

스트레스반응 조절에 대한
뇌 5-Hydroxytryptamine계 역할

연세대학교 대학원

의과학사업단

이 서 울

스트레스반응 조절에 대한
뇌 5-Hydroxytryptamine계 역할

지도교수 김 동 구

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2002년 12월 일

연세대학교 대학원

의과학사업단

이 서 울

이서울의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 _____

심사위원 _____

심사위원 _____

심사위원 _____

심사위원 _____

연세대학교 대학원

2002년 12월 일

감사의 글

게으르고 미련한 저를 깨어날 수 있도록, 또한 배움을 깨우치도록 일러 주시고, 보이지 않는 길을 살피가도록 혜안과 정성으로 길러주신 김동구 교수님께 감사드립니다. 논문 지도에 힘써 주신 약리학교실 안영수 교수님, 신경과학교실 이병인 교수님, 정신과학교실 고경봉 교수님, 그리고 고려대의대 약리학교실 신경호 교수님께 감사드립니다.

연세대학교 울타리 안에서 지낸 시간들이 찰나처럼 느껴지는데, 아둔한 몸은 울타리를 벗어나야 될 시간을 맞이합니다. 대학을 마치고 대학원에서 몸과 마음의 바른 자세와 학문을 배우고 익히면서, 작은 이의 욕심은 언제나 큰 학문을 위해 노력하였으나, 제 배움의 가족들에게 이제서야 쑥스러운 작은 결과를 내보이게 되었습니다.

시작부터 지금까지 저를 이끌어 주신 연세대학교 의과대학 약리학교실에 감사드립니다. 안영수 주임교수님, 이우주 전 총장님, 김경환 교수님, 김동구 교수님, 김혜영 교수님, 이민구 교수님, 그리고 장정원 교수님 정말 고맙습니다. 연구실의 이주영 박사님, 김정태, 김윤미, 김형진, 김민수, 김재구, 박재우, 조희정, 차미주, 최시호 선생님 모두 고맙습니다. 기수 임종수 선생님, 김건태 선생님, 민선자 선생님 감사합니다. 약리학 교실원 모두와 선배 및 후배님들, 그리고 임상의학연구센터 실험동물부, 서무팀 및 연구부 기수 및 조교 선생님들께도 감사드립니다. 대학원 의학과 및 의학도서관 선생님들께도 감사드립니다.

제가 대학원에 진학할 때 아버지께서 써주신 글귀가 '大學之道, 在明明德, 在親民, 在止於至善.' 3강령(綱領)으로 시작되는 대학(大學) 경문(經文)이었습니다. 格物致知를 다시 생각해봅니다. 사랑하는 부모님들과 형제들, 친구들 그리고 아내 정자와, 해든이, 달하랑 함께 더욱 좁아져버린 제게 주어진 길을 가려합니다.

차 례

표 차례	v
그림 차례	vi
국문요약	1
I. 서 론	4
II. 실험 및 결과	9
실험 1. 생애초기 반복적인 스트레스 경험으로 인한 성숙 후 학습행동 변동과 해마 corticosterone 수용체 변동	9
실험 1-1. 재료 및 방법	9
1. 실험동물	9
2. 스트레스 자극	9
3. 기호성 강화에 의한 학습능력 측정	10
4. 탐색행동 측정	11
5. 해마 corticosterone 수용체 자가방사선법 검색	11
6. 통계학적 분석	12
실험 1-2. 결 과	13
1. 생후 14일, 17일, 20일의 60회 전기충격 후 24시간 동안 체중변동	13
2. 생후 180일 자가학습검사	13

3. 생후 210일 탐색행동 측정	15
4. 생후 220일 해마 corticosterone 수용체 자가방사선법 검색	16
실험 1-3. 요약	17

실험 2. 생애초기 반복적인 스트레스 경험으로 인한

성숙 후 행동 및 뇌 신경전달물질 변동	18
실험 2-1. 재료 및 방법	18
1. 실험동물	18
2. 스트레스 자극	18
3. 탐색행동 측정	19
4. 혐오강화에 의한 학습 및 기억능력 측정	19
5. 기호성 강화에 의한 학습능력 측정	20
6. 솔기핵 5-HT 신경세포와 시상하부 c-Fos 양성세포 면역세포화학적 검색	24
7. Tyrosine hydroxylase mRNA <i>in situ</i> hybridization	25
실험 2-2. 결과	26
1. 생후 14일과 21일의 30회 전기충격 후 24시간 동안의 체중변동과 무력행동 관찰	26
2. 생후 100일 탐색행동 측정	29
3. 생후 150일 양방향 능동회피 학습행동 검사	29
4. 생후 180일 자가학습검사	33
5. 생후 200일의 Fixed Ratio 및 Progressive Ratio 검사	33
6. 솔기핵 5-HT 신경세포 면역세포화학적 검색	37
7. 시상하부 c-Fos 양성세포 면역세포화학적 검색	38
8. Norepinephrine 신경세포의 tyrosine hydroxylase mRNA 발현 검색	38
실험 2-3. 요약	40

실험 3. 생애초기 스트레스 경험 직후 5-HT _{1A} 수용체	
활성 변동에 의한 성숙 후 행동 변동	42
실험 3-1. 재료 및 방법	42
1. 실험동물	42
2. 스트레스 자극 및 실험군 설정	42
3. 무력 행동의 표출시점	43
4. 탐색행동 측정	44
5. 공간지각 학습 검사	44
6. 혈중 corticosterone 농도 측정	45
7. 기호성 강화에 의한 학습능력 측정	45
실험 3-2. 결 과	47
1. 생후 14일과 21일의 50회 전기충격 후 무력 행동이 표출되는 시기와 5-HT _{1A} 수용체 활성변동에 의한 무력 행동 표출 시점 변동	47
가. 생후 14일과 21일의 전기충격을 경험한 개체들의 무력 행동 표출 시점	47
나. 생후 14일에 전기충격을 경험 후 저용량의 5-HT _{1A} 수용체 효현제를 투여하고, 생후 21일에 반복하여 전기충격에 노출시킨 개체들의 무력 행동 표출 시점	48
다. 생후 14일에 전기충격을 경험 후 고용량의 5-HT _{1A} 수용체 효현제를 투여하고, 생후 21일에 반복하여 전기충격에 노출시킨 개체들의 무력 행동 표출 시점	50
라. 생후 14일에 전기충격을 경험 후 저용량의 5-HT _{1A} 수용체 길항제를 투여하고, 생후 21일에 반복하여 전기충격에 노출시킨 개체들의 무력 행동 표출 시점	52
마. 생후 14일에 전기충격을 경험 후 고용량의 5-HT _{1A} 수용체 길항제를 투여하고, 생후 21일에 반복하여 전기충격에 노출시킨 개체들의 무력 행동 표출 시점	54
2. 생후 100일 탐색행동 측정	56

3. 생후 150일 공간지각 학습능력 검사	56
4. 생후 160일 혈중 corticosterone 수준	59
5. 생후 180일 자가학습검사	60
6. 생후 200일 Fixed Ratio 및 Progressive Ratio 검사	61
실험 3-3. 요약	63
III. 고찰	65
IV. 결론	74
참고문헌	77
영문요약	83

표 차례

표 1. 생애초기 반복된 전기충격 스트레스 경험이 생후 220일 해마 CA1 영역에서 corticosterone 수용체에 미치는 영향	16
---	----

그림 차례

그림 1. 스트레스 조절에 관여하는 5-HT system 가설의 모식도	5
그림 2. 생후 180일 6초 지연강화를 이용한 자가학습검사	14
그림 3. 생후 210일 5분 동안의 탐색활동도 검사	15
그림 4. 양방향 능동 회피 검사의 조건 및 반응의 개요	21
그림 5. 표준 설치류 행동 측정 장치를 이용한 자가학습검사의 구성 및 행동분석 개요	22
그림 6. 본 실험에서 이용한 progressive ratio schedule 개요	23
그림 7. 생후 14일 및 21일의 전기충격 스트레스 경험 후 24시간 동안의 체중 변화	27
그림 8. 생후 14일과 21일의 반복된 전기충격 스트레스 경험에 의한 무력 행동 표출시점	28
그림 9. 생후 100일 탐색행동 검사	30
그림 10. 생후 150일 양방향 능동 회피행동 검사	31
그림 11. 생후 150일 단방향 수동 회피행동 검사	32
그림 12. 생후 180일 자가학습 행동검사	34
그림 13. 생후 200일 Fixed Ratio 1 검사	35
그림 14. 생후 200일 Progressive Ratio 검사	36
그림 15. 생애초기 전기충격 스트레스 경험 후 생후 210일 뇌 슬기핵 5-HT 신경세포 분포 양상	37
그림 16. 생애초기 전기충격 스트레스 경험 후 생후 210일 뇌 시상하부 c-Fos 양성세포 면역화학적 검색	39
그림 17. 생애초기 전기충격 스트레스 경험 후 생후 210일 뇌 청반 신경세포 TH mRNA 발현 정도	39
그림 18. 생후 14일과 21일의 반복적인 전기충격 스트레스 노출로 인한 무력 행동이 표출되는 시점	47

그림 19. 생후 14일과 21일의 반복된 전기충격 스트레스 경험으로 무력 행동이 표출되는 시점에 대한 저용량 (0.3 mg/kg) 5-HT _{1A} 수용체 효현제 효과	49
그림 20. 생후 14일과 21일의 반복된 전기충격 스트레스 경험으로 무력 행동이 표출되는 시점에 대한 고용량 (3.0 mg/kg) 5-HT _{1A} 수용체 효현제 효과	51
그림 21. 생후 14일과 21일의 반복된 전기충격 스트레스 경험으로 무력 행동이 표출되는 시점에 대한 저용량 (2.0 mg/kg) 5-HT _{1A} 수용체 길항제 효과	53
그림 22. 생후 14일과 21일의 반복된 전기충격 스트레스 경험으로 무력 행동이 표출되는 시점에 대한 고용량 (10.0 mg/kg) 5-HT _{1A} 수용체 길항제 효과	55
그림 23. 생후 14일과 21일의 반복된 전기충격 스트레스 경험 후 생후 100일 이동활동도	57
그림 24. 생후 14일과 21일의 반복된 전기충격 스트레스 경험 후 생후 100일 반복활동도	57
그림 25. 생후 150일 공간지각 학습능력검사	58
그림 26. 생후 160일 혈장 corticosterone 수준	59
그림 27. 생후 180일 자가학습검사의 학습곡선	60
그림 28. 생후 200일 Fixed Ratio 1 검사	61
그림 29. 생후 200일 Progressive Ratio 검사	62

국문요약

스트레스반응 조절에 대한 뇌 5-Hydroxytryptamine계 역할

스트레스에 대한 신체의 반응은 중추 norepinephrine의 활성화와 시상하부-뇌하수체-부신피질계 및 교감신경-부신수질계로 구성되는 스트레스 대응축의 활성화로 나타난다. 이러한 스트레스 반응은 조절 가능 또는 조절 불가능 반응으로 대별할 수 있는데, 스트레스 반응의 표출 양상은 개체의 사전 경험에 의하여 영향받을 것으로 생각된다.

따라서 본 연구에서는 신경가소성(neural plasticity)이 활발한 생애초기에 스트레스를 가하여 그 효과를 관찰하였고, 이 때 5-hydroxytryptamine (5-HT)계의 역할을 검색하여 다음의 결과를 얻었다.

1. 첫 번째 연구에서 생애초기 반복적인 전기충격 스트레스에 노출되었을 때 성숙 후 기호성 강화를 이용한 학습행동에서 빠른 학습성취를 보였으며, 타고난 행동양식을 이용한 환경 대응에서 빠른 적응을 나타내었다. 이 때 해마영역에서 corticosterone 수용체의 활성변동이 관찰되었다. 이상의 결과로 생애초기 반복적인 스트레스 노출로 초래된 스트레스반응계 활성 변동이 초래되며, 이는 성숙된 시기에 도 지속됨을 알 수 있었다.

2. 두 번째 연구에서 생애초기 반복적인 전기충격 스트레스에 노출되었을 경우 무력행동(helplessness behavior)이 표출되었던 개체들과 무력행동을 나타내 보이지 않은 개체들을 구분하였다. 탐색행동 검사에서 무력행동이 표출되었던 개체들과 무력행동을 나타내 보이지 않은 개체들간의 타고난 행동양식에 있어서 차이를 관찰할 수 없었다. 그러나 학습 행동 검사에서는 무력행동이 표출되었던 개체들의 경우 성숙 후 혐오자극을 이용한 회피행동 검사에서 높은 기억유지 수준을 보였으며, 무력행동을 보이지 않은 개체들의 경우 기호성 강화를 이용한 학습능력 검사에서 학습이 지체됨을 나타내었다. 또한 뇌 신경화학적 검사에서 무력행동이 표출되었던 개체들의 경우 뇌 솔기핵(raphe nucleus) 5-HT 신경세포 수와 뇌 청반(locus ceruleus) norepinephrine 신경세포의 tyrosine hydroxylase mRNA 발현 수준이 낮았다. 이상의 결과 생애초기 스트레스 노출 때 개체의 스트레스 반응양상의 차이는

성숙 후 타고난 행동의 차이를 초래하지 않았으나, 기억과 학습에 관련된 행동의 차이를 초래하였다. 개체의 스트레스 반응성의 차이가 스트레스에 의한 신체 기능 변동에 중요한 역할을 하고, 이에는 5-HT 신경화학적 변동이 관련되어 있을 것으로 생각되었다.

3. 세 번째 연구에서 생애초기 반복적인 전기충격 스트레스에 노출되었을 때 5-HT계 신경활성을 5-HT_{1A} 수용체 효현제(agonist) 및 길항제(antagonist)를 투여하여 인위적으로 변동시켜 성숙 후 행동변동과 뇌신경화학적 변동에 대한 5-HT계의 역할을 살펴보았다. 전기충격 스트레스 경험으로 인한 무력행동의 표출시점을 살펴 보았을 때, 5-HT_{1A} 수용체 효현제인 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin (8-OH-DPAT)을 투여한 경우 반복된 전기충격 스트레스에 노출 노출되었을 때 무력행동의 표출시점이 늦어짐을 알 수 있었고, 5-HT_{1A} 수용체 길항제인 NAN-190 (1-(2-Methoxyphenyl)-4-[4-(2-phthalimido)butyl]piperazine)을 투여 한 경우 무력행동의 표출시점 변동이 관찰되지 않았다. 성숙된 시기에 타고난 행동양식을 살펴본 결과 5-HT_{1A}수용체 효현제 투여군은 활발한 탐색활동도를 나타내었고, 5-HT_{1A} 수용체 길항제 투여군은 저하된 탐색활동도를 보였다. 수중미로학습을 이용한 공간지각 학습능력 검사와 기호성 강화를 이용한 자가학습검사에서 생애초기 반복된 스트레스 경험과 5-HT_{1A} 활성 변동은 영향이 없었으나, 먹이에 대한 동기요소 검사에서 생애초기 스트레스 경험으로 행동 중단점이 증가되었는데 5-HT_{1A} 수용체 효현제 투여군에서는 증가를 관찰할 수 없었다. 이상의 결과 한 개체에서 반복하여 유사한 스트레스에 노출될 경우 스트레스 반응성의 차이가 초래되는데 사전 스트레스 경험 당시의 5-HT_{1A} 수용체 활성이 중요한 역할을 하고있음을 알 수 있었다.

이상의 결과 생애초기 반복적인 전기충격 스트레스 노출은 성숙 후 타고난 행동양식 및 기억과 학습에 연관된 행동에 변동을 초래하였으며, 스트레스 경험 당시 개체의 스트레스 반응성 차이에 따라서 성숙 후 행동양식이 다르게 나타날 수 있음을 알 수 있었다. 적절한 5-HT_{1A} 수용체 활성이 신체의 정상적인 스트레스 적응 반응에 중요하다는 것을 알 수 있었다.

핵심되는 말 : Stress, Stressor, 5-Hydroxytryptamine, Behavior,
Neurochemistry, Learning and Memory, Rat
Autoshaping, Exploration, Avoidance, Water maze,
Immunohistochemistry, *in situ* hybridization,
Autoradiography, 5-HT_{1A} receptor, 8-OH-DPAT,
NAN-190, Corticosterone, Glucocorticoid receptor,
Mineralocorticoid receptor, Electric footshock stress,
Skinner box, Shuttle box, Open field,
Hippocampus, Hypothalamus, Raphe nucleus,
Locus ceruleus, Norepinephrine, Adrenal gland,
Fixed Ratio, Progressive Ratio, Inverted U shape,
Post-traumatic stress disorder (PTSD)

스트레스반응 조절에 대한 뇌 5-hydroxytryptamine계 역할

<지도교수 김 동 구>

연세대학교 대학원 의과학사업단

이 서 율

I. 서 론

스트레스는 생명유지에 있어서 각종 질병에 대한 원인을 제공하고 또한 진행에 있어서도 매우 광범위하게 영향을 미치는 해로운 인자로 생각되고 있다. 스트레스는 외부의 자극에 대한 개체의 반응을 말하는 것으로 생명체는 끊임없이 주변의 환경과 교감하고 있기 때문에 스트레스는 작용강도의 차이만 있을 뿐 언제나 존재하고 있다. 스트레스에 대한 원래의 정의는 구조적인 변화를 야기하는 외부의 힘을 뜻하는 표현으로 구조의 변화를 수반하는 물리적인 현상에 국한되었으나, 생명과학 분야에 있어서 스트레스는 물리적인 것뿐만 아니라 심리적으로 가해지는 외부의 압력까지 포함하여 스트레스반응을 나타낼 수 있는 각종 환경 자극을 일컫는다.¹ 스트레스반응은 항상성을 유지하려는 힘으로 이해되며 일련의 과정은 첫 번째로 경고작용, 두 번째로 스트레스에 저항하는 단계, 마지막으로 지쳐서 포기하는 단계로 진행하고 이것은 스트레스에 대한 신체의 적응과정으로 볼 수 있다.²

스트레스는 물리적 스트레스와 심리적 스트레스로 구분 할 수 있는데, 물리적 스트레스는 스트레스인자(stressor)의 과도한 유입(외상, 질식 상태 등)에 의해 구조의 변동을 초래함으로써 구조와 이와 관련된 기능을 변동시켜 항상성을 저해하는 반면, 심리적 스트레스는 상대적으로 약한 스트레스인자로서 구조의 변동을 즉시 초래하지는 않지만 반복적인 노출로 인해 이와 연관된 기능의 장애를 유발시키고 구조의 변화 또한 유발시킬 수 있다.

스트레스 반응의 회로는 중추 norepinephrine계 활성화로 인한 교감신경을 통한 부신 수질의 catecholamines의 분비로 야기되는 신경성 회로(sympatho-

adrenal-medullary system; SAM)와 시상하부를 시작점으로 하여 뇌하수체를 경유하여 부신피질에서 스트레스 호르몬을 유리시키는 신경호르몬성 회로 (hypothalamus-pituitary-adrenal axis; HPA axis)로 구분하여 생각할 수 있다.

스트레스 반응은 중추신경계 norepinephrine system의 활성 변동이 시작점으로 이후 여러 반응이 순차적으로 나타나는데 행동계, 신경-내분비계 및 면역계 반응 등이 복합되어 나타난다.^{3,4}

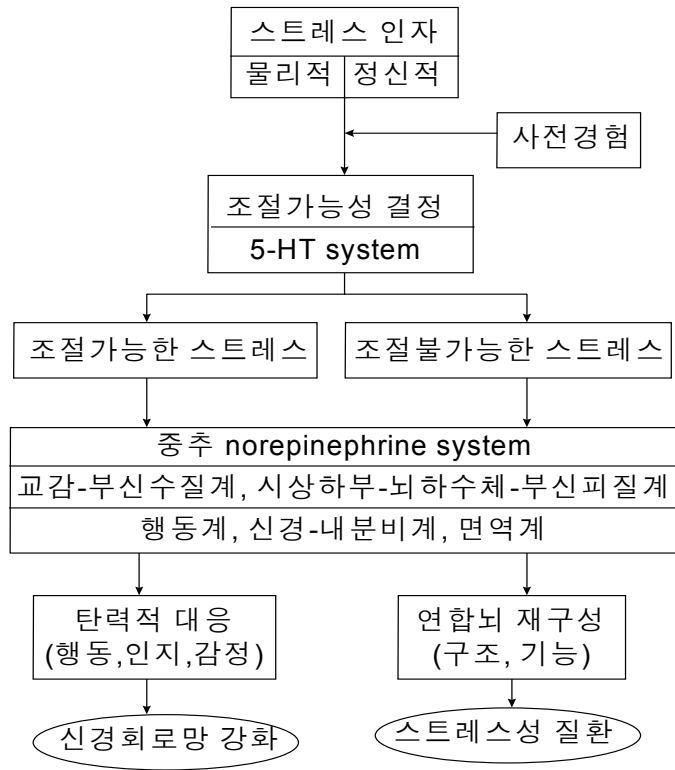


그림 1. 스트레스 조절에 관여하는 5-HT system 가설의 모식도.

또한 스트레스는 대뇌 변연계-시상하부-뇌하수체-부신 축을 활성화시키는 자극으로 정의된다. 주요한 스트레스반응으로는 중추 norepinephrine계 활성화와 HPA axis 활성화의 산물인 부신피질의 glucocorticoid의 생성 및 분비이며, 스트레스반응은 신속하게 일어나고 종결되는 것이 필수적이나 스트레스 반응이 시작되었을 때 이것의 억제가 이루어지지 않는다면 질병발생의 위험성을 높이고 결과적으로 기능

적 장애를 동반하게 된다.^{5,6,7} 스트레스 인자에 대한 노출은 교감신경계와 시상하부-뇌하수체-부신 축의 스트레스 반응계를 활성화시킨다. 활성화된 교감신경계는 부신 수질을 자극하여 norepinephrine과 epinephrine을 혈중으로 유리시켜 표적장기를 자극시키게 된다. 한편 시상하부-뇌하수체-부신피질의 스트레스 대응축의 활성화는 glucocorticoid를 부신피질로부터 유리시킨다. 대표적 부신피질 호르몬은 사람에서 cortisol이며, rat에서 corticosterone 인데 중추신경계에서 2가지 수용체 아형을 갖고 있다. Type I 수용체(mineralocorticoid receptor; MRs)와 type II 수용체(glucocorticoid receptor; GRs)이다.^{8,9} MRs 수용체는 GRs 수용체에 비해 corticosterone에 대한 결합 반응성이 100 배 이상 높아,¹⁰ MRs 수용체는 낮은 농도의 혈중 corticosterone 수준에서도 결합할 수 있지만, GRs 수용체는 스트레스 노출과 같은 자극에 의한 고농도의 혈중 corticosterone 수준이 유지되어야만 결합할 수 있다. 이러한 두 가지 수용체 아형의 결합반응성의 차이는 이들의 고유하고 다양한 기능과 연관되어 있다.¹¹

동물에 있어서 스트레스인자에 대한 반응이 조절 가능한 상태와 조절 불가능한 상태에 따라 전혀 다른 방향으로 나타나는데,^{12,13,14} 스트레스 인자에 대한 반응이 조절 가능할 경우에는 기존의 뇌 기능 및 구조가 강화되어 이에 대처하는 반응이 수반되나, 스트레스 인자에 대한 반응이 조절 불가능한 경우에는 그 당시까지의 사전 경험에 의하여 형성된 뇌 기능 및 구조가 파괴되어 무력화단계로 이행된다고 생각된다.¹⁵ 즉 스트레스로 유발된 행동계, 신경-내분비계 및 면역계 반응이 스트레스반응계의 활성화를 종결시킬 수 있으면 이러한 반응에 관여된 신경회로망은 스트레스 인자에 효율적으로 대처한 경우이므로 더욱 강화되나, 이러한 반응으로도 스트레스 반응계의 활성화를 종결시킬 수 없는 경우에는 효율적으로 대처하지 못한 기존의 신경회로망이 도태된다. 이 결과 새로운 환경적 요구에 대처할 수 있는 전략을 수행할 수 있는 신경회로망의 신설을 위한 기초를 만들게 되는 것이다.

따라서 스트레스인자에 대한 조절 가능성 여부를 결정짓는 단계가 스트레스 반응의 방향을 결정짓는 가장 중요한 단계로 판단된다(그림 1). 스트레스인자에 대한 반응의 조절가능성 판단은 행동학적으로는 사전 경험이 중요한 결정 요소로 작용하지만, 생물학적으로는 사전경험의 축적에 의해 뇌의 기능적 변동이 초래되고 지속됨으로서 재차 노출되는 스트레스인자에 대한 반응이 조절 가능하거나 조절 불가능한 방향으로 이루어질 것으로 생각된다. 방향을 설정하는 조절단계는 기억과 학습에 크게 의존하는 것으로 생각되며, 이러한 기능을 담당하는 뇌기능으로는 5-hydroxytryptamine (5-HT; serotonin) system이 밀접하게 관계될 것으로 판단된

다.¹⁶ 그 이유로는 첫째, 5-HT는 계통발생학적으로 매우 오래된 물질로 생명체의 기본 기능인 환경자극에 대한 반응에 5-HT가 중심적으로 관여할 가능성을 나타낸다.¹⁷ 둘째, 포유동물에서 5-HT는 뇌의 광범위한 부위에서 발견되고 대부분의 5-HT 신경섬유의 varicosity는 신경접합을 이루지 않고 있다.¹⁸ 이러한 세로토닌성 신경세포의 분포 특징은 특이작용이 없을 가능성이 있으나 뇌 전체의 기능을 항진 또는 억압하여 조화된 기능(harmonic function)을 수행하는 조절자의 역할에 필수적이다. 셋째, 5-HT는 역시 뇌의 광범위한 부위에 존재하는 다른 종류의 아민인 norepinephrine이나 dopamine보다 정상 생리상태에서 훨씬 약한 활성도를 보인다.¹⁹ 이는 휴지상태(resting state)보다는 개체가 환경자극에 반응하는 순간에 무리 없이 적응을 가능하게 하는 뇌 기능 조절역할을 5-HT가 담당할 가능성을 높인다. 넷째, 실제로 raphe nucleus의 5-HT신경세포의 활성을 조절하면 뇌의 대사와 혈류가 변동된다.²⁰ 이는 뇌 세포의 기능조절에 5-HT가 직접 관여한다는 증거이다. 다섯째로는 5-HT는 최근 그 수용체가 14종 이상이 존재함이 밝혀졌다.²¹ 이 중 ligand와 수용체가 결합한 경우 세포 내 2차 전령물질인 cAMP를 낮추는 5-HT_{1A} 수용체와, phosphoinositide를 가수분해하여 세포 내 Ca⁺⁺ 농도를 높이는 5-HT_{2A/2C} 수용체가 생리적으로 중요한 역할을 담당할 것으로 생각되고 있는데, 이 두 수용체가 활성화되었을 때 서로 반대되는 효과를 나타내는 경우가 많다. 이러한 현상은 두 수용체의 균형이 뇌의 최종 기능 발현의 방향을 결정할 가능성이 높음을 시사한다. 최근의 연구로서 물리적인 스트레스 자극 방법으로 저산소 환경(hypoxia)을 이용하였을 때, 고자극성 저산소 환경 자극은 조절 불가능한 스트레스 반응을 일으키는 스트레스인자로서 작용하여 행동의 저하와 면역 기능의 감소를 초래하나, 저자극성 저산소 환경은 오히려 행동의 일부를 호전시키고 면역 기능의 일부 변수들을 증가시키는 결과를 보고하여,²² 조절 가능한 스트레스 반응과 조절 불가능한 스트레스 반응은 개체의 적응 방향을 전혀 다른 쪽으로 변화시킨다는 것을 시사하였다.^{23,24}

스트레스반응의 시작점은 중추 norepinephrine계 활성 변동으로 알려져 있고, 순차적으로 말초에서도 여러 반응이 진행되는데, 이러한 급성 스트레스반응 종결에 관여하는 스트레스 호르몬의 뇌에 대한 되먹임 작용의 오류가 스트레스에 기인한 질병의 원인으로 인정되고 있는 추세이다.^{6,25} 스트레스반응의 방향성 결정 단계는 스트레스반응의 종결에 대한 경험과 기억이라고 생각되며, 이러한 기능에 중추신경계의 5-HT계가 밀접하게 관계될 것이라 판단된다. 사전 연구에서 스트레스 인자로서 footshock을 이용한 무력행동(helplessness behavior) 표출에 있어서 동일한 자극에 반복 노출되어질 경우 무력 행동이 표출되는 시점이 앞당겨지는 것으로 보아

스트레스 반응성의 방향 판단에는 경험과 학습 요소가 중요하게 작용하고 있고, 행동 변동에는 뇌의 5-HT계 변동을 수반하는 것을 관찰하였다.^{26,27}

현재 이루어지고 있는 스트레스 관련 연구들에서 스트레스 반응의 방향성을 결정하는 시작점에 관한 연구는 전무한 실정이며 대부분 하부에서 진행되는 병태-생리적 현상에 국한된 연구로서 스트레스로 유발된 각종 현상 및 질환에 근원적 대응이 아닌 말초적 대응만을 강조하고 있다.

