

유방암 환자에서 다중 표지자 RT-PCR을 이용한 미세전이의 발견

가톨릭대학교 의과대학 의정부성모병원 외과학교실

김정수 · 신종석 · 김기환 · 안창혁 · 박우찬 · 오세정 · 전해명 · 정상설 · 임근우

The Detection of Micrometastasis in RT-PCR Using Multiple Primers in Peripheral Blood and Bone Marrow of Breast Cancer Patients

Jeong Soo Kim, M.D., Jong Sok Shin, M.D., Kee Hwan Kim, M.D., Chang Hyeok Ahn, M.D., Woo Chan Park, M.D., Se Jung Oh, M.D., Hae Myung Jeon, M.D., Sang Seul Jung, M.D. and Keun Woo Lim, M.D.

Department of Surgery, Uijongbu St. Mary's Hospital, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Uijeongbu, Korea

Purpose: The detection of occult micrometastasis in breast cancer patients may allow the establishment of prognosis and development of new therapeutic approaches. This study was performed in order to improve on existing methods of detection by evaluating the potential of specific mRNA markers in reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) of peripheral blood and bone marrow taken from patients with breast cancer.

Methods: Peripheral blood and bone marrow samples were obtained from thirty-four breast cancer patients who undergone surgery in the Department of Surgery, Uijongbu St. Mary's Hospital between January 2000 and May 2001. In RT-PCR, we tried multiple primers on breast cancer cell lines and patient samples. Using MUC-1 and CK19 mRNA primers, we detected micrometastasis in breast cancer patients. Subsequently, we analysed the correlation with RT-PCR results and other prognostic factors.

Results: MUC-1 and CK19 were detected in all breast cancer cell lines. However, CEA was not detected in some cell lines. CK19 showed greater sensitivity than MUC-1 in RT-PCR. Using MUC-1 as primers, the detection rate was 47.1% and 35.3% in bone marrow and peripheral blood, respectively. Seven patients (20.5%) were positive in both sources. In the case of CK19, the detection rate was 50%

and 41.2% in bone marrow and peripheral blood, respectively. Twelve patients (35.2%), were noted as being positive for both primers. The concordance rate of both primers was 38.2% and 23.5% in bone marrow and peripheral blood, respectively. CK19 positivity in the peripheral blood was correlated with bone marrow positivity and MUC-1 positivity in both sources and inversely correlated with ER. CK19 positivity of bone marrow was correlated with MUC-1 positivity of bone marrow.

Conclusion: CK19 and MUC-1 may be good candidates for use in RT-PCR for the detection of micrometastasis of breast cancer. CK19 showed greater sensitivity. However, using both primers in RT-PCR, we may detect micrometastasis more sensitively and specifically and more wisely choose a treatment modality. (*Journal of Korean Breast Cancer Society* 2002;5:31-37)

Key Words: Micrometastasis, Cytokeratin 19, MUC-1, RT-PCR

중심 단어: 미세전이, 역전사-중합효소연쇄반응

서론

유방암은 조기에 진단되어 적절한 치료를 받으면 완치가 가능한 질환이지만 일단 유방암세포가 전이되어 유방 이외의 장기에 전이병소를 유발한 진행성 유방암에서는 5년 생존율이 20% 이하로 그 예후가 매우 불량하다.(1) 또한 수술 시 액와림프절에 전이가 없던 조기유방암에서도 5년이나 10년 후 30~50%의 재발률을 나타내고 있다.(2) 그러므로 유방암 환자의 생존율을 증가시키기 위하여는 전이를 억제하거나 이미 전이된 병소를 조기에 발견하고 치료하여야 한다. 이러한 노력으로 유방암 환자의 골수에서 면역화학염색법을 이용한 전이 세포를 발견한 연구를 시초로 하여 많은 연구가 이루어졌다.(3,4) 유방암 환자에서의 액와림프절이나 골수에서의 미세전이에 대한 임상적 중요성에 대하여는 아직 논란이 있으며 생존율 등 예후에 영향을 미치는 중요한 인자로서 그 인식이 증가되고 있다.(5-7) 미세전이를 진단하는 데는 통상적인 조직염색법 외에 연속절편이나 면역화학염색법이 사용되었으며(4)

