

흰쥐에서 저주파소음에 의한 스트레스 반응

Low Frequency Noise Induces Stress Responses in the Rat

최웅기* · 이규섭* · 정혜영* · 이영창** · 손진훈** · 이배환*** · 변광호* · 심인섭*†

Woong-Ki Choi* · Kyusop Lee* · Hye-Young Joung* · Young-Chang Lee**

Jin-Hun Sohn** · Bae-Hwan Lee*** · Kwang-Ho Pyun* · Insop Shim*†

가톨릭대학교 의과대학 통합의학교실*

Dept. of Integrative Medicine, College of Medicine, Catholic University of Korea

충남대학교 심리학과**

Dept. of Psychology, Institute for Brain Research, Chungnam National University

연세대학교 의과대학 생리학교실***

Dept. of Physiology, College of Medicine, Yonsei University

Abstract : Exposure to low frequency noise(LFN) can lead to vibroacoustic diseases(VADs), which include a systemic disease with lesions in a broad spectrum of organs and a psychiatric condition. It is known that VAD is an established risk factor for the development of many psychological conditions in humans and rodents, including major depression and anxiety disorder. The present study investigated the effects of LFN on neuronal stress responses in the rat brain. The neuronal expression of the proto-oncogene c-fos in the paraventricular nucleus(PVN) of the hypothalamus and tyrosine hydroxylase(TH) in the LC was observed. The immunocytochemical detection of the Fos protein and TH has been used as a marker of neuronal activation in response to stress. In addition, corticosterone concentration was evaluated by using an enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). The LFN groups were exposed to 32.5Hz and 125Hz of noise(4hr/day for 2days). The numbers of c-fos and TH-immunoreactive cells in the PVN and LC were significantly increased in the LFN groups(32.5Hz and 125Hz) compared to the normal group. Corticosterone concentration in plasma was also increased in LFN groups. The present results demonstrated that exposure with LFN produced a pronounced increase in expression of c-Fos and TH in stress-relevant brain areas. These results suggest that the neural characteristics involved in LFN are similar to those activated by typical processive stressors. These results also suggest that the central and peripheral activations by LFN may be

† 교신저자 : 심인섭(가톨릭대학교 의과대학 통합의학교실)

E-mail : ishim@catholic.ac.kr

TEL : 02-590-2972

FAX : 02-590-6359

related to LFN-related negative behavioral dysfunctions such as VADs.

Key words : Low frequency noise, stress, vibroacoustic disease, corticosterone, c-fos

요약 : 저주파소음(low frequency noise; LFN)은 인체의 다양한 기관과 정신적 상태에 영향을 미치며, 진동음향질환(vibroacoustic disease; VAD)같은 질병들을 야기 시킨다. 이전의 연구에서는 인간 또는 설치류에서 VAD는 우울증 또는 불안장애와 같은 만성적인 정신 건강에 위협을 미친다고 보고되고 있다. 본 연구에서는 LFN이 스트레스의 신경생리적 반응에 미치는 영향을 규명하고자 하였다. 이를 위하여, LFN에 노출된 흰쥐에서 스트레스 반응에 중요한 역할을 하는 paraventricular nucleus of the hypothalamus(PVN)에서 초기발현유전자인 c-fos 양성세포 발현, locus coeruleus(LC)에서 NE 생성 효소인 tyrosine hydroxylase(TH) 양성세포 발현과 스트레스 호르몬의 농도를 측정하였다. LFN 집단은 각각 32.5Hz 와 125Hz를 하루에 4시간씩 이틀 동안 소음에 노출 하였으며, 정상집단은 소음에 노출되지 않도록 하였다. 저주파소음에 노출 후 집단 간 혈액내 코르티코스테론 분석과, 면역조직염색법을 이용하여 스트레스에 반응하는 PVN에서 c-fos발현과, LC에서 TH를 분석한 결과, PVN에서는 c-fos의 발현과 LC에서 TH의 발현이 증가됨을 관찰할 수 있었으며, 그리고 혈중 코르티코스테론의 농도 또한 LFN 집단에서 높게 발현됨을 확인 하였다. 그리고 32.5Hz 보다 125Hz의 소음에서 면역염색반응과 코르티코스테론의 결과가 다소 높게 나타남을 알 수 있었다. 이러한 결과는 저주파소음에 의해 스트레스와 연관된 뇌의 부위에서 c-Fos와 TH의 발현이 증가됨을 증명하고 있다. 따라서 저주파소음은 일반적인 스트레스에 의한 반응과 비슷한 신경적 특징들을 보여주고 있다. 그리고 저주파소음에 의한 중추, 말초신경계의 활성화는 아마도 진동음향질환과 같은 행동장애 질병과 관련이 있을 것임을 시사한다.