급성 스트레스반응에서 중추 norepinephrine의 활성화는 부교감신경의 활성화와 말초 교감신경계의 흥분을 유도한다고 알려져 있다.²⁸ 일단 시작된 스트레스반응이 종결되지 않고 지속되면 치명적인 영향을 초래하므로 스트레스반응의 조절은 시간적으로 늦게 유도되는 부신피질호르몬(adrenal steroid hormones)의 되먹임(feedback) 작용으로 흥분성을 낮추는데 여기에는 인지-심리적 경험에 대한 기억기능과 연관되어 있는 것이 연구되고 있고 시상하부-뇌하수체-부신의 스트레스 반응축에 의존하는 반응임이 알려져 있다.^{4,29,30} 하지만 이들의 연구는 스트레스 반응에 관한 일련의 반응단계(cascade)에 있어서 후기 현상에 대한 연구가^{31,32,33} 대부분이어서 스트레스반응의 시작점인 조절 가능 또는 불가능성의 방향설정에 관여하는 내재적 조절인자에 대한 접근은 찾아볼 수 없는 실정이다.

생애초기 전기충격 스트레스 경험이 5-HT 관련 신경전달물질과 그 대사산물의 균형이 정상적인 군에 비해 변동되어 있었으며 이러한 뇌신경화학적 변동에 의존한 행동 변동이 수반되는 것을 인식하면, 스트레스에 대한 신체의 스트레스반응 경험은 단순하게 일과성으로 끝나는 것이 아니라 기억과 학습이 관련된 일련의 과정에서 증폭 또는 변조가 일어남으로 인해 영구적인 변화가 초래되는 것으로 생각된다. 또한 스트레스 반응의 조절에 있어서 5-HT_{1A} 수용체의 활성화는 말초에서의 스트레스 반응과 중추로의 되먹임 효과를 내는 시상하부-뇌하수체-부신피질 (HPA) 축의 시작단계와, 급성스트레스 반응인 교감신경계-부신수질 (SAM)계의 활성화에도 관여한다.⁴ 물리적 스트레스인자로 알려진 저산소상태를 유발시켰을 경우에도 5-HT_{1A} 수용체의 활성화 정도가 행동변화를 초래함을 관찰한 바 있다.³⁴ 따라서 본 연구에서는 신체적 외상이 없는 수준에서 회피할 수 없고 예측 불가능한 상황에서 주어지는 전기충격 스트레스를 이용하여³⁵ 신경가소성(neural plasticity)이 풍부한 생애초기에 스트레스 노출 경험이 성숙된 시기에서 어떠한 행동 변동을 초래하는지를 검색하였으며, 이 때 5-HT계 활성이 스트레스 반응의 조절에 어떠한 역할을 수행하는지를 밝히고자 하였다.

II. 실험 및 결과

실험 1. 생애초기 전기충격 스트레스 경험으로 인한 성숙 후 학습 행동 변동과 해마 corticosterone 수용체 변동

실험 1-1. 재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 Sprague-Dawley 계열 rat를 이용하였다. 임신 경험이 없는 암컷 쥐를 실험실 조건에 적응시킨 후 암컷 3마리와 수컷 1마리씩 같은 사육장에 넣어 교미를 유도하였다. 수태 시간을 추정하기 위하여 쥐들의 교미는 쥐들의 활동 시간인 야간에만 이루어지도록 하였으며, 낮 시간동안은 암컷과 수컷을 분리하여 교미가 이루어지지 않도록 격리시켰다.

교미유도가 시행된 다음 오전 8시에 암컷 쥐들은 질도말(vaginal smearing) 검사를 시행하여 광학현미경으로 정충이 확인되면 임신된 것으로 판단하여 임신일 0으로 정하고 교미장에서 격리시켜 임신된 암컷들끼리 사육시켰으며, 임신 15일부터는 출산에 대비하여 임신된 어미 쥐들은 개별 사육장에서 사육시켰고, 출산은 임신 21일 경에 있었다. 모두 15마리의 어미에게서 새끼를 받았으며, 출산 확인된 날을 생후 0일로 정하였으며, 생후 2일에 한 배당 사육두수를 조절하기 위해 암수 5:5의 비율로 체중을 기준으로 Latin square 방법을 사용하여 조절하였다.

실험에 사용한 모든 실험동물은 미국보건원(NIH)의 "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 1996 revised"과³⁶ 대한의학회(KAMS) 제정 "동물실험 지침, 2000"³⁷에 따른 연세대학교 실험동물의 사육과 사용에 관한 실험동물위원회(Yonsei University Animal Care and Use Committee)의 안전 관리 지침에 의거 사육 관리 및 실험에 임하였다.

2. 스트레스 자극

태어난 쥐들이 생후 14일, 17일, 그리고 20일에 반복적으로 체중을 측정하고 다음, 쥐를 개별적으로 회피 불가능한 전기충격 상자(20.5 x 17 x 20 cm)에 넣고 격자바닥(2.0 mm diameter, spaced 8 mm apart)을 통해 0.8 mA의 전류 세기로 5초 동안 전류를 공급하여(shock generator and grid scrambler; ENV-410, ENV-412, Med Associates, VT, USA) 전기 충격 스트레스(electric footshock stress)를 주었으

며 전기충격이 가해지는 간격(intershock interval)은 평균 55초 되게 무작위 간격을 두었고, 전체적으로는 1일 60회씩의 전기충격을 3일에 걸쳐 3회 시행하였다. 즉, 전기충격 상자 속의 쥐는 전기충격 스트레스가 언제 오는지를 알 수 없고(unpredictable) 또한 전기충격으로부터 회피할 수 없는(inescapable) 상황에서 스트레스 자극을 경험함으로써 Seligman이 제안했던 학습된 우울증(learned helplessness)의 실험적 모델을 변형하여 시행하였다.³⁸

실험군은 체중을 측정하기 위한 시간을 제외하고는 어미로부터 격리되지 않은 무처치군(the Non-handled group)과, 실험군과 동일한 시간동안 어미와 격리되어 전기충격 상자에 있었으나, 전기충격만을 경험하지 않은 대조군(the Handled control group), 그리고 생후 14일, 17일, 21일에 세 번 반복하여 전기충격을 경험한 실험군(the Shocked group)으로 구분하여 일련의 행동 및 신경화학적 검사를 시행하였다.

3. 기호성 강화에 의한 학습능력 측정

생후 180일에 표준 설치류 행동 측정 상자(Skinner box, Med Associates Inc., VT, USA)에서 먹이(Formula A, Noyes Co., NJ, USA)를 이용한 기호성 강화(appetitive reinforcement)에 의한 학습 능력을 자가학습검사(autoshaped learning test)를 시행하여 관찰하였다. 이것은 일정관리 행동검사(schedule-maintained behavior test)의 일종으로서, 실험 전에 쥐를 15일 동안 개별 사육장에서 사육시키면서 정상 체중의 85%로 식이 제한을 통해 먹이에 대한 선호도를 증가시켰고, 행동측정 상자에서 제공하는 기호성 강화용 먹이에 대한 거부감을 없애 주었다. 표준 설치류 행동측정 상자에서 매일 12회씩 12일에 걸쳐 레버 접촉과 먹이강화와의 연합학습능력을 검색하였다. 실험은 한 개의 레버가 15초 동안 상자 내로 돌출 되고 이후 레버가 철수되면 6초 후에 먹이가 공급되는 것으로 한번의 시도-기회(trial)가 이루어지게 되며 매일 12회의 기회 반복이 이루어지고(session) 12일 동안 연속하여 수행하였다. 매번 시도-기회마다 쥐가 돌출 되어 있는 레버를 접촉한 경우 레버는 곧바로 상자에서 철수되며 이때부터 6초 후에 먹이가 공급되어(6 sec delayed reinforcement), 기회가 반복되어 질수록 실험동물은 레버 접촉과 먹이 공급의 시간간격이 단축됨을 배워 이것의 연합이 학습 효과로서 나타나게 된다. 또한 반응이 없더라도 15초 동안의 시도기간이 종료되면 먹이는 자동으로 상자 안으로 분배되며, 실험동물들은 레버 접촉과 먹이 분배와의 관련성을 시간적 차이와 함께 학습-습득하게 된다. 이후 다음 시도기간에서도 동일한 방법으로 지속되며 하루 일정 동안 각 시도-기회들 사이의 시간 간격은 무작위 시간간격(10~100초, 평균 55초, randomized)이었다.^{39,40}

4. 탐색행동 측정

생애초기 전기충격 스트레스를 반복하여 경험한 실험동물들을 자가학습검사 시행 후 2주 동안 자유롭게 음식을 섭취하도록 배려하여 체중 회복을 확인한 후, 생후 210일에 새로운 환경에 쥐를 노출시켜 5분 동안 탐색행동을 측정하였다. 행동 측정상자(Activity Meter, Med Associates Inc., VT, USA)에 실험동물을 5분 동안 노출시키면서 이들의 행동을 적외선 추적 장치를 이용하여 탐색하는 양상과 이동 활동도(ambulatory activity) 및 반복활동도(stereotyped activity)를 각 1분 간격으로 수집하여 기록하였다. 탐색행동 측정은 실험동물을 사육환경이 아닌 새로운 환경(50 x 50 cm 면적의 측정 상자)에 최초 노출시켰을 때 나타나는 탐색활동(exploratory activity)을 측정하는 것으로 개체의 타고난 행동양식(innate behavior)에 의존적이다. 탐색행동 검사는 호기심 또는 경계심 및 불안 등의 감정상태로 객관화하여 측정할 수 있는 장점을 가지고 있다. 실험군간의 새로운 환경에 대한 적응도와 생애초기 경험된 반복된 스트레스에 대한 관계를 검색하였다.

5. 해마 corticosterone 수용체 자가방사선법 검색

실험동물을 단두하여 신속하게 뇌를 적출한 후 얼음으로 냉각된 생리식염수에 1회 담귀 혈액이나 기타 이물질을 제거하고 물기를 없애준 다음 저온 냉각된 isopentane 속에서 뇌를 냉각시키고 이어서 액체 질소를 이용해 급속 냉동시킨 후 -70°C 냉동고에 보관하였다. 조직 박절을 위해 냉동 보관된 뇌를 -20°C에 1일간 정지시킨 후 O.C.T compound(Sakura Chemical Co., Tokyo, Japan)에 포매한 후 냉동박절기(Cryotome; Microm, Zeiss Co., Germany)를 이용하여 해마 영역이 포함된 관상단면(bregma -5.3 mm; plate 41: The Rat Brain Stereotaxic Coordinates, Paxinos G & Watson C, 4th Eds., Academic Press, 1998)⁴¹으로 20 μm 두께로 연속절편을 제작한 다음 gelatin으로 coated된 슬라이드 위에 부착시켰다. 뇌 조직이 부착된 슬라이드를 보관 상자에 담아 상온에서 2시간 건조시킨 다음 실험 때까지 냉동 보관하였다. 수용체 결합검사를 위해서 냉동 보관중인 슬라이드를 꺼내어 순서대로 배열 한 후 cold air dry 시키고 반응 완충 용액 50 mM Tris-HCl (pH 7.4, 2 mM CaCl_2 , 1 mM EDTA, 0.01% Ascorbic acid 함유)에 20분간 pre-incubation 시킨 다음 공기 중에서 건조시켰다. 조직표면에 삼중수소로 방사성 표지된 ligand (^3H corticosterone; ^3H dexamethasone)를 농도별로 반응시키고(총 결합검사), 방사성 표지 ligand의 500배 농도 방사성 비 표지 ligand (corticosterone; dexamethasone)를 혼합한 반응을 동시에 시행하여(비 특이적 결합검사) 상온에서

60분 동안 반응시켰다.^{42,43} 반응 완충 용액에서 5초 동안 ligand를 씻어준 후 다시 10분씩 2회 세척하였다. 마지막으로 증류수에서 20초 동안 행귀 준 다음 cool air dry 20분 후 조직이 건조된 다음 Image plate (Fuji Film Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 상온에서 1주일 동안 농도표준 지표인 [³H] microscales (Amershampharmacia Biotech, IN, USA)와 함께 노출시킨 다음 BAS system (Fuji Film Co., Tokyo, Japan)과 MCID image analyzer (Imaging system Co., Quebec, Canada)를 이용하여 수용체 농도를 해마의 CA1 영역에서 densitometry로 256 gray scale로 읽은 다음, 데이터를 photo-stimulated luminescence (PSL) 수치로 분석하여 수용체의 밀도를 단위면적 당 PSL/mm² 으로 비교 분석하였다.

6. 통계학적 분석

실험결과는 평균±표준오차로 나타내었으며, 통계분석을 위하여 StatView (version 5.01, The SAS Institute, CA, USA) 프로그램을 사용하였다. 자가학습검사에서 학습 습득과정은 학습곡선을 이용하여 repeated measures ANOVA로 수행하였으며, 탐색행동의 비교와 해마 corticosterone 수용체의 자가방사선법 수용체 결합밀도는 일분산분석(one-way ANOVA)을 사용하였다. 전체적인 실험군간 분산분석 결과에서 유의한 차이는 집단 의 표본 수에 의거하여 Scheffe's F test 와 Fisher's protected least significance difference (PLSD) test 방법으로 *post hoc* test 를 수행하여 차이를 규명하였다.

실험 1-2. 결 과

1. 생후 14일, 17일, 20일의 60회 전기충격 후 24시간 동안 체중변동

생후 14일, 17일, 그리고 20일의 반복된 60회씩의 전기충격 스트레스 경험 후 24시간 동안의 쥐들의 체중을 측정하였으나, 실험군간의 유의한 차이는 발견할 수 없었다. 또한 성장과정에서도 1주일 간격으로 쥐들의 체중을 측정하였으나 발달에 미치는 영향은 관찰 할 수 없었다.

2. 생후 180일에 시행한 자가학습검사

수컷 실험동물을 정상 체중의 85%로 식이 제한 방법으로 점진적으로 감량하여 조절하였다. 목표 체중을 유지시키면서 생후 180일 되었을 때 12일 동안 매일 12회의 시도-기회가 주어지는 6초 동안의 기호성 지연 강화를 주는 방법으로 자가학습 검사를 시행하였다. 실험동물을 표준 설치류 행동측정 상자에 위치시키고, 레버가 상자 내로 돌출 되는 시도기간 중에 먹이 획득을 위해 레버 접촉을 한 경우 (extended lever touch)를 정확한 학습이 이루어진 것으로 판단하여 측정 변수로 사용하였다. 전체적인 학습성취도 곡선(그림 2-A)에서 실험동물들은 시간이 지날수록 정확한 레버 접촉이 증가됨을 알 수 있었으며 ($F_{(11,374)}=16.7, p<0.001$), 본 자가학습검사에서 학습 제10일의 기록에 의존하여 전체 12회의 시도기간 동안 정확한 레버접촉 횟수를 10회로 한정하여 10회 이상의 경우를 학습능력이 뛰어난 잘 배운 개체들로, 10회 미만의 경우를 학습성취도가 뒤쳐지는 경우로 구분하여 비교 분석하였다. 잘 배운 개체들(20/38)만을 선택하여 관찰한 결과(그림 2-B), 생애초기 반복적인 전기충격 스트레스를 경험한 실험군의 학습성취가 빠르게 일어남을 알 수 있었다 ($F_{(2,17)}=15.1, p<0.001$). 그러나 무처치군과 대조군의 학습성취도에 있어서는 유의한 차이가 관찰되지 않았다.

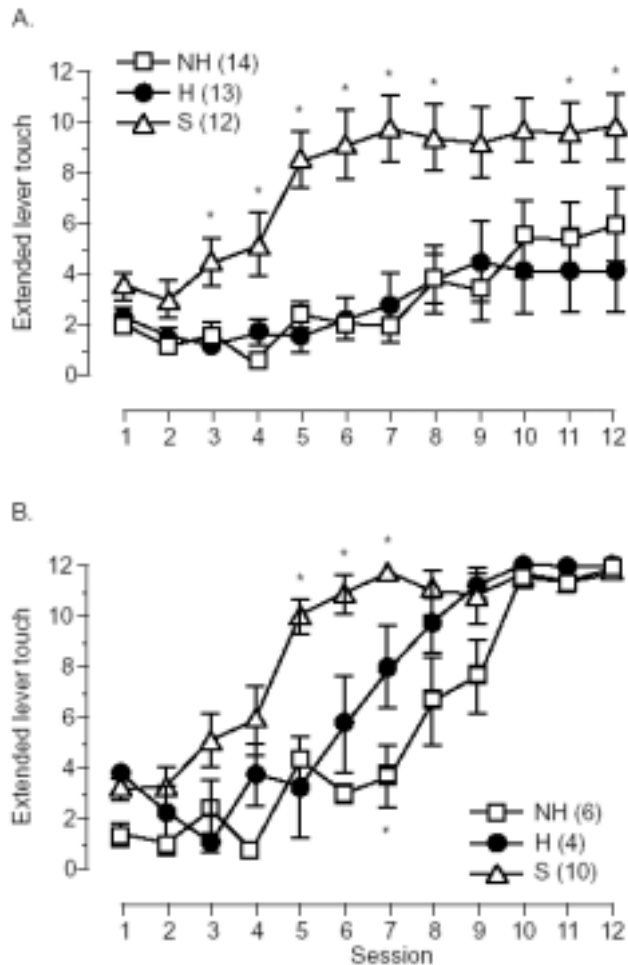


그림 2. 생후 180일에 시행한 6초 지연 강화를 이용한 자가학습검사. A. 전체 실험 동물의 학습곡선. B. 학습기준 이상 잘 배웠다고 판단되는 개체들의 학습곡선. NH: 체중을 측정하기 위한 시간을 제외하고는 어미로부터 격리되지 않은 무처치군(the Non-Handled group); H: 실험군과 동일한 시간동안 어미와 격리되어 전기충격 상자에 있었으나, 전기충격만을 경험하지 않은 대조군(the Handled control group); S: 생후 14일, 17일, 21일에 세 번 반복하여 전기충격을 경험한 실험군(the Shoked group).

* $p < 0.05$ vs. the Handled group by Scheffe's F test.

3. 생후 210일 탐색행동 측정

자가학습검사를 수행하고 2주 동안 자유롭게 먹이를 섭취하도록 하여 정상 체중으로 회복시킨 후 생후 210일에 실험동물을 새로운 환경에 노출시켜 5분 동안의 탐색활동도를 측정하였다(그림 3-A). 탐색활동도에 있어서 실험군들은 새로운 환경 노출 첫 1분 동안 활발한 활동양식을 특징적으로 보였다. 이후 활동도는 전반적으로 감소하였으나 대조군의 경우 다른 실험군에 비해 높은 활동도 수준을 나타내었다. 활동도가 낮아지는 시기인 3분에서 5분 동안의 활동도를 합산하여 비교 분석한 결과 대조군이 높았으며 ($F_{(2,21)}=4.3, p<0.05$), 생애초기 반복적인 전기충격 스트레스를 경험한 실험군의 경우 무처치군과 같은 양상을 나타내었다(그림 3-B).

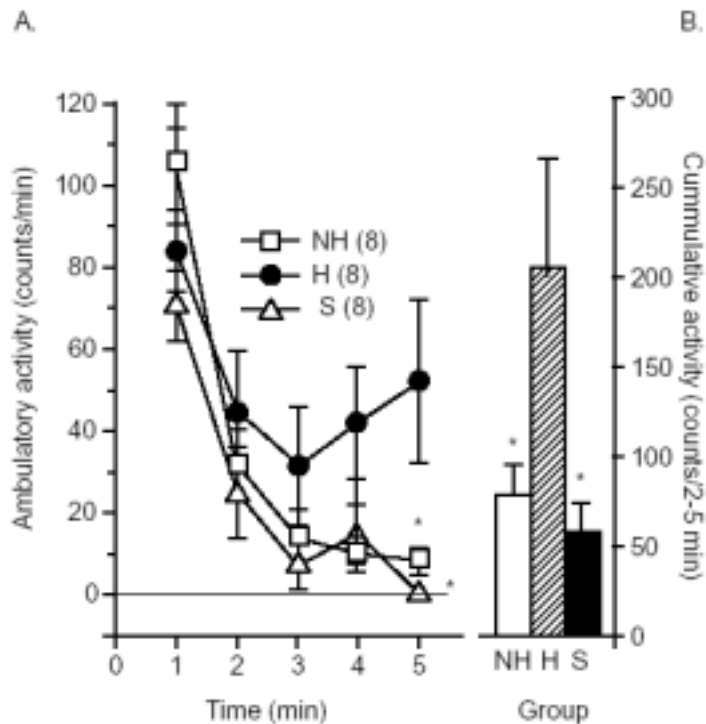


그림 3. 생후 210일의 5분 동안의 탐색활동도 검사. A. 5분 동안의 탐색활동도. B. 3~5분 동안의 활동을 합산한 활동도. NH: 체중을 측정하기 위한 시간을 제외하고는 어미로부터 격리되지 않은 무처치군(the Non-Handled group); H: 실험군과 동일한 시간동안 어미와 격리되어 전기충격 상자에 있었으나, 전기충격만을 경험하지 않은 대조군(the Handled control group); S: 생후 14일, 17일, 21일에 세 번 반복하여 전기충격을 경험한 실험군(the Shoked group).

* $p<0.05$ vs. the Handled group by Fisher's PLSD test.

4. 생후 220일 해마 corticosterone 수용체 자가방사선법 검색

행동검사가 끝난 실험동물을 희생시켜 뇌 해마영역에서의 corticosterone 수용체를 자가방사선법을 이용하여 관찰하였다(표 1). 생애초기 반복된 전기충격 스트레스 경험은 해마에 존재하는 2 종류 MRs, GRs corticosterone 수용체 활성을 변동시켰다. 대조군의 경우 [³H]corticosterone 결합검사에서 20.1±3.8을 나타내었으나, 전기충격 스트레스를 경험한 실험군의 경우 8.5±1.1로서 대조군에 비해 42.3% 수준으로 감소되었으며, [³H]dexamethasone 결합검사에서는 대조군의 6.4±0.4에 전기충격 스트레스를 경험한 실험군의 경우 10.8±1.4로서 비해 168.8% 수준으로 증가되었음을 관찰 할 수 있었다.

표 1. 생애초기 반복된 전기충격 스트레스 경험이 생후 220일의 해마 CA1 영역에 미치는 영향.

Group	[³ H]corticosterone	[³ H]dexamethasone
NH (8)	5.1±1.0*	8.2±0.9
H (6)	20.1±3.8	6.4±0.4
S (8)	8.5±1.1*	10.8±1.4*

PSL/mm² (mean±s.e.m.).

Numbers in parentheses are the number of animals.

NH: 체중을 측정하기 위한 시간을 제외하고는 어미로부터 격리되지 않은 무처치군(the Non-Handled group); H: 실험군과 동일한 시간동안 어미와 격리되어 전기충격 상자에 있었으나, 전기충격만을 경험하지 않은 대조군(the Handled control group); S: 생후 14일, 17일, 21일에 세 번 반복하여 전기충격을 경험한 실험군(the Shoked group).

* p<0.05 vs. the Handled group by Scheffe's F test.

실험 1-3. 요약

살아있는 개체들은 외부에서 유입되는 극심한 스트레스 자극에 대응하기 위해 생리적, 행동적 스트레스 반응을 나타낸다. 본 연구에서는 생애초기 생후 14일, 17일, 20일에 반복적으로 투여한 0.8 mA, 5 초 동안, 그리고 60회의 전기충격 스트레스를 경험시키고 성숙한 후 행동 변동과 해마 corticosterone 수용체를 관찰하였다.

1. 생후 180일에 기호성 강화자극을 이용한 자가학습검사에서 생애초기 반복적인 전기충격 스트레스 경험은 6초 지연강화를 이용한 작업에서 빠른 학습 습득 능력을 나타내었다.

2. 생후 210일에 타고난 행동양식을 살펴보는 탐색행동 검사에서 생애초기 반복적인 전기충격 스트레스 경험은 새로운 환경 노출에 의한 탐색활동도 비교에서 초기 반응성에는 차이는 없었으나, 시간이 지나면서 빠른 환경 적응 능력을 나타내었다.

3. 생후 210일 이후에 시행한 해마 corticosterone 수용체 자가방사선법 검사에서 MRs 수용체는 감소하였고, GRs 수용체는 증가하였는데, 생애초기 반복적인 전기충격 스트레스 경험은 MR/GR ratio를 효과적으로 감소시켰다.

