

Differential Effects of Combined Stress during Adolescence and Adulthood on Anxiety-related Behaviors in Rats*

Ji-Hye Lee¹, June-Seek Choi^{1†}

¹Department of Psychology, Korea University

We investigated the long-term effects of combined stress using adolescent and adult rats and determined whether there were differential effects depending developmental periods. The combined stress consisted of social isolation and chasing stress. The adolescent (5-weeks old) and adult (8-weeks old) rats were isolated three days prior to chasing stress. Both groups of the rats were assigned to social isolation (SI) or social isolation + chasing stress (SI+C) treatment. Chasing stress is a novel stress paradigm developed by the authors, in which the rats were chased by a fast-approaching robotic construct in an inescapable donut-shaped maze. Three weeks following the chasing stress, the rats were examined for long-term memory of the chasing tone, anxiety-like behavior, and new fear learning. In the chasing tone test, the adolescent SI+C showed a lower level of freezing in response to the chasing tone itself than the adult SI+C. However, there were no differences in freezing levels during inter-trial intervals. In the elevated plus-maze (EPM) test, the adolescent SI+C exhibited increased anxiety-related behaviors, but the adult SI+C did not. In the fear conditioning using footshock, the adult SI+C showed sensitized responses, whereas the adolescent SI+C showed impairment of new fear learning. In sum, the combined stress experienced during adolescence caused long-term disability in reacting properly to a warning cue as well as increased anxiety-related behavior. On the contrary, these effects were not induced by the same treatment during adulthood. Therefore, we propose that combined stress during adolescence, which consisted of social isolation and chasing stress, could be employed as an animal model of anxiety with consideration of the vulnerability of adolescents to anxiety disorders. Further studies are warranted to prove the utility of the new model and the underlying brain mechanism.

Keywords: Adolescence, Social isolation, Chasing stress, Combined stress, Anxiety, Fear learning, Rat

1 차원고접수 19.02.28; 수정본접수: 19.03.31; 최종게재결정 19.03.31

청소년기(adolescence)는 아동기에서 성체기로 가는 중간 단계로서 다방면의 발달적 성장과 성숙을 하는 중요한 시기이다. 청소년기는 성적인 성숙을 하는 시기를 지칭하는 사춘기(puberty)보다 조금 더 포괄적인 개념으로서 특정 발달이 일어나는 순간만을 지칭하는 것이 아닌 변화가 일어나는 기간을 의미한다(Spear, 2000). 따라서 청소년기에는 성선기능개시(gonadarche)와 같은 성적 변화 뿐 아니라(Dorn, Dahl,

Woodward, & Biro, 2006) 또래집단과의 사회적 상호작용의 증가(Harris, 1995)와 위험감수(risk taking) 행동의 증가(Steinberg, 2008; Trimpop, Kerr, & Kirkcaldy, 1998) 등의 행동적 변화도 일어난다. 또한 뇌와 인지적 발달 역시 청소년기에 활발히 일어난다(Chareyron, Lavenex, & Lavenex, 2012; Paus, 2005; Steinberg, 2005). 특히 청소년기는 스트레스에 취약한 시기이다. 청소년기는 그 자체로 다방면의 격

* 본 연구는 2014-2019년 교육부와 한국연구재단(글로벌 박사 양성사업, NRF-2014H1A2A1021401) 및 2015-2019년 과학기술정보통신부와 한국연구재단의 지원(뇌과학원천기술개발사업, NRF-2015M3C7A1031395)을 받아 수행되었음.

† 교신저자: 최준식, 고려대학교 심리학과, (02841) 서울특별시 성북구 안암동 안암로 145
E-mail: j-schoi@korea.ac.kr

동적인 변화를 겪고 있는 시기이기 때문에 외부적으로 스트레스가 주어질 경우 다른 발달 시기보다 스트레스에 대한 신경생물학적, 정서적 반응이 높으며 이러한 반응은 정신 질환에 취약한 개인에게는 정신 질환의 발생으로 이어질 수 있다(Spear, 2009). 실제로 불안 장애, 조현병, 약물 중독과 같은 정신 질환은 청소년기에 시작되는 경우가 많다(Kessler et al., 2005; Lee et al., 2014). 즉, 청소년기의 스트레스 경험은 성체기까지 장기적으로 영향을 미친다.

청소년기의 스트레스 경험의 장기적 효과에 대한 연구는 동물 모델을 이용해서도 이루어진다(Brown & Spencer, 2013; McCormick, Mathews, Thomas, & Waters, 2010). 사람의 청소년기에서 관찰되는 청소년기의 여러 특징적인 변화들은 동물에서도 관찰되기 때문이다. 즉, 호르몬 분비나 생식선의 발달과 같은 성적 성숙 뿐 아니라 전두엽의 발달과 같은 뇌의 발달과 사회적 상호작용, 위험 감수 행동 같은 행동적 특징도 동물에게서 관찰된다(Andersen, Thompson, Rutstein, Hostetter, & Teicher, 2000; Laviola, Macrì, Morley-Fletcher, & Adriani, 2003; Primus & Kellogg, 1989; Spear, 2000). 가장 보편적으로 사용되는 동물모델인 쥐에서는 이러한 특징들을 보이는 시기를 청소년기라고 정의하고 보수적인 연령의 기준은 생후 28에서 42일 사이로 본다(Spear, 2000). 이렇게 동물 모델을 이용한 연구는 사람을 대상으로 한 연구가 가진 윤리적 한계 및 청소년기의 스트레스 경험과 성년기에 나타나는 특징간의 인과관계를 명확하게 밝히기 어렵다는 점을 보완한다.

청소년기의 중요한 경험 중 하나인 사회적 상호작용이 박탈될 경우 우울 관련 증상, 자존감의 하락 등의 문제가 생긴다(Hall-Lande, Eisenberg, Christenson, & Neumark-Sztainer, 2007; Rubin & Mills, 1988). 동물에게도 청소년기는 사회적 놀이(social play)를 배우는 중요한 발달 시기이기 때문에(Pellis & Pellis, 2007; Vanderschuren, Achterberg, & Trezza, 2016) 청소년기에 사회적 접촉을 박탈시키면 사회적 상호작용에 문제가 생길 뿐 아니라 불안 관련 행동이나 인지적 결함이 유발되고 스트레스 호르몬 반응에도 변화가 일어난다(Bledsoe, Oliver, Scholl, & Forster, 2011; Burke, McCormick, Pellis, & Lukkes, 2017; Buwalda, Geerdink, Vidal, & Koolhaas, 2011; McCormick, Mathews, et al., 2010; Van den Berg et al., 1999; Weintraub, Singaravelu, & Bhatnagar, 2010; Weiss, Pryce, Jongen-Rêlo, Nanz-Bahr, & Feldon, 2004). 이러한 사회적 고립은 성체기보다 청소년기에 더 효과가 큰 것으로 나타났다(Einon & Morgan, 1977; Hodges & McCormick,

2015).

앞서 소개한 동물을 이용한 사회적 고립 연구는 보통 동물을 장기간 고립 시키고 그 사이에 다른 처치 없이 사회적 고립의 영향을 검사한다. 이러한 연구는 순수하게 사회적 고립만의 영향을 탐색할 수 있다는 장점이 있지만 실제 사회에서는 사회적 고립과 함께 다양한 스트레스를 받게 된다는 점을 반영하지 못한다. 사회적 고립은 그 자체로도 해로운 영향을 미치지만 다른 종류의 스트레스 상황에서 동물을 더욱 취약하게 만들기 때문에(Berardi et al., 2014; Lukkes, Mokin, Scholl, & Forster, 2009) 사회적 고립을 단독으로 받았을 때보다 스트레스 상황에 함께 처했을 때 더 해로운 영향을 미친다. 사회적 고립과 다른 스트레스를 복합적으로 주는 만성 가변성 스트레스(chronic variable stress) 모델을 사용한 연구들이 있지만 이 모델에는 사회적 고립 이외에 사용하는 스트레스의 종류가 너무 많아서(예를 들어 구금, 큰 소리, 저온 노출, 물 박탈, 과밀(crowding), 사회적 패배 등) 스트레스 모델의 어떠한 측면이 효과를 일으켰는지를 명확히 밝히기 어려운 한계가 있다(Isgor, Kabbaj, Akil, & Watson, 2004; Zurita, Martijena, Cuadra, Brandao, & Molina, 2000). 따라서 사회적 고립과 다른 종류의 단일 스트레스를 복합적으로 줘서 사회적 고립과 다른 스트레스간의 상호작용 및 효과를 밝힐 수 있는 동물 모델 연구가 필요하다. 특히 청소년기에 경험하는 스트레스는 단기적으로 드러나는 것보다 장기적인 영향이 더 크기 때문에(Green & McCormick, 2013a) 사회적 고립과 청소년기의 스트레스 경험이 복합적으로 주어졌을 때 장기적으로 어떠한 효과를 가지고 오는지에 대한 연구가 더욱 필요하다.

