

포르말린 고정 후 파라핀에 포매된 조직에서 Tissue Microdissection Technique을 이용한 PCR 연구

대구효성가톨릭대학교 의과대학 이비인후과학교실
박재율 · 유정운 · 신승헌 · 손진호

= Abstract =

A PCR Study using Tissue Microdissection Technique in Formalin-fixed, Paraffin-embedded Specimens

Jae Yul Park, M.D., Jung Woon You, M.D., Seung Heun Shin, M.D.,
Jin Ho Sohn, M.D.

*Department of Otolaryngology, School of Medicine,
Catholic University of Taegu-Hyosung, Taegu, Korea*

One of the most dramatic changes in the study of cancer is the usage of PCR technique for the research of genetic alterations. However, as the PCR technique amplifies DNA from small cell populations, there's always a problem of tissue heterogeneity. If PCR is done in specimens composed of multiple cell types such as normal epithelial cells, inflammatory cells, fat cells and cancer cells, the recovered DNA will reflect an average from all cell types and not the specific DNA of cancer cells. To overcome this problem, tissue microdissection technique was used in formalin-fixed, paraffin-embedded specimens. PCR was done with routine 10- μ slides of specimens after microdissection, which resulted in success. This technique is useful in DNA studies of small lesions and tissue samples of multiple cell types.

KEY WORDS : PCR · Tissue microdissection · Paraffin-embedded specimen

서 론

현재 종양 연구에서 가장 각광받고 있는 분야 중 하나는 유전자의 변이에 관한 연구이며, 특히 중합효소반응 (polymerase chain reaction, PCR)을 이용하여 활발히 진행되고 있다. 이는 또한 이미 파라핀에 포매되어 보관되어 있는 조직으로 유전자를 연구할 수 있다는 장

점이 있다¹⁾. 그러나 종양조직으로 PCR을 이용하여 유전자 변이를 연구할 때 가장 문제가 되는 것 중 하나가 조직 동질성 (homogeneity)에 관한 것이며 이는 종양조직으로 유전자를 증폭할 때 특정한 조직의 유전자만 증폭되는 것이 아니라 그 안에 포함된 모든 조직, 즉 정상세포나 염증세포 등의 유전자도 같이 증폭되므로 특정 유전자의 변이를 쉽게 알아 낼

없다는 점에 있다^{2,3,13,14,16}). 이런 문제점에 착안하여 Zhuang 등¹⁹은 직경 1 mm 이하의 조직을 microdissection 하여 PCR을 함으로써 조직의 동질성을 유지하는 방법을 발표하였다. 이 방법은 현미경하에서 1 high power field (1 HPF) 크기 이하의 조직을 채취할 수 있으므로 다양한 세포들의 유전자만 증폭시킬 수 있다는 장점이 있다. 저자도 조직의 동질성을 유지하기 위하여 파라핀에 포매되어 보관된 조직을 microdissection technique을 이용하여 채취한 뒤 PCR을 이용하여 성공적으로 유전자를 증폭하였으므로 보고하고자 한다.

대상 및 방법

1. 대 상

대구효성가톨릭대학병원 병리과에 두경부암으로 진단된 뒤 10% 포르말린 고정 후 파라핀 포매되어 보관된 조직을 이용하여 각각 1 cm²에서 10 micron 두께로 4 내지 5개의 절편을 만들었다. 대상의 선정은 연구하고자 하는 암종의 조직으로 하며, 본 연구에서는 후두유선암으로 진단된 뒤 포르말린 고정 후 파라핀 포매된 조직을 이용하였다.

2. 방 법

절편들을 유리 슬라이드에 올려놓은 후 1% toluidine blue 용액에 3회 탈파라핀하였다. 다음으로 hematoxylin and eosin 염색을 한 후 넷 혹은 다섯 개의 절편 중 하나를 mount하여 control을 사용하면서 보고 나머지는 microdissection을 위하여 mount하지 않았다. Mount한 표본은 brightfield microscope로 보면서 microdissection할 부위를 찾음과 동시에 mount하지 않은 표본들은 inverted microscope로 관찰하였다. tissue microdissection은 Olympus BH-2 microscope에 부착된 Narishige MO-302 three dimensional joystick hydraulic micromanipulator를 이용하였으며 (Fig. 1), 이 Narishige collection arm 끝에 1 cc 25G 5/8 Tuberculin sy-

ringe를 부착하여 mount하지 않은 절편에서 원하는 부위를 scrape하여 표본을 구하며 (Fig. 2), 총 50개의 표본을 채취하여 50 μ l의 digestion buffer에 넣었다. Digestion buffer는 500 mM Tris, 1 mM EDTA, 0.5% Tween 20으로 구성되어 있었다. 여기에 2.0 μ l의 proteinase

