

해마경화를 동반한 난치성 측두엽 간질 환자의 해마내 신경원세포의 Dynorphin 면역반응 양상

Dynorphin-immunoreactivity Patterns of Hippocampus in Patients with Intractable Temporal Lobe Epilepsy with Hippocampal Sclerosis

김장성¹ · 김정선² · 주희재² · 심철² · 조경기³ · 허균¹ · 서중석⁴ · 서기춘²
 Jang-Sung Kim, M.D.¹, Jung Sun Kim, M.D.², Hee Jae Joo, M.D.²,
 Chull Shim, M.D.², Kyung Gi Cho, M.D.³, Kyoon Huh, M.D.¹,
 Joong Seok Seo, M.D.⁴ and Gi Chun Seo, M.D.²

ABSTRACT

Background : Dynorphin (DYN) is one of neuropeptides widely distributed in primate brain. In human mesial temporal lobe epilepsy (TLE) with hippocampal sclerosis (HS), DYN-immunoreactivity (DYNIR) band in inner molecular layer of hippocampal dentate gyrus (DGIML) is a well-known immunohistochemical feature, whereas DYNIR is present in axonal terminals of dentate granular neurons (DGNs) in normal hippocampus. We evaluated DYNIR patterns in resected hippocampal specimens of Korean TLE patients with HS. **Methods** : Eleven hippocampal specimens resected from 11 intractable TLE patients with HS on MRI were available for immunohistochemical staining for dynorphin-A. Nine hippocampal specimens from autopsied controls were also evaluated for DYNIR. In either cases, we investigated patterns of DYNIR in neuronal fibers of all sectors in hippocampus from CA1 to dentate gyrus. **Results** : Five patterns of DYNIR were demonstrated as follows : 1) Pattern I : Four cases showed a typical pattern with DYNIR band in DGIML without demonstrating immunoreactivity in any other region. 2) Pattern II : Four cases demonstrated DYNIR in hilus as well as DGIML. 3) Pattern III : In one case, DYNIR appeared in DGIML, hilus and CA3. 4) Pattern IV : In one, only hilus and CA3 were immunoreactive to dynorphin. 5) Pattern V : The last one showed a combination of pattern III and no DYNIR at the opposite blade of DG. In normal hippocampal specimen, DYNIR was shown in hilus and at stratum lucidum along CA3 region. **Conclusion** : Previous studies have been emphasizing the typical pattern I. However, the result of this study argues that patterns of DYNIR are variable in intractable TLE with HS. (J Korean Epilep Soc 2 : 121-126, 1998)

KEY WORDS : Temporal lobe epilepsy · Hippocampal sclerosis · Dynorphin-immunoreactivity.

서론

Dynorphin(Dyn)은 κ -opioid 수용체에 작용하는 신경 펩티드로 잘 알려져 있다.¹⁾ 정상외 척추동물 해마내에서 CA3와 CA4 부위에 시냅스하는 치상회외 과립상 신경원세

포(dentate granular neuronal cell : 이하 DGN)의 축삭 종말에 Dyn이 주로 많이 분포하고 있는 것으로 알려져 있다.^{1,2)} 근래 수술치료를 받은 측두엽 간질환자에서 행해진 연구들에 의하면 해마경화가 있는 환자의 해마에서 일정한 형태의 Dyn 면역반응(DYNIR)이 나타난다고 하며 특징적으로 치상회외 내분자층에 DYNIR에 의한 대(band)가 형성됨이 발견되었다.³⁻⁵⁾ 그리고 이 DYNIR 대는 Timm's staining상 나타나는 태상섬유(mossy fiber) 발아(sprouting)⁶⁾에 상당하는 것이라는 주장들이 제기되고 있다.⁹⁻¹²⁾ 하지만 Dyn이 간질발생기전이나 간질발작의 기전 등과 관련하여 어떠한 역할을 하는지는 아직까지 명확히 규명되지 않은 상태이다.¹³⁻¹⁸⁾

최근까지 측두엽 간질 환자에서 해마의 DYNIR에 대한

¹아주대학교 의과대학 신경과학교실, ²병리학교실, ³신경외과학교실,
⁴Departments of Neurology, ²Pathology and ³Neurosurgery, Ajou
 University School of Medicine, Kyunggido, Korea

