

## 유방암 환자의 말초혈액에서 RT-PCR을 이용한 미세전이의 발견: MUC1, CK19, hMMG의 결과 비교

울산대학교 의과대학 외과학교실

강희준 · 홍성희 · 윤호성 · 안세현

### Detection of Micrometastasis in Peripheral Blood of Breast Cancer Patients Using RT-PCR Assay: Comparison of MUC1, CK19 and hMMG

Hee Joon Kang, M.D., Sung Hee Hong, M.D., Ho Sung Yoon, M.D. and Sei Hyun Ahn, M.D.

Department of Surgery, Ulsan University College of Medicine, Seoul, Korea

**Purpose:** Many of breast cancer patients develop distant recurrences after curative surgery. Therefore, tumor cell dissemination must have occurred at the time of disease presentation. We investigated the expression of candidate gene markers: MUC1, cytokeratin 19 (CK19) and mam-maglobin (hMMG) in peripheral blood of breast cancer patients to demonstrate prognostic significance of multiple marker RT-PCR assay for detection of micrometastasis in circulation

**Methods:** RT-PCR assay was used to analyze MUC1, CK19 and hMMG transcripts in peripheral venous blood samples of 47 patients with breast cancer and 14 patients with benign breast disease. Blood samples of 10 healthy volunteers served as negative controls.

**Results:** MUC1 was detectable in all blood samples of patients with breast cancer, benign breast disease and negative controls. CK19 was detectable in blood samples of 31 of 47 patients with breast cancer, 11 of 14 patients with benign breast disease and 10 of 10 negative controls tested positive. While hMMG was detectable in none blood samples with benign breast disease and negative controls, only 3 of 47 breast cancer patients could be detected hMMG expression.

**Conclusion:** MUC1, CK19 showed very low specificity and

hMMG showed low sensitivity as candidate marker for the detection of micrometastasis. The prognostic significance of RT-PCR assay using these markers could not be demonstrated. (*Journal of Korean Breast Cancer Society* 2002;5:298-304)

**Key Words:** Micrometastasis, MUC1, Cytokeratin 19, Mam-maglobin

**중심 단어:** 미세전이, MUC1, Cytokeratin 19, Mammaglobin

### 서론

유방암으로 진단을 받은 환자에 대하여 정확한 병기를 결정하는 것은 환자의 수술 후 적절한 치료방침을 결정하는데 매우 중요하다. 최근 10년간 유방암 환자에 대한 치료 방침은 주목할 만한 변화가 있었으며, 좀 더 많은 환자들이 보조 항암요법 치료를 받고 있다. 수술 후 보조치료를 하게 되는 기준으로서 종양의 크기, 액와림프절 전이 상태, 조직 등급 및 종양표지자 등의 예후인자가 쓰이고 있지만 유방암은 다양한 군으로 이루어져 있기 때문에 어떤 환자들이 조기에 재발을 하는 지에 대한 좀더 정확한 기준이 필요하다. 유방암은 각 개개의 세포에서 다단계의 유전적인 변이를 거치면서 발생하게 되며, 전이는 신생혈관 형성 등을 포함한 능동적인 다단계의 과정으로서 암세포의 주변 간질조직, 림프관, 혈관으로의 국소 침윤, 순환 혈류로의 침투 및 다른 장기로의 이동 등의 과정이 포함된다.(1) 종양의 크기가 작아도 암세포의 확산이 발견될 수 있고, 수술로 원발 종양을 제거한 후에도 림프계나 순환 혈류에 암세포가 잔존할 수 있어 보편적인 방법으로는 발견할 수 없는 이들 암세포가 유방암 재발의 원인이라고 생각한다.(2) 이러한 이유로 유방암 환자의 말초혈액에 존재하는 유방암 세포를 발견하는 것이 환자의 생존을 예측하는 중요한 예후인자로 부각되고 있으며 이에 따라 보조 치료의 방법을 선택하는 기준과 일차 치료 후 추적조사의 유용한 방법이 될 것으로 생각한다.(3,4) 그러나 혈액표본에 대한 직접적인 세포검사는 진단적 예민도가 매우 낮은

책임저자 : 안세현, 서울시 송파구 풍납 2동 388-1

☎ 138-736, 울산대학교 의과대학 외과학교실

Tel: 02-3010-3490, Fax: 02-474-9027

E-mail: ahnsh@amc.seoul.kr

접수일 : 2002년 11월 5일, 게재승인일 : 2002년 12월 15일

며 면역화학적 검사가 시행되기도 하지만 역시 진단적 예민도가 낮으며 경우에 따라서는 위양성의 결과를 얻기도 한다.

