

공포반응실험을 통한 [F-18]FDG 소동물 양전자단층촬영 기능뇌영상 평가

장동표

가천의과학대학교

The evaluation of [F-18]FDG small animal PET as a functional neuroimaging technique with fear response experiment

Dong-Pyo Jang

Neuroscience Research Institute, Gachon University of Medicine and Science

(Received January 10, 2011. Accepted February 2, 2011)

Abstract: Although recent studies have shown the usability of [F-18]FDG small animal Positron Emission Tomography (PET) as a functional neuroimaging technique in behavioural small animal study, researches showing the detection power of functional changes in the brain are still limited. Thus, in the study, we performed [F-18]FDG small animal PET neuroimaging in the well-established fear behavioural experiment. Twelve rats were exposed on cat for 30 minutes after the [F-18]FDG injection. As a result, the brain activity in bilateral amygdala areas significantly increased in the fear condition. In addition, the fear condition evoked the functional activities of hypothalamus, which seemed to be related to the response to stress. These clear localization of fear related brain regions may reflect that a functional neuroimaging technique using [F-18]FDG small animal PET has functional detectibility enough to be applied in small animal behavioral research.

Key words: fear response, small animal PET, [F-18]FDG, functional neuroimaging

1. 서 론

어떤 환경에서의 행동이나 반응이 뇌활동과의 연계 연구는 뇌를 이해하는데 필수적이다. 따라서 뇌의 전 영역에 걸쳐 뇌활동을 측정할 수 있는 뇌기능 영상기술(Functional neuroimaging)은 인지 및 행동학적 연구(Behavioral research)에서 역할이 점차 확대되고 있다[1]. 특히 뇌기능 자기공명영상(functional Magnetic Resonance Imaging)은 뇌기능을 측정하기 위해 가장 널리 사용되고 있는 기술이다[2,3]. 하지만 뇌기능자기공명영상 연구는 좁은 MRI 기기 안에서 뇌영상촬영이 진행되어야 하기 때문에, 인지나 행동 연구에 마취의 영향 없이도 실험을 진행할 수 있는 영장류나

사람을 대상으로 주로 진행될 수 밖에 없는 한계가 있었다. 이 때문에 다양한 소동물 모델 및 행동실험들에 대한 뇌기능 영상의 적용이 제한되었을 뿐만 아니라 다양한 프로토콜이 필요한 실험에 적용하기에도 어려움이 있었다[4]. 최근 이러한 단점을 보완하기 위해 [F-18]FDG 소동물 PET (양전자 단층촬영)을 이용한 행동학적 뇌영상 연구가 제안되었다[5,6]. 이는 [F-18]FDG가 에너지 대사가 높은 세포에 흡수(uptake)되어 포도당 대사가 진행되다가 더 이상 대사가 진행되지 못하고 세포내에 축적되는 성질을 이용하는 것이다. 행동실험 바로 전에 [F-18]FDG가 주입되고, 주입된 [F-18]FDG는 행동실험과 관련된 뇌 영역에 흡수되어 축적되어 진다. 이렇게 축적된 [F-18]FDG를 행동실험 후에 PET을 이용하여 촬영하게 되는 것이다. 이는 백서(rat)에서 [F-18]FDG 주입 후 마취 없이 행동실험을 한 후에 축적된 [F-18]FDG를 영상화할 수 있기 때문에 다양한 동물모델에서 인지, 행동학적 연구에도 활용할 수 있는 가능성을 보여 주었다. 하지만, 이러

Corresponding Author : 장동표
2804 2nd ST SW, Rochester, MN 55902, USA
TEL: / FAX: 1-507-202-1871
E-mail: dongpjang@gmail.com

