

Corticotropin Releasing Factor-Producing Neurons in the Central Amygdala Induces Experience-Dependent Influences on Behavior*

Yong Sang Jo[†]

Department of Psychology, Korea University

The central nucleus of the amygdala (CeA) contains a group of cells that produce a neuropeptide, corticotropin releasing factor (CRF). The literature suggests that CRF in the CeA has a negative effect on behavior, such as increased anxiety and fear. However recent studies reported a conflicting result showing a rewarding effect of CRF. To understand how CRF lead to different behavioral effects, CRF neurons in the CeA were genetically manipulated to express a light-activated cation channel, channelrhodopsin-2, using CRF-cre mice. When the animals were initially tested to press a lever for light delivery in an operant conditioning (OP) and to visit one of two compartment for light presentation in a real-time place preference task (RTPP), CRF activation did not alter animals' behavior at all. Stimulation of CRF neurons also failed to change animals' anxiety levels compared to their control group in an elevated plus maze (EPM). After experiencing a lever press for food rewards for 5 days, however, CRF activation in the same mice induced rewarding effects in both OP and RTPP. Using a different set of mice, it was also examined whether CRF activation after forming fear memory resulted in negative effects on behavior. Indeed, CRF activation did not produce any effects before fear conditioning, but the same manipulation significantly elevated anxiety levels in EPM and induced aversive effects in RTPP after fear conditioning. These results demonstrate that CRF neurons can exert either positive or negative impacts on behavior depending on prior experiences.

Keywords: central amygdala, corticotropin releasing factor, operant conditioning, fear conditioning

1차원고접수 20.07.13; 수정본접수: 20.10.03; 최종게재결정 20.10.19

부신피질 자극호르몬 방출인자(corticotropin releasing factor, 이하 CRF)는 대략 41개의 아미노산으로 이루어진 단백질로 뇌의 여러 부위에서 만들어져 분비된다. 1981년에 Wylie Vale와 그의 동료들은 시상하부에서 처음으로 CRF를 발견하였고, 스트레스를 받는 상황에서 CRF가 많이 방출된다는 실험결과를 발표하였다(Vale, Spiess, Rivier, & Rivier, 1981). 방출된 CRF는 뇌하수체의 전엽을 자극하여 부신피질 자극호르몬(adrenocorticotrophic hormone, 이하 ACTH)을 분비케하고, ACTH는 부신피질에서 코르티코이드(corticosteroid)를 분비시켜 온 몸의 기관으로 스트레스 신호를 전달하며 스트

레스 상황에 대응하는 기능을 하는 것으로 밝혀졌다. 이후 여러 과학자들이 CRF를 직접 동물들의 뇌에 주입하는 실험을 하였을 때, 동물들이 과불안 및 공포행동을 보인다는 다수의 논문들이 보고되었다(Britton, Lee, Vale, Rivier, & Koob, 1986; Dunn & File, 1987). 이러한 결과들이 축적되어 현재 CRF는 스트레스 및 불안과 같은 부정적 정서와 관련된 대표적인 물질로 인식되고 있다.

공포행동의 중추라 알려진 편도체에도, 특히 편도체 중심핵(central amygdala, 이하 CeA), CRF를 만드는 뉴런들이 존재한다(Sanford et al., 2017). 편도체내에서 CRF를 조작

* 본 연구는 2020학년도 고려대학교 문과대학 특별연구비의 지원을 받았다. 실험을 수행하는데 도움을 준 허정우에게 감사한다.

† 교신저자: 조용상, 고려대학교 심리학과, (02841) 서울특별시 성북구 안암로 145

Email: ysj@korea.ac.kr

한 연구들도 대체로 부정적 정서와 CRF의 관련성을 시사해 주고 있다. 예를 들어, 편도체에 직접 CRF를 투여하거나 CRF의 수용체(receptor)를 활성화시키는 약물을 넣으면 동물들의 불안행동이 증가하고, CRF를 억제하는 물질을 투여하면 불안감소를 유발할 뿐만 아니라 공포학습도 방해하였다 (Donatti & Leite-Panissi, 2011; Jo, Namboodiri, Stuber, & Zweifel, 2020; Pitts, Todorovic, Blank, & Takahashi, 2009; Sanford et al., 2017). 그러나 최근에 들어 소수이지만 몇몇 논문들이 편도체의 CRF가 불안이 아닌 보상 효과를 일으킨다는 새로운 실험결과를 보고하였다(Hartley et al., 2019; Kim, Zhang, Muralidhar, LeBlanc, & Tonegawa, 2017). 구체적으로 쥐들이 특정 구멍에 코를 들이밀어 냄새를 맡는 행동을 보이면 CeA내의 CRF뉴런들을 광유전학적으로 활성화시키는 처치를 가하자 이 행동을 보이는 빈도가 유의미하게 증가하였다(Kim, Zhang, Muralidhar, LeBlanc, & Tonegawa, 2017). 이처럼 기존의 시각과 대치되는 실험결과들은 편도체내에 존재하는 CRF뉴런들의 기능이 아직 명확하게 규명되지 않았다는 것을 보여준다.

편도체의 CRF뉴런들을 활성화시는 동일한 처치가 실험에 따라 보상적 또는 혐오적 영향을 모두 미칠 수 있다는 실험 결과들을 고려해 보았을 때, CRF뉴런들이 정서가치(valence)를 표상하는 기능을 수행하지는 못할 것이다. 대신 정서가치와 상관없이 현재의 정서상태나 기존에 형성한 정서기억을 고양시켜주는 역할을 수행한다면, CRF뉴런들의 활성화 효과가 보상적 또는 혐오적일 수 있다. 이 가설을 검증하기 위해서 본 연구는 보상적 또는 혐오적 사전경험을 습득한 동물들을 대상으로 편도체 CRF뉴런들을 활성화시키는 조작을 가했을 때 사전에 형성한 정서기억이 동물의 현재 행동에 영향

을 미치는지 확인하는 실험을 진행하였다. 만약 가설이 유효하다면, 사전 경험으로 보상물을 이용한 강화학습을 습득한 동물들의 경우 CRF뉴런들의 활성화는 보상적 효과를 유발할 것이다. 반대로 사전경험이 공포형성인 동물의 경우 CRF뉴런들의 활성화는 혐오적 효과를 일으켜 불안행동을 증가시킬 것이다. 본 논문은 일련의 동물실험들을 실시하여 이 가설과 부합되는 결과를 얻었다.

