

## OLETF 쥐에서 날록손의 MTII에 의한 식욕억제 증가효과

조은병원 신경외과, 영남대학교 의과대학 생리학교실<sup>1</sup>, 소아과학교실<sup>2</sup>, 신경외과학교실<sup>3</sup>, 내과학교실<sup>4</sup>

배장호 · 박용훈<sup>2</sup> · 김성호<sup>3</sup> · 박소영<sup>1</sup> · 김종연<sup>1</sup> · 손조영<sup>1</sup> · 허정윤<sup>1</sup> · 원규장<sup>4</sup> · 김용운<sup>1</sup>

### Naloxone Increases the Anorexic Effect of MTII in OLETF Rats

Jang Ho Bae, Yong Hoon Park<sup>2</sup>, Sung Ho Kim<sup>3</sup>, So Young Park<sup>1</sup>, Jong Yeon Kim<sup>1</sup>,  
Jo Young Son<sup>1</sup>, Jung Yoon Huh<sup>1</sup>, Kyu Chang Won<sup>4</sup>, Yong Woon Kim<sup>1</sup>

*Department of Neurosurgery, Joen Hospital; and  
Department of Physiology<sup>1</sup>, Pediatrics<sup>2</sup>, Neurosurgery<sup>3</sup>, Internal Medicine<sup>4</sup>, College of Medicine, Yeungnam University*

### ABSTRACT

**Background:** Leptin, an adipocyte-derived hormone, inhibits obesity in lean subjects, but is not widely used because of leptin resistance. Thus, circumventing the arcuate nucleus of the hypothalamus, the site responsible for leptin resistance, has been evaluated for treatment of obesity. However, chronic treatment of melanotan II (MTII), a synthetic agonist of the melanocortin 3/4 receptor, induces tachyphylaxis. Here, we evaluated whether naloxone, a non-specific agouti-related peptide (AgRP) antagonist, increases the anorexic effect of MTII in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats.

**Methods:** We measured food intake following intracerebroventricular (i.c.v.) infusion of MTII and/or naloxone in OLETF rats. Sprague-Dawley rats were used as a normal control group.

**Results:** The anorexic effect of i.c.v. MTII infusion decreased with time in OLETF rats, indicating the development of tachyphylaxis. In normal control rats, naloxone alone decreased AgRP expression in the hypothalamus but failed to induce anorexia. Moreover, there was no additional anorexic effect with co-treatment of naloxone and MTII. In OLETF rats, naloxone alone did not show an anorexic effect despite increased POMC expression in the hypothalamus. However, naloxone sensitized the anorexic effect of MTII when treated together.

**Conclusion:** These results suggest that naloxone augmented the anorexic effect of MTII when treated together in OLETF rats, but had no effect alone. These results suggest that a combination therapy of naloxone and a melanocortin receptor activator would be an effective modality for treatment of obesity. (J Kor Endocr Soc 23:18~26 2008)

**Key Words:** OLETF rats, leptin resistance, MTII, naloxone, tachyphylaxis

### 서 론

비만은 현대 문명사회에서 점차 증가하는 질환으로 대사

증후군과 관련된 당뇨병, 고혈압, 동맥경화, 고지혈증 및 고요산증 등의 유병률을 높여서 의료비용을 증가시키는 중요한 요인이 되고 있다. 비만은 체지방이 증가된 상태로 에너지의 섭취가 소비보다 높은 경우에 발생한다. 인체는 체내 에너지 항상성을 유지하기 위하여 여러 가지 조절 기전들을 사용하는데 그중 가장 중요한 부분이 체지방과 에너지원 섭취에 따라 분비가 조절되는 렙틴이다[1]. 렙틴은 지방세포에서 분비되어 혈관·뇌장벽을 통과한 후 시상하부의 궁상핵에서 렙틴 수용체에 작용하여 proopiomelanocortin (POMC)

접수일자: 2007년 11월 13일

통과일자: 2007년 11월 30일

책임저자: 김용운, 영남대학교 의과대학 생리학교실

\* 이 논문은 2006년도 재단법인 천마의학연구재단 지원에 의하여 이루어졌음.

유전자 발현을 자극한다[2]. 그 결과 만들어진  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH)이 뇌실주위핵(paraventricular nucleus, PVN)에서 3,4형 melanocortin 수용체(MC3/4 receptor, MC3/4R)에 작용하여 melanocortin 계를 활성화시킴으로서 식욕을 감소시킬 뿐 아니라 에너지소비도 증가시킨다[3]. 그러나 비만 환자에서 렙틴 농도가 증가하고 렙틴의 투여에도 식욕억제나 에너지소비 증가가 나타나지 않는 렙틴 저항성이 발생하기 때문에 렙틴의 임상적용이 극히 제한적으로밖에 이루어지지 않았다[4,5]. 렙틴 저항성은 렙틴이 혈관뇌장벽을 통과하는 과정에서 시상하부 궁상핵에서의 수용체 결합과정과 신호전달과정을 거쳐서 melanocortin 계를 활성화시키기까지의 각 단계에서 결함이 있으면 발생하는데 궁상핵에서의 렙틴 신호전달과정의 결함이 가장 중요한 원인이 된다[6,7].

따라서 렙틴저항성이 발생한 궁상핵을 우회하여 PVN의 MC3/4R을 직접 자극하여 렙틴유사효과를 유도하는 연구들이 이루어졌다. MC3/4R agonist인 melanotan II (MTII)가 사용되었는데, 정상 실험동물에서는 MTII의 렙틴유사 효과가 시간이 경과할수록 감소하는 빠른 내성(tachyphylaxis)의 발생[8]이 보고되었다. 그러나 Scarpace 등[9]은 시상하부에 렙틴유전자를 과발현시켜 렙틴-유도형 렙틴저항성이 발생한 쥐에서 뇌실로 주입한 MTII의 효과가 정상쥐에 비하여 증가한 것을 관찰하였으며, Kim 등[10]은 monosodium glutamate (MSG)-유도 비만 쥐 모델에서 MTII가 정상군보다 현저한 렙틴 유사 효과를 나타냄을 보고하였다. 특히 Kim 등[10]은 MSG-비만 쥐에서 MTII의 렙틴유사효과가 증가된 원인으로 MSG-비만쥐의 시상하부에서 MC3/4R의 길항제인 agouti-related peptide (AgRP)의 발현이 현저히 감소해 있는 것과 관련이 있을 것으로 주장하였다. 그러나 아직 다른 비만 모델에서 MTII의 효과가 증폭되어 나타나는지에 관해서는 알려져 있지 않다. 따라서 MSG-비만 모델 이외의 비만 모델에서 MTII의 렙틴유사효과가 증가해 있는지를 확인하고, MTII를 장기간 투여할 때 빠른 내성이 발생

한다면 이를 억제할 수 있는 방법을 찾아내는 것이 필요할 것이다.

