

# 실험적 쥐 대뇌 피질이형성증의 발현과정에 있어 아포토시스의 역할

이 윤 진 · 정 천 기

서울대학교 의과대학 신경외과학교실, 서울대학교병원 임상의학연구소, 서울대학교 의과대학 연구원 신경과학연구소

## Role of Apoptosis in Development of Experimental Rat Cerebral Cortical Dysplasia

Yun Jin Lee, M.S. and Chun Kee Chung, M.D., Ph.D.

Department of Neurosurgery, Seoul National University College of Medicine, Clinical Research Institute, Seoul National University Hospital, Neuroscience Research Institute, Seoul National University Medical Research Center, Seoul, Korea

Microgyria is one type of cortical dysplasia with dyslamination and anomalous cell densities, which could be produced experimentally. In a normal rat cortical development, overproduced neuroblasts gradually die by apoptosis. Thus, the diminished apoptosis may lead to the anomalous cell densities and dyslamination. This study examined the ontogeny of cell densities in rat microgyria, in homotopic contralateral cortex and in control cortex. Multiple applications of cold probe ( $-70^{\circ}\text{C}$ ) on the right hemisphere in postnatal day (PN) 0 rat pups produced unilateral microgyria. Cell densities had decreased from PN 1 to 2 in microgyria, in the contralateral left hemisphere, and in the control cortex. From PN3 to PN10, while the cell

density of the microgyria had increased ( $p < 0.001$ ), cell densities of the control and homotopic area continued to decrease. Apoptosis was greater in the microgyria than in the control and left hemisphere from PN1 to 3 and then remarkably decreased ( $p < 0.001$ ). These results suggest that the increased cell density in microgyria is not from decreased apoptosis, but probably caused by the increased proliferation or migration. (J Korean Epilep Soc 2003;7(2):101-107)

**KEY WORDS** : Microgyria · Apoptosis · Rat freezing model · Cortical dysplasia · Cell migration.

## 서론

대뇌 피질이형성증(cortical dysplasia)은 지능 박약, 발달 장애 및 간질을 일으킬 수 있는 것으로 잘 알려진 병리소견이며 간질로 수술을 받은 환자에서 해마의 위축에 이어 두 번째로 흔한 원인으로 생각되고 있다. 대뇌 피질이형성증은 대뇌 피질의 발달 과정의 장애를 가진 모든 중

류의 형태학적 변화라고 정의할 수 있으며 유전적 영향 및 환경적 요인을 포함한 비유전적 요인 등에 의해 대뇌 피질이형성증이 발생할 수 있다. 이러한 피질의 발달과정은 세포의 증식, 신경세포의 이주, 신경세포의 분화 및 신경전구세포와 신경세포의 아포토시스(apoptosis), 시냅스의 삭제, 신경가지의 가지 뻗기와 피질의 재구조화로 크게 나누어 생각해 볼 수 있다.<sup>1)</sup> 이런 여러 가지의 과정 중 어느 하나라도 잘못되면 피질의 구조장애가 나타나고 따라서 피질의 전기생리학적 장애, 즉 간질이 나타난다고 유추할 수 있다.<sup>2)</sup> 정상 신경계의 발달과정 중의 하나인 아포토시스가 이러한 대뇌 피질 발달 장애에 기여할 가능성에 대해서는 여러 저자들이 보고한 바 있다. 그러나 아포토시스가 대뇌 피질이형성증에 관여한다는 직접적인 증거는 보고된 바 없다. 아포토시스가 작은 뇌이랑중(microgyria)을 포함한 대뇌 피질이형성증과 관계가 있다는 것

Received 7 November 2003

Accepted 22 November 2003

**Corresponding author:** Chun Kee Chung, M.D., Ph.D., Department of Neurosurgery, Seoul National University College of Medicine, 28 Yeongeong-dong, Jongno-gu, Seoul 110-744, Korea

E-Mail: chungc@snu.ac.kr

This work was supported by a grant from the Seoul National University Hospital (05-1997-003-0).

이 증명된다면 이는 처음으로 대뇌 피질이형성증의 발현 과정에 대한 확실한 기전을 밝히는 것이 된다. 본 실험을 통하여 대뇌 피질이형성증과 아포토시스의 관계를 밝히게 된다면 현재 아포토시스를 유발시킬 수 있는 여러 가지 방법들이 알려져 있으므로 대뇌 피질이형성증에 대한 새로운 치료방법을 개발할 가능성이 있다고 생각된다. 따라서 본 연구에서는 실험적으로 유발한 대뇌 피질이형성증에서 관찰되는 신경 세포 수와 아포토시스와의 관계를 규명하여 아포토시스와 그들의 상관관계를 살펴보기 위하여 연구를 수행하였다.