⁴국립과학수사 연구소 법의학과

⁴Department of Forensic Medicine, National Institute of Scientific Investigation, Seoul, Korea

교신저자 : 김장성, 442-749 경기도 수원시 팔달구 원천동 산 5
 TEL : (0331) 219-5175 · FAX : (0331) 219-5178
 E-mail : jsknausm@madang.ajou.ac.kr

연구는 de Lanerolle 등이 시행했던 연구들로서 그들의 연구는 주로 해마경화가 동반된 내측두엽 간질에서 DYNIR가 DIML에서 특징적으로 나타남을 강조해 오고 있다.^{3,5,19)} 저자 등이 아는 바로 우리나라에서는 아직까지 그와 같은 연구가 시행된 적이 없다. 본 연구는 우리나라에서 해마경화를 동반한 난치성 내측두엽 간질환자의 수술로써 절제된 해마에서 DYNIR의 양상이 어떠한 특성을 갖고 있는지에 대해 조사하여 보고자 한다.

방 법

1. 연구대상

연구 대상 해마 조직은 측두엽 절제 수술을 받은 11명의 난치성 측두엽 간질환자로부터 얻어졌으며 모든 환자에서 수술전 검사상 발작시작 부위가 수술 동측 측두엽으로 확진되었으며 자기공명 영상상 동측의 해마경화로 진단되었다. 국립과학 수사연구소로 부검이 의뢰된 사체들 중 직접 사인이 뇌질환이나 뇌손상이 아닌 사체로부터 채취된 해마 9례가 정상 대조군으로 선정되었다.

2. 연구방법

1) 조직 표본 제작

수술전 시행된 검사상에서 발작 시작 부위로 진단된 측두엽에 대한 표준 전방 측두엽 절제술 및 해마 절제술이 모든 환자에서 *en bloc* 방식으로 시행되었다. 절제된 해마의 종축 길이는 대개 3~4 cm 이었다. 절제된 해마는 절제 직후 병리학 교실로 이송되어 30분 이내에 10% 포르말린 용액 내에 넣어서 고정 처리되는 과정을 거쳤다. 해마는 약 0.5~1.0 cm의 두께로 해마 종축에 대해 횡단(coronal section) 절편(slice)화 되었으며 해마의 체부(body)에 해당되는 부위를 포함하는 절편은 약 0.3 cm의 두께로 다시 절편화 되어 10% 포르말린액 내에서 24시간 동안 고정되었다. 고정된 절편은 탈수, 투명, 침투의 과정을 거친 후 파라핀으로 포매되었다. 대조군의 조직도 같은 과정을 거쳐 염색 준비단계가 완료되었다.

2) Dynorphin 면역화학 염색

파라핀으로 포매된 조직은 6 μm의 두께로 박절되어 슬라이드 부착 후 oven에 넣어 약 58°C에서 1시간 동안 방치 후 xylene에 의해 파라핀이 제거되었다. 조직 절편들은 100%

ethanol로 2분씩 3차례, 95% ethanol로 2분씩 2차례의 함수과정을 거친 후 증류수로 수세 되었다. 슬라이드들은 0.01M sodium citrate buffer (pH 6.0)에 넣어져서 microwave (Shandon)로 5분간 처리 되었다. 식힌 슬라이드들은 증류수 수세과정을 거쳐 3% H₂O₂가 첨가된 methanol로 10분간 실온에서 처리되었다. 다음 Tris buffered saline (pH 7.6, Tris base 1.4 gm, Tris HCl 6.0 gm, NaCl 8.7 gm)(TBS)로 수세 후 Labelled Streptavidine Biotine(LSAB, DAKO) Kit의 blocking reagent로 10분간 처리 되었다. 다음 Porcine Dynorphin-A에 대한 토끼(rabbit) 일차항체 (IHC 8730, Peninsula Laboratories, Inc., LAB-SA : 1 : 500)로 슬라이드들이 처리된 후 습윤상자 내에 4°C에서 18시간 동안 방치되었다. TBS로 충분히 세척된 조직 슬라이드들은 이차 항체인 link 용액(DAKO)으로 20분간 처리되었다. 다시 TBS 수세 후 Streptavidine peroxidase로 20분간 처리 되었고 또 TBS로 10분간 수세 후 조직 슬라이드들은 3-amino-9-ethylcarbazole(AEC) substrate-chromogen으로 발색 처리 되었다. 대조염색으로 Mayer hematoxylin 염색이 모든 조직 슬라이드에서 시행되었다. 발색과정이 끝난 조직 슬라이드들은 증류수로 세척 후 Universal mount로 봉입되었다.

