

생체 외 조직 고 분해능 Magic Angle Spinning을 이용한 정상 Adult Mice에서의 뇌 부위별 뇌 신경화학 대사물질 정량분석

*가톨릭대학교 의과대학 의공학교실, †건국대학교 수의과대학, ‡가톨릭대학교 의과대학 분자유전학교실, §경희의료원 진단방사선과, ||가톨릭대학교 의과대학 정신과학교실

이도완* · 우동철* · 이성호† · 김상영* · 김구영‡ · 임향숙‡ · 최치봉§ · 김휘율† · 이창욱|| · 최보영*

본 연구는 생체 외 ¹H 고분해능 매직앵글스핀닝(¹H High-Resolution Magic Angle Spinning; ¹H HR MAS) 기술을 이용하여 정상군 adult mice의 뇌에서의 부위별 뇌 신경화학 대사물질(brain neurochemical metabolites)을 정량적으로 분석하고, 이를 이용하여 정상군의 뇌 대사물질의 표준 data base를 정립하기 위함이다. 실험에 사용된 adult mice는 C57BL/6J 모델의 체중 25~28 g, 40주령 수컷 10마리를 사용하였으며, 연령과 성별을 일치시켰다. 또한 뇌의 전두엽(frontal cortex), 측두엽(temporal cortex), 해마(hippocampus), 시상(thalamus) 총 4개의 부위를 채취하여 생체 외 ¹H 고분해능 매직앵글스핀닝 실험을 진행 하였다. 생체 조직의 뇌 대사물질의 절대농도를 획득하기 위하여 대표적인 대사물질(Ace, NAA, NAAG, tCr, Cr, tCho, Cho, mlins, GPC+PC, Lac, GABA, Glu, Gln, tau, Ala)을 각 피크의 면적과 대사물질의 프로톤 개수를 계산하였다. 결과적으로 정상 군에서의 mice 뇌의 신경화학 대사물질들을 Acet, NAA, NAAG, Cho, mlins가 부위별로 절대농도차의 유의성을 나타내었으며, 이 외의 대사물질에서는 유의성이 없는 것으로 나타났다. 본 연구 결과를 토대로 ¹H HR-MAS을 이용한 생체조직 실험은 뇌조직 내 대사물질의 절대농도를 측정하고 기본적인 지표를 확보하는데 매우 정확하고 정량적인 방법이 될 수 있을 것으로 사료되며, 더 나아가 mice를 이용한 인간질병 모델의 실험동물에서의 뇌 신경화학 대사물질의 표준 자료화 하는데 도움이 될 수 있을 것으로 판단된다.

중심단어: ¹H HR-MAS, 핵자기공명분광법, 뇌 대사물질, 정상 mice, Neurochemical profile

서 론

자기공명분광학에서의 생체조직 양성자 고분해능 magic angle spinning 기술은 1997년 처음으로 소개되었으며, 이 기술은 조직의 표본을 온전히 보존한 상태에서 세포 대사물질의 생리학적, 병리학적 변화를 스펙트럼의 형태로 관찰 할 수 있는 유용한 기술 중 하나이다.¹⁾ 또한 조직 내에서의 서로 다른 생체 대사물질의 neurochemical profile을 측정하는데 있어서 정확도가 높으며, 특히 암환자의 조직 생검(biopsy)을 통하여 고분해능 magic angle spinning을 이용하여 신경화학 대사물질의 biochemical profile을 정량화할 수 있다.²⁻⁴⁾ 따라서 핵자기공명분광법을 이용하여 임상에서의 진단의 도구로도 사용될 수 있으며, 적당한 수술과 치료

계획을 세우는데 장점이 있다.⁵⁾

생체외 핵자기공명분광법을 시행하기 위해서는 뛰어난 SNR 과 spectrum resolution을 필요로 한다. 따라서 낮은 주파수의 생체외 핵자기공명분광법보다 자장의 세기(고주파수)가 높아질수록 여러 화학 구조물들을 더 세부적으로 관찰 할 수 있다는 장점이 있다. 최근에는 초고자장을 개발하는 추세이다.⁶⁾

질병의 발병기전과 부위에 따른 생리학적 미세한 조기변화를 진단하는 연구는 매우 중요하다.^{7,8)} 또한 이러한 변화를 비교하기 위해서는 정상군의 그룹 간 동일부위에서의 차이를 규명해야 한다. 이처럼 뇌는 질병과 노화, 손상 등으로 인해서 여러 가지 생리학적, 병리학적 변화가 동반된다. 따라서 실험동물을 통해서 정상 군 뇌의 생물학적인 특징에 대한 실험 데이터를 확보해야 하며,⁹⁾ 이를 기반으로 질병 모델 군에서 뇌의 특정 변화를 관찰, 비교할 수 있어야 한다.⁹⁾ 파킨슨 병(Parkinson's disease), 알츠하이머 성 치매(Alzheimer's dementia), 정신분열증(schizophrenia), 우울증(depression), 알코올 중독(alcoholism) 등 여러 가지 뇌 질환

