입관에서 철사를 분리하고 턱밑의 피부 절개부위를 3번 실크를 사용하여 봉합하였다. 등쪽 피부 절개부에 노출된 주입관에 보조관(supporting tube)을 끼우고 절개 부위의 안쪽 피부에 봉합 고정시킨 후, 절개부위의 피부를 수술 클립(surgical clip)으로 봉합하였다. 보조관을 한손으로 잡고 주입관을 다른 손으로 당겨서 지지대가 달린 주입관의 끝이 혀 밑에 제대로 위치되었는지 확인한 다음, 보조관의 위 쪽 끝부분과 주입관 사이의 공간을 순간접착제(3M, MN, USA)로 봉합하였다. 등쪽으로 노출되어 있는 주입관의 길이를 5-6 cm 정도 되게 자르고 주입관 속으로 생리염수를 주입하여 입에서 생리염수가 나오는지 확인한 후 수술 부위를 베타딘으로 소독하였다. 수술 후 3일 동안 항생제를 주사하였다. 7일 간의 회복기를 거쳐서 실험에 사용하였다.

6. 정량화 및 통계처리

c-Fos 항체로 면역염색된 세포의 수는 Olympus BX-50 광학현미경(Olympus Co., Tokyo, Japan)과 MCID image analyze system (Imaging Research Inc., Ontario, Canada)을 이용하여 측정하였다. 각 개체 당 해부학적으로 근접한 측뇌실험(bregma-1.88 mm 근접)의 2개의 조직절편들을 측정하여 각 절편 당 평균값을 계산하였다. 고립로핵은 후미부(c-NTS)와 중간부(i-NTS)의 지역으로 구분하여, 각 개체 당 4 개씩의 조직절편들을 측정하였다. 실험결과는 평균±표준오차로 나타내었으며, 통계분석을 위하여 statview (version 5.01, The SAS Institute, CA, USA) 프로그램을 사용하였다. 모든 실험 수치는 각 군간 분류하여 일원분산분석(one-way ANOVA) 방법을 사용하였다. 실험군간 분산분석 결과에서 유의한 차이는 최소유의차검정법(Fisher's protected least significance difference, PLSD)으로 사후검정법(post-hoc test)을 수행하여 차이를 규명하였고, 각각의 그래프들은 GraphPad PRISM (version 3.02, GraphPad Software Inc., CA, USA)을 사용하여 나타냈다.

III. 결 과

1. 구강을 통한 음식물의 자발적 섭취가 혈장 코르티코스테론 수준 및 뇌조직 뉴런 활성화에 미치는 효과

위 도관이 설치 시술된 백서에게, 48시간 동안의 금식 후 real feeding 또는 sham feeding 방식으로 액상의 먹이를 1시간 동안 자발적으로 섭취하도록 하였다. 설탕용액을 공급받은 실험군에서는 real feeding군(R/Suc)에 비해 sham feeding군(S/Suc)의 음용량이 감소된 것으로 보였지만, 통계적으로 유의한 차이는 아니었다.(Table 1) 사카린용액을 공급받은 경우에는 real feeding군(R/Sac)에 비해 sham feeding군(S/Sac)의 음용량이 현저히 감소되었다.($P<0.05$)

각 실험군에서 채취된 혈액의 혈장 코르티코스테론 농도를 방사성 동위원소를 이용한 면역분석법으로 측정하였다. R/Suc군의 혈장 코르티코스테론 수준은 금식군(FD)에 비해 통계적으로 유의하게 감소되었지만($P<0.05$), S/Suc군의 혈장 코르티코스테론 수준은 FD군에 비해 차이를 보이지 않았다.(Fig. 1) 한편, 금식 후 사카린용액을 음용한 실험군은 R/Sac군 뿐 아니라 S/Sac군에서도 혈장 코르티코스테론 수준이 FD군에 비해 통계적으로 유의하게 감소되었다.($P<0.05$)

각 실험군의 측뇌실험과 고립로핵 조직절편으로 c-Fos 면역조직화학 분석을 실행하였다.(Figs. 2, 3) 측뇌실험의 c-Fos 면역조직화학 염색강도는 R/Suc군 또는 R/Sac군에서 나머지 실험군들에 비해 증가된 것으로 관찰되었다.(Figs. 2. A-E) c-Fos 면역양성 핵의 수를 정량 분석한 결과, 설탕용액 또는 사카린용액의 real feeding군 측뇌실험에서 c-Fos 면역양성 핵의 수가 금식군에 비해 통계적으로 유의하게 증가되었으며($P<0.05$), S/Suc군 또는 S/Sac군에서는 이와 같은 증가가 관찰되지 않았다.(Fig. 3. A) 고립로핵의 c-Fos 면역조직화학 상을 검색한 결과(Figs. 2. F-O, 3. B), 설탕용액을 음용한 실험군에서는 섭식방법에 상관없이 고립로핵 후미부(R/Suc, $P<0.05$; S/Suc, $P<0.001$)와 중간부(R/Suc, $P<0.01$; S/Suc, $P<0.001$)에서 c-Fos 면역양성 핵의 수가 금식군에 비해 뚜렷하게 증가되었다.(Fig. 3. B) 사카린용액을 real feeding 또는 sham feeding 방식으로 음용한 실험군의 고립로핵에서 c-Fos 면역양성 핵의 수는 금식군의 것과 차이를 보이지 않았다.

