

Fite 염색에서 균이 발견되지 않은 중간결핵양형 나환자 조직에서 *in situ* Polymerase Chain Reaction에 대한 연구

이화여자대학교 의과대학 피부과학교실
이화여자대학교 의과대학연구소 분자생물학부

최 혜 영

= Abstract =

A Study of *in situ* PCR in the Tissue Sections of Borderline Tuberculoid Leprosy
without the Bacilli under the Fite Stain

Hae Young Choi

Department of Dermatology and Molecular Biology Section of Medical Research Center,
College of Medicine, Ewha Womans University

In situ PCR was applied to the paraffin embedded tissue sections of two borderline tuberculoid patients which did not show acid fast bacilli on the Fite stain. *In situ* PCR was performed with direct detection of Digoxigenin incorporated into PCR product. The best condition of the direct *in situ* PCR was pretreatment with 0.2N HCl for 40 minutes and with 10 μ g / ml of proteinase K at 37 $^{\circ}$ C for 5 minutes and 30 cycles of PCR. The positive signal was observed within the cytoplasm of the most Schwann cells, epithelioid cells and a few endothelial cells.

KEY WORDS : *in situ* PCR · Borderline tuberculoid leprosy.

서 론

In situ PCR법은 세포내에서 특정 DNA를 증폭시키고 증폭된 DNA를 *in situ* hybridization 이나 면역조직화학법을 이용하여 검출한다. 증합효소연쇄반응(PCR, polymerase chain reaction)은 민감도가 극히 높은 반면 병리조직학적 위치에 대한 정보는 주지 못하며 *in*

in situ hybridization은 바이러스(virus)를 예로할 때 한 세포당 10 copy 이하는 검출할 수 없다^{1,2}. 이 둘의 단점을 보완한 *in situ* PCR을 이용하여 단순포진바이러스(Herpes simplex virus), 인간면역결핍성바이러스가 잠복해 있는(latent) 세포에 대한 연구가 보고 되었다³. 저자는 나균의 염색법인 Fite 염색으로 균이 검출되지 않았던 중간결핵양형 나환자의 파라핀 포매조직으로 direct *in situ* PCR을 시행하여 결과를 보고하고자 한다.

대상 및 방법

1. 대상 및 재료

1994년과 1995년에 나병연구원에 내원한 중간결핵양형 초진 환자 2명에서 얻은 10개의 파라핀 포매조직을 사용하였다. 나이는 54세와 75세이었고, 피부도말검사의 세균학적 지수(BI, Bacteriological index)는 0과 2+이었다. 조직검사상 신경을 따라 분포한 상피양세포로 이루어진 육아종을 관찰할 수 있었고 두환자 모두 조직에서 Fite 염색으로 나균을 관찰할 수 없었다.

2. 방 법

1) 슬라이드 준비과정

유리슬라이드를 Dyanov 등의 방법⁶⁾에 따라 0.1% Bind-Silane 용액(Pharmacia Co.)에 30분간 담그고 용액이 마른 후에 다시 0.05% poly-l-lysine (Sigma Co.)용액에 담그어 슬라이드에서 조직이 잘 떨어 지지 않도록 하였다. 파라핀 포매조직을 각각 5개씩 5 μ m 두께로 잘라 슬라이드에 올려 놓고 약 30 분간 60 $^{\circ}$ C 오븐에 두었다.

2) PCR 과정

Xylene으로 파라핀을 제거한 후 90%, 70%, 50% 및 30% 알코올에 약 10분에 걸쳐 조직을 담그어 가수시킨 후 4% paraformaldehyde 용액에 10분간 고정시킨 후 인산완충용액으로 세척한 후 3군으로 나누었다.

