

Salivary Diagnostics

Jeong Kyu Kim

Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Catholic University of Daegu School of Medicine, Daegu, Korea

타액 진단학

김 정 규

대구가톨릭대학교 의과대학 이비인후과학교실

Received September 2, 2011
Accepted September 15, 2011
Address for correspondence
Jeong Kyu Kim, MD, PhD
Department of Otolaryngology-
Head and Neck Surgery,
Catholic University of Daegu
School of Medicine,
3056-6 Daemyeong 4-dong,
Nam-gu, Daegu 705-718, Korea
Tel +82-53-650-4071, 4525
Fax +82-53-650-4533
E-mail doctorjkkim@cu.ac.kr

Saliva contains various sources of biomarkers like protein, mRNA, microRNA, metabolites and microbiota that could be considered as diagnostic alphabets. Collection of saliva is safe, easy, and non-invasive for both patients and medical workers. For the past 20 years, salivary diagnostics have been developed to monitor oral diseases. Recently, salivary diagnostics have extended the range of application from oral cavity to systemic sites such as pancreatic cancer and diabetes. Establishment of definitive salivary biomarkers for different diseases and development of accurate, easy-to-use and portable detection devices are required for the real clinical application of salivary diagnostics in the future medical practice.

Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg 2011;54:741-5

Key Words Saliva · Biomarkers · Diagnosis · Oral cancer.

서 론

조기진단은 질병의 성공적인 치료를 위해 매우 중요하다.¹⁾ 초기 암과 진행된 암의 생존율을 비교해 보면 조기진단의 중요성은 자명하며, 당뇨병과 같은 대사성 질환도 초기에는 음식과 생활습관의 변화로 조절될 수 있다.²⁾ 하지만, 질병의 조기진단을 위한 내시경, 혈액검사 등은 여전히 두렵고 번거로우며 피하고 싶은 절차이다. 이러한 건강검진에 대한 부담감은 아직도 많은 전신질환들이 뚜렷한 증상이 나타난 이후에 진행된 상태로 진단되는 한 원인이 된다. 따라서 남녀노소를 막론하고 쉽고 거부감 없이 검체 채취가 가능한 타액을 이용한 질병의 진단은 그 유용성이 매우 크다고 할 수 있다.

타액: 질병진단을 위한 검체

타액은 이하선 타액, 악하선/설하선 타액, 또는 소타액선 타액 같이 각 타액선에서 분비되는 타액과 전타액(whole saliva)으로 구분할 수 있다. 전타액은 이하선, 악하선/설하선, 소타액

선의 타액을 모두 포함하며(95.6%), 잇몸틈새 액체(gingival crevis fluid)(2.4%), 탈락된 상피세포(1%), 미생물(1%) 등을 포함한다.³⁾ 각 타액선의 타액은 그 타액선의 병변을 파악하는 데 이용될 수 있지만, 채취를 위해서는 기구가 필요하고 어느 정도의 불편감이 동반된다. 이에 반해 전타액(whole saliva)은 채취가 쉽고, 비침습적이며, 특별한 기구가 필요 없다.⁴⁾ 타액은 채취시에 분비 자극의 유무에 따라 자극 타액과 무자극 타액으로 구분된다. 자극 타액은 파라핀 저작을 하거나 시트르산(citric acid) 또는 신맛이 나는 사탕/주스를 혀에 접촉시켜 미각자극을 유발하여 채취한다. 자극 타액은 자극에 사용된 물질이 타액의 pH를 변화시킬 수 있으며, 증가된 유량이 타액 분석물을 희석시킬 수 있으므로 타액을 이용한 질병의 진단에는 적합성이 떨어진다고 할 수 있다.^{3,5)} 따라서 현재 타액을 이용한 질병의 진단을 위한 대부분의 연구는 무자극 전타액을 주로 이용하고 있다.

