

Polymannuronate가 흰쥐의 혈청과 간장조직중의 Leptin에 미치는 영향

김인혜 · 이동수¹ · 권지영 · 권미진 · 남택정*
부경대학교 식품생명공학부, ¹(주)케이비피

The Effects of Polymannuronate on Leptin in Serum and Liver of Rats

In Hye KIM, Dong Soo LEE¹, Ji Young KWON, Mi Jin KWON and Teak Jeong NAM*
Faculty of Food Science and Biotechnology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea
¹Biotechnology Research Center, KBP Co. Ltd., Gyeonggido 459-050, Korea

This study investigated the effects of polymannuronate feeding on cholesterol levels and leptin in the serum and liver of Sprague-Dawley rats. After one week of basal diet feeding, four week old S.D. male rats were fed with polymannuronate. The feeding efficiency of the polymannuronate fed group averaged around 0.27, which was 0.02-0.03 lower than that of the control group, and liver weight, also had a lower increase. The liver tissue tagging of rats by staining fat drops increased in the cholesterol fed group. RIA and RT-PCR were used to determine the expression of leptin in the serum and liver of rats. The polymannuronate fed group had a larger reduction in the serum and liver leptin than the cholesterol fed group. The RT-PCR results showed that leptin mRNA was expressed in the liver. The polymannuronate fed group had a larger reduction in liver leptin mRNA expression than the cholesterol fed group. The above results suggest that feeding of polymannuronate improves the physiological function of rats by changing serum and liver lipid composition and the expression of leptin was repressed at a molecular level.

Key words: Polymannuronate, Leptin, Leptin mRNA, Rats

서론

알긴산은 해조 다당류의 일종으로 미역이나 다시마와 같은 갈조류 중 30-40%를 차지하며, poly-β-D-mannuronate와 poly-α-1,4-L-guluronate로 이루어져 있고, 유리 COOH기는 각종 무기질과 치환반응을 일으키는 것으로 알려져 있다 (Haug and Larsen, 1962). Tsuji et al. (1974)은 알긴산과 곤약 분말을 각각 흰쥐에 급이시켜 혈청 및 간의 콜레스테롤 저하 효과에 관하여 보고하였으며, Tsuji et al. (1968)은 알긴산이 고혈압유도 흰쥐의 혈압 및 혈청 콜레스테롤 상승억제에 효과가 크다고 하였다. Suzuki et al. (1993)은 L-guluronate와 D-mannuronate를 많이 함유하는 알긴산을 각각 구분하여 흰쥐에 급이시킨 결과 D-mannuronate가 많이 함유된 알긴산 급이군에서 혈청 및 간장 콜레스테롤의 저하 등 지질대사개선에 효과적인 것으로 보고하였다. 또 Lee et al. (1998)은 엽산으로 부분 가수분해하여 얻은 polymannuronate는 용해도, 유효성 및 담즙산 결합능을 현저히 증가시키며, 혈청 및 간장 지질 중의 콜레스테롤 수준에 대하여 유의적인 저감효과를 보였다고 보고하였다.

비만은 유전적인 배경을 가지므로 비만 유전자를 찾으려는 연구는 꾸준히 시도되었다. Zhang et al. (1994)에 의해 비만생쥐 (ob mouse)에서 비만유전자가 발견되었고, 비만유전자가

발현되는 지방세포에서 생성되어 체지방 정도를 반영하는 14-16 kD의 단백질이 leptin임을 확인하였다. Hallas et al. (1995)와 Pellemounter et al. (1995)의 보고에 따르면 leptin의 식욕억제 및 대사의 증가기능은 대부분의 비만 대상자들이 정상인에 비해 leptin 농도가 유의적으로 높다고 보고하였다. 또한 비만조절에 있어서 leptin의 작용을 검토하고자 고지방식이로 비만을 유도한 후에 혈 중 leptin의 변화를 살펴본 결과 고지방식이 섭취 시 마우스의 혈 중 leptin농도가 유의적으로 증가되었다 (Frederich et al., 1995; Reeves et al., 1993; Bucolo and David, 1973).