이상의 결과 생애초기 스트레스 경험은 성숙 후 행동변동을 초래하였으며, 해마의 MR/GR ratio 또한 변동되었다. 이는 뇌 신경가소성이 활발한 기간인 생애초기의 스트레스 경험이 스트레스 반응축을 변화시켰고, 또한 스트레스 반응축의 변동이 성숙 후에도 지속되어 나타나는 효과로 생각된다.

실험 2. 생애초기 반복적인 스트레스 경험으로 인한 성숙 후 행동 및 뇌 신경전달물질 변동.

실험 2-1. 재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 Sprague-Dawley 계열 rat를 이용하였다. 임신 경험이 없는 암컷 쥐를 실험실 조건에 적응시킨 후 암컷 3마리와 수컷 1마리씩 같은 사육장에 넣어 교미를 유도하였다. 수태 시간을 추정하기 위하여 쥐들의 교미는 쥐들의 활동 시간인 야간에만 이루어지도록 하였으며, 낮 시간동안은 암컷과 수컷을 분리하여 교미가 이루어지지 않도록 격리시켰다.

교미유도가 시행된 다음 오전 8시에 암컷 쥐들은 질도말 검사를 시행하여 광학 현미경으로 정충이 확인되면 임신된 것으로 판단하여 임신 제 1일로 정하고 교미장에서 격리시켜 임신된 암컷들끼리 사육시켰으며, 임신 15일 부터는 출산에 대비하여 임신된 어미쥐들은 개별 사육장에서 사육시켰고, 출산은 임신 21일 경에 있었다. 출산 확인된 날을 생후 0일로 정하였으며, 생후 2일에 한 배당 사육두수를 조절하기 위해 암수 5:5의 비율로 체중을 기준으로 하여 조절시켰다.

2. 스트레스 자극

태어난 쥐들이 생후 14일 되는 날 체중을 측정된 다음, 쥐를 개별적으로 전기충격 상자에 넣고 격자바닥을 통해 0.6 mA의 세기로 5초 동안 전류를 공급하여 전기충격 스트레스를 주었으며 1일 30회 시행하였고, 전기충격의 간격은 평균 55초 되도록 무작위 간격을 두고 시행하였다. 즉, 전기충격 상자 속의 쥐는 격자 바닥을 통한 전기충격 스트레스가 언제 오는지를 알 수 없고 또한 전기충격으로부터 회피할 수 없는 상황에서 스트레스를 경험함으로써 Seligman이 제안했던 학습된 우울증의 실험적 모델을 변형하여 시행하였다.³⁸ 생후 14일에 전기충격을 경험한 쥐들을 1주일 경과 후 동일한 조건에 반복 노출시켜 개체별로 판단 지표인 무력행동의 표출 시점을 측정하여 동일 스트레스에 대한 반응성의 차이(the response trait to the stress)로 실험군을 구분하였다.

실험군은 체중을 측정하기 위한 시간을 제외하고는 어미로부터 격리되지 않은 무처치군(Naive)과, 실험군과 동일한 시간동안 어미와 격리되어 전기충격 상자에 있었으나, 전기충격만을 경험하지 않은 대조군(Context), 그리고 생후 14일과 21일에 두 번 반복하여 전기충격을 경험한 개체들 중 무력행동을 나타낸 무력군

(HPLS(+))과 무력행동을 나타내 보이지 않은 비무력군(HPLS(-))으로 구분하여 일련의 행동 및 신경화학적 검사를 시행하였다.

3. 탐색행동 측정

생애초기 전기충격 스트레스를 반복적으로 경험한 쥐들을 실험실 환경에서 계속 사육하여 생후 100일이 되었을 때 성숙되었다고 판단하여 새로운 환경에 쥐를 노출시켜 5분 동안의 탐색행동을 측정하였다. 행동측정상자에 쥐를 5분간 노출시킨 다음 이들의 행동을 적외선 추적을 통하여 탐색활동 양상을 이동활동도 및 반복활동도로 수치화 하여 기록하였다. 탐색행동검사 방법은 50 x 50 cm 면적의 새로운 환경에 쥐를 최초 노출시켜 나타나는 행동을 호기심 또는 경계심 및 불안 등의 감정상태로 객관화하여 측정할 수 있는 장점을 가지고 있다. 실험군간의 새로운 환경에 대한 적응도와 생애초기 경험된 스트레스에 대한 개체의 반응성으로서 무력과 관계를 검색하였다.

4. 혐오강화에 의한 학습 및 기억 능력 측정

생후 150일에 양방향 능동형 회피행동검사(two-way active avoidance test)를 시행하였다. 모두 30회의 회피 및 탈출을 보는 시도 기회로 구성되었으며, 두 개의 방이 연결 통로로 연결되어 있어 실험동물은 자유롭게 방을 왕래할 수 있다(shuttle box, Med Associates Inc., VT, USA). 맨 처음 실험동물을 행동측정상자에 노출시키고 나서 3분 동안의 적응기간을 둔 후, 검사는 어두운 상태에서 시작하였다. 조건화자극(conditioned stimulus; CS)으로써 빛과 소리(light and tone)를 15초 동안 먼저 시작하고 10초가 경과된 후 비조건화 자극(unconditioned stimulus; US)으로써 5초 동안 쥐가 있는 방의 격자 바닥에 0.6 mA 세기의 전류를 흘려 주어 실험동물이 이를 피해 다른 방으로 이동하도록 구성하였다. 측정방법은 조건화 자극이 있는 동안에 뒤이어 오는 전기충격을 피해 다른 방으로 이동을 하면 회피(avoidance)한 것으로 판정하고, 조건화 자극에 이어 나타나는 비조건화 자극에 의한 실험동물의 이동을 탈출(escape)이라고 판정하였으며 두 가지 자극이 모두 끝날 때까지 이동하지 못한 경우를 실패(failure)로 판정하였다. 생애 초기의 전기충격과 같은 극심한 심리적 스트레스 경험에서는 전기충격을 회피할 수 없도록 하였으나, 이 실험방법에서는 회피행동이 가능하므로 행동의 변수를 검색하여 경험된 무력과 학습과의 관계를 살펴보았다(그림 4).

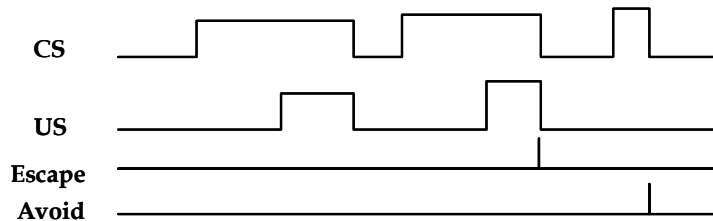
능동형 회피검사를 시행한 후 기억의 유지능력(memory retention)을 살펴보는 방법으로서, 혐오성 자극에 의한 수동형 회피행동 검사(passive avoidance test)를 수행하였다. 이 방법은 능동형 회피행동 검사와 마찬가지로 동일한 실험장치에서 이

루어지나 진행방법은 다르게 구성되어 다른 작업 수행 능력을 보인다. 실험이 시작 되면 실험동물은 밝은 쪽 방에 위치하게 되며 반대편의 어두운 방으로 이동 할 수 있도록 통로의 문은 개방되어있다. 어두운 방으로 실험동물이 이동하게되면 통로는 바로 닫히게 되고 실험동물은 어두운 방에서 15초 동안 자유롭게 방치하는 실험 전 적응과정(training)을 3일 동안 매일 1회씩 시행하였다. 이것은 실험동물이 야행성 동물(nocturnal animal)인 관계로 어두운 곳을 선호하는 것에 대한 내재적인 행동습성을 이용한 실험방법으로써 고안되었다. 3일 동안의 적응과정에서 밝은 쪽 방에서 어두운 방으로의 이동에 걸리는 시간이 일정하게 유지되도록 한 다음 실험 당일에는 적응과정과 동일하게 실험동물을 밝은 쪽 방에 위치시킨 후 어두운 방으로 이동하면 통로를 닫는다. 하지만 어두운 방에 들어온 후 2초가 지난 다음 5초 동안 0.8 mA 세기의 전류를 격자 바닥에 흘려주어 혐오성 기억을 만들어 주게 된다. 쥐는 사육장으로 되돌려진 후 24시간 경과 후에 다시 동일한 장치에 노출하여 밝은 쪽 방에서 어두운 쪽 방으로 이동하는데 걸리는 시간을 측정변수로 하여 24 시간 전에 경험한 혐오기억에 대한 기억능력을 검사하였다.

5. 기호성 강화에 의한 학습능력 측정

생후 180일에 표준 설치류 행동측정상자를 이용하여 기호성 강화에 의한 학습능력을 자가학습검사와 Progressive ratio 검사로 살펴보았다. 일정관리 행동 실험법의 일종으로, 실험 전 실험동물은 15일 동안 개별 사육장에서 사육하면서 정상 체중의 85%로 식이 제한을 통해 유지시키면서 먹이에 대한 선호도를 증가시키고, 행동측정 상자에서 주는 기호성 강화용 먹이에 대한 거부감을 없애 주었다. 표준 설치류 행동측정상자에서 매일12회씩 12일에 걸쳐 레버 접촉과 먹이 강화와의 연합 학습능력을 검색하였다. 실험은 한 개의 레버가 15초 동안 상자 내로 돌출되고 이후 레버가 철수되면 4초 후에 먹이가 공급되는 것으로 한번의 시도-기회가 이루어지게 되며 매일 12회의 기회반복이 이루어지고 12일 동안 연속하여 수행하였다. 매번 시도-기회마다 실험동물이 돌출된 레버를 접촉한 경우 레버는 곧바로 상자에서 철수되며 이때부터 4초 후에 먹이가 공급되어, 기회가 반복되어 질수록 실험동물은 레버 접촉과 먹이 공급의 시간간격이 단축됨을 배워 이것의 연합이 학습효과로서 나타나게 된다. 또한 반응이 없더라도 15초 동안의 시도기간이 종료되면 먹이는 분배되며, 실험동물들은 레버 접촉과 먹이분배와의 관련성을 시간적 차이와 함께 학습 습득하게 된다. 이후 다음 시도기간에서도 동일한 방법으로 지속되며 시도들 간의 시간 간격은 무작위 시간간격으로 이루어진다(그림 5).^{38,39}

Two-way Active Avoidance



30 trials per session
 Challenge: Dark compartment
 CS period: 15 sec, Light and tone, opposite site
 US period: 10 sec, with CS tone
 Termination: Avoid or Escape behavior

그림 4. 양방향 능동 회피 검사의 조건 및 반응의 개요. 동물은 연결 통로가 열려있는 2개의 방으로 구성된 실험장치(shuttle box)에 위치하고 3분 동안 탐색활동을 할 수 있는 적응기간을 준다. 실험동물이 위치하는 방에 총 15초 동안의 빛과 경고음으로 구성된 조건화 자극(CS; conditioned stimulus)이 선행되며, 10초 동안의 조건화 자극경과 후에 5초 동안 격자 바닥에 전기충격이 가해지는 비조건화 자극(US; unconditioned stimulus)을 조건화 자극과 함께 주었다. 매 회 능동회피 조건과 시간은 20초 동안으로 동일하였고, 각 시도기회 사이는 무작위 시간 간격을 두고 시행하였다. 조건화자극이 주어지는 동안 실험 동물이 통로를 통해 다른 방으로 이동하면 회피(avoid)로, 조건화 자극과 비조건화 자극이 동시에 있는 시간 중에 이동하면 탈출(escape)로, 그리고 자극이 모두 끝나도록 다른 쪽 방으로 이동하지 않은 경우는 실패(failure)로 정의하였다.

Autoshaped learning test with delayed reinforcement

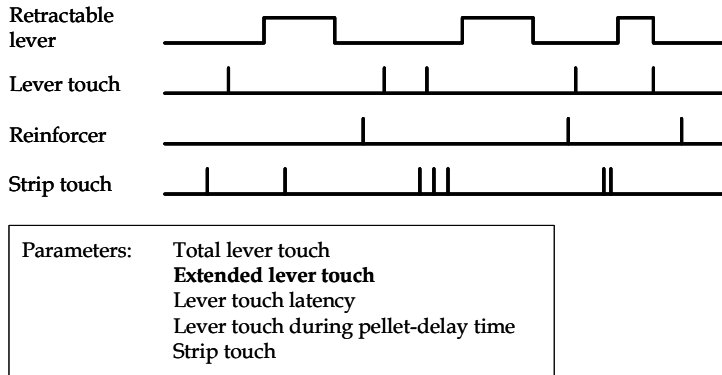


그림 5. 표준 설치류 행동 측정 장치를 이용한 자가학습검사의 구성 및 행동

분석 개요. 자가학습 검사는 매일 12회의 시도기회를 갖으며 총 12일 동안 시행하였다. 실험동물을 표준 설치류 행동측정 상자 내에 위치시키고 각 시도 기회간의 간격은 평균 55초 되도록 10초에서 100초까지의 무작위 수를 선택하였다. 각 시도 기회의 구성은 15초 동안 상자 내로 레버가 돌출 되며 이 시도기회 동안에 실험동물이 레버를 접촉할 경우 레버는 즉시 상자 내로 철수되며, 설정된 6초의 지연시간이 지난 다음 먹이 공급장치를 통해 상자 속으로 강화용 먹이가 배급된다. 만약 레버가 상자 내로 돌출 되어 있는 시도기회 동안 레버 접촉이 없는 경우에도 레버는 15초 후에 상자에서 철수되며 이후 설정된 지연시간 후에 먹이 배급이 이루어진다. 측정 변수로는 전체 레버 접촉 횟수, 시도기회동안의 레버접촉 횟수, 레버철수 후 먹이분배의 지연시간동안의 레버접촉 횟수, 그리고 레버가 아닌 벽면을 접촉한 횟수를 기록하였으며, 정확한 학습반응의 경우는 15초 동안 레버가 상자 내로 돌출 되어있는 시도기회 동안의 접촉 횟수를 이용하였다.

Fixed Ratio 검사는 레버가 철수하지 않고 항상 돌출 되어 있는 상태에서 실험 동물이 20 g 이상의 무게로 레버를 눌러야만 먹이의 분배가 이루어진다. 자가학습 검사가 끝난 실험동물은 먹이분배를 위한 작업이 레버접촉이 아닌 레버 누름(lever press)을 먼저 습득해야 한다. 레버 누름과 먹이분배의 비율을 1로 정한 것이 Fixed Ratio 1 (FR1)이다. 즉, 1번의 레버 누름이 수행된 다음 즉시 1개의 먹이 분배가 이루어진다. 총 5분 동안 레버를 눌러 먹이를 얻는 횟수를 측정 변수로 기록 하였다.

Progressive Ratio 검사는 동기 요소에 민감하다고 알려져 있는데 레버 누름 횟수와 먹이 분배와의 비율은 점진적으로 증가시키는 방법이다. 이 때 실험동물의 행동중단점(breakpoint)을 측정하여 동기요소를 판단하였다(그림 6).⁴⁴

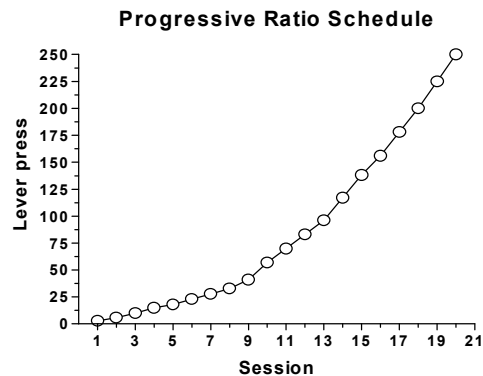


그림 6. 본 실험에서 이용한 progressive ratio schedule 개요. 실험동물이 20 g 이상의 무게로 레버 눌러야 작동되는 본 실험에서는 레버누름이 1, 2, 3, 3, 5, 8, 8, 12, 15, 15 로 점진적으로 증가되었다.

6. 솔기핵 5-HT 신경세포와 시상하부 c-Fos 양성세포 면역세포화학적 검색

5-HT 신경세포의 분포를 알아보기 위해 뇌 솔기핵(봉선핵; raphe nucleus)에서 5-HT 항체를 이용하여 면역세포화학적 검사를 시행하였다. 또한 스트레스 대응축의 시발점인 시상하부의 신경세포 활성 정도를 측정하기 위하여 c-Fos 단백질의 발현 정도를 c-Fos 항체를 이용하여 면역세포화학적 검사를 시행하였다. 행동 검색이 끝난 실험동물을 고농도 pentobarbital (120 mg/kg) 복강 내 주사하여 신속하게 마취시킨 후 심장관류법(transcardiac perfusion method)을 이용하여 고정하였다. 관류액(0.9% NaCl: 0.5% NaNO₃: 10u heparin)을 peristaltic pump를 통해 주입하여 혈관 내부 혈액을 제거한 후, 냉각시킨 고정액(4% paraformaldehyde: 0.1M sodium phosphate buffer, pH 7.2)을 주입하여 조직을 고정시켰다. 관류 고정이 끝난 후 뇌를 신속하게 적출한 다음, 동일한 고정액으로 4℃에서 1시간 동안 후고정하였다. 냉동절편 조작시 조직의 손상을 방지하기 위하여 30% sucrose용액에 고정된 뇌조직을 24시간 이상 방치한 다음 냉동 박절하였다. 냉동조직 절삭기(sliding microtome, Microm Co., Germany)를 이용하여 조직을 40 μ m로 냉동 박절하여 0.1M sodium phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2)에 조직을 받아내어 단기간 보존하였다. 조직을 완충용액에서 세척한 다음 0.2% Triton X-100(1% BSA: 0.2% Triton X-100: 0.1M PBS)에 30분간 처리 후 primary antibody가 들어있는 용액(0.5% BSA: 0.1M PBS)에 조직을 옮겨 상온에서 16시간 반응시켰다. PBS-BSA(0.1M PBS: 0.5% BSA)에 조직을 씻은 후 secondary antibody가 있는 PBS-BSA 용액에 1시간 동안 반응시킨 다음, 다시 PBS-BSA로 씻은 후 avidin-biotin-horseradish peroxidase complex (ABC Standard kit, Vector Lab. Inc. CA, USA)에 조직을 1시간동안 반응시켜 항원-항체 반응 과정에서 발색단을 표지시켰다. 0.1M PBS로 조직을 씻고 DAB(0.05% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride: 0.003% hydrogen peroxide: 0.1M PBS, pH 7.2)에 5분간 발색 반응을 유도하였다. 0.1M PBS로 조직 내 남아있는 발색단을 씻어내고 gelatin-coated 유리 슬라이드에 조직을 얹어서 실온에서 건조시킨 후 알코올과 xylene을 통한 탈수와 청명 과정을 거친 후 덮개유리를 씌운 다음 광학현미경 아래에서 관찰하였다.^{45,46}

면역조직화학법에 쓰인 1차 항체(primary antibody)로는 5-HT polyclonal anti-rabbit (Eugene Tech, Inc., NY, USA)또는 c-Fos polyclonal anti-rabbit (Oncogene Inc., CA, USA)을 사용하였고, 이차항체(secondary antibody)로는

biotinylated anti-rabbit IgG와 biotinylated anti-mouse IgG (Vector Lab., Inc., CA, USA)를 사용하였다.

7. Tyrosine hydroxylase mRNA *in situ* hybridization

또 다른 스트레스 반응의 증추의 시작점으로 알려진 뇌 청반(locus ceruleus)에서 norepinephrine 신경세포의 활성정도를 측정하기 위해, norepinephrine 합성에 있어서 속도제한 효소인 tyrosine hydroxylase mRNA 수준을 관찰하였다.

실험동물을 과량의 sodium pentobarbital 복강 투여로 마취시킨 다음, heparin (중외제약(주), 서울) 처리된 NaNO₂ 0.5% 함유 생리식염수로 심장을 통해 관류하였다. 이후 냉각시킨 4% paraformaldehyde가 섞인 0.1M phosphate buffer로 고정시킨 다음, 단두하여 뇌를 신속하게 적출하고 2시간동안 후고정 후에 30% sucrose 용액에 뇌가 가라앉을 때까지 담귀 놓았다. 냉동 박절용 matrix에 포매하고 냉동절삭기로 40 μ m 두께의 관상단면으로 박절하여 조직을 얻어 2X SSC 용액이 담겨 있는 20 ml 유리병에 담은 후 조직 절편이 다 모이면 2X SSC를 유리 피펫으로 제거하고, 50% formamide, 10% dextransulfate, 2X SSC, 1X Denhardt's solution, 50mM Dithiothreitol (DTT), 0.5 mg/ml denatured salmon sperm DNA를 함유한 hybridization buffer에 조직을 잘 침윤시켜 40 $^{\circ}$ C의 항온수조에서 2시간동안 흔들어 주면서(40 rpm) prehybridization을 수행하였다. [³⁵S]- α dATP (Roche GmbH, Germany)로 표지된 cDNA probe을 제작하여(1X10⁷ cpm) 첨가한 후 48 $^{\circ}$ C에서 밤새동안 hybridize 반응을 시행하였다. 15분 간격으로 SSC의 농도를 낮춰가며(2X, 2X, 1X, 0.5X, 0.25X, 0.125X, 0.125X) 48 $^{\circ}$ C를 유지하면서 세척을 하였고, 조직을 gelatin-subbed 슬라이드에 부착한 후 공기 중에서 건조시켰다. Hyperfilm (Amershampharmaciabiotech, Upsala, Sweden)과 autoradiographic film (Kodak, USA)을 이용하여 4 $^{\circ}$ C에서 6시간에서 24시간동안 방사성 표지된 조직을 노출시켜 autoradiographic film의 노출정도가 뛰어난 시점(a linear range of optical density)에서 hyperfilm을 D-19 developer (Kodak, USA)로서 현상하여 *in situ* hybridization 사진을 얻었다.

Autoradiographic image는 CCD camera를 이용하여 MCID system(Imaging Systems Inc., Canada)에서 digitize한 다음, radiolabeled probe이 부착되어 나타나는 mRNA의 relative optical density를 선택된 영역에서 구하여 광학적 농도차이를 측정변수로 구하였다.

실험 2-2. 결 과

1. 생후 14일과 21일의 30회 전기충격 후 24시간 동안의 체중변동과 무력행동 관찰

생후 14일에 첫 번째 전기충격 경험 후 24시간 동안의 체중 증가 변동을 살펴본 결과 무처치군에서 체중 증가가 2.38 ± 0.26 g 이었고, 전기충격을 30회 경험한 실험군에서 체중 증가는 2.00 ± 0.13 g 으로 무처치군에 비하여 감소하였으나 통계적인 유의성은 발견할 수 없어, 생후 14일의 전기충격 스트레스 경험은 이후 24시간 동안의 성장에 영향을 미치지 않았다(그림 7-A). 그리고 1주일 후 생후 21일의 전기충격 경험 후 24시간 동안의 체중증가 변동을 살펴 본 결과 무처치군은 5.61 ± 0.58 , 대조군은 5.36 ± 0.52 , 그리고 전기충격 경험 개체들은 평균 5.25 ± 0.40 g 으로 실험군간 차이는 관찰할 수 없었다(그림 7-B).

생후 21일에 경험한 두 번째 전기충격에서 무력행동을 표출한 개체(HPLS(+))들과 무력행동을 나타내지 않은 개체(HPLS(-))들을 구분하여 이것을 스트레스에 대한 개체의 반응성의 차이로 인식하였다. 무력군(HPLS(+))은 전기충격 경험 시에 26.1 ± 0.7 회 때 무력 행동을 표출하였으며, 비무력군(HPLS(-))은 전기충격 경험에서 무력 행동을 29.7 ± 0.1 회 때 나타내어 본 연구에서는 생애초기 반복된 전기충격에 대해 개체들이 무력 행동을 표출하는 시점을 기준으로 실험군을 구분하여 이후 실험에 이용하였다 (그림 8-A). 무력군의 경우 무력 행동을 표출하는 시점은 생후 14일의 전기충격에는 29.7 ± 0.2 회였으나, 생후 21일의 반복된 전기충격 노출에서는 20.6 ± 0.9 회로 무력 행동이 표출되는 시점이 일찍 나타났다(그림 8-B).

전기충격을 경험한 실험군 가운데 무력 행동을 나타내 보인 개체들과 무력 행동을 나타내 보이지 않은 개체들은 수컷의 경우 무력군은 $n=16$, 비무력군은 $n=24$ 였고, 암컷의 경우는 무력군 $n=22$, 비무력군 $n=19$ 마리 였다.

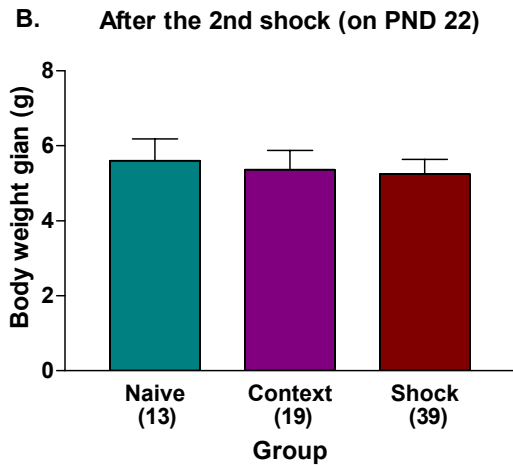
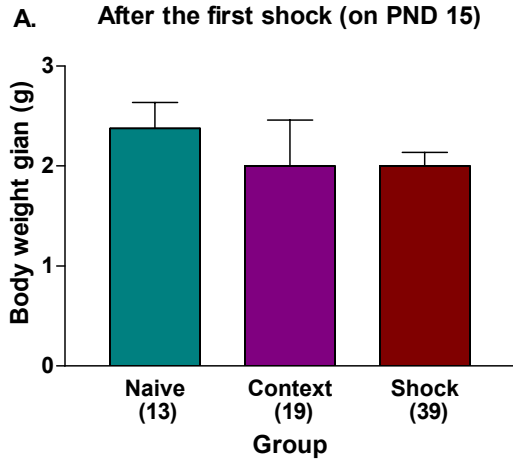


그림 7. 생후 14일 및 21일의 전기충격 스트레스 경험 후 24시간 동안의 체중 변화.
 A. 생후 14일에 전기충격 스트레스 경험 후 24시간 동안의 체중변동. B. 생후 21일의 반복된 전기충격 스트레스 경험 후 24시간 동안의 체중변동. Naive: 무력군; Context: 전기충격 상자에 스트레스 노출시간 동안 노출되었으나 전기충격만 받지 않은 대조군; Shock: 전기충격 스트레스를 경험한 실험군.

