

수면 조절을 위한 광유전학 신경조절

이유진^{1,2}, 이예나¹, 황서영¹, 문서연^{1,2}, 전상범^{1,2,3*}

이화여자대학교 전자전기공학과¹

이화여자대학교 스마트팩토리융합전공²

이화여자대학교 뇌인지과학과³

Optogenetic stimulation on rat brain for sleep modulation

Youjin Lee^{1,2}, Yena Lee¹, Seoyoung Hwang¹, Suh-Yeon Moon^{1,2}, Sang Beom Jun^{1,2,3*}

¹Department of Electronic and Electrical Engineering, Ewha Womans University, Korea

²Graduate Program in Smart Factory, Ewha Womans University, Korea

³Department of Brain and Cognitive Sciences, Ewha Womans University, Korea

*juns@ewha.ac.kr

Abstract

Sleep is essential not only for physical and mental recovery, but also for controlling physical functions or improving cognitive functions and long-term memory. The main sleep related neural circuit is cortical-thalamic circuit. Slow oscillation in cortical and thalamic networks involves the synchronous firing of neurons, and mediate recovery of cognitive functions. In particular, cortical slow waves play a major role in synaptic plasticity and memory consolidation during sleep. Therefore, we are attempting to optogenetically control neural activities to induce slow waves and modulate sleep patterns. In this study, excitatory neurons in rat mPFC (medial prefrontal cortex) are targeted for optical stimulation on the neurons expressing channelrhodopsin-2. As a result, neural signals are activated in synchronization with light pulse duration, and their activities induce cortical slow waves. This result is expected to be useful for sleep modulation and finding an effective neuromodulation approach for improving the quality of sleep.

1. 연구 배경

수면은 신체적·정신적 회복뿐 아니라 에너지 대사의 성장·보존 등 신체기능을 조절하거나 면역기능, 특히 인지·감정기능과 장기기억력을 강화해 건강을 유지하는 데도 필수적이다. 수면 부족은 대사장애, 심혈관 질환 및 알츠하이머 병의 위험을 증가시킬 수 있다[1]. 따라서 수면 관련 뇌 회로를 조절하기 위해 뇌 자극을 통해 수면의 질을 높이기 위한 다양한 연구가 진행되고 있다. 수면과 관련된 뇌 영역으로는 medial prefrontal cortex (mPFC), thalamus reticular nucleus (TRN), hippocampus 등이 주로 연구되고 있지만, 수면과 각성 조절을 위한 정확한 신경 메커니즘은 아직 명확하게 밝혀지지 않았다[2].

수면 단계에 따라 대뇌 피질에는 독특한 모양의 파형이 나타난다. 눈렘수면 (NREM, non-rapid eye movement)에서는 4 Hz 미만의 느린 서파 (slow wave), 약 1초 동안 수백 mV의 큰 파형인 k-complex, 그리고 14 Hz 리듬을 갖고 방추형 모양을 갖는 sleep spindle 등이 나타난다. 특히, 뇌파가 느려져 가장 깊게 잠드는 서파수면(SWS, slow wave sleep)은 인지능력의 회복과 관련이 있으며, 서파수면이 부족하면 뇌에 베타 아밀로이드 수위가 높아져 알츠하이머 병의 위험이 높아진다[3].

이 연구에서는 뇌를 자극하여 서파를 유도하고 동시에 수면의 패턴 변화를 관찰하였다. 뇌를 자극하는 방법으로 광유전학이 사용되었는데, 이는 특정 종류의 신경 세포에 특정한 빛에 반응할 수 있는 옵신 단백질을 발현시킴으로써 세포를 선택적으로 자극하거나 억제할 수 있는 기술이다. 광유전학 자극의 목표 뇌 영역으로는 수면과 관련된 뇌의 핵심 영역 중 하나인 mPFC(medial prefrontal cortex)가 표적이 되었다. mPFC 영역은 TRN, thalamus와 신경신호 oscillation하여 수면-각성 조절에 관여하는 핵심 신경회로인

cortical-thalamic loop 네트워크를 형성하고 있다. 따라서 본 연구에서는 mPFC를 광유전학적 기법으로 자극하여 신경신호의 변화를 관찰하고 수면에의 영향 또한 확인하였다.