본 연구는 식용갈조류 알긴산을 부분 가수분해하여 제조한 polymannuronate를 실험용 흰쥐에 급이시켜 혈청과 간장조직 중의 비만유전자 단백질인 leptin 수준을 통해 polymannuronate의 생리적 기능을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

시약 및 재료

실험에 사용된 polymannuronate (M.w. 40 kDa)를 (주) KBP (경기도, 평택 소재)에서 제공받아 사용하였다. 동물실험에 사용된 측정용 kit는 WAKO (WAKO, Japan), 신양화학 (신양화학, Korea)제품, leptin RIA kit (Linco Research, Inc., USA)는 Linco 제품, amyloglucosidase는 Sigma (Sigma Chemical Co., USA)제품을 사용하였다. 간장 조직 중의 total RNA는 Intron

*Corresponding author: namtj@pknu.ac.kr

(iNtRON Biotechnology, Inc., Korea) 제품인 easy BLUE™ Total RNA Extraction kit로 추출하였다. 전기영동용 agarose는 SeaKem LE agarose (BMA, Rockland, ME, USA)를 사용하였고, 100 bp DNA ladder는 Bioneer (Bioneer Co., Korea)에서 구입하였다. cDNA 합성에 사용한 oligonucleotide primer는 제노텍에 의뢰, 합성하여 사용하였다. Western blot에 사용한 protein standard marker는 rainbow high molecular marker (Amersham Pharmacia Bioscience, England)를, detection reagent로는 Super Signal West Pico Stable Peroxide Solution과 Super Signal West Pico Luminol/Enhancer Solution (PIERCE, Rockford, IL, USA)을, leptin antibody는 Santa Cruz (Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA) 제품을 사용하였다. 그 외 RNA 실험용 시약은 molecular biology용으로 Sigma 제품과 특급시약을 사용하였다.

실험동물의 사육 및 식이

실험동물은 생후 4주령 Sprague Dawley계 평균 체중 100±10 g인 수컷 흰쥐를 효창사이언스 (경북소재)에서 구입하여 1주간 고행사료로 적응시킨 다음, 각 군을 10마리씩 3개군의 실험 식이로 나누어 한 마리씩 사육 철망상자속에 넣고 각 해당식으로 4주간 사육하였다. 각 군의 실험식은 기초식이 (무콜레스테롤·무섬유식이)와 콜레스테롤식이 (무섬유식이) 및 POLYMAN식으로 구분하여 그 조성을 Table 1과 같이 조제하였다. 즉, 콜레스테롤식은 기초식에 콜레스테롤 1%를 첨가한 양만큼 corn-starch의 양을 줄여서 조제하였고, POLYMAN식은 기초식의 cornstarch의 양에서 1% 콜레스테롤과 5% polymannuronate에 해당하는 양을 줄인 수준에서 각각 조제하였다. 실험식이중 Casein, Mineral mixture, Vitamin mixture는 ICN제를 사용하였다. 전 사육기간 동안 실험식이와 물은 자유로이 섭취하게 하고, 사육실 온도 (22±

1°C), 습도 (50±10%) 및 명암은 12시간 간격으로 점등 및 소등하였다.

식이섭취량, 체중증가량 및 식이효율

식이섭취량은 매일, 체중은 격일로 측정하였다. 식이효율은 실험기간 동안의 체중증가량을 식이섭취량으로 나누어서 구하였다.

실험동물의 처리

실험사육 종료 후 사육한 흰쥐를 10시간 절식시키고 ether로 가볍게 마취시킨 후 단두하여 채혈한 각 혈액시료는 빙수중에서 약 1시간 방치하고 원심분리하여 취한 혈청을 분석 전까지 냉동고 (-70°C)에 보관하였다. 간장조직은 별도로 적출하여 생리식염수로 씻고 물기를 제거하였다. 그리고 무게를 잰 후, 일부는 조직염색에, 나머지는 액체질소로 급속 동결시켜 분석 전까지 냉동고에 보관하였다.