주제어 : 저주파소음, 스트레스, 진동음향질환, 코르티코스테론, c-fos

1. 서론

인간의 가청 주파수 범위는 20Hz에서 20kHz라고 한다. 이러한 가청범위를 넘는 20kHz 이상의 음을 초음파(ultrasound)라고 하며 20Hz 이하의 음을 초저주파음(infrasound)이라고 한다[8]. 저주파소음은 대략 10Hz에서 200Hz의 범위의 주파수를 말하며, 민감한 사람들에게는 특별한 환경적 소음 문제로 나타나고 있다[10]. 일반적인 소음과는 달리 시끄러움을 느낄 수는 없지만 인체에 압박감을 주기도 하고 문이나 창을 진동시켜 2차적인 소음을 발생시키고 있기 때문에 문제가 되고 있다. 발생원인은 주로 시가지에 있는 공장의 기계장치이며 특히 압축기, 송풍기, 펌프, 진동체, 세정장치 등이 그 대상으로 되고 있다. 기계가 아니더라도 고속도로의 다리를 자동차가 주행할 때, 터널에 열차가 돌입할 때, 항공기 엔진의 테스트시,

또는 댐의 방류 시에도 발생한다. 이러한 저주파에 의한 부작용은 진동음향질환(vibroacoustic disease; VAD)이라는 질병을 야기하며, 이는 저주파 소음에 노출된 직업을 가진 항공기술자, 비행기 조종사, 승무원 그리고 디제이와 같은 여러 직업에서 호흡기 질환, 위장 장애, 심혈관 장애, 공격성 증가, 우울증 등 스트레스와 관련된 다양한 병리적 양상으로 나타나고 있다[2,5].

스트레스에 반응하는 인체는 신체적, 정신적으로 다양한 반응을 나타낸다[17]. 대표적으로 스트레스에 의한 생리학적인 반응은 시상하부-뇌하수체-부신피질 축(hypothalamus-pituitary-adrenal gland; HPA axis)에 의해 조절된다. HPA축은 스트레스 반응시 항상성을 위해 신경, 내분비, 면역작용을 조절하는 기능을 하고 있다. 이 과정에서 시상하부는 부신 피질 자극 호르몬 방출 인자(corticotropin releasing

factor; CRF)를 분비하여 뇌하수체 전엽을 자극하여 부신 피질 자극 호르몬(adrenocorticotrophic hormone; ACTH)을 방출하고 방출된 ACTH는 부신피질에 분비되어 코르티코스테론을 방출하게 하며, 코르티코스테론은 몸의 기관과, 면역계, 중추신경계 등에 영향을 주어 내장기관손상, 면역기능 약화, 기억력 감소 등의 문제를 일으키게 한다[9,11,13]. 특히 실방핵(paraventricular nucleus; PVN)은 스트레스에 반응하는 부위로서, 코르티코스테론 자극 호르몬을 분비하는 뉴런이 집중되어 있어 스트레스 반응 연구에 객관적인 지표가 되고 있다 [1]. 그리고 청반(locus coeruleus; LC)은 스트레스에 의한 산화질소가스(Nitric oxide; NO)가 증가되고 이것으로 인하여 LC에 노르에피네프린(Norepinephrine; NE)을 증가시켜 주게 되어 스트레스에 의한 생리학적 변화가 일어나게 된다[18].