한 가능성에도 불구하고 [F-18]FDG 소동물 PET을 이용한 뇌기능영상 기술이 어느 정도의 뇌활동 변화 검출 능력을 가지고 있으며, 어느 정도의 국소활동변화까지 측정 가능한지에 연구는 전무한 상황이다. 특히나 현재 소동물 PET의 해상도가 보통 1 mm 이상으로 백서의 뇌 크기에 비해 상대적으로 해상도가 상당히 떨어지는 것을 감안하면, [F-18]FDG 소동물 PET을 이용한 뇌기능영상촬영에 대한 실제적인 뇌활동 변화검출 능력 평가는 향후 이 영상기술의 적용 및 활용에 중요하다[7]. 본 논문에서는 [F-18]FDG 소동물 PET 뇌기능 영상이 어느 정도의 뇌활동 변화검출 능력을 가지고 있는지를 측정하기 위해 고양이에 대한 쥐의 공포 반응 실험을 진행하였다. 이 전형적인 공포 반응 실험은 지금까지 전통적으로 많이 실행되었을 뿐만 아니라[8], 뇌활동과 행동과의 관계가 비교적 많이 알려져 있기 때문에 기존 연구결과와 비교를 통해 [F-18]FDG 소동물 PET을 이용한 뇌기능영상 기술을 평가할 수 있을 것이라 가정하였다.

II. 연구 방법

1. 실험동물

총 24마리의 300-350 g 무게의 Sprague Dawley 백서를 이 실험에 사용했다. 모든 실험진행은 동물연구에 대한 국립보건원지침(National Institutes of Health Guidelines for Animal Research)에 맞추어 진행되었다. 동물은 12시간 주기로 밤/낮(오전 8시 점등)이 구분되며, 50-60% 정도의 습도를 가지 방에서는 자유롭게 음식과 물을 먹을 수 있는 환

경에서 보관되어졌다. 기본적으로 실험시작하기 4일전에는 연구실에 배달되어 백서가 실험환경에 적응되도록 여유시간을 두었다.

2. 실험프로토콜

그림 1(a)처럼 91 cm(가로) × 51 cm(세로) × 61 cm(높이)의 투명한 플라스틱 상자를 두 칸으로 나누어 구성하였다. 한 칸의 가로는 60 cm, 그리고 다른 한 칸은 31 cm로 나누었다. 실험은 오전 9시~12시에 시행하였으며, [F-18]FDG의 축적을 극대화하기 위하여 실험 8 시간 전부터 물만 주고 금식하였다. 백서의 실험 환경적응을 위해서 작은 칸에 백서를 넣고 자극실험 전 30분 정도 적응시간을 가졌다[14]. 그림 1(b)와 같이 환경적응이 끝나면 백서를 꺼내 [F-18]FDG를 정맥주사하고, 작은 방에 다시 넣어 준다. 공포 조건에서는 다른 칸에는 고양이를 넣어 백서가 공포를 느끼게 하였고, 대조군으로는 다른 칸에 같은 종의 백서를 넣어 실험을 진행하였다. 자극실험 중에 비디오 촬영을 통해 백서의 반응 및 실험진행이 문제가 없는지 확인하였다. 자극이 끝나고 난 후 소동물 PET을 이용하여 소리자극 동안 축적된 [F-18]FDG를 영상화하였다. 실험 후에는 다음 실험에 대한 영향을 배제하기 위해 고양이의 분비물이나 백서의 흔적을 없애기 위해 플라스틱을 깨끗이 청소하였다. 총 공포 자극 그룹 12마리, 대조군 12마리에 대하여 데이터를 획득 분석하였다.

