대한외과학회지 : 제 58 권 제 2 호
Vol. 58, No. 2, February, 2000

유방암 감시림프절(Sentinel Node)에서 RT-PCR을 이용한 미세전이 진단에 관한 연구

성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 일반외과 및 *진단병리과

박해린 · 이상달 · 남석진 · 고영혜* · 양정현

= **Abstract** =

The Detection of Micrometastasis in Sentinel Nodes of Breast Cancer by Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Hai-Lin Park, M.D., **Sang-Dal Lee**, M.D., **Seok-Jin Nam**, M.D.
Young-Hyeh Ko, M.D.* and **Jung-Hyun Yang**, M.D.

Department of General Surgery and *Diagnostic Pathology, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Korea

Background: The accurate staging of patients with breast cancer is essential to its management and prognosis. Sentinel node biopsy appears to offer an alternative to routine axillary lymph node dissection for staging breast cancer patients. Current method of routine histopathologic analysis of dissected lymph nodes may be inadequate because up to 30% of patients free of lymph node metastases develop a relapse in 5 to 10 years. Recently, the development of amplification of MUC1 mRNA and keratin 19 mRNA by RT-PCR for detection of micrometastases in breast cancer has been shown to be a sensitive and useful diagnostic method. This study was performed to evaluate the usefulness of MUC1 mRNA and keratin 19 mRNA markers by RT-PCR to detect micrometastases in frozen sections of sentinel lymph nodes from breast cancer patients and to identify which histopathologic prognostic factors were related to RT-PCR detected micrometastases.

Methods: The incidence of axillary micrometastases in 15 sentinel lymph node specimens from 15 patients who underwent breast cancer surgery with sentinel lymphadenectomy was from June 1999 to July 1999 was studied. Complete axillary dissection was made in all of the patients. Each sentinel lymph node specimen was examined by hematoxylin and eosin (H&E) staining, immunohistochemical cytokeratin (IHC) staining and RT-PCR on adjacent sections to determine the expression of the mRNA tumor marker of MUC1 and keratin 19. All of the dissected lymph nodes were examined by serial sectioning.

Results: Fourteen out of 15 sentinel lymph nodes were histologically negative in usual H&E staining. Serial sectioning, immunohistochemical (IHC) staining for cytokeratin demonstrated micrometastases in one, two histologically negative sentinel nodes, respectively, and MUC1 mRNA was detected in all of them. Of the 12 sentinel lymph nodes that were diagnosed to be devoid of micrometastases by IHC

책임저자 : 박해린, 서울시 강남구 일원동 50번지, ㊥ 135-230, 삼성서울병원 일반외과
Tel: 3410-0927, Fax: 3410-0929
접수일 : 1999년 12월 14일, 게재승인일 : 2000년 1월 21일
본 논문의 요지는 1999년도 11월 6일 대한외과학회 추계학술대회에서 구연되었음.

and serial sectioning, MUC1 mRNA was expressed in 6 nodes, indicating the presence of micrometastases. Micrometastases detected by RT-PCR were significantly correlated with tumor size, expression of p53 and negative PR in conventionally lymph node-negative staged patients.

Conclusion: The MUC1 mRNA RT-PCR was more sensitive than immunohistochemistry and serial sectioning for the detection of micrometastases in axillary lymph nodes, but keratin 19 was not specific. Sentinel lymph node biopsy with RT-PCR is a more useful means of detecting micrometastases and may have a role in identifying a group of patients who will benefit from earlier adjuvant chemotherapy, but the prognostic significance must be determined after a longer follow-up.

Key Words: MUC1 mRNA, RT-PCR, Micrometastases, Breast cancer

서 론

유방암 환자에서 액와림프절 전이 여부는 예후를 예측하는 지표 중 가장 중요한 예측인자로 받아들여지고 있는데 그 이유는 액와림프절 전이 환자에서 재발의 위험도가 높고 전이된 림프절의 수와 예후가 반비례의 관계를 보여주는 데 있다.[1,2] 그러므로 액와림프절 전이 여부 및 전이 정도의 정확한 판정은 치료의 지침과 예후 결정의 필수적 요소로 받아들여지고 있다. 그러나 불행하게도 현재 시행되는 조직병리학적 진단 방법은 부정확하여 림프절 전이 음성으로 판명된 환자 중 30%에서 5~10년 후 재발되는 것으로 보고되어 왔다.[3~5] International (Ludwig) Breast Cancer Study Group[6]의 보고에 의하면 통상적인 H&E 염색 병리조직 검사에서 전이 음성으로 진단된 림프절에 대해 연속절편(serial sectioning) 기법으로 세밀한 조직학적 분석을 한 결과 10~30%의 림프절에서 미세전이를 확인하였으며 미세전이 양성인 환자가 음성인 환자에 비해 예후가 의미 있게 나빴음을 보고하였다. 이러한 결과는 세심하고 주의 깊은 림프절 미세전이 판정이 고위험 환자군을 선별하는데 상당히 기여 할 것임을 제시하고 있다.[4]

또 다른 미세전이 진단법인 epithelial cell marker인 cytokeratin에 대한 면역조직화학 염색법(Immunohistochemical staining for cytokeratin)은 림프절 미세전이 발견율이나 실용성면에서 연속절편 검사보다 좋은 것으로 알려져 연속절편의 필요성을 줄이는 결과를 가져왔다.[7] 그러나 이러한 연속절편법이나 면역조직화학 염색법 등은 액와림프절 절제술로 제거된 전 림프절에 대해 전이 여부를 분석하여야 하므로 많은 시간과 노력이 요구되는 등 실용성이 없어 임상적으로 거의 이용되지 못하였다.[4]

Giuliano등[2]이 유방암에서 원발 종양으로부터 우선적으로 전이될 가능성이 높은 감시림프절(sentinel node)의 개념을 도입한 이래 감시림프절에서의 미세전이 진단에 대한 연구가 꾸준히 진행되어 왔다. 그들에 의하면 감시림프절에 대한 연속절편법과 면역조직화학 염색법이 기존의 액와림프절 절제술 후 병리조직 검사법에 의한 진단법보다 유방암 환자의 액와부 림프절 전이 진단의 정확도를 증가시켰다고 보고하였다. 그 이유는 1~2개의 감시림프절에 대한 철저하고 집중적인 검사가 평균 15~20개 이상의 액와림프절 전체를 조사하는 것보다 훨씬 정확하고 효율적이라는 것이다.[8,9]

