

유방암에서 감시림프절 파라핀 포매조직 RT-PCR법을 이용한 미세전이 분석

정준, 최은창, 최유정¹, 이일균, 이승아, 박전환¹, 유영훈², 정우희³, 이희대

연세대학교 의과대학 외과학교실, 미생물학교실¹, 핵의학교실², 병리학교실³

Detection of micrometastasis in fixed paraffin-embedded Sentinel Lymph Nodes of Breast cancer using RT-PCR

Joon Jeong, Eun-Chang Choi, Youjeong Choi¹, Il-Kyun Lee, Seung Ah Lee, Jeon Han Park¹, Yong Hoon Ryu², Woo Hee Jung³, Hy-De Lee

Departments of Surgery, Microbiology¹, Nuclear Medicine², and Pathology³, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: Sentinel lymph node (SLN) biopsy is considered a highly accurate and very economic method of assessing the axillary nodal status in breast cancer patients. Recently immunohistochemical (IHC) staining and reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) are commonly used to evaluate micrometastasis in the sentinel lymph node. However, most of the RT-PCR studies have been performed using fresh tissue. This study was conducted to assess micrometastasis in clinically node-negative breast cancer by using RT-PCR technique on the paraffin embedded sentinel lymph nodes.

Methods: Sixty patients who undergone SLN biopsy followed by axillary lymph node dissection due to breast carcinoma were evaluated from February 2000 to January 2001 at the Breast Cancer Center,

Department of Surgery, Yongdong Severance Hospital. Serial sections were made from all sentinel lymph nodes for the H&E staining and for the IHC staining with monoclonal anti-cytokeratin antibody. RNA was extracted from the paraffin embedded sentinel lymph nodes and RT-PCR was performed using cytokeratin 19 mRNA, MUC-1 mRNA, and MAGE-A3 mRNA.

Results: In 32 out of 60 cases, β -actin mRNA was detected after RT-PCR, and the 28 cases which had no product after RT-PCR for β -actin were excluded from this study. Twenty five cases showed as being metastasis positive and 7 cases showed as being metastasis negative by serial section (SS) H&E staining. Three out of 25 negative cases tested for by SS H&E staining were found to be positive by IHC. Ten, six and, eight cases out of the 25 negative cases tested for by SS H&E were found to be positive by RT-PCR for cytokeratin 19, MUC-1, and MAGE-A3, respectively. Among the 22 cases that were found to be negative by both SS H&E staining

책임저자 : 이희대

135-270 서울시 강남구 도곡동 146-92 연세대학교 영동세브란스병원 외과

Tel: 02-3497-3373, Fax: 02-3462-6994, E-mail: hdlee@yumc.yonsei.ac.kr

접수일 : 2005년 2월 7일 : 게재승인일 : 2005년 5월 9일

1. 본 논문의 요지는 한국유방암학회 2004년 춘계학술대회에서 구연 발표되었음.

2. 본 연구는 연세대학교 의과대학 2001년도 교수연구비에 의하여 이루어졌음.

and IHC staining, 9, 4, and 6 cases were converted to positive by RT-PCR for cytokeratin 19, MUC-1, and MAGE-A3, respectively. Using the combination of two or three markers for performing RT-PCR was more sensitive than any single marker to detect micrometastasis ($p < 0.05$).

Conclusion: Even though we failed to extract RNA in 46% of the paraffin embedded tissues, it may be possible to detect micrometastasis by using RT-PCR with the paraffin embedded tissue. RT-PCR is far more sensitive than IHC for detecting micrometastasis, and when we combine multiple markers, the detection rate is higher than for any one marker.

(J Breast Cancer 2005;8:31-39)

Key Words Breast cancer, Micrometastasis, RT-PCR, Sentinel lymph node

중심 단어 유방암, 미세전이, 역전사 중합효소 연쇄반응, 감시림프절

서 론

액와 림프절 미세전이는 여러 유방암 예후 인자들 중 유방암 완치수술을 받고 병력 결과상 액와부 림프절 전이가 발견되지 않은 환자에서 장기 추적 관찰 중 국소 재발이나 원격 전이가 20-30%에서 발견되는 가장 큰 근거로 알려져 있다.⁽¹⁾ 그러나 미세전이는 통상적인 염색 방법의 난점을 극복 할 수 있는 연속 절편을 통한 H&E 염색법 그리고 면역조직화학 염색이나 역전사 중합효소 연쇄반응 (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction, 이하 RT-PCR) 과 같은 특수 진단 방법이 있음에도 불구하고 실제로 임상에서 널리 사용되지 못하고 있고, 통상적으로 유방암 수술시 절제되는 15-20개의 림프절 전체에 대해 평가하기에는 경제적 시간적 어려움이 있어 미세전이가 무병 생존율이나 사망률에 대한 영향을 분석하는 데에는 한계가 있다.^(2,3) Noguchi 등⁽⁴⁾ 이 이러한 난점을 극복하고자 절제된 림프절 전체에서 추출한 cytokeratin 19 mRNA와 MUC-1 mRNA를 가지고 RT-PCR을 시행하였으나, 이 방법 역시 미세한 양으로 존재하는 상피세포 mRNA가 정상 림프절에 의해 희석되거나 소실 될 수 있다는 단점이 있다. 따라서 이러한 문제점의 대안으로 최근 여러 연구 보고에서 감시 림프절을 대상으로 연속 절편에 대한 H&E 염색법이나 면역조직화학 염색법 그리고 RT-PCR을 통해서 예후를 분석하고 있다.⁽⁴⁻⁶⁾ 그러나 연속 절편에 대한 H&E 염색법은 전이된 종양의 양이 미미한 경우 진단표본 제작이나 현미경적 판단과정에서 6-15%의 위음성율이 발생 할 수