Table 1. Liquid intake during 1 h of refeeding period following 48 h of food deprivation

Groups	R/Suc	S/Suc	R/Sac	S/Sac
Liquid Intake (g)	15.236±1.193	12.964±1.690	11.566±2.191*	6.393±1.271

(R/Suc: 1 h real refeeding with sucrose, S/Suc: 1 h sham refeeding with sucrose, R/Sac: 1 h real refeeding with saccharin, S/Sac: 1 h sham refeeding with saccharin)

* $P<0.05$ vs. S/Sac, Data is presented by means±S.E.

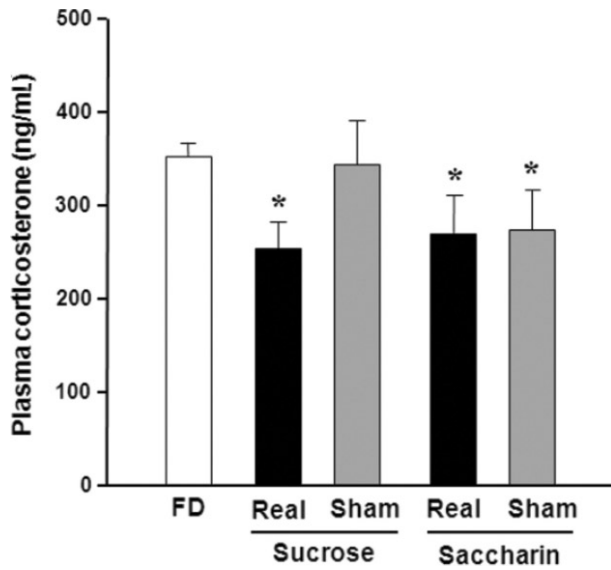


Fig. 1. Plasma corticosterone levels. Rats received *ad libitum* access to either 8% sucrose or 0.2% sodium saccharin for 1 h with gastric fistula closed (real feeding) or opened (sham feeding) following 48 h of food deprivation. Cardiac blood was collected immediately after exposing the heart for perfusion, and the plasma level of corticosterone was analyzed by radioimmunoassay. (FD: 48 h food deprivation)
* $P<0.05$ vs. FD. Data is presented by means \pm S.E.

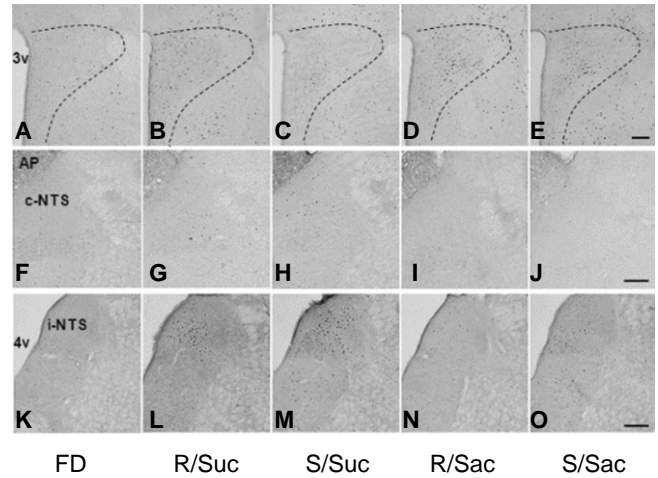


Fig. 2. c-Fos immunohistochemistry in the PVN and the NTS. Rats were trans-cardiac perfused with 4 % PFA immediately after 1 h of *ad libitum* access to either 8% sucrose or 0.2% sodium saccharin for 1 h with gastric fistula closed (real feeding) or opened (sham feeding) following 48 h of food deprivation. Distinctive black dots represent c-Fos immunoreactivity (-ir) nuclei. A-E. PVN, f-j, caudal NTS (c-NTS), K-O. intermediate NTS (i-NTS). (FD: 48 h food deprivation, R/Suc: 1 h real refeeding with sucrose, S/Suc: 1 h sham refeeding with sucrose, R/Sac: 1 h real refeeding with saccharin, S/Sac: 1 h sham refeeding with saccharin, AP: area postrema, 3v: 3rd ventricle, 4v: 4th ventricle)
Scale bars: 200 μ m.

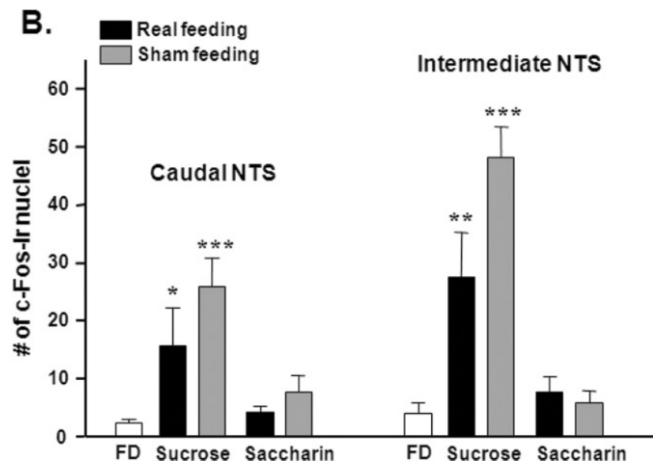
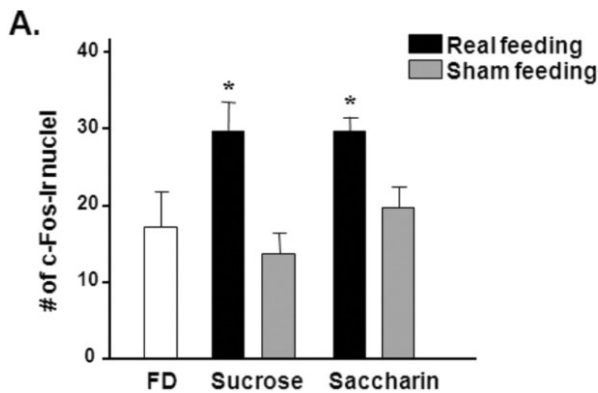


