

Activation of CGRP neurons in the parabrachial nucleus promotes defensive behavior appropriate to types of threat*

Hyewon Cho^{1,2†}, Gyeong Hee Pyeon^{1,2†}, Yong Sang Jo^{1,2‡}

¹School of Psychology, Korea University

²BK21FOUR Center for Psychological Research and Education, Korea University

Recent studies suggest that the neurons expressing calcitonin gene-related peptide (CGRP) in the parabrachial nucleus represent aversive information from diverse sensory modalities and signal a general alarm to the forebrain. All of the studies commonly found that CGRP stimulation increased freezing behavior among multiple defensive behaviors. However, it is unclear whether CGRP neurons can induce adaptive defensive behaviors that are relevant to specific threat circumstances. In this study, we optogenetically activated CGRP neurons when *Calca*-Cre mice received one of two aversive stimuli during Pavlovian fear conditioning: 1) an electrical footshock, 2) a chasing robot which mimicked an imminent predator-like threat. Our results showed that CGRP activation elevated freezing responses after the conventional conditioning with the footshock. On the other hand, the same CGRP manipulation increased flight responses after the conditioning with the chasing robot. Thus, these results clearly indicate that CGRP neurons can coordinate multiple defensive behaviors, including both freezing and flight, in order to adaptively respond to different types of threats.

Keywords: CGRP neurons, parabrachial nucleus, fear conditioning, freezing, flight, defensive behavior

1차원고접수: 23.04.21; 수정본접수: 23.07.03; 최종게재결정: 23.07.05



Copyright: © 2023 The Korean Society for Cognitive and Biological Psychology. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided that the article is properly cited and the use is non-commercial.

중성적인 조건자극(conditioned stimulus, CS)과 혐오적인 무조건자극(unconditioned stimulus, US)을 인과적으로 연합하는 과정을 거치면, CS는 공포 반응을 유발할 수 있는 특성을 획득하게 된다(LeDoux, 2003; Seo et al., 2006). 이러한 절차를 파블로프 공포 조건화라 하며, 실험실 상황에서 청각 CS와 발바닥 전기 충격 US를 사용하여 학습된 공포 반응의 뇌 신경학적 기전을 밝히기 위해 널리 사용되고 있다. 수십 년에 걸쳐 많은 연구자들이 공포 조건화와 관련된 신경회로

들을 규명하기 위해서 노력해 왔고, 그 결과 큰 진전을 이루었다(Johansen et al., 2011). 간략히 CS정보는 귀의 청신경과 시상의 내측슬상핵에서 처리된다. 이후 내측슬상핵은 CS 정보를 직접적으로 또는 청각 피질을 통해 간접적으로 편도체로 보낸다. 한편 혐오적 US 정보는 척수의 체감각 통증 경로를 통해 병렬적으로 중뇌수도주변회백질과 방완핵(parabrachial nucleus, 이하 PBN)으로 전달된다. 이 두 경로를 통해서 US정보는 최종적으로 편도체에 도달한다. 편도

* 본 연구는 2022학년도 고려대학교 심리학부 특별연구비에 의하여 수행되었다.

† 이 저자들은 본 연구에 동등하게 기여하였다.

‡ 교신저자: 조용상, 고려대학교 심리학부, (02841) 서울특별시 성북구 안암로 145, 구법학관 116호, E-mail: ysjo@korea.ac.kr

체 뉴런들은 CS정보와 US정보를 통합하고, 두 정보간의 연합을 시냅스 연결의 변화를 통해서 공포기억으로 저장한다.

위에서 언급한 공포 조건화 신경회로 중에서 PBN은 비교적 최근에 Palmiter와 그의 동료들에 의해서 발견되었다. 이 연구진이 2015년에 발표한 논문에 따르면, 마우스 PBN의 외측부위에서 칼시토닌 유전자관련 펩티드(calcitonin gene-related peptide, 이하 CGRP)를 발현하는 뉴런들은 전기 충격에 반응하여 활성화되었다(Han et al., 2015). 이 CGRP뉴런들의 활성도를 억제하는 처치를 가하자 전기 충격에 대한 공포 반응이 현저히 줄어들고, 공포기억 형성에 결함이 발생하였다. 한편 광유전학적인 방법으로 CGRP뉴런들의 활성도 증가는 공포 행동의 한 종류인 동결 반응(freezing)을 직접 유발하였다. 또한 실제 전기 충격을 사용하지 않고, CS와 CGRP뉴런들의 광유전학적 활성화를 짝지어 제시하면 동물들은 실제 공포 조건화를 받은 것처럼 CS에 대한 동결 반응을 보였다. 이 연구팀은 후속 연구를 통해서 PBN의 CGRP 뉴런들은 전기 충격에 반응할 뿐만 아니라 다중감각적 혐오 자극(뜨거운 열, 피부 가려움, 복통 등)에도 반응하여 활성화됨을 발표하였다(Campos et al., 2018). Palmiter는 이러한 연구결과들을 종합하여 CGRP뉴런들은 다양한 감각기관으로부터 들어오는 위협과 관련된 정보를 통합하여 편도체와 같이 정서를 처리하는 주요 뇌 영역들에게 종합적인 위협신호를 보내는 기능을 담당한다고 주장하였다(Palmiter, 2018). 물론 이 결론은 설득력 있게 들리지만, 이를 뒷받침할 수 있는 다른 연구진의 실험 결과들이 축적될 필요가 있다.

기존 CGRP뉴런들에 대한 논문들은 CGRP뉴런들의 광유전학적 활성도가 여러 공포 행동 중에서 유일하게 동결 반응만 증가시키는 것으로 보고하였다(Bowen et al., 2020; Han et al., 2015). 그렇다면 CGRP뉴런들은 다양한 혐오자극에 반응하여 동결 행동을 유발하는 데에만 관여하는지 아니면 다른 공포 행동에도 영향을 미칠 수 있는지에 대한 의문을 제기할 수 있다. 만약 혐오자극의 유형에 상관없이 동결 반응만 유발한다면, 종합적 위협신호라기보다는 동결 반응만을 일으키는 신경신호로 CGRP뉴런들의 역할을 제한적으로 해석해야 한다. 이 두 가지 가능성 중에서 어떤 것이 타당한지 확인하기 위해서, 전기 충격이나 뒤에서 쫓아오는 추격 로봇을 US로 사용하는 공포 조건화를 진행하면서 CGRP뉴런들의 활성도를 광유전학적으로 높이는 처치를 가하였다. 전기 충격을 이용한 공포 조건화에서 일반적인 동물들은 동결 위주의 반응을 보이는 반면(Jo et al., 2018), 쫓아오는 추격 로봇을 이용한 공포 조건화에서 동물들은 수동적인 동결 행동 뿐만 아니라 능동적인 도망 행동(flight)을 보인다(Lee et al.,

2018). 이러한 두 가지 공포 조건화에서 CGRP뉴런들의 활성도 상승이 공포 행동의 변화를 초래하는지 관찰하였다. 본 실험 결과는 CGRP뉴런들의 위협신호가 US의 종류에 따라서 해당 상황에 적절한 공포 행동을 증가시키는지 아니면 동결 반응만 증가시키는지 여부를 입증해 줄 것이다.