간장조직 분석

각 조건별로 사육한 흰쥐를 해부하여 같은 위치의 간장 일부를 떼내어 생리식염수로 가볍게 씻어 혈액을 제거한 다음, 일부를 절단하여 Bouin액에 고정하고, 동일한 고정액에 24시간 동안 재고정하였다. 이를 수세하여 순차농도 알코올에 탈수하여 xylene으로 투명화시킨 후, 파라핀 침투하여 포매하였다. 이를 5 µm 두께로 박절하고 Hematoxylin-Eosin으로 염색한 후 조직을 슬라이드글라스에 고정·봉입하여 광학현미경으로 관찰하여 지방생성정도를 200 배율로 확인하였다.

Leptin radioimmunoassay 및 western blot

혈청의 Leptin 농도는 ¹²⁵I-labeled LEPTIN RIA KIT (Linco Research, Inc., USA)로 측정하였다. 각 조건별로 회수한 혈청을 100 µL를 첨가하고 RAT Leptin Antibody를 100 µL씩 넣은 다음, 잘 혼합하여 실온에서 24시간 반응시켰다. 그 반응액에 ¹²⁵I-Rat Leptin Tracer를 100 µL를 넣은 후, 잘 혼합하여 다시 24시간 반응시켰다. 그 후 Precipitating reagent를 1 mL씩 첨가하여 잘 혼합한 후 4°C에서 20분간 방치하였다가 원심분리 (3,000 rpm, 30 min, 4°C)하였다. 상층액을 제거한 tube를 gamma counter (Wallac 1470 wizard, Amersham Pharmacia Biotech, England)에서 1분 간격으로 radio activity를 측정하여 ng/mL으로 나타내었다.

Western blot은 각 조건별로 사육하여 취한 혈청 2 µL를 취하여 최종농도가 1X Laemmi sample buffer와 0.1 M DDT가 되도록 희석하여 전기영동 샘플로 사용하였다. 12.5% polyacrylamide gel에 loading시켜 분리된 단백질은 Immobilon-P membrane (Millipore, pore size; 0.1 µm, USA)으로 옮겼다. 분리된 단백질은 Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (PIERCE, Rockford, IL, USA)를 이용하여 leptin 단백질 수준을 확인하였다. Leptin에 대한 1차 항체 (Anti-Leptin polyclonal antibodies rabbit IgG)는 5% fat-free milk가 포함된 TBS-T (20 mM Tris-base, 137 mM NaCl, 1 M HCl, 0.1% Tween

Table 1. Formulation of experimental diets (g/kg)

Constituents	Test animal group ¹		
	B ²	CHOL	POLYMAN
Corn starch	496	483.5	433.5
Sucrose	124	124	124
Casein	180	180	180
Lard	100	100	100
Corn oil	50	50	50
Mineral mixture	35	35	35
Vitamin mixture	10	10	10
Choline chloride	2	2	2
Methionine	3	3	3
Cholesterol	0	10	10
Sodium cholate	0	2.5	2.5
Polymannuronate	0	0	50

¹Test animal: Strain, Sprague Dawley; age, 4 weeks; average body weight; 100±10 g; feeding period, 4 weeks by experimental diet after a week of basal diet.

²Codes of experimental diet. B, fed the basal diet; CHOL, fed the cholesterol diet; POLYMAN, fed the cholesterol diet containing the polymannuronate.

20, pH 7.6) 완충용액에 1:1,500으로 희석하여 사용하였고, peroxidase labelled anti-rabbit antibodies를 1:1,500으로 희석하여 2차 항체로 사용하였다.