따라서 본 연구에서는 사회적 고립이 단독으로 주어졌을 때 혹은 사회적 고립과 다른 종류의 스트레스가 복합적으로 주어졌을 때의 장기적 효과를 알아보고자 하였다. 또한 이러한 효과가 청소년기와 성체기 간에 차이가 있는지를 비교하였다. 청소년기가 사회적 고립과 스트레스에 더 취약하다는 점을 바탕으로, 본 연구의 가설은 청소년기에 경험하는 복합 스트레스는 각각의 스트레스가 가진 효과가 상호작용하여 복합적 효과를 가지고 이러한 효과가 동물을 더 취약하게 만든다는 것이다. 반면 성체기에서는 이러한 복합적 효과가 나타나지 않을 것이라 예상하였다. 이를 확인하기 위해 선행 연구를 통하여 새롭게 개발된 추적 스트레스(chasing stress)를 다른 종류의 스트레스로서 활용하였다. 추적 스트레스는 탈출이 불가능한 메이즈(maze) 안에서 쥐가 빠른 속도로 움직이는 로봇에게 반복적으로 쫓기는 패러다임이다. 이는 잘 통제된 조건 아래 쥐가 야생에서 경험할 수 있는 포식자에게

쫓기는 상황을 모사하여 생태학적 타당도를 높였고, 심인성(psychogenic) 스트레스 모델이라는 점에서 전기 쇼크나 구속(restraint)과 같은 인위적이고 물리적인 스트레스와는 차별화된다. 또한 추적 스트레스는 동물의 즉각적인 공포 반응 및 스트레스 호르몬의 증가를 유발할 뿐 아니라 추적 스트레스에 대한 장기 기억 형성과 새로운 공포 사건에 대한 민감화된 반응과 같은 장기적인 영향을 유발하는 효과적인 스트레스 모델임이 확인되었다(Lee, Kimm, Han, & Choi, 2018).

본 연구에서 청소년기(생후 5주)와 성체기(생후 8주)의 쥐들은 추적 스트레스 3일 전부터 사회적 고립 처치를 받았으며 각 발달주기 집단은 사회적 고립(social isolation; SI) 집단 혹은 사회적 고립과 추적 스트레스(social isolation + chasing stress; SI+C) 집단으로 나뉘었다. 하루에 20시행씩 총 3일간 SI 집단은 소리자극의 제시만을 받았으며 SI+C 집단은 소리자극의 제시와 로봇의 추적(chasing)을 함께 받았다. 그리고 추적 스트레스 경험으로부터 3주 후에 장기적 효과를 확인하기 위해 행동 검사를 진행하였다. 행동 검사는 추적 스트레스 당시 제시되었던 소리자극에 관한 기억 검사와 불안 관련 행동 검사 그리고 새로운 공포 학습으로 구성되었다.

방 법

피험동물

연구에 사용된 동물은 수컷 Sprague-Dawley 종의 흰 쥐로 청소년기 집단은 실험 시작 당시 5주령, 성체기 집단은 8주령이었다((주)오리엔트 바이오, 한국). 동물은 온도(22~24°C)와 습도(40~50%)가 일정하게 유지되고 주야를 인위적으로 반전시킨(밤 주기, 7:00 ~ 19:00) 사육실에서 사육되었고 먹이와 물은 매일 충분히 공급되었다. 추적 스트레스 경험 3일 전부터 매일 하루에 5분간 핸들링(handling)하였다. 본 연구는 2×2 설계로, 발달주기(청소년기 vs. 성체기)와 처치(사회적 고립, social isolation; SI vs. 사회적 고립과 추적 스트레스, social isolation + chasing stress; SI+C)를 집단-간 변인으로 하였다. 연구에 사용된 피험동물의 수는 다음과 같다. 청소년기 집단의 총 25마리 중 SI 집단은 12마리, SI+C 집단은 13마리였고, 성체기 집단의 총 21마리 중 SI 집단은 10마리, SI+C 집단은 11마리였다.

장비

도넛 메이즈. 로봇을 이용한 추적 스트레스는 지름이 60

cm인 도넛 모양으로 생긴 아크릴로 된 메이즈 내 폭이 18 cm인 원형 트랙 내에서 진행되었다. 메이즈 내 모든 벽에는 메이즈 밖이 보이지 않게 하기 위해 검정색 폴리비닐 클로라이드 폼 시트를 붙였다. 메이즈는 검정색 커튼으로 둘러싸여 있고 할로겐 조명을 간접적으로 비쬘다. 세 개의 아날로그 비디오 카메라가 메이즈 중심에 위치한 투명한 원형 기둥 내에 위치하고, 아날로그 카메라와 디지털 카메라는 각각 하나씩 천장에 부착하여 동물의 움직임을 관찰하고 기록하는 데 사용하였다.

추적자 로봇. 추적자 로봇은 네 개의 바퀴가 달린 직육면체(15 × 26 × 35 cm) 형태의 차 모양의 로봇으로서, 블루투스 통신을 기반으로 하는 마이크로컨트롤러(microcontroller)로 움직임을 조절하였다(SPL-Duino BT, Helloapps, 한국). 두 개의 8Ω 스피커가 로봇의 앞뒷면에 각각 하나씩 부착되었고 이 스피커를 통해 소리자극(2 kHz)이 제시되었다. 로봇이 움직이는 속도와 방향은 아두이노(Arduino, USA)로 프로그래밍 하였다. 실험 조건에 따라 프로그래밍 된 명령어를 컴퓨터에 입력하면 블루투스 통신을 통해 명령어가 로봇에 전달되어 시행이 시작되었다. 로봇이 움직이는 방향(시계 혹은 반시계 방향)은 50/50의 확률로 시행마다 임의로 정해졌다.

높은 십자 미로(elevated plus-maze, EPM). 높은 십자 미로 검사는 쥐가 높고 밝은 곳을 두려워한다는 점을 이용하여 동물의 불안 수준을 측정하는 검사이다. 실험에 사용한 높은 십자 미로는 총 4개의 팔(10 × 50 cm)이 십자 모양으로 구성되어 있으며 바닥으로부터 50 cm 높이에 있다. 두 개의 폐쇄된 팔(closed arm)은 높이 40cm의 높은 벽으로 막혀있고, 두 개의 개방된 팔(open arm)은 벽이 없고 LED 조명이 빛을 비춘다(33 lux).

파블로프 조건화 상자. 파블로프 조건화 상자는 25 × 30 × 40 cm의 아크릴 상자로, 상자의 한 쪽 벽에는 8Ω 스피커가 부착되어 있다. 소리자극은 톤 제너레이터(Programmable Tone/Noise Generator, Coulbourn Instruments, USA)에서 생성되어 앰프(CPA-2000, Vascom, 한국)를 통해 스피커로 전달되었다. 전기 쇼크를 이용한 공포 조건화를 실시할 때는 상자 바닥에 스테인리스스틸 그리드(grid)를 놓고 전기 쇼크 발생기(Precision Animal Shocker, Coulbourn Instruments, USA)와 연결하였다. 또한 조명은 붉은 색으로 제시하였다. 공포 조건화에 사용된 소리

자극에 대한 기억 검사(FC tone test)를 진행할 때는 바닥에 깔짚 bedding)을 깔고 초록색 조명을 제시하였다. 한편 맥락을 바꿔 추적 소리자극 검사(chasing tone test in a different context)를 진행할 때도 파블로프 조건화 상자를 이용하였는데 이때는 그리드 대신 편평한 플라스틱판을 바닥에 놓고 파란색 조명을 제시하였다.

절차

실험 절차에 대한 전체적인 개요는 그림 1에 제시하였다. 청소년기 혹은 성체기에 추적 스트레스를 경험하기 3일 전에 사회적 고립이 시작되었다. 3일간의 추적 스트레스가 주어지고, 3주 후에 행동 검사가 하루에 하나씩 진행되었다. 행동 검사가 진행되는 동안에는 모든 집단이 성체기 주령이지만(청소년기 집단, 8주령; 성체기 집단, 11주령) 실험 결과의 서술 상 편의를 위해 추적 스트레스를 경험하였던 시점으로 집단 이름을 붙여서 각각 청소년기, 성체기 집단이라고 지칭하였다.

사회적 고립(social isolation). 모든 동물은 실험 시작 전까지는 한 케이지에 3마리씩 사육되다가 추적 스트레스로부터 3일 전에 개별 케이지로 옮겨졌다. 그리고 실험이 모두 종료될 때까지 개별 케이지에서 사육되었다.

추적 스트레스(chasing stress). 동물이 도넛 메이즈에서 2분간의 적응시간 후 빠른 속도(0.7 m/s)로 접근해오는 로봇에게 쫓기게 된다. SI+C 집단이 받는 한 시행은 5초간의 소리자극(2 kHz)을 제시하고 후반 2.5초간 로봇에게 쫓기는 사

건으로 구성되며 시행 간 간격은 15-25초로 진행되었다. SI 집단이 받는 한 시행은 로봇에게 쫓기는 경험 없이 5초간의 소리자극의 제시만으로 구성되었다. 두 집단 모두 하루에 20시행씩 총 3일간 실험을 실시하였다. 한 마리의 실험이 종료될 때마다 도넛 메이즈를 70%의 에틸 알코올로 닦아 주었다.

