



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학석사 학위논문

시냅스가소성 조절을 통한 Vaspin 과 Leptin 의  
장기간 지속되는 섭식 억제 작용

Long-Lasting Anorexigenic Effects of Vaspin and Leptin  
through the Regulation of Synaptic Plasticity

울 산 대 학 교 대 학 원

의 과 학 과

문 상 윤

시냅스가소성 조절을 통한 Vaspin 과 Leptin 의  
장기간 지속되는 섭식 억제 작용

지 도 교 수      김 민 선

이 논문을 이학석사 학위 논문으로 제출함

2023 년 8 월

울 산 대 학 교 대 학 원

의 과 학 과

문 상 윤

문 상 윤의 이학석사 학위 논문을 인준함

심사위원 정 창 희 (인)

심사위원 김 민 선 (인)

심사위원 민 세 희 (인)

울 산 대 학 교 대 학 원

2023 년 8 월

## 국문 요약

**연구 배경:** Vaspin 은 비만증을 동반한 2 형 당뇨병 모델인 Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) 쥐의 내장지방조직에서 처음으로 발견되었고, 비만한 마우스에 투여 시 혈당과 인슐린 저항성이 개선되는 대사에 유리한 작용을 가진 adipokine 이다. 마우스의 중추신경계로 vaspin 을 투여하면, 먹이 섭취가 감소되는 것을 관찰하였으나, 그 작용 기전은 아직 잘 밝혀져 있지 않다. Leptin 은 흰색 지방세포에서 주로 생산되고, 혈액으로 분비되어 대표적인 식욕 억제 작용을 가지는 호르몬이다. Leptin은 궁상핵에 있는 식욕억제 작용을 가지는 POMC 뉴런 활성을 촉진하고, 식욕 촉진 작용을 가지는 AgRP 뉴런 활성을 억제하여 식욕 억제 작용을 유발한다고 알려져 있으나, leptin 의 식욕 조절 작용이 장시간 지속되는 기전은 아직 명확하지 않다. 본 학위 논문에서는 vaspin 과 leptin 의 식욕 조절 작용이 장시간 지속되는 기전을 시냅스가소성 중심으로 연구하였다.

**연구 방법:** 정상 C57 마우스의 뇌실 내로 vaspin 과 leptin 을 투여하고, 식욕 억제 및 체중증가의 감소 효과가 얼마나 지속되는지 관찰하였다. 다음으로 시상하부 뉴런에서 leptin 작용의 주요한 신호전달 경로인 JAK2-STAT3 활성화가 vaspin 에 의해서도 유도되는지 확인하였다. 또한 시냅스가소성에 중요한 NMDA receptor (NMDAR)가 vaspin 과 leptin 의 장기간 지속되는 식욕억제 작용과 JAK2-STAT3 활성화에 관여하는지 알아보려고 NMDAR antagonist 를 함께 투여하여 vaspin 과 leptin 의 식욕 조절 작용이 차단되는지 살펴보았다. 시상하부 NPY/AgRP 뉴런에서 vaspin 과 leptin 이 NMDAR 을 통하여 long term depression (LTD)을 일으키는지 시상하부 뉴런 세포 실험과 마우스 실험을 통하여 증명하고, 마지막으로 vaspin 과 leptin 에 의한 LTD 유발에 JAK2-STAT3 신호전달계가 관여하는지 확인하였다.

**연구 결과:** 정상 C57 마우스의 뇌실 내로 vaspin 과 leptin 을 일 회 투여 시 현저한 식욕 억제효과와 체중증가 감소가 유발되었고, 이러한 효과는 각각 72 시간 96 시간까지 지속되었다.

Vaspin 의 뇌실 내 투여는 leptin 과 유사하게 시상하부에서 STAT3 신호전달계를 활성화시켰다. 또한 NMDAR antagonist 인 MK-801 이나 AP5 를 leptin 투여 전에 투여하면 leptin 에 의한 섭취 억제 및 STAT3 활성화가 차단되어 leptin 의 섭취 조절 작용에 NMDAR 이 중요함을 알 수 있었다. N1 시상하부 신경세포에서 vaspin 과 leptin 처리는 LTD 의 한 기전인 glutamate receptor AMPAR (GluR1) endocytosis 를 유발하였다. 그리고 이러한 작용은 NMDAR antagonist 나 JAK2-STAT3 inhibitor 를 같이 처리하면 억제되므로, NMDAR 과 JAK2-STAT3 신호전달계가 vaspin 과 leptin 에 의한 LTD 을 매개한다는 것을 알 수 있었다. 마지막으로, 마우스를 이용한 실험에서 vaspin 의 뇌실 내 투여는 식욕 촉진 작용을 가진 NPY/AgRP 뉴런에 AMPAR endocytosis 를 촉진하였고, LTD 의 또 다른 기전인 수상돌기에 spine 형성을 감소시켰다.

**결론:** 이상의 연구 결과들은 vaspin 과 leptin 이 시상하부 뉴런, 특히 NPY/AgRP 뉴런에 NMDA 과 JAK2-STAT3 신호전달계를 통하여 LTD 를 유발시킴으로써, 이 뉴런에 흥분성 신호 유입을 차단하여 식욕 억제 작용이 유지되도록 도와줄 가능성을 제시한다. 본 논문은 시상하부 뉴런에서 식욕 조절 작용에 시냅스가소성의 한 기전을 제시하였다는 점에서 의의가 있다.

# 목 차

국문요약.....	i - ii
서론.....	1-7
연구가설.....	8
연구방법.....	9-13
연구결과.....	14-33
고찰.....	34-37
결론.....	38
참고문헌.....	39-41
Abstract.....	42-43

# 그림 목차

서론 그림 1. 시상하부 뉴런에서의 섭식 조절 기전.....	6
서론 그림 2. 시냅스가소성(Synaptic Plasticity)와 LTD(Long-term Depression) .....	7
서론 그림 3. Vaspin 과 leptin 의 장기간 지속되는 식욕 조절 기전의 가설.....	8
그림 1. 정상 C57 마우스에 vaspin 과 leptin 를 뇌실 내로 투여 후 섭식 억제 작용의 지속 시간...	15
그림 2. 정상 C57 마우스에서 vaspin 과 leptin 를 뇌실 내로 투여 후 체중 변화.....	16
그림 3. Vaspin 투여 후 시상하부 AgRP 뉴런의 STAT3 활성화 .....	18
그림 4. NMDAR 차단이 leptin 의 식욕억제 작용에 미치는 효과 .....	20
그림 5. NMDAR 차단이 vaspin 과 NMDA 투여로 유도된 시상하부 STAT3 활성화에 미치는 영향...	21
그림 6. NMDAR 차단이 vaspin 과 leptin 투여로 유도된 시상하부 STAT3 활성화에 미치는 영향...	22
그림 7. 신경세포에 vaspin 투여가 NMDAR 활성화를 통하여 세포 내 Ca <sup>2+</sup> 증가.....	24
그림 8. 시상하부 뉴런에서 vaspin 처리가 NMDAR 을 통하여 AMPAR (GluR1) endocytosis 유도.....	26
그림 9. 시상하부 뉴런에서 leptin 에 의한 AMPAR endocytosis 촉진와 NMDAR 억제에 의한 효과 차단.....	27
그림 10. 시상하부 뉴런에서 Vaspin 에 의한 GluR1 과 Rab5 또는 Lamp1 의 colocalization 이 JAK2-STAT3 신호전달 antagonist 에 의해 차단.....	29
그림 11. 시상하부 NPY/AgRP 뉴런에서 vaspin 투여는 NMDAR 을 통하여 AMPAR endocytosis 유발.....	31
그림 12. Vaspin 에 의한 시상하부 AgRP 뉴런의 수상돌기 spine 수 조절과 NMDA 수용체 차단이 이에 미치는 영향 .....	33



# 서론

## 1. 비만증을 극복하기 위한 “시상하부” 연구의 필요성

지난 50 년 동안, 비만의 발생은 전 세계적으로 증가하였다. 세계보건기구 (World Health Organization, WHO) 통계에 따르면, 적어도 10 억 명의 성인들이 과체중이고 3 억명은 비만이며 미래에는 예측할 수 없는 만큼 증가될 수 있다고 보고하고 있다.<sup>1</sup> 한국 역시 지난 10 년간 비만 인구가 1.5 배 증가하였고, 특히 중년 남성의 경우 과체중이 40%를 초과하였다. 더욱 우려스러운 점은 소아 비만증의 유병률이 지난 30 년 동안 3 배 증가하였다는 점이다. 소아 비만증에 걸릴 경우 성인보다 합병증에 걸릴 기간이 더 길어 비만에 따른 여러 합병증에 장기간 노출될 가능성이 증가한다.<sup>2</sup> 비만과 과체중은 에너지 소모 보다 에너지 섭취가 만성적으로 초과하여 잉여의 에너지가 지방조직에 장기간 동안 축적되어 발생하는데, 에너지 섭취와 소모는 궁극적으로 뇌에 의하여 조절 되기 때문에, 비만은 “뇌”에 의한 에너지 대사 조절의 실패로 인하여 발생하는 질환으로 여겨진다.<sup>3</sup>

시상하부는 에너지 항상성을 일차적으로 담당하는 뇌 영역이다. 특히, 시상하부의 내측 하방에 위치하는 궁상핵(acruate nucleus, ARC)은 포만중추로 알려져 있으며, 이 부위에는 POMC(proopiomelanocortin)를 생산하는 뉴런과 이와 길항적인 작용을 하는 neuropeptide Y(NPY)와 Agouti-related protein(AgRP)를 생산하는 뉴런이 있다. POMC 뉴런은 식욕 억제 작용을 가지는 뉴로펩타이드인 alpha-melanocyte stimulating hormone(a-MSH)를 생산한다. 이 뉴런이 파괴되면 정상 체중인 생쥐가 2 배 정도로 심한 비만이 발생하므로 POMC 뉴런은 항비만 작용을 하는 중요한 뉴런으로 생각된다. 한편, a-MSH 와 melanocortin receptor-3/4(MC3/4-R)에 경쟁적으로 작용하는 AgRP 와 NPY 를 생산하는 NPY/AgRP 뉴런은 섭식 섭식을 증가시키고, 에너지소모를 감소시켜 체중을

증가시키는 방향으로 작용한다. 말초조직에서 분비되는 체중 조절 작용을 하는 많은 호르몬과 영양소들은 궁상핵 POMC 뉴런과 NPY/AgRP 뉴런들의 직·간접적인 작용을 통하여 먹이섭취와 에너지대사를 조절한다<sup>4</sup> (그림 1).

## 2. 식욕억제 호르몬 leptin 의 시상하부 작용 기전

Leptin 은 흰색지방세포에서 주로 생산되어 혈액으로 분비되는 호르몬으로, 섭식 및 체중조절에 관여하는 여러 호르몬들(예를 들면, ghrelin, peptide YY, GLP-1, CCK, pancreatic polypeptide) 중에서 가장 강력한 식욕억제 효과를 나타낸다. 랫트나 마우스의 제 3 뇌실에 leptin 을 투여하면 먹이섭취와 체중이 감소된다.<sup>5</sup> 더군다나 leptin 은 말초 조직의 포도당 대사와 지질 대사를 조절하는 작용도 가진다. 이러한 leptin 의 대사 조절 작용은 활성형 leptin 수용체 아형인 LepRb 수용체에 결합함으로써 이루어진다. 흥미롭게도 궁상핵 AgRP 뉴런과 POMC 뉴런에 LepRb 가 높은 수준으로 발현되어 있다.<sup>6,7</sup> POMC 뉴런과 AgRP 뉴런은 leptin 의 대사 조절 작용을 매개하는 주요한 뉴런으로 잘 알려져 있다.<sup>7,8</sup> Leptin 의 작용은 다양한 세포 내 신호전달 경로를 통하여 이루어지는데, 이 중 가장 중요한 경로는 Janus kinase-2 (JAK2)-signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) 경로이다. Leptin 이 LepRb 의 세포 외 도메인에 결합하면 JAK2 가 LepRb 의 세포내 도메인에 결합하면서 그 자신과 LepRb 을 인산화시킨다.<sup>9</sup> 이어서 STAT3 가 JAK2 에 결합하면서 인산화를 통하여 활성화된다. 인산화된 STAT3 는 핵으로 이동하여 POMC 와 AgRP 유전자의 프로모터에 결합하여 POMC 발현을 자극하고 AgRP 발현을 억제한다.<sup>10</sup> 비만한 사람이나 동물에서는 시상하부 뉴런에서 leptin 에 의한 STAT3 신호전달계의 활성화 과정에서 장애가 발생한다. 이를 렙틴 저항성이라 부른다. 한편 leptin 을 시상하부로 투여할 경우 24 시간 이상 섭식 억제가 지속되나, leptin 의 식욕조절 효과가 장시간 동안 지속되는 기전은 아직 밝혀지지 않았다.<sup>11</sup>

### 3. Vaspin 의 섭식 및 혈당 조절 효과

Visceral adipose derived serpin(vaspin)은 serpin family 에 속하는 415 개 아미노산으로 구성되어 있는 단백질 호르몬이다. 복부비만을 동반한 제 2 형 당뇨병 모델 동물 모델인 Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) 쥐의 내장 백색지방조직에서 vaspin cDNA 가 처음으로 분리하였다.<sup>12</sup> 이 동물 모델에서, 지방조직의 vaspin 의 발현 양은 비만과 혈장 인슐린 농도가 제일 높을 시점에서 가장 높았고, 당뇨병이 심해져서 체중이 감소됨에 따라 감소하였다.<sup>13</sup> 사람의 지방조직에서도 vaspin mRNA 발현은 제 2 형 당뇨병, 비만 및 인슐린저항성과 관련이 있는 것으로 밝혀졌다.<sup>14</sup> Vaspin 은 지방조직 이외에도 시상하부, 근육, 위, 결장, 고환, 심장, 신장 등 다양한 조직에서 발현된다.<sup>15,16</sup> 비만한 마우스에 vaspin 을 투여하면 혈당이 개선되며 인슐린저항성이 호전된다고 알려져 있다.<sup>13</sup> 또한 leptin 수용체가 결핍된 db/db 마우스와 C57BL/6 마우스의 시상하부 및 뇌척수액에서 vaspin 이 확인되었다. 흥미롭게도 말초 및 중추에 vaspin 을 투여하면 비만 db/db 마우스와 정상 C57BL/6 마우스에서 먹이섭취가 감소하였다.<sup>16</sup> 더욱 흥미로운 점은 vaspin 을 db/db 마우스의 뇌로 1 회 투여 시 혈당 감소 효과가 6 일 동안 지속되었다.<sup>16</sup> 그러나, 중추신경계에서 vaspin 의 섭식 억제 효과가 얼마나 지속되고, vaspin 효과가 장기간 지속되는 기전에 대해서는 아직 연구가 되어 있지 않다.

