

단순반복염기서열의 변이 형태에 따른 위암 내시경 조직의 유전자형 분류

가톨릭대학교 의과대학 미생물학교실, ¹내과학교실, ²병리학교실, ³방사선과학교실, ⁴외과학교실

최영덕 · 최상욱¹ · 전은정¹ · 정정조¹ · 민기옥² · 이강훈³ · 이 성⁴ · 유문간

Classification of Microsatellite Alterations Detected in Endoscopic Biopsy Specimens of Gastric Cancers

Young Deok Choi, M.D., Sang Wook Choi, M.D.¹, Eun Jeong Jeon, M.D.¹, Jeong Jo Jeong, M.D.¹, Ki Ouk Min, M.D.², Kang Hoon Lee, M.D.³, Sung Lee, M.D.⁴ and Mun Gan Rhyu, M.D.

Departments of Microbiology, ¹Internal Medicine, ²Pathology, ³Radiology, and ⁴Surgery, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

Purpose: Individual gastric cancers demonstrate complicated genetic alterations. The PCR-based analysis of polymorphic microsatellite sequences on cancer-related chromosomes has been used to detect chromosomal loss and microsatellite instability. For the purpose of preoperative usage, we analyzed the correspondance rate of the microsatellite genotype between endoscopic biopsy and surgical specimens.

Materials and Methods: Seventy-three pairs of biopsy and surgical specimens were examined for loss of heterozygosity and microsatellite instability by using 40 microsatellite markers on eight chromosomes. Microsatellite alterations in tumor DNAs were classified into a high-risk group (baseline-level loss of heterozygosity: 1 chromosomal loss in diffuse type and high-level loss of heterozygosity: 4 or more chromosomal losses) and a low-risk group (microsatellite instability and low-level loss of heterozygosity: 2 or 3 chromosomal losses in diffuse type or 1~3 chromosomal losses in intestinal type) based on the extent of chromosomal loss and microsatellite instability.

Results: The chromosomal losses of the biopsy and the surgical specimens were found to be different in 21 of the

73 cases, 19 cases of which were categorized into a genotype group of similar extent. In 100 surgical specimens, the high-risk genotype group showed a high incidence of nodal involvement (19 of 23 cases: ≤ 5 cm; 23 of 24 cases: > 5 cm) irrespective of tumor size while the incidence of nodal involvement for the low-risk genotype group depended on tumor size (5 of 26 cases: ≤ 5 cm; 18 of 27 cases: > 5 cm). Extraserosal invasion was more frequent in large-sized tumor in both the high-risk genotype group (≤ 5 cm: 12 of 23 cases; > 5 cm: 23 of 24 cases) and the low-risk genotype group (≤ 5 cm: 7 of 26 cases; > 5 cm: 16 of 27 cases). The preoperative prediction of tumor invasion and nodal involvement based on tumor size and genotype corresponded closely to the pathologic tumor stage (ROC area > 0.7).

Conclusion: An endoscopic biopsy specimen of gastric cancer can be used to make a preoperative genetic diagnosis that accurately reflect the genotype of the corresponding surgical specimen. (J Korean Gastric Cancer Assoc 2004;4:109-120)

Key Words: Gastric cancer, Microsatellite, Tumor invasion, Nodal involvement

중심 단어: 위암, 단순반복염기서열, 종양 침습, 림프절 전이

서 론

한국에서는 여전히 위암의 발병률이 높으며, 암으로 인한 사망 가운데서도 수위를 차지하고 있다.(1) 위암의 완전한 치료는 외과적 수술과 림프절 절제술을 통한 잔여 암세포의 완전한 제거에 의해서 가능하다.(2-4) 실제로 크기가 작은 위암에서 림프절 전이가 발견된다거나, 조기에 수술 하였음에도 재발하는 경우들이 있으며, 이는 각각의 경우마다 고유한 전이능을 지니고 있음을 시사한다.(5,6) 하지만 내시경에 의해 발견된 위암의 전이 정도를 가늠하는 일은 여전히 재래식 영상과 육안에 의한 경험적 판단에 의존하

책임저자 : 유문간, 서울특별시 서초구 반포동 505
가톨릭대학교 의과대학 미생물학교실, 137-701
Tel: 02-590-1215, Fax: 02-596-8969
E-mail: rhyumung@catholic.ac.kr
접수일 : 2004년 3월 29일, 게재승인일 : 2004년 4월 22일

고 있으며, 이는 암세포의 완전한 제거를 의미하는 치료 방침을 세우기에는 미흡하다.(7,8)

악성 암질환의 유전적 불안정성은 복잡한 유전적 변화에 의한 것이며,(9,10) 변이능이 항진되는 단순반복염기서열의 단축성 염색체 소실과 유전자불안정은 위장관암에서 매우 높은 빈도로 관찰된다.(11,12) 유전자형은 유전자불안정의 발생 여부와 염색체소실 정도에 따라 고위험유전자형과 저위험유전자형으로 분류되며,(13) 이는 2기와 3기 위암 환자의 생존율에 있어 매우 중요한 예측인자임이 보고되었다.(14,15) 위암 및 대장암에 관한 연구에서 이러한 유전자형의 분류는 특정 유전자의 개별적 소실보다는 전체 염색체의 소실 정도가 예후 예측인자의 지표가 될 수 있음을 지속적으로 보여주고 있다. 반면에 단순반복염기서열의 불안정은 여러 가지 암 관련 유전자와 연관되어 단층 변이를 유발함에도 불구하고 특정 암 질환의 저위험군을 반영하는 인자 중 일부로 알려져 있다.(14,15) 따라서 이러한 유전자 불안정성과 염색체 소실의 정도에 근거한 유전자형으로 기존의 형태학적 병기로 예측할 수 없었던 전이와 재발에 대한 설명이 가능할 것으로 본다.

유전적으로 불안정한 위암 병변의 대부분은 이질적 유전자형의 복합된 형태와 표현형을 갖는다.(13,16-21) 불안정한 종양에서의 유전자변화 중에는 종양의 진행 과정에 커다란 영향을 주지는 않지만 우연히 발생하는 경우도 있으므로, 발암에 연관된 유전자 변화만을 특이적으로 구별해 내는 것은 쉽지 않다. 그러나 종양의 분화와 진행에 중요한 역할을 수행하는 유전적 변화는 전체 병소 내 존재하는 종양세포들에 공통적으로 나타내게 될 것이다. 이전의 연구에서 염색체 결손이 빈번하게 일어나는 8개의 염색체로부터 선정된 40개의 표지자를 사용해 단일 병변 내의 여러 병소에 대한 분석을 실시하였으며,(13) high-level loss of heterozygosity (LOH-H; 고등도), low-level loss of heterozygosity (LOH-L; 저등도), baseline-level of heterozygosity (LOH-B; 초등도)와 microsatellite instability (MSI; 유전자 불안정형)의 4가지 유전자형으로 분류한 결과, 이질적 병소로 이루어진 병변이라도 유전자형이 다르게 나타난 경우는 드물었으며, 대부분 같은 유전자형으로 분류되었다. 이러한 결과는 4가지 유전자형이 불안정한 위암 유전자 변화의 근간을 이루고 있다는 것을 의미한다.

저자는 다병소 분석의 결과와 비교 분석하여 내시경 조직의 종양 세포가 전체 수술 병변에 공통적으로 존재하는 유전자형을 대변한다는 것을 증명하였다. 또한 고위험 유전자형의 위암은 병변의 크기와 관계없이 높은 림프절 전이 빈도를 보였으며 저위험 유전자형의 위암은 크기에 비례하여 림프절 전이 빈도가 증가하는 특성을 보였다. 따라서 수술 전 내시경 조직에서 확인한 유전자형과 병변의 크기에 따라 분류한 유전자 진단으로 림프절 전이 정도를 비롯하여 위암의 예후를 예측할 수 있었다.

