

In Situ PCR에 의한 중간균 나환자의 진단에 관한 연구

이화여자대학교 의과대학 피부과학교실, 의과학연구소 분자생물학부
최 혜 영

= Abstract =

A Study of in situ PCR on Borderline Leprosy Patients

Hae Young Choi

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

This study was planned to help the diagnosis of borderline leprosy by application of the *in situ* PCR. *In situ* PCR was performed in the tissue from skin biopsy using the Dig DNA probe synthesis kit[®] (Behringer Mannheim Co) on silanized slides and Dig incorporated PCR products were visualized by alkaline phosphatase conjugated anti-Dig antibody using NBT/BCIP as substrate. In the borderline lepromatous patients homogeneous or granular strong deposits were observed mainly within the cytoplasm of the histiocytes and proliferated Schwann cells. Some secretory cells of sweat glands, erector pile muscle and a few endothelial cells were weakly stained. In the tuberculoid leprosy patients no positive signal was observed. In conclusion *in situ* PCR can be applied on the tissue of berderline lepromatous patients of which sample does not need proteinase K treatment.

KEY WORDS : In situ PCR · Leprosy.

서 론

나병은 *Mycobacterium leprae*에 의한 만성 감염성 질환으로 나균에 대한 세포면역의 정도에 따라 결핵양형 나(tuberculoid leprosy), 중간균 나(borderline leprosy), 나중형 나(lepromatous leprosy)로 분류된다¹⁾. 이 중 나중형 나는 나균에 대하여만 선택적으로 세포면역이 결여된 것으로 피부 진피, 점막, 안구, 신경 등에서 수많은 나균과 나균을 탐식한 대식세포를 발견할 수 있다. 이에 반해 결핵양형 나는 피부 및 신경에서 나균을 발견할 수

없으며 감각이 소실된 피부 병변과 비후된 신경 및 신경을 따라 배열된 육아종으로 인하여 진단할 수 있다. 그러나 얼굴 등과 같이 신경분포가 많은 부위에서는 상대적으로 감각의 소실이 명확하지 않아 진단에 어려움이 있다. 중간균 나는 다시 세포면역의 정도에 따라 중간결핵양형 나(borderline tuberculoid leprosy)와 중간 나중형 나(borderline lepromatous leprosy)로 분류된다.

1985년 시험관에서 중합효소를 이용하여 특정 부위의 DNA를 증폭하는 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)²⁾이 개발되었으며 나병에 이를 적용한 보고들이 있다³⁻¹⁵⁾. PCR은 그 기법과 종류 또 이

에 따른 적용이 다양하며 신속하게 결과를 얻을 수 있고 나균의 경우 PCR에 의하여 1~10개 정도의 균이 있을 때에도 이를 검출할 수 있다는 장점이 있다. 그러나 이 방법은 DNA를 추출하는 과정과 PCR 반응 후 전기영동 및 hybridization 과정이 필요하며 이러한 과정에서 비교적 많은 시간이 소요된다. 이에 반해 *in situ* PCR은 조직에서 DNA를 추출하지 않고 직접 조직 위에서 PCR을 시행하여 나균 유전자를 증폭검출하는 것으로 DNA의 추출과정과 전기영동에 소요되는 시간이 절약되며 증폭된 DNA의 조직학적 위치를 알 수 있다.

저자는 중간균 나환자의 파라핀 포매조직을 이용하여 *in situ* PCR을 시행하여 그 결과를 보고하고자 하였다.

대상 및 방법

연구대상은 1994년부터 1996년까지 나병연구원을 방문한 중간균 나환자로 모두 신환이었으며 중간 결핵양형 나 1명, 중간 나종형 나 5명이었으며 34~56세 사이의 연령으로 피부도말검사상 중간 결핵양형 나에서는 나균이 관찰되지 않았으며 피부조직에서도 나균은 관찰되지 않았고, 중간나종형 나에서는 5명 중 3명은 세균학적 지수가 4+이었으며, 1명은 5+, 나머지 1명은 6+이었다(Table 1).