있고 면역조직화학염색은 검사에 응용되는 항체가 정상적인 림프절에 염색되는 경우도 관찰되어 위음성 뿐만 아니라 위양성의 가능성도 배제할 수 없는 단점이 있다.⁽⁷⁻⁹⁾ RT-PCR의 경우는 매우 소량의 검체로 전이를 평가할 수 있고 면역조직화학염색에 비해 민감도가 높기 때문에 감시 림프절의 미세전이 연구에 많이 이용되고 있다. 그러나 이들 감시 림프절을 이용한 방법은 감시 림프절 절제술이 비교적 최근에 연구되어 미세전이 분석 대상자가 적고, RT-PCR을 이용한 경우 대부분이 전향적 분석을 통해서 이루어졌기 때문에 예후분석에 한계가 있었다. 과거에는 파라핀 포매조직에서 RNA를 추출하는 것은 질적으로나 양적으로나 어려움이 많아서 파라핀 포매조직을 이용한 RNA 연구는 잘 시도되지 않았다. 하지만 최근 파라핀 포매조직에서도 양질의 RNA를 추출 할 수 있는 방법들이 개발되어 이용되면서 파라핀 포매되어 보관되고 있는 여러 조직들에서 RT-PCR 등과 같은 RNA를 이용한 연구들이 진행되고 있다.

이에 저자들은 파라핀 포매된 감시림프절 검체에서 연속 절편 H&E 염색법과 면역조직화학염색 그리고 RT-PCR 방법을 통해서 검사 방법에 따른 미세전이 발견 빈도를 알아보고 파라핀 포매된 감시림프절에서 RT-PCR을 이용한 미세전이 연구의 가능성에 대해 알아보고자 하였다.

방 법

(1) 연구 대상

2000년 2월부터 2001년 1월까지 연세 대학교 의과대학 영동세브란스병원 외과에서 원발 성 유방암으로 수술을 받은 환자들 중 감시 림프절 조직 표본의 보관 상태가 양호한 60명의 검체를 대상으로 하였다. 이들의 비감시 림프절은 추가적으로 H&E 염색을 시행하여 전이 여부를 확인하였다. 검체들은 수술전 검사상 과거 및 현 병력 그리고 유방암의 가족력 없었으며, 수술전 항암 치료나 방사선 치료 역시 받지 않았던 환자군들에서 얻어졌다. 환자의 연령, 원발 종양의 크기, 핵등급, 조직등급, 호르몬 수용체 발현 유무, 임상 병기 등은 대상 환자군 의무 기록, 병력 기록을 이용하였다.

(2) 연속 절편을 통한 H&E 염색

파라핀 포매된 감시 림프절은 수술 2시간 전 시행된 Tc-99m antimony trisulfide colloid 방사성 동위원소 화합물을 이용한 림프절 조영술과 수술 도중 시행된 감마선 검출기를 이용하여 발견되었다. 검체는 생검 후 즉시 병력 검사 실로 보내 오염되지 않은 면도칼로 3등분으로 균등하게 나

누었다. 동결절편을 시행하기 위한 검체 1조각의 일부를 제외한 나머지 두 조각과 남은 일부 림프절을 10% 포르말린에 고정하여 보관하였다. 10% 포르말린에 고정된 검체는 통상적인 방법으로 탈수 파라핀 포매를 만든 후 200 μ m의 일정한 간격을 두고 3 μ m 두께로 2장을 연속으로 박절하여 총 6장의 연속 절편을 만들었다. 이중 3장은 통상적인 Hematoxylin-Eosin 염색을 하여 광학 현미경을 이용하여 전이 여부를 판정하였고, 나머지 3장은 면역조직화학 염색을 시행하였다.

(3) 면역조직화학염색

3 μ m 두께로 3부위에서 심부 연속 절편한 조직을 coated slide에 도말하였고 탈 파라핀 과정 및 알코올 함수 과정을 거쳐 수세한 다음 0.01 M sodium citrate 완충액 (pH 6.0)에 담근 후 전자 레인지 (microwave oven)에서 10분간 가열하였다. Tris-Buffered Saline (TBS) 완충액 (pH 7.6)으로 10분 간 세척한 후에 내인성 과산화 효소를 억제하기 위해 3% 과산화수소를 펄구고 30분간 반응시킨 다음 TBS 완충액 (pH 7.6)으로 10분 간 세척하였다. 비특이적 면역염색을 차단하기 위해 정상 혈청에 30분간 반응시킨 다음 차단 용액을 제거하였고 일차 항체인 human cytokeratin에 대한 단일 항체 (clone MNF116, DAKO)를 펄구고 4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 반응시켰다. 다음날 TBS로 10분 간 세척 후 Labeled-Streptavidin-Biotinmethod (LSA-B) kit (DAKO, Glostrup, Denmark)를 이용하여 면역조직화학 염색을 시행하였고 acetyl-ethyl carbamazole로 발색시킨 후 Mayer's hematoxylin으로 대조 염색하여 광학 현미경으로 암전이 유무를 검색하였다.

(4) 역전사 중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)

1) 파라핀 포매된 조직에서 RNA 추출: 10% 포르말린에서 고정 후 통상적인 방법으로 탈 수 작성된 파라핀 블록 중 남은 부분은 30 μ m 크기로 절편을 만든 후 커버 슬라이드에 편평하게 펴서 담았다 그 후 광학 현미경하에서 파라핀 불순물이 많이 존재하는 조직 가장자리 부위를 미세절 세기를 이용하여 제거하였다. 절제된 파라핀 블록은 탈파라핀화나 재수액화 과정 없이 1.5 ml screw-cap tube에 직접 넣은 후 850 μ l denaturation solution (4 M guanidinium isothiocyanate/0.25 M sodium citrate/0.5% sarcosyl/0.1 M 2-mercaptoethanol)과 250 μ l proteinase K solution (20 mg/ml H₂O)을 이 tube에 첨가한 후 thermoshaker를 이용하여 1400 rpm, 55 $^{\circ}$ C에서 vortex 시켰다. 다음날 14,000 \times G, 4 $^{\circ}$ C에서 5분간 이 조직 표본을 원심분리시킨 후 상층의 파라핀 물질을 제거하