타액은 대부분이 물로 구성되지만 전해질과 질소생성물(nitrogenous product) 같은 무기물(inorganic component)과 아미노산, 단백질, 지질 등의 유기물(organic component)

을 포함한다. 이 중 전해질은 능동적인 과정에 의해 타액으로 운반되므로 혈장 농도와 관계가 없지만, 타액의 유기물은 주로 혈장에서 수동적 확산(passive diffusion)을 통해 들어오므로 혈액의 농도를 반영한다.⁶⁾ 이는 타액의 유기물을 매개로 구강암과 치주염 등 국소적인 질환뿐만 아니라 췌장암, 심장병, 당뇨병 등의 전신질환까지 진단 대상에 포함할 수 있는 이론적인 기초가 된다.^{3,5)} 타액에 포함된 분석물은 대체적으로 혈액보다 양이 작으므로 타액 채취 과정에 따른 변이를 최소화하기 위해서 타액 채취는 표준화된 방법에 따라 일정하게 시행되어야 한다.⁷⁾ 즉, 하루 중 같은 시각에 일정한 시간 동안 채취해야 하며, 채취 90분 전부터는 음식과 물의 섭취를 하지 말고, 타액 채취 직전에 물로 입을 세척하여 기존의 타액을 제거하며, 타액 분비에 영향을 줄 수 있는 약은 가능하면 최소 1일 전에 중지하여 타액 분비와 타액의 구성성분에 영향을 줄 수 있는 요소를 일정하게 조절해야 한다.³⁻⁵⁾

타액 진단학

지난 20년 동안, 타액 진단학은 치주질환, 치아우식증(dental caries) 같은 구강질환을 모니터링을 하기 위한 연구에서 시작되었다. 최근 타액 진단학의 범위는 암, 자가면역질환, 당뇨병 등과 같은 전신질환의 진단 및 추적에 관한 연구로 확대되고 있다.^{5,8)} 하지만 타액 진단학이 실제 임상에서 사용되기 위해서는 몇 가지 극복해야 할 과제가 있다. 첫째, 특정 질병을 진단할 수 있는 높은 민감도와 특이도를 가진 타액 생물표지자(biomarker)가 필요하고, 둘째, 개발된 타액 생물표지자를 안정적이고 정확하게 측정할 수 있는 기구가 필요하다. 이 기구는 저렴한 비용과, 쉽고 편리한 사용법, 휴대성을 겸비해야 할 것이다.⁹⁾ 최근 급속도로 발전하고 있는 생명공학 기술은, 검사자와 의료인 모두에게 불편과 감염의 위험 없이 안전하게 채취할 수 있는 타액이 지닌 장점과 더불어 미래의 건강검진과 질병진단에서 타액 진단학의 역할을 증가시킬 것으로 기대된다.

타액 생물표지자(Salivary Biomarker)

생물표지자는 유기체의 기능과 건강 또는 질병상태를 표시하는 양적인 지표로서 측정 가능한 물질이다.¹⁰⁾ 타액의 구성 성분 중에 단백질, mRNA, microRNA, 대사체(metabolome), 구강 미생물무리(oral microbiota) 등이 타액 생물표지자로 개발될 수 있다.^{8,9)} 이 중 많은 연구가 진행된 단백질과 mRNA 생물표지자에 대하여 살펴보자.

단백질

단백질은 타액 유기물의 대부분을 차지한다. 전타액의 단백질 함량은 200 mg/100 mL인데, 이는 혈장 단백질의 3%에 해당한다. 타액의 단백질은 항균, 완충(buffering), 소화, 운환 등의 기능을 담당한다.⁶⁾ 이러한 단백질을 건강검진과 질병진단에 이용하기 위한 첫 걸음은 타액 단백질의 완전한 목록을 작성하는 것이다. 현재 단백질의 연구에는 two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis(2-D PAGE)와 질량분광법(mass spectrometry)이 사용되는데,³⁾ 지금까지 총 1,165가지의 타액 단백질이 확인되었고,¹¹⁾ 데이터베이스화 되어 공개되고 있다(<http://www.hspp.ucla.edu>). 타액 단백질은 혈장 단백질과 뚜렷이 구분되는데, 3,020가지가 확인된 혈장 단백질과 비교하면 전타액 단백질의 약 27%만이 혈장에서도 발견되었다.¹²⁾ 하지만 타액 면역글로불린은 예외적으로 64% 정도 혈장에서도 중복 발견되었다.¹²⁾