소음에 의한 인체의 다양한 스트레스 반응은 그동안 많이 보고되어 왔다. 특히 소음에 의한 스트레스 결과 우울[16], 불안, 심장질환[14], 면역약화[21] 등 다양한 질병을 일으킨다고 한다. 특히 스트레스에 의한 우울, 불안과 같은 정신적 질환은 현대 사회에서 다양한 소음에 영향을 받으며 살아가는 현대인들의 정신건강과 밀접한 관련이 있음을 시사한다. 따라서 본 연구는 저주파소음이 미치는 스트레스 반응에 대한 지표를 객관화하고자, 저주파 소음 범위 내에서 32.5Hz와 125Hz의 저주파소음에 노출 시 각각의 저주파 범위 내에서 진동에 의한 스트레스의 차이와 저주파에 의해 미치는 신경생리적 영향과 호르몬적 영향을 규명하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 동물

웅성 백서(Wister rat, 270~300g)는 각 집단 실험에 8마리씩 사용하였다. 모든 동물들은 표준 실험실 상황($22 \pm 2^\circ\text{C}$)에 유지시켰으며, 12시간씩 밝음과 어둠

을 순환시켰다. 사료와 물은 자유롭게 제공되었다.

2.2 저주파소음 노출

백서는 방음 처리된 방에 설치된 저주파소음장치를 통해 각각 32.5Hz, 125Hz로 하루에 4시간씩 이를 동안 저주파소음에 노출 되도록 하였다.

2.3 코르티코스테론 농도 측정

코르티코스테론 농도는 혈장에서 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay; Assay designs Inc., Ann Arbor, Michigan, USA) kit를 이용하여 측정하였다. 저주파소음에 이를 동안 노출한 직후 심장에서 혈액을 채취하였으며, 이것을 $1000 \times g$ 에서 30분 동안 원심분리를 하여 혈장을 분리하였다. 얻어진 혈장은 well에 각각 100 μ 씩 옮겨 담고 항체 50 μ 를 넣어준 후 2시간 동안 반응 시켰다. 그 후 corticosterone conjugate 5 μ 와 p-nitrophenyl phosphate-substrate 200 μ 를 넣고 1시간 동안 반응 시켜준 다음, 마지막으로 stop solution 50 μ 를 넣고 405nm로 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

2.4 관류고정

저주파소음에 노출 시킨 후 곧바로 phentobarbital sodium(80mg/kg)을 복강 주사하여 마취를 하였다. 그리고 좌심실에 18게이지 바늘을 이용하여 생리식염수를 20ml/min로 관류하여 혈액을 모두 제거한 후 4% 파라포름알데하이드로 관류고정 시켰다.

2.5 면역조직염색

관류시킨 모델은 뇌를 적출 하여 4% 파라포름알데하이드에 overnight incubation 후 뇌를 20% 자당(sucrose)에 4°C 로 가라앉힌 동안 포매 시켜주었다. 가라앉은 뇌는 냉동조직절편기(cryo-microtome)를

이용하여 30um 두께로 절편 하였다.

절편된 조직은 PVN과 LC 부위에서 각각 c-fos와 TH 면역조직 염색을 시행하였다. c-fos와 TH의 일차 항체 IgG로 각각 1차 처리, 이차항체(anti-rabbit IgG, anti-mouse IgG)로 2차 처리 후 avidin biotin complex로 배양 한 다음 DAB(3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride dihydrate, 97%)을 이용하여 발색 후 세포의 발현을 현미경으로 확인하였다.

2.6 분석

결과는 one-way ANOVA를 이용하여 분석하였고, Tukey 검증을 이용하여 post-hoc 비교하였다.

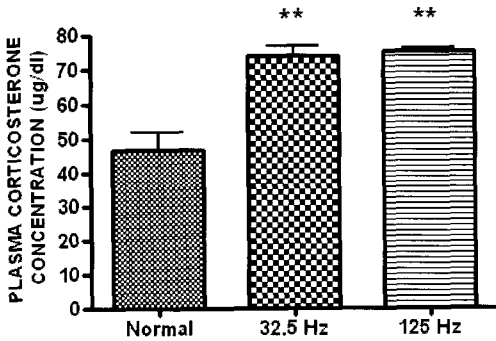


Figure 1. Plasma corticosterone concentrations in cardiac blood collected before perfusion are compared with the normal group and low frequency noise groups(32.5 and 125Hz) (one-way ANOVA, $F(2,8)=21.201$, $p<0.01$). The values are presented as mean S.E.M. **: $P<0.01$ as compared with the corresponding data of the normal group.

