

유방암 환자의 말초혈액 및 골수에서 Cytokeratin-20 검출의 의의

고려대학교 의과대학 외과학교실 및 ¹병리학교실

민연기 · 김남렬 · 강석형 · 조성진¹ · 김한겸¹ · 배정원 · 구범환

The Significance of Cytokeratin-20 Detection in Peripheral Blood and Bone Marrow of Breast Cancer Patients

Youn Ki Min, M.D., Namryeol Kim, M.D., Seok Hyung Kang, M.D., Seong Jin Cho, M.D.¹, Han Kyeom Kim, M.D.¹, Jeoung Won Bae, M.D. and Bum Hwan Koo, M.D.

Purpose: It is very important to detect hematogenous spread of cancer cells early in breast cancer patients in order to properly determine the prognosis and adjuvant therapy. In this study, we attempted to detect Cytokeratin-20 (CK-20) as a mRNA marker of cancer cells in peripheral blood and bone marrow using the reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR).

Methods: We obtained peripheral blood and bone marrow from 41 breast cancer patients who had been treated by Korea University Hospital. Using the RT-PCR method, we detected the CK-20 and compared the positive detection rate and concordance rate between two sources. Furthermore, we analysed the correlation with other known prognostic and predictive factors.

Results: The CK-20 detection rate was 36.5% in peripheral blood and in bone marrow. The concordance rate between both sources was 56%. In CK-20 detection, there was no significant correlation seen between peripheral blood and bone marrow ($p > 0.05$). Additionally, there were no statistically significant correlations found between the other predictive factors (ER, PR, p53 protein expression, nm23 protein expression). Six cases who were CK-20 positive and were detected in both (peripheral blood, bone marrow) source showed advanced stage and axillary lymph node metastasis ($p < 0.05$).

Conclusion: The detection of CK-20 in peripheral blood and bone marrow correlated with stage and axillary nodal status. Therefore, this may suggest poor clinical prognosis if CK-20

is detected in both sources in a breast cancer patient. The RT-PCR assay for detection of CK-20 is a very sensitive method, however the standardization and quality control of the RT-PCR method are important and multi-center trials are required. (J Korean Surg Soc 2001;61:259-265)

Key Words: Micrometastasis, Cytokeratin-20, Breast cancer, Prognostic factor, RT-PCR

중심 단어: 미세전이, 싸이토케라틴-20, 유방암, 예후인자, 역전사 중합효소반응

Departments of Surgery and ¹Pathology, Korea University Medical College, Seoul, Korea

서 론

유방암을 포함한 대부분의 악성 종양에 있어서 최근까지 진단 및 치료의학의 많은 발전에도 불구하고 기존의 진단방법과 병기 결정 방법에서 누락되는 혈행성 원격전이와 미세 전이는 암으로 인한 사망률을 크게 줄이지 못하는 주된 이유가 되고 있다. 수술 직후 특별히 원격전이가 발견되지 않으며 원발 종양이 유방 또는 액와 림프절에만 국한된 유방암 환자에 있어서도 특별한 부가적 치료(Adjuvant therapy)를 하지 않은 경우 약 30~40%에서 원격 전이가 발생하는데 가장 기본적인 원인으로 원발 종양 발생 당시 이미 종양세포의 원격확산으로 인한 것으로 생각된다.(1) 유방암에 있어서 골격계는 가장 흔한 원격전이 장소로 자주 가장 먼저 전이가 발견되는 곳이기도 하다.(2) 그리고 여러 연구들에 의하면 골수에서의 미세 전이의 발현은 조기재발과 생존율을 감소시키는 경향을 보여 주고 있다.(3-5) 따라서 이러한 혈행성 원격전이와 미세 전이를 조기에 발견하려는 여러 가지 형태의 진단방법이 시도되고 있으며 그중 대표적인 것이 종양표지물질 혹은 암세포를 말초혈액 혹은 골수, 또는 액와 림프절에서 찾아내어 조기에 원격전이를 발견하거나 예측하려는 노력들이 있었으며 이러한 것들을 찾아냄으로써 좀더 적극적인 수술 후 보조적 치료를 결정하거나, 예후를 정확히 예측하려는 지표로 사용할 수 있을 것이다. 이러한 혈행

책임저자 : 배정원, 서울시 성북구 안암동 5가 126-1
☎ 136-705, 고려대학교 의과대학 일반외과학교실
Tel: 02-920-5305, Fax: 02-928-9231
E-mail: kujwbae@unitel.co.kr

접수일 : 2001년 8월 9일, 게재승인일 : 2001년 9월 25일
2001년 춘계외과학회 구연.