최근 암세포 특이 mRNA에 대한 역전사-중합효소연쇄 반응(RT-PCR)을 이용하여 여러가지 종류의 암 환자에서 말초혈액이나 골수에서 이러한 암세포를 발견해 내는 것이 진단적 예민도가 매우 높은 방법으로 연구되고 있으며, 목표가 되는 mRNA는 찾고자 하는 암종의 특징에 따라서 선택이 되어야 하며 정상적인 골수세포나 림프구 및 말초혈액세포에서는 발견이 되지 않아야 한다.(3) MUC1은 transmembrane 당단백의 한 종류이며 암세포에서 과 발현되는 것으로 알려져 있으며 MUC1에 대한 RT-PCR은 유방암에서 림프절 미세전이를 검색하는데 유용하다고 연구되고 있다. 중간 섬유단백질인 CK19는 림프조직이나 혈액세포에서는 정상적으로 발견되지 않는 상피세포의 표지자이며 이 유전자를 대상으로한 RT-PCR은 유방암환자의 림프절이나 골수에서 미세한 유방암세포를 발견하는데 유용한 방법으로 연구되고 있다.(5,6) Mammaglobin (hMMG) 유전자는 인간 유방암과 연관된 유용한 표지자를 검색하기 위한 목적으로 발견된 유전자이다. 이 유전자는 인간 염색체 11q13에 위치하였고, uteroglobin 유전자의 한 일원이며 1996년 Watson 등에 의해 cDNA의 전체 염기서열이 밝혀졌다. 비록 이 유전자에 의하여 만들어지는 단백질의 기능에 대해서는 아직까지 잘 알려져 있지 않지만, 여러 성인 유방조직에 대한 Northern-blot 분석과 이보다 좀더 예민한 RT-PCR을 통하여 관찰해 보면, hMMG 유전자의 발현은 유방 조직에서만 국한된다는 점과 비악성 유방조직에 비하여 유방암 세포주와 유방암 조직에서 과 발현된다는 사실이 알려져 있다.(7,8) hMMG mRNA는 종양의 조직등급이나 호르몬 수용체 유무와는 관련이 없다고 알려져 있으며, MUC1이나 CK19와는 달리 유방조직에 국한되어 발현되기 때문에 유방암 미세전이를 발견하는데 특이도가 높을 것으로 생각하며, 유방암의 림프절 미세전이에 대한 여러 연구에서 전이가 없는 림프절에서는 hMMG의 발현이 관찰되지 않지만 전이가 있는 림프절에서는 hMMG가 발현됨을 보고하고 있다.(9-11)

본 연구는 유방암환자의 말초혈액에서 이들 유전자에 대한 RT-PCR의 방법이 미세전이 세포를 발견하는데 유용한 지를 알아보고 또 이들 유전자 중 어떤 유전자가 좀더 높은 특이도와 예민도를 가지고 유용하게 미세전이를 검색할 수 있는지 알아보기 위하여 정상 자원자, 양성유방질환 환자, 유방암 환자에게서 얻어진 말초혈액에 대하여 RT-PCR을 시행하고, 유방암 환자에게서 얻어진 결과는 현재에 쓰이고 있는 예후인자와의 연관관계를 비교 분석하고자 하였다.

## 방 법

### 1) 대상 및 혈액재료

2001년 10월에서 2001년 12월까지 서울아산병원 유방클리닉에 온 환자 중 유방검진을 목적으로 찾아 왔으나 유방질환이 발견되지 않은 10명을 음성 대조군으로 선택하고, 양성유방질환 환자 14명, 유방암으로 진단 받은 수술 전 환자 47명을 대상으로 하였다. 양성유방종양 환자 14명 중 9명은 섬유선종, 3명은 양성유두종, 1명은 과오종, 1명은 양성엽상종이었으며, 이들은 혈액 채취 후 세침흡인

Table 1. Characteristics of breast cancer patients

Characteristics		Number	Percent
		(n=47)	
Age	≤35	5	10.6
	>35, ≤50	27	53.4
	<50	15	31.9
T	IS	1	2.2
	1	22	47.8
	2	18	39.1
	≥3	5	10.9
Lymph node	Unknown	1	
	Negative	28	59.6
	Positive	19	40.4
Stage	0	1	2.1
	I	18	38.3
	IIa	11	23.4
	IIb	11	23.4
	IIIa	0	0
	IIIb	1	2.1
	IV	5	10.6
	Unknown	8	
Histologic grade	I	1	2.6
	II	15	38.5
	III	23	59.0
	Unknown	8	
ER	Positive	23	54.8
	Negative	19	45.2
	Unknown	5	
PR	Positive	12	28.6
	Negative	30	71.4
	Unknown	5	
p53	Negative	22	55.0
	Positive	18	45.0
	Unknown	7	
c-erbB2	Negative	24	60.0
	Positive	16	40.0
	Unknown	7	