본 연구에서는 MTII에 의한 빠른 내성의 한 원인이 melanocortin 계의 과도한 자극에 따른 보상적인 AgRP증가에 있기 때문에 AgRP를 억제하면 MTII의 효과를 증가시킬 수 있을 것이라는 가설을 만들고 이를 증명하기 위하여 Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF)쥐를 사용하여 AgRP의 비특이적 차단제인 날록손(naloxone)[11]을 MTII와 함께 뇌실로 투여하면서 식욕억제 증가효과를 관찰하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 실험동물

비만쥐에서 날록손이 MTII의 식이억제 효과를 강화시키는지를 관찰하기 위하여 7개월된 OLETF 쥐를 오츠카 제약회사(Osaka, Japan)에서 제공받아 사용하였다. 정상대조군으로는 4개월의 Sprague-Dawley (SD) 쥐를 사용하였다. 실험동물의 실험 시작 시 체중은 Table 1에 나타내었다.

모든 실험 동물은 영남대학교 의과대학 청정사육사에서 사육되었으며, 도착 후 1주일간의 적응기간을 거친 후에 실험에 사용되었다. 오전 7시부터 12시간은 밝게 유지하고 이후 12시간은 소등하였다. 실험동물은 영남대학교 의과대학 동물실험 관리지침에 따라서 관리되었다.

### 2. MTII, 날록손, 및 생리식염수의 주입

MTII (1 nm, Peonix Pharmaceutical Co, AZ), naloxone (100  $\mu$ g, Sigma Chemical Co, MO), MTII + 날록손, 및 생리식염수를 지난 연구[10]에 사용한 방법에 따라 좌측뇌실로 주입하였다. 간단히 요약하면, 실험동물을 Tiletamine와 Zolazepam (각각 25 mg/kg, Zoletil<sup>®</sup>, Virbac, Carros, France)과 xylazine hydrochloride (8 mg/kg)을 복강 내 주사하여 마취시킨 후 stereotaxic 장치에 고정하고 피부를 중앙

**Table 1.** Body weights of the experimental groups

	Groups	Body weights (g)
SD rats	Saline	327 $\pm$ 5.5
	MTII	326 $\pm$ 11.8
	Naloxone	340 $\pm$ 8.2
	MTII+naloxone	347 $\pm$ 9.0
OLETF rats	Saline	624 $\pm$ 20.2
	Naloxone	636 $\pm$ 21.9
	MTII	626 $\pm$ 32.3
	MTII+naloxone	624 $\pm$ 23.2

Values are mean  $\pm$  S.E. Number of cases is six per each group.

SD, Sprague-Dawley; OLETF, Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty.

**Table 2.** Real-time PCR primer sequences

		Sequences	Tm	Extension time
POMC	sense	5'-acc tca cca cgg aaa gca a-3'	55℃	4 sec
	anti-sense	5'-cgg gga ttt tca gtc aag g-3'		
NPY	sense	5'-tat ccc tgc tgc tgt gtt tg-3'	54℃	9 sec
	anti-sense	5'-gtt ctg ggg gca ttt tct g-3'		
AgRP	sense	5'-agc aga ccg agc aga aga tg-3'	54℃	5 sec
	anti-sense	5'-gac tcg tgc agc ctt aca ca-3'		
MC4R	sense	5'-ggt cgg gat cat cat cag ttg ta-3'	56℃	7 sec
	anti-sense	5'-cat cag gaa cat gtg gac ata ga-3'		
$\beta$ -actin	sense	5'-tac tgc cct gcc tcc tag ca-3'	60℃	4 sec
	anti-sense	5'-tgg aca gtg agg cca gga tag-3'		

POMC, proopiomelanocortin; NPY, neuropeptide Y; AgRP, agouti-related peptide; MC4R, melanocortin receptor 4.

선을 따라 절개하고 대천문(bregma)의 후방으로 1.3 mm, 측방으로 1.9 mm 지점에 구멍을 만들고 3 mm 깊이로 뇌주입기(brain infusion kit)를 삽입하였다. 뇌주입기는 약물들이 담긴 osmotic minipump (Alzet)와 연결한 다음 두개골에 고정된 두 개의 작은 나사를 지지대로 사용하여 치과용 시멘트로 고정하였다. Osmotic minipump는 등 뒤 피하조직에 만든 공간에 위치시켰다. 약물 주입속도는 1  $\mu$ L/hr이었으며 1주일간 계속 주입하였다. MTII의 투여 농도는 Kim 등[10]의 보고를 참고하였으며, 날룩손의 투여 농도는 Dube 등[12]의 보고를 따랐다.

### 3. 시료의 채취

1주일간의 주입을 마친 후 오전 9시경에 앞에 서술한 Zoletil로 마취를 시켰다. 복벽과 흉벽을 절개하여 심장을 노출시키고 좌심실에 주사기를 삽입하여 혈액을 채취한 다음 차게 한 생리식염수 50 mL를 밀어 넣어 관류시킨다. 관류 직전에 대정맥동을 절개하여 관류액을 빠져나오게 유도하였다. 복강에서 고환주위지방과 콩팥주위지방 및 후복막강지방 조직을 모두 절제하고 무게를 측정하여 복강 내 지방량으로 판정하였다. 마지막으로 뇌를 분리하여 Kim 등[13]의 방법을 사용하여 시상하부를 적출한 다음 액체질소에 보관하였다가 분석에 사용하였다.

### 4. Real-time PCR

시상하부의 유전자 발현은 real-time PCR로 분석하였다. 먼저 RNA를 추출하는 과정을 요약하면, 1 mL TRI-reagent (Sigma Chemical Co, MO)에 시상하부 조직을 넣고 초음파를 이용하여 균질화시켰다. 여기에 200  $\mu$ L의 chloroform을 넣고 15초간 격렬하게 흔든 뒤 실온에서 5분간 반응시킨 다음 4℃, 13,200 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 분리된 상층액에 같은 부피의 isopropanol을 넣고 10분간 상온에서 반응을 거친 다음 다시 4℃, 13,200 rpm으로 10분간 원심 분리하여 RNA를 침전시켰다. 침전시킨 RNA를 차가운

75% ethanol 1 mL로 세척하고 4℃, 13,200 rpm에서 5분간 원심분리하고 침전물을 실온에서 건조 시켰다. 마지막으로 남은 RNA를 Rnase가 제거된 물 30  $\mu$ L에 녹여 -70℃에서 보관하였다. RNA 농도는 Nano-drop을 이용하여 260 및 280 nm 파장에서 측정하였다.