책임저자 : 김정수, 경기도 의정부시 금오동 65-1

☎ 480-130, 가톨릭대학교 의정부성모병원 외과

Tel: 031-820-3048, Fax: 031-847-2717

E-mail: cumc2020@kornet.net

접수일 : 2001년 11월 15일, 게재승인일 : 2001년 11월 29일

이러한 기존 방법보다 더 민감한 진단법으로서 최근에는 골수나 말초혈액에서 RT-PCR법을 이용하여 더욱 민감하게 진단할 수 있게 되었다.(8,9) 유방암의 미세전이를 민감하게 진단하기 위한 RT-PCR법에 사용되는 표지자로는 CEA,(9,10) MUC-1, cytokeratin (CK)-19(2,4,11-14) 등이 있었다. RT-PCR법의 단점인 위양성은 증폭조건의 차이, primer의 선택, pseudogene의 존재, 증폭 유전자의 감염 등이 그 원인이 된다.(15) 본 연구는 인체 유방암세포주와 유방암 환자의 골수와 말초혈액에서 가장 흔히 사용되는 MUC-1과 CK19의 두 가지 표지자를 사용하여 RT-PCR을 시행하여 유방암세포를 발견하는 데 있어 각 표지자의 민감도를 알아보고 혈액채취장소에 따른 결과를 비교하여 유용한 표지자를 찾아내고 대상 환자의 임상적 자료와 함께 비교 분석하였다.

방 법

1) 대상환자

2000년 1월부터 2001년 5월까지 유방암으로 진단되어 수술받은 환자 중 원격전이가 있거나 염증성유방암으로 수술 전 항암요법을 시행하였던 경우를 제외하고 일차적 수술을 하였던 34명의 여성 환자를 대상으로 하였다. 이들의 평균연령은 48.7세(29~80세)였으며 TNM 조직학적 병기로 분류한 바 제I기는 12명(35.3%), IIa와 IIb를 포함한 제II기는 14명(41.2%), IIIa와 IIIb를 포함한 제III기는 8명(23.5%)이었다. 연령별로 보면 20~30세까지가 2명(5.9%), 31~40세까지가 7명(20.6%), 41~50세까지가 12명(35.3%), 51~60세까지가 5명(14.7%), 61세 이상이 8명(23.5%)이었다.

2) 방법

(1) 유방암 세포주: 표지자의 각 유방암 세포주에서의 발현과 각 표지자의 감수성을 알아보기 위하여 MDA-MB-231, MDA-MB-435, MDA-MB-453, MCF-7, SK-BR-3, T47D의 세포주에 대하여 각 표지자를 사용하여 RT-PCR을 시행하였다.

(2) 골수 및 혈액: 유방수술 직후 전신마취하에서 Silverman needle을 사용하여 후장골능에서 흡인하였다. 침이 피부를 통과하는 과정에서 상피세포오염을 피하기 위해 수술 칼로 작은 피부절개를 가한 후 침을 진입시켰다. 약 10 mL의 골수와 혈액을 항응고제가 첨가된 tube로 옮겨 잘 섞어 주었다.

(3) 단핵구 분리: 환자의 골수와 혈액은 동량의 PBS로 희석하여 비중액 ficoll에 중첩시켜 400 g에서 30분간 원심 분리하였다. 비중액과 혈청 사이의 경계면에 형성된 세포층을 채취하여 PBS로 2회 세척하고 원심분리하여 세포를 침전시켜 RNA 추출에 사용하였다.

(4) RNA의 추출: 분리한 단핵구에 TRIzol reagent (Gibco

BRL Co)를 첨가하여 상온에서 5분간 방치하고 Chloroform을 넣어 15초간 섞어주고 12,000 g에서 15분간 원심 분리하였다. 상층액을 새로운 tube에 옮겨 담고 Isopropyl alcohol을 넣어 RNA를 침전시킨 후, 75% 에탄올로 wash 하였다. RNA 침전물은 DEPC 용액을 넣어 녹이고 -70°C에 보관하였다.

(5) cDNA 합성: 추출한 RNA 1 ug을 사용하여 20 ul 용량으로 역전사를 시행하였다. RNA 1 ug, RNase inhibitor, oligo-(dT) 15 primer, 2.5 mM dNTP, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, reverse transcriptase를 넣어 25°C에서 15분, 42°C에서 60분, 99°C에서 5분간을 각각 반응시켜 cDNA를 합성하였다.