### 4. 뉴런 활성 조절에 있어서 시냅스가소성의 중요성

“시냅스가소성”이란 어떠한 조건에 의해 특정 뉴런에서 시냅스를 통한 흥분성 신호전달의 강도가 지속적으로 증가하거나 (long-term potentiation, LTP), 혹은 감소하는 (long-term depression, LTD) 현상으로, 기억, 중독, 학습의 신경생리학적 기전으로 제시되어 왔다 (그림 2).<sup>17</sup>

대표적인 흥분성 신경전달물질인 glutamate 의 수용체는 대사성(metabotropic)과 이온성(ionotropic), 두 종류가 있으며, glutamate 는 이들 수용체에 결합하여 신호를 전달한다. 이온성 glutamate 수용체에는 N-methyl-D-aspartic acid receptor (NMDAR),  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor (AMPA), kainate 수용체 등의 아형이 있으며, 칼슘이나 나트륨 같은 양이온들을 직접 통과시켜 시냅스후 (post-synaptic) 뉴런에 흥분성 탈분극을 유발시킨다. 이 들 중 NMDA 수용체가 시냅스가소성에 있어서 가장 중요한 수용체이다. NMDAR 의 경우 마그네슘이 통로를 막고 있다가 어떤 원인으로 시냅스 탈분극이 glutamate 에 의한 자극과 동시에 일어날 때 칼슘을 뉴런 내로 유입시키고, 칼슘에 의하여 활성화되는 여러 신호전달 경로를 통하여 시냅스에 AMPA 수용체의 양적인 증가를 유발한다. AMPA 수용체의 인산화를 통해서 AMPA 수용체의 전도성은 강화되고, 그 결과 나중에 오는 자극에 더 크게 반응하며 다 많은 수의 AMPA 수용체가 시냅스 세포막으로 이동한다. 즉 NMDAR 는 시냅스 후 세포막에 AMPA 수용체의 기능과 수를 증진시켜 LTP(long-term potentiation)를 유발한다.<sup>18</sup> 이와 반대방향으로 시냅스 반응이 감소하고, AMPA 수용체가 endocytosis 에 의해 양적 감소가 일어나면 LTD(long-term depression)가 유도된다.<sup>19</sup>

최근 연구에서 따르면 leptin 의 중요한 신호전달경로인 JAK2-STAT3 신호전달계가 NMDAR 가 매개하는 LTD 시냅스가소성에 관여한다고 한다.<sup>20</sup> 뉴런 기능에 있어 JAK/STAT 신호전달계의 역할은 아직 완전히 이해되지는 않았지만, JAK 은  $\gamma$ -amino-butyric acid (GABA)<sup>21</sup>, NMDAR, AMPAR 를 포함한 신경전달물질 수용체의 발현과 기능을 조절한다.<sup>22,23</sup> 또한 JAK2-STAT3 신호전달계가 해마(hippocampus) 뉴런에서 NMDAR 에 의존적으로 방식으로 LTD 을 유도한다는 것도 밝혀졌다.<sup>24</sup> 시냅스가소성 조절의 또 다른 기전으로 흥분성 시냅스가 형성되는 장소인 수상돌기(dendritic process)상의 spine 형성의 조절을 들 수 있다. 즉 LTP 발생시 dendritic spine 수가 증가하며, LTD 발생 시에는 수상돌기

spine 수가 감소한다. 시상하부에서 이러한 dendritic spine 형성의 변화를 관찰하는 것은 매우 흥미로울 거라 생각된다.

## 5. 에너지항상성을 조절하는 시상하부 뉴런에서 시냅스가소성

비만증은 몇 번의 과식을 통해서 발생하는 것이 아니라, 오랜 기간을 걸쳐 점차적으로 진행하므로 비만 발생 과정에서 에너지대사와 섭식 조절을 담당하는 뉴런들의 시냅스에 장기적인 변화를 일으킬 것으로 생각되며, 비만 발생에 있어서 시상하부 뉴런들의 시냅스가소성 변화를 이해하는 것은 매우 중요할 것으로 생각된다.

이전의 연구 논문에서 leptin 에 의한 시상하부 궁상핵에서 NPY 뉴런과 POMC 뉴런 절에 시냅스가소성이 관여함이 보고되었다.<sup>25</sup> 즉 leptin 이 없는 ob/ob 마우스에 leptin 을 투여하게 되면 NPY/AgRP 뉴런에 억제성 시냅스의 수가 증가하였고, 흥분성 시냅스의 수가 감소하였다. 그리고 POMC 뉴런에서는 반대 방향의 시냅스 변화를 유도하였다. 또한, leptin 은 해마 뉴런에서 LTD 를 유도 시킨다고 보고되었다.<sup>26</sup> 하지만 leptin 이 어떤 기전을 통하여 AgRP 뉴런과 POMC 뉴런의 시냅스가소성을 조절하는지는 잘 알려져 있지 않다.

선행 연구에 따르면 AgRP 뉴런은 dendritic spine 을 많이 가지고 있으나, POMC 뉴런에서는 dendritic spine 이 잘 형성되어 있지 않다. 흥미롭게도 마우스에서 단식(fasting)을 하면 AgRP 뉴런의 수상돌기 수와 glutamate 의 신경세포 내 신호전달이 증가되며 단식에 의한 AgRP 뉴런의 활성화가 NMDAR 에 의존적인 방식으로 이루어진다는 사실이 보고되었다.<sup>27</sup>

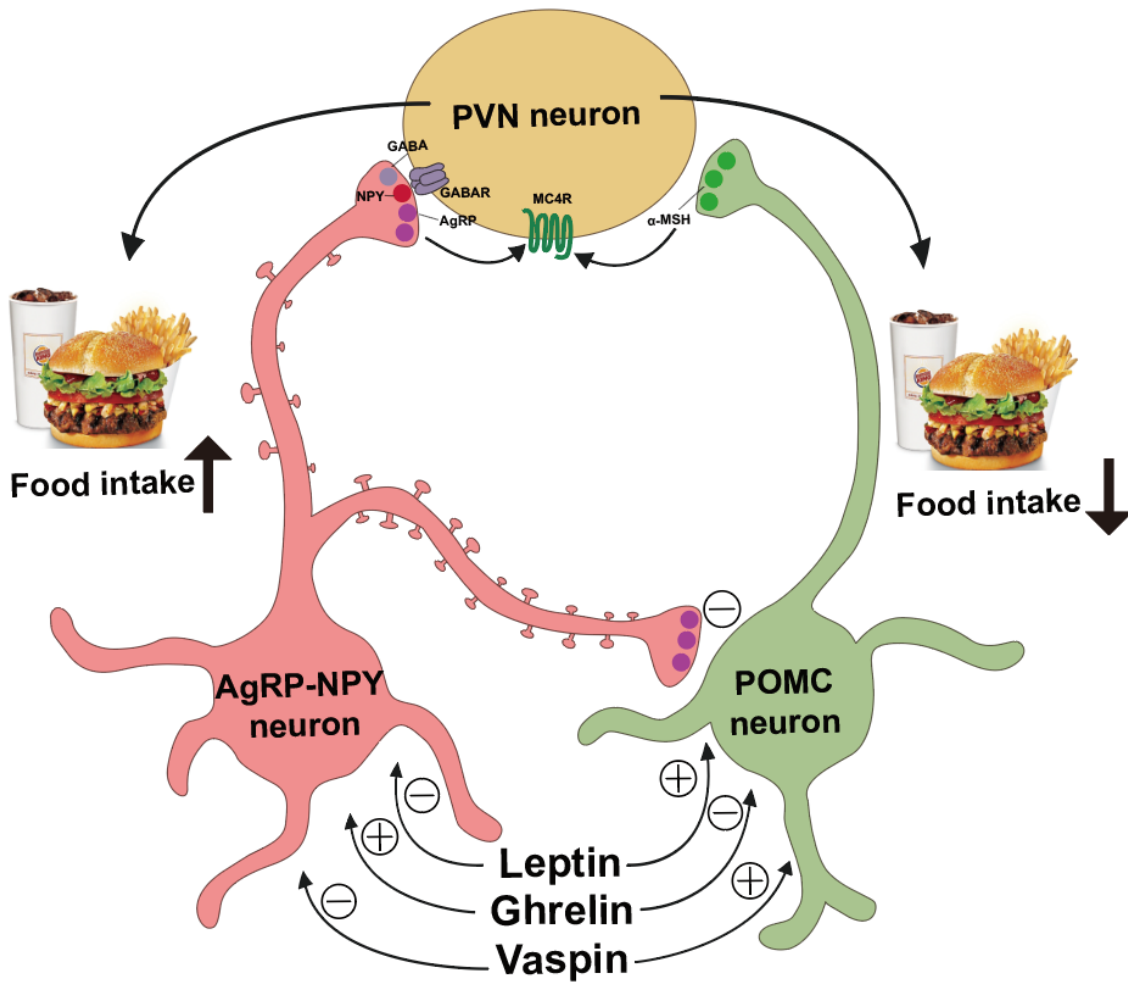


그림 1. 시상하부 뉴런에서의 섭식 조절 기전

포만중추부위로 알려진 시상하부의 궁상핵에는 식욕을 억제하는 POMC 를 생산하는 뉴런과 그와 반대로 식욕을 증진하는 NPY/AgRP 를 생산하는 뉴런이 존재한다. 말초조직에서 분비되는 다양한 호르몬들은 POMC 와 AgRP 뉴런의 직·간접적인 작용을 통해 섭식과 전신 에너지 대사를 조절한다.

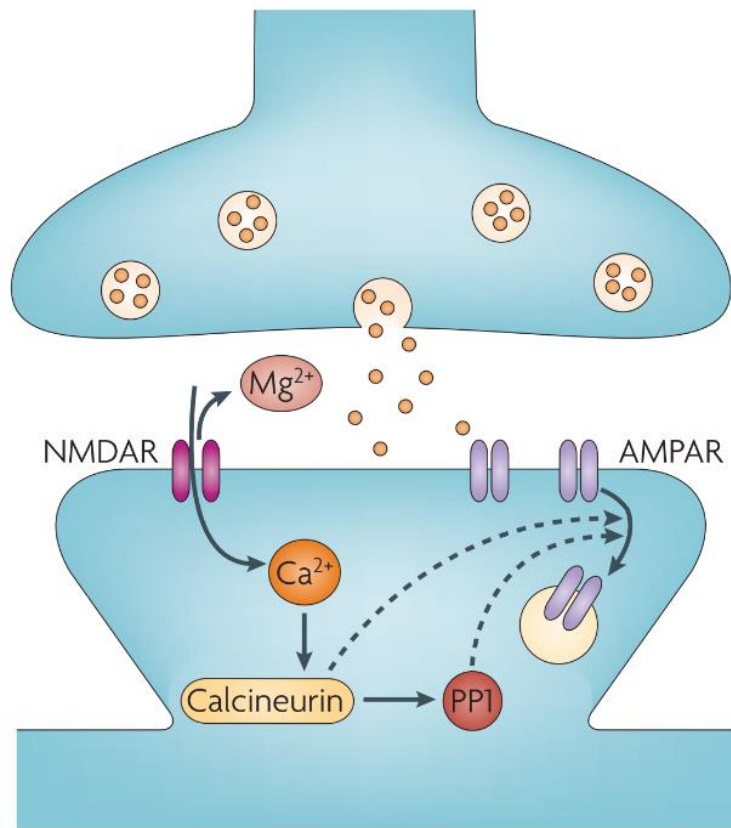


그림 2. 시냅스가소성(Synaptic Plasticity)와 LTD(Long-term Depression)

시냅스가소성에는 특정 뉴런에서 시냅스를 통한 신호전달의 강도가 지속적으로 증가하는 long-term potentiation (LTP)과 신호전달 강도가 지속적으로 감소하는 long-term depression(LTD)이 있다. 시냅스가소성에서 중요한 요소인 NMDAR 에 glutamate 가 결합하면 뉴런 내로 칼슘이 유입되고, 일련의 신호전달계를 통해 AMPA 수용체의 endocytosis 가 유도하여 LTD 이 일어난다.

## 연구 가설

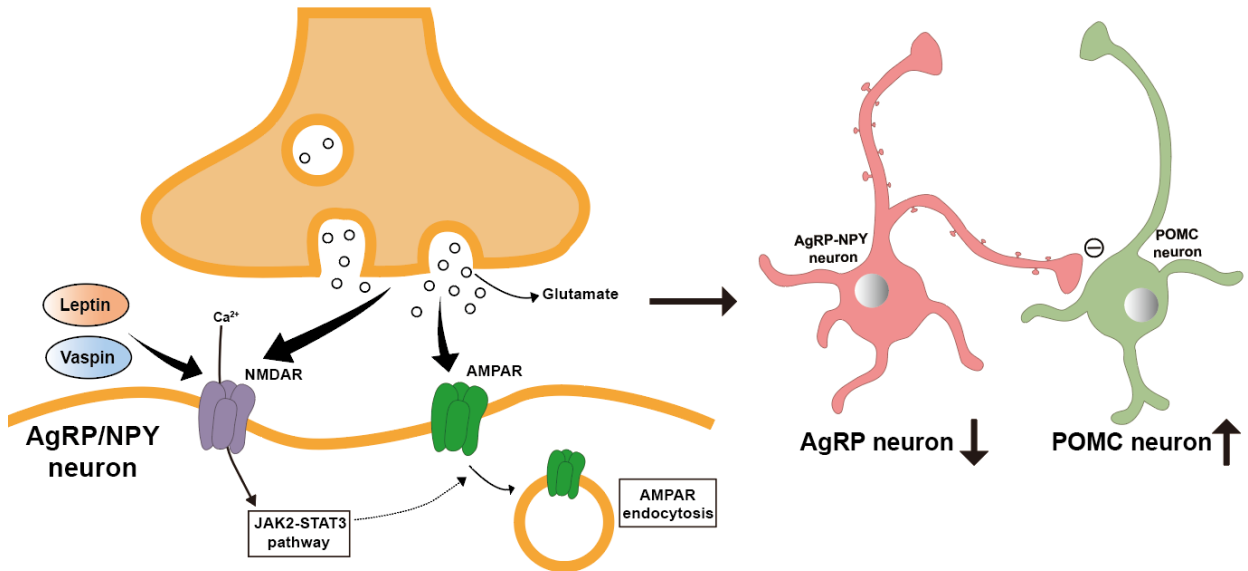


그림 3. Vaspin 과 leptin 의 장기간 지속되는 식욕 조절 기전의 가설 그림

선행 연구를 통하여 vaspin 투여 후 NPY/AgRP 발현이 감소하고 POMC 발현이 증가한다. 본 연구에서 시상하부 NPY/AgRP 뉴런에서 STAT3 신호전달계가 활성화되었다. 또한 vaspin 과 leptin 의 섭식억제 작용이 NMDAR 억제제에 의하여 차단됨을 확인하였다. 이 결과로 vaspin 과 leptin 은 NPY/AgRP 뉴런 내에서 vaspin/leptin-NMDAR-JAK2/STAT3 전달계를 통하여 Long-term depression 이 유도되고, NPY/AgRP 에 의해 억제를 받는 POMC 뉴런의 활성이 증가하여 섭식과 체중증가를 억제한다는 가설을 세우고, 본 연구를 통해 가설을 증명하고자 한다.