였다. 파라핀 조직을 제거한 조직 표본은 eppendorf tube에 조직 1 g 당 1 ml의 Trizol 시약 (Gibco-BRL, Co)를 넣고 다시 vortex한 후 5분간 실온에서 반응을 유도했다. 처리된 표본은 깨끗한 2 ml safe lock tube에 옮긴 후 100 μ l 3 M sodium acetate (pH 5.2), 630 μ l water saturated phenol 그리고 270 μ l chloroform을 이 tube에 첨가한 뒤 얼음 위에 15분간 방치하였다. 그 뒤, 표본은 14,000 \times G, 4 $^{\circ}$ C에서 20분간 원심 분리 후, 상층부위 1 ml를 하층의 다른 물질과 섞이지 않게 새 tube에 옮긴다. 이 RNA-containing supernatant에 1 μ l glycogen (20 mg/ml, Roche Molecular Diagnostics)과 1 ml isopropanol을 첨가 혼합한 후 영하 20 $^{\circ}$ C에서 밤 동안 (overnight) 보관하였다. 다음날 침전된 pellet만 남아 있는 tube에 70% 에탄올을 넣고 14,000 \times G, 4 $^{\circ}$ C에서 20분간 원심 분리하였다. 상층액을 제거하고 20 μ l DEPC (diethyl pyrocarbonate) 처리된 물을 이용 air-dried pellet (RNA 침전물을 녹이고 분광흡광계로 정량한 다음 영하 70 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

2) cDNA 합성: Safe lock tube에 3 μ g의 total RNA를 넣고 여기에 5 \times reverse transcription buffer 3 μ l, random primer 1.6 μ g, 2.5mM의 dNTP mixture (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 1 μ l, 0.1 M dithiothreitol(DTT) 1 μ l, RNase inhibitor (TakaRa Shuzo Co.) 40 units, MMLV (Molony Murine Leukemia virus) reverse transcriptase 20 units를 섞고 총 부피가 30 μ l가 되도록 DEPC 용액을 첨가한 후 vortex 한다. 25 $^{\circ}$ C에서 15분, 42 $^{\circ}$ C에서 60분, 99 $^{\circ}$ C에서 5분 간 반응시켜 cDNA를 합성하였다.

3) 중합효소 연쇄반응 (polymerase chain reaction): 미세전이 유무를 보기 위해서 CK-19, MUC-1, MAGE-A3에 대한 중합효소 연쇄반응을 시행하였다. 이들 중합효소 연쇄반응에 의해 나온 산물들은 β -actin을 통해 검증하였다. 각각의 primer는 (주)바이오니아에서 Table 1에서와 같이 합성하여 사용하였다. cDNA 30 μ l에서 2 μ l를 추출하

Table 1. Primer sequence for RT-PCR amplification.

mRNA	Primer 5' -3'	Product size(bp)
CK 19	AGG TGG ATT CCG CTC CGG CA	480
	ATC TTC CTG TCC CTC GAG CA	
MUC-1	CTC TGG CTG CCC CTT ATT GGA	248
	GGT ACC TCC TCT CAC CTC CTC CAA	
MAGE-3	GAA GCC GCC CCA GGC TCG	423
	GGA GTC CTC ATA GGA TTG GCT CC	
β -actin	CAC TGT GTT GGC CTA CAG GT	54
	TCA TCA CCA TTG GCA ATG AG	

bp=base pairs

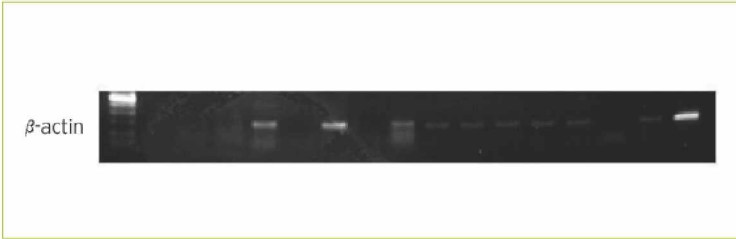


Fig 1. RT-PCR amplification of β -actin mRNA obtained from paraffin embedded sentinel lymph nodes. β -actin was amplified in 10 out of 16 cases.

Table 2. Histopathologic characteristics of 32 cases of primary breast cancer.

		sentinel(-)	sentinel(+)
No. of patients		25	7
Age(vear)		47.3 \pm 0.57	47.0 \pm 5.42
Menopuase	pre-	17(68%)	5(71.4%)
	post-	8(32%)	2(28.6%)
Operation	Partial mastectomy+SLNB	9(36%)	1(14%)
	Total mastectomy+SLNB	16(64%)	6(86%)
Histology	Intraductal cancer+microinva	4(16%)	0(0%)
	Infiltrating ductal cancer	20(80%)	7(100%)
	medullary	1(4%)	1(4%)
	mucinous	1(4%)	6(86%)
	others	18(72%)	0(0%)
	Infiltrating lobular carcimona	1(4%)	0(0%)
Tumor Size	T1mic	4(16%)	0(0%)
	T1c (1< and \leq 2 cm)	9(36%)	0(0%)
	T2 (2< and \leq 5 cm)	12(48%)	7(100%)
Stage	I	15(60%)	0(0%)
	II A	6(24%)	2(28.6%)
	II B	4(16%)	5(71.4%)
Histology Grade	not determined	11(44%)	5(71.4%)
	I	2(8%)	2(28.6%)
	II	8(32%)	0(0%)
	III	4(16%)	0(0%)
Nuclear Grade	not determined	9(36%)	5(71.4%)
	I	0(0%)	2(28.6%)
	II	7(28%)	0(0%)
	III	9(36%)	0(0%)
ER	(-)	8(32%)	7(100%)
	(+)	17(68%)	0(0%)
PR	(-)	8(32%)	4(57%)
	(+)	17(68%)	3(43%)
c-erbB-2	(-)	11(44%)	0(0%)
	(+)	14(56%)	7(100%)
Vascular invasion	(-)	7(28%)	4(57%)
	(+)	18(72%)	3(43%)
Lymphatic invasion	(-)	7(28%)	0(0%)
	(+)	18(72%)	7(100%)

여 20 pmol primer, dNTP 0.2 mM, 10 mM Tris-HCl, 2 mM MgCl₂, Tag polymerase I unit를 포함하여 혼합하였다. 중합효소 연쇄반응은 처음 94 °C에서 10분 간 가열하고 다시 94 °C에서 1분 (denaturation), 55 °C에서 1분 (annealing), 72 °C에서 1분 간 extension의 주기를 40회 반복한 뒤 마지막 cycle은 72 °C에서 10분 간 반응시킨 후 4 °C로 냉각시켜 보관하였다. 증폭된 산물은 ethidium bromide가 첨가된 1.7% agarose gel에서 전기영동을 시행하여 확인하였으며 100 bp DNA ladder를 size marker로 사용하였다.

