

위암에서 정량적 역전사 중합효소연쇄반응을 이용한 다중 표지자 분석

¹서울대학교 의과대학 외과학교실, ²암연구소, ³서울대학교 생명과학부

유문원¹ · 이혁준^{1,2} · 최수민² · 유지은² · 허 근² · 김영국³ · 양한광^{1,2}

목적: 위암 세포주 및 조직에서 다중 표지자 mRNA 발현을 정량적 RT-PCR 검사를 통해 확인함으로써 이들 표지자를 이용하여 위암의 복강내 미세전이 진단이 가능한가를 평가하고자 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법: 12개의 인체 위암 세포주와 10개의 위암 조직을 대상으로 Carcinoembryonic antigen (CEA), Cytokeratin 20 (CK20), Dopa decarboxylase (DDC), L-3-phosphoserine phosphatase (L3PP)의 네 가지 mRNA를 이용한 정량적 RT-PCR 다중 표지자 분석을 시행하였다.

결과: 12개의 인체 위암 세포주 중 CEA는 4개(33%), CK-20는 1개(8%), DDC는 6개(50%), L3PP는 12개 세포주 모두(100%)에서 과발현되었다. 10개의 위암 조직 중 CEA는 9개, CK20은 8개, DDC는 9개, L3PP는 10개 조직 모두에서 과발현되었다. L3PP는 모든 위암 세포주와 조직에서 과발현을 나타내었으나 과발현 정도는 비교적 낮게 측정된 반면, CEA와 DDC는 일부 위암 세포주 및 조직에서만 과발현을 나타내었지만 과발현 시 충분한 발현도를 나타내었다.

결론: 위암 환자에서 하나 이상의 암 특이적 유전자를 이용한 다중 표지자 분석은 단일 표지자 분석이 가지는 단점을 보완할 수 있을 것으로 예상되며, CEA, DDC, 및 L3PP의 세 가지 mRNA가 후보 유전자로 사용될 수 있을 것으로 생각한다.

중심단어: 다중 표지자, 역전사 중합효소연쇄반응, 위암

서 론

복막재발은 위암의 근치적 수술 후 가장 흔한 재발 형태 중의 하나로서(1,2) 장막층을 침범한 위암의 약 절반에서 발생한다고 한다.(3) 이러한 복막재발은 위암에서 떨어져

책임저자: 이혁준, 서울시 종로구 연건동 28
서울대학교 의과대학 외과학교실 및 암연구소, 110-744
Tel: 02-2072-1957, Fax: 02-766-3975
E-mail: appe98@snu.ac.kr

접수일: 2007년 3월 6일, 게재승인일: 2007년 6월 6일
본 연구는 서울대학교병원 임상의학연구소 일반연구비(09-2004-005-0)의 지원 하에 시행되었음

나온 유리 암세포(free cancer cell)들이 복막 내에 착상되면서 발생하며 이러한 유리 암세포 존재 여부는 환자의 복막 재발과 연관이 있는 것으로 알려져 있다.(4-6)

복강내 유리 암세포 존재 여부를 확인하는 가장 기본적인 검사는 복강 세척액 세포검사(peritoneal washing cytology)이다. 하지만 Papanicolaou 염색 등을 이용한 복강 세척액 세포검사는 민감도가 50~60% 정도로 너무 낮다는 단점이 있다.(7)

복강 세척액 세포검사의 낮은 민감도를 보완하기 위해 최근 활발히 연구되고 있는 방법이 종양 특이 mRNA의 발현을 역전사 중합효소연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)으로 측정하는 것이다. 말초 혈액에서 RT-PCR을 이용한 종양 특이 mRNA 검출법은 위암, 간암, 대장암 등에서 활발히 연구된 바 있다.(8-10) 하지만 위암에서 RT-PCR을 이용한 종양 특이 mRNA 검출법을 적용한 연구는 타 종양에 비해 제한적으로 시도되고 있다.

현재까지 위암에서 가장 활발히 연구된 종양 특이 항원은 암배아항원(carcinoembryonic antigen, CEA)이다. CEA는 위암 환자의 림프절이나 말초혈액에서 위암 미세전이 여부를 판정하기 위해 빈번히 적용되었다.(11-13) CEA mRNA를 이용한 복강 세척액 검사는 일본 Aichi 암센터의 Kodera 등이 가장 활발히 연구하고 있는데 이들은 189명의 위암 환자의 복강 세척액의 CEA mRNA 수치를 RT-PCR을 이용하여 측정한 결과 80%의 민감도와 94%의 특이도를 보여서 복강 세척액 세포검사의 56%와 91%보다 정확하다고 보고하였다.(14) 또한 최근에는 복강 세척액의 CEA mRNA 양성 여부가 암 관련 사망과 관련된 독립적 예후 인자라고 보고하였다.(15) 하지만 CEA 단독으로는 위암에서 적지 않은 위양성과 위음성을 보이므로(16) CEA와 함께 다른 종양 표지자를 함께 적용하려는 시도가 꾸준히 시도되고 있다.(17,18)

