

## In Situ Hybridization을 이용한 종양세포내 간기핵 염색체수의 이상

계명대학교 의과대학 병리학교실

이 상 숙

### Detection of Chromosome Aberration in Interphase Nuclei of Tumor Cells by Nonradioactive In Situ Hybridization Using Chromosome-specific Probes

Sang Sook Lee, M.D.

*Department of Pathology, Keimyung University School of Medicine*

An improved protocol for in situ hybridization (ISH) to routinely processed, paraffin-embedded tissue sections from lung carcinoma is presented. For this study, DNA probes for alpha-satellite chromosome 7 and 17 were used. The protocol to detect numerical chromosome aberrations involved treatment of sections with 1 M sodium thiocyanate prior to pepsin digestion, resulting in reproducible ISH reactions. The effect of avidin-biotin interactions in several detection systems for ISH was studied, using three or four layers of avidin-biotin detection system. Four layer avidin methods and triple biotin methods, using avidin-PO, goat antiavidin, biotinylated antigoat IgG, avidin-PO or anti-biotin, biotinylated antirabbit IgG, avidin-PO markedly enhanced the intensity of positive signals. More than 80% of the tumor and stromal cells showed distinct chromosome hybridization signals in 6  $\mu$ m-thick sections. Lung carcinoma cells showed multiple chromosome signals (2~5 spots), contrasted by one or two signals in the stromal cells in the same section.

These results suggest that chromosome polysomy can be reliably detected in tissue sections using in situ hybridization. This capability will prove to be an important tool for determining the underlying genetic basis for tumor development, tissue phenotype heterogeneity and progression by allowing genetic determination to be made on paraffin-embedded tissue sections where tumor histologic architecture is preserved. (**Korean J Pathol 1993; 27: 573~580**)

**Key Words:** In situ hybridization; Chromosome aberration; Avidin; Biotin; DN A probes

### 서 론

많은 예의 악성 병소에서 염색체의 양적, 구조적 이상이 동반된다<sup>1)</sup>. 이와 같은 종양의 염색체의 변화를

알고자 flow cytometry (FCM), 핵형분석 (karyotyping) 및 분자생물학적 기법들이 개발되어 사용되고 있다. 그러나 FCM의 방법으로 종양세포군의 전체 DNA 양을 알 수 있으나 특정 염색체의 이상 여부는 알 수 없다. 암세포의 핵형분석에 의한 염색체의 분석은 주로 유사분열의 중기 (metaphase)에서 이루어 지는데 이로서 염색체의 양 및 구조상의 아주 작은 변화 까지도 검색할 수 있다. 그러나 대부분의 경우 조직배양 후에야 핵형분석이 가능하다. 최근 분자생물학적 기법의 발전으로 유전자의 연구가 가능해져 유전자의 복제수, 구조와 발현 조절등을 규명할 수 있게 되었다.

접 수: 1993년 1월 30일, 게재승인: 1993년 6월 8일  
주 소: 대구시 중구 동산동 194번지, 우편번호 700-310  
계명대학교 의과대학 병리학교실, 이상숙

\*본 연구는 1992년도 계명대학교 비사연구비에 의해 지원되었음.

이러한 3가지 방법들의 한계를 극복하고자 non-radioactive in situ hybridization(NISH) 기법이 개발되었다<sup>2)</sup>. 근래에는 다양한 종류의 특정 염색체의 DNA probe들이 상품화되어 이를 이용한 ISH방법으로 증기뿐만 아니라 간기(interphase) 핵에서도 염색체의 수적, 구조적 이상을 알 수 있게 되었다. 소위 "Interphase cytogenetics"(IC)는 유사분열을 행하지 않는 세포의 간기핵에서 ISH를 실시하여 유전자를 분석함을 의미하는데 이는 처음 Cremer등<sup>3)</sup>에 의해 소개되었다. 특히 증식성 종양에서는 적당 수의 유사분열하는 세포들을 얻기 힘들고 설사 배양이 이루어진 다 하더라도 배양도중 유전자의 변이가 생길 수 있어 이러한 IS는 증식성 암종의 세포유전학의 연구에 한 강력한 방법이 될 수 있다. ISH는 핵형분석에 비해 시간이 적게 걸리고 또한 핵형분석이나 FCM보다도 유전자의 수적, 구조적 이상에 대한 더욱 정확한 정보를 제공하여 준다.

최근 파라핀 블록에 포매된 조직절편을 이용한 FCM<sup>4)</sup>, ISH<sup>5)</sup>, polymerase chain reaction(PCR) 기법<sup>6)</sup>들이 개발되어 특정 질환의 연구가 가능해 졌다. 이와 함께 파라핀 블록에서 특정 염색체의 DNA probe를 이용한 ISH방법들이 속속 개발되어<sup>7,8)</sup> 간기핵의 염색체의 이상을 탐지할 수 있어 배양에 쉽게 이루어 지지 않아 어려웠던 증식성 종양의 염색체의 분석이 가능해 지게 되었다. 지금까지 특정 염색체의 ISH가 유방암<sup>9)</sup>, 위암<sup>10)</sup>, 혈액종양<sup>11)</sup>, 방광암<sup>12,13)</sup> 등에서 이루어져 산발적인 보고가 있어 왔다. 그러나 파라핀 블록 조직의 종양 세포핵의 염색체 이상여부를 연구하는데 ISH의 적용은 아직 소수에 불과하나 최근 증가하는 경향을 띄고 있다. 한편 국내에서는 분자 유전학에 대한 관심은 증대되고 있으나 아직 연구실적의 발표는 극히 저조하다.