(5) 통계학적 분석

통계 검증 프로그램은 SPSS for windows, version 11.0을 사용하였다. 감시 림프절 미세전이 여부를 연속질편 검사 음성군을 대상으로 RT-PCR과 면역조직화학검사 결과를 비교하였다. 각 검사방법의 차이는 Fisher exact test를 사용 검증 하였고 유의 수준은 5% 미만으로 하였다.

결 과

(1) 원발성 종양에 대한 임상적 조직병리학적 특성

beta actin에 대한 RT-PCR에서 결과가 나오지 않은 28예는 대상에서 제외하였다 (Fig 1). 대상이 된 32예의 원발성 종양은 감시 림프절 전이 음성군이 25개, 양성군이 7개였다. 모든 32예의 비감시림프절에 대한 H&E 염색에서 전이는 발견되지 않았다. 평균 나이는 각각 47.3세와 47세였고 폐경 여부, 진단명, 수술방법, 종양의 크기, 핵등급, 호르몬 수용체 유무, c-erbB-2 그리고 림프절과 혈관 침범 정도는 두 군에 따라 약간의 차이가 있으나 통계적 유의성은 보이지 않았다 (Table 2).

(2) 진단 방법에 따른 미세전이 발견

32예 중 25예는 연속질편을 통한 H&E 염색에서 전이 음성이었고, 7예는 전이 양성이었다. H&E 염색에서 전이 음성이었던 25예 중 3예에서 pancytokeratin 면역조직화학염색에서 양성으로 나왔다. RT-PCR에서는 cytokeratin 19, MUC-1, MAGE-A3, 각각 10, 6, 8예에서 양성으로 나와 미세전이 발견 빈도가 면역조직화학염색법에 비해 의의 있게 높았다 ($p < 0.05$) (Fig 2). 또 3가지 RT-PCR 결과를 조합해보면, 3가지 중 어느 하나에서 양성인 경우가 13예, cytokeratin 19나 MAGE-A3에 양성인 경우가 13예, cytokeratin 19나 MUC-1에 양성인 경우가 11예, MAGE-A3나 MUC-1에 양성인 경우가 9예로, 표지자를 2가지 이상 조합한 경우 미세전이 발견율은 더 증가되었다. 특히 면

역조직화염색법에서 음성으로 나온 22예 중 RT-PCR에서 양성으로 나온 경우가 cytokeratin 19, MUC1, MAGE-A3 각각 9, 4, 6예 있었다 (Fig 3, 4). 면역조직화염색법에서 전이 음성이었던 예에서 이들 3가지 RT-PCR 결과를 조합해보면, 3가지 중 어느 하나에서 양성인 경우가 11예, cytokeratin 19나 MAGE-A3에 양성인 경우가 11예, cytokeratin 19나 MUC-1에 양성인 경우가 10예, MAGE-A3나 MUC-1에 양성인 경우가 7예로 면역조직화염색에서 전이 음성으로 나왔으나 RT-PCR에서 양성으로 나온 경우가 22예 중 11예로 50%에서 추가로 미세전이 가 확인되었다 (Fig 5). 면역조직화염색에서 양성으로 나온 3예 중 RT-PCR에서 양성으로 나온 경우는 cytokeratin 19, MUC1, MAGE-A3 각각 1, 2, 1 예 있었다.

고 찰

중앙 암등록 사업 보고에 따르면 1999년 자궁암 위암에 이어 3번째로 많은 여성 암이었던 국내 유방암은 발병율이 점진적 증가함에 따라 2002년 현재 여성 암 중 가장 많은 위치를 차지하고 있고 발병 연령군이 비교적 적은 30-40대에서 그리고 조기 유방암 환자가 늘고 있는 특성을 보이고 있다.⁽¹⁰⁾ 이는 유방암에 대한 생물학적 이해의 확대와 함께 식습관의 서구화 사회적 관심 증가 그리고 검진 유방촬영술의 보편화에 따라 나타난 변화로서 유방암 치료와 진단에도 영향을 주어 미세 침습적 수술 경향과 여러 보조 요법의 발전을 가져왔다.

미세 침습적 수술 방법들 중 감시 림프절 생검술은 유방 보존술과 함께 통상적인 변형 근치절제술의 대안으로 점차 제시되고 있는 방법으로서, 통상적인 액와 광창술을 받은 조기 유방암 환자들 중 2/3에서 불필요한 림프절 치료를 받은 것으로 보고되고 이들 중 약 10-25%에서 수술 후유증이 발생하는 것으로 보고됨에 따라 대두되었다.⁽¹¹⁾ 액와 부 림프절의 상태를 정확히 반영할 수 있는 감시 림프절 절제술이^(12, 13) 보편화되고 감시림프절전이 음성인 경우 액와림프절 광창술을 생략해도 무방하다는 보고들이^(14, 15) 나오면서 그 동안 액와림프절 광창술 후에는 번거로움과 시간상의 제약 때문에 하기 힘들었던 면역조직화염색이나 RT-PCR을 감시림프절에서는 할 수 있게 되었다.