최근 유방암 미세전이 진단을 위해 Shoenfeld등[10]과 Noguchi등[11]이 분자생물학적 기법인 RT-PCR을 이용하여 상피세포에서만 표현되는 mRNA를 증폭하여 액와림프절에서 6~55% 정도의 미세전이 발견율 향상을 보고하였다. Shoenfeld등은 keratin 19 mRNA를, Noguchi등은 MUC1 mRNA를 증폭하였는데 이 유전자들은 정상림프절에서는 발견이 되지 않으나 대부분의 유방암에서 매우 높게 표현되어 액와림프절에서의 상기 mRNA의 존재는 미세전이의 강력한 증거가 된다고 하였다.

저자들은 MUC1 mRNA와 keratin 19 mRNA의 RT-PCR 증폭을 이용하여 이들 유전자들의 발현이 감시림프절에 대한 미세전이 여부의 판정에 유용한지의 여부를 확인하고 RT-PCR에 의한 미세전이 진단이 기존의 연속절편법이나 면역조직화학 염색법보다 더 민감한지를 알아보고자 하였으며 또한 이러한 결과가 기존의 조직학적 예후인자들과의 관련성이 있는지를 알아보기 위해 이 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1) 대 상

1999년 7월부터 9월까지 유방암으로 유방절제술 및 액와부 림프절 곽청술을 시행받은 환자 중 감시림프절 생검을 시행받았던 15명의 환자에서 채취한 15개의 감시림프절에 대해 본 연구를 시행하였다.

2) 방 법

(1) 조직 검체: 전신마취를 시행한 후 isosulfan blue dye 1% 용액 5 ml를 원발종양의 주위 유방 조직 23 G 주사침을 이용하여 주사한 뒤 약 5~10분 경과 후 액와부에 절개창을 가하여 푸른색으로 착색된 림프관을 찾아 원위부 방향으로 추적하여 가장 근위부에서 발견된 림프절을 감시림프절로 정하고 절제하였다. 채취된 림프절에서 주위 지방조직과 혈액들을 주의깊게 분리한 뒤 이등분하여 한쪽절편은 냉동절편을 만들어 H&E 염색과 cytokeratin에 대한 면역조직화학 염색(AE1/AE3)을 시행하여 병리과 전문의에 의해 암 전이 여부를 판독하였고 다른 한쪽은 effendorff tube에 담아 액체질소에 넣어 급속 냉동시켜 RNA 추출시까지 보관하였다. 전 환자에서 동결절편 검사 결과에 상관없이 완전 액와림프절 절제술을 시행하였고 평균 액와림프절 개수는 평균 17개(13~30)였다. 이들 전 파라핀 포매 액와림프절에 대해 100 μm 간격으로 연속절편 후 H&E 염색을 실시하여 미세전이 여부를 판독하였다.

(2) 면역조직 화학 염색: Cytokeratin 항체(AE1/AE3)를 이용한 면역조직 화학 염색을 ABC (avidin biotin peroxidase complex) 법으로 시행하였다. 약술하면 4 μm 두께의 포르말린으로 고정된 조직을 탈파라핀, 탈수, 재탈수 과정을 거친 후 과산화수소에 처리하여 내인성 과산화효소를 차단시켰다. 이어 항원성 회복을 위해 citrate buffer에 넣어 전자레인지로 가열시킨 후 1차 항체를 넣고 1시간 동안 작용시켰다. 이어 2차 항체와 ABC 용액에 각각 30분간 작용시킨 후 0.05% 3,3'-diaminobenzidine (DAB)에서 발색하고 Meyer 헤마톡실린으로 대조 염색을 시행하였다.

(3) RNA의 추출: 감시림프절 조직 100~200 mg 정도를 잘라서 막자사발에서 액체질소가 떨어지지 않도록 부어 가면서 곱게 갈은 후 Trizol reagent 1 ml를 첨가하여 상온에서 5분 정도 기다린다. 얻어진 조직액을 2 ml tube에 옮겨 담은 후 0.2 ml의 chloroform을 첨가하고 15초간 vortex를 가한 다음 상온에서 2~3분간 incubation시킨다. 4°C 원심분리기에서 12,000 g의 속도로 15분간 돌린 후 새로운 tube에 상층액 부분을 옮겨 담는다. Isopropyl alcohol 0.5 ml를 첨가하여 4°C 에서 10분간 방치한 후 4°C 12,000 g의 속도로 원심 분리시킨 다음 상층액을 제거하고 75% 에탄올으로 wash한 후 5분간 7,500 g의 속도로 원심분리시킨다. Tube의 기저부에 붙어있는 RNA 침전물을 공기 중에 건조하고 DEPC 용액 15 μl를 첨가한 후 55~60°C에서 10분간 incubation하여 −70°C에서 보관하였다

(4) cDNA의 합성: 추출한 RNA 2 μl를 시험관에 넣고 Hexamer (random primer) 1.5 μl, Rnase-Inhibitor 1 L, DEPC H_2O 8.5 μl를 섞어 70°C에서 10분간 반응시킨 다음 얼음에서 냉각시킨 후 25°C에서 10분간 방치시켰다. 여기에 1 μl의 dNTP, 4 μl의 incubation buffer를 넣어 37°C에서 2분간 반응시킨 다음 1 μl의 M-MuLV (Reverse Transcriptase)를 가하여 최종 반응 용액이 20 μl이 되도록 조절한 후 37°C에서 1시간 반응시키고 70°C에서 10분간 방치하여 반응을 마쳤다.