방 법

피험동물

CGRP유전자 발현 시 Cre 재조합효소를 발현하도록 만들어진 암수 *Calca-Cre* 마우스(C57BL/6J 계통)를 미국 잭슨 연구소에서 구매하였다(품종번호: 033168). 12시간 주기로 밤낮(오전 7시에 낮주기 시작)이 변하면서 항온 항습이 가능한 사육실에서 이 동물들을 교배하였다. 생후 3-6개월 정도 자란 39마리의 암수 마우스들을 대상으로 고려대학교 동물 실험윤리 위원회의 절차에 따라서 행동실험을 실시하였다.

시술

Isoflurane을 사용하여 개별 동물들을 흡입마취한 후 뇌수술 장비(Model 942, Kopf Instruments)에 동물의 머리를 고정시켰다. PBN에 접근할 수 있도록 두개골 표면에 구멍을 만들었다. 해밀턴 정밀 주사기(7105KH, Hamilton Company)를 이용하여 브레그마에서 후측으로 5.0mm, 좌우측으로 ± 2.9 mm, 그리고 복측으로 4.6mm에 위치한 영역에 0.4 μ 의 바이러스(adeno-associated virus, 이하 AAV)를 주입하였다(그림 1A). 실험집단에 투여한 AAV는 Cre 재조합효소를 보유한 뉴런들에서 파란색 레이저 빛(473nm)에 반응하는 흥분성 광수용체(channelrhodopsin-2, ChR2)를 발현하는 유전자와 식별용 형광 단백질(eYFP)을 보유하고 있다. 통제집단의 경우 ChR2없이 eYFP유전자만 가지고 있는 AAV를 투여하였다. 투여 시점으로부터 10분간 주사기를 움직이지 않고 기다림으로써 AAV가 주사기로부터 널리 확산되도록 하였다. 그리고 광섬유(200 μ m 지름)를 바이러스를 투여한 곳으로부터 0.4mm 위에 이식하였다. 광섬유는 2개의 지지용 나사와 치과용 시멘트를 사용하여 두개골에 고정시켰다. 모든 동물들은 시술 후 2주간의 회복 기간을 부여받았다.

전기 충격을 이용한 공포 조건화

실험에 사용한 사각형 상자(21.6 X 17.8 X 12.7cm; Med Associates)는 투명 아크릴로 만들어졌으며, 철제망 바닥과 한쪽 벽면의 스피커를 구비하고 있었다(그림 2B). 바닥의 전기 충격과 스피커의 소리 자극은 컴퓨터 소프트웨어

어(Med-PC V, Med Associates)를 통해 자동으로 제시할 수 있도록 프로그래밍하였다. 공포 조건화 첫 번째 날은 CS에 대한 적응훈련이었다. 아크릴 상자 안에 흰색 플라스틱 상자(20 X 16 X 12cm)를 삽입하여 동물들이 철망 바닥과 접촉할 수 없는 환경을 구축하였다. 그리고 개별 동물을 상자에 넣고 2분 후부터 3번의 CS(6kHz; 80dB; 10초)를 90초 간격으로 들려주었다. 실험 종료 후 상자를 70% 에탄올을 사용하여 청소하였다. 둘째 날은 CS와 US를 연합하는 공포 조건화를 실시하였다. 철제망 바닥이 노출된 아크릴 상자를 사용하였고, 또한 철제망 바닥 밑에 1% 아세트산 용액을 떨어뜨려 공포 조건화 환경이 다중 감각적으로 적응훈련시의 환경과 다르게 지각될 수 있도록 하였다. 그리고 개별 동물을 상자에 넣고 2분 후부터 10초의 CS와 0.5초의 US(0.2mA의 전기 충격)가 동시에 끝나도록 제시하는 연합 훈련을 90초 간격으로 6번 실시하였다. 이 전기 충격은 중간 정도의 강도로 마우스에게 30-40% 정도의 공포 반응을 유발하는 것으로 알려져 있다(Fellinger et al., 2021; Jo, 2020; Jo & Choi, 2016). 실험이 끝난 후 아세트산 용액으로 철제망과 상자를 청소하였다. 마지막 셋째 날은 CS에 대한 공포 기억을 측정하였다. 첫 번째 날과 동일하게 마우스를 흰색 플라스틱 상자에 넣고 CS를 3번 들려주었다.

실험을 진행하는 동안 상자 위에 설치된 비디오카메라를 통해 동물들의 행동을 녹화하였다. 행동분석용 소프트웨어(ANY-maze, Stoelting Co.)를 이용하여 동물들의 이동속도를 사후 측정하였다. CS에 대한 공포 행동으로 동결 반응(freezing)과 도망 반응(flight)을 분석하였다. 전자는 최소 0.8초간 0.75cm/s 속도 이하로 거의 움직이지 않는 시간을, 후자는 갑작스럽게 8cm/s 이상의 속도로 빠르게 도망가는 움직이는 빈도로 정의하였다(Fadok et al., 2017).

추격로봇을 이용한 공포조건화

도넛 모양으로 만들어진 하얀색 아크릴 통로(도넛장비; 18cm 넓이, 40cm 높이, 60cm 지름) 안에서 빠르게 움직이는 사다리꼴 모양의 추격 로봇(바깥쪽 길이 16cm, 안쪽 길이 12cm, 높이 19cm)을 이용하여 공포 조건화 실험을 진행하였다(Lee et al., 2018; 그림 3B). 추격 로봇은 벽면을 따라 58cm/s의 속도로 이동할 수 있도록 네 바퀴와 옆면 롤러를 장착하고 있으며, CS(2kHz; 70dB; 10초)를 제시할 수 있는 스피커를 탑재하고 있었다. 추격 로봇의 작동은 블루투스용 아두이노(Arduino)을 활용하여 원격으로 제어하였다. 공포 조건화 전후로 새로운 환경에서 CS에 대한 공포 반응을 측정하기 위해서 사각형 상자(30 X 27 X 20cm)를 추가

적으로 이용하였다. 실험실의 천장에 비디오카메라를 부착하여 동물들의 행동을 기록하였다.