Fig. 3. The number of c-Fos-immunoreactive (-ir) nuclei in the PVN (A) and NTS (B). (FD: 48 h food deprivation)
* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs. FD. Data is presented by means \pm S.E.

2. 구강 내의 음식물 자극이 혈장 코르티코스테론 수준 및 뇌조직 뉴런 활성화에 미치는 효과

음식물의 자발적 섭취행동, 위내장계의 포만감 및 흡수된 열량의 효과가 배제된 상황에서 구강 내의 음식물 자극의 효과를 검색하기 위해, 백서의 구강에 도관을 설치 시술하였다. 48시간 동안 사료 공급이 중단된 백서의 구강에 도관을 통해 0.2%의 사카린용액을 주입하고 1시간 후 혈장 코르티코스테론 수준을 검색한 결과, 금식군(FD)에 비해 현저하게 감소($P<0.05$)된 것을 알 수 있었다.(Fig. 4) 또한, 금식 후 구강도관을 통해 증류수가 주입된 DW군의 혈장 코르티코스테론 수준도 FD군에 비해 통계적으로 유의한 감소를 보였다.($P<0.05$)

각 실험군의 측뇌실험에서 c-Fos 면역양성 핵의 수를 정량 분석한 결과(Fig. 5. A), DW군의 측뇌실험에서 c-Fos 유전자발현이 FD군에 비해 증가된 것으로 분석되었다.($P<0.05$) 사카린용액 주입군(Sac)의 측뇌실험에서 c-Fos 유전자발현은 FD군과 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.(Fig. 5. A) 한편, 금식 후 구강도관을 통한 사카린용액의 주입은 고립로핵에서 c-Fos 유전자 발현을 효과적으로 유도하여, 고립로핵의 중간부($P<0.05$)에서 c-Fos 면역양성 핵의 수가 FD군에 비해 뚜렷하게 증가되었다.(Fig. 5. B) 흥미롭게도, DW군의 고립로핵 중간부에서 c-Fos 면역양성 핵의 수가 FD군에 비해 증가된 것으로 분석되었다.($P<0.05$)

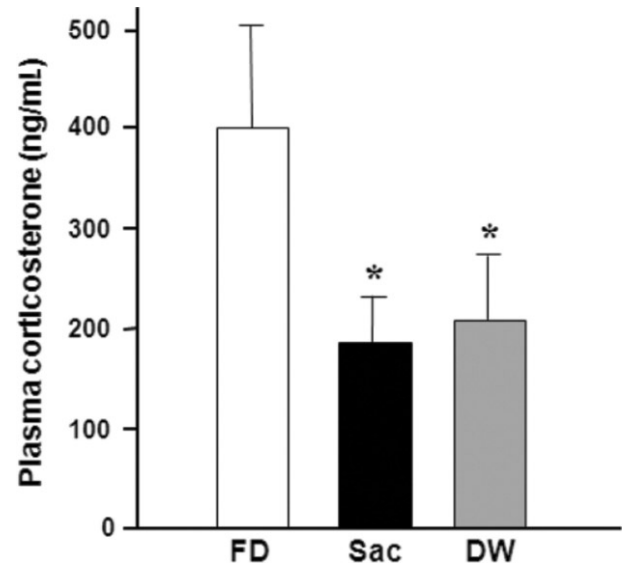


Fig. 4. Plasma corticosterone levels. Rats received intra-oral infusion with saccharin or distilled water for 10 min following 48 h of food deprivation, and then were sacrificed for analyzing plasma level of corticosterone.(FD: 48 h food deprivation, Sac: intra-oral infusion with 0.2% saccharin, DW: intra-oral infusion with distilled water)

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs. FD, Data is presented by means \pm S.E.