이 논문은 2009년 12월 14일 접수하여 2010년 2월 24일 채택되었음.
 책임저자 : 최보영, (137-701) 서울시 서초구 반포동 505
 가톨릭대학교 의과대학 의공학교실
 Tel: 02)2258-7233, Fax: 02)2258-7760
 E-mail: bychoe@catholic.ac.kr

에 의해서 뇌 신경화학 대사물질의 변화를 가져오게 되는 데¹⁰⁾ 이러한 연구는 정상 실험 동물군의 자료를 바탕으로 비교, 관찰할 수 있어야 한다.¹¹⁻¹³⁾

본 연구의 목적은 생체조직 양성자 고분해능 magic angle spinning 기술을 이용하여 정상군 adult mice 뇌 신경화학 대사물질의 정량분석 및 부위에 따른 절대농도 차이를 규명하고자한다. 연구방법은 여러 질병의 mice 동물 모델의 표준 자료화를 위해서 진행하였으며, 여러 부위를 통해서 각 부위에 따른 뇌 신경화학 대사물질의 절대농도를 정량 분석하였다.

대상 및 방법

모든 동물실험은 가톨릭대학교 실험동물사용관리위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee at the College of medicine, the Catholic University of Korea (IACUC No.: CUMC-2009-0004))의 승인을 받아 진행되었으며, 국제규격의 실험동물사용과 주의지침서를(Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No.80-23 issued by ILAR, USA.) 토대로 진행 하였다.

1. 실험동물(Animal)

Adult 정상 mice의 뇌 대사물질을 정량분석하기 위해 실험에 사용된 mice는 C57BL/6J 모델의 체중 25~28 g (The Jackson Laboratory; Bar Harbor, Maine, USA) 40주령 수컷 10마리를 사용하였으며, 연령과 성별을 일치시켰다. 또한 mice는 실온(20.5±2°C)이 일정하게 유지된 방에서 일주일동안 환경에 적응하도록 사료와 음수를 자유급식 시켰으며, 실내조명은 12/12 시간 주기로 on/off를 반복 하였다.

2. 조직 채취(Tissue collection)

실험에 사용된 mice의 뇌에서의 전두엽 피질(frontal cortex), 측두엽 피질(temporal cortex), 해마(hippocampus), 시상(thalamus) 총 4개의 부위를 brain matrix를(Mice Brain Slicer Matrix, 1.0 mm coronal slice intervals; Zivic Instruments inc., Pittsburgh, PA, U.S.) 이용하여 잘라내어 액체 질소에(-147.21°C) 바로 급속 냉각시켰다. 잘라낸 조직은 20 µl 부피를 가지는 지르코늄(zirconium) micro-tube에(Varian Inc., PaloAlto, CA, USA) 주입하였으며, 사용된 기준물질은 0.75 wt%의 TSP를 포함하는 D₂O (1.0 ml) ample을 사용하여 정량 분석하였다. 뇌 조직과 D₂O+TSP의 조직 혼합 용액 무게는 8~14 mg과 7~13 mg이었다.

3. 생체조직 양성자 고 분해능 magic angle spinning (ex vivo ¹HHR-MAS)

Varian 500 MHz 핵자기공명 분광장비(Varian Inc., PaloAlto, CA, USA)를 사용하여 총 40개의 뇌 조직에 대해 양성자 고분해능 magic angle spinning 실험을 진행하였다. 이 때 사용된 펄스열은 Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) 스핀에코 펄스열이고 실험에 사용한 변수들은 다음과 같다: 12000 complex points, 스펙트럼 폭(spectrum width)=8 kHz, 이완지연시간(relaxation delay)=4.0 s, 사전포화지연시간(pre saturation delay)=1.5 s (반복시간=5.5 s), 펄스간지연(inter pulse delay)=1.0 ms (에코시간=2.0 ms), 반복획득수(number of acquisition)=128, 스펙트럼 획득시간(scan time)=17 min 20 s.

4. 스펙트럼 분석(Spectra analysis)

스펙트럼 분석은 MestReNova-TM (Mestrelab Research, Santiagode Compostela, Spain)을 이용하여 분석하였으며, 각각의 스펙트럼의 자유유도 쇠퇴신호(free induction decay; FID)를 3-Hz Gaussian filter를 이용하여 apodization 하였으며, 64000 complex point, 푸리에 변환을 하였다. 또한 스펙트럼의 수동 위상 보정(manual phase correction)을 시행하였으며, TSP의 화학이동(chemical shift)을 0.00 ppm으로 지정, baseline을 보정 하였다.