그중 하나가 Cytokeratin 20 (CK20)이다. Cytokeratin은 상피세포의 세포질 내에서 세포 형태 유지에 중요한 역할을 담당하는 필라멘트로 20개의 아형(subtype)이 존재한다.(19) CK20은 CK7과 함께 위장관 상피세포에서 선택적으로 분비되고 가성유전자(pseudogene)가 없다는 특징 때문에 위암

을 비롯한 위장관 종양의 종양 표지자로 활발히 연구되고 있다.(20) 위암에 있어서는 일본 오사카 대학의 Okada 등이 림프절 미세전이의 진단에 있어서 CEA, MAGE-3 등과 함께 사용하면 보다 정확한 재발 예측이 가능하였다고 보고한 이후,(11) 말초혈액, 골수 천자액, 복강 세척액 등에서 CEA와 함께 적용한 연구가 다수 시행되었다.(12,18,21,22) 일본 교토도립대학의 Sakakura 등(23)은 위암의 복막 전이와 관련된 유전자를 복막 전이 병변에서 기원한 위암 세포주의 c-DNA 마이크로어레이(microarray)를 통해서 찾고자 하였다. 세포간 결합, apoptosis 등과 관련된 유전자를 평가하던 중 Dopa Decarboxylase (DDC)와 L-3-phosphoserine phosphatase (L3PP)라는 두 개의 복강 전이와 관련된 새로운 유전자를 보고하였다.

DDC는 DOPA (3, 4-dihydroxyphenylalanine)를 DA (dopamine)로 변환시키는 효소로 신경모세포종(neuroblastoma), 소세포폐암(small cell lung cancer)의 진단에 중요한 물질이다. Sakakura 등은 7개의 위암 세포주와 112명의 위암 환자의 복강 세척액으로 DDC의 진단적 정확도를 평가한 결과, 민감도는 87%, 특이도는 98%였다고 보고하였다.(24)

L-3-phosphoserine phosphatase (L3PP)는 serine, glycine, threonine, cysteine 등 아미노산의 생합성을 유도하는 효소이다. Shimomura 등은 L3PP를 CEA와 함께 위암 환자의 복강 세척액 검사에 적용하여, 85.7%의 진단 정확도를 보고하였다.(25) 주목할 점은 일반적으로 분화형(differentiated) 위암에 비해 CEA 발현 양성률이 낮다고 알려진 미분화형(undifferentiated) 위암에서 DDC나 L3PP의 발현 양성률은 비교적 높았다는 점이다.

연구자들은 위암의 복강내 미세전이 진단 척도로 사용할 위암 특이 mRNA 후보 물질을 찾고자 하였는데 문헌 고찰

결과, 위에서 언급한 바와 같이 CEA는 현재 위암에서 가장 활발히 연구되고 있는 종양 표지자이고 CK20은 위암의 림프절, 말초혈액, 복강 세척액 등에서 상당수의 연구가 보고되었기에 본 연구의 대상 물질로 선정하였다. DDC와 L3PP의 위암 적용 연구는 현재까지 단일 기관의 보고 밖에 없지만 CEA 및 CK20 검사에서 위음성을 나타내기 쉬운 미분화 위암의 진단율을 높일 수 가능성이 있다고 생각하여 연구 대상으로 선정하였다. 현재까지 CEA, CK20, DDC, L3PP의 네 가지 mRNA를 이용한 RT-PCR 분석은 보고된 바가 없다.

연구자들은 인체 위암 세포주와 위암 조직을 대상으로 CEA, CK20, DDC 및 L3PP mRNA를 이용한 정량적 RT-PCR 다중 표지자 분석을 시행함으로써, 위암의 복강내 미세전이 진단에의 적용 가능성을 알아보려고 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1) 위암 세포주 및 위암 조직

인체 위암 세포주 SNU-1, SNU-5, SNU-16, SNU-484, SNU-601, SNU-620, SNU-638, SNU-668, SNU-719, NCI-N87, MKN28, AGS의 총 12개 세포주를 이용하였다. 박 등(26,27)이 수집한 SNU 세포주를 포함하여 모든 세포주는 한국세포주은행에서 분양받았다. 세포주는 10% FBS와 항생제가 포함된 RPMI 1640 배지에서 배양하였다. 각 세포주의 기원 및 특성은 Table 1과 같다.