연구방법은 슬라이드를 Dyanov 등¹⁶⁾의 방법에 따라 Silane으로 처리한 후 사용하였고 Dig(Digoxigenin)-dUTP[®](Boehringer Mannheim Co.)를 사용하여 PCR 생성물에 labelling이 되게 하였으며 이를 직접 anti-Dig-AP(alkaline phosphatase) conjugate를 이용하여 반응시킨 후 NBT/BCIP를 기질로 하여 발색하였다. 6명 중 5명에서는 PCR 전에 100 μ g/ml Proteinase K로 10분간 처리하였으며 1명은 Proteinase

K 처리 없이 0.2N HCl로 40분간 처리하였다.

이를 간략히 설명하면 슬라이드를 0.1% Bind-Silane[®] 용액(Pharmacia Co.)에 10초간 담그고 용액이 마른 후에 다시 0.05% Poly-L-Lysine[®](Sigma Co.) 용액에 담그어서 슬라이드가 조직에 잘 부착될 수 있게 한 후 파라핀 포매조직을 5 μ m 두께로 잘라 슬라이드에 올려 놓고 Xylene으로 파라핀을 제거하였다. 90%, 70%, 50%, 30% 알코올에 10분간 걸쳐 조직을 담그어 가수시켰다. 6명 중 5명은 100 μ g/ml proteinase K를 10분씩 처리한 후 glycine으로 반응을 종료시키고 인산 완충용액으로 세척하였다. 다른 1명(Table 1의 N0. 5)은 proteinase K 처리 없이 0.2N HCl에 40분간 담근 후 인산 완충용액으로 세척하고 0.2% Tween²⁰에 10분간 조직을 담근 후 다시 인산완충용액으로 세척하였다. 6명의 조직을 모두 10분 정도에 걸쳐 30%, 50%, 70%, 90% 와 100% 알코올에 차례로 담그어 탈수시켰다. PCR 반응은 Behringer Mannheim사의 PCR Dig probe synthesis kit를 이용하였다. primer는 나균 DNA의 repetitive sequence 중에서 372bp DNA를 증폭하는 것으로 염기서열은 5-CGCCCGGATCCTCGATGCAC-3과 5-GCACGTAAGCTTGTGCGGTGG-3이며 50 μ mol씩 각각 사용하였고 200 μ M의 dATP, dCTP, dGTP와 130 μ M의 dTTP, 70 μ M의 Dig-dUTP, 4mM MgCl₂, 2.5U Taq polymerase를 사용하여 총 50 μ l의 반응용액을 만들었다. 조직에 Slide seal[®](Hybaid Co.)을 붙인 후 80 $^{\circ}$ C로 가열된 슬라이드에 PCR반응액을 넣고 mineral oil로 채우고 PCR 반응을 수행하였다(Omnigene thermocycler[®]). 반응조건은 94 $^{\circ}$ C 6분 후 94 $^{\circ}$ C 1분, 55 $^{\circ}$ C 2분, 72 $^{\circ}$ C 3분 30회, 72 $^{\circ}$ C 10분의 PCR반응을 수행하였고 반응 후 mineral oil을 제거한 후 2 \times SSC에 2번 씻은 후 42 $^{\circ}$ C 에서 0.1 \times SSC에 10분간 조직을 씻었다. Behringer Mannheim사의 Dig Nucleic acid detection kit를 이용하여 labelled DNA를 검출하였다. 조직을 세척완충액(100mM Maleic acid, 150mM NaCl, pH 7.5, 0.03% Tween²⁰)에 1분간 세척한 후 1% blocking solution(1% blocking reagent, 100mM Maleic acid, 150mM NaCl)에서 15분간 incubation시켰으며 1:2000으로 희석된 anti-Dig-AP conjugate 용액에서 1시간 반응시켰다. 100mM Maleic acid, 150mM NaCl, pH7.5용액으로 2번 세척한 후 detection buffer(100mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 50mM MgCl₂, pH9.5)에서

Table 1. The Characteristics of subjects

Patient No.	Age/Sex	Type	BI***	Biopsy site
1	M/34	BT*	0	foot
2	M/56	BL**	4+	leg
3	F/44	BL**	4+	leg
4	F/52	BL**	4+	arm
5	M/34	BL**	5+	arm
6	M/44	BL**	6+	leg