비록 유방암에 있어서 가장 중요한 예후 인자가 액와 림프절 전이 여부이지만 미세전이는 독자적인 예후 인자로서는 논란의 소지가 있다. 1990년 Ludwig 등⁽¹⁶⁾의 연구 보고 이전에 이루어진 초기 미세전이 연구보고들은 미세전이가 전체 생존율이나 무병생존율에 대하여 무관하다고 보고하고 있었다. 이는 대부분 그 대상 환자가 100명 이내에서 일반 병리 검사를 통한 연구에서 통계적 제한성을 내포하고 있었다. Trojani 등⁽¹⁷⁾은 150명을 대상으로 한 면역조직화학 검사의 유용성을 강조하면서 조직학적 분류를 감안하지 않은 전체 환자에서는 미세전이가 예후에 영향을 주지 않지만 침윤성 관암군에서는 생존율과 무병 생존율에 영향을 준다고 했다. 또한 de Mascarel 등⁽¹⁸⁾은 1680명에 대한 연속절편과 129명에 면역조직화학 검사를 통한 미세

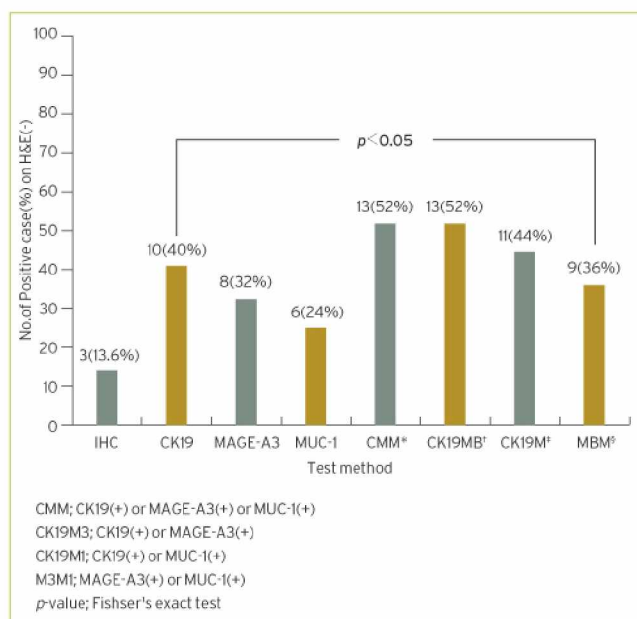


Fig 2. Positive expression rate in H&E negative group.

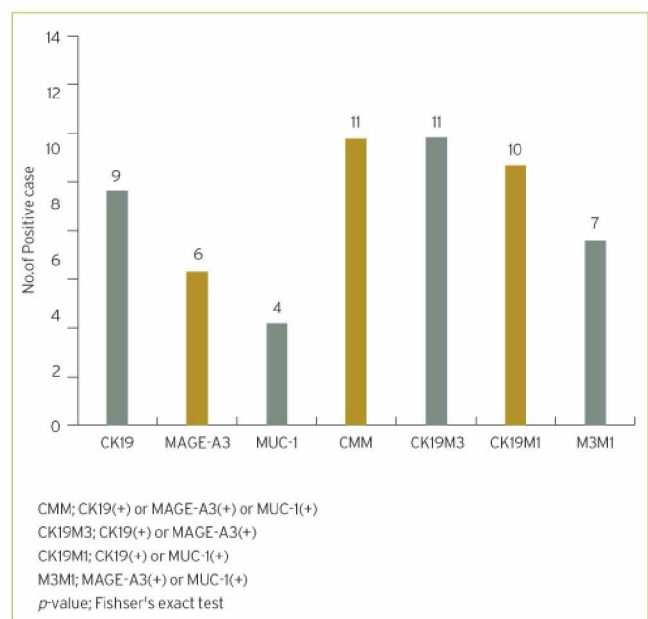


Fig 3. Positive expression rate in H&E(-), IHC(-) group.

전이 분석에서 무병 생존율이나 전체 생존율이 불량하다는 보고를 하는 등 전반적으로 미세전이가 예후에 불량하게 작용하는 것으로 보고 하는 연구들이 많았다. 하지만 Wilkinson 등(2)의 연구에서는 비교적 많은 대상군인 525명의 액와 림프절 음성군에 대한 보고에서, 24개의 연속 절편 결과 84명 (17%)의 림프절 미세전이와 미세전이군의 생존율과 통계적 무관성을 제시하여 이들 보고들과는 다른 결론을 말하였고 Tsuchiya 등(19)은 액와 림프절 음성인 유방암 환자에서 10년 재발율이 10%로 서구의 30%로 보다 낮은 것은 서구와 다른 생물학적 특성의 차이에 따라 산출된 결과로 미세 전이 역시 예후에 영향을 주지 않는 것으로 분석하였다. 국내에서는 고 등(2)의 연구에서 예후에는 영향을 주지 않지만 국소 재발율에는 차이가 나타나는 등 논란은

지속되고 있다.

RT-PCR을 이용한 감시림프절의 미세전이 연구는 그 방법상 전향적인 연구가 될 수 밖에 없었다. 따라서 국내에서 감시림프절 생검이 도입되어 널리 시행된 지가 그리 오래되지 않았고 더구나 RT-PCR을 이용한 감시림프절 미세전이에 대한 연구는 더 최근의 일이라 전향적인 연구로는 미세전이가 생존율에 미치는 의의이나 다른 유방암의 예후를 결정하는 인자와의 연관성에 관한 연구를 진행하기가 어려운 현실이다. 본 연구는 이러한 점을 고려하여 대상군을 확대 시키는 방법으로는 후향적 분석이 가능한 동결 절편된 검체에서 감시림프절을 분석하는 방법을 고려하였다.

