

□ 원 저 □

소세포 폐암에서 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)을 이용한 골수 미세전이(micrometastasis)의 분석

원자력병원 실험치료연구실¹ 및 내과²

김태유^{1,2}, 박종국¹, 류백렬^{1,2}, 임영혁^{1,2}, 강윤구^{1,2}

= Abstract =

Analysis of Bone Marrow Micrometastasis Using RT-PCR in Patients with Small Cell Lung Carcinoma

Tae You Kim, M.D.^{1,2}, Jong Kook Park¹, Baek Ryeol Ryoo, M.D.^{1,2},
Yung Hyuck Im, M.D.^{1,2}, Yoon Koo Kang, M.D.^{1,2}

Laboratory of Experimental Therapeutics¹ and Department of Internal Medicine²,
Korea Cancer Center Hospital, Seoul, Korea

Background : About 20% of small cell lung cancer (SCLC) patients have bone marrow (BM) metastasis at the time of diagnosis and the remaining patients are also considered with micrometastasis. In an attempt to detect BM micrometastasis, we used cytokeratin (CK)-20 as a molecular marker, which is specific for epithelial cells.

Method : A sensitive RT-PCR assay was used to compare CK-20 expression both in SCLC cell line H209 and normal leukocyte and to evaluate BM aspirates of 28 SCLC patients.

Result : H209 cell line showed CK-20 expression but normal leukocyte did not, suggesting CK-20 expression is lung tissue-specific. Of 28 patients (11 limited disease, 17 extensive disease), only 2 (1/11, 1/17) samples tested revealed positive signal for CK-20. Two patients with CK-20 expression had BM metastasis or multiple bone involvement during follow-up.

Conclusion : Although circulating tumor cells were detected in BM of small portion of patients with bone metastasis, CK-20 doesn't seem to be a reliable marker for the detection of micrometastasis in SCLC. This study

Address for correspondence :

Tae-You Kim, M.D.

Department of Internal Medicine Korea Cancer Center Hospital
Gongneung-dong, Nowon-ku, Seoul

emphasizes that identification of more specific marker for micrometastasis is mandatory prior to clinical application. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 1999, 47 : 797-806)

Key words : Small cell lung cancer, Micrometastasis, Cytokeratin.

서 론

소세포 폐암은 비소세포폐암과 비교하여 진행속도가 매우 빠르고 초기에 원격전이를 잘 일으켜 진단 당시 약 70%의 환자에서 원격장기 전이가 입증되고, 나머지 환자 대부분도 미세전이(micrometastasis)를 갖고 있는 것으로 인정되고 있다. 특히 약 20% 이상에서 진단 당시 골수전이가 발견됨으로써 초기의 혈행성 전이가 중요한 예후인자일 것으로 추정되고 있다¹. 따라서 진단 또는 치료당시 기존의 검사수기로는 확인할 수 없었던 미세전이 여부를 확인할 수 있다면 환자의 치료방침 및 예후결정에 유효한 지표가 될 수 있을 것이다^{2,3}. 암세포의 미세전이를 확인하기 위한 방법에는 일반적으로 중앙관련 항원을 이용하거나 암세포의 기원세포에 대한 항체를 이용하여 면역조직화학검사(immunohistochemistry) 또는 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction)을 이용하는 방법 등이 이용되고 있다. 그러나 이러한 검사방법이 유효하기 위하여 대상 표지자(marker)는 반드시 암세포 또는 기원조직에서만 특이적으로 발현되는 것을 전제로 하고 있으나⁴, 현재 연구결과 소세포폐암과 같은 상피세

포암에서 이러한 전제조건을 만족시킬 수 있는 표지자는 아직 밝혀지지 못하였고 따라서 그 결과 미세전이의 분석에 관한 연구결과는 매우 미흡한 상태이다. 현재 표 1 에서와 같이 cytokeratin(CK)이 상피세포에서 기원하는 표지자로 가장 많이 이용되고 있으며, 이 가운데 CK-8은 폐조직에서 주로 발현되는 동시에 정상 골수에서도 발현되는 단점이 있는 반면, CK-20은 골수와 같은 조혈기관에서는 발현되지 않으면서 상피세포에서만 발현되는 것으로 최근 알려져서 이 표지자가 소세포 폐암과 같은 상피세포암의 골수 미세전이의 발견에 효과적인 가능성을 시사하고 있다⁵⁻⁷. 따라서 본 연구자는 소세포 폐암의 환자로부터 추출한 골수세포를 대상으로 CK-20이 골수 미세전이의 발견에 유용한지를 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

28명의 소세포 폐암환자의 병기결정을 위한 검사로서 양측 후장골능(posterior iliac crest)부위에서 골수 천자를 시행하여 골수를 수집하였다.

