

## 마이크로파 처리 고정 조직의 조직염색 효과

이윤진, 이상한\*  
순천향대학교 생화학교실

### Effects of histochemical staining in microwave-irradiated tissues

Yoon-Jin Lee, Sang-Han Lee\*

Department of Biochemistry, College of Medicine, Soonchunhyang University

**요약** 포르말린을 사용한 조직 고정 방식은 우수한 세포 형태를 유지하며 장기간 조직을 보관할 수 있는 장점이 있으나, 느린 고정 시간, 유해 화학물질에 노출 및 단백질 변형 등의 단점이 있다. 본 연구에서는 마우스의 간과 신장 조직을 이용하여 포르말린 고정과 마이크로파 조사에 의한 빠른 고정을 각각 실시한 후 조직학적 검사와 단백질의 보존 상태를 측정하여 그 결과를 비교하였다. 동일 조직을 절단하여 포르말린 고정과 인산염 완충 식염수에서 마이크로파 조사에 의한 고정 과정을 동시에 실시하였으며, 파라핀 포매 조직에서 제조한 슬라이드에서 H & E와 면역화학염색을 시행하여 조직 고정의 적정성과 항원성을 검사하였다. 또한 고정 조직에서 단백질 추출 양과 질을 각각 BCA법 및 Western blotting법으로 평가하였다. H & E 염색과 면역화학염색을 수행한 결과, 적혈구의 부분적 소실을 제외하고는 마이크로파 고정 조직과 포르말린 고정 조직 간에 대등한 결과를 보였다. 특히, 마이크로파 고정 조직에서 단백질은 잘 보존된 상태로 추출되었다. 결론적으로, 마이크로파 조사를 통한 조직 고정은 포르말린 고정과 비교하여 빠른 고정시간과 우수한 단백질 회수율을 보였으며, 조직 고정의 적정성과 항원성에서도 포르말린 고정과 대등한 결과를 보여, 신속한 조직 고정이 필요한 환경에서 적용이 가능함을 제시하고 있다.

**Abstract** Despite its superior ability to show distinct cellular morphology and for long-term storage, conventional tissue fixation by formalin has many drawback, including slower fixation, the exposure to harmful chemicals and extensive protein modification. Herein, we assessed the effects of rapid microwave-assisted tissue fixation on histological examination and on protein integrity by comparing these microwave irradiation fixated tissues with the formalin-fixed tissues. One of the paired mouse tissues (liver and kidney) was fixed in formalin and the other was fixed by using microwave irradiation in phosphate buffered saline. Each slide from the paraffin-embedded tissues was examined by H & E staining for the adequacy of fixation and by immunohistochemical staining for antigenicity in a blinded fashion. Evaluation of protein recovery and the protein quality from the fixed tissues were analyzed by the BCA method and Western blotting, respectively. The results from H & E staining and immunohistochemical staining showed that the sections obtained from microwave-fixed tissues under our experimental conditions were comparable to those of the formalin-fixed tissues except for the integrity of RBCs. Furthermore, proteins were effectively extracted from the microwave-fixed tissues with acceptable preservation of the proteins' quality. Taken together, this microwave-assisted tissue processing yields a quick fixation and better protein recovery in higher amounts, as well as the adequacy of fixation and the antigenicity being comparable to formalin-fixed tissues, and this all suggests that this new fixation technique can be applied in an environment where rapid tissue fixation is required.

**Keywords** : Microwave, Formalin, Tissue Fixation, H & E staining, Immunohistochemical Staining

본 연구는 산업통상자원부 지역특화(주력)산업육성사업(과제번호:R0006423)과 순천향대학교 학술연구비 지원으로 수행하였음.

\*Corresponding Author : Sang-Han Lee(Soonchunhyang Univ.)

