

## 만성 스트레스를 받은 흰쥐의 뇌졸거에서 melatonin투여가 serotonin 면역반응에 미치는 영향

김명순

우석대학교 생명과학과

**간추림** : 흰쥐를 control (정상대조군, NaCl 0.9%)군, melatonin (1 mg/kg) 투여군, stress (2 mA, 2V의 전기충격 2분)군, stress-melatonin 투여군으로 나누어 15일간 처리한 후 면역 조직화학 염색법에 의하여 중간뇌 등쪽솔기핵의 염색된 세포수와 염색성, 습뇌의 창백솔기핵과 불명솔기핵, 습뇌의 고립로핵과 미주신경등쪽핵의 염색성을 비교 관찰한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Melatonin 투여군에서는 뇌졸거(중뇌의 등쪽솔기핵, 습뇌의 고립로핵과 미주신경 등쪽핵)의 serotonin 에 대한 면역반응세포는 다른 군들에 비해 약하게 염색 되었다. 또한, 등쪽솔기핵에서 serotonin에 대한 면역반응을 보인 세포수도 다른 군에 비해 적었다.
2. Stress를 가한군에서 뇌졸거(중뇌의 등쪽솔기핵, 습뇌의 고립로핵과 미주신경 등쪽핵)의 serotonin 에 대한 면역반응세포는 대조군이나 melatonin 투여군에 비교하여 강하게 염색되었다. 또한, 중뇌의 등쪽솔기핵에서 serotonin에 대한 면역 반응을 보인 세포수가 다른 군들에 비해 증가한 것을 관찰할수 있었다.
3. Stressed-melatonin 투여군에서 뇌졸거(중뇌의 등쪽솔기핵, 습뇌의 고립로핵과 미주신경 등쪽핵)의 serotonin 에 대한 면역반응세포는 stress 투여군에 비하면 약하지만 melatonin 투여군에 비해서는 강하게 염색되었다. 또한, 중뇌의 등쪽솔기핵에서 serotonin에 대한 면역반응을 보인 세포수는 stress 투여군에 비해서 감소하지만 melatonin 투여군에 비해서는 증가하였다.
4. 습뇌의 창백솔기핵과 불명솔기핵에서 serotonin 에 대한 면역반응 세포는 stress 투여군에서만 강하게 염색되었다. 이상의 결과를 종합해 보면 stress로 인하여 특히 중뇌 솔기핵의 serotonin에 면역반응을 보인 신경 세포체들이 활성화되어 증가되었으나 melatonin과 병용해서 처리했을때는 활성화되었던 신경 세포체들이 melatonin에 의하여 억제됨을 알 수 있었다.

**찾아보기 낱말** : stress, melatonin, serotonin, 중간뇌, 솔기핵, 습뇌

### 서론

스트레스는 임상적으로 우울증을 촉진하거나 또는 악화 시키는 것으로 알려져 있다. 더욱이 장기적인 스트레스에 노출된 흰쥐는 우울증 환자에서 볼 수 있는 신경 내분비 활동과 행동등이 유발된다. 이러한 이유 때문에 장기적인 스트레스를 받은 흰쥐

는 인간의 정서 장애에 대한 유용한 동물 모델로 여겨지고 있다 (Willner 1984).

특히 산화적 스트레스는 알츠하이머병, 파킨슨병, 간질 발작, 뇌손상 등과 같은 신경 퇴화 질환의 발달을 초래하는 중요한 요인중의 하나로 작용하고 있다. 노년에 특히 신경 장애의 발생률이 증가한다는 사실은 많은 연구자들로 하여금 나이가 증가함에 따라 melatonin의 점진적인 감소가 연령관련 퇴행성 질환을 가져오는 산화적 스트레스의 증가를 설명할 수 있는 공통 요소를 찾으려 자극했다. 그런

교신저자: 김명순(우석대학교 생명과학과)  
전자우편: mskim@core.woosuk.ac.kr

이후 송과체 호르몬인 melatonin은 직접적인 유리기 (free radical) 흡착체로서 두드러진 항산화적 성질을 가지고 있으며 (Gupta 등 2003), 연령이 증가함에 따라 그의 생산 비율 감소는 신경 질환의 발생에서 중요한 역할을 한다는 것을 많은 이들이 시사해 왔다 (Butterfield 등 2001, Srinivasan 2002, Gupta 등 2003).

또한 생식에 미치는 melatonin의 영향은 광범위하여 계절적 번식을 하는 온대지방 동물중 햄스터의 생식활동은 여름에 왕성하고 겨울에 정지되는데 이는 많은 환경요소 중 광주기의 효과로 입증되었다 (Choi 1996). 따라서 멜라토닌은 생식에 미치는 광주기의 정보를 생식 내분비계로 전달하는 신경전달물질로 여겨진다.