# 연구 방법

## 1. 동물

8-10 주령 수컷 마우스 C57BL/6J 마우스는 Orient Bio (Seoul, Korea)에서 구매하였다. AgRP-tdTomato 마우스는 AgRP-Cre 마우스 (University of Texas Southwestern Medical Center, Dr. Joel K. Elmquist로부터 얻음)와 Rosa26-loxP-STOP-loxP-tdTomato 마우스 (Jackson Laboratory, #007909)를 교배하여 제작하였다. 마우스들은 standard chow(Samyang, Seoul, Korea) ad libitum 를 먹었다. 23°C 통제된 온도와 12 시간 명암 주기 (명주기 8 A.M~8 P.M.) 환경에서 사육하였다. 모든 실험 과정은 Asan Institute for Life Sciences (Seoul, Korea)의 Institutional Animal Care and Use Committee 에서 승인 후 진행하였다.

## 2. 펩타이드와 약물

Vaspin (#8337-PI-050)와 leptin (CF-498-OB)은 R&D system 에서 구매하였다. NMDA antagonist MK801 과 AP5, NMDA (M3262) 및 Stattic 은 Sigma 에서 구매하였다. AG490 은 Tocris 에서 구매하였다.

## 3. 세포 배양

10% fetal bovine serum, penicillin/streptomycin (각 100units/ml)을 포함한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)을 사용하여 SH-SY5Y human neuroblastoma 세포와 N1 murine 시상하부 뉴런 세포를 배양하였다.

## 4. 뇌실 내 캐놀라 삽관 및 바이러스 주입

마취(Zoletil® 40 mg/kg + Rumpen® 5 mg/kg)하에 Kopf stereotactic frame (David Kopf Instruments, Tujunga, CA)을 사용하여 제 3 뇌실 (third ventricle)에 캐놀라를 삽입하기 위하여 Bregma 로 후방으로 1.4 mm, sagittal sinus 로부터 좌로 0.1 mm, 두개골 표면에서 하방으로 5.8 mm 위치에 26-게이지 stainless steel 캐놀라의 끝을 위치시켰다. 수술 후 일주일 회복기간을 가진 뒤 마우스가 약물 주입에 익숙해지도록 3 일동안 handling 을 진행하였다. 캐놀라가 뇌실 내에 제대로 삽입되었는지 확인하기 위해 Angiotensin-II (50 ng per mice) 음수 반응을 시행하여 음수 반응을 보인 동물 만을 실험과 데이터 분석에 사용하였다.

펩타이드과 약물은 Hamilton syringe (Hamilton Company, Reno, NV)와 Harvard infusion pump (Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts)를 이용하여 30 초 동안 5 µl/min 속도로 주입하였다. 마우스들을 하루 동안 금식 시키고 vaspin (1-3 µg), leptin (1 µg), NMDA(20 ng)을 0.9% saline 에 녹여 투여하였다. Inhibition study 로는 MK801 (1 µg), AP5 (1 µg)를 2 µl 의 0.9% saline 에 녹여 vaspin 과 leptin 투여하기 30 분 전에 주입하였다. 먹이섭취와 체중은 펩타이드 및 약물 주입 후 1, 2, 4, 7, 24 시간 동안 모니터링하였다.

AgRP 뉴런을 형광으로 표지하기 위하여 Cre 에 의존적인 방식으로 mCherry 를 발현시키는 adeno-associated virus (AAV8-hSyn-DIO-mchery)를 AgRP-Cre 마우스의 양측 궁상핵에 주입하고, 이어서 좌측 뇌실 (lateral cerebroventricle, LV)에 캐놀라를 삽관하였다. 바이러스를 이용한 유전자 발현이 일어나도록 2 주간 기다린 뒤 LV 캐놀라를 통하여 vaspin (1 µg)을 단독 또는 AP5 를 함께 주입하였다.

## 5. 면역 블로팅

궁상핵을 포함한 내배측 시상하부에서 인산화된 STAT3(phospho-STAT3, pSTAT3)와 총 STAT3 (total STAT3, tSTAT3) 단백질의 양을 보기 위해, 8-10 주령 C57BL/6J 마우스를

단두하여 희생시킨 뒤 시상하부 조직을 신속하게 얻어서 즉시 액체 질소에 넣어서 급속 냉동한 뒤 분석 전까지는  $-70^{\circ}\text{C}$  에 보관하였다. 펩타이드와 약물 ICV 투여 후 언급한 시간에 시상하부 조직을 얻었다. 조직으로 단백을 추출하여  $50\ \mu\text{g}$  단백을 SDS-PAGE gel 상에서 전기영동 한 뒤 PVDF membrane 으로 이동시켰다. 5% skim milk 로 blocking 후 phospho-STAT3(Y705) 또는 total Stat3 (Cell signaling, rabbit, 1:1000)에 대한 일차항체를 처리하였다. Horseradish peroxidase (HRP)가 결합된 이차항체에 처리 후 chemiluminescent detection system (New England Biolabs, Beverly, MA)을 이용하여 현상하였다. pSTAT3 와 tSTAT3 band intensity 는  $\beta$ -actin band intensity 로 보정하였다.

## 6. 면역 염색

마우스를 Zoletil® (40 mg/kg)와 Rumpen® (5 mg/kg)을 복강으로 투여하여 마취를 시킨 뒤 좌심실을 통해 50 ml 의 0.9% saline 를 관류하고, 그 다음 50 ml 4% paraformaldehyde 를 관류하였다. 전체 뇌 조직을 얻어 4% PFA 에 24 시간 보관하고, 이어서 30% sucrose solution 에 조직이 가라앉을 때까지 담가서 탈수시켰다. 탈수된 뇌조직을 cryostat (Leica, Wetzlar, Germany) 장비를 이용하여 20-30  $\mu\text{m}$  두께로 Coronal section 을 실시하였다.

pSTAT3 염색 면역 염색을 위하여 시상하부 절편을 1% NaOH, 1%  $\text{H}_2\text{O}_2$  가 들어있는 0.05% PBST 에 상온에서 20 분 반응시킨 후 0.3% glycine 이 들어있는 0.05% PBST 로 상온에서 10 분 더 반응시켰다. PBS 로 세척을 한 뒤 0.03% SDS 가 들어있는 PBS 에 10 분 반응시키고 3% donkey serum 으로 상온에서 2 시간 blocking 을 진행하였다. pSTAT3 일차항체는 Blocking 용액에 1:1000 (Cell signaling, rabbit, #9131) 희석 후  $4^{\circ}\text{C}$  에 48 시간 동안 반응시켰다. PBS 세척 후 anti-rabbit Alexa-Fluor-488,555 가 결합된 이차항체 용액 (1:1000)에서 상온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 세포의 핵을 염색하기 위해 DAPI

(1:10,000)에 10 분간 반응 후 형광 염색을 공초점 현미경 (Carl Zeiss 710, Germany)을 이용하여 촬영하여 공상핵 내의 pSTAT3 신호강도를 측정하였다.

세포에서 면역 염색을 위하여 12 well plate 에 poly-D-lysine 을 코팅한 glass 를 깔고, 그 위에 N1 시상하부 신경세포를  $1 \times 10^5$  개로 깔아주었다. 신경세포에서 AMPA 수용체의 endocytosis 를 확인하기 위해 세포를 vaspin (100 nM) 혹은 leptin (100 nM)을 AG490 (10  $\mu$ M)이나 stattic (1  $\mu$ M)와 같이 혹은 단독으로 30 분 처리 한 후 cold PBS 로 washing 해주었다. Cold 4% FPA 로 30 분 고정을 해준 후 일차항체 GluR1 (1:1000, SYSY, mouse, 182011), Rab5 (1:1000, abcam, rabbit, 18211), Lamp1 (1:1000, BD Biosciences, rat, #553792)에 4°C 에서 24 시간 반응시켰다. 그 후 PBS washing 을 한 후 anti-rabbit Alexa-Fluor-488, 555 가 결합된 이차항체 용액 (1:1000)에서 상온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 세포의 핵을 염색하기 위해 DAPI (1:10,000)에 반응 후 공초점 현미경 (Carl Zeiss 710, Germany)을 이용하여 촬영 후 각 세포별로(약 100 개) lamp1 rab5 positive 와 GluR1 positive 의 신호강도를 측정하였다.

## 7. AgRP 뉴런 dendritic spine 분석

AgRP-mcherry 의 신호 강도를 높이기 위해 DsRed (1:1000, Takara, 632496)항체를 반응시킨 후, 공초점 현미경을 이용하여 촬영하였다. Coronal 섹션 후 Image J 소프트웨어를 사용하여 dendrite 의 길이와 spine 의 수를 측정하였고, 각 dendrite 에 있는 spine 의 수를 10 $\mu$ m 당 spine 의 수로 표현하였다.

## 8. 세포 내 Ca<sup>2+</sup> 측정

세포 내 칼슘 농도는 Ca<sup>2+</sup>-sensitive dye Flou4 (Invitrogen)을 사용하여 측정하였다. SHSY5Y 세포는 12well plate 에 커버슬립을 깔고 그 위에  $1 \times 10^5$  개의 세포를 분주하였다.

측정 당일 serum free medium 에 2 시간을 배양한 뒤 0.04% Pluronic F-127 (Invitrogen)의 1 $\mu$ M Flou4/AM 이 포함되어 있는 DMEM 에 37°C 1 시간 반응시켜 주었다. 칼슘이 측정될 동안 세포는 Hank's balanced saline solution (HBSS) 버퍼에서 유지되었다. 칼슘 이미징은 inverted microscope (Leica)을 이용하여 진행하였으며, 이미지는 기록이 시작되는 후로 300 초 동안 측정하였다. 남은 200 초 동안 칼슘 이미징은 vaspin (100nM) 또는 NMDA inhibitor (MK801 or AP5 at 10  $\mu$ M) 처리 하에 측정하였다. 형광은 485 nm 파장으로 방출되고, 방출된 빛은 535 nm 파장에서 측정되었다. 모든 측정은 상온 (22-25°C)에서 진행하였다.

## 9. 통계

모든 데이터는 평균  $\pm$  표준오차로 표시하였고, Prism software version 9.2 (GraphPad)를 이용하여 통계 분석을 수행하였다. 그룹 간 분석을 위하여 두 그룹 간은 *t*-test 를 사용하였고, 3 그룹 이상 비교 분석은 ANOVA 분석 후 Tukey's post hoc 분석을 시행하였다. *P* 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 것으로 판단하였다.

## 연구 결과.

### 1. Vaspin 과 leptin 과 섭식 및 체중 조절 작용의 지속 시간 연구

이전 연구<sup>13</sup>에서 vaspin 중추신경계로 1 회 투여 시 혈중 포도당 농도를 6 일 동안 감소시켰기 때문에, 섭식 억제 작용도 오랫동안 지속되는지 알아보기 위해 정상 C576J 마우스의 제 3 뇌실에 캐놀라를 삽입하였다. 24 시간 단식 후 캐놀라를 통해 vaspin (1~3  $\mu$ g)을 뇌실 내로 투여하고, 효과가 사라질 때까지 매일 먹이섭취량을 측정하였다. 비교를 위하여 한 군의 동물에는 동일 조건에서 leptin (1  $\mu$ g)을 투여하였다. 그림 1 A 에서 보여주는 바와 같이 vaspin 과 leptin 투여 후 먹이 섭취 억제 작용이 24 시간이내부터 관찰되었다. Leptin 의 섭식 억제 작용이 가장 크게 나타났으며, vaspin 1  $\mu$ g 에서는 첫 24 시간에 큰 차이는 없었지만 시간이 지날수록 vaspin 3  $\mu$ g 보다 더 큰 효과가 나타남을 관찰하였다. 각각의 투여약물에 대하여 먹이섭취 억제효과에 대한 지속시간을 알아보기 위해 일단위의 먹이섭취량을 나누어 분석한 결과, vaspin 1  $\mu$ g 에서 72 시간 동안 지속되었으며, leptin 1  $\mu$ g 은 96 시간 동안 지속되었다. (그림 1 B) 또한 그림 2 에서 vaspin 과 leptin 뇌실 내 투여는 saline 을 투여한 대조군에 비하여 체중 증가도 96 시간 동안 유의하게 억제하였다. 이상의 결과를 통하여 vaspin 과 leptin 이 중추신경계에 작용하여 수 일간 먹이섭취 및 체중증가를 억제시키는 효과가 있음을 확인하였다.