3. [F-18] FDG 소동물 PET 영상 프로토콜 및 분석

[F-18]FDG 주입 30분전에는 약 30°C의 온도로 따뜻하게

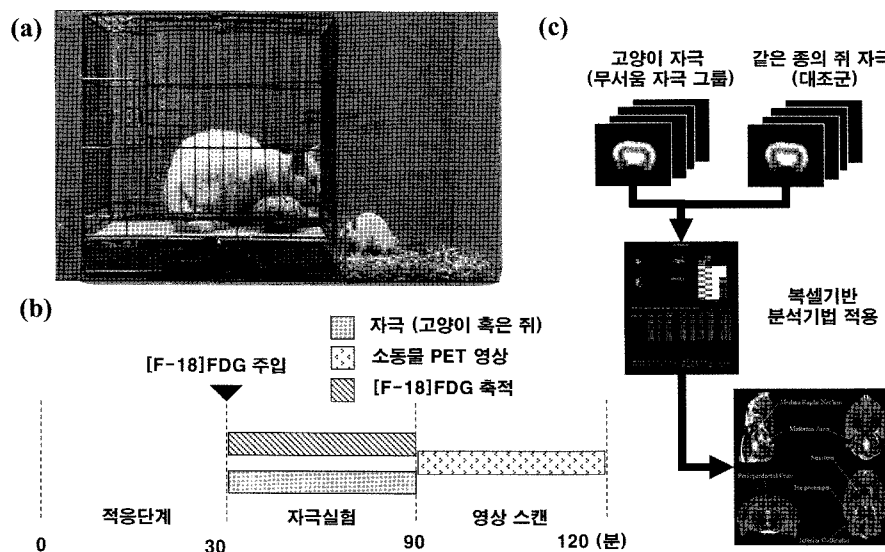


그림 1. 고양이에 대한 쥐의 공포 반응 실험을 위한 프로토콜 및 (a) 공포 반응 실험을 위한 실험 박스. (b) 실험 프로토콜 및 [F-18]FDG 소동물 PET 영상촬영 프로토콜(c) [F-18] FDG 소동물 PET 영상 분석 프로시저. 분석의 정확도를 위해 뇌부분만을 추출하여 정규한 후에 복셀기반 분석기법을 통해 그룹분석

Fig. 1. Experimental system and protocol for fear response (a) Fear stimulation chamber (b) Experimental protocol for micro PET imaging experiment with sound stimulation (c) [F-18] FDG small animal PET analysis procedure based on voxel based analysis

하여 FDG가 몸에 최소한 축적되고, 최대한 뇌에 축적되도록 하였다[14]. 100 g 몸무게당 500uCi [F-18]FDG는 마취 없이 꼬리 정맥을 통해 주입하였고, 자극실험 및 [F-18] FDG 축적이 끝난 후 30분간 소동물 PET 영상촬영을 하였다. 영상은 백서의 머리뼈에 대한 영향을 적다고 가정하고 감쇄보정(attenuation correction)없이 OSEM(ordered subset expectation maximization) 알고리즘을 이용하여 재구성하였다. 그림 2 처럼 얻어진 영상 데이터의 정확한 통계적 분석을 위해 소동물 PET 영상에서 백서의 뇌영상만을 손으로 그려서 추출하였다. 추출된 각 영상은 정확한 해부학적 위치 정보를 가지고 있는 [F-18]FDG PET 백서 뇌 템플릿에 정규화 되어 졌고, 여기서 사용된 템플릿은 정상 백서 30마리 [F-18]FDG 뇌영상을 얻어 평균하여 구성하였다. 정확한 해부학적인 정보를 위해서 뇌정위 좌표에 정규화된 MRI 템플릿과 일치시켜 사용하였다[13]. 또한 통계적인 파워를 높이기 위해 각 영상은 2 mm FWHM(full width at half-maximum)을 가지는 가우시안 커널을 이용하여 스무싱(smoothing) 단계를 거쳤다. 통계적인 분석은 복셀기반의 통계분석(Voxel based statistical analysis) 방법이 사용되었다[9]. 통계적 기준치는 $P < 0.05$ (Familywise 에러보정, $T = 6.0$)를 사용하였고, 결과에 대한 T-값을 PET 템플릿 영상과 함께 보여 주었다.

III. 결 과

그림 2에서 보는 바와 같이 복셀기반 분석을 통해 공포 자극 조건과 대조군을 비교했을 때 시상하부(Hypothalamus) 영역에서 포도당 대사의 가장 큰 유의미한 차이를 보였다(최대 T 값 : 9.59). 또한 좌우 양쪽의 편도체(Amygdala) 에서 공포 자극 일 때 포도당 대사의 뚜렷한 변화도 관찰되었다(좌측 최대 T 값 : 7.57, 우측 최대 T값 : 8.20). 이 이외에도 외측섬유띠(Lateral lemniscus)에서도 공포 자극 시 뇌활성도가 증가함을 보였다. 하지만 뇌 전체적으로 공포 자