## 연구대상 및 방법

### 작은 뇌이랑증의 동물 모델 및 표본 개취

출생직후(postnatal day 0, PNO)의 Sprague-Dawley 쥐를 저 체온유도로 마취하고 두부 정중선을 따라서 피부를 절개하여 두개골을 노출시켰다. 직경 2 mm인 스테인레스 스틸 팁을 드라이아이스로 냉각하여 -70°C로 유지시킨 메틸 부탄에 담가두었다가 두개골에 5초 동안 접촉시켰다. 절개선을 봉합하고 어미 쥐에게 되돌려주었다. 미리 정해진 날짜에 펜토바비탈을 60 mg/kg 복강 내 주사하여 동물을 깊이 마취시킨 상태에서 생리식염수를 1분간, 4% 파라포름알데히드(parafomaldehyde)를 3~5분간 심장 내 관류시켜서 희생시켰다. 즉시 뇌를 꺼내어 같은 고정액인 4% PFA에 24시간 고정시킨 후 25% 슈크로스(sucrose)/1X 인산염 완충식염수(phosphate buffered saline, pH 7.4)에 조직이 가라앉을 때까지 놓아두어 동결 보호하였다. 잘게 부순 드라이 아이스 속에서 급냉시키고 동결절편기에서 절편을 만들었다. 절편은 작은 뇌이랑증이 유도된 곳을 광상단면을 따라 연속적으로 만들었다. 절편의 두께는 10 μm로 하고 실레인(silane)으로 코팅된 슬라이드(DAKO, Denmark)에 절편을 붙였다.

### 니슬(Nissl) 염색

조직을 잘라내어 2~3시간 말린 후에 클로로포름에 1시간 담그어 지질을 제거하고 2분간 실온에서 건조시킨 뒤 함수과정으로 100%, 95%, 70% 에탄올에서 각각 5분씩 담근 후 아세트산 5방울을 떨어뜨린 삼차중류수에 담그었다. 그리고 나서 크레질 바이올렛(cresyl violet, Sigma, USA) 염색액에 2분간 담그어 조직을 염색하고 70% 에탄올에서 적당히 색깔을 감별한 뒤 에탄올로 탈수 및 자일렌으로 세척한 후 퍼마운트(Permount; Fisher Scientific, USA)로 봉입하여 커버글라스를 덮었다.

### 아포토시스 염색

영하 70°C에 보관된 슬라이드를 꺼내어 실온에서 1시간 이상 건조시킨 뒤 1X 인산염 완충식염수에 5분씩 3번 세척하였다. 프로티네이스 케이(Proteinase K; DAKO, Denmark)를 1 : 10으로 희석하여 15분간 실온에서 가한 후 슬라이드를 1X 인산염 완충식염수로 2분 간격으로 네 번 세척하였다. 여기에 3% 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)를 상온에서 5분간 가하여 자체의 과산화 효소를 불활성화 시켰다. 슬라이드를 1X 인산염 완충식염수로 5분씩 3번 세척한 후 평형완충액(equilibration buffer)에 적어도 실온에서 10초 이상 반응시킨 뒤 TdT 효소 33 μl에 반응 완충액(reaction buffer) 77 μl를 넣어 섞은 용액을 슬라이드에 가하고 37°C 습윤함에서 1시간 놓아두었다. 다음에 슬라이드를 상온의 반응 정지완충액(stop/wash buffer)에서 15초간 흔들어 준 뒤 10분간 반응시켜 TdT반응을 완료 시켰다. 슬라이드를 1X 인산염 완충식염수로 5분간 3번 닦아내고 anti-digoxigenin peroxidase conjugation을 30분간 반응시키고 다시 1X 인산염 완충식염수로 세척하였다. 반응이 끝난 조직은 10 mg Diaminobenzidine (DAB)를 15 ml PBS에 녹이고 5 μl의 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 DAB 용액에 넣고 주사기용 여과기로 걸러내어 5분 정도 발색시켰다. 발색이 완료된 조직 슬라이드를 일차 증류수로 세척한 뒤 에탄올로 탈수 및 자일렌으로 세척한 후 퍼마운트로 봉입하여 커버글라스를 덮었다.

