

## 우측 대장암 환자 문맥혈에서의 Cytokeratin 19 및 20의 발현

아주대학교 의과대학 외과학교실

김 흥 · 김봉완 · 김혜진 · 서광욱

### Detection of Cytokeratin 19 and 20 in Portal Bloods in Right Colon Cancer Patients

Hong Kim, M.D., Bong Wan Kim, M.D., Hye Jin Kim, M.S., Kwang Wook Suh, M.D.

Department of Surgery, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea

**Purpose:** We planned this prospective study to detect tumor cells in portal venous blood during a curative operation for colon cancer and to identify its clinical implications.

**Methods:** From August to December 1998, we collected portal venous blood (10 ml) during curative operations on 20 patients with colon cancer. Cytokeratin (CK) 19 and 20 transcripts were amplified using a reverse transcriptase-PCR assay. As a negative control, 10 ml of portal blood from 10 patients who underwent benign surgery were assayed. The HCT-116 colon cancer cell line was used for the positive control. All patients were closely followed until May 2003 (mean follow-up: 55 months).

**Results:** CK 19 was positive in 17 (85.0%) patients, and CK 20 was positive in 6 (30.0%) patients. However, CK 19 was also detected in 8 (66.7%) control patients, whereas CK 20 was negative in all control patients. CK 20 was found to be more relevant to the pathologic stage. During the follow-up period, liver metastases were found in 3 patients (50%) who had shown CK 20 in their portal bloods.

**Conclusions:** CK 20 is found to be more specific than CK 19 in the detection of epithelial cells from portal blood. Moreover, CK 20 is related to the stage and was predictive of hepatic metastases in 50% of the patients with colon cancer. With further accumulation of cases, the prognostic significance of CK 20 for hepatic metastases may be better evaluated. *J Korean Soc Coloproctol* 2003;19:322-326

**Key Words:** Cytokeratin, Reverse transcriptase polymerase chain reaction, Colonic neoplasms, Portal vein 역전사 다중효소중합 반응, 사이토케라틴 19, 20, 문맥, 결장종양

책임저자: 서광욱, 경기도 수원시 팔달구 원천동 산 5  
아주대학교 의과대학 외과학교실(우편번호: 442-749)  
Tel: 031-219-5208, Fax: 031-219-5755  
E-mail: kwsuh@ajou.ac.kr

### 서 론

최근 중합효소 연쇄 반응(Polymerase chain reaction, PCR) 기법이 발전함에 따라 암 환자의 말초 혈액 내에서 암 세포 표지자들을 찾고자 하는 연구가 활발히 이루어지고 있다. 특히 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase-PCR, RT-PCR) 기법의 발전으로 혈액 내에 존재하는 극미량의 RNA를 이용하여, 종양 표지자의 존재여부를 더욱 민감하게 찾아낼 수 있게 되었는데 이런 연구들의 궁극적인 목표는 말초 혈액 내에서 암세포 표지자의 발현 유무를 검색함으로써, 이것이 예후에 어떤 영향을 미치는가를 확인하는 것이다. 대장암의 경우, 간 전이가 대표적인 원격전이의 형태이므로, 말초 혈액보다는 문맥혈에서의 대장암 세포의 존재여부를 검색하는 것은 임상적으로 중요한 의의를 가진다.<sup>1</sup> 그러나 문맥혈을 이용한 암세포 표지자의 검색을 시도한 연구 자체가 많지 않고, 또한 검사실 간에 표준화된 방법이 없어, 해석하는 데 있어 차이가 있어서 상호호환의 여지가 아직 부족하다. 저자들은 대장암의 근치적 수술 중 종양을 손대기 전에 문맥혈을 채취하여, 역전사 중합효소 연쇄 반응기법으로, 상피세포 표지자로 알려진 Cytokeratin (CK) 19와 20의 존재여부를 측정하고, 이것이 임상적으로 어떤 의의를 가지는가를 분석하기 위하여 본 연구를 시행하였다.