위암 조직은 서울대학교병원 외과에서 2005년 7월부터 2006년 2월 사이에 위절제술을 시행한 위암 환자 중 본 연구를 위해 조직 제공에 서면 동의한 환자 10명을 대상으로

Table 1. Characteristics of human gastric cancer cell lines used in this study

Cell line	Age	Sex	Country of origin	Tumor site*	Cell type	Reference
SNU-1	44	M	Korea	stomach	PD	26
SNU-5	33	F	Korea	ascites	PD	26
SNU-16	33	F	Korea	ascites	PD	26
SNU-484	53	M	Korea	stomach	PD	27
SNU-601	34	M	Korea	ascites	SRC	27
SNU-620	59	F	Korea	ascites	PD	27
SNU-638	48	M	Korea	ascites	PD	27
SNU-668	63	M	Korea	ascites	SRC	27
SNU-719	53	M	Korea	stomach	MD	27
MKN28	70	F	Japan	lymph node	WD	28
NCI-N87	?	M	USA	liver	WD	26
AGS	54	F	USA	stomach	PD	29

*Tumor site used for cell culture. M = male; F = female; PD = poorly differentiated; SRC = signet ring cell; MD = moderately differentiated; WD = well differentiated.

Table 2. Primer sequences used for RT-PCR

	Sense	Antisense
CEA	5'-AATAATAACGGGACCTATGCCTGT-3'	5'-GGAGAAGTTCAGATGCAGAGAC-3'
CK20	5'-TCCAGTCCCATCTCAGCATG-3'	5'-GCTCAACAGCGACTGGAGGT-3'
DDC	5'-TAACGGGAGCCTTTAGACTGGA-3'	5'-TCTGCCAGTGGTATCTGCC-3'
L3PP	5'-TTGGAGATGGTGCCACAGATAT-3'	5'-TTGTTGCCTGATCACATTCCT-3'
GAPDH	5'-TGGAGTCCACTGGCGTCTTC-3'	5'-TTCACACCCATGACGAACATG-3'

CEA = carcinoembryonic antigen; CK20 = cytokeratin 20; DDC = dopa decarboxylase; L3PP = L-3-phosphoserine phosphatase; GAPDH = glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase.

하였다. 전 예가 진행위암이었으며, 고분화형과 저분화형 위암이 각각 5예씩 포함되었다. 수술로 절제한 위 조직에서 위암 조직과 주변 정상 점막 조직을 5 mm³ 정도 떼어 -80°C에 보관하였다. 본 연구는 서울대학교병원 의학윤리위원회 의 규정을 준수하였으며, 연구계획서의 사전 검토 및 승인 후에 시행되었다.

2) RNA 추출

배양 중인 세포주, 환자의 위암 조직 및 주변 정상 점막 조직에 Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 처리한 뒤 chloroform (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 첨가하고 상온에서 10분간 반응시킨 후 13,000 rpm에서 10분간 원심분리를 하였다. 상층액을 분리하여 Isopropanol (Merck, Darmstadt, Germany)를 첨가하고 15분간 상온에서 반응시킨 후 다시 13,000 rpm에서 10분간 원심분리를 하였다. 상층액을 버리고 75% 에탄올로 씻은 후 RNase-free water (Eppendorf, Hamburg, Germany)에 희석해서 사용하였다.

3) 실시간 역전사 중합효소연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction)

인체 위암 세포주와 위암 조직 및 주변 정상 점막 조직에서 추출한 total RNA를 Superscript kit III (Invitrogen)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. PCR은 Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR system을 이용하여 시행하였으며 SyBR Green 1을 사용하여 염색하였다. PCR 조건은 50°C에서 2분, 95°C에서 10분간 변성시킨 후, 95°C에서 15초, 58°C에서 1분으로 하여 40회 반복하였다. RT-PCR에 사용한 mRNA (CEA, CK20, DDC, L3PP)의 primer는 Table 2와 같다. 각각의 mRNA의 대조군으로는 housekeeping 유전자인 GAPDH (glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase)를 사용하였다.

4) mRNA 발현도 평가

RT-PCR을 통해 얻어진 각각의 mRNA의 Ct (crossover point) 값과 GAPDH의 Ct 값의 차이(n)를 이용해서 mRNA의 발현 정도를 정량화하였다. 각 샘플의 2ⁿ × 10⁷ 값을 구한

후, 인체 정상 위 조직 RNA (Ambion, Austin, USA)를 대조군으로 하여, 샘플의 2ⁿ × 10⁷ 값과 대조군의 2ⁿ × 10⁷ 값의 상대 발현도 [2ⁿ × 10⁷ (sample)/2ⁿ × 10⁷ (control)]를 구하였다. 상대 발현도가 1.0 이상인 경우 과발현되었다고 정의하였다. 위암 조직의 경우 추가적으로 동일 환자의 주변 정상 위 점막 조직과 위암 조직 간의 mRNA의 상대적인 발현도를 구하여 보았다.