Table 1. Specificity of epithelial marker to detect BM micrometastasis from noncarcinoma control patients

Epithelial marker	No. of BM aspirate		
	PCR(+)	PCR(-)	Total
EGP-40	53	0	53
DP II	5	0	5
CK-8	5	2	7
CK-18	5	2	7
CK-19	6	9	15
CK-20	0	15	15

1. RNA 추출 및 역전사 효소반응(reverse transcription reaction)

가. 세포주

양성 대조군의 설정을 위하여 소세포폐암 세포주인 NCI H209를 이용하였으며, 이 세포주는 10% FBS와 항생제가 첨가된 RPMI 배지내에서 37℃, 5% CO₂ 배양기를 이용하여 배양되었다.

나. 말초 혈액 및 골수내 단핵세포 분리

헤파린으로 처리된 환자의 골수 10ml을 Ficoll-Hypaque 용액에 서서히 첨가시킨 다음 2,000 rpm으로 30분간 원심 분리하여 단핵 세포를 얻었다. 분리한 단핵 세포를 phosphate buffered saline(PBS)으로 씻은 후 다시 1,800rpm으로 10분간 2번 원심 분리하여 상층부를 제거한 뒤 남은 단핵 세포를 모아 저장하였다.

다. RNA의 분리

세포주에서의 RNA 분리시 배양된 세포주를 flask에서 Trypsin-EDTA를 이용하여 떼어낸후 15ml 튜브로 옮긴 후 4℃에서 10분간 2,200rpm으로 원심분리하고 상층액을 제거한 후 10ml PBS로 모여진 세포들을 다시 풀어 4℃에서 5분간 2,000rpm으로 원심분리한 후 다시 상층액을 제거하고 이를 2번 반복하였다. 골수에서 분리된 단핵세포와 함께 최종적으로 모여진 암세포주의 pellet을 1ml PBS로 씻은 후 1ml Trizol 용액과 섞어 상온에서 5분간 방치한 후, 여기에 200ul phenol : chloroform : isoamylalcohol 혼합 용액(50 : 49 : 1)을 첨가하고 30초간 격렬하게 섞은 후 3분간 실온에 방치하고 4℃에서 12,000rpm으로 15분간 원심 분리하였다. 원심 분리한 상층액을 새 튜브로 옮기고 여기에 500ul isopropanol을 넣어 -20℃에서 보관하고 실온에서 15분간 방치한 다음 4℃에서 10분간 12,000rpm으로 원심 분리하였다. 모여진 pellet을 75% ethanol로 세척한 후 pellet을 말리고 DEPC-처리 증류수 30ul를 넣어

pellet을 녹였다. 이 DEPC-처리 증류수내 녹아있는 RNA를 확인하기 위하여 1% agarose gel에 이 RNA 용액을 3ul를 전기 영동하였고, spectrophotometer를 이용하여 정량하였다.

라. cDNA의 제조

위와 같은 방법으로 분리된 RNA를 이용하여 cDNA를 제조하였다. 먼저 측정된 RNA의 양이 1ug이 되게 PCR용 튜브에 넣은 후 MuLV 역전사 효소 0.5ul, 5x 역전사 효소 buffer 4ul, 10mM dNTP 혼합물 2ul, DTT 2ul, random primer 1ul, RNasin 0.5ul를 넣어 섞은 후 DEPC-처리 증류수를 총 용적이 50ul 되게 넣고 잘 섞었다. 이 혼합물을 37℃에서 1시간동안 반응시키고 95℃에서 10분간 처리하여 반응을 종료시킨 다음 얼음 위에서 1분간 식히고 보관하였다.

2. 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction)

위와 같은 방법에 의해 합성된 cDNA를 대상으로 미국 Perkin Elmer Cetus사의 PCR 기기(version 9600)를 이용하여 PCR을 시행하였다. PCR 반응에서 이용되는 primer로는 CK-20과 CK-8을 이용하였고, 양성 대조군으로 H209 세포주를 이용하였으며, 매 sample 마다 β -actin의 발현을 검사하여 RNA의 추출과 역전사반응이 적절한 지를 조사하였다.