5. 정량 분석(Absolute quantification)

각 뇌 대사물질의 정량분석은 피크의 면적을 엑셀 스프레드시트를 이용하여 물 농도를 계산하였으며, 식 (1)을 이용하여 각각의 뇌 대사물질을 정량분석 하였다.

$$C_m (\text{mol/Kg}) = \frac{\text{Mass of solvent (D}_2\text{O + TSP)} \times 0.75\% (\text{mg})}{\text{Molecular weight of TSP (172.23 g/mol)}} \times \frac{\text{Area of metabolite}}{\text{Area of TSP}} \times \frac{9 (\text{number of TSP proton})}{n (\text{number of metabolite proton})} \times \frac{1000 (\text{g/Kg})}{\text{tissue mass (mg)}} \quad (1)$$

각 뇌 대사물질의 수소원자 개수와 화학이동(chemical shift)은 다음과 같다: N-acetyl aspartate (NAA; 2.02 ppm; n=3), aspartate (Asp; 2.80, 2.65 ppm; n=2), total creatine (creatine + phosphocreatine, tCr; 3.04 ppm, 3.94 ppm; n=6), total choline (choline + phosphocholine + glycerophosphocholine, tCho; 3.19~3.23 ppm; n=9), glutamine (Gln; 2.14, 2.44, 3.76 ppm; n=4), glutamate (Glu; 2.05, 2.35, 3.74 ppm; n=4), γ-aminobutyric acid (GABA; 1.89, 3.01 ppm; n=4), myo-inositol (mIns; 3.52, 4.05, 3.61, 3.27 ppm; n=6), alanine (Ala; 1.47

ppm; n=3), and taurine (tau; 3.24, 3.42 ppm; n=4), acetate (Acet; 1.91 ppm; n=3).

또한 정량분석 그래프에서는 각 뇌 대사물질의 절대농도는 부위별 10마리의 절대농도를 계산하여 평균한 값을 그래프로 나타내었으며, 절대농도(C; mol/kg)와, 표준편차(standard deviation; SD)로 나타내었다.

6. 통계 분석(Statistical analysis)

통계분석을 위해서 SPSS (Windows Version 13.0; SPSS, Chicago, IL USA)을 사용하였으며, 뇌 각 부위에 따른 대사물질의 농도차의 유의성을 알아보기 위하여 One-Way ANOVA와 사후검정법(post hoc test)으로는 Bonferroni correction을 사용하였다(p<0.05, p<0.005, p<0.001). 각 부위

별 뇌 대사물질의 절대농도(C)와, 표준편차를(standard deviation; SD)를 함께 계산하였다.

결 과

본 연구에서는 생체조직 양성자 고분해능 magic angle spinning을 통해서 Fig. 1과 같이 뇌의 4가지 부위에 대해 Cho과 GPC+PC, Lac, tau의 식별이 가능한 고분해능 스펙트럼을 획득하였다. Table 1에 뇌 부위별 신경화학적 대사물질의 절대농도의 값과 표준편차의 값을 나타내었으며, 통계분석을 통하여 뇌 부위간 절대농도차의 유의성이 확인된 대사물질을 α 로 표기 하였다. 또한 절대농도값의 유의한 차이를 보이는 뇌 대사물질의 부위별 유의성정도는