소위 chromosome ISH 기법은 조직이나 세포배양 없이 세포도말이나 기존에 만들어진 파라핀 블록 조직을 이용하여 특정 염색체를 발현함을 의미하는데 여기에는 정해진 방법이 없어 상당히 기술상의 어려움이 따른다. 이는 조직의 종류, 특성, 고정액 및 고정 시간, 보관상태 등 여러 요소들이 관여하여 적절한 조건을 맞추기가 어렵기 때문이다.

이에 저자들은 계명대학교 동산의료원 해부병리과에서 통상적으로 만들어져 3년에서 6년동안 보관된 파라핀 블록을 대상으로 NISH 방법으로 종양세포 및 정상세포의 간기핵에서 특정 염색체를 발현하고 이 때 생길 수 있는 제반 문제점 및 그 해결책을 제시하고자 한다.

### 재료 및 방법

재료는 포르말린으로 고정되고 파라핀으로 포매되어 3~6년간 보관된 폐의 원발성 편평상피암 및 어린이

의 편도조직 5예씩을 대상으로 하였다.

방법은 아래와 같다.

#### 1) 유리슬라이드 및 조직 절편 준비

유리슬라이드를 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS, Sigma, USA)용액에 2시간 담구어 흔들어 씻은 후 흐르는 물에 2시간동안 수세하였다. 95% 에탄올로 5분씩 2번 탈수한 후 공기중에 건조시켰다. 아세톤에 2%로 용해한 3-aminopropyltriethoxysilane (APES, Sigma, USA)로 2분간 처리한 후 다시 증류수로 수세하여 공기에 건조시켜 60°C 오븐에 하루밤 말린 후 사용하였다.

전처리한 유리슬라이드위에 6 μm의 조직절편을 부쳐 60°C 오븐에서 하룻밤 두어 조직절편이 유리슬라이드에 밀착되게 하였다.

#### 2) 전처리

조직절편이 붙어 있는 유리슬라이드는 xylene에 5분씩 2번 담구어 파라핀을 철저히 제거한 후 100% 에탄올에 5분씩 2번 담구어 탈수하고 공기에 건조시켰다. 내인성 페록시다제반응을 차단하기 위해 메탄올에 1% 농도로 용해한 과산화수소용액에 담구어 30분간 실온에 두었다. 그후 조직의 단백질 분해를 위해 Hopman등<sup>12)</sup>에 의해 제시된 80°C 수조에 미리 덜혀 둔 1 M sodium thiocyanate(Sigma, USA) 용액에 슬라이드를 담구어 80°C의 수조에 10분간 둔 후 증류수로 수세하여 반응을 종료하였다. 0.2 M 염산에 0.4% 농도로 용해한 펩신용액에 슬라이드를 담구어 37°C에서 5~15분가량 두어 대부분의 세포질의 단백 및 핵의 단백 일부를 제거하였다. 적당한 펩신 소화의 조건을 설정하기 위해 펩신 농도를 0.1%, 0.2%, 0.4%로, 시간을 37°C에서 15, 30, 45, 60분까지 두었다. 한편 sodium thiocyanate를 사용하지 않고 0.4% 펩신만을 사용하여 37°C에서 15, 30, 45, 60, 90분간 두어 결과를 서로 비교하였다. 그후 증류수로 씻어 펩신 반응을 중지시킨 후 일련의 에탄올로 탈수하고 아세톤으로 후고정하여 공기에 건조시켰다.

DNA probe는 Oncor사의 제 7 및 17 번 염색체의 중심절부위의 DNA 배열순을 인지하는 반복성 alpha satellite DNA probe(p7tet1), biotinylated를 사용하였다.

#### 3) ISH

ISH의 방법은 Kim등<sup>14)</sup>의 방법을 수정하여 사용하였다. 중요과정을 보면 RNase A, 1.0 mg/ml (Sigma, USA)로 37°C에 1시간 처리하여 조직내 RNA를 없애고 2×SSC(0.3 M NaCl: 30 mM sodium citrate, pH 7.0)로 3분씩 3번 수세한 후 제열 에탄올로 다시 탈수하여 공기에 건조시켰다. Hybri-

dization 혼합물의 최종 농도는 60% formamide, 2× SSC, 5% dextran sulfate, 0.1 μg/μl salmon sperm DNA와 1 ng/μl biotinylated DNA probe로 구성하였다. 조직절편위에 각각 10 μl의 hybridization 혼합물을 놓고 덮게 유리를 덮은 후 rubber cement로 덮게 유리의 주변을 봉하였다. 슬라이드의 조직절편의 표적 DNA와 DNA probe를 denaturation을 하였는데 이 때 94°C의 수조, 오븐 또는 heating block을 이용하였다. 94°C에서 4분간 가열한 후 얼음위에 5분간 두었다. Hybridization은 37°C 항온기에서 하룻밤(16시간 가량) 두어 시행하였다. 다음날 조직절편 위에 남아있는 결합되지 않은 DNA probe를 떼어내기 위해 50% formamide: 1× SSC(pH 7.0)으로 실온에서 15분간씩 2번, 0.1× SSC로 37°C에서 15분씩 2번 세척하였다. 음성대조군으로 슬라이드의 조직절편위에 DNA probe를 놓지 않고 완충액을 사용하였으며 그밖의 과정은 동일하게 처리하였다.