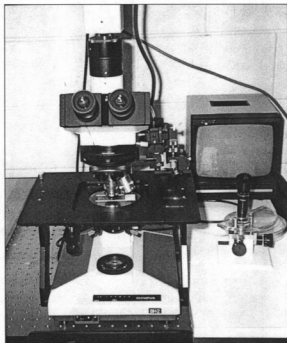


Fig. 1. A Narishige MO-302 three dimensional joystick hydraulic micromanipulator mounted to an Olympus BH-2 microscope.

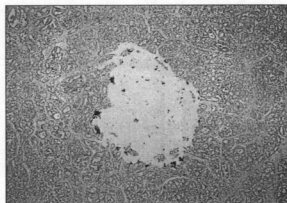


Fig. 2. Prostate carcinoma after microdissection. Microdissected area equals to 1 HPF (hematoxylin and eosin, $\times 40$).

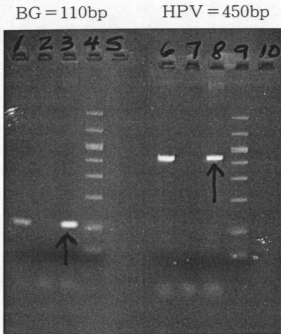


Fig. 3. Gel electrophoresis of samples amplified with HPV L1 consensus primers. PCR products of each reaction were visualized by UV light. The L1 amplification products are visualized at approximately 450 bp. Lanes 4 and 9, 100-bp ladder; lanes 6 and 8, laryngeal papilloma samples. Lanes 6 and 8 are positive for HPV, as demonstrated by a band at approximately 450 bp. Lanes 2 and 7 are negative samples. Lanes 1 and 3 (beta-globin, 110 bp target) were used to ensure DNA integrity and eliminate the possibility of PCR inhibitors.

K (Boehringer Mannheim 사, 16.2 mg/ml)를 넣고 잘 혼든 후, 60°C에서 4시간 incubation하고 95°C에서 15분간 열을 가하여 DNA를 추출한 뒤 5 µl의 용액으로 standard PCR 분석에 사용하였다. Fig. 3은 후두유두종으로 진단된 표본 내에서 위와 같은 방법으로 DNA를 추출한 뒤 human papilloma virus를 찾아내기 위하여 primer로 L1 consensus primers (Positive Strand Primer-MY11-5'GCMCAGGGWCATAA-YAA TGG, Negative Strand Primer-MY09-5'CGTCCMARRGGAWACTGATC, M=A+C, R=A+G, W=A+T, Y=C+T)를 사용하여

PCR을 하였으며 여기에서 증폭되는 부위의 base pair는 약 450-bp이다¹²⁾. Reaction mixture로는 500 nM의 L1 consensus primers, dNTP 각 200 µM, MgCl₂ 2 mM, 10×PCR buffer, 2.5unit의 Taq polymerase (Promega) 그리고 5 µl의 sample을 혼합하여 총 50 µl로 만들었다. PCR은 DNA Thermal Cycler (Perkin-Elmer Cetus Instruments, Norwalk, Connecticut, U.S.A.)로 온도조건은 95°C에서 1분, 55°C에서 1분 그리고 72°C에서 2분간의 조건으로 40회 반응시켰다. 마지막으로 extension을 위해 72°C에서 5분간 더 incubation 하였다¹²⁾. 반응이 종료된 후 반응액 중 약 10 µl를 ethidium bromide가 포함된 1.5% agarose gel에 걸어 100 Volt에서 전기영동을 시행한 후 UV transilluminator로 증폭된 핵산의 유무를 관찰하였다.

3. 결 과

위와 같은 방법으로 후두유두종의 표본에서 DNA를 추출하여 PCR을 한 결과 Fig. 3에서와 같이 성공적으로 human papillomavirus의 핵산이 증폭되어 450-bp 부위의 band를 볼 수 있었다. 그 외의 다른 중앙 조직에서도 (포르말린 고정 후 파라핀에 포매된 조직) 이와 같은 microdissecton technique을 이용하여 원하는 세포에서의 핵산의 증폭이 가능하였다.