(1) 제 1군

0.2N HCl에 40분간 담그고 인산완충용액에서 10분간 세척한 후 0.01% triton X-100에 3분간 담그고 다시 인산완충용액으로 세척하였다. 조직을 모두 10분에 걸쳐 30%, 50%, 70%, 90% 및 100% 에탄올에 차례로 담그어 탈수시킨 후 90 $^{\circ}$ C에 15초간 조직을 올려놓고 Slideseal chamber(Hybaid Co.)를 붙인 후 즉시 PCR 반응액을 넣었다. PCR은 Behringer Mannheim 사의 PCR Dig probe synthesis kit를 사용하여 시행하였다. Primer는 나균 DNA의 repetitive sequence 중에서 372bp를 증폭하게 계획하였으며 그 염기서열은 5'-CGGCCGGATCCTCGATGCAC-3'와 5'-GCACGTAAGCTTGTCGGTGG-3'이다^{7b)}. PCR 반응 용액은 각 primer를 50pmol씩, 200 μ M의 dATP, dCTP, dGTP와 130 μ M의 dTTP, 70 μ M의 DigdUTP,

4mM MgCl₂, 2.5U Taq polymerase를 사용하여 총 40 μ l로 구성되었으며 Taq polymerase를 제외한 PCR 반응액을 80 $^{\circ}$ C에서 5분간 둔 후 효소를 넣고 preheated mineral oil을 넣어 chamber를 채운 후 봉하였다. Omnigene thermocycler(Hybaid Co.)를 사용하여 PCR을 수행하였으며 조건은 94 $^{\circ}$ C 6분 후 94 $^{\circ}$ C 1분, 55 $^{\circ}$ C 2분, 72 $^{\circ}$ C 3분을 1 cycle로 하여 25회에 이어 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 수행하였다. 각각 2개의 조직을 primer 또는 Taq polymerase를 제외하여 음성대조군으로 하였다.

(2) 제 2군

2명의 환자의 조직을 제 1군과 동일한 방법으로 0.2N HCl로 전처리한 후 동일하게 준비된 PCR 용액, 온도 및 시간으로 30회 수행하였다.

(3) 제 3군

1명의 환자(No. 1)의 조직을 제 1군과 동일하게 전처리 한 후 10 μ g/ml proteinase K(lysis buffer, 50mM Tris-HCl pH 7.4, 10mM EDTA, 10mM NaCl)에 5분간 37 $^{\circ}$ C로 항온시켰으며 2mg/ml glycine에 5분간 2회 담그어 효소반응을 종료시키고 20% acetic acid에 15초간 4 $^{\circ}$ C에서 담그고 인산완충용액으로 2회 세척하였다. 동일한 조건으로 30회 조건의 PCR을 수행하였다.

(4) 제 4군

1명의 환자(No. 2)의 조직을 0.2N HCl에 10분간 담그고 세척한 후 0.01% triton X-100에 3분간 담그고 후 세척하고 10 μ g/ml의 proteinase K로 7분간 37 $^{\circ}$ C에서 항온시켰다. PCR은 동일한 조건으로 30회 수행하였다.

3) 직접검출(direct detection)

Mineral oil을 chloroform으로 제거한 후 세척하고 Behringer Mannheim 사의 Dig nucleic acid detection kit를 이용하여 증폭된 DNA를 검출하였다. 조직을 세척완충액(100mM maleic acid, 150mM NaCl pH7.5, 0.03% Tween 20)에서 1분간 세척한 후 1% blocking solution(1% blocking reagent, 100mM Maleic acid, 150mM NaCl)에서 15분간 반응시키고 1:1000으로 희석된 anti-Dig-alkaline phosphatase conjugate 용액에서 30분간 반응시켰다. 100mM maleic acid가 포함된 완충액(pH 7.5)으로 10분씩 2회 세척하여 결합되지 않은 항체를 제거한 후 detection

buffer(100mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 50mM MgCl₂ pH9.5)에 2분간 담그어 평형(equilibrate)시킨 후 NBT/BCIP(nitro blue tetrazolium /5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate)를 기질로 하여 색이 변할 때까지 빛을 차단하였다. TE buffer(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0)에 5분간 담그어 반응을 종료시킨 후 neutral red염색을 하여 광학현미경하에서 관찰하였다. 양성을 보이는 세포의 특이도(specificity)를 높이기 위하여 핵주위로 고리같이 염색되었거나 핵과 세포질이 모두 염색된 세포는 제외하였다.

결 과

2명의 결핵양형 나환자로부터 얻은 10개의 파라핀 포매조직으로 Digoxigenin을 이용하여 direct *in situ* PCR을 수행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) HCl로 40분간 전처리한 후 25cycle의 PCR을 수행한 조직에서는 양성조건을 관찰할 수 없었다.