방 법

피험동물

CRF유전자 발현시 Cre재조합효소(recombinase)를 발현하도록 유전자 변형된 CRF-cre 마우스(C57BL/6J 계통; 미국 와싱턴대학교 Larry Zweifel 교수 연구실)를 사용하였다. 총 44마리의 암수 마우스들(실험 1과 2에서 23마리, 실험 3에서 21마리)을 온도와 습도가 일정하게 유지되는 사육실에서 한 사육상자당 3-5마리씩 집단으로 사육하였다. 사육실은 12시간 주기로 밤과 낮을 바꾸어 주었으며, 아침 7시에 낮주기가 시작되었다.

시술

Isoflurane을 이용하여 흡입마취 후 입체 뇌수술장비(Model 1900, Kopf Instruments)에 개별 동물들을 올려놓고 뇌를 고정시켰다. 두피를 절개하고 목표 부위의 두개골 표면에 작은 구멍을 만들었다. 해밀턴 정밀 주사기(7105KH, Hamilton Company)를 이용하여 브레그마에서 후측으로 1.2mm 그리고 좌측으로 ±2.9mm, 복측으로 4.6mm에 위치한 CeA에 0.5µl의 바이러스(adeno-associated virus, 이하

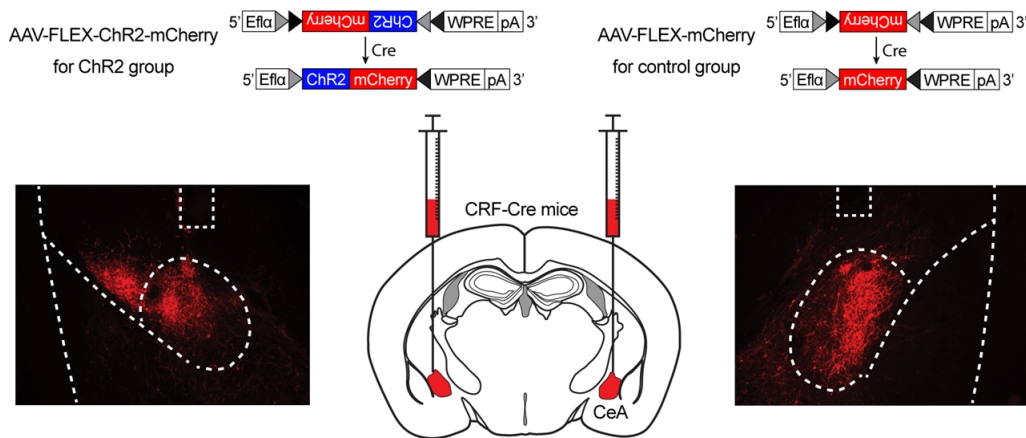


Figure 1. Expression of ChR2 in CRF neurons. AAV-FLEX-ChR2-mCherry was bilaterally injected into the CeA of CRF-cre mice for the ChR2 group, whereas AAV-FLEX-mCherry was infused for the control group. Representative CeA sections stained for mCherry showed the expression of ChR2 in the CeA. The dotted rectangles indicate the location of optic fibers above the CeA.

AAV)를 주입하였다(Figure 1). 실험집단에 투여한 AAV는 Cre재조합효소를 보유한 뉴런들에서 파란색 레이저 빛(473nm)에 반응하는 흥분성 광수용체(channelrhodopsin-2, ChR2)를 발현시키기 위한 유전자를 함유하고 있다. 통제집단의 경우 ChR2를 보유하지 않은 AAV를 투여하였다. 투여시점으로부터 10분간 주사기를 움직이지 않고 기다림으로써 AAV가 주사기로부터 널리 확산되도록 하였다. 주사기를 제거 후 투여지점보다 0.5mm 위에 빛을 제공할 광섬유를 위치시키고, 2개의 지지용 나사와 치과용 시멘트로 고정시켰다. 시술 후 AAV의 유전자가 충분히 발현될 수 있도록 3주간의 회복시간을 부여하였다.

도구적 조건화

투명한 아크릴 상자(21.6 × 17.8 × 12.7cm, ENV-307W, Med Associates)를 이용하여 실험을 진행하였다. 상자의 한쪽 벽면에 두 개의 레버가 위치해 있고, 그 사이에 먹이를 제공할 수 있는 그릇이 위치해 있다(Figure 2A). 실험 1주일 전부터 먹이량을 제한하여, 시작 시점의 동물 몸무게에서 80% 정도로 유지시키며 도구적 조건화를 실시하였다. 실험 당일 개별 마우스들을 상자에 넣고 레버를 누르면 20mg의 먹이를 얻을 수 있는 훈련을 1시간 실시하였다. 이러한 훈련을 5일간 반복적으로 학습시켰다. 그리고 6일째 동물들을 다시 상자에 넣었을 때에는, 레버를 누르면 먹이를 제공하는 대신, 1초간 10Hz의 파란 빛(5ms 펄스, 10–15mW/mm² 강

도)을 CeA에 비추어 주어 CRF뉴런들을 광유전학적으로 자극시켰다. 이렇게 레버와 빛을 연합하는 훈련을 5일간 더 진행하였다. 도구적 조건화 실험을 마치고 모든 동물들은 먹이와 물을 자유롭게 먹을 수 있도록 했다.

실시간 장소선호

흰색 아크릴로 상자(60 × 30 × 30cm)의 한가운데에 칸막이를 설치하여 동일한 크기의 두 구역으로 나눈 장비를 사용하여 이 과제를 수행하였다(Figure 2B). 동물들이 두 구역을 잘 구별하도록 서로 상이한 시각자극들로 벽면을 꾸며 놓았다. 실험 전에 한 구역을 무작위로 선정하여 파란 빛을 제시할 장소로 지정하였다. 그리고 마우스를 빛 자극을 제시하지 않는 구역에 내려놓고 20분간 자유롭게 두 구역을 탐색하도록 두었다. 동물의 네 발이 빛과 연합할 구역 안에 들어가면 10Hz의 파란 빛(1초 자극-1초 멈춤을 반복적으로 제시)을 CeA에 비추어 주었고, 이 구역을 벗어나는 즉시 빛을 멈추었다. 동물의 행동을 비디오카메라로 기록하였고, 두 장소에서 머문 시간과 움직인 경로를 Ethovision으로 분석하였다.

