

Argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR)

염색을 이용한 림프구의 미세핵분석법의 개선

김성호 · 한동운 · 강문일 · 임정택

전남대학교 수의과대학
(1995년 11월 24일 접수)

Improvement of micronucleus assay in the lymphocytes using Argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) staining

Sung-ho Kim, Dong-un Han, Mun-il Kang, Jeong-taek Lim

College of Veterinary Medicine, Chonnam National University

(Received Nov 24, 1995)

Abstract : A technique to improve the analysis of micronuclei (MN) in lymphocytes as a cytogenetic indicator is reported. For the purpose of diminishing the variation of the result from individual reader and making it easier to distinguish accurately a cytokinesis blicked (CB) lymphocyte and micronuclei, we tried a modified one-step silver staining technique as a method for detection of the argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) with or without conventional Giemsa stain in the slide from CB method. Compared with the conventional Giemsa stain, the preparation processed with this method are especially useful for the accurate analysis of MN of cultured lymphocyte with cytochalasin B. This method will be a useful technique for automated calculation of MN.

Key words : AgNOR, micronucleus assay, lymphocyte, radiation.

서 론

림프구를 이용한 미세핵분석법은 방사선 및 화학물질 등에 의한 세포유전학적 손상의 판별에 중요한 지표로서 많이 적용되고 있는 실험방법이다¹⁻⁶. 이는 기존의 염색체분석법에 비하여 표본의 제작이 용이하고 슬라이드의 검경 및 결과산출이 단기간에 완료될 수 있으며 특별한 경험이 없는 실험자도 판별이 가능한 간편한 실험방법으로 알려져 있다^{1,3}. 그러나 염색체분

석법과 마찬가지로 각 검경자에 따른 주관적 판별기준이 다를 수 있어, 그 결과 각 실험실간의 결과차이가 있기도 하며 한 실험실내에서도 결과의 검경시 한사람에 의해 완전히 이루어져야 한다고 권고되고 있다¹. 이는 기존의 Giemsa 염색에 의한 표본이 염색정도의 차이, 미세핵의 위치 및 크기 등의 요인에 따라 확실한 구별이 어려운 경우가 있어 검경자의 주관적 판단기준에 의존하기 때문이다.

최근 방사선 등에 의한 세포유전학적 선량측정의 연

구에서 영상분석기(image analyzer)에 의한 자동화분석법의 확립이 관심을 끌고 있으며^{7,8}, 만약 자동영상분석이 가능해지면 이는 보다 간편하고 객관적인 실험결과의 도출이라는 점에서 의의가 있을 것이다. 그러나 현 상황에서 염색표본의 선명도와 색의 차이 등이 장애요인이 되어 실질적인 적용에는 많은 문제가 있다.

검경상의 편차를 줄이고 궁극적으로 자동분석에 적용하기 위하여 표본을 건조전에 수세를 장기간하거나 또는 고정시 acetic acid의 비율을 높이는 방법을 주로 사용하며 이외 염색전 표본을 강산(5N HCl)에 처리하거나⁹ RNase A로 처리하여 세포질 성분의 염색성을 감소시키는 방법¹⁰이 소개되기도 하였다.

본 연구는 방사선에 의해 유도된 미세핵을 AgNOR 염색, AgNOR 및 Giemsa 이중염색을 실시한 후 기존의 Giemsa 단독염색과 비교 분석한 바 그 결과를 보고한다.

재료 및 방법

세포배양 : 건강한 사람의 말초혈액을 10% heat inactivated foetal calf serum, L-glutamine, 항생제 등이 첨가된 RPMI1640배지(GIBCO)를 이용하여 multi-well tissue culture plate (Corning No.25820)에 배양하였다. 세포분열 유도물질로서 phytohaemagglutinin(PHA)를 배지 ml당 5 μ g 농도로 첨가하여 38 $^{\circ}$ C, CO₂배양기에 배양하였다.

방사선조사 : 정상대조군을 두고 방사선조사군은 ⁶⁰Co r-선(Theratron 780 teletherapy unit)을 분당 211 cGy의 선량률로 2 Gy 및 4 Gy를 시험관내에서 일회 조사하였다.

Cytokinesis-block method : 림프구에 PHA를 혼합배양한 후 44시간에 cytochalasin B (Cyt-B, Aldrich Chemical Co.)를 배지 ml당 3 μ g 농도로 첨가하여 cytokinesis-block을 유도하고 배양 72시간에 세포를 수확하여 methanol:gracial acetic acid(3:1)용액에 고정후 검경용 슬라이드를 제작하였다.