3. 실험 결과

3.1 혈액내 코르티코스테론 농도

저주파소음에 노출 시킨 두 집단(32.5Hz, 125Hz)과 정상 집단 간의 스트레스 호르몬인 코르티코스테론 농도를 혈액에서 채취해 검정하였다. 그 결과 정상집단 보다 저주파소음에 노출된 두 집단이 코르티코스

테론 농도가 유의하게 증가됨이 관찰되었다($F(2,8)=21.201$, $p<0.01$). 정상 집단의 경우 46.6 ± 5.3 ug/dl 의 농도로 나타났으며, 저주파소음 노출 집단인 32.5Hz는 73.2 ± 2.8 ug/dl($P<0.01$) 그리고 125Hz는 75.2 ± 0.6 ug/dl($P<0.01$)의 농도를 나타냈다(Figure 1).

3.2 면역조직염색

3.2.1 PVN에서의 c-fos 발현

저주파소음 노출 두 집단(32.5Hz, 125Hz)과 정상집단의 뇌 내 PVN에서 c-fos의 발현 정도를 면역조직염색법을 이용하여 관찰하였다(Figure 2). 사진에서 정상집단 (A)보다 저주파소음노출 집단 32.5Hz (B), 125Hz (C)에서 c-fos 발현 정도가 높게 나타남을 확인할 수 있었다($F(2,28)=19.510$, $p<0.001$). 그리고 발현된 세포를 집계해본 결과 정상집단의 경우 72.9 ± 10.5 개 그리고 저주파노출 집단의 경우 32.5Hz, 125Hz 각각 100.2 ± 7.1 ($P<0.01$), 157.4 ± 10.6 ($p<0.05$) 개로 저주파노출 집단이 c-fos의 발현이 유의하게 증가됨이 관찰되었다(Figure 2).

3.2.2 LC에서의 TH 발현

LC에서 TH의 발현을 정상집단과 저주파소음에 노출된 두 집단(32.5Hz, 125Hz) 간의 발현을 비교한 결과, 정상집단 보다 저주파소음에 노출된 집단에서 TH 세포의 발현이 증가됨을 면역조직염색을 통해 알 수 있었다($F(2,32)=4.030$, $p<0.05$). 그리고 LC 부위에서 TH 발현 세포의 발현을 집계해 본 결과 정상집단과 저주파소음노출집단간의 발현차이는 정상집단은 7.9 ± 0.7 , 32.5Hz는 10.7 ± 1.4 ($p<0.05$) 그리고 125Hz 12.9 ± 0.8 ($P<0.05$) 개가 나타났다(Figure 3).

이 결과 LC에서의 TH의 발현은 저주파노출 집단이 정상집단보다 세포 발현이 유의하게 증가됨을 관찰할 수 있었다.

