

구강점막의 탈락세포를 이용한 Micronuclei 검사의 유용성 검토

김진, 김경주, *차인호

연세대학교 치과대학 구강병리학교실, *구강악안면외과학교실, 구강종양연구소

(ABSTRACT)

Usefulness of Micronuclei Test in Desquamated Oral Epithelial Cells

*Jin Kim, Kyung Ju Kim, *In Ho Cha*

Department of Oral Pathology, *Oral and Maxillofacial Surgery, Oral Cancer Research Institute, Yonsei University College of Dentistry

Based on the fact that oral squamous cell carcinoma(OSCC) develops as a multistep process in the carcinogen-exposed fields, oral precancerous lesions have been treated as a target tissue for chemoprevention study. The specific biological marker for monitoring chemopreventive effects and for predicting the risk of cancer development must be valuable in chemopreventive study. Micronuclei have been studied as a biomarker of elevated risk in the target tissue, in that micronuclei are a reflection of clastogenic events and indicate the ongoing process of DNA damage. This study aimed to evaluate the usefulness of micronuclei test in chemoprevention study. To gain the objectivity and reliability of the data, we cytopinned the desquamated cells rather than did cytologic smear. We compared the micronuclei frequency among normal control, leukoplakia, and OSCC patients. As expected, all of OSCC and dysplastic leukoplakia patients showed micronuclei, while micronucleated cells was found only in 10% of normal control. This result suggests that micronuclei test may contribute to assess the risk of cancer development of the target tissue.

Keywords: oral leukoplakia, squamous cell carcinoma, micronuclei, biomarker

※ 본 논문은 1998년도 연세대학교 치과대학 교수연구비로 수행되었음.

1. 서론

암예방(chemoprevention)개념은 1976년 처음으로 Sporn¹⁾에 의해 언급되었으며 발암과정을 억제하거나 정상조직으로 거꾸로 되돌리는 과정으로 정의된다. 인체에 발생하는 대부분의 암은 다단계과정^{2,3)}과 field cancerization⁴⁾에 의해서 정상조직으로부터 암조직으로 이행되기 때문에 전암상태에서의 암예방은 인간이 암을 극복할 수 있는 가장 핵심적인 방법으로 이해되고 있다^{5,6)}. 특히 구강암은 다단계과정과 field cancerization으로 발생하는 전형적인 암의 일종으로

임상적으로 접근이 용이하여 전암병소를 쉽게 발견하고 암예방 결과를 비교적 쉽게 관찰할 수 있다는 점 때문에 구강의 전암병소는 암예방 연구에 target tissue로 이용되고 있다.

암예방 연구에서 가장 중요한 것 중의 하나로 암의 예방 목적으로 투여된 물질이 과연 암예방 효과가 있는가는 점이다. 약제의 예방 효과를 알기 위해서는 약제가 투여된 환자를 암이 생길 때까지 경우에 따라서는 한평생 정기적 검진이 요구된다. 암예방 연구에서는 이러한 문제점을 극복하고 암예방 약제의 효과와 암의 진행 정도를 평가할 수 있는 방법으로 발암

과정의 intermediate end point로서 biomarker 에 대한 연구의 중요성이 강조되어 왔다⁷⁾.

현재까지 연구되어 온 지표들로서는 유전인자의 변화를 이용한 지표, 증식 능력의 변화를 이용한 지표, 세포의 분화 정도를 이용한 지표 등이 있다⁸⁾. 이 중 micronuclei는 특정한 유전인자 변화는 알 수 없으나 암유발물질에 노출된 부위에 DNA손상이 진행되고 있다는 것을 반영한다⁹⁻¹¹⁾. 탈락세포를 이용한 검사이기 때문에 조직손상을 주지 않는 방법으로 암 발생 위험을 알 수 있는 가장 손쉬운 지표로서 주기적인 관찰에 도움이 되는 장점이 있다. 따라서 본 연구에서는 암으로의 진행을 미리 예측할 수 있는 표지자로, 또한 암예방물질 치료후 약의 효과를 screening하는 표지자로 micronuclei검사의 이용 가능성을 확인하고 이를 검사하는 객관적이고 효과적인 방법을 찾고자 본 연구를 계획하였다.