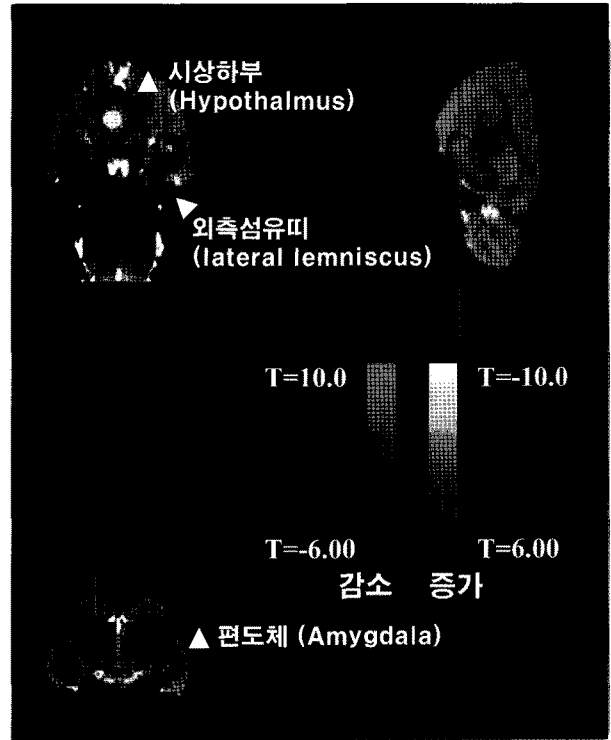


그림 2. 공포 반응에 따른 뇌활성도의 변화. 고양이에 대한 내제된 공포에서 관련하여 대사량 활성화 차이를 보이는 뇌영역들 (편도체-Amygdala, 시상하부-hypothalamus, 외측섬유띠 -lateral lemniscus)

Fig. 2. The glucose metabolism changes to the fear conditioning. Brain regions related to fear conditioning which the glucose metabolism changes clearly were observed in the comparison between fear condition and control condition (Amygdala, Hypothalamus, and Lateral lemniscus)

극시 뇌활성도 유의미하게 감소하는 영역은 없었다(표 1).

IV. 토의 및 결론

본 연구는 처음으로 [F-18]FDG 소동물 PET 뇌영상기술을 이용하여 소동물에서 공포 자극에 따른 뇌활동 변화를 보여 주었다. 일반적으로 백서에게 포식자인 고양이는 내제

표 1. 무서운 자극 조건과 대조군과 비교했을때 유의미하게 포도당 대사량의 활성화도 높이지거나 낮아진 뇌영역들과 각 영역에서 최대 T 값을 가지는 Paxinos 좌표를 표시한 것이다

Table 1. The activated brain region in the comparison analysis between fear condition and control condition. Paxinos coordinates was found as a position with maximum T-value in the activated area vicinity

뇌영역	Paxinos 좌표계			T-value	Z-value	
	X	y	Z			
편도체 (Amygdala)	L	-5.0	-3.4	-8.8	+7.57	2.82
	R	4.0	-3.6	-8.6	+8.20	2.89
증가	시상하부 (Hypothalamus)	-1.0	-1.0	-8.4	+9.59	3.03
외측섬유띠 (Lateral Lemniscus)	L	-1.8	-7.0	-7.6	+6.73	2.55
	R	1.8	-6.8	-7.8	+6.82	2.57

