

## 반복적인 금식으로 인한 렙틴 농도 변동이 렙틴 감수성에 미치는 영향

영남대학교 의과대학 산부인과학교실, 소아과학교실<sup>1</sup>, 생리학교실<sup>2</sup>, 내과학교실<sup>3</sup>

박성철 · 박용훈<sup>1</sup> · 박소영<sup>2</sup> · 김종연<sup>2</sup> · 박윤기 · 이태형 · 원규장<sup>3</sup> · 김용운<sup>2</sup>

### The Effect of Leptin Level Fluctuations by a Repeated Fasting/Refeeding on the Leptin Sensitivity in OLETF Rats

Sung-Chul Park, Yong-Hoon Park<sup>1</sup>, So-Young Park<sup>2</sup>, Jong-Yeon Kim<sup>2</sup>, Yoon-Ki Park, Tae-Hyung Lee, Kyu-Chang Won<sup>3</sup>, Yong-Woon Kim<sup>2</sup>

Department of OBGY, Department of Pediatrics<sup>1</sup>, Department of Physiology<sup>2</sup>, and Department of Internal Medicine<sup>3</sup>, College of Medicine, Yeungnam University

#### ABSTRACT

**Background:** Leptin resistance is a common feature in obese subjects and animals, and this is commonly accompanied with hyperleptinemia. We speculated that one of the causes of leptin resistance is a persistently elevated leptin concentration and then we hypothesized that fluctuations of serum leptin would increase leptin sensitivity in the leptin-resistant state.

**Methods:** We used a repeated fasting and refeeding (RFR) protocol to produce fluctuation in leptin levels in 7 month-old Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats and Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) rats. We then measured the leptin sensitivity following an intracerebroventricular (i.c.v.) infusion of leptin.

**Results:** The OLETF rats exhibited severe visceral fat deposition, hyperleptinemia and leptin resistance. However, in the OLETF-RFR rats, the anorexic effect following i.c.v. leptin infusion was restored. Moreover, the visceral fat mass and serum leptin levels decreased, while the serum adiponectin levels were elevated in the OLETF-RFR rats compared to the OLETF-Control rats. The leptin receptor content in the hypothalamus increased in the OLETF-RFR rats compared to the OLETF-Control rats, and the leptin receptor content in the OLETF-RFR rats decreased compared to that in the the LETO-Control rats.

**Conclusions:** These results suggest that the intermittent suppression of the serum leptin level reversed the leptin resistance in OLETF rats, and this may have occurred due to an increased number of leptin receptors in the hypothalamus. (J Korean Endocr Soc 23:310~318, 2008)

**Key Words:** fasting/refeeding, food intake, leptin resistance, OLETF rats

#### 서 론

비만은 현대 문명사회에서 대표적인 대사관련 질환으로

대사증후군의 주된 위험인자로 알려져 있다. 체지방은 에너지 섭취와 소비의 균형에 의하여 섬세하게 조절되는데 장기간에 걸쳐 에너지섭취가 소비를 증가하면 비만이 발생하게 된다. 체지방 조절에 가장 중요한 역할을 하는 물질로 지방세포에서 분비되어 시상하부의 궁상핵(arcuate nucleus)에 작용하여 식욕을 억제하고 에너지 소비를 증가시키는 렙틴이 있다[1]. 렙틴은 지방세포에서 분비되어 혈관·뇌장벽을 통과한 후 시상하부의 궁상핵에서 B형 렙틴 수용체와 결합

접수일자: 2008년 7월 23일

통과일자: 2008년 8월 20일

책임저자: 김용운, 영남대학교 의과대학 생리학교실

\* 이 논문은 (주)엘지생명과학 지원에 의하여 이루어졌음.

하여 proopiomelanocortin 유전자 발현을 자극하고, 그 결과 만들어진  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone이 뇌하수체하핵(paraventricular nucleus)에서 melanocortin system을 활성화시킴으로서 효과를 나타낸다[2]. 그러나 렙틴은 정상인 사람과 동물에서는 현저한 항비만효과를 나타내지만 비만인 경우에는 렙틴 농도가 이미 높아져 있고 렙틴의 투여에 반응하지 않는 렙틴 저항성이 발생하며[3,4], 이 때문에 임상에서의 렙틴 사용이 제한되게 되었다. 렙틴 저항성의 개선은 렙틴을 임상에 적용할 수 있다는 것을 의미할 뿐 아니라, 렙틴을 주사하지 않아도 렙틴 저항성 상태에서 이미 증가한 렙틴에 의한 항비만 효과를 얻을 수 있다는 점에서 중요한 의미를 지닌다고 할 수 있다. 렙틴 저항성은 렙틴이 혈관외 장벽을 통과하여 시상하부 궁상핵의 수용체에 결합하고 신호전달과정을 거쳐서 melanocortin system을 활성화시키기까지의 각 단계에서 결함이 있으면 발생하게 된다[5,6]. 렙틴 저항성을 유발하는 원인은 아직 완전히 규명되어 있지 않지만 비만 또는 노령인 사람과 동물에서 일반적으로 나타나고 있다. 비만과 노령의 공통된 특징은 고렙틴증이며 렙틴 저항성에 따른 보상적인 증가 때문인 것으로 생각되어 왔다. 그러나 Scarpance 등[7]은 시상하부에 렙틴 유전자를 장기간 과발현하였을 때 비만이 아닌 상태에서 렙틴 저항성이 발생하는 것을 관찰하여 고렙틴증 자체가 렙틴 저항성의 원인이 될 수 있음을 시사하였다. 이는 고인슐린 환경에 3주간 노출된 지방세포와 근세포에서 인슐린 저항성이 발생하였다는 보고[8]와 비슷한 개념으로 볼 수 있다.