이러한 melatonin의 처리는 퇴행성 신경질환의 실험적 모델과 그러한 질환으로 고통 받는 환자에서 신경 퇴화조건을 방해하는데 효과적인 것으로 알려져 있을 뿐만 아니라 퇴행성 신경 질환을 겪고 있는 환자에서 melatonin의 리듬과 분비의 불균형이 기록되고 있다 (Reiter 1998, Srinivasan 2002). 위의 사실로도 melatonin은 신경 보호작용을 가진다는 증거를 알 수 있다.

다른 신경 전달물질과 마찬가지로 serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT)도 중추신경계의 이마엽 (frontal lobe)과 해마 (hippocampus)에 많이 있는 수용체와 상호작용을 함으로써 그 특성을 나타내게 된다. 특히 시상하부와 시각교차 앞구역은 모두 성행동 (Caggiula 등 1973)과 신경 내분비 (Palkovits 등 1977)와 관련된 중요한 영역으로서 숨뇌의 솔기핵과 중간뇌의 등쪽 솔기핵의 신경원들이 모두 이러한 시상하부에 투사되는 것으로 보고되고 있기 때문이다. 포유류의 시신경교차상핵 (suprachiasmatic nuclei, SCN)은 일주기 리듬발생부위 (Reiter 등 2000)로 광구심성 신경 (photic afferences)과 비광구심성신경 (non-photic afferences)에 의해서 조절되고 있는 일주기 시계를 포함한다. 이들 중에서 등쪽 솔기핵 (dorsal raphe nucleus, DRN)에서 유래하는 serotonin 작동성 입력 (serotonergic input)은 대단히 중요하며 일주기 리듬을 조절하는데 또 하나의 역할을 하는 것으로 생각된다 (Prosser 등 1990, Smale 1990,

Morin and Blanchard 1991). 이것은 이러한 조절이 부분적으로는 DRN의 serotonin 신경세포에 대한 망막 투사 (retinal projection)에 의해서 중재되고 있다는 것을 시사하기도 한다.

강제 수영으로 유도된 자포자기 행동 테스트에서 melatonin의 생리, 약리학적 농도의 항우울 효과를 조사한 결과, 수영 테스트에 앞서 매일 반복적인 melatonin (2.5 ~ 10.0 mg/kg)의 처리는 수영 테스트로 장기간 노출 되었을 때 관찰된 부동자세 기간의 증가를 역전 시켰을 뿐만 아니라 강제 수영 테스트에 장기간 노출시킨 쥐에서 melatonin의 급성처리는 GABA계통 약제와 마찬가지로 항우울 효과를 보여주었다 (Prosser 등 1990). 결론적으로 이 연구는 약리학적 농도의 melatonin이 장기간의 강제 수영으로 유도된 자포자기 행동에서 말초의 benzodiazepine (BZ) 수용체와 관련된 작용을 함으로써 항우울 효과를 가진다는 것을 보여 주었다.

다른 항산화제와는 달리 melatonin은 모든 형태적, 생리적 장애물인 혈액-뇌장벽 (blood-brain barrier), 태반 등을 쉽게 통과하고 세포안으로 들어갈 수 있다 (Reiter 등 2000).

이러한 사실을 근거로 본 연구에서는, 항우울 효과를 나타내고 산화적 스트레스를 완화시키는 것으로 알려진 melatonin을 장기적으로 처리하여 스트레스가 흰쥐 뇌졸거의 5-HT 발현에 미치는 영향을 알아 보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 동물

체중 200 ~ 230 g의 수컷 흰쥐 (Sprague Dawley, 다물 사이언스) 구입하여 4마리씩 우리에 넣고 먹이와 물이 자유롭게 공급되는 항온 항습실 (22.0 ± 2.0, 55.0 ± 2.0)에서 광주기/암주기 (12 h 간격)에 3일정도 적응시킨후 실험기간 동안 사육하였다.

### 2. 실험 방법

#### 1) 약품의 주입

정상 대조군 : 생리 식염수 (0.9% NaCl) 투여

Melatonin 투여군 : melatonin (1.0 mg/kg, Sigma, USA)투여

Stress 투여군 : 전기충격(2.0 mA, 2.0 V: 전기 충격 장치, (주)삼일테크) 2분 가함

Stress-melatonin 처리군 : stress를 가한지 30분 후 melatonin 투여

모든 동물들은 생리 식염수에 녹인 melatonin을 15일간 복강내에 투여한지 30분 후에 희생 하였다.

## 2) 조직의 처리

흰쥐는 클로로포름으로 마취시킨 후 흉강을 열어 하대 정맥을 절단하고 좌심실을 통하여 생리적 식염수(0.9%)로 관류, 방혈 시켰다. 뒤이어 4% paraformaldehyde로 관류고정한 다음 두개골과 뇌막을 제거하고 뇌를 적출하여 30% sucrose용액(고정액에 sucrose녹임)에 넣고 24시간동안 침적 시켰다. 그 후 냉동 절편기(-21°C, Leica)를 이용하여 30 µm 두께의 관상 연속절편을 제작하고 면역 반응을 실시할 때까지 0.1 M PB에 넣어 4°C에서 보관하였다.

