

# 절식시킨 생쥐와 식욕부진 돌연변이 생쥐의 시상하부와 대뇌겉질에서 Neuropeptide Y와 NADPH-diaphorase의 이중면역조직화학법에 의한 발현

김영옥 · 김미자<sup>§</sup> · 정주호\*

동덕여자대학교 자연과학대학 식품영양학과, 경희대학교 의과대학 약리학교실\*

## Expression of Neuropeptide Y(NPY) and NADPH-diaphorase Neurons in the Hypothalamus and Cerebral Cortex of Fasting and Anorexia Mutant Mice(*anx/anx*)

Kim, Young Ok · Kim, Mi Ja<sup>§</sup> · Chung, Joo Ho\*

Department of Food and Nutrition, Dongduk Women's University, Seoul 136-714, Korea

Department of Pharmacology,\* College of Medicine, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

### ABSTRACT

Food intake is regulated by both central and peripheral mechanisms. In the central nervous, the hypothalamus acts for autonomic and endocrine homeostasis. The paraventricular nucleus(PVN) of hypothalamus is an important site of interaction in central feeding pathways. Neuropeptide Y(NPY) is one of the most powerful neurochemical stimulants of food intake known. Also brain nitric oxide(NO), known as neurotransmitter, is involved in the mechanisms that regulate food intake. In this experiment, 24hr fasting mice and anorexia mutant mice have been used to examine the expression of NPY, which is the major neuropeptide increasing food intake. Double staining with NPY and nicotinamide-adenine-dinucleotide-phosphate diaphorase(NADPH-d), followed by immunohistochemical method and image analysis, have been used to observe coexisting neurons and the level of expression of each neurons. The results were as follows. 1) NPY-immunoreactivities reduced immune response of the hypothalamus, particularly paraventricular nucleus(PVN), in anorexia mutant mice. Decreased level of NPY is assumed to be a major pathological factor in anorexia mutant mice. On the other hand, PVN in hypothalamus of fasting mice showed increased immunoreactivity which is in agreement of other researchers. 2) NPY and NADPH-d double staining revealed coexisting neurons in the cerebral cortex. Fasting mice had a tendency to have increased level of coexisting neurons compared to the control group. Compared to the control group, fasting mice express is not increase level of NPY-immunoreactivity, while anorexia mutant mice tended to have a decreased level. (*Korean J Nutrition* 33(5) : 491~496, 2000)

**KEY WORDS:** anorexia, fasting, NPY, hypothalamus, NADPH-diaphorase.

## 서론

체지방의 분포는 항상성 조절 기전에 의해 이루어지는 것으로 알려져 있고, 체지방이 비정상적으로 과다 축적되면 비만증을 일으키고,<sup>1)</sup> 이러한 비만증은 산업사회의 발전으로 중요한 건강의 문제로 대두되고 있어, 그 유병률 또한 증가하는 추세이다. 이러한 비만증이 중요한 건강상의 문제로 대두되는 이유로는 이로 인한 인슐린의존성 당뇨병, 고혈압, 동맥경화증 등의 합병증을 동반하기 때문이다.<sup>2)</sup> 이와는

달리 식이섭취 이상현상의 하나인 식욕부진증의 경우는 유전적, 환경적인 요인에 의해서 음식섭취를 거부하여 급격한 체중감소로 결국은 죽음에 이르는 현상으로,<sup>3)</sup> 최근 그 유병률이 증가하는 추세이다. 이러한 음식섭취조절은 중추신경계에서는 주로 시상하부내의 신경펩타이드 발현의 차이에 의해 이루어진다고 한다.<sup>4)</sup>

시상하부는 음식섭취와 에너지 대사의 조절에서 첫 번째로 중요한 센터로, 몇 가지의 시상하부에 존재하는 신경펩타이드들은 몸무게 조절에 중요한 역할을 담당하고 있다. 그 예로 시상하부 영역중 ventromedial hypothalamic lesion(VMH)을 전기적으로 자극하면 음식섭취 증가와 에너지 소비의 감소로 비만현상이 일어나고,<sup>5)</sup> lateral hypoth-