email: m1037624@sch.ac.kr

Received June 14, 2019

Revised July 16, 2019

Accepted August 2, 2019

Published August 31, 2019

## 1. 서론

임상 조직 표본의 신속한 처리는 조직병리 검사 결과를 바탕으로 빠르게 진단과 치료를 시작할 수 있으며, 의료서비스 비용을 절감할 수 있다는 점에서 급성 환자를 치료하는 임상 의사에게는 중요한 사항이다. 조직 고정에 널리 사용되고 있는 포르말린은 단백질의 자가분해를 막고 세포내의 용해성의 구조단백질을 고형화(coagulation)하여 염색을 촉진하지만[1], 16-24시간의 긴 고정시간과 인체에 유해한 포르말린을 사용하며, 단백질의 교차결합으로 인한 고정 후 단백질 추출에 어려움이 있으며[2,3], 과도한 분자 변형으로 단백질의 3차 구조를 변화시켜 항원성 보존에 영향을 줄 수 있다[4]. 동결 절편(frozen section) 기술은 수술 중에 조직병리학적 평가를 신속하게 할 수 있는 방법이지만, 지방조직을 비롯한 일부 조직 표본들을 제작하거나 절단하는데 어려움이 있으며, 형태학적 변형으로 조직병리학적 해석을 어렵게 하여 임상 표본 제작을 위한 조직 처리 방법으로는 널리 사용되지 않고 있다[5]. 기존 고정 방법의 단점을 보완하기 위해 많은 방법들이 연구되어 왔으며, 그 중에서 마이크로파 조사를 통한 조직 처리는 300 MHz - 300 GHz의 주파수와 1 mm에서 1 m의 파장을 가진 전자파를 사용하며[6] 신속한 침투와 내부 열 발생을 통하여 조직 고정에 필요한 시간을 줄이며, 조직의 자가분해나 부패 현상이 진행되는 범조직학 분야나 신속한 진단이 필요한 외과 영역에서 유용하게 이용할 수 있는 방법이다. 그러나 조직의 수축과 RBC의 파괴가 발생하는 단점이 있으며, 특히 면역화학염색에서 사용된 항체에 따라 마이크로파 노출 시간이나 와트(watt) 수의 조정이 필요하다는 결과도 보고되고 있다[7,8]. 본 연구는 마이크로파 TEM Cell을 이용한 반도체방식 마이크로파처리기를 사용하여 마이크로파 조직 고정의 유용성을 검사하고 기존의 포르말린 조직 고정 방식과 효능을 비교 분석하였다.

## 2. 실험재료 및 방법

### 2.1 조직 고정 및 검체 표본 제작

약 8 mm × 8 mm × 5 mm로 절단한 ICR 마우스의 간 및 신장 조직을 10% 중성 완충 포르말린에서 24시간 고정하였으며, 동일 조직 절편을 처리 시간과 온도를 변화하여 다음의 4조건에서 마이크로파(50 watt)를 조사하였다(마이크로파 처리기 MD-501, 셀비온, 대한민국).

1) 조직을 인산염 완충 식염수(phosphate buffered saline용액)에 담근 후 마이크로파를 조사하여 1군은 35°C 도달 후 80초간 추가 조사, 2군은 37°C 도달 후 중지, 3군은 37°C 도달 후 80초간 추가 조사, 그리고 4군은 40°C 도달 후 중지하였다. 마이크로파 조사가 완료된 조직을 30% 에탄올에 넣어 조직처리기(Citadel 2000, Thermo Shandon, United Kingdom)에서 탈수, 파라핀 처리 및 파라핀 포매 과정을 진행하며 블록을 제조하였다. 마이크로톰(RM2255, Leica, Germany)에서 약 4  $\mu$ m 두께로 박절하고 절편을 슬라이드에 부착하여 건조시킨 후 탈 파라핀과 흡수 과정을 거쳐 증류수로 세척하였으며, hematoxylin & eosin (H & E) 염색과 면역화학염색을 실시하였다.

### 2.2 H & E 염색

H & E 염색은 Harris hematoxylin염색법[9]에 따라 실시하였다. 조직 슬라이드를 60°C 오븐에 1시간 보관한 후 xylene용액에 5분씩 3회 처리하여 탈 파라핀과정을 실시한 후 에탄올 처리와 수세 과정을 거쳐 hematoxylin으로 15분간 염색하였다. 수세, 1% HCl 처리, 수세, 1% 암모니아 처리 및 수세 과정을 거쳐 eosin용액에서 3분간 염색한 후 수세, 에탄올 처리 및 xylene처리과정을 거쳐 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다. 표본은 병리 전문의에게 의뢰하여 Meenakshi Tripathi법[1]에 따른 품질평가기준에 준하여 실시되었으며, 염색 결과는 세포 윤곽, 세포질의 상세, 핵의 상세, 적혈구의 완전성, 림프구의 형태, 전체적 형태 및 전체적 염색 상태의 7개 항목에서 1점: 불량(poor), 2점: 적절(fair), 3점: 양호(good), 4점: 우수(excellent), 5점: 매우 우수(outstanding)로 점수를 매겨 작성 한 후, 점수를 합산하여 7-13점: 불량, 14-20점: 적절, 21-27점: 양호, 28-34점: 우수, 34점 이상: 매우 우수로 판정하였다. 결과 신뢰성을 위하여 사설 시험 실시 기관인 (주)케이피엔티에 별도 의뢰하여 동일한 조건에서 H & E 염색 표본의 이중 평가를 실시하였다.

### 2.3 면역화학 염색

슬라이드 표본을 xylene용액에서 탈 파라핀 과정과 100%, 95%, 70% 및 50%의 에탄올에 순차적으로 처리하여 흡수 과정을 실시한 후 Histostatin<sup>®</sup>-Plus Bulk kit (Invitrogen, USA)를 사용하여 면역조직화학염색을 실시하였다. 슬라이드에 용액 A (serum blocking solution)

를 첨가하여 실온에서 10분간 처리하였고, 1차 항체로 4°C에서 밤새 반응시켰다. 다음날, 용액 B (바이오틴화 2차 항체)에 30분간, 용액 C (streptavidin-peroxidase conjugate)에 10분간 반응시킨 후, 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)로 1분간 발색시켰으며, 세척 및 탈수 과정을 거쳐 permount로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다. Anti-hepatocyte antigen (1:50; Dako, Denmark), anti-vimentin (1:50; Zymed Laboratories, Inc., USA)와 anti-human cytokeratin 7 (1:50; Leica Biosystems Newcastle Ltd., United Kingdom)과 anti-CD10 (1:100; Leica Biosystems Newcastle Ltd., United Kingdom) 항체를 1차 항체로 사용하였다.