(5) 역중합효소 연쇄반응(Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction): MUC1과 keratin 19 mRNA의 oligonucleotide primer는 Stern등[12]과 Luqmani등[13]이 제안한 것과 동일하게 사용하였으며 Table 1과 같다. β-actin PCR primer는 RNA의 손상여부를 확인하기 위하여 사용하였다(Table 1). PCR용 튜브에 상기 방법으로 만든 2 μl의 cDNA를 넣은 후 100 mM Tris, 500 mM KCL (pH 8.3), 25 pM의 sense primer

Table 1. Primers for RT-PCR amplification of MUC1 mRNA, keratin 19 mRNA, -actin mRNA

mRNA	Product size (bp)	Primers 5'-3'
MUC1	288	CGTCGTGGACATTGATGGTACC
		GGTACCTCCTCTCACCTCCTCCAA
Keratin 19	460	AGGTGGATTCCGCTCCGGGCA
		ATCTTCCTGTCCCTCGAGCA
β-Actin	154	CACTGTGTTGGCGTACAGGT
		TCATCACCATTGGCAATGAG

와 antisense primer, 10 mM dNTP (Boehringer Mannheim Biochemical, Germany), 5 U/μl Taq DNA polymerase (Boerhinger Mannheim Biochemical, Germany)를 넣어 총 50 μl의 반응 용액을 만든 후 mineral oil로 반응용액의 상층부를 덮고 94°C에서 1분간 denaturation(변성)시킨 후 Perkin-Elmer DNA thermal cycler에서 40 cycles 증폭을 시행하였다. PCR cycle 조건은 94°C에서 1분간 변성시키고, 60°C에서 1분간 annealing한 다음, 72°C에서 1분간 primer extension을 시행하였으며, 35 cycles 증폭 후 마지막 cycle은 72°C에서 10분간 반응시켰다. 증폭 산물은 1% agarose gel (AMRESCO agarose, U.S.A), ethidium bromide 혼합겔에서 전기영동으로 분리하였으며 100 bp DNA ladder를 size marker로 사용하였다.

(6) 통계학적 분석: MUC1 mRNA 발현과 병리조직학적 예후 인자들과의 관련여부는 Chi-square test로 분석하여 p-value가 0.05 이하인 경우에 의의가 있다고 판정하였고 통계 program은 윈도우용 SPSS를 이용하였다.

결 과

1) 유방암 환자 감시림프절과 대조군 정상림프절에서 시행한 MUC1 mRNA 발현 비교

15명의 유방암 환자에서 채취한 15개의 감시림프절과 2명의 양성 액와부 질환 환자에서 채취한 2개의 정상림프절에 대해 MUC1 mRNA RT-PCR을 시행 하여 전기 영동상에서 확인한 결과 15개의 감시림프절중 9예에서 288 bp fragment의 MUC1 mRNA 증폭을 볼 수 있었으나 정상 림프절에서는 나타나지 않았다(Fig. 1).

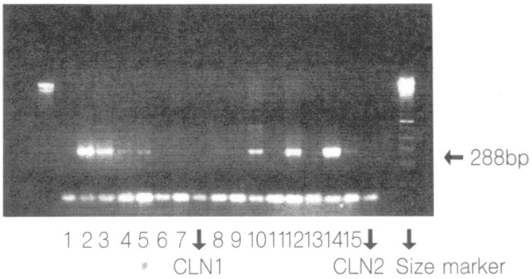

Fig. 1. Detection of micrometastases in axillary lymph nodes by RT-PCR amplification of MUC1 mRNA. Total RNA was extracted from each of 15 sentinel lymph nodes obtained from 15 breast cancer patients and 2 normal control lymph nodes obtained from patients with benign axillary disease. MUC1 mRNA expression was detected in lane 2, 3, 4, 5, 8, 10, 12, 14, 15 sentienl lymph nodes. No band was detected in lane 1, 6, 7, 9, 11, 13 and control lymph nodes. *CLN: Control lymph node

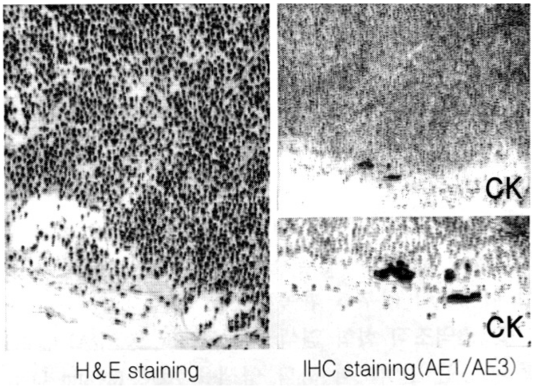

Fig. 2. Immunohistochemical (IHC) staining for cytokeratin. Routine H&E staining (left) showed negative lymph nodes metastases but IHC staining (right) revealed cancer cells in that lymph nodes indicating micrometastasis.

2) 감시림프절에 대한 조직학적, 면역조직화학적, 연속절편 검사와 MUC1, keratin 19 mRNA RT-PCR과의 비교

술중 H&E 염색을 이용한 동결절편 검사와 영구조직 검사상 병리조직학적 전이 양성으로 판정된 1예를 제외한 14예에서 전이 음성 소견을 보였다. 평균 림프절 개수는 15개였다(range 7～19). 림프절 전이 음성으로 판정된 환자 14예 중 1예에서 연속절편 검사 양성이었으며 이를 포함한 2예에서 조직면역화학적 양성을 보였다. 면역조직화학 검사상 양성인 2예 모두 MUC1 양성 발현을 보였으며 면역조직화학 검사 음성인 6예에서 MUC1 양성발현을 나타내어 RT-PCR이 미세전이 진단에 더욱 민감하였다. 그러나 keratin 19 mRNA는 전 예에서 발현되어 특이도가 관찰되지 않았다(Table 2, 3).