따라서 본 연구에서는 지속적인 고렙틴증이 렙틴 저항성을 유도한다는 가정하에 고렙틴증과 렙틴 저항성을 동반하는 실험 모델에서 렙틴 농도를 반복적으로 감소시키면 렙틴 감수성이 회복될 수 있을 것이라는 가설을 만들고 이를 증명하고자하였다. 렙틴 저항성을 나타내는 비만 모델로는 Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) 쥐를 사용하였으며 24시간 간격으로 반복되는 금식기간을 통하여 혈중 렙틴 농도를 주기적으로 감소시킨 다음 렙틴 감수성을 측정하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 실험동물

현저한 복강 내 지방축적은 나타나지만 당뇨병은 발생하지 않은 7개월령의 OLETF쥐를 비만쥐 모델로 사용하였으며, 대조쥐로는 동일 연령의 Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO)쥐를 사용하였다. 본 연구실이 축적한 7개월령의 OLETF쥐의 인슐린 농도(ng/mL)는 약 1.99이며 LETO쥐는 0.96이었다. OLETF쥐는 시상하부의 CCK<sub>A</sub> 수용체 결함으로 인하여 식욕이 증가하고 과도한 지방 축적이 나타나서 유전적 비만 모델로 사용되고 있으며[9], 오츠카 제약회사

(Osaka, Japan)에서 제공받았다.

실험 동물은 생후 1개월에 제공받은 후 영남대학교 의과대학 청정사육사에서 사육되었으며, 오전 7시부터 12시간은 밝게 유지하고 이후 12시간은 소등하였다. 실험은 영남대학교 의과대학 동물실험 관리지침에 따라서 진행되었다.

### 2. 실험디자인

OLETF쥐와 LETO쥐 수컷을 대상으로 각각 3군씩 나누어서 실험을 진행하였다. 첫째 실험군은 대조군(Control)으로 식이섭취에 제한을 두지 않았으며, 둘째 실험군은 24시간의 금식과 24시간의 재식을 반복한 군(RFR, repeated fasting and refeeding)으로 아침 9시부터 익일 9시까지의 금식과 동일한 시간의 재식을 14회 반복하였다. 세 번째 실험군은 대조식이군(PF, pair-fed)으로서 RFR군이 재식이 시점부터 섭취량의 절반을 매일 섭취하게 하여 28일간 유지하였다. 위의 3가지 실험군은 다시 뇌하수체 후엽을 주입한 군(Vehicle)과 렙틴 주입군(Leptin)으로 나누었다. 실험 동물들은 체중과 식이섭취량에 맞추어서 각 군별로 분류를 하였다. 사용한 실험동물 수는 Vehicle군이 5마리, Leptin군이 6마리였다. 식이는 chow diet를 사용하였다.

### 3. 렙틴 또는 인공뇌척수액의 주입

각 군에서 주어진 방식으로 식이가 이루어진 다음 렙틴 (15  $\mu$ g/rat/day) 또는 인공뇌척수액을 지난 연구[10]에 사용한 방법에 따라 좌측 뇌실로 주입하였다. 간단히 요약하면, 실험동물을 xylazine hydrochloride (8 mg/kg, subcutaneously)와 ketamine (90 mg/kg, intraperitoneally)을 복강 내 주사하여 마취시킨 후 stereotaxic instrument에 고정하고 피부를 중앙선을 따라 절개하고 bregma를 기준으로 하여 후방 1.3 mm, 측방 1.9 mm 및 깊이 4 mm의 좌표에서 drilling하여 brain infusion kit (Alzet, CA)를 삽입하였다. Brain infusion kit를 약물이 담긴 osmotic minipump (Alzet, CA)와 연결한 다음 두개골에 고정한 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. 렙틴 감수성은 식이섭취량과 체중의 감소로 평가하였다. 시료 채취 시 뇌조직을 박리하여 cannula가 통과한 흔적을 추적하여 brain infusion kit가 정확히 위치하였는지를 확인하였다.

### 4. 시료의 채취

시료의 채취는 두 단계로 나누어서 시행하였다. 첫 단계로 모든 실험동물에서 실험시작 7일째에 식이섭취가 자유로이 이루어진 상태에서 꼬리 정맥에서 채혈하여 식이 혈중 렙틴 농도를 분석하였다. RFR군에서는 실험 14일째에 24시간 금식 후에 꼬리 정맥에서 채혈하여 공복 혈중 렙틴 농도

를 분석하였다. 두 번째 단계는 일주일간 측비실로 약물 주입을 마친 후 오전 9시경에 앞에 서술한 xylazine hydrochloride와 ketamine 마취 하에서 이루어졌다. 요약하면, 복벽과 흉벽을 절개하여 심장을 노출시키고 좌심실에 주사기를 삽입하여 혈액을 채취한 다음 차게 한 생리식염수 50 mL를 밀어 넣어 관류시켰다. 관류 직전에 대정맥동을 절개하여 관류액을 빠져나오게 유도하였다. 복강에서 부고환주위, 콩팥주위, 및 후복막강의 지방조직을 모두 절제하여 무게를 측정하고 값을 복강 내 지방량으로 간주하였다. 마지막으로 뇌를 분리하여 Kim 등[10]의 방법을 사용하여 시상하부를 적출한 다음 액체질소에 보관하였다가 분석에 사용하였다. 각 실험실에서 시료는식이섭취를 인위적으로 제한하지 않은 상태에서 채취하였다.

## 5. Western Blot 분석

균질화한 시상하부에서 추출한 단백질을 레틴 수용체 특이항체(Ob-R, Cat. No.: sc-8325, rabbit polyclonal antibody, Santa Cruz Biotechnology Inc, CA)를 사용하여 희석하여 레틴 수용체를 분석하였다. 희석배수는 1:1000으로 하였다. 내부표준으로 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 분석하여 비교하였다. 결합한 특이 항체는 horseradish peroxidase로 결합된 2차 항체(Cell Signaling, MA)와 반응시켰으며, enhanced chemiluminescence kit (Amersham Biosciences, UK)로 단백 발현을 확인하고 Scion Image software (Scion Corp, Frederick, Md)를 사용하여 정량 분석하였다.