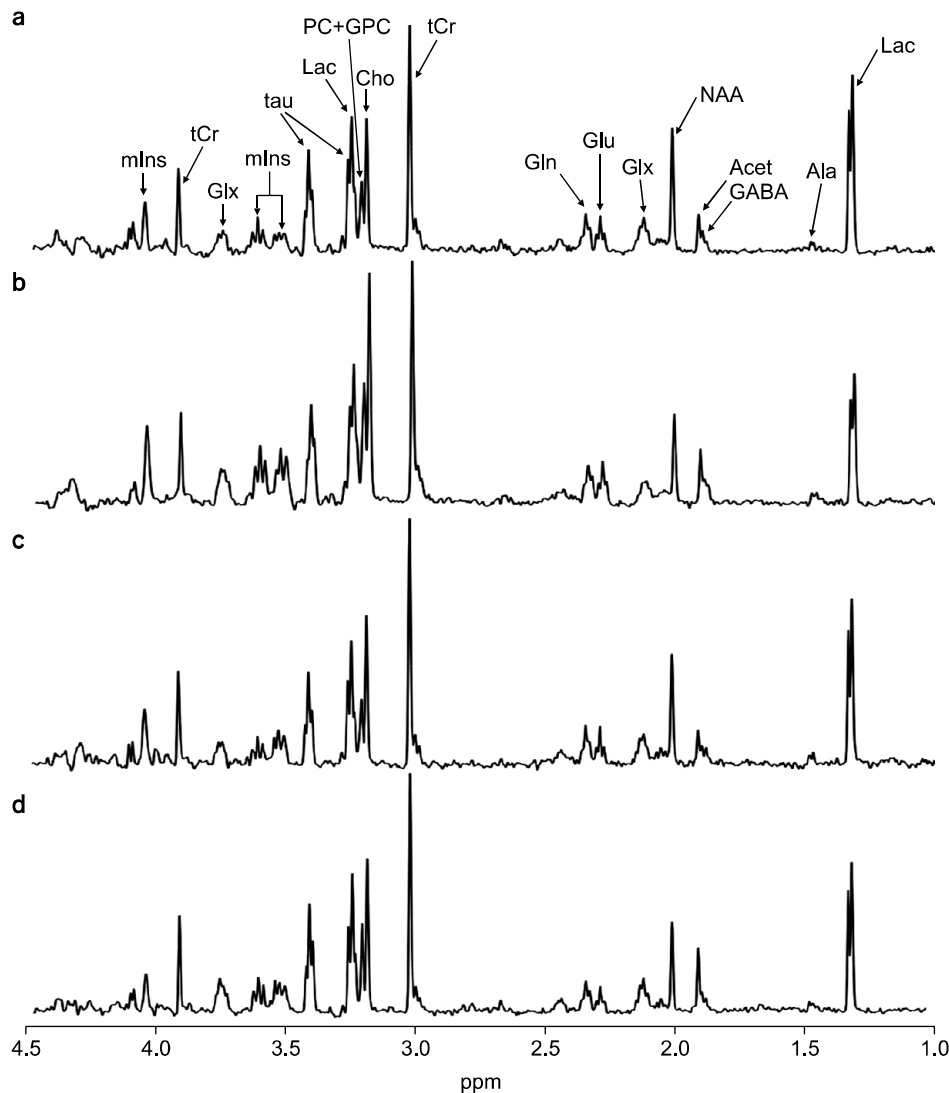


Fig. 1. Four regions were performed using ^1H HR-MAS NMRs. This Fig illustrated (a) frontal cortex, (b) hippocampus, (c) temporal cortex, (d) thalamus region of 1D NMR spectra; Lac, Ala, GABA, Acet, NAA, Glx, Glu, Gln, tCr, Cho, PC+GPC, tau, mIns.

Table 1. A total of 15 neurochemical brain metabolites were significantly differed among the four regions of adult mice (Concentrations: mol/kg).

Metabolites	Frontal cortex	Hippo-campus	Temporal cortex	Thalamus
	mean (SD)	mean (SD)	mean (SD)	mean (SD)
Lac	9.73 (2.34)	8.98 (2.89)	9.70 (1.55)	8.52 (1.07)
Ala	0.51 (0.18)	0.59 (0.25)	0.60 (0.26)	0.45 (0.20)
GABA	1.95 (0.60)	2.38 (0.53)	2.10 (0.38)	2.49 (0.92)
Acet*	1.80 (0.72)	2.92 (0.98)	1.40 (0.45)	2.56 (0.72)
NAA*	5.56 (1.25)	3.86 (1.06)	5.06 (0.75)	3.70 (0.70)
NAAG*	1.10 (0.34)	0.89 (0.38)	1.27 (0.29)	0.83 (0.22)
Glu	5.70 (0.94)	5.20 (1.45)	5.47 (1.06)	4.50 (0.75)
Gln	3.29 (0.70)	3.17 (0.48)	3.69 (0.51)	3.56 (0.63)
Asp	0.87 (0.53)	0.81 (0.39)	0.33 (0.23)	0.66 (0.50)
tCr	8.51 (1.08)	8.85 (0.74)	8.67 (0.71)	8.37 (0.80)
Cho*	1.94 (0.51)	2.35 (0.58)	1.84 (0.28)	2.53 (0.58)
GPC+PC	1.13 (0.26)	1.54 (0.44)	1.31 (0.21)	1.87 (0.41)
tCho	3.08 (0.74)	3.89 (0.95)	3.15 (0.34)	4.40 (0.93)
mIns*	6.22 (2.12)	9.25 (2.37)	7.18 (1.72)	9.11 (2.04)
tau	13.28 (2.33)	11.38 (2.92)	13.62 (1.77)	13.08 (3.11)

*p<0.05 for among the four regions One-way ANOVA tests, followed post-hoc tests by the Bonferroni correction.

Fig. 2에 나타내었다. 과적으로 mice 뇌의 4개의 부위의 스펙트럼에 따른 뇌대사물질의 절대농도 크기의 양상은 전두엽 피질, 해마, 측두엽 피질, 시상 총 4개의 부위에서 각각 다르게 나타났으며, 통계처리를 통해서 5가지의 대사물질에 대해서 절대농도차의 유의성 정도를 평가하였다.

