

신생아 장 신경절세포에서 cathepsin D 발현

서울대학교 의과대학 외과학교실

김대연 · 이성철 · 박귀원 · 김우기

= Abstract =

Cathepsin D Expression in Intestinal Ganglion Cells of Neonate

Dae-Yeon Kim, M.D., Seong-Cheol Lee, M.D., Kwi-Won Park, M.D., Woo-Ki, Kim, M.D.

*Department of Surgery, Seoul National University College of Medicine,
Seoul, Korea*

Diagnosing Hirschsprung's disease is one of the clinical challenges of this disorder. In the stomach and the intestines, Cathepsin D was readily detected in cytoplasm of the rat gastric and in intestinal ganglion cells of the autonomic nervous system. The objectives of the present study were to examine cathepsin D expression in ganglion cells of the submucosal and myenteric plexuses of the intestine of children and to determine the utility of immunohistochemical staining of cathepsin D for detection of immature ganglion cells. Paraffin blocks of 35 intestinal segments were reviewed for immunohistochemical staining with polyclonal antibody to cathepsin D and hematoxylin-eosin stainings from the compatible specimens. There were 9 aganglionic segments and 9 ganglionic segments of neonates with Hirschsprung's disease, 8 intestinal segments with non-Hirschsprung's disease in neonates and 9 intestinal segments with non-Hirschsprung's disease infants over the age of 10 months. All ganglion cells showed intense granular cytoplasmic reactivity for cathepsin D regardless of maturity and all aganglionic segments had no expression for cathepsin D in the submucosal and myenteric plexuses of the intestine. However, histiocytes within the lamina propria and submucosa stained positively for cathepsin D. In conclusion, intestinal ganglion cells in children have reactivity for cathepsin D, therefore immunohistochemical staining for cathepsin D can be used for identification of ganglion cells in neonates.

Index Words : *Cathepsin D, Hirschsprung's disease, Ganglion cell, Neonate*

서 론

히루쉬스프룽병은 1887년 Hirschsprung이 무신경절 거대결장(aganglionic megacolon)이라고 처음으로 발표한 이후¹, 1948년 Whitehouse와 Kernohan은 이환된 원위부 장의 점막하와 근신경층에 신경절세포가 없는 선천성 질환임을 밝혔다². 히루쉬스프룽병은 1948년 Swenson과 Bill이 처음으로 전층직장생검으로 진단하고 치료방침을 밝힌 이후 많은 병태 생리학적인 연구에 뒷받침한 임상적인 발전이 있었다³. 인종과 관계없이 5,000명 출생 당 1명의 발생률을 가지고 있는 히루쉬스프룽병은 소아외과 영역에서 상당히 발생빈도가 높은 선천성 질환이고 서울대학교 어린이병원 소아외과 수술 중 3번째로 많은 선천성 기형이다⁴. 히루쉬스프룽병의 진단은 임상 증상과 대장조영술을 통한 방사선검사, 직장 balloon manometry, 직장흡입생검을 통한 acetylcholinesterase활성도 측정 등을 이용하기도 하지만 확정적인 진단은 직장 생검이다. 히루쉬스프룽병이 진단되는 평균 연령은 1970년대까지만 해도 생 후 3-6개월이었지만, 최근 들어 환자의 70% 이상이 생 후 1달 이내에 진단된다^{5,6}. 히루쉬스프룽병의 조직학적 진단은 보통 hematoxylin-eosin 염색으로 장의 점막하와 근신경층의 신경절세포 유무로 하고, 원위부 장에서 다양한 정도의 축삭 비후와 해체를 보이는 것으로 이루어진다⁷. 장의 신경절세포는 생후 1년동안 상당한 정도로 미성숙한 상태로 있는 데 특히 생후 2개월 이내의 미성숙도가 심하다⁸. 이런 미성숙 신경절세포는 내피세포(endothelial cell), 조직구(histocyte), 임파구(lymphocyte), 횡문근세포 등과 구별하기 어렵기 때문

에 이를 제대로 인식하는 것이 매우 중요하다⁹.