## 3) 면역 조직 화학 염색

면역 조직 화학 염색법은 avidin-biotin-peroxidase (Vector Laboratories Inc, ABC kit)를 이용한 부유법에 의해 다음과 같은 순서에 따라 시행하였다.

조직 절편들은 1차 항체인 rabbit anti-serotonin (Sigma)을 희석액 (0.3% triton X-100, 1% normal goat serum 및 1% bovine serum albumin in 0.1M PB)에 1:5,000으로 희석하여 4°C에서 24시간 동안 반응 시켰다. 0.1M PB로 수세한 조직절편들은 다시 2차 항체인 biotinylated anti-rabbit IgG를 1:250으로 희석한 용액에 넣어 37°C 항온기에서 2시간 동안 반응 시켰다. 같은 방법으로 다시 수세한 조직절편들은 ABC complex를 1:50으로 희석한 용액에 넣어 실온에서 1시간 정도 반응 시켰다. 그 후 0.1 M PB로 수세한 조직들은 발색제 (10 mg의 3-3 diaminobenzidine을 50 mL의 0.1M PB에 녹여 여과한 후 0.005% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 첨가하여 만듦)를 이용하여 5분 정도 발색 시켰다. 발색 후 조직절편들은 수세하고 gelatin이 입혀진 슬라이드에 부착시킨 다음 12시간 정도 건조 시켰다. 그 후 통상적인 방법에 따라 탈수와 투명화 과정을 거친 후 봉입하여 현미경으로

관찰하였다.

## 4) 면역 조직화학의 판정

면역 조직 화학 반응의 판정을 하기 위한 serotonin (5-HT)에 대한 면역 반응부위는 중뇌의 등쪽솔기핵, 연수의 솔기핵 및 고립로핵으로 이들의 면역 반응 염색 강도를 현미경과 육안으로 비교 판정하였다.

## 5) 면역반응세포의 계수

면역 염색한 각 표본은 ×50의 배율로 면역반응 세포를 조사하였다. 면역반응에 의하여 염색된 세포의 계수방법은 각 동물 당 5개의 절편을 선별하여 10개의 표본에서 면역염색이 된 부위의 광학현미경 시야(visual field, 직경 0.9 mm)를 선택하여 각 군간에 상대적인 비교를 하였다.

# 결 과

각 실험군별로 조직을 비교 관찰한 결과는 다음과 같았다 (Table 1, 2, Figs. 1-12).

## 1. 생리 식염수 투여군 (정상 대조군)

정상 대조군으로 Serotonin에 대한 면역반응세포의 염색은 중간뇌의 등쪽솔기핵 (dorsal raphe nucleus), 연수의 고립로핵 (nucleus tractus solitarius)과 미주신경등쪽핵 (dorsal motor nucleus of vagus nerve)에서 모두 중등도(+3)의 염색성을 보였으나 (Table 1, 2, Figs. 1, 5), 연수의 고립로핵 (nucleus tractus solitarius)과 미주신경등쪽핵 (dorsal motor nucleus of vagus nerve)에서는 미약하게 (+2) 염색되었다 (Table 2, Fig. 9).

## 2. Melatonin을 투여군

Melatonin을 주입한 melatonin 투여군에서 serotonin에 대한 면역반응세포의 염색강도는 중뇌의 등쪽솔기핵, 연수의 고립로핵과 미주신경등쪽핵에서 +2, 연수의 창백솔기핵과 불명솔기핵에서는 +1 정도로 모두 미약하게 염색되었다 (Table 1, 2, Figs. 2.

6). 특히 등쪽솔기핵내 염색된 세포의 수도 대조군에 비하여 감소하는 경향(+2)을 보였다(Table 2).

### 3. 전기 충격 stress군

Stress를 가한군에서 serotonin에 대한 면역반응세포의 염색 강도를 보면 다른 군들에 비하여 관찰한 뇌졸거의 대부분인 연수의 고립로핵과 미주신경등쪽핵에서 +5, 연수의 창백솔기핵과 불명솔기핵에서는 +4 정도의 강한 염색성을 나타내었다 (Table 2, Figs. 7, 11). 또한 중뇌의 등쪽솔기핵의 염색 강도 및 염색된 세포체의 수도 나머지 다른 군들에 비하여 현저히 증가하는 경향을 나타내었다 (Table 1, Fig. 3).

### 4. Stress를 가한 후 melatonin을 투여한 군

Stress를 가한 후 melatonin을 투여한 군에서 sero-

tonin에 대한 면역반응세포의 염색강도는 중뇌의 등쪽솔기핵, 연수의 고립로핵과 미주신경 등쪽핵에서는 대조군에서 보다 오히려 더 강하게 염색되어 +4정도로 관찰되었고(Table 1, 2, Figs. 4, 8.) 연수의 창백솔기핵과 불명솔기핵에서는 대조군과 비슷한 수준으로 염색되었다(Table 2, Fig. 12). 등쪽솔기핵의 염색된 세포체의 수도 대조군에 비하여 증가하는 경향을 나타내었다 (Table 1, Fig. 4).