II. 연구 대상 및 방법

예비실험으로 탈락세포를 도말표본을 만들어 광학현미경적 관찰을 하였으나, 이 방법은 세포수를 세는데 관찰자간의 오차가 있기 때문에 객관적인 연구결과를 얻을 수 없었다. 따라서 본 연구에서는 구강점막으로부터 탈락세포를 채취하여 cytopsin을 시행한 후 Feulgen 염색을 하여 일정면적(19.6 mm²)에서 세포수를 확인하므로써 연구결과의 객관성을 높이고자 하였다.

1. 연구 대상

연구대상으로는 구강상태가 건강하고 전신질환이 없는 본 대학 2학년 남학생들 중 지원자 40명을 대상으로 암설자로 협점막 세포를 채취하였다. 실험군으로는 구강악안면외과에 내원한 구강암종 환자중 세포채취가 가능하였던 3예(verrucous carcinoma 1예 포함)와 백반증 8예, lichen planus 3명을 대상으로 하였다. 모든 환자는 조직생검전 암설자로 병소부위의 세포를 채취하였다.

2. 구강점막으로부터 탈락세포 채취 및 cytopsin

구강점막으로부터 암설자를 이용하여 세포를 채취한 후 세포가 묻은 암설자를 Ca⁺⁺-negative phosphate buffered saline이 담겨져 있는 1.5 ml tube에 넣어 혼돈다. Hemocytometer를 이용하여 세포 수를 측정하고 세포의 농도를 5×10⁵으로 하여 cytopsin을 이용하여 tube내에 있던 세포를 slide로 옮겼다.

3. Feulgen 염색

95% alcohol 에 고정된 slide를 1M-HCl에 1분 동안 실온에서 담가둔후 60℃ 되는 1M-HCl에 10-14분 동안 hydrolysis 시키고 Schiff reagent에 실온에서 45분 이상 염색을 한후 Bisulphit 용액을 3단계로 바꾸어서 각2분 동안 담갔다. Alcohol에 탈수를 한 다음 xylene을 거쳐 봉입하여 광학현미경상 고배율에서 관찰하였다.

4. 결과 분석

Cytopsin시 일정한 농도의 세포를 유지하여 비교적 균일하게 세포가 분포하도록 하였으며, 겹친 부위는 관찰하지 않았다. Micronuclei의 판독은 한 명의 구강병리의사(김 진)가 두 번씩 판독하였다. 판독 기준으로는 Feulgen염색에 양성으로 주핵과 같은 평면상에 위치하는 둥근 조각으로 핵의 크기보다 약 1/3 내지 1/4 크기의 것을 micronuclei로 해석하였다. 결과를 정상대조군과 구강암 및 백반증으로 나누어서 비교 관찰하였다.

III. 연구결과

연구결과를 보면 정상인 남자 40명에서는 10%에서만 micronuclei세포를 관찰할 수 있었다. Micronuclei 세포가 관찰되었던 4명 모두 비흡연자이었으며, 지원자 40명 중 흡연 경력이 있는 12명은 모두 micronuclei 세포가 관찰되지 않았다. 이와는 대

Table 1. Micronuclei frequency in desquamated oral mucosal cells

	Total case	Incidence of micronucleated cells
control	40	4*(10%)
leukoplakia	8	
with dysplasia	4	4
without dysplasia	4	1
lichen planus	3	0
squamous cell carcinoma	2	2
verrucous carcinoma	1	0

* : No smoking history

조적으로 dysplasia가 동반된 백반증 환자 4명은 모두 micronuclei세포를 관찰하였고, 구강암환자 2명도 마찬가지로 2명 모두에서 micronuclei세포가 관찰되었다. Dysplasia가 없었던 백반증에서는 4예 중 1에서만 micronuclei세포가 관찰되었고, lichen planus 환자에서는 micronuclei세포를 볼 수 없었다(Table 1). Micronuclei세포가 관찰될 경우 암종이라 하더라도 전 면적 당 약 1개 내지 2개의 세포에서만 관찰되어 빈도는 극히 낮았다.