Table 2. Comparison between histological examination, immunohistochemical staining, serial sectioning and RT-PCR in the detection of breast cancer micrometastasis in axillary sentinel lymph nodes

Patient	H&E staining	IHC staining	Serial sectioning	MUC1	Keratin -19
1	−	−	−	−	+
2	+	+	+	+	+
3	−	+	−	+	+
4	−	−	−	+	+
5	−	−	−	+	+
6	−	−	−	−	+
7	−	−	−	−	+
8	−	−	−	+	+
9	−	−	−	−	+
10	−	−	−	+	+
11	−	−	−	−	+
12	−	−	−	+	+
13	−	−	−	−	+
14	−	+	+	+	+
15	−	−	−	+	+

Table 3. Comparison of pathology-negative sentinel lymph nodes evaluated by RT-PCR, serial sectioning and immunohistochemistry

	RT-PCR positive	IHC positive	Serial sectioning with H&E positive
Pathology positive	1 (100%)	1	1
Pathology negative	8 (57%)	2	1
Total	9	3	2

3) MUC1 mRNA의 발현으로 진단된 미세전이와 조직병리학적 예후인자와의 관계

병리조직학적 특성은 pure DCIS 2예 모두 MUC1 mRNA 음성으로 미세전이가 없었음을 알 수 있었고 미세침윤을 동반한 DCIS (DCIS with microinvasion) 1예와 침윤성 유관암 8예 중 4예에서 MUC1 양성을 보여 침윤성암에서 미세전이가 높게 나타났으나 통계적으로 유의성은 없었다 침윤성 유관암 중 원발종양의 크기가 1 cm 이하인 3예 모두 MUC1 음성을 보였으며 1.1 cm 이상 2 cm 이하군 3예 중 2예와 2.1 cm 이상인 6예 모두 MUC1 양성으로 원발종양의 크기가 클수록 통계적으로 유의하게(p=0.012) 미세전이가 빈도가 높았음을 알 수 있었다. 핵 분화도나 조직학적 분화도에 따른 미세전이 빈도와의 관계는 통계적으로 유의하지 않았다(Table 4).

Table 4. Histo-pathologic correlation with the presence of MUC1 mRNA RT-PCR

	No. of patients MUC1 (+)	No. of patients MUC (−)	p-value
Tumor size (cm) (invasive tumor)			P=0.012
0~1.0	0	3	
1.1~2.0	2	1	
2.1~5.0	6	0	
>5	0	0	
Histologic type			NS
Pure DCIS	0	2	
DCIS with focal microinvasion	1	0	
Infiltrating ductal carcinoma	8	4	
Nuclear grade			NS
1	0	0	
2	6	5	
3	3	1	
Histologic grade			NS
1	1	0	
2	4	3	
3	4	3	

4) MUC1 mRNA의 발현으로 진단된 미세전이와 호르몬 수용체, 암유전자와의 관계

Progesterone 수용체 음성(p=0.020)과 p53 유전자 양성(p=0.030)에에서 통계적으로 유의하게 미세전이의 빈도가 높았음을 알 수 있었으나 estrogen 수용체나 c-erbB-2 유전자의 존재 유무와 미세전이와의 관계는 통계적으로 유의성이 없었다(Table 5).

Table 5. Correlation of hormone receptor, oncogene with the presence of MUC1 mRNA RT-PCR

	No. of patients		p-value
	MUC1 (+)	MUC (−)	
Estrogen receptor			NS
Positive	2	2	
Negative	6	3	
Progesteron receptor			
Positive	0	2	
Negative	9	3	P=0.020
p53			
Positive	7	2	P=0.036
Negative	1	3	
C-erbB-2			NS
Positive	7	2	
Negative	2	3	

고 찰

유방암 및 식도암, 위암, 대장암 환자들의 생존율 및 재발률 등의 예후를 예측할 수 있는 여러 요소 중 원발종양의 크기와 더불어 림프절 전이 여부는 가장 유용한 지표 중 하나로 받아들여지고 있다.[14~16] 특히 유방암환자에서 액와부 림프절의 전이여부 및 전이정도의 정확한 판정은 치료의 지침과 예후결정의 필수적 요소로서 현재까지 액와부 림프절 곽청술 및 조직병리학적 진단은 가장 중요한 역할을 차지해 왔다. 그러나 각 림프절에서 1~2개의 절편을 만들어 H&E 염색을 시행하는 현재의 통상적인 조직병리학적 진단방법으로는 아무리 경험 많은 병리의사라 할지라도 림프절 전이를 진단하지 못하는 경우가 많아 최고 30%의 액와림프절 음성 환자에서 5~10년 내 재발하는 것으로 알려져 왔다.[1~3] 1990년 Ludwig등[6]과 1991년 Gusterson등[17]은 림프절 전이 음성으로 진단된 환자를 대상으로 연속절편(serial sectioning)을 시행하여 재검토 한 결과 각각 10~30%, 25%에서 미세전이가 있었음을 보고하였고 이러한 발견되지 않은 구역림프절의 미세전이가 0기를 포함한 조기유방암 치료 실패의 중대한 한 원인이 되고 있음을 강조하였다.

Trojani등[18]과 Lindemannem등[19]은 종양세포내 cytokeratin에 대한 단클론 항체를 이용한 면역조직화학 검사를 시행하여 조직학적 검사에서 놓친 미세전이를 진단하였는데 cytokeratin은 상피세포와 이들에서 기원하는 종양세포에서만 특이적으로 표현되는 세포골격구조로서[20] 27개의 아형이 알려져 있다. 이 중 keatin19는 유방암 환자에서 대부분 표현되며[21] 정상 림프절에서는 존재하지 않는다고 하였는데[22] Neville 등[23]은 이 검사를 시행하여 2400명의 환자 중 13%에서 림프절 전이음성이 양성으로 전환되었다고 하였다.

이러한 미세전이의 진단은 병기를 상향 조정시킬 뿐만 아니라 예후에도 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. Ludwig Breast Cancer Study Group[6]은 림프절 미세전이을 보였던 환자들의 5년 추적조사에서 무병생존율 16% 감소, 전체생존율 9% 감소를 보였다고 하며 림프절 미세전이 환자에서 예후가 의미있게 낮았음을 보고하였다.

이렇듯 많은 문헌에서 미세전이의 예후적 가치를 인정하고 미세전이 진단의 중요성과 필요성을 역설하고 있으나 보편적인 검사로 인식되어 오지 못하여 임상적 적용이 가능하지 못하였던 가장 큰 이유는 평균 15~20여개에 달하는 전 액와림프절에 대해 면역조직화학 검사나 연속절편을 시행하는 것은 많은 비용, 시간과 노력 등이 요구되었기 때문이다.