## 고 찰

흰쥐의 뇌에서 유리기 (free radical) 발생과 연관이 있는 것으로 뇌실내로 투여한 (intracerebroventricular, ICV) streptozotocin (STZ)은 인지 손상을 유발하는 것으로 알려져 왔다(Sharma and Gupta 2001). 흰쥐에서 ICV STZ에 의해 유도된 인지적 손상과 산화적 스트레스에 대한 melatonin의 효과를 연구하기 위하여 STZ를 뇌실내로 투여한 동물과 비교한 melatonin-treated ICV STZ 흰쥐에서는 산화제 스트레스의 매개 요인인 malondialdehyde (MDA)와 glutathione이 약간의 증가와 감소를 보였지만 인지 손상은 확실히 덜 나타냈다(Sharma and Gupta 2001).

이 연구는 인지 손상을 예방하는데 melatonin이 효과적이라는 것을 입증 하였고 인지 손상이 관련되어 있는 노년과 연령관련 퇴행성 신경 장애에서도 그것의 가능성을 시사하였다.

STZ에 의해 유발된 당뇨병 흰쥐에 melatonin을 장기적으로 투여하면 신장의 상해가 감소하므로, 따라서 melatonin은 산화적 스트레스와 진성 당뇨병 환자와 관련된 신장 상해에 대하여 유용한 치료제가 될 수 있다(Cam 등 2003).

철에 의해 유도된 산화적 스트레스가 다양하고 폭넓은 신경장애를 유발한다는 것은 이미 알려져 있는 사실이다. 1.0mM ferric ammonium citrate (FAC) 또는 0.9% 식염수(NaCl) 1.0 μL를 피하 주입한 후 24시간 후에 죽는 신경세포의 비율을 melatonin이 변화시킬 수 있는지 연구한 결과 매일 melatonin (5 mg/kg)을 체계적으로 주입한 흰쥐는 FAC에 의해 죽은 신경세포의 비율을 40% 감소 시켰다는 것을

**Table 1.** Immunoreactivity for serotonin in the dorsal raphe nucleus of rat midbrain following stress and/or melatonin treatment

Group	Dorsal raphe nucleus	
	Number <sup>1)</sup>	Density <sup>2)</sup>
Control	+++	+++
Melatonin treated	++	++
Stressed	+++++	+++++
Stressed-melatonin treated	++++	++++

<sup>1)</sup> ++ : low (5 ~ 25%), +++ : moderate (25 ~ 50%), ++++ : high (50 ~ 75%), +++++ : very high (>75%); <sup>2)</sup> ++ : weak, +++ : moderate, +++++ : strong, ++++++ : strongest

**Table 2.** Immunoreactive density for serotonin in the rostral and caudal portion of rat medulla oblongata following stress and/or melatonin treatment

Group	Medulla oblongata	
	NTS/DMV	RPa/ROb
Control	+++	++
Melatonin treated	++	+
Stressed	+++++	++++
Stressed-melatonin treated	++++	++

Degree of reaction intensity +: weakest, ++ : weak, +++ : moderate, +++++ : strong, ++++++ : heavily strong  
 RPa : raphe pallidus, ROb : raphe obscurus, NTS : nucleus tractus solitarius, DMV : dorsal motor nucleus of vagus nerve.

알 수 있었다(Hayter 등 2004).

Lead acetate (100 mg/kg)을 투여한 흰쥐에서도 해마와 줄무늬체에서 심각한 손상과 신경세포 밀도의 감소를 나타냈지만 다시 melatonin (10 mg/kg)을 투여하면 형태학적 손상이 경감되고, 감소되었던 신경세포의 밀도가 회복되었다(El-Sokkary 등 2003). 이 결과는 melatonin의 약리학적 농도가 철/납 유도 손상 뉴런들을 보호한다는 것을 시사했다(El-Sokkary 등 2003, Hayter 등 2004).

신생아기 melatonin (neonatal melatonin)투여는 줄무늬체 (striatum)에서 5-HT와 5-HIAA수준, 해마 (hippocampus)에서 5-HIAA농도를 증가 시켰다. 이 결과는 초기 신생아기 동안 외부에서의 melatonin투여는 해마와 줄무늬체를 포함하는 시상하부 이외의 지역에서 serotonin 작동성 시스템의 발달에 영향을 준다는 것을 가리킨다(Muneoka 등 2000).

전기 충격, 구속, 소음 등 수많은 정신적, 생리적 스트레스는 serotonin 작동성 신경 세포체에 의해서 신경 지배되는 대부분의 영역에서 5-HT 전환을 증가 시켰다(Amat 등 1998, Clement 등 1993, Dilts and Boadle-Biber 1995). 솔기핵에서 TPH mRNA 수준이 현저히 상승한다는 발견은 구속 스트레스에 대한 반응으로 serotonin 작동성 활성화와 5-HT 전환의 증가가 상승된 TPH유전자 발현에 의해서 조절될 수 있다는 것을 시사한다. 반복된 구속 스트레스에 의한 serotonin과 norepinephrine 합성효소의 유전자 발현에서 장기 변화는 우울증에 대하여 스트레스 유도 민감성에 관련되어 있을 것이라고 추측하였다(Chamas 등 1999). 임상적으로 serotonin 작동성 시스템과 adrenaline 작동성 시스템의 변화는 정서 장애, 특히 우울증과 걱정에 관련되어 있다는 보고도 있다(Handley 1995).