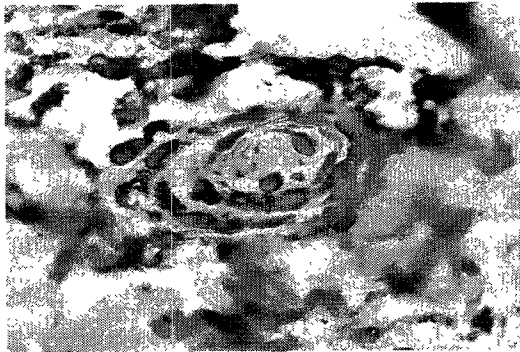


Fig. 1. Strongly positive signals of schwann cells(×1000).

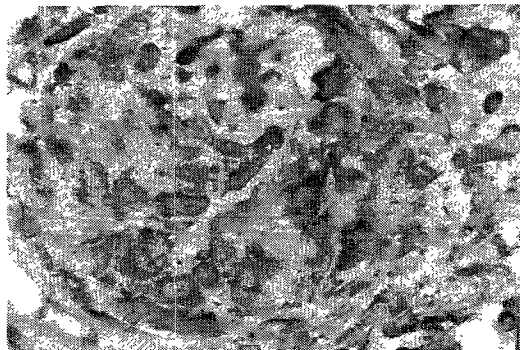


Fig. 2. Positive-stained cytoplasm of about a half of epithelioid cells within a swollen nerve bundle(×1000).

2) HCl로 40분간 전처리한 후 30cycle의 PCR을 수행한 환자의 조직 2예 중 1예에서만 양성으로 염색되는 몇 개의 상피양세포를 관찰할 수 있었다.

3) HCl로 40분간 전처리한 후 10μg/ml proteinase K로 5분간 처리한 조직은 슈만세포(Schwann cell)의 대부분과 종창된 신경내의 상피양세포(epithelioid cell) 및 슈만세포와 육아종을 구성하는 상피양세포의 약 반수에서 증폭된 DNA를 세포질 내에서 관찰할 수 있었다(Fig. 1~3). 혈관 중 1개에서만 양성으로 염색되는 세포질을 갖는 혈관내피세포를 관찰하였다(Fig. 4). 직모근, 한선 분비세포 또는 표피직하부 진피 등에서는 양성반응을 볼 수 없었다.

고 안

중간결핵양형 나는 나균에 대하여 비교적 높은 세포면역을 보이며 감각이 소실된 피부병변과 비후된 말초신경을 갖는 것을 특징으로 한다. 피부도말검사의 세균학적

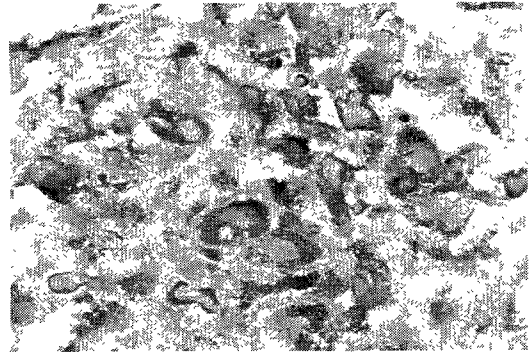


Fig. 3. Most epithelioid cells composing of the granuloma show positive signal(×1000).

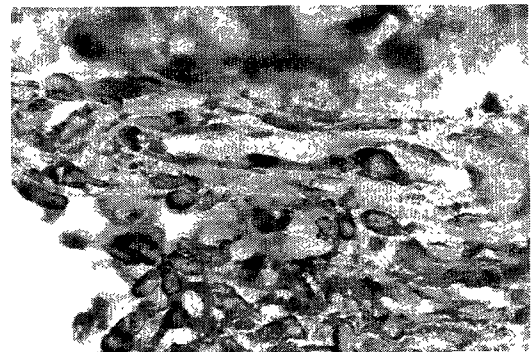


Fig. 4. The cytoplasm of endothelial cell strongly stained(×1000).