3) 해마내 DYNIR 부위에 대한 검정

신경원세포의 축삭 종말이 분포하는 부위나 세포체의 세포질에서 검경상 진한 주황색을 발하는 부위가 DYNIR 양상으로 판정되었고 신경망(neuropil)이나 신경원 세포핵 혹은 신경교세포의 배경 염색과 명확하게 구별되었다. 해마의 세부구조는 Lorente de No의 구획²⁰⁾에 따라 CA4, CA3, CA2, CA1 피라미드세포층 및 과립세포층으로 구분되었다. CA4와 CA3의 일부중 과립세포층으로 둘러싸인 부위는 hilus로 별도 구분되었다. 또한 신경원세포층 외의 신경교세포나 중간신경원세포(interneuron) 등이 분포하는 세포섬유층 역시 Lorente de No의 분류에 따랐다.

결 과

1. 대조군의 해마 DYNIR 양상

9례의 조직 표본 모두에서 DYNIR인 신경 축삭 섬유들이 hilus와 CA3 주변의 투명층(stratum lucidum)까지 나타나 보였으며 DGN의 세포질과 외분자층에서도 옅은

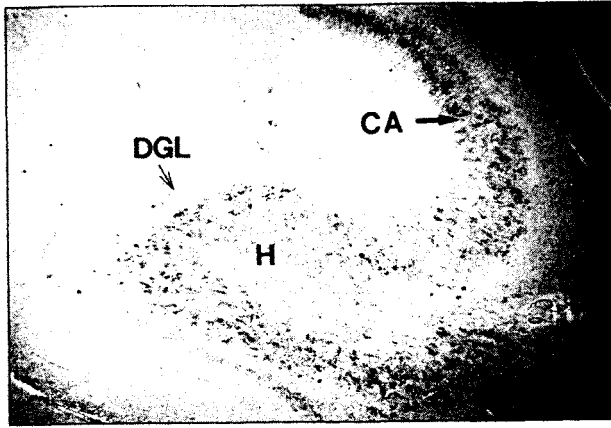


Fig. 1. Dynorphin immunoreactivity in control hippocampus. Dynorphin immunoreactive synapses are demonstrated throughout hilus (H) and CA3 (CA) region. DGL : dentate granular cell layer. X 20, Dynorphin immunohistochemical staining.

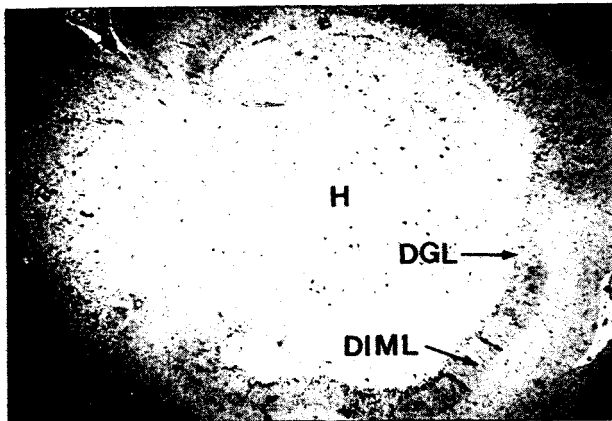


Fig. 2. Dynorphin immunoreactivity pattern I. Dynorphin immunoreactive band (↔) appears in dentate inner molecular layer (DIML). (DGL : dentate granular cell layer ; H : hilus) X20, Dynorphin immunohistochemical staining.