본 실험에서는 장기적으로 stress를 받은 흰쥐가 신경전달물질 대사에 대한 직접적인 효과를 최소화하기 위해 마지막 스트레스후 melatonin을 주입하고 30분만에 희생하였다.

전기 충격 stress를 매일 2분씩 15일간 주고 흰쥐의 뇌졸거에서 serotonin 변역 반응 세포체에 미치는 영향을 관찰한 결과 등쪽 솔기핵에서 (DRN)는 다른 군들에 비하여 stress로 인하여 신경 세포체들이 활

성화됨으로써 염색된 세포의 수 및 염색 강도가 증가 되었고 고립로핵 (NTS), 미주신경등쪽(DMV), 불명솔기핵 (ROb) 및 창백솔기핵 (RPa)에서는 다른 군들에 비해 염색 강도가 증가되었다. 이 결과는 매일 1시간씩 24일 동안 움직이지 못하도록 구속하면 몇몇 뇌영역, 특히 피질의 이마엽 (frontal cortex), 시상하부, 해마에서 5-HT와 5-HIAA 모두가 증가되었다는 Adell (1988) 등의 보고와 유사 하였다. 이것은 장기적인 구속이 5-HT합성뿐만 아니라 대사를 활성화시킨다는 것을 시사한다.

본 연구에서는 전기 충격에 반복적으로 장기간 노출시킨 흰쥐에서 melatonin을 장기 주입하게 되면 stress에 의해서 상승되었던 신경 세포의 활성을 melatonin이 억제시킴으로써 등쪽 솔기핵에서 serotonin 항체에 염색된 세포의 수 및 염색 강도, 연수의 고립로핵 및 미주신경등쪽핵, 연수의 창백솔기핵 및 불명솔기핵의 염색 강도가 대조군 수준 이상으로 감소하는 것을 관찰할 수 있었다.

이상의 연구 결과를 종합해 봄으로써 stress, melatonin 투여 등이 serotonin 신경원의 활성화에 영향을 줄 수 있다는 것을 확인했기 때문에 앞으로 부가적인 연구를 통해 뇌졸거의 여러 부위에서 분비되는 신경전달물질 이상으로 유발되는 질병의 연구에 기초 자료를 제공할 수 있을 것이다.