### 방 법

#### 1) 문맥혈액의 채취 및 대장암 세포주

1998년 8월부터 같은 해 12월까지 우측 및 횡행 결장암으로 근치적 절제가 가능하였던 20명의 환자를 대상으로 정중 절개로 개복한 후 종양을 만지기 전에 각각 10 ml의 문맥혈을 채취하였다. 문맥은 소장의 일부를 박리하여 소낭(lesser sac)으로 진입한 후 간십이지장 인대의 좌측에서 확인하였으며, 20개이지 바늘로

천자한 후 헤파린을 담은 30 ml 주사기로 채취하였다. 천자 직후 혈관벽 세포가 오염될 것을 막기 위해, 처음 5 ml의 혈액은 채취하지 않았다. 지혈은 면 스폰지로 천자부위를 약 3분간 압박하였으며, 출혈 등의 합병증은 관찰되지 않았다. 음성 대조군으로서, 양성질환(담낭 절제술 5예, 십이지장 궤양 천공 수술 3예 외상성 소장 천공에 대한 소장 절제술 2예)에 대한 개복수술을 시행하던 10예에서 문맥혈을 같은 양(10 ml) 채취하였으며, 혈액은 Ficoll-Paque (Pharmacia)를 이용하여 400 g에서 30분간 원심분리한 후 단핵세포층을 분리하여 RNA추출할 때까지 -70°C에 보관하였다. 양성 대조군으로서, 대장암세포주인 HCT 116 (서울대학교 암연구소 한국세포주은행)을 이용하였으며, 10%의 FBS가 첨가된 RPMI 1640에서 배양하였다.

2) RNA의 분리

TRIzol (GIBCO BRL, Eggenstein, Germany)을 이용하여 total RNA를 추출하였다. 107개의 세포를 TRIzol 1 ml에 균질화시킨 후 5분간 방치한 다음 0.2 ml의 chloroform 첨가후 12,000 g에서 15분간 원심분리하였다. 상층액을 80% 정도 취하여 동량의 isopropanol을 가한 다음 10분간 방치 후 위와 같이 원심분리하여 상층액을 버렸다. RNA 침전물을 75% 에탄올(ethanol) 1 ml로 세척한 다음 잘 말린 후 DEPC 처리된 3차 증류수를 가하여 55초에서 10분간 방치 후 섭씨 -70도에서 보관하였다. 추출한 RNA의 양과 순도는 260 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다.

3) Oligonucleotide primer

RT-PCR과 nested PCR에 사용된 primer는 Fig. 1과 같다.

4) RT-PCR과 nested PCR

CK19와 CK20의 검출은 Reverse transcription (RT)-PCR과 nested PCR의 두 단계로 나뉘어 수행하였다. RT-PCR의 최종용적을 30μl로 하였으며 RT-PCR 반응액(50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 0.1% Triton X-100, 200μm dNTP, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM DTT, 2.5 unit AMV transcriptase, 0.25 unit taq polymerase, 10 unit RNasin, 25 pmole external primer)에 약 1μg의 RNA를 첨가한 뒤 PCR증폭기(Perkin Elmer 9600)를 이용하여 42°C에서 한 시간 반응시켜 cDNA를 합성하고 denaturation (1분), annealing (CK19, CK20, 1.5분), extension (2분)을 한 cycle로 하여 35cycle을 실시하였고 마지막 extension은 10분간 수행하였다. 그 시료 중 2μl를 다시 취하여 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 0.1% Triton X-100, 200μm dNTP, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25 unit taq polymerase, 25 pmole internal primer의 반응액 20μl을 denaturation (1분), annealing (CK19, CK20, 1.5분), extension (2분)을 한 cycle로 하여 35 cycle 실시하였고 마지막 extension은 10분간 수행하여 nested PCR을 하였다. 세포에서 적절한 mRNA가 분리되었는지 확인하기 위하여 표지자로 모든 세포에서 발현되는 actin을 사용하였다. 분리한 total RNA에서 RT-PCR을 시행하여 전 예에서 actin을 확인하였다.