가. β -액틴 primer를 이용한 cDNA 제조 확인

각각의 cDNA의 존재를 확인하기 위해 housekeeping 유전자인 β -actin primer(A : 5' GCG GGA AAT CGT GCG TGA CATT 3' B : 5' GAT GGA GTT GAA GGT AGT TTC GTG 3')를 이용하여 PCR반응을 진행시켰다⁸. 이 반응에는 β -actin 1nmol primer가 각각 5ul, cDNA 5ul, Taq polymerase 2U, 10x polymerase buffer 5ul, 10nmol dNTP mixture 4ul, 멸균 증류수 25.8ul을

Table 2. Primer sequences for CK-20 and CK-8

Primer	Sequence
CK-20 A	5' GCG TTT ATG GGG GTG CTG AGA 3'
B	5' AAG GCT CTG GGA GGT GCG TCT 3'
C	5' CGG CGG GGA CCT GTT TGT 3'
D	5' CAG TGT TGC CCA GAT GCT TGTG 3'
CK-8 A	5' CTG GTG GAG GAC TTC AAG AAC 3'
B	5' GAC CTC AGC AAT GAT GCT GTC 3'

Table 3. PCR condition for CK-20

Step	Denaturation temp. and time	Annealing and Extension temp. and time		Cycle no.
1	94℃ / 40 sec.	70℃ / 2 min.		1
2		69℃ / 115 sec.		1
3		68℃ / 110 sec.		1
4		67℃ / 105 sec.		1
5		66℃ / 100 sec.		1
6		65℃ / 95 sec.		1
7		64℃ / 90 sec.		1
8		63℃ / 85 sec.		1
9-30	94℃ / 40 sec.	Annealing time and temp.	Extension time and temp.	21
			72℃ / 90 sec.	
31		61℃/1 min.	72℃ / 15 min.	1

섞어 50ul이 되게하여 94℃ 7min, 1회, 94℃ 75sec, 55℃ 75sec, 72℃ 90sec을 20회, 94℃ 75sec, 55℃ 75sec, 72℃ 120sec을 10회 시행한뒤, 72℃, 10min을 1회시행하였고, 그중 10ul를 취하여 전기 영동하여 cDNA가 제조되었는지를 확인 하였다.

나. 미세전이의 검색

소세포 폐암의 미세전이의 표지자로서 상피세포에 특징적인 표지자로 최근 보고된 CK-20과 폐에서 주로 발현되며 또한 조혈세포에서도 발현되는 것으로 이미 알려진 CK-8을 이용하였으며 이때 사용된 primer의 염기서열은 표 2와 같다. CK-20 검색을 위한 PCR

반응의 조건은 표 3과 같으며, 이는 “touch-down PCR” 방식⁷⁾의 하나로서 PCR 반응의 특이성과 민감도를 증진시키기 위하여 다 단계의 denaturation, annealing, extension 과정을 사용하는 방법이다. CK-20을 위한 PCR 반응의 조건 CK-20의 반응시 먼저 A와 B의 1nmol primer가 각각 5ul, cDNA 5ul, Taq polymerase 2U, 10x polymerase buffer 5ul, 10nmol dNTP mixture 4ul, 멸균 증류수 25.8ul을 섞어 50ul이 되게하여 표 3과 같이 PCR을 진행하고 이 product 5ul를 다시 C와 D micrometer 1nmol primer 각각 5ul, Taq polymerase 2U, 10x polymerase buffer 5ul, 10nmol dNTP mixture 4ul, 멸균 증류수 25.8ul와 섞어 50ul이 되게하여 다

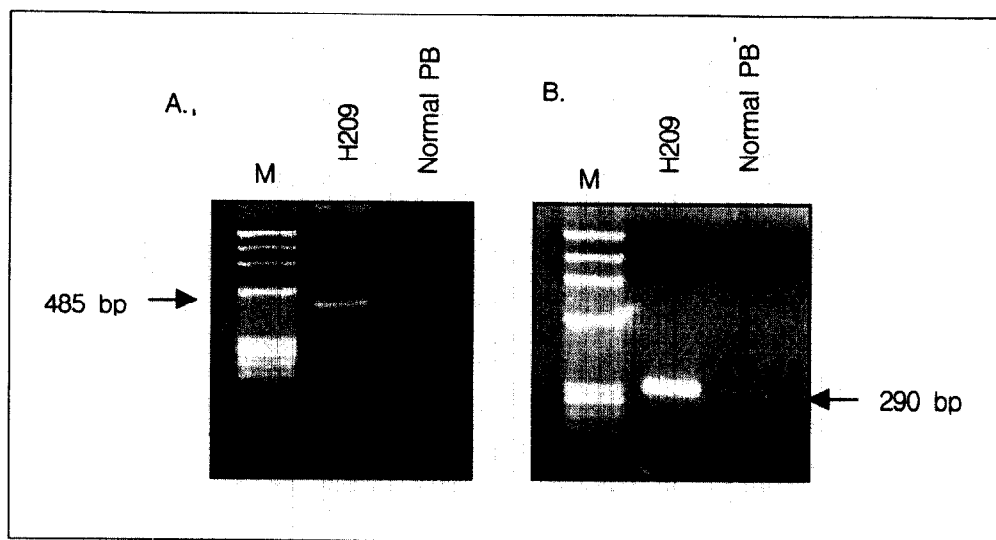


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of RT-PCR for CK-20 (A) and CK-8(B).