Cathepsin D는 중추신경계를 포함한 많은 기관에 존재하는 lysosomal aspartic proteinase 로 사람에서는 태생 12주부터 나타나기 시작한다¹⁰. Cathepsin D는 뇌조직, 특히 신경원(neuron)에 풍부하고, 신경절세포가 이 효소를 특히 많이 포함하고 있다는 것은 소, 쥐, 사람의 안구조직과 쥐의 후근 신경절(dorsal root ganglion)과 척수에서 입증되었고, 쥐의 장 신경절세포에서 cathepsin D가 발현하는 것은 밝혀져 있다¹¹⁻¹³.

저자들은 cathepsin D가 소아의 장 신경절세포에서 발현되는지를 알아보고, cathepsin D 면역조직화학검사가 신경절세포가 미성숙되어 조직 진단이 어려운 신생아기의 히루쉬스프룽병의 조직 진단에 도움을 줄 수 있는 지 알아보려고 하였다.

대상 및 방법

1. 대상

1994년부터 1998년까지 서울대학교 어린이병원 소아외과에서 히루쉬스프룽병으로 개복술을 받은 신생아 중에서 무신경 장절의 파라핀 포매 조직을 구할 수 있었던 환자와 히루쉬스프룽병이 아닌 다른 질병으로 장절제술을 받은 신생아 중 파라핀 포매 조직이 남아 있었던 환자를 대상으로 하였고, 생후 10개월 이상의 장조직은 장루 복원술을 시행한 쇠창 환자에서 무신경절의 파라핀 포매 조직을 구할 수 있었던 신생아와 동일한 수로 무작위 선정하였다(표 1).

2. 방법

외과적 병리검사보고서에 근거한 파라핀 포매

Table 1. Materials and Tissue with Ganglion Cells Immunoreactive to Cathepsin D

Tissues	No. of cases	Age range	Site	No. of positive reaction
Mature ganglionic segment				
imperforate anus	9	10-17m	2 ileum, 7 colon	9
Ganglion segment in neonate				
necrotizing enterocolitis	4	2-28d	All ileum	4
ileal atresia	4	1-2d	All ileum	4
Hirschsprung's disease	9	2-28d	1 jejunum, 1 ileum, 7 colon	9
Aganglionic segment in neonate				
Hirschsprung's disease	9	4-28d	2 ileum, 2 appendix, 5 colon	0



Fig. 1. Mature colonic ganglion cells in 17 month-old male(H & E, $\times 1,000$).

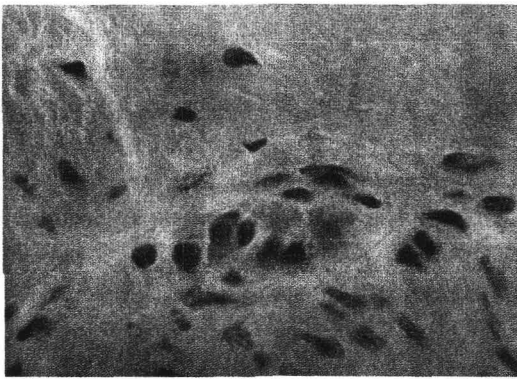


Fig. 2. Cathepsin D immunohistochemical staining of mature colonic ganglion cells in 17 month-old male ($\times 1000$). This figure shows deep yellow granules crowded the cytoplasm.

조직절편으로 hematoxylin-eosin 염색을 시행하고 동시에 일차항체(active cathepsin D isolated from human liver)와 이차항체(DAKO polyclonal rabbit anti-cathepsin D)를 사용하여 cathepsin D에 대한 면역조직화학염색을 시행하였다.

3. 결과 판독

1) Hematoxylin-eosin 염색

근신경총과 점막하층에서 세포질이 풍부한 다각형으로 둥근 편심성 핵과 뚜렷한 핵소체를 가지고 있는 세포를 신경절세포로 판정하였다⁷(그림 1, 2).

2) Cathepsin D에 대한 면역조직화학염색

세포질이 과립형의 황갈색으로 진하게 염색되

고, 장미꽃같은 배열을 보이면 신경절세포로 판정하였다^{12,13}(그림 3, 4).