추적 소리자극 검사(chasing tone test). 추적 소리자극 검사는 추적 스트레스 당시 제시되었던 소리자극에 대한 장기 기억 검사로서, 추적 스트레스로부터 3주 후에 총 두 가지 맥락(동일 맥락, 다른 맥락)에서 실시하였다. 첫 번째 추적 소리자극 검사는 추적 스트레스가 진행되었던 도넛 메이즈(동일 맥락)에서 진행하였다. 먼저 동물을 도넛 메이즈에 놓고 2분 동안 맥락을 탐색하고 맥락에 적응하도록 두었다. 2분 후에 추적 스트레스 경험 당시 제시받았던 소리자극(2 kHz)을 20초간 3회 제시하였고 시행 간 간격은 20초였다. 두 번째 추적 소리자극 검사는 맥락을 바꿔서 파란색 조명을 제시하고 바닥에는 플라스틱판을 둔 파블로프 조건화 상자(다른 맥락)에서 진행하였다. 2분간의 맥락에 대한 탐색 및 적응 시간 후 추적 소리자극을 총 20초간 5회 제시하였고 시행 간 간격은 60초였다. 추적 소리자극 검사 동안 동물의 동결 반응(freezing)과 초음파 발성(ultrasonic vocalization; USV)을 측정하였다. 한 마리의 실험이 종료될 때마다 도넛 메이즈 또는 파블로프 조건화 상자를 70%의 에틸 알코올로 닦아 주었다.

높은 십자 미로 검사(elevated plus-maze test, EPM test).

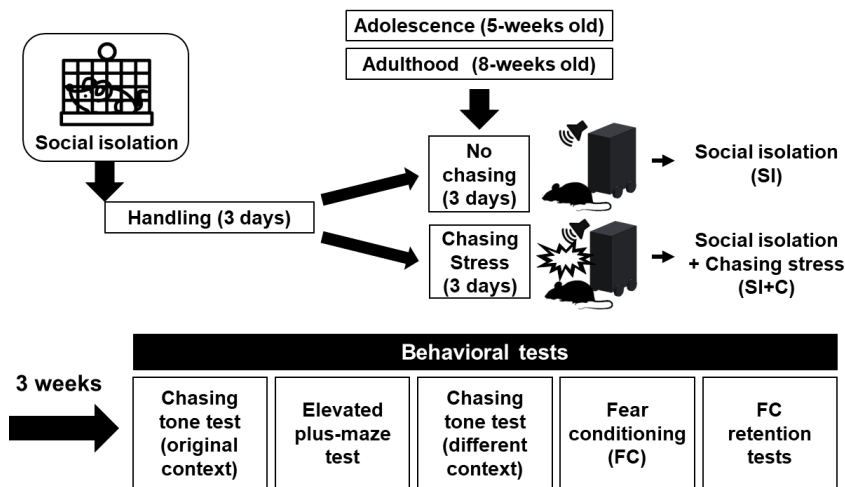


Figure 1. Experimental procedure for testing the long-term effects of combined stress which consisted of social isolation and chasing stress. The rats received social isolation only (SI group) or social isolation + chasing stress (SI+C group) during adolescence or adulthood. The behavioral tests were conducted three weeks following the chasing stress procedure.

높은 십자 미로 검사는 동물의 불안 관련 행동(anxiety-related behavior)을 측정하는 대표적인 검사 중 하나이다. 먼저 동물을 개방된 팔을 바라보는 방향으로 중앙 플랫폼에 둔다. 그 후 10분간 자유롭게 미로를 탐색하게 한 다음 홈 케이지에 다시 돌려놓는다. 개방된 팔과 폐쇄된 팔에 들어간 횟수와 각 팔에서 보낸 시간은 비디오 추적 프로그램(ANY-maze, Stoelting, USA)을 사용하여 분석하였다. 각 시행 후에는 미로를 70%의 에틸 알코올로 닦아 주었다.

전기 쇼크를 이용한 공포 조건화(fear conditioning, FC).

본 실험에서 조건 자극(conditioned stimulus, CS)으로는 4 kHz, 75-80 dB의 소리자극을, 무조건 자극(unconditioned stimulus, US)으로는 0.6 mA의 전기 쇼크를 사용하였다. 한 시행은 20초간 CS를 제시한 후 마지막 1초간 US를 제시하는 것으로 구성되었고 총 3번의 시행을 제시했다. 상자에 동물을 넣고 2분간의 적응 시간 후에 시행이 시작되었고, 시행 간 간격(intertrial interval, ITI)은 110-130초(평균 120초)였다. 한 마리의 실험이 종료될 때마다 상자와 그리드를 70%의 에틸 알코올로 닦아 주었다.

공포 조건화 기억 검사(FC retention tests). 공포 조건화에 사용되었던 맥락과 소리자극에 대한 검사는 공포 조건화 다음날 진행하였다. 먼저 공포 조건화 맥락 검사(FC context test)는 공포 조건화를 받은 상자와 동일한 상자에 5분간 동물을 넣고 동결반응과 초음파 발성을 측정하였다. 공포 조건화 소리자극 검사(FC tone test)는 공포 조건화 맥락검사로부터 3시간 후 다른 맥락(바닥에 깔짚 및 초록불 제시)에서 진행하였다. 2분간의 적응 시간 후 20초간 공포 조건화에 사용된 소리자극을 2회 제시하였으며 시행 간 간격은 110-130초(평균 120초)였다. 검사 동안 동물의 동결반응과 초음파 발성을 측정하였다. 한 마리의 실험이 종료될 때마다 상자 및 그리드(혹은 플라스틱 판)을 70% 에틸 알코올로 닦아 주었다.

분석

동결반응과 초음파 발성의 분석. 비디오 녹화 파일을 비디오 추적 프로그램(ANY-maze, Stoelting, USA)을 이용하여 분석해서 동결반응을 보인 시간을 측정하였다. 초음파 발성은 측정 범위를 22 kHz에 맞춘 초음파 탐지기(Mini-3 Detector, Ultra Sound Advice, UK)를 녹화 장비에 연결해서 비디오 녹화 파일 내에 오디오 트랙으로 들어가도록 녹음하였다. 배경 소음이나 로봇이 움직이면서 나는 기계적인 소

음은 소리 분석 프로그램(Adobe Audition, Adobe Systems, USA) 내의 디지털 필터 기능을 사용하여 제거하였다. 초음파 발생 시간은 Matlab (MathWorks, USA)를 이용한 자체 분석 프로그램을 통해 계산하였다.

통계분석. 본 연구의 결과분석은 통계분석 프로그램(SPSS version 20.0, IBM SPSS, USA)을 이용하여 분석하였다. 공포 조건화를 제외한 모든 검사의 분석에서 발달주기(청소년기 vs. 성체기)와 처치(SI vs. SI+C)를 변인으로 두고 주효과 및 상호작용 효과를 확인하기 위하여 이원분산분석(Two-way ANOVA)을 실시하였다. 공포 조건화에서는 집단-간 변인인 발달주기(청소년기 vs. 성체기)와 처치(SI vs. SI+C) 및 집단-내 변인인 시행(3 trials)의 주효과 및 상호작용 효과를 확인하기 위하여 2×2×3의 반복 측정 변량분석(repeated-measure ANOVA)을 실시하였다. 발달주기나 처치 간의 차이를 더 자세하게 비교하기 위해 Bonferroni 방법으로 보정한 다중평균비교(multiple comparisons)를 통해 사후 검정을 실시하였다. 사후 검정은 상호작용 효과가 유의하거나, 상호작용 효과가 유의하지 않더라도 주효과가 유의하여서 집단 간 차이를 밝히기 위해 추가적으로 분석이 필요한 경우에 실시하였다. 모든 분석에서 p 값이 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

추적 소리자극 검사

동물이 추적 스트레스에 대해 형성하고 있는 장기 기억을 확인하기 위해 추적 스트레스 경험으로부터 3주 후에 추적 소리자극 검사를 실시하였다. 추적 소리자극 검사는 추적 스트레스를 받았던 동일한 맥락과 그와는 다른 맥락에서 총 두 번 진행하였다.

동일 맥락. 추적 스트레스 경험을 받았던 도넛 메이즈에서 진행된 추적 소리자극 검사 결과를 그림 2에 제시하였다. 추적 소리자극은 총 세 번 제시되었다. 먼저 동결반응의 분석 결과(그림 2A), 처치의 유의미한 주효과가 관찰되었다 [$F(1,42) = 24.25, p < .001$]. 발달주기의 주효과 [$F(1,42) = 0.01, p > .05$]와 발달주기×집단의 상호작용 효과 [$F(1,42) = 1.32, p > .05$]는 관찰되지 않았다. 사후 검정 결과 청소년기와 성체기 모두 SI+C 집단이 SI 집단보다 유의하게 높은 동결반응을 보였다(청소년기, $p < .001$; 성체기, $p < .05$). 초음파 발성의 분석 결과(그림 2B), 처치의 유의미한 주효과가 관찰되었고 [$F(1,42) = 4.89, p < .05$] 발달주기의 주효과 [$F(1,42) = 0.93, p > .05$]와 발달주기×집단의 상호작용 효과 [$F(1,42) =$

0.93, $p > .05$)는 관찰되지 않았다. 따라서 청소년기와 성체기 두 집단 모두 로봇의 추적을 예고하는 단서로 사용된 소리 자극에 대한 장기 기억을 형성한 것으로 나타났다.