### 2.4 단백질 농도 측정

포르말린과 마이크로파로 고정시킨 간 및 신장 조직에 RIPA 용액(1X 인산염 완충 식염수, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 10 µg/ml phenylmethanesulfonylfluoride)을 첨가한 후 초음파분쇄기를 이용하여 조직용해액을 제조하였다. 조직용해액 5 µl와 BCA용액(A용액 : B용액= 50 : 1) 200 µl를 96-well microplate에 첨가하여 37°C 보온기에서 30분간 반응시킨 후, 562 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 단백질(bovine serum albumin)을 농도 별(0, 200, 400, 800, 1600, 2000 µg/ml)로 희석하여 위와 동일한 방법으로 작성한 표준 곡선에 적용하여 시료의 단백질 농도를 결정하였다.

### 2.5 Western blotting

40 µg의 단백질이 포함된 조직용해액을 NuPAGE 4-12% bis-tris polyacrylamide 젤(Invitrogen)에서 분리한 후 PVDF membrane으로 이전시켰으며, 1차 항체로 2시간, 수세 및 horseradish peroxidase (HRP)가 결합된 2차 항체(1: 5000 희석)로 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. ECL용액을 처리한 후 X-ray 필름에서 ERα와 β-actin 단백질 밴드를 확인하였다. Anti-ERα (1:500 희석; Santa Cruz Biotechnologies, )와 anti-β-actin (1:1,000 희석; Sigma) 항체를 1차 항체로 사용하였다.

### 2.6 통계학적 분석

통계학적 분석은 SPSS 프로그램(SPSS Inc., version

17.0, Chicago, USA)을 이용하여 결과를 평균값과 표준편차로 표시하였으며, 일원배치 분산분석(One-way ANOVA)으로  $p < 0.05$  수준에서 대조군과 비교군 사이의 유의성을 검증하였다.

## 3. 결과

### 3.1 H & E 염색

총 52개의 조직(간과 신장)에 마이크로파를 조사하여 4가지 조건(1군: 35°C 도달 후 80초간 추가 조사, 2군: 37°C 도달 후 중지, 3군: 37°C 도달 후 80초간 추가 처리, 4군: 40°C 도달 후 중지)에서 고정된 후, H & E 염색을 시행하여 조직 절편의 상태를 평가하여 포르말린 고정군과 비교하였다. 2인의 병리 전문의가 실험 재료 및 방법에 제시된 판정 기준에 따라 평가하였으며, 현미경 검사에서 마이크로파 고정 1군과 2군에서는 포르말린 고정군에 비하여 세포질을 비롯한 전체 형태와 염색 상태가 선명하지 않았으며, 적혈구의 부분적 소실이 관찰되어 낮은 평가를 보였다(Table 1).

Table 1. Overall grade after H & E staining in formalin-fixed and microwave-irradiated tissues.

Tissue	Formalin fixation (12 cases)	Microwave irradiation			
		Group 1 (8 cases)	Group 2 (6 cases)	Group 3 (6 cases)	Group 4 (6 cases)
Liver	21.7 (good)	14.0 (fair)	15.5 (fair)	22.0 (good)	20.0 (fair)
Kidney	19.6 (fair)	13.0 (poor)	14.5 (fair)	19.5 (fair)	19.7 (fair)

마이크로파 고정 3군과 4군에서는 적혈구의 부분적인 소실이 있었지만, 세포 윤곽, 세포질의 상세, 핵의 상세, 림프구의 형태, 전체적 형태, 전체적 염색 상태 등에서는 포르말린 고정 조직과는 통계학적으로 유의한 차이가 없었으며, 두 조직 모두에서 포르말린 처리군과 대등한 결과인 적절 또는 양호 수준의 평가를 나타냈다(Fig. 1A-B).

마이크로파로 고정된 간 조직 3군에서 세포 윤곽과 세포질 및 핵의 형태가 대체적으로 선명하였으며(Fig. 2A-C), 신장 조직 4군에서는 핵과 전체 형태에서 포르말린 고정군과 대등한 결과를 보였다(Fig. 2D-F).

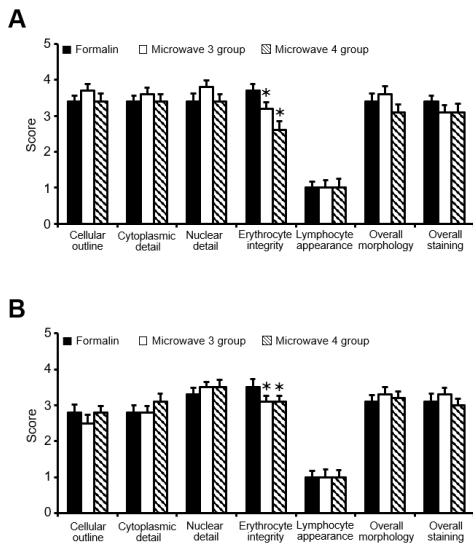


Fig. 1. Scores of seven parameters between formalin-fixed and microware-irradiated tissues. (A) liver tissues (B) kidney tissues. \* $p < 0.05$  vs. the respective formalin- fixed group.