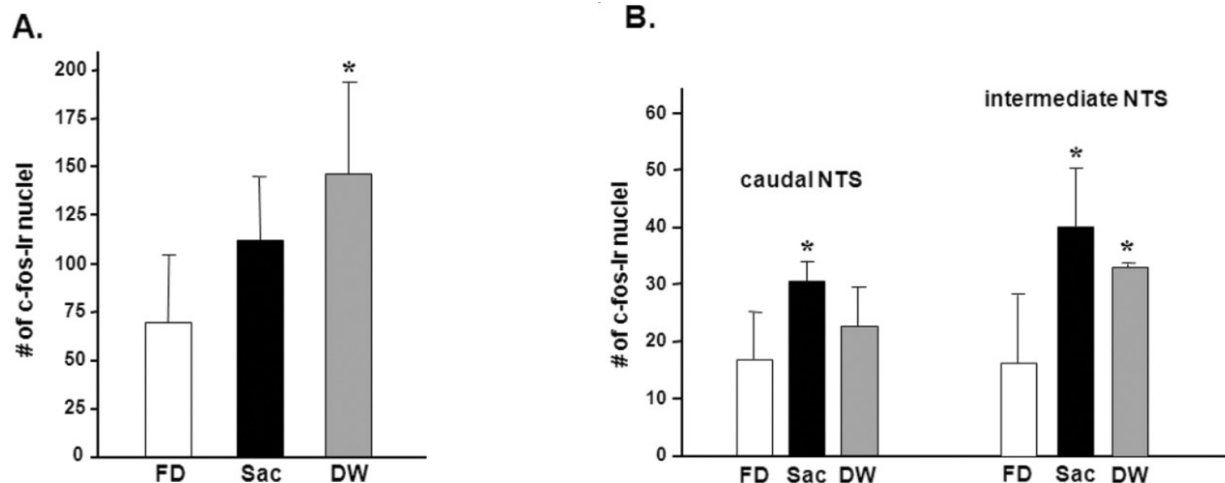


Fig. 5. The number of c-Fos-immunoreactive (-ir) nuclei in the PVN (A) and NTS (B).(FD: 48 h food deprivation, Sac: intra-oral infusion with 0.2% saccharin, DW: intra-oral infusion with distilled water)

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs. FD, Data is presented by means \pm S.E.

IV. 고찰

1. 구강을 통한 음식물 섭취에 따른 혈장 코르티코스테론 변화

백서의 혈장 코르티코스테론 수준은 금식 동안 증가되고^{6,9}, 재금식 후 빠른 시간 내에 정상수준으로 회복된다고^{10,11} 보고되었다. 본 연구진은 이전의 연구에서, 재금식 시 열량이 배제된 사료 역시 비록 정상 사료보다 속도는 느리지만 금식 동안 증가된 혈장 코르티코스테론 수준을 회복시키는 것으로 보고하였다²⁸. 본 연구에서, 위도관이 설치된 백서에게 금식 후 real feeding 방식으로 설탕용액 또는 사카린용액을 음용하도록 한 결과, 혈장 코르티코스테론 수준이 금식 대조군에 비해 유의하게 감소된 것으로 나타났다. 이러한 결과는 열량의 유무에 관계없이 단 맛이 있는 음식물의 섭취는 금식 동안 증가되었던 혈장 코르티코스테론 수준을 회복시킬 수 있음을 시사한다. 맛있는 음식의 섭취는 스트레스에 대한 심리적이고 생리적인 반응을 감소시킬 수 있다고 보고되었다³⁵. 역설적 수면 부족(paradoxical sleep deprivation, PSD)이 유도된 백서에서 사카린 및 설탕용액의 섭취는 혈중의 부신피질 자극 호르몬 및 코르티코스테론 수준을 감소시킨다고 보고되었다³⁶. 위도관이 설치된 백서에서 real feeding 방식은 위도관을 닫은 상태에서 음식물을 자발적으로 섭취하도록 하는 방법으로, 음식물의 섭취과정 동안 음식의 질감이나 맛 등의 구강 내의 물리, 화학적 자극뿐 아니라 위내장계에서 포만감 및 소화 흡수로 인한 자극 정보들을 형성하게 된다²⁹⁻³². 따라서 단 맛이 나는 음식물 섭취에 따른 구강 및 위내장계의 정보는, 영양성분의 소화 흡수로 형성되는 정보가 배제된 상태에서도, 금식으로 인한 스트레스 대응축의 활성화를 회복시키는 신호가 될 수 있는 것으로 사료된다.

한편, 금식 후 사카린용액 또는 설탕용액을 sham feeding 방식으로 음용시킨 결과, 사카린용액 sham feeding군의 혈장 코르티코스테론 수준은 금식 대조군에 비해 감소되었으나, 설탕용액 sham feeding군은 금식 대조군과 차이를 보이지 않았다. Sham feeding 방식은 위도관이 열린 상태에서 음식물을 섭취하도록 하는 방법으로, 구강에서 섭취된 액상의 음식물이 위도관을 통해 위장밖으로 유출되므로 음식의 질감이나 맛 등의 구강 내의 물리, 화학적 자극은 형성하지만³³ 위내장계의 포만감 및 소화 흡수로 인한 자극 정보의 형성을 최소화시킬 수 있기 때문에, 백서에서 음식 맛의 선호도를 측정하기 위한 유용한 방법으로 알려져 있다²⁹. 따라서 이전의 보고³⁷에서와 같이 금식 후 sham feeding군의 사카린용액 음용량이 real feeding군의 사카린 음용량보다 현저히 감소했음에도 불구하고, 사카린용액 sham feeding군의 혈장 코르티코스테론 수준이 금식군에 비해 감소되었다는 사실은, 구강 및 인두에서의 단 맛 정보가 금식으로 인한 스트레스 대응축 활성화를 회복시키는데 강