공포 조건화 실험의 첫 번째 날은 CS에 대한 적응훈련을 실시하였다. 개별 마우스를 사각형 상자에 넣고 3분의 탐색 시간을 부여한 후, 4번의 CS를 60초 간격으로 제시하였다. 이때 추격 로봇은 상자의 바깥에 위치하여 동물들이 추격 로봇을 볼 수 없도록 하였다. 두 번째 날은 공포 조건화로, 도넛 장비 안에 추격 로봇과 동물을 넣고 3분간의 탐색하는 시간을 제공하였다. 그리고 10초의 CS와 3초의 추격 로봇 움직임이 동시에 끝나도록 설계된 연합 훈련을 60초 간격으로 8번 실시하였다. 추격 로봇은 빠른 속도로 마우스를 쫓아가서 충돌하거나 밀치는 육체적 위협을 가하였다. 사전 실험에 따르면 CS와 추격 로봇을 8번 짝지어 제시하였을 때 정상 동물들은 CS에 대하여 대략 30-40%의 동결 반응을 보였다. 이 조건화 절차는 전기 충격을 이용한 공포 조건화를 받았을 때와 유사한 수준의 동결 반응을 유발하였고, CGRP 뉴런들을 자극하였을 때 추가적인 공포 행동의 상승을 관찰하기에 적당한 수준이었기 때문에 선정되었다. 마지막 셋째 날은 CS에 대한 공포 행동을 측정하였다. 마우스를 사각형 상자에 넣고, 3분 후부터 60초 간격으로 CS를 4차례 제시하였다. 이렇게 3일간의 공포 조건화를 마치고 동물들의 동결과 도망 반응을 사후 분석하였다.

광유전학 CGRP활성화

수술에서 회복된 모든 동물들을 대상으로 광유전학 처치가 잘 작동하는지 검증하는 실험을 가장 먼저 실시하였다. 마우스 머리에 이식된 광섬유를 광케이블에 연결하고, 해당 동물을 사육용 상자에 놓았다. 3분의 탐색 및 적응 시간을 제공한 후, 30초간 40Hz의 파란빛을 60초 간격으로 4번 PBN에 비추었다. 동물의 행동을 녹화하고 빛이 제시될 때 동물의 행동을 사후 분석하였다.

위 실험으로부터 3-5일 후에 동물들은 할당된 집단에 따라 전기 충격 또는 추격 로봇을 이용한 공포 조건화 실험을 받았다. 조건화 동안 CGRP뉴런들을 광유전학적으로 자극하기 위해서, 동물의 머리에 있는 광섬유와 레이저 광원(473nm; Laserglow Technologies)을 광케이블로 연결하였다. 이 광케이블의 중간에 회전형 부품(rotary joint)을 부착하여 광케이블이 꼬이는 것을 방지하였다. US가 제시되는 시간 동안 5ms의 파란빛(10-12mW 강도)을 40Hz로 제시하였다.

면역조직화학적 염색

모든 행동실험이 끝난 뒤, CGRP뉴런들의 ChR2 발현 상태와 광섬유의 위치를 확인하기 위한 조직 검사를 실시하였다. 마취제(pentobarbital sodium)를 동물들에게 복강 주사한 후, 심장을 통해 생리식염수와 4% 포르말린 용액을 각각 환류하였다. 뇌를 추출하고 포르말린 용액에 24시간 냉장 보관하였다. 그리고 뇌를 30% 설탕이 든 생리식염수로 옮기고 최소 3일간 냉장 보관하였다. 미세절편기(CM1850, Leica Biosystems)를 이용하여 30µm 두께의 관상 단면으로 뇌를 잘랐다. 뇌 절편을 유리 슬라이드에 올리고, 형광용 봉입제(Fluoromount-G, Southern Biotech)를 뿌리고 덮개유리를 씌웠다. 공기중에서 2일 건조시킨 후, 형광현미경(EVOS M5000, Thermo Fisher Scientific)으로 뇌 절편들을 관찰하였다.

결 과

실험 1. 전기충격을 이용한 공포조건화에서 CGRP뉴런들의 활성화 효과

Calca 유전자 발현 시 Cre도 함께 발현되도록 만들어진 *Calca-Cre* 마우스들을 무작위로 두 집단으로 나누었다. 두 집단의 PBN에 각각 AAV-DIO-ChR2-eYFP 또는 AAV-DIO-eYFP를 주입하여 ChR2집단(전자)과 eYFP집단(후자)을 구성하였다(그림 1A-B). 그림 1B에서 보는 바와 같이 이 바이러스들은 CGRP뉴런들이 존재하는 PBN 영역에서 ChR2-eYFP 또는 eYFP를 발현시켰다. 총 21마리 동물 중에서 바이러스 발현에 실패한 3마리를 제외하고, 각 집단당 9마리의 행동 결과를 분석하였다.

기존 논문에 따르면 CGRP뉴런들의 활성화는 동물들의 동결 반응을 증가시킨다고 알려져 있다(Bowen et al., 2020; Han et al., 2015). 따라서 이 동물들의 PBN에 40Hz의 파란빛을 30초간 제시하여 행동적 측면에서 CGRP뉴런들의 활성화 효과가 나타나는지 확인하는 실험을 진행하였다(그림 2A). 빛은 eYFP집단의 행동에 아무런 영향을 미치지 못하였