채택일 2000년 5월 15일

<sup>§</sup>To whom correspondence should be addressed

alamus(LH)을 전기적으로 자극하면 음식섭취의 감소와 에너지 소비의 증가로 왜소증이나 식욕부진증의 현상이 일어난다는 보고가 있다. 최근에는 시상하부의 신경펩타이드와 신경전달물질의 역할에 대한 연구가 활발히 진행중이며, 이런 신경펩타이드 중에서도 많이 연구되고 있는 neuropeptide Y(NPY)는 음식섭취를 자극하는 물질로 알려져 있다. NPY는 말초신경계나 중추신경계 전역에 걸쳐 존재하는 신경펩타이드로, Clark 등<sup>6)</sup>에 의해 pancreatic polypeptide-like substance로 알려졌던 NPY가 시상하부 지역에 catecholamines와 공존하여 음식섭취를 조절한다고 하였다. 특히 뇌에서는 시상하부에 많이 존재하며, 시상하부에서도 arcuate nucleus(ARC)에서 만들어져서 paraventricular nucleus(PVN), dorsomedial nucleus(DMH), medial preoptic area(MPO)에 투사된다고 한다.<sup>7)</sup> 또한 비만연구와 그에 따른 합병증을 연구하기 위한 동물모델들에서 NPY의 과분비라는 신경분비계의 잘못된 조절이 관찰되었다. *ob/ob*와 *db/db* 생쥐는 현저하게 NPY mRNA가 증가되어 있는 상태로 이로 인해 음식섭취가 증가되어 비만연구와 당뇨연구에 이용되고, 비만 yellow A<sup>Y</sup> 또한 NPY 수준이 증가되어 비만이 유도된 상태이며, melanocortin-4 receptor(MC4-R) knockout 생쥐는 melanocortin 기능이 떨어져 유의적으로 DMH에서 NPY의 발현이 유도된 상태의 모델로 알려져 있다.<sup>8)</sup>

Nitric oxide(NO)는 혈소판 내에서 혈소판의 응집을 억제하며 혈관에서 혈관확장물질로 작용하는 것으로 알려져 있으나,<sup>9)</sup> 최근에는 불과 음식섭취를 조절한다고 보고되었다.<sup>10)</sup> Nitric oxide synthase(NOS)는 nitric oxide를 만드는 효소로써, NOS를 방해하는 물질을 주어 NO의 생성을 억제하면 음식섭취가 감소한다는 연구가 있다.<sup>11)</sup> NOS를 갖고 있는 신경세포를 조직학적으로 관찰하는 방법으로 nicotinamide-adenine-dinucleotide-phosphate diaphorase(NADPH-d) 조직화학법을 사용하며, 이 방법은 NOS가 nitroblue tetrazolium(NBT)을 물에 녹지 않는 NBT formazan으로 환원시키는 NADPH-d 작용이 있다는 원리를 이용한 방법이다. 이러한 일련의 과정에 NADPH가 필요하며 NOS는 NADPH를 전자 공여자로 필요로 한다.<sup>12)</sup> 최근에는 NOS와 여러 다른 신경전달물질의 공존성에 대한 연구들이 이루어지고 있으며, 대뇌결절에는 NPY의 공존성이 알려져 있다.<sup>13)</sup>

이에 본 연구는 음식섭취를 조절하는 NPY의 발현을 24시간 절식시킨 생쥐와 유전적 식욕부진증 돌연변이 생쥐의 시상하부에서 관찰하였고, NPY와 NADPH-d 이중염색을 실시하여 대뇌결절에서 공존하는 신경세포를 관찰하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물 및 사육환경

식욕부진 돌연변이 생쥐군은 heterozygous breeder(B6C3Fe-a/a-anx A/+a, anx/-)를 교배시켜 출생한 homozygous 식욕부진(*anx/anx*) 생쥐를 이용하였다. 물과 사료는 충분히 공급하였고, 12시간 간격으로 밤과 낮이 교대되며 온도가 22~25°C가 유지되는 동물실에서 사육하였다. 식욕부진 돌연변이 생쥐는 출생 후부터 최약한 모습을 보이고, 음식섭취가 감소하여 출생 7일 후부터 현저하게 성장이 저하되어 출생 후 16일 경부터 신체진전(tremor), 과다행동(hyperactivity), 비협조성 보행(uncoordinated gait) 등의 비정상적인 행동이 뚜렷하게 나타나면서 음식섭취가 감소하여 체중이 같은 자손인 wild type과 heterozygous type의 반 이하로 되면서 결국 출생 후 21일에서 26일 사이에 기아상태가 되어 죽게된다.<sup>14)</sup> 이와 같은 특징을 기준으로 출생 후 3주가 경과한 생쥐 중 실험군을 선별하였으며, 식욕부진 돌연변이 4마리, wild type을 24시간 절식시킨 군으로 4마리, wild type 4마리를 대조군으로 하여 3군을 정하였다.