Leptin mRNA 분석

간장조직 중의 leptin mRNA를 정량하기 위해서 RT-PCR법을 사용하였다. 각 조건별로 사육하여 액체질소에 급속동결시켜 -70°C에 보관한 간장조직을 easy BLUE™ Total RNA Extraction kit를 사용하여 total RNA를 추출하고, 0.1% DEPC (diethylpyrocarbonate)에 녹인 후, 260 nm/280 nm에서 흡광도를 측정하여 농도를 구한 다음 -70°C에서 보관하였다. mRNA 분석은 QIAGEN one step RT-PCR kit를 사용하였는데, total RNA (1 µg/µL)와 함께 kit manual대로 혼합하였다. 이 반응혼합물을 PCR thermal cycler 480 (TAKARA, JAPAN)으로 옴긴 후, 50°C에서 30분, 95°C에서 15분간 reverse transcription 반응시킨 다음 95°C에서 1분, 59°C에서 1분, 72°C에서 1분씩 35 cycles을 반응시켜 증폭시켰다. 이때 사용한 primers는 다음과 같다.

5'-CCCTCACAAGACCATTGTCACC-3' (sense)
5'-GCAGCCTGCTCAAAGCCACC-3' (antisense)

실험결과의 통계처리

실험결과는 통계처리에 의하여, 실험 군 당 평균치와 표준편차를 계산하였고, 콜레스테롤식이군과 POLYMAN식이군을 비교하여 p<0.05 수준에서 t-test로 각 실험군간의 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

식이효율 및 각 장기의 무게

각 실험식이로 4주간 사육한 흰쥐의 체중증가량과 사육기간 중의 사료섭취량, 식이효율 및 간장의 무게를 Table 2에 나타내었다. 각 군의 체중증가량은 기초식이군과 콜레스테롤식이군 및 POLYMAN식이군이 거의 비슷한 경향을 보였다. POLYMAN식이군의 경우 식이섭취량은 콜레스테롤식이군과 비슷하였으나, 체중증가량과 식이효율은 오히려 낮게 나타

Table 2. Weight gain, feed intake, feed efficiency ratio and weight of the liver in the rats fed the experimental diets

Test group ¹	Weight gain (g/4 weeks)	Feed intake (g/day)	Feed efficiency ratio	Weight of the liver (g)
B ²	176.9±5.4	21.7±0.9	0.30±0.01	9.82±0.57
CHOL	162.5±12.6	21.2±0.9	0.28±0.02	14.94±1.27
POLYMAN	158.1±9.0	22.2±1.1	0.27±0.02	13.29±1.07*

¹Refer to the footnote of Table 1.

All data were calculated by Mean±S.D. for 10 individuals.

²Sample significantly different from basal diet (B) group by Student's t-test (p<0.05).

났다. Tsuji et al. (1968)의 보고에서도 흰쥐에 5% 알긴산을 첨가한 실험군에서 성장 지연을 확인하였고, Suzuki et al. (1993)도 흰쥐에 5% 알긴산을 첨가한 군의 체중증가가 기초식이군에 비해 저하하였다고 보고하였다. 이에 반해 본 연구에서는 polymannuronate의 급이로 인한 유의적인 체중의 감소는 확인되지 않았으나 식이효율만은 기초식이군과 콜레스테롤식이군에 비해 다소 낮은 경향을 보였다. 또한 간장의 무게는 콜레스테롤식이군에서 현저하게 높았고, POLYMAN식이군에서도 기초식이군에 비해 간장의 무게가 증가되었는데, 이는 콜레스테롤의 섭취에 의한 영향으로 판단된다. 그러나 POLYMAN식이군은 콜레스테롤식이군에 비해 간장의 무게가 유의적으로 적었으며, 이는 polymannuronate의 첨가가 콜레스테롤식이로 인한 간장의 무게를 약간 감소시킨 것으로 생각된다.