5) 통계적 분석

위암 세포주 및 조직의 특성에 따른 각 mRNA의 과발현 여부는 chi-square test로, 상대 발현도는 independent t-test를 이용하여 비교하였다. 각 mRNA의 발현도의 상관 관계는 linear regression test로 분석하였다. P 값이 0.05 이하인 경우 통계적으로 유의하다고 판정하였다. 통계 처리는 SPSS for Windows (Version 12.0, SPSS Inc., USA) 프로그램을 이용하였다.

결 과

1) 위암 세포주에서 CEA, CK20, DDC, L3PP mRNA 발현도

13개의 인체 위암 세포주 중 CEA mRNA는 4개(33%)의 세포주(SNU-16, SNU-601, SNU-620, AGS)에서 정상 위 조직보다 과발현되었고, CK20 mRNA는 SNU-5 1개(8%) 세포주에서만 과발현되었다. DDC는 6개(50%) 세포주(SNU-5, SNU-16, SNU-601, SNU-620, SNU-719, NCI-N87)에서 과발현되었으며, L3PP는 12개 세포주 모두(100%)에서 과발현되었다(Table 3). 각각의 mRNA의 상대 발현도의 중앙값은 CEA가 0.04 (0~165.421), CK20이 0.001 (0.0~4.959), DDC가 13.49 (0.001~467.897) 그리고, L3PP가 12.74 (2.056~63.558)였다. CEA, DDC 및 L3PP의 RT-PCR 결과는 일부 세포주에서 기존에 보고된 바 있는 Northern blotting 결과와 잘 일치하였다.(24,25,27)

각 세포주의 기원(원발 종양 기원 vs. 복수 기원) 및 분화도(고분화암 vs. 저분화암)에 따라 각 mRNA의 과발현 여부

및 상대 발현도를 비교하였을 때, 두 군 간에 유의한 차이는 보이지 않았다. 각 mRNA 발현도 간 상관 관계를 분석하였을 때, DDC와 L3PP 간에 연관성이 있는 경향을 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았다($P=0.10$).

2) 위암 조직 및 주변 정상 위 조직에서 CEA, CK20, DDC, L3-PP mRNA 발현도

10개의 위암 조직 중 CEA mRNA는 9개 조직(90%)에서, CK20 mRNA는 8개 조직(80%)에서, DDC mRNA는 9개 조

직(90%)에서, L3PP mRNA는 10개 조직 모두(100%)에서 과 발현되었다. 각각의 mRNA 상대 발현도의 중앙값은 CEA가 8.90 (0.384~233.941), CK20가 5.21 (0.002~65.799), DDC가 31.89 (0.95~404.514), 그리고 L3PP가 17.45 (3.58~143.014)였다. 10명의 환자의 위암 주변 정상 조직 각 mRNA의 발현 양상은 CEA mRNA는 3개 조직에서, CK20 mRNA는 8개 조직에서, DDC mRNA는 4개 조직에서, L3PP mRNA는 6개 조직에서 과발현되었다. 주변 위 조직에서 각 mRNA가 과 발현된 경우에는 항상 위암 조직에서도 해당 mRNA가 과 발현되었다(Table 4).

고분화형과 저분화형 위암 조직 간에 각 mRNA의 상대 발현도를 비교하였을 때, L3PP mRNA의 경우 고분화형 13.3, 저분화형 67.2로 저분화형에서 L3PP의 발현도가 높은 경향을 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았으며($P=0.11$), CK20 mRNA 역시 고분화형 2.80, 저분화형 28.2로 저분화형에서 CK20의 발현도가 높은 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다($P=0.13$). CEA와 DDC mRNA의 경우 위암의 분화형에 따른 발현도는 차이는 관찰되지 않았다.

고 찰

본 연구에서 연구자들은 진행위암 환자의 복강 세척액에서 위암 특이적 mRNA를 이용한 다중 표지자 검사를 위한 선행 연구로서, 위암 세포주와 인체 위암 조직에서 CEA, CK20, DDC, L3PP의 네 가지 mRNA의 발현도를 조사하였다. 말초혈액이나 림프절 등에서 RT-PCR을 이용한 종양 특이 mRNA 검출은 여러 고형암에서 활발히 연구되고 있으나, 위암에서는 이에 대한 연구가 그다지 많이 보고되지 않

Table 3. mRNA levels of CEA, CK20, DDC, and L3PP in 13 human gastric cancer cell lines

Cell line	CEA	CK20	DDC	L3PP
SNU-1	0.001	0	0.007	6.063
SNU-5	0.041	4.959	26.91	7.362
SNU-16	19.698	0.114	233.949	18.126
SNU-484	0	0	0.017	51.625
SNU-601	39.671	0.42	195.368	33.129
SNU-620	165.421	0.036	187.409	37.531
SNU-638	0.002	0.002	0.004	4.112
SNU-668	0	0	0.001	3.482
SNU-719	0.034	0.001	64.002	4.228
NCI-N87	0.131	0.241	467.897	63.558
MKN28	0.003	0	0.004	2.056
AGS	48.168	0.001	0.067	62.683

CEA = carcinoembryonic antigen; CK20 = cytokeratin 20; DDC = dopa decarboxylase; L3PP = L-3-phosphoserine phosphatase.