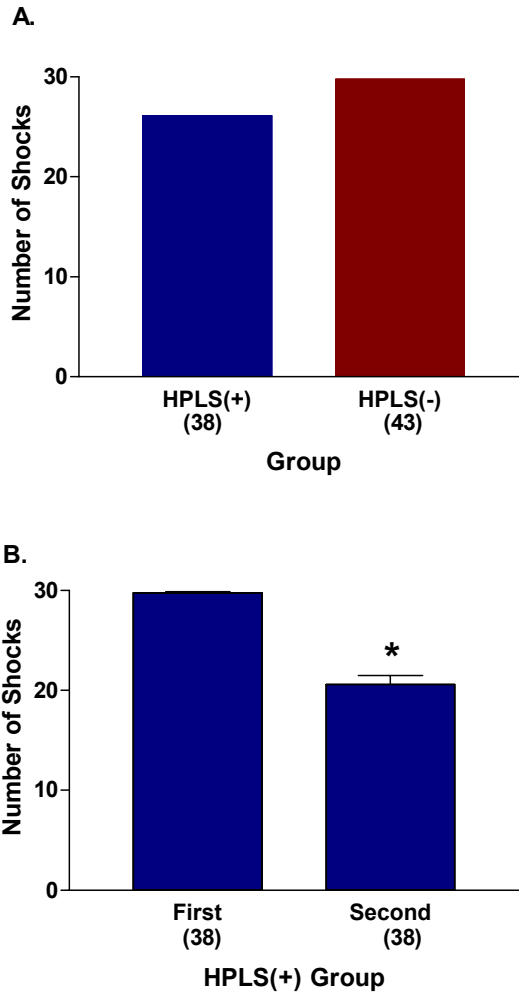


그림 8. A. 생후 14일과 21일의 반복된 전기충격 스트레스 경험에 의한 무력행동 표출 시점.

A. 생후 14일과 21일의 반복된 전기충격 스트레스 경험으로 무력 행동을 표출하는 개체들과 무력 행동을 보이지 않는 개체들의 무력행동 표출 시점. B. 무력군의 생후 14일과 21일의 전기충격 당시 무력 행동을 표출하는 시점. HPLS(+): 반복된 전기충격 스트레스를 경험하였을 때 무력을 표출한 실험군; HPLS(-): 반복된 전기충격 스트레스를 경험하였을 때 무력을 표출하지 않은 실험군, First: HPLS(+군에서 생후 14일에 무력을 표출한 시점; Second: HPLS(+군에서 생후 21일에 무력을 표출한 시점. * $p < 0.05$ vs. First.

2. 생후 100일 탐색행동 측정

생애초기 반복된 전기충격 스트레스 경험 후 생후 100일에 실험동물을 새로운 환경에 노출시켜 5분 동안의 탐색활동도를 관찰하였다. 수컷 무처치군(n=9)의 경우 새로운 환경에 노출되었을 때 첫 1분 동안의 이동활동도는 149.0 ± 17.7 회였고, 이후 이동활동도는 감소되어 안정화되는 양상을 나타내었다. 첫 1분 동안의 이동활동도는 대조군(n=9)이 126.1 ± 14.3 , 무력군(n=12)이 172.6 ± 21.5 , 비무력군(n=15)이 162.5 ± 13.4 회였다(그림 9-A). 암컷의 경우 첫 1분 동안의 이동활동도는 무처치군(n=9)의 경우 158.6 ± 21.0 , 대조군(n=9) 150.2 ± 20.2 , 무력군(n=16) 178.1 ± 14.8 , 비무력군(n=10) 167.2 ± 19.5 회로 관찰되었다(그림 9-B).

3. 생후 150일 양방향 능동회피 학습행동검사

양방향 능동회피 학습을 30회 시행한 결과, 조건자극이 주어지는 동안 다른 구역으로 회피행동을 보인 횟수를 측정 변수로 기록하였다. 회피행동 성공횟수를 비교한 결과 무력군(n=10)에서 회피행동이 7.3 ± 0.7 회로 증가된 학습이 관찰되었으며 ($F_{(3,23)}=3.124$, $p<0.05$), 무처치군(n=10) 4.8 ± 0.9 , 대조군(n=10) 4.3 ± 0.7 , 비무력군(n=10) 4.7 ± 1.0 회로 다른 실험군들은 대조군과 차이를 나타내지 않았다(그림 10-A). 암컷의 경우 회피행동 학습이 무처치군(n=11) 5.1 ± 0.8 , 대조군(n=9) 3.8 ± 1.0 , 무력군(n=11) 5.0 ± 1.4 , 비무력군(n=13) 4.0 ± 0.8 회로 실험군간의 차이를 나타내지 않았다(그림 10-B).

수동 회피 검사를 수행하여 24시간 동안의 혐오강화에 의한 기억 유지 능력을 검색하였다. 실험장치의 밝은 쪽 방에서 어두운 방으로 이동한 후 5초 동안의 전기충격을 주었다. 전기충격을 경험 한 후 24시간 후에 다시 실험 동물을 밝은 쪽 방에 위치시키고 어두운 쪽 방으로 이동하여 들어가는 시간을 기억유지에 관련된 측정 변수로 하여 관찰하였다. 수컷 실험동물에서 생애초기 전기충격 스트레스 경험 시 학습된 무력을 나타내 보인 무력군은 260.5 ± 37.6 초가 걸렸으며, 무력을 보이지 않은 비무력군은 112.8 ± 50.8 초, 무처치군은 224.3 ± 37.4 초, 그리고 대조군은 81.4 ± 38.5 초로 가장 낮은 수준의 기억 유지 능력이 관찰되었다 ($F_{(3,27)}=4.321$, $p<0.05$) (그림 11-A). 암컷 실험동물의 경우 무처치군 11.8 ± 3.7 초, 대조군 23.6 ± 9.1 초, 무력군 17.2 ± 2.5 초, 그리고 비무력군은 24.1 ± 8.5 초로 수컷과 비교하였을 경우 무척 낮은 수준의 기억 유지능력을 보였으나, 암컷 실험동물에서 실험군간의 차이는 관찰할 수 없었다(그림 11-B).

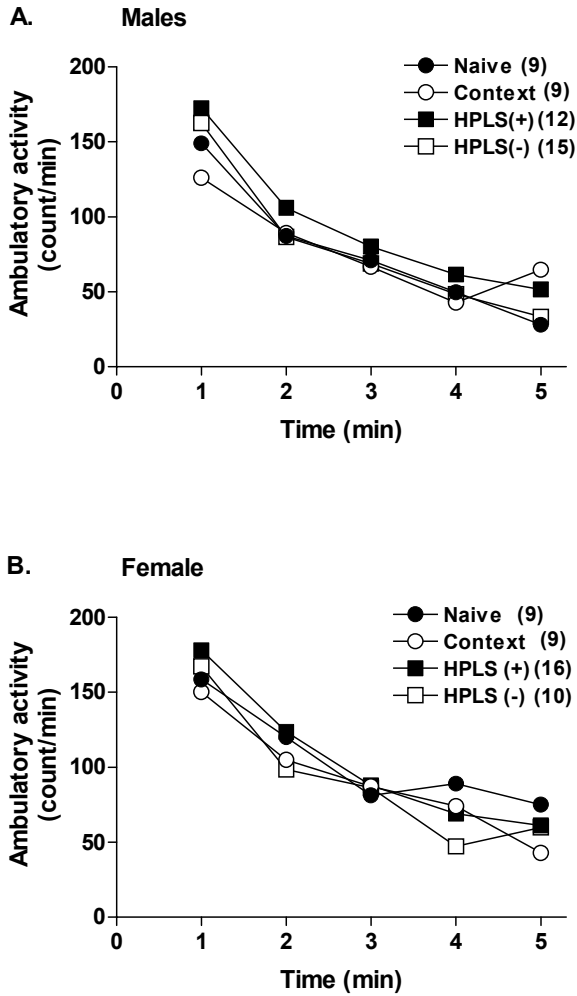


그림 9. 생후 100일 탐색행동 검사. 생후 100일이 되었을 때 5분 동안 새로운 환경에 노출시켜 탐색활동을 관찰하였다. A. 수컷 실험동물의 5분 동안의 탐색활동도. B. 암컷 실험동물의 5분 동안의 탐색활동도. Naive: 체중을 측정하기 위한 시간을 제외하고는 어미로부터 격리되지 않은 무처치군; Context: 전기충격 상자에 스트레스 노출시간 동안 노출되었으나 전기충격만 경험하지 않은 대조군; HPLS(+): 생후 14일과 21일에 두 번 반복하여 전기충격을 경험한 개체들 가운데 무력행동을 나타낸 실험군. HPLS(-): 생후 14일과 21일에 두 번 반복하여 전기충격을 경험한 개체들 가운데 무력행동을 나타내지 않은 실험군.

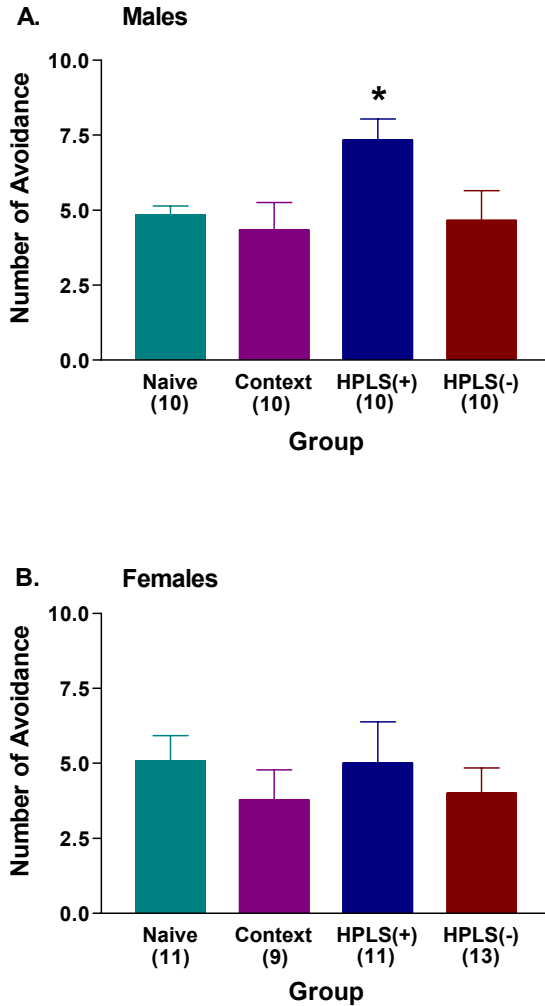


그림 10. 생후 150일 양방향 능동 회피행동 검사. A. 수컷 실험동물의 회피행동 성적. B. 암컷 실험동물 회피행동 성적. Naive: 체중을 측정하기 위한 시간을 제외하고는 어미로부터 격리되지 않은 무처치군; Context: 전기충격 상자에 스트레스 노출시간 동안 노출되었으나 전기충격만 경험하지 않은 대조군; HPLS(+): 생후 14일과 21일에 두 번 반복하여 전기충격을 경험한 개체들 가운데 무력행동을 나타낸 실험군. HPLS(-): 생후 14일과 21일에 두 번 반복하여 전기충격을 경험한 개체들 가운데 무력행동을 나타내지 않은 실험군. * $p < 0.05$ vs. the Context group.

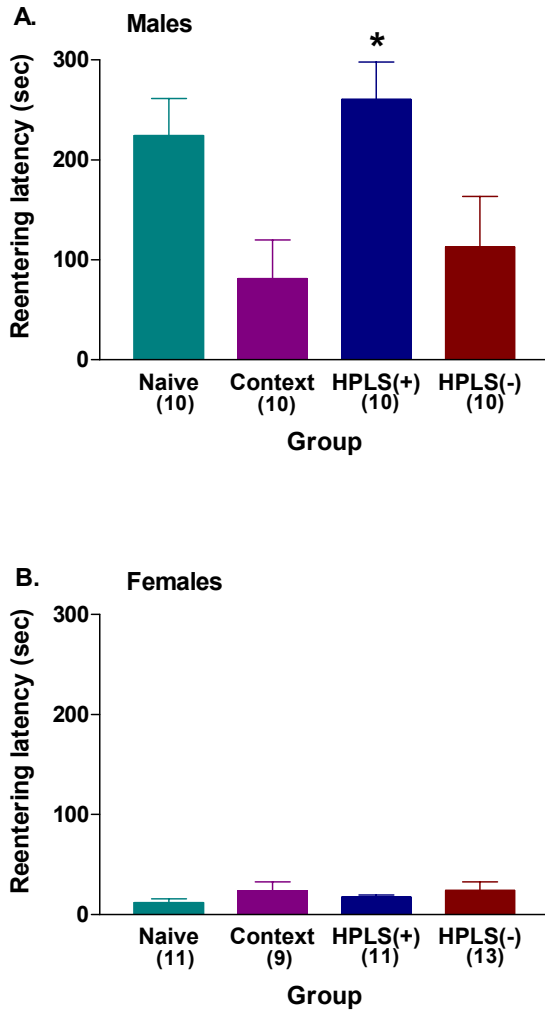


그림 11. 생후 150일 단방향 수동 회피행동 검사(passive avoidance test).

A. 수컷 실험동물에서 수동 회피행동 검사 B. 암컷 실험동물에서 수동 회피행동 검사. Naive: 체중을 측정하기 위한 시간을 제외하고는 어미로부터 격리되지 않은 무처치군; Context: 전기충격 상자에 스트레스 노출시간 동안 노출되었으나 전기충격만 경험하지 않은 대조군; HPLS(+): 생후 14일과 21일에 두 번 반복하여 전기충격을 경험한 개체들 가운데 무력행동을 나타낸 실험군. HPLS(-): 생후 14일과 21일에 두 번 반복하여 전기충격을 경험한 개체들 가운데 무력행동을 나타내지 않은 실험군. * $p < 0.05$ vs. the Context group.

4. 생후 180일에 수행한 자가학습검사

생후 14일과 21일의 반복된 전기충격 스트레스 경험에서 무력 행동을 표출한 개체들과 무력 행동을 나타내 보이지 않은 개체들을 분리하여 사육한 수컷 실험동물을 이용하여 회피행동 검사 후 체중을 정상 상태의 85%로 식이 제한 방법으로 유지시킨 후, 목표 체중을 유지시키면서 생후 180일이 되었을 때 12일 동안 매일 12회의 시도기회가 주어지는 기호성 강화를 이용한 자가학습검사를 통하여 학습행동 능력을 검색하였다. 실험동물을 표준 설치류 행동측정 상자에 위치시키고, 레버가 상자 내로 돌출 되어 있는 시도기간 중에 먹이 획득을 위해 레버 접촉을 한 경우를 조작조건화 상황에서 정확한 학습이 이루어진 것으로 판단하여 측정변수로 이용하였다.

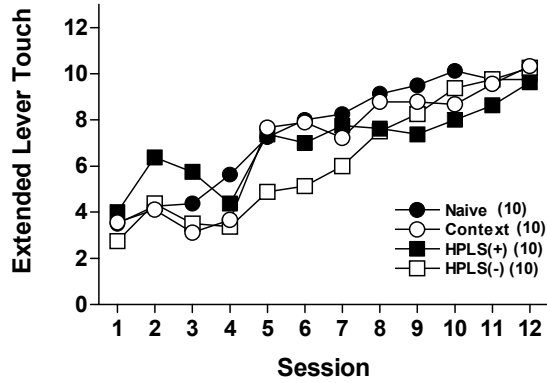
실험동물은 각 실험군 별 10마리씩이었으며, 전체적인 학습성취도 곡선에서는 뚜렷한 차이는 관찰할 수 없었다 (그림 12-A). 학습 제 10 일의 성취도를 기준으로 잘 배운 개체들만을 선택하여 관찰한 결과 생애초기 반복적인 전기충격 스트레스 경험에서 무력 행동을 보이지 않았던 개체들의 학습성취가 늦게 일어남 (retardation of learning acquisition)을 알 수 있었다 (그림 12-B).

5. 생후 200일의 Fixed Ratio 및 Progressive Ratio 검사

자가학습 검사 후 레버 누름과 먹이 분배의 비율을 1로 정한 Fixed Ratio (FR) 1을 3일 동안 시행하였다. 레버 누름과 먹이 분배를 배우게 되는 과정을 매일 3분씩 3일 동안 시행하였다. 생애초기 반복 경험된 전기충격 스트레스에서 무력 행동을 표출하였던 무력군의 경우 제 1 일의 반응은 낮았으나 이후 학습 성취도가 높았으며, 전체적인 경향은 각 실험군에서 비슷하게 관찰되었다. 그러나 스트레스 경험에서 무력 행동을 보이지 않은 비무력군의 경우 전반적인 레버 누름 반응 수준이 둔화되어 있었다 (그림 13).

레버 누름과 먹이 분배와의 관계를 FR 1 검사를 반복하여 습득한 후 레버 누름 횟수와 먹이 분배와의 비율을 점진적으로 증가시켜서 동기요소를 검색하는 방법인 Progressive Ratio 검사를 실시하였다. 레버 누름을 중단하는 행동 중단점 (break point)과 전체 레버 누름 횟수(number of perseverative presses)를 살펴본 결과 스트레스 경험 당시 무력 행동을 표출하였던 무력군이 가장 높게 관찰되었다. 행동 중단점은 무처치군 8.3 ± 0.5 , 대조군 9.2 ± 0.7 , 무력군 10.6 ± 0.3 , 그리고 비무력군은 9.3 ± 0.7 이었다(그림 14-A). Progressive Ratio schedule 동안의 전체 레버 누름 횟수를 관찰한 결과 무처치군 107.4 ± 15.5 , 대조군 152.9 ± 26.0 , 무력군 198.4 ± 11.7 , 그리고 비무력군은 154.1 ± 30.7 이었다(그림 14-B).

A. All animals



B. Learned animals

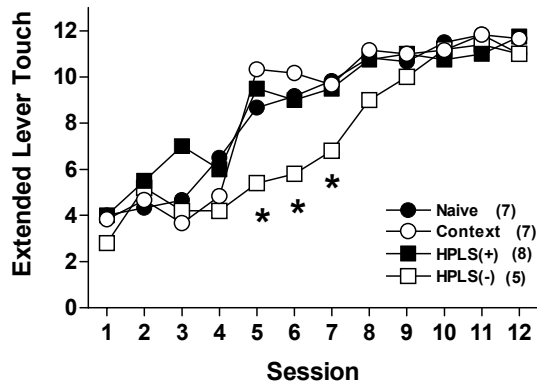


그림 12. 생후 180일에 수행한 자가학습 행동 검사(autoshaped learning test). A. 전체 실험동물의 학습 곡선 (learning curve of acquisition). B. 제 10일에 10회 이상 정확한 레버 접촉 반응(extended lever touch)을 보인 개체들(good learner)의 학습 곡선. Naive: 체중을 측정하기 위한 시간을 제외하고는 어미로부터 격리되지 않은 무처치군; Context: 전기충격 상자에 스트레스 노출시간 동안 노출되었으나 전기충격만 경험하지 않은 대조군; HPLS(+): 생후 14일과 21일에 두 번 반복하여 전기충격을 경험한 개체들 가운데 무력행동을 나타낸 실험군. HPLS(-): 생후 14일과 21일에 두 번 반복하여 전기충격을 경험한 개체들 가운데 무력행동을 나타내지 않은 실험군. * $p < 0.05$ vs. the Context group; vs. the HPLS(+) group.

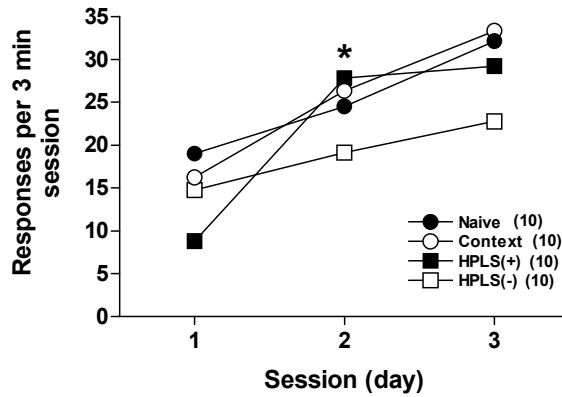


그림 13. 생후 200일 Fixed Ratio 1 검사. Fixed Ratio 1 test를 3일 동안 매일 3분씩 수행하였다. Naive: 체중을 측정하기 위한 시간을 제외하고는 어미로부터 격리되지 않은 무처치군; Context: 전기충격 상자에 스트레스 노출시간 동안 노출되었으나 전기충격만 경험하지 않은 대조군; HPLS(+): 생후 14일과 21일에 두 번 반복하여 전기충격을 경험한 개체들 가운데 무력행동을 나타낸 실험군. HPLS(-): 생후 14일과 21일에 두 번 반복하여 전기충격을 경험한 개체들 가운데 무력행동을 나타내지 않은 실험군. * $p < 0.05$ vs. the HPLS(-) group by repeated measures ANOVA.

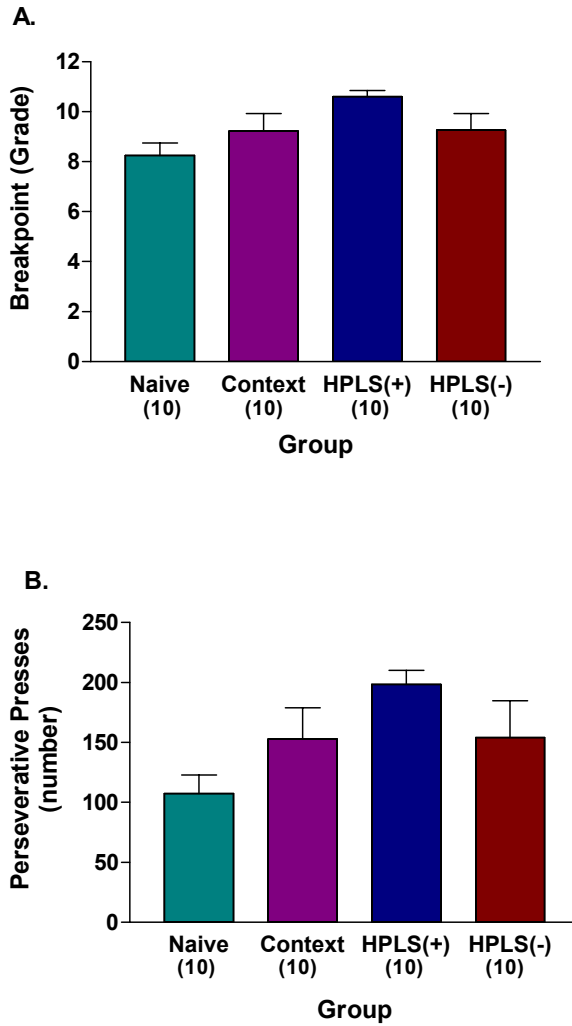


그림 14. 생후 200일 Progressive Ratio 검사. 점진적으로 레버누름 횟수와 먹이분배의 비율이 변화되는 작업인 Progressive ratio (PR) 검사를 수행하였다. Naive: 체중을 측정하기 위한 시간을 제외하고는 어미로부터 격리되지 않은 무처치군; Context: 전기충격 상자에 스트레스 노출시간 동안 노출되었으나 전기충격만 경험하지 않은 대조군; HPLS(+): 생후 14일과 21일에 두 번 반복하여 전기충격을 경험한 개체들 가운데 무력행동을 나타낸 실험군. HPLS(-): 생후 14일과 21일에 두 번 반복하여 전기충격을 경험한 개체들 가운데 무력행동을 나타내지 않은 실험군.

6. 솔기핵 5-HT 신경세포의 면역세포화학적 검색

생애 초기 전기충격 스트레스를 경험한 후 행동검사를 시행한 실험동물을 생후 210일에 희생시켜 뇌 신경화학적 변동을 관찰하였다. 뇌 솔기핵(봉선핵; raphe nucleus)에서의 생애초기 전기충격 스트레스 경험에 의한 성숙 후의 세로토닌 신경세포체 분포 변동을 면역세포화학적 방법으로 검색하였다. 생애초기 전기충격 스트레스를 경험 당시 무력 행동을 표출한 무력군의 경우 5-HT 면역 활성 세포(5-HT immunoreactive cells)들의 분포가 무력 행동을 나타내지 않은 비무력군과 환경에만 노출되었던 대조군과 비교하여 감소되어 있었다 (그림 15).

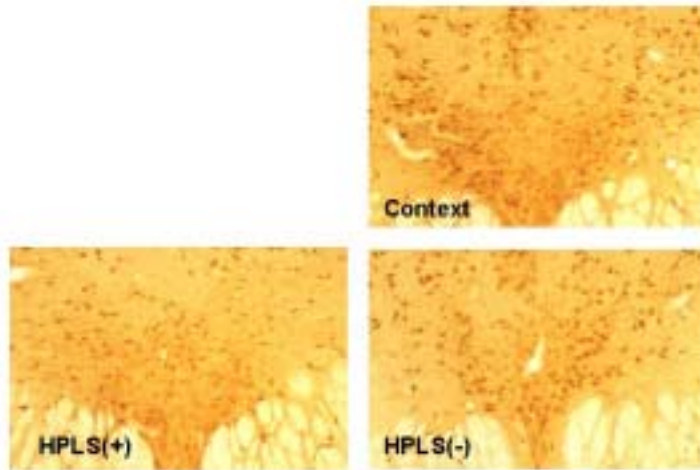


그림 15. 생애초기 전기충격 스트레스 경험 후 생후 210일 뇌 솔기핵 5-HT 신경세포체 분포 양상. Naive: 체중을 측정하기 위한 시간을 제외하고는 어미로부터 격리되지 않은 무처치군; Context: 전기충격 상자에 스트레스 노출시간 동안 노출되었으나 전기충격만 경험하지 않은 대조군; HPLS(+): 생후 14일과 21일에 두 번 반복하여 전기충격을 경험한 개체들 가운데 무력행동을 나타낸 실험군. HPLS(-): 생후 14일과 21일에 두 번 반복하여 전기충격을 경험한 개체들 가운데 무력행동을 나타내지 않은 실험군.

7. 시상하부에서의 c-Fos 단백질 면역세포화학적 검색

생후 210일에 행동검색이 모두 끝난 실험동물을 희생시켜 스트레스 반응에 있어서 시작점으로 알려져 있는 시상하부에서의 생애초기 전기충격 스트레스 경험에 의한 성숙 후의 변동을 면역세포화학적 방법으로 검색하였다. c-Fos 단백질의 활성화는 시상하부 신경세포의 활성을 간접적으로 살펴볼 수 있는 지표로 이용되는데, 본 연구에서는 추가적인 스트레스 자극 없이 정상 생리상태에서 실험동물을 희생하여 기저상태(basal state)에서의 발현 정도를 조사하였다. 전체적으로 전기충격 스트레스를 경험한 개체들의 경우 c-Fos 단백질 면역활성 세포(c-Fos immunoreactive cells)들의 수 (HPLS(+): 37.7 ± 9.9 ; HPLS(-): 49.0 ± 7.2)가 생애초기 전기충격을 경험하지 않은 군 (Naive: 35.7 ± 10.4 ; Context: 26.5 ± 0.9)에 비해 증가되어 있었으나 유의한 차이는 발견할 수 없었다 ($F_{(3,21)}=1.302$) (그림 16).

