

## 직장암의 CD44v 발현에 의한 골반 측방 림프절 전이의 검색

계명대학교 의과대학 외과학교실

배 옥 석

= Abstract =

### The Significance of CD44v Expression in the Pelvic Lateral Lymph Node in Distal Rectal Cancer

Ok Suk Bae, M.D.

*Department of Surgery, Keimyung University College of Medicine, Taegu, Korea*

The CD44 has been known a lymph node homing receptor on circulating lymphocytes. CD44 spliced variants have been found to be overexpressed in human cancers and meta-static cancers. The variant CD44v 6-7 in particular has been suggested to have a potential role in tumor metastasis. It has been reported that histopathological examination could occasionally miss lymph node micrometastasis. **Purpose:** The aim of this study was to investigate the role of CD44v in metastasis of rectal carcinoma to the pelvic lateral lymph nodes around the obturator nerve, obturator vessel and superior vesical artery. **Methods:** Thirty pelvic lateral lymph nodes reported normal histopathologically from 22 patients with rectal carcinomas, 22 rectal carcinomas and their corresponding colonic mucosas. We have used RT-PCR for the detection of CD44 gene products (CD44v and CD44 v6-7) in samples. **Results:** The expression rates of CD44v were 2/22 (9%) for normal colonic mucosa, 20/22 (90%) for cancer tissues, and 4/30 (13.3%) for pelvic lateral lymph nodes. The rates of CD44v6-7 were also 2/22 (9%) for normal colonic mucosa 20/22 (90%) for cancer tissues, but 7/30 (23.3%) for pelvic lateral lymph nodes. **Conclusions:** The analysis of CD44v might be useful for determination of pelvic lateral lymph nodes metastasis, but it should not be used as a metastatic marker in general for rectal cancer patients.

---

**Key Words:** Pelvic lateral lymph node, CD44v, CD44v6-7, Rectal cancer

---

책임저자: 배옥석, 대구광역시 중구 동산동 194, 계명대학교 동산의료원 일반외과(우편번호: 700-712)

(Tel: 053-250-7308, Fax: 053-250-7322, E-mail: oksukbae@dsmc.or.kr)

본 논문은 1996년도 동산의료원 특수과제(제안과제) 연구비에 의해 이루어졌음.

본 논문의 요지는 1997년도 추계 대한대장항문학회에서 발표되었음.

## 서 론

직장암에서 측방 골반 림프절 광청은 술기의 난해성 뿐아니라 수술시간이 상당히 지연되므로 술후 골반내 출혈의 위험성이 높다. 수술후에 광청한 외장골 내장골동맥사이의 폐쇄동맥, 폐쇄신경주위의 측방 림프절을 병리조직학적으로 검사한 결과 상당히 낮은 전이율을 보이고 있으므로 모든 허부 직장암에서 측방 림프절의 광청의 필요성에 대한 의문점이 발생된다.

림프절 전이가 극히 미세할 경우에 병리조직 검사에서 림프절 절단면에 따라 전이의 가음성의 결과를 초래할수 있으므로 종양의 유전자 발현을 이용하여 미세전이를 확인할 필요성이 있다. CD44 유전자는 lymphocyte homing receptor로 알려져 있으며 50 kilobase로 20개의 exon을 가지고 있고 이중 10개의 exon이 alternative splicing으로 이들 변이형이 종양 및 종양전이와 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 이 유전자의 발현을 이용하여 미세한 전이 즉 소량의 전이세포가 있어도 PCR을 이용하여 전이를 검색할 수 있다. CD44v와 Variant exon중 v6-7의 발현과 직장암 및 측방림프절간의 관계유무를 연구하여 이 유전자가 림프절 전이표지자로서의 사용가능성 유무를 검색하기 위한 목적으로 본 연구를 시작하였다.