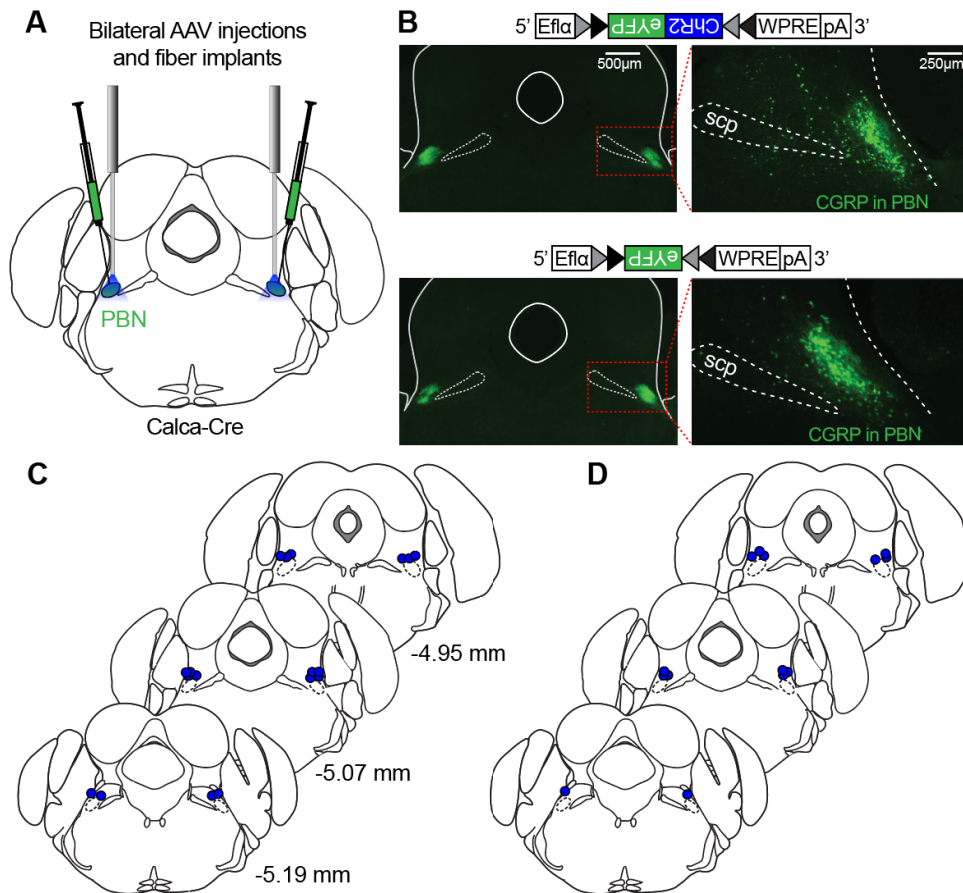


Figure 1. Optogenetic manipulations of CGRP neurons in the PBN. (A) Schematic of bilateral injections of AAV-DIO-ChR2-eYFP or AAV-DIO-eYFP followed by fiber implants in the PBN of *Calca-Cre* mice. (B) Expression of ChR2-eYFP (top; ChR2 group) and eYFP (bottom; eYFP group) in the PBN. scp, superior cerebellar peduncle. (C-D) Locations of fiber tips in ChR2 group used in the first (C) and second (D) experiments.

으나, ChR2집단에서는 평균적으로 80% 이상의 높은 동결 반응을 초래하였다. 4번의 빛 제시에 대한 동결 반응을 반복 측정변량분석한 결과 ChR2집단의 동결 반응은 eYFP집단에 비해서 유의미하게 높았다($F(1,16) = 529.6, p < 0.001$). 이 결과를 통해 광유전학적으로 CGRP뉴런들을 자극하는 기법은 정상적으로 작동하며, CGRP뉴런들의 활성화는 동결 반응을 두드러지게 일으킨다는 것을 재확인하였다.

다음으로 청각 CS와 발바닥 전기 충격 US(0.2mA)를 연합하는 일반적인 공포 조건화 동안 CGRP뉴런들의 광유전학적 활성화가 공포 반응에 미치는 영향을 확인하는 실험을 진행하였다(그림 2B). CGRP뉴런들은 US에 의해 활성화된다고 알려져 있으므로(Kang et al., 2022), US가 제시되는 시간대에 40Hz의 빛을 제시하여 CGRP뉴런들의 활성도를 높이는 처치를 가하였다. CS와 US를 연합하는 횟수가 많아질수록 두 집단 모두 높은 동결 반응을 보였다(반복측정변량분석,

연합 횟수 효과, $F(5,80) = 21.33, p < 0.001$; 그림2C). 특히 ChR2집단은 eYFP집단을 능가하는 강한 동결 반응을 나타냈다(집단효과, $F(1,16) = 5.21, p = 0.03$). 이는 CGRP뉴런들의 활성화가 공포 행동의 강도를 증가시켰음을 의미한다. 동결 반응 뿐만 아니라 공포 행동의 다른 지표인 도망 반응도 분석하였다(그림 2D). 연합 횟수나 집단에 따라서 도망 반응의 차이는 발견할 수 없었다(연합횟수효과, $F(5,80) = 0.75, p = 0.59$; 집단효과, $F(1,16) = 0.12, p = 0.73$).

공포 조건화 전후로 전기 충격용 철허마미 없는 환경(그림 2B의 오른쪽 상자)에서 CS에 대한 공포 행동의 변화를 분석하였다. 도망 반응의 경우 공포기억을 측정한 시기(pre와 post)나 집단에 따른 유의미한 변화를 관찰할 수 없었다(반복측정변량분석, $F(1,16) < 2.06, p \text{ values} > 0.17$; 그림 2F). 반면 동결 반응은 공포 조건화를 마친 후 유의미하게 증가하였으며($F(1,16) = 176.58, p < 0.001$; 그림 2E), 특히