(6) PCR: 전체 혼합물 20 ul에 각각 2 ul의 cDNA, 20 pmol primer, dNTP 0.2 mM, 10 mM Tris-HCl, 2 mM MgCl₂, Taq polymerase 1 unit을 포함하여 혼합하였고, 95°C에서 1분간 변성시킨 후 증폭하였다. PCR cycle 조건은 94°C에서 1분간 변성시키고, 60°C에서 30초간 annealing한 다음, 72°C에서 1분간 extension을 시행하였으며, 35 cycles 증폭한 후 마지막 cycle은 72°C에서 10분간 반응시켰다. Primer는 (주)바이오니아에서 다음과 같이 합성하여 사용하였다.

Cytokeratin 19	5-AGGTGGATTCCGCTCCGGGCA-3 5-ATCTTCCTGTCCCTCGAGCA-3
MUC-1	5-CTCTGGCTGCCCCCTTATTGGA-3 5-GGTACCTCCTCTCACCTCCTCCAA-3
GAPDH	5-GCTATGAGCCCTTCCACGATGC-3 5-GAATCTACTGGCGTCTTCACC-3

(7) PCR 생성물의 확인: 증폭된 산물은 1% agarose, ethidium bromide 혼합 gel에서 전기영동하여 분리하였으며 100 bp DNA ladder를 size marker로 사용하였다.

(8) ER, PR에 대한 면역화학염색: 환자의 포르말린포매 조직을 사용하여 중성 포르말린 용액에 고정하여 파라핀에 포매하고 4μm 두께로 잘라 probe on plus 슬라이드에 부착시켰다. Xylene으로 3분간 3회 담구어 파라핀을 제거한 후, 100%, 85%, 70%, 50% 알코올에 3분씩 처리 후 증류수에 넣어 함수화하였다. 10 mM Citrate 용액에 넣어 121°C에서 10분간 가압멸균한 후 조직 표본 위에 Peroxidase-Blocking solution을 떨어뜨려 10분간 두어 내인성 peroxidase를 저지시키고, TBS 용액으로 씻어 non-immune serum과 실온에서 10분간 반응시킨 후, 1 : 50으로 희석한 Anti-Estrogen receptor (Zymed, San Francisco, CA), Anti-Progesteron receptor (Zymed, San Francisco, CA)와 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. TBS용액으로 씻은 후 2차 항체인 biotinylated polyvalent antibody (Histostain-Plus, Zymed, San Francisco, CA)를 실온에서 10분간 반응시켜 TBS 용액으로 씻고 streptavidine peroxidase와 10분간 반응시켰다. TBS 용액으로 씻

고 발색시약인 DAB로 5분간 반응시킨 후 물로 세척하였다. Hematoxylin으로 15초간 대조염색하고 알코올과 Xylene으로 탈수시켜 canada balsam으로 봉입하여 현미경으로 검경하였다. 각 환자의 조직상 유전자의 반응을 그 염색 정도와 범위를 기준으로 하여 -, +로 나누어 2명의 의사가 관독하여 분류하였다.

결 과

1) 유방암 세포주에서의 RT-PCR

MUC-1과 CK19 종양표지자를 이용한 RT-PCR에서 양성 발현을 나타냈으나 CEA의 경우에서는 3개의 세포주에서 음성을 나타내었다(Fig. 1). 또한 각 표지자에 대한 감수성을 비교하여 보면 CK 19가 MUC-1보다 더 높은 감수성을 나타냈다(Fig. 2).

2) 표지자의 병기별 양성률

MUC-1 사용 시 전체적으로 골수에서는 16명(47.1%), 말초혈액에서 12명(35.3%)이 양성을 나타냈으며 병기별로 보면 1기 환자 중 골수에서는 12명 중 5명(41.7%)에서 양성을 보였고 말초혈액에서는 3예(25%)가 양성을 나타냈다. 2기에서는 골수에서는 14명 중 7예(50%)를 보였고 말초혈액에서는 7예(50%)를 보였다. 3기에서는 8명 중 골수

에서는 4명(50%)에서 말초혈액에서는 2명(25%)에서 양성을 보였다. 골수와 말초혈액과의 양성일치율은 2기에서 5명(41.7%), 3기에서 2명(25%)을 나타냈다. CK19 사용 시에는 전체 환자에서 골수에서는 17명(50%), 말초혈액에서 14명(41.2%)에서 양성을 보였고, 병기별로는 1기에서는 골수에서 6명(50%), 말초혈액에서 6명(50%)을 보였고 2기에서는 골수에서 8명(57.1%), 말초혈액에서 5명(35.7%)을 보였다. 3기에서는 골수에서 3명(37.5%), 말초혈액에서 3명(37.5%)을 보였다. 골수와 말초혈액에서의 양성일치율은 1기에서 5명(41.7%), 2기에서 5명(35.7%), 3기에서 2명(25%)을 나타냈다.