시 PCR을 진행한 뒤 그중 일부를 취하여 전기영동 하였으며, 이때 예상되는 CK-20의 크기는 485 bp 였다. CK-8에 대한 PCR 반응조건은 94℃, 7min, 1회, 94℃ 60sec, 55℃ 60sec, 72℃ 120sec를 25 회, 72℃, 10min, 1회로 하였으며 증폭된 CK-8의 크기는 290 bp였다.

결 과

1. 대상환자의 특성

28명의 소세포 폐암환자중 제한기(limited disease, LD)가 11명, 확장기(extensive disease, ED) 환자가 17명이었다. 17명의 확장기 환자가운데 골수조직 검사상 골수침범이 확인되었거나 또는 골주사검사상 전이가 확인된 환자는 7명(41%)이었다. 모든 환자에 대해 ECIP(etoposide, carboplatin, ifosfamide, cisplatin) 복합항암화학요법을 시행하였으며 그 결과 제한기의 환자는 95%, 확장기의 환자에서는 70%의 반응을 보였으며, 이들 환자의 중앙 생존기간은 제한기의 환자가 13.5개월, 확장기의 환자가 9.2개월로서

유의한 차이가 관찰되었다($p\text{-value} < 0.05$).

2. CK-20을 대상으로 RT-PCR에 의해 검출된 골수 미세전이

소세포폐암 세포주인 NCI H209와 정상인으로부터 채취한 단핵구를 대상으로 CK-20과 CK-8에 대하여 RT-PCR을 시행하였다. 그 결과 H209세포주에서는 CK-20과 CK-8의 발현이 관찰되었고, 정상인의 혈액에서는 CK-20은 관찰되지 않은 반면, CK-8의 경우 희미한 띠가 관찰되어 CK-8은 폐조직이외에 혈액 세포에서도 발현될 수 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 대상환자의 골수로부터 분리한 단핵구에서 RNA를 추출하였으며, 이를 이용하여 RT-PCR을 시행하였다. RNA가 적절히 검출되었는지를 평가하기 위하여 β -actin의 발현을 동시에 관찰하여 β -actin의 발현이 적절한지를 확인하였다(Fig. 2, 3). 대상환자 전예에서 CK-20에 대한 PCR이 시행되었고, PCR 산물을 전기영동한 결과 CK-20을 이용한 경우 각각 LD 11예중 1예(10%)(Fig. 2), ED 17예중 1예(6%)(Fig. 3)에서 CK-20의 증폭이 관찰되었다.