지수는 0에서 2+이며 신경을 따라 분포하는 육아종을 관찰할 수 있으며 조직에서 대부분 나균이 검출되지 않는다. 현미경하에서 균의 검출이 가능하려면 피부조직 50mg당 적어도 1 내지 3×10^4 개의 균이 있어야 하므로⁷⁾ 저자는 *in situ* PCR을 시행하여 세포내의 나균의 DNA를 증폭하여 증폭된 DNA가 존재하는 세포를 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

In situ PCR은 PCR에 비하여 세포내에서 모든 반응이 일어나야 하므로 반응액의 침투와 동시에 조직의 형태가 보존되어야 하고 전 과정에 걸쳐 조직이 마르지 않게 해야 하는 어려운 점이 있다. 저자는 조직의 형태를 보존하고 전과정의 시간을 최소화하기 위하여 PCR cycle 수를 25cycle로 시도하였으나 양성세포를 관찰할 수 없었다. 25cycle에서 양성세포를 관찰할 수 없었던 것은 proteinase K처리를 하지 않았으므로 반응액의 침투가 충분하지 않았거나 PCR에 비하여 *in situ* PCR의 효율 (efficiency)이 낮기 때문인 것으로 사려된다. 0.2N HCl로 전처리하고 30cycle을 수행한 조직 중 한 명에서는 양성반응을 관찰할 수 없었던 것은 HCl의 전처리만으로는 세포내의 침투가 충분하지 않아서인 것으로 사려된다. 연구결과로는 0.2N HCl에서 40분간 그리고 10 µg/ml proteinase K로 5분간 처리한 조직에서 양성세포를 가장 잘 관찰할 수 있었으나 1예에 불과하여 앞으로 더 많은 수의 조직에서 수행하여 확인되어야 할 것으로 사려된다.

In situ PCR의 검출법은 직접 검출법과 간접검출법으로 나누어지며 직접검출법은 Dig-dUTP를 이용하여 표지된 PCR 생산물을 항체를 이용하여 검출하는 것이며 간접검출법은 슬라이드 위에서 PCR을 수행하고 *in situ* hybridization을 하는 것을 말한다. Komminoth 등⁸⁾은 조직을 이용하는 경우 조직이 cut되는 과정에서 DNA의 손상 등이 일어나므로 직접검출법은 간접검출법에 비하여 mispriming의 가능성이 훨씬 높아지므로 조직은 간접검출을 할 것을 추천하였으나 나균은 핵이 아니라 세포질 내에서 기생하므로 전체과정의 시간을 줄이고자하여 직접검출 하였다. 또한 본실험에서 primer를 넣지 않은 음성대조군에서는 몇개의 극히 약한 signal을 보이는 세포만이 관찰되었으며 핵과 핵주위로 고리같이 염색되는 세포는 mispriming의 가능성을 배제할 수 없어서 제외하였다.

나균이 진피 신경에 도달하는 경로에 대하여 지금까지

세가지로 추측하고있다. 첫째는 나균이 표피로부터 직접 표피 또는 상부진피의 종말신경말단(terminal nerve ending)으로 들어와서 신경을 따라 진피의 슈반세포로 이동한다는 것이며¹²⁾ 둘째는 나균이 혈류를 따라 신경내 혈관에 도달하여 슈반세포로 이동한다는 것이며¹³⁻¹⁵⁾ 셋째는 나균을 가진 탐식세포를 통해 subperineurial space에 나균이 기생하다가 후에 혈류의 순환과 함께 파급된다는 것이다¹⁶⁾. Ridley 등¹⁷⁾은 초기에는 피부에 있는 신경말단에 나균이 들어와서 주로 혈행성으로 nerve trunk로 상향하여 있다(ascend) 후에 혈관 신경 막(blood-nerve barrier)이 염증에 의해 파괴될 때 순환혈류로부터 진피의 신경에 도달한다고 하였으며 이들은 전자현미경 관찰을 통하여 이를 추측하였다. 좀 더 많은 수의 조직에서 시행하여야 하겠으나 본 연구결과만으로는 슈반세포와 탐식세포의 하나인 상피양세포와 혈관내피세포에서 양성반응을 볼 수 있었으며 표피적하부의 진피와 표피 각질세포에서는 양성반응을 볼 수 없었다. 관찰된 조직은 염증반응이 이미 시작된 병변으로 초기 병변의 조직에서 이를 시행할 수 있으면 나균의 전과 경로에 대하여 좀 더 많은 정보를 얻을 수 있으리라 기대한다.