악하선/설하선 타액의 락토페린, 알부민, 리소자임, 점액소(mucin), 그리고 시스타틴(cystatin)¹³⁾과 전타액의 statherin, 시스타틴-5가¹⁴⁾ 치아우식증(dental caries)의 생물표지자로 제시되었고, 전타액의 interleukin-1 beta, matrix metalloproteinase-8의 증가가 치주염의 생물표지자로 보고되었다.^{15,16)} 쇼그렌증후군의 전타액에서는 알파-아밀라제, 탄산탈수효소(carbonic anhydrase) 같은 염증 단백질이 증가하고, 리소자임 C, polymeric immunoglobulin receptor 같은 샘파리(acinar) 단백질은 감소하였다고 보고되었다.^{17,18)} 구강 편평상피세포암의 전타액에서는 cytokeratin-19 fragment, tissue polypeptide antigen, cancer antigen-125가 유의하게 증가되었다고 보고되었으며,¹⁹⁾ M2BP, MRP14, profilin, CD59 그리고 catalase의 5가지 단백질 조합으로 민감도 90%, 특이도 83%로 구강암을 진단할 수 있었다고 보고되었다.²⁰⁾ 그 외 당뇨병과,²¹⁾ AIDS,²²⁾ hepatitis B, C와 같은 바이러스 감염,^{23,24)} 췌장암,²⁵⁾ 유방암²⁶⁾과 같은 전신질환의 진단에 관한 연구도 진행되어 보고되고 있다.

mRNA

타액의 RNA를 생물표지자로 사용하기 위해서는 전타액에서 세포를 분리한 상청액(supernatant)을 사용한다. 전타액에 포함된 정상세포에서 기원한 RNA가 질병과 관련된 RNA를 상쇄할 수 있기 때문이다. 상청액에 포함된 RNA를 보존하기 위해서는 전타액에서 원심분리된 상청액에 RNase inhibitor 같은 안정화를 위한 첨가제를 주입하고 -20°C에서 보관해야 한다.³⁾ 무엇보다 검체의 채취, 처리, 보관 등의 과정을 표준운영지침(standard operating procedure)에 따라 일정하게 유지, 관리하는 것이 중요하다.⁷⁾ 타액 RNA 생물표지자의 연구

는 마이크로어레이(microarray)로 특정 질병에 특이한 생물표지자를 찾고, 이를 qPCR로 확인하는 방법을 사용한다(Fig. 1).^{5,8,9)} 전타액의 상청액에서 3,000종 이상의 mRNA가 분리되어 보고되었는데,²⁷⁾ 이 RNA는 완전한 형태도 있지만 절반 정도는 일부분이 조각난 형태로 존재하며, 대분자들(macro-molecules)과 결합하여 혈장 RNA처럼 안정적으로 보존된다고 보고되었다.²⁸⁾ 조각난 형태의 타액 RNA와 적은 양의 타액 검체가 가지는 한계점을 극복하기 위해 다발성 사전신호증폭(multiplex pre-amplification)의 새로운 검사법이 개발되어 적용되고 있다.²⁹⁾ 최근에, 타액의 mRNA는 타액 엑소솜(exosome)에 존재하며, 타액의 리보핵산분해효소(ribonuclease)로부터 안전하게 보존된다고 보고되었다.³⁰⁾ 더욱이 mRNA를 표적기관에 전달하는 엑소솜의 역할^{31,32)}은 유방, 췌장 등 원위부에서 기원한 mRNA가 엑소솜을 통해 타액에 전달된다는 가정하에 타액 RNA 생물표지자의 기전을 밝히려는 연구의 출발점이 되었다.

32명의 T1/T2 구강암 환자의 타액을 동수의 건강한 피험자 타액과 비교하여 3.5배 이상 증가된 8가지 전사물(IL8,

IL1 β , DUSP1, HA3, OAZ1, S100P, SAT)이 확인되었고, 이 중 4가지 mRNA 생물표지자를 조합하면, 민감도 91%, 특이도 91%로 구강암을 진단할 수 있었다.³³⁾ 구강암의 타액 mRNA 생물표지자는 민감도 91%, 특이도 71%를 보인 혈장 mRNA 생물표지자보다 우수한 진단력을 보였고,³⁴⁾ 다른 인종을 대상으로 한 연구에서도 일치된 결과를 보였다.³⁵⁾ 하지만 구강암의 타액 mRNA 생물표지자는 이형성 등의 전암성 질환이 고려되지 않았고, IL8은 치아우식증 또는 잇몸염(gingivitis) 등 다양한 염증성 조건에도 증가되는 한계점이 있다.³⁶⁾ 향후, 전암성 질환, 염증성 질환을 포함한 많은 수의 인구집단을 대상으로 구강암 특이도가 높은 생물표지자가 개발되어야 실제적인 임상적용이 가능할 것이다. 그밖에 췌장암,²⁵⁾ 유방암,²⁶⁾ 쇼그렌증후군³⁷⁾ 등의 진단을 위한 타액 mRNA 생물표지자가 개발되어 보고되고 있다.