고 찰

PCR의 발달에 따라 과거보다 훨씬 적은 양의 세포를 가지고도 DNA 분석이 가능해졌다²⁵⁾. 그러나 병리조직의 유전자 연구에서 커다란 문제점으로 지적되고 있는 것 중 하나가 조직의 이질성 (heterogeneity)이며 특히 환자에서 추출된 조직으로 유전자의 변이 등을 연구할 경우 조직의 동질성 (homogeneity)이 유지되지 않아 정확한 결과를 얻지 못하는 수가 있다. PCR을 이용한 연구일 경우 극히 적은 양의 타 조직이 섞여 있어도 PCR 과정을 통하여 유전자의 증폭이 발생하므로 보고자 하

hybridization⁸⁾ 등 조직 표본 내에서 특정한 포 집단만 분석할 수 있게 하려는 연구가 도되어 왔으며^{2,5,16)} 특히 Zhuang 등¹⁹⁾은 포르핀에 고정된 후 파라핀에 포매된 조직을 이용하여 직경 1 mm 이하의 조직을 채취하여 공적으로 종양세포에서의 LOH를 보고하였다. 저자 역시 종양세포에서의 microsatellite stability를 보고자 하여 처음엔 파라핀에 포매된 조직에서 절편을 얻어 microdissection technique을 사용하지 않고 전체조직에서 DNA 추출하여 LOH^{1,18)}를 관찰하였으나 예상과 달리 조직의 유전자와 혼합되어 원하는 결과를 얻지 못하게 된다.^{2,3,13,14,16)} 종양의 크기나 성상 따라 다르지만 조직 표본에 따라서는 실제 양 외에 주위의 염증세포, 정상세포, 또는 양으로 변해나가는 과정 중에 있는 세포 등 섞여 있는 경우가 많다 (Fig. 4). 이러한 조를 그대로 DNA 추출하여 PCR을 한다면 여서 나온 DNA는 종양의 DNA가 아니라 여러 조직의 DNA가 섞여 있는 것에 지나지 않게 된다. 특히 종양세포의 loss of heterozygosity (LOH)의 연구에서 이러한 종양이외의 세포 contamination에 의해 LOH가 차폐 (masking) 되는 수가 많다.

이러한 문제점을 해결하기 위하여 selective ultraviolet radiation fractionation¹⁵⁾, in situ



Fig. 4. Adenocarcinoma of stomach showing tumor cells admixed with infiltrating fibrous tissue (hematoxylin and eosin, $\times 200$).

LOH의 빈도가 높지 않아 Zhuang 등¹⁹⁾이 보고한 바와 같이 종양이외의 조직의 contamination을 의심하게 되어 microdissection technique을 이용한 PCR 연구를 시행하게 되었다.

Zhuang 등¹⁹⁾은 tissue microdissection에 modified Pasteur pipette을 사용하였으며 pipette의 끝을 불에 달구어 잡아당김으로써 끝을 아주 뾰족하게 만든 후 원하는 조직을 채취하였다. 저자 역시 이와 동일한 방법으로 시행하여 보았으나 pipette의 끝이 너무 뾰족한 관계로 조직의 채취시 쉽게 부러지는 단점이 있고 또한 digestion buffer에 채취한 조직을 담을 때도 조직이 쉽게 떨어지지 않고 pipette의 끝이 자주 부러져서 이후의 검사진행이 어려운 점을 발견하였다. 따라서 쉽게 구할 수 있고 끝이 단단한 tuberculin syringe를 사용하여 본 결과 pipette을 사용할 때의 단점을 극복할 수 있었다. Proteinase K는 incubation 직전에 따로 넣었으며 이는 조직의 채취와 incubation 할 때 까지의 시간차이가 있으므로 proteinase K의 불활성화를 방지하기 위한 방법이었다. 본 연구에서는 약 50 μ l의 digestion buffer에 50개 정도의 조직을 채취하여 넣음으로써 조직의 함량을 높이고 PCR에 가용한 시료의 양을 증가시켜 다양한 종류의 검사를 하려고 하였다. 그러나 필요한 경우에는, Zhuang 등¹⁹⁾의 보고와 같이 digestion buffer의 양을 줄이고 조직의 채취를 하나의 절편에서 원하는 특정한 세포집단에 국한시킴으로써 microdissection 본래의 목적을 달성할 수도 있다.

이러한 microdissection technique을 이용한 방법은 파라핀에 포매된 조직을 이용함으로써 기존에 보관되어 있는 다양한 조직을 이용할 수 있음과 동시에 직접 현미경하에서 원하는 조직만 채취하고 주위 조직은 포함시키지 않음으로 조직의 동질성을 유지시켜 유전자의 연구에 큰 도움이 될 것으로 사료된다. 현재 저자는 이러한 방법으로 두경부암에서의 human papillomavirus의 발현을 및 microsatellite loci에서의 loss of heterozygosity (LOH)를 봄으로써 replication error phenotype (RER+)

를 연구하고 있다^{4,6,7,9,10,11}).