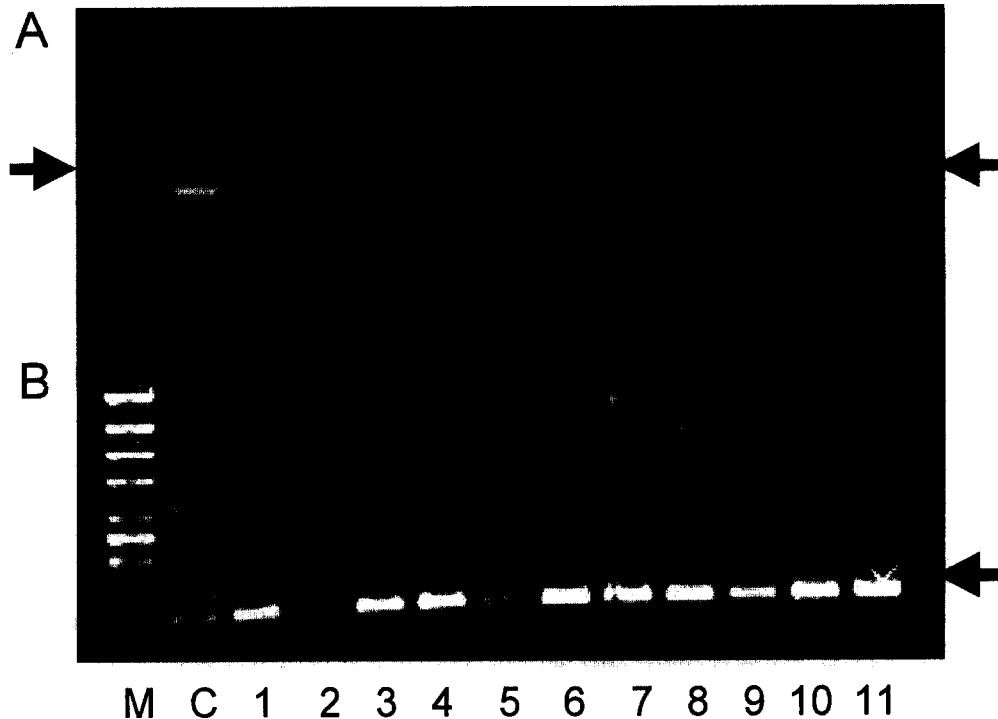


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of RT-PCR for CK-20 in patients with limited stage of SCLC (panel A) and for β -actin as internal control(panel B). Arrows denote expression of target band. (M : marker, C : H209)

CK-20의 증폭이 관찰된 2예 중 ED 환자는 골수침범과 골전이가 확인되었고, LD 환자는 진단당시는 원격전이가 없는 제한기의 환자였으나 4개월 후에 골전이가 발생하였다. 전체 17예의 ED 환자 중 골수 또는 골 전이가 확인된 7명중 나머지 6명의 환자에서는 CK-20의 증폭이 관찰되지 않았다.

고 찰

소세포 폐암은 발생빈도에 있어서 전체 폐암의 20%를 차지하며, 다른 비소세포폐암과 비교하여 진행속도가 매우 빠르고, 특징적으로 초기에 원격전이를 잘 일으켜 진단 당시 이미 약 70%의 환자에서 골, 골수, 간, 뇌 및 림프절 등으로의 원격전이가 입증되고, 나

머지 환자 대부분도 기존의 검사방법으로는 발견되지 않지만 임상적인 경과를 고려할 때 이미 미세전이(micrometastasis)를 갖고 있는 것으로 인정되고 있다¹. 그 결과 소세포 폐암은 치료를 하지 않은 경우 진단후 평균 생존기간이 2-4개월에 지나지 않으며, 이는 앞서 언급된 바와 같이 진단 또는 치료당시 암세포의 혈행성 또는 림프성 전이 또는 미세전이에 의해 전신으로 확산되는 것이 가장 중요한 요인의 하나로 인정되고 있다^{8,9}.

최근 항암치료의 발달과 진단기법의 향상에 의해 그 치료성적이 증진되고 있으며 그 결과 좀 더 초기에 진단 및 치료를 시행하고 선택적으로 예후가 좋은 환자군에 대해서는 더욱 적극적인 치료가 권장되고 있다^{10,11}. 따라서 기존의 검사방법으로는 진단할 수는 없으