결론

타액은 혈액, 소변, 뇌척수액과 같은 다른 체액처럼 몸의 병

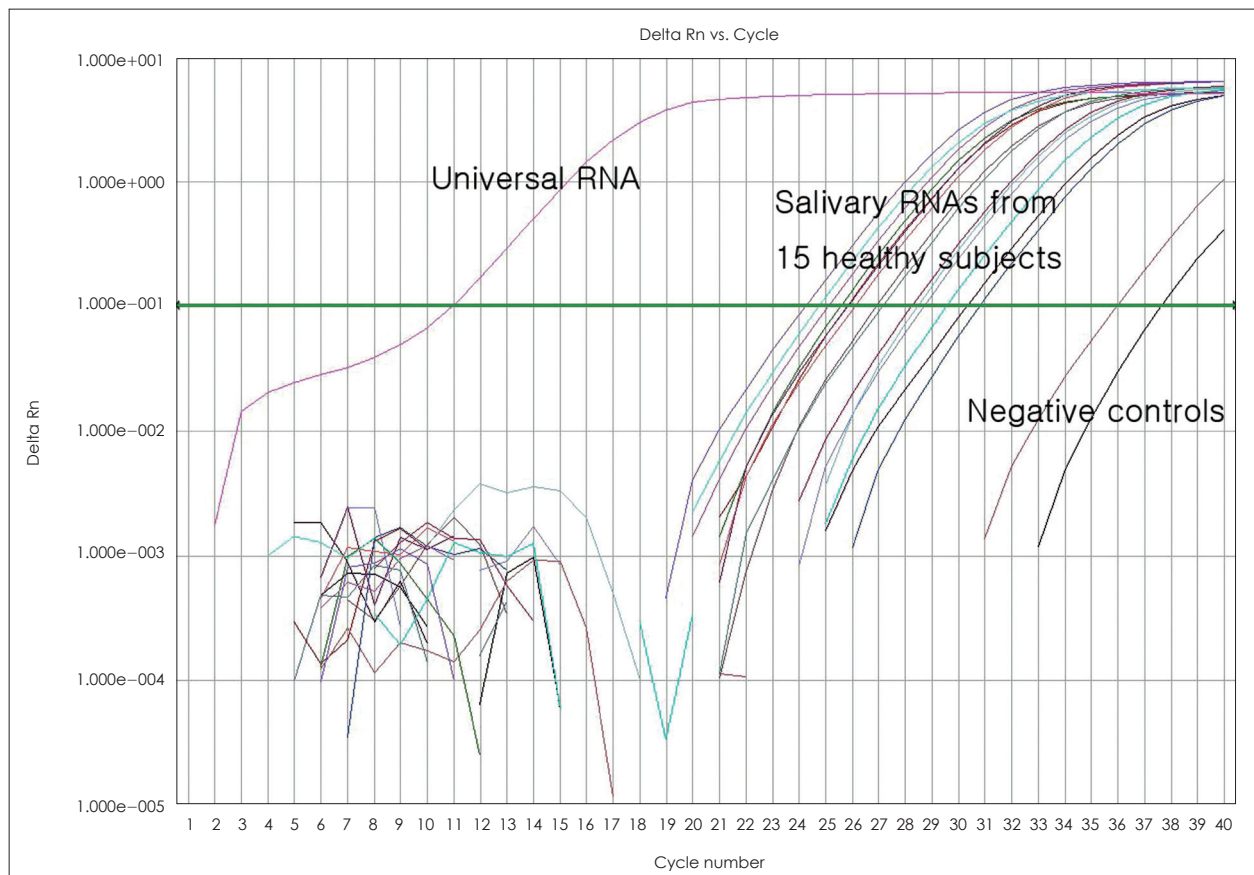


Fig. 1. Amplification plots of quantitative real-time PCR for salivary interleukin 8. Cycle numbers are plotted against delta Rn (the difference between the fluorescence detected at a certain point of the reaction and the initial fluorescence). The universal RNA shows the lowest cycle number and the negative controls show the highest cycle numbers. The cycle numbers of salivary RNAs from 15 healthy subjects are between cycle numbers of universal RNA and negative controls.