두 표지자 간의 양성일치율은 1기에서는 골수에서 4명(33.3%), 말초혈액에서 2명(16.7%)을 보였고 2기에서는 골수에서 6명(42.9%), 말초혈액에서 4명(28.6%), 3기에서는 골수에서 3명(37.5%), 말초혈액에서 2명(25%)을 보였다(Table 1).

3) ER의 양성

ER의 양성률은 24명(70.6%)에서 나타났으며 병기별로 보면 1기에서 8명(66.7%), 2기에서 11명(78.6%), 3기에서 5명(62.5%)를 보였고 PR은 22명(64.7%)에서 양성을 보였으며 1기에서 5명(41.7%), 2기에서 12명(85.7%), 3기에서 5명(62.5%)을 나타냈다.

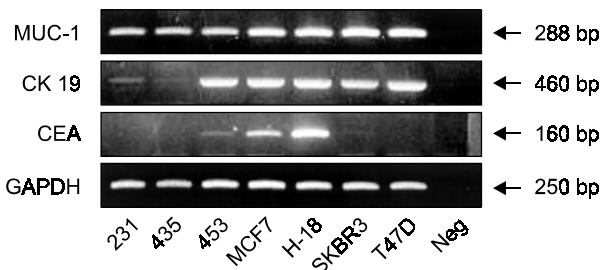


Fig. 1. RT-PCR using multiple primers in breast cancer cell lines.

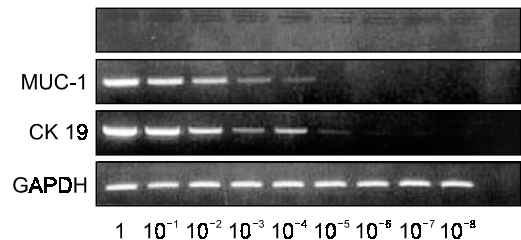


Fig. 2. Sensitivity test using MUC-1 and CK19 primer in MCF-7 breast cancer cell line.

Table 1. The positive result of RT-PCR using multiple primers

Stage	MUC-1			CK 19			Both	
	BM	PB	Both	BM	PB	Both	BM	PB
I	5/12 (41.7%)	3/12 (25%)	0/12 (0%)	6/12 (50%)	6/12 (50%)	5/12 (41.7%)	4/12 (33.3%)	2/12 (16.7%)
II	7/14 (50%)	7/14 (50%)	5/14 (41.7%)	8/14 (57.1%)	5/14 (35.7%)	5/14 (35.7%)	6/14 (42.9%)	4/14 (28.6%)
III	4/8 (50%)	2/8 (25%)	2/8 (25%)	3/8 (37.5%)	3/8 (37.5%)	2/8 (25%)	3/8 (37.5%)	2/8 (25%)
Total (n=34)	16/34 (47.1%)	12/34 (35.3%)	7/34 (20.5%)	17/34 (50%)	14/34 (41.2%)	12/34 (35.2%)	13/34 (38.2%)	8/34 (23.5%)

BM = bone marrow; PB = peripheral blood.

Table 2. The correlations between MUC-1, CK19 and other factors (Spearman's correlation analysis)

	Age	PB MUC1	BM MUC1	PB CK19	BM CK19	ER	PR	Stage
Age	·	.778	.624	.851	.787	.941	.944	.712
PB MUC1	.778	·	.346	.026	1.00	.260	.579	.792
BM MUC1	.624	.346	·	.016	.000	.608	.096	.691
PB CK19	.851	.026	.016	·	.000	.027	.142	.533
BM CK19	.787	1.00	.000	.000	·	.467	.160	.692
ER	.941	.260	.608	.027	.467	·	.260	.968
PR	.944	.579	.096	.142	.160	.260	·	.194
Stage	.712	.792	.691	.533	.692	.968	.194	·

BM = bone marrow; PB = peripheral blood; ER = estrogen receptor; PR = progesterone receptor.