IV. 고찰

Micronucleus test는 증충상피에서 손상받은 기저 세포가 세포분열할 때 형성된 염색체조각들이 주핵으로부터 분리되어 형성되는 micronuclei를 검색하여 세포의 유전적 손상정도를 분석하는 방법으로 상피층으로부터 탈락되는 세포를 대상으로 유전적 손상의 정도를 판정하는 유용한 방법으로 보고되고 있다^{12,13,14}. Stich등은¹⁵⁻¹⁷ carcinogen에 노출된 부위에 micronuclei의 빈도가 증가함을 보고하여 DNA손상을 나타내는 지표로 사용할 수 있음을 확인하였다.

두경부 종양의 높은 위험율을 보이는 흡연자나 betel quid chewers 들을 상대로 조사해보면 micronuclei 가 높은 빈도로 관찰되며 vitamin A, alpha-tocopherol등을 투여한 경우 micronuclei 를 가

진 세포 수가 감소되는 것이 보고되었다^{10,11,18}. 이러한 결과로 미루어 micronuclei검사가 전암 병소로서 암 발생의 위험을 알리는 유일한 지표는 될 수 없어도 적어도 field cancerization개념화에서 볼 때 위험 부위를 screening하는데 도움이 되는 지표로 생각되었다.

본 연구 결과로 보아 전암병소환자에 대하여 chemopreventive trial를 시도할 경우 micronuclei검사가 biomarker로서 유용할 것임을 시사하는 결과로 생각된다. 그러나 예수가 적은 관계로 통계학적으로 유의있는 결과를 얻기 위하여는 전암병소 환자와 구강암 환자를 대상으로 data가 계속 추가되어야 한다고 본다.

탈락세포를 이용하여 암발생 위험정도를 조기발견 하려는 시도는 끊임없이 있어왔다. 최근에는 분자생물학적 연구방법의 눈부신 발전으로 탈락세포를 이용하여 messenger RNA를 이용한 검사가 연구된 바 있으나 각화 세포로 terminal differentiation되는 과정에 이미 messenger RNA가 분해되기 때문에 이 검사법은 임상에 이용 가능성이 희박하다고 생각된다¹⁹. Huang등은²⁰ 탈락되는 구강상피세포를 이용하여 p53유전자의 loss of heterozygosity를 연구한 바 조직손상 없이 탈락세포에서 유전자 변화를 조기에 진단할 수 있는 가능성을 보여줬다. 본 연구에서 시행한 micronuclei 검사는 연구방법이 간단한 반면, 몇가

지 문제점을 안고 있다. 첫째 micronuclei를 판정하는 기준이 각기 다르다는 점이다. 즉, Belien¹⁴⁾은 모핵크기의 1/5이하로 둥근 형태만을 micronuclei로 취하였으나, Robin¹³⁾는 작고 불규칙한 모양의 Feulgen염색 양성의 조각을 모두 포함시켰다. 이와같이 학자에 따라 micronuclei를 판독하는 기준점이 달라 연구결과 의 객관성이 문제되고 있다. 본 연구에서는 오차를 줄이기 위하여 1/4 이하의 둥근 모양만을 포함시켰고 한명의 구강병리학자가 같은 표본을 두 번씩 반복 판독하였다. 둘째로 field cancerization을 고려할 때 carcinogen에 노출된 부위마다 각기 유전적 손상 정도가 다양할 것이기 때문에 세포를 채취하는 부위가 다르면 정확한 유전적 손상 정도를 분석하기 어렵다. 이와 같은 문제를 극복하기 위하여는 여러부위를 주기적으로 반복적으로 채취하는 것이 필요하다고 생각되지만 채취하는데 따른 환자의 협조 및 반복적인 채취로 인한 조직 손상이 문제가 될 것이다. 또한 염색시약의 신선도 정도에 따라 염색의 균질성이 달라져 염색 침전물이 핵주위에 겹친 경우 micronuclei로 오인할 가능성이 있기 때문에 염색시약의 신선도 유지도 중요할 것으로 생각되었다. 따라서 조직손상이 적은 탈락세포를 이용한 검사를 임상에 활용하기 위해서는 연구결과에 객관성을 기하기 위하여 염색방법과 측정 오차를 줄이는 방법에 대한 연구가 개발되어야 하겠다.