Formalin에 고정된 paraffin block에서 DNA와 RNA를 추출하는 방법은 그 자체의 RNA 상태에 따라 차이가 있을 수 있지만 RNA의 양이 매우 적고 분자량도 적어 기존의 Northern blotting과 nuclease protection assay를 통해서 원하는 유전자 염기 상태를 구하기 어려운 작업이 될 수 있다. 그러나 Formalin에 고정된 paraffin block 상태로 보관된 조직은 비교적 다루기 쉽고 형태적 가동이 용이하며 과거부터 보편화된 조직 보관방법으로서의 여러 장점이 있어 언급된 문제를 극복하는 연구들이 있어왔다. 최근 ribonuclease protection assay를 이용하는 Paraffin block RNA isolation kit 등을 이용하여 4×10^5 copies 단위의 적은 RNA transcript를 추출할 수 있는 방법이 개발되었다. 이런 연구들은 paraffin block 상태로 보관된 간조직에서 먼저 연구 결과가 이루어졌는데 90% 이상의 정확성을 보고하고 있다.(21-23) 본 연구는 유방암의 감시림프절 평가에도 이 방법을 이용하였다. 본 연구에서는 파라핀 고정된 검체에서 β -actin이 검출되지 않은 경우가 전체 60예 중 28예 (46.7%)로 나타나 DNA나 RNA를 확인하는데 어려움이 나타나 파라핀 보관상의 난점, 증폭 등의 검출 기술이나 검체 보관 상태를 개선하여야 하는 난점이 있었다. 그러나 나머지 32예에서는 신선조직에서처럼 RT-PCR이 가능한 정도의 RNA를 추출할 수 있었다.

미세전이를 검사하는 방법으로는 Cibull 등(24)이 제시한 것처럼 연속 절편을 만들고 추가적으로 이에 대한 면역조직화학 분석을 통하는 방법 그리고 이에 대한 RT-PCR 분석을 시행하는 방법이 있다. 연속절편과 면역조직화학 검사 두 가지 방법을 병행은 보고자에 따라 차이가 있지만 단순 음성군을 평균 11% 최고 33%의 양성군으로 변화된 연구들이(8) 많다. 본 연구도 연속 절편 H&E 염색 검사에서 음성군이 면역조직화학 검사를 함으로써 25 예 중 3예 (13.6%)의 발견율을 보였고 비감시 림프절 전이는 0%로서 Turner 등(7)이 면역조직화학 검사 음성군에서 비감시 림

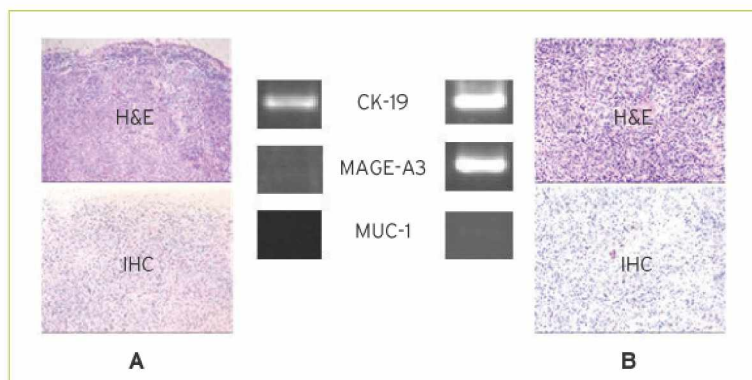


Fig 4. Examples of micrometastasis detected by different methods. A, example of micrometastasis detected by RT-PCR(CK-19) only. H&E and IHC showed negative staining. B, example of micrometastasis detected by both IHC and RT-PCR(CK-19 and MAGE-A3). H&E showed negative staining but isolated tumor cells were noted in IHC staining.

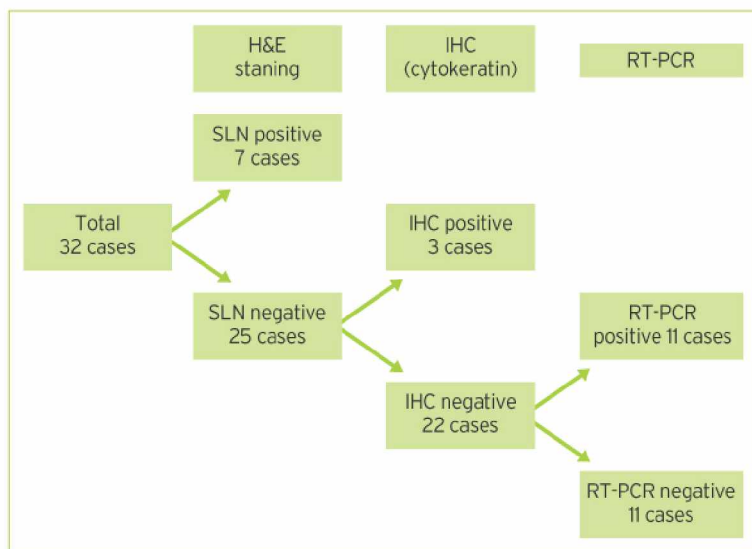


Fig 5. Micrometastases detected by means of H&E, IHC and RT-PCR.

프질 전이가 있을 확률을 01%로 보고한바와 같은 결과를 보였다. RT-PCR은 비교적 최근에 개발된 분자생물학적 방법으로 면역조직화학 검사보다 100배나 민감도가 높아 106-107개의 정상 세포에서 1개의 종양세포를 발견할 수 있다.⁽²⁵⁾ 따라서 유방암 환자에서 특히 2mm 이내의 미세 전이를 발견하는데 일반 병리나 면역조직화학 검사보다도 높은 민감도를 보일 수 있어 연구자들마다 차이가 있지만 보편적인 염색방법으로 전이가 없다고 여겨진 림프절에서 6-55%의 미세전이를 발견하게 되는데,⁽⁷⁾ 본 연구에서도 면역조직화학 검사 음성군에서 표지자에 따라 차이가 있지만 18.2%에서 40.9%의 추가 발견을 확인할 수 있었다.

유방암의 RT-PCR 표지자들 중 가장 보편적으로 응용 되는 것들에는 Cytokeratin 19, MUC-1 등이 있다. Cytokeratin 19는 상피세포와 종양에서 발현되는 ketain filament의 8, 18, 19 3가지 기본형 중 하나로서 Noguchi 등^(1, 25)의 보고에 따르면 정상조직에서는 발현되지 않고 MUC-1보다 10배 이상의 민감도를 보이며 유방암에서는 97% 이상의 특이도를 보이는 것으로 되어있지만 Bostick 등⁽²⁶⁾이나 Luppi 등⁽²⁷⁾의 연구에서는 오히려 위양성율이 30%에 이르고 pseudogene의 가능성을 보고하고 있다.