#### 4) Hybridized DNA probes의 검색

Biotinylated DNA probe를 사용하여 avidin항체와 biotin항체를 매개로 하여 각기 3~4단계의 일련의 avidin-biotin계열의 시약을 사용하여 페록시다제반응에 의해 발색하였다.

이때 사용한 avidin-biotin 계열의 시약 및 희석율은 다음과 같다.

- 1) ABC(avidin and biotinylated peroxidase complex)(ABC Vectastain kit, Vector, U.S.A.), 1 : 50
- 2) Avidin, FITC-conjugated(Av-FITC; Vector, U.S.A.), 1 : 100
- 3) Avidin, peroxidase-conjugated(Av-PO; Dako, U.S.A.), 1 : 80
- 4) Rabbit anti-biotin(Anti-bio; Enzo, U.S.A.), 1 : 100
- 5) Biotinylated goat anti-avidin(Bio-anti-avidin; Vector, U.S.A.), 1 : 100
- 6) Streptavidin peroxidase-conjugated(St. av-PO; Dako, U.S.A.), 1 : 500
- 7) Biotinylated anti-goat IgG(Bio-anti-goat; Vector, U.S.A.), 1 : 100
- 8) Biotinylated anti-rabbit IgG(Bio-anti-rabbit; Vector, U.S.A.), 1 : 50

#### A. Avidin 항체를 이용한 3단계 방법

- (1) Av-FITC/Bio-anti-avidin/Av-PO
- (2) Av-PO/Bio-anti-avidin/Av-PO
- (3) Av-FITC/Bio-anti-avidin/ABC
- (4) Av-PO/Bio-anti-avidin/ABC
- (5) Av-FITC/Bio-anti-avidin/St.av-PO
- (6) Av-PO/Bio-anti-avidin/St.av-PO

#### B. Avidin 항체를 이용한 4단계 방법

- (1) Av-PO/Bio-anti-avidin/Bio-anti-goat/Av-PO
- (2) Av-PO/Bio-anti-avidin/Bio-anti-goat/St.av-PO
- (3) Av-PO/Bio-anti-avidin/Bio-anti-goat/ABC

#### C. Biotin 항체를 이용한 3단계 방법

- (1) Anti-bio/Bio-anti-rabbit/Av-PO
- (2) Anti-bio/Bio-anti-rabbit/St.av-PO
- (3) Anti-bio/Bio-anti-rabbit/ABC

조직절편을 처음 3% bovine serum albumin (BSA, Sigma, USA)와 0.05% Tween 20(Sigma, USA)를 함유한 phosphate-buffered saline(PBS)로 10분간 반응시켜 페록시다제의 비특이성 결합을 차단하였다. 그후 위에 열거한 avidin-biotin 계열의 시약을 차례대로 37°C에서 30분씩 반응시켰다. 반응 사이에 슬라이드를 PBS로 3차례씩 세척하였다. Avidin-biotin-peroxidase complex(ABC)는 30분전에 미리 만들어 둔 것을 사용하였다. Diaminobenzidine tetra-hydrochloride(DAB)-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>용액으로 10~20분 두어 발색하고 희석한 Mayer's hematoxylin 또는 Giemsa용액으로 대조염색하였다. DAB의 발색을 강하게 하기 위해 NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O를 첨가하였다.

#### 6) ISH 결과의 판정

ISH의 결과 발현되는 신호(signal)은 80~90% 이상의 거의 모든 세포의 핵에서 고루 발현되어야만 만족할 만하며 그렇지 못한 경우는 다시 실시하였다. 전체적으로 200배의 현미경 시야에서 거의 모든 세포의 핵에서 까만 점이 보일 정도이면 아주 만족할 만하며 신호의 강도 또한 적당하다고 생각되었다.

ISH의 신호의 검색은 종양 세포인 경우 슬라이드당 400개 이상의 핵을, 정상 세포인 경우 200개 이상을 세었다. 적절하게 수를 세는 요건은 Hopman등<sup>15)</sup>에 의해 제안된 것을 따랐는데 다음과 같다. ① 핵이 서로 중첩되지 않는 것, ② 신호의 강도가 같은 핵속에서 균일한 것, ③ 반점은 단지 신호들이 완전히 분리될 때 만 인정하였고 쌍으로 존재하거나 갈라졌을 때는 하나로 세었다. ④ 미세한 결합 부위 같은 비특이적인 신호는 수에서 제외하였다.

#### 성 적

파라핀으로 포매한 조직절편을 이용할 때 ISH 기법은 단백질분해과정, 높은 열을 가하는 denaturation과정 및 수많은 수세 과정을 통해 조직의 상해가 초래되어 ISH 도중에 조직의 일부 또는 전부가 탈락되기도

한다. 이를 막기 위해서 사용할 유리슬라이드에 미리 접착제를 처리하게 된다. 슬라이드를 깨끗이 세척한 후 poly-L-lysine나 APES를 처리하여 60°C에서 하룻밤 둔후 사용한다. 이 때 poly-L-lysine을 사용한 슬라이드는 냉장고에서 2주간 저장할 수 있으나 APES의 경우 실온에서 영구 보관할 수 있어 APES를 추천한다. 전처리한 슬라이드에 조직절편을 부착한 후 60°C에서 하룻밤 두어 조직 절편을 유리에 밀착시켜 조직의 탈락을 예방할 수 있었다.