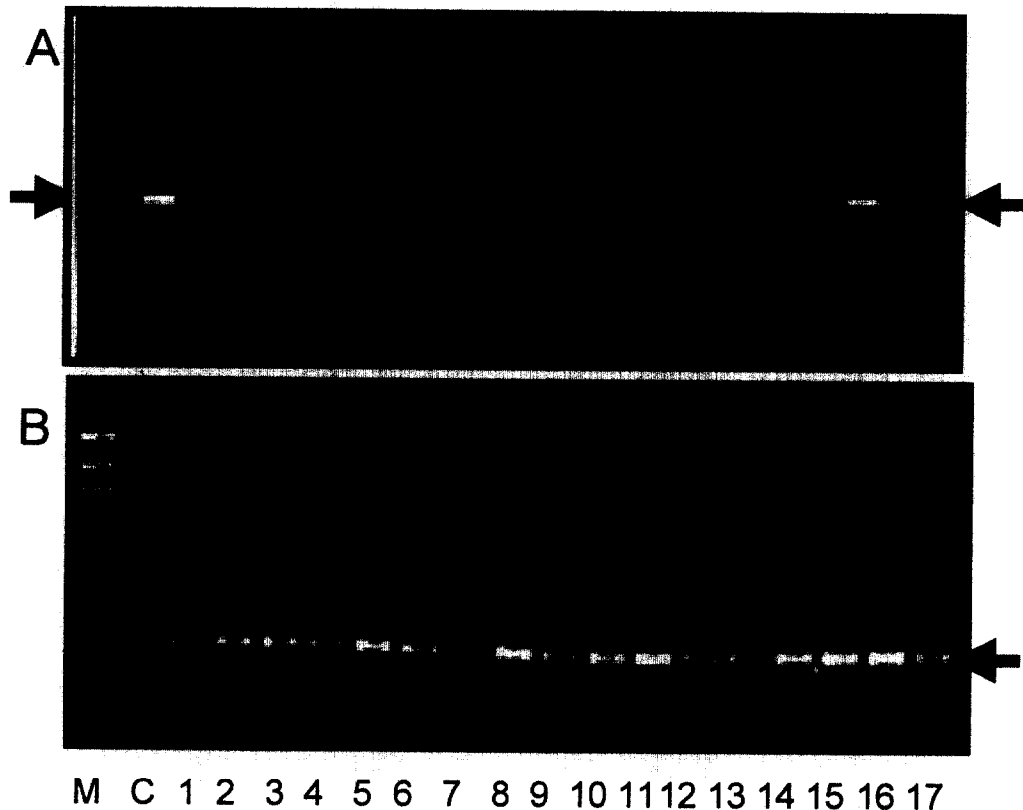


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of RT-PCR for CK-20 in patients with extensive stage of SCLC(panel A) and for β -actin as internal control(panel B). (M : marker, C : H209)

나 분자생물학의 기법을 이용하여 혈액내에 존재하는 소위 미세전이를 검출하기 위한 노력이 진행되어 왔다^{2,3,8,12}. 일반적으로 PCR을 이용하는 경우 혈액내에서 10^7 개의 정상세포중 1개의 암세포를 검출할 수 있는 것으로 알려져 있으며, 이에 반하여 면역조직화학 검사를 이용하여 현미경으로 항체에 대한 염색반응을 관찰하는 경우 10^{4-5} 세포중 1개의 암세포를 검출할 수 있는 검사로 알려져 있어서 PCR을 이용하는 것이 더욱 민감한 검사방법으로 인정되고 있다. 그러면 이런 방법에 의해 검출된 혈액내에 존재하는 소수의 암세포가 과연 어떤 영향을 가져올 것인가가 의문이 되고 있다. 동물실험에 의하면 실제 혈액내에 존재하는 암세포의 단 0.01%만이 실질적으로 혈행성 전이에 의해 원격지에 전이를 유발시킬 수 있는 것으로 알려져 있다². 즉, 이 경우 70kg을 기준으로 하였을 때 약

10,000개의 암세포가 혈액에서 존재하는 경우 혈액 0.2 ml당 1개의 암세포가 이론적으로 존재하고 이 한 개의 암세포가 원격전이를 가져올 수 있을 것으로 추정되고 있다. 따라서 이러한 극소수의 암세포의 존재를 인지하여 이에 대한 치료가 가능하다면 이러한 미세전이의 발견은 향후 원격전이를 억제시킬 수 있는 매우 유용한 수단이 될 수 있을 것이다. 따라서 10 ml의 혈액으로부터 10^{5-6} 개 내외의 단핵구를 추출할 수 있으므로 이론적으로는 PCR을 이용하여 단 1개의 암세포가 존재하여도 그 검출이 가능할 것이다. 그러나 이러한 검사가 임상적으로 유용하기 위하여 현재 이러한 검사방법에 이용되고 있는 표지자(marker)보다 더욱 효과적인 표지자가 필요하다. 즉, 암세포에서만 선택적으로 발현되거나 또는 암세포가 기원하는 세포에서만 선택적으로 발현됨으로써 정상세포와 구

분이 가능해야 할 것이다. 그러나 현재까지 이러한 조건을 만족시키는 표지자가 알려지지 않아서 이러한 미세전이를 발견하는 연구에 가장 커다란 장애가 되고 있으며, 암세포 또는 암기원 조직에서만 선택적으로 발현되는 암표지자의 개발이 무엇보다도 시급한 실정이다. 암세포의 혈행성 미세전이의 검사에 있어서 현재 가장 유용한 것은 전립선암에서 발현되는 PSA (prostate specific antigen)이다. PSA는 암세포에서만 특징적으로 발현이 증가되고, 또한 정상 조혈세포에서는 발현되지 않은 것으로 알려져 있어서 이상적인 표지자로 인정되고 있으며 실제 여러 연구결과 혈행성 미세전이가 발견되는 경우 그 임상적 예후와의 관련성이 높다는 보고가 있다^{5,13}. 이에 반해 골수 또는 골전이를 많이 하는 소세포 폐암과 같은 상피세포암의 경우 현재 CEA, NSE (neuron specific enolase)가 유용한 암 표지자로 알려져 있어서 환자의 50-60% 내외에서 관련되는 것으로 알려져 있으나 정상 혈액세포에서도 이러한 표지자를 발현하므로 이상적인 표지자가 될 수 없고^{12,15}, 또한 상피세포의 표지자인 EGP (epithelial glycoprotein-40), cyto-keratin 등도 상피세포 뿐만 아니라 정상 조혈세포에서도 발현됨으로써 적절한 표지자가 될 수 없으며, 따라서 이를 이용한 연구결과 분석에 있어서 신중을 기하여야 할 것으로 생각된다^{5,16-18}.