성 미세 전이를 확인할 수 있는 한 표지자로서 Cytokeratin-20 (이하 CK-20)은 상피세포의 세포골격을 구성하는 intermediate filament protein의 일종으로 조혈세포에는 존재하지 않으며 염증성 질환 등, 양성 유방질환에서는 검출되지 않고 정상인의 혈행 내에 존재하지 않는 것으로 알려져 있어 상피 세포에서 기원한 암세포의 혈행 내 존재를 알 수 있는 것으로 알려져 있다.(6-8) 저자들은 이러한 CK-20을 역전사 중합효소반응(Reverse transcriptase polymerase chain reaction: RT-PCR)을 이용 같은 환자의 말초 혈액과 골수모두에서 검출을 시도하여 각 검체간의 일치율을 비교하고 기존의 알려진 예후인자들과 비교하여 그 의미를 알아보고자 하였다.

방 법

1) 대상 환자

고려대학교 안암병원에서 2000년 1월부터 12월까지 1년간 유방암으로 진단받고 수술받은 환자 중 수술당시 이미 원격전이가 확인되었거나 다른 의료기관에서 절제 생검 등의 수술을 받아 원발 종양이 남아 있지 않는 환자 등을 제외한 41명의 환자를 대상으로 하였다. 대상 환자의 평균연령은 49.3±8.8세이었고 최소연령 35세에서 최고 연령 72세까지 분포하였다. 조직학적 분류로 침윤성관암이 33예(80%)로 가장 많았고, 관내상피암이 3예(7.3%), 화생암이 3예(7.3%), 침윤성엽상암이 1예(2.4%), 침윤성유두암이 1예(2.4%)이었다. TNM 병기체계에 의한 병기별로는 DCIS 및 LCIS 등의 0기 암이 3예, I기가 3예, IIa 및 IIb를 포함한 II기가 29예, IIIa 및 IIIb를 포함한 III기가 6예이었다(Table 1).

2) 방법

(1) 검체 채취 및 역전사 중합효소반응(RT-PCR): 검체

로 사용한 말초혈액은 수술 직전 환자의 antecubital vein을 천자하여 채취하였으며 피부천자 시 피부의 상피세포 오염을 최소화하기 위하여 천자 후 흡인된 최초의 혈액 수 ml를 버린 후 다음 10 cc의 혈액을 채취하여 EDTA 처리된 용기에 담아 주위에 얼음을 채운 후 즉시 검사실에 보내어졌으며, 골수 혈액은 유방암 수술을 위한 전신마취 하에서 Silverman needle을 이용 흉골을 천자하여 골수혈액을 채취하였다. 이후의 조작은 말초혈액과 동일하게 하였다.

다음으로 Total RNA 분리를 위하여 0.5 ml의 말초 및 골수 혈액을 0.5 ml의 TRI REAGENT (MRC Ind., Cincinnati, OH, U.S.A.)로 희석한 후 시약제작사의 프로토콜에 따라 전체 RNA를 분리한 후 0.2 ml의 chloroform을 가해 단백질을 제거하고, 4°C 온도에서 20분간 14,000 G로 원심 분리하여 상등액을 취해 새 tube에 옮겨 담은 후 RNA 추출을 위해 0.3 ml의 isopropanol을 첨가하였다. 추출된 RNA는 70% 에탄올로 수세 후 건조시킨 다음 diethylpyrocarbonate 처리된 증류수에 녹인 후 -20°C에 보관하였다. 다음은 RT-PCR 과정으로서 50 ng의 RNA추출물을 0.02 mM의 deoxynucleotide triphosphate (dNTP), 25 ng/μL의 oligodithiothreitol (dT), 2 unit/μL RNAsin 그리고 5 μL의 5 배 reverse transcriptase reaction buffer 혼합물과 반응시켜 cDNA를 합성한 후 Table 1의 Cytokeratin-20 primer를 이용 증폭시켰다. 이때의 PCR condition으로 95°C에서 5분간 1 cycle의 denaturing 과정을 거친 후 95°C에서 1분간씩 35 cycle, 55°C에서 1분간, 72°C에서 1분간, 72°C에서 5분간의 마지막 cycle을 두 차례 반복하였으며 5~8 μL의 aliquots PCR 생산물을 2% agarose gels 상에서 전기영동을 시행한 다음 bromide 염색 후 자외선 불빛 하에서 검사하여 판독하였다. 최초 Cytokeratin-20 PCR 산물은 349-bp의 띠를 나타내었으며 두 번째 PCR 산물은 303-bp의 띠를 나타내었

Table 1. Patient characteristics (n=41)

Mean age	49.3±8.8 years old
Pathologic type	
Infiltrating ductal carcinoma	33 (80.0%)
Metaplastic carcinoma	3 (7.3%)
DCIS (ductal carcinoma in situ)	3 (7.3%)
Invasive papillary carcinoma	1 (2.4%)
Invasive lobular carcinoma	1 (2.4%)
Stage	
0	3 (7.3%)
I	3 (7.3%)
II	29 (70.7%)
III	6 (14.6%)