방 법

1) 대상

2000년도부터 2003년도까지 위암으로 절제술을 시행받은 100예를 대상으로 하였다. 이 중 73예에 대하여는 내시경 조직의 정상 DNA와 종양 DNA로 구분하여 환자의 병리학적 검사 및 전산화 단층촬영 결과와 비교하여 보았다.

2) 방법

(1) 영상 및 병리진단: 위암의 수술 전 유전자형에 의한 진단과 비교 분석하기 위한 위암의 병리형태학적 진단은 Tumor-Node-Metastasis (TNM)병기에 기초한 전산화 단층촬영 결과를 이용했다. 위벽의 장막 외면이 매끄럽거나 병소 주위의 지방층이 깨끗한 경우 장막 내 침습(T1-2)으로 정하고, 장막 외면이 불규칙하거나 지방층과 병소 및 인접 기관간의 경계가 불분명한 경우 장막 외 침습(T3-4)으로 결정하였다. 국소 림프절은 단축 직경이 8 mm 이상되는 것을 전이가 있는 것으로 보았으며, 원격전이(distant metastasis)는 해당 기준에 의거해 결정하였다. 임상병리학적 병기는 이전 연구에서 5년 생존율에 차이가 있었다는 보고에 따라 TNM 분류법에 의거하여 초기(1-2기) 위암과 진행성(3-4기) 위암으로 분류하였다. 조직학적 형태는 Lauren 분류에 의해 장형(glandular, cohesive 또는 solid), 미만형 그리고 혼합형으로 분류하였으며, 분화도는 WHO 분류 기준을 따랐다. 병변의 위치는 근위(분문부와 체부)와 원위(유문부)로 구분하였다. 종양의 크기는 병변의 최대 직경으로 하였다.

(2) 미세절제 및 DNA 증폭: 수술 조직 내의 다양한 병소에 대하여 40배율의 입체 현미경 아래서 미세절제를 시행하였다. 파파린 블록에 고정시킨 내시경 조직은 이형세포간에 혼합되는 현상을 피하기 위해 종양세포의 구성이 70% 이상인 단일 표본 조각을 미세절제하여, Tween 20-Proteinase K lysis buffer 1μl당 약 50개의 미세절제된 세포를 용해시켰다. 50~70μl의 lysis buffer에 용해된 각 내시경 조직은 37°C에서 3시간, 50°C에서 3시간 처리 후 95°C에서 5분간 Proteinase K를 비활성화시켜준 후 PCR에 의한 DNA 증폭에 사용되었다. PCR을 통한 주형 DNA의 증폭은 여러 표지자를 한 번에 관찰할 수 있고, 온도 변화의 영향을 최소화할 수 있는 '다중법, 고온시작법'을 적용하였다. 각 PCR 과정은 두 쌍의 프라이머를 사용하여 주형-프라이머 혼합액을 가열한 후 dNTP와 Taq DNA 중합효소를 첨가하였다. 증폭 반복염기서열은 32P-dCTP를 사용하여 표지하였으며, 8 M urea가 포함된 polyacrylamide gel에 전기영동하여 radio-luminograph scanner (BAS 2500, Fuji Photo Film Co. Ltd. Kanakawa, Japan)를 사용해 확인하였다. 전기영동상의 대립 유전자배열 신호의 선택 강도를 측정하기 위해 TINA image software (Raytest Isotopenmegerte GmbH, Straubenhardt, Ger-

many)의 신호 강도 측정 기능을 사용하였다.

(3) 단순반복염기서열 대립유전자 분석: LOH (loss of heterozygosity)와 MSI는 이전에 기술한 것과 같은 8개의 염색체 환(3p, 4p, 5q, 8p, 9p, 13q, 17p 그리고 18q)을 포함하는 40개의 표지자 조합을 사용하여 결정하였다. 우선적으로 동형접합성을 보이는 전체 표지자에서 정상 DNA에 없던 새로운 대립 유전자 신호를 피는 표지자가 40% 이상의 빈도로 발견될 경우 MSI로 결정하였다. MSI가 없는 경우 정상 DNA의 이형 대립 유전자 신호의 상호 비율에 대한 중앙 DNA의 대립 유전자 신호의 상대적 비율을 계산하여 LOH

를 판정하였다. LOH 양성을 보인 예로부터 중앙세포의 구성 비율이 70~80%, 80~90% 그리고 90% 이상 증가함에 따라 소실이 일어난 대립 유전자 신호의 강도는 감소하는 경향이 뚜렷하였다. 중앙 세포의 비율이 낮은 경우에도 염색체 결손을 의미하는 신호 강도의 감소는 정상 대립 유전자 신호 강도와 비교할 때 상대비 환산값(cut off point) 0.65에서 가장 구분이 잘되었다(Fig. 1). 이 환산값은 중앙세포의 구성 비율에 따라 LOH를 결정하는 최저 경계선으로 적용되었으며, 완전한 소실을 보인 대립유전자 신호는 육안으로 식별이 가능했다.(13)

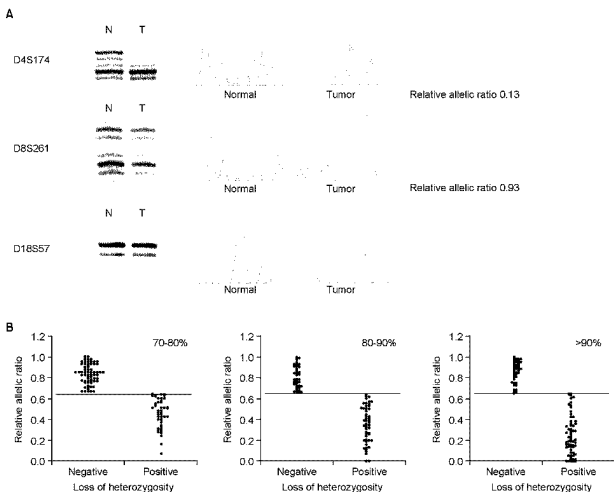


Fig. 1. Determining of chromosomal losses in results of electrophoresis. Using electrophotometer, reciprocal relative allelic ratio was calculated as a divide of the tumor allelic ratio by the normal allelic ratio. (A) Microsatellite marker, D4S174 represents the case of LOH positive. The relative allelic ratio (asterisk) of signal reduction in tumor DNA (T) compared to normal DNA (N) exceeds the cutoff (0.65; see Method). In case of LOH negative marker D8S261, the relative intensity ratio is higher than 0.65 in spite of background level. The excessive comigration of the main and satellite bands for two alleles is seen for D18S57, which represents uninformative. (B) Most of wild type (negative) allelic signals were ranged between 0.65 and 1.0 fold. Allelic signals of tumor DNA had different ranges according to tumor cell purity (70~80%, 80~90%, >90%). As the purity increased, relative allelic signals were also increased. The cutoff value of LOH positive was commonly determined as 0.65 fold. The dotted lines represent the cutoff value (0.65).

(4) 내시경 조직의 반복염기서열 유전자형 분석: 염색체 소실 범위는 LOH를 수반한 염색체의 개수로 판정하였으며, 이전의 위암에 관한 연구에서 기술한 장형과 미만형 위암의 이원적 분류방법을 적용하였다.(13) 장형 위암은 저등도(LOH-L: 3개 이하 소실)와 고등도(LOH-H: 4개 이상 소실) 염색체소실형으로 구분하였고, 미만형 위암은 초등도(LOH-B: 0 또는 1개 소실), 저등도(LOH-L: 2개 또는 3개 소실), 고등도(LOH-H: 4개 이상 소실) 염색체소실형으로 구분하였다.(14) LOH-B 유전자형은 미만형 위암을 위한 기준이므로 작은 내시경 조직 절편으로부터 다양한 조직학적 특징을 지닌 위암을 평가하기에 적절치 않았다. 따라서 내시경조직에서는 종양의 영역이 근위에 있을 경우 LOH-B 유전자형으로 평가되었으며, 이는 0 또는 1개의 염색체 소실을 보인 근위 위암의 대부분(94%)이 미만형 위암으로 나타났다기 때문이다.(13)

(5) 통계처리: 통계 처리는 Windows용 SPSS 11.0 프로그램을 사용하였다. 유전자형에 따른 위암의 임상적 인자와의 상관관계에 대한 통계적 유의성 검증은 교차분석과 chi-square test로 하였으며 전산화 단층촬영 및 유전자 진단의 효과는 receiver operating characteristic (ROC) 영역의 값으로 비교하였다. 통계적 유의성은 P값이 0.05 이하인 경우로 하였다.