MUC-1은 비록 정상 발조 혈액에서도 발현되며 유선, 침샘, 소화기등에서도 발현되지만 Noguchi 등⁽¹⁾, Manzotti 등⁽²⁸⁾의 연구보고에 따르면 유방암의 림프절 전이 경우에는 100%에 이를 정도로 높은 특이성을 보이고 있다. 그러나 Hoon 등⁽²⁹⁾의 연구에 따르면 액와 림프절 전이가 없는 환자 8개의 검체에서 4개의 양성율을 보일 정도로 30-40%대의 낮은 특이도가 보고되었다.

새로운 RT-PCR 표지자로서 대두되고 있는 것 중에는 MAGE-A3가 있다. 이는 tumor associated antigen으로 Wascher 등⁽³⁰⁾의 보고에 따르면 혈액이나 비암성 종양세포에서는 발현되지 않고 종양세포에서, 그리고 주로 정상적인 유방 상피세포는 발현되지 않으나 유방암조직과 림프절에 전이된 유방암세포의 특이적인 표지자로 인식되고 있다. 이는 일반 H&E stain, IHC에서 음성인 감시 림프절에서도 38%정도로 높은 민감성을 보이고 있으며 특히 침윤성 소엽암 (infiltrating lobular carcinoma)에서 침윤성 관암 (infiltrating ductal carcinoma)보다 높게 검출되는 것으로 되어 있으며 감시 림프절의 미세전이를 평가하는데 있어 최근 가장 적합한 표지자로 인정받고 있다.

비록 RT-PCR은 유방암의 감시 림프절 미세전이 평가에 유용한 방법으로서 면역조직화학검사법이나 기존의 일반 H&E 염색에서는 발견되지 않은 미세전이를 찾을 수 있지만 각각의 민감도나 특이도 측면에서 문제점을 가지고 있다. 여러 연구보고들에 따르면 실험 도중 위유전자

(pseudogene)이나 검체의 오염 등 여러 요인들에 의해 위양성이 일어날 수도 있고 또 종양의 이질성 (heterogeneity)에 의해 위음성을 보일 수도 있다⁽³¹⁾. 본 연구에서도 면역조직화학염색검사서 양성인 3예 중 RT-PCR에서 양성으로 나온 경우는 33-66% 밖에 되지 않아 위음성의 경우가 많았다. 검체의 질적인 문제, 종양의 이질성 등이 원인일 수 있겠으나 대상 수가 너무 적어서 단정적으로 말하기는 어렵고 더 많은 검체를 대상으로 하는 실험이 필요하리라 생각된다. 이런 위양성, 위음성을 개선하기 위한 방법으로 다 표지자 검사와 함께 유방암의 미세전이 발견에 이상적인 mRNA marker의 발견이 요구되고 있다.⁽³²⁾ 그러나 특이도의 경우는 발현된 표지자나 표지자 개수에 따라서 차이가 있을 수 있다. Bostick 등⁽²⁶⁾의 연구보고에서는 3개의 표지자 중 1개가 특이성을 나타내는 경우가 94%였고 5개의 다표지를 사용한 Manzotti 등⁽²⁸⁾은 특이성 측면에서는 66.3%의 감소를 나타내었다고 보고하였다.

RT-PCR은 미세전이에 대해 높은 민감도를 가지고 있어 연속절편에 의한 H&E 염색이나 면역조직화학염색법에 비해 미세전이의 발견율이 높지만, RT-PCR에 의해 발견된 미세전이의 의의에 대해서는 아직 논란이 되고 있다. 본 연구에서는 파라핀 포매조직을 이용한 감시림프절의 RT-PCR의 가능성을 제시하였다. 파라핀 포매조직에서 양질의 RNA를 추출하기 위해서는 조직을 보관할 때 충분한 파라핀을 이용하여 조직이 완전히 싸이도록 하는 것이 중요하며 또한 실험자의 숙련도 또한 중요하다고 하겠다. 파라핀 포매조직에서의 RNA 추출방법이 개선되어 추출율이 올라가고 양질의 RNA 추출이 가능해지면 많은 환자를 대상으로 한 후향적 연구가 가능할 것이고 좋은 연구 결과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

결론

감시림프절의 파라핀 포매조직의 연속 절편 H&E 염색과 면역조직화학 염색, 그리고 RT-PCR을 이용한 미세전이 연구를 통하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 동결 절편에서 RNA kit를 이용한 분석은 46%의 검체 분석 실패가 있었지만 신선조직에서와 같이 면역조직화학 검사 그리고 RT-PCR 결과를 얻을 수 있었다.

2) 면역조직화학 검사 음성군에서 RT-PCR 표지자에 따라 차이가 있지만 18.2%에서 40.9%의 미세전이를 추가 발견을 확인할 수 있었다. 다표지자가 단일 표지자 보다 연속 절편 검사와 면역조직화학 검사 음성군에서 미세전이를 발견율을 높일 수 있었다.

3) RT-PCR에 의한 감시림프절의 미세전이 양성 의의에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