Polymannuronate가 간장조직 중의 지방분포에 미치는 영향

조직검사는 정상 또는 병리 조직의 형태, 이들 조직 사이의 상호 관련성 및 조직을 구성하는 각 세포들의 구조를 자세히 관찰하기 위하여 필요한 부위의 조직편을 여러 과정을 통하여 제작하여 현미경하에서 검사하는 방법이다. 조직 검사에는 여러 가지의 방법이 있지만, 본 실험에서는 조직 절편 검사를 하였다. 조직 절편 검사는 조직편을 박절기를 사용하여 얇고 투명한 절편을 제작하여 관찰하는 방법으로 조직의 구성, 즉 세포와 세포 사이의 상호 관련성을 보존할 수 있다는 것이 가장 큰 장점이다. 본 실험에서는 실험식이에 따른 흰쥐의 간장조직을 Hematoxylin-Eosin으로 염색한 후 광학현미경으로 관찰하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 지방구를 제외한 부분은 붉게 염색되었으며, 염색되지 않은 것이 지방구임을 확인하였다. 기초식이군은 정상 간장 조직의 것이며, 콜레스테롤식이군은 대조군으로써 아주 심한 정도의 지방침착을 관찰할 수 있었고, POLYMAN식이군은 정상군에 가까운 정도로 아주 경한 지방변성을 보였다. 이는 콜레스테롤에 의한 영향으로 보이고, 식이섬유인 polymannuronate에 의해 간장조직의 지방축적이 감소되었음을 보여주는 증거이다. Stuart and Smith (1975)은 고콜레스테롤 급이 흰쥐에게 간세포질에서 지방공포 출현을 관찰하였고, Drevon and Hovig (1977)도 지질 투여 guinea pig에서 간의 현저한 콜레스테롤 축적, 간세포내 지방구 출현과 아울러 인지질의 증가를 보였다고 하였다. 또한 이 결과는 급이에 따른 간장의 무게의 결과와도 일치함을 알 수 있었다.

Polymannuronate에 의한 leptin 단백질과 분비 억제

Figs. 2, 3은 polymannuronate가 흰쥐의 혈청 중에 leptin 발현과 분비에 미치는 영향을 검토하기 위해 western blot과 RIA 분석을 통해 살펴보았다. Fig. 2에서와 같이 14 kDa의 leptin이 각 조건에 따라 밴드의 크기가 달리 나타났는데, POLYMAN식이군이 콜레스테롤식이군보다 약한 밴드를 보였다. 즉, 흰

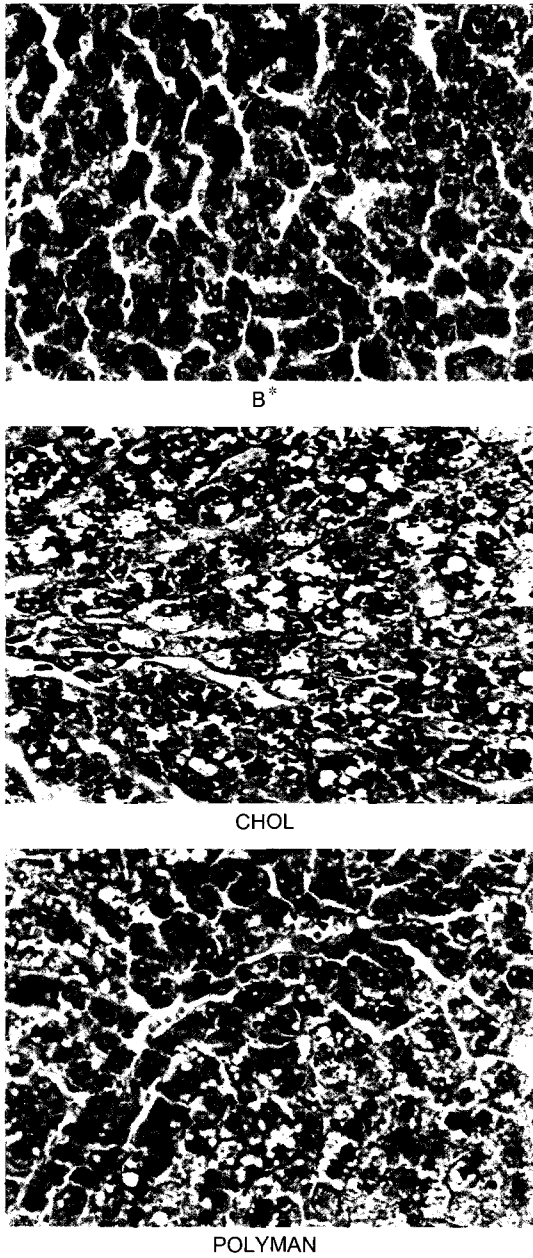


Fig. 1. Photomicrographs of Hematoxylin-Eosin staining in the liver of rats ($\times 200$).