결 과

1) 위암 유전자 불안정성의 특징

내시경 조직과 수술 조직 73쌍의 반복염기유전자형을 비교하여 보았다(Table 1). 이 중 52예(71%)는 내시경 조직과 수술 조직에서 동질의 유전자불안정(9예) 또는 염색체 소실(43예)이 일어났으며 반복염기 유전자형이 일치하였다. 나머지 21예(39%)의 위암은 병변 내 이질성(intratatumoral heterogeneity)을 가지고 있었으며, 이 중 2예는 다른 염색체에서 염색체소실이 발견되었으나 소실된 염색체의 수가 동일했다. 5예는 같은 염색체 내 대립유전자의 상반되는 소실이 있었으며, 10예는 염색체 소실이 발견된 염색체 수가 달랐지만 동일 유전자형에 분류되어 총 17예의 위암이 반복염기 유전자형의 병변 내 이질성에도 불구하고 같은 유전자형으로 분류되어 결과적으로 총 69예(95%)의 반복염기 유전자형이 일치하였다(Table 2). 나머지 4예(5%)는 서로 다른 반복염기 유전자형에 분류되었다. 2예는 염색체 소실이 일어난 염색체의 수가 다르게 나타났으며, 이 중 2예는 병변 내 염색체 소실과 유전자 불안정이 함께 존재했다. 수술 조직에 대한 다병소 분석 결과도 크게 다르지 않았다(Table 3). 총 100예에 대한 분석 결과 65예(65%)에서 동질의 유전자불안정(10예)과 염색체소실(55예)이 발견되었다. 나머지 35예(35%)는 반복염기 유전자형이 병변 내 이질성을 가진

Table 1. Genotypes and microsatellite alteration patterns of biopsy and surgical specimen in gastric cancer

Surgical specimen of gastric cancer (n=73)			Low-risk genotype		High risk genotype		Total	
			MSI	LOH-L	LOH-B	LOH-H		
Biopsy specimen	Low-risk genotypes	MSI	9				9	
		LOH-L	2	30		1	33	
	High-risk genotypes	LOH-B		1	9		10	
		LOH-H				21	21	
	Patterns of chromosomal loss*	Homo	Type A	9	21	9	13	52
			Mixed					
		Type B		2			2	
		Type C		1		4	5	
		Type D		6		4	10	
		Type E		1		1	2	
Type F		2			2			

*Type A = Same chromosome, same number of chromosomal loss, same genotype; Type B = Different chromosome, same number of chromosomal loss, same genotype; Type C = Reciprocal allele, same or different number of chromosomal loss, same genotype; Type D = Different chromosome, different number of chromosomes, same genotype; Type E = Different chromosome, different number of chromosomes, different genotype; Type F = Microsatellite instability and loss of heterozygosity were within 8 chromosomes. MSI = microsatellite instability; LOH-L = low-level loss of heterozygosity; LOH-B = baseline-level of heterozygosity; LOH-H = high-level loss of heterozygosity.

Table 2. Clinicopathological characters and patterns of the heterogenous chromosomal loss between biopsy specimen and surgical specimen

Case	Specimen	Chromosomal loss*	Level of LOH	Tumor location	TNM stage
72	Surgical	8, 3 (U/L)	Low	Body	T1N0M0
	Biopsy	8, 3 (U/L)	Low		
81	Surgical	9, 3, 18	Low	Body	T4N1M0
	Biopsy	9	Baseline		
84	Surgical		Low	Cardia	T3N0M0
	Biopsy	5, 18	Low		
95	Surgical	18, 4, 17	Low	Cardia	T1N0M0
	Biopsy	18	Low		
125	Surgical	4, 17, 18, 5 (U/L)	High	Cardia	T3N1M0
	Biopsy	4, 17, 18, 5 (U/L)	High		
129	Surgical	5, 8, 17, 3, 4, 18	High	Antrum	T3N3M0
	Biopsy	5, 8, 17, 9, 13	High		
130	Surgical	8, 9, 18, 4, 5 (U/L), 13 (U/L), 17 (U/L)	High	Body	T4N0M0
	Biopsy	8, 9, 18, 5 (U/L), 13 (U/L), 17 (U/L)	High		
175	Surgical	5, 9, 13, 17, 3 (U/L), 4, 18 (U/L)	High	Antrum	T3N2M1
	Biopsy	5, 9, 13, 17, 3 (U/L), 18 (U/L)	High		
190	Surgical	3, 13	Low	Body	T2N1M0
	Biopsy	3, 4, 5	Low		
204	Surgical	3, 5, 4, 13, 17	High	Cardia	T3N0M0
	Biopsy	3, 5	Low		
205	Surgical	3, 8	Low	Body	T3N0M0
	Biopsy	5, 9	Low		
208	Surgical	13, 8, 17	Low	Antrum	T2N1M0
	Biopsy	13, 18	Low		
218	Surgical	8	Low	Antrum	T3N1M0
	Biopsy	5, 13	Low		
219	Surgical	3, 5, 8, 9, 13, 17, 18, 4	High	Antrum	T2N0M0
	Biopsy	3, 5, 8, 9, 13, 17, 18	High		
223	Surgical	3, 5, 8, 9, 13, 17	High	Antrum	T2N0M0
	Biopsy	3, 5, 8, 9, 13, 17, 18	High		
232	Surgical	3, 4, 5, 9, 17, 8	High	Antrum	T1N0M0
	Biopsy	3, 4, 5, 9, 17	High		
233	Surgical	8, 18, 5 (U/L), 9, 13 (U/L), 17 (U/L)	High	Body	T3N3M0
	Biopsy	8, 18, 5 (U/L), 13 (U/L), 17 (U/L)	High		
240	Surgical	3, 4, 9	Low	Antrum	T1N0M0
	Biopsy	3, 4, 17	Low		
241	Surgical	8, 4, 13	Low	Antrum	T1N0M0
	Biopsy	8, 3	Low		

*(n=19) microsatellite alterations of the cases showing only LOH both biopsy specimens and the surgical specimens. See the table 1, the mixed chromosomal loss patterns (type B, C, D, E).

Boxes mean heterologous patterns of chromosomal loss and U/L is reciprocal allelic loss.

LOH = loss of heterozygosity; TNM = tumor-node metastasis.

것으로 나타났다. 병변 내 이질성을 가진 경우에서 소실이 일어난 염색체는 다르지만 그 수가 일치하는 경우가 3예, 소실이 일어난 염색체의 수가 일치하며 같은 염색체 내의

대립 유전자의 상반되는 소실 현상이 있었던 경우가 9예, 소실이 서로 다른 염색체에서 일어났으며, 그 수가 일치하지 않았지만 같은 반복염기 유전자형으로 분류된 경우가

Table 3. Multi-focal analysis of the genotypes and the microsatellite alteration patterns of surgical specimen in gastric cancer

Class-I of specimen type (n=100)			Low-risk genotype		High risk genotype		Total	
			MSI	LOH-L	LOH-B	LOH-H		
Class-II of specimen type	Low-risk genotypes		MSI	10			10	
			LOH-L	2	39	2	3	46
	High-risk genotypes		LOH-B		1	12		13
			LOH-H		1		30	31
Patterns of chromosomal loss*	Homo	Type A	10	29	12	14	65	
		Mixed						
		Type B		2		1	3	
		Type C		2		7	9	
		Type D		6		8	14	
		Type E		2	2	3	7	
	Type F		2			2		

*Type A = Same chromosome, same number of chromosomal loss, same genotype; Type B = Different chromosome, same number of chromosomal loss, same genotype; Type C = Reciprocal allele, same or different number of chromosomal loss, same genotype; Type D = Different chromosome, different number of chromosomes, same genotype; Type E = Different chromosome, different number of chromosomes, different genotype; Type F = Microsatellite instability and loss of heterozygosity were within 8 chromosomes. MSI = microsatellite instability; LOH-L = low-level loss of heterozygosity; LOH-B = baseline-level of heterozygosity; LOH-H = high-level loss of heterozygosity.