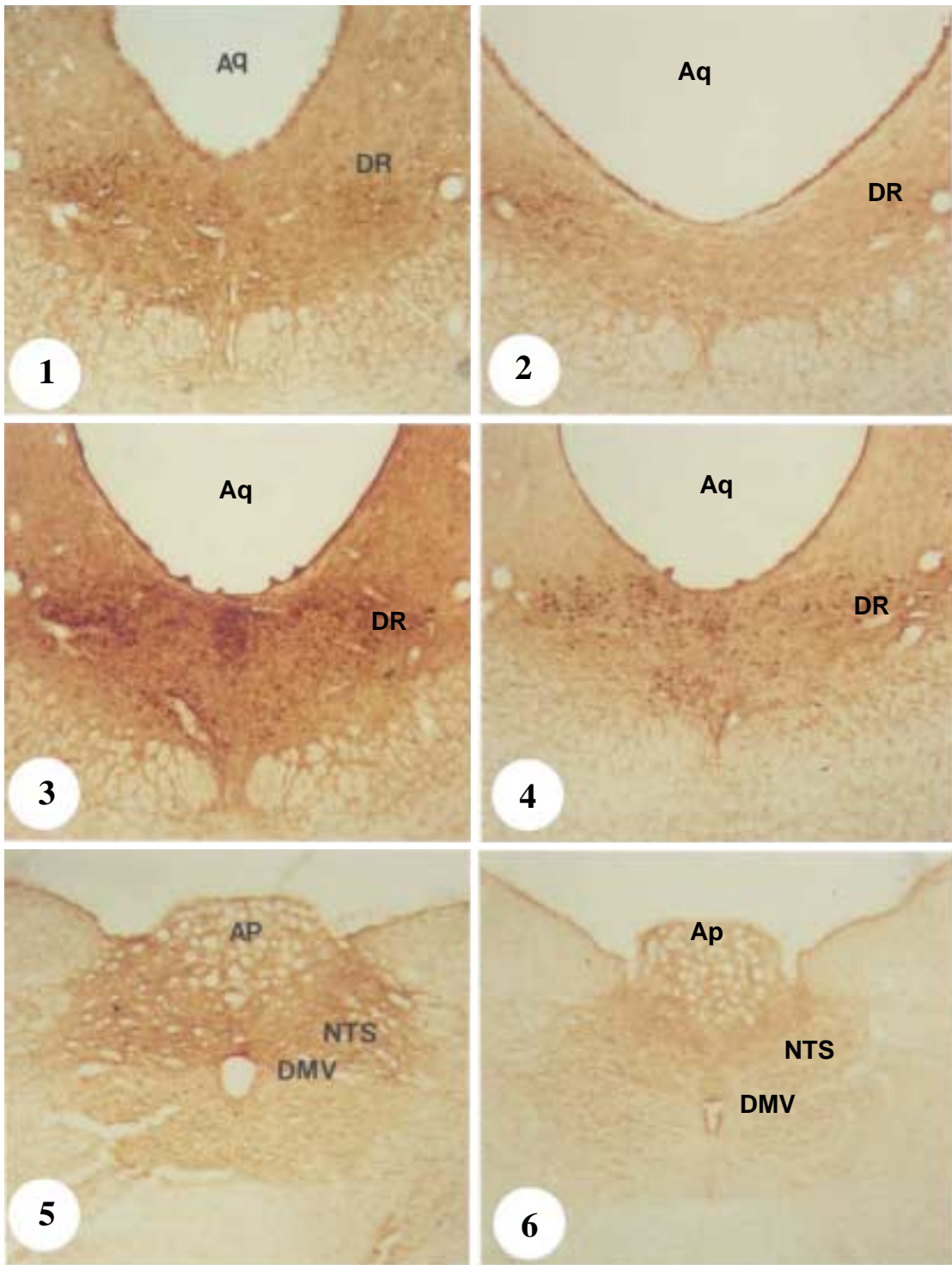
## 참 고 문 헌

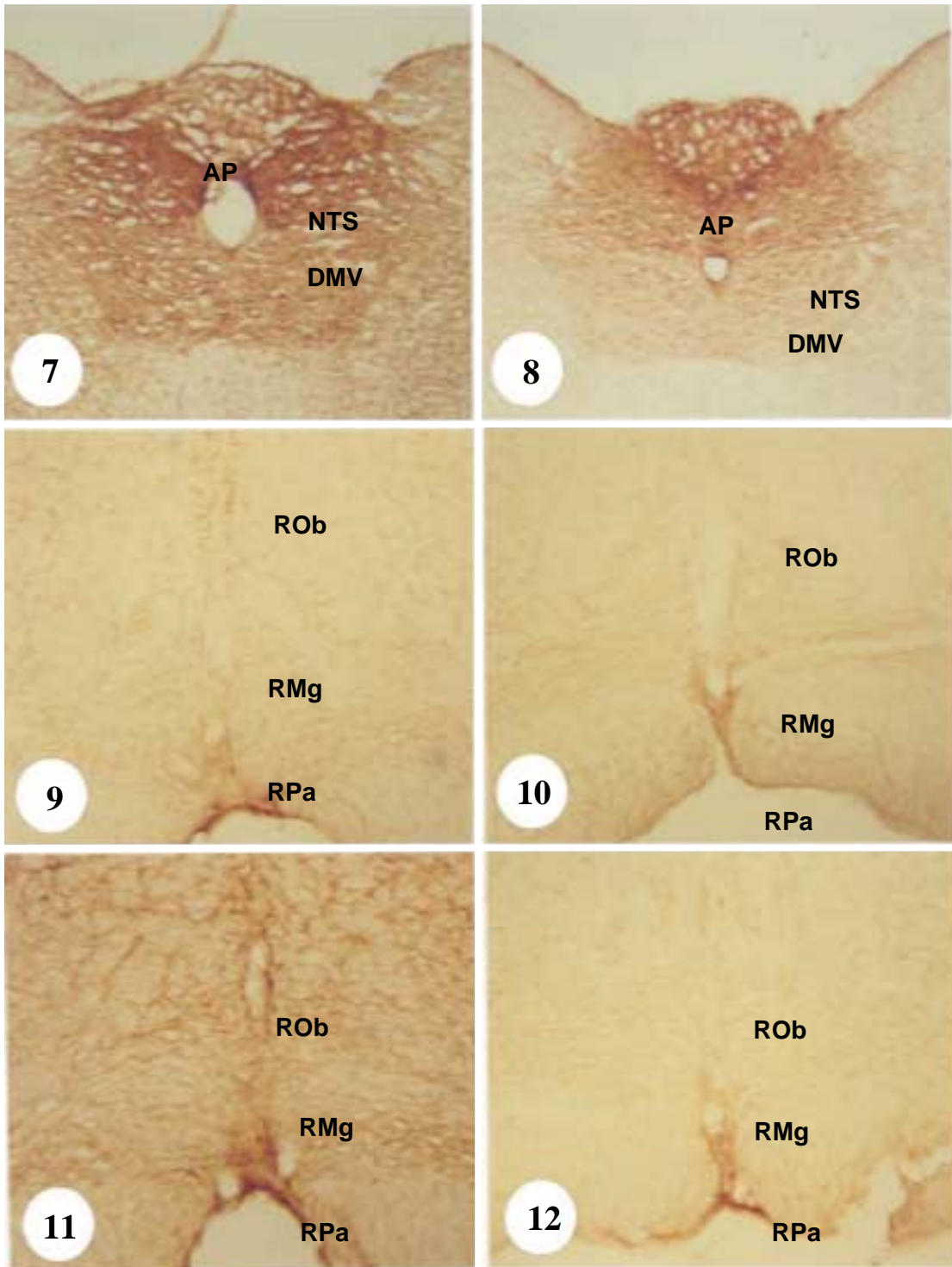
- Adell A, Garcia-Marquez C, Armario A, Gelpi E : Chronic stress increases serotonin and noradrenaline in rat brain and sensitizes their responses to a further acute stress. *J Neurochem* 50 : 1678-1681, 1988.
- Amat J, Matus-Amat P, Watkins LR, Majer SF : Escapable and inescapable stress differentially and selectively alter extracellular levels of 5HT in the ventral hippocampus and dorsal periaqueductal gray of the rat. *Brain Res* 797 : 12-22, 1998.
- Butterfield DA, Howard BJ, LaFontaine MA : Brain oxidative animal models of accelerated aging and the age-related neurodegenerative disorders Alzheimer's disease and Huntington's disease. *Curr Med Chem* 8 : 815-828, 2001.