력하고 유효한 자극이 됨을 시사한다. 그런데, 금식 후 sham feeding군의 설탕용액 음용량이 real feeding군의 설탕용액 음용량과 유사했음에도 불구하고, 설탕용액 sham feeding군의 혈장 코르티코스테론 수준은 금식군의 것과 차이를 보이지 않았다는 점은 주목할 만하다. 이전의 연구에서, 금식상태의 백서에게 sham feeding을 하였을 때, 포도당용액의 음용량이 사카린용액 음용량에 비해 현저히 많은 것으로 보고된 바 있다³⁸. 본 연구의 sham feeding 결과에서도, 열량이 없는 사카린용액 음용량에 비해 열량이 있는 설탕용액 음용량이 많은 것을 알 수 있다. 앞서, sham feeding은 백서에서 음식 맛의 선호도를 측정하기 위한 유용한 방법으로 사용된다는 사실을 언급한 바²⁹, 백서의 구강 및 인두에서 포도당, 설탕 등의 열량이 있는 단 맛을 열량이 없는 사카린의 단 맛보다 선호하는 맛으로 인지한다는 것을 알 수 있다. 따라서 구강 인두에서 사카린의 단 맛 인지는 금식에 의한 스트레스 대응축 활성화를 회복시키는 데 효과적 신호를 형성하였으나, 백서가 사카린보다 선호하는 설탕의 단 맛은 오히려 효과적이지 못하였다는 결론에 이르게 된다. 현재로서는 그 기전을 설명할 만한 근거는 없으나, 구강 인두를 통해 인지된 설탕 맛의 정보로부터 백서가 예상하였던 위내장계를 통한 열량의 유입이 sham feeding 방식에서는 이루어지지 않은 것이 또 다른 스트레스 상황이 되었을 가능성을 짐작할 수 있다.

백서의 위장에 설치된 도관을 열고 진행하는 sham feeding 방식의 실험 결과에서, 금식 스트레스, 즉 금식으로 인한 스트레스 대응축의 활성화를 완화시키는 데 있어서 구강 및 인두를 통한 사카린 맛의 수용은 유효한 효과를 내었으나, 설탕 맛의 수용은 그렇지 못하였다. 금식 스트레스의 완화 효과가 구강 인두에서 특정 맛의 수용을 필요로 하는지 알아보기 위해, 금식 상태의 백서에게 구강 도관을 통하여 소량의 사카린용액 또는 증류수를 공급하였다. 구강에 설치된 도관을 통해 음식물을 공급하는 방법은, 자유롭게 움직이는 백서에게 동일한 양의 액상 음식물을 일정한 속도로 공급하여 미각 자극에 대한 반응을 평가하는 방법으로 사용된다³⁹. 금식 후 소량의 증류수만을 공급받은 백서의 혈장 코르티코스테론 수준이, 사카린 공급군의 경우와 마찬가지로, 금식군에 비해 통계적으로 유의하게 감소된 결과는, 금식 스트레스의 완화를 위해 구강 인두내의 특정 맛 수용이 필수적이지 않음을 시사한다. 이전의 연구에서, 백서에서 48시간 동안의 금식은 물에 대한 양성적 쾌감(hedonic) 반응을 증진시킨다고 보고되었다⁴⁰. 쾌감 반응의 조절 기전에는 전뇌의 중격의지핵이 중심 역할을 하는 것으로 알려져 있으며⁴¹⁻⁴³, 스트레스 반응 시 중격의지핵 뉴런의 활성화가 수반된다고 보고되었다⁴⁴⁻⁴⁷. 본 연구 결과에서, 백서의 금식 후 구강 인두에 주어진 소량의 증류수 자극은 고립로핵 및 측뇌실핵의 뉴런 활성화를 유도하는 사실을 알았다. 따라서 금식 후 구강 인두에 주어지는 소량의 증류수에 의한 금식 스트레스 완화효과에는 고립로핵 및 측뇌

실행 뉴런 활성화와 연계하여 중격의지핵 뉴런의 기능이 관련되었을 가능성을 짐작할 수 있다.

2. 구강을 통한 음식물 섭취에 따른 측뇌실행 뉴런의 활성화 기전

백서의 경우, 음식물 섭취시 측뇌실행 및 고립로핵에서 c-Fos 유전자 발현이 유도되는데^{10,12-14,48}, 특히 열량을 함유한 단 맛 음료의 real feeding은 측뇌실행 뉴런에서 c-Fos 발현을 유도한다고 보고되었다⁴⁸. 본 연구에서는 열량을 함유한 단 맛 음료인 설탕용액뿐 아니라 열량을 함유하지 않은 단 맛 음료인 사카린용액의 real feeding에 의해서도 측뇌실행의 c-Fos 발현이 뚜렷하게 유도되었으나, sham feeding으로 섭취된 설탕용액 및 사카린용액은 측뇌실행 뉴런에서 c-Fos 발현을 유도하지 못함을 보여 주었다. 이 결과는 음식물 섭취 시, 음식물에 함유된 열량이나 음식의 맛 정보보다는 위내장계의 팽만감이 측뇌실행 뉴런의 활성화를 유도하는 유효한 자극 정보가 됨을 시사한다. 백서의 위장에 설치된 풍선을 이용한 이전의 연구에서 위장의 인위적 팽창은 측뇌실행 뉴런의 활성화를 유도한다고 보고된 바 있다¹⁶. 음식물의 섭취 시 구강 인두에서의 맛 자극과 위내장계의 팽만감 등의 자극 정보는 후뇌의 고립로핵을 통해 시상하부의 측뇌실행으로 전달되는 것으로 알려졌다^{18,20,49}. 본 연구에서, 설탕용액의 real feeding 또는 sham feeding은 모두 고립로핵 후미부 및 중간부 뉴런의 활성화를 효과적으로 유도하였으나, 측뇌실행 뉴런의 활성화는 설탕용액 real feeding에 의해서만 유도되었다. 이 결과는, 구강을 통한 음식물 섭취 시 구강 인두에서 형성되는 자극에 의한 고립로핵 뉴런의 활성화는 측뇌실행 뉴런의 활성화를 유도하기에 충분한 정보가 아님을 시사한다. 한편, 음식물 섭취 시 위내장계의 정보는 간뇌의 고립로핵 후미부와 교뇌의 부완핵을 거쳐 시상하부의 측뇌실행으로 전달된다고 알려져 있다^{20,26}. 본 연구에서 위장도관이 설치된 백서의 사카린용액 real feeding은 고립로핵 뉴런의 활성화를 효과적으로 유도하지 못하였음에도 불구하고 측뇌실행 뉴런의 활성화를 뚜렷하게 유도한 것을 보았다. 이는, 음식물 섭취 시 위내장계의 자극 정보는 고립로핵 후미부 뉴런의 활성화를 매개로 하지 않고서도 측뇌실행 뉴런의 활성화를 유도할 수 있음을 뜻한다.