다른 맥락. 동물이 맥락 정보와 분리된 소리 자극에 보이는 공포 반응을 확인하기 위해 두 번째 추적 소리검사는 도넛 메이즈가 아닌 다른 맥락에서 진행하였다. 추적 소리 자극은 총 다섯 번 제시되었으며 실험 결과는 추적 소리 자극이 들리는 동안(CS mean; 그림 3A, 3B)과 시행 간 간격 동안(ITI mean; 그림 3C, 3D)으로 나누어 분석하였다. 먼저 추적 소리 자극이 들리는 동안 동물이 보인 동결반응의 분석 결과(그림 3A), 발달주기[$F(1,42) = 31.60, p < .001$]와 처치[$F(1,42) = 58.09, p < .001$]의 유의미한 주효과가 관찰되었고, 발달주기×집단의 상호작용 효과 또한 유의하였다[$F(1,42) = 9.92, p < .05$]. 사후 검정 결과, 청소년기와 성체기 모두 SI+C 집단이 SI 집단보다 유의하게 높은 동결반응을 보였다(청소년기, $p < .01$; 성체기, $p < .001$). 하지만 청소년기 SI+C 집단은 성체기 SI+C 집단보다 유의하게 낮은 동결반응을 보였다($p < .001$). 초음파 발성의 분석 결과(그림 3B), 처치의 유의미한 주효과가 관찰되었고[$F(1,42) = 5.30, p < .05$] 발달주기의 주효과[$F(1,42) = 0.28, p > .05$]와 발달주기×집단의 상호작용 효과[$F(1,42) = 0.29, p > .05$]는 관찰되지 않았다. 따라서 청소년기에 사회적 고립과 추적 스트레스의 복합 스트레스를 받은 집단은 성체기 집단보다 추적 소리 자극의 공포 학습 능력에 결함이 있다고 볼 수 있다.

청소년기 집단이 성체기 집단에 비해 단순히 추적 스트레스로 인한 공포 반응을 적게 보인 것은 아닌지를 확인하기 위해 시행 간 간격 동안 동물이 보인 동결반응을 분석한 결과(그림 3C), 처치[$F(1,42) = 59.20, p < .001$]의 유의미한 주효과가 관찰되었지만 발달주기의 주효과[$F(1,42) = 0.62,$

$p > .05$]와 발달주기×집단의 상호작용 효과[$F(1,42) = 0.33, p > .05$]는 관찰되지 않았다. 사후 검정 결과, 청소년기와 성체기 모두 SI+C 집단이 SI 집단보다 유의하게 높은 동결반응을 보였다(청소년기, $p < .001$; 성체기, $p < .001$). 초음파 발성의 분석 결과(그림 3D), 처치의 유의미한 주효과가 관찰되었고[$F(1,42) = 9.31, p < .01$] 발달주기의 주효과[$F(1,42) = 3.46, p > .05$]와 발달주기×집단의 상호작용 효과[$F(1,42) = 2.32, p > .05$]는 관찰되지 않았다. 사후 검정 결과, 청소년기에서만 SI+C 집단이 SI 집단보다 유의하게 높은 초음파 발성을 보였다($p < .01$). 즉, 시행 간 간격 동안은 청소년기 집단도 성체기 집단과 비슷하거나 더 높은 수준의 공포 반응을 보였으므로 단순히 공포 반응을 덜 보이는 것이 아니라 추적 스트레스 당시 제시되었던 추적 소리 자극에 대한 적절한 공포 반응을 학습하는 능력에 결함이 있다고 볼 수 있다.

높은 십자 미로 검사

동물의 불안 관련 행동을 측정하기 위해 높은 십자 미로 검사를 진행하였다. 높은 십자 미로 검사에서는 동물이 개방된 팔에 나가는 횟수나 시간이 적을수록 불안 수준이 높다고 정의한다. 개방된 팔에 나가는 횟수를 분석한 결과(그림 4A), 발달주기[$F(1,42) = 4.93, p < .05$]의 유의미한 주효과가 관찰되었다. 발달주기×집단의 상호작용 효과는 근소하게 (marginally) 유의하였다[$F(1,42) = 0.33, p < .06$]. 처치의 주

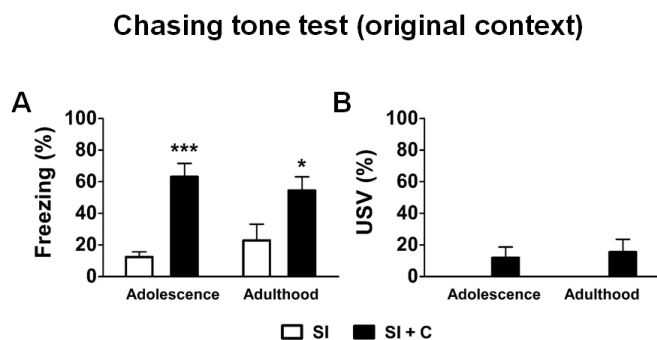


Figure 2. (A) Freezing and (B) ultrasonic vocalization (USV) during the chasing tone test in the original context. (*) comparison to the SI group within the same developmental period. (**) $p < .05$; (***) $p < .001$.

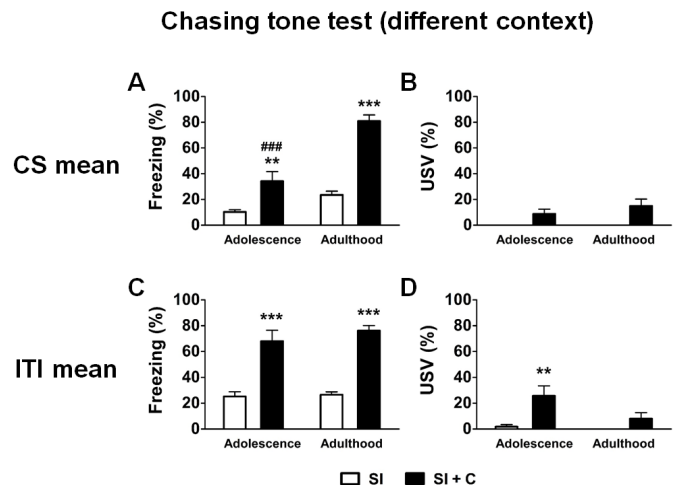


Figure 3. Defensive responses during the chasing tone test in a different context. (A, B) Average of freezing and ultrasonic vocalization (USV) while the chasing tone was presented. (C, D) Average of freezing and USV during inter-trial interval (ITI). (*) comparison to the SI group within the same developmental period; (#) comparison to the adulthood group within the same treatment. (**) $p < .01$; (***) $p < .001$.

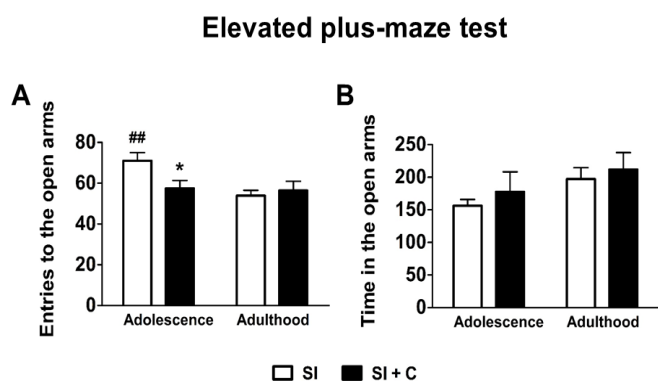


Figure 4. Anxiety-like behaviors measured by the elevated plus-maze (EPM) test. (A) Number of entries to the open arms. (B) Time spent in the open arms.

(*) comparison to the SI group within the same developmental period; (#) comparison to the adulthood group within the same treatment. (*) $p < .05$; (##) $p < .01$.

효과는 유의하지 않았다 [$F(1,42) = 1.79, p > .05$]. 사후 검정 결과, 청소년기에서만 SI+C 집단이 SI 집단보다 유의하게 적은 횟수로 개방된 팔에 나갔다 ($p < .05$). 또한 청소년기 SI 집단은 성체기 SI 집단보다 유의하게 많은 횟수로 개방된 팔에 나갔다 ($p < .01$). 개방된 팔에 나간 시간을 분석한 결과(그림 4B), 처치 [$F(1,42) = 2.74, p > .05$]와 발달주기 [$F(1,42) = 0.57, p > .05$]의 주효과는 유의하지 않았고 발달주기×집단의 상호작용 효과 [$F(1,42) = 0.20, p > .05$] 역시 관찰되지 않았다. 따라서 청소년기의 추적 스트레스 경험은 불안 수준의 증가를 유발하지만 성체기의 추적 스트레스 경험은 불안 수준에는 효과가 없는 것으로 나타났다.