REFERENCES

- 1 Noguchi S, Aihara T, Motomura K, Inaji H, Imaoka S, Koyama H. Detection of breast cancer micrometastasis in axillary lymph nodes by means of RT-PCR: Comparison between MUC1 mRNA and keratin 19 mRNA amplification. *Am J Pathol* 1996;148:649-56.
- 2 Wilkinson EJ, Hause LL, Hoffman RG. Occult axillary lymph node metastases in invasive breast carcinoma: Characteristics of the primary tumor and significance of the metastases. *Pathol Annual* 1982;17:67-91.
- 3 Fisher ER, Sass R, Fisher B. Pathologic findings from the NSABP(protocol no.4).X. Discrimination from tenth year treatment failure. *Cancer* 1984;53:712-23.
- 4 Cox CE, Yeatman T. Significance of sentinel lymph node micrometastasis. From the comprehensive breast cancer program and GI tumor program at the H Lee Moffitt Cancer center & Research Institute at the university at south Florida. Tampa, Fla. November/December.1999.Vol 6. No 6.
- 5 Fitzgibbons, PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM et al. Prognostic factors in breast cancer. College of American pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124:966-78.
- 6 Carter BA, Jensen RA, Simpson JF, Page DL. Benign transport of breast epithelium into axillary lymph nodes after biopsy. *Am J Clin Pathol* 2000;113:259-65.
- 7 Turner RR, Ollila DW, Krasne DL, Giuliano AE. Histopathologic validation of sentinel lymph node hypothesis for breast carcinoma. *Ann Surg* 1997;226:271-8.
- 8 van Diest PJ, Hans Torrenge, Meijer S, Meijer CJ. Pathologic analysis of sentinel lymph nodes. *Semin Surg Oncol* 2001;20:238-45.
- 9 Noguchi S, Aihara T, Nakamori S, Motomura K, Inaji H, Imaoka S, et al. Detection of breast cancer micrometastasis in axillary lymph nodes by means of reverse transcriptase-polymerase chain reaction. 1994;74:1595-1600.
- 10 Ministry of Health and Welfare, Republic of Korea. Annual Report of the Central Cancer Registry in Korea(2002. 1.-2002. 12.), 2003.
- 11 Cutuli B, Velten M, Martin C. Assessment of axillary lymph node involvement in small breast cancer: analysis of 893 cases. *Clin Breast Cancer* 2001;29:59-65.
- 12 Fisher B, Slack N, Katcher D, Wolmark N. Ten year follow up results of patients with carcinoma of breast in a co-operative clinical trial evaluation surgical adjuvant chemotherapy. *Surg Gynecol Obst* 1975;140:528-32.
- 13 Giuliano AE, Jones RC, Brennan M, Statman R. Sentinel lymphadenectomy in breast cancer. *J Clin Oncol* 1997;15:2345-50.
- 14 Giuliano AE, Haigh PI, Brennan MB, Hansen NM, Kelley MC, Ye W, et al. Prospective observational study of sentinel lymphadenectomy without further axillary dissection in patients with sentinel node-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 2000;18:2553-9.
- 15 Lee H, Choi JW, Kim DY, Park BW, Lee IK, Song HJ, et al. Clinical Experience for sentinel lymphadenectomy alone in early breast cancer. *J Korean Breast Cancer Soc* 2003;6:263-70.
- 16 International(Ludwig) Breast Cancer Study Group. Prognostic importance of occult axillary lymph node micrometastases from breast cancer. *Lancet* 1990;335:1565-8.
- 17 Trojani M, de Mascarel I, Bonichon F, Coindre JM, Delsol G. Micrometastases to axillary lymph nodes from carcinoma of breast: detection by immunohistochemistry and prognostic significance. *Br J Cancer* 1987;55:303-6.
- 18 de Mascarel I, Bonichon F, Coindre JM, Trojani M. Prognostic significance of breast cancer axillary lymph node micrometastases assessed by two special techniques : reevaluation with longer follow up. *Br J Cancer* 1992;66:523-7.
- 19 Tsuchiya A, Sugano K, Kimijima I, Abe R. Immunohistochemical evaluation of lymph node micrometastases from breast cancer. *Acta Oncologica* 1996;35:425-9.
- 20 So HS, Koh SH. A retrospective study with Immunohistochemical Analysis of Axillary nodal Micrometastasis in breast cancer. *J Korean Breast Cancer Soc* 1999;2:240-50.
- 21 Stanta G, Schneider C. RNA extracted from Paraffin-Embedded Human Tissues is Amenable to analysis by PCR Amplification. *Biotechniques* 1991;11:304-8.
- 22 de Andres B, del Ozo V, Gallardo S, de Arruda-Chaves E, Cardaba B, Martin O, et al. Improved method for mRNA Extraction from Paraffin-Embedded Tissues. *Biotechniques* 1995;18:42-3.
- 23 Lehmann U, Kreipe H. Real-Time PCR Analysis of DNA and RNA extracted from Formalin-fixed and Paraffin-Embed Biopsies. USA, Elsevier Science 2001. p409-418.
- 24 Cibull ML. Handling sentinel lymph node biopsy specimens. A work in progress. *Arch Pathol Lab Med* 1999;123:620-1.
- 25 Noguchi S, Akihara T, Nakamori S, Motomura K, Inaji H, Imaoka S, et al. The detection of breast carcinoma micrometastases in axillary lymph nodes by means of RT-PCR *Cancer* 1994;74:1595-1600.
- 26 Bostick PJ, Huynh KT, Sarantou T, Turner RR, Qi K,

Giuliano AE, et al. Detection of metastases in sentinel Lymph nodes of breast cancer patients by multiple-marker RT-PCR. *Int J cancer* 1998;79:645-51.

27 Luppi M, Morselli M, Bandieri E, Federico M, Marasca R, Barozzi P, et al. Sensitive detection of circulating breast cancer cells by RT-PCR of mapsine gene. *Ann Oncol* 1996;7:619-24.

28 Manzotti M, Dell'Orto P, Maisonneuve P, Zurrida S, Mazzarol G, Viale G. RT-PCR assay for multiple mRNA markers in the detection of breast cancer metastases in sentinel Lymph nodes. *Int J Cancer* 2001;95:307-12.

29 Hoon D, Fukashi D, Giuliano AE. The detection of breast carcinoma micrometastases in axillary lymph nodes by means of RT-PCR. *Cancer* 1995;76:533-4.

30 Wascher RA, Bostick PJ, Huynh KT, Turner RR, Qi K, Giuliano AE. Detection of MAGE-A3 in breast cancer patients' sentinel lymph nodes. *Br J Cancer* 2001;85:1340-6.

31 Taback B, Chan AD, Kuo CT, Bostick PJ, Detection of occult metastatic breast cancer cells in blood by a multi-molecular marker assay: correlation with clinical stage of disease. *Cancer Res* 2001;15:8845-50.

32 Brandt B, Roetger A, Heidl S, Jackisch C, Lell RJ, Assmann G, et al. Isolation of blood-borne epithelium-derived c-erbB2 oncoprotein-positive clustered cells from the peripheral blood of breast cancer patients. *Int J Cncer* 1998;76:824-8.