### 2. 조직처리

실험동물은 ether로 전신 마취시킨 후 심장의 좌심실을 통하여 0.05M 인산염 완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)를 1분간 주입, 0.1M 인산염 완충액(phosphate buffer)에 녹인 4% paraformaldehyde 용액(PFA)을 4°C에서 10분간 관류시킨다. 관류고정 후 뇌를 적출, 4% PFA에 담가서 4°C에서 12~16시간 후고정하였다. 고정된 뇌 조직은 30% sucrose용액에서 2~5일간 침전시킨 후 Cryostat(American Optical)를 이용하여 40µm 두께의 연속관상절편을 제작, 자른 조직은 그룹별로 시상하부와 대뇌결절의 조직을 취하여 염색을 시행하였다.

### 3. NADPH-diaphorase 조직화학법

조직절편은 PBS에서 10분간 담근 후, 조직절편을 0.1% NADPH, 0.01% nitroblue tetrazolium, 0.3% Triton X-100을 0.1M PB에 녹인 반응혼합액에 넣어 37°C 항온기에서 60~90분간 반응시켰다. 원하는 정도의 반응이 나타나면 조직을 PBS로 세척하여 더 이상의 발색이 이루어지지 않게 하였다.

### 4. 면역조직화학법

NADPH-d로 발색된 조직을 자유부유(free-floating)법

을 이용하여,<sup>19)</sup> 다시 이중염색을 하였다. 조직절편은 조직내에 존재하는 peroxidase를 비활성화시키기 위해서 0.05 M PBS에 1%로 희석된 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)에 15분간 반응시킨 후, 10분 간격으로 3회 0.05M PBS로 세척한 후, rabbit polyclonal NPY antibody(Diasorin, USA)를 0.05 % bovine serum albumin(BSA), 1.5% goat serum, 0.3 % Triton X-100의 희석용액에 1 : 4000으로 희석하여, 24 시간동안 상온에서 반응시켰다. 1차 항체용액의 반응 후에, 조직을 0.05M PBS로 10분간 3번씩 세척한 후 2차 항체용액(Vecta Laboratories, Inc., USA)의 biotinylated anti-rabbit IgG를 1 : 200으로 희석하여 1시간동안 실온에서 반응시켰다. 2차 항체 용액과 반응 후에 0.05M PBS로

10분간 3번씩 세척한 후, avidine-biotin-peroxidase complex(Vectastain-Elite ABC kit, Vector Laboratories, Inc., USA)에서 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 발색제로는 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB)을 0.05M Tris 완충용액에 0.02%로 하였으며, 0.003%의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 첨가하였다. 발색반응은 상온에서 4분간 발색시켰으며, 반응이 끝난 후, 조직을 0.05M PBS로 10분간 3번씩 세척하였다. 발색이 끝난 조직은 gelatin-coated slide에 얹어서 2시간 동안 실온에서 건조시킨 후, NADPH-d로 염색된 부분이 빠질수 있으므로 에탄올에 의한 탈수과정을 생략하고 PBS와 증류수에 5분간씩 두었다가 xylene으로 투명화시켜 polymount로 봉입하였다.