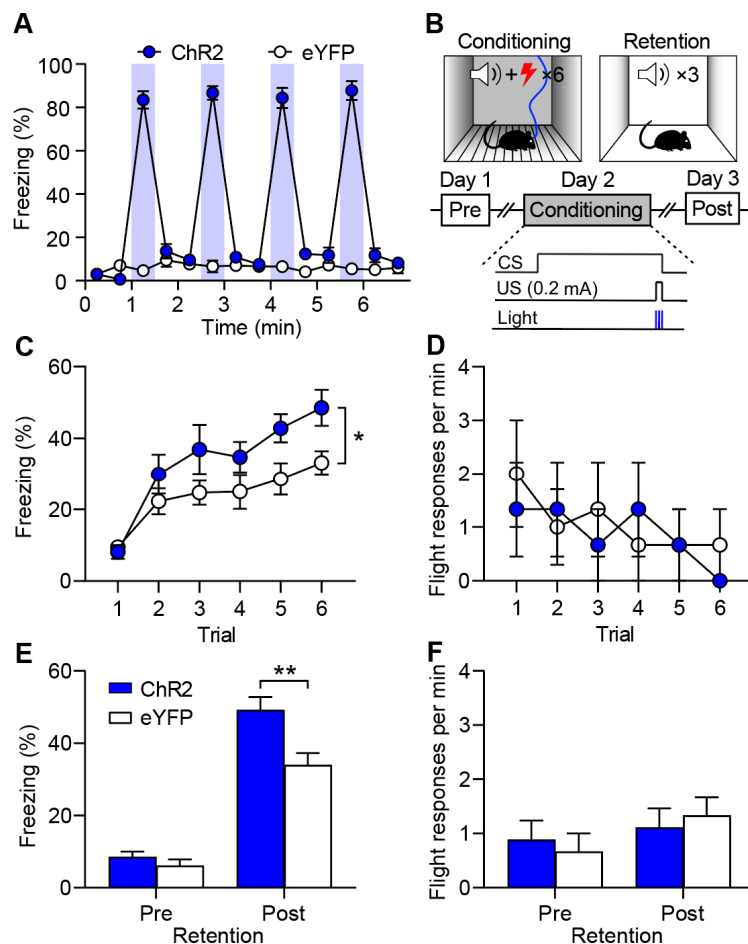


Figure 2. Stimulation of CGRP neurons during conventional fear conditioning with a footshock as US. (A) Freezing responses to optical stimulation of CGRP neurons in freely moving mice. Blue light was presented for 30 s at 40 Hz in the shaded areas. (B) Experimental procedures. Fear conditioning was conducted on day 2 in which CGRP neurons were optically stimulated during the presentation of US. Two retention tests (pre and post) were performed in a different context to examine animals' fear memory in response to CS before and after fear conditioning. (C–D) Freezing (C) and flight (D) responses during fear conditioning. (E–F) Freezing (E) and flight (F) responses in two retention tests. **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$.

ChR2집단의 동결 반응이 eYFP집단에 비해서 높았다(상호작용 효과, $F(1,16) = 6.19, p = 0.02$; 본페로니 사후비교, $p = 0.006$). 따라서 이러한 결과들은 전기충격을 이용한 공포 조건화를 할 때 CGRP뉴런들의 활성화는 도망보다는 동결 반응 우선적인 공포 행동을 증가시킨다는 것을 알려준다.

실험 2. 추격로봇을 이용한 공포조건화에서 CGRP뉴런들의 활성화 효과

동물에게 위협적으로 다가가 충돌하는 추격 로봇을 이용하여 공포 기억을 형성하는 동안 CGRP뉴런들의 활성화가 공포 행동에 미치는 영향을 알아보기 위해서 두 번째 실험을 진행

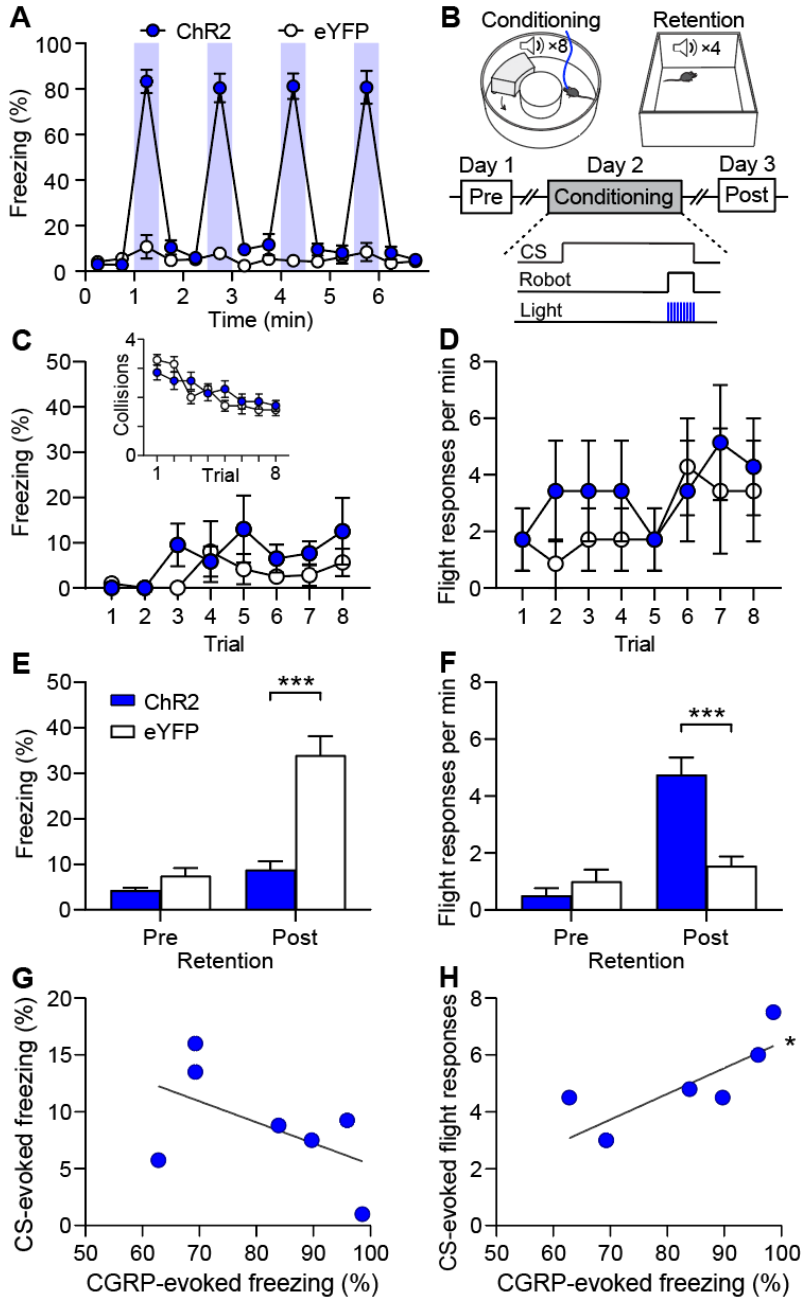


Figure 3. Stimulation of CGRP neurons during fear conditioning with a chasing robot as US. (A) Freezing behavior in response to CGRP stimulation. (B) Conditioning procedures. CGRP neurons were activated during the running of the chasing robot. Fear responses to CS were measured in retention tests before and after fear conditioning. (C-D) Changes in freezing (C) and flight (D) responses across trials during fear conditioning. The inset in (C) showed the number of collisions between mice and the chasing robot. (E-F) Freezing (E) and flight (F) responses to CS in retention tests. (G-H) Correlations between the magnitude of CGRP stimulation and defensive behavior evoked by CS in the post-retention test. The behavioral consequences resulting from CGRP stimulation (i.e., freezing) in (A) were used as the indicators of CGRP activation during fear conditioning. The magnitude of CGRP stimulation was significantly correlated with flight responses (H), but not freezing behavior (G). *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$.