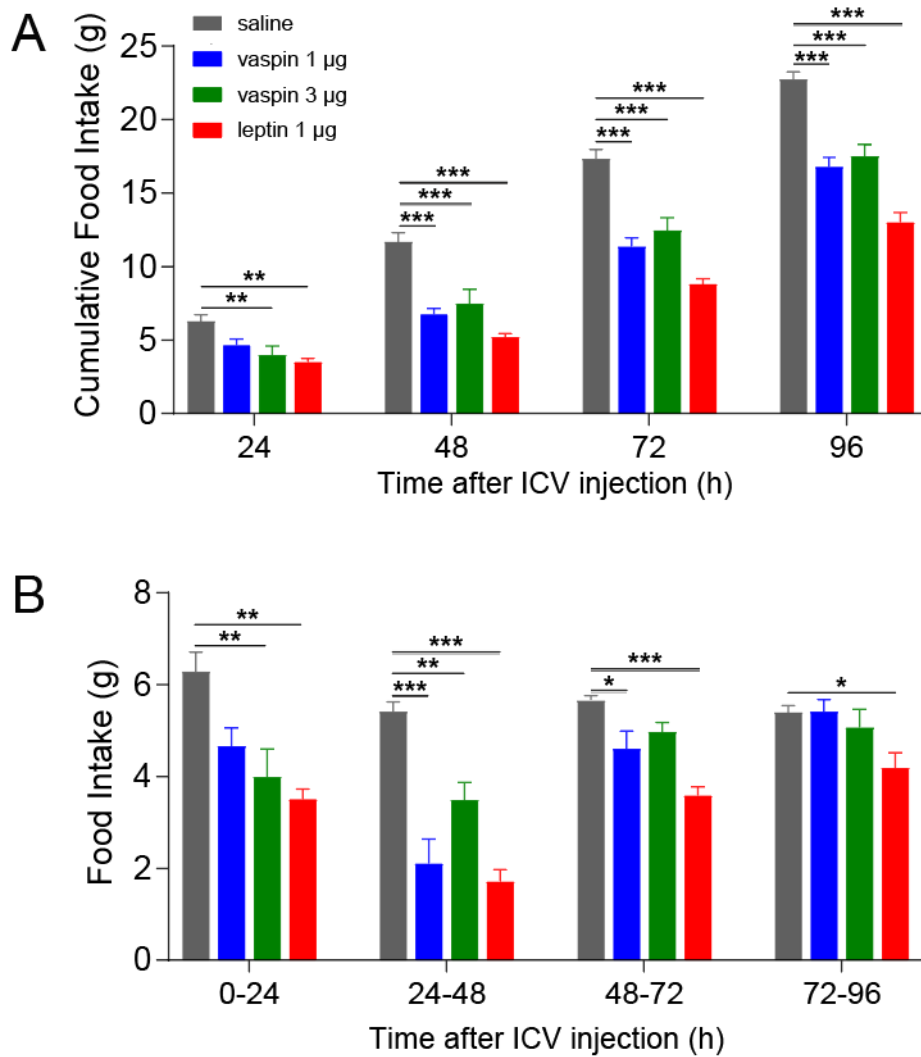


그림 1. 정상 C57 마우스에 vaspin 과 leptin 를 뇌실 내로 투여 후 섭식 억제 작용의 지속 시간

8-10 주령 C57BL/6J 마우스에 제 3 뇌실 내로 삽관한 캐눌라를 통하여 saline, vaspin (1  $\mu$ g), vaspin (3  $\mu$ g), leptin (1  $\mu$ g)을 주입 후 96 시간 동안 먹이섭취량을 측정. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs. saline 투여군.

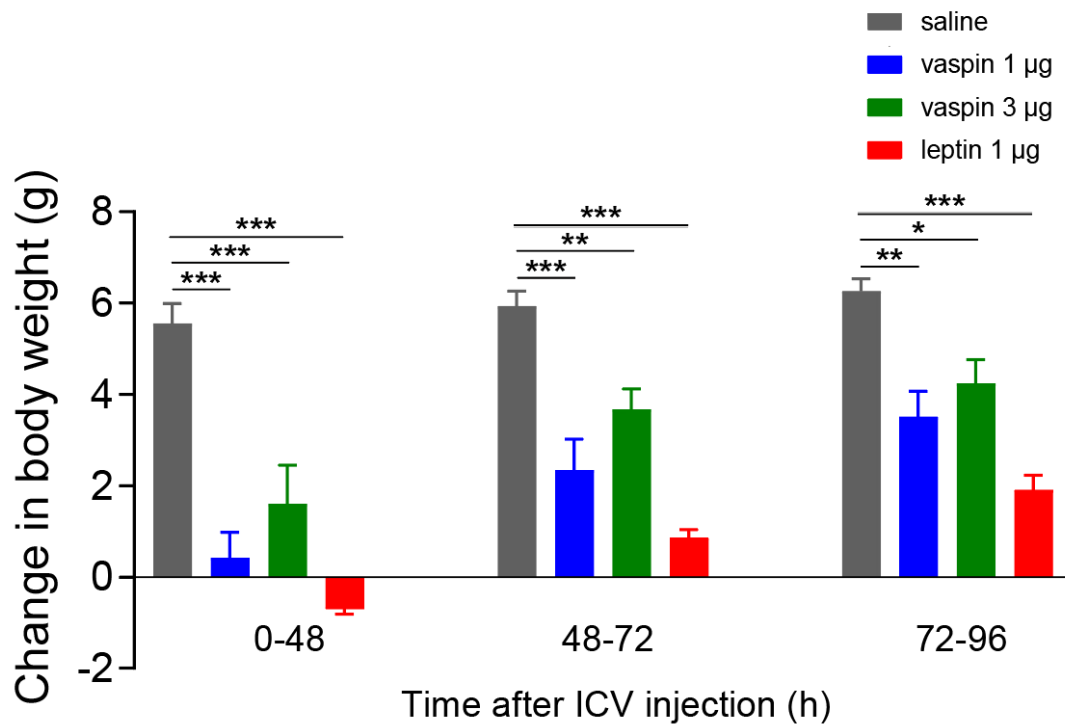


그림 2. 정상 C57 마우스에서 vaspin 과 leptin 를 뇌실 내로 투여 후 체중 변화

8-10 주령 C57 마우스에 뇌실 내로 saline, vaspin (1 µg), vaspin (3 µg), leptin (1 µg)을 주입 후 체중 변화. \* $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs. saline 투여군.



## 2. Vaspin 의 의한 시상하부 AgRP 뉴런에 STAT3 신호전달계 활성화

시상하부에서 leptin 의 주요한 신호전달계는 JAK2-STAT3 로 알려져 있다. <sup>28</sup> 따라서 vaspin 도 leptin 과 같이 시상하부 STAT3 활성화를 증가시키는지 알아보려고 하였다. 이를 위하여 밤 사이 공복 상태에서 C57 마우스의 제 3 뇌실에 삽입한 캐놀라를 통하여 vaspin (1 µg)을 투여 후 30 분 뒤에 뇌를 채취하여 pSTAT3 항체를 사용하여 면역염색을 시행하였다. 대조군에게는 saline 을 투여하였다. 그림 3A 에서 보여 주는 바와 같이 vaspin 투여는 시상하부 궁상핵 부위에 STAT3 활성화 지표인 인산화된 STAT3 (pSTAT3) 발현을 현저하게 증가시켰다. 본 연구실의 미발표 선행 연구에서 vaspin 을 뇌실 내로 투여 시 시상하부에서 섭식 억제 인자인 NPY/AgRP mRNA 발현이 유의하게 감소하고, 섭식촉진 인자인 POMC, CART mRNA 발현이 증가함을 확인하였다. AgRP 뉴런은 GABA 를 분비하여 POMC 뉴런 활성을 억제하는 것을 알려져 있으므로 <sup>29</sup>, 본 연구에서는 vaspin 에 의한 AgRP 뉴런 조절에 주목을 하기로 하였다. 따라서 vaspin 투여가 AgRP 뉴런의 STAT3 신호전달계를 활성화시키는지 보고자 하였다. AgRP 뉴런의 somata 를 염색하는 좋은 일차 항체가 없기 때문에 AgRP-tdTomato 마우스를 이용하였다. 이 마우스에 상기에서 기술한 것과 동일한 방법으로 vaspin 을 제 3 뇌실내로 주입하고, 30분 뒤에 뇌를 채취하여 pSTAT3 면역염색을 실시하여 붉은색 형광을 띤 AgRP 뉴런에 pSTAT3 면역활성의 강도를 측정하여 대조군과 비교하였다. 그림 3B 에서 보여 주는 바와 같이 AgRP 뉴런의 pSTAT3 염색 강도가 vaspin 투여군에서 대조군 보다 현저하게 증가하였다. 이러한 연구 결과는 vaspin 이 leptin 과 유사하게 시상하부 뉴런, 특히 NPY/AgRP 뉴런에서 STAT3 신호전달계를 활성화시킴을 증명하였다.

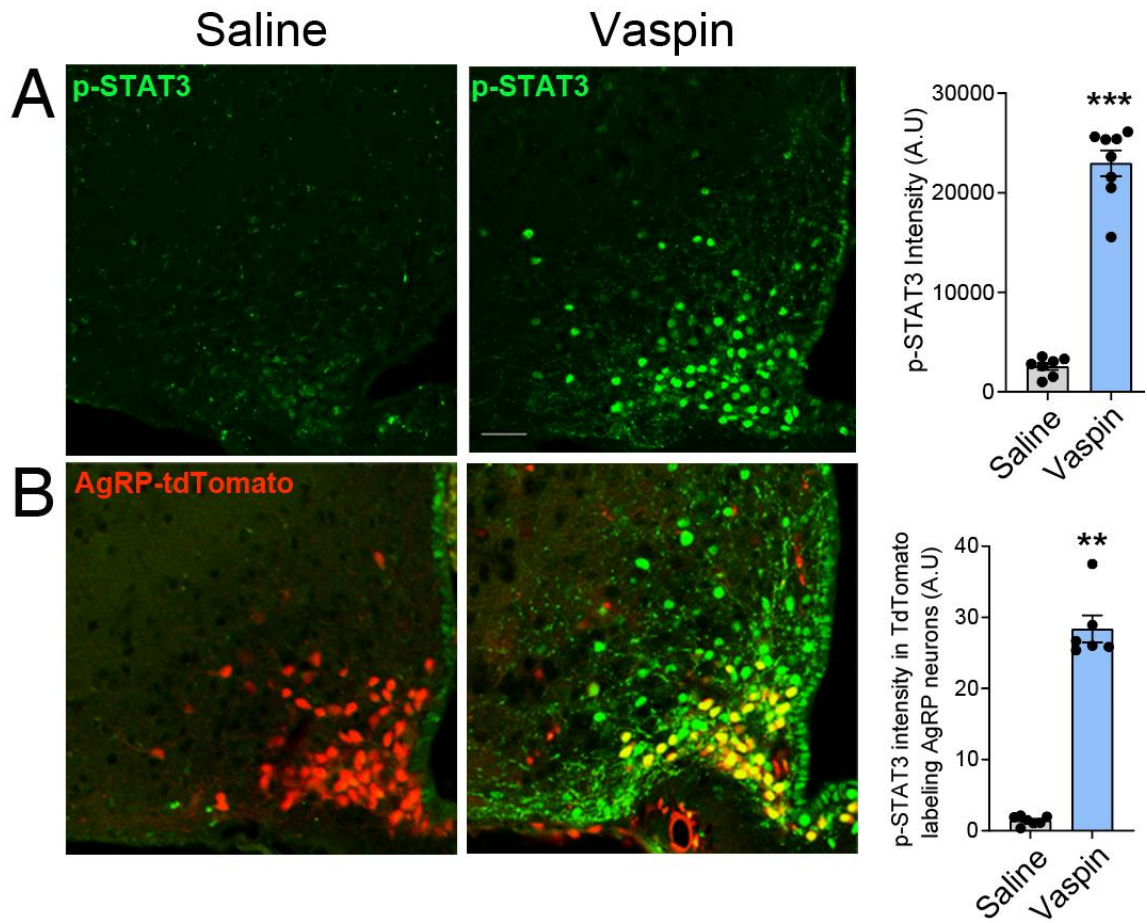


그림 3. Vaspin 투여 후 시상하부 AgRP 뉴런의 STAT3 활성화

밤 사이 금식한 AgRP-TdTomato 마우스의 제 3 뇌실 내로 saline 또는 vaspin (1  $\mu$ g)을 투여 후 30 분 뒤 뇌 조직을 얻어 pSTAT3 면역염색을 시행함. AgRP-TdTomato 뉴런을 포함한 시상하부 궁상핵 뉴런에서 vaspin 을 투여하였을 때 pSTAT3 발현이 현저하게 상승함을 관찰함. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. saline 투여군.

### 3. NMDA 수용체 차단이 vaspin 과 leptin 의 식욕억제 작용과 시상하부 STAT3 활성화에 미치는 영향

다음으로 vaspin 과 leptin 을 뇌실 내로 투여 후 유도되는 장기간 지속되는 섭식 억제 효과의 기전에 시냅스가소성이 관여하는지 알아보고자 시냅스가소성 발생에 가장 중요한 수용체인 NMDAR 가 vaspin 과 leptin 의 섭식 조절 작용에 관여하는지를 조사하였다. 본 연구실의 미발표 선행 연구에서 vaspin 에 의한 식욕억제 효과가 NMDAR 차단제(antagonist)인 MK801 혹은 AP5 에 의해 차단되는 것을 확인하였다. Leptin 의 식욕억제 효과가 MK801 또는 AP5 에 의해 차단되는지 확인하기 위하여, MK801 또는 AP5 를 leptin 투여 30분전에 뇌실 내로 삽입한 캐뉼라를 통하여 주고, leptin 이 식욕 억제 작용에 미치는 영향을 살펴보았다. 그림 4 에서 보여 주는 바와 같이 MK-801 과 AP5 투여는 leptin 의 섭식 억제 작용을 유의하게 차단하였다. 다음으로 NMDAR 차단이 vaspin 의 시상하부 STAT3 신호전달계 활성화에 미치는 영향을 조사하였다. 섭식 조절 작용과 유사하게 vaspin 에 의하여 유도된 시상하부 STAT3 활성화가 NMDAR 차단제인 AP5 를 같이 투여할 경우 억제되는 것을 면역블로팅을 통해 확인하였다. (그림 5A) 추가적으로, vaspin 과 leptin 에 의한 STAT3 활성화가 AP5 에 의해 차단됨을 면역염색하여 확인하였다 (그림 6). 한편, NMDAR 이 STAT3 신호전달계의 upstream 으로 작용하는지 알아보고자 NMDA 를 뇌실 내로 투여하고, 시상하부에서 pSTAT3 면역블로팅을 시행한 결과, NMDA 투여는 시상하부에서 STAT3 신호를 강력하게 증가시켰다 (그림 5B). 따라서 이상의 연구 결과는 NMDAR 의 활성화가 vaspin 과 leptin 의 섭식 조절 및 시상하부 STAT3 신호전달계 활성화의 상위 신호 전달에 있어서 중요한 역할을 한다는 것을 암시한다.