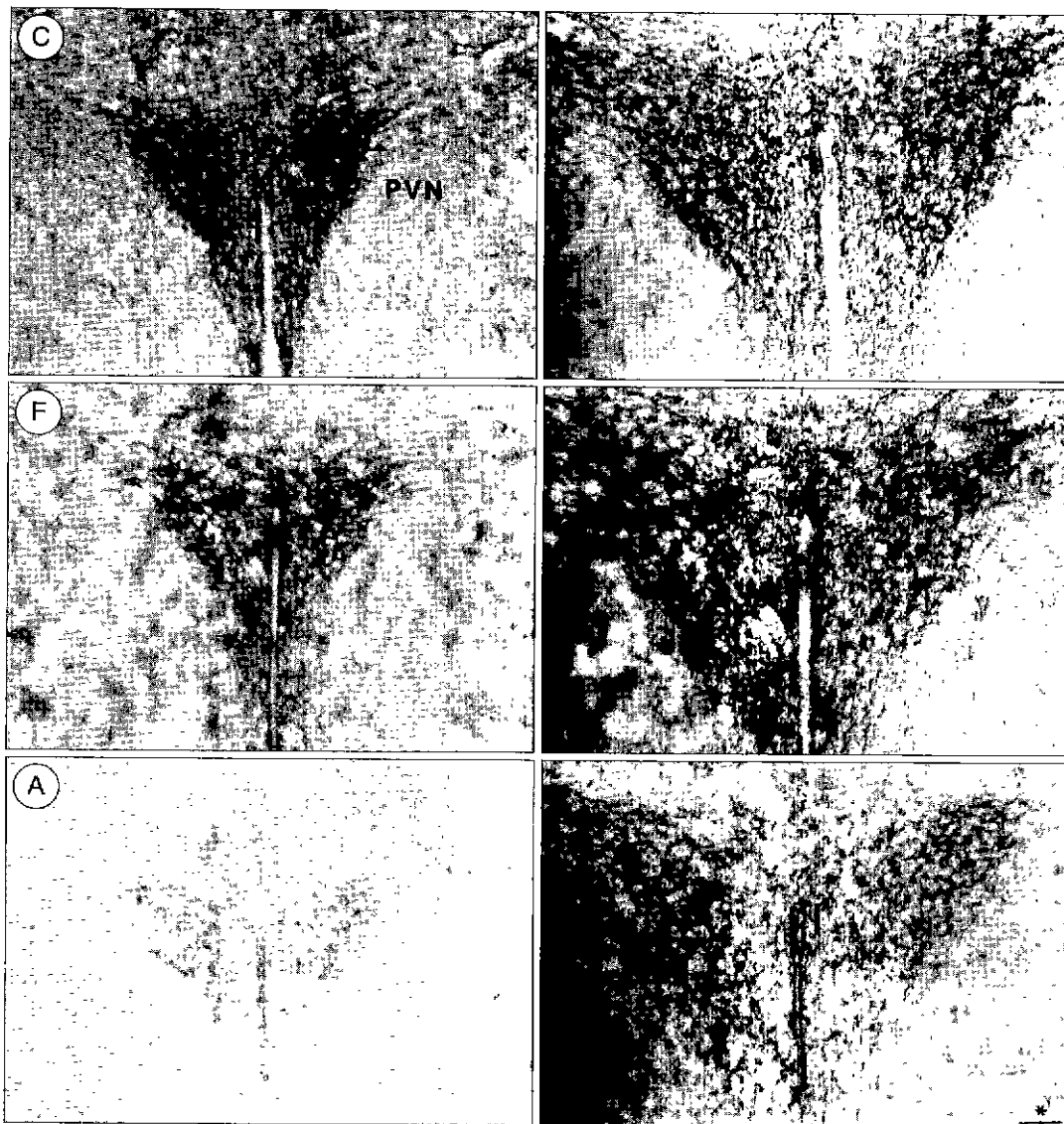


Fig. 1. Double staining with NPY-immunoreactivity and NADPH-diaphorase-positive neurons in the hypothalamus. NPY-immunoreactivity fibers are brown color, and NADPH-d activities are blue in color. C control mice, F' fasting mice, A' anorexia mutant mice, PVN: paraventricular nucleus, Scale bar: 200µm, \*Scale bar: 80µm

4. 조직관찰 및 영상분석법(Image analysis)