5) 전기 영동 및 증폭 확인

2% agarose gel에서 100 volt로 전기영동 후 ethidium bromide로 염색한 후 자외선 투조(illumination)하에서 사진을 찍었다.

6) 환자의 추적 관찰

CK19 external sense: 5'--AGGTGGATTCCGCTCCGGGCA--3' antisense:  
 5'--GCTCGAGGGACAGGAAGAT--3' internal sense:  
 5'--GACATGCGAAGCCAATATGAGG--3'antisense:  
 5'--GCTGCCTTGAAGACACACT--3'

CK20 external sense: 5'--ATGGATTTTCAGTCGCAGA--3' antisense:  
 5'--ATGTAGGGTTAGGTCATCAAAG--3' internal sense:  
 5'--TCCAACCTCCAGACACACGGTGAACATG--3' antisense:  
 5'--CAGGACACACCGAGCATTTTGCAG--3'

βactin sense: 5'--CACTGTGTTGGCGTACGGT--3' antisense:  
 5'--TCATCACCATTGGCAATGAG--3'

Fig. 1. Oligonucleotide Primer used in RT-PCR and nested PCR.

20예의 대장암 환자 모두, TNM 병기 2 및 3기로 진

단되었으며, 전 예 모두 5-fluorouracil 및 folinic acid regimen으로 총 6주기의 전신 항암화학 요법을 시행하였다. 수술일로부터 2003년 5월까지(평균 추적기간 55개월, 53~57개월 범위) 추적관찰하였으며 수술 후 3개월마다 혈중 암 태아항원(carcinoembryonic antigen)을 측정하고, 1년마다 흉부 단순촬영과 복부 전산화 단층촬영을 2년마다 대장 조영술을 각각 시행하여 재발 및 원격전이 여부를 관찰하였다. 변수에 따른 관찰값 차이에 대한 유의성은 student *t*-test로 검정하여 P값이 0.05 미만인 것을 의미있는 것으로 간주하였다.

결 과

1) CK19 및 20의 양성률

대장암 환자 문맥혈에서 CK19의 양성률은 85.0% (17/20), CK20의 양성률은 30.0% (6/20)이었다. 양성 대조군인 HCT-116 세포주에서는 CK 19와 20이 모두 양성이었다. 음성 대조군인 양성질환자의 문맥혈의 CK19

의 양성률은 80.0% (8/10)이었던 반면 CK20 양성률은 0%로, CK19의 위양성률이 높음을 확인할 수 있었다 (Table 1).

2) CK 양성률과 병기, 암 분화도 및 크기와의 상관관계

환자의 TNM 병기와 CK19 및 CK20의 양성률을 비교하면, CK19 양성예 17예 중 10예가 병기 II(59%)였고, 7예(41%)가 병기 III이었다(P=0.113). 그러나 CK 20 양성예 6명의 경우는 1예(16.7%)가 병기 II였고, 5예(83.3%)가 병기 III으로 관찰되어 병기가 높아질수록 발현율이 증가함을 알 수 있었다(P<0.05, Table 1). 20 예 모두 중등도의 분화도(moderately differentiated)를 보인 선암이였으며, CK19 양성 예의 평균 종양의 최대 직경은 4.4±2.0 cm CK 19 음성 예의 평균 종양 최대 직경은 4.9±1.6 cm CK 20 양성 예의 평균 종양의 최대 직경은 4.2±2.3 cm CK 20 음성 예의 평균 종양 최대 직경은 4.7±1.3 cm으로 Cytokeratin 발현율과 종양