*Refer to the footnote of Table 1.



Fig. 2. Western blot for detecting the effects of Poly-mannuronate on leptin protein levels in the serum of rats.

*Refer to the footnote of Table 1.

쥐의 식이 중 콜레스테롤의 투여는 지질대사를 촉진하여 leptin 발현을 증가시킨 반면, polymannuronate의 투여는 지질

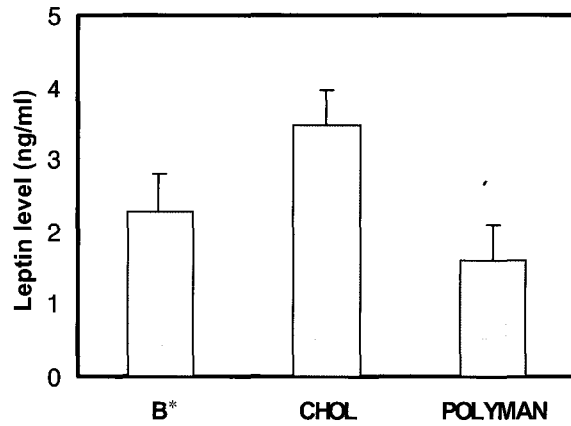


Fig. 3. The effect of polymannuronate on leptin secretion in the serum of rats.

*Refer to the footnote of Table 1.

대사를 저해하여 leptin 발현이 억제되었음을 알 수 있었다. Ferderich et al. (1995)은 12주 동안의 고지방식이 섭취시 지방 조직에서 leptin 단백질의 증가되었다고 하여 본 실험과 동일한 결과를 보였다.

Fig. 3은 RIA 분석을 이용하여 polymannuronate가 leptin 분비에 미치는 영향을 살펴본 것이다. 그 결과, western blot의 결과에서 보여준 leptin의 발현과 일치하는 수준으로 나타나, polymannuronate가 단백질수준에도 영향을 미친다는 것을 확인할 수 있었다. 사람과 동물을 대상으로 한 Hallas et al. (1995)과 Pelley-mounter et al. (1995)의 보고에 따르면 leptin의 식욕억제 및 대사율의 증가는 대부분의 비만 대상자들이 정상인에 비해 leptin 농도가 유의적으로 높다고 하였고, Frederich et al. (1995)은 12주 동안의 고지방식이 섭취시 혈 중 leptin의 농도가 증가한다고 하였으며, 유전 혹은 식이에 의하여 비만을 유발시킨 동물에게서 정상군에 비해 leptin 농도가 높았다고 하였다. 본 연구에서도 콜레스테롤식이 섭취 시 혈 중 leptin 농도가 증가했으며, 이는 체내 지방 축적량이 증가된 것에 의한 영향이라고 추정된다.

Polymanuronate에 의한 leptin mRNA 발현 억제

Fig. 4의 결과와 같이 콜레스테롤식이군의 leptin mRNA는 앞선 leptin 분비 결과와 일치하는 수준으로 나타났으며, POLYMAN식이군의 leptin mRNA는 콜레스테롤식이군보다 약한 밴드를 보였다. 이로써 polymannuronate는 leptin mRNA의 전사단계에서부터 영향을 주고 있음을 알 수 있으며, 이는 식이섭유가 지방세포 증식과 분화를 억제하여 체중감량 및 체지방 감소에 효과가 있다는 것에 대한 간접적인 증거이다 (Han et al., 1994). Masuzaki et al. (1995)은 2주 동안의 고에너지/고지방식이 섭취시 지방조직에서 leptin의 mRNA의 증가를 보고하였다. 또한 Reeves et al. (1993)과 Bucolo and David (1973)의 보고에 따르면 비만조절에 있어서의 leptin의 작용을 살펴보고자 고지방식이로 비만을 유도한 후에 혈 중 leptin의



Fig. 4. The effects of polymannuronate on leptin mRNA expression in the liver of rats by RT-PCR.