높은 십자미로

흰색 아크릴로 만들어진 십자형 미로(MED-ELVM, Med Associates)를 지상으로부터 94cm 높은 곳에 설치하였다. 네 개의 십자형 통로(35 × 6cm) 중 마주보고 있는 두 개는 검은색 벽(높이 19cm)으로 둘러싸여 있고, 다른 두 통로는 벽

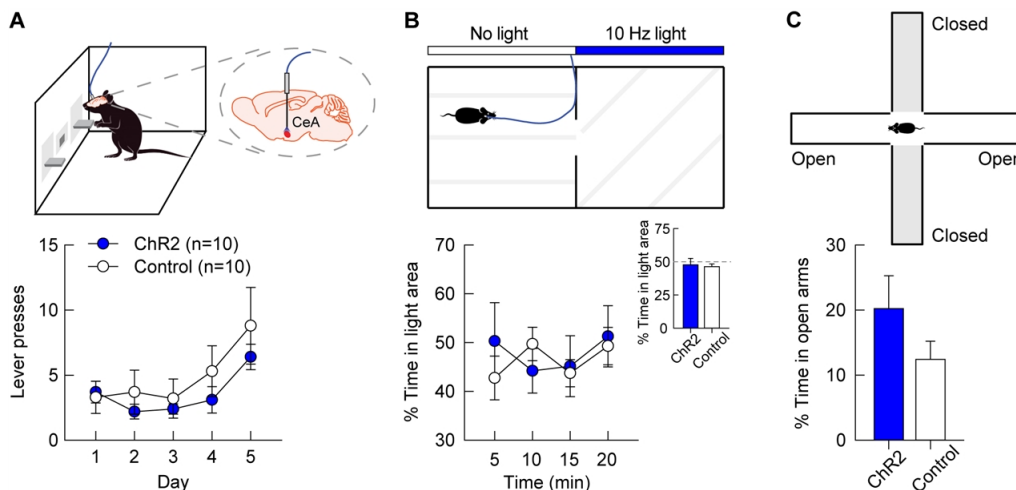


Figure 2. Initial effects of CRF stimulation on behavior. (A) In an operant conditioning box, individual mice were trained to press the levers for light delivery (1s, 10Hz) into the CeA. No group difference was found during 5 days of training. (B) One of two compartments was paired with continuous light stimulation (1s on and 1s off) and mice's preference to a particular place was tested for 20 min. Two groups spent equal amounts of time in both compartments. Inset shows the average time spent in the light-paired compartment. (C) After stimulating CRF neurons with light for 3s, mice were placed on an elevated plus maze for 10 min. No statistical group difference was found in the total amount of time spent in the open arms.

없이 개방된 공간이었다(Figure 2C). 기존 연구에 의하면 불안수준이 높을수록 벽이 있는 통로에 머무는 시간이 길다고 알려져 있다(Zweifel et al., 2011). 먼저 개별 동물들의 CeA에 10Hz로 3초간 파란 빛을 비추어 CRF뉴런들을 활성화시킨다. 5-6분 정도의 대기시간 후, 높은 십자미로의 가운데에 동물들을 위치시키고 10분간의 자유롭게 탐색하는 시간을 부여하였다. 동물의 행동을 녹화하였고, 벽이 있는 통로와 개방된 통로를 탐색한 시간을 Ethovision으로 분석하였다.

공포조건화

도구적 조건화에 사용하였던 장비와 동일한 규격의 아크릴 상자(ENV-307W, Med Associates)에서 공포조건화를 진행하였다. 이 상자의 바닥에는 0.8cm 간격으로 스테인리스 스틸 그리드를 배열하여 동물의 발에 0.6mA의 전기충격(unconditioned stimulus, 이하 US)을 제시할 수 있었다(Figure 4C). 상자의 한쪽 벽면에는 소리자극(12kHz tone; conditioned stimulus, 이하 CS)을 들려 줄 스피커를 설치하였다. 또한 상자의 위에는 비디오카메라를 부착하여 마우스의 움직임을 기록할 수 있도록 하였다. 실험 첫째 날은 마우스들이 실험 장비에 적응하도록 개별적으로 상자에 넣고 CS(10초)를 3번 들려주며 10분 동안 탐색하는 시간을 주었다. 둘째 날은 동물들을 다시 상자에 넣고, CS와 US(0.5초)를 동시에 끝나도록 제시하는 연합훈련을 10차례(CS간의 간격(intertrial interval): 90초) 실시하였다. 다음 날 CS에 대한 공포반응을 측정하기 위해서, 동일 상자에 그리드를 제거하고 흰색 플라스틱 상자(20 × 16 × 12cm)를 넣어 변화된 배경에서 CS를 3번 들려주는 실험을 최종적으로 진행하였다. 동물들의 공포반응을 측정하기 위해서, CS가 제시되는 10초 동안 마우스들이 보인 동결행동(freezing)을 사후분석하였다. Ethovision(XT 8.5, Noldus Technology)을 이용하여 동물들이 움직인 속도를 계산하였고, 이 속도가 0.5cm/sec 미만으로 1초 이상 지속되면 동결반응으로 정의하였다(Jo, Heymann, & Zweifel, 2018). 공포조건화시 10번의 CS-US를 제시하는 동안 동물들이 보인 동결반응은 2번씩 평균을 내서 5개의 데이터로 제시하였다. 공포조건화 전과 후로 CS에 대한 동결반응을 측정하였을 때에는 3번의 CS를 제시하는 동안 보인 동결반응을 평균하여 1개의 데이터로 표시하였다.

면역조직화학적 염색

모든 실험이 끝난 뒤, CeA에서 ChR2의 발현상태를 확인하

고 또한 광섬유의 위치를 검증하기 위해서 조직검사를 실시하였다. 안락사용 약물(pentobarbital sodium)을 동물들에게 복강주사하고, 생리식염수와 4% 포르말린 용액을 심장을 통해 환류하였다. 뇌를 추출하여 동일 포르말린 용액에 냉장보관하였다. 다음 날 뇌를 30% 설탕물로 옮기고 최소 4일간 냉장보관하였다. 미세절편기(Leica CM, 1850, Leica Biosystems)를 이용하여 뇌를 30µm 두께의 관상단면으로 잘랐다. 이후 뇌절편을 DsRed 일차항체(토끼 다중클론성, 1:2000, Millipore)에 12시간 노출시켜, mCherry를 발현하는 뉴런들을 표지하였다. 그리고 CY3 이차항체(항-토끼성, 1:200)를 사용하여 표지된 뉴런들을 최종 염색하였다. 형광현미경(Eclipse E600, Nikon)을 이용하여 염색된 뇌절편들을 관찰하였다.