Table 2. The primer sequence of beta-microglobulin and synthetic oligonucleotide primers of CK-20 RT-PCR

mRNA Primers 5'-3'	Product size (bp; base pair)
Beta-microglobulin	
F: TGA CGG GGT CAC CCA CAC TGT GCC	281 bp
R: CTA GAA CCA TTG GGG TGG ACG ATG	
CK-20	
(First PCR)	
F: CAG ACA CAC GGT GAA CTA TGG	349 bp
R: GAT CAG CTT CCA CTG TTA GAC G	
(Second PCR)	
F: CTG TTT GTT GGC AAT GAG AAA ATG G	303 bp
R: GTA TTC TCT CAG TCT CAT ACT	

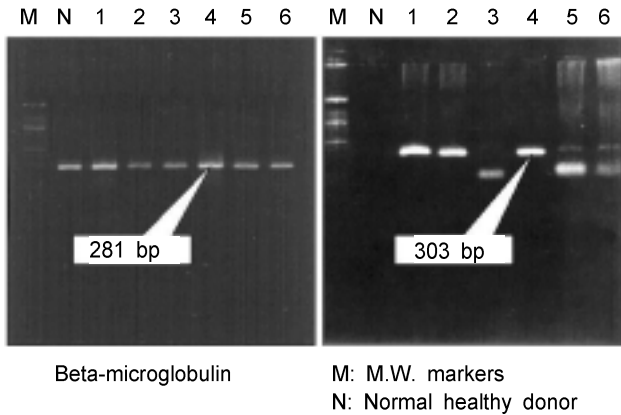


Fig. 1. Pictures of electrophoresis results showing the 281 bp size beta-microglobulin (Lt.) and the 303 bp size CK-20 RT-PCR gene product (Rt.).

다. 이러한 PCR 과정의 적절성을 검증하기 위해서 281-bp 의 beta-microglobulin primer를 이용하였다(Table 2)(Fig. 1).

(2) Cytokeratin-20 검출에 따른 다른 종양 특성들과의 관련성 비교: 각 환자의 말초혈액 및 골수 혈액의 CK-20 검출 양성과 음성으로 판정한 후 말초혈액과 골수 혈액의 CK-20 검출의 일치율을 구하였으며, 말초혈액 CK-20 양성(이하 “말초양성”), 골수혈액 CK-20 양성(이하 “골수양성”), 말초 및 골수 혈액 모두 CK-20 양성(이하 “모두 양성”), 말초 및 골수 모두 CK-20이 검출되지 않은 군(이하 “모두 음성”)의 네 군으로 나누어 CK-20이 검출된 검체에 따른 유방암의 병기, 조직 타입, 액와 림프절 전이유무, 에스트로겐 및 프로게스테론 수용체, nm23 단백질 발현과의 관련성을 비교하였다. 에스트로겐 및 프로게스테론 수용체, 그리고 nm23 단백질 발현은 종양 조직의 파라핀 포매조직에 대한 각각의 단클론항체(monoclonal antibody)를 이용한 면역조직 화학염색법(immunohistochemical stain)을 이용하여 검출하였다.

3) 통계처리

CK-20의 검출에 따른 다른 종양 특성들과의 연관성 비교는 Chi-Square test를 통해 검증하였으며 p 값이 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의한 관련성이 있는 것으로 판정하였다. 이러한 모든 통계처리는 SPSS 9.0 P.C.용 통계프로그램을 이용하였다.

결 과

1) 말초혈액과 골수의 Cytokeratin-20 검출률(Table 3)

CK-20은 말초혈액에서 41명 중 15명에서 검출되어 36.5%의 검출률을 보였다. 골수 혈액 역시 41명 중 15명(36.5%)에서 검출되었으나 말초혈액과 골수 혈액에서 동일한 결

Table 3. The comparison between bone marrow and peripheral blood in CK-20 detection

		Bone marrow		
		Negative	Positive	Total
Peripheral blood	Negative	17 (41.4%)	9 (21.9%)	26 (63.4%)
	Positive	9 (21.9%)	6 (14.6%)	15 (36.5%)
Total		26 (63.4%)	15 (36.5%)	41 (100%)

Concordance rate of CK-20 detection between peripheral blood and bone marrow: 56% (p>0.05).

과를 보인 경우는 모두 양성을 보인 6예(14.3%), 모두 음성을 보인 18예(42.9%)를 포함한 24예로서 57.2%의 일치율을 보였으며 말초혈액과 골수 혈액에서의 CK-20의 검출은 서로 유의한 상관관계가 없었다(p>0.05).