RNA를 증폭시키는 과정을 요약하면, 분리한 RNA 1  $\mu$ g을 70℃에서 5분 반응시킨 뒤, M-MuLV Reverse Transcriptase와 dNTP, oligo (dT) primer를 넣어(First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentas) 42℃에서 60분, 70℃에서 10분 반응시켜 cDNA를 만들었다. 이후 FastStart Taq DNA polymerase (LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I, Roche)와 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4  $\mu$ M primer를 첨가하여 LightCycler 1.5 Instrument에서 증폭시켰다. 그 과정은 95℃에서 10분의 전반응을 거친 다음, 변성(95℃, 10초), 어닐링(54~60℃, 5초), 및 연장(72℃, 4~9초)의 과정을 45회 반복하는 것이었다. 반응이 끝난 뒤에 증폭의 특이도를 확인하기 위하여 온도를 65℃까지 내린 후에 점차적으로 0.2℃/초의 속도로 95℃까지 온도를 높여 형성된 PCR 산물의 동일성 여부를 분석하였다. 내부 표준으로는  $\beta$ -actin을 사용하였으며 primer 서열은 Table 2에 나타내었다.

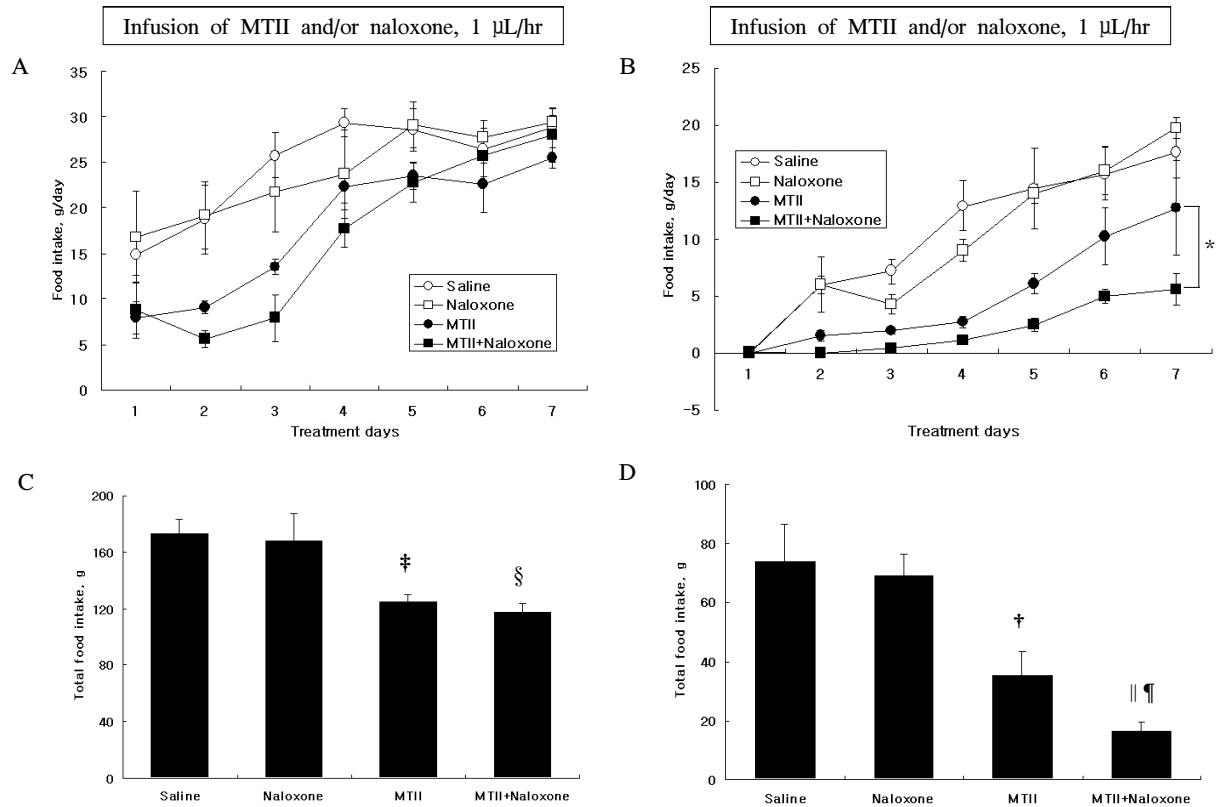
### 5. 통계분석

성적은 평균  $\pm$  표준오차로 표기하였다. 각 군 간의 차이는 t-test를 사용하여 평가하였으며, 약물 주입에 따른 식이 섭취와 체중의 변화는 ANOVA로 검정하였다. 95% 유의수준을 인정하였다.

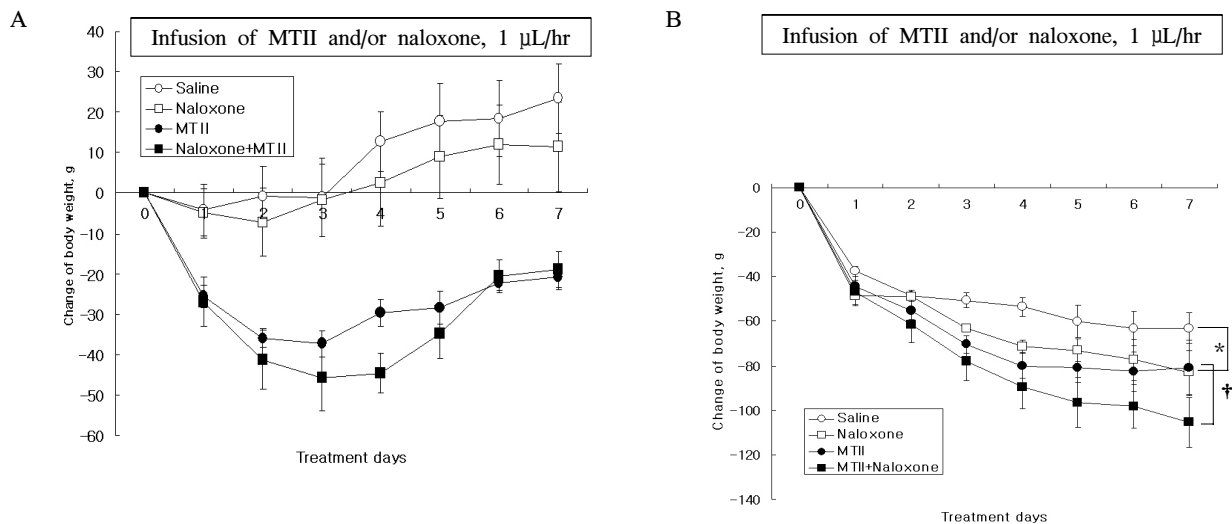
## 결 과

### 1. MTII와 날룩손의 효과

MTII는 대조군인 Sprague-Dawley 쥐와 비만군인 OLETF 쥐 모두에서 유의하게 식욕을 억제하였으나 시간이 경과함에 따라 나타내었다(Fig. 2). 비만쥐에서는 MTII 뿐 아니라 날룩손도