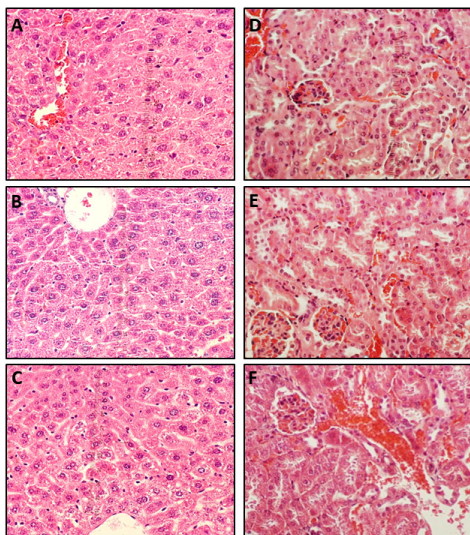


Fig. 2. Representative H & E staining between formalin-fixed and microware-irradiated tissues. (A-C) Liver tissues. Formalin-fixed (a), microware-irradiated Group 3 (b), and microware-irradiated Group 4 (c). (D-F) Kidney tissues. Formalin-fixed (d), microware-irradiated group 3 (e), and microware-irradiated group 4 (f).

(주)케이피앤티 의뢰하여 간과 신장조직에서 위와 동일한 조건으로 시행한 결과, 마이크로파 고정군 1군과 2군

에서는 포르말린 고정군에 비하여 낮은 평가를 보였다. 간 조직에서는 마이크로파 고정 3군(37℃, 80초동안 처리)과 4군(40℃ 도달 후 정지)에서 포르말린 고정군과 동등 이상의 결과를 보였으며, 신장 조직에서는 4군(40℃ 도달 후 정지)에서 우수한 평가를 받았다(Table 2). 특히 신장 조직은 마이크로파 고정 4군을 제외하고는 낮은 평가를 보였으며, 마이크로파 고정 4군은 두 조직 모두에서 포르말린 고정군과 대등한 결과를 나타냈다.

Table 2. Overall grade after H & E staining in formalin-fixed and microwave-irradiated tissues (KP&T).

Tissue	Formalin fixation (5 cases)	Microwave irradiation			
		Group 1 (6 cases)	Group 2 (6 cases)	Group 3 (6 cases)	Group 4 (6 cases)
Liver	21.0 (good)	20.0 (fair)	20.0 (fair)	21.0 (good)	21.3 (good)
Kidney	26 (good)	14.0 (fair)	15.0 (fair)	14.0 (fair)	23.0 (good)

### 3.2 면역화학 염색

H & E염색에서 양호한 결과를 보인 마이크로파 고정 3군과 4군에서 얻은 조직 표본을 4종의 항체를 이용하여 면역화학염색을 시행하여 포르말린 고정군과 비교 평가 하였다. 간 조직에서 hepatocyte antigen과 CD10을, 신장 조직에서 vimentin과 CK-7을 면역화학염색으로 확인한 결과, 간 조직에서 hepatocyte antigen은 포르말린 고정군이 간세포에 선명하게 염색되어 가장 우수하였으며, CD10은 비교군과 큰 차이가 없었다. 신장 조직에서 vimentin과 CK7은 마이크로파 고정 4군에서 가장 우수하였다(Table 3).

Table 3. Immunohistochemical analysis in formalin-fixed and microwave-irradiated tissues.

Tissue	Antigen	Formalin fixation				Microwave group 3				Microwave group 4			
		0	+	++	+++	0	+	++	+++	0	+	++	+++
Liver	Hepatocyte antigen	4 (31%)	9 (69%)	0	0	9 (100%)	0	0	0	5 (45%)	6 (55%)	0	0
	CD10	2 (15%)	11 (85%)	0	0	1 (11%)	8 (89%)	0	0	1 (13%)	7 (87%)	0	0
Kidney	Vimentin	3 (21%)	11 (79%)	0	0	1 (11%)	8 (89%)	0	0	8 (27%)	1 (6%)	1 (11%)	1 (11%)
	CK7	11 (79%)	3 (21%)	0	0	6 (67%)	3 (33%)	0	0	3 (27%)	7 (64%)	1 (9%)	0

0: negative, +: weak, ++: moderate, +++: strong

Fig. 3과 4에서 보는 바와 같이 항원성의 보존은 대체로 양호하였으며, 비특이적 교차 반응도 낮았다. Hepatocyte antigen과 CD10은 간세포 주변에서 잘 반응하였으며, 포르말린 고정군에서 다소 진하게 염색되었다(Fig. 3). Vimentin과 CK-7은 신장조직의 사구체내에서 뚜렷하게 염색되었으며, 마이크로파 고정 4군에서 다소 우수한 염색을 보였다(Fig. 4).