2) 각 검체에서 CK-20 검출에 따른 다른 예후인자와의 상관성(Table 4)

두 검체 모두에서 양성 검출된 예는 병기 II에서 2예, 병기 III이 4예이었다. 병기 0 또는 I기 환자에서는 두 검체 모두에서 CK-20이 검출된 예는 없었다(Fig. 2). 그리고 CK-20이 두 검체 모두에서 검출되었던 6예는 모두 액와 림프절 전이를 보였다(Fig. 3). 에스트로겐 수용체 음성환자 14명 중 8명(57.1%)에서 CK-20은 모두 음성을 보였고, 말초혈액에서 1예(7.1%), 골수에서 3예(21.4%), 말초 및 골수 모두에서 양성 발현을 보인 예는 2예(14.3%)였고 에스트로겐 수용체 양성 발현을 보인 27명 중 9예(33.3%)에서는 모두 음성을 보였고 8예(30.3%)에서는 말초혈액에서만, 6예(22.2%)에서는 골수에서만 양성 발현을 보였으며 4예(14.8%)에서는 말초혈액 및 골수 모두에서 양성 발현을 보였다. 그리고 에스트로겐 수용체 발현에 따른 CK-20 발현의 차이는 없었다(p>0.05). 프로게스테론 수용체 음성을 보인 15예 중 두 검체 모두 CK-20 음성인 예는 10(66.7%)이었고, 1예(6.7%)에서 말초혈액에서, 3예(20.0%)에서는 골수에서 양성 발현을 보였으며 1예(6.7%)에서는 말초 및 골수 모두에서 양성 발현을 보였다. 프로게스테론 수용체 양성을 보인 26예 중 말초 및 골수모두 음성인 예는 7예(26.9%), 말초혈액에서 8예(30.8%), 골수에서 6예(23.1%), 말초혈액 및 골수 모두에서 검출된 예는 5예(19.2%)로 프로게스테론 수용체의 발현과 CK-20의 검출은 연관성이 없었다(p>0.05). p53 단백질 발현 음성인 17예 중 7예(41.2%)는 모두 음성을, 4예(23.5%)는 말초혈액에서, 5예(29.4%)는 골수에서만 양성 발현을 보였고 모두 양성 발현을 보인 예는 1예(5.9%)이었다. p53 단백질 양성 발현을 보인 24예 중 모두 음성 검출을 보인 예는 10예(41.7%),

Table 4. The correlation with other prognostic factors according to CK-20 detected source

Factors	CK-20 detected in				p-value
	Both negative (n=17, 41.5%)	PB (n=9, 22.0%)	BM (n=9, 22.0%)	Both positive (n=6, 14.6%)	
Pathologic type					
Infiltrating ductal (n=33)	13 (39.4%)	8 (24.2%)	5 (15.1%)	6 (18.1%)	NS
DCIS (n=3)	1 (33.3%)	1 (33.3%)	1 (33.3%)		
Metaplastic (n=3)	2 (66.7%)		1 (33.3%)		
Invasive papillary (n=1)			1 (100%)		
Invasive lobular (n=1)	1 (100%)				
Stage					
0 (n=3)	1 (33.3%)	1 (33.3%)	1 (33.3%)		0.014
I (n=3)		1 (33.3%)	2 (66.7%)		
II (n=29)	15 (51.7%)	6 (20.7%)	6 (20.7%)	2 (6.9%)	
III (n=60)	1 (16.7%)	1 (16.7%)		4 (66.7%)	
Axillary node metastasis					
Negative (n=19)	7 (36.8%)	6 (31.6%)	6 (31.6%)		0.039
Positive (n=22)	10 (45.5%)	3 (13.6%)	3 (13.6%)	6 (27.3%)	
ER receptor expression					
Negative (n=14)	8 (57.1%)	1 (7.1%)	3 (21.4%)	2 (14.3%)	NS
Positive (n=27)	9 (33.3%)	8 (29.6%)	6 (22.2%)	4 (14.8%)	
PR receptor expression					
Negative (n=15)	10 (66.7%)	1 (6.7%)	3 (20.0%)	1 (6.7%)	NS
Positive (n=26)	7 (26.9%)	8 (30.8%)	6 (23.1%)	5 (19.2%)	
p53 protein expression					
Negative (n=17)	7 (41.2%)	4 (23.5%)	5 (29.4%)	1 (5.9%)	NS
Positive (n=24)	10 (41.7%)	5 (20.8%)	4 (16.7%)	5 (20.8%)	
nm23 protein expression					
Negative (n=10)	3 (30.0%)	3 (30.0%)	4 (40.0%)		NS
Positive (n=31)	14 (45.1%)	6 (19.3%)	5 (16.1%)	6 (19.3%)	

NS = not significant; PB = peripheral blood; BM = bone marrow; ER = estrogen receptor; PR = progesteron receptor.