Table 4. Clonality of chromosomal losses in the biopsy and surgical specimens of gastric cancer

	Biopsy specimen		Surgical specimen	
	Homogeneous (%)	Heterogeneous (%)	Homogeneous (%)	Heterogeneous (%)
Genotype				
LOH-B	9 (20)	1 (5)	10 (18)	4 (12)
LOH-L	23 (51)	10 (53)*	30 (55)	11 (33)
LOH-H	13 (19)	8 (42)	15 (27)	18 (55)*
Histological type				
Homo	38 (84)	13 (68)	41 (75)	18 (55)
Mixed	7 (16)	6 (32)*	14 (25)	15 (45)*
Tumor stage				
Early	18 (40)	11 (58)	24 (44)	14 (42)
Advanced	27 (60)	8 (42)	31 (56)	19 (58)

*High frequency of heterologous chromosomal loss were observed compared with other types. LOH-B = baseline-level of heterozygosity; LOH-L = low-level loss of heterozygosity; LOH-H = high-level loss of heterozygosity.

14예로 총 26예(26%)가 병변내 이질성에도 불구하고 같은 반복염기 유전자형으로 분류되었다. 그리고 나머지 9예(9%)는 다른 반복염기 유전자형으로 분류되었으며, 소실된 염색체수가 다른 경우가 7예, 유전자불안정형과 염색체 소실이 공존하는 경우가 2예이었다.

2) 내시경 조직과 수술 조직에서 분석한 위암 유전자형의 차이점

위암에 대한 다병소 분석을 통해 염색체소실 유전자형의 병변내 이질성의 특징을 반복염기 유전자형, 조직학적 특성 및 암 병기에 따라 살펴본 결과 수술 조직에서는 주로

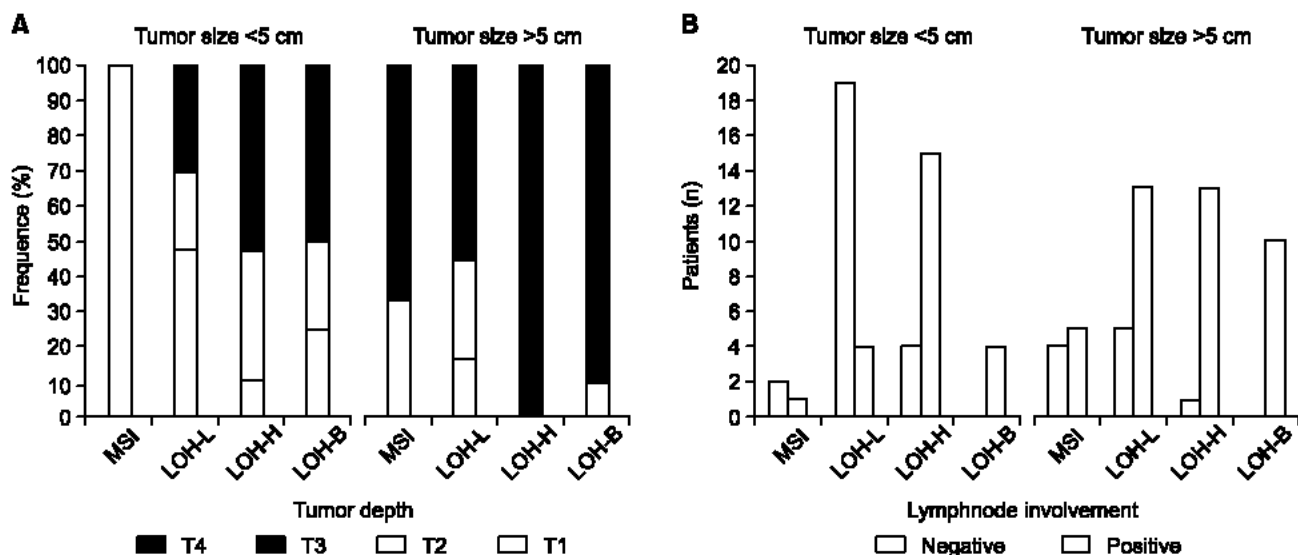


Fig. 2. Genetic analysis of tumor invasion and lymph node involvement were divided into two groups according to the tumor size 5 cm. (A) Tumor invasion depth was tend to increase as size grew larger. In cases of tumor size <5 cm, invasion depth of LOH-B and LOH-H had highest frequencies in T3 (50% and 47%), MSI and LOH-L had highest frequencies in each of T2 (100%) and T1 (48%). In cases of tumor size >5 cm, LOH-B had highest frequency in T4 and all of other cases had highest frequencies in T3 (>50%). (B) In tumor size <5 cm, the frequencies of lymph node involvement in LOH-B (100%) and LOH-H (79%) were higher than MSI (17%) and LOH-L (33%). In tumor size >5 cm, LOH-B and LOH-H had high frequencies of lymph node involvement constantly, frequencies of lymph node involvement were in MSI (55%) and LOH-L (72%). lymph node involvement had high frequencies in LOH-B (100%) and LOH-H (79%) than other genotypes. In cases of tumor size >5 cm, all genotypes had high frequencies, MSI (55%), LOH-L (72%), LOH-B (100%), LOH-H (90%). MSI = microsatellite instability; LOH-L = low-level loss of heterozygosity; LOH-B = baseline-level of heterozygosity; LOH-H = high-level loss of heterozygosity.

Table 5. Size depended comparison of low-risk genotype and high-risk genotype in invasion depth and lymph node involvement

		Genotype		P value [‡]	
		Low-risk*	High-risk [†]		
Small sized tumor (<5 cm)	Intra-serosal invasion (T1-2)	19	11	0.064	
	Extra-serosal invasion (T3-4)	7	12		
Large sized tumor (>5 cm)	Intra-serosal invasion (T1-2)	11	1	0.002	
	Extra-serosal invasion (T3-4)	16	23		
P value		0.018	0.001		
Small sized tumor (<5 cm)	Lymph node involvement			<0.001	
		Negative	21		4
		Positive	5		19
Large sized tumor (>5 cm)	Lymph node involvement			0.009	
		Negative	9		1
		Positive	18		23
P value [§]		<0.001	0.142		

*MSI and LOH-L; [†] LOH-B and LOH-H; [‡] Significances of the low-risk genotypes to the high-risk genotypes; [§]Significances of the small sized tumor (<5 cm) to the large sized tumor (>5 cm).

전체 유전자형 중 LOH-H (55%) 유전자형에서 빈번하였지만, 내시경 조직에서는 수술 조직에 비해 LOH-L (51%) 유전자형에서 더욱 빈번하게 발견되었다(Table 4). 조직형태에 따라 분석한 결과, 병변내 동질의 유전자형을 갖는 병변과 비교하여 유의한 차이를 보이지는 못 했지만 수술 조직에서 유전자형의 병변내 이질성을 갖는 경우는 혼합 조직형태(45%)에서 빈번하게 관찰되었다. 내시경 조직에서도 통계학적으로 유의한 차이를 보이지는 못 했지만, 이 역시 병변내 이질성 유전자를 갖는 경우가 혼합 조직형태(32%)에서 빈번하였다. 위암 유전자형의 병변내 이질성을 병기에 따라 초기 위암(1~2기)과 진행성 위암(3~4기)으로 나누어 비교하였을 때, 내시경 조직과 수술 조직 모두 병기에 따라 의미 있는 차이가 없었으며 비슷한 빈도로 나타났다.