3.3 고정조직에서 단백질 정량 및 Western blotting

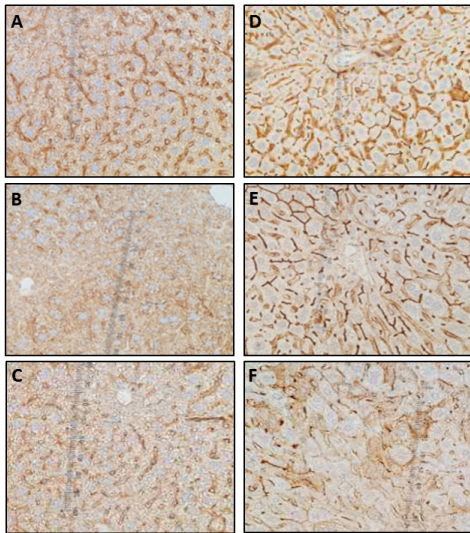


Fig. 3. Representative immunohistochemical staining of hepatocyte antigen and CD10 in liver tissues. (A-C) Hepatocyte antigen. (D-F) CD10. Formalin-fixed (a, d), microwave-irradiated Group 3 (b, e), and microwave-irradiated Group 4 (c, f). x100

포르말린으로 고정시킨 고적과 다양한 조건에서 마이크로파로 고정한 조직(40°C, 45°C, 50°C에서 80초 또는 120초 조사)에서 단백질의 회수량을 측정하기 위하여, 조직을 RIPA용액에서 초음파로 분쇄하여 조직 용해액을 제조한 후 BCA법에 따라 단백질 농도를 측정하였다. 포르말린 고정과 포르말린 고정 후 5분간 열처리한 간 및 신장조직에서는 단백질의 검출이 거의 이루어지지 않았으나, 마이크로파를 조사한 조직 모두에서는 고정 과정을 거치지 않았던 대조군의 조직과 유사한 농도로 단백질이 추출되었다(Fig. 5A).

조직에서 추출한 단백질의 질 평가를 위하여 Western blotting으로 에스트로젠 수용체  $\alpha$  ( $ER\alpha$ )의 검출 여부를 조사하였다. 마이크로파 고정 조직의 경우  $ER\alpha$  단백질

밴드의 양이 비고정 조직에서와 비슷한 정도로 검출되었으며, 마이크로파의 처리시간을 증가하였을 때(120초) 측정된  $ER\alpha$ 의 양은 다소 감소되었다(Fig. 5B).

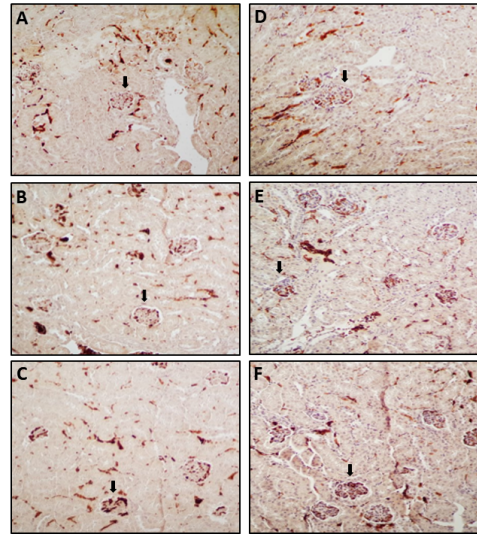


Fig. 4. Representative immunohistochemical staining of vimentin and CK-7 in kidney tissues. (A-C) Vimentin. (D-F) CK-7. Formalin-fixed (a, d), microwave-irradiated Group 3 (b, e), and microwave-irradiated Group 4 (c, f). Arrows indicates glomerulus. x100

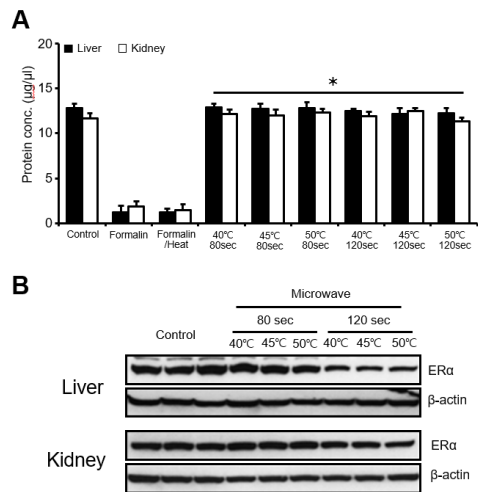


Fig. 5. Protein quantification and  $ER\alpha$  detection in cell lysates extracted from formalin-fixed and microwave-irradiated tissues. (A) Measurement of protein concentration (B) Western blotting analysis of  $ER\alpha$ .