Fig. 2는 뇌 부위에 따른 신경화학 대사물질 중에서 Acet, NAA, NAAG, Cho, mIns의 절대농도차이에 따른 유의성을 나타낸 그래프이다. Acet는 전두엽 피질($C_{\text{fro-Acet}}=1.80\pm0.72$)과 해마($C_{\text{hip-Acet}}=2.92\pm0.98$)에서의 절대농도차이는 $p<0.05$ 로 유의성을 나타냈으며, 해마와 측두엽 피질($C_{\text{tem-Acet}}=1.40\pm0.45$) 사이에서의 Acet의 절대농도 차이는 $p<0.001$ 로 가장 높은 절대농도차의 유의성을 보였다. 또한 측두엽 피질과 시상($C_{\text{tem-Acet}}=2.56\pm0.72$)의 Acet 절대농도 차이가 $p<0.05$ 의 유의성을 나타내었다. NAA의 절대농도는 전두엽 피질($C_{\text{fro-NAA}}=5.56\pm1.25$)과 해마($C_{\text{hip-NAA}}=3.86\pm1.06$)의 절대농도차의 유의성이 $p<0.005$ 였으며, 전두엽 피질과 시상($C_{\text{thal-NAA}}=3.70\pm0.70$)의 절대농도 또한 $p<0.005$ 로 나타났다. 측두엽 피질($C_{\text{tem-NAA}}=5.06\pm0.75$)과 시상의 절대농도는 $p<0.05$ 의 유의성을 보였다. 반면 NAAG의 절대농도는 측두엽 피질($C_{\text{tem-NAAG}}=1.27\pm0.29$)과 시상($C_{\text{thal-NAAG}}=0.83\pm0.22$)에서만 절대농도차의 유의성을 나타냈으며, 유의성 정도는 $p<0.05$ 로 나타났다.

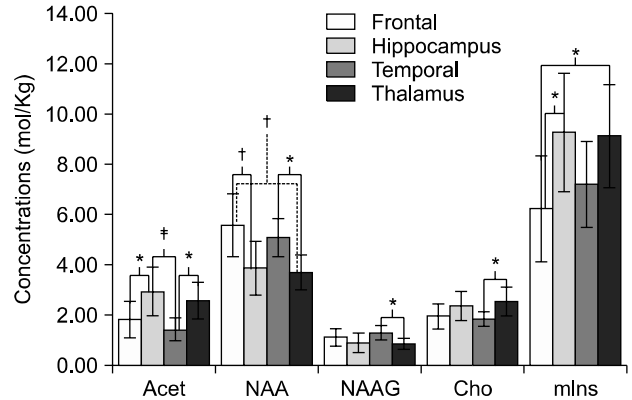


Fig. 2. This Fig shows that the four brain regions of normal adult mice brain were significantly differed Acet, NAA, NAAG, Cho and mIns (*p<0.05, †p<0.005, ‡p<0.001).

Cho의 절대농도는 측두엽 피질($C_{\text{tem-Cho}}=1.84\pm0.28$)과 시상($C_{\text{thal-Cho}}=2.53\pm0.58$)에서 유의성이 $p<0.05$ 로 나타났다. mIns의 절대농도는 전두엽 피질($C_{\text{fro-mIns}}=6.22\pm2.12$)과 시상($C_{\text{thal-mIns}}=9.11$, $SD=2.04$)에서 $p<0.05$, 전두엽 피질과 해마($C_{\text{fro-mIns}}=9.25\pm2.37$)의 절대농도 유의성은 $p<0.05$ 로 나타났다.

고 찰

본 연구는 adult의 mice에서 관찰되는 신경화학 대사물질의 정량화를 목적으로 진행하였으며, 이를 바탕으로 여러 동물실험의 비교 관찰 대상군 자료의 데이터 베이스 기반을 마련하는데 목표를 두고 있다. 따라서 이 실험은 정상군 adult mice에서의 뇌의 부위별 대사물질의 차이를 규명하였다.

현재 인간의 뇌 질환을 유전자 변형을 통한 mouse 모델이 개발되어 연구가 진행되고 있으며, 이를 통해 최근까지 실험동물을 이용한 양성자 핵자기공명분광법을 이용한 생체 신경화학 대사물질의 변화를 분석하는 연구가 많이 진행되고 있다.¹⁴⁻¹⁷ 최근에 연구된 알츠하이머성 치매의(Alzheimer's dementia) mice의 경우에는 연령이 증가할수록 즉, 노화가 진행 될수록 시상(hippocampus)과 피질(cortex) 부위에서 tCr의 절대농도와 비교했을 때 mIns의 농도가 증가하며, NAA, Gln의 절대농도는 감소하는 결과를 보였다.¹⁸ 또한 정신분열증(schizophrenia) 모델의 mice에서는 뇌량(corpus callosum)과 후부시상(posterior thalamus)에서의 Cho/NAA의 비율이 정상군에 비해서 감소하는 양상을 보였으며, 이는 일찍 태어났을 때부터 스트레스를 받은 동물모델에서 매우 비슷

한 대사물질 변화의 결과 양상을 나타냈다고 보고된바 있다.¹⁹⁾ 그 외 우울증 mice 모델의 경우에는 대뇌 배외측 전두엽 피질(dorsolateral prefrontal cortex; DLPFC)에서 정상군에 비해서 Cho/Cr와 Cho/NAA의 비율이 유의성 있게 증가하였으며,²⁰⁾ 파킨슨 질환(Parkinson's disease)의 mice 동물 모델에서는 측두엽과 렌즈 핵(lentiform nucleus)에서의 NAA의 절대농도가 감소하고, mIns이 증가한 결과가 실험을 통해 보고되었다.²¹⁾ 이처럼 질병에 따라서 뇌 대사물질의 변화의 양상이 다르고, 부위마다도 절대농도차의 유의성이 다르게 나타난다.