결 과

CRF유전자 발현시 Cre도 함께 발현되도록 고안된 CRF-Cre 마우스들을 두 집단으로 무작위로 나누고, ChR2집단의 CeA에는 AAV-FLEX-ChR2-mCherry를 통제집단의 CeA에는 동일한 종류의 바이러스이지만 ChR2유전자가 제거된 AAV-FLEX-mCherry를 주입하였다(Figure 1). CeA에 바이러스들이 잘 주입되었는지, 그리고 빛을 제시할 광섬유가 CeA의 상단에 잘 위치해 있는지 확인하기 위해서 면역조직화학적 기법을 통하여 mCherry단백질을 염색하였다. Figure 1에서 보는 것과 같이 대부분의 동물들(44마리 중 40마리)은 바이러스가 CeA의 CRF뉴런들에 잘 침투하여 단백질을 만들고 있음을 확인하였다. 또한 광섬유는 CeA로부터 0.2-0.7mm 위쪽에 이식되어 있어, 파란 빛을 비추었을 때 ChR2를 발현하는 뉴런들을 활성화시킬 수 있는 곳에 위치하여 있었다. 나머지 4마리의 경우 mCherry단백질을 확인하지 못하였거나, 또는 광섬유의 위치가 CeA의 바깥쪽에 이식되어 있었기 때문에 최종 행동결과를 분석에 포함시키지 않았다. 이로 인해 동물수에 결손이 생겼을 경우, 동물들을 보충하여 각 집단당 10마리를 확보하였다.

실험 1. 최초 CRF뉴런들의 활성화가 행동에 미치는 영향

AAV주입과 광섬유 이식수술을 받고 최소 3주간의 회복기간을 거친 ChR2집단(n=10)과 통제집단(n=10)은 우선 도구적 조건화 훈련을 받았다. 두 집단의 동물들이 레버를 누르면 CeA에 1초간 빛을 비추어 주는 과제(Figure 2A), 만약

CRF뉴런들의 활성화가 보상효과를 일으킨다면 레버를 누르는 횟수가 1시간당 최소 100회 이상 기록할 것으로 예상되었다(Kim et al., 2017; Heymann et al., 2020). 5일간의 훈련동안 ChR2집단과 통제집단의 레버를 누른 횟수를 반복측정변량분석으로 비교한 결과 집단간의 차이는 발견되지 않았다($F(1,18) = 0.68, p = 0.42$). 레버횟수만 소폭이지만 유의미하게 증가하여 마지막 5일째 날 1시간당 10회 정도를 기록하였으나($F(4,72) = 6.28, p < 0.001$), 이 증가는 도구적 조건화에 노출되는 시간이 늘어날 수록 자연적으로 증가하는 수준에 머물렀다(Heymann et al., 2020).

이후 며칠간의 간격을 두고 실시간 장소선호 과제를 진행하였다. 실험용 상자를 두 구역으로 나누고 특정 구역에 동물이 들어가면 CeA에 빛을 비추어 주는 실험으로(Figure 2B), 만약 CRF뉴런들이 보상효과를 유발한다면 동물들은 빛과 연합된 구역에 더 오래 머물 것이다. 반복측정변량분석을 통해 확인해 본 결과, 두 집단간 유의미한 차이는 없었다($F(1,18) = 0.07, p = 0.79$). 그리고 빛을 제시한 구역에 대한 선호 없이 두 구역을 균등한 시간동안 탐색하였다(Figure 2B, 삽입).

다음으로 CRF뉴런들의 활성화가 불안에 미치는 영향을 알아보기 위해서, 두 집단의 CeA에 3초간 빛을 비추어 주고 높은 십자미로를 실시하였다(Figure 2C). ChR2집단이 개방된 통로를 다소 많이 탐색하는 경향이 있었지만, 집단간의 통계적 차이는 발견하지 못하였다($t(18) = 1.35, p = 0.19$). 일련의 세가지 실험결과들을 종합해 보면, CRF뉴런들의 활성화가 연합학습 및 정서행동에 특별한 영향을 미치지 않는다는 것을 보여준다.

실험 2. 강화학습 후 CRF뉴런들의 활성화가 행동에 미치는 영향

다음으로 보상을 얻는 경험을 사전에 습득한 동물들을 대상으로 CeA의 CRF뉴런들을 활성화시키면 행동에 어떠한 영향을 미치는지 확인하는 실험을 진행하였다. 실험 1을 마친 동물들을 대상으로 도구적 조건화 훈련을 다시 실시하였다. 그러나 이번에는 동물들의 몸무게를 80%로 유지시키며, 레버를 누르면 20mg의 먹이를 보상물로 얻을 수 있도록 실험 조건을 변경하였다(Figure 3A). 두 집단은 모두 레버와 먹이 간의 연합을 빠르게 학습하였고, 5일째 날에는 1시간동안 75회 이상의 레버 누르는 횟수를 보였다(반복측정변량분석; 집단효과, $F(1,18) = 0.13, p = 0.73$). 6일째 날에는 실험조건을 변경하여, 레버를 누르면 먹이를 제공하는 대신 CRF뉴런들을 자극할 파란 빛을 1초간 비추어 주었다. 통제집단의 경우 빛으로 바뀐 첫날 레버를 누른 횟수가 일시적으로 증가하였다. 이는 먹이를 먹는데 소요되었던 시간이 줄어들고 대신 레버를 누를 수 있는 시간이 상대적으로 증가하면서 생기는 현상으로, 이전 논문에도 보고된 바 있다(Heymann et al., 2020). 그러나 그 이후로 레버횟수는 소거학습 곡선과 유사하게 지속적으로 감소하는 경향을 보였다. 통제집단과 달리 ChR2집단은 6일째 증가된 레버횟수를 큰 감소없이 10일째 까지 유지하는 반응을 보였다. 반복측정변량분석을 통해서 유의미한 집단차이를 확인할 수 있었다($F(1,18) = 6.71, p = 0.018$). 이 결과는 CRF뉴런들을 활성화하면 보상효과를 유발시켜 레버를 누르는 행동을 유지시킬 수 있음을 시사해 준다. 도구적 조건화를 마치고 2-3일 간의 휴식을 부여한 후,

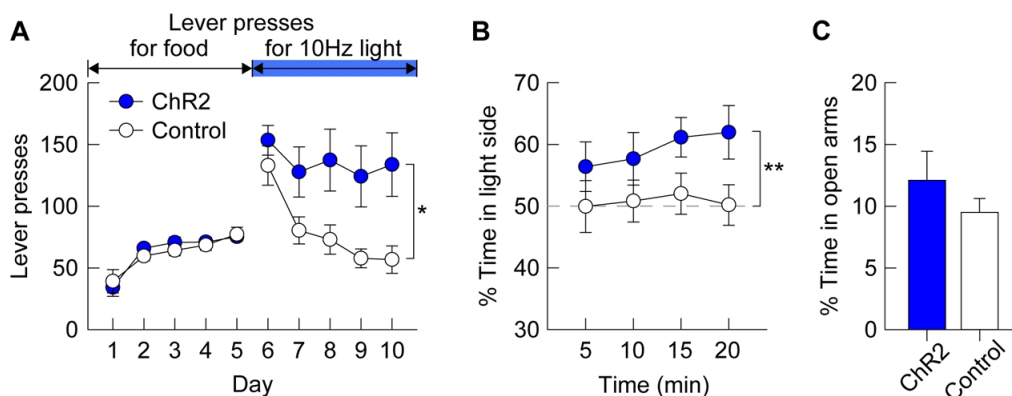


Figure 3. Effects of CRF activation on behavior after experiencing rewards during operant conditioning. The same groups of mice used in Figure 2 were trained to press a lever for a food pellet (20mg) for 5 days. From day 6 to 10, each lever press resulted in light stimulation (1s, 10Hz) instead of food delivery. The ChR2 showed significantly higher lever presses than the control group (*, $p < 0.05$). (B) The ChR2 group also preferred the light-paired compartment significantly more than the control group (**, $p < 0.01$). (C) The two groups showed no difference in anxiety-related behavior.