검사나 절제생검을 받고 진단 받았다. 47명의 유방암 환자들은 혈액 채취 전 유도 항암요법이나 호르몬 치료를 받지 않은 환자들로서 1명을 제외하면 혈액 채취 전 절개생검 또는 절제생검을 받지 않았다. 각각 뼈와 간에 전이가 확인된 2명은 수술을 받지 않았으며, 쇄골상부 림프절에 전이가 확인된 3명은 유방절제술 및 쇄골상부 림프절 광청술을 동시에 받았고, 나머지 환자들은 유방절제술 또는 유방보존술을 받았다. 유방암 환자들은 AJCC 분류상 0기 2명, I기 17명, IIA기 11명, IIB기 11명, IIIB기 1명, IV기 5명으로 분포하였다(Table 1). 유방암 환자의 경우 수술 전 CA15-3 수치와 수술을 한 후 최종 병리보고서에 따른 원발종양의 크기, 림프절 전이상태, 조직분화도, 호르몬 수용체 유무 및 종양표지자인 p53, c-erbB2에 대한 데이터를 구축하였다.

혈액채취는 채혈에 대한 동의를 얻은 뒤 시행하였는데, 특히 이번 연구에서는 혈액을 채취할 때 상피세포의 오염을 최소화하기 위하여 주사침으로 찌른 뒤 곧바로 채취되는 혈액을 이용하지 않고 임상검사에 필요한 모든 혈액(20 ml 이상)을 채취한 뒤 마지막으로 채취되는 혈액을 2 ml 선택하여 EDTA tube에 넣은 뒤 4°C 냉장고에 보관하였다.

## 2) RNA의 추출 및 RNA의 역전사

(1) RNA의 추출: RNA의 추출은 냉장고에 보관한 지 3 시간 이내에 시행하였으며, Qiaamp RNA Blood Mini kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 RNA를 추출하였다. EL buffer를 이용하여 적혈구를 용해시킨 다음 원심분리를 통하여 남아 있는 세포들을 침강시킨 후 여기에 RLT buffer를 넣어 다시 용해시키고 QIAshredder에 넣어 homogenize시킨다. 여기에 700µl의 70% ethanol을 넣어 QIAamp RNA mini spin column으로 옮긴다. 이 column을 RW1 buffer에 한 번, RPE buffer에 두 번 세척한다. 마지막으로 RNA를 30µl의 RNase-free water에 elution시킨다. Formaldehyde가 포함된 agarose gel상에서 전기영동하여 RNA가 잘 추출됐는지 확인하고, 분광흡광계로 RNA를 정량한다.

(2) RNA의 역전사(reverse transcription): 1µg의 total RNA를 포함하는 RNase free water aliquot에 1.0µM (2.0µl)의 oligo-dT primer를 첨가한다. 이 시료를 65°C에서 5분간 가열하여 primer와 RNA가 annealing되게 한 다음 냉각시킨다. 여기에 4 units (1.0µl)의 Omniscript reverse transcriptase (Qiagen, Germany), dNTP mix (5 mM each dNTP) 2.0µl, 10x buffer RT 2.0µl, 10 units RNase inhibitor (TaKaRa, Korea)를 혼합한 뒤 RNase free water를 넣어 전체 부피가 20µl가 되도록 한다. 이 혼합물을 37°C에서 60분간 반응시킨 다음 enzyme를 비활성화시키기 위하여 93°C에서 5분간 가열한 후 얼음에서 냉각시키고 -80°C 냉동고에 보관하였다.