3) 위암 유전자형과 병리학적 병기와의 관계

100예의 수술 조직에 대한 반복염기 유전자형은 LOH-B 14예(14%), LOH-L 41예(41%), LOH-H 33예(33%) 그리고 MSI가 12예(12%)로 나타났으며 병변의 크기에 따라 유전자형에 기초하여 침습깊이 및 림프절 전이와의 관계를 도출하였다.

LOH-B (평균 6.8 cm)는 MSI (평균 6.5 cm)와 LOH-L (평균 4.1 cm) 그리고 LOH-H (평균 4.7 cm)에 비하여 병변의 평균 크기가 컸다. 위암은 평균크기(5 cm)를 기준으로 큰 경우(>5 cm)와 작은 경우(≤5 cm)로 구분하였다. 병변의 크기 및 유전자형에 따른 장막 침윤 정도와 림프절 전이의 대략적인 특성을 살펴보았다(Fig. 2). 병변의 크기가 작은 49예의 장막 침윤도를 유전자형별로 구분했을 때 MSI는 T2 (100%)의 빈도가 높았으며 LOH-L은 T1 (48%)의 빈도가 높았고 LOH-B와 LOH-H는 모두 T3의 빈도가 각각 50%와 47%로 가장 높게 나타났다. 병변이 큰 경우에 MSI와 LOH-L 유전자형 모두 T3 (>50%)의 장막침윤도를 갖는 경우가 가장 빈번했으며 LOH-B는 T4 (50%)의 빈도가 증가하였고, LOH-H는 여전히 T3 (56%)의 빈도가 가장 높았다. 림프절 전이 역시 같은 방법에 의해 유전자형 간의 차이를 살펴보았다. 병변의 크기가 작은 경우의 림프절 전이 유무를 살펴보았을 때 LOH-B 유전자형과 LOH-H 유전자형이 각각 4예(100%)와 15예(79%)의 높은 림프절 전이를 보인 반면 MSI와 LOH-L 유전자형은 각각 1예(17%)와 4예(33%)의 빈도로 림프절 전이가 나타나 고위험도를 대변하는 유전자형과 저위험도를 대변하는 유전자형 간에 큰 차이를 보였다. 병변의 크기가 큰 경우에서는 LOH-B와 LOH-H가 각각 10예(100%)와 13예(90%)로서 여전히 높은 빈도를 보였고, 저위험 유전자형인 MSI와 LOH-L은 작은 병변에서도 다 높은 5예(55%)와 13예(72%)의 빈도를 각각 나타냈다.

이러한 결과를 토대로 4개의 유전자형을 장막 침윤 및 림프절 전이에 대하여 그 위험성을 같은 범주 내에서 예측하는 것들로 고위험 유전자형(LOH-B와 LOH-H)과 저위험유

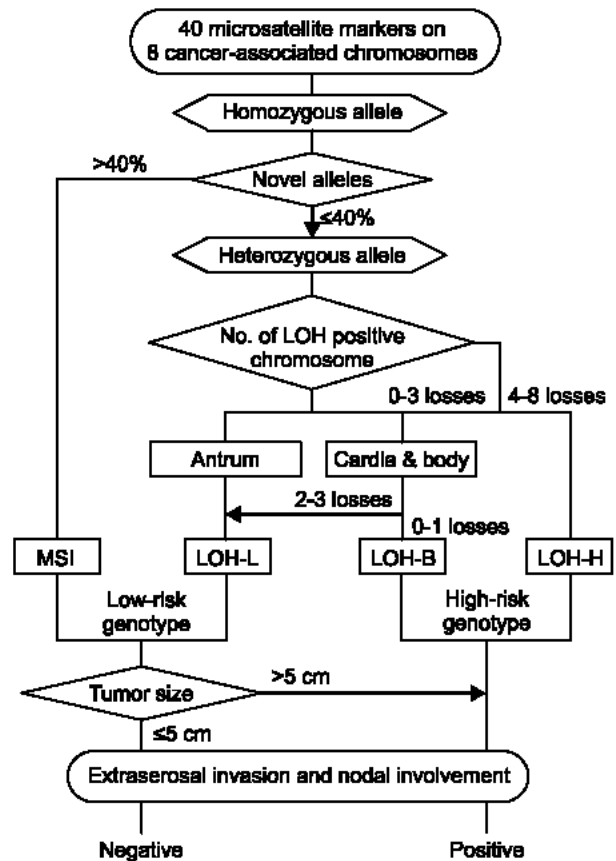


Fig. 3. Proposed procedure of genetic diagnosis of gastric cancer. Forty markers from 8 cancer related chromosomes were used. Microsatellite genotypes were categorized into MSI, LOH-L, LOH-B and LOH-H according to the number of chromosomal losses and tumor location. MSI and LOH-L were grouped as low risk genotypes and was assigned to extravesical invasion and lymph node metastasis if tumor size was larger than 5 cm. LOH-B and LOH-H were grouped as high risk genotype and interpreted as extravesical invasion and lymph node metastasis. MSI = microsatellite instability; LOH-L = low-level loss of heterozygosity; LOH-B = baseline-level of heterozygosity; LOH-H = high-level loss of heterozygosity.

전자형(MSI와 LOH-L)으로 나누어 두 위험군 간의 차이를 살펴보았다(Table 5). 그 결과 장막 침윤과 림프절 전이 정도가 두 집단 간에 다르게 분포하는 것을 알 수 있었다. 장막 외 침윤은 병변의 크기가 큰 경우에 빈번하였으며 (P=0.001), 저위험 유전자형보다 고위험 유전자형에서 빈번하게 나타났다(P=0.002). 림프절 전이는 저위험 유전자형에서 병변의 크기가 큰 경우에 빈번하게 관찰되었으며(P<0.001), 고위험 유전자형에서는 크기와 관계없이 높은 빈도로 나타났다(P=0.142).

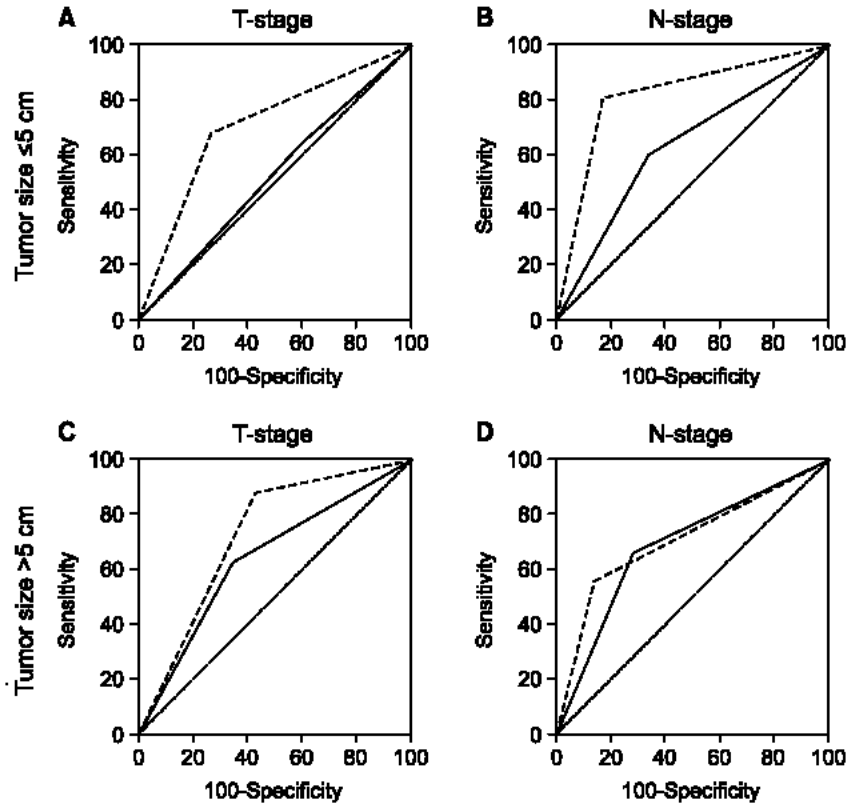


Fig. 4. ROC (receiver operating characteristic) curve of preoperative genetic stages and CT (computed tomograph) stages depend on tumor size. (A) In cases of tumor size <5 cm, ROC area for genetic stage (0.70) was higher than CT stage (0.52) in T (tumor invasion) stage. (B) In cases of tumor size <5 cm, ROC area for genetic stage (0.81) was higher than CT stage (0.63) in N (lymph node involvement) stage. (C) In cases of tumor size >5 cm, ROC area for genetic stage (0.72) was higher than CT stage (0.63) in T stage. (D) In cases of tumor size >5 cm, ROC area for genetic stage (0.70) was higher than CT stage (0.68) in N stage. From these results, genetic stages represent more precise tumor invasion and metastasis than CT stages.