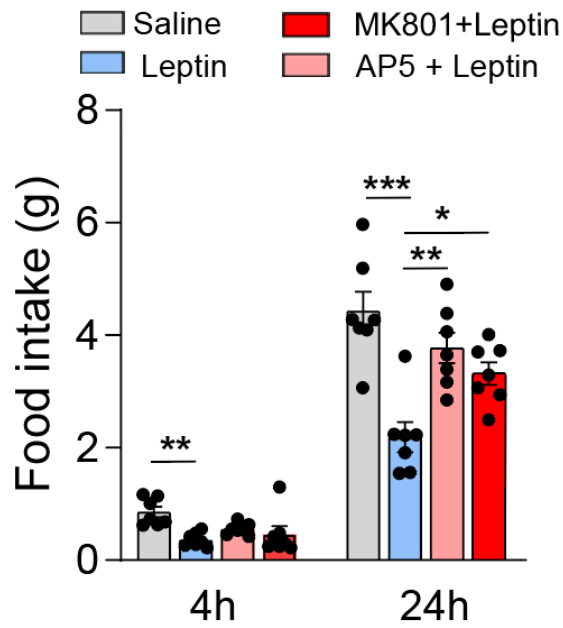


그림 4. NMDAR 차단이 vaspin 과 leptin 의 식욕억제 작용에 미치는 효과

24 시간 금식 시킨 C57 마우스에 leptin (1  $\mu$ g)을 뇌실 내로 투여하기 30 분 전에 NMDAR 차단제인 MK801 또는 AP5 (각 1  $\mu$ g)를 뇌실 내로 투여하고 24 시간 동안 먹이섭취량을 측정. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  between indicated groups.

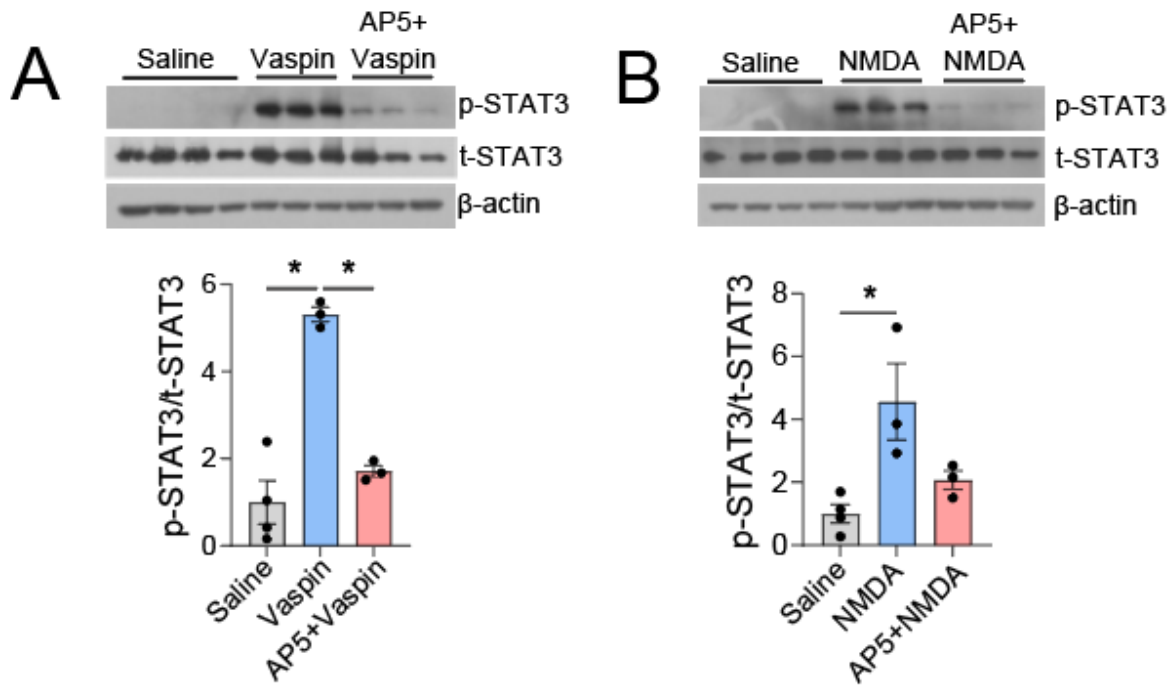


그림 5. NMDAR 차단이 vaspin 과 NMDA 투여로 유도된 시상하부 STAT3 활성화에 미치는 영향

24 시간 금식 시킨 C57 마우스에 vaspin (3 µg) 혹은 NMDA (20 ng)을 뇌실 내로 투여하기 30 분 전에 NMDAR 차단제인 AP5 (각 1 µg)를 뇌실 내로 투여함, vaspin 이나 NMDA 투여 후 30 분 뒤에 희생시켜서 시상하부를 채취하여 pSTAT3, tSTAT3, beta-actin 면역블로팅을 시행함. \* $P < 0.05$  between indicated groups.

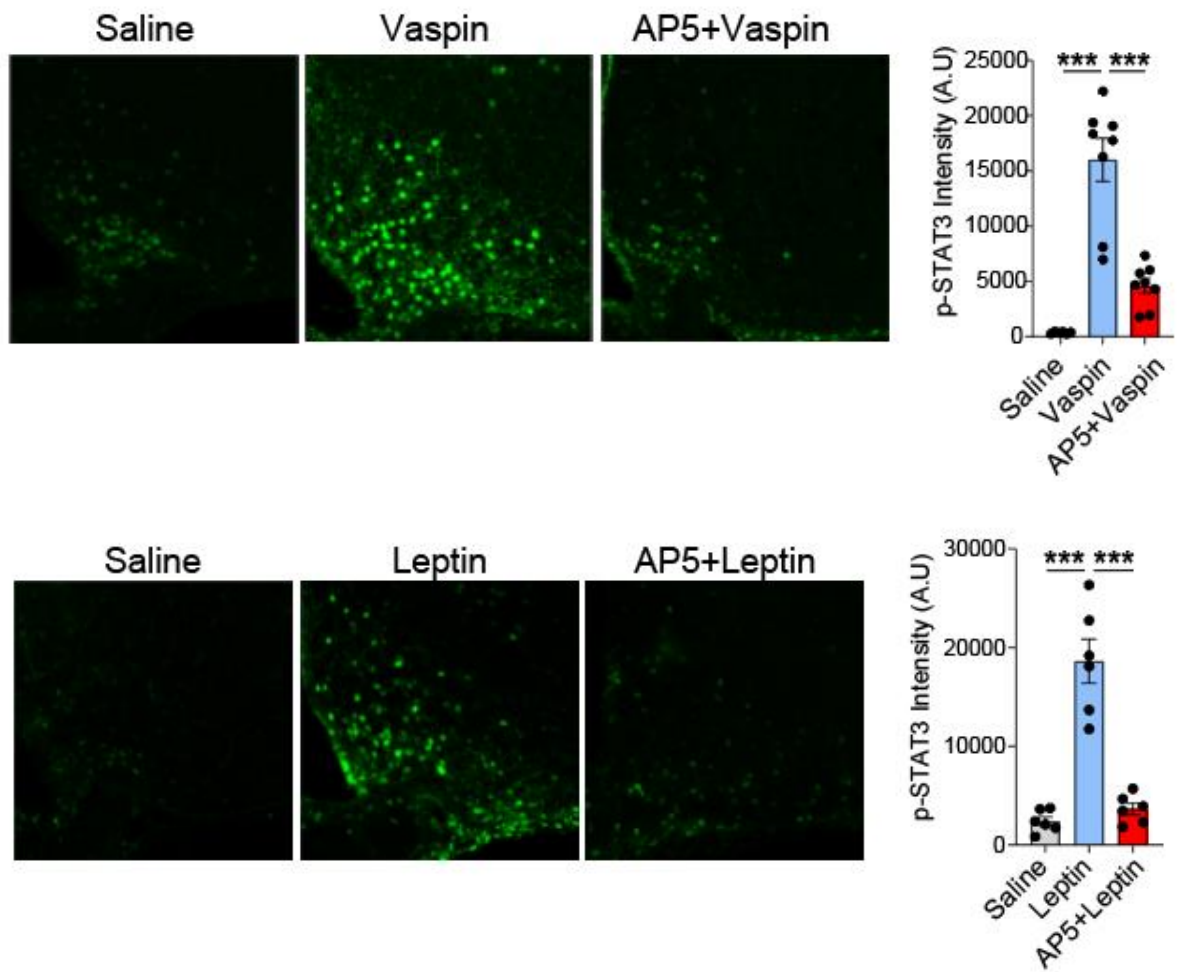


그림 6. NMDAR 차단이 vaspin 과 leptin 투여로 유도된 시상하부 STAT3 활성화에 미치는 영향

24 시간 금식 시킨 C57 마우스에 vaspin (1  $\mu$ g) 혹은 leptin (1  $\mu$ g)을 뇌실 내로 투여하기 30 분 전에 NMDAR 차단제인 AP5 (각 1  $\mu$ g)를 뇌실 내로 투여함, 마우스를 vaspin 이나 leptin 투여 후 30 분 뒤에 희생시켜서 뇌를 얻어서 pSTAT3 면역염색을 시행함, \*\*\* $P < 0.001$  between indicated groups.

#### 4. 뉴런세포에서 NMDA 수용체를 통한 vaspin 의 세포 내 $Ca^{2+}$ 신호 활성화

NMDAR 가 활성화되면 NMDAR 를 통하여  $Ca^{2+}$ 이 세포 내로 유입되어서 세포 내  $Ca^{2+}$  농도가 증가한다.<sup>30</sup> 따라서 SH-SY5Y 뉴런 세포에 vaspin 을 처리하고 세포 내  $Ca^{2+}$  양이 증가하는지 살펴보고, NMDA 수용체를 억제할 경우 vaspin 에 의하여 유도된  $Ca^{2+}$ 의 양적인 변화가 차단되는지 살펴 보았다.

그림 7 에서 보여 주는 바와 같이 vaspin 을 처리 후 세포 내  $Ca^{2+}$  양이 유의하게 증가하였으며, AP5 (50  $\mu$ M)을 함께 처리하면 vaspin 의 세포 내  $Ca^{2+}$  양 증가 효과가 완전히 차단되었다. 이러한 연구 결과는 vaspin 이 신경세포에서 NMDAR 를 활성화시킬 수 있음을 시사하였다.

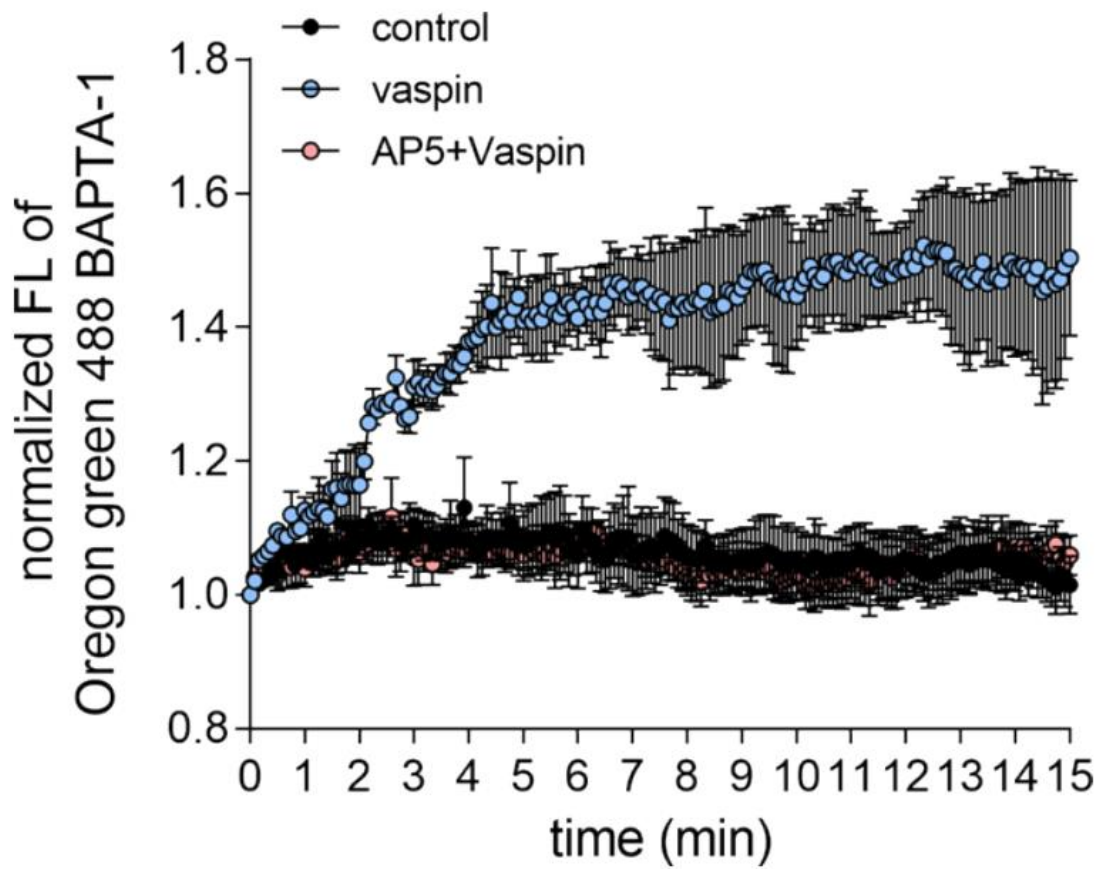


그림 7. 신경세포에 vaspin 투여가 NMDAR 활성화를 통하여 세포 내  $Ca^{2+}$  증가  
 SH-SY5Y 세포에 vaspin (100 nM) 단독 처리 혹은 AP5 (50  $\mu$ M)와 함께 처리 후 세포 내  $Ca^{2+}$  양의 변화를  $Ca^{2+}$ -sensitive dye Flou4 를 사용하여 측정



## 5. 시상하부 뉴런세포에서 vaspin 와 leptin 처리 후 NMDAR 를 통한 AMPAR endocytosis

이전의 연구 보고에서 POMC 뉴런과 AgRP 뉴런에 특이적으로 NMDAR 인 NR1 을 제거시킨 마우스를 제작하여 섭식 및 체중의 변화를 관찰한 결과, POMC 뉴런에서 NMDAR 을 제거한 마우스에서는 대사표현형에 별다른 변화가 없었으나, AgRP 뉴런에서 NMDAR 을 제거한 마우스에서는 섭식, 체중, 체지방양이 감소하였다.<sup>27</sup> 따라서 vaspin 은 NPY/AgRP 뉴런을 억제하는 방향으로 작용하므로, vaspin 은 NMDAR 을 통하여 NPY/AgRP 뉴런에 LTD 을 일으킨다는 가설을 세우고 이를 증명하고자 실험을 진행하였다.