V. 참고 문헌

1. Sporn MB: Approaches to prevention of epithelial cancer during the preneoplastic period. *Cancer Res* 1976 ; 36 : 2699-702.
2. Farber E: The multistep nature of cancer development. *Cancer Res*, 1984 ; 44 : 4217-23.
3. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AMM, Bos JL: Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N. Engl. J. med.*, 1988 ; 319 : 525-32.
4. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W: "Field cancerization" in oral stratified squamous epithelium. Clinical implication of multicentric origin. *Cancer* 1953 ; 6 : 963-8.
5. Kelloff GJ, Boone CW, Steele VE, Crowell JA, Lubet R, Sigman CC: Progress in cancer chemoprevention: perspectives on agent selection and short-term clinical intervention trials. *Cancer Res.* 1994 ; 54(S) : 2015-24.
6. Boone CW, Kelloff GJ, Steele VE: Natural history of intraepithelial neoplasia in humans with implications for cancer chemoprevention strategy. *Cancer Res.* 1992 ; 52 : 1651-9.
7. Schatakin A, Freedman LS, Schiffman MN, Dawsey SM: Validation of intermediate end points in cancer research. *J. Natl. Cancer Inst.* 1990 ; 82 : 2746.
8. Kim J, Shin DM: Biomarkers of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Histol & Histopathol* 1997 ; 12 : 205-18.
9. Prasad MPR, Mukundan MA, and Krishnaswamy K: Micronuclei and carcinogen DNA adducts as intermediate end points in nutrient intervention trial of precancerous lesions in the oral cavity. *Oral Oncol., Eur. J. Cancer* 1995 ; 31(B) : 155-9.
10. Stich HF, Rosin MP, Hornby P, Mathew B, Sankaranarayanan R, and Nair MK: Remission of oral leukoplakias and micronuclei in tobacco/betel quid chewers treated with beta-carotene and with beta-carotene plus vitamin A. *In. J. Cancer* 1988 ; 42 : 195-9.
11. Benner SE, Wargovich MJ, Lippman SM, Fisher R, Velasco M, Winn RJ, and Hong WK: Reduction in oral mucosa micronuclei frequency following alpha-tocopherol treatment of oral leukoplakia. *Cancer epidemiology, Biomar Prev* 1994 ; 3 : 73-6.
12. Stich HF: Micronucleated exfoliated cells as

- indicators for genotoxic damage and as markers in chemoprevention trials. *J Nutri Growth & Cancer* 1987 ; 4 : 9-18.
13. Rosin MP: The use of the micronucleus test on exfoliated cells to identify anti-clastogenic action in human: a biological marker for the efficacy of chemopreventive agents. *Mutation Res* 1992 ; 267 : 265-76.
 14. Belien JAM, Copper MP, Braakhuis MP, Snow GB, Baak JPA: Standardization of counting micronuclei: definition of a protocol to measure genotoxic damage in human exfoliated cells. *Carcinogenesis* 1996 ; 10 : 2395-400.
 15. Stich HF, Rosin MP: Quantitating the synergistic effect of smoking and alcohol consumption with the micronuclei test on human buccal mucosa cells. In *J Cancer* 1983 ; 31 : 305-8.
 16. Stich HF, Curtis JR, Parida BB: Application of the micronucleus test to exfoliated cells of high cancer risk groups: tobacco chewers. In *J Cancer* 1982 ; 30 : 553-9.
 17. Stich HF, Stich W, Parida BB: Elevated frequency of micronucleated cells in the buccal mucosa of individuals at high risk for oral cancer: betel quid chewers. *Cancer Lett* 1982 ; 17 : 124-34.
 18. Stich HF, Hornby AP, Dunn BP: A pilot beta-carotene intervention trial with inuits using smokless tobacco. In *J Cancer* 1985 ; 36 : 321-7.
 19. Klaassen I, Copper MP, Brakenhoff RH, Smeets SJ, Snow GB, Braakhuis BJM: Exfoliated oral cell messenger RNA: Suitability for biomarker studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers & Prev* 1998 ; 7 : 469-72.
 20. Huang MF, Chang YC, Liao PS, Huang TH, Tsay CH, Chou MY: Loss of heterozygosity of p53 gene of oral cancer detected by exfoliative cytology. *Oral Oncol* 1999 ; 35 : 296-301.