Table 4. mRNA levels of CEA, CK20, DDC, and L3PP in 10 human gastric cancer tissues and corresponding normal gastric mucosal tissues

Sample No.	Differentiation	CEA		CK20		DDC		L3PP	
		N	T	N	T	N	T	N	T
1	WD	0.007	0.38	0.005	0.002	1.58	64.00	1.09	3.58
2	MD	0.32	1.28	0.08	0.91	0.85	3.29	0.41	4.44
3	MD	0.99	7.41	3.14	1.92	0.13	10.70	0.86	5.39
4	MD	3.71	10.13	2.25	8.57	0.72	53.08	4.53	43.71
5	MD	1.05	159.79	1.67	2.59	14.62	390.74	3.05	9.45
6	PD	0.88	7.67	9.85	7.84	0.40	6.64	32.90	143.01
7	PD	86.23	233.94	44.94	65.80	0.54	4.99	0.08	49.52
8	PD	0.88	215.27	1.45	1.80	2.77	404.51	3.46	25.46
9	Mucinous	0.58	17.88	33.83	53.82	0.48	0.95	6.02	4.96
10	Mucinous	0.91	3.81	7.41	11.88	15.78	313.01	0.90	112.99

CEA = carcinoembryonic antigen; CK20 = cytokeratin 20; DDC = dopa decarboxylase; L3PP = L-3-phosphoserine phosphatase; N, normal; T = tumor; WD = well differentiated; MD = moderately differentiated; PD = poorly differentiated.

고 있다. 이는 아마도 임상적으로 적용 가능한 위암 특이 유전자가 충분히 존재하지 않기 때문일 것으로 생각된다.

본 연구에서 적용한 CEA, CK20, DDC, L3PP는 이미 여러 연구자들이 위암 환자의 복강 세척액 검사에 적용하였던 물질들로, 이들 mRNA의 RT-PCR 검사를 통해서 기존의 복강 세척액 세포검사의 50~60% 대의 낮은 민감도를 80% 이상으로 올릴 수 있다고 보고한 바 있다.(14,22,23,25) 하지만 위암에 있어서 한 가지 mRNA만을 이용하여 복강내 미세전이 여부를 보다 정확하게 진단하기에는 한계가 있다고 판단하여, 최근에는 2가지 이상의 위암 관련 유전자의 mRNA 발현을 함께 검사하는 다중 표지자 검사가 연구되고 있다. 일본 국립암센터의 Mori 등(18)은 CK20, FABP1, MUC2, TFF1, TFF2의 다섯 가지 유전자 검사를 시행함으로써 90% 이상의 민감도를 보고하였다.

본 연구 결과 L3PP가 12개 세포주와 10개의 위암 조직 모두에서 정상 대조군에 비해 과발현되어 가장 높은 민감도(각각 100%)를 나타내었다. 뒤를 이어 DDC가 6개 세포주(50%)와 9개 조직(90%)에서, CEA가 4개 세포주(33%)와 9개 조직(90%)에서, CK20은 1개 세포주(8%)와 8개 조직(80%)에서 과발현되었다. 따라서 L3PP와 DDC가 위암 세포주와 위암 조직 모두에서, 현재까지 위암에서 가장 빈번히 적용되었던 CEA보다 높은 발현도를 나타냄을 확인할 수 있었다.

본 연구에서는 대조군으로 위 점막세포, 근육세포, 장막세포 등이 모두 포함되어 있는 인체 정상 위 조직을 사용하였다. 하지만 복강 세척액 검사에서도 이를 대조군으로 사용할 수 있을지는 불분명하다. 실제로 현재까지 시행된 대부분의 복강 세척액 연구에서는 양성 질환 환자나 조기위암 환자의 복강 세척액을 대조군으로 사용하였다. L3PP의 경우 위암 세포주와 조직 모두에서 과발현을 나타내기는 하였지만 CEA나 DDC에 비해 상대 발현도가 낮게 나타나서(위암 세포주 24.5, 조직 40.3), 복강 세척액 검사에서 양성 질환 환자나 조기위암 환자의 복강 세척액을 대조군으로 사용할 경우 민감도가 떨어질 가능성이 존재한다. 따라서 실제 복강 세척액 검사에 있어서는 L3PP mRNA만을 단독으로 적용하기에는 무리가 있을 수 있으며, 과발현 비율은 떨어지지만 일단 과발현되면 충분한 상대 발현도를 보이는 CEA와 DDC를 함께 적용하는 것이 나을 것으로 생각된다. 이러한 점을 고려하면 추후 시행할 복강 세척액 검사에서는 CEA, DDC, L3PP의 세 가지 mRNA를 적용하는 것이 적절할 것으로 판단하였다.