최근 유전자의 구조와 기능에 대한 정보의 급격한 증가와 재조합 DNA 기법(recombinant DNA technology) 등의 기술적인 발전 등은 종양세포에서의 유전자변이와 유전자의 과표현을 분자생물학 수준에서 분석이 용이하게 하였다. 이에 따라 종양세포 내 특정 염기 서열을 증폭하여 유전자의 구조이상을 밝히는 RT-PCR법을 이용하여 림프절 미세전이를 더욱 민감하게 진단할 수 있게 되었다. Lockett등[24]에 의하면 RT-PCR은 백만개의 정상세포 중 존재하는 1개의 종양세포를 찾아낼 수 있는 매우 민감한 방법으로 조직학적 림프절 전이 음성 환자 중 48%에서 잠재 전이를 발견할 수 있으며 위 음성률 5% 이내에서 시행될 수 있다고 하였다.

액와림프절 미세전이를 진단하기 위해서는 정상림프절에서는 발현되지 않고 유방암세포에서만 높게 나타나는 이상적인 mRNA 표지자(marker)가 필수적이다. 현재 이용되는 유방암 mRNA marker로는 MUC1, keratin −18, 19, CEA 등이 있는데 MUC1 mucin

은 아포 당단백 골격(apomucin protein backbone)에 고도로 분지된 탄수화물(oligosaccharide)이 결합하여 형성된 분자량 300~450 kDa의 당단백으로서 유선, 침샘, 소화기관, 호흡기관 등의 선상피세포의 세포막에서 발견되며 정상 세포막 mucin은 세포-세포간 상호(cell-cell communication)에 필수적인 기능을 담당한다. 이러한 여러 인간 mucin의 중심 단백(core protein)인 MUC1-MUC7 등은 분자생물학적인 기법으로 밝혀졌으며 이들 mucin 유전자는 각기 다른 장기와 다른 세포들에서 각각 달리 표현되었다. MUC1은 염색체 1q21에 존재하는 MUC1 유전자에 의해 암호되어지며 이들 중심단백의 과생산이나 당단백에 붙어있는 탄수화물의 변성은 암세포의 기능이나 성장에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 믿어지며 비정상적인 glycosylation 등으로 인하여 MUC1이 암세포와 조직 내에 다량 축적되어 과표현되는 것을 볼 수 있다. MUC1 mRNA는 특히 유방과 췌장 조직에서 높게 발현되는 것으로 유방암에서 MUC1 mRNA의 발현은 주위 정상 선상피보다 10배 이상 높아 유방암의 종양 표식자로 잘 알려져 있다.[26~28]

Noguchi등[11]은 MUC1 mRNA가 정상 상피세포나 상피세포 종양인 유방암에서는 발현되나 비상피 세포인 림프절에서는 발현되지 않는 데서 착안하여 MUC1 mRNA RT-PCR을 이용한 림프절 미세전이 진단법을 시도하였다. 그들의 보고에 의하면 MCF-7 cell, 유방암조직 그리고 양성 질환에서 획득한 대조군 정상림프절들에서 각각 total RNA를 추출하여 RT-PCR을 시행한 결과 MCF-7 cell과 유방암 조직에서는 288 bp fragment의 MUC1 mRNA의 증폭을 볼 수 있었으나 정상 림프절에서는 나타나지 않았다고 하였다. 또한 MUC1 mRNA RT-PCR의 민감도를 알아보기 위해 기존의 면역조직화학 염색법과 비교하였는데 9예의 면역조직화학 검사상 양성인 림프절의 전예에서 MUC1 양성 소견을 보였고 41예의 면역조직화학 검사상 음성이었던 림프절 중 6예에서 MUC1 양성 소견을 보여 15% 정도의 미세전이 발견율 상승 효과를 가져와 미세전이 진단에 RT-PCR이 면역조직화학 염색법보다 더욱 민감한 방법임을 피력하였다

또 다른 상피세포 기원의 종양 표지자인 Cytokeratin 19를 이용하여 골수와 혈액 내 존재하는 유방암 세포를 찾기 위한 연구가 진행되어 왔는데[22,29~31] Datta등[29]은 keratin 19 mRNA RT-PCR법이 골수와 혈액내의 유방암 세포를 찾아내는 데 매우 민감하고 특이적인 방법이었다고 하였으며 민감도는 10개의 유방암세포/10^7 조혈세포였다고 주장하였다. Schoenfeld 등[31]은 원격전이의 증거가 없었던 유방암 환자를 대상으로 RT-PCR과 면역세포 검사를 비교하였는데 keratin 19 mRNA의 발현을 27/65 (42%)예의 골수에서와 20/75 (27%)의 말초혈관 내에서 볼 수 있었던 반면 면역세포검사 단독으로는 14/65 (22%)예의 골수와 4/75 (5%)예의 말초혈관에서 cytokeratin-19 양성세포를 검출하여 RT-PCR이 골수내 미세전이 진단에 더욱 민감하다고 하였다. Schoenfeld등[10]은 keratin 19 mRNA RT-PCR을 이용하여 병리조직학적 액와림프절 전이 음성으로 진단된 75예의 유방암 환자 중 23예(30.6%)에서 미세전이 양성으로 밝혀져 keratin 19 mRNA가 액와림프절 미세전이를 진단하는 데 유용한 방법이라고 결론을 내렸다.

그러나 이들의 획기적인 주장과는 달리 전혀 상반된 이론의 보고들로 인하여 그 유용성이 논란이 되어 왔는데 Krismann등[32]은 1994년 Datta등이 이용하였던 기시자(primer)를 이용하여 RT-PCR을 시행한 결과 keratin 19 mRNA의 발현을 정상인 대조군 골수의 38%에서, Lopez등[33]은 정상 대조군 말초혈액의 64% (n=34)에서 볼 수 있었다고 주장하며 이들 종양 표식자들의 비특이도를 강조하였다. Hoon등[25]은 RT-PCR과 Southern blot analysis로 정상림프절 8예 중 4예에서 MUC1 mRNA의 발현을 볼 수 있었다고 하였고 Mori등[34]은 정상 림프절에서 CEA 발현이 있었음을 보고하였다.