* BT : Borderline tuberculoid leprosy

** BL : Borderline lepromatous leprosy

***BI : Bacterial index

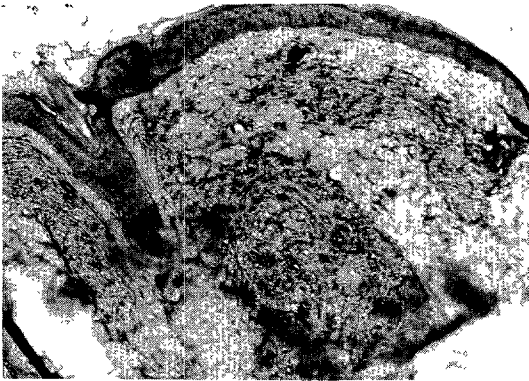


Fig. 1 In the dermis, positively stained cells compose of granulomas($\times 100$).

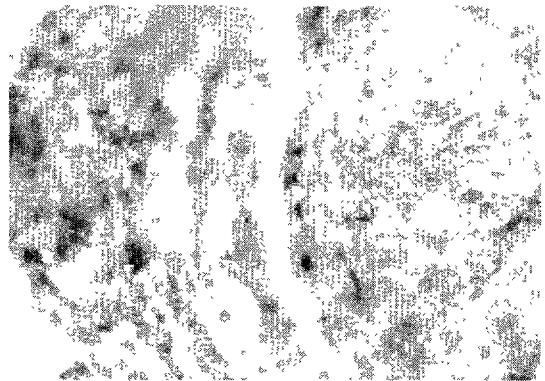


Fig. 4 Weakly stained proliferated Schwann cells($\times 400$).

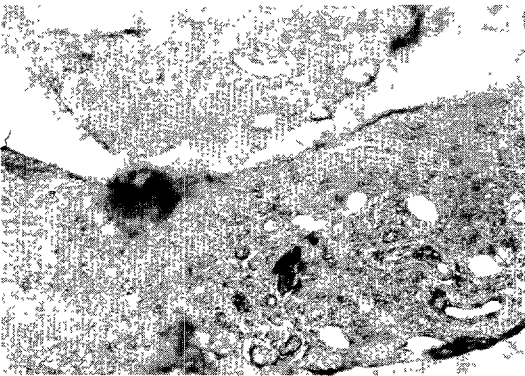


Fig. 2 Most stained cells locate around the sweat glands($\times 100$).

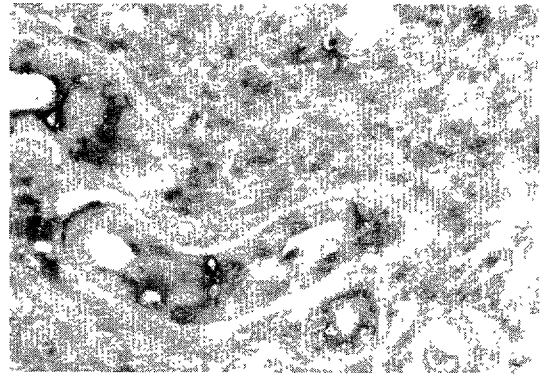


Fig. 5 Positively stained secretory cells of eccrine sweat glands($\times 400$).

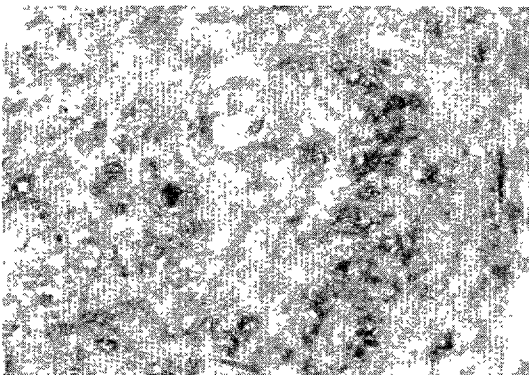


Fig. 3 Granular stains within the histiocytes and proliferated Schwann cells($\times 400$).