8. Norepinephrine 신경세포에서 tyrosine hydroxylase mRNA 발현 검색

뇌 청반에 위치한 A계 신경세포에서 분비되는 중추 norepinephrine은 스트레스 반응 시 중추에서 시작되는 자율신경 흥분에 관여하는 것으로 알려져 있는데, 이들 신경전달물질을 합성하는 과정에서 생성속도에 관여하는 속도제한효소(synthesis limiting enzyme)로 알려진 tyrosine hydroxylase (TH)의 mRNA 발현 양상을 *in situ* hybridization법으로 살펴보았다. 5-HT 신경세포의 면역활성 세포의 분포와 마찬가지로 생애초기 반복적인 전기충격 스트레스를 경험 당시 무력 행동을 표출하였던 무력군에 있어서 TH mRNA의 광학적 농도(optical density)가 무력 행동을 나타내지 않았던 비무력군에 비해 낮게 관찰되었다 (그림 17).

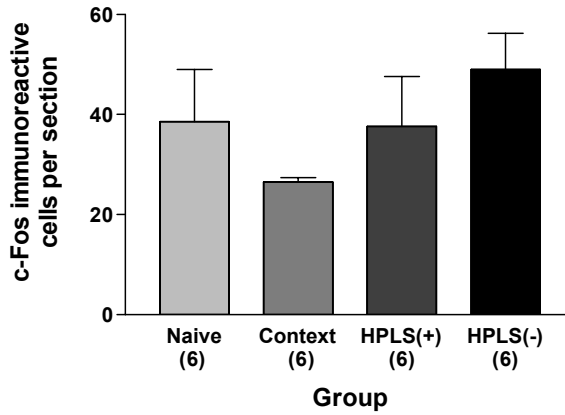


그림 16. 생애초기 전기충격 스트레스 경험 후 생후 210일 뇌 시상하부 c-Fos 양성세포 면역화학적 검색. Naive: 체중을 측정하기 위한 시간을 제외하고는 어미로부터 격리되지 않은 무처치군; Context: 전기충격 상자에 스트레스 노출시간 동안 노출되었으나 전기충격만 경험하지 않은 대조군; HPLS(+): 생후 14일과 21일에 두 번 반복하여 전기충격을 경험한 개체들 가운데 무력행동을 나타낸 실험군. HPLS(-): 생후 14일과 21일에 두 번 반복하여 전기충격을 경험한 개체들 가운데 무력행동을 나타내지 않은 실험군.

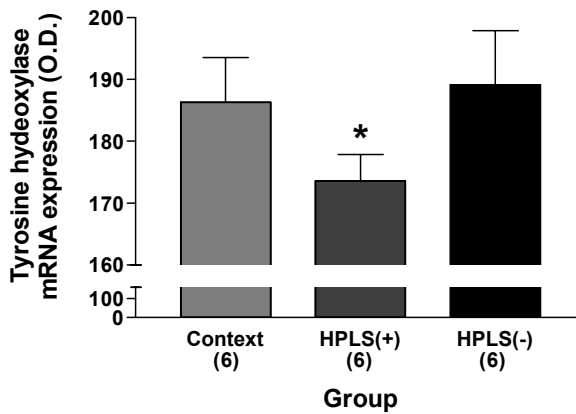


그림 17. 생애초기 전기충격 스트레스 경험 후 생후 210일 뇌 청반 신경세포 TH mRNA 발현 검색.

* $p < 0.05$ vs. the Context group.

실험 2-3. 요약

생애초기 극심한 자극에 노출된 경우 개체는 외부에서 유입된 스트레스에 대응하기 위한 스트레스 반응을 나타내어 보인다. 본 연구에서는 개체들을 각각의 고유한 스트레스 반응성에 따라 구분하여 성숙 후의 행동변동을 검색하였고, 스트레스 반응에 관련된 신경전달물질의 신경세포들의 활성을 조직학적 방법을 이용하여 검색하였다.

1. 생후 100일에 타고난 행동인 탐색활동 검사에서 어린 시기의 스트레스의 경험 유무 또는 스트레스 반응성의 차이는 활동도의 변동을 초래하지 않았다.

2. 생후 150일에 조건화된 행동검사 양방향 능동회피검사를 실시한 결과 생애초기 반복적인 스트레스 경험 당시 무력 행동을 표출하였던 무력군에서 회피행동 성공률이 높았다.

3. 생후 160일에 수동형 회피 검사에서 생애초기 반복적인 스트레스 경험 당시 무력 행동을 표출하였던 무력군에서 높은 24시간 동안 기억 유지 수준을 나타내었다.

4. 생후 180일에 기호성 강화자극을 이용한 자가학습검사에서 생애초기에 반복적인 전기충격 스트레스를 경험하였을 때 무력 행동을 표출하지 않았던 비무력군의 학습이 지체(learning retardation)되어 나타남을 관찰할 수 있었다.

5. 행동검색이 끝난 생후 210일경 실험동물 뇌의 솔기핵에서 생애초기 반복적인 스트레스 경험 시 무력 행동을 표출하였던 무력군에서 5-HT 면역표지된 신경세포 빈도가 낮았다.

6. 행동검색이 끝난 생후 210일경 실험동물 뇌의 시상하부 영역에서 c-Fos 단백질의 발현에서 생애초기 반복적인 전기충격 스트레스를 경험한 무력군과 비무력군 모두에서 아무런 자극이 없는 상태에서의 발현량이 증가되어 있었다.

7. 행동검색이 끝난 생후 210일경 실험동물 뇌의 청반에서 tyrosine hydroxylase mRNA 발현에서 생애초기 반복적인 스트레스 경험 당시 무력 행동을 표출하였던 무력군에서 낮은 수준을 나타내었다.

이상의 결과 생애초기 스트레스 경험은 성숙된 시기의 행동양식에서 타고난 행동의 변동은 초래하지 않았으나, 기억과 학습에 연관된 행동에 변동을 초래하였고 이러한 행동변동은 개체의 스트레스 반응성이 중요한 역할을 하였음을 알 수 있었다. 또한 뇌 5-HT계의 변동이 행동변동과 동반되어 있어서 본 연구에서 관찰된 생애초기 스트레스경험으로 인한 지속적 행동변이 표출에는 뇌 5-HT계가 관련되어 있을 것으로 추측된다.

실험 3. 생애초기 스트레스 경험 직후 5-HT_{1A} 수용체 활성 변동에 의한 성숙 후 행동 변동.

실험 3-1. 재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 Sprague-Dawley 계열 rat를 이용하였다. 임신경험이 없는 암컷 쥐를 실험실 조건에 적응시킨 후 암컷 3마리와 수컷 1마리씩 같은 사육장에 넣어 교미를 유도하였다. 수태 시간을 추정하기 위하여 쥐들의 교미는 쥐들의 활동 시간인 야간에만 이루어지도록 하였으며, 낮 시간동안은 암컷과 수컷을 분리하여 교미가 이루어지지 않도록 격리시켰다.

교미유도가 시행된 다음 오전 8시에 암컷 쥐들은 질도말 검사를 시행하여 광학현미경으로 정충이 확인되면 임신된 것으로 판단하여 임신 제 1일로 정하고 교미장에서 격리시켜 임신된 암컷들끼리 사육시켰으며, 임신 15일 부터 출산에 대비하여 임신된 어미 쥐들은 개별 사육장에서 사육시켰고, 출산은 임신 21일 경에 있었다. 출산 확인된 날을 생후 0 일로 정하였으며, 생후 2일에 한 배당 사육두수를 조절하기 위해 암수 5:5의 비율로 체중을 기준으로 하여 조절시켰다.

2. 스트레스 자극 및 실험군 설정

태어난 쥐들이 생후 14일 되는 날 체중을 측정된 다음, 쥐를 개별적으로 전기충격 상자에 넣고 격자바닥을 통해 0.6 mA의 세기로 5초동안 전류를 공급하여 전기충격 스트레스를 주었으며 1일 50회 시행하였고, 전기충격이 반복되는 간격은 평균 55초 되게 무작위 간격을 두고 시행하였다. 즉, 전기충격 상자 속의 쥐는 전기충격 스트레스가 언제 오는지를 알 수 없고 또한 전기충격으로부터 회피할 수 없는 상황에서 스트레스 자극을 경험함으로써 Seligman이 제안했던 학습된 우울증의 실험적 모델을 변형하여 시행하였다.³⁸ 생후 14일에 전기충격을 경험한 개체들과 환경 자극에만 노출되었던 개체들에게 5-HT_{1A} 수용체 효현제 8-OH-DPAT (Sigma Co., MO, USA) 또는 5-HT_{1A}수용체 길항제 NAN-190 HBr (Sigma Co., MO, USA)을 전기충격 스트레스 종료 30분 경과 후에 복강 내 투여하였다. 1주일 경과 후 동일한 조건에 반복 노출시켜 개체별로 스트레스 반응의 판단지표인 무력 행동이 표출되는 것을 측정하였다.

실험군 설정은 1) 무처치군(naive); 어미로부터 격리시키지 않은 실험군, 2) 대조군(control); 생후 14일 및 21일에 전기충격에 2번 노출된 군, 3) 저용량 효현제 PND 14 투여군(low dose agonist on PND 14); 생후 14일에 첫 번째 전기충격 노출 및 스트레스자극 종료 30분 후 8-OH-DPAT 0.3 mg/kg/2ml i.p. 1회 투여 받고 21일에는 전기충격만 받은 군, 4) 저용량 효현제 PND 21 투여군(low dose agonist on PND 21); 생후 14일에 첫 번째 전기충격을 경험하고 생후 21일 전기충격 반복 노출 30분 전에 8-OH-DPAT 0.3 mg/kg/2ml i.p. 1회 투여 군, 5) 고용량 효현제 PND 14 투여군(high dose agonist on PND 14); 생후 14일에 첫 번째 전기충격 노출 및 스트레스자극 종료 30분 후 8-OH-DPAT 3.0 mg/kg/2ml i.p. 1회 투여 받고 21일에는 전기충격만 받은 군, 6) 고용량 효현제 PND 21 투여군(high dose agonist on PND 21); 생후 14일에 첫 번째 전기충격을 경험하고 생후 21일 전기충격 반복노출 30분 전에 8-OH-DPAT 3.0 mg/kg/2ml i.p. 1회 투여 군, 7) 저용량 길항제 PND 14 투여군(low dose antagonist on PND 14); 생후 14일에 첫 번째 전기충격 노출 및 스트레스자극 종료 30분 후 NAN-190 2.0 mg/kg/2ml i.p. 1회 투여 받고 21일에는 전기충격만 받은 군, 8) 저용량 길항제 PND 21 투여군(low dose antagonist on PND 21); 생후 14일에 첫 번째 전기충격을 경험하고 생후 21일 전기충격 반복노출 30분 전에 NAN-190 2.0 mg/kg/2ml i.p. 1회 투여 군, 9) 고용량 길항제 PND 14 투여군(high dose antagonist on PND 14); 생후 14일에 첫 번째 전기충격 노출 및 스트레스자극 종료 30분 후 NAN-190 10.0 mg/kg/2ml i.p. 1회 투여 받고 21일에는 전기충격만 받은 군, 10) 고용량 길항제 PND 21 투여군(high dose antagonist on PND 21); 생후 14일에 첫 번째 전기충격을 경험하고 생후 21일 전기충격 반복노출 30분 전에 NAN-190 10.0 mg/kg/2ml i.p. 1회 투여 군으로 구분하여 실험을 진행하였다.

3. 무력 행동의 표출시점

무력 행동(helplessness behavior)이 표출되는 시점을 판정하는 방법은 육안으로 행동을 관찰하면서 할 수밖에 없는데 판단 지표를 나열하면 다음과 같다. ① 움직임이 전혀 없다. 즉, 격자 바닥을 통해 electric footshock이 공급되는 5초 동안에 움직임 (발을 들어 회피하는 행동, 이동, 벽을 오르는 행동, 깜짝 놀라 움츠러드는 행동 등)이 전혀 없어야 한다. ② 꼬리가 늘어 뜨려져 있다. electric footshock session 초기에는 쥐는 스트레스 자극으로 인해 무척 흥분된 상태에 있다. 이때에는 움직임이 사라졌어도, 꼬리를 들고 있게 되는데, 꼬리를 들고 있는 것은 흥분된 상태를 반영한다. 이때에는 움직임이 없어도 이것은 learned helplessness로 판단하지 않는다. ③ 일반적으로 쥐들의 학습된 무력이 표출되어지는 시점은 0.6

mA current, 5 sec duration 의 session에서는 40회 정도에서 나타남을 사전 연구 과정을 통해 알 수 있었다. ④ 쥐의 무력 행동 표출은 연속된 3회의 electric footshock trial 동안 회피하고자 하는 움직임이 없을 때를 육안으로 판정하여, 맨 처음 안 움직인 때의 횟수를 기록한다. ⑤ session 끝까지 회피행동을 보이는 경우에는 session의 종료 횟수를 기록한다.

이상과 같은 측정 표준을 이용하여 전기충격 스트레스가 가해지는 동안 무력 행동의 표출 시점을 개체별로 측정하였다.

4. 탐색행동 측정

생애초기 전기충격 스트레스를 반복적으로 경험한 실험동물을 실험실 환경에서 계속 사육하여 생후 100일이 되었을 때 성숙되었다고 판단하여 새로운 환경에 실험동물을 노출시켜 5분 동안의 탐색행동을 측정하였다. 행동 측정상자에 쥐를 5분간 노출시킨 다음 이들의 행동을 적외선 추적을 통하여 탐색행동을 이동활동도 및 반복활동도로 수치화 하여 기록하였다. 탐색행동 검사 방법은 50 x 50 cm 면적의 새로운 환경에 실험동물을 최초 노출시켰을 때 나타나는 호기심 및 경계심 또는 불안 같은 감정상태를 객관화하여 측정할 수 있는 장점을 가지고 있다. 실험군간의 새로운 환경에 대한 적응도와 생애초기 경험된 스트레스와 여기에 수반된 인위적인 5-HT_{1A} 수용체 활성화에 관련된 타고난 행동양식의 변동을 검색하였다.

5. 공간지각 학습 검사 (Morris water maze test)

생후 150일에 직경 2 m의 원형 수조에 물을 30 cm 깊이로 채우고, 4 분면의 중앙에 수심 2 cm 깊이로 수면에서 보이지 않도록 직경 20 cm의 플랫폼을 설치하였다. 매일 실험동물들을 동, 서, 남, 북 4방향에서 출발시켜 숨어있는 플랫폼을 찾아가도록 6일 동안 훈련과정을 실시하였다. 하루에 4 방향에서 출발해서 플랫폼을 찾는 훈련을 하였으며 매 시도 마다 수조 속의 가려진 플랫폼 위에서 실험동물은 15 초 동안 주변 지형과 사물을 숙지하도록 배려하였다. 한 번의 시도가 끝나면 물기를 제거하고 온열 전구 아래에서 젖은 몸을 말릴 수 있도록 하고, 다음 시도는 최소 5분이 경과된 이후에 시행하였다.

7일째 되는 날 probe test를 시행하였는데, 플랫폼을 수조에서 제거한 후 훈련받았던 실험동물을 플랫폼이 있던 자리의 정반대 위치에서 출발시켜 플랫폼이 있었던 4 분면에서 보내는 시간을 측정하여 이를 공간지각학습의 측정변수로 기록하였다. 이 모든 과정은 영상추적장치 (video tracking system; SMART ver. 2.0, Ugo

Basile Co., Spain)를 이용하여 기록한 후 IBM 호환 컴퓨터를 이용하여 분석하였다.

6. 부신피질 스테로이드 홀몬의 혈중 농도 측정

실험동물을 과도한 pentobarbital 복강 내 투여로 급속 마취 유도시킨 다음 흉강을 열고 심이를 통해 혈액을 채취하여 heparine sodium 함유 진공 혈청 분리관에 20분간 방치하고 원심 분리하여 혈장만을 수집하여 분석할 때까지 -70°C 극저온 냉동고에 보관하였다. 혈장 내 corticosterone 분석은 방사성표지 면역화학적 방법 (Radioimmuno Assay)으로 검사하였으며 사용한 분석법은 ^{125}I odine 으로 방사성표지된 rat corticosterone Radioimmunoassay (RIA) Kit (DPC Co., CA, USA)를 이용하여 상온에서 혈장에 함유되어 있는 corticosterone 시료를 항원-항체반응시켜 gamma counter (Beckman Co. CA, USA)를 이용하여 정량화 하였다.

7. 기호성 강화에 의한 학습능력 측정

생후 180일에 표준 설치류 행동측정상자를 이용하여 기호성 강화에 의한 학습능력을 자가학습검사와 Progressive Ratio 검사를 시행하였다. 실험 전 쥐는 15일 동안 개별 사육장에서 사육하면서 정상 체중의 85%로 식이 제한을 통해 먹이에 대한 선호도를 증가시키고, 행동측정 상자에서 주는 기호성 강화용 먹이에 대한 거부감을 없애 주었다. 설치류 표준 행동측정 상자에서 매일 12회씩 12일에 걸쳐 레버 누름과 먹이강화와의 연합학습능력을 검색한다. 실험은 한 개의 레버가 15초 동안 상자 내로 돌출 되고 이후 레버가 철수되면 4초 후에 강화용 먹이가 공급되는 것으로 한번의 시도-기회가 이루어지게 되며 매일 12회의 기회반복이 이루어지고 12일 동안 연속하여 수행하였다. 매번 시도-기회마다 쥐가 돌출된 레버를 접촉한 경우 레버는 곧바로 상자에서 철수되며 이때부터 4초 후에 먹이가 공급되어, 기회가 반복되어 질수록 실험동물은 레버 접촉과 먹이 공급의 시간간격이 단축됨을 배워 이것의 연합이 학습효과로서 나타나게 된다. 또한 반응이 없더라도 15초 동안의 시도기간이 종료되면 먹이는 분배되며, 쥐들은 레버 접촉과 먹이분배와의 관련성을 시간적 차이와 함께 학습 습득하게 된다. 이후 다음 시도기간에서도 동일한 방법으로 지속되며 시도들 간의 시간 간격은 무작위 시간간격이었다.^{36,37}

Fixed Ratio 검사는 레버가 철수하지 않고 항상 돌출 되어 있는 상태에서 20 g 이상의 무게로 눌러야만 먹이의 분배가 이루어진다. 자가학습검사가 끝난 실험동물은 먹이분배를 위한 작업이 레버접촉이 아닌 레버 누름을 먼저 습득해야 한다. 레

버 누름과 먹이분배의 비율을 1로 정한 것이 Fixed Ratio 1 (FR1)이다. 즉, 1번의 레버 누름이 수행된 다음 즉시 1개의 먹이 분배가 이루어진다. 총 5분 동안 레버를 눌러 먹이를 얻는 횟수를 측정 변수로 기록하였다.

Progressive Ratio 검사는 동기요소에 민감하다고 알려져 있는데 이때 레버 누름 횟수와 먹이분배와의 비율은 점진적으로 증가시키는 방법을 적용하여 쥐들의 행동 중단점을 측정하여 동기요소를 판단하게 된다.

실험 3-2. 결과

1. 생후 14일과 21일의 50회 전기충격 후 무력행동이 표출되는 시기와 5-HT_{1A} 수용체 활성변동에 의한 무력 행동 표출 시점 변화

가. 생후 14일과 21일의 전기충격을 경험한 개체들의 무력 행동 표출 시점

생후 14일과 21일에 전기충격 스트레스 노출 당시 무력 행동을 표출하는 시점을 측정하였다. 생후 14일의 전기충격 때에는 43.4±0.7회의 자극에서 무력 행동을 표출하였으나, 생후 21일의 반복된 전기충격 스트레스에는 무력 행동을 나타내는 시점은 12.8±1.1회로 무력 행동 표출이 일찍 나타나는 것을 관찰하였다 ($F_{(2,32)}=267.5$, $p<0.001$). 또한 실험 당시의 동물 나이에 따른 효과를 해소할 목적으로 생후 21일에 동일한 전기충격 스트레스에 최초 노출시킨 나이 대조군의 경우는 무력 행동을 표출하는 시점이 45.0±1.3회로서 생후 14일의 최초 노출 결과와 차이를 나타내지 않았다 (그림 18).

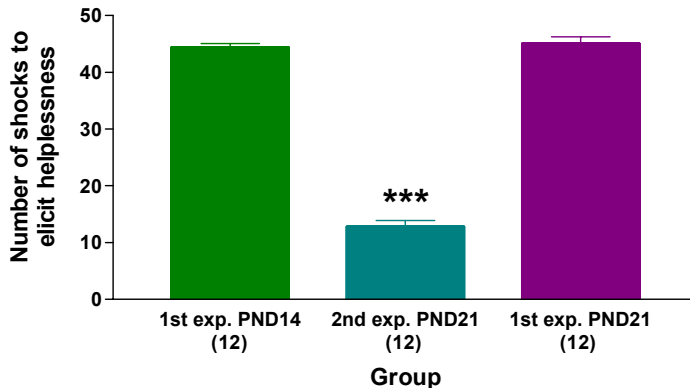


그림 18. 생후 14일과 21일의 반복적인 전기충격 스트레스 노출로 인한 무력 행동이 표출되는 시점. 1st exp. PND 14: 생후 14일 처음 전기충격 스트레스에 노출되었을 경우 무력을 표출하는 시점; 2nd exp. PND 21: 생후 14일에 전기충격 스트레스를 경험하고 생후 21일에 반복적인 전기충격 스트레스에 노출되었을 때 무력이 표출되는 시점; 1st exp. PND 21: 생후 21일에 처음 전기충격 스트레스에 노출된 경우 무력을 표출하는 시점. *** $p<0.001$ vs. 1st exp. PND 14; 1st exp. PND 21.

나. 생후 14일에 전기충격 경험 후 저용량의 5-HT_{1A} 수용체 효현제를 투여하고, 생후 21일에 반복하여 전기충격에 노출시킨 개체들의 무력 행동 표출 시점

생후 14일에 전기충격 스트레스를 처음 경험한 직후 30분에 5-HT_{1A} 효현제인 8-OH-DPAT 0.3 mg/kg 또는 생후 21일 스트레스 투여 30분 전 5-HT_{1A} 효현제인 8-OH-DPAT 0.3 mg/kg로 복강 내 투여한 개체들을 생후 21일에 동일한 스트레스 조건에 반복하여 노출시켰을 때 무력 행동이 표출되는 시점을 관찰하였다 (그림 19). 생후 14일 스트레스 노출 직후 8-OH-DPAT 0.3 mg/kg를 투여 받은 저농도 효현제 PND 14 투여군은 생후 21일의 반복된 전기충격 노출에서 무력 행동 표출 시점이 30.4±3.7회였고, 생후 21일 반복적인 전기충격 노출 30분전 8-OH-DPAT 0.3 mg/kg를 투여 받은 저용량 효현제 PND 21 투여군은 2번째 스트레스 노출에서 무력 행동을 나타낸 시점이 19.6±2.9회였다. 이것은 생후 14일의 전기충격 후 약물 처치하지 않은 대조군의 경우 생후 21일의 반복된 전기충격 스트레스 자극 때 무력 행동을 나타내었던 시점 12.8±1.1회와 비교하여 무력 행동을 표출하는 시점이 연기되어 나타남을 알 수 있었다.

생후 14일의 전기충격 노출이 끝나고 30분 후에 8-OH-DPAT을 저용량로 투여 받은 개체들의 생후 21일의 무력 행동 표출시점은 대조군에 비해 표출 시점이 늦게 나타났으며, 생후 14일 전기충격 노출 후 생후 21일의 두 번째 반복 노출 30분 전에 저용량 8-OH-DPAT을 투여한 경우에도 무력 행동 표출 시점이 늦게 나타나는 경향이 있었으나 통계적 의의를 발견할 수 없었다.

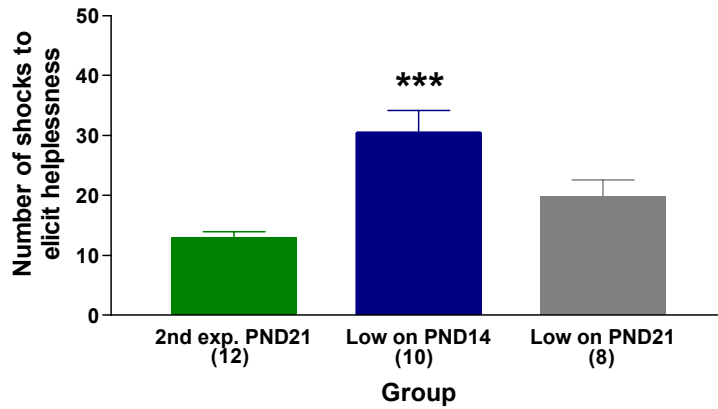


그림 19. 생후 14일과 21일의 반복된 전기충격 스트레스 경험으로 무력행동이 표출되는 시점에 대한 저용량 (0.3 mg/kg)의 5-HT_{1A}수용체 효현제 효과. 2nd exp. PND 21: 생후 14일에 전기충격 스트레스를 경험하고 생후 21일에 반복적인 전기충격 스트레스에 노출되었을 때 무력이 표출되는 시점; Low on PND 14: 생후 14일 전기충격 경험 후 30분에 8-OH-DPAT 0.3 mg/kg 투여받고 생후 21일에 동일한 전기충격 스트레스에 노출되었을 때 무력을 표출하는 시점; Low on PND 21: 생후 14일 전기충격을 경험하고 생후 21일 전기충격 스트레스에 반복적으로 노출 하기 30분 전에 8-OH-DPAT 0.3 mg/kg 투여 받은 후 동일한 전기충격 스트레스에 노출되었을 때 무력을 표출하는 시점. *** p<0.001 vs. 2nd exp. PND 21.

다. 생후 14일에 전기충격 경험 후 고용량의 5-HT_{1A} 수용체 효현제를 투여하고, 생후 21일에 반복하여 전기충격에 노출한 개체들의 무력 행동 표출 시점

생후 14일에 전기충격 스트레스에 처음 노출된 후 30분 후 또는 생후 21일 스트레스 투여 30분 전 5-HT_{1A} 효현제인 8-OH-DPAT 3.0 mg/kg로 복강 내 투여하고 생후 21일에 전기충격 스트레스에 반복적으로 노출되었을 때 무력 행동을 표출하는 시점을 관찰하였다 (그림 20). 생후 14일 스트레스 노출 직후 8-OH-DPAT 3.0 mg/kg를 투여 받은 고용량 효현제 PND 14 투여군은 생후 21일의 반복된 전기충격 노출에서 무력 행동을 나타낸 시점이 46.0±0.9회였고, 생후 21일 반복적인 전기충격 노출 30분전 8-OH-DPAT 3.0 mg/kg를 투여 받은 고용량 효현제 PND 21 투여군은 2번째 스트레스 노출에서 무력 행동을 나타낸 시점이 48.6±1.4회였다. 이것은 생후 14일의 전기충격 후 약물 처치하지 않은 대조군이 생후 21일의 반복된 전기충격 스트레스 자극 당시 무력 행동을 나타내었던 시점 12.8±1.1회와 비교하여 무력 행동을 표출하지 않았다는 것을 알 수 있었다 ($F_{(2,38)}=208.4$, $p<0.0001$).