리와 생리적 상태를 반영해 줄 충분한 양의 단백질과 핵산 등의 분자를 포함하고 있다. 타액의 채취는 다른 체액과는 달리 검사자와 피험자 모두에게 안전하며, 쉽고, 비침습적이므로 미래의 의학진단에서 그 비중이 크게 증가할 것으로 기대된다. 하지만 타액 진단학의 실제적인 임상적용을 위해서는 보다 높은 특이도를 지닌 생물표지자와, 안정적이고 적은 비용의 편리한 검사기술이 개발되어야 할 것이다.

REFERENCES

- 1) Loré JM Jr. Early diagnosis and treatment of head and neck cancer. *CA Cancer J Clin* 1995;45(6):325-7.
- 2) Crandall JP, Knowler WC, Kahn SE, Marrero D, Florez JC, Bray GA, et al. The prevention of type 2 diabetes. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2008;4(7):382-93.
- 3) Wong DT. *Salivary Diagnostics*. 1st ed. Ames, USA: Wiley-Blackwell;2008. p.37-135.z
- 4) Navazesh M. Methods for collecting saliva. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 694:72-7.
- 5) Miller CS, Foley JD, Bailey AL, Campell CL, Humphries RL, Christodoulides N, et al. Current developments in salivary diagnostics. *Biomark Med* 2010;4(1):171-89.
- 6) Batsakis JG. Physiology. In: Cummings CW, Fredrickson JM, Harker LA, Krause CJ, Richardson MA, Schuller DE, editors. *Otolaryngology Head and Neck Surgery*. 3rd ed. St Louis: Mosby;1998. p.1210-1222.
- 7) Fraser CG, Harris EK. Generation and application of data on biological variation in clinical chemistry. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1989;27(5): 409-37.
- 8) Spielmann N, Wong DT. Saliva: diagnostics and therapeutic perspectives. *Oral Dis* 2011;17(4):345-54.
- 9) Lee JM, Garon E, Wong DT. Salivary diagnostics. *Orthod Craniofac Res* 2009;12(3):206-11.
- 10) Pepe MS, Feng Z, Janes H, Bossuyt PM, Potter JD. Pivotal evaluation of the accuracy of a biomarker used for classification or prediction: standards for study design. *J Natl Cancer Inst* 2008;100(20): 1432-8.
- 11) Denny P, Hagen FK, Hardt M, Liao L, Yan W, Arellanno M, et al. The proteomes of human parotid and submandibular/sublingual gland salivas collected as the ductal secretions. *J Proteome Res* 2008;7(5): 1994-2006.
- 12) Yan W, Apweiler R, Balgley BM, Boonthueung P, Bundy JL, Cargile BJ, et al. Systematic comparison of the human saliva and plasma proteomes. *Proteomics Clin Appl* 2009;3(1):116-34.
- 13) Mungia R, Cano SM, Johnson DA, Dang H, Brown JP. Interaction of age and specific saliva component output on caries. *Aging Clin Exp Res* 2008;20(6):503-8.
- 14) Rudney JD, Staikov RK, Johnson JD. Potential biomarkers of human salivary function: a modified proteomic approach. *Arch Oral Biol* 2009;54(1):91-100.
- 15) Rai B, Kharb S, Jain R, Anand SC. Biomarkers of periodontitis in oral fluids. *J Oral Sci* 2008;50(1):53-6.
- 16) Miller CS, King CP Jr, Langub MC, Kryscio RJ, Thomas MV. Salivary biomarkers of existing periodontal disease: a cross-sectional study. *J Am Dent Assoc* 2006;137(3):322-9.
- 17) Ryu OH, Atkinson JC, Hoehn GT, Illei GG, Hart TC. Identification of parotid salivary biomarkers in Sjogren's syndrome by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and two-dimensional difference gel electrophoresis. *Rheumatology (Oxford)* 2006;45(9):1077-86.
- 18) Giusti L, Baldini C, Bazzichi L, Bombardieri S, Lucacchini A. Proteomic diagnosis of Sjögren's syndrome. *Expert Rev Proteomics* 2007;4(6):757-67.
- 19) Nagler R, Bahar G, Shpitzer T, Feinmesser R. Concomitant analysis of salivary tumor markers--a new diagnostic tool for oral cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12(13):3979-84.