4) 각 인자와의 상관관계

MUC-1, CK19에서의 양성환자군과 각 환자의 연령, 병기, ER, PR, 채취장소와의 상관관계를 보면 CK19와 ER 간의 유의한 역상관관계를 보여($P=0.027$) ER 음성군에서 미세전이가 많이 나타났고 골수에서의 CK19 양성발현은 골수에서의 MUC-1 양성발현과 상관관계를 보였으며($P=0.00$) 말초혈액에서의 CK19 양성발현은 골수에서의 CK19 ($P=0.00$), MUC-1의 골수($P=0.016$), 말초혈액($P=0.026$)에서의 양성발현과 모두 유의한 상관관계를 보였다(Table 1). 따라서 말초혈액에서의 CK19의 측정이 유용한 것으로 보이며 MUC-1의 골수와 말초혈액에서의 양성발현은 서로 유의한 상관관계를 보이지 않아서($P=0.35$) CK19이 MUC-1보다 더 효과적인 것으로 보인다. 그러나 각 표지자에서의 양성발현은 연령이나 병기에 따른 차이를 보이지 않았다(Table 2).

고 찰

유방암의 조기 진단과 수술적 치료의 발달에도 불구하고 유방암의 사망률은 지난 10여년간 크게 감소되지 않은 실정이다. 또한 일차적 수술 시 90% 이상의 환자가 원격전이가 나타나지 않으나 수술 후 5년이 경과되면 환자의 약 50%에서 재발이 된다고 한다.(2,5) 이러한 원인은 암의 생성 초기에도 암세포가 이미 미세전이를 야기하여 수술 시 골수에 미세전이가 국소성 유방암의 경우 20~45%가 이미 나타나고(2-4) 조기 유방암이라고 하더라도 이러한 유방암세포의 미세전이가 재발 및 생존율에 영향을 미치는 것으로 생각되어(5-7) 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 유방암의 미세전이는 현재로서는 기존의 병기에서는 아직 분류가 되고 있지 않아서 이를 추가하여 더욱 세밀한 분류를 하자는 보고도 있다.(16) 미세전이에 대한 임상적 의의에 관하여는 많은 연구가 이루어졌으며 Mansi 등(6)은 350명의 유방암 환자에서 12.5년의 추적조사에서

골수에 미세전이가 없었던 환자군에서의 10년 무재발 생존율과 전체생존율이 각각 65.7%, 62.7%로써 미세전이가 있었던 환자군에서의 44.9%, 43.9%보다 월등히 양호하다고 하였다. Cote 등(17)은 골수에서의 종양세포의 수가 조기 재발에 유의한 조건이라고 하였다. 그러나 이들과 달리 미세전이가 임상적으로 생존율이나 재발률과 연관이 없다는 연구도 있어 Funke와 Schraut(7)은 20개의 연구들을 분석하여 이 중 14개가 미세전이와 무병기간과의 연관이 있다고 하였으나 전체 생존율과의 연관성에 관한 연구로서 다중변수 분석(multivariate analysis)에서는 오직 12개 연구 중 2개만이 미세전이가 독립인자로서 의미있는 것으로 보고하여 미세전이의 임상적 의의에 대하여는 아직 논란의 여지가 있는 상태이다.

이러한 미세전이를 발견하기 위한 방법에는 연속절편 검사, 면역화학염색법, RT-PCR 등의 여러 가지 방법이 연구되고 있으며 면역화학염색법과 RT-PCR법이 결과에 있어 높은 일치율을 보인다고 하였으나 Racila 등(18)은 면역화학염색법의 단점으로 종양세포의 정량분석을 할 수 없고 종양세포의 수가 적을 경우 이를 발견하기 위한 시간과 노력이 많이 요구된다고 하였으며, Vannuchi 등(19)은 RT-PCR에서 음성인 경우에도 면역화학염색법에서 종양세포를 발견하였던 경우를 보고하고 두 가지 방법의 병행을 추천하였다. RT-PCR법은 백만 개의 정상세포 중 1개의 종양세포가 있어도 이를 발견할 수 있는 매우 민감한 방법으로 Lockett 등이 이미 보고한 바 있으며,(19) Diamandis 등(20)은 말초혈액 중에 1,000개의 종양세포만 있어도 RT-PCR로서 이를 발견할 수 있다고 하였다. 본 연구에서도 표지자(primer)에 따라 차이는 있으나 1/10 -4~-6 정도의 높은 민감도를 나타냈다. 민감도에 있어서 다른 여러 전통적인 항체를 이용한 진단방법과의 비교실험에서도 RT-PCR은 Western blot 분석이나 ELISA 방법보다 더욱 민감한 방법이라고 보고되었다(15). 이러한 RT-PCR법에도 문제점이 몇 가지가 있어서 환자의 선택요건, 표본의 채취