결 과

1. Hematoxylin-eosin 염색으로 신경절세포를 확인할 수 있었던 조직은 cathepsin D 면역조직화학염색에 반응하였다(표 1).

2. 성숙 신경절세포가 미성숙 신경절세포보다 세포질이 풍부하였고 섬세한 과립형의 염색질(chromatin)과 좀 더 돋보이게 중심에 위치한 핵소체로 구분이 잘 되었지만 모두 cathepsin D에 강한 면역 반응을 보였다(그림 3, 4).

3. 내피세포, 임파구는 cathepsin D에 면역 반응



Fig. 3. Immature intestinal ganglion cells in 2 day-old female(H & E, $\times 1,000$).

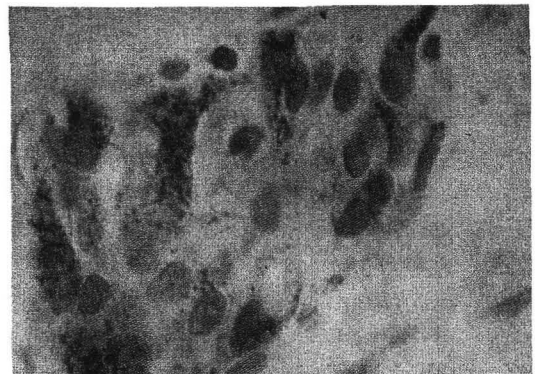


Fig. 4. Cathepsin D immunohistochemical staining of immature intestinal ganglion cells in 2 day-old female ($\times 1,000$). This figure shows granular localization of cathepsin D in the perinuclear cytoplasm and rosette-like arrangement.

하지 않았다.

4. 고유층과 점막하안에 있는 조직구는 cathepsin D에 면역 반응을 보이지만, 단일 구조이고 신경절세포에서 보이는 과립형의 세포질적인 특징은 없었다.

고 찰

히루쉬스프롱병이 재태기간 36주 미만의 미숙아에서 생길 확률은 4-8%로 보고되고 있다¹⁴. Smith는 미숙아에 있어서 신경절세포는 조직학적으로 다른 모양이고, 소아의 신경절 세포는 출생 후에도 성숙과정에 있다고 보고하였고, 점막하층에 비후화된 많은 신경지맥(nerve twig)이 보이지만 이것에는 신경절세포가 없을 뿐만 아니라 신경절세포와 구별하기 쉽지 않다^{8,15}. 히루쉬스프롱병의 진단은 신경절세포가 없다는 것에 의존하기 때문에 신경절세포를 정확히 인식하는 것이 매우 중요하고, 신경절세포의 유무 판정으로 장루의 위치 선정과 장절제 범위를 올바르게 결정하여 수술 후의 합병증을 줄일 수 있다.

이런 인식에서 히루쉬스프롱병 환자의 무신경장절에서 acetylcholinesterase(AchE)의 증가된 활동성에 근거를 두고 흡입 생검을 시행하여 신경절세포와 비후성 신경을 구별하는 AchE 조직화학법으로 히루쉬스프롱병을 진단하는 것은 Meier-Ruge등에 의해 도입된 이래 널리 사용되어져 왔다¹⁶. 많은 연구에서 이 염색법이 뛰어난 진단적 정확성을 보고하였지만, 위음성에 대한 보고도 있다^{17,18}. 이후 면역조직화학을 병리 진단에 도입하면서 신경절세포에 대한 표지자를 찾으려는 많은 연구가 있었다. Neuron-specific enolase(NSE) 면역염색은 neural element, S100단백질 면역염색은 schwann cell을 구별하는 것으로 시행되어 왔지만 그 정확성에 대한 보고는 다양하고 신경절세포에 특이한 유일한 표지자는 아니다¹⁹. 그대신 NSE와 S100단백질, protein gene product 9.5(PGP 9.5)와 S100단백질을 동시에 면역 염색하는 시도를 하였으나 신경절세포에 특이한 염색 시약으로 부족했다²⁰. 최근에는 peripherin, placental alkaline phosphatase와 synaptophysin을 결합한 면역염색검사에 대한 보고가 있지만 peripheral nerve fiber도 염색되는 단점이 있

다²¹.