4) 내시경 병변의 유전자형에 따른 암병기 결정

일반적으로 내시경 검사를 통하여 대략적인 병변의 크기 및 조직의 병리학적 특성을 알 수 있다. 하지만 병변의 외형과 크기만으로는 림프절 전이와 침습 정도를 추측하는 것은 어렵고 병변의 작은 일부분인 내시경 생검 조직을 이용한 병리학적 검사로 전이와 침습 정도를 추측하는 것 또한 어렵다. 따라서 유전자형이 이러한 단점을 보완해 줄 수 있다는 가정하에 수술 전 내시경 조직을 활용한 유전자 진단을 바탕으로 크기와 유전자형의 관계를 감안하여 암병기를 결정하였다(Fig. 3). 저위험 유전자형의 경우 평균 직경이 5 cm 이상일 경우 장막 외 침윤(T3-4)과 림프절 전이가 있을 것으로 예측하였고, 고위험 유전자형의 경우 크기와 관계없이 림프절 전이와 장막 외 침윤(T3-4)이 있을 것으로 예측하였다. 제시된 방법에 의해, 73예의 내시경 조직에 대한 유전자형은 31예의 고위험 유전자형과 42예의 저위험 유전자형으로 확인되었다. 병변의 크기에 기초한 내시경 조직에 대한 침습과 림프절 전이 위험도는 수술 후의 병리학적 진

단 결과에 의거하여 병변의 크기가 5 cm 이하인 경우 침습 정확도가 유전자검사는 ROC 영역 0.70, 전산화 단층촬영은 ROC 영역 0.52로 나타났으며, 림프절 전이 예측 정확도가 유전자검사는 ROC 영역 0.81, 전산화 단층촬영은 ROC 영역 0.63으로 나타났다. 병변의 크기가 5 cm보다 큰 경우에 유전자검사의 침습정확도는 ROC 영역 0.72로 나타났으며 전산화 단층촬영은 ROC 영역 0.63으로 나타났다. 림프절 전이의 경우 유전자검사의 예측 정확도는 ROC 영역 0.70이었으며, 전산화 단층촬영은 ROC 영역 0.68의 예측 정확도를 보였다. 따라서 병변의 크기와 관계없이 반복염기 유전자형에 의한 유전자 검사의 예측 정확도가 전산화 단층촬영에 의한 결과보다 높았다(Fig. 4).

고 찰

우리나라에서 가장 많이 발생하는 위암은 치료 효과가 낮은 것은 물론, 임상 경과를 예측하기 어렵다고 알려져 있다. 그 이유는 크게 세 가지로 요약할 수 있는데, 첫째는 위

에서 발생한다는 공통점에서 위암이라 통칭하지만 생물학적 특징은 매우 다양한 악성 질병이라는 점이다. 예를 들어 병리 조직학적으로 장형과 미만형으로 분류하였을 때, 두 형태가 동시에 존재하는 경우, 장형이나 미만형으로 분류되는 병소 내에도 다양한 조직학적 분화가 존재할 수 있다. 두 번째는 병리 조직학적 소견에 따른 형태학적 분류기준이 임상경과를 예측하는 데 아직 미흡하다는 점이다. 이는 가장 중요한 예후 기준으로 활용하는 TNM병기를 수술 전 내시경 검사나 방사선과적 검사 등으로 추정하지만 수술 후 병리학적 진단과 상이한 경우가 많다. 예를 들어 T3N0, T2N1, T1N2는 모두 2기 위암에 해당하지만, 서로 다른 림프절 전이와 조직 침습도를 갖는다. 즉 동일한 병기라도 생물학적 특징에 의해 분화하는 위암의 특징을 형태학적으로 구분하기 위해서는 수술 후 시행하는 자세한 병리조직학적 검사 결과로 알 수 있다는 것이다. 수술로서 병변을 제거하는 방법이 지금까지 가장 효과적인 위암치료 수단이지만, 최종적인 형태학적 진단은 수술이 끝난 후에 판정되므로 임상적 이용가치 측면에서 볼 때는 커다란 의미는 갖지 못한다. 세 번째 이유는 형태학적 분류 기준은 검사 시점의 소견이므로 암의 본질과 진행 과정을 설명하기 어렵다는 것이다. 예를 들어 T3N0의 경우와 T1N2를 비교할 때 상이한 진행 경로를 거친다고 예상할 수 있고 이러한 단계에도달하기까지의 과정이나 소요되는 기간은 상이할 수 있다. 하지만 임상적 경과에 대한 예측은 모두 2기 위암으로 구분하여 동일하게 판정할 수밖에 없다. 이와 같은 위암의 생물학적 특징과 예측하기 어려운 임상 경과 때문에 위암 치료 방침도 아직 공식적으로 정해지지 않았으며 매우 다양한 위암에 대한 세부적인 치료 기준은 대단히 난해한 과제로 남아있다. 하지만 위암의 유전자검사는 이러한 형태학적 진단 기준의 부족한 점을 보완할 수 있을 것으로 보인다. 따라서 본 연구에서는 위암의 임상적 경과에서 매우 유의한 예측인자로 보고된 바 있는 반복염기 유전자형에 기초하여, 위암의 내시경 조직을 이용한 수술 전 유전자 검사의 유용성을 입증하였다.

위암 유전자 불안정성의 특징을 알아보기 위해 내시경 조직과 수술 조직에 대한 유전자형 비교와 수술 조직에 대한 다병소 분석을 실시한 결과 다양한 병변내 이질성을 보였으며 이들은 모두 유사한 염색체 소실형이나 반복염기 불안정성으로 분류되었다.(13) 약 70%에서는 병변내 이질성을 보이지 않고 내시경 조직과 수술 조직의 염색체소실 위치와 소실된 대립유전자가 모두 일치하였으며 같은 유전자형으로 분류되었다. 약 30%에서는 염색체 소실이 다양하게 나타났다. 즉 염색체 소실의 숫자는 동일하였지만 소실된 염색체가 다르거나 염색체 소실의 숫자나 종류도 다른 경우가 있었다. 또한 같은 염색체 내에 존재하는 서로 다른 대립유전자의 대칭적 결손 현상도 자주 관찰되었다. 종합적으로 상이한 유전자 변화도 대부분 동일한 염색체 소실