NPY와 NADPH-d의 면역 반응된 신경세포나 부위들은 발색제인 DAB에 의해 갈색과 푸른색으로 나타났으며, 이런 반응을 나타낸 신경세포나 신경섬유와 뇌 조직의 각 부위의 염색성등을 광학현미경으로 관찰하고 사진을 촬영하였다. 뇌의 각 부위의 위치와 명칭은 Franklin과 Paxinos<sup>16)</sup>의 부도를 참고로 하였다. 뇌의 시상하부의 NPY 신경섬유 면역 반응도는 영상분석기(IBAS, Kontron)로 분석하였고, 대뇌 겉질에 NPY와 NADPH-d로 염색되어 공존하는 신경세포는 일정한 영역에서 그 개수를 측정하였다. 측정된 자료는

t-test를 시행하였다

결과 및 고찰

본 연구결과 시상하부 중 PVN에서의 NPY의 면역반응도는 정상군에 비해, 식욕부진 돌연변이 생쥐군에서 감소하였으며, 절식시킨 생쥐군에서는 증가하였다(Fig. 1). 식욕부진 돌연변이 생쥐의 시상하부 중 PVN에서의 NPY의 감소는 Broberger등<sup>17)</sup>의 연구와 일치한 결과를 보였으며, 절식시킨 생쥐에서 보여준 결과 또한 기존의 많은 연구들과