## 3) 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction)

본 연구에서는 새로운 primer와 반응조건을 찾기보다는 고찰된 문헌들에서 자주 인용되었으며, 비교적 저명한 문헌에 인용된 방법을 채택하여 실험조건 자체의 오류를 피하고자 하였다. MUC1은 Noguchi 등(12)이 사용한 primer를 이용하여 PCR을 시행하였고, CK19는 Datta 등(13)이 사용한 primer를 이용하여 nested PCR을, hMMG는 Zach 등(14)이 사용한 primer를 이용하여 nested PCR을 시행하였고(Table 2), mRNA의 추출과 reverse transcription 반응의 타당성을 검증하기 위한 양성 대조군으로  $\beta$ -actin에 대한 PCR을 시행하였다. 각각의 PCR반응은 1.5µl의 template DNA, 0.5µM의 forward, reverse primer, 10µl의 Taq PCR Master Mix (Qiagen, Germany), H<sub>2</sub>O 6.5µl를 혼합하여 전체 부피가 20µl인 상태에서 반응시켰다.  $\beta$ -actin과 MUC1의 경우 94°C에서 3분간 반응시킨 뒤, 94°C : 30초; 60°C : 1분; 72°C : 2분의 과정을 35회 반복시키고 72°C에서 10분간 더 반응시켰다. CK19에 대한 nested PCR은 outer PCR의 경우 94°C에서 3분간 반응시킨 뒤, 94°C : 1분; 72°C : 2분 30초의 과정을 20회 반복시키고 72°C에서 7분간 더 반

Table 2. Primer sequences

Marker	Primer sequence	
	Forward	Reverse
$\beta$ -actin	ctctccagccttcctcct	agcactgtgttgccgtacag
MUC1	cgctcgtggacattgatgtacc	ggtacctcctctcacctctccaa
CK19		
Outer	aagctaaccatgcagaacctcaacgaccgc	tattggcaggtcaggagaagagcc
Inner	tccgcgactacagccactactacagacc	cgcgactgatgtccatgagccgctgtag
hMMG		
Outer	gaagttgctgatggtctcatgctggc	ctcaccataccctgcagttctgtgagc
Inner	ctccagcactgctacgcaggctc	cacctcaacattgctcagagtttcatccg

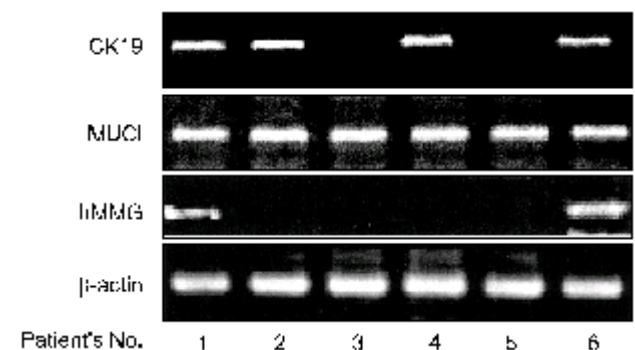


Fig. 1. Results of RT-PCR in peripheral blood of breast cancer patients.

응시했으며 inner PCR의 경우 94°C에서 3분간 반응시킨 뒤 94°C : 50초; 72°C : 2분의 과정을 26회 반응시키고 72°C에서 10분간 더 반응시켰다. hMMG에 대한 nested PCR은 outer PCR, inner PCR 모두 95°C에서 2분간 반응시킨 뒤, 95°C : 15초; 62°C : 15초; 72°C : 20초의 과정을 30회 반응시키고 72°C에서 7분간 더 반응시켰다. 얻어진 반응산물에 6x loading dye를 첨가하여 Ethidium Bromide가 첨가된 1.5% agarose gel에서 50 V로 전기영동한 뒤 자외선 램프하에서  $\beta$ -actin : 116 bp, MUC1 : 288 bp, CK19 : 745 bp, hMMG : 201 bp의 band가 확인되는 경우 양성발현으로 정하였다(Fig. 1).

#### 4) 통계처리

각 유전자의 발현유무와 T병기, 림프절 전이 여부, 원격전이 여부, 조직등급, ER, PR 발현 여부, p53, c-erbB2 발현 여부, CA15-3 수치와의 관련성을 Window용 SPSS (version 10.0) 통계 프로그램을 이용하여 Chi-square test를 실시하였고, P값이 0.05 이하일 때 통계학적으로 유의성이 있는 것으로 인정하였다.

### 결 과

#### 1) 종합효소연쇄반응 결과

(1)  **$\beta$ -actin**:  $\beta$ -actin은 음성대조군 100% (10/10), 양성유방종양 환자 100% (14/14), 유방암 환자 100% (47/47)의 혈액 모두에서 발현 양성으로 mRNA의 추출과 reverse transcription 반응에 오류가 없었음을 확인할 수 있었다(Table 3).