## 6. 혈액분석

혈장 레틴 농도는 rat leptin radioimmunoassay kit (Linco Research, MO)를 사용하였으며, 혈장 adiponectin 농도는 adiponectin ELISA kit (Adipogene, Korea)를 사용하여 정량 분석하였다.

## 7. 통계분석

성적은 평균  $\pm$  표준오차로 표기하였다. 체중, 총 식이량, 복강내지방량, 및 혈중 레틴과 adiponectin 농도의 세 군 (Control, RFR, 및 PF) 간 차이의 유의성은 Kruskal-Wallis test로 검정하였으며, 각 군 간 차이의 사후검정은 ANOVA의 다중비교(Tukey 방식)를 이용하였다. Vehicle군과 Leptin군 및 LETO-Control과 OLETF-Control의 평균의 차이는 t-test로 검정하였다. 인공뇌척수액 또는 레틴을 주입하는 7일 동안의 식이량과 체중의 변화의 유의성은 repeated measured ANOVA를 사용하여 검정하였다. 통계 분석은 SPSSK 14.0으로 분석하였으며 유의수준은 95%로 하였다.

## 결 과

### 1. OLETF쥐의 특성

OLETF쥐는 동일한 연령의 LETO쥐에 비하여 체중은 29%, 28일간의 누적식이섭취량은 36%, 복강 내 지방량은 226%, 혈중 레틴 농도는 200%, 혈중 adiponectin 농도는 38% 더 높았다(Table 1, 2). 뇌질로 주입한 레틴의 효과로 LETO-Control군에서는 체중, 식이섭취량, 및 복강 내 지방량이 감소하였으나 OLETF-Control군에서는 Vehicle군과 비교하여 전혀 차이가 나타나지 않았다(Fig. 1, 2). 이는 OLETF쥐에서 심한 레틴 저항성이 발생하였음을 의미한다. OLETF-Control군에서 시상하부의 레틴 수용체 단백질량은 LETO-Control군에 비하여 유의하게 감소하였다( $P < 0.05$ ) (Fig. 3).

### 2. 반복적인 금식과 재식으로 인한 변화

체중은 반복적인 금식과 재식(RFR)의 결과로 OLETF와 LETO쥐 모두에서 Control군에 비하여 유의하게 감소하였으며( $P < 0.01$ ), PF군에서도 이와 비슷한 감소를 나타내

**Table 1.** Physical and biochemical changes during repeated fasting/refeeding or pair feeding protocol in the experimental groups

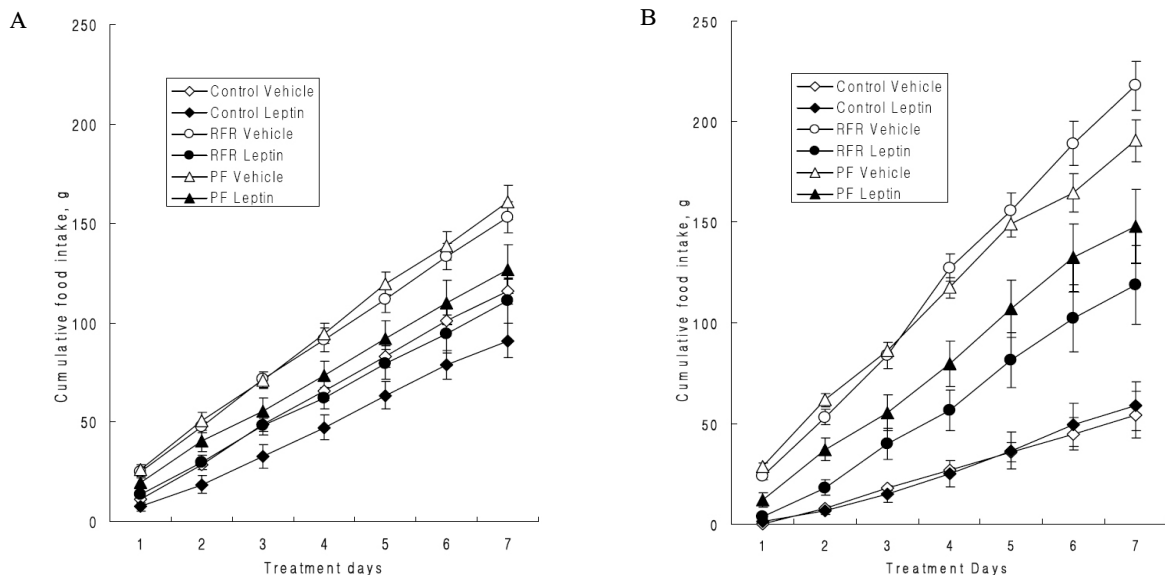
	LETO				OLETF			
	Control	RFR	PF	P-value	Control	RFR	PF	P-value
<b>Body weights (g)</b>								
Initial	513 $\pm$ 4.2	514 $\pm$ 12.9	515 $\pm$ 7.4	NS	663 $\pm$ 11.8	663 $\pm$ 11.4	665 $\pm$ 11.3	NS
Final	516 $\pm$ 4.6 <sup>a</sup>	434 $\pm$ 9.7 <sup>b,*</sup>	442 $\pm$ 6.2 <sup>b,*</sup>	0.001	664 $\pm$ 13.4 <sup>a</sup>	577 $\pm$ 6.2 <sup>b,*</sup>	577 $\pm$ 12.7 <sup>b,*</sup>	0.001
Difference	3 $\pm$ 2.2	-80 $\pm$ 5.9	-74 $\pm$ 4.0		2 $\pm$ 7.7	-84 $\pm$ 6.7	-88 $\pm$ 3.3	
<b>Total food consumptions during 28 days (g)</b>								
	558 $\pm$ 9.2 <sup>a</sup>	307 $\pm$ 6.2 <sup>b</sup>	303 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	0.001	759 $\pm$ 21.41 <sup>a</sup>	411 $\pm$ 13.3 <sup>b</sup>	403 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	0.001
<b>Serum leptin concentration (ng/mL)</b>								
Fed state	13.8 $\pm$ 0.6	12.6 $\pm$ 1.8	14.6 $\pm$ 0.6	NS	31.2 $\pm$ 1.6	26.9 $\pm$ 1.1	27.9 $\pm$ 1.8	NS
Fast state	n.m.	7.9 $\pm$ 0.7 <sup>†</sup>	n.m.		n.m.	15.6 $\pm$ 1.7 <sup>‡</sup>	n.m.	