이를 본 연구에서 적용시켜 보면, 상대 발현도가 1 이상일 때 과발현되었다고 정의하였을 때 각 유전자의 민감도(상대발현도 1 이상 / 암세포주 12개와 위암조직 10개)와 특이도(상대 발현도 1 미만 / 주변 위 점막 조직 10개)를 구해보면 CEA는 59.1% (13/22)와 70% (7/10), CK20은 40.9% (9/22)와 20% (2/10), DDC는 68.2% (15/22)와 60% (6/10) 그

리고 L3PP는 100% (22/22)와 40% (4/10)이었다. 그런데 CEA, DDC 그리고 L3PP의 세 가지 mRNA를 동시에 적용시키면 민감도는 100% (22/22), 특이도는 20% (2/10)로 다중 표지자 분석의 장점을 찾을 수가 없었다. 그러나 상대 발현도를 10 이상일 때 과발현되었다고 정의하면 각 유전자의 민감도와 특이도가 각각 CEA는 40.9% (9/22)와 90% (9/10), CK20은 13.7% (3/22)와 80% (8/10), DDC는 54.5% (12/22)와 80% (8/10), L3PP는 27.3% (6/22)와 90% (9/10)가 되며 CEA, DDC, 그리고 L3PP 세 가지 mRNA를 동시에 적용시키면 민감도와 특이도가 77.3% (17/22)와 80% (8/10)로 단일 표지자 분석에 대한 다중 표지자 분석의 이점을 찾을 수가 있었다. 그러므로 위암 세포의 검출에 있어서 민감도와 특이도를 동시에 높이기 위해서는 상대 발현도 값을 10 이상일 때 과발현되었다고 판단하고 단일 표지자 분석에서의 낮은 민감도를 높이는 데 다중 표지자 분석이 도움이 되리라 생각된다.

본 연구에 DDC와 L3PP mRNA를 포함한 이유는 저분화형 위암에서 CEA mRNA의 발현율이 고분화암에 비해서 낮다는 점을 보완하기 위해서였다. 실제로 L3PP의 경우 저분화형 위암에서 고분화형 위암에 비해 상대 발현도가 높게 나타났다. 하지만 DDC의 경우에는 이러한 분화형에 따른 차이가 관찰되지 않았으며, 세포주 검사에 있어서도 L3PP를 포함한 모든 mRNA에서 분화형에 따른 차이는 관찰되지 않았다. 이에 대해서는 추후 충분한 증례를 대상으로 하는 연구를 통한 재확인이 필요할 것으로 생각한다.

본 연구에서는 추가적으로 위암 조직과 동일 환자의 주변 정상 위 점막의 각 mRNA의 발현도를 비교해 보았다. 그 결과 주변 위 조직에서 mRNA가 과발현된 경우에는 항상 위암 조직에서도 해당 mRNA가 과발현되었으며, 대부분의 경우에서 주변 정상 조직의 발현도보다 위암 조직의 발현도가 높은 점을 관찰할 수 있었다. 이는 한 위암 환자에서 주변 정상 위 점막의 유전자 발현 양상과 위암 조직의 유전자 발현 양상이 유사하다는 것을 시사하는 소견으로, 정상처럼 보이는 주변 위 조직을 위암 조직의 대조군으로 삼는다면 보다 많은 위음성이 초래될 수도 있을 것으로 조심스럽게 예상해 보았다.

결론

위암 환자에서 하나 이상의 암 특이적 유전자를 이용한 다중 표지자 분석은 단일 표지자 분석이 가지는 단점을 보완할 수 있을 것으로 예상되며, CEA, DDC 및 L3PP의 세 가지 mRNA가 후보 유전자로 사용될 수 있을 것으로 생각한다.