2. 연구 방법

모든 동물 실험은 이화 의과대학 연구소 동물관리위원회의 허가를 받아 수행되었다. (IACUC No. 069-1)

그림 1은 광자극을 이용한 수면조절 실험 셋업의 모식도다. 빛 자극은 이식된 광 파이버에 의해 타겟 영역인 mPFC(medial prefrontal cortex)에 조사되었고, 동시에 Intan사의 증폭기와 인터페이스 보드를 통해 신경신호가 실시간 기록되었다.

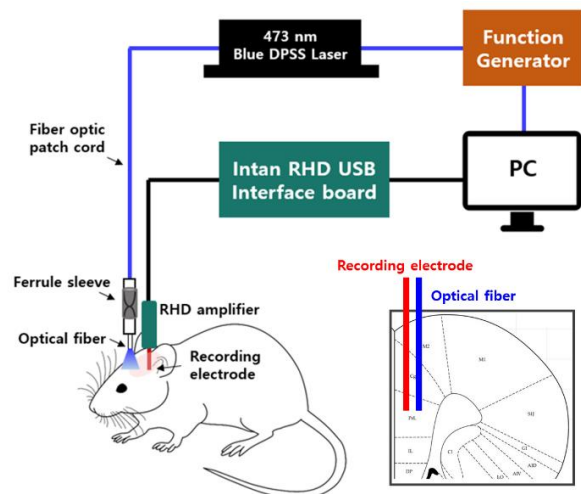


그림 1. 광 자극 및 전기생리학적 신경신호기록 개념도

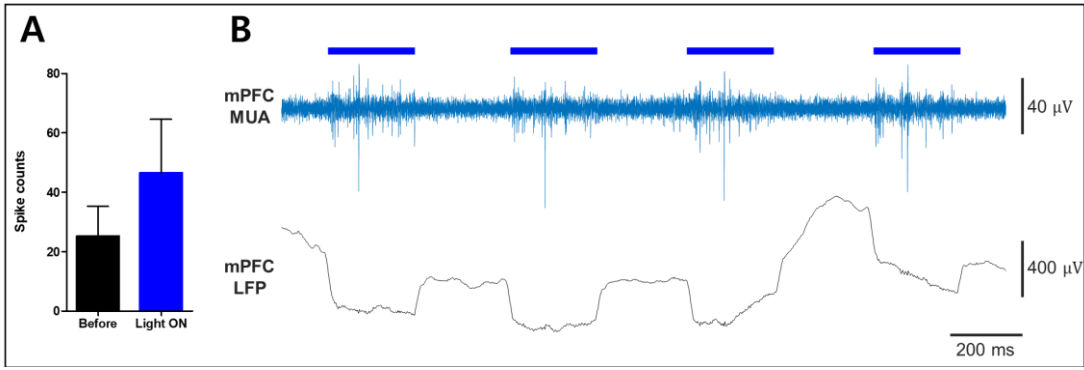


그림 2. 수면마취 상태에서 광자극 실험 결과

A: 광자극 전과 중 spike 수. B: 광자극에 의해 활성화된 MUA(Multi unit activity)와 LFP(Local field potential)의 서파

실험동물 쥐(Sprague-Dawley rat, male)는 실험 전 채널로돕신(channelrhodopsin-2, ChR2) 발현을 위해 바이러스 주입 수술이 진행된다. 1.5 μ l 바이러스 (AAV-CaMKII α -hChR2(H134R)-EYFP)는 10 μ l 해밀턴 주사기를 사용하여 15분에 걸쳐 주입하였고, 주입 5분 후 천천히 주사기 니들을 제거하였다. 바이러스는 주입 후 5주 후 발현이 되었고, 이후에 뇌정위수술을 통해 200 μ m의 광파이버와 100 μ m 텅스텐 전극이 집적된 전극을 mPFC에 삽입하였다 (AP: 2.7 mm, ML: 0.5 mm, DV: 3.6 mm). 광자극은 473 nm의 레이저를 250 ms 펄스 지속시간, 50 % 듀티 사이클, 2 Hz 펄스 주기와 4.7 mW/mm²의 강도로 조사하였다.