표본의 염색 : 각 실험군의 슬라이드를 각각 Giemsa 염색(10%, 10분), AgNor 염색, AgNOR 및 Giemsa 이중염색을 실시하였다. AgNOR 염색은 아래와 같다. AgNOR과 Giemsa 이중염색의 경우

AgNOR 염색후 Giemsa염색을 실시하였다.

AgNOR 염색 : One-step silver colloid method for AgNOR staining(modified procedure)

1. Rinse in distilled water
2. Place in staining solution* for 40 minutes at room temperature in the dark

* Staining solution:

(A)2% gelatin in 1% pure formic acid solution

(B)50% silver nitrate solution

The working solution:mixing(A)&(B)in a proportion of 1:2 just before use

3. Wash in running deionized water
4. Dehydrate in ascending ethanol concentrations
5. Clear in xylene

미세핵의 계측 : 현미경 400배의 시야에서 500개의 CB세포내 MN수를 계측하였다. MV의 판별 기준은 Almasy 등의 방법²을 적용하였다.

결 과

Giemsa 염색에 비하여 AgNOR 단독염색시 소형의 미세핵도 AgNOR의 흑색점이 나타나 구별이 한층 용이하였으며(Fig 1-A) 다수의 세포가 서로 접하여 있는 경우에도 세포간의 구별이 쉬웠다. Giemsa 염색시 미세핵관찰에서 배제될 수 있는 염색성이 약한 미세핵의 경우(Fig 1-B)에도 AgNOR 과립이 염색되어 보다 정확한 판별이 가능하였다.(Fig 1-C)

AgNOR과 Giemsa 이중염색 표본에서 CB세포의 핵은 진한 갈색, 핵내 AgNOR 과립은 검은색 그리고 세포질의 색깔은 녹색으로 각각 완전히 구별되어, CB세포의 선택확인이 100배 시야에서도 가능하여 검경시간이 단축되었고 핵 및 미세핵의 내부과립 또한 선명하게 나타나 미세핵의 판별기준이 보다 분명하였다.(Fig 1-D)

인체 말초혈액림프구 표본을 제작하여 검경한 결과(Table 1), 기존의 Giemsa 염색과 비슷한 미세핵의 발생이 관찰되었으나 AgNOR과 Giemsa 병행염색시 세포당 다수의 미세핵을 가진 경우가 많이 관찰되었고 검경자간의 차이가 현저히 감소하였으며 검경시간도 절약되었다.

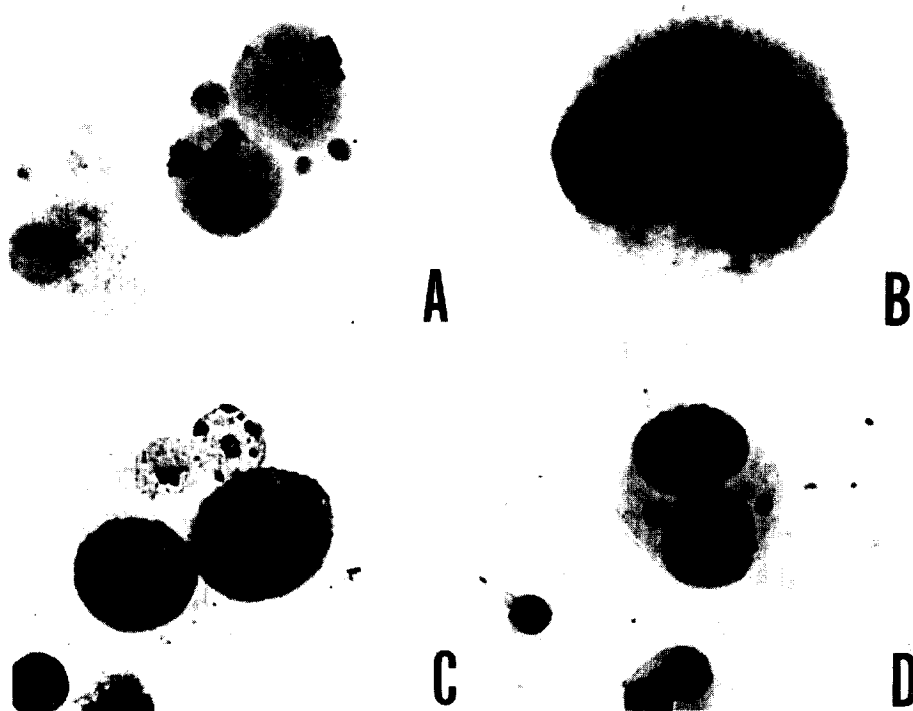


Fig 1. The micronucleus-positive binucleated lymphocytes stained with AgNOR staining solution (A, C), the darkly stained dots in nuclei and micronuclei are clearly visible, stained with Giemsa solution (B), stained with AgNOR and Giemsa solution (D), X500.