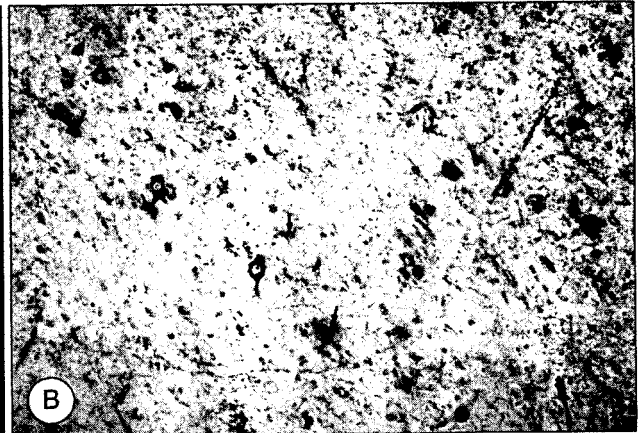
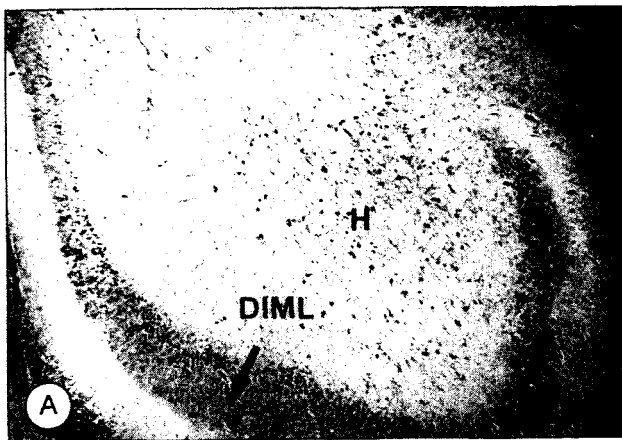


Fig. 3. Dynorphin immunoreactivity pattern II. A : Dynorphin immunoreactive band appears in dentate inner molecular layer (DIML) and dynorphin immunoreactive synapses are seen in hilus(H). X20, Dynorphin immunohistochemical staining B : Dynorphin immunoreactive synapses(arrows) around hilar neurons. X100, Dynorphin immunohistochemical staining.

반응도가 관찰되었다. 하지만 내분자층이나 다른 신경원세포 섬유층, CA1, CA2, CA3 등의 세포층에서는 DYNIR 이 나타나지 않았다(Fig. 1).

2. 측두엽간질 환자의 해마 DYNIR 양상

1) 유형 I

4례에서 치상회 내분자층(DGIML)에 국한된 IDYNIR 대가 나타났다(Fig. 2).

2) 유형 II

4례에서 DGIML의 DYNIR대와 hilus의 신경원세포와의 시냅스 부위에서의 DYNIR가 나타났다(Fig. 3).

3) 유형 III

1례에서 DGIML의 DYNIR대와 hilus의 신경원세포와의 시냅스 부위 및 CA3의 신경원세포의 선단 수상돌기(apical dendrite)와의 시냅스 부위에서 DYNIR가 나타났다(Fig. 4).

4) 유형 IV

1례에서 hilus와 CA3의 신경원세포와의 시냅스 부위에서 DYNIR가 열게 나타났으나 DGIML에서의 DYNIR 대는 나타나지 않았다(Fig. 5).

5) 유형 V

1례에서 CA3의 신경원세포와의 시냅스 부위에서 DYNIR가 나타났으며 hilus와 DIML에서는 치상회의 한쪽편 반측에서만 나타났고 다른편 반측에서는 나타나지 않았다(Fig. 6).