Table 1. Follow-up result of 20 patients

Case No.	CK19 (portal blood)	CK20 (portal blood)	TNM stage	Distant metastases			
				Liver	Lung	Peritoneal	Paraortic
1	+	-	II	-	-	-	-
2	+	-	II	-	-	-	-
3	+	+	I	-	-	-	-
4	-	-	II	-	-	-	-
5	+	+	III	+	-	-	-
6	+	-	II	-	-	-	-
7	-	-	II	-	-	-	-
8	+	+	II	-	-	-	-
9	+	-	III	-	-	-	-
10	+	-	II	-	-	-	-
11	+	-	II	-	-	-	-
12	+	-	II	-	-	-	-
13	+	+	III	-	-	-	-
14	-	-	II	-	-	-	-
15	+	+	III	+	-	+	+
16	+	-	II	-	-	-	-
17	+	-	III	-	-	-	-
18	+	-	III	-	-	-	-
19	+	+	III	-	-	-	-
20	+	-	II	-	-	-	-

TNM = tumor, node, metastasis.

의 크기 간에는 유의한 상관관계가 관찰되지 않았다( $P > 0.05$ ).

### 3) 추적 관찰

대장암 환자 20예들에 대하여, 술 후 최소 53개월부터 최대 57개월까지 추적한 결과(평균 추적기간, 55개월), 3예에서 원격전이가 진단되었으며, 전이 장기는 3예 모두 간이었으며, 그중 1예에서는 복막 전이와 대동맥주위 림프절로의 전이가 동반되었다. 간 전이가 진단된 3예 모두 문맥혈에서의 CK 19와 20양성이었던 예로서 문맥혈에서의 CK 19 및 CK 20의 양성률과 원격 전이와의 상관관계는 각각 17.6% (3/17)와 50.0% (3/6)로 측정되었다(Table 1).

## 고 찰

대장암환자에서 골수나 림프절로의 미세전이 여부는 역전사 중합효소 연쇄 반응(RT-PCR)을 통해 연구되어 왔으며, 이는 암의 병기와 상관관계가 있다고 보고된 바 있다.<sup>2-5</sup> 그러나 이런 소견이나 말초혈액에서 발견되는 암 세포의 존재 등이 원격전이를 예측할 수 있는 지표인가에 대해서는 아직 확실한 연구결과가 없는 것이 현실이다.<sup>6-10</sup> 본 연구는 말초 혈액이나 골수보다 임상적으로 대장암의 원격전이와 더욱 유관한 문맥혈을 채취하여 기존 연구들에서 알려진 예민한 상피세포 탐지자로서 CK 19과 20의 mRNA를 측정하여 특히 간전이와의 상관 관계를 관찰하는 것이 주목적이었다.

본 연구의 결과 대장암 환자 문맥혈에서의 CK 19 mRNA 양성률은 85.0% (17/20), CK 20 mRNA의 양성률은 30.0% (6/20)으로 CK20이 낮아 보이지만 음성 대조군인 양성질환자의 문맥혈에서의 발현율과 비교하면 CK19 mRNA이 위양성률이 높아 CK 20 mRNA가 특이도가 높은 검사라는 것을 알 수 있었다. 문헌을 통해 보고된 바에 따르면, 문맥혈에서 채취하여 측정된 CK 19 mRNA의 보고는 없으나, 장간막정맥에서 채취한 혈액에서 보인 양성률은 29%로 보고되어 있으며,<sup>11</sup> CK 20 mRNA는 75.9%로 보고된 바 있다.<sup>12</sup> CK 20 mRNA가 특이도가 높음에도 불구하고 감수성이 낮은 점에 대해서는 검사의 기술적 문제로도 설명할 수 있는데 그것은 RT-PCR이 매우 감수성이 높은 검사이기 는 하지만 CK 20 mRNA가 탐지역치가(detection threshold)에 가까운 농도를 지닐 경우 RT-PCR을 위한 준비과정, 즉 RNA 추출과정에서 소실됐을 가능성이

있을 것으로 설명할 수 있다.