**Fig. 1.** Effects of MTII and/or naloxone on daily food intake and total food intake in SD (A, C, respectively) and OLETF (B, D, respectively) rats. MTII (1 nm/day/rat) and/or naloxone (100 µg/day/rat) were infused for 7 days. Values are means ± SE of six rats per group. \*  $P < 0.01$ , †  $P < 0.05$ , ‡  $P < 0.01$  vs saline, §  $P < 0.05$ , ||  $P < 0.05$  vs naloxone, ¶  $P < 0.05$  vs MTII.



**Fig. 2.** Effects of MTII and/or naloxone on body weight changes in SD (A) and OLETF (B) rats. MTII (1 nm/day/rat) and/or naloxone (100 µg/day/rat) were infused for 7 days. Values are means ± SE of six rats per group. \*  $P < 0.05$ , †  $P < 0.01$ .

에 따라 식욕억제효과가 감소하는 빠른 내성을 나타내었다 (Fig. 1). 그러나 날록손은 정상대조쥐와 비만쥐 모두에서 생 리식염수 주사군에 비하여 유의한 식욕억제 효과를 나타내 지 못하였다. MTII와 날록손을 함께 처치하였을 때 대조쥐 에서는 MTII 단독투여군에 비하여 식욕이 차이가 나타나지

않았으나, 비만쥐에서는 MTII 단독투여군에 비하여 추가적 인 식욕억제가 유도되었다( $P < 0.01$ ).

체중의 변화는 정상대조쥐에서 날록손이 유의한 차이를 나타내지 못하였지만 MTII는 체중의 감소를 유도하였다. 그 러나 체중의 감소는 시간이 지남에 따라 줄어드는 양상을

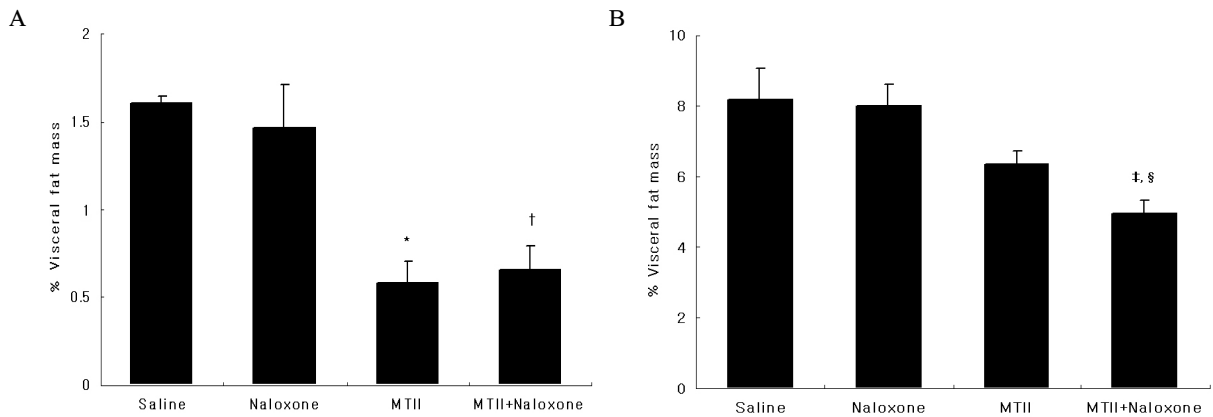
체중을 감소시키는 효과를 나타내었으며( $P < 0.05$ ) MTII와 날록손의 혼합 투여 시 추가적인 체중감소를 나타내었다( $P < 0.01$ ). 정상대조군에서 수술 후 식이섭취와 체중이 빠르게 회복되는데 반하여 비만쥐에서는 식이 섭취의 회복이 느리고 체중은 계속 감소하는 양상을 나타내었다. 이 결과는 비만쥐에서 수술 후 회복이 지연됨에 따른 현상으로 사료되었다.

연령 7개월의 OLETF 비만쥐는 복강 내 지방량이 체중의 7.3%인  $45.7 \pm 3.76$  g으로 대조쥐의  $5.7 \pm 0.21$  g (체중의 1.7%)에 비하여 심한 복강 내 지방축적을 나타내었다. 복강 내 지방량은 대조쥐에서 MTII에 의하여 현저한 감소를 나