Values are means  $\pm$  S.E.. n.m., not measured. RFR, repeated fasting and refeeding; PF, pair fed. NS, not significant. Initial and final denote the first and 28th day of the experiment. \* $P < 0.01$ , vs the corresponding initial. <sup>†</sup>  $P < 0.05$ , <sup>‡</sup>  $P < 0.01$ , vs the corresponding fed state. <sup>a,b</sup>The values of same indication have not significant difference.

**Table 2.** Effect of intracerebroventricular leptin infusion on serum concentrations of leptin and adiponectin and on visceral fat mass in the experimental groups

	LETO				OLETF			
	Control	RFR	PF	P-value	Control	RFR	PF	P-value
<b>Serum leptin concentration (ng/mL)</b>								
Vehicle	10.0 ± 0.9	10.7 ± 1.4	7.9 ± 0.5	NS	30.0 ± 0.8 <sup>‡</sup>	24.1 ± 1.6	24.9 ± 0.9	NS
Leptin	7.8 ± 0.4 <sup>a</sup>	2.8 ± 0.8 <sup>b,†</sup>	3.9 ± 0.6 <sup>b,†</sup>	0.012	27.1 ± 3.8	11.3 ± 2.7 <sup>†</sup>	17.4 ± 2.7	0.054
<b>Serum adiponectin concentration (μg/mL)</b>								
Vehicle	15.2 ± 2.0 <sup>a</sup>	29.9 ± 2.3 <sup>b</sup>	16.6 ± 1.9 <sup>a</sup>	0.017	21.1 ± 1.7 <sup>a</sup>	39.4 ± 4.9 <sup>b</sup>	31.8 ± 4.2 <sup>a,b</sup>	0.038
Leptin	23.6 ± 7.8	41.0 ± 2.4 <sup>*</sup>	30.6 ± 2.1 <sup>†</sup>	0.095	23.2 ± 2.4 <sup>a</sup>	38.2 ± 2.0 <sup>a,b</sup>	43.5 ± 7.0 <sup>b</sup>	0.018
<b>Visceral fat mass (g)</b>								
Vehicle	17.8 ± 1.1 <sup>a</sup>	14.8 ± 1.0 <sup>a,b</sup>	12.6 ± 0.9 <sup>b</sup>	0.006	58.1 ± 5.0 <sup>‡</sup>	55.1 ± 5.9	44.6 ± 4.5	NS
Leptin	12.3 ± 1.2 <sup>a,†</sup>	7.2 ± 0.7 <sup>b,†</sup>	7.7 ± 0.9 <sup>b,†</sup>	0.025	53.6 ± 5.0 <sup>a</sup>	30.4 ± 2.9 <sup>b,*</sup>	38.4 ± 2.2 <sup>b</sup>	0.012
Difference	6.2	7.6	4.9		4.5	24.7	7.6	

Values are means ± S.E.. RFR, repeated fasting and refeeding; PF, pair fed. NS, not significant. Leptin (15 μg/day) or vehicle (artificial cerebrospinal fluid) was infused for 7 days. \**P* < 0.05, † *P* < 0.01, vs their vehicle treated rats. ‡ *P* < 0.01, vs the corresponding LETO-Control. <sup>a,b</sup>The values of same indication have not significant difference.



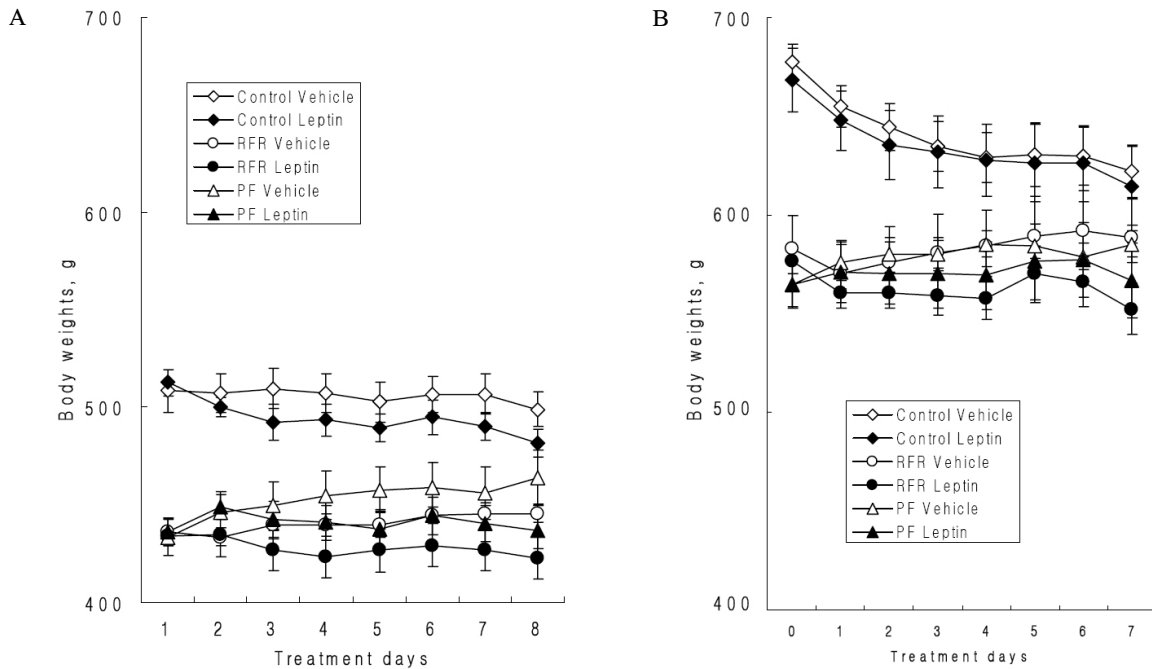
**Fig. 1.** Effects of intracerebroventricular (i.c.v.) leptin infusion on cumulative food intake in the LETO (A) and OLETF (B) rats. Leptin (15 μg/day) or vehicle (artificial cerebrospinal fluid) was infused for 7 days. Food intake was measured everyday. Values are means ± SE of 5-6 rats per group. *P* < 0.01 for difference between Vehicle and Leptin by ANOVA with repeated measures in the LETO-Control, -RFR, and -PF rats and OLETF-RFR and -PF rats. The difference between Vehicle and Leptin in each group at the seventh day represented the anorexic effect of i.c.v. infused leptin. RFR, repeated fasting and refeeding; PF, pair fed.