REFERENCES

1. Maehara Y, Hasuda S, Koga T, Tokunaga E, Kakeji Y,

- Sugimachi K. Postoperative outcome and sites of recurrence in patients following curative resection of gastric cancer. *Br J Surg* 2000;87:353-357.
2. Yang HK, Cho SJ, Chung KW, Kim YH, Lee HK, Lee KU, Choe KJ, Kim JP. A clinicopathological analysis of recurrent gastric cancer. *J Korean Cancer Assoc* 2001;33:207-215.
 3. Boku T, Nakane Y, Minoura T, Takada H, Yamamura M, Hio-ki K, Yamamoto M. Prognostic significance of serosal invasion and free intraperitoneal cancer cells in gastric cancer. *Br J Surg* 1990;77:436-439.
 4. Bonenkamp JJ, Songun I, Hermans J, van de Velde CJ. Prognostic value of positive cytology findings from abdominal washings in patients with gastric cancer. *Br J Surg* 1996;83:672-674.
 5. Burke EC, Karpeh MS Jr, Conlon KC, Brennan MF. Peritoneal lavage cytology in gastric cancer: an independent predictor of outcome. *Ann Surg Oncol* 1998;5:411-415.
 6. Kodera Y, Yamamura Y, Shimizu Y, Torii A, Hirai T, Yasui K, Morimoto T, Kato T. Peritoneal washing cytology: prognostic value of positive findings in patients with gastric carcinoma undergoing a potentially curative resection. *J Surg Oncol* 1999;72:60-64.
 7. Abe S, Yoshimura H, Tabara H, Tachibana M, Monden N, Nakamura T, Nagaoka S. Curative resection of gastric cancer: limitation of peritoneal lavage cytology in predicting the outcome. *J Surg Oncol* 1995;59:226-229.
 8. 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* 1994;12:475-482.
 9. Matsumura M, Niwa Y, Kato N, Komatsu Y, Shiina S, Kawabe T, Kawase T, Toyoshima H, Ihori M, Shiratori Y, et al. Detection of alpha-fetoprotein mRNA, an indicator of hematogenous spreading hepatocellular carcinoma, in the circulation: a possible predictor of metastatic hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1994;20:1418-1425.
 10. Gerhard M, Juhl H, Kalthoff H, Schreiber HW, Wagener C, Neumaier M. Specific detection of carcinoembryonic antigen-expressing tumor cells in bone marrow aspirates by polymerase chain reaction. *J Clin Oncol* 1994;12:725-729.
 11. Okada Y, Fujiwara Y, Yamamoto H, Sugita Y, Yasuda T, Doki Y, Tamura S, Yano M, Shiozaki H, Matsuura N, et al. Genetic detection of lymph node micrometastases in patients with gastric carcinoma by multiple-marker reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Cancer* 2001;92:2056-2064.
 12. Kubota K, Nakanishi H, Hiki N, Shimizu N, Tsuji E, Yamaguchi H, Mafune K, Tange T, Tatematsu M, Kaminishi M. Quantitative detection of micrometastases in the lymph nodes of gastric cancer patients with real-time RT-PCR: a comparative study with immunohistochemistry. *Int J Cancer* 2003;105:136-143.
 13. Shin JH, Chung J, Kim HO, Kim YH, Hur YM, Rhim JH, Chung HK, Park SC, Park JG, Yang HK. Detection of cancer cells in peripheral blood of stomach cancer patients using RT-PCR amplification of tumour-specific mRNAs. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16(Suppl 2):137-144.
 14. Kodera Y, Nakanishi H, Ito S, Yamamura Y, Kanemitsu Y, Shimizu Y, Hirai T, Yasui K, Kato T, Tatematsu M. Quantitative detection of disseminated free cancer cells in peritoneal washes with real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction: a sensitive predictor of outcome for patients with gastric carcinoma. *Ann Surg* 2002;235:499-506.
 15. Kodera Y, Nakanishi H, Ito S, Mochizuki Y, Ohashi N, Yamamura Y, Fujiwara M, Koike M, Tatematsu M, Nakao A. Prognostic significance of intraperitoneal cancer cells in gastric carcinoma: analysis of real time reverse transcriptase-polymerase chain reaction after 5 years of follow-up. *J Am Coll Surg* 2006;202:231-236.
 16. Kodera Y, Isobe K, Yamauchi M, Satta T, Hasegawa T, Oikawa S, Kondoh K, Akiyama S, Itoh K, Nakashima I, et al. Expression of carcinoembryonic antigen (CEA) and nonspecific crossreacting antigen (NCA) in gastrointestinal cancer; the correlation with degree of differentiation. *Br J Cancer* 1993;68:130-136.
 17. Yonemura Y, Fujimura T, Ninomiya I, Kim BS, Bandou E, Sawa T, Kinoshita K, Endo Y, Sugiyama K, Sasaki T. Prediction of peritoneal micrometastasis by peritoneal lavaged cytology and reverse transcriptase-polymerase chain reaction for matrix metalloproteinase-7 mRNA. *Clin Cancer Res* 2001;7:1647-1653.
 18. Mori K, Aoyagi K, Ueda T, Danjoh I, Tsubosa Y, Yanagihara K, Matsuno Y, Sasako M, Sakamoto H, Mafune K, et al. Highly specific marker genes for detecting minimal gastric cancer cells in cytology negative peritoneal washings. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;313:931-937.
 19. Chu PG, Weiss LM. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology* 2002;40:403-439.
 20. Tot T. Cytokeratins 20 and 7 as biomarkers: usefulness in discriminating primary from metastatic adenocarcinoma. *Eur J Cancer* 2002;38:758-763.
 21. Sugita Y, Fujiwara Y, Taniguchi H, Mori T, Ishii T, Niwa H, Okada Y, Takiguchi S, Yasuda T, Yano M, et al. Quantitative molecular diagnosis of peritoneal lavage fluid for prediction of peritoneal recurrence in gastric cancer. *Int J Oncol* 2003;23:1419-1423.
 22. Kodera Y, Nakanishi H, Ito S, Yamamura Y, Fujiwara M, Koike M, Hibi K, Ito K, Tatematsu M, Nakao A. Prognostic significance of intraperitoneal cancer cells in gastric carcinoma: detection of cytokeratin 20 mRNA in peritoneal washes, in addition to detection of carcinoembryonic antigen. *Gastric Cancer* 2005;8:142-148.
 23. Sakakura C, Hagiwara A, Nakanishi M, Shimomura K, Takagi T, Yasuoka R, Fujita Y, Abe T, Ichikawa Y, Takahashi S, et