DNA probe가 조직내 잘 침투하려면 세포핵 주변의 세포질과 핵막 일부가 없어져야 한다. Sodium thiocyanate는 단백을 소화시키는 가장 강력한 제재 중 하나로서 세포 추출물에서 DNA나 RNA로부터 단백을 분리시킨다고 알려져 있다<sup>16)</sup>. 조직절편위에 1 M sodium thiocyanate 용액을 적당량 놓은 후 80°C 수조에서 10분간 열을 가하면 DNA-nucleo-histone complex를 효과적으로 분리시킬 수 있다. 또한 비특이적인 배경 염색이 없이 좋은 신호를 얻기 위해서는 산과 단백분해 효소(proteinase)의 처리가 필수적이다. Sodium thiocyanate를 사용하지 않고 펩신만을 사용한 경우 0.2 M 염산에 0.4%로 용해한 펩신이 가장 적당한 농도였다. 펩신을 37°C에서 30분 반응시켰을 때 단백 분해가 덜되어 신호가 아주 약했다. 그러나 60분간 두었을 때 암조직에서 대체적으로 분명한 신호를 보였다. 그러나 반복하여 같은 암조직을 사용하여 ISH를 시행해 보니 그 결과가 상당히 다양하였다. 펩신은 농도에 관계없이 반응한지 60분 이상이 초과되면 과도하게 단백분해가 되어 핵의 손상이 심하여 핵 모양이 부서지거나 심지어 핵의 탈락이 초래 되었다. 저자는 1 M sodium thiocyanate로 80°C에서 10분간 전처리한 후 다양한 펩신 농도와 온도 및 반응시간들을 사용하여 단백소화의 결과를 비교하였는데 0.2 M 염산에 0.4%로 용해한 펩신으로 37°C에서 5~15분간 반응한 것이 가장 좋았다. 이와 같이 sodium thiocyanate를 펩신과 함께 사용했을 때가 펩신만 사용했을 때 보다 더욱 일관성 있고 효율적인 반응을 보였다. Sodium thiocyanate를 전처리함으로써 펩신 처리시간을 단축시킬 수 있어 핵형태를 더욱더 잘 보존할 수 있고 동시에 비교적 균일한 ISH신호를 발현할 수 있게 되었다.

그러나 종양조직주변의 간질세포나 염증세포는 종양 세포보다 더욱 긴 시간의 펩신소화가 필요하다. Kim 등<sup>14)</sup>에 의하면 정상조직이 종양조직과 같이 좋은 ISH 신호를 발현하기 위해서는 냉장고내에서 15분간의 펩신의 전처리를 추천하였다. 저자들도 펩신의 사전 처리에 의해 정상세포와 같은 균일한 결과를 얻을 수 있었다.

조직절편의 두께는 4 μm보다 6 μm로 잘랐을 때 핵이 비교적 좋은 형태와 충분한 하이브리드결합 신호를 보였다. 6 μm의 조직절편이 일반적으로 추천되는

바 저자의 결과와 일치하였다.

Denaturation조건은 핵 형태가 잘 보존되고 충분한 하이브리드결합 신호를 내는데 95°C 수조내에서 조직내 표적 DNA와 DNA probe가 동시에 4분간 denaturation함이 가장 적당하였다. 80°C에서 조직과 DNA probe를 따로따로 denaturation한 경우 발현이 거의 되지 않았으며 100°C가 넘게 되면 조직의 손상이 심했다.

Hybridized probe의 검색은 신호의 증폭을 위해 일련의 avidin-biotin 시약을 이용한 페록시다제 방법을 사용하였다. Avidin 항체를 이용한 3단계 방법 중 첫 단계에서 Av-PO를 사용한 쪽이 Av-FITC를 사용하였을 때 보다 더욱 강한 신호를 보여 주었다(Fig. 1a). Avidin 항체를 이용한 3단계 방법보다 이차 항체를 한번 더 사용한 4단계 방법을 사용했을 때 훨씬 더 분명한 신호를 보였다(Fig. 1b). Biotin 항체를 이용한 3단계 방법을 시행한 결과 avidin 항체를 이용한 4단계 방법보다 더욱 강한 신호를 보여(Fig. 1c) 현미경 배율 100~200배에서도 반응여부를 알 수 있다. 모든 방법의 마지막 단계에 사용하는 Av-PO, ABC, St.av-PO 사이에는 큰 차이는 없었다. DNA probe를 사용하지 않고 동일한 ISH방법을 실시한 결과 전혀 신호가 보이지 않았다(Fig. 1d). 본 연구결과에 의해 저자는 avidin 항체를 이용한 4단계 방법보다 시간 및 비용이 적게 들면서 더 큰 신호의 증폭을 보이는 biotin 항체를 이용한 3단계 방법을 추천하는 바이다.