## 대상 및 방법

1996년부터 1998년 8월까지 동산의료원 일반외과에서 한 외과외에 의해 수술받은 30세에서 60세 사이 허부 직장암환자 22예를 대상으로 수술 직후 직장암, 직장암 상연으로부터 10 cm 이상 떨어진 부위의 대장 정장점막조직과, 외장골, 내장골 동맥사이의 폐쇄동맥, 폐쇄신경과 상방광동맥주위의 측방 림프절 조직을 획득하여 Chomczynski-Sachi 방법으로 RNA를 분리하였고 RT-PCR 방법으로 CD44v발현을 확인하였다.

## 1) 각종 조직으로부터 RNA 추출

Chomzynski 및 Sacchi 방법에 따라 조직 약 400 mg을 guanidium isocyanate buffer와 혼합한 후 얼음에서 차게 하면서 ultraturax로 완전히 분쇄한 다음 phenol- chloroform- isoamylacohol을 혼합하여 제단백을 하고 원심한 후에 얼음에 1분간 둔후 원심분리하여 상층액을 추출하여 동량의 isoamylacohol을 첨가한 후  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간 이상 방치한 다음 원심, 침전시켰다. 상층액을 제거하고 남아있는 RNA 침전물(pellet)을 70% ethanol로 세척한 후 원심시키고 95% ethanol로 두번 세척한 후 speed-vac에서 건조시켰다. RNA 순도를 UV spectrometer에서 측정후 DEPC water를 부가하여  $2.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 되게 한후,  $-70^{\circ}\text{C}$  냉장고에 보관하였다.

2) CD44 유전자의 PCR을 위한 primer를 제작하였다(Table 1, Fig. 1).

## 3) 역전사 종합효소 연쇄반응(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)

각 조직의 RNA  $2.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$   $1 \mu\text{l}$ , M-MLV 5X RT buffer  $4 \mu\text{l}$ , 10 mM dNTP mixture  $4 \mu\text{l}$ , 40U/ $\mu\text{l}$  RNase Inhibitor  $1 \mu\text{l}$ , 200U/ $\mu\text{l}$  M-MLV Reverse Transcriptase  $1 \mu\text{l}$ , 50p olido-dT  $1 \mu\text{l}$ , DEPC treated  $\text{H}_2\text{O}$   $8 \mu\text{l}$  넣어 총량을  $20 \mu\text{l}$ 로 만든후, 반응조건은  $42^{\circ}\text{C}$  1분,  $99^{\circ}\text{C}$  5분,  $5^{\circ}\text{C}$  5분으로 하였다. PCR은 10X reaction bufferII  $2.5 \mu\text{l}$ , 25 mM  $\text{MgCl}_2$   $1.5 \mu\text{l}$ , 10 mM dNTP mixture  $2 \mu\text{l}$ , 10p primers (Table 1) 각  $0.5 \mu\text{l}$ , 역전사 반응시킨 cDNA  $1 \mu\text{l}$ , 10U Taq polymerase  $0.25 \mu\text{l}$ 를 넣어 DNA thermal cycler (Perkin-Elmer Corp.)를 사용하여 시행하였다(Fig. 2).

## 4) 자료분석

CD44v, v6-7의 RT-PCR 발현이 양성인 경우를 미세전이림프절로 판독하였으며 통계처리는 유의수준 0.05으로  $X^2$ , Z 검정을 하였다.



Table 2. Comparison of RT-PCR for CD44v and CD44v6-7 between normal colonic mucosa and rectal cancer tissue

	Normal colonic mucosa	Rectal cancer tissue	P-value
CD44v	2/22 (9.1%)	20/22 (90.9%)	0.000
CD44v6-7	2/22 (9.1%)	20/22 (90.9%)	0.000

Table 3. Comparison of RT-PCR for CD44v and CD44v6-7 between normal colonic mucosa and pelvic lateral lymph node reported normal histopathologically in rectal cancer patients

	Normal colonic mucosa	Pelvic lateral lymph node	P-value
CD44v	2/22 (9.1%)	4/30 (13.3%)	0.636
CD44v6-7	2/22 (9.1%)	7/30 (23.3%)	0.272

\*p=0.3174

\*There was no significant difference in lateral pelvic lymph node between CD44v and CD44v6-7 ( $p > 0.5$ ).