Table 1. Micronuclei per 500 cytokinesis-blocked human lymphocytes after r-ray exposure

Dose	Micronucleus distribution per CB cell												
	Giemsa stain						AgNOR-Giemsa double stain						
	0	1	2	3	4	total	0	1	2	3	4	5	total
0 Gy	495	5				5	496	4					4
	493	7				7	495	5					5
	497	3				3	494	6					6
						$0.1 \pm 0.004^*$							0.1 ± 0.002
2 Gy	363	104	28	5		175	370	104	17	8	1		166
	355	125	14	6		171	370	110	15	5			155
	363	119	16	2		157	391	87	18	3	1		136
						0.34 ± 0.019							0.32 ± 0.056
4 Gy	214	203	65	18		387	194	190	81	26	5	4	470
	241	187	54	15	3	352	216	184	80	14	4	2	412
	189	213	80	14	4	431	233	166	71	20	4	6	414
						0.78 ± 0.079							0.86 ± 0.066

* Mean \pm S.E. per CB cell.

고 찰

본 연구는 방사선에 의해 유도된 미세핵을 AgNOR 염색, AgNOR 및 Giemsa 이중염색을 실시한 후 기존의 Giemsa 단독염색과 비교 분석하여 미세핵분석의 방법을 개선하고자 하였다.

AgNOR반응은 오랫동안 세포유전학 분야의 연구에 사용되어 왔으나 조직병리학분야에 적용된 것은 최근의 일이며 점차적으로 방법이 개선되어 one-step 방법으로 간편해졌다¹¹⁻¹⁵. NOR은 세포내 핵소체에 존재하고 ribosomal RNA gene을 가지는 DNA의 고리이며 이것이 RNA polymerase I에 의하여 전사되고 단백질산생의 표시가 된다¹¹. 따라서 NOR의 수 및 모양은 일반적으로 세포의 활성도를 나타내며^{11,16} NOR의 수는 상대적인 휴지세포에 비하여 증식세포에서 많이 나타나고 또한 종양세포 특히 악성종양세포에서 다수 관찰된다¹⁷. AgNOR 염색법은 사실상 NOR-associated protein들이 염색되나 이들에 대해서는 완전히 알려져 있지 않다. 그럼에도 불구하고 AgNOR 염색법은 핵소체의 구조 및 활성도 변화의 지표로서 사용되고 있다. One-step AgNOR 염색법은 Howell과 Black¹⁹에 의해 발전된 이래 최근 조직병리학분야에서 세포활성도 및 종양성의 판별척도가 되기도 한다^{13-15,20}. NOR내의 ribosomal DNA는 은에 선택적으로 염색되는 산성단백질의 일종과 관계가 있으며 이러한 단백질은 AgNOR 단백질이라 정의되었다²¹.

CB 세포유도 실험법은 기존의 염색체 분석법에 비하여 간편하고 민감하며 특히 단기간내에 다수의 세포를 검사할 수 있어 통계학적 정확성을 기할 수 있으나 검경상의 주관적 판별의 단점은 배제할 수 없었다^{3,21}.

본 연구의 결과 기존의 Giemsa 염색의 경우 염색성의 불균일성, 세포질 염색이 강할 경우 및 소형의 미세핵 발생시 판단의 기준이 주관적일 수 있는데 반하여 AgNOR 염색을 실시한 바 이를 개선할 수 있었다. 특히 이중염색시 세포의 염색된 색깔의 구분이 각 부분별로 다르게 나타나 세포의 염색후 색채 및 미세구조의 명확성이 전제되어야 하는 자동화 계측^{7,8}에도 한층 개선된 방법으로 적용가능할 것이며 방사선의 생물학적 선량측정시 큰 결점으로 대두되고 있는 검경자의 주관적 판단의 범위를 줄일 수 있어 실험실간의 결과 차이가 어느정도 극복될 수 있을 것이다.