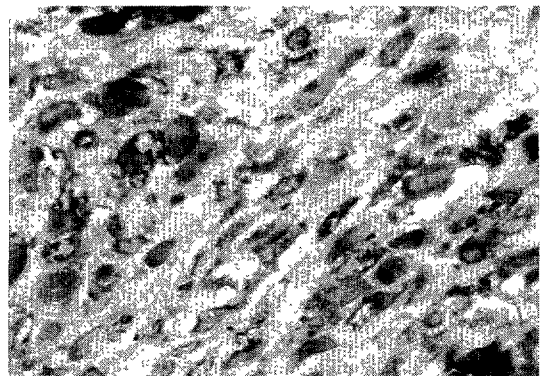


Fig. 6 Under the higher magnification, homogeneous and granular deposits within the histiocytes($\times 1000$).

2분간 담그고 NBT/BCIP용액에서 색이 변할 때까지 빛을 차단하였다. TE buffer(10mM Tris-HCL, 1mM EDTA, pH8.0)에서 5분간 세척하여 반응을 종료시킨 후 neutral red 염색을 하여 광학현미경하에서 관찰하였다.

결 과

1) Proteinase K 처리를 하지 않은 환자의 조직에서는 진피내에 침윤된 대부분의 조직구 세포질 내에 균일

고 안

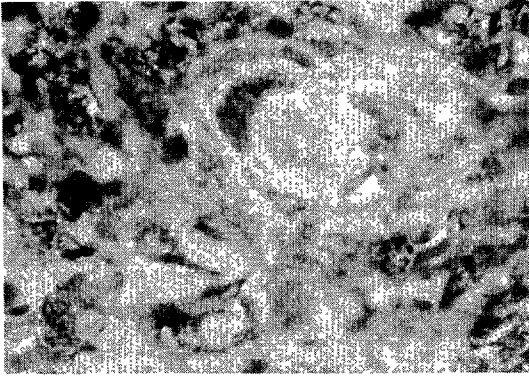


Fig. 7 Strongly stained histiocytes around the vessels(X 1000).

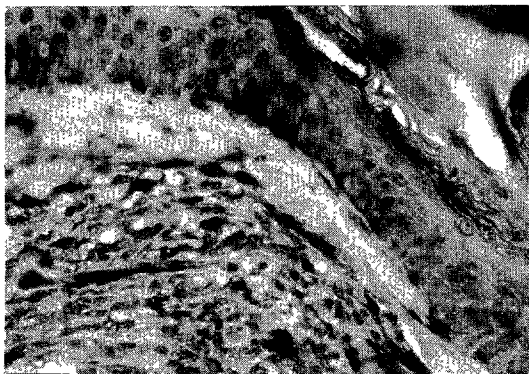


Fig. 8 There is no positively stained cells in the grenz zone and epidermis(X 1000).

하게 또는 점상으로 염색되는 것을 관찰할 수 있었고 진 피신경의 증식된 Schwann cell에서도 비교적 강한 정 도의 염색상을 볼 수 있었다. 혈관 내피세포와 한선의 분 비세포에서도 세포질 내의 염색을 볼 수 있었다. 그러나 대부분의 혈관 내피세포는 염색되지 않았다. 한선의 분 비세포는 주로 분비관에 인접하여서만 염색되어서 한선의 비특이적인 염색과 구별하기가 어렵다. 직모근의 세 포 중 몇몇 세포에서는 핵 주위로 약하게 염색되는 것을 관찰할 수 있었고 상부진피와 표피에서 양성으로 염색되 는 세포는 관찰할 수 없었다(Fig. 1-8).

2) Proteinase K 처리를 한 5명의 환자의 조직은 중 간 결핵양형 나와 중간 결핵양형 나는 조직을 제외하고는 PCR 반응 도중 또는 PCR 반응 후의 과정 중 진피의 콜라겐섬유와 표피 및 한선을 제외하고는 거의 모든 진피내 세포들이 소실 되고 비특이적인 배경염색만을 보였다. 중간결핵양형 나 환자의 조직은 양성으로 염색되는 세포를 관찰할 수 없 었다.