(2) **MUC1**: MUC1은 음성대조군 100% (10/10), 양성유방종양 환자 100% (14/14), 유방암 환자 100% (47/47)의 혈액 모두에서 발현 양성으로, 유방암에 대한 특이도가 없다고 판정되어 MUC1의 발현유무와 유방암 환자의 임상적 병리학적 특성을 비교 분석하는 것이 의미가 없었다(Table 3).

(3) **CK19**: CK19는 음성대조군 100% (10/10), 양성유방종양 환자 78.6% (11/14), 유방암 환자 66.0% (31/47)의 혈액에서 발현 양성으로, MUC1과 마찬가지로 유방암에 대한 특이도가 없다고 판정되었다(Table 3). Table에 나와 있

**Table 4.** Relationship between hMMG positivity and histopathological parameters

Parameter	Number of patients (n=47)	hMMG status		P-value
		Negative (%)	Positive (%)	
T				
≤2	46	39 (84.8)	2 (4.3)	1.0
≥3		5 (10.9)	0 (0)	
Unknown	1	0	1	
Lymph node				
Negative	47	28 (59.6)	0 (0)	0.06
Positive		16 (34.0)	3 (6.4)	
Distant metastasis				
Negative	47	40 (85.1)	2 (4.3)	0.29
Positive		4 (8.5)	1 (2.1)	
Histologic grade				
I	39	1 (2.6)	0 (0)	0.93
II		14 (35.9)	1 (2.6)	
III		22 (56.4)	1 (2.6)	
Unknown	8	7	1	
ER				
Positive	42	17 (40.5)	2 (4.8)	0.58
Negative		22 (52.4)	1 (2.4)	
Unknown	5	5	0	
PR				
Positive	42	27 (64.3)	3 (7.1)	0.54
Negative		12 (28.6)	0 (0)	
Unknown	5	5	0	
p53				
Positive	40	20 (50.0)	2 (5.0)	0.58
Negative		17 (42.5)	1 (2.5)	
Unknown	7	7	0	
c-erbB2				
Positive	40	23 (57.5)	1 (2.5)	0.35
Negative		14 (35.0)	2 (5.0)	
Unknown	7	7	0	
CA15-3				
≤30	45	40 (88.9)	1 (2.2)	0.17
>30		3 (6.7)	1 (2.2)	
Unknown	2	1	1	

**Table 3.** Results of RT-PCR

Marker	$\beta$ -actin	MUC1	CK19	hMMG
Subject				
Negative control	10/10 (100%)	10/10 (100%)	10/10 (100%)	0/10 (0%)
Benign disease	14/14 (100%)	14/14 (100%)	11/14 (78.6%)	0/14 (0%)
Breast cancer	47/47 (100%)	47/47 (100%)	31/47 (66.0%)	3/47 (6.4%)

지는 않지만 유방암 환자의 경우 T병기, 림프절 전이 유무, 원격전이 여부 및 ER, PR 발현 유무, p53, c-erbB2 발현 유무, 수술 전 CA15-3 수치에 따른 CK19 발현의 통계적 유의성을 찾을 수 없었다.

(4) hMMG: hMMG는 음성대조군 0% (0/10), 양성유방종양 환자 0% (0/14)에서 발현양성, 유방암 환자 6.4% (3/47)의 혈액에서 발현 양성으로 판정되어 MUC1, CK19와는 달리 위양성의 가능성을 배제할 수 있었다. hMMG의 발현과 원발종양의 임상적 조직학적 특성을 비교하였을 때, T병기에 따른 발현의 차이점을 발견할 수 없었고, ER, PR 발현유무 및 p53, c-erbB2 발현유무와의 관련성을 조사하였지만 이들 인자와의 연관관계는 관찰할 수 없었다. 림프절 전이가 있었던 경우 경계선적인 유의성으로 발현 양성이 높았고( $P=0.06$ ), 원격전이가 있었던 경우 및 CA15-3 수치가 정상치보다 높았을 때 hMMG 발현 양성인 경향이 있었으나( $P=0.29$ ,  $P=0.17$ ) 통계적인 유의성은 없었다(Table 3, Table 4).