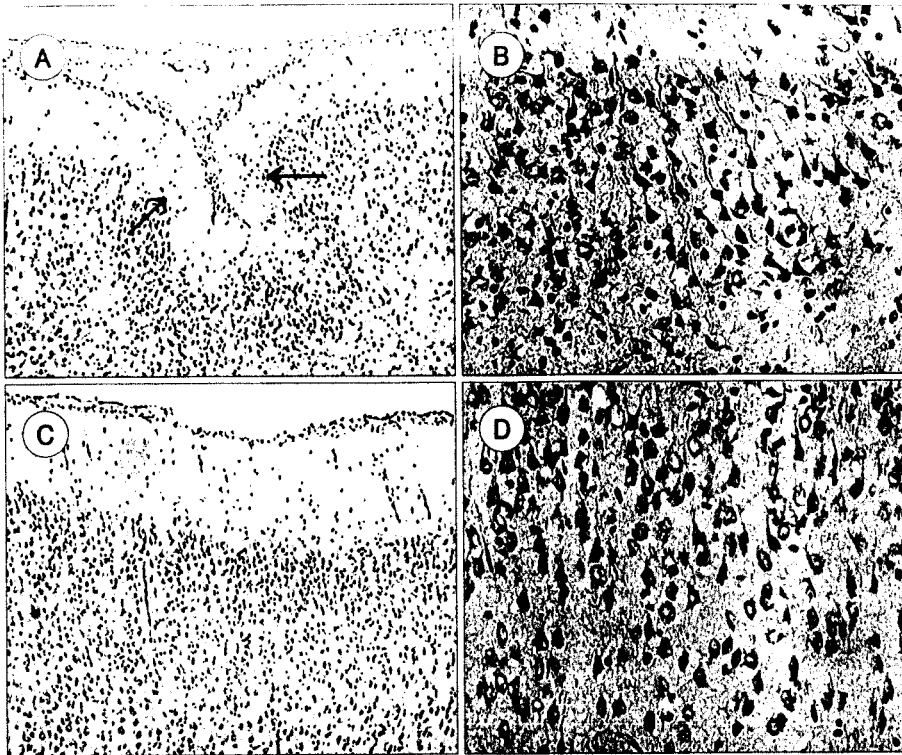
### 니슬 염색과 아포토시스의 세포 수 측정과 통계적 분석

니슬 염색과 아포토시스 염색의 각각에서 정상대뇌반구(control)와 병변부위(microgyria), 병변부위 대뇌반구의 상응하는 부위(homotopic area)에서 양성 세포의 수를 세어 세포 수를 측정하였다. 세포 수 측정은 40배 대물렌즈를 사용하였고, 1 mm<sup>2</sup>의 세포 수 세기용 격자를 사용하였으며 정상대뇌반구와 병변부위, 병변부위 대뇌반구의 상응하는 부위의 각각의 세포치밀층에서 5구간을 세었다. 여기서 측정된 세포 수를 이용하여 히스토그램을 그려서 분포도를 나타내었고, SPSS 10.0을 이용하여 유의성을 알아보기 위해 각 출생 후 날짜(postnatal day)별로 Paired-samples t test를 이용하여 분석하였다.

## 결 과

### 니슬 염색에서의 신경 세포 수 측정과 통계적 분석

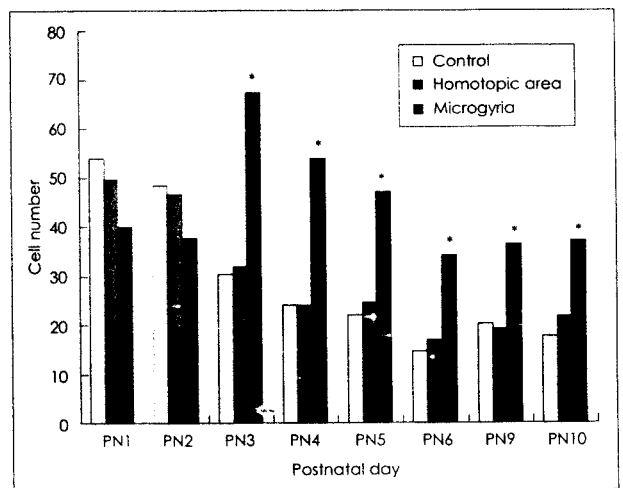
니슬 염색 결과 출생 1일(PN1)의 뇌 조직은 우측 대뇌반구의 작은 뇌이랑을 보여주며 피질 두께가 얇고 비정상



**Fig. 1.** Photomicrographs of nissl's staining of rat pup cold-lesioned on PN0. A : Cold-lesion of PN0, resulted in typical microgyria showing deep false sulcus (between arrows), anomalous cell densities and dyslaminations and surrounding cell-dense layer sacrificed on PN10, (original magnification  $\times 40$ ). B : High magnifications of dyslaminated neurons in microgyria from the box A (original magnification  $\times 200$ ). C : Cold-lesion of PN0, in homotopic area-homologous cortical layer II-III contralateral to the box in A, showing normal cortical cell densities and laminations sacrificed on PN10 (original magnification  $\times 40$ ). D : High magnifications of normal neurons in homotopic area from the box C (original magnification  $\times 200$ ).

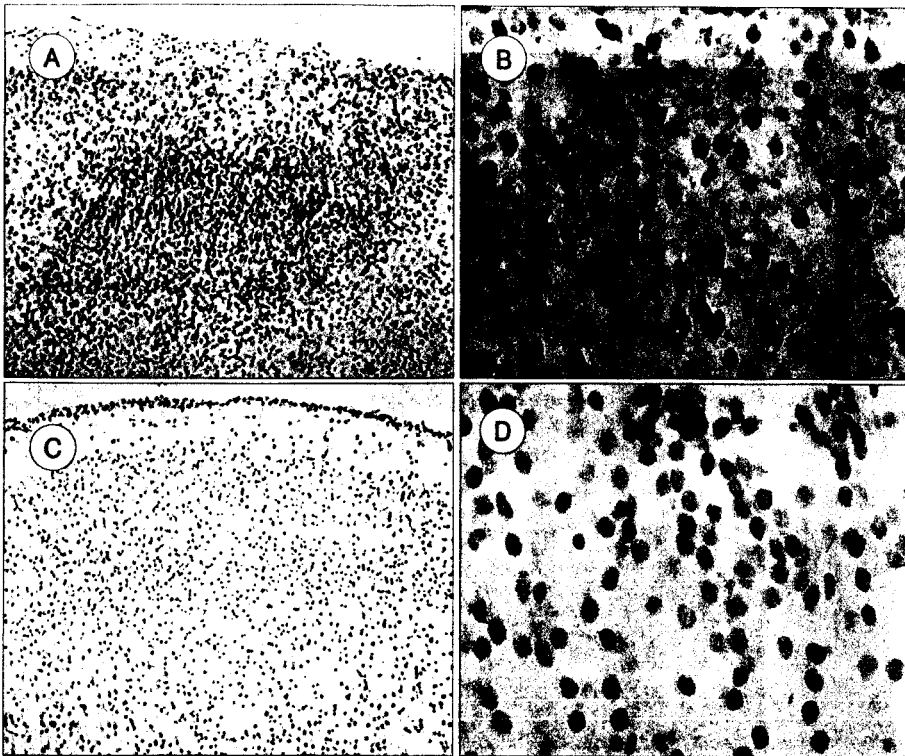
적으로 관찰되었다. 작은 뇌이량은 네 개의 층으로 이루어졌는데 첫 번째는 주변 정상조직과 연결되는 분자층(molecular layer)이다. 두 번째는 주변조직의 제 2~3 층과 해당되는 세포치밀층(cell-dense layer)이다. 이 층은 주변의 제 2~3 층에 비해서 훨씬 두꺼웠고 신경세포의 배열도 불규칙했다. 세 번째 층은 세포희박층(cell-sparse layer)로서 주변의 제 4~6 층은 병변 부위에서 갑자기 사라지면서 이 층으로 교체되는 소견을 보였다. 네 번째 층은 깊은 신경세포층(deep neuronal layer)으로서 주변조직의 6b 층과 연결되어 있었다. 우측 대뇌반구는 좌측 대뇌반구에 비해 전반적으로 위축된 소견이 있었다. 한편, 출생 10일째의 병변부위의 뇌 조직(Fig. 1A, B)의 병변의 영역은 출생 1일 때의 크기와 비슷하였고 신경세포의 이주가 거의 끝난 상태이며 눈으로 확인할 수 있는 깊은 고랑을 관찰할 수 있었다. 그러나, 출생 직후의 뇌 조직과는 달리 층도 비교적 잘 유지되고 있었으며, 정상적인 피질 세포의 밀도를 보여주고 있음을 알 수 있었다. 또한, 병변부위 대뇌반구의 상응하는 부위의 뇌 조직은 Fig. 1C, D와 같이 정상대뇌반구의 뇌 조직과 다름없는 밀도와 잘 유지된 층들을 볼 수 있었다.