유전자형으로 분류되었고 약 5%에서 상이한 염색체 소실 유전자형으로 분류되었다. 그리고 아주 드물게 100에 중 오직 2예만이 병변 내 MSI와 LOH가 함께 관찰되었다. 위암 유전자형의 병변내 이질성은 수술 조직에서는 주로 LOH-H 유전자형에서 빈번하였지만 내시경 조직에서는 LOH-L 유전자형에서 더 자주 발견되었다(Table 4). 이전의 다병소 분석에서도 초기 위암의 LOH-L에서 병변내 이질성이 빈번하다는 소견이 보고된 바 있다.(21) 이와 같은 차이는 내시경 조직은 전체 병변 중 주로 상부에서 조직의 형태와 구분 없이 채집되는데 반하여 수술 조직에 대한 다병소 분석은 형태학적으로 구분되는 병소를 선정하는 차이에 기인하는 것으로 보인다. 예를 들어 종양 표면에서 채집한 내시경 병변의 조직에서는 LOH-L 유전자형이었으나 수술 조직에서는 LOH-H로 나타나기도 하는데 상대적으로 약한 침윤능을 보이는 LOH-L형 세포가 표면에 남아 선택된 결과로 해석된다. 그러나 이러한 경우는 검사한 내시경 검체 중 약 5% 내외로 드물게 발견되었다. 병변내 이질성을 보이는 염색체 소실의 숫자를 다른 유전자형, 다른 병기, 다른 조직형 사이에서 비교했을 때 유의한 차이 없이 유사한 염색체 소실 범주에서 관찰되었다. 이러한 결과는 대부분의 LOH-H가 LOH-L에서 부가적인 LOH가 축적되어 이루어진 것은 아니라는 사실을 시사한다. 또한 위치가 상이한 종양 병변에서 같은 염색체 내의 상·하 대립유전자의 동시적 소실을 수반한 것을 포함하여 비슷한 수준의 염색체 소실을 보였다. 이러한 발견은 위암 발생 초기에 이질적 염색체 소실을 포함한 여러 염색체 소실이 동시에 일어난다는 것을 시사한다. 따라서 위암의 대부분에서 시작단계 또는 초기에서 비슷한 수준의 염색체 소실이 발생하여 침윤과 전이능이 결정되고 이에 따른 고유의 암진행 과정을 갖는 것으로 생각된다.

위암 유전자 불안정성의 특징과 관련하여 염색체 소실과 반복염기 불안정성의 유전자형이 각각 다른 발병 나이, 조직학적 형태, 병변의 위치를 보인다는 사실은 주목할 만하다. MSI 유전자형(평균 67세, 장형, 원위)의 임상적 특징들은 LOH 양성형의 경우들과 유의한 차이가 있었다.(13) 대장암의 경우 MSI 유전자형은 근위의 대장에서 특이적으로 관찰되었지만 직장에서는 드물게 나타났다.(15) LOH-B 유전자형(평균 48세, 미만형, 원위)은 초기 단계부터 악성 미만형 위암으로의 진행을 암시한다. 이러한 결과들은 염색체 소실 범위가 나이나 감수성과 같은 개인적 특징 및 조직의 종류에 따라 침습과 전이능에 특징적으로 기여한다는 사실을 시사한다. 이러한 암의 진화와 위암 유전자형의 관계는 유전자 불안정성을 갖는 다양한 암세포들이 개인별 특징에 따라 지속적으로 선택되어 고유의 악성을 지니는 암 종류로 분류되며 그 유전적 배경은 기간적인 유전자 불안정성으로 설명될 수 있다고 생각된다.

유육종암과 신경내분비선암과 같이 다양하게 분화하는

암에 대한 여러 병소의 유전자 분석에서는 매우 넓은 이질적인 범위를 보였고 결국 다른 유전자형으로 구분되는 경향이 있었다.(22,23) 침윤 암종과 상피내암을 모두 지닌 유육종암에서는 상피내암이 오히려 과도한 염색체 소실을 갖고 있었으며 침윤암에서는 상대적으로 적은 양의 염색체 소실이 나타났는데 이는 암 발생 초기에 다양한 염색체 소실이 발생하여 그 중 악성 유전자형이 암의 진행을 주도한다는 사실을 뒷받침한다. 또한 LOH-L 유전자형이 유전자형의 불안정한 변화로 인해 LOH-H 유전자형으로 발전하지는 않는다고 생각된다. 위암에서는 발병나이에 따라 유의한 차이를 나타내지 않았고 오히려 대장암에서는 LOH-H형의 발병 나이가 LOH-L형의 발병나이보다 유의하게 낮았다.(15) 개별 암마다 세포의 분열, 증식 그리고 이주 등이 다양하게 발전하므로 악성 종양의 침윤, 전이능을 형태학적으로 구분할 수는 없다. 암의 진행과 관련된 이와 같은 요인들이 암 유전자형의 영향을 받고, 또한 암 유전자형이 조기에 결정된다면 각 종양은 고유의 성장 특성을 획득하고 특징적 병변을 보일 것이다.

위암의 임상적 경과에 대하여 매우 유의한 예측인자로 보고된 바 있는 단순반복염의 유전자형에 기초한 LOH-H와 LOH-B 유전자형은 미세전이와 악성 진행을 시사한다. 고위험 유전자형의 위암은 병변의 크기가 작은 경우에도 림프절 전이가 있거나 병소 주변으로 넓게 퍼진 경우 타 기관으로 전이되는 경향이 있는 반면, 저위험 유전자형의 경우 크기에 의존하는 특징이 있다(Table 5). 세포의 증식과 전이에 따라 결정된 종양의 성장 특징은 유전자 불안정 및 염색체소실 범위와 밀접한 관련이 있는 것으로 보인다. 병변의 크기에 관련 없이 림프절 전이가 빈번한 LOH-H 유전자형의 림프절 전이와의 관계로 볼 때 염색체 소실의 정도가 암세포 전이를 주도하는 데 중요한 역할을 수행하는 것으로 생각된다.

반면에 염색체 소실 범위와 달리 개별 염색체 소실은 특정 유전자의 비정상적 발현과 변이에 직접적 연관성이 없는 것 같다. 유육종암과 신경 내분비선암과 같은 다형적 분화와 관련된 각기 다른 계열의 암세포들에서 같은 염색체 내의 동일한 대립유전자의 소실이 관찰되었다. 이러한 사실은 확률적으로 염색체 소실에 의한 암의 구성이 다르다 해도 조직형태학적 차이로 이어지지는 않는다는 것을 의미하며, 따라서 염색체 소실은 다양한 경로를 통해 진행되는 종양에 직접적으로 관여하지는 않지만 매우 동적이며 확률론적으로 의미가 있었다.

수술 전 유전자 진단의 정확성을 알아보기 위해 크기와 유전자형의 관계를 감안하여 암병기를 결정하였다(Fig. 3). 이렇게 결정된 암병기를 수술 조직에 대하여 기존의 형태학적 진단 방법인 전산화 단층촬영에 의한 병기와 함께 그 정확도를 비교해 본 결과 유전자 진단의 정확도가 전산화 단층촬영에 의한 진단보다 높게 나타났다(Fig. 4). 위암의

적절한 치료 방침은 수술 전 영상적 진단에 기초한 TNM분류에 의해 결정된다.(25) 위암은 국소 림프절 전이를 동반한 암 종괴의 절제술이 유일하게 완치를 기대할 수 있는 방법이다. 실제로 광범위한 림프절 절제술은 10여년 전부터 논쟁이 되고 있다.(2,25) 종양의 크기와 내시경 조직의 유전자형에 기초하여 예측된 림프절 전이 정도는 전산화 단층촬영에 의한 병기보다 정확했으며, 이러한 수술 전 유전자 진단으로 위암의 임상적 경과를 정확히 예측할 수 있을 것이다. 따라서 수술 전의 유전자 진단은 치료 방침을 세우는 데 매우 유용할 것으로 기대된다. 예를 들면, 간류암세포의 가능성이 낮은 LOH-L과 MSI 경우, 즉 2~3기 암에서 LOH-L이나 MSI의 경우 림프절 전이가 거의 없었고 재발률이 낮으므로 광범위 림프절 제거에 의해서 간류암세포의 완전한 제거를 기대할 수 있다. 반면에 2~3기 위암에서 LOH-B와 LOH-H는 높은 재발률과 초기 전이로 인해 림프절 절제 범위는 치료 효과를 예측하는 데 도움을 주지 못할 것이다. 최근 작은 위암은 내시경 절제를 하는 경향이 증가하고 있다. MSI나 LOH-L과 같은 저위험 유전자형을 가진 위암은 내시경 절제로도 간류암세포의 완전 제거가 가능할 것으로 생각되며, LOH-B나 LOH-H 같은 고위험 유전자형을 가진 위암에서는 작은 크기의 병변이라 할지라도 국소적 절제나 불완전한 림프절 절제를 동반한 축소 수술은 재발 위험이 클 것으로 생각된다.