두 집단을 대상으로 실시간 장소선호 과제를 실시하여 CRF의 보상효과가 이 과제에서도 나타나는지 검증해 보았다. Figure 3B에서 보듯이 통제집단은 특정 구역에 대한 선호를 보이지 않았고, 두 구역에서 대략 50%의 시간동안 탐색하였다. 그러나 ChR2집단은 통제집단에 비해서 유의미하게 높은 시간을 빛과 연합된 구역에서 탐색하는데 소비하였다(반복측정변량분석, $F(1,18) = 11.18, p = 0.004$). 따라서 강화훈련을 사전경험한 동물들의 CeA에서 CRF뉴런들이 활성화되면 보상효과가 확실히 나타난다는 것을 알 수 있다. 마지막으로 CRF뉴런들을 활성화시키고 높은 십자미로에서 불안수준을 측정하였으나, 두 집단간의 차이를 발견하지 못하였다($t(18) = 1.001, p = 0.33$).

실험 3. 공포조건화 후 CRF뉴런들의 활성화가 행동에 미치는 영향

사전경험에 따라 CeA의 CRF가 행동에 미치는 영향이 달라진다면, 공포조건화와 같이 혐오적 경험을 형성한 동물들의 경우 CRF뉴런들의 활성화 효과는 긍정적이기 보다는 부정적일 것이라 예상할 수 있다. 새로운 동물로 구성된 ChR2집단($n=10$)과 통제집단($n=10$)을 대상으로 이 가능성을 실험해

보았다. 수술에서 회복한 두 집단의 행동을 먼저 실시간 장소선호 과제와 높은 십자미로에서 평가하였으며, 이때 순서효과를 차단하기 위하여 두 과제의 순서는 집단내에서 균형배치(counterbalance)하였다. 두 집단은 유의미한 차이없이 동등한 수준의 행동결과들을 보여주었다(Figure 4A, 집단효과, $F(1,18) = 0.04, p = 0.83$; Figure 4B, $t(18) = 0.84, p = 0.42$).

이후 두 집단은 CS와 US를 연합하는 공포조건화 실험을 받았다(Figure 4C). Figure 4D에서 보듯이 모든 동물들은 연합이 진행될수록 집단간 차이없이 CS에 대해 높은 수준의 공포반응을 보였다(Figure 4D; 반복측정변량분석, 집단효과, $F(1,18) = 0.14, p = 0.71$; 연합효과, $F(4,72) = 22.29, p < 0.001$). 다른 맥락에서 CS에 대한 공포기억의 강도를 측정해 보았을 때에도 두 집단 모두 동등한 수준의 공포반응을 보여주었다(Figure 4E, post test, $t(18) = 1.64, p = 0.12$).

이렇게 부정적 경험을 형성한 두 집단의 행동을 실시간 장소선호 과제와 높은 십자미로에서 다시 균형배치하여 측정함으로써, 경험에 따른 행동의 변화가 있는지를 관찰하였다. 특정 구역에서 CeA에 빛을 제시하였을 때 ChR2집단은 이 구역에 대해서 유의미하게 낮은 선호경향을 보여주었다(Figure 4F; 반복측정변량분석, 집단효과, $F(1,18) = 18.42,$

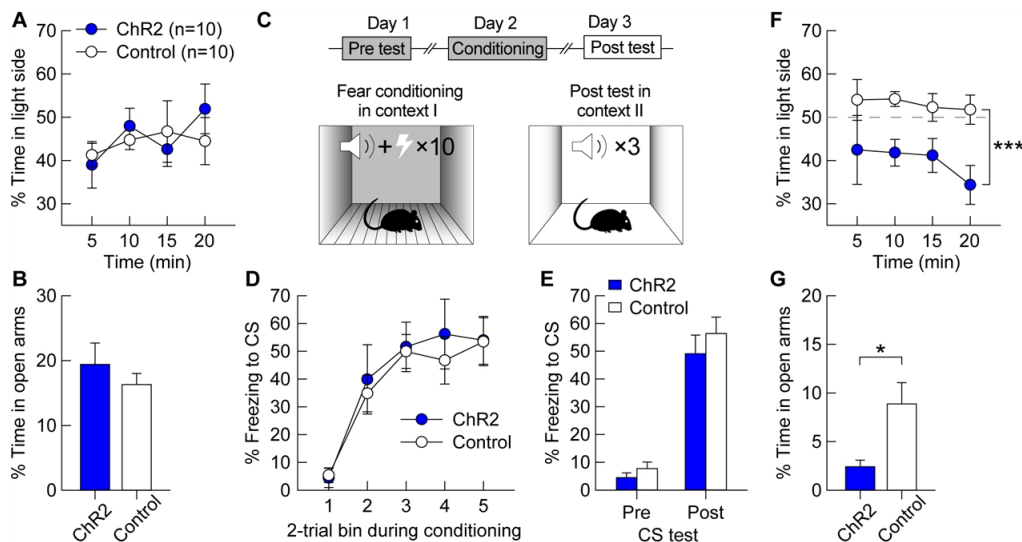


Figure 4. Effects of CRF activation on behavior after experiencing aversive stimuli in fear conditioning. (A–B) Prior to fear conditioning, two groups exhibited no behavioral differences in the real-time place preference task (A) and elevated plus maze (B). (C) All mice underwent fear conditioning in which a tone CS was paired with a footshock US (0.6mA) 10 times. Freezing responses to CS were tested before (pre test) and after conditioning (post test). (D–E) Two groups learned the CS–US association well and showed similar levels of fear responses during the acquisition (D) and during the post test (E, Post). (F–G) Animals’ behavior was measured again after fear conditioning. The ChR2 group significantly less preferred the light-paired compartment, compared to the control group (F; ***, $p < 0.01$). The ChR2 group also spent significantly less time in the open arms (G; *, $p < 0.05$), which indicated higher anxiety levels.