신경 세포의 수는 Fig. 2에서 보듯이 정상대뇌반구와 병변부위 대뇌반구의 상응하는 부위는 출생 1일과 출생 2일 이후 출생 3일에서 급격한 감소를 보이나 출생 4일 이



**Fig. 2.** Histogram representing Mean of cell density among the cell-dense layer of microgyria, layers II-III of the contralateral hemisphere, and control from PN1 through PN10. \* : There was statistically significant difference in cell density of microgyria from PN3 through PN10 ( $p=0.0001$ , paired t-test).

후에는 일정한 수준을 유지하고 있다. 그러나, 이에 비해 병변 부위에서는 출생 3일에서 매우 높은 값을 나타내고 점차 감소하였다. 또한, 출생 1일에서 출생 2일까지는 병변부위에서 보다 정상대뇌반구와 병변부위 대뇌반구의 상응하는 부위가 더 높게 나타나지만, 출생 3일에서부터는 정상 대뇌반구와 병변부위 대뇌반구의 상응하는 부위에서 보다 병변부위가 더 높게 나타나는 것을 볼 수 있었다. 정



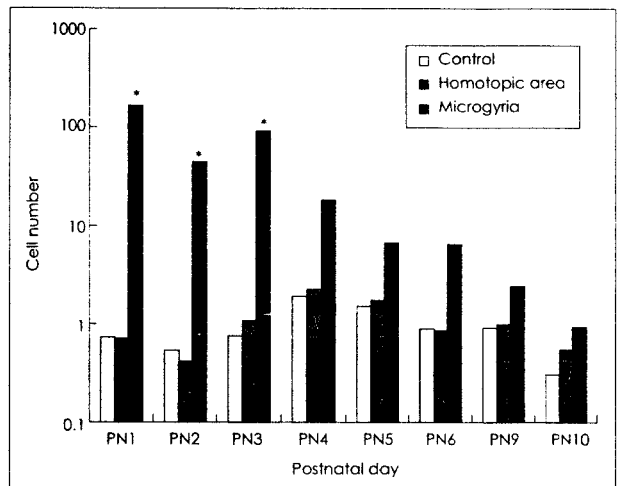
**Fig. 3.** Photomicrographs of apoptosis staining of rat pup cold-lesioned on PNO. A : Cold-lesion of PNO, resulted in microgyria showing many apoptotic cells in cell-dense layer sacrificed on PN3, (original magnification  $\times 40$ ). B : High magnifications of apoptotic cells in microgyria from the box A (original magnification  $\times 200$ ). C : Cold-lesion of PNO, in homotopic area-homologous cortical layer II-III contralateral to the box in A, showing few apoptotic sacrificed on PN3 (original magnification  $\times 40$ ). D : High magnifications of apoptotic cells in homotopic area from the box C (original magnification  $\times 200$ ).

상대뇌반구와 병변부위, 병변부위 대뇌반구의 상응하는 부위의 세포 수를 이용하여 Paired-samples t test를 하여 보면 출생 3일 이후 출생 10일까지 모두  $p=0.0001$  ( $p < 0.001$ )의 통계학적으로 유의한 차이를 보였다.