방법 및 보관과 운반의 조건, PCR 시 증폭 조건의 차이, 표지자의 차이, Pseudogene의 존재가 중요하며 이 중 증폭된 DNA의 오염에 의한 위양성이 문제가 될 수 있다. 또한 유방암세포의 유전학적 불안정성에 의하여 표지자의 표현도가 감소될 수 있어 민감도를 감소시킬 수 있다고 한다.(15) RT-PCR을 시행하는 혈액을 채취하는 장소에 있어 말초혈액과 골수에서 모두 가능한데(10,18) 골수는 림프절과 같이 정상이나 종양의 상피세포가 없는 상태이므로 RT-PCR에 대한 재료를 채취하는 데 좋은 장소이다. 그러나 Datta 등(21)은 유방암 환자에서 골수와 말초혈액에서 RT-PCR을 이용하여 좋은 성적을 보였다고 하였으며, Schoenfeld 등(22)은 환자의 말초혈액과 골수에서의 cytokeratin 19을 이용한 미세전이를 진단하는 데 있어 말초혈액보다는 골수에서 더 발견율이 높았으며 면역화학염색법보다 RT-PCR법에서 말초혈액과 골수에서의 양성 일치율이 더 우수하게 나타났다고 하였다. 저자들의 연구에서도 골수에서 말초혈액보다 민감도가 더욱 높게 나타났다.

RT-PCR법에서 종양의 종류에 따라 사용되는 표지자가 결과에 중대한 영향을 미치는 인자로서 이에 대한 선택이 중요하며 이상적인 표지자로서는 정상세포나 양성종양에서 나타나지 않고 유방암세포에서만 나타나는 표지자를 선택하여야 신뢰성 있는 결과를 기대할 수 있다. 유방암의 미세전이를 발견하는 데 사용되는 표지자로서는 여러 가지가 있으며 이 중 CEA, MUC-1, cytokeratin, mammoglobin 등이 보고되었으나 아직 확실한 결과를 나타내었던 표지자가 정립되지는 않았다.

CEA는 대장암에서 주로 발현이 나타나고 다른 위암, 췌장암, 유방암에서도 40~70% 정도의 발현을 나타내는 것으로 알려져 있으며 소화기암이나 유방암의 림프절이나 혈액 및 골수에서 RT-PCR에 유용한 표지자로서 보고되었다. 액와부 림프절의 미세전이 발견율이 면역화학염색법의 26%에서 RT-PCR을 이용하여 66%로 증가시켜 우수한 결과를 보였다고 하였으나(9,10) Mori 등(10)은 전이암에서 24%의 위음성을 보고하였고 Min 등(23)은 유방암 세포주에서 7가지 중 5가지에서만 양성을 나타내어 민감도가 감소되었다고 하였다.

MUC 유전자군은 9가지로 구성되어 있으며 이 중 MUC-1 mucin은 300~450 Kd의 당단백으로서 유선, 침샘, 소화기, 호흡기 등의 정상 상피세포에서 발견되며 세포의 유착에 관계되는 것으로 유방암에서 주위 조직보다 10배 이상 높은 발현을 보여 유방암의 좋은 표지자로서 알려졌으며 임상적 경과와 발현도가 비례한다고 하였다.(24) 또한 조직학적으로 음성인 림프절에서 미세전이 발견율이 15%에 달하여 RT-PCR의 표지자로서 유용하다고 하였다. 그러나 Brugger 등(25)은 이러한 MUC-1 발현도 2~10%의 정상적인 골수의 단핵구세포에서 발현이 되기도 하며 Hoon 등(26)도 정상적인 혈액이나 림프절에서 위양성을 나타낼

수 있다고 하였다.

Keratin filament는 상피세포와 종양에서 발현되는 것으로서 이에 대한 cytokeratin은 8, 18, 19의 세 가지 기본형이 있다고 하며 cytokeratin 8, 18은 위양성이 많은 것으로 알려져 있고 cytokeratin 19, 20은 RT-PCR에 많이 사용되었다. Bostick 등(27)은 CEA, cytokeratin 19, MUC-1보다 cytokeratin 20이 혈액과 림프절에서 미세전이를 발견하는데 우수한 성적을 보였다고 하였다. 그러나 cytokeratin 19은 유방암에서 97% 이상의 특이도를 나타내고 혈액 내에서도 골수에서 10^5 내지 10^7 단핵구에서 1개의 암세포를 발견하는 우수한 민감도를 나타내는 표지자로서 여러 연구에서 사용되었다.(11-14) Noguchi 등(11)은 MUC1과 keratin 19 mRNA를 사용한 결과 정상 조직에서는 전혀 발현이 되지 않는데 비하여 유방암에서는 모두 발현되어 적당한 표지자라고 하였고 cytokeratin 19 mRNA를 이용한 RT-PCR의 감수성이 MUC-1 RT-PCR에서보다 10배 정도가 높았다고 하였으며 본 연구에서도 10~100배 정도 높은 감수성을 나타냈다. 그러나 cytokeratin 19에 대하여 Luppi 등(28)은 많게는 30%까지 위양성을 보고하였고, pseudogene에 대한 보고도 있다.(14)