하였다. 총 18마리의 *Calca-Cre* 마우스를 대상으로 광유전 학용 바이러스를 투여하고 광섬유를 이식하였다. 바이러스 발현에 실패하거나 실험을 끝마치기 전에 광섬유가 빠져버린 동물들을 제외하고, 7마리씩 ChR2집단과 eYFP집단을 구성 하였다. 광유전학적 활성화가 정상적으로 작동하는지 확인하 기 위해서 30초의 파란빛을 CGRP뉴런들에게 제시하였다(그 립3A). eYFP집단에 비해서 ChR2집단은 80% 이상의 높은 동결 반응을 보인다는 것을 확인하였다(반복측정변량분석, $F(1,12) = 167.4$, $p < 0.001$).

이 두 집단을 대상으로 청각 CS와 빠르게 움직이는 추격 로봇 US(3초)를 연합하는 공포 조건화를 실시하였다(그림 3B). 추격 로봇이 작동하는 동안 파란빛을 제시하여 CGRP 뉴런들을 활성화하는 처치를 가하였다. 공포 조건화 동안 CS에 대해 동결 반응을 보이는 경향성은 다소 높아졌으나, 반복측정변량분석의 결과에 따르면 통계적 유의성에는 도달 하지 못하였다(연합횟수효과, $F(7,84) = 1.6$, $p = 0.14$; 그림 3C). 또한 ChR2와 eYFP 집단간 통계적 차이도 발견되지 않았다(집단효과, $F(1,12) = 3.58$, $p = 0.08$). 반면 동물들은 연합 횟수가 증가할수록 CS에 대해 유의미하게 많은 도망 반응을 보였다(횟수횟수효과, $F(7,84) = 2.3$, $p < 0.01$; 그림 3D). CGRP뉴런들의 활성화 여부에 따른 도망 반응의 차이는 없었다(집단효과, $F(1,12) = 0.28$, $p = 0.6$). CS에 반응 하여 도망가는 빈도가 많아질수록 동물들이 추격 로봇과 충돌하는 빈도는 반대로 유의미하게 감소하였다(연합횟수효과, $F(1,12) = 14.99$, $p < 0.001$; 그림3C의 삽화). 충돌 빈도의 집단 간 차이는 없었으며(집단효과, $F(1,12) = 0.1$, $p = 0.76$), 공포 조건화 후반부에 두 집단 모두 추격 로봇과 평균 1.6회 충돌하였다. 이러한 결과들은 추격 로봇을 사용한 공포 조건화에서 동물들은 동결보다는 도망 반응 위주로 공포 행동을 보였음을 알려준다.

공포 조건화 전후로 추격 로봇과 연합되지 않은 중립적 환경(그림 3B의 오른쪽 상자)에서 CS를 제시하며 공포기억을 측정하였다. 동결 반응에 대한 반복측정변량분석을 실시한 결과 유의미한 집단 간 차이를 발견하였다(집단효과, $F(1,12) = 24.69$, $p < 0.001$; 그림 3E). 본페로니 사후비교를 이용하여 추가 분석을 한 결과, 공포 조건화 이후 eYFP 집단이 ChR2집단에 비해 CS에 대해 유의미하게 높은 동결 반응을 보였다($p < 0.001$). ChR2집단의 동결 반응은 10% 미만으로, 공포기억을 제대로 형성하지 못했을 의구심이 들 정도로 낮았다. 그러나 도망 반응을 측정한 결과 ChR2집단은 CS에 대해서 동결이 아니라 뛰어서 도망가는 반응을 보였다는 것을 확인하였다(그림 3F). 통계분석을 통해 공포 조

건화 이후 진행한 기억검사에서 ChR2집단이 eYFP집단에 비해서 유의미하게 많은 도망 반응을 보였음이 밝혀졌다(집단효과, $F(1,12) = 10.79$, $p = 0.007$; 본페로니 사후비교, $p < 0.001$). 이 결과는 공포 조건화 동안 CGRP뉴런들의 활성화도를 높이는 처치가 동물의 공포기억을 변형시켜 도망 반응 위주로 공포 행동을 표현하도록 영향을 미쳤음을 보여준다.

추가적으로 CGRP뉴런들의 활성화와 도망 반응 사이의 관련성을 확인하기 위하여, CGRP뉴런들이 강하게 활성화된 동물일수록 도망 반응의 빈도가 높아지는지 여부를 분석하였다. 공포 조건화를 실시하기 전에 CGRP뉴런들을 30초간 자극하면서 동결 반응을 측정한 그림 3A의 데이터는 광유전학에 의한 CGRP뉴런들의 활성화 정도를 보여주는 직접적인 행동지표이다. 이를 활용하여 추격 로봇이 작동할 때 개별 동물들에게 가해진 CGRP 뉴런들의 활성화 강도를 유추할 수 있다. 피어슨 상관분석을 통해 CGRP뉴런들의 활성화도가 높았던 동물일수록 유의미하게 많은 도망 반응을 보였음을 확인하였다($r(7) = 0.81$, $p = 0.03$). 반대로 CGRP뉴런들의 활성화도가 높았던 동물일수록 낮은 동결 반응을 보이는 경향이 있었으나, 통계적 유의미성에는 도달하지 못하였다($r(7) = -0.54$, $p = 0.21$). 이러한 결과는 추격로봇과 함께 제시된 CGRP뉴런들의 자극이 도망 반응을 위주로 공포 행동을 조건화하는 데 중요한 역할을 했음을 시사한다.

논 의

비교적 최근인 2015년에 PBN의 CGRP뉴런들이 US 정보를 표상하여 공포기억을 형성하는 데 필수불가결한 역할을 한다는 연구결과가 발표되었다(Han et al., 2015). 이 논문은 CGRP뉴런들이 전기 충격을 받을 때 활성화되며, 인위적으로 CGRP뉴런들을 자극하면 동결 반응을 유발할 수 있고 심지어 CS와 연합을 통해 공포기억까지 만들 수 있다고 보고 하였다. 이후 칼슘 이미징 기법을 이용한 후속 논문들은 공포 조건화 동안 CGRP뉴런들이 CS보다는 US에 의해서 활성화되며, 비단 전기 충격만이 아니라 뜨거운 열이나 복통, 불쾌한 냄새와 같은 다양한 혐오자극에 대해서도 CGRP뉴런들이 활성화되는 반응을 보이는 것으로 알려졌다(Campos et al., 2018; Kang et al., 2022). 이러한 결과들에 기반하여 CGRP뉴런들은 개체의 여러 감각기관을 통해 들어오는 혐오자극을 표상하고 편도체와 같이 정서를 처리하는 주요 뇌 영역들로 종합적 위험신호를 보내는 역할을 하는 것으로 여겨지고 있다(Palmiter, 2018). 이 제안에 따르면 CGRP뉴런들은 고온, 복통, 또는 추격해 오는 포식자와 같이 다양한 혐

오자극의 특성을 반영한 위험신호를 전달하여 해당 상황에 적절한 정서반응을 일으킬 것으로 예상할 수 있다. 그러나 지금까지 발표된 모든 실험에서 CGRP뉴런들을 자극하였을 때 동물들은 일관되게 동결하는 반응만을 보였다(Bowen et al., 2020; Han et al., 2015). 이러한 점에 착안하여 본 실험은 상이한 US를 사용하여 공포 조건화를 실시하였을 때 CGRP뉴런들의 활성화 상승이 US의 유형에 적합한 공포 행동을 유발할 수 있는지 검증하였다.