**아포토시스 염색에서의 세포 수 측정과 통계적 분석**

아포토시스 염색의 결과 Fig. 3의 A와 B에서 보듯이 병변부위에서 거의 대부분의 아포토시스를 보이는 세포들은 정상피질의 제 2~3층에 해당하는 세포치밀층에서 관찰되고, 다른 층에서의 아포토시스는 일부분 혹은 거의 무시할 정도만 관찰할 수 있었다. 또한, 아포토시스는 손상(lesion)을 준 초기에 해당하는 출생 1일에서 출생 3일 사이에서 많은 아포토시스가 일어나고 있음을 알 수 있었고 그 이후에도 약간의 아포토시스는 계속적으로 일어나고 있으나 상당히 감소하는 경향을 보이고 있다. 그러나, 이와 반대로 정상대뇌반구와 병변부위 대뇌반구의 상응하는 부위는 Fig. 3의 C와 D에서와 같이 아포토시스가 거의 일어나지 않은 것을 볼 수 있었으며 이러한 관찰은 실험 전 기간에 걸쳐 비슷하게 보여지고 있다.

아포토틱 세포(apoptotic cell)는 Fig. 4에서 볼 수 있는 것처럼 작은 뇌이랑중 유도 후 1일에서 10일까지 지속적으로 관찰할 수 있었으며 정상대뇌반구와 병변부위 대뇌반구의 상응하는 부위의 아포토틱 세포는 약간의 수



**Fig. 4.** Histogram representing mean number of apoptotic cells in the cell-dense layer of microgyria, layers II-III of the contralateral hemisphere, and control from PN1 through PN10. \* : There was statistically significant difference in apoptotic cells of microgyria from PN1 through PN3. ( $p=0.0001$ , paired t-test).

만이 관찰되고 출생 1일에서 출생 19일까지의 기간동안 커다란 변화가 없었다. 이에 비해 병변부위의 아포토틱 세포는 출생 1일에서 출생 3일까지 매우 많은 수가 관찰되었고 그 이후로 갈수록 현저히 감소함을 볼 수 있었다. 또한, 정상대뇌반구와 병변부위, 병변부위 대뇌반구의 상응하는 부위의 세포 수를 이용하여 Paired-samples t test를 하여보면 출생 1일에서 출생 3일까지 모두  $p=0.0001$

( $p < 0.001$ )의 통계학적으로 유의한 차이를 보였다.

## 고 찰

대뇌 피질이형성증은 형태학적으로는 다음에 열거하는 9가지의 특징을 가지고 있다. 첫째, 피질 층 구조장애, 둘째, 백색질내 이소성 신경 세포들, 셋째, 신피질 분자층에서의 신경 세포들, 넷째, 연질막밑 과립 세포층 지속성, 다섯째, 가장자리 아교신경세포 이소증, 여섯째, 백색질 신경세포 이소증, 일곱째, 못미세이랑증(polymicrogyria), 여덟째, 세포골격 이상과 연관된 신경세포의 세포비대증, 아홉째, 풍선세포 변화이다. 이러한 특징들은 피질 발달 단계상 일정한 시간대에 일어난 사건들을 반영한다고 생각되고 있고, 따라서 이러한 형태학적 특징들을 태생기에 따라 조기(<15주), 중기(16에서 24주)와 말기(25주 이상)에 발생한 것으로 구분할 수 있다. 풍선세포와 신경세포의 세포비대증은 조기 발생과정의 장애로 생각되며, 못미세이랑증과 현미경적 신경세포 이소증은 중기, 가장자리 아교신경세포 이소들, 연질막밑 과립세포층 지속성, 신피질 분자층에서의 신경 세포들과 백색질내 이소성 신경세포들은 말기 태생기에 일어난 장애로 구분할 수 있다. 피질이형성증의 가장 큰 특징인 피질 층의 구조장애는 피질 발달 과정에 장애가 있었다는 것을 반영하며, 태생기 말기에 나타난다고 생각되고 있다.<sup>2)</sup> 이러한 작은 뇌이랑증은 해부학적으로, 또 피질의 층 구조의 연결을 포함한 피질의 배열과도 관련이 있다고 보고하고 있다.<sup>3-5)</sup> 게다가 신피질의 변형이 생길 때 또한 신경세포의 크기의 변화도 함께 가져온다고 한다.<sup>6-8)</sup>

대뇌 피질이형성증의 한 형태인 못미세이랑증이 이주장애, 최종 분화과정의 장애 및 아포토시스의 장애와 관계가 있을 것이라고 Rorke가 처음으로 주장하였다.<sup>9)</sup> 아포토시스는 신경계의 발달의 특징 중의 하나이다. 신경 세포들이 제한된 발육요인을 획득하지 못하거나, 본태적으로 가지고 있는 사망프로그램을 억제하는 데 필요한 시냅스를 형성하지 못하면 도태되게 된다.<sup>10-12)</sup> 사람의 경우 거의 대부분의 아포토시스를 보이는 세포들은 피질 제 2~3층에서 관찰되고, 일부분이 제 4층에서 관찰되게 된다. 제 5~6층에서의 아포토시스는 거의 무시할 정도만 관찰할 수 있다고 한다.<sup>13)</sup> 또한, 출생 후 1주일까지 아포토시스는 계속 증가해서 출생 후 6일에서 8일 사이에 최고에 달하고 그 후에는 감소한다고 한다.<sup>14-16)</sup> Miller는 피질에서 50%의 사이신경세포(interneuron)와 20%의 투사신경세포(projection neuron)들이 생후 6일에서 60일 사이에

아포토시스가 일어난다고 보고하였다.<sup>17)</sup> 과립피질(granular cortex)의 제 2~3층에서는 66.8%가 89.3%까지의 세포가 아포토시스가 일어난다고 하였다.<sup>18)</sup>