결론적으로 본 염색방법은 검사시간의 단축, 자동화 분석 가능성 및 검경자간의 편차감소 등의 관점에서 개선된 방법으로써 세포유전학적 진단, 특히 방사선 피폭후 생물학적 선량측정에 유용하게 적용할 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

림프구의 세포유전학적 분석법의 일종인 CB세포를 이용한 미세핵분석의 시료제작시 판별의 기준을 보다 확실히 할 수 있는 염색법을 적용하여 분석의 정확도를 개선하기 위하여 기존의 Giemsa 염색외에 AgNOR 염색, AgNOR 및 Giemsa 이중염색을 실시하여 미세핵을 측정된 결과 AgNOR 염색 단독 또는 Giemsa 이중염색시 CB세포의 포착 및 미세핵의 확실한 구별이 가능하였으며 검경시간의 단축, 검경자별 편차 및 주관적 판단대상의 축소가 가능하였으며 본 연구의 결과 이들 염색법은 미세핵분석분야, 특히 향후 자동계측분야에 개선된 방법으로 적용가능할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Muller WU, Streffer C. Biological indicators for radiation damage. *Int J Radiat Biol*, 59 : 863~873, 1991.
2. Almassy Z, Krepinsky AB, Bianci A, et al. The present state and perspectives of micronucleus assay in radiation protection. A review. *Appl Radiat Isot*, 38 : 241~249, 1987.
3. Gantenberg HW, Wuttke K, Streffer C, et al. Micronuclei in human lymphocytes irradiated *in vitro* or *in vivo*. *Radiat Res*, 128 : 276~281, 1991.
4. Sinues B, Nunez E, Bernal ML, et al. Micronucleus assay in biomonitoring of patients undergoing excretory urography with diatrizoate and ioxaglate. *Mutat Res*, 260 : 337~342, 1991
5. Mudry MD, Carballo M, Labal de Vinuesa M, et al. Mutagenic bioassay of certain pharmacological drugs: III. Metranidazole (MTZ). *Mutat Res*, 305 : 127~132, 1994.
6. Kim SH, Cho CK, Kim TH, et al. Frequency of micronuclei in lymphocytes following gamma and fast-

- neutron irradiations. *Anticancer Res*, 13 : 1587~1592, 1993.
7. Fenech M, Jarvis LR, Morley AA. Preliminary studies on scoring micronuclei by computerized image analysis. *Mutat Res*, 203 : 33~38, 1988.
 8. Bates AD, van Welin MT, Ploem JS. The present state of the automated micronucleus test for lymphocytes. *Int J Radiat Biol*, 58~813~825, 1990.
 9. Finnon P, Lloyd D. A preliminary evaluation of the Edinburgh dicentric hunter, *J Radiat Res*, 33 : 215~221, 1992.
 10. Hayata I. Removal of stainable cytoplasmic substances from cytogenetic slide preparations. *Biotechnic and Histochemistry*, 68 : 150~152, 1993.
 11. Crocker J, Paramjit N. Nucleolar organizer regions in lymphomas. *J Pathol*, 151 : 111~118, 1987.
 12. Fallowfield ME, Dodson AR, Cook MG. Nucleolar organizer regions in melanocytic dysplasia and melanoma. *Histopathology*, 13 : 95~99, 1988.
 13. Mikou P, Kanavaros P, Aninos D, et al. Nucleolar organizer regions (NORs) staining and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining in mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) gastric lymphomas. *Path Res Pract*, 189 : 1004-1009, 1993.
 14. Munakata S, Hendricks J. A multilabeling technique for simultaneous demonstration and quantitation of Ki-67 and nucleolar organizer regions (AgNORs) in paraffin-embedded tissue. *J Histochem Cytochem*, 42 : 789~793, 1994.
 15. Kobayashi I, Matsuo K, Ishibashi Y, et al. The Proliferative activity in dysplasia and carcinoma in situ of the uterine cervix analyzed by proliferating cell nuclear antigen immunostaining and silver-binding argyrophilic nucleolar organizer region staining. *Hum Pathol*, 25 : 198~202, 1994.
 16. Ploton D, Menager M, Jeannesson G, et al. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem J*, 18 : 5~14, 1986.
 17. Bolognari A, Contini A. The role of the nucleolus in carcinogenesis. *Riv Biol Norm Pathol* 7 : 43~68.
 18. Derenzini M, Betts CM, Ceccarelli C, et al. Ultrastructure organization of nucleoli in benign and malignant melanomas. *Virchows Arch (Cell Pathol)*, 52 : 343~352, 1986.
 19. Howell WM, Black DA. Controlled silver staining of nucleolar organizer regions with a protective colloidal developer: a one-step method. *Experientia*, 36 : 1014, 1980.
 20. Kim SH, Kim TH, Jang JJ. Nucleolar organizer regions (NORs) in normal tissue and neoplastic lesions of mouse and rat. *Environmental Mutagen and Carcinogens*, 10 : 134~145, 1990.
 21. Kormos C, Koteles GJ. Micronuclei in x-irradiated human lymphocytes. *Mutat Res*, 199 : 31~35, 1988.