이러한 표지자들은 각각에 다소간의 문제점이 있다고 보여지며 이러한 문제점을 보완하기 위하여 Bostick 등(27)은 종양의 이소성과 mRNA의 다양성을 고려하여 다중 표지자를 사용하는 것이 민감도를 증대할 수 있다고 하였다. Verbanac 등(29)과 Ooka 등(30)도 그 종류는 다르나 표지자들을 병합 사용함으로써 진단을 더욱 정확하게 하였다고 보고하였다. 저자들도 사용된 다중 표지자 중에서 MUC-1과 cytokeratin 19을 병합 사용하는 것이 더 발견율을 향상시켜 유방암 미세전이의 조기진단에 도움을 줄 수 있을 것으로 생각된다.

결 론

RT-PCR은 미세전이를 조기에 진단할 수 있는 방법이나 그 표지자의 종류에 따라 결과가 달리 나타날 수 있어 표지자의 선택이 중요하다. 본 연구의 결과 CK19와 MUC-1을 병합하여 사용하고 말초혈액에서보다 골수에서 검사하는 것이 더욱 민감하게 진단할 수 있을 것으로 생각한다. 또한 한 표지자만 선택할 경우에는 CK19이 더 유용한 것으로 생각한다. 이러한 RT-PCR은 조기에 미세전이를 진단함으로써 유방암의 치료방침에 있어 한 지표가 될 수 있을 것으로 생각하며 향후 더욱 많은 환자에서의 검사 및 추적조사를 하여야 할 것으로 생각한다.