었다. 이는 체중이 식사시기보다 식이섭취량에 의존적임을 시사하는 것이다. RFR군에서 총 식이섭취량은 각각의 Control군에 비하여 OLETF쥐는 54%, LETO쥐는 55%로 서로 차이가 없었다. 24시간 금식 시 혈중 렙틴 농도는 식후와 비교하여 OLETF쥐에서 58%, LETO쥐에서 62%로 감소하여 서로 차이가 없었다(Table 1). OLETF쥐에서 시상하부 렙틴 수용체 단백질량은 Control군에 비하여 RFR과 PF군에서 유의하게 증가하였다(*P* = 0.004) (Fig. 3).

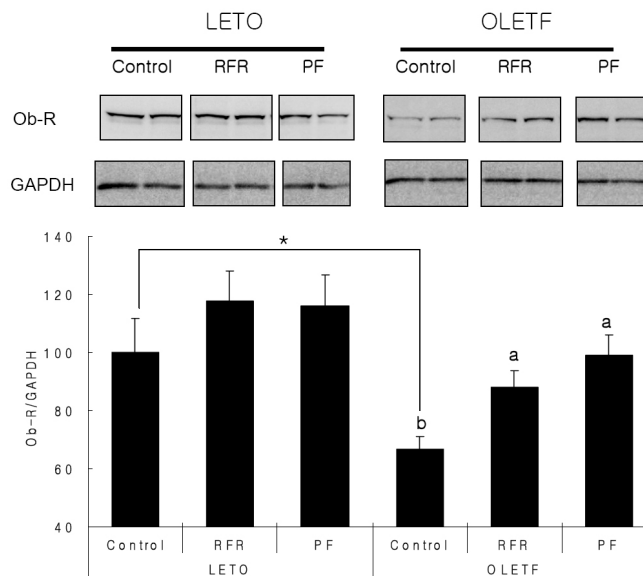
### 3. 뇌실로 주입한 렙틴의 효과

LETO-Control군과 비교하여 OLETF-Control군에서 뇌

실로 주입한 렙틴에 대하여 반응하지 않은 심한 렙틴 저항성이 나타났으나, OLETF-RFR군에서는 렙틴 투여군의 7일간 누적식이 섭취량이 Vehicle 처치군에 비하여 45% 감소하여 렙틴 감수성이 회복되었음을 알 수 있었다. 이는 OLETF-PF군에서 렙틴에 의한 누적식이섭취 감소가 22%인 것에 비하여 더 높은 값이었다(Fig. 1). LETO쥐에서는 렙틴에 의한 누적식이 섭취량 감소가 Control, RFR, PF군에서 각각 21%, 27%, 21%로 서로 차이가 나타나지 않았다(Fig. 1). 뇌실로 주입한 렙틴에 의한 체중의 변화는 식이섭취 변화와 비슷한 경향을 나타내었으나 OLETF-PF군에서는 렙틴의 효과가 유의하게 나타나지 않았다(Fig. 2).



**Fig. 2.** Effects of intracerebroventricular (i.c.v.) leptin infusion on daily body weight in LETO (A) and OLETF (B) rats. Leptin (15  $\mu$ g/day) or vehicle (artificial cerebrospinal fluid) was infused for 7 days. Values are means  $\pm$  SE of 5-6 rats per group.  $P < 0.01$  for difference between Vehicle and Leptin by ANOVA with repeated measures in the LETO-Control, -RFR, and -PF rats and OLETF-RFR rats. RFR, repeated fasting and refeeding; PF, pair fed.



**Fig. 3.** Leptin receptor (Ob-R) level in the hypothalamus of the experimental groups. Protein level was determined by Western blot. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as an internal control. Values are the means  $\pm$  SE for groups of 5 or 6 rats. \*  $P < 0.05$ . The Ob-R levels were elevated by RFR and PF compared to Control in OLETF rats ( $P = 0.004$ ), however, there was no significant difference in LETO rats. Values that do not share a common superscript are significantly different at  $P < 0.05$ . RFR, repeated fasting and refeeding; PF, pair fed.

일주일간의 렙틴 처치 후 복강 내 지방은 LETO쥐에서는 Control, RFR, PF군에서 Vehicle 처치군에 비하여 모두 유의하게 감소하였으나, OLETF쥐에서는 Vehicle 처치군에 비하여 RFR군에서만 유의하게 감소하였다(Table 2).

#### 4. 혈중 렙틴과 Adiponectin 농도

혈중 렙틴 농도는 OLETF쥐에서 LETO쥐에 비하여 현저히 증가하였다. OLETF쥐와 LETO쥐에서 RFR과 PF 자극

에 따른 혈중 렙틴 농도의 유의한 감소는 나타나지 않았다. 그러나 LETO-RFR군과 OLETF-RFR군에서는 렙틴 처치 시 현저한 렙틴 농도 감소가 나타났다. LETO-PF군에서도 렙틴 처치로 인한 렙틴 농도의 유의한 감소가 나타났다 (Table 2).