일반적인 공포 조건화는 발바닥 전기 충격을 US로 사용한다. 전기 충격은 상자의 바닥에 있는 철망을 통해서 전달되고, 동물들은 공포 조건화 상자 안에서 머무는 내내 철망과 접촉해 있다가 간헐적으로 CS와 함께 전기 충격을 받는 상황을 경험한다. 이러한 실험에서 설치류 동물들은 주된 공포 행동으로서 동결 반응을 보인다는 사실이 수많은 논문들을 통해서 입증되었다(Fellinger et al., 2021; Jo et al., 2018; LeDoux, 2003). 동물들의 관점에서 얼핏 안전해 보였던 철망에서 갑작스레 전기 충격을 받기 때문에 혐오자극의 존재나 발생 요인이 불명확하여 동결 행동 우위의 공포 반응을 보이는 것으로 판단된다(Fanselow, 2018). 본 실험의 동물들 역시 전기 충격을 이용한 공포 조건화에서 도망 반응이 아닌 동결 반응을 우세하게 사용하였다. 또한 CGRP뉴런들을 활성화하는 처치는 ChR2집단의 동결 반응 수준을 통제집단인 eYFP집단에 비해 유의미하게 높게 증가시켰다. 이는 전기 충격에 반응하는 CGRP뉴런들의 활성도를 인위적으로 강화시켰기 때문에 US에 대한 위험신호가 높아져서 동결 반응의 증가를 유도한 것으로 보인다.

추격 로봇을 이용한 공포 조건화는 생태학적 측면에서 야생에 존재할 만한 포식자를 모사한 로봇을 US로 사용하여 공포기억을 형성하는 절차이다(Lee et al., 2018). 추격 로봇은 동물에게 빠른 속도로 다가가 밀쳐대는 위협을 가하기 때문에, 정상 동물들은 추격 로봇이 존재하는 상황에서 도망 반응을 주로 보이고, 추격 로봇 없이 CS만 제시되는 상황에서는 동결 반응을 주로 표출한다고 알려져 있다. 본 실험 결과에서도 유사한 공포 행동이 관찰되었다. 공포조건화를 진행하는 동안 마우스들은 두 가지 공포행동 중에서 도망 반응을 우세하게 보였다. 가만히 동결 반응을 보이던 추격 로봇과 부딪히는 빈도가 높아지기 때문에 도망가는 행동의 빈도를 높인 것으로 판단된다. 공포 조건화 동안 CGRP뉴런들을 자극하면 위험신호를 높여 도망 행동의 빈도를 높일 것으로 예상하였으나, ChR2와 eYFP집단 간에 통계적 차이는 발견하지 못하였다. 개별 동물들의 데이터를 확인해 본 결과, 일반적으로 8cm/s 이상의 속도로 도망가는 반응을 한번 시작

하면 계속해서 움직이는 경우가 많았고, 일부 동물의 경우 잠시 멈추었다가 두 번째 도망 반응을 보였다. 한 번의 CS가 제시되는 동안에 최고로 많이 관찰된 도망 반응의 횟수는 2번(1분당으로 환산했을 때 12번)이었다. 따라서 이미 모든 동물들이 높은 수준의 도망 반응을 보이고 있었기 때문에, CGRP뉴런들의 활성화를 통해 위험신호를 높였음에도 불구하고 도망 반응의 증가를 관찰하지 못했을 가능성이 있다.

CGRP뉴런들의 활성화 여부에 따른 차이는 공포 조건화 다음 날 CS에 대한 공포 반응을 측정된 결과에서 확인하였다. ChR2집단은 CS에 대해 동결보다 도망 위주로 공포 행동을 표현하였으나, 통제집단인 eYFP집단은 반대로 동결 반응을 더 많이 보였다. 추격 로봇을 직접적으로 관찰할 수 없는 상황에서 이와 연합된 CS만 제시되었기 때문에 eYFP집단처럼 동결 행동의 비중이 높은 것이 설치류의 일반적인 공포 행동이다(Fanselow, 2018). 따라서 ChR2집단에서 관찰된 공포 행동의 변화는 공포 조건화 시 추격 로봇과 함께 가해진 CGRP뉴런들의 자극 때문인 것으로 판단된다. 도망 행동이 증가한 이유로 여러 가지 가능성을 고려해볼 수 있다. 우선 첫 번째로 추격 로봇에 대한 위험신호를 상승시킴으로써 동물들이 위협적으로 쫓아오는 US정보를 더 명확히 저장했을 가능성이 있다. 즉 eYFP집단은 CS와 위험간의 연합을 기억하여 동결 반응을 보였다면, ChR2집단은 CS와 추격로봇의 쫓아오는 움직임 사이의 연합을 기억하여 도망가는 반응으로 공포기억을 나타냈을 수 있다. 두 번째로 추격 로봇과 함께 위험신호를 증가하였기 때문에 편도체의 여러 출력 회로 중에서 도망 반응을 유발하는 회로가 선택적으로 강화되었을 가능성이 있다. 따라서 eYFP집단은 CS를 듣고 현 상황에 가장 적절한 공포 행동을 선택하는 반면 ChR2집단은 CS에 의해 도망 위주로 반응하도록 공포기억이 형성되었을 수 있다. 마지막으로 CGRP뉴런들의 활성화로 인해 ChR2집단의 움직임이 느려지고 그 결과 추격 로봇과의 충돌이 더 많아지면서 도망 반응이 강화되었을 가능성이 있다. 하지만 공포 조건화동안 두 집단이 추격 로봇과 충돌한 횟수에 차이가 없는 것을 감안하였을 때 이 가능성은 낮은 것으로 판단된다. CGRP뉴런들의 자극이 어떠한 기전을 통해서 도망 반응 증가를 유발했는지 불명확한 상황이다. 그러나 ChR2집단 내에서 CGRP뉴런들이 강하게 자극되었던 동물일수록 더 강한 도망 반응을 표현하였다는 사실은 CGRP뉴런들의 활성화와 도망 반응의 사이의 직접적 연관성을 시사해 준다.