- 20) Hu S, Arellano M, Boonthueung P, Wang J, Zhou H, Jiang J, et al. Salivary proteomics for oral cancer biomarker discovery. *Clin Cancer Res* 2008;14(19):6246-52.
- 21) Rao PV, Reddy AP, Lu X, Dasari S, Krishnaprasad A, Biggs E, et al. Proteomic identification of salivary biomarkers of type-2 diabetes. *J Proteome Res* 2009;8(1):239-45.
- 22) Landrum ML, Wilson CH, Perri LP, Hannibal SL, O'Connell RJ. Usefulness of a rapid human immunodeficiency virus-1 antibody test for the management of occupational exposure to blood and body fluid. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2005;26(9):768-74.
- 23) Zhang YL, Pan HY, Chen CR, Lou GQ, Ye RX, Lu DR. [The roles of saliva testing for preventing hepatitis B virus spreading]. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* 2008;42(8):596-8.
- 24) Moorthy M, Daniel HD, Kurian G, Abraham P. An evaluation of saliva as an alternative to plasma for the detection of hepatitis C virus antibodies. *Indian J Med Microbiol* 2008;26(4):327-32.
- 25) Zhang L, Farrell JJ, Zhou H, Elashoff D, Akin D, Park NH, et al. Salivary transcriptomic biomarkers for detection of resectable pancreatic cancer. *Gastroenterology* 2010;138(3):949-57, e1-7.
- 26) Zhang L, Xiao H, Karlan S, Zhou H, Gross J, Elashoff D, et al. Discovery and preclinical validation of salivary transcriptomic and proteomic biomarkers for the non-invasive detection of breast cancer. *PLoS One* 2010;5(12):e15573.
- 27) Li Y, Zhou X, St John MA, Wong DT. RNA profiling of cell-free saliva using microarray technology. *J Dent Res* 2004;83(3):199-203.
- 28) Park NJ, Li Y, Yu T, Brinkman BM, Wong DT. Characterization of RNA in saliva. *Clin Chem* 2006;52(6):988-94.
- 29) Hu Z, Zimmermann BG, Zhou H, Wang J, Henson BS, Yu W, et al. Exon-level expression profiling: a comprehensive transcriptome analysis of oral fluids. *Clin Chem* 2008;54(5):824-32.
- 30) Palanisamy V, Sharma S, Deshpande A, Zhou H, Gimzewski J, Wong DT. Nanostructural and transcriptomic analyses of human saliva derived exosomes. *PLoS One* 2010;5(1):e8577.
- 31) Skog J, Würdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Estevés M, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* 2008;10(12):1470-6.
- 32) Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007; 9(6):654-9.
- 33) Li Y, St John MA, Zhou X, Kim Y, Sinha U, Jordan RC, et al. Salivary transcriptome diagnostics for oral cancer detection. *Clin Cancer Res* 2004;10(24):8442-50.
- 34) Li Y, Elashoff D, Oh M, Sinha U, St John MA, Zhou X, et al. Serum circulating human mRNA profiling and its utility for oral cancer detection. *J Clin Oncol* 2006;24(11):1754-60.
- 35) Brinkmann O, Kastratovic DA, Dimitrijevic MV, Konstantinovic VS, Jelovac DB, Antic J, et al. Oral squamous cell carcinoma detection by salivary biomarkers in a Serbian population. *Oral Oncol* 2011;47 (1):51-5.
- 36) Westra WH, Califano J. Toward early oral cancer detection using gene expression profiling of saliva: a thoroughfare or dead end? *Clin Cancer Res* 2004;10(24):8130-1.
- 37) Hu S, Wang J, Meijer J, Jeong S, Xie Y, Yu T, et al. Salivary proteomic and genomic biomarkers for primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2007;56(11):3588-600.