결 론

본 연구에서는 수술용 소도를 이용한 내시경 조직 절편의 미세절제를 통해 충분한 양의 종양 DNA를 얻을 수 있었다. 작은 양이라 하더라도 약 500개의 세포로부터 얻은 양질의 DNA는 40개의 표지자 조합에 대한 두 개 이상의 프라이머를 이용한 다중 PCR을 통해 실험이 가능하였다. 따라서 종양 병소의 다형 LOH들은 적은 양의 DNA가 요구되는 PCR에 기초한 단순반복염기서열 분석에 의해 확인이 가능할 것이다. 이전 연구에서 여덟 개의 암관련 염색체에서 선택한 40개의 표지자는 최소한의 위양성 반응을 동반하였으며, 단축성 염색체 결손을 정확하게 대변하는 것으로 확인된 바 있다.(15,22,26) 또한 본 연구에서 제시한 반복염기 유전자형(MSI, LOH)은 각각의 위암에서 기간적 유전자 변이 과정을 통해 분화된 이형(heterogenous) 종양세포들로 이루어진 병소와 매우 다양한 성장 특징을 보이는 각각의 경우를 잘 반영할 수 있을 것이다. 하지만 유전자검사를 위암의 임상적 진단으로서 활용하기 위해서는 높은 순도의 종양세포 구성을 갖는 병변이 요구된다. 따라서 본 연구에서는 70% 이상의 종양세포 구성을 지닌 병변만을 이용하여 순도에 따라 가장 적합한 상대비 환산값을 마련하였으며, 이를 기준으로 유전자 불안정과 염색체 소실을 판단하였다. 하지만 극복해야 할 종양세포의 순도 문제는 아직 남아 있으

며, 지속적인 연구를 통해 더욱 높은 순도의 종양세포를 안정적으로 얻을 수 있다면 맞춤형 치료를 위한 수술 전 진단 과정 및 종양의 침습과 전이에 관련된 유전학적 기전을 밝히는 데 도움을 줄 수 있을 것으로 생각한다.

REFERENCES

1. Lee KE, Lee HJ, Kim YH, et al. Prognostic significance of p53, nm23, PCNA and c-erbB-2 in gastric cancer. *JPN J Clin Oncol* 2003;33:173-179.
2. Bonenkamp JJ, Hermans J, Sasako M, van de Velde CJ. Extended lymph-node dissection for gastric cancer. Dutch Gastric Cancer Group. *N Engl J Med* 1999;340:908-914.
3. Meyer HJ, Jahne J. Lymph node dissection for gastric cancer. *Semin Surg Oncol* 1999;17:117-124.
4. Sierra A, Regueira FM, Hernandez-Lizoain JL, Pardo F, Martinez-Gonzalez MA, Cienfuegos J. Role of the extended lymphadenectomy in gastric cancers surgery: experience in a single institution. *Ann Surg Oncol* 1997;4:137-140.
5. Adachi Y, Oshiro T, Mori M, Maehara Y, Sugimachi K. Tumor size as a simple prognostic indicator for gastric carcinoma. *Ann Surg Oncol* 1997;4:137-140.
6. Yokota T, Ishiyama S, Saito T, et al. Is tumor size a prognostic indicator for gastric carcinoma? *Anticancer Res* 2002;22:3673-3677.
7. Maehara Y, Oshiro T, Endo K, et al. Clinical significance of occult micrometastasis lymph nodes from patients with early gastric cancer who died of recurrence. *Surgery* 1996;119:397-402.
8. Matsumoto M, Natsugoe S, Ishigami S, Uenosono Y, Takao S, Aikou T. Rapid immunohistochemical detection of lymph node micrometastasis during operation for upper gastrointestinal carcinoma. *Br J Surg* 2003;90:563-566.
9. Balmain A, Gray J, Ponder B. The genetics and genomics of cancer. *Nat Genet* 2003;33 (Suppl):238-244.
10. Rajagopalan H, Nowak MA, Vogelstein B, Lengauer C. The significance of unstable chromosomes in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2003;3:695-701.
11. Rhyu MG. Genetic events underlying morphological complexity of gastric carcinoma. *J Korean Med Sci* 1998;13:339-349.
12. Martin L, Assem M, Piard F. Are there several types of colorectal carcinomas? Correlations with genetic data. *Eur J Cancer Prev* 1999;8(Suppl 1):S13-S20.
13. Kim KM, Kwon MS, Hong SJ, et al. Genetic classification of intestinal-type and diffuse-type gastric cancer based on chromosomal loss and microsatellite instability. *Virchows Arch* 2003;443:491-500.
14. Choi SW, Choi JR, Chung YJ, Kim KM, Rhyu MG. Prognostic implications of microsatellite genotypes in gastric carcinoma. *Int J Cancer* 2000;89:378-383.
15. Choi SW, Lee KJ, Bae YA, et al. Genetic classification of colorectal cancer based on chromosomal loss and microsatellite instability predicts survival. *Clin Cancer Res* 2002;8:2311-2322.
16. Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary non-polyposis colon cancer. *Cell* 1993;75:1027-1038.
17. Nagel S, Borisch B, Thein SL, et al. Somatic mutations detected by mini- and microsatellite DNA markers reveal clonal intratumor heterogeneity in gastrointestinal cancers. *Cancer Res* 1995;55:2866-2870.
18. Luinetti O, Ficocca R, Villani L, Alberizzi P, Ranzani GN, Solcia E. Genetic pattern, histological structure, and cellular phenotype in early and advanced gastric cancers: evidence for structure-related gastric subsets and for loss of glandular structure during progression of some tumors. *Hum Pathol* 1998;29:702-709.
19. Chung YJ, Kim KM, Choi JR, Choi SW, Rhyu MG. Relationship between intratumor histological heterogeneity and genetic abnormalities in gastric carcinoma with microsatellite instability. *Int J Cancer* 1999;82:782-788.
20. Sepulveda AR, Wu L, Ota H, et al. Molecular identification of main cellular lineages as a tool for the classification of gastric cancer. *Hum Pathol* 2000;31:566-574.
21. Chung YJ, Choi JR, Park SW, Kim KM, Rhyu MG. Evidence for two modes of allelic loss: multifocal analysis on both early and advanced gastric carcinomas. *Virchows Arch* 2001;438:31-38.
22. Kwon MS, Hong SJ, Cho HA, et al. Extensive and divergent chromosomal losses in squamous and spindle-cell components of esophageal sarcomatoid carcinoma. *Virchows Arch* 2003;443:635-642.
23. Kim KM, Kim MJ, Cho BK, Choi SW, Rhyu MG. Genetic evidence for the multi-step progression of mixed glandular-neuroendocrine gastric carcinomas. *Virchows Arch* 2002;440:85-93.
24. Fuchs CS, Mayer RJ. Gastric carcinoma. *N Engl J Med* 1995;333:32-41.
25. Kitagawa Y, Fujii H, Mukai M, Kubo A, Kitajima M. Current status and future prospects of sentinel node navigational surgery for gastrointestinal cancers. *Ann Surg Oncol* 2004;11(Suppl 3):242S-244S.
26. Hyun JS, Jo BK, Park CJ, Yi JY, Lee JY, Rhyu MG. Loss of heterozygosity and PCR artifacts in a microsatellite analysis of psoriasis and colorectal cancer. *J Korean Med Sci* 2002;17:641-647.