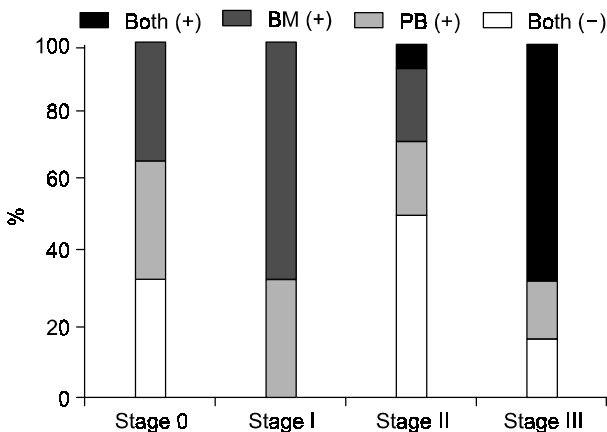


Fig. 2. The composition of CK-20 detected sources according to stage (PB = peripheral blood, BM = bone marrow).

말초혈액에서만 검출된 예는 5예(20.8%), 골수에서만 검출된 예는 4예(16.7%)이었으며 5예(20.8%)에서는 말초 및 골수 모두에서 CK-20이 검출되었다. 하지만 이 역시 통계적으로 의미 있는 차이는 아니었다($p > 0.05$). nm23 단백질 발현 음성인 10예 중 모두 음성인 예는 3예(30.0%) 말초 양성인 예는 3예(30.0%), 골수 양성인 예는 4예(40.0%)이었으며 모두 양성인 예는 없었다. nm23 단백질 발현 양성인 31예 중 14예(45.1%)는 모두 음성, 6예(19.3%)는 말초혈액에서만, 5예(16.1%)에서는 골수에서만 검출되었으며 모두 양성을 나타내었던 6예(19.3%)에 있어서는 모두 nm23 단백질 발현을 나타내었다. 하지만 이 역시 CK-20의 발현과는 연관성이 없었다($p > 0.05$). Table 4에서 보는 바와 같이 CK-20이 검출된 검체에 따라 조직학적 유형의 차이, 호르몬 수용체 발현유무, p53 단백질 발현유무, nm23 단백질 발현상태 등은 차이를 보이지 않았으나, 병기와 액와 림프절 전

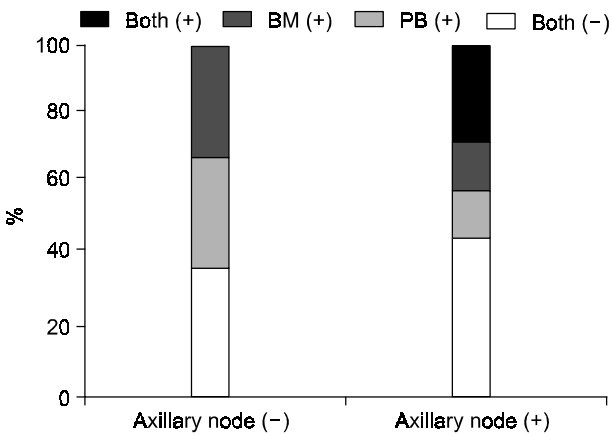


Fig. 3. The composition of CK 20 detected source according to axillary lymph node status. All of the both positive cases were included in axillary node metastasis group (PB; peripheral blood, BM: bone marrow).

이 상태는 각 군에 따라 서로 유의한 차이를 보였다($p=0.014, 0.039$). (Table 4) 그리고 모두 양성검출을 보인 환자군(both positive)과 나머지 환자군(both negative, 말초 양성, 골수 양성)을 비교하였을 때 병기와 액와 림프절 전이 상태의 유의한 차이를 볼 수 있었다($p=0.000, p=0.005$). 하지만 말초 양성(PB)과 골수 양성(BM)인 환자 군을 비교하였을 때 두 군간 병기 및 액와 림프절 전이 상태의 유의한 차이를 볼 수는 없었다. 골수 혹은 말초, 어느 한 검체에서만 CK-20 검출이 된 경우, 검출되지 않은 군과 림프절 전이 및 병기에 있어서 유의한 차이를 보이지 않았다.

고 찰

다른 암들과 마찬가지로 유방암 환자에 있어서 기존의 병기결정 방법이나 일반적인 진단방법에서 누락되는 수술당시의 미세 원격전이의 존재는 암으로 인한 사망의 주된 원인이 되고 있다. 따라서 이러한 혈행성 미세 원격전이를 조기에 진단할 수 있다면 좀더 정확한 병기와 예후를 결정할 수 있으며 그에 따른 보조적 치료선택에 있어서 중요한 지표가 될 수 있을 것이다. 형태학적 방법, 유세포 분석(flowcytometry), 세포 유전학적 방법 등 다양한 방법을 통해 유리된 암세포를 감지하기 위한 많은 시도가 이루어져 왔으나 대부분의 이러한 방법들은 민감도와 특이도가 떨어지며 시간이 많이 걸리는 단점들로 인해 사용이 제한되었다.(9) 종양과 관련된 단 클론 항체를 이용한 면역조직화학염색법은 이러한 단점을 많이 개선시켰으나 여전히 관찰자의 경험에 의한 차이를 보이며 종양항원을 표현하고 있는 면역세포와도 교차반응을 나타내어 이용하는데 제한 사항이 되고 있다.(10,11) 최근의 새로운 시도로 종양 특이 DNA 서열 이상부위를 중합효소반응(PCR)