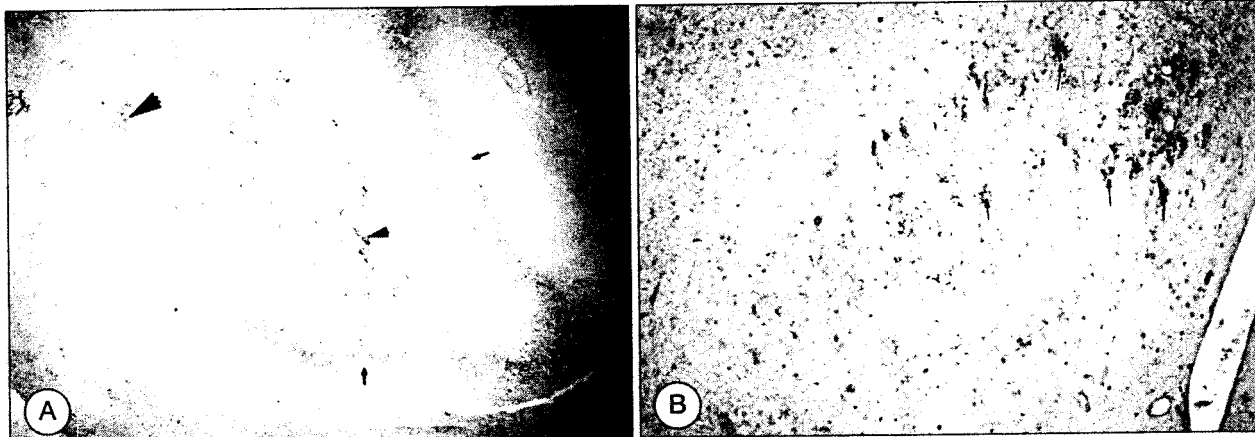


Fig. 4. Dynorphin immunoreactivity pattern III. A : Dynorphin immunoreactive band(arrows) is seen in dentate inner molecular layer (DIML). Dynorphin immunoreactive synapses (arrowheads) are demonstrated in hilus (H) and CA3 region. X20, Dynorphin immunohistochemical staining. B : Dynorphin immunoreactive synapses (arrows) around CA3 region near stratum lucidum. X100, Dynorphin immunohistochemical staining.

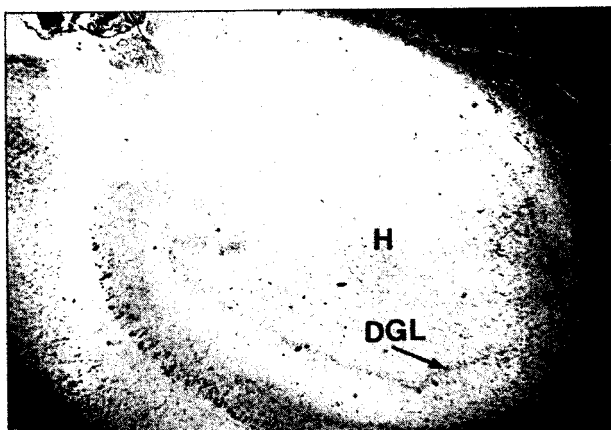


Fig. 5. Dynorphin immunoreactivity pattern IV. No dynorphin immunoreactivity is seen throughout DIML despite severe neuronal loss in all sectors of hippocampus. (DGL : dentate granular cell layer) X20, Dynorphin immunohistochemical staining.

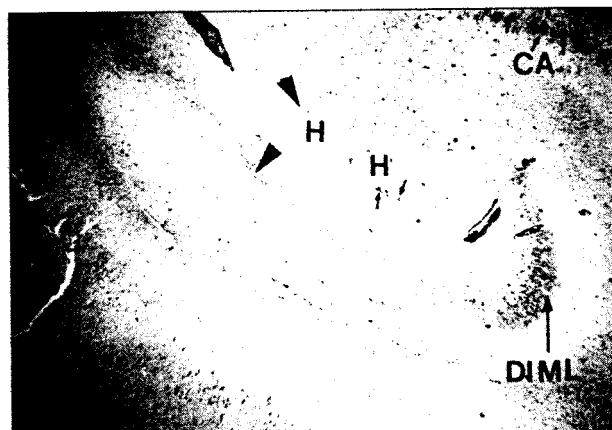


Fig. 6. Dynorphin immunoreactivity pattern V. At one side of dentate gyrus(arrows), dynorphin immunoreactivity is seen in hilus (H) and inner molecular layer (DIML) while no dynorphin immunoreactivity is demonstrated at the other side (arrowheads). In CA3 (CA), dynorphin immunoreactive synapses are seen (arrows). X20, Dynorphin immunohistochemical staining.

고찰

Dynorphin(Dyn)은 정상 해마조직에서는 주로 CA3의 선단수상돌기와 시냅스하는 치상회와 과립형 신경원세포의 축삭 말단에 분포한다고 알려져 있다.¹²⁾ 그리고 간질에 대한 동물 실험에서는 발작시 과립형신경원세포로부터 다량의 Dyn이 유리된다고 하며 그러한 Dyn 대사과정의 의미는 아직까지 명확히 알려져 있지 않다.¹³⁻¹⁸⁾ 근래들어 해마경화를 보이는 내측두엽간질 환자에서의 해마 DYNIR에 대한 연구가 de Lanerolle 등에 의해 시행되어 DGIML에서 DYNIR 대가 형성됨을 보고하였고³⁻⁵⁾ 최근의 연구에서 de Lanerolle 등은 DGIML의 DYNIR 대가 형성되지 않는

측두엽간질도 있음을 보고하였다.¹⁹⁾ 그러한 측두엽 간질에서 다른 병리 소견은 없었고 해마 신경원세포의 소실이 비교적 심하지 않았다.