혈중 adiponectin 농도는 OLETF쥐에서 LETO쥐에 비하여 감소하지 않고 오히려 약 40% 증가하는 경향을 나타내었다. RFR 자극에 의하여 LETO와 OLETF쥐에서 모두 혈중 adiponectin 농도가 유의하게 증가하였다. 렙틴 처치 후 혈중 adiponectin 농도는 LETO 쥐에서는 -RFR과 -PF군에서 유의하게 증가하였으나 OLETF쥐에서는 유의한 변화가 없었다 (Table 2).

## 고 찰

본 연구에 사용한 OLETF쥐는 위장으로부터의 포만신호를 받는 시상하부 CCK<sub>A</sub> 수용체 결함으로 과식을 하여[9] 심한 복강 내 지방 축적을 특징으로 하며 중년 이후 발생하는 복부비만과 유사한 특성을 나타낸다. 본 연구에서도 OLETF쥐는 같은 연령의 LETO쥐에 비하여 체중은 약 130%, 복강 내 지방량은 3배 이상이었으며 혈중 렙틴 농도 역시 3배로 높은 결과를 얻었으며, 이는 앞선 연구들과 일치하는 경향이었다[11,12]. OLETF쥐에서 뇌실로 주입한 렙틴의 식욕억제 효과는 전혀 나타나지 않는 심한 렙틴 저항성을 나타내었으며 이 역시 Niimi 등의 연구 결과와 일치하는 것이다[13].

본 연구에서는 혈중 렙틴 농도의 지속적인 증가가 렙틴 저항성의 한 원인이며 렙틴 농도를 반복적으로 감소시키면 렙틴 감수성이 회복될 것이라는 가설을 만들고 이를 증명하기 위하여 OLETF쥐에서 24시간의 반복적인 금식을 통하여 혈중 렙틴 농도를 주기적으로 감소시킨 다음 렙틴을 뇌실로 주입하면서 식욕억제 정도를 분석하였다. 24시간 금식에 의하여 혈중 렙틴 농도는 식이 시에 비하여 OLETF쥐에서 58%, LETO쥐에서 62%로 유의하게 감소하였으며, OLETF 쥐의 금식 시 혈중 렙틴 농도는 LETO식이군의 식이 시 값에 비하여 불과 1.8 ng/mL 높은 것이었다. 따라서 혈중 렙틴 농도를 반복적으로 대조군인 LETO쥐 수준으로 감소시킨 것으로 판단되어 본 연구에서 사용한 RFR은 연구목적에 적합한 방법으로 생각된다.

렙틴 저항성의 원인은 아직 완전히 규명되어 있지 않지만 렙틴 저항성이 발생한 노령쥐에서 시상하부 렙틴 수용체가 감소하는 결과가 보고되었으며[14,15], Koletsy쥐에서 렙틴 수용체 유전자를 과발현한 경우에 에너지대사가 개선되었다는 보고[16]를 종합하면 렙틴수용체의 감소가 렙틴 저항성의 한 원인임을 알 수 있었다. 본 연구 결과도 OLETF쥐에서 렙틴 수용체 단백질이 LETO쥐에 비하여 유의하게 감소

하여 이를 뒷받침하였다. 렙틴 수용체의 감소는 렙틴 농도 증가에 따른 적응 현상으로 가정하면 혈중 렙틴 농도의 반복적인 감소는 렙틴 수용체 수를 증가시킬 수 있을 것으로 생각하였다. 본 연구 결과는 OLETF쥐의 -RFR와 -PF군에서 유의한 증가를 나타내었으며 LETO쥐에서는 증가하는 경향을 나타내었다. 이 결과는 OLETF쥐에서 RFR 자극 후 감소되었던 렙틴 수용체 수가 정상화됨을 의미하며 렙틴 감수성이 증가하는 현상을 설명할 수 있게 하였다.

OLETF쥐에서 반복적인 금식과 재식이(RFR) 후 뇌실로 주입한 렙틴의 식이섭취 억제 효과는 현저히 증가하였다. 이는 RFR이 렙틴 저항성을 나타내는 OLETF쥐에서 렙틴 감수성을 증가시켰음을 의미하는 결과이다. 그러나 RFR군에서 총 식이 섭취량은 Control군에 비하여 OLETF쥐에서 54%, LETO쥐에서는 55%에 걸쳐서 중등도 이상의 식이섭취 제한이 가해진 것으로 볼 수 있다. 식이섭취 제한이 렙틴 감수성을 증가시킬 수 있기 때문에[17,18], 식이섭취 제한의 효과를 배제하기 위하여 대조식이군(-PF)을 사용하였다. OLETF-PF군에서, OLETF-Control군에 비하여, 뇌실로 주입한 렙틴에 의한 식이섭취가 유의하게 감소하였으나 누적 식이섭취량 감소가 Vehicle군의 22%로 OLETF-RFR군에서의 45%에 비하여 낮았다. 또한 OLETF-PF군에서는 렙틴 투여후 복강 내 지방량의 유의한 감소도 나타나지 않았다. 즉, 동일한 양의 식이를 섭취한 OLETF-PF군에서도 렙틴 감수성 증가는 나타났으나 그 정도는 OLETF-RFR군에 비하여 낮은 것으로 판단되었다. 이와같이 OLETF-PF군에서 시상하부 렙틴 수용체 단백질이 OLETF-RFR군과 마찬가지로, OLETF-Control군에 비하여, 유의하게 증가하였지만 렙틴 감수성 증가는 OLETF-RFR군에서 더욱 현저하였던 결과는 부분적으로 혈중 adiponectin 농도의 증가로 설명할 수 있을 것으로 생각한다.