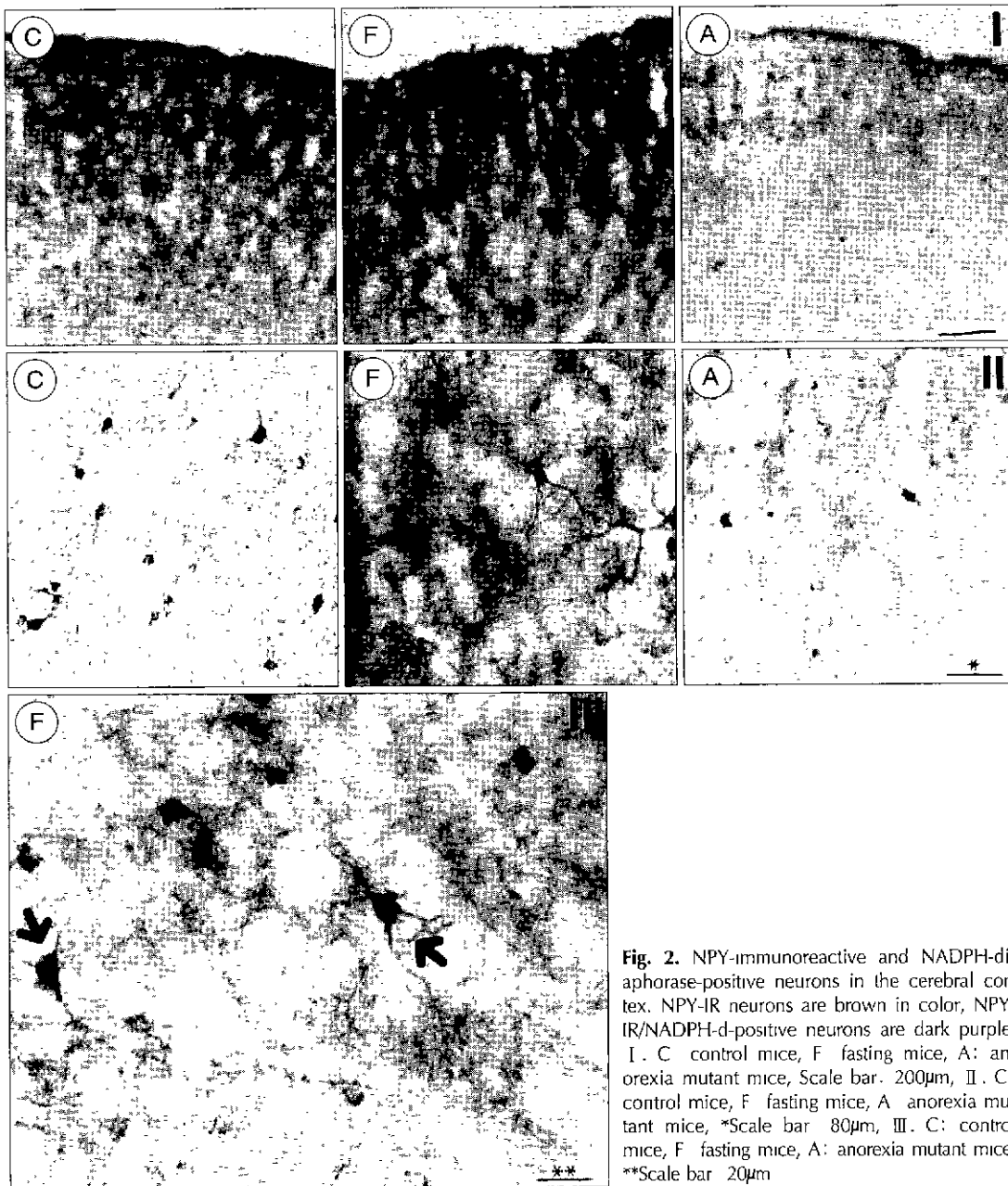


Fig. 2. NPY-immunoreactive and NADPH-diphosphorase-positive neurons in the cerebral cortex. NPY-IR neurons are brown in color, NPY-IR/NADPH-d-positive neurons are dark purple. I. C control mice, F fasting mice, A: anorexia mutant mice, Scale bar. 200µm, II. C: control mice, F fasting mice, A anorexia mutant mice, \*Scale bar 80µm, III. C: control mice, F fasting mice, A: anorexia mutant mice, \*\*Scale bar 20µm

**Table 1.** The number of NPY-immunoreactive and NADPH-positive neurons in mouse brain

Brain region	Control		Fasting		Anorexia	
	NPY alone	NPY colocalized with NADPH-d	NPY alone	NPY colocalized with NADPH-d	NPY alone	NPY colocalized with NADPH-d
RS	54.0 ± 5.0	2.3 ± 0.9	42.3 ± 7.2	3	29.3 ± 2.3*	2
M	31.3 ± 4.6	3.0 ± 1.5	55.0 ± 10.4	10 ± 2.5	24.0 ± 2.1	2
S1	109.7 ± 11.9	15.0 ± 3.2	145.7 ± 30.9	17.7 ± 2.9	77.3 ± 4.7	5.7 ± 0.3
S2	118.3 ± 1.7	13.7 ± 0.7	111.3 ± 6.9	16.3 ± 1.3	66.3 ± 8.11*	7.3 ± 0.9
Ect	79.3 ± 5.9	14.0 ± 3.1	39.3 ± 2.9*	11.7 ± 2.3	27.3 ± 2.3*	8.7 ± 0.7
PRh	53.3 ± 5.0	11.7 ± 2.6	27.3 ± 2.3*	11.3 ± 1.9	37.0 ± 4.7	8.0 ± 0.6
Total	66.4 ± 11.7	9.95 ± 2.4	64.8 ± 14.6	11.7 ± 2.1	39.3 ± 7.3	5.6 ± 1.2

Data are mean ± SE of the number.

\*p < 0.05 compared with the control group.

RS: retrosplenial, M: M1(primary motor) and M2(secondary motor), S1: primary somatosensory, S2: secondary somatosensory, Ect. ectorhinal, PRh: perirhinal

일치하였다. NPY의 기존의 연구에 의하면, PVN에 NPY 주사시, NPY가 강력한 중추 식욕증강효과를 나타내어 탄수화물이나 지방에 선택적인 과식증을 나타낸다는 보고도 있다. 또한 NPY는 음식을 제한하거나, 절식하거나, 당뇨, 과도한 운동과 같은 에너지손실시에 자극을 받아 mRNA발현이 증가된다는 연구가 있다.<sup>18,20</sup> 이와 같이 ARC-PVN의 NPY 뉴런은 음식섭취를 자극하여 에너지 결핍상태에서 에너지 소비를 방지하므로써 항상성을 유지하게 하며, 이러한 반응으로 에너지평형을 유지하게 하여 몸무게 유지를 가능하게 한다.<sup>21</sup>

유전적으로 비만 Zucker rat의 경우, ARC-PVN에 NPY가 증가되어있어, 이런 동물모델의 비만 원인이 증가된 NPY mRNA일 것으로 생각하고 있으며, 증가된 NPY의 분비가 갈색지방세포의 활성을 감소시키며, 과식증을 일으키는 것으로 알려져 있다.<sup>22</sup> 이외는 반대로 유전적인 요인이 아니라 식이 조성(에너지의 60%을 지방으로 조제)을 달리하여 비만을 유도한 경우인 diet-induced obese(DIO) 모델에서는 정상군과 비교시 DIO 모델에서 DMH과 VMH에서 NPY가 40배 증가되는 것을 관찰하였고, ARC에서는 NPY mRNA의 발현이 감소되는 것을 관찰하였다.<sup>8</sup>