본 연구에서는 내분자층의 DYNIR대가 9례(81.8%)에서 나타났고, 전형적인 DGIML 부위만의 DYNIR은 4례(36.4%), DGIML 및 그의 부위의 DYNIR은 5례(45.4%)에서 나타났다. 그리고 DGIML의 면역반응대가 나타나지 않은 경우가 1례에서 있었다. 이 경우 de Lanerolle 등의 연구 결과¹⁹⁾와 달리 해마 신경원세포의 소실이 매우 심했다. DGIML의 DYNIR대가 아마도 치상회 과립형 신경원세포 축삭의 시냅스 재형성에 의한 것이라는 보고들로 판단할 때 DGIML의 Dyn 면역반응대가 나타나지 않은 경우에 대한

de Lanerolle 등의 연구 결과는 해마의 신경원세포의 소실이 적었기 때문에 DGN의 시냅스 재형성이 일어나지 않았다라는 설명이 가능하나 본 연구의 증례에서는 신경원세포의 소실이 컸기 때문에 그와 같은 기전으로 설명이 되지 않는다. 또한 모든 증례에서 마지막 간질 발작이 1주 이내에 있었던 경우는 없었다. 따라서 DYNIR가 나타나지 않음이 발작에 의한 Dyn의 과다 유리에 의한 것으로 추정하는 것은 불가능하다. 본 연구의 1례에서 나타난 신경원세포소실이 심하면서 DGIML 면역반응대가 나타나지 않은 경우는 아마도 기전이 다른 간질일 가능성이 높다. 본 연구에서는 DGIML뿐만 아니라 hilus나 CA3에서도 면역 반응이 나타났다. 이는 정상에서 나타나는 면역반응이 여전히 남아 있기 때문이라고 추정해 볼 수 있다. 즉 hilus와 CA3의 신경원세포들과 시냅스 하는 DGN의 축삭의 일부가 아직 남아 있어서 면역반응이 나타났다고 가정해 볼 수 있다. 이것이 정상적인 시냅스가 남아 있는 것인지 아니면 시냅스 재형성에 의한 것인지는 이 연구로서는 판단할 수 없다. 본 연구에서 또 다른 흥미로운 점은 CA3에 면역 반응이 나타나면서 치상회의 한쪽 반 부위에서는 면역반응이 없으나 다른 반쪽 부위에서는 DGIML과 hilus에서 면역반응이 나타나

는 1례이다. 이 증례에서 면역반응이 없는 쪽의 hilus내에는 신경원세포들이 없었으나 면역반응이 있는 쪽의 hilus에서는 신경원세포들이 남아 있으며 남아있는 세포들과의 시냅스 부위에서 면역반응을 보이고 있다. 그런 한편으로 과립형세포층의 세포소실도의 차이는 없어 보인다. 이와 같은 상반된 세포손상 양상과 면역반응도가 동일한 해마에서 나타난 이유는 이 연구의 결과관으로는 설명이 불가능하다.

해마경화를 보이는 난치성 측두엽간질은 치상회 내분자층에서 특징적인 dynorphin 면역반응대를 나타낼 뿐만 아니라 정상 해마에서와 같은 CA3 주변이나 hilus에서 면역 반응을 나타내기도 하며 내분자층에서 면역반응이 나타나지 않는 등의 다양한 dynorphin 면역반응 양상을 나타내는 것이 본 연구를 통해 밝혀졌다. 향후 다양한 양상의 면역 반응이 발작이나 간질의 기전 및 세포손상 기전 등과 어떠한 관련성이 있는지에 대한 연구가 요구된다.

중심 단어 : 측두엽간질 · 해마경화 · Dynorphin 면역반응.