생후 14일의 전기충격 노출이 끝나고 30분 후에 8-OH-DPAT을 고용량으로 투여 받은 개체들뿐만 아니라 생후 14일 전기충격 노출 후 생후 21일의 두 번째 반복노출 30분전에 고용량 8-OH-DPAT을 투여한 경우에도 무력 행동이 표출되는 시점이 처음 전기충격 스트레스를 경험한 경우처럼 후반부에서 나타났다.

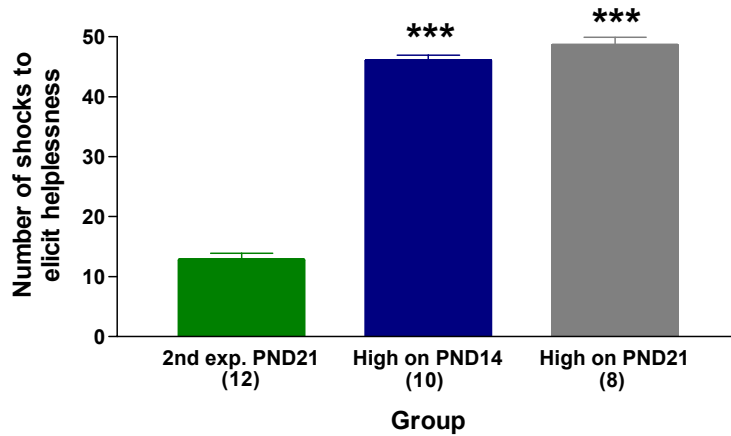


그림 20. 생후 14일과 21일의 반복된 전기충격 스트레스 경험으로 무력 행동이 표출되는 시점에 대한 고용량 (3.0 mg/kg)의 5-HT_{1A}수용체 효현제 효과. 2nd exp. PND 21: 생후 14일에 전기충격 스트레스를 경험하고 생후 21일에 반복적인 전기충격 스트레스에 노출되었을 때 무력이 표출되는 시점; High on PND 14: 생후 14일 전기충격 경험 후 30분에 8-OH-DPAT 3.0 mg/kg 투여받고 생후 21일에 동일한 전기충격 스트레스에 노출되었을 때 무력을 표출하는 시점; High on PND 21: 생후 14일 전기충격을 경험하고 생후 21일 전기충격 스트레스에 반복적으로 노출 하기 30분 전에 8-OH-DPAT 3.0 mg/kg 투여 받은 후 동일한 전기충격 스트레스에 노출되었을 때 무력을 표출하는 시점. *** p<0.001 vs. 2nd exp. PND 21.

라. 생후 14일에 전기충격 경험 후 저용량의 5-HT_{1A} 수용체 길항제를 투여하고, 생후 21일에 반복하여 전기충격에 노출한 개체들의 무력 행동 표출 시점

생후 14일에 전기충격 스트레스에 처음 노출된 후 30분 후 또는 생후 21일 스트레스 투여 30분 전 5-HT_{1A} 길항제인 NAN-190 2.0 mg/kg로 복강 내 투여하고 생후 21일에 전기충격 스트레스에 반복적으로 노출되었을 때 무력 행동을 표출하는 시점을 관찰하였다(그림 21). 생후 14일 스트레스 노출 직후 NAN-190 2.0 mg/kg를 투여 받은 저용량 길항제 PND 14 투여군은 생후 21일의 반복된 전기충격 노출에서 무력 행동을 나타낸 시점이 19.6 ± 2.2 회였고, 생후 21일 반복적인 전기충격 노출 30분전 NAN-190 2.0 mg/kg를 투여 받은 저용량 길항제 PND 21 투여군은 2번째 스트레스 노출에서 무력 행동을 나타낸 시점이 17.9 ± 2.4 회였다. 이것은 생후 14일의 전기충격 후 약물처치하지 않은 대조군이 생후 21일의 반복된 전기충격 스트레스 자극 시 무력 행동을 나타내었던 시점 12.8 ± 1.1 회와 비교하여 차이가 없음을 알 수 있었다.

생후 14일의 전기충격 노출이 끝나고 30분 후에 NAN-190을 저용량으로 투여 받은 개체들과 생후 14일 전기충격 노출 후 생후 21일의 두 번째 반복노출 30분전에 저용량 NAN-190을 투여한 경우 모두 무력 행동이 표출되는 시점이 대조군과 비교하여 차이를 발견할 수 없었다.

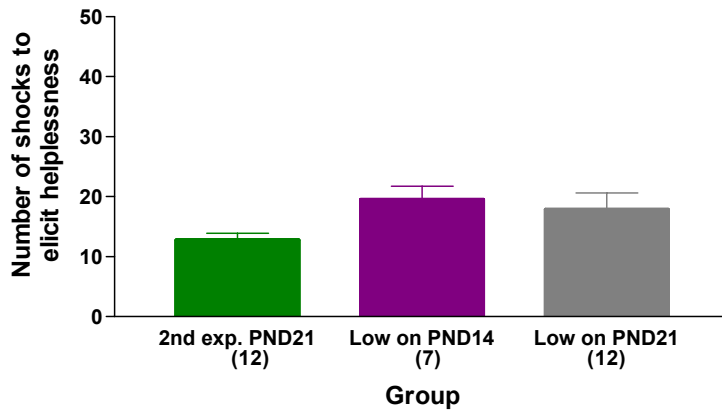


그림 21. 생후 14일과 21일의 반복된 전기충격 스트레스 경험으로 무력 행동이 표출되는 시점에 대한 저농도 (2.0 mg/kg)의 5-HT_{1A}수용체 길항제 효과. 2nd exp. PND 21: 생후 14일에 전기충격 스트레스를 경험하고 생후 21일에 반복적인 전기충격 스트레스에 노출되었을 때 무력이 표출되는 시점; Low on PND 14: 생후 14일 전기충격 경험 후 30분에 NAN-190 2.0 mg/kg 투여받고 생후 21일에 동일한 전기충격 스트레스에 노출되었을 때 무력을 표출하는 시점; Low on PND 21: 생후 14일 전기충격을 경험하고 생후 21일 전기충격 스트레스에 반복적으로 노출 하기 30분 전에 NAN-190 2.0 mg/kg 투여 받은 후 동일한 전기충격 스트레스에 노출되었을 때 무력을 표출하는 시점.

마. 생후 14일에 전기충격 노출 후 고용량의 5-HT_{1A} 수용체 길항제를 투여하고, 21일에 반복하여 전기충격을 경험한 개체들의 무력 행동 표출 시점

생후 14일에 전기충격 스트레스에 처음 노출된 후 30분 후 또는 생후 21일 스트레스 투여 30분 전 5-HT_{1A} 길항제인 NAN-190 10.0 mg/kg로 복강 내 투여하고 생후 21일에 전기충격 스트레스에 반복적으로 노출되었을 때 무력 행동을 표출하는 시점을 관찰하였다(그림 22). 생후 14일 스트레스 노출 직후 NAN-190 10.0 mg/kg를 투여 받은 고용량 길항제 PND 14 투여군은 생후 21일의 반복된 전기충격 노출에서 무력 행동을 나타낸 시점이 13.0±1.2회였고, 생후 21일 반복적인 전기충격 노출 30분전 NAN-190 10.0 mg/kg를 투여 받은 고용량 길항제 PND 21 투여군은 2번째 스트레스 노출에서 무력 행동을 나타낸 시점이 14.2±1.9회였다. 이것은 생후 14일의 전기충격 후 약물 처치하지 않은 대조군이 생후 21일의 반복된 전기충격 스트레스 자극시 무력 행동을 나타내었던 시점 12.8±1.1회와 비교하여 차이가 없음을 알 수 있었다.

이상과 같은 결과들을 토대로 하여 이후의 행동검사에는 생후 21일 전기충격 스트레스 반복 30분전에 약물을 투여한 개체들은 제외하고 실험에 임하였다.

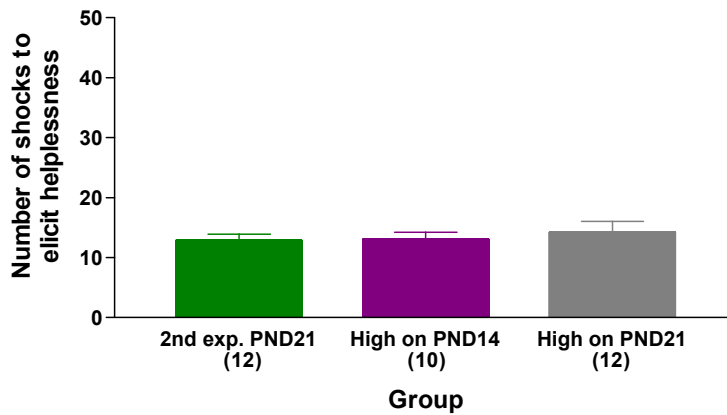


그림 22. 생후 14일과 21일의 반복된 전기충격 스트레스 경험으로 무력 행동이 표출되는 시점에 대한 고용량 (10.0 mg/kg)의 5-HT_{1A}수용체 길항제 효과. 2nd exp. PND 21: 생후 14일에 전기충격 스트레스를 경험하고 생후 21일에 반복적인 전기충격 스트레스에 노출되었을 때 무력이 표출되는 시점; High on PND 14: 생후 14일 전기충격 경험 후 30분에 NAN-190 10.0 mg/kg 투여받고 생후 21일에 동일한 전기충격 스트레스에 노출되었을 때 무력을 표출하는 시점; High on PND 21: 생후 14일 전기충격을 경험하고 생후 21일 전기충격 스트레스에 반복적으로 노출 하기 30분 전에 NAN-190 10.0 mg/kg 투여 받은 후 동일한 전기충격 스트레스에 노출되었을 때 무력을 표출하는 시점.

2. 생후 100일 탐색행동 측정

생애초기 반복된 전기충격 스트레스 경험 후 생후 100일에 실험동물을 새로운 환경에 노출시켜 5분 동안의 탐색행동을 관찰하였다. 생애초기 전기충격 스트레스의 반복적인 경험과 그 당시의 인위적인 5-HT_{1A} 수용체 활성 변동에 의한 행동양상을 관찰하였다. 고용량 효현제 PND14군의 경우 증가된 활동 양상이 관찰되었고, 저용량 길항제 PND14군에서는 낮은 탐색활동도를 나타내었다. 그러나 고용량 길항제 PND14군의 경우는 차이를 관찰할 수 없었다(그림 23).

반복활동도 관찰에 있어서는 5-HT_{1A} 효현제 약물처치로 차이를 관찰할 수 없었으나, 저용량 길항제 PND14군의 경우는 탐색활동도의 경우와 유사하게 반복활동도가 감소되어 있었다(그림 24).

3. 생후 150일 공간지각 학습능력 검사

생후 14일에 전기충격 스트레스 경험 30분 후 5-HT_{1A} 수용체 효현제 8-OH-DPAT 또는 5-HT_{1A} 수용체 길항제 NAN-190을 저용량 또는 고용량으로 투여 하고, 생후 21일에 동일한 스트레스 조건을 반복 경험한 개체들이 성숙한 후 생후 150일에 6일 동안의 수조에서 숨겨진 회피장소(플랫폼)를 찾아가도록 수중미로 학습 훈련을 1일 4회 씩 매일 실시하였다. 훈련기간 동안 수중미로 학습 성취에 있어서는 실험군들간의 특이한 차이점은 관찰할 수 없었다.

훈련기간이 종료된 후 수조에서 플랫폼을 제거하였다. 다음 날 실험동물은 플랫폼이 있던 자리의 정반대 쪽의 새로운 착수 지점에서 수중으로 놓여진 후 수조의 숨겨진 회피장소가 놓여 있던 곳에서 보내는 시간을 1분 동안 관찰하는 probe trial을 검색하였다 (그림 25). 무처치군은 31.2±2.4초, 대조군은 23.8±8.2초, 저용량 효현제 PND14 군은 23.2±3.6초, 고용량 효현제 PND14군은 23.3±3.4초, 저용량 길항제 PND14군은 25.5±2.8초, 그리고 고용량 길항제 PND14군은 23.9±1.8초를 나타내어 회피장소가 숨겨져 있던 4분면에서 탐색을 위해 보낸 시간에는 차이가 없었다.

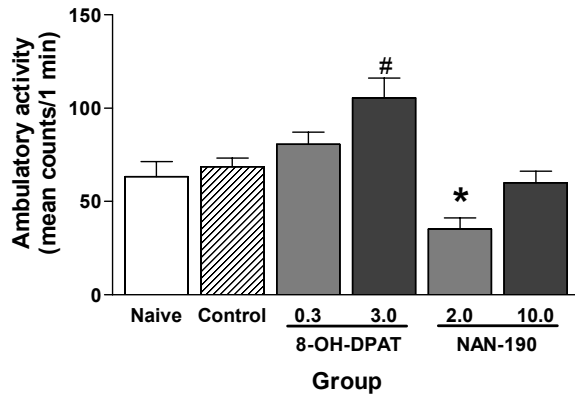


그림 23. 생후 14일과 21일의 반복된 전기충격 스트레스 경험 후 생후 100일에 측정한 이동활동도. Naive: 무처치군; Control: 대조군; 8-OH-DPAT: 생후 14일에 전기충격 종료 30분 후 8-OH-DPAT을 투여 받고 21일에는 전기충격만 받은 군, 용량 단위는 mg/kg; NAN-190: 생후 14일에 전기충격 종료 30분 후 NAN-190을 투여 받고 21일에는 전기충격만 받은 군, 용량 단위는 mg/kg 이다. 각 실험군당 개체 수는 6마리 임. * $p < 0.05$ vs. the Control group; # < 0.05 vs. NAN-190 2.0 mg/kg group.

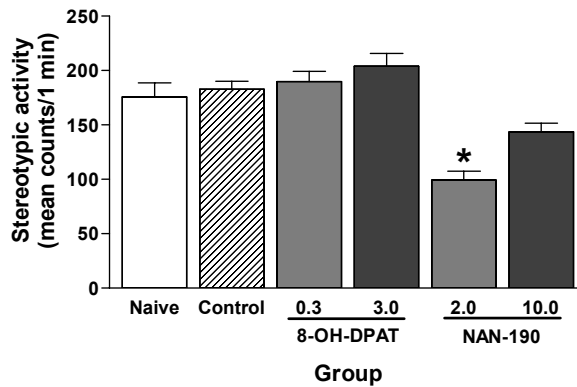


그림 24. 생후 14일과 21일의 반복된 전기충격 스트레스 경험 후 생후 100일 반복 활동도. 용량단위는 mg/kg 임. 각 실험군 당 개체 수는 6마리 임. * $p < 0.05$ vs. the Control group.

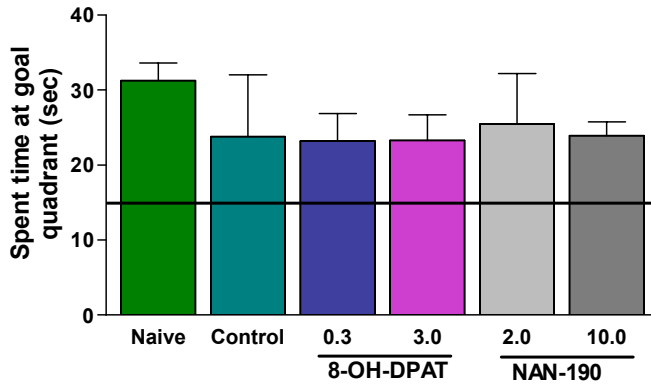


그림 25. 생후 150일 공간지각 학습능력검사(water maze test). 실험에 이용한 개체 들은 각 실험군 당 6마리씩 임. Naive: 무처치군; Control: 대조군; 8-OH-DPAT: 생후 14일에 전기충격 종료 30분 후 8-OH-DPAT을 투여 받고 21일에는 전기충격만 받은 군, 용량 단위는 mg/kg; NAN-190: 생후 14일에 전기충격 종료 30분 후 NAN-190을 투여 받고 21일에는 전기충격만 받은 군, 용량 단위는 mg/kg 이다. 각 실험군당 개체 수는 6마리 임.

4. 생후 160일 혈중 corticosterone 수준

생후 14일에 전기충격 스트레스 경험 30분 후 5-HT_{1A} 수용체 효현제 8-OH-DPAT을 고용량 또는 저용량으로 투여하고, 생후 21일에 동일한 스트레스 조건을 반복 경험한 개체들이 성숙한 후 행동검색이 종료된 후 생후 160일에 무자극 상태에서 혈액을 채취하여 혈중 corticosterone 수준을 측정하였다 (그림 26). 대조군의 경우 아무런 자극이 가해지지 않은 정상상태에서 혈장 corticosterone 수준은 116.3±5.2, 저농도 효현제 PND 14 투여군은 115.9±1.1, 고농도 효현제 PND 21 투여군은 129.4±4.4 ng/ml로서 생애초기 스트레스 경험 직후 인위적으로 5-HT_{1A} 수용체를 고농도로 자극한 경우 성숙한 후에도 기초 corticosterone 농도가 미약하나 유의있게 상승되어 유지됨을 알 수 있었다.

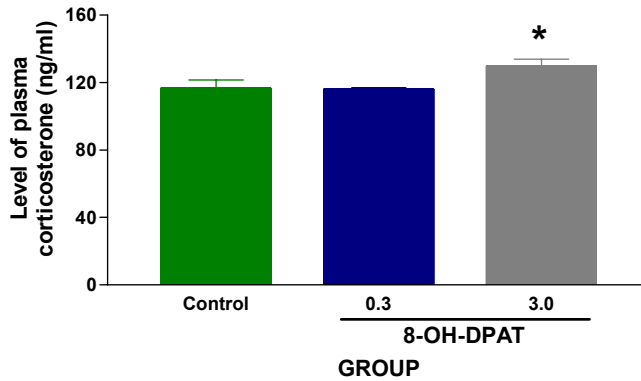


그림 26. 생후 160일의 혈장 corticosterone 수준 측정. 실험에 이용한 개체들은 각 실험군 당 6마리씩 임. Naive: 무처치군; Control: 대조군; 8-OH-DPAT: 생후 14일에 전기충격 종료 30분 후 8-OH-DPAT을 투여 받고 21일에는 전기충격만 받은 군, 용량 단위는 mg/kg 이다. 각 실험군당 개체 수는 6마리 임. * p<0.05 vs. the Control group.

5. 생후 180일 자가학습검사

생후 180일부터 12일 동안 매일 12회의 시도기회가 주어지는 기호성 강화를 이용한 자가학습검사를 실시하였다. 레버가 상자 내로 돌출 되어 있는 시도기간 중에 먹이 획득을 위해 레버 접촉을 한 경우를 조작조건화 상황에서 정확한 학습이 이루어진 것으로 판단하여 측정변수로 이용하였다. 전체적인 실험군 간의 학습성취도는 차이가 발견되지 않았으며 나타났으며, 생애초기 전기충격 경험과 5-HT_{1A} 수용체 효현제, 길항제 투여의 경우 성숙 후 학습행동에 미치는 효과는 없는 것으로 나타났다 (그림 27).

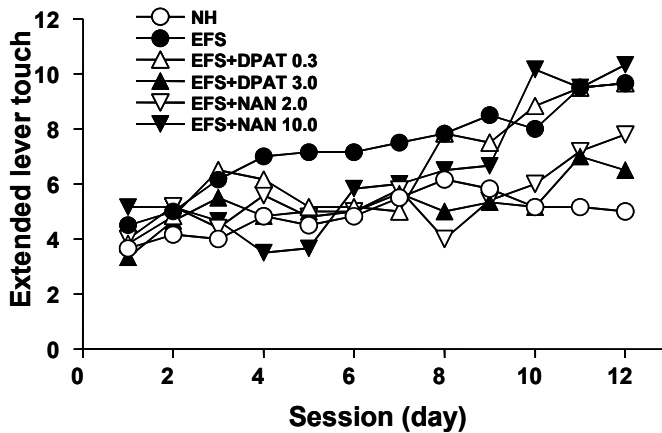


그림 27. 생후 180일의 자가학습검사. Naive: 무처치군; Control: 대조군; 8-OH-DPAT: 생후 14일에 전기충격 종료 30분 후 8-OH-DPAT을 투여 받고 21일에는 전기충격만 받은 군, 용량 단위는 mg/kg; NAN-190: 생후 14일에 전기충격 종료 30분 후 NAN-190을 투여 받고 21일에는 전기충격만 받은 군, 용량 단위는 mg/kg 이다. 각 실험군당 개체 수는 6마리 임. 실험에 이용한 개체들은 각 실험군 당 6마리씩 임.

6. 생후 200일 Fixed Ratio 및 Progressive Ratio 검사

자가학습 검사 후 레버 누름과 먹이 분배의 비율을 1로 정한 FR 1을 행하였다. 레버 누름과 먹이 분배를 배우게되는 과정을 매일 3분씩 3일 동안 시행하였다. 생애초기 반복된 전기충격 스트레스와 5-HT_{1A} 수용체 길항제를 투여 받은 군에서 전체적인 레버 누름 정도가 증가되어 나타났으며 ($F_{(5,29)}=2.30$, $p=0.0707$) (그림 28), 레버 누름과 먹이분배와의 관계를 습득한 후 레버 누름 횟수와 먹이분배와의 비율을 점진적으로 증가시켜서 동기요소를 검색하는 방법인 progressive ratio 검사를 실시하였다. 레버 누름을 중단하는 레버 누름 중단점(breakpoint)과 (그림 29-A), 전체 레버 누름 횟수를 살펴본 결과(그림 29-B), 스트레스 경험 시 NAN-190 고농도 투여군과 스트레스만 경험한 개체들의 경우 레버 누름 중단점이 무처치군에 비해 증가되어 있었다 ($F_{(5,29)}$, $p<0.01$).

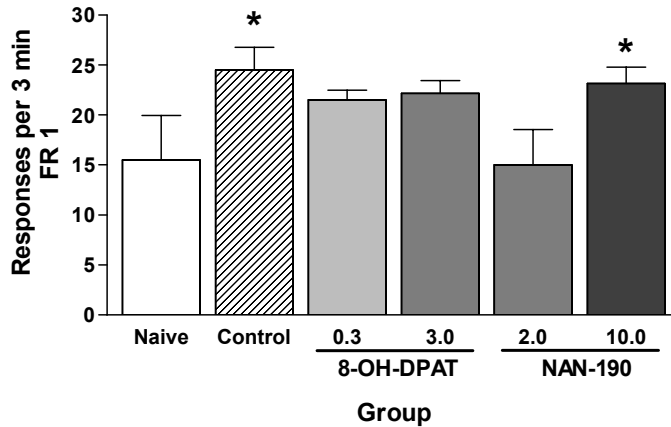


그림 28. 생후 200일의 Fixed Ratio 1 검사. Naive: 무처치군; Control: 대조군; 8-OH-DPAT: 생후 14일에 전기충격 종료 30분 후 8-OH-DPAT을 투여 받고 21일에는 전기충격만 받은 군, 용량 단위는 mg/kg; NAN-190: 생후 14일에 전기충격 종료 30분 후 NAN-190을 투여 받고 21일에는 전기충격만 받은 군, 용량 단위는 mg/kg 이다. 각 실험군당 개체 수는 6마리 임. 실험에 이용한 개체들은 각 실험군 당 6마리씩 임. * $p<0.05$ vs. the Naive group by Fischer's PLSD test.

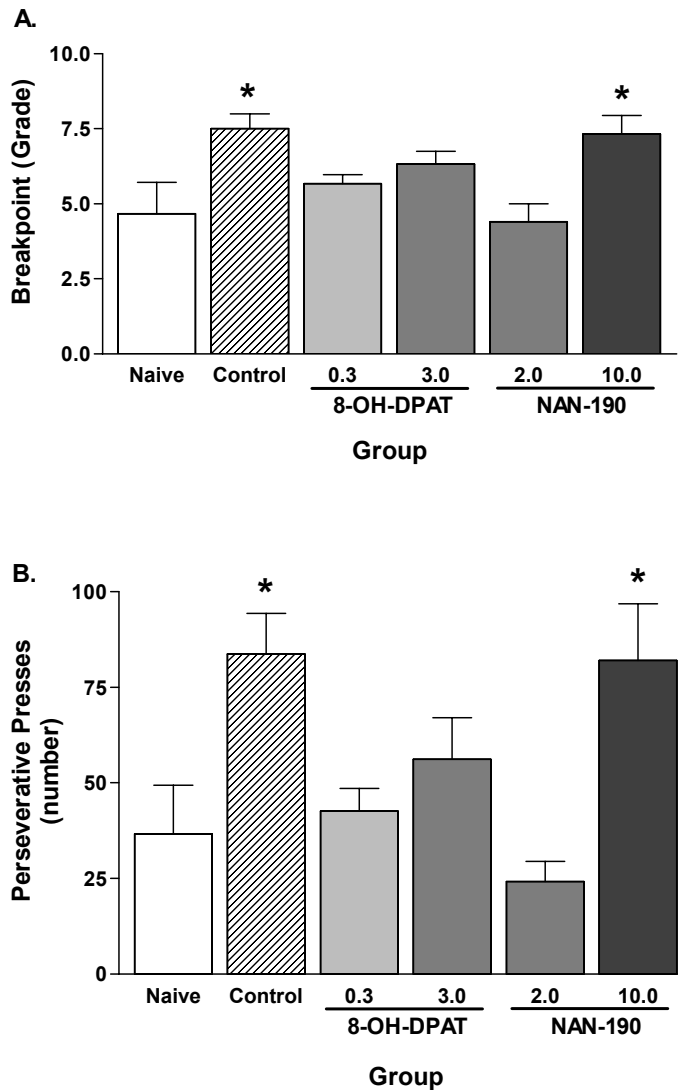


그림 29. 생후 200일 Progressive ratio 검사. 먼저 실험동물들은 FR1을 통해 레버 누름과 먹이분배와의 관련성을 일정 수준 습득한 후에 실시하였다. Naive: 무처치군; Control: 대조군; 8-OH-DPAT: 생후 14일에 전기충격 종료 30분 후 8-OH-DPAT을 투여 받고 21일에는 전기충격만 받은 군, 용량 단위는 mg/kg; NAN-190: 생후 14일에 전기충격 종료 30분 후 NAN-190을 투여 받고 21일에는 전기충격만 받은 군, 용량 단위는 mg/kg 이다. 각 실험군당 개체 수는 6마리 임. 실험에 이용한 개체들은 각 실험군 당 6마리씩 임. * $p < 0.05$ vs. the Naive group by Fischer's PLSD test.