공포 조건화

새로운 공포 자극에 대한 반응과 학습의 양상을 확인하기 위해 전기 쇼크를 이용한 공포 조건화를 진행하였다. 조건 자극과 전기쇼크를 연합하는 세 차례의 시행 동안 동물의 동결 반응과 초음파 발성을 측정하였으며 이를 그림 5에 제시하였다. 먼저 시행 전체 동안(Total)의 동결반응을 분석한 결과(그림 5A), 발달주기 [$F(1,42) = 4.59, p < .05$]와 처치 [$F(1,42) = 5.76, p < .05$]의 주효과가 있었다. 발달주기×처치의 상호작용 효과는 유의하지 않았다 [$F(1,42) = 0.91, p > .05$]. 사후 검정 결과, 성체기에서만 SI+C 집단이 SI 집단보다 유의하게 높은 동결반응을 보였다 ($p < .05$). 또한 청소년기의 SI+C 집단이 성체기의 SI+C 집단보다 유의하게 낮은 동결반응을 보였다 ($p < .05$). 또한 시행 전체 동안의 초음파 발성을 분석한 결과(그림 5B), 처치 [$F(1,42) = 16.86, p < .001$]의 유의한 주효과가 있었다. 발달주기 [$F(1,42) = 0.68, p > .05$]의 주효과와

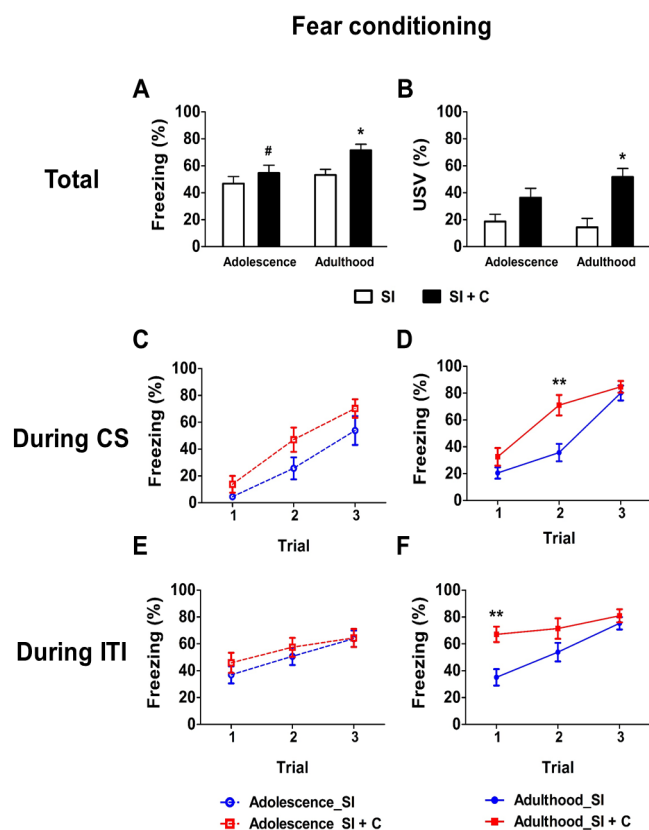


Figure 5. Freezing and ultrasonic vocalization (USV) during fear conditioning (FC). (A, B) Total freezing and USV during the conditioning session. (C, D) Freezing and USV in response to the tone conditioned stimulus (CS). (E, F) Freezing and USV during inter-trial interval (ITI). (*) comparison to the SI group within the same developmental period; (#) comparison to the adulthood group within the same treatment. (*, #) $p < .05$; (**) $p < .01$.

발달주기×처치의 상호작용 효과 [$F(1,42) = 2.12, p > .05$]는 유의하지 않았다. 사후 검정 결과, 성체기에서만 SI+C 집단이 SI 집단보다 유의하게 높은 초음파 발성을 보였다 ($p < .05$). 따라서 이러한 결과는 청소년기에 사회적 고립과 추적 스트레스의 복합 스트레스를 받은 집단이 성체기에 복합 스트레스를 받은 집단에 비해 새로운 공포 학습에 결함을 보인다는 것을 의미한다.

공포 학습을 하는 과정을 더 자세히 살펴보기 위해 동결 반응을 시행으로 나누어 분석하였다. 먼저 조건 자극이 제시 되는 동안(During CS)의 결과를 그림 5C와 5D에 발달주기 별로 나누어 표시하였다(그림 5C, 청소년기 집단; 5D, 성체기 집단). 통계 분석 결과, 발달주기 [$F(1,42) = 11.02, p < .01$], 처치 [$F(1,42) = 9.02, p < .01$] 그리고 시행 [$F(2,41) = 64.40, p < .001$]의 유의한 주효과가 있었으며 시행×처치의 유의한 상호작용 효과 [$F(2,41) = 3.51, p < .05$]가 관찰되었다.

시행×발달주기×처치의 상호작용 효과[$F(2,41) = 1.27, p>.05$]는 유의하지 않았다. 시행×처치의 유의한 상호작용 효과를 바탕으로 한 사후 검정 결과, 청소년기 집단에서는 세 시행 모두 처치에 따른 차이가 없었지만(그림 5C) 성체기 집단의 경우 2에서 SI+C 집단이 SI 집단에 비해 유의하게 높은 동결반응을 보였다(그림 5D, $p<.01$).

또한 시행 간 간격 동안(During ITI)의 동결반응 결과를 발달주기별로 표시하였다(그림 5E, 청소년기 집단; 5F, 성체기 집단). 통계 분석 결과, 처치[$F(1,42) = 4.07, p<.05$] 그리고 시행[$F(2,41) = 35.86, p<.001$]의 유의한 주효과가 있었고 시행×처치의 유의한 상호작용 효과[$F(2,41) = 4.41, p<.05$]가 관찰되었다. 발달주기[$F(1,42) = 3.34, p>.05$]의 주효과와 시행×발달주기×처치의 상호작용 효과[$F(2,41) = 1.16, p>.05$]는 유의하지 않았다. 시행×처치의 유의한 상호작용 효과를 바탕으로 한 사후 검정 결과, 청소년기 집단의 경우 모든 시행에서 처치에 따른 유의한 차이가 없었지만(그림 5E) 성체기 집단의 경우 시행 1에서 SI+C 집단이 SI 집단에 비해 유의하게 높은 동결반응을 보였다(그림 5F, $p<.01$). 이러한 결과는 성체기에 사회적 고립과 추적 스트레스를 이용한 복합 스트레스를 받은 경우에는 새로운 공포 학습에 민감화가 일어나지만 청소년기에 경험한 복합 스트레스를 받은 경우에는 이러한 민감화를 상쇄시키는 공포 학습의 결함을 보인다는 것을 의미한다.

공포 조건화 기억 검사

전기 쇼크를 이용한 공포 조건화에 사용되었던 맥락과 조건 자극으로 제시 된 소리자극에 대한 기억 검사를 다음 날 실시하였다.

공포 조건화 맥락 검사. 공포 조건화를 진행하였던 맥락에 5분간 동물을 놓고 동물의 동결반응과 초음파 발성을 측정하였다. 동결반응의 분석 결과(그림 6A), 발달주기[$F(1,42) = 1.15, p>.05$]와 처치[$F(1,42) = 0.74, p>.05$]의 주효과와 발달주기×처치의 상호작용 효과[$F(1,42) = 0.11, p>.05$]는 유의하지 않았다. 초음파 발성의 분석 결과(그림 6B), 발달주기[$F(1,42) = 9.06, p<.01$]의 유의한 주효과가 관찰되었다. 처치[$F(1,42) = 0.18, p>.05$]의 주효과와 발달주기×처치의 상호작용 효과[$F(1,42) = 0.60, p>.05$]는 유의하지 않았다. 사후 검정 결과, 청소년기의 SI 집단이 성체기 SI 집단 보다 유의하게 낮은 초음파 발성을 보였다($p<.05$).

공포 조건화 소리자극 검사. 공포 조건화를 진행한 맥락과

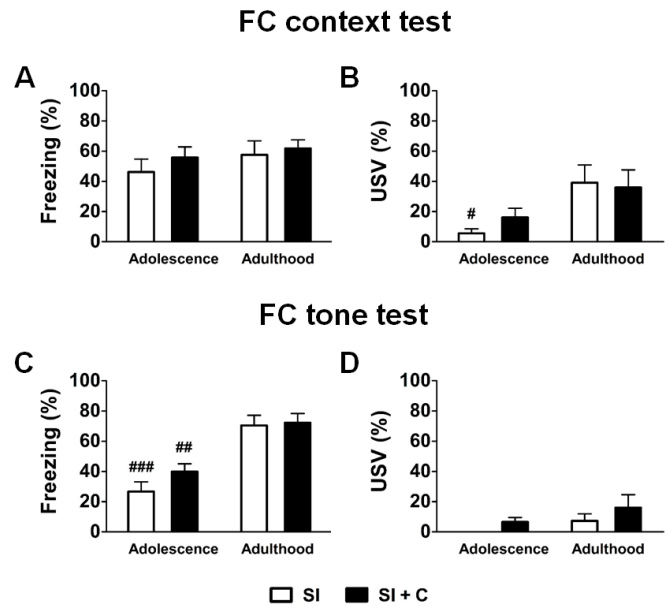


Figure 6. Freezing and ultrasonic vocalization (USV) during the retention tests of fear conditioning (FC). (A, B) Freezing and USV during FC context test. (C, D) Freezing and USV during FC tone test. (#) comparison to the adulthood group within the same treatment. (#) $p<.05$; (##) $p<.01$; (###) $p<.001$.