작은 뇌이랑증은 대뇌 피질이형성증의 한가지로 잘 알려져 있으며 동물실험모델이 사용 가능하다. 이러한 작은 뇌이랑증의 두 번째 층인 세포치밀층(cell-dense layer)은 정상 피질의 제 2~3층에 해당되고, 이 세포치밀층에서 아포토시스가 가장 많이 일어난다고 보고되고 있다.<sup>13,17)</sup> 구조적으로 인간의 대뇌 피질이형성증과 유사한 변화를 가지고 있는 동물모델들이 알려져 있다. 동계번식 모델로는 릴러(reeler) 생쥐가 알려져 있고,<sup>18,19)</sup> 그 외에도 실험동물의 태생기에 방사선을 조사하거나, 독성 물질을 투여하면 백색질 신경세포 이소증과 가장자리 아교신경세포 이소증을 유발시킬 수 있다고 한다.<sup>20-23)</sup> 이러한 태생기에 손상을 가할 때 손상의 성질보다도 손상이 가해지는 시점이 더 중요하다고 알려져 있다.<sup>24)</sup> Sarnat는 조기(태생기 20주전) 이주 장애에서는 주로 유전적인 요인이 작용하고, 말기 이주 장애는 손상에 의해 발생한다고 주장하였다.<sup>1)</sup> Jellinger는 영아연축을 나타냈던 환자들에 대한 부검결과 10%의 환자에서 선천성 기형과 손상의 증거가 같이 존재한다고 보고하였다.<sup>25)</sup> 그는 또 손상이 가해진 태생기의 시점과 이후에 발생하는 기형간에 연관이 있다고 하였다. 이러한 손상의 증거들과 대뇌 피질이형성증이 같이 존재한다는 사실들은 두 가지 사이에 원인-결과관계가 있을 수 있다는 것을 나타낸다. 대뇌 피질이형성증이 피질의 손상을 촉진할 가능성이 있고, 반면에 태생기 초기에 손상이 가해지면 대뇌 피질이형성증이 나타날 가능성도 있다. Dvorak 등은 출생 직후의 쥐에게 냉동손상을 가하여 못미세이랑증을 유발하였다. 쥐에서는 출생 후 2일에서 3일까지는 신경세포의 이주가 계속된다.<sup>26,27)</sup> 즉, 사람의 경우와 비교하면 태생기 18주에서 24주까지의 기간에 해당된다.<sup>25)</sup> 대뇌 피질은 제일 깊이 있는 제 6층이 제일 먼저 이주를 완료하고, 그 후 5~2층의 순서로 이주를 한다. 출생 직후에는 이때 이주를 마친 피질 제 4~6층이 바깥쪽에 있게 되므로 냉동손상을 가하면 이 층(제 4~6층)에서만 괴사가 일어나고, 아직 이동을 끝마치지 않은 피질 제 2층과 3층은 이 괴사지역을 통과하여 바깥쪽으로 이주를 하게 되지만 층이 확실하게 구분되지 못하고 섞이게 된다. 따라서 정상 피질은 6개 층으로 이루어지지만 못미세이랑증은 4개 층만으로 구성된다. 첫 번째 층은 분자층, 두 번째 층은 세포치밀층(정상 제 2층과 3층이 섞여진 층), 세 번째 층은 세포희박층(정상 제 4, 5, 6a층이 괴사되어 세포수가 희박한 층)와 깊은 신경세포층

(정상 피질의 제 6b 층)로 구성된다. 뭇미세이랑증의 두 번째 층은 정상 제 2층과 3층을 합친 것보다 두껍게 되고, 세포수도 많이 된다. 세포가 많아지는 것은 두 가지 중의 한 가지로 생각할 수 있다. 첫째, 신경세포 이주 중에 외부손상이 가해지므로 이러한 요인이 뇌실층이나 뇌실하층에서 신경모세포의 증식을 촉진하여 생산된 세포가 많아지는 것이다. 두 번째는 생산된 세포의 수는 일정하나, 세포의 탈락이 감소하는 것이다. 즉, 신경세포의 정상적인 아포토시스가 감소하는 것이다.

첫 번째 가설에 대해서는 Dvorak 등이 냉동손상 모델에서 H3-thymidine을 신경세포 이주기에 반복 주입한 후 작은 뇌이랑증과 반대쪽 대뇌반구를 검사하였으나 표식된 신경세포를 관찰할 수 없었다.<sup>26,27)</sup> 즉, 냉동 손상이 가해진다고 해서 신경모세포의 증식이 증가하였다는 증거를 찾을 수 없었다. 따라서 Dvorak 등의 결과에서는 작은 뇌이랑증의 두 번째 층인 세포치밀층은 세포증식의 증가에 기인하는 것은 아니라는 것이 확인되었다.<sup>27,28)</sup>

두 번째 가설에 대해서는 뭇미세이랑증은 이주장애, 최종 분화과정의 장애 및 아포토시스의 장애와 관계가 있을 것이라고 보고된 바 있다.<sup>9)</sup> 이는 피질이형성증의 가장 큰 특징인 피질 층의 구조장애는 피질의 발달과정 즉, 세포의 증식, 신경세포의 이주, 신경세포의 분화, 신경전구세포와 신경세포의 아포토시스, 시냅스의 삭제, 신경가지의 가지 뻗기와 피질의 재구조화 등에 장애가 있었다는 것을 반영한다고 생각된다.<sup>2)</sup> 이러한 두 번째 가설을 검증해보고자 본 연구에서 간질환자에서 흔한 원인으로 생각되는 대뇌 피질이형성증을 실험적으로 유발한 작은 뇌이랑증에서의 신경 세포수와 아포토시스를 관찰하여 보았다.