적인(Intrinsic) 공포를 일으키고, 이 공포에 대하여 중추적으로 반응하는 뇌 영역이 편도체라고 널리 알려져 있다[10]. 편도체는 뇌의 여러 영역과 연결되어 있어 공포에 대한 행동 반응 및 기억 등 다방면에 걸쳐 핵심적인 역할을 한다. 본 연구에서 [F-18]FDG 소동물 PET 뇌기능 영상이 어느 정도의 뇌활동 변화검출 능력을 가지고 있는지 측정하기 위해 고양이에 대한 쥐의 공포 반응 실험을 진행한 이유도 여기에 있다. 공포 자극에 대한 편도체 활동 변화 측정은 [F-18] FDG 소동물 PET 뇌기능 영상기술의 성능을 가늠할 수 있는 하나의 지표로 생각하였다. 그림 2 결과에서 보는 바와 같이 대조군에 비하여 무서운 자극에서 좌우 양쪽의 편도체의 뇌활동성 증가를 명확히 볼 수 있었다. 특히 편도체의 영역의 형태와 비슷하게 경계가 명확한 뇌영상 변화가 관찰됨으로써 소동물 PET의 해상도에 비해 보다 정확한 뇌활동 변화 측정이 가능한 것으로 판단된다. 편도체 이외에도 무서운 자극에 대해서 뇌줄기(Brainstem) 영역 중 외측섬유띠(Lateral lemniscus)에서도 활동성이 증가함을 보였다. 이 영역은 청각영역에 관련된 영역으로 일반적으로는 놀라는 소리(startle sound)같은 자극에 대해서는 공포 반응과 관련 있다고 알려져 있다[11]. 기존의 연구를 바탕으로 고려해봤을 때, 본 연구의 실험환경에서 고양이 울음 소리 및 움직임에 관련된 소리가 백서의 공포를 자극하는 하나의 주요한 요인이었는지 않았을까 생각된다. 향후 소리만을 이용한 공포 자극 실험 혹은 다른 형태(냄새)를 이용한 실험을 통해서 외측섬유띠의 대사량 변화에 대한 이유를 좀더 명확히 할 수 있을 것이다. 본 연구에서 흥미로운 것 중에 하나는 시상하부(Hypothalamus) 활동성 변화이다. 우리는 이전 연구에서 움직이지 못하는 스트레스를 주어 시간에 따른 뇌활동 변화를 보고 하였다[12]. 이 때 스트레스에 관련되어 확연히 반응한 뇌 영역이 시상하부이다. 시상하부는 스트레스시 호르몬 조절이나 다른 뇌 영역과의 연결을 통해 신체적인 반응을 조절하는 핵심영역이라고 알려져 있다[15,16]. 하지만 모든 스트레스 자극에 대하여 [F-18]FDG 소동물 PET 뇌기능 영상 변화가 보고된 것은 아니다. 최근 우리의 연구에서는 움직이지 못하는 스트레스에는 시상하부의 활동성이 두드러지게 증가했지만 아직 발견되지 않은 우리의 다른 연구 중 100 dB의 큰 소리의 스트레스 자극에 대한 연구에서는 시상하부의 변화가 없었다. 본 연구에서 공포 자극시 시상하부의 활동성 증가는 공포가 스트레스를 동반하는 것처럼 보여진다. 이러한 스트레스를 포함한 놀라움 자극에 대한 일련의 영역들의 활동성 변화는 향후 다양한 실험조건을 통한 공포에 대한 연구에 [F-18]FDG 소동물 PET 뇌기능 영상이 충분히 활용될 수 있음을 보였다. 특히 [F-18]FDG 소동물 PET 뇌기능 영상은 c-fos 나 자가방사법 (autoradiography) 같은 방법과는 달리 하나의 개체에서 여러 실험조건에서 반

복해서 영상을 얻을 수 있고, 마취의 영향을 배제하고 뇌영상을 할 수 있기 때문에 하나의 개체에서 긴 시간에 걸쳐 뇌의 변화의 관찰이 필요한 연구에 널리 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

결론적으로 본 연구에서는 고양이에 대한 백서의 공포 반응 실험을 통해 예측된 뇌대사의 변화를 [F-18]FDG 소동물 PET 뇌영상기술을 이용하여 측정할 수 있음을 변화를 보여주었다. 더 나아가 FDG 소동물 PET 뇌기능 영상기술을 통해 다른 국소적인 국소 뇌영역들의 변화까지도 검출함으로써 이 기술이 향후 소동물 행동실험에 충분히 활용될 수 있을 것이 생각된다.