실험 3-3. 요약

본 연구에서는 생애 초기 스트레스 경험에 의한 성숙 후 행동변동에 5-HT계(system)의 역할을 살펴보았다. 스트레스 경험 직후 인위적으로 5-HT_{1A} 수용체 활성을 변동시켜 그 효과를 검색하였다.

1. 생후 14일 스트레스 경험 직후 5-HT_{1A} 수용체 효현제인 8-OH-DPAT을 투여하고 생후 21일 동일한 스트레스에 노출되었을 때, 무력 표출 시점이 늦어졌다. 이러한 현상은 5-HT_{1A} 수용체 길항제인 NAN-190를 투여하였을 때는 관찰할 수 없었다.

2. 생후 100일에 비조건화 행동검사인 탐색활동도를 검사하였다. 5-HT_{1A} 수용체 효현제 처치군의 경우 활발한 탐색활동을 보이는 것으로 관찰되었고, 5-HT_{1A} 길항제 처치군의 경우에는 저용량 처치군에서는 탐색활동도와 반복활동도가 감소되었다.

3. 생후 150일에 수중미로를 이용한 공간지각 학습능력 검사를 시행하였다. 생애 초기 스트레스 경험과 5-HT_{1A}수용체 활성변동으로 인한 공간지각 학습능력의 변동은 관찰되지 않았다.

4. 생후 180일이 되었을 때 4 초 지연 기호성 강화자극을 이용한 자가학습검사를 시행하였다. 생애 초기 스트레스 경험과 5-HT_{1A}수용체 활성변동으로 인한 공간지각 학습능력의 변동은 관찰되지 않았다.

5. 생후 200일에 자가학습검사가 끝난 후 시행한 Fixed Ratio 1 검사에서 생애 초기 반복적 스트레스 경험 당시 고용량의 NAN-190를 처치한 경우 레버 누름 정도가 증가되어 있었다. 이어서 시행한 먹이에 대한 동기요소에 민감한 Progressive Ratio 검사에서 생애초기 스트레스경험으로 증가된 행동 중단점을 5-HT_{1A} 수용체 효현제 투여군에서 관찰할 수 없었다.

이상의 결과 생애초기 스트레스 경험 시 5-HT_{1A} 수용체 활성 정도는 행동 변동양식에 영향을 미침을 알 수 있었다. 생애 초기 스트레스 경험 직후 인위적 5-HT_{1A} 수용체 변동은 반복적으로 스트레스에 노출되었을 경우 및 성숙된 시기에서 타고난 행동양식의 변동을 보였으며, 기억 또는 학습과 연관된 행동에 있어서도

스트레스 반응성의 차이에 따라서 대응 양상이 다르게 표출됨을 알 수 있었다. 특히 5-HT_{1A} 수용체 활성 저하는 스트레스 노출과 동반될 경우 성숙 후 학습능력 저하가 초래되므로 적절한 5-HT_{1A} 수용체 활성이 정상적인 스트레스 반응에 필수적임을 추측하게 한다.

III. 고 찰

5-hydroxytryptamine (serotonin; 세로토닌; 5-HT)은 1948년 Rapport 등이 최초 발견한 것으로 뇌에서 추출한 물질이 말초 혈관에 작용시켰을 때 혈관수축작용이 일어나는 물질이었다.⁴⁷ 이 후 1952년 Erspamer와 Asero가 소화기관 점막 (gastrointestinal mucosa)에 존재하는 크롬친화세포(enterochromaffin cell)에서 장 운동 수축을 일으키는 물질을 찾아내었다.⁴⁸ 이를 enteramine이라고 명명하였으며 후에 serotonin과 동일한 물질임을 알았다. 1964년 Dahlstrom과 Fuxe는 형광표지 조직화학적방법(fluorescence histochemistry)을 이용하였고,⁴⁹ 1992년에 Jacobs와 Azmitia는 면역조직화학적(immunohistochemistry) 방법을 이용하여 뇌와 장기에서의 5-HT 신경세포의 분포를 밝혔다.⁵⁰ 5-HT 신경세포는 뇌줄기(뇌간; brainstem)의 중앙축(midline)에 종축으로 산재하는 일련의 세포군이며, 대뇌피질부터 척수까지 신경 분지(axon terminal)를 내고 있고, 주로 중앙솔기핵(median raphe nuclei)와 후방솔기핵(dorsal raphe nuclei)으로 세포군을 구획 지을 수 있다. 뇌의 앞쪽으로 투사되는 5-HT 신경분포 영역은 주로 시상하부, 대뇌피질, 해마, 편도체, 선조체이며, 5-HT 신경의 특징은 잘 분지(bifurcation)되어있다.⁵¹ 이러한 분포 및 구조적 특징은 5-HT이 중추신경계 각 영역에 영향을 미치는데 매우 효율적임을 시사한다. 그리고 이러한 신경섬유의 분포와 신경지배양식은 포유류 전반에 걸쳐 계통적으로 매우 유사한 동질적 특징으로 보고되고 있다.⁵² 5-HT은 생리체계에 있어서 광범위하게 영향을 미치는 것으로 알려져 있는데, 심혈관계 조절, 호흡, 체온조절, 및 다양한 행동기능- 일주기(circadian rhythm entrainment); 수면과 각성 상태 (sleep-wake cycle); 섭식(appetite); 공격행동(aggression); 성행동(sexual behavior); 감각지각 운동성(sensory motor reactivity); 통증의 민감화(pain sensitivity); 학습 (learning) 등 -에 영향을 미친다. 그래서 5-HT 기능에 대한 약리학적 조절작용은 정신과적 질환에 작용을 하며, 이러한 관련 질환들을 살펴보면, 우울증(depression), 정서불안(generalized anxiety disorder); 공황장애(panic disorder); 강박장애 (obsessive compulsive disorder); 사회적 어울림 기피현상(social phobia), 정신분열 증(schizophrenia), 거식증(anorexia nervosa) 등 일련의 불안 장애(a spectrum of anxiety disorders)등이며, 공격행동(aggression), 약물의 남용(substance abuse), 도박(gambling), 주의력 집중장애(attention deficit disorder) 등에도 5-HT 기능이 관여한다고 알려져 있다. 위와 같은 보고들을 종합해 보면 5-HT는 스트레스에 대한

적응반응에 있어서 중추적인 역할을 수행할 것이라 생각된다.⁵³⁻⁵⁵ 다양한 종류의 스트레스 인자들은 5-HT 합성과 대사율(synthesis/turnover)을 증가시키지만, 스트레스에 대한 5-HT계의 반응은 비특이적으로 관찰되어진다.⁵⁴

본 연구의 실험 1에서는 Sprague-Dawley rat를 이용하여 생애초기 급속한 발달 시기인 생후 2주에 3회에 걸쳐 반복적인 전기충격 스트레스를 가하였다. 생애초기 14일, 17일, 그리고 20일에 반복적인 전기충격 스트레스를 60회씩 0.8 mA로 5초 동안 경험하였을 경우 성숙 후 행동변동과 뇌신경화학적 변동을 초래함을 관찰하였다. 생애초기 전기충격 스트레스를 경험한 실험군의 경우 생후 180일에 수행한 6초 지연 강화를 이용한 자가학습검사에서 빠른 학습습득을 나타내었으며, 새로운 환경 노출로 인한 적응 정도를 살펴보는 탐색활동도 검사에서 낮은 수준의 활동도를 나타내어 빠른 적응 능력을 관찰할 수 있었다. 또한 스트레스 실험군의 경우 해마의 corticosterone 수용체 아형에 대한 결합 검사를 수행한 결과 glucocorticoid 수용체(MRs)는 증가되어 있었으며, mineralocorticoid 수용체(GRs)는 감소되어 있음을 알 수 있었다. 이러한 결과는 생애초기 자극을 이용한 다른 연구자들의 보고와 비교하여 행동과 해마의 glucocorticoid 수용체 활성화에 있어서 매우 비슷한 결과를 나타내었으며,⁵⁶ 본 실험에서는 전기충격 스트레스 실험군의 경우 높은 수준의 학습 및 인지 기능을 성숙된 후에 나타내었다.

6초의 지연강화를 이용한 자가학습검사법은 학습이 매우 어려운 것으로 알려져 있는데⁵⁷ 실험에 참가한 전체 실험동물 중 12일 동안의 학습 진행에 따라 완벽한 학습은 각 실험군 가운데서 절반 정도만이 성공하였다. 그러나 실험군별로 세분하여 비교하였을 경우 전기충격 스트레스를 경험한 실험군의 경우 83%의 개체들이 학습성공률을 보여 대조군에 비해 높았으며, 또한 학습성취도 곡선의 비교에 있어서도 무처치군이나 대조군과 비교하여 매우 빠른 학습 능력을 나타내었다.

탐색활동도 검사에 있어서 생애초기 전기충격 스트레스를 경험한 실험군의 경우 새로운 환경으로 노출된 초기 1분 동안의 활동정도는 무처치군이나 대조군과 비교하여 차이를 나타내지 않았으나, 이후 진행되는 시간 동안의 특징적인 감소 양상에 있어서 대조군과 비교하였을 경우 빠르게 안정되는 양상을 나타내었다. 이러한 새로운 환경에 노출되었을 경우의 신속한 적응행동은 환경에 대한 인지기능이 강화되어 있음을 반증한다고 할 수 있다.⁵⁸ 이상과 같이 행동검사를 통해 살펴본 결과 생애초기 스트레스 경험과 성숙된 후의 학습과 기억에 연관된 인지기능의 개선은 매우 밀접한 관련이 있음을 알 수 있었다.

생애초기 스트레스 자극은 성숙 후 해마의 GRs를 증가시켰고, MRs는 감소시켰다. 이것은 현재 주목받고 있는 해마의 MR/GR ratio가 스트레스에 의한 해마의 기능 조절에 관여한다는 이론과 비교하여 생애초기 스트레스 자극이 성숙 후에도 해마에서 MR/GR ratio를 변동시킴을 관찰함으로써 매우 설득력이 있다고 할 수 있다.⁵⁹

또한 생애초기 전기충격 스트레스를 반복하여 시행하였으나, 개체들의 성장지표를 체중을 변수로 하여 관찰한 결과 실험군간의 차이를 관찰할 수 없었다. 실험에서 사용한 전기충격 스트레스 방법은 근본적으로는 격자를 통해 전류를 흘려줌으로써 전기적 자극에 의한 물리적인 스트레스의 일종으로 간주되었으나, 전기충격을 받는 장소에서 개체가 자극에 대한 회피를 할 수 없고, 또한 다음 차례의 자극이 들어오는 시점을 전혀 예측하지 못하도록 조절하여 전기충격 스트레스를 시행함으로써 선행 연구자들이 제안했던 학습된 무력을 표출시키는 방법이다.

탐색행동에 있어서 생애초기 전기충격 스트레스를 경험한 실험군의 행동은 무처치군과 비슷한 양상을 나타내었다. 이것은 스트레스와 스트레스반응과의 관련성에 있어서 탐색활동의 정도는 종모양 용량-반응 곡선(inverted U-shaped curve)으로 해석될 수 있다. 스트레스의 강도는 무처치군, 대조군, 그리고 실험군의 순서로 강해진다고 볼 수 있는데, 이러한 inverted U-shaped curve는 해마의 MR/GR ratio의 각 실험군간의 비교에 있어서도 비슷한 양상으로 관찰되었으므로 스트레스에 의한 행동변동과 뇌신경변동 모두 밀접하게 연관되어 나타났다고 여겨진다.

또한 해마의 MR/GR ratio의 변동은 생애초기 전기충격 스트레스 경험에 의해 생성되어 성숙된 시기까지 지속되어온 것으로 생각된다. 이것은 다른 연구자들의 실험에서 생애초기 스트레스 자극은 시상하부-뇌하수체-부신피질의 스트레스 반응축을 변동시키고 변화된 스트레스 대응축의 활성화는 영구히 지속된다는 보고와 비교하였을 때 본 연구의 경우는 매우 밀접한 유사성을 갖고 있다.⁶⁰ 변화된 스트레스 대응축의 활성화는 해마의 MR/GR ratio를 변동시키며, 이는 나아가 뇌 질환의 요인으로서도 작용될 것으로 생각된다. 현재 스트레스 대응축의 이상이 특정 질환을 유도한다는 보고는 알려져 있지 않으나, 우울증의 경우 해마의 MRs 수용체 밀도 저하로 인하며, 삼환계 항우울제 약물을 처치한 경우에도 MRs 수용체 활성화 증가로 인한 효과가 알려져 있다.⁶¹

본 연구에서 생애초기 생후 14일, 17일, 20일에 반복적으로 투여한 0.8 mA, 5 초 동안, 그리고 60회의 전기충격 스트레스 경험은 성숙한 후 행동과 해마 corticosterone 수용체를 변동시켰다. 생애초기 전기충격 스트레스 경험은 생후 180

일의 자기학습검사에서 빠른 학습습득 능력을 나타내었고, 생후 210일의 새로운 환경 노출로 인한 탐색활동도에서 초기 반응성의 차이는 없었으나 이 후 빠른 환경 적응 능력을 나타내었다. 해마의 MRs 수용체는 감소하였고, GRs 수용체는 증가하였는데, 따라서 MR/GR ratio는 효과적으로 감소시켰다. 이상의 결과 생애초기 스트레스 경험은 성숙 후 행동변동을 초래하였으며, 해마의 MR/GR ratio 또한 변동되었다. 이 같은 결과는 신경 가소성이 뛰어난 시기의 스트레스 경험은 스트레스 반응축의 변화를 초래하고 변동 스트레스 반응축이 성숙 후에도 지속되어 나타나는 효과로 사료된다.

실험 2에서는 Sprague-Dawley rat를 이용하여 생애초기 급속한 발달 시기인 생후 2주에 2회에 걸쳐 반복적인 전기충격 스트레스를 가하였다. 생애초기 극심한 자극에 노출된 경우 개체는 외부에서 유입된 스트레스에 대응하기 위한 스트레스 반응을 나타내어 보인다. 생애초기 14일과 21일에 반복적인 전기충격 스트레스를 0.6 mA로 5초 동안 30회씩 경험하였을 경우 개체들은 전기충격 스트레스를 회피할 목적으로 탈출행동(escape behavior)을 보이는데 이러한 탈출 행동이 소실되었을 경우 무력 행동(helplessness behavior)의 표출로 인정하였다. 본 연구에서는 30회의 전기충격 스트레스 기간 동안 무력행동을 표출하는 개체들(HPLS(+))과 탈출 또는 자극회피행동이 지속되는 무력행동을 나타내 보이지 않는 개체들(HPLS(-))을 구분하였는데, 무력행동의 표출은 개체들의 타고난 각각의 고유한 스트레스 반응성에 따른 것으로 생각되었다. 이들 실험동물들을 조절된 사육환경에서 사육하여 성숙 후의 행동변동을 검색하였고, 스트레스 반응에 관련된 신경전달물질의 신경세포들의 활성을 조직학적 방법을 이용하여 검색하였다.

생후 100일에 타고난 행동인 탐색활동 검사에서 어린 시기의 스트레스의 경험 유무 또는 스트레스 반응성의 차이는 활동도의 변동을 초래하지 않았다. 생후 150일에 조건화된 행동검사로써 양방향 능동회피검사를 실시한 결과 생애초기 반복적인 스트레스 경험 시에 무력을 표출하였던 무력군의 회피행동 성공률이 높았다. 또한 수동형 회피 검사에서 생애초기 반복적인 스트레스 경험 시에 무력을 표출하였던 무력군이 높은 24시간 동안 기억 유지 수준을 나타내었다. 생후 180일에 기호성 강화자극을 이용한 자기학습검사에서 생애초기 반복적인 전기충격 스트레스 경험 시 무력을 표출하지 않았던 비무력군의 학습이 지체(learning retardatin)되어 있음을 관찰할 수 있었다.

생후 14일과 21일의 30회 전기충격 스트레스 경험에 의한 발달정도의 차이를 살

퍼보기 위해 전기충격 후 24시간 동안의 체중증가를 관찰하였다. 생후 14일에 처음 스트레스를 경험한 후 24시간 동안의 체중증가는 무처치군, 전기충격을 경험하지 않은 환경 대조군, 전기충격을 경험한 실험군의 순으로 증가됨이 관찰되어 스트레스 경험이 성장에 영향을 주는 것처럼 보였으나, 각 군간의 유의한 차이는 관찰할 수 없었다. 또한 생후 21일의 2번째 스트레스 노출 경험으로 인한 24시간 동안의 체중 증가를 관찰하였으나 실험군간의 차이는 관찰할 수 없었다. 스트레스 경험에 의한 체중증가의 차이를 관찰할 수 없었는데 이는 본 연구에서 실시한 30회의 전기 충격 스트레스의 경우 발달에 영향을 미칠 만큼 극심한 경우에 해당되지 않는 것으로 생각된다. 또한 이러한 결과는 그림 8-A를 참고하면 전기충격을 경험한 개체들 가운데 무력행동을 나타내 보인 개체들과 무력행동을 나타내지 않은 개체들의 분포를 살펴보면 이 둘 두 세부 실험군간의 돛수 분포에 있어서 차이가 관찰되지 않는데, 생애초기 2번 반복된 30회의 전기충격 스트레스 경험으로 개체들의 스트레스 반응이 표출되는 방향이 한 쪽으로 치우치지 않는 적절한 강도의 자극으로 생각된다. 그러나 무력행동을 나타내 보인 개체들의 경우 스트레스 경험 횟수에 따른 무력행동 표출 시점을 측정하였다(그림 8-B). 무력을 보인 개체들의 스트레스 경험 기간 동안의 무력 표출 시점은 생후 14일의 최초 노출되었을 때보다, 생후 21일에 반복 노출되었을 경우 무력행동의 표출시점이 앞당겨지는 것으로 보아 이러한 현상에도 일련의 기억과 학습에 관련된 기전이 내재되어 있을 것으로 생각되었다. 탐색행동은 새로운 환경에 개체가 노출되었을 경우 취하는 행동을 분석하는데, 이는 조건화된 학습에 의한 효과가 아닌 개체의 타고난 행동양식을 살펴보는 방법으로서 의미를 갖는다. 실험동물을 조절된 사육환경에서 사육하여 성숙된 시기인 생후 100일에 새로운 환경에 5분 동안 노출시켜 행동을 살펴본 결과 생애초기 스트레스의 경험과 스트레스 경험 당시 무력행동을 표출 여부와 같은 스트레스에 대한 개체의 반응성의 차이에 의한 탐색행동의 차이는 관찰되지 않았다(그림 9). 전체적인 탐색행동 양상을 1분씩 쪼개어 기록 및 분석하였으나, 새로운 환경 노출 초기에 증가되어 있던 활동도는 이후 시간이 증가될수록 감소되어 가는 정상적인 행동양상으로 관찰되었다. 이는 본 실험의 경우 생애초기 스트레스 경험 유무 및 스트레스에 대한 반응성의 차이가 타고난 행동양식을 변동시킬 정도의 극심한 것이 아니었음을 알 수 있었다. 생후 150일에 조건화된 행동검사인 양방향능동회피 학습 행동검사와 단방향 수동 회피행동 검사를 수행하였는데, 생애초기 스트레스 경험 당시 무력행동을 표출하였던 개체들의 경우 양방향 능동 회피 학습검사에서 회피 행동 성공률이 증가되어 있었고, 단방향 수동 회피행동 검사에서 24시간 동안의 협

오 기억유지 수준이 증가되어 있었다. 이는 생애초기 스트레스 경험 당시 무력을 나타내 보인 개체들의 경우 스트레스에 최초 노출된 때에 비하여 2번째 반복 노출 되었을 경우 무력을 표출하였던 시점이 앞당겨지는 결과(그림8-B)에서 증명할 수 없는 일련의 기억과 학습 기전이 관여하는 것으로 보았을 경우, 성숙된 후에도 이들 개체들의 경우 학습과 기억에 관한 행동 검사에서도 유의한 상관관계를 보여주는 것으로 생각된다. 생후 180일의 자가학습검사에서 생애초기 스트레스 경험으로 인한 무력행동을 나타내었던 개체들의 경우 대조군과 동일한 학습성취도를 나타내었으나, 비무력군의 경우 학습성취가 지체되어 있음이 관찰되었다. 또한 Fixed Ratio1 검사를 통해 살펴본 먹이에 대한 반응성을 관찰한 결과 전체적인 동기요소 검사에서 차이가 관찰되지 않았으나, 레버누름과 먹이분배의 관련성에 대한 새로운 지식의 습득에 있어 반응성에 차이가 있음을 관찰할 수 있었다. 생애초기 동일 스트레스의 반복 경험에 의한 반응성의 차이에 기인된 성숙 후의 행동변동을 살펴본 결과 스트레스 경험 당시 무력을 표출하였던 개체들의 경우 조건화 학습 및 작업 검사에서 무력을 표출하지 않은 개체들에 비해 성취도가 증가되어 있음을 알 수 있었다. 그러나 타고난 행동을 분석하는 비조건화 방법인 탐색행동의 관찰에서는 차이가 없어, 스트레스 대응방식(반응성)의 차이는 타고난(내재적으로 고정화되어 있는) 행동양식에는 변동을 미치지 않았으나, 새로운 자극에 대응하는 적응방식 또는 대응행동에 영향을 미치는 것으로 생각된다.

행동검색이 끝난 생후 210일에 실험동물 뇌의 솔기핵에서 생애초기 반복적인 스트레스 경험 시 무력을 표출하였던 무력군에서 세로토닌성 면역표지된 신경세포 빈도가 낮았으며, 시상하부 영역에서 c-Fos 단백질 발현 정도는 생애초기 반복적인 전기충격 스트레스를 경험한 무력군과 비무력군 모두에서 아무런 자극이 없는 정상생리 상태에서의 발현량이 증가되어 있었다. 뇌 청반에서 tyrosine hydroxylase mRNA 발현에서 생애초기 반복적인 스트레스 경험 시 무력을 표출하였던 무력군에서 낮은 수준을 나타내었다.

이상의 결과 생애초기 스트레스 경험은 성숙된 시기의 행동양식에서 타고난 행동의 변동은 초래하지 않았으나, 기억과 학습에 연관된 행동에 변동을 초래하였고 이러한 행동변동은 개체의 스트레스 반응성이 중요한 역할을 하였음을 알 수 있었다. 또한 중추 5-HT계의 변동이 행동변동에 수반되어 나타남이 관찰되어, 본 연구의 생애초기 스트레스 경험 및 성숙한 시기에서 나타나는 지속적 행동변이 표출에 5-HT계가 관련되어 있을 것이라고 추측된다.

실험 3에서는 Sprague-Dawley rat를 이용하여 생애초기 14일과 21일에 반복적인 전기충격 스트레스를 50회씩 0.6 mA로 5초 동안 경험하였을 경우 성숙 후 행동변동과 뇌신경화학적 변동을 초래함을 관찰하였다. 실험 2에서 제안되었던 생애초기 스트레스에 의한 성숙 후 행동 변동에는 뇌 5-HT계가 관련이 있을 것으로 생각되어 본 연구에서는 생애 초기 스트레스 경험에 의한 성숙 후 행동변동에 5-HT계(system)의 역할을 살펴보았다. 스트레스 경험 직후 인위적으로 5-HT_{1A} 수용체 활성을 변동시켜 그 효과를 검색하였다.

생후 14일 스트레스 경험 직후 5-HT_{1A} 수용체 효현제인 8-OH-DPAT을 투여하고 생후 21일 동일한 스트레스에 노출되었을 때, 무력 표출 시점이 늦어졌다. 이러한 현상은 5-HT_{1A} 수용체 길항제인 NAN-190를 투여하였을 때는 관찰할 수 없었다.

생후 100일에 비조건화 행동검사인 탐색활동도를 검사하였다. 5-HT_{1A} 수용체 효현제 처치군의 경우 활발한 탐색활동을 보이는 것으로 관찰되었고, 5-HT_{1A} 길항제 처치군의 경우에는 저농도 처치군에서는 탐색활동도 및 반복활동도가 감소되었다. 현재까지 알려진 바로는 증강된 5-HT 활성 및 기능은 행동적 활성을 억압하고, 감소된 5-HT 기능은 다양한 환경자극에 대해 행동활성을 촉진시킨다. 이것은 1957년 Brodie와 Shore가 arousal을 관찰함으로써 알려졌는데, 5-HT가 behavioral inhibition을 일으킴을 최초 보고하였다.⁶² 5-HT를 고갈시켰을 경우 행동변동에 대해서는 일관되게 보고되어지고 있는데, 5-HT 기능 감소는 통증민감성 증가, 탐색활동도 증가, 공격행동 증가 등으로 행동활성이 나타나며, 5-HT 기능을 증강시켰을 경우에는 이와 같은 행동현상이 반대로 나타남을 비슷한 실험 조건에서 관찰되었다.⁶³ 생후 100일에 시행한 탐색활동도 측정에서 5-HT_{1A} 수용체 효현제 처치군에서의 증강된 보행활동도 및 stereotyped 활동도는 생애초기 스트레스와 함께 증강된 5-HT 활성에 의해 5-HT 유리가 감소되는 현상이 고착화되어 성숙 후에도 나타나는 현상으로 이해되며, NAN-190 처치군의 경우 탐색행동 검색에 있어서 반대의 증상이 초래되는 것 또한 이와 반대의 소견으로 이해될 수 있다.

생후 150일에 수증미로를 이용한 공간지각 학습능력 검사를 시행하였다. 생애 초기 스트레스 경험과 5-HT_{1A}수용체 활성변동으로 인한 공간지각 학습능력의 변동은 관찰되지 않았다.