는 다른 맥락에서 소리자극을 두 번 제시하는 동안 동물의 동결반응과 초음파 발성을 측정하였다. 동결반응의 분석 결과(그림 6C), 발달주기[$F(1,42) = 1.35, p<.05$]의 유의한 주효과가 관찰되었다. 처치[$F(1,42) = 1.35, p>.05$]의 주효과와 발달주기×처치의 상호작용 효과[$F(1,42) = 0.80, p>.05$]는 유의하지 않았다. 사후 검정 결과, 청소년기의 SI, SI+C 집단이 각각 성체기의 SI, SI+C 집단보다 유의하게 낮은 동결반응을 보였다(SI, $p<.001$; SI+C, $p<.01$). 초음파 발성의 분석 결과(그림 6D), 발달주기[$F(1,42) = 2.64, p>.05$]와 처치[$F(1,42) = 2.16, p>.05$]의 주효과와 발달주기×처치의 상호작용 효과[$F(1,42) = 0.04, p>.05$]는 유의하지 않았다. 공포 조건화 기억 검사 결과를 종합적으로 정리하면 청소년기에 사회적 고립 혹은 사회적 고립과 추적 스트레스의 복합 스트레스를 받은 집단 모두 성체기에 비해 새로운 공포 조건화 학습의 결함을 보이는 반면 공포 조건화 동안 관찰되었던 성체기의 민감화된 반응은 다음날 공포 기억 검사에서는 드러나지 않았다.

논 의

본 연구는 사회적 고립이라는 단독 스트레스 혹은 사회적 고립과 추적 스트레스를 함께 받는 복합 스트레스를 청소년기와 성체기에 경험하였을 때 발생하는 장기적 효과를 탐색하

고 이러한 효과에 발달 주기에 따른 차이가 있는지 확인하였다. 이를 위하여 청소년기와 성체기의 쥐에게 사회적 고립 혹은 사회적 고립과 추적 스트레스로 구성된 복합 스트레스를 주고 3주 후에 행동 검사를 통해 추적 소리자극에 대한 장기 기억, 불안 관련 행동, 새로운 공포 학습 양상을 알아 보았다. 행동 검사를 통해 밝힌 사실은 다음과 같다.

첫째로, 청소년기에 경험한 추적 스트레스는 성체기까지 유지되는 장기기억을 형성하였다. 동일 맥락에서 진행된 추적 소리자극 검사 결과, 청소년기와 성체기의 SI+C 두 집단 모두 각각 SI 집단보다 유의하게 높은 동결반응을 보였다. 이전 연구에서 확인하였듯이 성체기의 추적 스트레스 경험은 장기 기억의 형성을 유발한다(Lee et al., 2018). 본 연구에서는 이러한 효과가 청소년기에도 적용된다는 것을 확인하였다. 공포 기억은 정서적으로 강력한 기억이기 때문에 장기간 지속될 수 있으며, 이러한 사실은 공포 조건화를 이용한 실험을 통해 증명되었다(Berardi et al., 2014; Maren, Aharonov, & Fanselow, 1997). 하지만 청소년기에 형성된 공포 기억이 성체기까지 지속된다는 것을 직접적으로 기억 검사를 통해 확인한 연구는 거의 없기 때문에(Toledo-Rodriguez & Sandi, 2007) 본 연구 결과를 통해 청소년기에 경험한 공포 사건이 성체기까지 지속되는 장기 기억을 형성할 수 있음을 확인하였다.

하지만 다른 맥락에서 진행된 추적 소리자극 검사 결과, 추적 소리자극이 제시되는 동안 청소년기의 SI+C 집단은 성체기 SI+C 집단에 비해 낮은 동결반응을 보였다. 맥락을 옮겨서 소리자극 검사를 한 이유는 맥락과는 분리되어 소리자극 자체에만 보이는 공포 반응을 알아보기 위해서였다. 즉, 청소년기 SI+C 집단은 맥락과는 분리된 추적 소리자극에 대한 공포 학습 능력의 결함을 보였다고 할 수 있다. 흥미롭게도, 시행 간 간격 동안에는 청소년기 SI+C 집단과 성체기 SI+C 집단이 비슷한 수준의 동결반응을 보였고 초음파 발성은 오히려 청소년기 SI+C 집단이 성체기 SI+C 집단보다 더 많이 보였다. 즉 맥락을 바꾸면 단순히 공포 반응이 사라지는 것이 아니라 공포 자극을 예고하는 단서에 대해서 적절히 반응하는 행동에만 결함이 생겼다는 것을 알 수 있다. 이러한 결과는 청소년기에 사회적 고립과 추적 스트레스를 복합적으로 받는 경우 로봇의 추적을 직접적으로 예고하는 단서에 대해서만 선택적인 공포 학습의 저하가 일어났다는 것을 의미하며 성체기에 경험하는 복합 스트레스는 이러한 학습 능력의 저하를 유발하지 않았다는 것을 나타낸다.

추적 소리자극에 대한 선택적 학습의 결함은 공포 자극을 예고하는 예측가(predictive value)가 높은 단서에 더 집중하

게 하는 자극 경쟁의 부족(a lack of stimulus competition)을 의미한다(Esmoris-Arranz, Méndez, & Spear, 2008). 자극 경쟁에는 해마(hippocampus)가 편도체(amygdala)에 보내는 신호를 통해(Winocur et al., 1987; Pattwell and Casey, 2013) 중요한 역할을 담당한다. 따라서 사회적 고립과 추적 스트레스의 복합 스트레스 모델이 유발한 자극 경쟁의 부족은 해마의 기능 장애(dysfunction) 때문일 수 있다. 또한 선행 연구들은 청소년기에 경험하는 사회적 고립이 맥락 공포 조건화(contextual fear conditioning), 방사성 미로(radial arm maze) 및 물체 위치 검사(spontaneous alteration task)에서의 공간 학습 능력과 같은 해마에 의존적인 학습(hippocampal-dependent learning) 능력을 저하시킨다는 사실을 밝혔다(Buwalda et al., 2011; D. Einon, 1980; D. F. Einon & Morgan, 1977; Green & McCormick, 2013b; McCormick, Nixon, et al., 2010; Weiss et al., 2004). 따라서 청소년기에 사회적 고립과 추적 스트레스를 복합적으로 받은 경우 추적 스트레스로 인한 장기적 공포기억이 형성되는데 이 때 사회적 고립이 예측가가 높은 자극에 대한 학습의 결함을 유발하여 불안 행동과 유사하게 공포 사건을 예고하는 특정 자극이 아닌 관계없는 자극에 공포 반응을 보이게 된다.

둘째로, 청소년기의 추적 스트레스 경험은 성체기에 불안 관련 행동의 증가를 유발하였다. 청소년기 SI+C 집단은 SI 집단에 비해 높은 십자미로 검사에서 개방된 팔에 더 적은 횟수로 나갔고 이는 높은 불안 수준을 의미한다. 반면 성체기의 SI+C 집단과 SI 집단은 차이가 없었다. 청소년기 SI 집단은 오히려 성체기 SI 집단보다 개방된 팔에 나가는 횟수가 많았던 것으로 보아 불안 관련 행동의 증가는 사회적 고립의 효과라기보다는 추적 스트레스의 효과로 보인다.

성체기의 추적 스트레스 경험이 장기적으로 불안 수준의 변화를 일으키지 않는다는 것은 이전 연구를 통해 밝혀졌다(Lee et al., 2018). 하지만 청소년기는 공포와 불안을 처리하는 뇌의 구조가 발달하고 있는 시기이기 때문에(Ganella & Kim, 2014) 동일한 스트레스에도 다르게 반응할 수 있다. 물론 청소년기에 경험하는 모든 스트레스 경험이 불안 행동을 증가시킨 것은 아니지만(Pohl, Olmstead, Wynne-Edwards, Harkness, & Menard, 2007; Toth, Avital, Leshem, Richter-Levin, & Braun, 2008) 많은 연구들은 청소년기 스트레스가 성체기의 불안 행동을 증가시킨다고 보고하고 있다(Avital & Richter-Levin, 2005; Brown & Spencer, 2013; Green, Barnes, & McCormick, 2013; McCormick, Mathews, et al., 2010; Vidal et al., 2007).

본 연구 결과, 추적 스트레스 역시 청소년기에 경험했을 때만 불안 관련 행동의 증가를 유발한다고 볼 수 있다. 청소년기의 스트레스 경험이 성체기의 불안 관련 행동을 증가시키는 것을 밝힌 대부분의 연구들이 성체기와 동일한 스트레스를 주고 직접 비교하기 보다는 청소년기만을 대상으로 실험하여 결과를 밝히는데 반해 본 연구는 성체기와 직접 비교함으로써 추적 스트레스가 발달주기에 따라 불안 관련 행동에 다르게 미치는 영향을 더 확실하게 밝혔다고 볼 수 있다.