$p < 0.001$). 또한 CeA에 빛을 비추고 높은 십자미로에 동물들을 올려놓았을 때, 통제집단에 비교해서 ChR2집단은 개방된 통로를 탐색한 수준이 유의미하게 감소하였다(Figure 4G; $t(18) = 2.83, p = 0.01$). 두 과제에서 집단간 총 움직인 거리는 유의미한 차이가 없었다($t(18) < 0.22, p > 0.83$). 이 실험결과들은 CRF뉴런들의 활성화가 동물의 정서행동에 부정적인 영향을 미친다는 것을 보여준다.

논 의

2017년부터 편도체내에서 CRF를 생산하여 분비하는 뉴런들의 기능에 대한 논쟁이 제기되었다. CRF뉴런들이 활성화되면 부정적 정서를 유발한다는 기존의 전통적인 시각과 달리, 최근 두 편의 논문들은 CRF뉴런들의 활성화가 보상효과를 일으킨다는 실험결과를 발표하였다(Hartley et al., 2019; Kim et al., 2017). 이 연구들은 Cre재조합효소와 광유전학과 같이 개선된 실험기술을 이용하여 CRF뉴런들을 선택적으로 활성화시키고 행동에 미치는 영향을 실험하였다. 따라서 약물을 주입하여 실험했던 기존 연구보다 고도화된 실험 방법을 사용하였기 때문에 다른 연구결과를 관찰했다고 치부할 수 있다. 그러나 동일하게 개선된 방법으로 진행된 연구에서도 CRF뉴런들이 공포와 불안을 유발한다는 결과가 도출되었다(Jo et al., 2020; Sanford et al., 2017). 이는 연구 방법의 차이로 인해서 상이한 결과들이 나온 것은 아니라, 선택적으로 CRF뉴런들을 조작했음에도 다른 결과가 도출되었다는 것을 명확히 알려준다.

편도체에서 CRF뉴런들의 활성화가 보상적 또는 혐오적 효과를 일으킬 수 있다는 사실은 정서가치에 대한 정보를 전달하는 것이 CRF뉴런들의 주된 기능이 아니라는 것을 시사해준다. 이를 바탕으로 본 연구는 과연 어느 조건에서 CRF의 역할이 달라지는지 검증해 보는 실험을 진행하였다. 우선 사전경험이 없는 상태에서 레버를 누르는 훈련이나 실시간 장소선호 과제를 진행하였을 때에는 CRF뉴런들의 활성화가 행동에 아무런 영향을 미치지 않았다(Figure 2). 그러나 선천적 보상물인 먹이를 추구하는 행동을 5일간 진행한 이후, 동일한 동물들에서 CRF뉴런들을 활성화시키면 보상효과가 유발됨을 확인하였다(Figure 3). 또한 새로운 동물들을 대상으로 공포조건화 전후로 CRF뉴런들의 활성화 효과가 달라지는지도 검증하였다. 실제로 공포조건화를 거치기 전에는 CRF뉴런들의 활성화가 동물의 탐색 및 정서행동에 특별한 영향을 미치지 않았다. 반면 공포를 형성한 후 동일한 공간에서 행동변화를 재측정한 결과, 동물들은 CRF뉴런들의 활

성화와 연합된 공간에 대한 기피반응을 보였고 불안수준 또한 고양되어 있었다(Figure 4). 일련의 실험결과들은 동물들이 형성한 경험에 따라서 CeA의 CRF뉴런들이 행동에 미치는 영향이 달라진다는 것을 시사해 준다.

편도체가 아닌 다른 뇌영역의 CRF이었지만, 본 연구와 일관되게 경험에 따라 CRF의 영향이 달라진다는 다수의 실험 결과들이 보고되었다. 예컨대 뇌에 CRF를 투여하고 사전에 노출되어 친숙한 공간에 쥐를 놓고 행동을 관찰하면 투여량에 비례하여 운동량과 탐색행동이 증가하였다. 반면 CRF처리 후 쥐들을 새로운 공간에 노출시키면 정반대로 운동량과 탐색행동이 감소하였다(Dunn & Berridge, 1990; Koob et al., 1984; Sutton, Koob, Le Moal, Rivier, & Vale, 1982). 사전에 노출된 경험 여부에 따라 CRF이 탐색 및 정서행동에 미치는 영향이 달라진 것이라 할 수 있다. 또 다른 예로 Paul Phillips와 그의 동료들은 쥐의 측핵(nucleus accumbens, 이하 NAc)에 CRF를 직접 투여하면 보상효과를 일으킨다는 실험결과를 얻었다(Lemos et al., 2012). 그리고 동일한 동물들에게 급성 스트레스를 부과한 후 다시 CRF를 투여하며 행동실험을 했을 때 부정적 혐오효과가 발생한다는 사실을 확인하였다. 이 두가지 실험결과는 기존에 형성된 경험이나 기억에 따라서 CRF의 기능이 가변적임을 증명해 준다.

그렇다면 CeA에서 CRF뉴런들이 수행하는 본연의 기능은 무엇일까? CRF를 뇌에 투여하면 피질영역의 활성도를 증가시키고, 고농도의 CRF인 경우 발작행동까지 일으킬 수 있다는 실험결과가 1983년에 발표된 이후로(Ehlers et al., 1983), CRF는 스트레스 상황에서 ACTH의 분비를 촉진시키는 역할을 할 뿐만 아니라 뇌의 각성을 유지시키는 기능을 한다고 알려져 왔다(Koob, 1999). 이처럼 CeA의 CRF뉴런들도 편도체내 다른 뉴런들의 활성화를 조절하여 각성수준을 변화시키는 역할을 수행할 가능성이 있다. 특정 공간을 탐색하는 기억을 형성한 후 흥분성 약물을 투여하거나 각성관련 뇌회로를 전기자극하여 쥐들의 각성수준을 증가시키면 기존 기억을 인출하는 능력이 향상된다는 연구결과가 보고되어 있다(Sara & Devauges, 1989; Sara & Deweer, 1982; Sara, Deweer, & Hars, 1980). 따라서 CRF뉴런들을 활성화하면 편도체 신경회로의 각성수준을 높이고, 이는 정서가치가 긍정적이던 부정적이던 상관없이 사전 경험에서 습득한 행동의 경향성을 높이는 방향으로 작동할 수 있다.