히루쉬스프롱병에서 장의 정확한 신경지배는 불분명하고 장 신경근성 억제제의 소실이 기능적 특징이다. 장의 억제성 신경지배는 외인성 아드레날린성 섬유와 내인성 비아드레날린성, 비콜린성 신경들을 포함한다고 밝혀져 왔고, 최근 들어 조직화학 및 면역조직화학적 분석을 통해 많은 neuropeptide가 연구되어 왔다. Vasoactive intestinal polypeptide(VIP), gastrin releasing peptide(GRP), substance P, met-enkephalin, galanin, neuropeptide Y 등 신경원성과 펩타이드 표지자에 대한 면역조직화학적 연구는 히루쉬스프롱병의 장에서의 neuronal network을 지도화하고 장 점막의 내분비 세포계를 밝히는 데 기여해 왔지만, 대부분 진단에 보조적이다²¹.

Yonezawa등의 연구에서 cathepsin D가 52 kd의 glycoprotein으로 골지체에서 라이소좀으로 이동하면 두 mature form의 34 kd와 14 kd의 안정된 단백질로 된다는 것을 밝혀내었다²². Cathepsin D는 일생동안 다발성의 단백질 분해(proteolytic cleavage)가 일어나는 데, substance P, somatostatin, β -lipoprotein, angiotensinogen같은 여러 neuropeptide를 분해하는 것으로 알려져 있다²². Cathepsin D에 대한 면역조직화학적 염색은 세포질의 과립형으로 이 효소의 리소좀적인 분포를 반영하는 것이다. Cathepsin D는 뇌조직, 특히 신경원에 존재하고, 신경절세포가 cathepsin D를 상당한 양 포함하고 있다는 것은 소, 쥐, 사람의 눈 조직과 쥐의 후근 신경절과 척수에서 입증되었다¹¹⁻¹³. Whitaker와 Rhoades는 쥐의 위장으로부터 시작한 장의 자율신경계의 신경절세포의 세포질에서 cathepsin D가 발현됨을 입증하였고, cathepsin D는 망막의 색소상피, 신경절 세포등과 부신수질, 폐, 간, 비장의 대식세포에 발현되고, 사람 장의 신경절세포에서도 성숙도와 관계없이 존재한다는 최근의 연구 결과가 있다^{12,13}. 본 연구에서도 cathepsin D가 신경절세포의 성숙도에 관계없이 강하게 면역반응함을 보여주고 있고, 미성숙 신경절세포를 흉내낼 수 있는 내피세포, 임파구, schwann cell은 cathepsin D에 반응하지 않았다. 그러나 신경절세포 이외에 cathepsin D에 면역반응하는 것은 조직구인데 보통 점막하층에 뚜렷한 핵소체가 부족하고 길고 뒤틀린 핵이 있는 단일 구조이고 신경절세포에서 보이는 과립

형의 세포질적인 특징은 없고, 섬세한 염색질과 큰 중심성 핵소체를 갖지 않아 신경절세포와 구별이 어렵지 않았다.

Cathepsin D가 중추신경계 및 자율신경계의 성숙과정에 매개하는 것으로 알려져 있는 데, 앞으로는 그 과정에서의 정확한 기능적 역할과 정상 및 병적 상태에서의 분포에 대한 연구가 되어야 한다고 생각한다.

결 론

Cathepsin D는 미성숙 및 성숙 신경절세포 모두에 존재하였으며, cathepsin D의 이러한 사실은 면역조직화학검사를 신생아기의 히루쉬스프룽병의 조직 진단에 시행하여 유용한 조건을 얻을 수 있었다.