향후 이러한 tissue microdissection technique을 이용한 유전자의 연구는 조직 생검의 양이 아주 적은 경우나, 주위 조직과의 contamination을 피해야 하는 경우, 특히 정상세포에서 악성세포로 변해 가는 과정 중에 있는 일련의 세포들의 유전자의 변화 등의 연구에 도움이 될 것이다.

결 론

Tissue microdissection technique은 파라핀에 포매되어 있는 조직을 이용하여 현미경하에서 직접 관찰하면서 원하는 세포들만 채취한 뒤 PCR을 통하여 유전자를 증폭시킬 수 있으므로 주위 세포에서의 유전자의 contamination 없이 특정한 유전자의 연구를 시행할 수 있다.

References

- 1) Anglard P, Tory K, Brauch H, et al : *Molecular analysis of genetic changes in the origin and development of renal cell carcinoma. Cancer Res 51 : 1071~1077, 1992*
- 2) Bianchi AB, Navone NM, Conti CJ : *Detection of loss of heterozygosity in formalin-fixed, paraffin-embedded tumor specimens by the polymerase chain reaction, Am J Pathol 138 : 279~284, 1991*
- 3) Cimino GD, Metchette K, Issaca ST, et al : *More false-positive problems. Nature 345 : 773~774, 1990*
- 4) Fong KM, Zimmerman PV, Smith PJ : *Microsatellite instability and other molecular abnormalities in non-small cell lung cancer. Cancer Res 55 : 28~30, 1995*
- 5) Goelz SE, Hamilton SR, Vogelstein B : *Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. Biochem Biophys Res Commun 130 : 118~126, 1985*
- 6) Horii A, Han H, Shimada M, et al : *Frequent replication errors at microsatellite loci in tumors of patients with multiple primary cancers. Cancer Res 54 : 3373~3375, 1994*
- 7) Loeb LA : *Microsatellite instability : marker of a mutator phenotype in cancer. Cancer Res 54 : 5059~5063, 1994*
- 8) Long AA, Mueller J, Andres-Schwartz J, et al : *High-specificity in situ hybridization. Methods application. Diagn Mol Pathol 1 : 45~47, 1992*
- 9) Lothe RA, Peltomäki PP, Meling GI, et al : *Genomic instability in colorectal cancer: relationship to clinicopathological variables and family history. Cancer Res 53 : 5849~5852, 1993*
- 10) Patel U, Grundfest-Broniatowski S, Gupta M, et al : *Microsatellites at five chromosomes in primary breast tumors. Oncogene 9 : 3695~3700, 1994*
- 11) Quinn AG, Healy E, Rehman I, et al : *Microsatellite instability in human non-melanoma and melanoma skin cancer. J Invest Dermatol 104 : 309~312, 1995*
- 12) Resnick RM, Corneilissen MTE, Wright DK, et al : *Detection and typing of human papillomavirus in archival cervical cancer specimens by DNA amplification with consensus primers. J Natl Cancer Inst 82 : 1477~1484, 1990*
- 13) Sarkar G, Sommer S : *Shedding light on PCR contamination. Nature 343 : 27, 1990*
- 14) Sarkar G, Sommer S : *More light on PCR contamination. Nature 347 : 340~341, 1990*

- 15) Shibata D, Hawes D, Li Z, et al : *Specific genetic analysis of microscopic tissue after selective ultraviolet radiation fractionation and the polymerase chain reaction. Am J Pathol* 141 : 539~543, 1992
- 16) Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al : *Genetic alterations during colorectal-tumor development. N Engl J Med* 319 : 525~532, 1988
- 17) Wright DK, Manos MM : *Sample preparation from paraffin-embedded tissues. In PCR Protocols. A guide to methods and applications (ed. Innis MA), 1st Ed. Academic Press, pp153~158, 1990*
- 18) Zbar B, Brauch H, Talmadge C, et al : *Loss of alleles of loci on the short arm of chromosome 3 in renal cell carcinoma. Nature* 327 : 721~724, 1987
- 19) Zhuang Z, Bertheu P, Emmert-Buck MR, et al : *A microdissection technique for archival DNA analysis of specific cell populations in lesions <1 mm in size. Am J Pathol* 146 : 620~625, 1995