본 연구에서는 인간의 질병을 모델링한 실험동물들의 뇌 대사물질 비교를 위해 adult 정상군 mice를 이용하여 실험을 진행한 결과 전두엽, 해마, 측두엽, 시상에서 Acet, NAA, NAAG, Cho, mIns의 대사물질의 절대농도의 차이가 유의성을 보였다. Lac, Ala, GABA, Cr, tCr, GPC+PC, Asp, Ala, Glu, Gln, tCho 대사물질의 절대농도의 차이는 부위별 유의성이 나타나지 않았다.

NAA의 절대농도는 전두엽($C_{\text{fro-NAA}}=5.56$)과 측두엽에서($C_{\text{tem-NAA}}=5.06$) 가장 높게 나타났다. 뇌신경 전달물질(neurotransmitter) NAA는 대부분 신경단위(neuron)와 가지돌기(dendritic), 축삭돌기(axonal processes)에 가장 많이 존재한다고 알려져 있으며,²²⁾ 이는 측두엽과 전두엽에서 다른 부위보다 신경섬유를 더 많이 포함한다고 볼 수 있다. 따라서 NAA의 신호 강도가 감소하는 경우는 신경단위의 소실 혹은 변성을 의미한다고 할 수 있다. Cho의 경우에는 절대농도가 시상에서($C_{\text{thal-Cho}}=2.53$) 가장 높은 농도를 나타냈다. Cho의 신호강도는 세포막합성(membrane synthesis)시에 가장 높게 증가하는 양상을 나타낸다.²²⁾ 따라서 시상에서 세포막합성과 acetyl CoA에 의해서 생성되는 화학적 신경전달 물질인 아세틸콜린(acetylcholine)의 생성적인 변화가²³⁾ 가장 활발하게 일어날 것이라고 추측해 볼 수 있다. mIns의 절대농도는 해마부위와($C_{\text{hip-mIns}}=9.25$) 시상부위에서($C_{\text{thal-mIns}}=9.11$) 가장 높게 나타나는 양상을 보였으며, 최근 진행된 연구에 의하면, 주로 퇴행성 뇌 질환의 질병에서 상대적으로 NAA와 Cr의 절대농도에 비해서 높게 나타난다고 알려져 있다.²¹⁾ 이러한 결과는 알츠하이머성 치매에서도 같은 양상을 보인다고 최근에 보고된바 있다.^{18,24)} Acet는 single methyl group으로서 작은 분자에 속하며, 대부분의 신경 단위에는 존재하지 않고 오로지 교세포(glia)에만 존재한다.²⁵⁻²⁷⁾ 또한 Acet의 특성은 생체 내 정상 뇌 조직의 스펙트럼에서는 관찰되지 않는 특징이 있다.²⁸⁾ NAAG의 절대농도는 측두엽($C_{\text{tem-NAAG}}=1.27$) 피질에서 가장 높게 나타났으며,

측두엽과 시상($C_{\text{thal-NAAG}}=0.83$)사이에서 유일하게 절대농도차이의 유의성을 확인 하였다. 시상의 NAAG 절대농도는 측두엽에 비해서 65.3% 수준의 농도 값이다. 본래 NAAG는 신경화학적으로 뇌에서 Glu의 근원이 되는 것뿐만 아니라 흥분성 신경전달(excitatory neurotransmission)에 관여하는 역할을 한다.²⁵⁾ 따라서 결과적으로 다른 부위들 보다 전두엽 피질에서 흥분성 신경전달 물질인 NAAG의 활성도가 가장 높다고 판단해 볼 수 있다.

본 연구에서는 40주령의 adult 정상군의 mice를 대상으로 실험을 진행 하였지만, 이는 adult 정상군의 mice에서만 해당되는 연구이기 때문에 계통, 성별, 연령별 등의 다양한 종류의 실험들이 이루어져야 한다. 또한 더 나아가 더 많은 뇌의 부위별 조직 채취 하여 실험을 진행하여 좀 더 자세한 부위별 신경화학 대사물질의 차이를 규명하여야 하며, 본 연구에서 사용된 500 MHz NMR 장비보다 높은 자장의 세기에서 실험을 진행하여 더 세분화되고, 정확도 높은 분석을 목표로 삼고 있다.