최근 연구보고에 의하면 CK-20이 상피세포에서만 특징적으로 발현되면서 조혈세포에서는 발현되지 않는다는 것이 보고되고 있어서 관심을 끌고 있다⁶. 본 연구에서도 그림 1에서와 같이 다른 표지자와는 달리 조혈세포에서는 CK-20의 발현이 관찰되지 않음을 알 수 있었다. 따라서 본 연구에서는 소세포 폐암에서 가장 중요한 예후인자인 병기(limited vs. extensive) 결정에 있어서 기존의 검사에서는 발견할 수 없었던 골수 미세전이 여부를 CK-20을 이용하여 가장 민감한 검사방법인 RT-PCR에 의해서 측정하여 미세전이의 발견이 가능한지 또한 그 경우 이러한 소견이 어떠한 임상적 의미를 갖는지를 보고자 하였다. 그러나 본 연구결과 단지 7% (2/28)의 환자에서만

CK-20의 증폭이 관찰되어 그 임상적 의미를 평가하기는 힘들 것으로 생각된다. 그러나 증폭이 관찰된 2예의 환자가 모두 골수 또는 골전이가 발견됨으로써 골수에서의 CK-20의 발현이 미세전이의 발견에 유용할 수 있을 가능성이 있을 것으로 추정할 수는 있으나, 기존의 검사로 골수전이가 확인되었던 7명중 6명은 골수전이가 병리학적 검사상 관찰되었음에도 불구하고, 이들 환자에서 CK-20을 이용한 PCR 검사상 미세전이가 관찰되지 않아서 CK-20 보다 좀 더 유용한 표지자의 개발이 필요할 것으로 생각된다.

요 약

연구배경 :

소세포 폐암은 진단 당시 약 20% 이상에서 진단 당시 골수전이가 발견됨으로써 초기의 혈행성 전이가 중요한 예후인자일 것으로 추정되고 있다. 따라서 진단 또는 치료당시 기존의 검사수기로는 확인할 수 없었던 미세전이를 확인할 수 있다면 환자의 치료방침 및 예후결정에 유효한 지표가 될 수 있을 것으로 기대되어 왔다. 최근 cytokeratin(CK)-20이 골수와 같은 조혈기관에서는 발현되지 않으면서 상피세포에서만 발현되는 것으로 알려져서 이 표지자가 소세포 폐암과 같은 상피세포암의 골수 미세전이의 발견에 효과적일 가능성을 시사하고 있다.

방 법 :

소세포암세포주인 H209와 정상인의 혈구세포를 대상으로 CK-20 발현을 비교하였고, 소세포 폐암환자의 병기결정을 위한 검사로서 골수천자를 시행하면서 동시에 골수를 수집하여 이로부터 RNA를 추출하여 CK-20에 대한 primer를 이용하여 RT-PCR을 시행하였다.

결 과 :

H209 세포주에서는 CK-20의 발현이 관찰된 반면, 정상 혈구세포에서는 관찰되지 않아서 CK-20이 조혈세포에서는 발현되지 않고, 상피조직에서만 특이적으로 발현되는 것으로 생각되었다. 28명의 소세포 폐

암환자중 제한기가 11명, 확장기 환자가 17명이었으며, 17명의 확장기 환자 가운데 골수조직검사상 골수 침범이 확인되었거나 또는 골주사검사상 전이가 확인된 환자는 7명 (41%)이었다. CK-20 에 대한 PCR 결과 각각 LD 11예중 1예 (10%), ED 17예 중 1예 (6%)에서 CK-20의 증폭이 관찰되었다. CK-20의 증폭이 관찰된 2예 중 ED 환자는 골수전이기가 있었고, LD 환자는 진단당시는 원격전이가 없는 제한기의 환자였으나 후에 골전이가 관찰되었다.