이렇듯 RT-PCR법의 가장 중대한 문제점인 위양성은 RT-PCR 증폭 조건의 차이, 기시자의 차이, Psudogene의 존재(CK19b) 등 여러 인자와 관련이 있는데 그중 이미 증폭된 DNA에 의한 오염이 가장 흔한 위양성의 원인으로 간주되고 있다. 이러한 오염을 막기 위해서 dTTP 대신 dUTP를 넣어서 uracil-N-glycosylase를 작용 후 고온 알칼리 조건하에서 인산에스테르 결합을 개열시켜 이미 증폭된 DNA를 분해해 버리는 방법이 있다. 또 다른 주요한 위양성의 원인은 림프절의 유방 정상조직의 상피 세포에 의한 오염이므로 림프절의 채취시 세심한 주의가 요구되어진다.[4] 이외에도 RT-PCR의 특이도를 향상시키기 위한 시도로 여러 연구가 시행되었는데 Field등[35]은 한번 PCR로 증폭된 DNA 단편을 한번 더 내부의

primer를 이용하여 증폭시키는 nested PCR법으로 비특이적인 증폭물을 배제하여 위양성을 줄일 수 있다고 보고하였고 Mori등[34]은 증폭횟수를 35회에서 20회로 낮추어 정상림프절에서는 CEA의 발현을 볼 수 없었다고 하였으며 Noguchi등[4]은 RT-PCR product를 Southern blot anaysis보다는 EtBr로 측정할 것을 주장하였는데 EtBr을 이용하는 것이 민감도는 낮았으나 미세전이 진단에 대한 특이도를 증가시켰다고 하였다.

또한 Eaton등[36]은 annealing temperature (Tm) 의존성 특이도를 주장하였는데 Datta등의 primer에 대한 68°C의 annealing temperature가 keratin 19 RT-PCR의 신뢰도를 증가시켰다고 하였으며 Zhong등[37]은 정상인의 골수와 말초혈액에서의 keratin 19에 대한 annealing temperature에 대한 연구에서 72°C의 온도에서는 전예에서 keratin 19 발현 음성을 보였고 63°C에서는 93.5%, 65°C에서는 48.1% , 68°C에서는 2.2%에서 keratin 19에 대한 양성 소견을 보여 72°C의 annealing temperature가 keratin 19 RT-PCR의 골수와 말초혈액 내 종양세포의 진단에 특이적으로 이용될 수 있다고 하였다. Bostick등[38]은 single marker assay보다는 multiple-marker assay가 민감도와 특이도를 더 향상시킬 수 있는 접근법이라고 주장하였다.

Noguchi등과 Schoenfeld등은 액와림프절 절제술 후 무작위로 림프절을 선택하여 RT-PCR을 시행하였다고 하였으며 Noguchi등은 만약 전 액와림프절에 대해 RT-PCR을 시행하였다면 미세전이 발견율을 2배 정도 향상시킬 수 있었을 것이라고 하였다. 사실 전 액와림프절에 대해 RT-PCR을 시행하는 것은 시간적, 경제적 소모가 필요하다는 단점을 가지고 있어 대부분의 연구들은 RT-PCR의 향상된 특이도를 인정하는 정도의 학문적인 가치에 의미를 부여할 수밖에 없었다.

그러나 1997년 Giuliano등[8]과 Turner등[9]은 유방암 환자에서 원발 종양으로부터 가장 전이 가능성이 높은 림프절이며 액와림프절의 조직 병리학적인 전이 여부를 가장 잘 예측할 수 있는 지표라고 보편적으로 인정된 감시 림프절(sentinel node)의 생검[39~41]을 시행하여 1개 혹은 2개 정도의 림프절에 집중적으로 면역조직화학 검사와 연속절편을 시행하고 분석함으로써 더욱 정확하고 효율적으로 림프절 미세전이를 진단할 수 있다고 보고하였다.

감시림프절 생검을 실시하고 이들을 대상으로 tumor marker RT-PCR 분석을 시행한 연구는 미미하여 아직 정립된 이론이 없으며 Min등[42]은 감시림프절을 대상으로 시행한 multiple tumor marker (mammoglobin, CEA) RT-PCR로 미세전이를 더욱 효율적으로 진단할 수 있을 것이라고 하였다.

저자들은 여러 가지 합병증의 원인이 되는 액와림프절 절제술을 생략할 수 있는 저위험군 환자들을 선별하는 노력을 경주해 왔는데 1 cm 이하 유방암 환자군에서 감시림프절 생검과 병리조직검사를 토대로 전이음성으로 확인될 경우 액와림프절 절제술을 생략할 수 있을 것이라고 생각하였다.[41] 그러나 수술 중 시행하는 동결절편 검사나 통상적 H&E 염색 병리조직검사의 결과만으로는 미세전이를 확인하기 어렵고 또한 우리나라의 실정에서 이들 결과만을 토대로 액와림프절 절제술을 생략하는 시술을 결정하기에는 아직 이르다고 판단하였다. 또한 액와림프절 전이는 전신 전이를 시사하는 소견이므로 보조 항암요법 치료가 필수적인 단계인데 병기의 하향조정으로 인한 조기유방암 치료실패의 주요한 원인 중 하나로 알려진 술후 보조 항암요법의 생략을 피하기 위하여 감시림프절에 대한 미세전이 여부를 확인하고자 하였다.

본 연구에서 병리조직학적으로 감시림프절 전이양성을 보인 1예를 제외하고 전이음성을 보인 14예에 대한 연속절편 검사상 1예에서 미세전이 양성으로 나타났으며 이를 포함한 2예에서 면역조직화학 검사상 미세전이 양성을 확인하였다. 면역조직화학 검사상 양성인 2예 모두 MUC1 mRNA 발현을 보였으며 6예의 면역조직화학 검사상 전이 음성군에서도 MUC1 mRNA 발현을 보여 미세전이 진단에 RT- PCR이 더욱 민감한 방법임을 알 수 있었다.