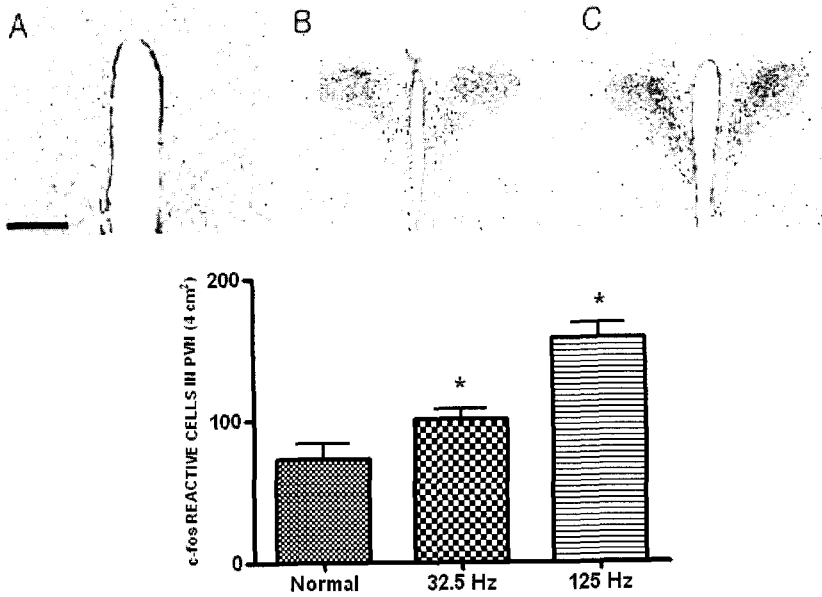


Figure 2. Representative photographs are showing c-fos immunoreactive cells in the Paraventricular nucleus(PVN) of the normal (A), 3,25Hz (B) and 125Hz (C) groups. Scale bar in A, B and C ; 200 μ m. Lower : The number of c-fos cells in the PVN region. The results were analyzed by one-way ANOVA of cells among the groups followed by the Turkey test(one-way ANOVA, $F(2,28)=19.51$, $p<0.001$). Each value represents the mean \pm S.E.M. * <0.05 compared with the normal group.

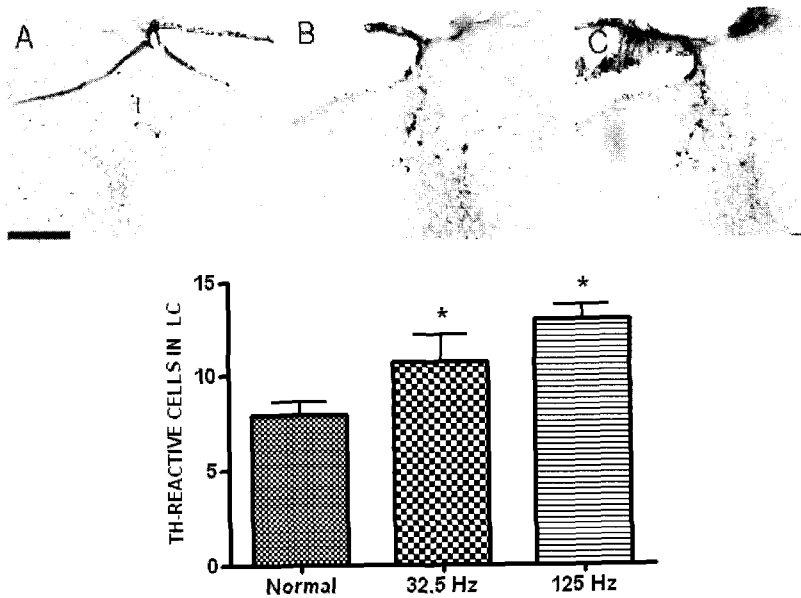


Figure 3. Representative photographs are showing TH(tyrosine hydroxylase) immunoreactive cells in the locus coeruleus (LC) of the normal (A), 3,25Hz (B) and 125Hz (C) groups. Scale bar in A, B and C ; 200 μ m. Lower : The number of TH cells in the LC region. The results were analyzed by one-way ANOVA of cells among the groups followed by the Turkey test(one-way ANOVA, $F(2,32)=4.030$, $p<0.05$). Each value represents the mean \pm S.E.M. * <0.05 compared with the normal group.

4. 논의

환경공해의 하나인 소음공해는 현대사회에서 커다란 문제로 대두되고 있다. 소음으로 인한 정신적, 육체적 고통은 현대인의 스트레스에 커다란 영향을 미치고 있다. 특히 귀로는 잘 들리지는 않지만 진동에 의한 저주파소음은 귀에 들리는 소음 못지않게 커다란 문제를 일으키고 있다. 이러한 저주파소음은 공장지대, 도로, 댐, 항공기 등에서 발생하며 저주파진동과 그로 인한 2차적 소음에 의한 피해는 늘어 가고 있다.

저주파소음은 인체에 정신적 육체적으로 영향을 미친다[3]. 이 결과 우울, 불안, 면역저하, 심장질환, 호흡질환 등과 같은 진동 음향 질환과 같은 질병을 야기 시키고, 그로 인하여 현대 사회에서는 저주파소음에 대한 관심이 증가 되고 있다. 본 연구는 저주파 발생장치를 이용하여 저주파소음에 노출된 동물 모델을 만들고 그에 따른 스트레스 반응에 대한 생리학적 변화를 확인하고자 본 실험을 수행하였다.