나병은 *Mycobacterium leprae*에 의한 만성감염성 질환으로 매우 다양한 피부병변으로 나타나고 한국에서는 약 만여명의 환자들이 항나제 치료를 받고있다. 나병 중 결핵양형 나와 중간 결핵양형 나는 감각의 소실과 조직 검사상 신경을 따라 분포하는 육아종을 형성하는 점을 특징으로 하나 감각의 소실이 불분명한 안면부위의 병변 이나 부정균 나(indeterminate leprosy)인 경우 피부 도말검사나 병변의 조직 내에서 나균을 발견할 수 없으 며 현재까지는 나균의 배양이 되지 않으므로 확진에 어 려움이 있었다. 그러나 PCR의 개발 및 보급으로 피부조직, 피부조직액, 말초혈액 등에서 이를 적용하여 진단에 도움을 주고 있다. PCR 반응후 생성물을 방사성 동위원 소를 이용하여 hybridization을 하므로써 확인할 수 있 다. 방사선 동위원소는 특이하고 민감한 결과를 가져오 는 장점이 있으나 다루는 데에 어려움이 있으므로 방사 성 동위원소가 아닌 biotin이나 digoxigenin 등을 이용 하는 방법들이 소개되고 있다. 조직이나 세포에서 비방 사성동위원소를 이용하여 PCR 후 labelling한 보고들 이 있으며 주로 Human papilloma virus 나 Herpes simplex virus를 검출하였다¹⁷⁻²³⁾. 조직을 이용하여 전 형적인 PCR을 수행하는 경우 조직에서 우선 DNA를 추출하고 반응 후에는 전기영동을 하여 예상되는 크기의 band를 얻음으로서 어떤 유전자의 존재여부를 판가름 한다. *in situ* PCR의 경우 앞의 두 과정을 거치지 않는 장점은 있으나 조직이 전 과정에서 형태를 유지하면서 슬 라이드에 부착되어야 하고 과정 중에 조직이 말라버리지 않아야 하는 문제가 있다. 또한 PCR 반응액이 조직 내의 DNA에 잘 침투하는 것이 또한 어려움이 될 수 있다. 나 환자 조직에서 비방사선동위원소에 의한 hybridization 을 시행한 보고²⁴⁻²⁷⁾들은 전형적인 PCR을 한 후 이 생성 물을 colorimetric method에 의하여 확인하였다. 본 실험은 Dig-dUTP를 이용하여 PCR 생성물이 labelling 되게 한 후 직접 anti-Dig-AP conjugate를 이용하여 반응시켰다. 1992년 Arnoldi 등²⁸⁾은 대식세포에 나균을 *in vitro* infection시킨 후 이러한 세포들을 *in situ* hybridization과 PCR을 통하여 관찰하였다. 본 실험에서 와 같이 직접 환자의 조직에서 *in situ* PCR을 하는 경우 조직내의 나균 DNA의 존재와 함께 나균의 위치를 알

수 있다는 장점이 있다고 하겠다. 저자의 경우 균이 검출되는 조직을 이용하여 *in situ* PCR의 적용여부를 알고자 하였으며 PCR 반응액의 침투를 위해 Proteinase K를 사용하였으나 비교적 짧은 시간 incubation하였음에도 효소반응 직후나 PCR 과정 중의 높은 온도에서 조직의 소실을 가져 왔다. 이는 앞으로 적절한 반응시간을 결정하는 것이 과제임을 보여준다고 하겠다. 균이 매우 많은 경우를 제외하고는 대개의 경우 균이 잘 관찰되지 않는 혈관내피세포에서 양성 염색이 관찰된 점은, 추후 조직에서 균을 관찰할 수 없는 결핵양형 나와 중간결핵양형 나에 이를 적용하여 진단과 발병기전에 도움을 줄 수 있을 것을 생각할 수 있다. 본 실험은 비교적 나균이 많은 조직을 이용하여 *in situ* PCR 적용여부를 보고자 하였으며, Proteinase K 처리를 하지 않고 HCl 처리만 한 조직에서 결과를 관찰할 수 있었던 것은 조직에 나균이 비교적 많은 수가 있었기 때문인 것으로 사려된다. 나균이 관찰되지 않았던 중간 결핵양형 나환자의 조직은 Proteinase K로 반응을 시켰음에도 양성으로 염색되는 세포를 관찰할 수 없었던 것은 양성을 보일 수 있는 조직이 과정 중에 소실된 것인지 Proteinase K 처리가 중간 나중형 나환자의 조직에 비해 더 많은 시간이 필요한 것인지는 아직은 알 수 없다.