7과의 유의한 발현의 차이는 없었고( $p=0.3174$ ), 정상대장점막과의 비교에서도 유의한 차이가 없었다(Table 3).

## 고 찰

대장암 세포가 전이하기 위하여 내피세포층 표면(endothelial surface)으로부터 혈액내로 유입된 후 원위부에 이 종양세포가 착상할 수 있어야 한다. 이러한 과정에 여러 유착 유전자(adhesion molecule)의 역할이 이러한 종양세포의 전이에 영향을 줄 수 있다. CD44는 림프절 상피세포의 유착에 영향을 주어 림프구 재순환을 조장하는 세포표면 유착인자로 알려져 있으며 CD44 spliced variants는 그 길이가 120에서 250 kDa이고 10개의 exon으로 구성되어 있으며 주로 상피세포의 종양세포에서 발현이 되는 것으로 알려져 있다. 각 exon과 전이와의 관계에 대한 연구가 진행중이며 spliced CD44 isoforms은 부착된 side chain에 의해 그 역할 즉 전이와 관련된 기능이 다른 것으로 알려져 있다. Herrlich등<sup>1</sup>은 v6가 림프절 전이의 초기에 필요하고 운동성 기능보다는 v6를 통하여 림프절의 특정한 연결물질(ligand)에 부착되어 림프구나 종양세포가 림프절에 침습된 후 수출림프관을 통

하여 전신 순환하게 되고 종양세포는 특정부위나 림프절에 전이된다고 주장하였다.

CD44v6를 이용하여 전이검색 탐지자로서의 가능성에 대한 연구가 지속되어 왔다. Mulder등<sup>2</sup>은 CD44v6발현이 환자의 예후에 좋지 않은 결과를 가져오는 것을 보고했으며, Wielenga등<sup>3</sup>은 대장암의 Duke병기가 진행될수록 CD44v6의 발현율이 높고 Duke A, B 환자에게서 발현의 정보는 환자의 예후 예측에 크게 도움을 줄 것으로 주장하였다.

Duke B 또는 Duke C 대장암 환자를 외과적으로 근치한 후에도 여전히 대장암의 전이에 의한 재발사망률을 보이고 있는 것은 술후 단순히 병리검사에 의한 종양병기를 정하는 것이 부적절할 수도 있는 것을 시사한다. 직장암 수술시에 대동맥 전방, 상직장혈관, 하장간막 동맥 주변의 림프절은 비교적 용이하게 광청할 수 있으나 양측 측방향 림프절의 광청은 많은 시간을 요할 뿐 아니라 때로는 술후 출혈에 대한 위험율이 있을 수 있다. 저자는 측방향 림프절을 광청한 환자 78예 중 5예(6.4%)의 출혈을 경험하였으며 이중 3예는 출혈에 의한 재수술을 시행하였다.

正木등<sup>4</sup>은 직장암의 측방 림프절전이는 직장 S 상부암은 1~2%, 상부직장암은 4%, 하부 직장암

은 5~8%로 보고했다. 저자는 직장 S상부암 8예에서 0/8 (0%), 상부 직장암에서 2/52 (3.8%)의 낮은 전이율을 확인하였다.

림프절의 미세전이 검색을 위하여 Oberg<sup>5</sup>은 Duke A, B 병기의 환자에서 anticyto-keratine antibody를 이용하여 병리조직검사로 전이가 확인이 안된 림프절의 미세전이를 확인한 결과 결과보다는 직장암에서 많으며 이 전이가 환자의 생존율에 영향을 주지 않고 예후 예측탐지자로서의 효용성이 없음을 주장하였다. 면역조직화학방법에 의하여 전이검색을 하는 것은 조직의 절단면에 따른 가음성의 가능성이 높다. 이러한 단점을 보완하기 위하여 검사하고자 하는 조직내의 미세한 전이 세포의 검색을 위해서는 PCR이 더 정확한 것으로 사료된다.