본 연구는 작은 뇌이랑증을 유발하기 위해 냉동손상을 가한 후 니슬 염색방법을 통하여 생후 10일까지 신경세포의 수의 변화를 관찰하였다. 그 결과 출생1일과 출생2일에서는 세포 수 세기가 어려울 만큼 층 구조가 분명하지 않았으며 냉동손상을 가한 대뇌반구가 정상대뇌반구와 반대쪽 대뇌반구에 비해 신경세포의 숫자가 작은 것을 볼 수 있었다. 그러나 출생3일에서 신경세포 수는 67.4로 급격히 많아졌으며 그 이후로는 계속 감소하여 출생 10일에서는 37.3으로 감소하였으나 정상대뇌반구와 반대쪽 대뇌반구에 비해서는 훨씬 더 많은 수의 신경세포를 관찰할 수 있었다. 즉 출생 3일부터는 병변부위의 세포치밀층에서의 신경세포의 수가 정상대뇌반구와 반대쪽 대뇌반구의 피질 제 2~3 층의 신경세포의 수보다 많아져 세포수의 증가는 정상대뇌반구와 반대쪽 대뇌반구보다 병변부위에서 더욱 뚜렷했다. 이것으로 냉동손상을 가한 병변부위에서

신경세포가 다른 부위에 비해 증가하는 것을 확인하였고 이것은 정상적으로 발생하는 피질 신경세포의 아포토시스가 감소하여 세포치밀층이 나타나게 될 가능성을 시사하였다. 그러나, 아포토시스관찰을 위해 시행한 ApopTaq 염색방법을 통해 나타난 아포토틱 세포는 병변부위에서 출생 1일에서부터 출생 3일까지 높은 값을 보이고 그 후에는 급속히 감소하였다. 그러나 정상대뇌반구와 반대쪽 대뇌반구에서는 거의 변화가 없었다. 이것으로 미루어 볼 때 우리가 추측한 것과 같이 병변부위에서 세포수가 많은 것이 생후 기간의 아포토시스의 감소로 세포수의 감소가 덜 이루어진데서 기인한 것이 아니라고 생각되어진다. 즉, 위에서 언급한 것과 같이 출생직후에는 이때 이주를 마친 피질 제 4~6 층이 바깥쪽에 있게 되므로 냉동손상을 가하면 이 층(제 4~6 층)에서만 괴사가 일어나고, 아직 이동을 끝마치지 않은 피질 제 2층과 3층은 이 괴사지역을 통과하여 바깥쪽으로 이주를 하게 되는데, 이 때 이 손상부위에 집중적으로 이주를 하게 되어 손상 부위의 집중적인 신경세포의 수의 증가를 가져오게 되는 것이다. 또, 문헌에서 보고된 바는 무과립피질의 피질 제 2~3 층에서는 정상적으로 66.8에서 89.3%까지의 세포가 아포토시스가 일어난다고 한다.<sup>8)</sup> 그러나 본 연구에서는 단지 2~20% 정도였다. 이는 정상대뇌반구와 반대쪽 대뇌반구가 병변부위에서 일어난 아포토시스에 비해 매우 적은 수치로 그 이유는 아마도 아포토시스 염색과정 중에 프로티네이스 키를 사용하는 과정에서 세 군의 각 부위에서 염색성이 가장 차이가 많이 나는 조건으로 실험을 진행하였기 때문이라고 생각된다. 그러나 병변부위의 대조군으로 사용한 정상대뇌반구가 반대쪽 대뇌반구와 같은 결과를 보여주고 있으므로 실험결과는 믿을 수 있다고 판단된다. 이와 같이 본 연구에서 시행한 ApopTaq 염색방법은 실험조건에 상당한 영향을 받는다고 많은 논문에서 보고되고 있다. 그러므로 이 부분에 대해서는 지속적인 연구가 진행되어야 할 것이라고 생각된다. 또한, 이러한 문제를 극복하기 위해 아포토시스를 볼 수 있는 다른 여러 가지 방법 즉, DNA 사다리를 사용하는 전기영동법, 효소면역측정법(ELISA), 웨스턴 블롯팅(western blot), Flow Cytometer를 사용하는 FACS법, 형광물질을 표식하여 관찰하는 형광염색법 등 아포토시스를 보기 위해 시행하는 여러 방법들을 이용하여 좀 더 명확히 규명하여 보고자 하였으나 FACS의 경우는 세포분리(cell sorting)를 하여야 하나 본 실험에서는 조직에서 관찰해야 되기 때문에 사용이 불가능하였고, DNA 사다리를 통한 전기영동법도 본 연구의 경우 전체 조직을 사용하여야 하므로 대표성에 문제가 있었다. 따라

서 향후 방법의 개선과 함께 계속 실험을 진행하여 확인하여 볼 필요가 있다고 판단된다.