V. 참고문헌

- [1] F. Maestu, F. Quesney-Molina, T. Ortiz-Alonso, P. Campo, A. Fernandez-Lucas, and C. Amo, "Cognition and neural networks, a new perspective based on functional neuroimaging," *Rev Neurol*, vol. 37, pp. 962-6, 2003.
- [2] S. Ogawa, D. W. Tank, R. Menon, J. M. Ellermann, S. G. Kim, H. Merkle, and K. Ugurbil, "Intrinsic signal changes accompanying sensory stimulation: functional brain mapping with magnetic resonance imaging," *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 89, pp. 5951-5, 1992.
- [3] A. Van der Linden, N. Van Camp, P. Ramos-Cabrera, and M. Hoehn, "Current status of functional MRI on small animals: application to physiology, pathophysiology, and cognition," *NMR Biomed*, vol. 20, pp. 522-45, 2007.
- [4] R. R. Peeters, I. Tindemans, E. De Schutter, and A. Van der Linden, "Comparing BOLD fMRI signal changes in the awake and anesthetized rat during electrical forepaw stimulation," *Magn Reson Imaging*, vol. 19, pp. 821-6, 2001.
- [5] D. P. Jang, S. H. Lee, S. Y. Lee, C. W. Park, Z. H. Cho, and Y. B. Kim, "Neural responses of rats in the forced swimming test: [F-18]FDG micro PET study," *Behav Brain Res*, vol. 203, pp. 43-47, 2009.
- [6] D. P. Jang, S. H. Lee, C. W. Park, S. Y. Lee, Y. B. Kim, and Z. H. Cho, "Effects of fluoxetine on the rat brain in the forced swimming test: a [F-18]FDG micro-PET imaging study," *Neurosci Lett*, vol. 451, pp. 60-64, 2009.
- [7] J. S. Kim, J. S. Lee, K. C. Im, S. J. Kim, S. Y. Kim, D. S. Lee, and D. H. Moon, "Performance measurement of the microPET focus 120 scanner," *J Nucl Med*, vol. 48, pp. 1527-35, 2007.
- [8] J. LeDoux, "The emotional brain, fear, and the amygdala," *Cell Mol Neurobiol*, vol. 23, pp. 727-38, 2003.
- [9] J. S. Kim, J. S. Lee, M-H Park, H. Kang, J. J. Lee, K. C. Im, D. H. Moon, S. M. Lim, S. H. Oh, D. S. Lee, "Assessment of cerebral glucose metabolism in cat deafness model: strategies for improving the voxel-based statistical analysis for animal PET studies," *Mol Imaging Biol*. 2008, vol. 10(3), pp. 154-161.
- [10] E. A. Phelps and J. E. LeDoux, "Contributions of the amygdala to emotion processing: from animal models to human behavior," *Neuron*, vol. 48, pp. 175-87, 2005.
- [11] W. K. Berg and M. Davis, "Associative learning modifies startle reflexes at the lateral lemniscus," *Behav Neurosci*, vol.

- 99, pp. 191-9, 1985.
- [12] K. K. Sung, D. P. Jang, S. Lee, M. Kim, S. Y. Lee, Y. B. Kim, C. W. Park, and Z. H. Cho, "Neural responses in rat brain during acute immobilization stress: a [F-18]FDG micro PET imaging study," *Neuroimage*, vol. 44, pp. 1074-1080, 2009.
- [13] P. Schweinhardt, P. Fransson, L. Olson, C. Spenger, J. L. Andersson, "a template for spatial normalisation of MR images of the rat brain," *J. Neurosci. Methods*, vol. 129, pp. 105-113, 2003.
- [14] B. J. Fueger, J. Czernin, I. Hilderbrandt, C. Tran, B. S. Halpern, D. Stout, M. E. Phelps, and W. A. Weber, "Impact of animal handling on the results of 18f-FDG Pet studies in mice," *J. Nucl. Med.*, vol. 47, pp. 999-1006, 2006.
- [15] A. Valles, O. Marti, and A. Armario, "Long-term effects of a single exposure to immobilization: a c-fos mRNA study of the response to the homotypic stressor in the rat brain," *J. neurobiol.*, vol. 66, pp. 591-602, 2006.
- [16] M. F. Dallman, S. F. Akana, N. Levin, C. D. Walker, M. J. Bradbury, S. Suemaru, and K. S. Scribner, "Corticosteroids and the control of function in the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis.," *Ann. N.Y. Acad. Sci.* vol. 746, pp. 22-31, 2004.