이를 세포 수준에서 먼저 증명하고자 시상하부 뉴런 세포인 N1 세포에서 vaspin (100 nM)을 단독으로 처리하거나 NMDAR 차단제인 AP5 (50  $\mu$ M) 와 함께 30 분 동안 처리한 뒤 glutamate 의 가장 중요한 수용체인 AMPAR 가 endocytosis 되어서 세포막에 존재하는 AMPAR 양이 감소하고 결과로 LTD 가 유도되는지를 확인하였다. AMPAR endocytosis 는 AMPAR 아형 중 하나인 GluR1 이 세포 내로 유입되면 early endosome, late endosome, lysosome 으로 차례로 전달되므로 GluR1 과 early endosome 마커인 Rab5 또는 late endosome/lysosome 마커인 Lamp1 과 colocalization 되는 것으로 확인하였다. Vaspin 처리는 GluR1 과 Rab5 또는 Lamp1 과 colocalization 을 증가시켰다. 그리고 AP5 처리는 GluR1 과 Lamp1 의 colocalization 을 차단시켰다 (그림 8). Vaspin 과 유사하게 leptin 처리도 GluR1 endocytosis 를 촉진시켰고, 이러한 효과가 AP5 에 의하여 억제되었다 (그림 9). 이러한 연구 결과는 vaspin 과 leptin 이 NMDAR 을 통하여 AMPAR endocytosis 를 촉진하여 LTD 을 유발할 수 있음을 시사한다.

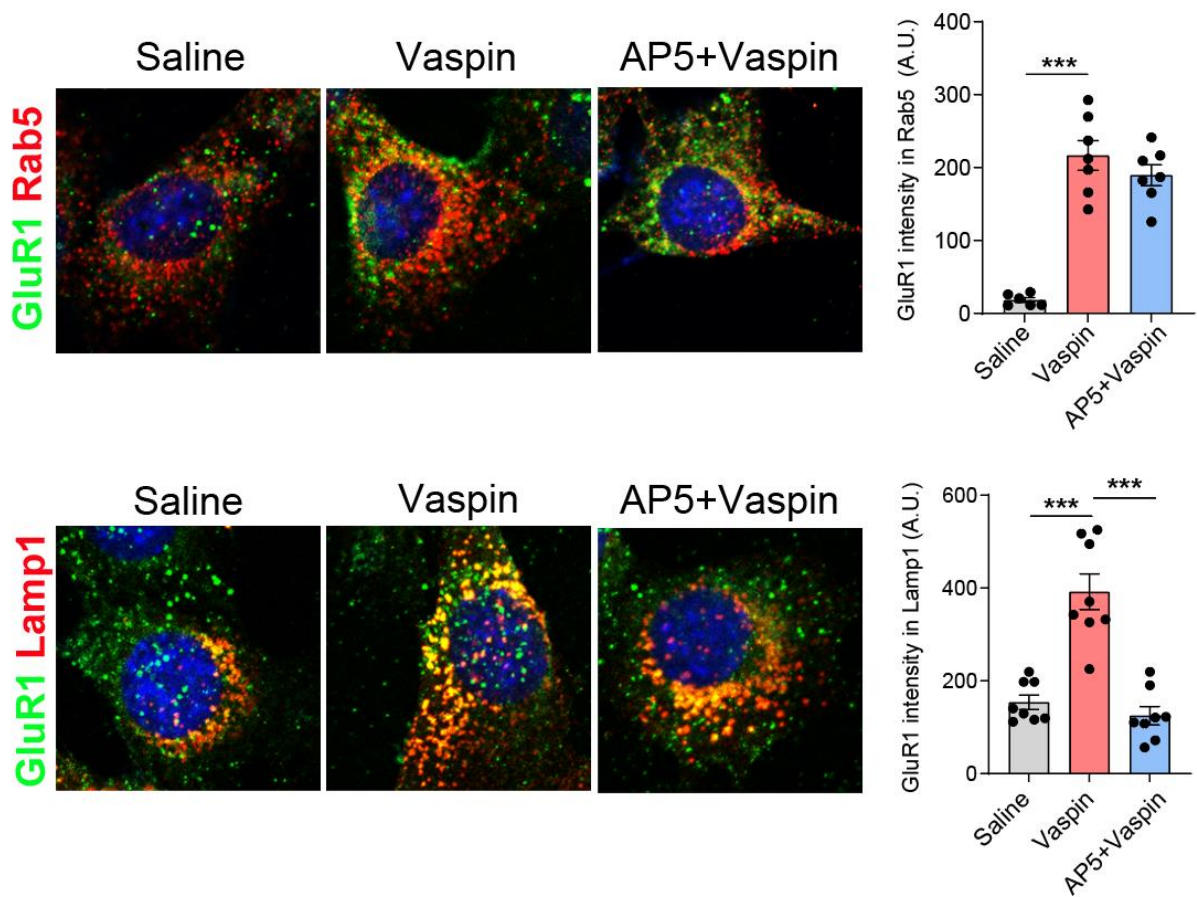


그림 8. 시상하부 뉴런에서 vaspin 처리가 NMDAR 을 통하여 AMPAR (GluR1) endocytosis 유도

시상하부 N1 cell 에 vaspin (100 nM)을 처리 후 AMPAR subunit 인 GluR1 의 endocytosis 를 GluR1 과 early endosome 마커인 Rab5 혹은 late endosome/lysosome 마커인 Lamp1 간의 colocalization 을 통하여 확인. 한 군에서는 NMDAR 차단제인 AP5 (50  $\mu$ M)를 vaspin 을 처리하기 30 분 전 전처리함. \*\*\* $P < 0.001$  between indicated groups.

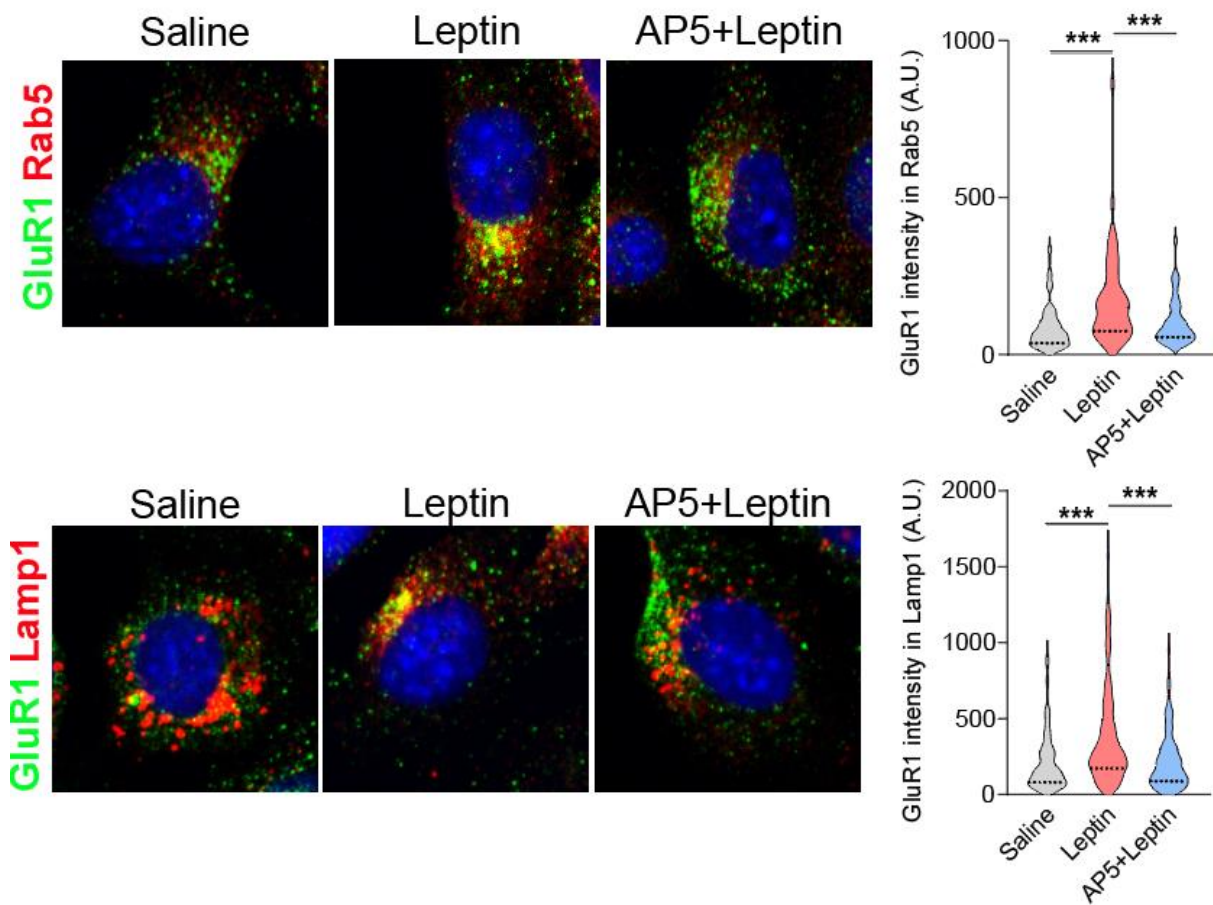


그림 9. 시상하부 뉴런에서 Leptin 에 의한 AMPAR endocytosis 촉진과 NMDAR 억제에 의한 효과 차단

시상하부 N1 cell 에 NMDAR antagonist AP5 (50  $\mu$ M)를 leptin (100 nM)을 처리 30 분 전 처리하고 GluR1 과 Rab5 또는 Lamp1 의 colocalization 확인. Leptin 처리군에서 GluR1 의 endocytosis 가 증가하고, AP5 에 의해 GluR1 의 endocytosis 가 차단됨. \*\*\*  $P < 0.001$  between indicated groups.

## 6. 시상하부 뉴런세포에서 vaspin 에 의한 AMPAR 수용체 endocytosis 에 STAT3 신호전달계 관련성

연구 논문에 따르면 NMDA 수용체가 매개하는 LTD 에 JAK2-STAT3 신호전달계가 관여한다.<sup>24</sup> 또한 본 연구에서 vaspin 은 시상하부에 STAT3 신호전달계를 활성화시켰다. 따라서 vaspin 이 유도한 AMPAR endocytosis 가 JAK2-STAT3 신호전달계에 의해 조절을 받는지 확인해보았다. 시상하부 N1 세포에 vaspin (100nM) 단독 처리 그룹, JAK2 inhibitor 인 AG490 (10  $\mu$ M)을 함께 처리한 그룹, 또는 STAT inhibitor 인 stattic (1  $\mu$ M)을 함께 처리한 그룹에서 GluR1 과 Rab5, 또는 Lamp1 을 이중 염색하여 endocytosis 를 관찰하였다. 그림 10 에서보여 주는 바와 같이 vaspin 에 의한 GluR1 endocytosis 촉진 효과가 JAK2, STAT3 inhibitor 에 의해 차단되는 것을 확인하였다.

이상의 데이터들은 vaspin 이 시상하부 뉴런의 NMDA 수용체와 JAK-STAT 신호전달계를 통해 AMPAR 를 세포 내로 이동시켜 glutamate 신호 전달을 약화시켜서 LTD 을 일으킬 가능성을 제시하였다.

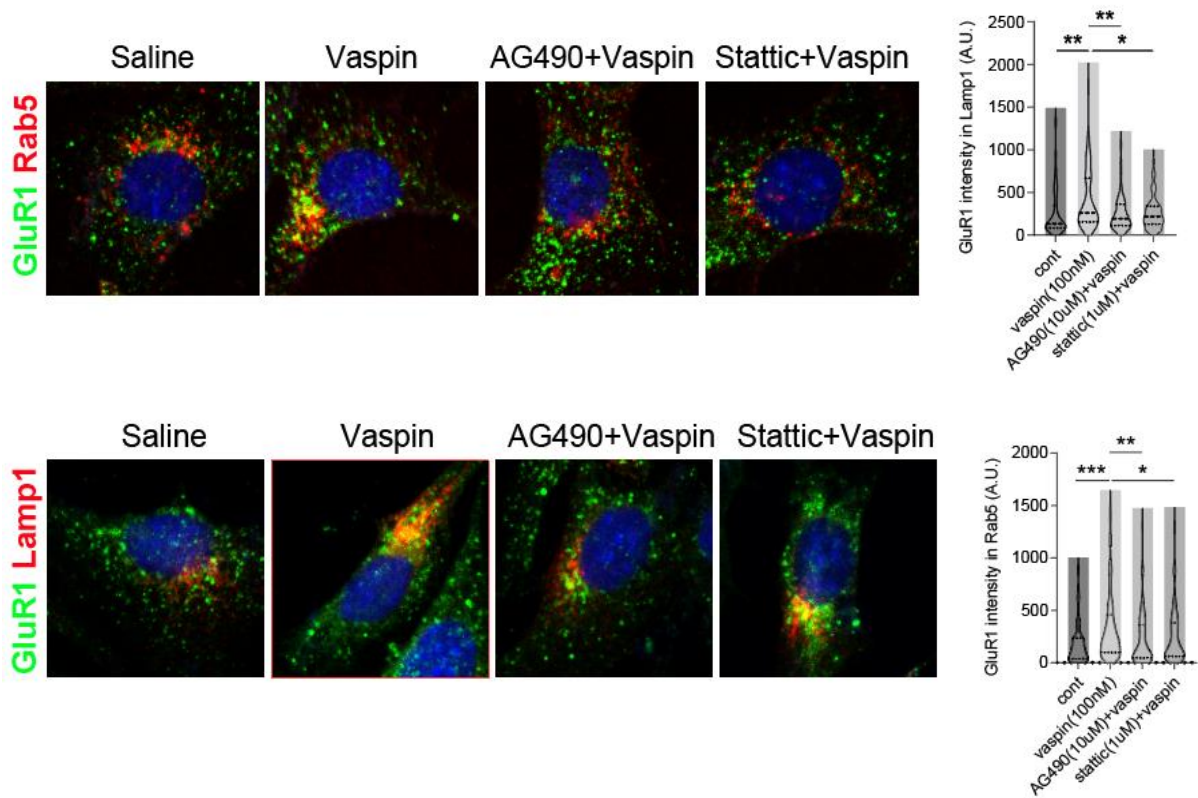


그림 10. 시상하부 뉴런에서 Vaspin 에 의한 GluR1 과 Rab5 또는 Lamp1 의 colocalization 이 JAK2-STAT3 신호전달 antagonist 에 의해 차단.