*Refer to the footnote of Table 1.

변화를 살펴 본 결과, 고지방식이 섭취 시 흰쥐의 혈 중 leptin 농도가 유의적으로 증가했으며, 이는 증가된 체지방 크기와 비례하였고 지방조직에서 leptin mRNA가 증가한다고 하여 본 결과와 같은 경향을 나타내었다. 따라서 polymannuronate 는 leptin을 분자수준에서 조절하는 것으로 추정된다.

사 사

본 연구는 해양수산개발원(수산특정연구과제-20000031)의 지원에 의한 것입니다.

참 고 문 헌

- Bucolo, G. and H. David. 1973. Quantitative determination of the serum triglycerides by the use of enzymes. *Clin. Chem.*, 19, 476-479.
- Drevon, C.A. and J. Hovig. 1977. The effects of cholesterol rat feeding on lipid levels and morphological structure in liver, kidney and spleen in guinea pigs. *Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. A.*, 85, 1.
- Frederich, R.C., A. Hamann, S. Anderson, B. Lollmann, B.B. Iowell and J.S. Flier. 1995. leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nature Med.*, 1, 1311-1314.
- Hallas, J.L., K.S. Gajiwala, M. Maffei, S.L. Cohen, B.T. Chait, D. Rabinowitz, R.L. Lallion, S.K. Burley and J.M. Friedman. 1995. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*, 269, 543-546.
- Han, J.S. and Y.B. Han. 1994. The effect high fat diet and dietary fiber on adipocyte of epididymal fat pads in Rat. *Kor. J. Nutr.*, 7, 118-126 (in Korean).
- Haug, A. and B. Larsen. 1962. Quantitative determination of the uronic acid composition of alginates. *Acta Chem. Scand.*, 16, 1908-1918.
- Lee, D.S., T.J. Nam and J.H. Pyeun. 1998. Effect of low molecular alginates on cholesterol levels and fatty acid compositions of serum and liver lipids in cholesterol-fed rats. *J. Kor. Fish.*, 31, 399-408 (in Korean).
- Masuzaki, H., Y. Ogawa and N. Isse. 1995. Adipocyte-specific expression and regional differences in the adipose tissue. *Diabetes*, 44, 855-858.
- Pelleymounter, M.A., M.J. Cullen, M.B. Baker, R. Hecht, D. Winters, T. Boone and F. Collins. 1995. Effect of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science*, 269, 540-543.
- Reeves, P.G., F.H. Nielsen and G.C. Fahey. 1993. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the american institute of nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.*, 123, 1939-1951.
- Stuart, A.E. and I.I. Smith. 1975. Histological effects of lipids on the liver and spleen of mice. *J. Pathol.*, 115, 63.
- Suzuki, T., K. Nakai, Y. Yoshie, T. Shirai and T. Hirano. 1993. Effects of sodium alginates rich in guluronic and mannuronic acids on cholesterol levels and digestive organs of high-cholesterol-fed rats. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 59, 545-551. (in Japanese)
- Suzuki, T., K. Nakai, Y. Yoshie, T. Shirai and T. Hirano. 1993. Digestibility of dietary fiber in brown alga, kombu, by rats. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 59, 879-884. (in Japanese)
- Tsuji, K., S. Oshima, E. Matuszaki, A. Nakamura, S. Innami, T. Tezuka and S. Suzuki. 1968. Effect of polysaccharides on cholesterol metabolism (part 1) Studies on konnyaku powder, sodium alginate and pectin. *Eiyogaku Zashi*, 26, 113-122. (in Japanese)
- Tsuji, K., Y. Horid, E. Tsuji and S. Suzuki. 1974. Effect of a konjac flour diet on the endogenous cholesterol metabolism in rats. *Eiyogaku Zashi*, 27, 405-411. (in Japanese)
- Zhang, Y., R. Proence, M. Maffel, M. Barone, L. Leopold and J.M. Friedman. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372, 425-432.

2003년 10월 11일 접수

2003년 12월 13일 수리