제 7 번 및 17 번 염색체 중심절 probe를 사용하여 ISH한 결과 폐암조직의 50% 이상의 종양 핵에서 3 개 이상의 염색체 중심절의 신호를 보여 이배성(aneuploidy)을 나타내었다. 한편 간질에 침윤하는 임파구와 간질세포에서는 1개 내지 2개의 분명한 신호를 나타내었다. 편도조직의 림프구도 1개 또는 2개의 신호를 보였다. 신호들의 모양, 크기 또는 염색 강도 등은 다양했으나 미소한(minor) 결합장소와는 감별이 가능하였다.

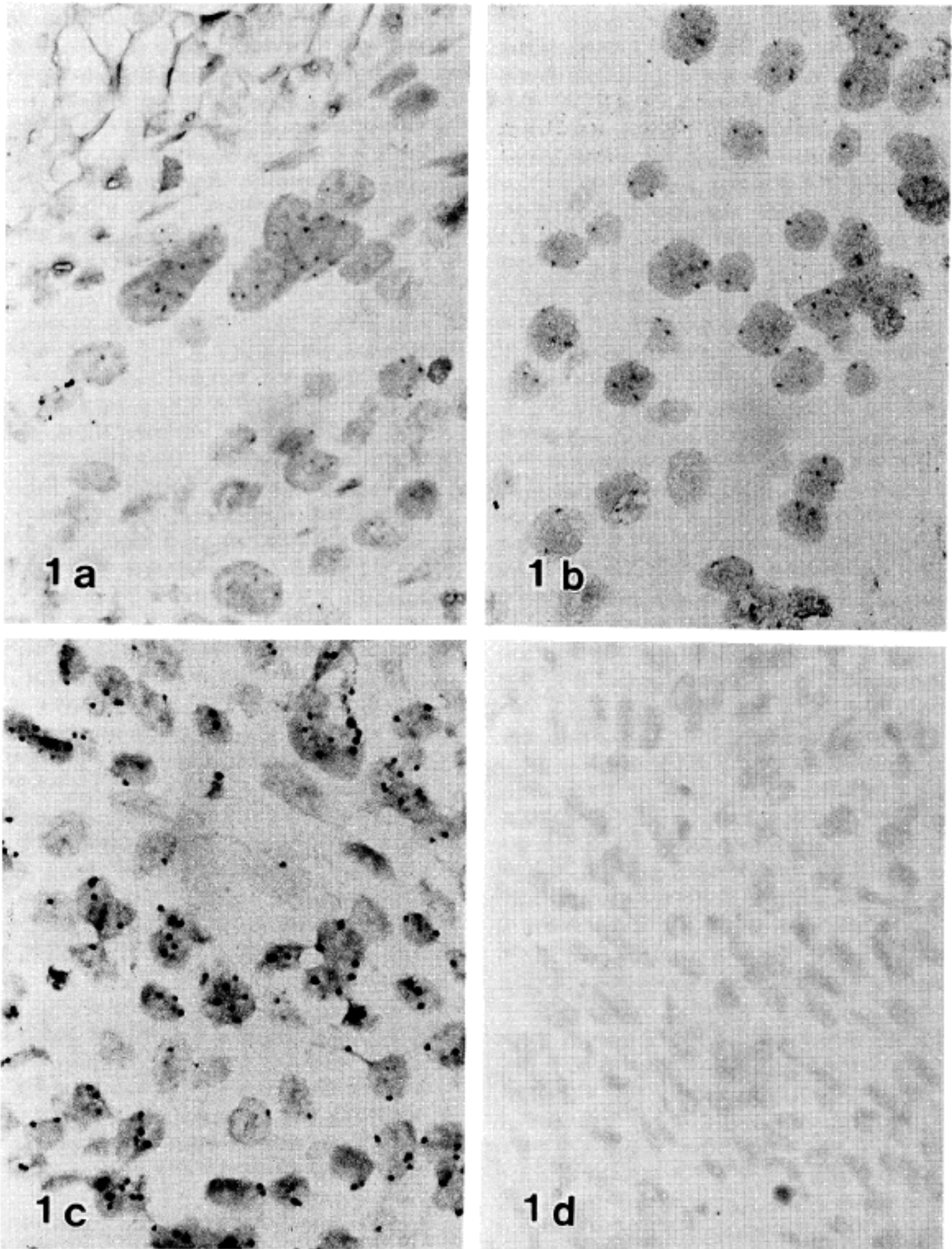
제 17 번 염색체를 이용한 ISH 방법은 7번과 유사하였다. 그러나 17번 염색체의 DNA의 반복성 배열 순의 복제수가 5,000개로 7번의 500개에 비하면 훨씬 많아서 발현되는 신호도 더욱 강했다.

이상의 결과로 보아 ISH은 종양의 조직학적 구조가 보존되어 있는 조직 절편에서 유전학적으로 검색함으로써 종양의 발생, 종양 형태의 이질성 및 종양의 진행 등에 따른 형태적 변화와 염색체의 수적 변화를 서로 비교함으로써 종양의 표현형과 유전형을 동시에 연구할 수 있는 획기적 방법이라 생각된다.

## 고 찰

분자 세포 유전학(molecular cytogenetics)으로





**Fig. 1.** The effects of avidin-biotin interactions in detection systems for ISH. (a) Triple step avidin method(Av-PO/Bio-anti-avidin/Av-PO) with a moderate signal intensity; (b) Four step avidin method(Av-PO/Bio-anti-avidin/Bio-anti-goat/Av-PO) with a strong signal intensity; (c) Triple step biotin method(anti-bio/bio-anti-rabbit/Av-PO) with a very intense chromosome signals; (d) No signals in the negative control slide without using DNA probe.