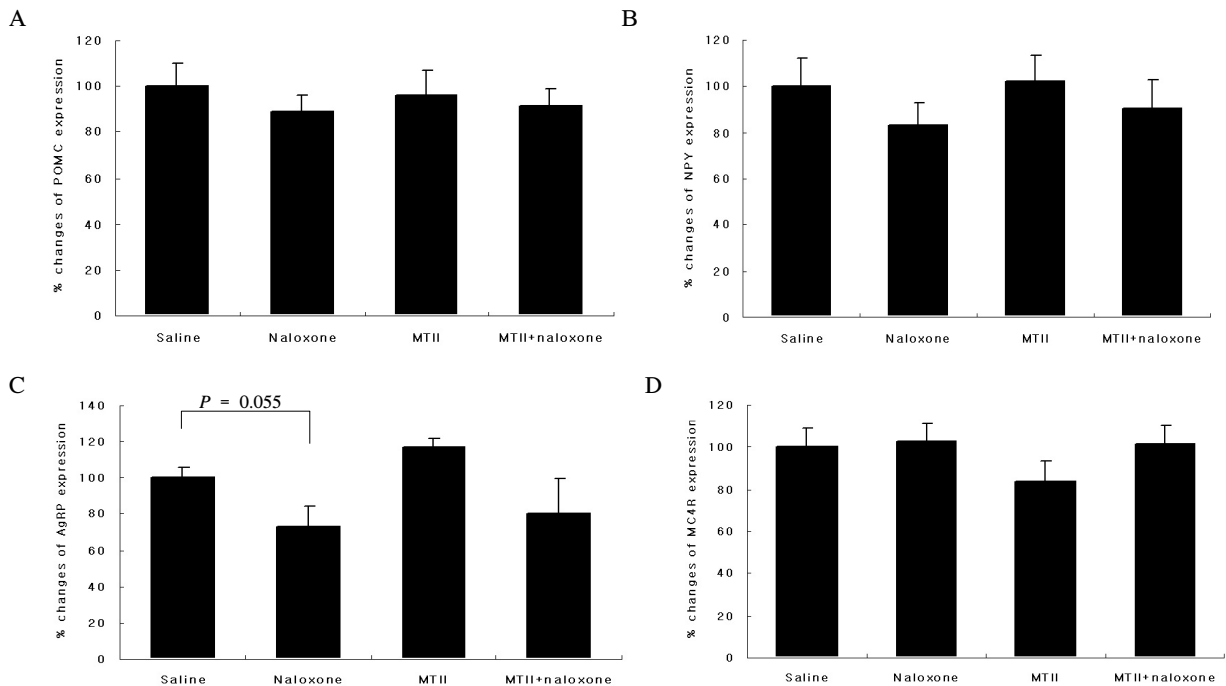
타내었지만 날록손에 의하여서는 체지방감소가 나타나지 않았으며 MTII와 날록손을 함께 처치하여서도 추가적인 체지방 감소는 나타나지 않았다. 그러나 비만쥐에서는 날록손에 의해서는 내장지방량 감소가 유도되지 않았으나 MTII와 함께 처치하였을 때 유의한 차이는 아니었으나( $P = 0.06$ ) 추가적인 감소를 나타내는 경향을 보여주었다(Fig. 3).

## 2. MTII와 날록손 투여 후 시상하부 식욕조절 단백질 발현 변화

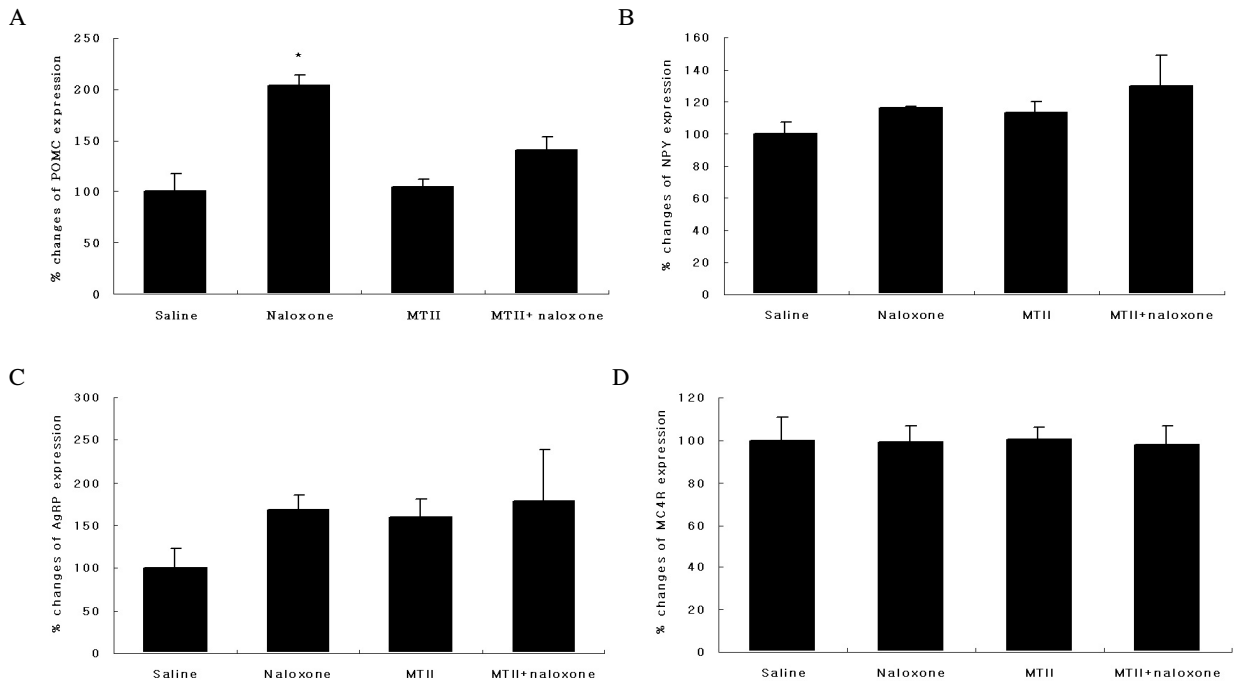
Real-time PCR로 분석한 결과에 따르면, 정상대조쥐에서



**Fig. 3.** Effects of MTII and/or naloxone on percent visceral fat mass in SD (A) and OLETF (B) rats. MTII (1 nm/day/rat) and/or naloxone (100 ug/day/rat) were infused for 7 days. Values are means $\pm$ SE of six rats per group. \*  $P < 0.01$  vs saline, †  $P < 0.05$ , ‡  $P < 0.01$  vs naloxone, §  $P < 0.05$  vs MTII.



**Fig. 4.** Expressions of POMC (A), NPY (B), AgRP (C), and MC4R (D) in the hypothalamus of saline-, naloxone-, MTII-, MTII plus naloxone-treated Sprague-Dawley rats. Values are means  $\pm$  SE of six rats per group.



**Fig. 5.** Expressions of POMC (A), NPY (B), AgRP (C), and MC4R (D) in the hypothalamus of saline-, naloxone-, MTII-, MTII plus naloxone-treated OLETF rats. Values are means  $\pm$  SE of six rats per group. \* $P < 0.01$  vs saline.

는 날록손 투여로 NPY와 AgRP가 감소하는 경향을 나타내었으며, MTII 처리시 AgRP는 증가하는 MC4R은 감소하는 경향을 나타내었다. 그러나 통계적으로 유의한 차이는 없었다(Fig. 4). 비만쥐에서는 날록손 처리 시 POMC가 현저히 증가하였으며( $P < 0.01$ ) AgRP도 증가하는 경향을 나타내었다(Fig. 5). 그러나 NPY와 MC4R의 발현에는 유의한 차이가 나타나지 않았다.