CK 19 mRNA가 비교적 높은 위양성률을 그리고 CK 20 mRNA가 비교적 높은 위음성률을 각각 가질 가능성이 있어 이 두 가지 검사를 동시에 시행하고 더 많은 증례에 대한 연구를 통해 좀 더 완벽에 가까운 결과를 기대할 수 있을 것으로 생각된다. CK19의 높은 위양성률은 아직 그 원인에 대해 확실한 연구 결과는 없으나, 변칙적인 전사가 다량 이루어졌을 가능성과 문맥혈 내 상피세포의 존재 가능성이 있다고 생각된다.<sup>6</sup> Cytokeratin은 원발암으로부터 지속적인 방출보다는 간헐적으로 방출되기 때문에 여러 번 채취하는 것이 위음성을 줄이는 방법이 될 것으로 생각된다. 이후의 연구에서는 근치 수술 중 암 종괴를 조작하기 전과 후 등 일정한 시간간격을 두고 문맥혈을 채취하는 방법 등을 통해 위음성률을 최소화하는 것이 중요하다고 생각된다. 또한 대장암의 근치적 절제 후 재발한 환자의 약 2~4%에서 간전이 없이 폐전이가 올 수 있기 때문에<sup>13,14</sup> 문맥혈과 말초혈액에서의 상피세포 표지자를 동시에 측정하는 것도 바람직할 것으로 생각된다.

본 연구의 결과로 보면 환자의 TNM 병기와 특히 CK20의 양성률이 직접적인 상관관계를 보였는데 아직 적은 수의 증례이기 때문에 단정적으로 말할 수는 없지만 병기가 높아질수록 대장암 세포의 방출률도 증가한다는 것은 충분히 이론적으로도 설명될 수 있었다. 향후의 연구에서는 더 많은 증례에 대한 결과는 물론 종괴의 최대 직경이나 주위 조직으로의 침윤정도, 그리고 전이 림프절 개수 등과의 상관관계도 같이 조사하는 것이 바람직할 것으로 생각되었다.

연구 대상 환자 20예에 대하여, 술 후 최소 53개월부터 최대 57개월까지 추적한 결과, 문맥혈에서의 CK 20 양성이었던 6예 중 3예에서 간 전이가 진단되어 50%의 예측률을 관찰할 수 있었다. 양성예의 수가 아직 적어서 50%라는 수치의 의미는 약하지만 CK 20이 발현되지 않은 14예에서는 원격전이 특히 간 전이가 관찰되지 않아 특이도 면에서 의미를 찾을 수 있었다. 아직 적은 수의 증례에 대한 연구 결과여서 이 결과가 CK 20 발현여부가 간 전이에 대한 유의한 예후인자인가에 대해서는 결론을 내리기 어렵지만 아직 많은 문헌들이 말초혈액이나 골수 등에서 CK 20을 확인한 것과 원격전이와의 상관관계를 발견하지 못한 사실들을 볼 때, 본 연구의 양성 결과는 향후 더 많은 증례에 대한 연구를 계획하기에 충분하였다.

결론적으로 대장암 환자에서 근치 수술 중 문맥혈을 채취하여 측정된 상피세포 존재 여부에 대한 검사

에서 CK19보다 CK20가 특이도가 높은 검사이며, CK20은 병기와 직접적인 상관관계를 보였고 최장 57개월간 대상환자들을 추적관찰한 결과 CK 20 양성 예의 50 %에서 간 전이가 진단되어 비교적 높은 예측률을 가짐을 알 수 있었다. 향후 더 많은 증례에 대한 검사를 통해 문맥혈에서의 CK20 발현 여부가 간 전이에 대한 의미있는 예후인자인가에 대한 연구가 시행되어야 할 것이다.