사람에서 생긴 암조직이나 암세포에서 유전자의 이상을 분석하려는 시도가 급증하고 있다. 특수한 염색체의 반복성 표적이 되는 DNA의 배열순이나 전 염색체의 배열순(library sequence)을 감지할 수 있는 cloned DNA probe를 사용한 FISH가 주로 사용되고 있다<sup>17)</sup>. 최근에는 biotinylated chromosome DNA probe를 이용한 NISH 기법이 개발 도입됨으로서 세포유전학 분야의 주된 발전이 이루어졌다<sup>21)</sup>. NISH은 주로 세포의 증기의 염색체 조작에 의해서 이루어 졌으나 최근에는 간기 핵의 간 염색체를 발현할 수 있게 되었다. 심지어 여러 가지의 다른 핵산 표적을 각기 다른 형광으로 발현하여 구조적인 염색체 이상을 알 수 있게 되어<sup>18,19)</sup> NISH가 암의 세포유전학 특히 충실성 암종에서 염색체 이상을 아는 중요한 방법이 될 수 있을 것이다. 지금까지 방광암<sup>13)</sup>, 유방암<sup>9)</sup> 및 위암<sup>10)</sup> 등에서 채취한 신선한 종양의 종양세포의 간기 핵에서 ISH에 의해 수 많은 염색체의 이상이 밝혀졌다. 대부분의 ISH를 이용한 IC는 신선한 종양조직의 단일세포부유물에서 이루어져 왔다. 이 때 신선한 종양 채취의 어려움, 단일 세포부유물을 만들 때 종양세포와 정상세포가 서로 혼합되는 점, 그리고 동반되는 병리조직소견을 알 수 없는 단점이 있다. 반면 파라핀 블록을 이용하게 되면 위의 문제점들이 해결될 수 있다. 그러나 신선한 조직을 사용할 때보다 파라핀으로 포매된 조각을 쓸 경우 조직의 종류, 고정액의 종류 및 시간, 파라핀 블록의 보관 상태등 여러 요인들이 복잡하게 작용하여 ISH 당시 파라핀 제거, 포르말린 고정에 따른 단백질분해과정 등 DNA probe의 조직침투를 위한 적절한 조직의 준비과정이 어렵다. 즉 조직의 손상을 극소화하며 신호가 분명하게 드러나는 데는 조직마다, 조직 유형에 따라 너무나 달라 ISH에 의해 일관성 있게 발현하기란 어렵다. 특히 염색체 probe를 사용하는 경우 바이러스 DNA의 ISH<sup>20)</sup>와는 달리 발현이 아주 작은 점으로 핵에 나타나게 되므로 적절한 ISH의 기준을 정하기가 까다로운 실정이다. NISH의 개발로 급기야 포르말린으로 고정되고 파라핀으로 포매된 조직 블록에서도 그 적용이 가능하게 되었다<sup>5)</sup>. 이 연구에서 조직병리 실험실에서 만들어진 기존의 파라핀으로 포매된 종양조직의 IC를 위한 보다 일관성있는 NISH 방법에 대해 기술하였다. ISH 기법상 가장 중요한 점은 다음과 같다. 첫째 조직이 탈락되지 않아야 되며, 둘째, 적절한 단백질분해로 세포질단백 및 핵막의 단백질 일부가 제거되어야 비로써 probe의 침투가 가능해 지며 셋째, 높은 온도의 열을 가함으로서 denaturation의 효율을 높여야 조직내 표적 DNA와 DNA probe 사이의 결합율이 높아 진다는 점이다. 그 밖에 발색과정 중에 면역조직화학법이 이용되는데 여러 단계를 이용한 증폭방법으로 보다 발색을 더욱 강하게 할 수 있다. 조직의 ISH도중 탈락은 APES를 사용하여 슬라이드를 전처리한 후 하

룻밤 60°C 오븐에 둠으로써 방지할 수 있었다. NISH에 의해 발색된 염색체의 신호를 분석하기 위해서는 잘 보존된 핵내에 분명한 신호(점)이 존재해야 하고 핵주위나 핵을 덮는 배경의 비특이 반응이 없어야 한다. 배경의 비특이 반응을 없애기 위해 적당한 산 처리와 단백질분해가 중요하다. 파라핀으로 포매된 조직내 viral DNA를 검색하기 위한 NISH에서는 일반적으로 0.1~0.4% 펩신이 적당하나 이는 IC용으로는 적합하지 않았다. 1 M Sodium thiocyanate로 80°C에서 10분 처리한 후 0.4% 펩신으로 5~15분간 반응하니 가장 적당하였다.