## 고 찰

본 연구는 랩티저항성을 나타내는 비만 모델에서 랩티저항성의 표적부분인 시상하부의 궁상핵을 우회하여 뇌실주위핵의 melanocortin 수용체를 직접 자극하는 방법의 효율성을 검정하고 그 효율성을 증가시키는 방법을 확인하고자 하였다. OLETF 비만쥐에서 MTII의 랩티유사효과는 대조군에 비하여 증가되지 않았으며 빠른 내성을 나타내었다. 그러나 OLETF 비만쥐에 AgRP 억제제인 날록손을 MTII와 함께 뇌실로 투여하여 MTII에 의한 식욕억제와 체중감소 및 복강내 지방감소를 증폭시키는 결과를 얻었다.

본 연구에 사용한 OLETF 비만쥐는 위장으로부터의 포만 신호를 받는 CCKA 수용체에 결합이 있어서 포만감을 느끼지 못하는 장애로 과잉식욕을 나타내게 되며[14], 복강 내에 지방이 심하게 축적되어 중년 이후에 발생하는 복부비만과 유사한 특성을 나타내며 랩티저항성과 현저한 혈중 랩틴 농도 증가를 특징으로 하고 있다. 본 연구에서도 체중의 7.3%

가 복강 내 지방으로 축적된 심한 복부비만을 보여주었다.

랩티저항성이 발생하면 궁상핵에서 POMC를 활성화시키는 과정은 장애가 발생하지만 궁상핵으로부터 신호를 받는 melanocortin 계는 정상이다. 최근에는 melanocortin 계가 에너지 대사조절에 중요한 역할을 한다는 사실이 밝혀지고, MC4R을 결손시킨 생쥐에서 비만이 발생하고 사람에서 고도 비만의 4~5%가 MC4R의 돌연변이 때문인 것으로 보고되어[15], melanocortin 계가 비만 치료의 중요한 목표점으로 생각하게 되었다. MC4R은 작용제인  $\alpha$ -MSH의 농도에 따라 증가 또는 감소하게 된다. POMC 발현이 감소된 노인 쥐 시상하부에 POMC를 과발현시키면 melanocortin 계가 활성화되어 비만을 줄일 수 있지만[16], 젊은 쥐 시상하부에 POMC를 과발현시키면 고지방식이 시 비만이 오히려 더 잘 유도되는 것으로 보고되었는데[17], 그 원인으로  $\alpha$ -MSH 증가에 의한 MC4R의 감소와 AgRP 발현이 증가한 결과임이 제시되었다. AgRP는 MC4R에 대하여  $\alpha$ -MSH와 작용제인 MTII에 경쟁적으로 결합하여 억제 효과를 나타내게 된다[18]. AgRP 과발현 마우스는 비만이 발생하게 되며[19], AgRP 결손 생쥐는 나이가 들어서 체중이 빠지는 특성을 나타낸다[20]. 또한 뇌실로 투여된 AgRP는 식욕을 증가시키는데[21,22], 특히 식욕증가 효과가 10 pmol 주사 시 24시간, 100 pmol 주사 시 1주간 지속되는 강력한 작용으로[23] AgRP가 비만과 관련된 중요한 표적물질로 생각하게 되었다.

이러한 AgRP의 식욕 증가 효과는 아편양 수용체의 비특

이적인 길항제인 날룩손에 의하여 차단될 수 있음이 보고되었다[23,24]. Brugman 등[11]은 아편양 수용체를 차단하면 AgRP에 의한 식욕촉진 효과를 차단할 수 있다고 하였으며, 날룩손은 galanin에 의한 식욕증가도 감소시킨다고 보고되었다[12]. 또한  $\mu$ -아편양수용체 결손 생쥐는 고지방식이에도 비만이 잘 발생하지 않는 양상이 보고되어[25], 아편양 물질이 식이조절에 관여한다는 것을 알 수 있었다.

본 연구에서는 OLETF 비만쥐에서 MTII를 뇌실로 주입하였을 때 식욕억제효과가 대조쥐에 비하여 증가하지 않았으며, 빠른 내성도 발생하였다. 이 결과는 MSG-비만 쥐에서 MTII에 증폭된 반응으로 나타났다는 보고[10]와 차이가 있었다. 그 차이는 Kim 등[10]이 사용한 MSG-비만쥐는 대조군에 비하여 시상하부 AgRP가 현저히 감소한데 반하여 본 연구에 사용한 OLETF 비만쥐의 AgRP 발현이 정상대조쥐에 비하여 감소하지 않은 점에 기인하는 것으로 생각된다. 위의 결과들과 Li 등[17]의 정상쥐 시상하부에서 POMC 과 발현 시 AgRP가 증가하여 고지방식이에 의하여 비만이 오히려 더 잘 유도되었다는 보고[17]를 종합해 보면 MTII를 장기 간 처치할 때 발생하는 빠른 내성의 기전은 melanocortin 계의 자극에 따른 음성피드백 기전으로 인한 AgRP의 보상적 증가에 기인하는 것으로 생각된다. 본 연구에서 확인된 결과도 정상 대조쥐와 OLETF 비만쥐에서 MTII 처치 시 통계학적으로 유의한 차이는 아니었지만 AgRP의 발현이 증가하는 경향을 나타내었으며 MC4R이 감소하는 경향을 나타내어 위 가정을 뒷받침하였다. 따라서 본 연구에서는 AgRP를 억제하는 것으로 MTII에 의한 빠른 내성의 발생을 억제할 수 있는지를 규명하기 위하여 비특이적으로 AgRP를 차단하는 날룩손을 MTII 함께 처치하여 랩틴 유사효과를 관찰하였다. 날룩손은 정상쥐에서는 식욕에 영향을 미치지 못하였으나 OLETF 비만쥐에서는 MTII의 식욕억제 효과를 증가시켰다. 날룩손은 정상쥐와 OLETF 비만쥐 모두에서 단독 투여 시에는 식이섭취에 영향을 미치지 못하였다. 이는 날룩손이 단독으로 식이섭취를 억제한다는 보고[12]와는 차이가 있었지만 날룩손 단독 투여 시 식이섭취에 영향을 미치지 않다가 다른 약물과 병용 투여에는 추가적인 식이섭취 억제를 나타낸다는 Schusdziarra 등[26]의 보고와 일치하였다. Schusdziarra 등[26]은 뇌실로 주사한 날룩손(25  $\mu$ g)이 식이섭취는 감소시키지 못하였지만 glucagon-like peptide 1 (GLP-1)와 함께 주사될 때는 GLP-1의 식욕억제 효과를 증폭시키는 것으로 나타났으며, 특히 식욕억제 효과를 나타내지 못하는 5  $\mu$ g의 GLP-1에 병행하여서도 식이섭취 억제 효과를 나타내었다고 보고하였다. 또한 위 결과는 MaLaughlin과 Baile[27]의 날룩손에 대하여 비만 모델에서 더욱 예민하게 반응한다고 보고와 유사한 점이 있다. 이와 같이 날룩손에 대한 효과가 단독 또는 병합 투여 및 종간에 다른 이유는 아편양 수용체가 널리 퍼져있고 시상하부에 수많은 핵들이