구강을 통한 음식물 섭취 시 위내장계의 자극 정보는 고립로핵 후미부에서 뇌로 입수되고^{20,25}, 구강 인두의 맛 정보는 고립로핵의 전두부 및 중간부에서 입수되는 것으로 알려져 있다^{18,20}. 본 연구에서, 위도관이 설치 시술된 백서에서 사카린용액의 sham feeding은 고립로핵 중간부 뉴런의 활성화를 효과적으로 유도하지 못하였으나, 구강도관이 설치된 백서에서 사카린용액의 소량 공급은 고립로핵 중간부 뉴런의 활성화를 뚜렷하게 유도하였다. 이전의 연구에서도, 구강 도관을 통한 사카린용액 주입은 고립로핵에

서 c-Fos 발현을 증가시킨다고 보고되었다⁵⁰. 사카린용액의 sham feeding에 의한 고립로핵 뉴런의 c-Fos 유전자 발현 유도에 관한 다른 연구자들의 보고는 찾아보기 힘들고, 본 연구진은 이전 연구에서 백서의 금식 후 사카린이 함유된 무열량 사료의 섭취는 고립로핵에서 c-Fos 발현을 유도하지 못함을 보고한 바 있다²⁸. 백서에서 구강도관을 통한 음식물의 공급은 음식물 섭취에 대한 자발적인 의지가 없는 상황에서 인위적으로 구강 내 자극을 유도하는 방식으로, 음식물 섭취과정에서 수반되는 뇌부위 활성화의 조절 기전에 있어서 음식물의 자의적 섭취 행동이 요구되는 sham feeding 방식과는 근본적으로 차이가 있다. 이전의 연구에서, 구강도관을 통한 증류수의 공급은 백서의 고립로핵 중간부에서 c-Fos 유전자 발현을 유도한다고 보고되었다¹⁸. 본 연구 결과에서, 금식 후 구강도관을 통한 증류수 공급은 간뇌의 고립로핵 중간부 뿐 아니라 전뇌의 측뇌실행에서도 c-Fos 발현을 유도하였다. 반면, 구강도관을 통한 사카린용액의 공급은 고립로핵 중간부에서 c-Fos 발현은 통계적으로 유의하게 증가시켰으나 측뇌실행 뉴런에서 c-Fos 발현은 효과적으로 유도하지 못하였다. 이러한 결과는, 금식 후 구강에 주어진 증류수 자극에 의한 측뇌실행 뉴런의 활성화는 고립로핵 뉴런의 활성화를 매개로 한 것이 아닐 가능성을 시사한다.

3. 혈장 코르티코스테론 수준 변화와 측뇌실행 뉴런 활성화

백서의 혈장 코르티코스테론 수준은 금식 동안 증가되고⁶⁹, 재금식 후 빠른 시간 내에 정상수준으로 회복된다^{10,11}는 보고들로부터, 재금식 시 고립로핵을 통해 스트레스 대응축의 중심에 위치한 측뇌실행에 전달되는 구강 인두 및 위내장계의 정보가 금식 동안 증가되었던 스트레스 대응축의 활성화의 완화에 기여할 가능성이 시사된다. 본 연구에서, 설탕용액 또는 사카린용액의 real feeding이 측뇌실행 뉴런의 c-Fos 유전자 발현을 유도한 동시에 금식 동안 증가되었던 혈장 코르티코스테론 수준을 감소시켰다. 뇌조직에서 c-Fos 유전자 발현은 뉴런 활성화의 일반적 지표로 사용된다. 따라서 이 결과는, 구강 인두 및 위내장계에서 전달된 정보에 의한 측뇌실행 뉴런 활성화와 혈장 코르티코스테론 수준 감소 사이의 관련성을 시사한다. 또한 구강도관을 통해 공급된 소량의 증류수가 측뇌실행 뉴런 활성화와 아울러 혈장 코르티코스테론 감소를 유도한 결과는, 재금식 시 측뇌실행 뉴런 활성화와 혈장 코르티코스테론 수준 감소 사이의 연관성을 더욱 뒷받침한다. 한편, sham feeding 또는 구강도관을 통해 공급된 사카린용액은 측뇌실행 뉴런의 활성화를 효과적으로 유도하지 못하였으나 금식동안 증가되었던 혈장 코르티코스테론 수준을 감소시켰다. 이 결과는, 구강 인두에서 입수된 선호 맛 자극은 측뇌실행 뉴런 활성화를 통하지 않는 다른 신경전달회로를 통해 스트