을 통해 증폭시키는 방법이 사용되고 있다. 이러한 RT-PCR 방법은 면역조직화학염색법에 비하여 빠르고 좀더 쉽게 자동화 할 수 있으며 표준화가 가능한 특성이 있어 좀더 일상적인 검사방법으로 적용하기에 용이하며 이론적으로 좀더 민감하다는 장점이 있다.(12) 그러나 이러한 PCR 방법은 생존 가능한 종양세포의 DNA 서열 이상뿐만 아니라 생존가능하지 않은 종양세포의 DNA 조각까지도 발현시킨다는 단점이 있다.(13) 그리고 유방암에 있어서는 종양 특이적 DNA 이상이 알려져 있지 않다.(11) 그러므로 혈 중 유리된 유방암 세포를 찾아내기 위해서는 정상 혈구세포에서는 발현되지 않는 유방조직 특이 mRNA에 초점을 맞추어야 하며 양성 역전사 중합 효소반응(RT-PCR)은 mRNA의 불안정성으로 인해 살아 있는 암세포의 존재를 나타낸다.(13) 이러한 RT-PCR의 mRNA marker로 이용할 수 있는 조직 특이 mRNA로는 상피세포의 세포골격을 이루는 intermediate filament protein의 일종인 Cytokeratin family로 정상 유 세포 및 암세포에서 발현되며 기타 다른 상피세포와 상피세포에서 유래한 암세포에서 발현되는 것으로 알려져 있다.(14) 그중 Cytokeratin-20 역시 intermediate filament protein의 한 종류로서 암이 존재하지 않는 환자의 혈액 내에서는 발현되지 않는 mRNA marker로 알려져 있다. 그러므로 말초혈액 혹은 골수를 채취하여 CK-20 mRNA marker를 RT-PCR 방법을 통해 검출함으로써 유리 암세포의 존재를 확인할 수 있다.(6-8) 상피세포 특이적 mRNA 추출을 위한 검체로 가장 많이 사용되는 것은 말초혈액과 골수이다. 말초혈액은 환자로부터 혈액을 채취하기 쉽고 원발 종양의 전이 과정에서 혈중으로 종양세포가 유리되기 때문에 매우 유용한 검체이다. 하지만 Zippelius와 Pantel(15)의 종설에 의하면 유리된 종양 세포는 매우 빨리 소실되며 이는 혈 중에서 제거되거나 아니면 목표장소에 착상됨을 의미하고 많은 문헌들이 말초혈액에서 RT-PCR에 의한 상피세포기원의 mRNA marker 검출은 낮은 임상적 민감도를 보이는 것으로 보고하는 반면에 골수는 유방암에 있어서 전이가 잘 되는 장소이며 과행된 종양 세포가 골수에서 발현될 경우 임상적 의미가 큰 것으로 보고하고 있다. 연구자에 따라 골수를 채취하는 장소가 상이한데 Lee 등(16)은 골수혈액을 장골에서 채취하였으나 저자들은 전신마취 하에서 유방암에 대한 수술 시작 직후 흉골쪽으로 피관을 만든 후 흉골을 천자하여 골수혈액을 채취하였다. 따라서 골수천자로 인한 통증과 환자의 불안감 등 스트레스를 최소화할 수 있었다. 그리고 이로 인한 합병증은 발생하지 않았다. 저자들은 본 연구에서 동일한 환자에 있어서 말초혈액과 골수의 CK-20 검출 양상이 어떻게 나타나는지에 대하여 관심을 갖고 연구를 시작하였으며 실험 결과, 두 검체 모두에서 CK-20이 검출되지 않은 경우 17예(41.2%)와 두 검체 모두에서 검출된 경우는 6예(14.6%)를 포함하여 56%의 낮