Adiponectin은 지방세포에서 분비되어 인슐린 감수성을 증가시킬[19] 뿐 아니라 렙틴의 효과를 강화시키는 것으로 알려져[20] 있다. OLETF쥐의 혈중 adiponectin 농도는 LETO쥐에 비하여 감소하지 않았다. 이는 비만쥐에서 혈중 adiponectin 농도가 감소한다는 연구들[21,22]과는 차이가 있지만 40주령의 OLETF쥐 혈중 adiponectin 농도가 LETO와 차이가 없음을 보고한 Choi 등[12]의 연구결과와는 일치하였다. 본 연구에서 RFR후 혈중 adiponectin 농도가 증가하였는데, 이 결과는 저자들의 본 연구와 동일한 조건으로 21회 RFR 후 지방조직 adiponectin 발현이 현저히 증가되었다는 지난 연구의 결과[23]와 일맥상통하는 것이다. Adiponectin 농도는 공복과 같은 단기간의 대사적인 변화에 의하여 변하지 않지만[24,25] 체중감소[26,27]와 렙틴 처치[28]에 의해서 증가하는 것으로 알려져 있다. 그러나 본 연구 결과 동일한 식이섭취와 체중 감소를 나타내는 PF군은 Control군에 비하여 유의한 혈중 adiponectin 농도 변화를 보이지 않았으

나 RFR군에서만 유의한 증가는 나타난 결과는 RFR이 adiponectin 증가와 관련이 있음을 시사하는 것이며 기전 규명을 위한 추가적인 연구가 필요한 것으로 생각한다.

RFR에 대한 생체의 반응은 사용한 실험동물에 따라 다르게 나타난다. 즉, RFR에 대하여 생체가 절약모드로 전환하면 에너지 소비가 감소되고 저장이 증가되지만[29,30], 저자의 지난 연구[31]와 같이 RFR 결과 지방 저장에 필요한 lipoprotein lipase는 증가되지만 랩틴이 함께 증가하여 체중이 오히려 감소하기도 한다. 본 연구에서 나타난 RFR에 따른 체중의 변화는 저자의 지난 결과[31]와 유사하여 체중은 기본적으로 식이시점보다는 식이 섭취량에 의해 결정되는 것으로 판단하였다. 저자들은 RFR을 임상의 비만치료에 그대로 적용할 수는 있다고는 생각하지 않지만 비만 환자의 랩틴 저항성을 개선한다면 임상적으로 랩틴을 적용할 수 있음을 의미하는 것이기 때문에 본 연구가 가치를 가지는 것으로 생각한다.

요약하면 심한 복강 내 지방축적과 랩틴 저항성을 나타내는 OLETF 쥐에서 반복적인 금식과 재식을 통한 혈중 랩틴 농도 변화는 랩틴 감수성 회복, 복강 내 지방량 감소, 및 혈중 adiponectin 농도 증가의 효과를 유도하였으며 이는 부분적으로 시상하부 랩틴 수용체 단백질의 증가에 기인하는 것으로 생각되었다.

## 요 약

**연구배경:** 랩틴 저항성은 비만의 전형적인 특성인데 고렙틴증과 동반된다. 고렙틴증은 랩틴 저항성에 따른 보상적인 증가 때문인 것으로 생각되어 왔으나 최근에 시상하부에 랩틴 유전자를 장기간 과발현시킨 모델에서 비만 없이 랩틴 저항성이 발생하는 현상이 보고되어 고렙틴증 자체가 랩틴 저항성의 원인이 될 수 있음이 제시되었다. 이에 저자들은 비만에서 발생하는 랩틴 저항성의 한 원인으로 지속적인 고렙틴증을 가정하고 랩틴 농도를 주기적으로 감소시키면 랩틴 저항성이 회복될 수 있다는 가설을 만들고 이를 증명하기 위하여 본 연구를 계획하였다.

**방법:** 비만쥐에서 혈중 랩틴 농도를 주기적으로 감소시키기 위하여 7개월된 Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF)쥐를 24시간 간격으로 금식과 재식(Repeated fasting/refeeding, RFR)을 14차례 반복한 다음 뇌실로 랩틴을 주입하면서 랩틴 감수성을 측정하였다. 대조군(Control)은 자유롭게 식이를 섭취하게 하였으며 대조식이군(pair fed, PF)은 RFR군의 재식이 시 식이량의 절반씩을 매일 섭취하게 하였다. 정상 대조쥐로는 같은 연령의 Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) 쥐를 사용하였다.

**결과:** OLETF쥐는 심한 복강 내 지방축적과 고렙틴증 및 랩틴 저항성을 나타내었다. 그러나 OLETF-RFR군에서는

OLETF-Control군에 비하여 뇌실로 주입한 랩틴의 식이섭취 억제효과가 증가되었으며 복강 내 지방량이 감소하고 혈중 adiponectin 농도가 증가하였다. 또한 LETO-Control군에 비하여 감소하였던 OLETF-Control군의 시상하부 랩틴 수용체 단백질도 OLETF-RFR군에서는 유의하게 증가되었다.

**결론:** 심한 복강 내 지방축적과 랩틴 저항성을 나타내는 OLETF 쥐에서 반복적인 금식과 재식을 통한 혈중 랩틴 농도 변화는 랩틴 감수성 회복, 복강 내 지방량 감소, 및 혈중 adiponectin 농도 증가의 효과를 유도하였으며, 이는 부분적으로 시상하부 랩틴 수용체 단백질의 증가에 기인하는 것으로 생각된다.