#### 4. 고찰

본 연구는 다양한 조건에서 마이크로파 조사로 조직을 고정한 후, H & E 염색과 면역화학염색을 실시하여 포르말린 고정 조직과 비교, 평가하고 마이크로파 조사의 최적 조건을 설정하기 위한 목적으로 수행하였다. 1 X 인산염 완충 식염수에 조직을 담근 후 마이크로파 조사를 실시하였으며, 30% 에탄올에 넣은 후 조직처리기로 이동하였을 때, 전체적인 염색 상태가 우수하였으며, 이러한 결과는 에탄올의 첨가가 세포내 분자들을 보호하며 세포 형태를 잘 보존시키는 데 기여하는 것으로 보인다. 본 연구에 사용된 마이크로파는 50 watt로 고정하여 조사하였으며, 40°C 이상이나 37°C 미만의 마이크로파 조직처리 조건에서 H & E 염색 결과는 세포 윤곽, 세포질의 상세, 핵의 상세, 적혈구완전성, 림프구의 형태, 전체적 형태, 전체적 염색 상태 등에서 포르말린 고정 조직에 비하여 불량한 결과를 보였다. 특히 40°C 이상에서는 마이크로파 조사보다는 조직의 탈락과 적혈구의 소실이 뚜렷하였다. 그러나 마이크로파를 조사하여 37°C 도달 후 80초간 추가 처리한 3군과 40°C 도달 후 중지한 4군에서는 RBC 완전성을 제외하고 전 평가항목에서 포르말린 고정군과 대등한 결과를 보였다. 이러한 결과는 전체적인 H & E 염색에서 마이크로파의 고정이 포르말린 고정과 대등한 효과가 있음을 제시한 다른 연구자들의 보고와 일치한다. 상피 조직, 섬유 조직 및 샘 조직 등에서 마이크로파 조직 처리가 포르말린 조직 고정과 비교하여 세포질 및 핵의 세부 항목에 대해서 통계적으로 유의한 차이가 없다는 결과가 보고된 바 있으며[12-14], Kango 등은 마이크로파 처리 된 조직에서 세포질 및 핵의 세부 항목과 적혈구 및 임파구의 형태가 포르말린처리 조직보다 우수하다고 보고하였다[15]. Panja 등은 마이크로파로 처리 한 조직이 포르말린으로 처리 한 조직에 비해 통계적으로 유의하게 적은 수축을 보였고[13], Kok 등은 포르말린 고정과 마이크로파 처리 조직 간에 조직 수축량에 현저한 차이가 없다고 보고하였다[16]. 또한, 전자현미경을 통한 관찰에서 마이크로파로 고정한 조직은 잘 보존된 미세 구조, 미세한 세포 세부 형태, 및 잘 구분된 세포질 구조와 핵막 등을 보여 포르말린으로 고정된 조직과 큰 차이가 없음을 보고하였다[11]. 다수의 논문들은 조직의 부분적인 소실이나 위축, RBC 소실 및 약한 염색 형태 등이 마이크로파 조사에서 야기될 수 있는 주요 문제점으로 지적하고 있지만[6,10,11], 본 실험 조건에서 RBC의 부분 소실 외에 유의한 차이는 관찰되지 않

았다. 이러한 결과는 검사 조직, 마이크로파 처리 조건 즉 온도, 시간 및 사용된 용매 등의 차이에 기인하는 것으로 보인다. 본 실험 결과에서 나타난 RBC의 소실은 마이크로파 조사에 의한 손상으로 나타날 수 있으며, 마이크로파 조사 조직에서 적혈구 분해를 입증 한 Mayer와 Hopwood 등의 연구와 일치하나[6,11], Boon ME 등은 뇌의 마이크로파 조사로 적혈구가 손상되지 않았음을 보고한 바 있다[15]. 그러나 본 실험결과에서 세포의 윤곽, 세포질 및 핵의 형태가 포르말린 고정군에 비하여 마이크로파 고정군에서 다소 선명하고 밝았으며, 이러한 현상은 마이크로파 처리 된 조직이 포르말린으로 처리된 조직에 비하여 eosin에 더 강한 반응성에 기인하는 것으로 보인다[16].

마이크로파 고정 조직의 면역화학 염색 결과는 H & E 염색 결과와 유사한 결과를 보였으며, hepatocyte antigen은 포르말린 고정군에서 우수하였으며, vimentin과 CK7은 마이크로파 고정 4군에서 우수하였으나, CD10은 비교군 간에 차이가 없었다. 이러한 항체에 따른 상이한 결과는 항체나 조직에 따라 마이크로파 노출 시간과 조사 watt에서 최적 조건이 다를 수 있음을 암시한다[7,8]. 면역화학 염색에서 마이크로파의 효과를 평가한 대부분의 논문은 주로 파파린 포르말린 고정 조직에 추가적으로 이루어졌으며[17]. 마이크로파의 조사가 항원에 항체의 접근을 촉진하여 포르말린 고정 조직에서 면역결합을 향진시키며, 포르말린에 의해 형성된 단백질의 교차결합을 제거시킴으로써 일어날 수 있음을 제시하고 있다[18,19].