은 일치율(concordance rate)을 보였다. 그리고 골수 및 말초혈액에서의 CK-20 검출은 서로 유의한 상관관계를 나타내지 않았다($p > 0.05$). 다른 문헌에 의하면 CK-20과 함께 Cytokeratin의 일종인 CK-19는 유방암 환자의 골수와 말초에서 RT-PCR에 의한 검출방법에 의해 66%의 일치율을 보였다고 보고된 바 있다.(17) 저자들의 연구 결과에 있어서 말초혈액과 골수에서의 CK-20 검출률은 각각 36.5%로 비슷하였으나 골수는 혈행 내 존재하는 암세포가 농축되어 걸러지는 역할을 하기 때문에 일반적으로 말초혈액에 비해 검출률이 높게 나타나는 것으로 알려져 있으며 특히 유방암에 있어서 골 전이가 많은 이유이기도 한 것으로 알려져 있다.(17) 또한 최근의 연구에 의하면 림프종 진단에 있어서도 말초혈액에 비하여 골수에서 혈액을 채취하는 것이 좀더 정확한 것으로 결론짓고 있다.(18) 본 연구에서 골수 혹은 말초혈액 어느 한 검체에서의 CK-20 검출과 종양의 병기와는 통계적으로 의미 있는 관련성을 찾을 수 없었으나 골수 및 말초혈액 모두에서 CK-20이 검출되었던 6명의 환자는 TNM 병기상 0기나 I기에서는 없었고 병기 II, III의 환자로서 상대적으로 높은 병기에서 볼 수 있었다. 본 연구 결과 의외로 관내 상피암 3예 중 말초혈액에서 1예, 골수 혈액에서 1예씩 CK-20이 양성 검출되었다 하지만 골수와 말초혈액 모두에서 검출된 예는 없었다. 이와 유사하게 CK-19를 통해 유방암의 미세 전이에 관해 연구했던 Schoenfeld 등(16)의 연구에서도 관내상피암 환자의 골수에서 CK-19가 검출되었던 예를 보고하였으며 그 환자에 있어서 광범위 절제를 한 조직에서 미세 침윤(micro-invasion)을 발견할 수 있었다고 보고하고 있다. 액와 림프절 전이 유·무와 CK-20의 검출과의 관계에 있어서 골수와 말초혈액 각각의 CK-20 검출과 액와 림프절 전이 유·무는 통계적으로 유의한 상관관계를 증명할 수 없었으나 두 검체 모두에서 CK-20이 검출되었던 6명은 모두 액와 림프절 전이 양성인 환자들이었으며 이러한 결과는 높은 병기와 림프절 전이가 있는 진행된 유방암 환자에 있어서 골수 및 말초혈액 모두에서 CK-20이 검출되는 경향을 보인다고 생각된다. 골수 및 말초혈액에서 발견되는 유리 암세포가 모두 전이종양으로 성장하는 것은 아니며 유리된 종양세포의 대다수는 모세혈관에서 제거되고 다음으로 림프절, 폐, 간 등에서 제거되며 이를 통과한 극소수의 종양세포 중에서 전이에 적합한 세포 군이 존재할 때 실제 임상적 의의가 있는 전이종양으로 성장하는 것으로 알려져 있다.(19,20) Bae 등(21)은 말초혈액에서 CK-20 검출에 관한 연구를 통해 ER 음성인 유방암 환자에서 양성환자에 비해 말초혈액의 CK-20 검출률이 높으며 PR, p53 단백 및 nm23 단백발현에 따른 말초혈액의 CK-20 검출률은 통계적으로 의미 있는 차이를 보이지 않는다고 보고하였으나 본 연구에서는 골수 및 말초혈액에서의 CK-20 검출 양상과 ER, PR 등 호르몬수용체와 p53

단백발현, nm23 단백발현과의 연관성을 보여 주지 않았다. 하지만 면역화학염색법을 통한 Cytokeratin family의 검출을 통해 골수 미세 전이에 관하여 연구한 많은 보고들(4,5)에 있어서 골수 미세 전이와 종양의 크기, 맥관 침범, 림프절 상태 등과 서로 상관관계를 보인다고 보고하고 있고 국내환자를 대상으로 한 Lee 등(16)은 CK-19의 검출을 통한 골수 미세 전이와 병리 조직학적 유형, 종양크기, 핵등급, 림프절 전이 상태, 에스트로겐 수용체 발현 유무 모두 유의한 상관관계가 없는 것으로 보고하였다. CK-20 검출과 다른 예후인자들과의 상관성에 관해서는 좀더 많은례를 대상으로한 연구를 통해서만 결론을 내릴 수 있을 것으로 생각된다. Braun 등(22)은 Cytokeratin에 대한 단클론항체를 이용한 면역화학염색을 통해 골수에서 미세 전이를 확인하였던 환자에서 낮은 무병생존율과 전체 생존율을 보고한 바 있으나 본 연구에서 사용된 RT-PCR 방법은 면역화학염색법에 비하여 민감도가 우수한 검사방법으로서 이를 통한 CK-20의 검출로 확인된 말초혈액 및 골수의 유리 암세포의 존재가 조기 재발 및 원격전이 등 실제 환자의 예후에 미치는 영향에 대해서는 장기간의 추적관찰을 통한 보고가 아직 없으며 향후 좀더 많은 환자를 대상으로 장기간의 추적관찰이 필요할 것이다.