결 론 :

증폭이 관찰된 2예의 환자가 모두 임상적으로는 골수 전이가 없는 상태에서 골전이가 발견됨으로써 CK-20의 발현이 혈행성 미세전이의 발견에 유용할 수 있을 가능성이 있을 것으로 추정할 수는 있으나, 골수전이가 확인되었던 7명중 6명에서는 CK-20이 발현되지 않아서, CK-20 보다 좀 더 유용한 표지자의 개발이 필요할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Devita VT, Hellman S, Rosenberg SA. Cancer: principles & practice of oncology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997
2. Johnson PWM, Burchill SA, Selby PJ. The molecular detection of circulating tumor cells. Br J Cancer, 1995;72:268-76
3. Ghossein RA, Rosai J. Polymerase chain reaction in the detection of micrometastases and circulation tumor cells. Cancer 1996;78:10-6
4. Deguchi T, Doi T, Ehara H, Ito S, Takahashi Y, Nishino Y, et al. Detection of micrometastatic prostate cancer cells in lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Cancer Res 1993;53:5350-4
5. Zippelius A, Honold KG, Kollecman MW, Oberneder R, Schlinak G, Riethmuller G, et al. Limitations of reverse-transcriptase polymerase chain reaction analyses for detection of micrometastatic epithelial cancer cells in bone marrow. J Clin Oncol, 1997;15(7):2701-8
6. Soeth E, Vogel I, Roder C, Juhl H, Marxen J, Kruger U, et al. Comparative analysis of bone marrow and venous blood isolated from gastrointestinal cancer patients for the detection of disseminated tumor cells using reverse transcription PCR. Cancer Res 1997;57:3106-10
7. Soeth E, Roder C, Juhl H, Kruger U, Kremer B, Kalthoff H. The detection of disseminated tumor cells in bone marrow from colorectal cancer patients by a cytokeratin-20 specific nested reverse transcriptase polymerase chain reaction is related to the stage of disease. Int J Cancer 1996;69:278-82
8. Pantel K, Izbicki J, Passlick B, Angstwurm M, Haussinger K, Thetter O, et al. Frequency and prognostic significance of isolated tumor cells in bone marrow of patients with non-small-cell lung cancer without overt metastasis. Lancet 1996;347:649-53
9. Johnson PWM, Joel SP, Love S, Butcher M, Pandian MR, Squires L, et al. Tumour markers for prediction of survival and monitoring of remission in small cell lung cancer. Br J Cancer 1993;67:760-6
10. Fields KK, Elfenbein GJ, Trudeau WL, Perkins JB, Janssen WE, Moscinski LC. Clinical significance of bone marrow metastases as detected using the polymerase chain reaction in patients with breast cancer undergoing high-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation. J Clin Oncol 1996;14:1868-76
11. Datta YH, Adams PT, Drobyski WR, Ethier SP, Terry VH, Roth MA. Sensitive detection of occult

- breast cancer by the reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Oncol* 1994;12:475-82
12. Gerhard M, Juhl H, 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(4):725-9
 13. Seiden MV, Kantoff PW, Krithivas K, Probert K, Bryant M, Haltom E. Detection of circulating tumor cells in men with localized prostate cancer. *J Clin Oncol* 1994;12(12):2634-9
 14. Mattano LA, Moss TJ, Emerson SG. Sensitive detection of rare circulating neuroblastoma cells by the reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Cancer Res* 1992;52:4701-5
 15. Pechumer H, Bender-Gotze C, Ziegler-Heitbrock HWL. Detection of neuron-specific enolase messenger ribonucleic acid in normal human leukocytes by polymerase chain reaction amplification with nested primers. *Lab Invest* 1993;69(6):743-9
 16. Traweek ST, Liu J, Battifora H. Keratin gene expression in non-epithelial tissues : detection with polymerase chain reaction. *Am J Pathol* 1993; 142(4):1111-8
 17. Dingemans AM, Brakenhoff RH, Postmus PE, Giaccone G. Detection of cytokeratin-19 transcripts by reverse transcriptase polymerase chain reaction in lung cancer cell lines and blood of lung cancer patients. *Lab Invest* 1997;77(3):213-20
 18. de Graaf H, Maelandsmo GM, Ruud P, Forus A, Oyjord T, Fodstad O, et al. Ectopic expression of target genes may represent an inherent limitation of RT-PCR assays used for micrometastasis detection : studies on the epithelial glycoprotein gene EGP-2. *Int J Cancer* 1997;72(1):191-6
 19. ten Velde GP, Kuypers BT, Volovics A, Bosman FT. Examination of bone marrow biopsy specimens and staging of small cell lung cancer. *Eur J Cancer* 1990;26(11-12):1142-5
 20. Broers JL, Rot MK, Oostendorp T, Bepler G, De Leij L, Carney DN, et al. Spontaneous changes in intermediate filament protein expression patterns in lung cancer cell lines. *J Cell Sci* 1988;91(1): 91-108