셋째로, 추적 스트레스로 인해 유발되는 새로운 공포 자극에 대한 반응의 민감화는 성체기 집단에서만 관찰되고 청소년기 집단에서는 관찰되지 않았다. 즉, 로봇의 빠른 움직임과는 전혀 다른 종류의 공포 자극인 발바닥 전기쇼크를 이용하여 공포 조건화를 진행했을 때 성체기 SI+C 집단은 기존 연구 결과와 동일하게(Lee et al., 2018) 성체기 SI 집단에 비해 민감화된 공포 반응을 보였지만 청소년기 집단은 SI+C와 SI 집단 간의 차이가 없었다. 이는 앞서 관찰된 사회적 고립이 유발하는 학습 능력의 결함이 새로운 종류의 공포 학습에도 영향을 미쳐서 추적 스트레스의 민감화 효과를 상쇄시킨 것처럼 보인다. 이러한 해석은 공포 조건화 기억 검사 결과를 통해 뒷받침된다. 공포 조건화 기억 검사에서 청소년기 SI, SI+C 집단은 성체기 SI, SI+C 집단보다 낮은 공포 반응을 보임으로서 청소년기에 경험하는 사회적 고립이 성체기의 새로운 공포 학습에도 결함을 유발하였다는 사실을 나타낸다.

이러한 결과는 청소년기에 경험하는 사회적 고립과 추적 스트레스가 새로운 공포 학습에 미치는 효과가 상반된다는 것을 의미한다(공포 학습의 결함 vs. 민감화된 반응). 실제로 많은 연구에서 스트레스 종류와 이후에 진행되는 검사에 따라 그 영향이 달라진다는 것이 밝혀졌다(Avital & Richter-Levin, 2005; Green & McCormick, 2013b; McCormick, Mathews, et al., 2010; Tsoory, Cohen, & Richter-Levin, 2007). 또한 스트레스에 대한 반응에 중요한 역할을 하는 시상하부-뇌하수체-부신 축(Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis, HPA axis) 역시 스트레스의 종류에 따라서 반응하는 양상이 다르다(McCormick, Mathews, et al., 2010; Romeo, Patel, Pham, & So, 2016). 확실히 사회적 고립과 추적 스트레스는 여러 가지 면에서 속성이 다르다. 사회적 고립은 동물에게서 사회적인 자극을 박탈하는 스트레스를 주며 장기간(3주 가량) 지속되는 반면 추적 스트레스는 위협적인 자극을 가하는 스트레스이며 단기적(3일)으로 주어진다. 따라서 사회적 고립과 추적 스트레스의 어떠한 측면이 새로운 공포 학습에 상반된 효과를 유도했는지에 대해서는 추가

적인 연구가 필요하다.

이 연구의 한계점은 사회적 고립이라는 단일 스트레스와 사회적 고립과 추적 스트레스의 복합 스트레스를 받은 두 집단 간의 비교만 실행되었다는 점이다. 즉, 사회적 고립과 추적 스트레스 자체가 가지는 효과는 대조군의 비교를 통한 실험 결과로 증명된 것이 아니라 기존 연구 결과를 바탕으로 설명되었다. 따라서 사회적 고립과 추적 스트레스 자체가 가지는 발달 주기에 따른 효과는 대조군을 포함한 향후 실험을 통해 추가적으로 밝혀져야 한다.

종합적으로, 사회적 고립과 추적 스트레스를 복합적으로 주었을 때 나타나는 효과는 청소년기와 성체기 집단에서 다르게 나타났다. 먼저 청소년기의 복합 스트레스 경험은 예측가가 높은 단서에 대해 선택적인 공포 학습의 결함을 유발하였고 이는 불안 행동과 유사한 점이 있다. 또한 청소년기 복합 스트레스는 EPM 검사에서 불안 관련 행동을 증가시켰다. 따라서 청소년기에 사회적 고립과 추적 스트레스를 함께 받는 것은 불안 관련 행동의 증가라는 일종의 결합된 효과(combined effect)를 가지는 것처럼 보인다. 반면 성체기에 사회적 고립과 추적 스트레스를 복합적으로 받은 경우에는 청소년기 집단에서 관찰된 공포 학습의 결함을 보이지 않았으며 불안 관련 행동에도 변화가 없었다. 또한 새로운 공포 학습에서는 추적 스트레스가 유발하는 민감화된 반응이 청소년기보다 더 두드러졌다. 즉, 성체기의 사회적 고립과 추적 스트레스의 복합 스트레스 경험은 불안 행동을 유발하는 결합된 효과를 보이지 않았다. 따라서 본 연구는 사회적 고립과 추적 스트레스를 이용한 청소년기 복합 스트레스 모델이 불안 장애에 대한 취약성을 가지는 청소년기의 특징을 잘 반영한 동물 모델임을 제안하며 향후 불안 장애에 관련된 뇌 메커니즘과 치료 개발에 본 모델이 유용하게 사용될 수 있다는 점을 시사한다.

References

- Andersen, S. L., Thompson, A. T., Rutstein, M., Hostetter, J. C., & Teicher, M. H. (2000). Dopamine receptor pruning in prefrontal cortex during the periadolescent period in rats. *Synapse*, 37(2), 167-169.
- Avital, A., & Richter-Levin, G. (2005). Exposure to juvenile stress exacerbates the behavioural consequences of exposure to stress in the adult rat. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 8(2), 163-173.
- Berardi, A., Trezza, V., Palmery, M., Trabace, L., Cuomo, V.,

- & Campolongo, P. (2014). An updated animal model capturing both the cognitive and emotional features of post-traumatic stress disorder (PTSD). *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8, 142.
- Bledsoe, A. C., Oliver, K. M., Scholl, J. L., & Forster, G. L. (2011). Anxiety states induced by post-weaning social isolation are mediated by CRF receptors in the dorsal raphe nucleus. *Brain Research Bulletin*, 85(3-4), 117-122.
- Brown, G. R., & Spencer, K. A. (2013). Steroid hormones, stress and the adolescent brain: a comparative perspective. *Neuroscience*, 249, 115-128.
- Burke, A. R., McCormick, C. M., Pellis, S. M., & Lukkes, J. L. (2017). Impact of adolescent social experiences on behavior and neural circuits implicated in mental illnesses. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 76, 280-300.
- Buwalda, B., Geerdink, M., Vidal, J., & Koolhaas, J. M. (2011). Social behavior and social stress in adolescence: a focus on animal models. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 35(8), 1713-1721.
- Chareyron, L. J., Lavenex, P. B., & Lavenex, P. (2012). Postnatal development of the amygdala: a stereological study in rats. *Journal of Comparative Neurology*, 520(16), 3745-3763.
- Dorn, L. D., Dahl, R. E., Woodward, H. R., & Biro, F. (2006). Defining the boundaries of early adolescence: A user's guide to assessing pubertal status and pubertal timing in research with adolescents. *Applied Developmental Science*, 10(1), 30-56.
- Einon, D. (1980). Spatial memory and response strategies in rats: age, sex and rearing differences in performance. *The Quarterly Journal of Experimental Psychology*, 32(3), 473-489.
- Einon, D. F., & Morgan, M. (1977). A critical period for social isolation in the rat. *Developmental Psychobiology: The Journal of the International Society for Developmental Psychobiology*, 10(2), 123-132.
- Esmoris-Arranz, F. J., Méndez, C., & Spear, N. E. (2008). Contextual fear conditioning differs for infant, adolescent, and adult rats. *Behavioural Processes*, 78(3), 340-350.
- Ganella, D. E., & Kim, J. H. (2014). Developmental rodent models of fear and anxiety: from neurobiology to pharmacology. *British Journal of Pharmacology*, 171(20), 4556-4574.
- Green, M. R., & McCormick, C. M. (2013a). Effects of social instability stress in adolescence on long-term, not short-term, spatial memory performance. *Behavioural Brain Research*, 256, 165-171.
- Green, M. R., Barnes, B., & McCormick, C. M. (2013b). Social instability stress in adolescence increases anxiety and reduces social interactions in adulthood in male Long-Evans rats. *Developmental Psychobiology*, 55(8), 849-859.
- Green, M. R., & McCormick, C. M. (2013). Effects of stressors in adolescence on learning and memory in rodent models. *Hormones and Behavior*, 64(2), 364-379.
- Hall-Lande, J. A., Eisenberg, M. E., Christenson, S. L., & Neumark-Sztainer, D. (2007). Social isolation, psychological health, and protective factors in adolescence. *Adolescence*, 42(166), 265-287.
- Harris, J. R. (1995). Where is the child's environment? A group socialization theory of development. *Psychological Review*, 102(3), 458.
- Hodges, T. E., & McCormick, C. M. (2015). Adolescent and adult male rats habituate to repeated isolation, but only adolescents sensitize to partner unfamiliarity. *Hormones and Behavior*, 69, 16-30.
- Isgor, C., Kabbaj, M., Akil, H., & Watson, S. J. (2004). Delayed effects of chronic variable stress during peripubertal juvenile period on hippocampal morphology and on cognitive and stress axis functions in rats. *Hippocampus*, 14(5), 636-648.
- Kessler, R. C., Berglund, P., Demler, O., Jin, R., Merikangas, K. R., & Walters, E. E. (2005). Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Archives of General Psychiatry*, 62(6), 593-602.
- Laviola, G., Macrì, S., Morley-Fletcher, S., & Adriani, W. (2003). Risk-taking behavior in adolescent mice: psychobiological determinants and early epigenetic influence. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 27(1-2), 19-31.
- Lee, F. S., Heimer, H., Giedd, J. N., Lein, E. S., Šestan, N., Weinberger, D. R., & Casey, B. (2014). Adolescent mental health-opportunity and obligation. *Science*, 346(6209), 547-549.
- Lee, J.-H., Kimm, S., Han, J.-S., & Choi, J.-S. (2018). Chasing as a model of psychogenic stress: characterization of physiological and behavioral responses. *Stress*, 21(4), 323-332.
- Lukkes, J. L., Mokin, M. V., Scholl, J. L., & Forster, G. L.