존재하여 서로 복잡하게 연결되어 있는 시상하부의 내적인 경과 관련이 있는 것으로 생각된다. 생체에서 식욕은, 기전은 매우 복잡하지만, 식욕을 증가시키는 신호와 억제시키는 신호 사이의 균형에 의하여 조절되며, 체중은 식욕조절에 에너지 소비과정이 추가되어 조절되게 된다. 본 연구의 결과 중 비만쥐에서 날룩손 투여가 식욕을 억제시키지 못하였으나 체중의 유의한 감소를 초래한 부분이 날룩손의 작용이 뇌에서 광범위하게 나타나고 식욕과 에너지대사의 조절 방향이 일치하지 않은 점과 관련이 있을 것으로 생각한다. 따라서 아직 AgRP에 특이적인 길항제가 시판되지 않아서 날룩손을 사용한 점은 본 연구의 제한점으로 추후 특이적인 길항제를 사용하는 연구가 이루어지면 좀 더 일관성있는 결과를 도출할 수 있을 것으로 생각한다. 그리고 본 연구에서 분석한 식욕관련 펩타이드는 주로 궁상핵에서 이루어지는 변화이기 때문에 PVN에 존재하는 melanocortin 계의 자극 효과는 식욕의 감소로 밖에 평가할 수 없었다는 것이 또다른 제한점이었다.

식욕 조절의 증추인 시상하부의 식욕 조절 물질을 분석한 결과와 식이섭취를 비교하면, 정상 대조군에서는 날룩손을 투여하였을 때 시상하부 NPY와 AgRP 발현이 감소하는 경향을 보였지만 POMC 역시 감소하는 경향을 나타내어 식욕에 뚜렷한 변화를 초래하지 못한 것으로 생각되었다. OLETF 비만쥐에서도 시상하부에서 POMC 발현이 증가되었음에도 불구하고 식이섭취가 억제되지 않은 원인으로 NPY와 AgRP의 동반상승경향을 생각할 수 있겠다. OLETF 비만쥐는 포만감에 장애가 있어서 랩틴 신호에 따른 POMC의 변화에 의하여 식욕이 좌우되는 정상적인 상태와는 달리 NPY와 AgRP의 역할이 강조된다는 점[28]을 감안하면 부분적으로 설명이 되지만 추가적인 연구가 필요한 부분이다.

요약하면, OLETF 비만쥐에서 뇌실로 1주일간 주입한 MTII의 랩틴 유사효과는 정상 대조쥐에 비하여 증가하지 못하였으며 빠른 내성이 발생하였다. 날룩손은 대조쥐와 OLETF 비만쥐에서 단독으로는 식욕억제 효과가 나타나지 않았으나 OLETF 비만쥐에서 MTII와 함께 투여하였을 때 MTII의 식욕억제, 체중감소 및 복강내지방감소효과가 증가되었다. 이 결과는 melanocortin 계를 목표로 하는 비만 약물을 사용할 때 날룩손을 함께 사용하는 것이 효과적임을 시사하는 것이다.

## 요 약

**연구배경:** 지방세포에서 분비되어 시상하부에 작용하여 식욕 감소와 에너지 소비 증가를 유도하는 랩틴은 강력한 체지방 감소효과에도 불구하고 비만한 사람이나 실험동물에서 발생하는 랩틴저항성 때문에 임상에서 제한적으로만 사용되고 있다. 따라서 랩틴 저항성의 원인이 되는 시상하부의

궁상핵 우회한 melanocortin 계를 자극하여 랩틴 효과를 만들어내는 연구들이 진행되어 왔다. 그러나 제 3/4형 melanocortin 수용체에 작용하는 MTII를 뇌실로 장기간 주입하면 랩틴 유사 효과가 시간이 지나면서 감소하는 빠른 내성이 나타나게 된다. 본 연구에서는 MC3/4R에 억제적으로 작용하는 AgRP를 날록손으로 차단하여 MTII의 랩틴 유사 효과를 증가시킬 수 있는지를 규명하고자 하였다.

**방법:** 비만 실험동물로는 OLETF 비만쥐를, 정상대조군으로는 Sprague-Dawley 쥐를 사용하였다. MTII와 날록손을 뇌실로 삽입된 뇌주입기와 연결된 osmotic minipump를 사용하여 1주일간 투여하면서 매일 식이섭취량을 측정하여 식욕억제효과를 판정하였다.

**결과:** OLETF 비만쥐에 MTII를 주입한 결과 초기에는 식욕억제가 나타났으나 시간이 지남에 따라 그 효과가 감소하는 빠른 내성이 나타났다. 그러나 OLETF 비만쥐에서 MTII와 날록손을 함께 투여한 경우에는 MTII의 식욕억제, 체중감소 및 복강 내 지방 감소효과가 증가되었다. 정상대조 쥐에서는 날록손의 식욕억제 효과가 나타나지 않았을 뿐 아니라 MTII의 효과도 증가시키지 못하였다. OLETF 쥐에서 real-time PCR로 분석한 시상하부 proopiomelanocortin (POMC) 발현은 날록손 처치군에서 유의하게 증가하였다. AgRP의 발현은 MTII, 날록손, 및 혼합 투여군에서 증가하는 경향을 나타내었다. Neuropeptide Y (NPY)의 발현은 AgRP와 유사한 경향을 나타내었다. 제4형 melanocortin 수용체 발현은 정상대조쥐에서 MTII처치에 의하여 감소하는 경향이었으나 OLETF 비만쥐에서는 차이가 없었다.

**결론:** OLETF 비만쥐에서 날록손은 단독투여로는 식욕억제효과를 나타내지 못하였으나 MTII와 함께 투여되었을 때는 MTII의 식욕억제, 체중감소 및 복강 내 지방감소효과를 증가시켰다. 이 결과는 melanocortin 계를 목표표는 비만 약물을 사용할 때 날록손을 함께 사용하는 것이 효과적임을 시사하는 것이다.