또 다른 가능성으로 사전 경험이 특정 뇌영역으로 투사하는 CeA의 CRF뉴런들의 시냅스 가소성(plasticity)을 선택적으로 강화시켜 행동에 영향을 미칠 수 있다. 최근 유전학적

연구기법의 발달로 인해 CRF뉴런들이 직접투사하는 하위 뇌구조물들이 밝혀지고 있다. 대표적으로 CeA의 CRF뉴런들은 강화학습의 중추인 도파민 뉴런들이 있는 복측피개핵(ventral tegmental area, 이하 VTA)으로 투사하고 있고(Dedic et al., 2018), 또한 불안행동에 지대한 영향을 미치는 분계선조의 침대핵(Bed nucleus of the stria terminalis, 이하 BNST)에 투사하고 있다(Asok et al., 2018). 정적인 경험을 겪고 VTA로의 시냅스 연결이 강화되고, 부정적인 경험 후 BNST로의 연결이 향상되는 식으로 CRF뉴런들의 시냅스 가소성이 선택적으로 변할 수 있다. 이후 CRF뉴런들을 활성화시키면 선택적으로 강화된 시냅스 연결을 통해 정적 또는 부적인 효과를 일으킬 수 있을 것으로 보인다.

본 연구의 발단은 최근들어 불어린 CeA의 CRF뉴런들의 기능에 대한 논란이었다. 어떤 연구들에선 CRF의 활성화가 공포 및 불안과 같은 혐오적 영향을 미쳤고(Jo et al., 2020; Sanford et al., 2017), 다른 연구들에선 특정 행동을 반복하게 하는 보상적 효과를 유발했다(Hartley et al., 2019; Kim et al., 2017). 특히 Patal과 그의 연구진은 2015년에는 CRF의 혐오적 효과를(Gray et al., 2015) 2019년에는 보상적 효과를(Hartley et al., 2019) 발표하기도 하였다. 이러한 논란을 절충하기 위해서 실시한 본 연구는 CRF의 활성화가 사전경험에 따라서 다른 효과를 일으킨다는 행동실험결과를 얻었다. 이 결과를 기반으로 과연 어떤 요소들이 연구별로 다른 결과를 초래하였는지 고찰해 보고자 한다. 우선 행동실험 이전에 동물들이 받은 수술은 물론 매우 영향력이 큰 혐오적 사전경험이지만, 행동에 미치는 영향은 미미한 것으로 판단된다. 각 연구기관에 설치된 동물실험윤리위원회는 수술시 동물들이 느끼는 통증을 최소화 하기 위해서 마취제와 진통제 사용을 강제하고 있다. 또한 전신마취 후 수술기억에 대한 기억상실 현상이 일어나 혐오기억이 경감되었을 가능성도 존재한다(Pearlman, Sharpless, & Jarvik, 1961). 본 연구의 실험-1결과에서도 수술과 3주의 회복시기를 부여받은 쥐들의 경우 CRF뉴런들의 활성화는 행동에 특별한 영향을 미치지 않았다.

다음 요소로 동물들이 태어난 후 3-4주 사이에 진행되는 유전형 분석절차에서 연구실별로 차이가 발생할 수 있다. 개별 동물들이 Cre유전자를 가지고 있는지 확인하기 위해서 피부조직을 잘라내는 과정이 필수적이다. 통상적으로 마취없이 진행하며, 꼬리의 끝부위를 절제하냐 또는 귀부위를 자르느냐에 따라서 동물들이 느낄 수 있는 통증의 정도는 매우 다를 수 있다. 꼬리절제시 척추뼈 일부도 잘리기 때문에 귀를 자를 때보다 쥐들이 더 큰 고통을 느끼는 것으로 알려져

있다. CRF의 부정적 효과를 보고한 논문들(Jo et al., 2020; Sanford et al., 2017)은 꼬리조직을 이용해 유전형 분석을 실시하였고, 이로 인해서 동물들이 혐오적 사전경험이 축적되었을 가능성이 있다. CRF의 긍정적 효과를 보고한 논문들은 어떻게 유전형 분석을 하였는지 알려지지 않았다. 또 다른 요소들로 행동실험을 진행하기 전에 실험자와 동물들간의 친숙화 정도와 사육환경(예, 집단 사육시 쥐들간의 싸움) 등을 꼽을 수 있다. 연구실에 따라서 이런 요소들에 차이가 발생할 수밖에 없고, 이러한 사전경험들이 누적되어 행동실험에서 상이한 결과가 도출되었을 수 있다. 위에 언급된 요소들 중 본인의 후속연구에서 우선적으로 검증해 보고자 하는 것은 유전형 분석절차의 차이에 따른 CRF의 활성화 효과가 달라지는지 여부이다. 더불어 CRF뉴런들의 활성화를 직접 측정할 수 있는 실험기법을 이용하여, 사전경험이 CeA에 있는 CRF뉴런들의 활성화 정도를 변화시킬 수 있는지 확인하는 실험이 추가한다면 CRF뉴런들의 기능을 규명하는데 효과적일 것이다.

References

Asok, A., Draper, A., Hoffman, A. F., Schulkin, J., Lupica, C. R., & Rosen, J. B. (2018). Optogenetic silencing of a corticotropin-releasing factor pathway from the central amygdala to the bed nucleus of the stria terminalis disrupts sustained fear. *Molecular Psychiatry*, 23, 914-922.

Britton, K. T., Lee, G., Vale, W., Rivier, J., & Koob, G. F. (1986). Corticotropin releasing factor (CRF) receptor antagonist blocks activating and 'anxiogenic' actions of CRF in the rat. *Brain Research*, 369, 303-306.

Dedic, N., Kuhne, C., Jakovcevski, M., Hartmann, J., Genewsky, A. J., Gomes, K. S., Anderzhanova, E., Pohlmann, M. L., Chang, S., Kolarz, A., Vogl, A. M., Dine, J., Metzger, M. W., Schmid, B., Almada, R. C., Ressler, K. J., Wotjak, C. T., Grinevich, V., Chen, A., Schmidt, M. V., Wurst, W., Refojo, D., & Deussing, J. M. (2018). Chronic CRH depletion from GABAergic, long-range projection neurons in the extended amygdala reduces dopamine release and increases anxiety. *Nature Neuroscience*, 21, 803-807.

Donatti, A. F., & Leite-Panissi, C. R. (2011). Activation of corticotropin-releasing factor receptors from the basolateral or central amygdala increases the tonic immobility response in guinea pigs: an innate fear behavior. *Behavioural Brain Research*, 225, 23-30.