## 고 찰

유방암 환자의 말초혈액이나 골수에서 유방암세포의 미세전이를 발견하는 연구가 점차적으로 주목을 받고 있으며, 임상적인 환자의 관리에서 환자의 병기에 관계없이 수술 전, 후로 유방암 세포의 미세전이 유무를 확인하는 일은 진단이나 수술 후 추적관리면 모두에서 중요한 요소가 될 것이다. 수년 전부터 RT-PCR법은 암환자의 미세잔여암을 진단하는데 매우 유용하면서도 감수성이 높은 방법으로 보고 되고 있어,<sup>(3)</sup> 본 연구자들은 MUC1, CK19, hMMG 3가지의 다른 표지자를 이용한 RT-PCR로 유방암 환자의 혈액에서 미세전이를 탐색하는데 유용한 방법이 무엇인지 알고자 하였다. 이 3가지 표지자들은 본 저자의 기존의 연구에서 유방암조직이나 유방암 세포주에서 추출된 RNA에서 양성 발현하는 것으로 확인되었으나,<sup>(5,11)</sup> RT-PCR법을 이용한 이들 표지자의 위 양성률은 많이 연구가 되어있지 않아, 비교적 많은 수의 양성유방질환 환자( $n=14$ ) 및 음성대조군인 정상자원자( $n=10$ )에서 추출한 혈액에서도 양성발현이 되는지를 관찰하여 이들 표지자의 특이도를 판단하고자 하였으며, 각각의 표지자의 발현양상을 관찰하여 현재에 쓰이고 있는 예후인자와의 연관관계를 비교 분석하고자 하였다.

본 연구의 결과에서 CK19는 양성유방종양 환자 78.6% (11/14) 및 음성대조군 100% (10/10)에서 양성 발현이 관찰되어 Datta 등<sup>(13)</sup>이 정상적인 환자의 혈액에서는 발현이 되지 않는다는 보고와는 상반된 결과였으며, Burchill 등<sup>(15)</sup>의 정상자원자 혈액에서도 상당 수 발현 양성(6/15)으로 관찰된다는 보고보다도 발현 양성이 높게 관찰되었다. CK19는 정상적인 상피조직에서도 발현이 되므로 본 연구

자들은 말초혈액 채취 시 상피세포 오염에 따른 위 양성을 피하기 위하여, 환자에게 진공을 이용한 혈액 채취 주사침을 꽂은 뒤 입원 전 혈액검사에 필요한 약 20 ml 이상의 모든 혈액을 순차적으로 채취한 뒤 실험에 필요한 혈액시료를 채취하였고, 입원 전 검사가 필요한 유방암 환자뿐만 아니라 양성유방질환 환자 및 정상자원자에게도 동일한 방법으로 혈액을 채취하여 피부상피 세포의 오염을 최소화하였다. 이러한 방법을 사용해도 일부에서는 상피세포의 오염을 피할 수 없다고 추측은 하나 기존의 CK19를 대상으로 한 연구보다 철저하게 하였다고 생각하며 본 연구의 높은 양성발현율은 상피세포의 오염이 원인이 되었다고 생각하지 않는다. Cytokeratin의 pseudogene은 CK19와 유사한 구조를 가지고 있어 이들 pseudogene의 증폭이 위 양성의 원인이라고 보고되고 있으나, 본 연구에 사용된 primer 및 PCR 기법은 기존의 연구<sup>(6,13)</sup>와 큰 차이가 없어 pseudogene의 발현이 본 연구의 높은 위 양성률을 설명한다고 생각하지 않는다. 그러나 비중액에 시료를 첨가하여 원심분리 기법을 이용한 기존의 백혈구 추출기법이 백혈구 중 단핵구와 림프구만을 추출할 수 있는 것에 비하여, 본 연구는 적혈구 용해기법으로, 적혈구 및 혈장성분을 먼저 추출한 뒤 남아있는 세포 pellete에서 백혈구를 추출하므로 단핵구와 림프구뿐만 아니라 과립구까지 RNA추출의 대상이 되었다. 본 연구 방법은 냉동의 과정을 거치지 않으며 혈액채취 후 3시간 이내에 RNA를 추출하여 이 세포들에서의 CK19의 비정상적인 과 발현(illegitimate expression)이 높은 위양성의 원인이 되었다고 생각한다.