특정 염색체의 biotinylated 중심질 probe를 이용한 NISH로 발현되는 신호의 크기가 아주 작아서 발색이 강하지 않고서는 탐색하기 어렵다. 그러나 Pinkel등<sup>17)</sup>에 의해 세포화학염색시 증폭방법이 처음으로 기술되어 검색의 감수성이 증가하게 되었다. 이는 흔히 FISH에서 Av-FITC, Bio-anti-avidin, Av-FITC의 3단계방법이 주로 사용되어 왔다. FISH에서 증폭을 실시하면 신호는 분명해 지나 배경염색과 감별이 어렵고 오랜 시간 보관할 수 없다는 단점이 있다. 최근에 NISH에서 신호 증폭을 위해 여러 단계의 avidin-biotin 계열의 효소 및 항체들을 사용한 연구들이 시도되고 있다<sup>21,22)</sup>. 지금까지의 결과를 보면 avidin 분자들이 2개의 biotinylated 분자층, 즉 hybridized biotinylated DNA probe층과 Bio-anti-avidin층을 서로 효율적으로 연결시키지 못함이 알려져 있다. 이미 표적 DNA와 biotinylated DNA probe가 hybridize되어 패쇄된 망을 일차 형성하고 이를 탐지하는 avidin 분자들의 유입으로 더욱 강하게 패쇄된 망을 형성하게 되어 다음의 Bio-anti-avidin층과 결합이 어렵게 된다. 이와 같은 지건을 바탕으로 저자들은 hybridized probe의 검색을 위해 일련의 avidin-biotin 시약을 이용한 폐목시다제 방법을 사용하였다. Avidin 항체를 이용한 3단계 방법중 첫 단계에서 Av-PO를 사용한 쪽이 Av-FITC를 사용하였을 때 보다 더욱 강한 신호를 보여 주었다. Avidin 항체를 이용한 3단계 방법보다 이차 항체를 한번 더 사용한 4단계 방법이 3단계만 사용했을 때 보다 훨씬 더 분명한 신호를 보였다. Biotin항체를 이용한 3단계 방법을 시행한 결과 avidin 항체를 이용한 4단계 방법보다 더 큰 신호의 증폭을 보여 avidin 항체를 이용한 4단계 방법보다 시간 및 비용이 적게 들면서 신호의 증폭을 보이는 biotin 항체를 이용한 3단계 방법을 추천하는 바이다.

ISH의 신호를 분석하기 위해 Hopman등<sup>15)</sup>이 추천한 조건을 수정하여 적용하였다. 이때 단지 문제가 되는 것은 ISH 신호의 크기가 다양한 것이다. 이는 조직절편을 끓을 당시 DNA 표적 부위의 일부 소실, 암이 발생할 때 생길 수 있는 재배열이나 전좌, 소실 또는 inversion, 중심질에 fragile site의 존재, probe

에 의해 인지되는 장소의 polymorphism 또는 염색체의 밀집성에 의해서도 생길 수 있다.

제 7번 및 17번 염색체 중심절 probe를 사용하여 ISH한 결과 폐암조직의 50% 이상의 종양 핵에서 3개 이상의 염색체 중심절의 신호를 보여 이배성을 나타내었다. 한편 간질에 침윤하는 림프구와 간질세포에서는 1개 내지 2개의 분명한 신호를 나타내었다. 신호들의 모양, 크기 또는 염색 강도 등은 다양했으나 미소한 결합장소와는 감별이 가능하였다.

이 연구에서 대조군으로 어린이의 편도 조직을 사용하였는데 대부분 1개 또는 2개의 신호를 보였다. 이렇듯 hypoploidy가 많은 것은 probe 침투가 불충분하거나, 조직절편을 끊을 당시 표적부위의 소실, 2개의 염색체의 복제가 서로 겹치거나 시각상 혼동되어 수를 센 것으로 생각된다. 종양세포의 핵내의 신호도 전반적으로 신호 수가 적게 산정될 가능성이 많다. 그러나 각 특정 probe로 같은 조건 하에서 ISH한 같은 조직절편 내에서 종양과 정상조직의 핵간의 신호의 modal 수의 비를 조정할 수는 있다. 이는 종양세포의 핵에 발견되는 염색체의 신호의 평균수를 같은 조직절편에 존재하는 정상세포의 염색체 신호의 평균수로 나눈 수, 즉 각 종양의 염색체지수(chromosome index)로써 알 수 있을 것이다<sup>14)</sup>.

결론적으로 저자는 통상적으로 만들어진 파라핀으로 포매된 병리조직절편에서 biotinylated chromosome probe를 이용한 ISH를 실시하여 염색체의 수적 이상여부를 검색할 수 있게 되었다. 이와같이 NISH 방법의 개발로 파라핀으로 포매된 종양조직에서 특정 염색체 이상을 발현함으로써 보다 다양한 장기의 종양조직에 이용하면 이들 종양과 염색체 이상과의 관계를 알 수 있을 뿐만 아니라 주변정상 조직 및 상피내암조직 및 침윤성 암조직에서 비교검토함으로써 다단계 암발생(multistep carcinogenesis) 도중에 생기는 시간별(chronological) 유전학적 변화를 조직병리학적 형태적 변화와 함께 연관시켜 비교할 수 있다. 향후 telomeric probe를 함께 적용하면 염색체의 구조적 변화까지도 알아낼 수 있다. 이러한 분자 세포유전학의 발달로 다양한 종양의 생기는 특정 염색체의 수적, 구조적 이상을 알 수 있고, 치료후 잔여질환을 감지할 수 있으며 앞으로는 이러한 유전적 변화와 예후를 연관시킬 수 있으리라 전망된다. 특히 기존의 핵형분석으로는 결과를 얻기 힘들었던 충실성 종양의 IC의 연구에 더욱 기여할 가능성이 크다고 생각된다.