결 론

혈행 내의 유리 암세포의 존재를 확인하기 위한 방법으로 RT-PCR은 매우 민감한 방법으로서 골수 및 말초혈액의 CK-20은 서로 비슷한 정도의 검출률을 보였으며 두 검체간의 일치율은 약 51%로 높지 않아 골수 또는 말초혈액 어느 한 검체에 대한 검사만으로 다른 검체에 대한 검사를 대체할 수 없다고 생각되어지며, 골수 및 말초혈액 모두에서 CK-20이 검출된 예들은 TNM 병기상 II, III의 진행된 병기에서 나타났고 모두 액와 림프절 양성이었다. 따라서 두 검체 모두에서 CK-20이 검출된 경우 기존의 나쁜 임상적 예후인자와 상관성을 보인다. 그러나 이러한 결과에 따른 생존율과 무병생존율 등 예후에 미치는 영향은 장기적 추적 관찰을 통해 확인되어야 할 것이다. 그리고 이에 사용되는 RT-PCR은 매우 민감한 검사법이나 처리 과정의 미세한 차이에 의해서도 결과가 매우 다르게 나타날 수 있어 그 방법상의 표준화가 이루어져야 하며 여러 연구기관에서 같은 시도가 이루어지는 것이 중요하다 하겠다.

REFERENCES

- Schlimok G, Riethmuller G. Detection, characterization and tumorigenicity of disseminated tumor cells in human bone marrow. *Semin Cancer Biol* 1990;1:207-15.

- 2) Osborne MP, Rosen PP. Detection and management of bone marrow micrometastases in breast cancer. *Oncol* 1994;8:25-31.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) Mansi JL, Easton D, Berger U, Gazet J-C, Ford HT, Dearnaley D, et al. Bone marrow micrometastases in primary breast cancer: prognostic significance after 6 years' follow up. *Eur J Cancer* 1991;27:1552-5.
- 6) Bae JW, Choi KH, Kim HK, Park SH. The detection of circulating breast cancer cells in peripheral blood by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Korean Med Sci* 2000;15:194-8.
- 7) Burchill SA, Bradbury MF, Pittman K, Southgate J, Smith B, Selby P. Detection of epithelial cancer cells in peripheral blood by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Br J Cancer* 1995;71:278-81.
- 8) 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 micrometastases in the lymph nodes and blood of breast cancer patients. *J Clin Oncol* 1998;16:2632-40.
- 9) Eltahir EM, Mallinson DS, Birnie GD, Hagah C, George WD, Purushotham AD. Putative markers for the detection of breast carcinoma cells in blood. *Br J Cancer* 1998;77:1203-7.
- 10) 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.
- 11) Johnson PWM, Burchill SA, Seiby PJ. The molecular detection of circulating tumour cells. *Br J Cancer* 1995;72:268-76.
- 12) Goeminne JC, Guillaume T, Symann M. Pitfalls in the detection of disseminated non-hematological tumor cells. *Ann Oncol* 2000;11:785-92.
- 13) Mori M, Mimori K, Ueo H, Tsuji K, Shiraish T, Barnard GF, et al. Clinical significance of molecular detection of carcinoma cells in lymph nodes and peripheral blood by reverse transcription-polymerase chain reaction in patients with gastrointestinal or breast carcinomas. *J Clin Oncol* 1998;16:128-32.
- 14) Fuches E, Weber K. Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem* 1994;63:345-82.
- 15) Zippelius A, Pantel K. RT-PCR based detection of occult disseminated tumor cells in peripheral blood and bone marrow of patients with solid tumors: an overview. *Ann NY Acad Sci* 2000;906:110-23.
- 16) Lee MH, Suh WS, Cheon HJ, Jo KS, Shin EJ, Park KK, et al. Determination of Sensitivity of RT-PCR for Cytokeratin 19 and detection of micrometastasis from bone marrow of breast cancer patients. *J Korea Surg Soc* 2000;58:34-43.
- 17) Schoenfeld 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.
- 18) Gribben JG, Neuberg D, Barber M, et al. Detection of residual lymphoma cells by PCR in peripheral blood is significantly less predictive for relapse than detection in marrow. *Blood* 1994;83:3800-7.
- 19) Garcia-Olmo D, Ontanon J, Garcia-Olmo DC, et al. Detection of genomically-tagged cancer cells in different tissues at different stages of tumor development: Lack of correlation with the formation of metastasis. *Cancer Lett* 1999;140:11-20.
- 20) Putz E, Witter K, Offner S, Stosiek P, Zippelius A, Johnson J, et al. Phenotypic characteristics of cell lines derived from disseminated cancer cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors: Establishment of working models for human micrometastases. *Cancer Res* 1999;59:241-8.
- 21) Bae JW, Choi KH, Min YK, Lee JB, Lee ES, Koo BH. Detection of circulating cancer cells in peripheral blood of breast cancer patients by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Abstract Book of Korea Surg Soc Meeting 2000 (spring); Abstract No 46.*
- 22) Braun S, Pantel K, Miller P, Janni W, Hepp F, Christina RM, et al. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *New Eng J Med* 2000;342:525-33.