RT-PCR로 진단된 미세전이와 임상적, 병리조직학적 예후인자와의 관련여부에 대한 연구에서 Shoenfeld등[10]은 원발종양의 크기, 림프관 및 혈관 침범, 조직학적 분화도 등과 PCR로 진단된 미세전이와의 의미있는 관련성을 보고하였고 Noguchi등[43]은 원발종양의 크기와 종양세포의 림프관 침범은 관련이 있었으나 조직학적 유형이나 분화도, 에스트로겐 수용체 등과는 관련이 없었다고 하였으며 이러한 결과는 연속절편과 면역조직화학 염색검사법 등에 의해 진단된 미세전이 환자의 조직학적 특성과 일치하였다

고 하였다. 또한 림프절 전이가 매우 드문 것으로 보고되고 있는 DCIS 환자 14예 중 1예에서 keratin19 RT-PCR 양성 소견을 보였다고 하여 DCIS 원발종양에 대해서도 세심한 조직학적 분석을 함으로써 미세전이를 진단할 수 있을 것이라고 하였다. 본 연구에서는 큰 원발종양, progesterone 수용체 음성, p53 양성 등의 예후인자 등이 MUC1 mRNA RT-PCR로 발견된 미세전이와의 관련성을 보여주었으며 특히 1 cm 이상의 유방암 환자 중 66.7%, 2 cm 이상의 전예에서 액와림프절 미세전이가 있었음을 알 수 있었다. 이상의 결과들을 종합하여 보면 조직학적 전이음성으로 판정된 환자에 있어서 T1병변은 물론 그 이상의 환자에서도 미세전이의 존재여부에 대한 철저한 검사가 이루어져야 할 것이며 기존의 병기에 액와 림프절 미세전이 상태를 포함시켜 병기를 더욱 세분화함으로써 더욱 정확한 예후 예측과 병기의 상향조정에 따른 보조요법의 적용으로 조기유방암 치료 실패를 줄일 수 있으리라 생각된다.

결 론

기존의 병리조직학적 검사에서 전이음성으로 판정된 유방암 환자에 있어서 감시림프절 생검과 RT-PCR법의 병용은 1개 혹은 2개의 액와림프절에 대한 집중적인 분석을 가능하게 함으로써 시간과 비용의 절감은 물론 더욱 정확한 미세전이 진단이 가능하게 되었다. 특히 MUC1 mRNA RT-PCR에 의한 미세전이 진단은 면역조직화학 검사나 연속절편보다 훨씬 민감하였으며 keratin 19 RT-PCR은 비특이적이었음을 알 수 있었다. 이들 MUC1 mRNA RT-PCR에 의해 진단된 미세전이 양성은 원발 종양의 크기, p53, progesterone 수용체 등의 예후인자들과 유의한 관련성이 있음을 알 수 있었다. 추후 이러한 결과들을 토대로 병기를 세분화하고 상향 조정함으로써 정확한 예후 추정 및 적절한 술후 보조치료법의 적용에 의한 보다 높은 생존율을 기대할 수 있을 것으로 사료되며 1 cm 이하 유방암 환자에서 림프절 전이음성 환자를 더욱 정확히 선택함으로써 불필요한 액와림프절 절제술에 의한 술후 합병증의 빈도를 감소시킬 수 있으리라 생각된다.

REFERENCES

1) Giuliano AE, Kirgan DM, Guenther JM, Morton DL: Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. Ann Surg 220: 391, 1994
2) Guiliano AE, Dale PS, Turner RR, Morton DL, Evans SW, Krasne DL: Improved axillary staging of breast cancer with sentinel lympahdenectomy. Ann Surg 222: 394, 1995
3) Hellman S: Natural history of small breast cancer. J Clin Oncol 12: 2229, 1994
4) Noguchi S, Aihara T, Motomura K, Inaji H, Imaoka S, Koyama H: Detection of breast cancer micrometastasis in axillary lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Am J Pathol 148: 649, 1996
5) Fisher ER, Swonidoss S, Lee CH, Rockette H, Redmond C, Fisher B: Detection and significance of occult axillaty node metastasis in patients with invasive breast cancer. Cancer 42: 2025, 1978
6) Ludwig Trial, International Breast Cancer Study Group: Prognostic importance of occult axillary lymph node micrometastasis from breast cancers. Lancet 335: 1565, 1990
7) Mascarel I, Bonichon F, Coindre JM, Trojani M: Prognostic significance of breast cancer axillary lymph node micrometastases assessed by two special techniques: reevaluatin with longer follow-up. Br J Cancer 66: 523, 1992
8) Giuliano AE, Jones RC, Brennan M, Statman R: Sentinel lymphadenectomy in breast cancer. J Clin Oncol 15: 2345, 1997
9) Turner RR, Ollila DW, Krasne DL, Giuliano AE: Histopathologic validation of the sentinel lymph node hypothesis for breast carcinoma. Ann Surg 226: 271, 1997
10) Shoenfeld A, Luqmani Y, Sinnett HD, Shoushua S, Coombes RC: Keratin 19 mRNA measurement to detect micrometastasis in lymph nodes in breast cancer patients. Br J Cancer 74: 1639, 1996
11) Noguchi S, Aihara T, Nakamori S, Motomura K, Inaji H, Imaoka S, Koyama H: The detection of breast carcinoma micrometastases in axillary lymph nodes by means of reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Cancer 74: 1595, 1994
12) Stern L, Palatsides M, Kretser T, Ford M: Expression of the tumor-associated mucin MUC1 in an ovarian