MUC1은 유방암 환자, 양성유방질환 및 정상자원자의 혈액에서 전부 발현 양성으로 관찰되었다. Noguchi 등<sup>(12)</sup>은 림프절에서 유방암세포의 미세전이를 발견하는데 높은 특이도를 가지는 유용한 방법이라고 하였으나, Hoon 등<sup>(16)</sup>은 정상자원자 8명 중 7명의 혈액에서 MUC1의 양성발현을 보고하였고, Berois 등<sup>(17)</sup>은 20명의 정상자원자 혈액 중 12예에서 MUC1의 양성발현을 보고하였다. 또 Bostick 등<sup>(18)</sup>은 정상자원자 13명 중 6명의 혈액에서, 정상 림프절 조직 5예 중 5예 모두에서 발현 양성을 보고하여 본 연구와 비슷하거나 조금 낮은 정도의 위 양성률을 보고하였으며, 이러한 결과는 MUC1도 CK19와 마찬가지로 pseudogene이 존재할 것이라고 추측하였다. 본 연구의 결과는 MUC1은 말초혈액에서 유방암의 미세전이를 발견하는 대상 유전자로는 적합하지 않음을 시사하였으나 de Cremoux 등<sup>(19)</sup>은 MUC1의 위양성결과가 말초백혈구에서의 비정상적 과 발현이 원인이며 immuno magneticbeads를 이용하여 백혈구의 오염을 최소화 한 다음 시행한 MUC1 RT-PCR 결과가 위양성을 최소화할 수 있다고 보고하여 아직 이러한 결론을 내리기에는 다른 많은 연구에서 표준화된 방법으로 시행한 RT-PCR 결과가 필요할 것으로 생

각한다.

hMMG 유전자는 림프절과 말초혈액에서 유방암세포의 미세전이를 발견하는 특이도와 민감도가 높은 표지자의 유력한 후보자로서 주목받고 있다.(7-11,14) 특이도라는 측면에서는 hMMG의 발현은 양성유방질환자나 정상자원자의 혈액에서는 전혀 양성발현을 관찰하지 못하고 유방암 환자의 혈액에서만 양성발현을 관찰할 수 있었으나, 유방암 환자의 혈액 중 6.4% (3/47)에서만 발현양상을 관찰할 수 있었고, 유방암 환자 중 림프절 전이가 있었던 군에서 발현 양성률이 높은 것이 관찰되기는 하였으나( $P=0.06$ ), 다른 예후 인자에 따른 발현율의 차이는 관찰되지 않았다. Watson 등(8)은 원발유방암 조직에서는 hMMG mRNA가 23%에서 과 발현되나 전이된 유방암 조직에서는 62%에서 과 발현됨을 보고하여 유방암의 진행과정에서 이 유전자가 관여하는 것임을 시사하였다. Zach 등(14)은 유방암 환자의 말초혈액 중 25%에서 hMAM의 양성발현을 관찰하였다고 보고하였으나 원격전이된 유방암 환자가 실험대상군의 38%를 차지하고 있었다. 이와는 달리 본 연구는 11% (5/47)만이 원격전이가 확인된 환자였고 이 중 3명이 동측쇄골상부 림프절 전이된 환자였으며 타 장기로 전이가 확인된 환자는 2명에 불과하여 본 연구에서 양성발현이 낮은 이유 중의 하나로 생각한다. Zach 등(14)은 대상 환자에서 10 ml의 혈액시료를 채취하여 실험하였지만, 본 연구에서는 2 ml의 혈액시료만을 사용함으로써 미세전이된 암세포가 채취된 혈액에 포함되어 있을 가능성이 그만큼 낮기 때문에 양성발현이 낮은 또 다른 이유가 되지 않았나 생각한다.

말초혈액에서의 미세전이세포를 발견하기 위해서는 많은 양의 혈액을 대상으로 해야 하는데 이에 따른 문제점으로는 정상적인 조혈세포에서의 pseudogene 발현이나 비정상적인 과 발현(illegitimate expression)이 문제가 되므로 최근에는 immunomagnetic bead를 이용하여 미세전이세포를 가능한 한 농축시켜 면역조직화학염색을 하거나 RT-PCR을 시행하는 방법이 시도되고 있다.(20)

## 결 론

CK19, MUC1, hMMG RT-PCR을 이용한 유방암 환자의 말초혈액에서의 미세전이의 발견은 CK19, MUC1의 너무 낮은 특이도와 hMMG의 낮은 양성률에 의해 얻어진 결과이기 때문에, 현재에 쓰이고 있는 예후인자와의 연관관계를 비교 분석하는 것이 큰 의미가 없었으며, 이들 표지자를 이용한 RT-PCR이 말초혈액에서 미세전이를 발견하는데 유용한 방법이 되려면 본 연구자가 사용한 실험방법 이외의 다른 방법이나 개선책이 필요하다고 생각한다.