종양세포에서 PCR에 의한 발현율이 높은 CD44v를 이용할 경우 각종 조직의 매우 적은 수의 전이 세포의 검색이 가능하리라 생각되어 CD44v와 CD44v6-7을 이용하여 하부 직장암환자의 골반 측방 림프절의 미세전이검색을 시도하였다.

CD44v와 CD44v6-7의 발현율이 정상 림프절조직에서 13.3%, 23.3%로 각각 높게 발현이 되었지만 통계적인 유의한 차이를 보이지 않으므로 림프절 전이 검색용으로 이 유전자를 사용하는 것은 부적절한 것으로 사료된다. CD44v6-7이 CD44v보다도 발현율은 높지만 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않으므로 다른 exon 부위의 발현율에 대한 연구는 잔존 암세포와 대장암 수술후 암재발검사에 도움을 줄 것으로 생각된다. Guo<sup>6</sup>은 환자의 혈청내 soluble CD44v 농도가 종양환자의 종양과 전이의 탐지자가 될 수 있을 뿐아니라 종양절제후에 soluble CD44v의 혈청내 농도가 감소하는 것을 발표하므로 수술정확도와 술후 재발에 대한 탐색자의 가능성을 시사해주고 있으나 저자의 경우 직장암환자의 혈액에서 CD44v의 발현을 확인할 수가 없었다. 혈액에서 이 유전자의 발현은 이미 종양 절제시에 미세전이가 가능성을 시사하고 있는 것으로 생각된다. 저자의 실험에서 CD44v

의 가양성이 RT-PCR에서는 10%정도로 낮게 발현이 되었지만 차후 즉이성과 감수성이 높고 값싸고 간편한 전이 탐지자의 개발이 필요할 것이다.

## 결 론

정상 골반 측방 림프절 미세전이 검색에서 CD44v와 CD44v6-7의 발현율이 13.3%, 23.3%로 각각 높게 발현이 되었고 CD44v6-7이 CD44v보다 발현율은 높으나 통계적으로 유의한 차이가 없으므로 CD44v 뿐아니라 CD44v6-7의 발현검사가 림프절의 미세전이 검색에는 도움이 될 수 있으나 림프절 전이 검색용으로 이용하는 것은 부적절한 것으로 사료된다.

## REFERENCES

1. Herrlich P, Zoller M, Pals ST, Ponta H. CD44 splice variants: metastases meet lymphocytes. *Immunol Today* 1993; 14: 395-9.
2. Mulder JWR, Kruyt PM, Sewnath M, Oosting J, Seltenrijk CA, Weidema WF, et al: Colorectal cancer prognosis and expression of exon-v6-containing CD44 proteins. *Lancet* 1994; 344: 1470-2.
3. Wielenga VJM, Heider KH, Offerhaus JA, Adolf GR, Berg van den FM, Ponta H, et al. Expression of CD44 Variant proteins in Human colorectal cancer is related to tumor progression. *Cancer Res* 1993; 53: 4754-6.
4. 正木忠彦, 武藤澈一郎, 安富正幸: 대동맥주위 림프절 전이의 실태, 제44회 대장암연구회 양케트조사보고. *일본대장항문병학회지* 1997; 50: 318-30.
5. Öberg A, Stenling R, Tavelin B, Lindmark G. Are lymph node micrometastases of any clinical significance in Dukes Stages A and B colorectal cancer. *Dis Colon and Rectum* 1998; 41: 1244-9.
6. Guo YJ, Liu G, Wang X, Jin D, Wu M, Ma J, et al. Potential use of soluble CD44 in serum as indicator of tumor burden and metastasis in patients with gastric or colon cancer. *Cancer Res* 1994; 54: 422-6.
7. Seiter BS, Arch R, Reber S, Komitowski D, Hofmann M, Ponta H, et al. Prevention of tumor metastasis formation by Anti-Variant CD44. *J Exp Med* 1993; 177: 443-55.