- Dunn, A. J., & Berridge, C. W. (1990). Physiological and Behavioral-Responses to Corticotropin-Releasing Factor Administration - Is Crf a Mediator of Anxiety or Stress Responses. *Brain Research Reviews*, *15*, 71-100.
- Dunn, A. J., & File, S. E. (1987). Corticotropin-releasing factor has an anxiogenic action in the social interaction test. *Hormones and Behavior*, *21*, 193-202.
- Ehlers, C. L., Henriksen, S. J., Wang, M., Rivier, J., Vale, W., & Bloom, F. E. (1983). Corticotropin releasing factor produces increases in brain excitability and convulsive seizures in rats. *Brain Research*, *278*, 332-336.
- Gray, J. M., Vecchiarelli, H. A., Morena, M., Lee, T. T., Hermanson, D. J., Kim, A. B., McLaughlin, R. J., Hassan, K. I., Kuhne, C., Wotjak, C. T., Deussing, J. M., Patel, S., & Hill, M. N. (2015). Corticotropin-releasing hormone drives anandamide hydrolysis in the amygdala to promote anxiety. *Journal of Neuroscience*, *35*, 3879-3892.
- Hartley, N. D., Gaulden, A. D., Baldi, R., Winters, N. D., Salimando, G. J., Rosas-Vidal, L. E., Jameson, A., Winder, D. G., & Patel, S. (2019). Dynamic remodeling of a basolateral-to-central amygdala glutamatergic circuit across fear states. *Nature Neuroscience*, *22*, 2000-2012.
- Heymann, G., Jo, Y. S., Reichard, K. L., McFarland, N., Chavkin, C., Palmiter, R. D., Soden, M. E., & Zweifel, L. S. (2020). Synergy of Distinct Dopamine Projection Populations in Behavioral Reinforcement. *Neuron*, *105*, 909-920.
- Jo, Y. S., Heymann, G., & Zweifel, L. S. (2018). Dopamine Neurons Reflect the Uncertainty in Fear Generalization. *Neuron*, *100*, 916-925.
- Jo, Y. S., Namboodiri, V. M. K., Stuber, G. D., & Zweifel, L. S. (2020). Persistent activation of central amygdala CRF neurons helps drive the immediate fear extinction deficit. *Nature Communications*, *11*, 422.
- Kim, J., Zhang, X., Muralidhar, S., LeBlanc, S. A., & Tonegawa, S. (2017). Basolateral to Central Amygdala Neural Circuits for Appetitive Behaviors. *Neuron*, *93*, 1464-1479.
- Koob, G. F. (1999). Corticotropin-releasing factor, norepinephrine, and stress. *Biological Psychiatry*, *46*, 1167-1180.
- Koob, G. F., Swerdlow, N., Seeligson, M., Eaves, M., Sutton, R., Rivier, J., & Vale, W. (1984). Effects of alpha-flupenthixol and naloxone on CRF-induced locomotor activation. *Neuroendocrinology*, *39*, 459-464.
- Lemos, J. C., Wanat, M. J., Smith, J. S., Reyes, B. A., Hollon, N. G., Van Bockstaele, E. J., Chavkin, C., & Phillips, P. E. (2012). Severe stress switches CRF action in the nucleus accumbens from appetitive to aversive. *Nature*, *490*, 402-406.
- Pearlman, C. A., Jr., Sharpless, S. K., & Jarvik, M. E. (1961). Retrograde amnesia produced by anesthetic and convulsant agents. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, *54*(2), 109-112.
- Pitts, M. W., Todorovic, C., Blank, T., & Takahashi, L. K. (2009). The central nucleus of the amygdala and corticotropin-releasing factor: insights into contextual fear memory. *Journal of Neuroscience*, *29*, 7379-7388.
- Sanford, C. A., Soden, M. E., Baird, M. A., Miller, S. M., Schulkin, J., Palmiter, R. D., Clark, M., & Zweifel, L. S. (2017). A Central Amygdala CRF Circuit Facilitates Learning about Weak Threats. *Neuron*, *93*, 164-178.
- Sara, S. J., & Devauges, V. (1989). Idazoxan, an Alpha-2 Antagonist, Facilitates Memory Retrieval in the Rat. *Behavioral and Neural Biology*, *51*, 401-411.
- Sara, S. J., & Deweer, B. (1982). Memory Retrieval Enhanced by Amphetamine after a Long Retention Interval. *Behavioral and Neural Biology*, *36*, 146-160.
- Sara, S. J., Deweer, B., & Hars, B. (1980). Reticular Stimulation Facilitates Retrieval of a Forgotten Maze Habit. *Neuroscience Letters*, *18*, 211-217.
- Sutton, R. E., Koob, G. F., Le Moal, M., Rivier, J., & Vale, W. (1982). Corticotropin releasing factor produces behavioural activation in rats. *Nature*, *297*, 331-333.
- Vale, W., Spiess, J., Rivier, C., & Rivier, J. (1981). Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science*, *213*, 1394-1397.
- Zweifel, L. S., Fadok, J. P., Argilli, E., Garelick, M. G., Jones, G. L., Dickerson, T. M., Allen, J. M., Mizumori, S. J., Bonci, A., & Palmiter, R. D. (2011). Activation of dopamine neurons is critical for aversive conditioning and prevention of generalized anxiety. *Nature Neuroscience*, *14*, 620-626.

사전 경험에 따라 편도체에서 부신피질 자극호르몬 방출인자를 분비하는 뉴런들이 행동에 미치는 영향

조용상

고려대학교 심리학과

편도체내에는 부신피질 자극호르몬 방출인자(corticotropin releasing factor, 이하 CRF)를 분비하는 뉴런들이 존재한다. 기존에는 CRF이 방출되면 불안 및 공포와 같은 부정적 행동결과를 초래한다고 알려져 있었으나, 최근 보상효과를 일으킨다는 상반된 주장이 제기되고 있다. 본 연구에서는 사전 경험에 따라서 CRF뉴런들의 활성화 효과가 달라질 수 있다는 가설을 검증하기 위해서 동물실험을 진행하였다. 유전자변형 동물들을 이용하여 광유전학적으로 편도체내의 CRF뉴런들을 선택적으로 활성화할 수 있도록 조작하였다. 사전에 특별한 경험이 없는 상태에서 CRF뉴런들을 활성화하였을 경우 통제집단과 비교해서 행동 반응에 유의미한 차이가 관찰되지 않았다. 그러나 먹이 보상물을 이용한 도구적 조건화 훈련을 마친 뒤에 CRF뉴런들을 활성화하였을 때에는 이전 행동을 지속하게 만드는 보상효과를 유발하였다. 새로운 집단의 동물들을 대상으로 공포조건화 전후로 CRF활성화가 행동에 미치는 영향도 실험하였다. 공포를 경험하기 전에는 나타나지 않았으나, 공포기억을 형성한 후에 CRF뉴런들을 활성화하면 불안 및 기피행동을 관찰 할 수 있었다. 이러한 실험결과들은 사전 경험에 따라서 행동에 미치는 CRF의 영향이 달라지는 것을 보여준다. 따라서 편도체의 CRF뉴런들은 정서가치를 표상하는 것이 아니라, 최근에 형성한 경험 및 기억이 더 발현되도록 유도하는 기능을 하는 것으로 판단된다.

주제어: 편도체, 부신피질 방출인자, 강화학습, 공포학습, 불안