## REFERENCES

- 1) Frost P, Levin B. Clinical implications of metastatic process. *Lancet* 1992;339:1458-61.
- 2) Mori MK, Mimori K, Ueo H, Tsuji K, Shirashi T, Barnard GF, et al. Clinical significance of molecular detection of carcinoma cells in lymph nodes and peripheral blood by reverse transcription-polymerase chain reaction in patients with gastrointestinal or breast carcinomas. *J Clin Oncol* 1998;16:128-2.
- 3) Ghossein RA, Juan R. Polymerase chain reaction in the detection of micrometastases and circulating tumor cells. *Cancer* 1996;78:10-6.
- 4) Giesing M, Austrup F, Bockmann B, Driesel G, Eder C, Kusiak I, et al. Independent prognostication and therapy monitoring of breast cancer patients by DNA/RNA typing of minimal residual cancer cells. *J Bio Markers* 2000;15:94-9.
- 5) Lee RA, Kang HJ, Kim SW, Kang HS, Kim SS, Yun YK, et al. Detection of axillary lymph node micrometastases in breast cancer using RT-PCR Comparison the results of MUC1, Cytokeratin 19. *J Korean Surg Soc* 2001;59:29-35.
- 6) Lee MH, Suh WS, Cheon HJ, Jo KS, Shin EJ, Park KK, et al. Determination of sensitivity of RT-PCR for cyokeratin 19 and detection of micrometastasis from bone marrow of breast cancer patients. *J Korean Surg Soc* 2000;58:35-43.
- 7) Watson MA, Fleming TP. Mammaglobin, a mammary-specific member of the uteroglobin gene family, is overexpressed in human breast cancer. *Cancer Res* 1996;56:860-5.
- 8) Watson MA, Darrow C, Zimonjic DB, Popescu NC, Fleming TP. Structure and transcriptional regulation of the human mammaglobin gene, a breast cancer associated member of the uteroglobin gene family localized to Chromosome 11q13. *Oncogene* 1998;16:817-24.
- 9) Leygue E, Snell L, Dotzlaw H, Hole K, Troup S, Hiller-Hitchcock T, et al. Mammaglobin, a potential marker of breast cancer nodal metastasis. *J Pathol* 1999;189:28-33.
- 10) Watson MA, Dintzis S, Darrow CM, Voss LE, DiPersio J, Jensen R, et al. Mammaglobin expression in primary, metastatic, and occult breast cancer. *Cancer Res* 1999;59:3028-31.
- 11) Kang HJ, Kim SW, Lee RA, Yun YK, Oh SK, Choe KJ, et al. Detection of lymph node micrometastases in breast cancer by using mammaglobin mRNA RT-PCR. *J Korean Surg Soc* 2000;59:709-19.
- 12) Noguchi S, Aihara T, Nakamori S. The detection of breast carcinoma micrometastases in axillary lymph nodes by means of reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer* 1994;74:1595-600.
- 13) Datta YH, Adams PT, Drobysky WR, Ethier SP, Terry VH, Roth MS. Sensitive detection of occult breast cancer by the reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Oncol* 1994;12:475-82.
- 14) Zach O, Kasparu H, Krieger O, Hehenwarter W, Girschikofsky

- M, Lutz D. Detection of circulating mammary carcinoma cells in the peripheral blood of breast cancer patients via a nested reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for mammaglobin mRNA. *J Clin Oncol* 1999;17:2015-9.
- 15) Burchill A, Bradbury M, Pittman K, Southgate J, Smith B, Selby P. Detection of epithelial cancer cells in peripheral blood by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Br J Cancer* 1995;71:278-81.
- 16) Hoon D, Fukashi D, Giuliano A. The detection of breast carcinoma micrometastases in axillary lymph nodes by means of reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer* 1995;76:533-4.
- 17) Berois N, Varangot M, Aizen B, Estrugo R, Zarantonelli L, Fernandez P, et al. Molecular detection of cancer cells in bone marrow and peripheral blood of patients with operable breast cancer. Comparison of CK19, MUC1 and CEA using RT-PCR. *Eur J Cancer* 2000;36:717-23.
- 18) Bostick PJ, Chatterjee S, Chi DD, Huynh KT, Giuliano AE, Cote R, et al. Limitation of specific reverse-transcriptase polymerase chain reaction markers in the detection of metastases in the lymph nodes and blood of breast cancer patients. *J Clin Oncol* 1998;16:2632-40.
- 19) de Cremoux P, Extra JM, Denis MG, Pierga JY, Boursstyn E, Nos C, et al. Detection of MUC1-expressing mammary cells in the peripheral blood of breast cancer patients by real-time polymerase chain reaction. *Clin Cancer Res* 2000;6:3117-22.
- 20) Pantel K, Ott M. Occult micrometastasis: enrichment, identification and characterization of single disseminated tumor cells. *Semin Cancer Biol* 2001;11:327-37.