결 론

본 연구는 정상군의 adult mice의 뇌 신경화학적 대사물질의 정량분석 및 부위에 따른 대사물질의 절대농도차이를 규명하고자 하였다. 그 결과 Acet, NAA, NAAG, Cho, mIns의 대사물질에서 각 부위별 절대농도차의 유의성을 보이는 결과를 얻었으며, 본 연구는 40주 이상 사육된 adult mice를 이용하여 실험을 진행하였기 때문에 알츠하이머성 치매, 파킨슨씨병과 같은 노인성 퇴행 뇌 질환의 데이터로 사용될 수 있을 것으로 기대된다. 더 나아가 정상군의 adult mice 뿐만 아니라, 연령별과, 성별, 계통별로 정상군의 실험을 진행하여 더 세부적인 정상군의 뇌 대사물질 정량화를 위한 데이터베이스를 마련할 수 있을 것 이라고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 a grant from the Seoul R&BD Program (10550), the Korea Health 21 R&D Project, Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (A081057), a grant (R01-2007-000-20782-0) from the Purpose Basic Research Grant of the KOSEF, the Korea Research Foundation Grant funded by the Korean Government (KRF-2008-313-D01324), the program of Basic Atomic Energy Research Institute (BAERI) which is a part of the Nuclear R&D Programs funded by the Ministry of

Education의 연구비 수혜로 수행되었습니다.

저자들은 본 연구를 도와주신 Varian Technologies Korea, Ltd.의 신해청 선생님, 남윤기 선생님, 한준성 선생님에게 깊이 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Cheng LL, Anthony DC, Comite AR, et al: Quantification of microheterogeneity in glioblastoma multiforme with ex vivo high resolution magic-angle spinning (HRMAS) proton magnetic resonance spectroscopy. *Neuro Oncology* 2:87-95 (2000)
2. Beatriz MG, Daniel MM, Carmen MB, et al: Metabolite identification in human liver needle biopsies by high-resolution magic angle spinning ^1H NMR spectroscopy. *NMR Biomed* 19:90-100 (2006)
3. Cheng LL, Ma MJ, Becerra L, et al: Quantitative neuropathology by high resolution magic angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 94:6408-6413 (1997)
4. Martinez-Bisbal MC, Marti-Bonmati L, Piquer J, et al: ^1H and ^{13}C HR-MAS spectroscopy of intact biopsy samples ex-vivo and in-vivo ^1H MRS study of human high grade gliomas. *NMR Biomed* 17:191-205 (2004)
5. Opstad KS, Bell BA, Griffiths JR, Howe FA: An assessment of the effects of sample ischaemia and spinning time on the metabolic profile of brain tumour biopsy specimens as determined by high-resolution magic angle spinning ^1H NMR. *NMR Biomed* 21:1138-1147 (2008)
6. Mlynarik V, Cudalbu C, Xin L: ^1H NMR spectroscopy of rat brain in vivo at 14.1 Tesla Improvements in quantification of the neurochemical profile. *Journal of Magnetic Resonance* 194:163-168 (2008)
7. Sackeim HA: The anticonvulsant hypothesis of the mechanisms of action of ECT. *The Journal of ECT* 15:5-26 (1999)
8. Nobler MS, Oquendo MA, Kegeles LS, et al: Decreased regional brain metabolism after ECT. *The American Journal of Psychiatry* 158:305-308 (2001)
9. Tkac I, Dubinsky JM, Keene CD, et al: Neurochemical changes in Huntington R6/2 mouse striatum detected by in vivo ^1H NMR spectroscopy. *Journal of Neurochemistry* 100:1397-1406 (2007)
10. Bonavita S, Salle F, Tedeschi G. Proton MRS in neurological disorders. *European Journal of Radiology* 30:125-131 (1999)
11. Michaelis T, Boretius S, Frahm J: Localized proton MRS of animal brain in vivo: Models of human disorders. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 55:1-34 (2009)
12. Kantarci K, Jack CR, Xu YC, et al: Regional metabolic patterns in mild cognitive impairment and Alzheimer' disease: A ^1H MRS study. *Neurology* 55:210-217 (2000)
13. Wang GJ, Volkow ND, Franceschi D, et al: Regional brain metabolism during alcohol intoxication. *alcoholism. Clinical and Experimental Research* 6:822-829 (2000)
14. Bates GP, Mangiarini L, Mahal A, et al: Transgenic models of Huntington's disease. *Human Molecular Genetics* 6:1633-1637 (1997)
15. Price DL, Sisodia SS, Borchelt DR: Genetic neurodegenerative diseases: the human illness and transgenic models. *Science* 282:1079-1083 (1998)
16. Jankowsky JL, Savonenko A, Schilling G, et al: Transgenic mouse models of neurodegenerative disease: opportunities for therapeutic development. *Current Neurology and Neuroscience Reports* 2:457-464 (2002)
17. Aguzzi A, Klein MA, Montrasio F: Prions: pathogenesis and reverse genetics. *The New York Academy of Sciences* 920:140-157 (2000)
18. Marjanska M, Curran GL, Thomas MW, et al: Monitoring disease progression in transgenic mouse models of Alzheimer's disease with proton magnetic resonance spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102:11906-11910 (2005)
19. Torres G, Hallas BH, Gross KW, et al: Magnetic resonance imaging and spectroscopy in a mouse model of schizophrenia. *Brain Research Bulletin* 75:556-561 (2008)
20. Hong ST, Choi CB, Park CS, et al: Variation of the choline signal intensity in the dorsolateral prefrontal cortex of rats exposed to the forced swimming test as detected by in vivo ^1H MR spectroscopy. *Journal of Neuroscience Methods* 165:89-94 (2007)
21. Firbank MJ, Harrison RM, O'Brien JT: A comprehensive review of proton magnetic resonance spectroscopy studies in dementia and parkinson's disease. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* 14:64-76 (2002)
22. Salo R, Nordahl TE, Natsuaki Y, et al: Attentional control and brain metabolite levels in methamphetamine abusers. *Biological Psychiatry* 61:1272-1280 (2007)
23. Dobrzyn A, Dobrzyn P, Miyazaki M, et al: Stearoyl-CoA desaturase 1 deficiency increases CTP: choline cytidyltransferase translocation into the membrane and enhances phosphatidylcholine synthesis in liver. *The Journal of Biological Chemistry* 280:23356-23362 (2005)
24. Oberg J, Spenger C, Wang FH, et al: Age related changes in brain metabolites observed by ^1H MRS in APP/PS1 mice. *Neurobiology of Aging* 29:1423-1433 (2008)
25. Deelchand DK, Shestov AA, Koski DM, et al: Acetate transport and utilization in the rat brain. *Journal Neurochemistry* 109:46-54 (2009)
26. Nicklas WJ, Clarke DD: Decarboxylation studies of glutamate, glutamine, and aspartate from brain labelled with $[1-^{14}\text{C}]$ acetate, $L-[U-^{14}\text{C}]$ -aspartate, and $L-[U-^{14}\text{C}]$ glutamate. *Journal Neurochemistry* 16:549-558 (1969)
27. Badar-Goffer RS, Bachelard HS, Morris PG: Cerebral metabolism of acetate and glucose studied by ^{13}C -NMR spectroscopy. A technique for investigating metabolic compartmentation in the brain. *Biochemical Journal* 266:133-139 (1990)
28. Robin A: de Graaf: *In vivo* NMR Spectroscopy - Principles and Techniques. 2nd ed. John Wiley & Sons, Chichester, West Sussex county (2007), pp. 43-78