데이터는 20 kHz의 sampling rate으로 저장하였으며, 마취된 쥐에서 자극 전과 자극 후의 신경신호와 EEG를 분석하였고, freely moving 한 상태에서는 자극 전 1분, 자극 중 1분, 자극 후 1분의 신경신호를 기록하여 분석하였다.

3. 연구 결과

Isoflurane을 이용한 수면마취 상태에서 mPFC 영역에 광자극을 주었을 때의 반응은 그림 2와 같다. 자극 전에 비해 자극 중 spike 수가 증가하였으며, spike는 250 ms 펄스의 지속시간과 동기화되어 활성화되었다. 그 결과 서파(slow wave)가 EEG상에 유도되는 것을 확인하였다.

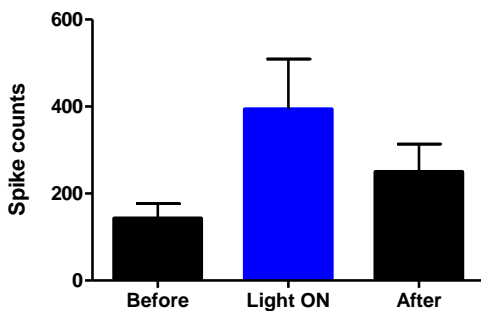


그림 3. Freely moving 상태에서 광자극 전, 중, 후 spike 수

실험 쥐의 freely moving 상태에서 위와 같은 실험을 반복한 결과, 광자극 전과 후에 비해 광자극 동안 spike 수가 증가하였다. mPFC 영역은 뇌의 수면관련 회로에서 TRN, thalamus와 함께 연결되는 cortical-thalamic 회로를 이루는 중요한 영역으로서 mPFC 영역의 활성도를 조절할 수 있다는 그림 2, 3의 결과는 광유전학 방법으로 수면 조절의 가능성을 확인했다는 점에 의의가 있다.

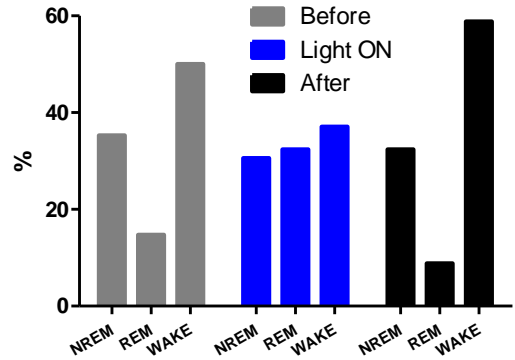


그림 4. 광자극 전, 중, 후의 수면단계 비율

따라서 수면 패턴의 변화를 광자극 전, 중, 후 동안 비교하는 실험을 다음으로 진행하였다. 그림 4는 각각의 수면상태를 NREAM, REM, WAKE상태로 구분하여 비율로 나타낸 그래프이다. 그림 4에서 볼 수 있듯이 자극 전과 후는 REM수면의 비율이 낮고 깨어있는 상태가 가장 높았으나, 광자극 중에는 REM수면의 비중이 증가하여 전체적으로 수면상태가 늘어났다. 이 결과를 통해 mPFC 영역을 광유전학 자극으로 활성화 시켜 수면을 유도할 수 있으며 특히 깊은 수면인 REM수면을 증가시켜 전반적인 수면의 질을 높일 수 있다는 가능성을 확인하였다.

4. Acknowledgements

본 연구는 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 휴먼플러스융합연구개발사업(NRF-2019M3C1B8090805)의 지원과 정부(과학기술정보통신부, 산업통상자원부, 보건복지부, 식품의약품안전처)의 재원으로 범부처전주기의료기기연구개발사업단(1711139110, KMDF_PR_20210527_0006) 지원과 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (No. 2022R1A2C2005062).

5.참고 문헌

- [1] Z. D. Yu, and G. Seelig. "Dynamic DNA nanotechnology using strand-displacement reactions." *Nature chemistry*, Vol 3, No.2, p.103-113, 2011
- [2] Q. Lulu, and E. Winfree. "Scaling up digital circuit computation with DNA strand displacement cascades." *Science*, Vol 332. No. 6034, p.1196-1201, 2011
- [3] Lee, Yee Fun et al. "Slow Wave Sleep Is a Promising Intervention Target for Alzheimer's Disease." *Frontiers in neuroscience* vol. 14 705. 30 Jun. 2020