또한 대뇌결절에서 NADPH-d 방법으로 염색성을 나타내는 NOS와 NPY는 공존하는 물질로 연구되고 있으나,<sup>23</sup> 식욕부진 돌연변이 생쥐에서의 NOS 및 NOS와 NPY의 공존에 관한 연구는 아직 보고 된 바 없어, 공존하는 세포의 역할은 자세히 알 수 없다. 본 연구에서 Fig. 2에 나타난 것 같이, 대뇌결절에서 정상군에 비해 절식시킨 생쥐군에서 NPY 신경세포의 수는 증가하지 않았으나, 공존하는 신경세포수는 증가하였다. 반면에 식욕부진 돌연변이 생쥐군에서는 정상군에 비해 감소하는 경향을 보였다. 대뇌결절에서 공존하는 신경세포는 진한 보라색으로 관찰되었고, Table

1에 나타났듯이 대뇌결절을 부위별로 나누어서 신경세포의 개수를 측정한 결과, 식욕부진 돌연변이 생쥐군의 대뇌결절의 retrosplenial, secondary somatosensory, ectorhinal 영역에서 NPY와 NADPH-d 공존세포는 정상군에 비해 유의적(p < 0.05)으로 감소하였고, 절식시킨 생쥐군의 ectorhinal, perirhinal 영역에서 정상군에 비해 감소하였다. 또한 전체적인 대뇌결절에서의 총 NPY 신경세포는 정상군에 비해 절식시킨 생쥐군에서는 증가되지 않았고, 식욕부진돌연변이 생쥐군에서는 감소하는 경향을 보였다. 공존하는 신경세포는 대조군과 식욕부진 돌연변이 생쥐군에 비해 절식시킨 생쥐군에서 증가되는 경향을 보였다(Table 1).

### 요약 및 결론

본 연구에서는 24시간 절식시킨 생쥐와 유전적으로 식욕부진증을 가지고 태어난 식욕부진 돌연변이 생쥐를 이용하여, 음식섭취를 증가시키는 대표적인 신경펩타이드인 NPY의 발현을 관찰하였고, NPY와 NADPH-d로 이중염색하여 면역조직화법과 영상분석법을 이용하여, 공존하는 신경세포와 그들 각각의 발현정도를 관찰하였다. 연구결과는 다음과 같다.

1) NPY 염색시에, 시상하부에서 특히 PVN에서 식욕부진 돌연변이 생쥐군이 대조군에 비해 면역반응도가 감소하였고, 절식시킨 생쥐군에서는 증가하는 경향을 보여, 절식시킨 생쥐군의 경우는 기존의 이론과 일치하였으며 식욕부진 돌연변이 생쥐에서 NPY의 면역반응도는 감소하였다.

2) 이중염색의 결과, 대뇌결절에서 공존하는 신경세포를 관찰할 수 있었고, 대조군에 비해 절식시킨 생쥐군에서는 NPY로 염색된 신경세포가 전체적으로 증가되지 않았고 식욕부진 돌연변이 생쥐군에서는 감소하는 경향을 보였으며,

공존하는 신경세포는 절식시킨 생쥐군에서 대조군에 비해 증가하는 경향을 보였다.

위의 관찰된 결과로, 24시간 절식시킨 경우에 기존의 연구결과와 같이 시상하부에서의 NPY의 면역반응도는 증가하였고, 식욕부진 돌연변이 생쥐군 경우에는 대조군과의 비교시에 시상하부에서 NPY 감소가 관찰되었다. 이러한 감소현상이 이 동물모델의 식욕부진증에 주요한 요인으로 작용할 것으로 사료된다.