생후 160일에 스트레스 호르몬으로 알려진 corticosterone의 혈중 농도를 정상 생리상태에서 검색하였다. 생애초기 전기자극 스트레스와 5-HT_{1A} 수용체 효현제 8-OH-DPAT을 함께 투여한 경우 성숙 후 기저상태의 corticosterone 수준이 증강되어 있음을 관찰하였다. 5-HT계 약물의 구분은 직접작용 효현제(direct agonist),

5-HT 선택적 재흡수 억제제 (selective serotonin reuptake inhibitors; SSRIs), 5-HT 유리촉진제(5-HT releaser) 등이 있으며, 이것들은 뇌 5-HT 기능을 증강시키며, 증강되어진 5-HT 활성은 사람에서는 cortisol을 rat의 경우 corticosterone을 그리고 adrenocorticotrophic hormone (ACTH)의 혈청 농도를 증가시킨다.^{64,65} 이러한 효과는 시상하부 측뇌실핵 (praventricular nucleus; PVN)의 corticotropin releasing factor (CRF) 함유 신경세포로의 세로토닌성 신경분포에 의해 매개되어지는데, 이들 신경은 정중 용기(median eminence)로 투사되어 문맥계를 통해 CRF를 유리시키면서 시작된다. Corticosterone release 조절에 관여하는 5-HT 수용체 아형은 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C}로 알려져 있다. 이러한 보고들은 실험 2에서 관찰된 생애초기 스트레스 경험으로 인한 성숙 후 뇌 슬기핵에서 5-HT 신경세포체의 활성 결과에 의해 효과가 나타나는 것을 뒷받침하며, 본 연구에서 생애초기 경험된 스트레스와 5-HT_{1A} 수용체 효현제로 인한 활성에 의해 스트레스 경험 당시 변동된 스트레스 반응축의 활성화가 성숙 후에도 지속되는 것으로 생각된다. 생애초기 또는 살아가는 동안 겪는 극심한 스트레스 자극은 현재 외상성 스트레스 증후군 (post-traumatic stress disorder; PTSD)의 원인으로 알려져 있다.⁶⁶ 외상성 스트레스 증후군의 경우 생물학적인 기전에는 스트레스 반응축의 변동이 보고되고 있고, 의학적 치료에 있어서 선택의 주안점은 5-HT계 약물이 이용되고 있다. 본 연구는 생애초기 스트레스 경험으로 인한 성숙 후 행동변동과 이에 연관된 뇌신경화학적 변동에 있어서 5-HT계를 중심으로 관찰하였다. 해마의 신경세포들은 HPA axis와 5-HT계와 연관되어 있다. 이것은 스트레스 반응과 관련이 있는데 스트레스에 의한 혈중 corticosterone 수준의 증가 또는 dexamethasone에 의한 직접적인 GRs의 자극은 해마에서 5-HT_{1A} 수용체 (결합정도) 수준을 감소시킨다.⁶⁵ 부신절제술을 시행한 (adrenalectomized; ADX) 동물은 해마 5-HT_{1A} 수용체 밀도가 증가되어 있으며, 선택적인 신경독성물질(selective neurotoxin)에 의한 5-HT 신경세포를 제거시킨 경우 해마에서의 GRs와 GR mRNA 발현 수준을 감소시킨다. 이것은 항우울제 투여시 5-HT 재흡수가 저하되면 해마에서 GRs와 GR mRNA가 증가되는 것과 일치되는 견해로 이해된다.

생후 180일이 되었을 때 기호성 강화자극을 이용한 자가학습검사를 시행하였는데, 생애초기 반복된 전기충격 스트레스 경험 차이에 의한 실험군간의 비교에 있어서 학습능력에는 차이가 나지 않음을 알 수 있었다. 생후 200일에 자가학습검사가 끝난 후 시행한 Fixed Ratio 1 검사에서 생애초기 반복적 스트레스 경험 당시 고농도의 NAN-190을 처치한 경우와 약물 없이 반복된 전기충격 스트레스를 경험한

실험군에서 레버 누름 정도가 무처치군에 비해 증가됨이 관찰되었고, 이어서 시행한 Progressive Ratio 검사에서도 중단점이 늦게 나타났다.

이상의 결과 생애초기 스트레스 경험 시 5-HT_{1A} 수용체 활성정도는 행동변동 양식에 영향을 미침을 알 수 있었다. 생애 초기 스트레스 경험 직후 인위적 5-HT_{1A} 수용체 변동은 반복적으로 스트레스에 노출했을 경우 및 성숙된 시기에서의 타고난 행동양식 검사에서 변동을 보였으며, 기억 또는 학습과 연관된 행동에 있어서도 스트레스 반응성의 차이에 따라서 대응 양상이 다르게 표출됨을 알 수 있었다. 특히 5-HT_{1A} 수용체 활성저하는 스트레스 노출과 동반될 경우 성숙 후 학습능력 저하가 초래되므로 적절한 5-HT_{1A} 수용체 활성이 정상적인 스트레스 반응에 필수적임을 추측하게 한다.

IV. 결 론

본 연구에서는 신경가소성이 풍부한 생애초기에 실험동물에 스트레스를 가하여 그 효과를 나이에 따라 관찰하였고, 이 때 5-hydroxytryptamine계의 역할을 검색하여 다음의 결과를 얻었다.

제 1 연구는 생애초기 생후 14일, 17일, 20일에 반복적으로 투여한 0.8 mA, 5 초 동안, 그리고 60회의 전기충격 스트레스를 경험시키고 성숙한 후 행동 변동과 해마 corticosterone 수용체를 관찰하였다.

1. 생후 180일에 기호성 강화자극을 이용한 자가학습검사에서 생애초기 반복적인 전기충격 스트레스 경험은 6초 지연강화를 이용한 작업에서 빠른 학습 습득 능력을 나타내었다.
2. 생후 210일에 타고난 행동양식을 살펴보는 탐색행동 검사에서 생애초기 반복적인 전기충격 스트레스 경험은 새로운 환경 노출에 의한 탐색활동도 비교에서 초기 반응성에는 차이는 없었으나, 시간이 지나면서 빠른 환경 적응 능력을 나타내었다.
3. 생후 210일 이후에 시행한 해마 corticosterone 수용체 자가방사선법 검사에서 MRs 수용체는 감소하였고, GRs 수용체는 증가하였는데, 생애초기 반복적인 전기충격 스트레스 경험은 MR/GR ratio를 효과적으로 감소시켰다.

이상의 결과 생애초기 스트레스 경험은 성숙 후 행동변동을 초래하였으며, 해마의 MR/GR ratio 또한 변동되었다. 이는 뇌 신경가소성이 활발한 기간인 생애초기의 스트레스 경험이 스트레스 반응축을 변화시켰고, 또한 스트레스 반응축의 변동이 성숙 후에도 지속된 결과로 생각된다.

제 2 연구는 개체들을 생애초기 30회의 전기충격 스트레스를 경험시키고, 각각의 고유한 스트레스 반응성에 따라 구분하여 성숙 후의 행동변동을 검색하였고, 스트레스 반응에 관련된 신경전달물질의 신경세포들의 활성을 조직학적 방법을 이용하

여 검색하였다.

1. 생후 100일에 타고난 행동인 탐색활동 검사에서 어린 시기의 스트레스의 경험 유무 또는 스트레스 반응성의 차이는 활동도의 변동을 초래하지 않았다.
2. 생후 150일에 조건화된 행동검사 양방향 능동회피검사를 실시한 결과 생애 초기 반복적인 스트레스 경험 당시 무력 행동을 표출하였던 무력군에서 회피행동 성공률이 높았다.
3. 생후 160일에 수동형 회피 검사에서 생애초기 반복적인 스트레스 경험 당시 무력 행동을 표출하였던 무력군에서 높은 기억 유지 수준을 나타내었다.
4. 생후 180일에 기호성 강화자극을 이용한 자가학습검사에서 생애초기 반복적인 전기충격 스트레스 경험 시 무력 행동을 표출하지 않았던 비무력군의 학습이 지체되어 습득됨을 관찰할 수 있었다.
5. 행동검색이 끝난 생후 210일 실험동물 뇌의 솔기핵에서 생애초기 반복적인 스트레스 경험 시 무력 행동을 표출하였던 무력군에서 5-HT 면역표지된 신경세포 빈도가 낮았다.
6. 행동검색이 끝난 생후 210일 실험동물 뇌의 시상하부 영역에서 기초 상태에서의 c-Fos 단백질 발현은 생애초기 반복적인 전기충격 스트레스를 경험 유무에 변동이 없었다.
7. 행동검색이 끝난 생후 210일 실험동물 뇌의 청반에서 tyrosine hydroxylase mRNA 발현은 생애초기 반복적인 스트레스 경험 당시 무력 행동을 표출하였던 무력군에서 낮은 수준을 나타내었다.

이상의 결과 생애초기 스트레스 경험 당시의 개체의 스트레스 반응성이 성숙된 시기의 행동양식에 중요한 역할을 하였음을 알 수 있었다. 또한 뇌 5-HT계의 변동이 행동변동과 동반되어 있어서 본 연구에서 관찰된 생애초기 스트레스경험으로 인한 지속적 행동변이 표출에는 뇌 5-HT계가 관련되어 있을 것으로 추측되었다.

제 3 연구는 생애초기 스트레스 경험에 의한 성숙 후 행동변동에 5-HT계(system)의 역할을 살펴보았다. 스트레스 경험 직후 인위적으로 5-HT_{1A} 수용체 활성을 변동시켜 그 효과를 검색하였다.

1. 생후 14일 스트레스 경험 직후 5-HT_{1A} 수용체 효현제인 8-OH-DPAT을 투여하고 생후 21일 동일한 스트레스에 다시 한 번 노출되었을 때, 무력 표출 시점이 늦어졌다. 이러한 현상은 5-HT_{1A} 수용체 길항제인 NAN-190를 투여

하였을 때는 관찰할 수 없었다.

2. 생후 100일에 비조건화 행동검사인 탐색활동도를 검사하였다. 5-HT_{1A} 수용체 효현제 처치군의 경우 활발한 탐색활동을 보였고, 5-HT_{1A} 길항제 처치군의 경우에는 저하된 탐색활동을 보였다.
3. 생후 150일에 수중미로를 이용한 공간지각 학습능력 검사와 생후 180일 기호성 강화자극을 이용한 자가학습검사에서 생애초기 스트레스 경험과 5-HT_{1A}수용체 활성변동으로 인한 차이를 관찰할 수 없었다.
4. 생후 200일에 시행한 Fixed Ratio 검사에서 생애초기 반복적 스트레스 경험으로 행동중단점이 증가되었는데 이는 5-HT_{1A} 효현제 투여군에서는 증가를 관찰할 수 없었다.

이상의 결과 생애초기 스트레스 경험 시 5-HT_{1A} 수용체 활성정도는 행동변동 양식에 영향을 미침을 알 수 있었다. 특히, 반복하여 유사한 스트레스에 노출될 경우 스트레스 반응서의 차이가 초래되는데, 사전 스트레스 경험 당시의 5-HT_{1A} 수용체 활성이 중요한 역할을 하고 있음을 알 수 있었다.

본 연구를 수행한 결과 성숙된 시기에서 표출되는 행동변동은 발달시기인 생애초기의 스트레스 경험에 의존적임을 알 수 있었다. 생애초기 경험되는 스트레스에 의한 신체의 스트레스 반응은 타고난 스트레스 반응성을 변화시킬 수 있으며, 변동된 스트레스 반응성은 성숙된 후까지도 유지됨을 알 수 있었다.

또한 생애초기 스트레스를 경험할 당시 뇌 5-hydroxytryptamine계의 활성, 특히 5-HT_{1A} 수용체 활성은 스트레스 반응성을 변동시키는데 중요하게 관여할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Selye H. Syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* 1936; 138:32-35.
2. Selye H. *The stress of life* (2nd Ed). McGraw-Hill, New York, USA. 1978. pp. 1-2.
3. Bloom FE, Schulman JA, and Koob GF. Catecholamines and behavior. In: GVR Born, P Cuatrecasas, H Herken, and A Schwarz Eds. *Handbook of Experimental Pharmacology Volume 90/II*. Springer-Verlag, New York, 1994, pp. 27-88
4. Heuther G. The central adaptation syndrome: psychological stress as a trigger for adaptive modifications of brain structure and brain function. *Prog Neurobiol* 1996;48:569-612.
5. De Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, and Joels M. Glucocorticoid feedback resistance. *Trends Endocrinol Metab* 1997;8:26-33.
6. De Kloet ER, Vreugdenhil E, Oizl MS, and Joels M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocrine Rev* 1998;19:269-301.
7. Vazquez DM, Van Oers H, Levine S, and Akil H. Regulation of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor mRNAs in the hippocampus of maternally deprived infant rat. *Brain Research* 1996;731: 79-90.
8. Moguilewsky M and Raynaud JP. Evidence for a specific mineralocorticoid receptor in rat pituitary and brain. *J Steroid Biochem* 1980;12:309-314.
9. Van Steensel B, Van Binnendijk E, Hornsby CD, van der Voort HT, Krozowski ZS, de Kloet ER, van Driel R. Partial colocalization of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in discrete compartments in nuclei of rat hippocampus neurons. *J Cell Sci* 1996;109: 787-792.
10. Reul JM and De Kloet ER. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* 1985;117:2505-2511.
11. De Kloet ER and Reul JM. Feedback action and tonic influence of corticosteroids on brain function: a concept arising from the heterogeneity of brain receptor systems. *Psychoneuroendocrinology* 1987;12:83-105.
12. Amat J, Matus-Amat P, Watkins LR, and Maier SF. Escapable and inescapable stress differentially alter extracellular levels of 5-HT in the basolateral amygdala of the rat. *Brain Res* 1998;812:113-120.

13. Amat J, Matus-Amat P, Watkins LR, and Maier SF. Escapable and inescapable stress differentially and selectively alter extracellular levels of 5-HT in the ventral hippocampus and dorsal periaqueductal gray of the rat. *Brain Res* 1998;797:12-22.
14. Oitzl MS, Fluttert M, and De Kloet ER. Acute blockade of hippocampal glucocorticoid receptors facilitates spatial learning in rats. *Brain Res* 1998;797:159-162.
15. Auguilera G. Corticotropin releasing hormone, receptor regulation and the stress response. *Trends in Endocrinol Metabol* 1998;9:329-336.
16. Meneses A, Hong E. A pharmacological analysis of serotonergic receptors: effects of their activation or blockade in learning. *Prog Neuro-Psychopharmacol Psychiat* 1997;21:273-296.
17. Peroutka SJ. 5-Hydroxytryptamine receptors in vertebrates and invertebrates: why are there so many?. *Neurochem int* 1994;25:533-536.
18. Descarries L, Audet MA, Doucet G, Garcia S, Oleskevich S, Seguela P, Soghomonian J-J, Watkins K. Morphology of central serotonin neurons. *Ann NY Acad Sci* 1990;600:81-92.
19. Sanders-Busch E. Adaptive regulation of control 5-HT receptors linked to phosphoinositide hydrolysis. *Neuropsychopharmacol* 1990;3:411-416.
20. Cohen Z, Bonveto G, Lacombe P, Hamel E. Serotonin in the regulation of brain microcirculation. *Prog Neurobiol* 1996;50:335-362.
21. Uphouse L. Multiple serotonin receptors: Too many, not enough, or just the right number? *Neurosci Biobehav Rev* 1997;21:679-698.
22. 강동원. 저산소 스트레스가 마우스의 행동 및 면역계에 미치는 영향. 박사학위 논문, 연세대학교. 1998
23. Meaney MJ, Aitken DH, van Berkel C, Bhatnagar S, and Sapolsky RM. Effect of neonatal handling on age-related impairments associated with the hippocampus. *Science* 1988;239:766-768.
24. Liu D, Diorio J, Tannenbaum B, Caldji C, Francis D, Freedman A, Sharma S, Pearson D, Plotsky PM, and Meaney MJ. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science* 1997;277:1659-1662.
25. Weaver SA, Meaney MJ. Regulation of forebrain glucocorticoid receptor systems and the development of individual differences in stress responses in the rat. *Current Opinion in Endocrinol Diabetes* 1997;4:148-157.

26. Kim DG, Lee S, Lim JS. Effects of exposure conditions to footshocks early in life on spontaneous locomotor activity at maturity in rats. *Yonsei Medical Journal* 1999;40:124-130.
27. Wu J, Kramer GL, Kram M, Steciuk M, Crawford IL, and Petty F. Serotonin and learned helplessness: a regional study of 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} receptors and the serotonin transport site in rat brain. *J Psychiat Res* 1999;33:17-22.
28. Davis M. The role of amygdala in conditioned fear. In J. P. Aggleton (Ed.). *The amygdala: Neurobiological aspects of emotion, memory and mental dysfunction* (pp. 255-306). New York: Willey-Liss. 1992.
29. Gewirtz JC, Falls WA, Davis M. Normal conditioned inhibition and extinction of freezing and fear-potentiated startle following electrolytic lesions of medial prefrontal cortex in rats. *Behav Neurosci* 1997;111:712-726.
30. Pugh CR, Tremblay D, Fleshner M, Rudy JW. A selective role for corticosterone in contextual-fear conditioning. *Behavioral Neuroscience* 1991;111:503-511.
31. McEwen BS, Conrad CD, Kuroda Y, Frankfurt M, Magarinos AM, and McKittrick C. Prevention of stress-induced morphological and cognitive consequences. *European Neuropsychopharmacology* 1997;7: S323-S328.
32. Meijer OC, Van Oosten RV, and De Kloet ER. Elevated basal trough levels of corticosterone suppress hippocampal 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor expression in adrenally intact rats: Implication for the pathogenesis of depression. *Neuroscience* 1997;80:419-426.
33. McEwen BS: Hormones as regulators of brain development: life-long effects related to health and disease. *Acta Paediatr Suppl* 1997;422:41-44.
34. Lee SS, Lee S, Kang DW, Kim JS, Kim DG. Neurobehavioral teratology 연쇄 hypoxic exposure in newborn rats. *J Kor Neurol Ass* 1998;16:143-154.
35. Overmeir JB, Seligman MEP. Effects of inescapable shock upon subsequent escape and avoidance learning. *J Comp Physiol Psychol.* 1967;63:23-33.
36. Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life Sciences National Research Council Eds. *Guide for the care and use of laboratory animals*. National Academy Press, Washington D.C., 1996.
37. Korea Association of Medical Sciences Ed. *Guide for animal experiments* edited by the korean academy of medical sciences. KAMS, Seoul, 2000.
38. Seligman MEP. *Helplessness on depression, development and death*. San

Francisco, WH freeman and Co., pp. 21-43, 1975

39. Skinner BF. Science and human behavior. Macmillan, New York, USA. 1953
40. Johnstone JM, Pennypecker HS. Strategies and tatics of behavioral research, Hillsdale, NJ, USA. 1993
41. Paxinos G, Watson C. 4th Eds. The atlas of the rat brain, A stereotaxic coordination. Acedemic Press, New York, 1986.
42. Pazos A and Palacios JM. Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. I. Serotonin-1 receptors. Brain Res 1985;346:205-230.
43. Pazos A and Palacios JM. Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. II. Serotonin-2 receptors. Brain Res 1985;346:231-249.
44. Stolerman IP. A method for studying the influences of drugs on learning for food rewards in rats. Psychopharmacologia 1971;19:398-406.
45. Jahng JW, Houpt T, Kim SJ, Joh DH, Son JH. Neuropeptide Y and serotonin innervation in the arcuate nucleus of *anorexia* mutant mice. Brain Res 1998;790:67-73.
46. Jahng JW, Houpt T, Joh DH, Son JH. Differential expression of monoamine oxidase A, serotonin transporter, tyrosine hydroxylase and norepinephrine trnasporter mRNA by anorexia mutation and food deprivation. Develop Brain Res 1998;107:241-246.
47. Rapport MM, Green AA, Page IH. Partial purification of the vasoconstrictor in beef serum. J Biol Chem 1948;174:735-738.
48. Erspamer V, Asero B. Identification of enteramine, specific hormone of enterochromaffin cells, as 5-hydrozytryptamine. Nature 1952;169:800-801.
49. Dahlstrom A, Fuxe K. Evidence for existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system: I. Demonstration of monoamines in the vell bodies of brainstem neurons. Acta Physiol Scand 1964;62(Supple 232):1-55.
50. Jacobs BL, Azmitia EC. Structure and function of the brain serotonin system. Physiol Rev 1992;72:165-229.
51. Azmitia EC, Buchan AM, Williams JH. Structural and functional restoration by collateral sprouting of hippocampal 5-HT axons. Nature 1978;274:374-377.

52. Tierney AJ. Structure and function of invertebrate 5-HT receptors: a review. *Comp Biochem Physiol Part A* 2001;128:791-804.
53. Cullinan WE, Herman JP, Battaglia DF, Akil H, Watson SJ. Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience* 1995;64:477-505.
54. Chaouloff F. Physiopharmacological interactions between stress hormones and central serotonergic systems. *Brain Res Rev* 1993;18:1-32.
55. Graeff FG. Role of 5-HT in defensive behavior and anxiety. *Rev Neurosci* 1993;72:181-211.
56. Kim DG, Lee S, Lim JS. Neonatal footshock stress alters adult behavior and hippocampal corticosteroid receptors. *Neuroreport* 1999;10:2551-2556.
57. Sparber SB. Use of autoshaping with non-delayed and delayed reinforcement for studying effects upon acquisition and consolidation of information. In: Buccafusco JJ Ed. *Methods of behavior analysis in neuroscience*. CRC Press, New York, 2001, pp. 231-267.
58. Azmitia EC. Serotonin neurons, neuroplasticity, and homeostasis of neural tissue. *Neuropsychopharmacol* 1999;21:33S-45S.
59. De Kloet ER, Sutanto W, Rots N, van Haarst A, van den Berg D, Oitzl M, van Eekelen A, Voorhuis D. Plasticity and function of brain corticosteroid receptors during aging. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1991;125 Suppl 1:65-72.
60. Meaney MJ, Aitken DH, Sharma S, Viau V. Basal ACTH, corticosterone and corticosterone-binding globulin levels over the diurnal cycle, and age-related changes in hippocampal type I and type II corticosteroid receptor binding capacity in young and aged, handled and nonhandled rats. *Neuroendocrinology* 1992;55:204-213.
61. Graham YP, Heim C, Goodman SH, Miller AH, Nemeroff CB. The effects of neonatal stress on brain development: Implication for psychopathology. *Develop Psychopathol* 1999;11:545-565.
62. Brodie BB, Shore PA. *Ann NY Acad Sci* 1957;66:631.
63. Mazer C, Muneyyirci J, Taheny K, Raio N, Borella A, Whitaker-Azmitia P. Serotonin depletion during synaptogenesis leads to decreased synaptic density and learning deficits in the adult rat: A possible model of neurodevelopmental disorders with cognitive deficits. *Brain Res* 1997;760:68-73.

64. Flugge G. Dynamics of central nervous 5-HT_{1A} receptors under psychosocial stress. *J Neurosci* 1995;15:7132-7140.
65. Mendelson S, McEwen BS. Autoradiographic analyses of the effects of restraint-induced stress on 5-HT_{1A}, 5-HT_{1C}, and 5-HT₂ receptors in the dorsal hippocampus of male and female rats. *Neuroendocrinology* 1991;54:454-461.
66. Yehuda R. Post-traumatic stress disorder. *N Engl J Med* 2002;346:108-132.

Abstract

Role of brain 5-hydroxytryptamine system in regulation of stress responses

Seoul Lee

Department of Medical Science

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Dong Goo Kim)

Exposure to a stressor elicits a stress response mainly mediated by the sympathetic nervous system and hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. Stress is common experience of daily life and all organisms have evolved mechanisms and strategies to deal with crucial alterations in their internal and external environment. The ability to cope with or adapt to stressors is a fundamental requirement for survival.

These stress responses are variable and there are individual differences both physiologically and behaviorally in the resulting adaptational/maladaptational processes. The ability of the brain to perform functionally relevant adaptations following various challenges is called plasticity.

In this study, I aimed to elucidate long-term behavioral and neurochemical consequences of exposure to stress early in life when the neural plasticity is active. Exposure to unpredictable and uncontrollable electric footshock stress was used as the stressor early in life. I also examined the role of brain 5-HT system in the consequences of exposure to the stress early in life. The

following results obtained:

In the experiment 1, Sprague-Dawley rats were exposed to 60 electric footshock stress 3 times on postnatal days (PNDs) 14, 17, and 20.

1. The exposure to electric footshock stress early in life resulted in a faster acquisition of the autoshaped learning task with 6 sec delayed reinforcement in 180-day old rats.

2. The exposure to electric footshock stress early in life resulted in a quicker adaptation after exposed to a novel environment in 210-days old rats.

3. The exposure to electric footshock stress early in life resulted in decreased ratio of MR/GR receptors in the hippocampus in 210-days old rats.

This study showed that the experience of stress early in life resulted in altered behaviors in later life, and continuing impairment of HPA function may be responsible for these phenomena.

In the experiment 2, rats were exposed to 30 electric footshock stress 2 times on PNDs 14 and 21. Then, animals were divided into 2 subgroups depends on their stress response trait, such as rats eliciting the helplessness behavior or not during the stress session.

1. The exposure to electric footshock stress early in life did not result in altered exploratory behavior in 150-day old rats regardless of showing helplessness behavior.

2. In the avoidance learning test of 150-day old rats, better performance was noted in rats showed helplessness behavior at the time of exposure to stress.

3. In the autoshaped learning test of 180-day old rats, a retardation of acquisition was noted in rats not showed helplessness behavior at the time of exposure to stress..

4. A decreased in 5-HT immunoreactive cells in the raphe nuclei and a

decreased expression of tyrosine hydroxylase mRNA in the locus ceruleus were observed in rats showed helplessness behavior during exposure to footshock stress early in life in 210-day old rats.

This study showed that different traits of stress responses resulted in different behavioral and neurochemical alterations at maturity. Moreover, 5-HT system seemed to be involved in there consequences from experience of different responses upon the same stressor.

In the experiment 3, rats were exposed to 50 electric footshock stress 2 times on PNDs 14 and 21. In order to investigate the role of 5-HT_{1A} receptor activity in the regulation of stress response, rats were treated with 5-HT_{1A} receptor agonist, 8-OH-DPAT, or 5-HT_{1A} antagonist, NAN-190 30 minutes after the first footshock session finished.

1. The number of footshocks necessary to elicit helplessness behavior was chosen as an index of behavioral stress response. When rats were exposed to the same stress twice, the number of footshocks necessary to elicit helplessness behavior decreased during the second footshock session on PND 21 compare to the first footshock session on PND 14. This phenomenon was abolished by the treatment with 8-OH-DPAT, but not with NAN-190.

2. In the exploratory activities at PND 100, rats treated with 8-OH-DPAT or NAN-190 showed increased or decreased activity, respectively.

3. There were no significant changes in the Morris water maze test at PND 150 and the autoshaped learning test at PND 180.

4. In the Progressive Ratio test at PND 200, rats experienced early in life stress showed higher break point, and this higher break point was not observed in rats treated with 8-OH-DPAT.

This study showed that the nature of stress response to the facing stressful event is determined by the memory of the stressful event previously experienced by the organism, and that 5-HT_{1A} receptor activity during memory

consolidation plays a role in determining the nature of response to following stress.

These results suggest that behavioral expression at maturity is modified by the experience early in life in relation with the nature of stress response trait and 5-HT_{1A} receptor activity at the time of exposure to the stress.

Key words : Stress, Stressor, 5-hydroxytryptamine, Behavior, Neurochemistry, Learning and Memory, Rat Autoshaping, Exploration, Avoidance, Water maze, Immunohistochemistry, *in situ* hybridization, Autoradiography, 5-HT_{1A} receptor, 8-OH-DPAT, NAN-190, Corticosterone, Glucocorticoid receptor, Mineralocorticoid receptor, Electric footshock stress, Skinner box, Shuttle box, Open field, Rota-rod, Hippocampus, Hypothalamus, Raphe nucleus, Locus ceruleus, Norepinephrine, Adrenal gland, Fixed Ratio, Progressive Ratio, Inverted U shaped curve