## 참 고 문 헌

1) Bishop JM. *The molecular genetics of cancer*. Science 1986; 235: 305-11.  
2) Cremer T, Lichter P, Borden J, Ward DC,

Manuelidis L. *Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells by in situ hybridization using chromosome-specific library probes*. Hum Genet 1988; 80: 235-46.

- 3) Cremer T, Landegent J, Brückner A, Scholl HP, Schardin M, Hager HD, Devilee P, Pearson P, van der Ploeg M. *Detection of chromosome aberrations in the human interphase nucleus by visualization of specific target DNAs with radioactive and non-radioactive in situ hybridization techniques: Diagnosis of trisomy 18 with probe L 1.84*. Hum Genet 1986; 74: 346-52.
- 4) mHedley DW, Friedlander ML, Taylor IW. *Application of DNA flow cytometry to paraffin-embedded archival material for the study of aneuploidy and its clinical significance*. Cytometry 1985; 6: 327-35.
- 5) Arnoldus EPJ, Dreef EJ, Noordermeer IA, Verheggen MM, Thierry RF, Peters ACB, Cornelisse CJ, van der Ploeg M, Raap AK. *Feasibility of in situ hybridization with chromosome specific DNA probes on paraffin wax embedded tissue*. J Clin Pathol 1991; 44: 900-4.
- 6) Shibata DK, Arnheim N, Martin WJ. *Detection of human papillomavirus in paraffin-embedded tissue using the polymerase chain reaction*. J Exp Med 1988; 167: 225-30.
- 7) Emmerich P, Jauch A, Hofmann MC, Cremer T, Walt H. *Interphase cytogenetics in paraffin embedded sections from human testicular germ cell tumor xenografts and in corresponding cultured cells*. Lab Invest 1989; 61: 235-42.
- 8) Walt H, Emmerich P, Cremer T, Hofmann M, Banneart F. *Super-numerary chromosome 1 in interphase nuclei of atypical germ cells in paraffin-embedded human seminiferous tubules*. Lab Invest 1989; 61: 527-31.
- 9) Devilee P, Thierry RF, Kievis T, Kolluri R, Hopman AHN, Willard HF, Pearson PL, Cornelisse CJ. *Detection of chromosome aneuploidy in interphase nuclei from human primary breast tumors using chromosome-specific repetitive DNA probes*. Cancer Res 1988; 48: 5825-30.
- 10) van Dekken H, Pizzolo JG, Kelsen DP, Melamed MR. *Targeted cyto-genetic analysis of gastric tumors by in situ hybridization with a set of chromosome-specific DNA probes*. Cancer 1990; 66: 491-7.
- 11) Rowley JD. *Recurring chromosome abnormalities in leukemia and lymphoma*. Semin Hematol 1990; 27: 122-36.
- 12) Hopman AHN, van Hooren E, van de Kaa CA, Vooijs PGP, Ramaekers FCS. *Detection of numerical chromosome aberrations using in situ hybridization*



- dization in paraffin sections of routinely processed bladder cancers. *Mod Pathol* 1991; 4: 503-13.
- 13) Hopman AHN, Poddighe PJ, Smeets AWGB, Moesker O, Beck JLM, Vooijs GP, Ramaekers FCS. Detection of numerical chromosome aberrations in bladder cancer by in situ hybridization. *Am J Pathol* 1989; 135: 1105-117.
  - 14) Kim SY, Lee JS, Ro JY, Gay ML, Hong WK, Hittelman WN. Inter-phase cytogenetics in paraffin sections of lung tumor by non-isotopic in situ hybridization: Mapping genotype/phenotype heterogeneity. *Am J Pathol* 1993; 142: 307-18.
  - 15) Hopman AHN, Ramaekers FCS, Raap AK, Beck JLM, Devilee P, van der Ploeg M, Vooijs GP. In situ hybridization as a tool to study numerical chromosome aberrations in solid bladder tumors. *Histochem J* 1988; 89: 307-16.
  - 16) Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched ribonuclease. *Biochemistry* 1979; 18: 5294.
  - 17) Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 2934-8.
  - 18) Arnoldus EPJ, Wiegant J, Noordermeer IA, Wessels JW, Beverstock GC, Grosveld GC, van der Ploeg M, Raap AK. Detection of the Philadelphia chromosome in interphase nuclei. *Cytogenet Cell Genet* 1990; 54: 108-11.
  - 19) van Dekken H, Bauman JGJ. A new application of in situ hybridization: Detection of numerical and structural chromosome aberrations with a combination centromeric-telomeric DNA probe. *Cytogenet Cell Genet* 1988; 48: 188-9.
  - 20) Brigati DJ, Myerson D, Leary JJ, et al. Detection of viral genomes in cultured cells and paraffin-embedded tissue sections using biotin-labelled hybridization probes. *Virology* 1982; 126: 32-50.
  - 21) Speel EJM, Schutte B, Ramaekers FCS, Hopman AHN. The effects of avidin-biotin interactions in detection systems for in situ hybridization. *J Histochem Cytochem* 1992; 40: 135-41.
  - 22) Holm R, Karlsen F, Nesland JM. In situ hybridization with nonisotopic probes using different detection systems. *Mod Pathol* 1992; 5: 315-9.