REFERENCES

- 1) Welch DR, Steeg P, Rinker-Schaeffer CW. Molecular biology

- of breast cancer metastasis; genetic regulation of human breast carcinoma metastasis. *Br Cancer Res* 2000;2:408-16.
- 2) Hellman S. Natural history of small breast cancers. *J Clin Oncol* 1994;12:2229-34.
 - 3) Dearnaley D, Sloane J, Ormerod M, Steele K, Coombes R, Clink H, et al. Increased detection of mammary carcinoma cells in marrow smears using antisera to epithelial membrane antigen. *Br J Cancer* 1983;44:85-90.
 - 4) Redding WH, Commbes RC, Monaghan P, Clink HM, Imrie SF, Dearnaley DP, et al. Detection of micrometastases in patients with primary breast cancer. *Lancet* 1983;2:1271-4.
 - 5) Diel IJ, Kaufmann M, Goerner R, Costa SD, Kaul S, Bastert G. Detection of tumor cells in bone marrow of patients with primary breast cancer: A prognostic factor for distant metastasis. *J Clin Oncol* 1992;10:1534-9.
 - 6) Mansi JL, Gogas H, Bliss JM, Gazet J-C, Berger U, Coombes RC. Outcome of primary breast cancer patients with micrometastases: a long term follow up study. *Lancet* 1999;354:197-202.
 - 7) Funke I, Schraut W. Meta-analyses of studies on bone marrow micrometastases: An independent prognostic impact remains to be substantiated. *J Clin Oncol* 1998;16:557-66.
 - 8) Smith B, Selby P, Southgate J, Pittman K, Bradley C, Blair GE. Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *Lancet* 1991;338:1227-9.
 - 9) Gerhard M, Hartmut J, Kalthoff H, Schreiber HW, Wagener C, Neumaier M. Specific detection of carcinoembryonic antigen expressing tumor cells in bone marrow aspirates by polymerase chain reaction. *J Clin Oncol* 1994;12:725-9.
 - 10) Mori M, Mimori K, Ueo H, Karimine N, Barnard GF, Sugimachi K, et al. Molecular detection of circulating solid carcinoma cells in the peripheral blood: the concept of early systemic disease. *Int J Cancer* 1996;68:739-43.
 - 11) Noguchi S, Aihara T, Motomura K, Inaji H, Imaoka S, Koyama H. Detection of breast cancer micrometastases in axillary lymph nodes by means of reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Am J Path* 1996;148:649-56.
 - 12) Brown DC, Purushotham AD, Birnie GD, George WD. Detection of intraoperative tumor cell dissemination in patients with breast cancer by use of reverse transcription and polymerase chain reaction. *Surgery* 1995;117:96-101.
 - 13) Noguchi S, Aihara T, Motomura K, Inaji H, Imaoka S, Koyama H. Histologic characteristics of breast cancers with occult lymph node metastases detected by keratin 19 mRNA reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Cancer* 1996;78:1235-40.
 - 14) Savchenko ES, Schiff TA, Jiang CK, Freedberg IM, Blumenberg M. Embryonic expression of the human 40 kD keratin: evidence from a precessed pseudogene sequence. *Am J Hum Genet* 1998;43:630-7.
 - 15) Raj GV, Moreno JG, Gomella LG. Utilization of polymerase chain reaction technology in the detection of solid tumors. *Cancer* 1998;82:1419-42.
 - 16) Hermanek P, Hutter RVP, Sobin LH, Wittekind C. Classification of isolated tumor cells and micrometastases. *Cancer* 1999;86:2668-73.
 - 17) Cote RJ, Rosen PP, Lesser ML, Old LJ, Osborne MP. Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult bone marrow micrometastases. *J Clin Oncol* 1991;9:1749-56.
 - 18) Racila E, Euhus D, Weiss AJ, Rao C, McConnell J, Terstappen LWM, et al. Detection and characterization of carcinoma cells in the blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:4589-94.
 - 19) Vannuchi AM, Bosi A, Glinz S, Pacini P, Linari S, Saccardi R, et al. Evaluation of breast tumour cell contamination in the bone marrow and leukapheresis collections by RT-PCR for cytokeratin 19 mRNA. *Br J Haem* 1998;103:610-7.
 - 20) Diamandis EP, Yu H. Prostate specific antigen immunoreactivity in the milk of lactating women. *Clin Chem* 1994;410:204-10.
 - 21) Datta YH, Adams PT, Drobyski 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.
 - 22) Schoefeld A, Kruger KH, Gomm J, Sinnett HD, Gazet JC, Sacks N, et al. The detection of micrometastases in the peripheral blood and bone marrow of patients with breast cancer using immunohistochemistry and reverse transcriptase polymerase chain reaction for keratin 19. *Eur J Cancer* 1997;33:854-61.
 - 23) Min CJ, Tafta L, Verbanac KM. Identification of superior markers for polymerase chain reaction detection of breast cancer metastases in sentinel lymph nodes. *Cancer Res* 1998;58:4581-4.
 - 24) Graves R, Hilgers J, Fritsche H, Hayes D, Robertson JFR. MUC-1 mucin assays for monitoring therapy in metastatic breast cancer. *The Breast* 1998;7:181-6.
 - 25) Brugger W, Buhning HJ, Grunebach F, Vogel W, Kaul S, Muller R, et al. Expression MUC-1 epitopes on normal bone marrow: implications for the detection of micrometastatic tumor cells. *J Clin Oncol* 1999;17:1535-44.
 - 26) Hoon DSB, Doi F, Giuliano AE, Schmid P, Conrad AJ. Comments on "The detection of breast carcinoma micrometastases in axillary lymph nodes by means of reverse transcriptase-polymerase chain reaction". *Cancer* 1995;76:533-4.
 - 27) Bostick PJ, Chatterjee S, Chi DD, Huynh KT, Giuliano AE, Cote R, et al. Limitations 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.
 - 28) Luppi M, Morselli M, Bandieri E, Federico M, Marasca R, Barozzi P, et al. Sensitive detection of circulating breast cancer cells by reverse transcriptase polymerase chain reaction of maspin gene. *Ann Oncol* 1996;7:619-24.

- 29) Verbanac KM, Min CJ, Purser SM, Swanson MS, Lo K, Albrecht JA, et al. RT-PCR analysis for mammoglobin and carcinoembryonic antigen detects metastases in histology negative sentinel lymph nodes. *Breast Cancer Res Treat* 2000; 64:37.
- 30) Ooka M, Masuda M, Sakita I, Tamaki Y, Fujiwara Y, Yamamoto H, et al. Multimarker analysis for detection of micrometastases in axillary lymph nodes of breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 1999;57:38.
-