- 논문접수일 : 1999년 1월 9일
- 심사통과일 : 1999년 1월 25일

REFERENCES

- 1) McLean S, Rothman RB, Jacobson AE, Rice KC, Herkenham M. Distribution of opiate receptor subtypes and enkephalin and dynorphin immunoreactivity in the hippocampus of squirrel, guinea pig, rat, and hamster. *Journal of Comparative Neurology* 1987; 255:497-510.
- 2) Fallon JH, Leslie FM. Distribution of dynorphin and enkephalin peptides in the rat brain. *Journal of Comparative Neurology* 1986; 249:293-336.
- 3) de Lanerolle NC, Kim JH, Robbins RJ, Spencer DD. Hippocampal interneuron loss and plasticity in human temporal lobe epilepsy. *Brain Research* 1989; 495:387-95.
- 4) de Lanerolle NC, Kim JH, Brines ML. Cellular and Molecular Alterations in Partial Epilepsy. *Clinical Neuroscience* 1994; 2:64-81.
- 5) de Lanerolle NC, Magge SN, Philips MF, Trombley P, Spencer DD, Brines M. Adaptive changes of epileptic human temporal lobe tissue: Properties of neurones and glia. In: Wolf P, ed. *Epileptic Seizures and Syndromes*. London: John Libbey & Co. Ltd., 1994:431-48.
- 6) Sloviter RS. The functional organization of the hippocampal dentate gyrus and its relevance to the pathogenesis of temporal lobe epilepsy. *Ann Neurology* 1994; 35:640-54.
- 7) Isokawa M, Levesque MF, Babb TL, Engel J. Single mossy fiber axonal systems of human dentate granule cells studied in hippocampal slices from patients with temporal lobe epilepsy. *Journal of Neuroscience* 1993; 13:1511-22.
- 8) Babb TL, Kupfer WR, Pretorius Jk, Crandall PH, Levesque MF. Synaptic Reorganization by mossy fiber in human epileptic fascia dentata. *Neuroscience* 1991; 42:351-63.
- 9) Houser CR, Miyashiro JE, Swartz BE, Walsh GO, Rich JR, Delgado-Escueta AV. Altered patterns of dynorphin immunoreactivity suggest mossy fiber reorganization in human hippocampal epilepsy. *Journal of Neuroscience* 1990; 10:267-82.
- 10) Elmer E, Kokaia M, Kokaia Z, Feencz I, Lindvall O. Delayed kindling development after recurring seizures: Relation to mossy fiber sprouting and neurotrophin, GAP-43 and dynorphin gene expression. *Brain Research* 1996; 712:19-34.
- 11) Simpson JN, Zhang WQ, Bing G, Hong JS. Kainic acid-induced sprouting of dynorphin- and enkephalin-containing mossy fibers in the dentate gyrus of the rat hippocampus. *Brain Research* 1997; 747:318-23.
- 12) Wagner JJ, Evans CJ, Chavkin C. Focal stimulation of the mossy fibers release endogenous dynorphins that bind k1-opioid receptors in guinea pig hippocampus. *Journal of Neurochemistry* 1991; 57:333-43.
- 13) Gall C. Seizures induce dramatic and distinctly different changes in enkephalin, dynorphin, and CCK immunoreactivities in mouse hippocampal mossy fibers. *Journal of Neuroscience* 1988; 8:1852-62.
- 14) Hong JS, McGinty JF, Lee PHK, XiE CW, Mitchell CL. Relationship between hippocampal opioid peptides and seizures. *Progress in Neurobiology* 1993; 40:507-28.
- 15) Harrison MB, Shumate MD, Lothman EW. Opioid peptide expression in models of chronic temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 1995; 65:785-95.
- 16) Simnato M, Romualdi P. Dynorphin and Epilepsy. *Progress in Neurobiology* 1996; 50:557-83.
- 17) Iadarola MJ, McNamara JO, Shin C, Yang HYT. Changes in dynorphin, enkephalin

- and cholecystokinin content of hippocampus and substantia nigra after amygdala kindling. *Brain Research* 1986;365:185-91.
- 18) Xie CW, Lee PHK, Takeuchi K, *et al.* Single or repeated electroconvulsive shocks alter the levels of prodynorphin and proenkephalin mRNAs in rat brain. *Molecular Brain Research* 1989;6:11-9.
- 19) de Lanerolle NC, Williamson A, Meredith C, Kim JH, Tabuteau H, Spencer DD, Brines ML. Dynorphin and the kappa 1 ligand [³H]U69,593 binding in the human epileptogenic hippocampus. *Epilepsy Research* 1997;28:189-205.
- 20) Lorente de No R. Studies on the structure of the cerebral cortex II. Continuation of the study of the Ammonic system. *J Psychol Neurol(Leipzig)* 1934;46:114-77.