조직 고정의 주요 목적은 조직의 자가 분해를 막거나, 이를 정지시켜 살아있는 상태에 가깝게 조직을 유지시키는 데 있으며, 질 좋은 조직 시료와 조직 내 염색액의 확산 및 기질과의 결합이 정확한 조직 표본의 해독을 위한 주요 영향 인자이다. 포르말린을 이용한 조직 고정은 외부 표면으로부터 용액의 침투가 비교적 느리게 진행되어 고정 시간이 오래 걸리며, 가교 결합(cross-linking)에 의해 단백질을 불용성화 하여 고정 후 단백질의 회수가 어려운 단점이 있다. 마이크로파는 전자기장이 번갈아 발생하는 비 이온화 방사선으로 물의 양극 분자와 단백질의 극성 사슬(polar side chain)과 같은 이극성 분자가 반발력에 의해 회전하며 발생하는 내부 열로 조직표본 안팎으로 용액의 확산을 가속화시키며, 특히, 인체에 잠재적인 위험 물질인 포르말린을 사용하지 않고 고정 시간을 5분 내로 단축시킴으로써 당일내 조직 처리와 진단을 가능하게 하여 치료 시간을 단축할 수 있는 장점을 지

니고 있다. 본 연구에서 간 및 신장 조직의 포르말린 고정 후 단백질의 추출은 거의 이루어지지 않았으나, 마이크로파 고정은 모든 조건에서 비고정 조직과 비교하여 대등한 양으로 회수되었다. 또한 마이크로파 고정 후 추출한 조직용해액으로 Western blotting 분석을 시행하여 에스트로젠 수용체 $\alpha$ 를 검출할 수 있었으며 포르말린 고정과 달리 마이크로파 고정 조직에서는 단백질의 변형 없이 잘 보존이 되었으며 추가적인 단백질 분석에 사용이 가능함을 보여주고 있다.

### 5. 결론

마이크로파를 이용한 조직 고정 효능을 포르말린 고정 방식과 비교하여 수행한 결과를 요약하면 다음과 같다.

첫째, 마이크로파 고정은 인체에 해를 주는 포르말린의 사용을 막고, 수분 내에 조직고정을 가능하게 하여 병원내 현장에서 신속한 진단에 도움을 줄 수 있다

둘째, 마이크로파 조직 고정은 조직의 위축 및 탈락, RBC 소실과 검체 조직 및 반응 조건에 따른 효과에서 차이가 나타날 수 있으며, 조직에 따라 마이크로파 처리 시간과 온도의 최적조건을 설정함으로써 효과를 극대화 할 수 있을 것으로 보인다.

셋째, 기존의 포르말린 고정은 단백질의 교차결합을 유도하여 고정 후 단백질의 회수가 어려웠으나, 마이크로파 고정 후에는 조직내 양질의 단백질 추출이 가능하여 western blotting 등의 추가적인 분석에 사용할 수 있다.

넷째, 마이크로파 고정의 우수성과 타당성을 높이기 위해 다양한 질환의 병리 조직을 이용한 추가 검증이 필요하다.

### References

- [1] M. Tripathi, R. Bansal, M. Gupta, V. Bharat, "Comparison of routine fixation of tissues with rapid tissue fixation", *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, Vol.7, No.12, pp.2768-2773, Dec. 2013. DOI: <http://doi.org/10.7860/JCDR/2013/6233.3754>
- [2] C. Stumptner, D. Pabst, M. Loibner, C. Viertler, K. Zatloukal, "The impact of crosslinking and non-crosslinking fixatives on antigen retrieval and immunohistochemistry", *New Biotechnology*, Vol.52, pp.69-83, Sep. 2019. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.05.003>
- [3] S. Ongay, M. Langelaar-Makkinje, M. P. Stoop, N. Liu, H. Overkleeft, T. M. Luijck, G. M. M. Groothuis, R. Bischoff, "Cleavable crosslinkers as tissue fixation reagents for proteomic analysis", *Chembiochem*, Vol.19, No.7, pp.736-743, April 2018. DOI: <http://doi.org/10.1002/cbic.201700625>
- [4] W. Chu, B. Furusato, K. Wong, I. A. Sesterhenn, F. K. Mostofi, M. Q. Wei, Zhu Z, S. L. Abbondanzo, Q. Liang, "Ultrasound accelerated formalin fixation of tissue improves morphology, antigen and mRNA preservation", *Modern Pathology*, Vol.18, No.6, pp.850-863, Jun. 2005. DOI: <http://doi.org/10.1038/modpathol.3800354>
- [5] L. R. Rohr, L.J. Layfield, D. Wallin, D. Hardy, "A comparison of routine and rapid microwave tissue processing in a surgical pathology laboratory. Quality of histologic sections and advantages of microwave processing", *American Journal of Clinical Pathology*, Vol.115, No.5, pp.703-708, May 2001. DOI: <http://doi.org/10.1309/15fb-fld1-408x-iga3>
- [6] D. Hopwood, G. Coghill, J. Ramsay, G. Milne, M. Kerr, "Microwave fixation: its potential for routine techniques, histochemistry, immunocytochemistry and electron microscopy", *The Histochemical Journal*, Vol.16, No.11, pp.1171-1191, Nov. 1984.
- [7] S. G. Temel, F. Z. Minbay, Z. Kahveci, L. Jennes, "Microwave-assisted antigen retrieval and incubation with cox-2 antibody of archival paraffin-embedded human oligodendroglioma and astrocytomas" *Journal of Neuroscience Methods*, Vol.156, No.1, pp.154-160, Sep. 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneumeth.2006.02.025>
- [8] I. Sassi, F. Invernizzi, C. Doglioni, "Short formalin fixation and rapid microwave processing do not affect HER2 testing", *Recent Results in Cancer Research*, Vol.199, No.199, pp.55-64, Jan. 2015. DOI: <http://doi.org/10.1007/978-3-319-13957-96>
- [9] M. Titford, "The long history of hematoxylin", *Biotechnic & Histochemistry*, Vol.80, No.2, pp.73-78, Mar. 2005. DOI: <http://doi.org/10.1080/10520290500138372>
- [10] A. S. Leong, M. E. Daymon, J. Milios, "Microwave irradiation as a form of fixation for light and electron microscopy", *The Journal of Pathology*, Vol.146, No.4, pp.313-321, Aug. 1985. DOI: <http://doi.org/10.1002/path.1711460404>
- [11] J. L. Brubacher, A. P. Vieira, J. Azimzadeh, "Processing schmidtea mediterranea for transmission electron microscopy: Classical and microwave techniques", *Methods in Molecular Biology*, Vol.1774, pp.519-538, Jan. 2018. DOI: <http://doi.org/10.1007/978-1-4939-7802-123>
- [12] A. M. Mathai, R. Naik, M. R. Pai, S. Rai, P. Baliga, "Microwave histoprocessing versus conventional histoprocessing", *The Indian Journal of Pathology and Microbiology*, Vol.51, No.1, pp.12-16, Jan. 2008.