설치류 동물들이 자유롭게 활동하는 상황에서 CGRP뉴런들을 인위적으로 자극하면 동결 행동이 우선적으로 표출된다(그림 2A와 3A). 이 사실은 CGRP뉴런들의 활성화를 통해

위험신호를 발생시켰을 때 기본적으로 우세한 행동표현은 동결 반응임을 의미한다. 현재 알려져 있는 CGRP뉴런들이 혐오자극에 대한 위험신호를 전달하는 역할을 한다는 기존 제안을 확장하여(Palmiter, 2018), 본 실험 결과는 혐오자극의 유형에 따라 수동적 동결 반응이나 능동적 도망 반응을 유발할 수 있는 적응적 위험신호로서 CGRP뉴런들이 기능을 시사해 준다. 단일 공포 조건화를 진행하면서 동결과 도망 반응 모두를 유발할 수 있는 실험절차를 후속 연구에서 활용한다면(Fadok et al., 2017), CGRP뉴런들이 공포 행동에 기여하는 역할을 보다 구체적으로 이해할 수 있을 것으로 기대한다.

References

- Bowen, A. J., Chen, J. Y., Huang, Y. W., Baertsch, N. A., Park, S., & Palmiter, R. D. (2020). Dissociable control of unconditioned responses and associative fear learning by parabrachial CGRP neurons. *Elife*, 9.
- Campos, C. A., Bowen, A. J., Roman, C. W., & Palmiter, R. D. (2018). Encoding of danger by parabrachial CGRP neurons. *Nature*, 555(7698), 617-622.
- Fadok, J. P., Krabbe, S., Markovic, M., Courtin, J., Xu, C., Massi, L., Botta, P., Bylund, K., Muller, C., Kovacevic, A., Tovote, P., & Luthi, A. (2017). A competitive inhibitory circuit for selection of active and passive fear responses. *Nature*, 542(7639), 96-100.
- Fanselow, M. S. (2018). The role of learning in threat imminence and defensive behaviors. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, 24, 44-49.
- Fellinger, L., Jo, Y. S., Hunker, A. C., Soden, M. E., Elum, J., Juarez, B., & Zweifel, L. S. (2021). A midbrain dynorphin circuit promotes threat generalization. *Current Biology*, 31(19), 4388-4396.
- Han, S., Soleiman, M. T., Soden, M. E., Zweifel, L. S., & Palmiter, R. D. (2015). Elucidating an Affective Pain Circuit that Creates a Threat Memory. *Cell*, 162(2), 363-374.
- Jo, Y. S. (2020). Corticotropin releasing factor-producing neurons in the central amygdala induces experience-dependent influences on behavior. *Korean Journal of Cognitive and Biological Psychology*, 32(4), 345-354.
- Jo, Y. S., & Choi, J. S. (2016). Effects of optogenetic activation of dopamine neurons during discriminatory fear learning. *Korean Journal of Cognitive and Biological Psychology*, 28(1), 143-155.
- Jo, Y. S., Heymann, G., & Zweifel, L. S. (2018). Dopamine Neurons Reflect the Uncertainty in Fear Generalization. *Neuron*, 100(4), 916-925.
- Johansen, J. P., Cain, C. K., Ostroff, L. E., & LeDoux, J. E. (2011). Molecular Mechanisms of Fear Learning and Memory (vol 147, pg 509, 2011). *Cell*, 147(4), 948-948.
- Kang, S. J., Liu, S. J., Ye, M., Kim, D. I., Pao, G. M., Copits, B. A., Roberts, B. Z., Lee, K. F., Bruchas, M. R., & Han, S. (2022). A central alarm system that gates multi-sensory innate threat cues to the amygdala. *Cell Reports*, 40(7).
- LeDoux, J. (2003). The emotional brain, fear, and the amygdala. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 23(4-5), 727-738.
- Lee, J. H., Kimm, S., Han, J. S., & Choi, J. S. (2018). Chasing as a model of psychogenic stress: characterization of physiological and behavioral responses. *Stress (Amsterdam, Netherlands)*, 21(4), 323-332.
- Palmiter, R. D. (2018). The Parabrachial Nucleus: CGRP Neurons Function as a General Alarm. *Trends in Neurosciences*, 41(5), 280-293.
- Seo, D. O., Lee, Y. K., & Choi, J.-S. (2006). Making of Fear: A Systematic Dissection of Pavlovian Fear Conditioning. *Korean Journal of Cognitive and Biological Psychology*, 18(1), 1-19.

방안핵 CGRP뉴런들의 활성화는 혐오자극에 적합한 방어행동을 유발하는 데 기여함

조혜원^{1,2}, 편경희^{1,2}, 조용상^{1,2}

¹고려대학교 심리학부

²고려대학교 4단계 BK21 심리학교육연구단

방안핵에 존재하는 칼시토닌 유전자관련 펩티드(calcitonin gene-related peptide, 이하 CGRP)을 발현하는 뉴런들이 다중감각적 혐오자극을 표상하여 종합적 경고신호를 만드는데 중요한 역할을 한다고 알려졌다. 기존에 발표된 논문들은 공통적으로 CGRP뉴런들의 경고신호를 인위적으로 높였을 경우, 여러 다양한 공포행동 중에서 동결 반응(freezing)만 유발함을 보고하였다. 그러나 CGRP뉴런들이 동결 반응 이외의 다른 공포행동도 조절할 수 있는지 여부는 아직 알려지지 않았다. 이를 검증하기 위해서 본 논문은 전기충격이나 쫓아오는 추격로봇을 혐오자극으로 사용하는 공포조건화를 진행하는 동안 마우스의 CGRP 뉴런들을 광유전학적으로 활성화시키는 처치를 가하였다. 그리고 다음 날 혐오자극과 연합된 청각 조건자극을 제시하면서 동물들이 공포기억을 어떠한 행동으로 표현하는지 관찰하였다. 전기충격과 함께 CGRP뉴런들을 활성화한 집단은 통제집단에 비해 유의미하게 높은 동결 반응을 보였다. 반면 추격로봇과 함께 CGRP뉴런들을 자극하는 처치를 받은 집단은 통제집단에 비해 도망가는 반응(flight)을 유의미하게 많이 보였다. 이러한 실험결과는 CGRP뉴런들이 혐오자극의 유형에 따라서 해당 위험 상황에 적합한 공포 반응을 표현하는 데 기여함을 시사한다.

주제어: CGRP뉴런, 방안핵, 공포조건화, 동결, 도망, 방어행동