먼저, 저주파발생장치를 이용하여 32.5Hz, 125Hz의 저주파를 하루에 4시간씩 이틀 동안 노출 시킨 두 집단을 만들었으며, 스트레스 호르몬인 코르티코스테론 농도를 통하여 스트레스 반응을 살펴보았다. 코르티코스테론은 스트레스에 반응하는 호르몬으로서 부신피질에서 분비되며 스트레스반응에 대한 객관적인 척도로 많이 이용된다. 이전의 연구에서는 스트레스 발생 시 혈장 내에서 증가됨이 보고되어 왔다[15]. 심장에서 혈액을 채취 후 ELISA kit를 사용하여 혈액 내 코르티코스테론 농도를 측정할 결과 정상집단보다 저주파소음에 노출된 두 집단의 혈액 내 코르티코스테론 농도가 유의하게 증가됨이 확인 되었으며, 그로 인하여 저주파소음이 스트레스에 영향을 주는 것을 확인할 수 있었다.

PVN은 스트레스에 반응하는 주요한 부위이며, 스트레스에 반응하여 부신 피질 자극 호르몬 방출 호르몬(corticotropin-releasing hormone; CRH), vasopressin 그리고 갑상선 자극 호르몬 방출 호르몬(thyrotropin-releasing hormone; TRH) 과 같은 스트레스와 관련된

물질이 분비됨이 보고되어 왔다[4]. c-fos는 초기발현 유전자로서 뇌신경세포의 활성지표로 사용된다[19]. 면역조직염색 실험결과 스트레스와 관련된 호르몬 분비 부위인 PVN에서 c-fos 발현을 측정한 결과 정상 집단보다 저주파소음에 노출된 두 집단(32.5Hz, 125Hz)의 발현이 현저하게 증가됨을 확인할 수 있었다. 즉, 저주파소음에 의하여 스트레스에 반응하는 PVN에서 c-fos의 발현이 증가됨을 보아 저주파소음에 의하여 스트레스에 반응하는 PVN이 활성화됨을 알 수 있었다.

LC는 뇌간에 위치하고 스트레스에 행동학적, 생리학적으로 반응하는 세포핵으로서 감정적 질환과 관련이 있다고 한다[12]. 스트레스 노출 시 뇌내 주요 스트레스의 호르몬이라 알려진 노르에피네프린(NE)을 LC에서 합성하여 PVN으로 방출하는데, TH는 NE 신경세포의 활성 지표로 이용되면 스트레스 유발시 증가된다고 보고되어 왔다[7]. 본 연구에서는 저주파소음에 노출된 두 집단(32.5Hz, 125Hz)과 정상집단의 LC에서 TH 면역반응 정도를 확인하였다. 그 결과 TH 세포의 발현은 정상집단 보다 저주파소음에 노출된 두 집단에서 높은 증가를 확인할 수 있었다. 따라서 저주파소음에 노출되면 스트레스관련 신경세포들을 활성화시켜 스트레스 반응을 유발시킴을 확인하였다.

일반적으로 소음은 스트레스를 유발 한다고 알려져 있다. 그러나 저주파소음의 경우 가청 주파 범위는 아니지만 진동으로 인한 스트레스유발 인자로서 인체의 건강에 중요한 영향을 미치고 있음을 알 수 있었다. 본 연구에서 진행된 저주파소음 노출 집단에서는 이전의 스트레스와 관련된 연구에서 보고되었던 다양한 생리학적 징후를 확인 할 수 있었다.

따라서, 본 연구에서는 저주파소음으로 인한 스트레스 발생을 확인할 수 있었으며, 일상생활에 발생하는 저주파소음에 의한 진동음향 질병이 스트레스에 의해 발생될 수 있음을 시사한다.

감사의 글

본 연구는 한국과학기술부(2004-01757)와 한국학술진흥재단(KRF-2006-311-E00631)으로부터 지원을 받았습니다.