시상하부 N1 cell 에 JAK2 inhibitor AG490 (10  $\mu$ M) 또는 STAT inhibitor stattic (1  $\mu$ M)를 30 분 전 미리 처리 후 vaspin (100 nM)을 30 분 처리한 세포에서 이중면역염색을 이용하여 GluR1 과 Rab5 또는 Lamp1 의 colocalization 확인. Vaspin 처리 그룹에서 GluR1 의 endocytosis 가 증가하며 JAK2-STAT inhibitor 에 의해 차단됨을 확인. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  between indicated groups.

## 7. 시상하부 AgRP 뉴런에 vaspin 에 의한 AMPAR endocytosis 유도

이상의 세포 실험 결과를 in vivo 에서 확인하고자 vaspin 투여가 NPY/AgRP 뉴런에 GluR1 endocytosis 를 일으키는지를 확인하는 실험을 진행하였다. 이를 위하여 NPY-GFP 마우스의 제 3 뇌실에 캐놀라를 삽입하고 vaspin (1 µg)을 투여한 뒤, 투여 후 30 분 뒤 뇌 조직을 얻어 NPY/AgRP 뉴런에서 GluR1 과 Lamp1 면역조직염색을 진행하였다. 다른 한 군에서는 AP5 (1 µg)을 vaspin 투여하기 30 분 전에 투여하였고, 대조군에게는 두 약물 대신 saline 을 투여하였다. 그림 11 에서 보여 주는 바와 같이 vaspin 을 투여한 군에서는 NPY/AgRP 뉴런에 GluR1 과 Lamp1 의 colocalization 이 증가하였고, AP5 에 의해 이러한 효과가 차단되었다 (그림 11). 따라서 vaspin 은 NPY/AgRP 뉴런에 AMPAR endocytosis 를 유도하여 LTD 를 일으킬 가능성이 있다.

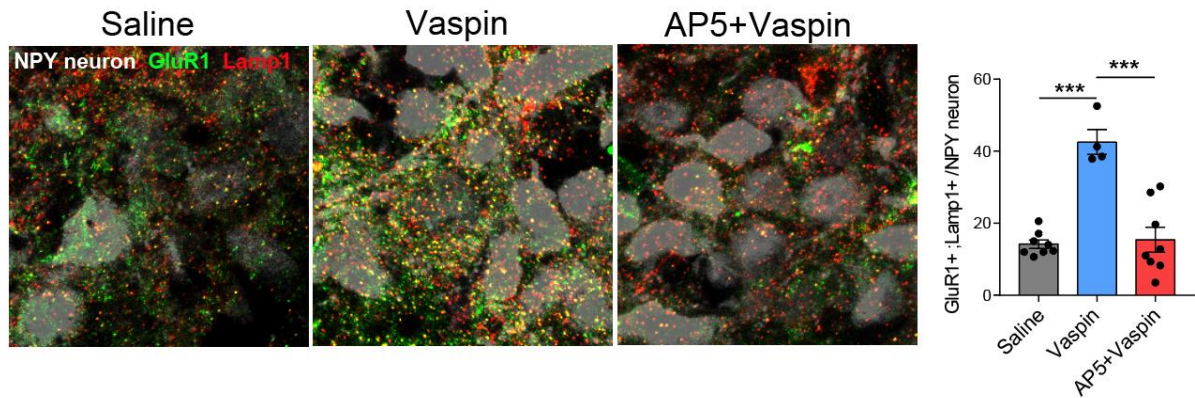


그림 11. 시상하부 NPY/AgRP 뉴런에서 vaspin 투여는 NMDAR 을 통하여 AMPAR endocytosis 유발

밤 사이 음식을 시킨 상태에서 NPY-YFP 마우스에 saline 또는 vaspin (1  $\mu$ g)을 뇌실 내로 주입하고, 한 군에서는 vaspin 투여 30 분 전 NMDAR antagonist 인 AP5 (1  $\mu$ g)를 투여하고, vaspin 투여 후 30 분 뒤 뇌 조직을 얻어 면역조직염색을 실시함. Vaspin 을 투여하였을 때, NPY 뉴런에서 GluR1 과 Lamp1 의 colocalization 이 증가하고, AP5 에 의하여 이러한 효과는 차단되었음. \*\*\* $P < 0.001$  between indicated groups.

## 8. Vaspin 에 의한 시상하부 AgRP 뉴런의 수상돌기 spine 형성 조절

In vivo 에서 LTD 의 한 기전으로 흥분성 시냅스가 형성되는 수상돌기사의 spine 형성 조절을 들 수 있다.<sup>31</sup> 따라서 vaspin 의 뇌실 내 투여가 NPY/AgRP 뉴런의 수상돌기 상 spine 형성에 미치는 영향을 조사하였다. 이를 위하여 AgRP-Cre 마우스의 양측 궁상핵에 AAV8-hSyn-DIO-mcherry 를 microinjection 을 시행하고, 2 주 뒤에 측내실 내로 vaspin 단독 혹은 AP5 + vaspin 을 투여하고, 1 시간 뒤에 뇌를 얻어서 AgRP 뉴런상에 spine 수를 측정하였다. 그림 12 에서 보여 주는 바와 같이 vaspin 투여 군에서는 AgRP 뉴런의 수상돌기 spine 수가 유의하게 감소하였고, NMDA 수용체 차단제를 함께 투여한 군에선 이러한 효과가 억제되었다. 이는 vaspin 이 NPY/AgRP 뉴런에 작용하여 수상돌기 spine 수 감소를 통하여 LTD 을 유도한다는 것을 지지해 주었다.



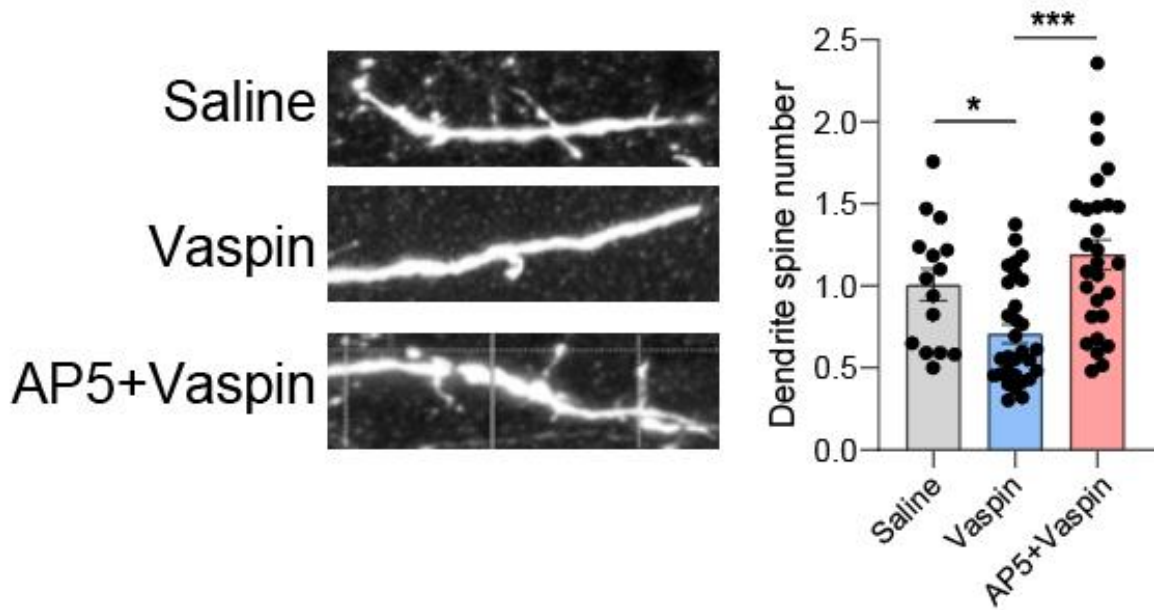


그림 12. Vaspin 에 의한 시상하부 AgRP 뉴런의 수상돌기 spine 수 조절과 NMDA 수용체 차단이 이에 미치는 영향

AgRP-Cre 마우스에 AAV8-hSyn-DIO-mcherry 를 ICV injection 후 LV cannulation 실시. Saline 또는 Vaspin(1ug)을 ICV injection 하기 30 분 전 AP5(1ug) 투여하고 그 후 30 분 뒤 뇌 조직을 얻어 mcherry 신호강화를 위해 DsRed 면역조직염색을 실시. AgRP 뉴런 내 dendritic spine 을 카운팅함. Vaspin 을 투여하였을 때 spine 의 수가 감소하고 이 효과가 NMDAR antagonist AP5 에 의해 차단됨. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs. between indicated groups. ICV: intracerebroventricular, LV: lateral ventricle

## 고 찰

본 학위 논문은 vaspin 과 leptin 이 시상하부에 작용하여 장시간 지속되는 식욕 억제 작용 기전을 탐구하였다. Leptin 은 지방세포에서 만들어져서 혈액으로 분비되어 시상하부에 작용하고 식욕 억제 작용을 하는 것으로 알려져 있다.<sup>7</sup> Vaspin 도 처음부터 adipokine 으로 분리되었기 때문에, 내장지방조직에서 만들어진 vaspin 이 혈액으로 분비되고 시상하부에 작용하여 식욕 조절 작용을 할 것으로 생각된다. 하지만 vaspin 은 섭식조절과 관련 있는 위장이나 시상하부에서도 만들어지기 때문에<sup>16</sup>, 현재로서는 말초조직에서 생산되는 vaspin 이 섭식 조절에 관여하는지, 아니면 중추신경계 내에서 생산되는 vaspin 이 섭식 조절에 관여하는지는 불분명하며, 이는 조직-특이적으로 vaspin 이 결핍된 마우스를 이용하여 추후 밝혀져야 한다. 또한 vaspin 이 시상하부에서 어떤 기전을 통하여 식욕 억제 작용을 나타내는지에 대해서도 아직 알려져 있지 않다.

본 연구에서는 정상 C57 마우스 뇌실 내로 vaspin 의 1 회 투여가 식욕억제 작용을 72 시간까지 지속시키는 것을 관찰하였다. 대부분의 호르몬이나 신경 펩타이드들의 식욕 조절 작용은 수 시간 지속되므로 며칠 동안 지속되는 식욕 조절 작용은 예외적이고 흥미로운 것으로 생각되어 그 기전을 연구하였고, vaspin 의 섭식억제 작용에 있어 시냅스가소성 형성에 절대적으로 중요한 작용을 하는 NMDAR 이 관여함을 밝히게 되었다.

Leptin 의 식욕 조절 작용 기전에 상당히 많이 연구가 되어 있다. Leptin 은 시상하부 및 뇌 여러 부위에 작용하여 식욕 억제 작용을 일으키는 것으로 알려져 있으나, 이 중 leptin 작용의 일차적 작용 부위는 궁상핵으로 생각된다.<sup>32</sup> Leptin 은 궁상핵에 있는 POMC 뉴런이나 NPY/AgRP 뉴런에 대한 조절 작용을 통하여 식욕 조절 작용을 한다고 알려져 있다. Leptin 이 뉴런의 세포막에 있는 LepRb 에 결합하면 JAK2-STAT3 신호전달계가

활성화되고 인산화된 STAT3 는 핵으로 이동하여 유전자 발현을 조절함으로써 뉴런의 활성을 조절한다.<sup>28</sup> 또한 인산화된 JAK2 를 통하여 K-ATP 채널 활성의 조절을 통하여 뉴런의 흥분성을 직접 조절하기도 한다.<sup>33</sup> 한편 면역전자현미경 연구를 통하여 leptin 이 POMC 뉴런이나 NPY/AgRP 뉴런의 흥분성 시냅스와 억제성 시냅스 수를 조절함으로써 이들 뉴런에서 시냅스가소성을 조절한다는 것이 제시되었지만, 구체적인 분자생물학적 혹은 신경생리학적 기전은 아직 밝혀져 있지 않다. 한편, 이전의 연구에서 leptin 은 해마 뉴런의 시냅스 가소성을 조절하는 것으로 알려져 있다. Leptin 은 NMDAR subunit 인 NR2B 인산화를 통해 glutamate 시냅스 형성을 촉진하여 항우울작용을 한다고 보고되었다.<sup>34</sup> 또한 leptin 이 해마의 CA1 부위 뉴런에서 NMDAR 의존적인 방식으로 LTD 를 일으킨다는 것이 보고되었다.<sup>35</sup> 또한 leptin 작용에 있어서 NMDAR 이 관여함은 췌장  $\beta$ -세포에서 인슐린 분비 조절 <sup>36</sup>, 척추 뉴런에서 통증 조절 <sup>37</sup>, 뇌간 solitary tract nucleus (NTA) 뉴런에서 미주 신경 자극의 민감도 조절 <sup>38</sup> 등에서 증명되었다. 본 학위 논문은 시상하부에서 leptin 의 식욕 조절 작용에 NMDAR 이 관여함을 밝혔다는 점에서 중요한 의의를 가진다.

NMDAR 에 의한 시냅스가소성 조절에는 LTP 와 LTD 가 있다. 이전의 연구 보고에서 POMC 뉴런에 NMDAR subunit 인 NR1 을 없앤 마우스에서는 섭식과 체중에 변화를 초래하지 않았고, NPY/AgRP 뉴런에 NR1 을 없앤 마우스에서는 먹이섭취와 체중에 변화가 관찰되었다. 따라서 본 연구에서도 NPY/AgRP 뉴런에 집중하여 연구를 수행하였다. 또한 vaspin 과 leptin 은 식욕을 촉진하는 NPY/AgRP 뉴런 흥분성을 억제하는 것으로 알려져 있으므로 NMDAR 에 의한 LTD 이 일어나는지를 관찰하였다. 그 결과 시상하부 뉴런 세포에서 vaspin 과 leptin 을 처리하면 AMPAR subunit 인 GluR1 의 endocytosis 가 촉진됨을 관찰하였다. 그리고 이러한 작용이 NMDAR antagonist 를 미리 처리하면 차단되는 것도 확인하였다. 그리고 비슷한 결과가 vaspin 을 마우스 뇌실 내로 투여 후

공상핵의 NPY/AgRP 뉴런에서도 관찰되었다. GluR1 endocytosis 는 세포막 GluR1 의 감소를 의미하고, GluR1 endocytosis 는 LTD 의 한 하나의 기전으로 알려져 있으므로 <sup>19</sup>, 이러한 연구 결과는 vaspin 과 leptin 이 NPY/AgRP 뉴런에 LTD 를 유발하여 이 뉴런을 자극하는 신호에 대한 반응을 줄임으로써 섭식 억제 작용이 유지되도록 도와주는 역할을 할 가능성이 있다.