나병은 지금까지 정확한 나균의 전파와 발병경로가 불확실하며 따라서 생체조직에서의 나균의 위치는 이러한 면에서 어떤 실마리를 제공할 수 있을 것으로 사려된다. 본 실험에서는 나균이 있는 것으로 알려진 신경, 조직구, 혈관내피세포, 직모근 및 한선 등에서 양성으로 염색되는 세포들이 관찰되었으나, 나균의 발견이 보고된 상부 진피에서는 양성반응을 볼 수 없었다.

요 약

6명의 중간군 나환자의 조직에서 *in situ* PCR을 시행하여 나병 진단의 적용여부를 알고자 하였다. Dig DNA probe synthesis kit² (Behringer Mannheim Co.)를 이용하여 나환자의 조직에서 *in situ* PCR을 시행하였으며 증폭된 나균유전자는 Dig DNA nucleic acid kit[®] (Behringer Mannheim Co.)의 anti-Dig 항체로 검출하였고 기질로 NBT/BCIP를 사용하여 현미경하에서 관찰하였다. 대상이 되었던 중간군 나환자 중 중간 나중형 나환자의 조직은 proteinase K 처리없

이 HCl 처리를 하였을 때 진피내 조직구와 Schwann cell에 균일하게 또는 점상으로 강하게 염색되었으며 일부 혈관내피세포, 한선 및 직모근의 세포도 약한 양성의 소견을 관찰할 수 있었고, 중간결핵양형 나환자의 조직에서는 양성반응을 관찰할 수 없었다.

■ 감사의 글

나환자 조직을 제공하여 준 대한나관리협회 나병연구원의 원장님과 피부과 과장님, 및 조직의 처리과정에 도움을 준 나관리협회 김기희과장님, 강필수 이희숙 선생과 본원 피부과의 최유원, 최윤정선생에게 감사를 드립니다.

References

- 1) Ridley DS, Jopling WH : *Classification of Leprosy according to immunity-a five group system. Intern J Leprosy* 1966 ; 34 : 255-273
- 2) Saike RK, Scharf S, Falona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al : *Enzymatic amplification of globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science* 1985 ; 230 : 1350-1354
- 3) Williams EL, Fillis TP, Booth RJ : *The use of a specific DNA probe and polymerase and polymerase chain reaction for the detection of Mycobacterium leprae. J Infect Dis* 1992 ; 162 : 193-200
- 4) Hartskeerl RA, Madeleine YL de Wit, Klatse PR : *Polymerase chain reaction for the detection of Mycobacterium leprae. J Gen Microbiol* 1989 ; 135 : 2357-2364
- 5) Pikaytis BB, Gelber RH, Shinnick TM : *Rapid and sensitive detection of Mycobacterium leprae using a nested primer gene amplification assay. J Clin Microbiol* 1990 ; 28 : 2913-2917
- 6) George EB, Lila CO, James TS : *Rapid, simple method for treating clinical specimens containing Mycobacterium tuberculosis to remove DNA for polymerase chain reaction. 1992 ; 30 : 1331-1334*
- 7) Woods SA, Cole ST : *A family of dispersed repeats in Mycobacterium leprae. Mol Microbiol* 1990 ; 4 : 1745-1751
- 8) Woods SA, Cole ST : *A rapid method for the detection of potentially viable Mycobacterium leprae in human biopsies : a novel application of PCR. FEMS*