#### Literature cited

- 1) Schwartz MW, Dallman MF, Woods SC. Hypothalamic response to starvation implications for the study of wasting disorders. *Am J Physiol* 269: R949-957, 1995
- 2) Millo MG. Regulation of ob gene and overexpression in obesity. *Bio-med Pharmacother* 51: 318-323
- 3) Hsu G, Crisp A. Outcome of anorexia nervosa. *Lancet* 1: 61-65, 1979
- 4) Flier JS, Maratos-flier E. Obesity and the hypothalamus novel peptides for new pathways. *Cell* 92: 437-440, 1998
- 5) Vilberg TR, Keeseey RE. Reduced energy expenditure after ventromedial hypothalamic lesions in female rats. *Am J Physiol* 247: R183-188, 1984
- 6) Clark JT, Kalra PS, Crowley WR, Kalra SP. Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats. *Endocrinology* 115: 427-429, 1984
- 7) Morris BJ. Neuronal localization of neuropeptide Y gene expression in rat brain. *J Comp Neurol* 290: 358-368, 1989
- 8) Guan XM, Yu H, Trumbauer M, Frazier E, Lex HT, Ploeg Van der, Chen H. Induction of neuropeptide Y expression in dorsomedial hypothalamus of diet-induced obese mice. *Neuro Report* 9: 3415-3419, 1998
- 9) De luca B, Monda M, Sullo A. Changes in eating behavior and thermogenic activity following inhibition of nitric oxide formation. *Am J Physiol* 268: R1533-R1538, 1995
- 10) Calapai G, Mazzaglia G, Sautebin L, Costantino G, Marciano MC, Cuzzocrea S, Rosa MD, Caputi AP. Inhibition of nitric oxide formation reduces voluntary ethanol consumption in the rat. *Psychopharmacology* 125: 398-401, 1996
- 11) Morley JE, Flood JF. Evidence that nitric oxide modulates food intake in mice. *Life Sci* 49: 707-711, 1991
- 12) Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron* 8: 3-11, 1992
- 13) Kowall NW, Ferrante RJ, Beal MF, Richardson EP, Sofroniew MV, Cuello AC, Martin JB. Neuropeptide Y, somatostatin and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase in the striatum: a combined immunocytochemical and enzyme histochemical study. *Neuroscience* 20: 817-828, 1987
- 14) Son JH, Baker H, Park DH, Joh TH. Drastic and selective hyperinnervation of central serotonergic neurons on a lethal neurodevelopmental mouse mutant, Anorexia(anx). *Mol Brain Res* 25: 129-134, 1994
- 15) 김영수 · 허영범 · 안희경. 생쥐 대뇌결절의 neuropeptide Y와 NADPH-diaphorase 신경 세포의 분포에 관한 면역조직화학적 연구. *대한재활인류학회지* 11: 61-71, 1998
- 16) Franklin KBJ, Paxinos G. The mouse brain in stereotaxic coordination, Academic Press, San Diego, 1997
- 17) Broberger C, Johansen J, Schalling M, Hokfelt T. Hypothalamic neurohistochemistry of the murine *anorexia(anx/anx)* mutation altered processing of neuropeptide in the arcuate nucleus. *J Comp Neurol* 387: 124-135, 1997
- 18) Brady LS, Smith MA, Gold PW, Herkenham M. Altered expression of hypothalamic neuropeptide Y mRNAs in food-restricted and food-deprived rats. *Neuroendocrinology* 52: 441-447, 1990
- 19) Jones PM, Pierson AM, Williams G, Ghatei MA, Bloom SR. Increased hypothalamic neuropeptide Y messenger RNA in two rat models of diabetes. *Diabetic Med* 9: 76-80, 1992
- 20) Lewis D, Shellard L, Koeslag DG, Boer DE, McCarthy HD, McKibbin PE, Russell JC, Williams G. Intense physical exercise and food restriction cause similar increases in hypothalamic neuropeptide Y concentration in rats. *Am J Physiol* 264: E279-284, 1993
- 21) Frankish HM, Dryden S, Hopkins D, Wang Q, Williams G. Neuropeptide Y, the hypothalamus and diabetes insights into the central control of metabolism. *Peptides* 16: 757-771
- 22) Bray GA. Genetic and hypothalamic mechanisms for obesity-finding the needle in the haystack. *Am J Clin Nutr* 50: 791-802, 1989
- 23) Huh YB, Lee WK, Cho JS, Ahn HK. Regional changes of NADPH-diaphorase and neuropeptide Y neurons in the cerebral cortex of aged Fischer 344 rats. *Neurosci Lett* 247: 79-82, 1998