레스 대응축 활성화의 회복기전에 관여할 것임을 시사한다. 음식 동안 증가되었던 스트레스 대응축의 회복 조절 기전을 밝히기 위해서는 구강내의 다양한 맛 자극에 의해 활성화되는 측뇌실핵 뉴런의 정체를 규명하는 연구가 선행되어야 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

1. 채급식 시 구강 및 인두에서 수용되는 음식의 맛이나 위내장계의 포만감 및 열량흡수 등의 정보는, 음식 동안 증가된 혈장 코르티코스테론 수준의 회복을 위한 필수적인 조건이 아님을 알 수 있었다.
2. 구강 인두에서 입수되는 음식의 맛이나 열량 정보는 측뇌실핵 및 고립로핵 뉴런 활성화를 유도하기 위한 효과적인 신호이기는 하나 필수 조건은 아님을 알 수 있었다.
3. 구강 인두에서 입수된 선호 맛 자극은 음식으로 인한 스트레스 대응축의 증가된 활성도를 회복시킬 수 있는데, 이 기전에 측뇌실핵 뉴런 활성화는 중심적 역할을 하지 않을 것임이 시사되었다.

References

1. Isse T, Ueta Y, Serino R, Noguchi J, Yamamoto Y, Nomura M, *et al.* Effects of leptin on fasting-induced inhibition of neuronal nitric oxide synthase mRNA in the paraventricular and supraoptic nuclei of rats. *Brain Res* 1999;846:229-35.
2. Nelson RJ, Kriegsfeld LJ, Dawson VL, Dawson TM. Effect of nitric oxide on neuroendocrine function and behavior. *Front Neuroendocrinol* 1997;18:463-91.
3. Watts AG. Understanding the neural control of ingestive behaviors: helping to separate cause from effect with dehydration-associated anorexia. *Horm Behav* 2000;37:261-83.
4. Antoni FA. Hypothalamic control of adrenocorticotropin secretion: advances since the discovery of 41-residue corticotropin-releasing factor. *Endocr Rev* 1986;7:351-78.
5. Whitnall MH. Regulation of the hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurosecretory system. *Prog Neurobiol* 1993;40:573-629.
6. 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;663:84-92.
7. van Haasteren GA, Linkels E, van Toor H, Klootwijk W, Kaptein E, de Jong FH, *et al.* Effects of long-term food reduction on the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in male and female rats. *J Endocrinol* 1996;150:169-78.
8. Yoshihara T, Honma S, Katsuno Y, Honma K. Dissociation of paraventricular NPY release and plasma corticosterone levels in rats under food deprivation. *Am J Physiol* 1996;271:E239-45.
9. Kim YM, Lee JY, Choi SH, Kim DG, Jahng JW. RU486 blocks fasting-induced decrease of neuronal nitric oxide synthase in the rat paraventricular nucleus. *Brain Res* 2004;1018:221-6.
10. Timofeeva E, Picard F, Duclos M, Deshaies Y, Richard D. Neuronal activation and corticotropin-releasing hormone expression in the brain of obese (*fa/fa*) and lean (*fa/+*) Zucker rats in response to refeeding. *Eur J Neurosci* 2002;15:1013-29.
11. Jahng JW, Lee JY, Yoo SB, Kim YM, Ryu V, Kang DW, *et al.* Refeeding-induced expression of neuronal nitric oxide synthase in the rat paraventricular nucleus. *Brain Res* 2005;1048:185-92.
12. Fraser KA, Davison JS. Meal-induced c-fos expression in brain stem is not dependent on cholecystokinin release. *Am J Physiol* 1993;265:R235-9.
13. Rinaman L, Baker EA, Hoffman GE, Stricker EM, Verbalis JG. Medullary c-fos activation in rats after ingestion of a satiating meal. *Am J Physiol* 1998;275:R262-68.
14. Fraser KA, Raizada E, Davison JS. Oral-pharyngeal-esophageal and gastric cues contribute to meal-induced c-fos expression. *Am J Physiol* 1995;268:R223-30.
15. Phillips RJ, Powley TL. Gastric volume rather than nutrient content inhibits food intake. *Am J Physiol* 1996;271:R766-9.
16. McCann MJ, Rogers RC. Impact of antral mechanoreceptor activation on the vago-vagal reflex in the rat: functional zonation of responses. *J Physiol* 1992;453:401-11.
17. Raybould HE, Gayton RJ, Dockray GJ. CNS effects of circulating CCK8: involvement of brainstem neurones responding to gastric distension. *Brain Res* 1985;342:187-90.
18. Harrer MI, Travers SP. Topographic organization of Fos-like immunoreactivity in the rostral nucleus of the solitary tract evoked by gustatory stimulation with sucrose and quinine. *Brain Res* 1996;711:125-37.
19. Norgren R. Gustatory system. In: Paxinos G, ed. *The Rat Nervous System*. 2nd ed. San Diego: Academic Press; 1995:751-71.
20. Yamamoto T. Electrophysiology of CTA. In: Bures J, Bermúdez-Rattoni F, Yamamoto T, eds. *Conditioned taste aversion: memory of a special kind*. 1st ed. New York: Oxford Univ. Press; 1998:76-107.
21. Pritchard TC, Hamilton RB, Norgren R. Projections of the parabrachial nucleus in the old world monkey. *Exp Neurol* 2000;165:101-17.
22. Yamamoto T, Matsuo R, Kiyomitsu Y, Kitamura R. Taste responses of cortical neurons in freely ingesting rats. *J Neurophysiol* 1989;61:1244-58.
23. Kobayakawa T, Ogawa H, Kaneda H, Ayabe-Kanamura S, Endo H, Saito S. Spatio-temporal analysis of cortical activity evoked by gustatory stimulation in humans. *Chem Senses* 1999;24:201-9.
24. Bermúdez-Rattoni F. Molecular mechanisms of taste-recognition memory. *Nat Rev Neurosci* 2004;5:209-17.
25. Tsukamoto G, Adachi A. Neural responses of rat area postrema to stimuli producing nausea. *J Auton Nerv Syst* 1994;49:55-60.
26. Hermann GE, Kohlerman NJ, Rogers RC. Hepatic-vagal and gustatory afferent interactions in the brainstem of the rat. *J Auton Nerv Syst* 1983;9:477-95.
27. Cechetto DF, Saper CB. Evidence for a viscerotopic sensory representation in the cortex and thalamus in the rat. *J Comp Neurol* 1987;262:27-45.
28. Yoo SB, Lee JH, Ryu V, Jahng JW. Ingestion of non-caloric liquid diet is sufficient to restore plasma corticosterone level, but not to induce the hypothalamic c-Fos expression in food-deprived rats. *Nutr Neurosci* 2007;10:261-7.
29. Weingarten HP, Watson SD. Sham feeding as a procedure for assessing the influence of diet palatability on food intake. *Physiol Behav* 1982;28:401-7.
30. Conover KL, Shizgal P. Competition and summation between rewarding effects of sucrose and lateral hypothalamic stimulation in the rat. *Behav Neurosci* 1994;108:537-48.
31. Davis JD, Smith JP, Kung TM. Abdominal vagotomy alters the structure of the ingestive behavior of rats ingesting liquid diets. *Behav Neurosci* 1994;108:767-79.
32. Nissenbaum JW, Sclafani A. Sham feeding response of rats to polycose and sucrose. *Neurosci Biobehav Rev* 1987;11:215-22.
33. Emond MH, Weingarten HP. Fos-like immunoreactivity in vagal and hypoglossal nuclei in different feeding states: a quantitative study. *Physiol Behav* 1995;58:459-65.
34. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in Stereotaxic Coordinates*.