DOI: <http://dx.doi.org/10.4103/0377-4929.40383>

- [13] P. Panja, G. Sriram, T. R. Saraswathi, B. Sivapathasundharam, "Comparison of three different methods of tissue processing", *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, Vol.11, No.1, pp.15-17, Jul. 2007.  
DOI: <http://doi.org/10.4103/0973-029X.33958>
- [14] A. R. Morales, M. Nassiri, R. Kanhoush, V. Vincek, M. Nadj, "Experience with an automated microwave assisted rapid tissue processing method. Validation of histologic quality and impact on the timeliness of diagnostic surgical pathology", *American Journal of Clinical Pathology*, Vol.121, No.1, pp.528-536, April 2004.  
DOI: <http://doi.org/10.1309/ACK8-AHV0-1T47-QR53>
- [15] P. G. Kango, R. S. Deshmukh, "Microwave processing: A boon for oral pathologists", *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, Vol.15, No.1, pp.6-13, Jan. 2011.  
DOI: <http://doi.org/10.4103/0973-029X.80031>
- [16] L. P. Kok, M. E. Boon, "Microwaves for microscopy", *J. Microsc.*, Vol.158, No.3, pp.291-322, Jun. 1990.  
DOI: <http://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1990.tb03003.x>
- [17] K. Katoh, "Microwave-assisted tissue preparation for rapid fixation, decalcification, antigen retrieval, cryosectioning, and immunostaining", *International Journal of Cell Biology*, Vol.2016, pp.7076910, Oct. 2016.  
DOI: <http://doi.org/10.1155/2016/7076910>
- [18] S. R. Shi, M. E. Key, K. L. Kalra, "Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections", *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, Vol.39, No.6, pp.741-748, Jun. 1991.  
DOI: <http://doi.org/10.1177/39.6.1709656>
- [19] M. Warembourg, D. Leroy, "Microwave pretreatment of sections to improve the immunocytochemical detection of progesterone receptors in the guinea pig hypothalamus", *The Journal of Neuroscience Methods*, Vol.104, No.1, pp.27-34, Dec. 2000.  
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(00\)00320-4](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(00)00320-4)

이 윤 진(Yoon-Jin Lee)

[정회원]



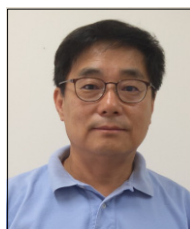
- 1996년 2월 : 순천향대학교 대학원 식품영양학과 (이학석사)
- 2005년 2월 : 순천향대학교 대학원 식품영양학과 (이학박사)
- 2012년 3월 ~ 현재 : 순천향대학교 의과대학 생화학교실 부교수

<관심분야>

발암, 암치료 유용물질 발굴

이 상 한(Sang-Han Lee)

[정회원]



- 1989년 2월 : 순천향대학교 대학원 의학과 (의학석사)
- 1992년 2월 : 순천향대학교 대학원 의학과 (의학박사)
- 1997년 9월 ~ 1999년 8월 : 미국 국립 암연구소 연구원
- 2006년 3월 ~ 현재 : 순천향대학교 의과대학 생화학교실 교수

<관심분야>

발암, 신약개발