tumor cell line. Int J Cancer 50: 783, 1992
13) Luqmani YA, Smith J, Coombes RC: Polymerase chain reaction-aided analysis of gene expression in frozen tissue sections. Anal Biochem 200: 291, 1992
14) Sugimachi K, Kitamura K, Matsuda H, Mori M, Kuwano H, Ide H: Proposed new criteria for early carcinoma of the esophagus. Surg Gynecol Obstet 173: 303, 1991
15) Adachi Y, Mori M, Matsushima T, Kido A, Shimono R, Inoue T, Sugimachi K: The distribution of lymph node metastasis in right sided colon cancer. J Clin Gastroenterol 19: 210, 1994
16) Carter CL, Allen C, Henson DE: Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. Cancer 63: 181, 1989
17) Gusterson B: Are micrometastases clinically relevant? Br J Hosp Med 47: 247, 1992
18) Trojani M, Mascarel I, Bonichon F, Delsol G: Micrometastases to axillary lymph nodes from carcinoma of breast: detection by immunohistochemistry and prognostic significance. Br J Cancer 55: 303, 1987
19) Lindemann F, Schlimok G, Dirschedl P, Witte J, Riethmuller G: Prognostic significance of micrometastatic tumor cells in bone marrow of colorectal cancer patients. Lancet 340: 685, 1992
20) Moll R, Lowe A, Laufer J, Franke WW: Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. Am J Pathol 140: 427, 1992
21) Bartek J, Taylor-Papadimitriou J, Miller N, Millis R: Patterns of expression of keratin 19 as detected with monoclonal antibodies in human breast tissues and tumors. Int J Cancer 36: 299, 1985
22) Traweek ST, Liu J, Battifora H: Keratin gene expression in non-epithelial tissues. Detection with poymerase chain reaction. Am J Pathol 142: 1111, 1993
23) Neville AM: Are breast cancer micrometastases worth detecting? J Pathol 161: 283, 1990
24) Lockett MA, Metcalf JS, Baron PL, O.Brien PH, Elliott BM, Robison JG, Cole DJ: Efficacy of reverse transcriptase-polymerase chain reaction screening for micrometastatic diseas in axillary lymph nodes of breast cancer patients. The Am Surg 64: 539, 1998
25) Hoon DS, Doi F, Giuliano AE, Schmid P, Conrad AJ: The detecton of breast carcinoma micrometastses in axillary lymph nodes by means of reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Cancer 76: 533, 1995
26) Yonezawa S, Sato E: Expression of mucin antigens in human cancers and its relationship with malignancy potential. Path International 47: 813, 1997
27) Ren L, Marquardt MA, Lech JJ: Estrogenic effects of nonylphenol on pS2, ER and MUC1 gene expression in human breast cancer cells-MCF-7. Chem Bio Interact 104: 55, 1997
28) Bon GG, Van Kamp GJ, Verstraeten RA, Von Mensdorff-Pouilly S, Hilgers J, Kenemans P: Quantificatio of MUC1 in breast cancer patients. A method comparison study. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 83: 67, 1999
29) 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 12: 475, 1994
30) Kruger W, Krzizanowski C, Holweg M, Stockschlader M, Kroger N, Jung R, Mross K, Jonat W, Zander AR: Reverse transcriptase/polymerase chain reaction detection of cytokeratin 19 mRNA in bone marrow and blood of breast cancer patients. J Cancer Res Clin Oncol 122: 679, 1996
31) Shoenfeld A, Kruger KH, Gomm J, Sinnett HD, Gazet JC, Sacks N, Bender HG, Luqmani Y, Coombes RC: The detection of micrometastses in the peripheral blood and bone marrow of patients with breat cancer using immunohistochemistry and reverse transcriptase polymerase chain reaction for keratin 19. Eur J Cancer 33: 854, 1997
32) Krismann M, Todt B, Schroder J, Gareis D, Muller KM, Seebers S, Schutte J: Low specificity of cytokeratin-19 reverse transcriptase-polymerase chain reaction analyses for detection of hematogneous lung cancer dissemination. J Clin Oncol 13: 2769, 1995
33) Lopez-Guerrero JA Bolufer P, Barragan E, Sanz Alonso M, Palau J, Sempere A, De la Rubia J, Bonanad S, Torregrosa MD: Levels of cytokeratin 19 expression in mononuclear blood cells evaluated using a reverse PCR. Snagre (Bare) 42: 441, 1996
34) Mori M, Mimori K, Inoue H, Barnard GF, Tsuji K, Nambaras, Ueo H, Akiyosh T: Detection of cancer micrometastses in lymph nodes by reverse transcriptase chain reaction. Cancer Res 55: 3417, 1995
35) Field 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 14: 1868,

1996

36) Eaton MC, Hardinham JE, Kotasek D, Dobrovic A: Immunobead RT-PCR: a sensitive method for detection of circulating tumor cells. Biotechniques 22: 100, 1997

37) Zhong XY, Kaul S, Diel I, Eichler A, Bastert G: Analysis of sensitivity and specificty of cytokeratin 19 reverse transcriptse/polymerase chain reaction for detection of occult breast cancer in bone marrow and leukapheresis products. J Cancer Res Clin Oncol 125: 286, 1999

38) Bostick PJ, Hynnh KT, Saranton T, Tarner RR, Qi K, Ginliano AE, Hoon DS: Detection of metastases in sentinel lymph nodes of breast cancer patients by multiple- marker RT-PCR. Int J Cancer 79: 645, 1998

39) 양정현, 남석진, 이병붕: 유방암 수술시 감시임파절 생검의 의의. 대한외과학회지 52: 940, 1997

40) 양정현, 이해경, 남석진: 유방암 환자 111예에서 액와림프절 전이상태 예측을 위한 감시림프절 생검법의 효용성. 대한암학회지 30: 951, 1998

41) 양정현, 이상달, 박해린, 남석진, 고영혜, 이희정, 김병태: 유방암에서 T_1 이하 병변에 대한 감시림프절 생검은 임상적 적용이 가능한가? 대한외과학회지 58: 29, 2000

42) Min CJ, Tafra L, Verbanac KM: Identification of superior marker for polymerase chain reaction detection of breast cancer metastases in sentinel lymph nodes. Cancer Res 58: 4581, 1998

43) Noguchi S, Aihara T, Motomura K, Inaji H, Imaoka S, Koyama H: Histologic characteristics of breast cancer with occult lymph node metastases detected by keratin 19 mRNA reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Cancer 78: 1235, 1996