Neurochemical Profile Quantification of Regional Adult Mice Brain Using: *ex vivo* ^1H High-Resolution Magic Angle Spinning NMR Spectroscopy

Do-Wan Lee*, Dong-Cheol Woo*, Sung-Ho Lee[†], Sang-Young Kim*, Goo-Young Kim[‡],
Hyang-Shuk Rhim[‡], Chi-Bong Choi[§], Hwi-Yool Kim[†], Chang-Wook Lee^{||}, Bo-Young Choe*

*Department of Biomedical Engineering, Research Institute of Biomedical Engineering, College of Medicine, The Catholic University of Korea, [†]Department of Veterinary Surgery, Konkuk University, [‡]Department of Molecular Biology, College of Medicine, The Catholic University of Korea, [§]Department of Radiology, Kyung-Hee University, ^{||}Department of Psychiatry, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

The purpose of this study is to quantitate regional neurochemical profile of regional normal adult mice brain and assess regional metabolic differences by using *ex vivo* ^1H high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance spectroscopy (^1H HR-MAS NMRS). The animals were matched in sex and age. The collected brain tissue included frontal cortex, temporal cortex, thalamus, and hippocampus. Quantitative 1D spectra were acquired on 40 samples with the CPMG pulse sequence (8 kHz spectral window, TR/TE = 5500/2.2 ms, NEX = 128, scan time: 17 min 20 sec). The mass of brain tissue and D_2O +TSP solvent were 8~14 mg and 7~13 mg. A total of 16 metabolites were quantified as follow: Acet, NAA, NAAG, tCr, Cr, tCho, Cho, GPC + PC, mIns, Lac, GABA, Glu, Gln, Tau and Ala. As a results, Acet, Cho, NAA, NAAG and mIns were showed significantly different aspects on frontal cortex, hippocampus, temporal cortex and thalamus respectively. The present study demonstrated that absolute metabolite concentrations were significantly different among four brain regions of adult mice. Our finding might be helpful to investigate brain metabolism of neuro-disease in animal model.

Key Words: ^1H HR-MAS, NMRS, Metabolites, Normal mice, Neurochemical profile