- Caggiula AR, Antelman SM, Zigmond, MJ : Disruption of copulation in male rats after hypothalamic lesions. *Brain Res* 59 : 273-287, 1973.
- Cam M, Yavuz O, Guven A, Ercan F, Bukan N, Ustundag N : Protective effects of chronic melatonin treatment against renal injury in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Pineal Res* 35 : 212-220, 2003.
- Chamas F, Serova L, Sabban EL : Tryptophan hydroxylase mRNA levels are elevated by repeated immobilization stress in rat raphe nuclei but not in pineal gland. *Neurosci Lett* 267 : 157-160, 1999.
- Choi DC : Reproductive physiology of pineal hormone melatonin. *Korean J Zool* 39 : 337-351, 1996.
- Clement HW, Schafer F, Ruwe C, Gemsa D, Wesemann W : Stress-induced changes of extracellular 5-hydroxyindoleacetic acid concentrations followed in the nucleus raphe dorsalis and the frontal cortex of the rat. *Brain Res* 614 : 117-124, 1993.
- Dilts RP, Boadle-Biber MC : Differential activation of the 5-hydroxytryptamine-containing neurons of the midbrain raphe of the rat in response to randomly presented inescapable sound. *Neurosci Lett* 199 : 78-80, 1995.
- El-Sokkary GH, Kamel ES, Reiter RJ : Prophylactic effect of melatonin in reducing lead-induced neurotoxicity in the rat. *Cell Mol Biol Lett* 8 : 461-470, 2003.
- Gupta YK, Gupta M, Kohli K. : Neuroprotective role of melatonin in oxidative stress vulnerable brain. *Indian J Physiol Pharmacol* 47 : 373-386, 2003.
- Handley SL : 5-hydroxytryptamine pathways in anxiety and its treatment. *Pharmacol Ther* 66 : 103-148, 1995.
- Hayter CL, Bishop GM, Robinson SR : Pharmacological but not physiological concentrations of melatonin reduce iron-induced neuronal death in rat cerebral cortex. *Neurosci Lett* 362 : 182-184, 2004.
- Morin LP, Blanchard J : Depletion of brain serotonin by 5,7-DHT modifies hamster circadian rhythm response to light. *Brain Res* 566 : 173-185, 1991.
- Muneoka K, Ogawa T, Takigawa M : Effects of neonatal melatonin administration on the extrahypothalamic regions in rat brains : effects on the serotonergic system. *Neurochem Res* 25 : 817-822, 2000.
- Palkovits M, Saavedra JM, Jacobowitz DM, Kizer JS, Zaborszky L, Brownstein MJ : Serotonergic innervation of the forebrain effect of lesions on serotonin and tryptophan hydroxylase levels. *Brain Res* 130 : 121-134, 1977.
- Prosser RA, Miller JD, Heller HC : A serotonin agonist phase-shifts the circadian clock in the suprachiasmatic nuclei in vitro. *Brain Res* 534 : 335-339, 1990.
- Reiter RJ : Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Prog Neurobiol* 56 : 359-384, 1998.
- Reiter RJ, Tan DX, Qi W, Manchester LC, Karbonik M, Calvo JR : Pharmacology and Physiology of melatonin in the reduction of oxidative stress in vivo. *Biol Signals Recept* 9 : 160-171, 2000.
- Sharma M, Gupta YK : Effect of chronic treatment of melatonin on learning, memory and oxidative deficiencies induced by intracerebroventricular streptozotocin in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 70 : 325-331, 2001.
- Smale L, Michels KM, Moore RY, Morin LP : Destruction of the hamster serotonergic system by 5,7-DHT : effects on circadian rhythm phase entrainment and response to triazolam. *Brain Res* 515 : 9-19, 1990.
- Srinivasan V : Melatonin oxidative stress and neurodegenerative diseases. *Indian J Exp Biol* 40 : 668-679, 2002.
- Willner P : The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology* 83 : 1-6, 1984.