- (2009). Adult rats exposed to early-life social isolation exhibit increased anxiety and conditioned fear behavior, and altered hormonal stress responses. *Hormones and Behavior*, 55(1), 248-256.
- Maren, S., Aharonov, G., & Fanselow, M. S. (1997). Neurotoxic lesions of the dorsal hippocampus and Pavlovian fear conditioning in rats. *Behavioural Brain Research*, 88(2), 261-274.
- McCormick, C. M., & Mathews, I. Z. (2007). HPA function in adolescence: role of sex hormones in its regulation and the enduring consequences of exposure to stressors. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 86(2), 220-233.
- McCormick, C. M., Mathews, I. Z., Thomas, C., & Waters, P. (2010). Investigations of HPA function and the enduring consequences of stressors in adolescence in animal models. *Brain and Cognition*, 72(1), 73-85.
- McCormick, C. M., Nixon, F., Thomas, C., Lowie, B., & Dyck, J. (2010). Hippocampal cell proliferation and spatial memory performance after social instability stress in adolescence in female rats. *Behavioural Brain Research*, 208(1), 23-29.
- Paus, T. (2005). Mapping brain maturation and cognitive development during adolescence. *Trends in Cognitive Sciences*, 9(2), 60-68.
- Pellis, S. M., & Pellis, V. C. (2007). Rough-and-tumble play and the development of the social brain. *Current Directions in Psychological Science*, 16(2), 95-98.
- Pohl, J., Olmstead, M. C., Wynne-Edwards, K. E., Harkness, K., & Menard, J. L. (2007). Repeated exposure to stress across the childhood-adolescent period alters rats' anxiety-and depression-like behaviors in adulthood: The importance of stressor type and gender. *Behavioral Neuroscience*, 121(3), 462.
- Primus, R. J., & Kellogg, C. K. (1989). Pubertal related changes influence the development of environment related social interaction in the male rat. *Developmental Psychobiology: The Journal of the International Society for Developmental Psychobiology*, 22(6), 633-643.
- Romeo, R. D., Patel, R., Pham, L., & So, V. M. (2016). Adolescence and the ontogeny of the hormonal stress response in male and female rats and mice. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 70, 206-216.
- Rubin, K. H., & Mills, R. S. (1988). The many faces of social isolation in childhood. *Journal of Consulting and Clinical Psychology*, 56(6), 916.
- Spear, L. P. (2000). The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 24(4), 417-463.
- Spear, L. P. (2009). Heightened stress responsivity and emotional reactivity during pubertal maturation: Implications for psychopathology. *Development and Psychopathology*, 21(1), 87-97.
- Steinberg, L. (2005). Cognitive and affective development in adolescence. *Trends in Cognitive Sciences*, 9(2), 69-74.
- Steinberg, L. (2008). A social neuroscience perspective on adolescent risk-taking. *Developmental Review*, 28(1), 78-106.
- Toledo-Rodriguez, M., & Sandi, C. (2007). Stress before puberty exerts a sex-and age-related impact on auditory and contextual fear conditioning in the rat. *Neural Plasticity*, 2007.
- Toth, E., Avital, A., Leshem, M., Richter-Levin, G., & Braun, K. (2008). Neonatal and juvenile stress induces changes in adult social behavior without affecting cognitive function. *Behavioural Brain Research*, 190(1), 135-139.
- Trimpop, R. M., Kerr, J. H., & Kirkcaldy, B. (1998). Comparing personality constructs of risk-taking behavior. *Personality and Individual Differences*, 26(2), 237-254.
- Tsoory, M., Cohen, H., & Richter-Levin, G. (2007). Juvenile stress induces a predisposition to either anxiety or depressive-like symptoms following stress in adulthood. *European Neuropsychopharmacology*, 17(4), 245-256.
- Van den Berg, C. L., Hol, T., Van Ree, J. M., Spruijt, B. M., Everts, H., & Koolhaas, J. M. (1999). Play is indispensable for an adequate development of coping with social challenges in the rat. *Developmental Psychobiology: The Journal of the International Society for Developmental Psychobiology*, 34(2), 129-138.
- Vanderschuren, L. J., Achterberg, E. M., & Trezza, V. (2016). The neurobiology of social play and its rewarding value in rats. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 70, 86-105.
- Vidal, J., de Bie, J., Granneman, R. A., Wallinga, A. E., Koolhaas, J. M., & Buwalda, B. (2007). Social stress during adolescence in Wistar rats induces social anxiety in adulthood without affecting brain monoaminergic content and activity. *Physiology & Behavior*, 92(5), 824-830.
- Weintraub, A., Singaravelu, J., & Bhatnagar, S. (2010). Enduring and sex-specific effects of adolescent social isolation in rats on adult stress reactivity. *Brain Research*, 1343, 83-92.
- Weiss, I. C., Pryce, C. R., Jongen-Rêlo, A. L., Nanz-Bahr, N.

- I., & Feldon, J. (2004). Effect of social isolation on stress-related behavioural and neuroendocrine state in the rat. *Behavioural Brain Research*, 152(2), 279-295.
- Zurita, A., Martijena, I., Cuadra, G., Brandao, M. L., & Molina, V. (2000). Early exposure to chronic variable stress facilitates the occurrence of anhedonia and enhanced emotional reactions to novel stressors: reversal by naltrexone pretreatment. *Behavioral Brain Research*, 117(1-2), 163-171.

사회적 고립과 추적 스트레스를 이용한 복합 스트레스가 청소년기와 성체기 쥐에게 미치는 장기적 효과

이지혜¹, 최준식¹

¹고려대학교 심리학과

본 연구는 사회적 고립과 추적 스트레스를 이용한 복합 스트레스 모델이 청소년기와 성체기 쥐에게 미치는 장기적 효과를 알아보려 하였다. 이를 위해 청소년기(생후 5주)와 성체기(생후 8주)의 쥐들은 추적 스트레스 3일 전부터 사회적 고립 처치를 받았으며 각 발달주기 집단은 사회적 고립(social isolation, SI)집단 혹은 사회적 고립과 추적 스트레스(social isolation + chasing stress, SI+C) 집단으로 나뉘었다. 추적 스트레스는 본 연구실에서 새롭게 개발된 스트레스 모델로서, 탈출할 수 없는 원형 트랙에서 빠르게 접근해오는 로봇에게 쫓기는 경험이다. 하루에 20시행씩 총 3일간 SI 집단은 소리자극의 제시를 받았으며 SI+C 집단은 소리자극의 제시와 추적 스트레스를 함께 받았다. 그리고 추적 스트레스 경험으로부터 3주 후에 행동 검사가 실시되었다. 행동 검사는 추적 스트레스 당시 제시되었던 소리자극에 관한 기억 검사와 불안 관련 행동을 측정하는 높은 십자미로 검사가 진행되었다. 또한 새롭게 경험하는 공포 학습의 양상을 보기 위해 전기 쇼크를 이용한 공포 조건화가 진행되었다. 실험 결과, 추적 스트레스 당시 제시되었던 소리자극에 대한 기억 검사에서 청소년기 SI+C 집단은 성체기 SI+C 집단보다 추적 소리자극 자체에 대해서는 낮은 동결반응을 보였지만 추적 소리자극이 제시되지 않는 시행 간 간격 동안에는 성체기 SI+C 집단과 비슷한 수준의 동결반응을 보였다. 높은 십자미로 검사에서는 청소년기 SI+C 집단이 SI 집단보다 높은 불안 수준을 보였지만 성체기는 두 집단 간 차이가 없었다. 또한 공포 조건화에서 성체기 SI+C 집단은 민감화된 공포 반응을 보이는데 반해 청소년기 SI+C 집단은 공포 학습의 결함을 보였다. 이러한 결과는 청소년기에 사회적 고립과 추적 스트레스를 이용한 복합 스트레스를 받을 경우 불안 수준의 증가 뿐 아니라 공포 자극에 대한 적절한 반응을 학습하는 것에 결함이 생긴다는 것을 의미한다. 반면 이러한 복합 스트레스의 효과는 성체기 집단에서는 관찰되지 않았다. 따라서 본 연구는 사회적 고립과 추적 스트레스를 이용한 청소년기 복합 스트레스 모델이 청소년기의 불안 장애에 대한 취약성을 반영하는 동물 모델임을 제안하며 본 모델이 청소년기 불안 장애의 뇌 기전을 밝히는 향후 연구에 활용 가능성이 크다는 점을 시사한다.

주제어: 청소년기, 사회적 고립, 추적 스트레스, 복합 스트레스, 불안, 공포학습, 쥐