참 고 문 헌

1. McCready RA, Beart R Jr: Classic articles in colonic and rectal surgery. Constipation in the newborn as a result of dilatation and hypertrophy of the colon: Harald Hirschsprung, *Jahrbuch fur Kinderheilkunde*, 1888 adult Hirschsprung's disease: results of surgical management at Mayo Clinic. *Dis Colon Rectum* 24:408-415, 1981
2. Swenson O: My early experience with Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg* 24:839-844, 1989
3. Skinner MA: Hirschsprung's disease. *Curr Probl Surg* 33:389-460, 1996
4. 김우기, 박귀원, 이성철: 선천성 거대결장증(선천성 무신경절증)-214례 증례분석('78~'84년). *대한외과학회지* 32:436-444, 1987
5. Swenson O, Sherman JO, Fisher JH: Diagnosis of congenital megacolon: an analysis of 501 patients. *J Pediatr Surg* 8:587-594, 1973
6. Polly T Jr, Coran AG, Wesley JR: A ten-year experience with ninety-two cases of Hirschsprung's disease. Including sixty-seven consecutive endorectal pull-through procedures. *Ann*

- Surg* 202:349-355, 1985
7. Dahams BB: The gastrointestinal tract, in Stoccker JT, Debner LP: *Pediatric Pathology*. Lippincott, Philadelphia, PA, 1991, p 670
8. Venugopal S, Mancor K, Shandling B: the validity of rectal biopsy in relation to morphology and distribution of ganglion cells. *J Pediatr Surg* 16:433-437, 1981
9. Yunis EJ, Dibbins AW, Sherman FE: Rectal suction biopsy in the diagnosis of Hirschsprung disease in infants. *Arch Pathol Lab Med* 100:329-333, 1976
10. Muller A, Bernstein HG, Wiederanders B, Rose I, Dorn A: Immunohistochemical detection of cathepsin D in human neuroontogenesis. *Acta Histochem* 82:29-33, 1987
11. Bernstein HG, Wiederanders B, Rinne A, Dorn A: Distribution of cathepsin D immunoreactivity in the central nervous system of rat and selected brain regions of man. *Acta Histochem* 77:139-142, 1985
12. Whitaker JN, Rhodes RH: The distribution of cathepsin D in rat tissues determined by immunocytochemistry. *Am J Anat* 166:417-428, 1983
13. Abu-Alfa, Kuan SF, West AB, Reyes- Mugica MR: Cathepsin D in intestinal ganglion cells. *Am J Surg Pathol* 21: 201-205, 1997
14. Teitelbaum DH, Coran AG, Weitzman JJ, Ziegler MM: Hirschsprung's disease and related neuromuscular disorders of the intestine, in O'Neill, Jr, Rowe MI, Grosfeld JL, Fonkalsrud EW, Coran AG(eds): *Pediatric Surgery*(ed 5), chapter 94. Mosby-Year Book, St. Louis, 1998, Pp1381-1424
15. Smith B: Pre- and postnatal development of the ganglion cells of the rectum and its surgical implications. *J Pediatr Surg* 3:386-391, 1968
16. Meier-Ruge W, Luttwrbeck PM, Herzog B, Morger R, Moser R, Scharli A: Acetylcholinesterase activity in suction biopsies of the rectum in the diagnosis of Hirschsprung's di-

- sease. J Pediatr Surg 7:11-17, 1972
17. Ikawa H, Kim SH, Hendren WH, Donahoe PK: Acetylcholinesterase and manometry in the diagnosis of the constipated child. Arch Surg 121:435-438, 1986
18. Athow AC, Filipe MI, Drake DP: Problems and advantages of acetylcholinesterase histochemistry of rectal suction biopsies in the diagnosis of Hirschsprung's disease. J Pediatr Surg 25:520-526, 1990
19. Robey SS, Kuhajda FP, Yardley JH: Immunoperoxidase stains of ganglion cells and abnormal mucosal nerve proliferations in Hirschsprung's disease. Hum Pathol 19:432-437, 1988
20. Tam PK: An immunochemical study with neuron-specific-enolase and substance P of human enteric innervation -the normal developmental pattern and abnormal deviations in Hirschsprung's disease and pyloric stenosis. J Pediatr Surg 21(3):227-232, 1986
21. Larsson LT: Hirschsprung's disease-immunohistochemical findings. Histol Histopathol 9(3): 615-629, 1994
22. Yonezawa S, Takahashi T, Wang XJ, Wong RN, Hartsuck JA, Tang J: Structures at the proteolytic processing region of cathepsin D. J Biol Chem 263:16504-16511, 1988