또한 본 연구에서는 LTD 의 또 다른 기전으로 알려진 NPY/AgRP 뉴런에서 수상돌기 spine 형성을 vaspin 이 조절하는지 연구하였고, vaspin 을 투여한 마우스의 NPY/AgRP 뉴런에서 수상돌기 spine 수가 감소하고, NMDAR antagonist 에 의하여 이러한 효과가 상쇄되었다. 따라서 vaspin 은 NPY/AgRP 뉴런의 수상돌기에서 spine 형성을 NMDAR 의존적인 방식으로 조절한다는 것을 알 수 있으며, leptin 도 비슷한 작용이 있는지 추후 연구하려고 한다.

본 학위논문은 leptin 의 주요한 신호전달계로 알려진 JAK2-STAT3 신호전달계가 NMDAR 에 의한 섭식 조절 작용과 밀접한 관련성이 있음을 발견하였다. 즉 NMDA 를 마우스의 뇌실 내로 투여하면 시상하부에 STAT3 활성화의 지표인 pSTAT3 발현이 현저하게 증가함을 발견하였다. 또한 JAK2-STAT3 antagonist 투여는 vaspin 에 의한 AMPAR endocytosis 를 억제하였다. 이러한 연구 결과는 JAK2-STAT3 신호전달계가 NMDAR 에 의하여 조절을 받는 하위 신호전달계이면서, NMDAR 에 의한 LTD 유도도 도와준다는 것을 알 수 있었으며, 앞으로 in vivo 실험을 통하여 JAK2-STAT3 신호가 수상돌기 spine 형성도 조절하는지를 추가로 연구할 예정이다.

결론으로, 본 학위 논문은 새로운 식욕억제 호르몬인 vaspin 이 NMDA receptor 와 JAK2-STAT3 신호전달계, 그리고 시상하부 NPY/AgRP 뉴런을 통하여 에너지 균형을 조절하는 분자적 메커니즘을 제시하였다. 이미 잘 알려진 식욕 조절 인자인 leptin 과

새로운 식욕 조절 인자인 vaspin 의 생리학적 역할, 더 나아가 구체적인 작용 기전을 연구하기 위해서 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다. 또한 시상하부의 섭식조절에 있어서 시냅스가소성의 구체적인 기전을 규명한다면 비만과 섭식 조절 장애 질환의 이해와 치료 개발에 확장하여 적용할 수 있을 것이다.

## 결론

본 학위 논문의 연구 결과를 종합하면, vaspin 과 leptin 은 시상하부 NPY/AgRP 뉴런에서 NMDA 수용체와 JAK2-STAT3 신호전달계의 일련의 활성화를 통하여 AMPAR 의 endocytosis 를 촉진하고, 수상돌기에서 spine 형성의 억제 작용을 통하여 LTD 을 유도함으로써 식욕을 촉진하는 작용을 가진 NPY/AgRP 뉴런의 흥분성을 억제하고, 그 결과 식욕을 억제하는 POMC 뉴런 흥분성을 증가시켜서 장시간 지속되는 식욕 억제 작용을 유도할 것으로 생각된다.

## 참고문헌

- 1 Gregor, M. F. & Hotamisligil, G. S. Inflammatory Mechanisms in Obesity. *Annual Review of Immunology* **29**, 415-445, doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101322 (2011).
- 2 Ogden, C. L., Carroll, M. D., Curtin, L. R., Lamb, M. M. & Flegal, K. M. Prevalence of high body mass index in US children and adolescents, 2007-2008. *JAMA* **303**, 242-249, doi:10.1001/jama.2009.2012 (2010).
- 3 Fosch, A., Zagmutt, S., Casals, N. & Rodriguez-Rodriguez, R. New Insights of SF1 Neurons in Hypothalamic Regulation of Obesity and Diabetes. *Int J Mol Sci* **22**, doi:10.3390/ijms22126186 (2021).
- 4 Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte, D., Jr., Seeley, R. J. & Baskin, D. G. Central nervous system control of food intake. *Nature* **404**, 661-671, doi:10.1038/35007534 (2000).
- 5 Brown, L. M., Clegg, D. J., Benoit, S. C. & Woods, S. C. Intraventricular insulin and leptin reduce food intake and body weight in C57BL/6J mice. *Physiol Behav* **89**, 687-691, doi:10.1016/j.physbeh.2006.08.008 (2006).
- 6 Cheung, C. C., Clifton, D. K. & Steiner, R. A. Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology* **138**, 4489-4492, doi:10.1210/endo.138.10.5570 (1997).
- 7 Cowley, M. A. *et al.* Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* **411**, 480-484, doi:10.1038/35078085 (2001).
- 8 van den Top, M., Lee, K., Whyment, A. D., Blanks, A. M. & Spanswick, D. Orexigen-sensitive NPY/AgRP pacemaker neurons in the hypothalamic arcuate nucleus. *Nat Neurosci* **7**, 493-494, doi:10.1038/nn1226 (2004).
- 9 Vaisse, C. *et al.* Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice. *Nat Genet* **14**, 95-97, doi:10.1038/ng0996-95 (1996).
- 10 Mesaros, A. *et al.* Activation of Stat3 signaling in AgRP neurons promotes locomotor activity. *Cell Metab* **7**, 236-248, doi:10.1016/j.cmet.2008.01.007 (2008).
- 11 Friedman, J. M. Leptin and the endocrine control of energy balance. *Nat Metab* **1**, 754-764, doi:10.1038/s42255-019-0095-y (2019).
- 12 Hida, K. *et al.* Identification of genes specifically expressed in the accumulated visceral adipose tissue of OLETF rats. *J Lipid Res* **41**, 1615-1622 (2000).
- 13 Hida, K. *et al.* Visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor: a unique insulin-sensitizing adipocytokine in obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 10610-10615, doi:10.1073/pnas.0504703102 (2005).
- 14 Youn, B. S. *et al.* Serum vaspin concentrations in human obesity and type 2 diabetes. *Diabetes* **57**, 372-377, doi:10.2337/db07-1045 (2008).

- 15 Korner, A. *et al.* Vaspin is related to gender, puberty and deteriorating insulin sensitivity in children. *Int J Obesity* **35**, 578-586, doi:10.1038/ijo.2010.196 (2011).
- 16 Kloting, N. *et al.* Central vaspin administration acutely reduces food intake and has sustained blood glucose-lowering effects. *Diabetologia* **54**, 1819-1823, doi:10.1007/s00125-011-2137-1 (2011).
- 17 Citri, A. & Malenka, R. C. Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology* **33**, 18-41, doi:10.1038/sj.npp.1301559 (2008).
- 18 Luscher, C. & Malenka, R. C. NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**, doi:10.1101/cshperspect.a005710 (2012).
- 19 Ehlers, M. D. Reinsertion or degradation of AMPA receptors determined by activity-dependent endocytic sorting. *Neuron* **28**, 511-525, doi:10.1016/s0896-6273(00)00129-x (2000).
- 20 Bjorbaek, C. & Kahn, B. B. Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Prog Horm Res* **59**, 305-331, doi:10.1210/rp.59.1.305 (2004).
- 21 Lund, I. V. *et al.* BDNF selectively regulates GABAA receptor transcription by activation of the JAK/STAT pathway. *Sci Signal* **1**, ra9, doi:10.1126/scisignal.1162396 (2008).
- 22 Mahmoud, G. S. & Grover, L. M. Growth hormone enhances excitatory synaptic transmission in area CA1 of rat hippocampus. *J Neurophysiol* **95**, 2962-2974, doi:10.1152/jn.00947.2005 (2006).
- 23 Orellana, D. I., Quintanilla, R. A., Gonzalez-Billault, C. & Maccioni, R. B. Role of the JAKs/STATs pathway in the intracellular calcium changes induced by interleukin-6 in hippocampal neurons. *Neurotox Res* **8**, 295-304, doi:10.1007/BF03033983 (2005).
- 24 Nicolas, C. S. *et al.* The JAK/STAT Pathway Is Involved in Synaptic Plasticity. *Neuron* **73**, 374-390, doi:10.1016/j.neuron.2011.11.024 (2012).
- 25 Pinto, S. *et al.* Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. *Science* **304**, 110-115, doi:10.1126/science.1089459 (2004).
- 26 Li, X. L. *et al.* Impairment of long-term potentiation and spatial memory in leptin receptor-deficient rodents. *Neuroscience* **113**, 607-615, doi:10.1016/s0306-4522(02)00162-8 (2002).
- 27 Liu, T. *et al.* Fasting activation of AgRP neurons requires NMDA receptors and involves spinogenesis and increased excitatory tone. *Neuron* **73**, 511-522, doi:10.1016/j.neuron.2011.11.027 (2012).
- 28 Ladyman, S. R. & Grattan, D. R. JAK-STAT and feeding. *JAKSTAT* **2**, e23675, doi:10.4161/jkst.23675 (2013).
- 29 Rau, A. R. & Hentges, X. T. The Relevance of AgRP Neuron-Derived GABA Inputs to POMC Neurons Differs for Spontaneous and Evoked Release. *Journal of Neuroscience* **37**, 7362-7372, doi:10.1523/Jneurosci.0647-17.2017 (2017).



- 30 Schiller, J., Schiller, Y. & Clapham, D. E. NMDA receptors amplify calcium influx into dendritic spines during associative pre- and postsynaptic activation. *Nature Neuroscience* **1**, 114-118, doi:Doi 10.1038/363 (1998).
- 31 Segal, M. Dendritic spines and long-term plasticity. *Nat Rev Neurosci* **6**, 277-284, doi:10.1038/nrn1649 (2005).
- 32 Spiegelman, B. M. & Flier, J. S. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* **104**, 531-543, doi:Doi 10.1016/S0092-8674(01)00240-9 (2001).
- 33 Mirshamsi, S. *et al.* Leptin and insulin stimulation of signalling pathways in arcuate nucleus neurones: PI3K dependent actin reorganization and K-ATP channel activation. *Bmc Neurosci* **5**, doi:Artn 5410.1186/1471-2202-5-54 (2004).
- 34 Guo, M. *et al.* Forebrain glutamatergic neurons mediate leptin action on depression-like behaviors and synaptic depression. *Transl Psychiat* **2**, doi:ARTN e8310.1038/tp.2012.9 (2012).
- 35 Durakoglugil, M., Irving, A. J. & Harvey, J. Leptin induces a novel form of NMDA receptor-dependent long-term depression. *J Neurochem* **95**, 396-405, doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03375.x (2005).
- 36 Wu, Y., Fortin, D. A., Cochrane, V. A., Chen, P. C. & Shyng, S. L. NMDA receptors mediate leptin signaling and regulate potassium channel trafficking in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* **292**, 15512-15524, doi:10.1074/jbc.M117.802249 (2017).
- 37 Liang, Y. L. *et al.* Leptin Contributes to Neuropathic Pain via Extrasynaptic NMDAR-nNOS Activation. *Mol Neurobiol* **58**, 1185-1195, doi:10.1007/s12035-020-02180-1 (2021).
- 38 Bruce, K., Li, R. J. W., Lim, Y., Yue, J. T. & Lam, T. K. Leptin Action in the Nucleus of the Solitary Tract. *Diabetes* **71**, doi:10.2337/db22-1307-P (2022).

# Abstract

## Long-Lasting Anorexigenic effect on Vaspin and Leptin through the Regulation of Synaptic Plasticity

**Background:** Vaspin, which was first discovered in the visceral adipose tissue of Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats, a type 2 diabetes model with obesity, has been found to have beneficial effects on glucose and insulin resistance in obese mice. When vaspin was administered to the central nervous system of mice, a decrease in food intake was observed, but the underlying mechanism of action is not yet well understood. Leptin, a hormone mainly produced and secreted by white adipocytes, is a representative appetite-suppressing hormone. Leptin is known to stimulate the activation of POMC neurons, which have appetite-suppressing effects, and inhibit the activity of AgRP neurons, which have appetite-stimulating effects, in the arcuate nucleus, leading to appetite suppression. However, the mechanism by which leptin's appetite-regulating effects persist for a long time is still unclear. In this study, we investigated the synaptic plasticity as the main mechanism for the long-term appetite-regulating effects of vaspin and leptin.

**Methods:** Vaspin and leptin were administered into the lateral ventricle of normal C57 mice, and the duration of appetite suppression and weight loss effects were observed. Next, we investigated whether the JAK2-STAT3 activation, a major signaling pathway of leptin action in the hypothalamus, is also induced by vaspin. Furthermore, to investigate whether the long-term appetite-suppressing effects of vaspin and leptin and the activation of JAK2-STAT3 pathway are involved in synaptic plasticity, we co-administered an NMDAR antagonist to examine whether the appetite-regulating effects of vaspin and leptin are blocked. We investigated whether vaspin and leptin induce long-term depression (LTD) in

hypothalamic NPY/AgRP neurons through NMDA receptors (NMDAR), performing both hypothalamic neuron cell experiments and mouse experiments. Subsequently, we provided evidence for this phenomenon and examined the involvement of the JAK2-STAT3 signaling pathway in LTD induction mediated by vaspin and leptin.

**Results:** A single administration of vaspin and leptin into the cerebral ventricles of normal C57 mice significantly induced significant appetite suppression and reduced weight gain, which lasted up to 72 and 96 hours, respectively. Intracerebroventricular administration of vaspin activated the STAT3 signaling pathway in the hypothalamus, like leptin. Furthermore, pretreatment with NMDAR antagonists MK-801 or AP5 before leptin administration blocked the appetite-suppressing effects and STAT3 activation induced by leptin, indicating the importance of NMDAR in leptin's appetite-regulating actions. Treatment of N1 hypothalamic neurons with vaspin and leptin resulted in the induction of AMPA receptor (GluR1) endocytosis, a mechanism involved in long-term depression (LTD). Moreover, this effect was suppressed when co-treated with NMDAR antagonists or JAK2-STAT3 inhibitors, suggesting the involvement of NMDAR and JAK2-STAT3 signaling in vaspin/leptin-induced LTD. Finally, intracerebroventricular administration of vaspin in mice facilitated AMPAR endocytosis in NPY/AgRP neurons, which are known to promote appetite, and reduced spine formation, another mechanism of LTD, on dendritic spines.

**Conclusion:** The above research findings suggest that vaspin and leptin induce LTD in hypothalamic neurons, particularly NPY/AgRP neurons, through NMDAR and JAK2-STAT3 signaling pathways. This mechanism helps block excitatory signals in these neurons, thereby supporting the maintenance of appetite suppression. This study is significant in presenting a synaptic plasticity mechanism in appetite regulation in the hypothalamic neurons.