Microbiol Lett 1990 ; 4 : 1745-1751

- 9) Clark-Curtiss JE, Docherty MA : *A species specific repetitive sequence in Mycobacterium leprae DNA. J Infect Dis* 1989 ; 159 : 7-15
- 10) Grosskinsky CM, Jacobs WR, Clark-Curtiss JE : *Genetic relationship among Mycobacterium leprae, Mycobacterium tuberculosis, and candidate leprosy vaccine strains determined by DNA hybridization : identification of an Mycobacterium leprae-specific repetitive sequence. Infect Immun* 1989 ; 57 : 1535-1541
- 11) 윤경환 · 조상래 · Gerald PW · 이정복 · 김주덕 : 나환자 피부생검조직에서 중합효소연쇄반응을 이용한 나균의 검출. *대피지* 1994 ; 32 : 409-415
- 12) Grange JM : *The rapid diagnosis of paucibacillary tuberculosis. Tubercle* 1989 ; 70 : 1-4
- 13) Diana LW, Thomas PG, Roger JB, Douglas L, James DW : *The use of a specific DNA probe and polymerase chain reaction for the detection of Mycobacterium leprae. J Infect Dis* 1990 ; 162 : 193-200
- 14) Madeleine YL, William RF, Suze RK, James TD, Sebastian BL, et al : *Application of a polymerase chain reaction for the detection of Mycobacterium leprae in skin tissues. J Clin Microbiol* 1991 ; 29 : 906-910
- 15) Paulo F, Diana LW, Gertrude PC, Thomas PG : *Effects of fixation on polymerase chain reaction detection of Mycobacterium leprae. J Clin Microbiol* 1992 ; 30 : 3095-3098
- 16) Hristem MD, Svetlana GD : *Method for attachment of microscopic preparation on glass for in situ hybridization, PRINS and in situ PCR studies. Biotechnique* 1995 ; 18 : 824-826
- 17) Leary JJ, Browne G, Johnson MI, Landers R, Crowley M, Healy I, et al : *PCR in situ hybridization detection of HPV 16 in fixed CaSki and fixed SiHa cell lines. J Clin Pathol* 1994 ; 47 : 933-938
- 18) Nuovo GJ, Joanne B, Michele M, Phyllis M, Stephen C, Herbert H : *Histological distribution of polymerase chain reaction-amplified human papillomavirus 6 and 11 DNA in penile lesions. Am J Surg Pathol* 1992 ; 16 : 269-275
- 19) Nuovo GJ, Phyllis MC, Angella F, Phyllis D : *Detection of Human Papillomavirus DNA in formalin-fixed tissues by in situ hybridization after amplification by polymerase chain reaction. Am J Pathol* 1991 ; 139 : 847-854
- 20) Nuovo JG, Frances G, Phyllis M, Joanne B, Will Bloch : *An improved technique for the in situ detection of DNA after polymerase chain reaction amplification. Am J Pathol* 1991 ; 139 : 1239-1244
- 21) Bernard C, Mouglin C, Bettinger JM : *Detection of juman papillomavirus by in situ polymerase chain reaction in paraffin-embedded cervical biopsies. Mol Cell Probe* 1994 ; 8 : 337-343
- 22) Viviane C, Remy G : *Chemiluminescent and colorimetric detection of a fluorescein-labelled probe and a digoxigenin-labelled probe after a single hybridization step. Mol Cell Probe* 1994 ; 8 : 401-407
- 23) 박경찬 : *In situ PCR. Kor Soc Med Biochem Mol Biol News* 1996 ; 1 : 31
- 24) Jamil S, Wilson SM, Hackett M, Hussain R, Stoker NG : *A colorimetric PCR method for the detection of M. lepre in skin biopsies from leprosy patients. Intern J Leprosy* 1994 ; 62 : 512-520
- 25) Nishimura M, Shibuta K, Uoshikawa U, Oh CK, Suzuki T, Chung TA : *Methods in pathology. An improved method for DNA diagnosis of leprosy using formaldehyde-fixed, paraffin-embedded skin biopsies. Modern Pathol* 1994 ; 7 : 253-256
- 26) Dayanghirang JA, Matsuoka M : *Quantitative determination of PCR products by colorimetric method. Mippon Rai Gakkai Zasshi- Japanese J Leprosy* 1993 ; 62 : 21-27
- 27) Vliet GM, de Wit MY, Kaltser PR : *A simple colorimetric assay for detection of amplified Mycobacterium leprae DNA. Mol Cell Probes* 1993 ; 7 : 61-66
- 28) Arnoldi JC, Schloter MD, Hubner L, Ernst M, Teske A, Flad HD : *Species-specific assessment of Mycobacterium leprae in skin biopsies by in situ hybridization and polymerase chain reaction. Lab Invest* 1992 ; 68 : 618-623