참고문헌

[1] Benarroch, E. E. (2005). Paraventricular nucleus, stress response, and cardiovascular disease. *Clin auton reserch*, 15(4), 247-8.

[2] Branco, N. A. (2004). Vibroacoustic disease. *Noise Health*, 6(23), 3-20.

[3] Branco, N. A., Ferreiram JR. & Alves-Pereiram M. (2007). Respiratory pathology in vibroacoustic disease: 25 years of research. *Revista portuguesa de pneumologia*, 13(1), 129-35.

[4] Eduardo, E. (2005). Benarroch Paraventricular nucleus, stress response, and cardiovascular disease. *Clin Auton Res*, 15, 254-263.

[5] Fonseca, J. (2006). Noise-induced gastric lesions: a light and scanning electron microscopy study of the alterations of the rat gastric mucosa induced by low frequency noise. *Central European journal of public health*, 14(1), 35-8.

[6] Graeff, F. G. (1993). The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam. *Brazilian journal of medical and biological research*, 26(1), 67-70.

[7] Kathleen, R., MeUa, Nestler J. & Duman, R. (1992). Chronic imipramine treatment normalizes levels of tyrosine hydroxylase in the locus coeruleus of chronically stressed rats. *Psychopharmacology*, 108, 23-26.

[8] Kim, D. W. (2003). Concentration of catecholamine in urine by low-frequency noise exposure. *Korean Society of Environmental Administration*, Vol. 9. No. 3. 321~329.

[9] Lahmame, A. (1997). Brain corticotropin-releasing factor immunoreactivity and receptors in five inbred rat strains relationship to forced swimming behaviour. *Brain Research*, 285-292.

[10] Leventhall, H. G. (2004). Low Frequency Noise and Annoyance. *Noise Health*, 6(23), 59-72.

[11] Majzoub, J. (2006). Corticotropin-releasing hormone physiology. *European Journal of Endocrinology*, 155 S71-S76.

[12] Mark, A., Smith, M. S., Altemus, M., Michelson, D., Hong, S., Kvetnansky, R. & Post, R. (1995). Stress and antidepressants differentially regulate neurotrophin 3mRNA expression in the locus coeruleus. *Neurobiology*, 8788-8792.

[13] Merali, Z. (1998). Aversive and appetitive events evoke the release of corticotropin-releasing hormone and bombesin-like peptides at the central nucleus of the amygdala. *The journal of Neuroscience*, 18, 4758-66.

[14] Obelenis, V., Malinauskiene, V. (2007). The influence of occupational environment and professional factors on the risk of cardiovascular disease. *Medicina (Kaunas)*, 43(2), 96-102.

[15] Patterson-Buckendahl, P., Pohorecky, LA., Kvetnansky, R. (2007) Differing effects of acute and chronic stressors on plasma osteocalcin and leptin in rats. *Stress*, 10(2):163-72.

[16] Samad, N., Haleem, D. J. (2007). Serotonin-1A receptor responsiveness in stress and following adaptation to stress. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 20(2), 115-9.

[17] Samson, J., Sheeladevi R. & Ravindran, R., (2007). Oxidative stress in brain and antioxidant activity of *Ocimum sanctum* in noise exposure. *NeuroToxicology*, 28 679-685.

[18] Smith M., Makino S., (2005). Stress and antidepressants differentially regulate neurotrophin 3 mRNA expression in the locus coeruleus. *Neurobiology*, Vol. 92, pp.8788-8792.

[19] Veenema, A. H., Torner, L., Blume, A.,

Beiderbeck, D. I. & Neumann, I. D. (2007). Low inborn anxiety correlates with high intermale aggression: link to ACTH response and neuronal activation of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Hormones and behavior*, 51(1), 11-9.

[20] Walf, A. A., (2007). Estradiol decreases anxiety behavior and enhances inhibitory avoidance and gestational stress produces opposite effects. *Stress*, 10(3), 251-260.

[21] Zheng, K. C., Ariizumi, M. (2007). Modulations of immune functions and oxidative status induced by noise stress. *Journal of Occupational Health*, 49(1), 32-8.

원고접수 : 07.08.06

수정접수 : 07.09.01

게재확정 : 07.09.08