## 참 고 문 헌

1. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM: Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-432, 1994
2. Scarpance PJ, Tümer N: Peripheral and hypothalamic leptin resistance with age-related obesity. *Physiol Behav* 74:721-727, 2001
3. Shek EW, Scarpance PJ: Resistance to the anorexic and thermogenic effects of centrally administered leptin in obese aged rats. *Regul Pept* 92(1-3):65-71; 2000
4. Van Heek M, Compton DS, France CF, Tedesco RP, Fawzi AB, Graziano MP, Sybertz EJ, Strader CD, Davis HR Jr: Diet-induced obese mice develop peripheral, but not central, resistance to leptin. *J Clin Invest* 99:385-390, 1997
5. Widdowson PS, Upton R, Buckingham R, Arch J, Williams G: Inhibition of food response to intracerebroventricular injection of leptin is attenuated in rats with diet-induced obesity. *Diabetes* 46:1782-1785, 1997
6. Caro JF, Kolaczynski JW, Nyce MR, Ohannesian JP, Opentanova I, Goldman WH, Lynn RB, Zhang PL, Sinha MK, Considine RV: Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity, a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet* 348:159-161, 1996
7. Halaas JL, Boozer C, Blair-West J, Fidathusein N, Denton DA, Friedman JM: Physiological response to long term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:8878-8883, 1997
8. Jonsson L, Skarphedinsson JO, Skuladottir GV, Atlason PT, Eiriksdottir VH, Franzson L, Schiöth HB: Melanocortin receptor agonist transiently increases oxygen consumption in rats. *Neuroreport* 12:3703-3708, 2001
9. Scarpance PJ, Matheny M, Zolotukhin S, Tümer N, Zhang Y: Leptin-induced leptin resistant rats exhibit enhanced responses to the melanocortin agonist MT II. *Neuropharmacology* 45:211-219, 2003
10. Kim YW, Choi DW, Park YH, Huh JY, Won KC, Choi KH, Park SY, Kim JY, Lee SK: Leptin-like effect of MTII are augmented in MSG-obese rats. *Regul Pept* 127:63-70, 2005
11. Brugman S, Clegg DJ, Woods SC, Seeley RJ: Combined blockade of both micro- and kappa-opioid receptors prevents the acute orexigenic action of Agouti-related protein. *Endocrinology* 143:4265-4270, 2002
12. Dube MG, Horvath TL, Leranath C, Kalra PS, Kalra SP: Naloxone reduces the feeding evoked by intracerebroventricular galanin injection. *Physiol Behav* 56:811-813, 1994
13. Kim YW, Kim JY, Park YH, Park YH, Park SY, Won KC, Choi KH, Huh JY, Moon KH: Metformin Restores Leptin Sensitivity in High Fat Fed Obese Rats with Leptin Resistance. *Diabetes* 55:716-724, 2006



14. Covasa M, Ritter RC: Attenuated satiation response to intestinal nutrients in rats that do not express CCK-A receptors. *Peptides* 22:1339-1348, 2001
15. Spiegelman BM, Flier JS: Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 104:531-543, 2001
16. Li G, Zhang Y, Wilsey JT, Scarpance PJ: Hypothalamic pro-opiomelanocortin gene delivery ameliorates obesity and glucose intolerance in aged rats. *Diabetologia* 48:2376-2385, 2005
17. Li G, Zhang Y, Cheng KY, Scarpance PJ: Lean rats with hypothalamic pro-opiomelanocortin overexpression exhibit greater diet-induced obesity and impaired central melanocortin responsiveness. *Diabetologia* 50:1490-1499, 2007
18. Fong TA, Mao C, MacNeil T, Kalyani R, Smith T, Weinberg D, Tota MR, Van der Ploeg LH: ART (protein product of agouti-related transcript) as an antagonist of MC-3 and MC-4 receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 237:629-631, 1997
19. Ollmann MM, Wilson BD, Yang YK, Kerns JA, Chen Y, Gantz I, Barsh GS: Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* 278:135-138, 1997
20. Wortley KE, Anderson KD, Yasenchak J, Murphy A, Valenzuela D, Diano S, Yancopoulos GD, Wiegand SJ, Sleeman MW: Agouti-related protein-deficient mice display an age-related lean phenotype. *Cell Metab* 2:421-427, 2005
21. Rossi M, Kim MS, Morgan DG, Small CJ, Edwards CM, Sunter D, Abusnana S, Goldstone AP, Russell SH, Stanley SA, Smith DM, Yagaloff K, Ghatei MA, Bloom SR: A C-terminal fragment of agouti-related protein increases feeding and antagonizes the effect of  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone in vivo. *Endocrinology* 139:4428-4431, 1998
22. Hagan MM, Rushing PA, Pritchard LM, Schwartz MW, Strack AM, Van der Ploeg LH, Woods SC, Seeley RJ: Long-term orexigenic effects of AgRP- (83-132) involve mechanisms other than melanocortin receptor blockade. *Am J Physiol* 279:R47-R52, 2000
23. Hagan MM, Rushing PA, Pritchard LM, Schwartz MW, Strack AM, Van der Ploeg HT, Woods SC, Seeley RJ: Long-term orexigenic effects of AgRP- (83-132) involve mechanisms other than melanocortin receptor blockade. *Am J Physiol* 279:R47-R52, 2000
24. Kotz CM, Grace MK, Briggs J, Levine AS, Billington CJ: Effects of opioid antagonists naloxone and naltrexone on neuropeptide Y-induced feeding and brown fat thermogenesis in the rat. *Neural site of action. J Clin Invest* 96:163-170, 1995
25. Tabarin A, Diz-Chaves Y, Carmona Mdel C, Catargi B, Zorrilla EP, Roberts AJ, Coscina DV, Rousset S, Redonnet A, Parker GC, Inoue K, Ricquier D, Pénicaud L, Kieffer BL, Koob GF: Resistance to diet-induced obesity in mu-opioid receptor-deficient mice: evidence for a "thrifty gene". *Diabetes* 54(12):3510-3516, 2005
26. Schusdziarra V, Zimmermann JP, Schick RR: Importance of orexigenic counter-regulation for multiple targeted feeding inhibition. *Obes Res* 12:627-632, 2004
27. MaLaughlin CL, Baile CA: Feeding behavior responses of Zucker rats to naloxone. *Physiol Behav* 32:755-761, 1984
28. Jarosz PA, Metzger BL: The effect of opioid antagonism on food intake behavior and body weight in a biobehavioral model of obese binge eating. *Biol Res Nurs* 3:198-209, 2002