## 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. Shek, EW, Scarpance PJ: Resistance to the anorexic and thermogenic effects of centrally administered leptin in obese aged rats. *Regul Pept* 92:65-71, 2000
3. Van Heek M, Compton DS, France CF, Tedesco RP, Fawzi AB, Graziano MP, Sybertz EJ, Strader CD, Davis HR: Diet-induced obese mice develop peripheral, but not central, resistance to leptin. *J Clin Invest* 99:385-390, 1997
4. 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
5. 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
6. Halaas JL, Booze 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* 94:8878-8883, 1997
7. Scarpance PJ, Matheny M, Zhang Y, Shek EW, Prima V, Zolotukhin S, Tumer N: Leptin-induced leptin resistance reveals separate roles for the anorexic and

- thermogenic responses in weight maintenance. *Endocrinology* 143:3026-3035, 2002
8. Fernández-Veledo S, Nieto-Vazquez I, de Castro J, Ramos MP, Brüderlein S, Möller P, Lorenzo M: Hyperinsulinemia induces insulin resistance on glucose and lipid metabolism in a human adipocytic cell line: paracrine interaction with myocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 93:2866-2876, 2008
9. Tachibana I, Akiyama T, Kanagawa K, Shiohara H, Furumi K, Watanabe N, Otsuki M: Defect in pancreatic exocrine and endocrine response to CCK in genetically diabetic OLETF rats. *Am J Physiol* 270:G730-G737, 1996
10. 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
11. Yamashita S, Nakamura T, Shimomura I, Nishida M, Yoshida S, Kotani K, Kameda-Takemura K, Tokunaga K, Matsuzawa Y: Insulin resistance and body fat distribution. *Diabetes Care* 19:287-291, 1996
12. Choi KC, Ryu OH, Lee KW, Kim HY, Seo JA, Kim SG, Kim NH, Choi DS, Baik SH, Choi KM: Effect of PPAR- $\alpha$  and - $\gamma$  agonist on the expression of visfatin, adiponectin, and TNF- $\alpha$  in visceral fat of OLETF rats. *Biochem Biophys Res Commun* 336:747-753, 2005
13. Niimi M, Sato M, Yokote R, Tada S, Takahara J: Effects of central and peripheral injection of leptin on food intake and on brain Fos expression in the Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rat with hyperleptinaemia. *J Neuroendocrinol* 11:605-611, 1999
14. Scarpance PJ, Matheny M, Tumer N: Hypothalamic leptin resistance is associated with impaired leptin signal transduction in aged obese rats. *Neuroscience* 104:1111-1117, 2001
15. Kurose Y, Iqbal J, Rao A, Murata Y, Hasegawa Y, Terashima Y, Kojima M, Kangawa K, Clarke II: Changes in expression of the genes for the leptin receptor and the growth hormone-releasing peptide/ghrelin receptor in the hypothalamic arcuate nucleus with long-term manipulation of adiposity by dietary means. *J Neuroendocrinol* 17:331-340, 2005
16. Keen-Rhinehart E, Kalra SP, Kalra PS: AAV-mediated leptin receptor installation improves energy balance and the reproductive status of obese female Koletsy rats. *Peptides* 26:2567-2578, 2005
17. Wilsey J, Scarpance PJ: Caloric restriction reverses the deficits in leptin receptor protein and leptin signaling capacity associated with diet-induced obesity: role of leptin in the regulation of hypothalamic long-form leptin receptor expression. *J Endocrinol* 181:297-306, 2004
18. Fernandez-Galaz C, Fernandez-Agullo T, Perez C, Peralta S, Arribas C, Andres A, Carrascosa JM, Ros M: Long-term food restriction prevents ageing-associated central leptin resistance in wistar rats. *Diabetologia* 45:997-1003, 2002
19. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T: The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med* 7:941-946, 2001
20. Qi Y, Takahashi N, Hileman SM, Patel HR, Berg AH, Pajvani UB, Scherer PE, Ahima RS: Adiponectin acts in the brain to decrease body weight. *Nat Med* 10:524-529, 2004
21. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y: Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 257:79-83, 1999
22. Prada PO, Hirabara SM, de Souza CT, Schenka AA, Zecchin HG, Vassallo J, Velloso LA, Carneiro E, Carnevalheira JB, Curi R, Saad MJ: L-glutamine supplementation induces insulin resistance in adipose tissue and improves insulin signalling in liver and muscle of rats with diet-induced obesity. *Diabetologia* 50:1949-1959, 2007
23. Lee CK, Kim YW: Changes of adipogenic and lipolytic activities following repeated fasting and refeeding in rat. *Korean J Obesity* 14:16-21, 2005
24. Kmiec Z, Pokrywka L, Kotlarz G, Kubasik J, Szutowicz A, Mysliwski A: Effects of fasting and refeeding on serum leptin, adiponectin and free fatty acid concentrations in young and old male rats. *Gerontology* 51:357-362, 2005



25. Merl V, Peters A, Oltmanns KM, Kern W, Born J, Fehm HL, Schltes B: Serum adiponectin concentrations during a 72-hour fast in over- and normal-weight humans. *Int J Obes Relat Metab Disord* 29:998-1001, 2005
26. Baratta R, Amato S, Degano C, Farina MG, Patane G, Vigneri R, Frittitta L: Adiponectin relationship with lipid metabolism is independent of body fat amss: Evidence from both cross-sectional and intervention studies. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2665-2671, 2004
27. Valsamakis G, McTernan PG, Chetty R, Daghi NA, Field A, Hanif W, Barnett AH, Kumar S: Modest weight loss and reduction in waist circumference after medical treatment are associated with favorable changes in serum adipokines. *Metabolism* 53:430-434, 2004
28. Delporte ML, Mkadem SAE, Quisquater M, Brichard SM: Leptin treatment markedly increased plasma adiponectin but barely decreased plasma resistin of ob/ob mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287: E446-E453, 2004
29. Kim TS, Freake HC: High carbohydrate diet and starvation regulate lipogenic mRNA in rats in a tissue-specific manner. *J Nutr* 126:611-617, 1996
30. Kochan Z, Karbowska J, Swierczynski J: Unusual increase of lipogenesis in rat white adipose tissue after multiple cycles of starvation-refeeding. *Metabolism* 46:10-17, 1997
31. Kim YW, Scarpace PJ: Repeated fasting/refeeding elevates plasma leptin without increasing fat mass in rats. *Physiol Behav* 78:459-464, 2003