- 2nd ed. San Diego: Academic Press; 1986.
35. Ulrich-Lai YM, Ostrander MM, Thomas IM, Packard BA, Furay AR, Dolgas CM, *et al.* Daily limited access to sweetened drink attenuates hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis stress responses. *Endocrinology* 2007;148:1823-34.
36. Suchecki D, Antunes J, Tufik S. Palatable solutions during paradoxical sleep deprivation: reduction of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity and lack of effect on energy imbalance. *J Neuroendocrinol* 2003;15:815-21.
37. Sclafani A, Nissenbaum JW. On the role of the mouth and gut in the control of saccharin and sugar intake: a reexamination of the sham-feeding preparation. *Brain Res Bull* 1985;14:569-76.
38. Sclafani A, Nissenbaum JW. Is gastric sham feeding really sham feeding? *Am J Physiol* 1985;248:R387-90.
39. Grill HJ, Norgren R. The taste reactivity test. I. Mimetic responses to gustatory stimuli in neurologically normal rats. *Brain Res* 1978;143:263-79.
40. Berridge KC. Modulation of taste affect by hunger, caloric satiety, and sensory-specific satiety in the rat. *Appetite* 1991;16:103-20.
41. Wacker J, Dillon DG, Pizzagalli DA. The role of the nucleus accumbens and rostral anterior cingulate cortex in anhedonia: integration of resting EEG, fMRI, and volumetric techniques. *Neuroimage* 2009;46:327-37.
42. Pizzagalli DA, Holmes AJ, Dillon DG, Goetz EL, Birk JL, Bogdan R, *et al.* Reduced caudate and nucleus accumbens response to rewards in unmedicated individuals with major depressive disorder. *Am J Psychiatry* 2009;166:702-10.
43. Shirayama Y, Chaki S. Neurochemistry of the nucleus accumbens and its relevance to depression and antidepressant action in rodents. *Curr Neuropharmacol* 2006;4:277-91.
44. Bruchas MR, Xu M, Chavkin C. Repeated swim stress induces kappa opioid-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2. *Neuroreport* 2008;19:1417-22.
45. Kalivas PW, Duffy P. Selective activation of dopamine transmission in the shell of the nucleus accumbens by stress. *Brain Res* 1995;675:325-8.
46. Campioni MR, Xu M, McGehee DS. Stress-induced changes in nucleus accumbens glutamate synaptic plasticity. *J Neurophysiol* 2009;101:3192-8.
47. Lucas LR, Wang CJ, McCall TJ, McEwen BS. Effects of immobilization stress on neurochemical markers in the motivational system of the male rat. *Brain Res* 2007;1155:108-15.
48. Naimi N, Rivest S, Racotta I, Richard D. Neuronal activation of the hypothalamic magnocellular system in response to oropharyngeal stimuli in the rat. *J Neuroendocrinol* 1997;9:329-40.
49. Berthoud HR. Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neurosci Biobehav Rev* 2002;26:393-428.
50. Yamamoto T, Sawa K. Comparison of c-fos-like immunoreactivity in the brainstem following intraoral and intragastric infusions of chemical solutions in the rats. *Brain Res* 2000;866:144-51.