결 론

근치적 절제가 가능했던 우측 대장암환자의 문맥정맥에서 혈액 내에 있는 대장암 세포의 탐지방법으로서 cytokeratin mRNA를 RT-PCR법으로 측정한 결과 CK 20 mRNA가 CK 19 mRNA보다 특이도가 높은 표식자로 측정되었으며 CK 20은 CK 19보다 TNM병기와 직접적인 상관관계를 보였고 대상환자들을 추적관찰한 결과 CK 20 양성 예의 50%에서 간 전이가 진단되어 비교적 높은 예측률을 가짐을 알 수 있었다. 향후 더 많은 증례에 대해서 종양 크기, 분화도, 침윤 정도 등 암의 여러 특성들과의 상관관계를 분석함으로써 문맥혈 내에서의 CK 20 발현 여부가 간 전이에 대한 의미있는 예후인자인가에 대한 연구가 시행되어야 할 것이다.

REFERENCES

1. Tien YW, Lee PH, Wang SM, Hsu SM, Chang KJ. Simultaneous detection of colonic epithelial cells in portal venous and peripheral blood during colorectal cancer surgery. *Dis Colon Rectum* 2002;45:23-9.
2. 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.
3. Liefers GJ, Cleton-Jansen AM, van de Velde CJ, Hermans J, van Krieken JH, Cornelisse, et al. Micrometastases and survival in stage II colorectal cancer. *N Engl J Med* 1998;339:223-8.
4. Yasuda K, Adachi Y, Shiraishi N, Yamaguchi K, Hirabayashi Y, Kitano S. Pattern of lymph node microme-

5. Noura S, Yamamoto H, Ohnishi T, Masuda N, Matsumoto T, Takayama O, et al. Comparative detection of lymph node micrometastases of stage II colorectal cancer by reverse transcriptase polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 2002;20:4232-41.
6. Bustin SA, Gyselman VG, Williams NS, Dorudi S. Detection of cytokeratins 19/20 and guanylyl cyclase C in peripheral blood of colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 1999;79:1813-20.
7. Wong IH, Yeo W, Chan AT, Johnson PJ. Quantitative relationship of the circulating tumor burden assessed by reverse transcription-polymerase chain reaction for cytokeratin 19 mRNA in peripheral blood of colorectal cancer patients with Dukes' stage, serum carcinoembryonic antigen level and tumor progression. *Cancer Lett* 2001;162:65-73.
8. Wong IH, Yeo W, Chan AT, Johnson PJ. Quantitative correlation of cytokeratin 19 mRNA level in peripheral blood with disease stage and metastasis in breast cancer patients: potential prognostic implications. *Int J Oncol* 2001;18:633-8.
9. Wyld DK, Selby P, Perren TJ, Jonas SK, Allen-Mersh TG, Wheeldon J, et al. Detection of colorectal cancer cells in peripheral blood by reverse-transcriptase polymerase chain reaction for cytokeratin 20. *Int J Cancer* 1998;79:288-93.
10. Bustin SA, Dorudi S. Molecular assessment of tumour stage and disease recurrence using PCR-based assays. *Mol Med Today* 1998;4:389-96.
11. Fujita S, Kudo N, Akasu T, Moriya Y. Detection of cytokeratin 19 and 20 mRNA in peripheral and mesenteric blood from colorectal cancer patients and their prognosis. *Int J Colorectal Dis* 2001;16:141-6.
12. Luo C, Li S. The detection and its clinical significance of cancer cells in portal vein blood of patients with colorectal carcinoma. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 1999;37:214-5.
13. Goldberg RM, Fleming TR, Tangen CM, Moertel CG, Macdonald JS, Haller DG, et al. Surgery for recurrent colon cancer: strategies for identifying resectable recurrence and success rates after resection. Eastern cooperative oncology group, the north central cancer treatment group, and the southwest oncology group. *Ann Intern Med* 1998;129:27-35.
14. Berman JM, Cheung RJ, Weinberg DS. Surveillance after colorectal cancer resection. *Lancet* 2000;355:395-9.