## Legends for Figures

- Fig. 1.** Photomicrograph of serotonin-immunoreactive neurons in dorsal raphe nucleus of control group, ×50. Aq, aqueduct; DR, dorsal raphe nucleus. Serotonin immunoreactive neuron was moderate stained.
- Fig. 2.** Photomicrograph of serotonin-immunoreactive neurons in dorsal raphe nucleus of melatonin treated group, ×50. Serotonin immunoreactive neuron was weakly stained compared with control group.
- Fig. 3.** Photomicrograph of serotonin-immunoreactive neurons in dorsal raphe nucleus of stressed group, ×50. Heavily stained immunoreactive neurons were observed to be numerous, compared with all the other groups.
- Fig. 4.** Photomicrograph of serotonin-immunoreactive neurons in dorsal raphe nucleus of stress-melatonin treated group, ×50. Immunoreactive neuron was heavily stained compared with control and melatonin treated group.
- Fig. 5.** Photomicrograph of serotonin-immunoreactive neurons in nucleus tractus solitarius (NTS) and dorsal motor nucleus of vagus nerve (DMV) of control group, ×50. AP, area postrema. Serotonin immunoreactive neuron was moderate stained.
- Fig. 6.** Photomicrograph of serotonin-immunoreactive neurons in nucleus tractus solitarius (NTS) and dorsal motor nucleus of vagus nerve (DMV) of melatonin treated group, ×50. AP, area postrema. Serotonin immunoreactive neuron was weakly stained compared with control group.
- Fig. 7.** Photomicrograph of serotonin-immunoreactive neurons in nucleus tractus solitarius (NTS) and dorsal motor nucleus of vagus nerve (DMV) of stress treated group, ×50. AP, area postrema. The intensity of staining is strong compared with all the other groups.
- Fig. 8.** Photomicrograph of serotonin-immunoreactive neurons in nucleus tractus solitarius (NTS) and dorsal motor nucleus of vagus nerve (DMV) of stress-melatonin treated group, ×50. AP, area postrema. The intensity of staining is a bit strong compared with control.
- Fig. 9.** Photomicrograph of serotonin-immunoreactive neurons in raphe pallidus (RPa) and raphe obscurus (ROb) of control group, ×50. RMg, raphe magus. Serotonin immunoreactive neuron was weakly stained.
- Fig. 10.** Photomicrograph of serotonin-immunoreactive neurons in raphe pallidus (RPa) and raphe obscurus (ROb) of melatonin treated group, ×50. RMg, raphe magus. The intensity of staining is a bit weaker than that of the control group.
- Fig. 11.** Photomicrograph of serotonin-immunoreactive neurons in raphe pallidus (RPa) and raphe obscurus (ROb) of stressed group ×50. RMg, raphe magus. The intensity of staining is strong compared with that of all the other groups.
- Fig. 12.** Photomicrograph of serotonin-immunoreactive neurons in raphe pallidus (RPa) and raphe obscurus (ROb) of stress-melatonin treated group, ×50. RMg, raphe magus. The intensity of staining is similar to that of the control group.





**Abstract**

## **The Effect of Melatonin Injection into Rat Brain Stem with Chronic Stress on Serotonergic Immunoreactivity**

**Myoung-Soon Kim**

*Department of Bioscience, College of Natural & Technology, Woosuk University*

These experiments were performed to investigate the effect of saline, melatonin, stress, stressed-melatonin on serotonin immunoreactivity in rat brain stem. The animals were injected with melatonin (1 mg/kg, i.p.) after electric shocks for 15days.

The results were as follows;

1. Serotonin immunoreactive neurons in brain stem (the number of staining neuron & the stain intensity in dorsal raphe nucleus of midbrain, the stain intensity in nucleus tractus solitarius and dorsal raphe nucleus of vagus nerve in medulla oblongata) were decreased in melatonin treated group compared with all the other groups.
2. Serotonin immunoreactive neurons in brain stem (the number of staining neuron & the stain intensity in dorsal raphe nucleus of midbrain, the stain intensity in nucleus tractus solitarius and dorsal raphe nucleus of vagus nerve in medulla oblongata) were significantly increased in stressed group compared with all the other groups.
3. Serotonin immunoreactive neurons in brain stem(the number of staining neuron & the stain intensity in dorsal raphe nucleus of midbrain, the stain intensity in nucleus tractus solitarius and dorsal raphe nucleus of vagus nerve in medulla oblongata) were significantly decreased in stressed-melatonin treated group compared with only stressed group but were significantly increased compared with melatonin treated group.

These experiments indicate that serotonin immunoreactive neurons in dorsal raphe nucleus of midbrain were increased, due to the activation of stress, and decreased when the activating of stress is suppressed through melatonin treatment.

**Key words** : Stress, Melatonin, Serotonin, Midbrain, Raphe nucleus, Medulla