요 약

Fite 염색으로 조직에서 나균이 관찰되지 않았던 중간 결핵양형 나환자 2명으로부터 얻은 10개의 파라핀 포매 조직을 이용하여 direct *in situ* PCR을 수행하였다. 시료 조직은 0.2N HCl에서 40분간 그리고 10µg/ml proteinase K로 5분간 전처리한 후 비방사성 동위원소인 Digoxigenin을 이용하여 표지하는 조건으로 PCR을 30회 수행한 결과 1개의 조직에서 부분의 슈반세포와 상피양세포, 몇개의 혈관내피세포가 양성반응을 보였다.

References

- 1) Crum CP, Nuovo G, Friedman D : A comparison of biotin and isotope labeled ribonucleic acid probes for *in situ* detection of HPV 16 ribonucleic acid in genital precancers. *Lab Invest* 1988 ; 58 : 354-359
- 2) Nuovo GJ : A comparison of different methodologies (biotin based and 355 based) for the detection of hu-

- man papillomavirus DNA. Lab Invest* 1989 ; 61 : 471-476
- 3) Gressens P and Martin JR : *In situ polymerase chain reaction : Localization of HSV-2 DNA sequences in infections of the nervous system. J Virol Methods* 1994 ; 46 : 61-83
 - 4) Hasse AT, Retzel EF and Staskus KA : *Amplification and detection of lentiviral DNA inside cells. Proc Natl Acad Sci USA* 1990 ; 87 : 4971-4975
 - 5) Embretson J, Zupancic M, Beneke J, Till M, Wolinsky S, Ribas JL, et al : *Analysis of human immunodeficiency virus-infected tissues by amplification and in situ hybridization reveals latent and permissive infections at single-cell resolution. Proc Natl Acad Sci USA* 1993 ; 90 : 357-361
 - 6) Dyanov HD, Pzitoeva SG : *Method for attachment of microscopic preparation on glass for in situ hybridization. Biotechnique* 1995 ; 18 : 824-826
 - 7) Williams DL, Gilli TP, Booth RJ : *The use of a specific DNA probe and polymerase chain reaction for the detection of mycobacterium leprae. J Infect Dis* 1990 ; 162 : 193-200
 - 8) Long AA, Komminoth P, Wolfe HF : *Comparison of indirect and direct in situ polymerase chain reaction in cell preparations and tissue sections. Histochemistry* 1993 ; 99 : 151-162
 - 9) Nuovo GJ, Gallery F, MacConnell P, Becker J, Bloch W : *An improved technique for the in situ detection of DNA after polymerase chain reaction amplification. Am J Pathol* 1991 ; 139 : 1239-1244
 - 10) Spann W, Pachmann K, Zabnienska H, Pielmeier A, Emmerich B : *In situ amplification of single copy gene segments in individual cells by the polymerase chain reaction. Infection* 1991 ; 19 : 242-244
 - 11) Konninoth P, Long AA, Wolfe HJ : *Comparison of in situ polymerase chain reaction, in situ hybridization and polymerase chain reaction for the detection of viral infection in fixed tissue. Pathologia* 1992 ; 25 : 253
 - 12) Khanolkar VR : *Perspectives in pathology of leprosy. Indian J Med Sci* 1955 ; 9 : 1-44
 - 13) Weddell AGM, Palmer E : *The pathogenesis of leprosy. Lepr Rev* 1963 ; 34 : 57-61
 - 14) Pearson JMH and Ross WF : *Nerve involvement of leprosy-pathology, differential diagnosis and principles of management. Lepr Rev* 1975 ; 46 : 199-212
 - 15) Chandi SM and Chacko CJG : *An ultrastructural study of dermal nerves in early human leprosy. Int J Lepr* 1987 ; 55 : 515-520
 - 16) Boddinus J : *Ultrastructural changes in blood vessels of peripheral nerves in leprosy neuropathy. Acta Neuropathol(Berl)* 1977 ; 40 : 21-39
 - 17) Ridley DS : *Pathogenesis of leprosy and related diseases, 1st ed. London, Wright, 1988 : p 72*