- al. Differential gene expression profiles of gastric cancer cells established from primary tumour and malignant ascites. *Br J Cancer* 2002;87:1153-1161.
24. Sakakura C, Takemura M, Hagiwara A, Shimomura K, Miyagawa K, Nakashima S, Yoshikawa T, Takagi T, Kin S, Nakase Y, et al. Overexpression of dopa decarboxylase in peritoneal dissemination of gastric cancer and its potential as a novel marker for the detection of peritoneal micrometastases with real-time RT-PCR. *Br J Cancer* 2004;90:665-671.
 25. Shimomura K, Sakakura C, Takemura M, Takagi T, Fukuda K, Kin S, Nakase Y, Miyagawa K, Ohgaki M, Fujiyama J, et al. Combination of L-3-phosphoserine phosphatase and CEA using real-time RT-PCR improves accuracy in detection of peritoneal micrometastasis of gastric cancer. *Anticancer Res* 2004;24:1113-1120.
 26. Park JG, Frucht H, LaRocca RV, Bliss DP Jr, Kurita Y, Chen TR, Henslee JG, Trepel JB, Jensen RT, Johnson BE, et al. Characteristics of cell lines established from human gastric carcinoma. *Cancer Res* 1990;50:2773-2780.
 27. Park JG, Yang HK, Kim WH, Chung JK, Kang MS, Lee JH, Oh JH, Park HS, Yeo KS, Kang SH, et al. Establishment and characterization of human gastric carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 1997;70:443-449.
 28. Motoyama T, Hojo H, Watanabe H. Comparison of seven cell lines derived from human gastric carcinomas. *Acta Pathol Jpn* 1986;36:65-83.
 29. Barranco SC, Townsend CM Jr, Casartelli C, Macik BG, Burger NL, Boerwinkle WR, Gourley WK. Establishment and characterization of an in vitro model system for human adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res* 1983;43:1703-1709.

= Abstract =

Multiple Genetic Marker Analysis with Using Quantitative RT-PCR in Gastric Cancer

Moon-Won Yoo, M.D.¹, Hyuk-Joon Lee, M.D., Ph.D.^{1,2}, Soo Min Choi², Jieun Yu², Keun Hur², Young-Kook Kim³ and Han-Kwang Yang, M.D., Ph.D.^{1,2}

¹Department of Surgery, ²Cancer Research Institute, Seoul National University College of Medicine and ³Department of Biological Science, Seoul National University, Seoul, Korea

Purpose: This study was aimed at evaluating the diagnostic validity of peritoneal dissemination of gastric cancer cells by performing multiple genetic marker analysis via quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) in gastric cancer cell lines and gastric cancer tissues.

Materials and Methods: Quantitative RT-PCR was performed on 12 human gastric cancer cell lines and 10 gastric cancer tissues with four mRNAs of carcinoembryonic antigen (CEA), Cytokeratin 20 (CK20), dopa decarboxylase (DDC), and L-3-phosphoserine phosphatase (L3PP).

Results: Out of the 12 human gastric cancer cell lines we tested, CEA was overexpressed in four cell lines (33%), CK20 in one (8%), DDC in six (50%) and L3PP was expressed in all the lines (100%). Out of the 10 gastric cancer tissues we tested, CEA was overexpressed in nine tissues, CK20 in eight, DDC in nine and L3PP was overexpressed in all the tissues. L3PP was overexpressed in all the gastric cancer cell lines and tissues, but the levels of overexpression were lower than those of CEA and DDC.

Conclusion: Multiple genetic marker analysis can compensate for the weak points of single marker analysis when testing gastric cancer, and three mRNAs of CEA, DDC and L3PP can be used as candidate genes. (**J Korean Gastric Cancer Assoc 2007;7:59-66**)

Key Words: Multiple marker, RT-PCR, Gastric cancer