이상과 같이 본 연구를 통해 아포토시스가 작은 뇌이랑증을 포함한 대뇌 피질이형성증과 관계가 있다라는 가능성에 대해서는 세포수가 많아지는 것이 아포토시스가 원인이 아니라 신경세포의 이주가 원인이라고 생각되며 여기에 더 많은 연구를 통하여 신경세포의 이주가 확인된다면 이는 대뇌 피질이형성증에 대한 좀 더 확실한 기전을 밝히는 것이 되므로 현재의 대뇌 피질이형성증에 대한 치료방법인 수술적 치료 외에 새로운 치료방법을 개발할 가능성에서 상당히 희망적이라 할 수 있다.

## REFERENCES

- Sarnat HB. Cerebral dysgeneses. Embryology and clinical expression. New York: Oxford University Press, 1992
- Mischel PS, Nguyen LP, Vinters HV. Cerebral cortical dysplasia associated with pediatric epilepsy. Review of neuropathologic features and proposal for a grading system. *J Neuropathol Exp Neurol* 1995;54:137-53.
- Giannetti S, Gaglini P, Granato A, Di Rocco C. Organization of callosal connections in rats with experimentally induced microgyria. *Childs Nerv Syst* 1999;15:444-8.
- Giannetti S, Gaglini P, Di Rocco F, Di Rocco C, Granato A. Organization of cortico-cortical associative projections in a rat model of microgyria. *Neuroreport* 2000;11:2185-9.
- Rosen GD, Burstein D, Galaburda AM. Changes in efferent and afferent connectivity in rats with induced cerebrocortical microgyria. *J Comp Neurol* 2000;418:423-40.
- Galaburda AM, Menard MT, Rosen GD. Evidence for aberrant auditory anatomy in developmental dyslexia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:8010-3.
- Herman AE, Galaburda AM, Fitch RH, Carter AR, Rosen GD. Cerebral microgyria, thalamic cell size and auditory temporal processing in male and female rats. *Cereb Cortex* 1997;7:453-64.
- Peiffer AM, Rosen GD, Fitch RH. Rapid auditory processing and MGN morphology in microgyric rats reared in varied acoustic environments. *Brain Res Dev Brain Res* 2002;138:187-93.
- Rorke LB. A perspective: The role of disordered genetic control of neurogenesis in the pathogenesis of migration disorders. *J Neuropathol Exp Neurol* 1994;53:105-17.
- Oppenheim RW. Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 1991;14:453-501.
- Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD. Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science* 1993;262:695-700.
- Thomaidou D, Mione MC, Cavanagh FR, Parnavelas JG. Apoptosis and its relation to the cell cycle in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* 1997;17:1075-85.
- Finlay BL, Slattery M. Local differences in the amount of early cell death in neocortex predict adult local specializations. *Science* 1983;219:1349-51.
- Ferrer I, Bernet E, Soriano E, Rio T, Fonseca M. Naturally occurring cell death in the cerebral cortex of the rat and removal of dead cells by transient phagocytes. *Neuroscience* 1990;39:451-8.
- Woo TU, Beale JM, Finlay BL. Dual fate of subplate neurons in a rodent. *Cereb Cortex* 1992;1:433-43.
- Valverde F, Lopez-Mascaraque L, Santacana M, De Carlos JA. Persistence of early-generated neurons in the rodent subplate: assessment of cell death in neocortex during the early postnatal period. *J Neurosci* 1995;15:5014-24.
- Miller MW. Relationship of the time of origin and death of neurons in rat somatosensory cortex: barrel versus septal cortex and projection versus local circuit neurons. *J Comp Neurol* 1995;355: L6-14.
- Caviness VS Jr, Sidman RL. Time of origin of corresponding cell classes in the cerebral cortex of normal and reeler mutant mouse. An autoradiographic analysis. *J Comp Neurol* 1973;148:141-52.
- Stanfield BB, Cowan WM. The morphology of the hippocampus and dentate gyrus in normal and reeler mice. *J Comp Neurol* 1979;185:423-60.
- Barth PG. Disorders of neuronal migration. *Can J Neurol Sci* 1987;14:1-16.
- Damska M, Haddad R, Kozloxski PB, Lee MH, Shek J. Telencephalic cytoarchitectonics in the brains of rats with graded degrees of micrencephaly. *Acta Neuropathol* 1982;58:203-9.
- Yurkewicz L, Valentino KL, Floeter MK, Fleshman JW, Jones EG. Effects of cytotoxic deletions of somatic sensory cortex in fetal rats. *Somatosensory Res* 1984;1:303-27.
- Roper SN, Houser CR. Experimentally-induced heterotopias contain GAD-immunoreactive neurons. *Epilepsia* 1992;33 (S3):75.
- Meencke HJ. Morphological aspects of etiology and the course of infantile spasms (West Syndrome). *Neuropediatrics*, 1985;59-66.
- Jellinger K. Neuropathological aspects of infantile spasms. *Brain Dev* 1987;9:349-57.
- Dvorak K, Feit J. Migration of neuroblasts through partial necrosis of the cerebral cortex in newborn rats-Contribution to the problems of morphological development and developmental period of cerebral microgyria. *Acta Neuropathol* 1977;38:203-12.
- Dvorak K, Feit J, Jurankova Z. Experimentally induced focal microgyria and status verrucosus deformis in rats-Pathogenesis and interrelation histological and autoradiographic study. *Acta Neuropathol* 1978;44:121-9.
- Rosen GD, Press DM, Sherman GF, Galaburda AM. The development of induced cerebrocortical microgyria in the rat. *J Neuropathol Exp Neurol* 1992;51:601-11.