

백혈병 미세잔존질환 정량검출을 위한 실시간 역전사중합효소연쇄반응법의 유용성

화순전남대학교병원 진단검사의학과¹, 화순전남대학교병원 조혈계질환 유전체 연구센터²
광양보건대학 임상병리과³, 전남대학교 의과대학 외과학교실⁴

조 정 애¹ · 김 다 운¹ · 정 성 두¹ · 천 지 선¹ · 나 경 아¹ · 김 혜 란² · 김 진 각³ · 김 인 환¹ · 김 수 현¹ · 신 명 근¹ · 김 형 록⁴

Utility of Real Time RT-PCR for the Quantitative Detection of Minimal Residual Disease in Hematological Malignancy

Jeung-Ai Cho¹, Da-Woon Kim¹, Seong-Du Jeong¹, Ji-Seon Cheon¹, Gyeong-Ah Na¹, Hye-Ran Kim², Jin-Gak Kim³,
In-Hwan Kim¹, Soo-Hyun Kim¹, Myung-Geun Shin¹, and Hyeong-Rok Kim⁴

*Department of Laboratory Medicine, Chonnam National University Hwasun Hospital, Hwasun 519-809, Korea¹
Genome Research Center for Hematopoietic Disease, Chonnam National University Hwasun Hospital,
Hwasun 519-809, Korea²*

*Department of Clinical Pathology, Gwangyang Health College, Gwangyang 545-703, Korea³
Department of Surgery, Chonnam National University Medical School, Gwangju 501-746, Korea⁴*

Chromosomal rearrangements are major pathology in hematological malignancies. The detection of minimal residual disease (MRD) for these gene rearrangements helps in monitoring treatment outcomes and predicting prognosis of patients. Recently, quantification of these gene transcripts based on real-time quantitative polymerase chain reaction (RQ-PCR) has been used as MRD detection. The purpose of this study is to ensure the usefulness of the RQ-PCR technique for detecting MRD in hematological malignancy patients. The patients had been diagnosed to AML1-ETO positive AML, PML-RARa positive AML and BCR-ABL positive MPN at Chonnam National University Hwasun Hospital from Jan. 2006 to Aug. 2008. The fusion transcript was quantified by RQ-PCR and analyzed in comparison to conventional cytogenetics, FISH and RT-PCR. The fusion gene transcript was quantified by RQ-PCR in 57 samples from 14 patients with AML1-ETO positive AML, 79 samples from 27 patients with PML-RARa positive AML and 108 samples from 36 patients with CML. At diagnosis, the quantitative fusion transcripts for AML1-ETO, PML-RARa and BCR-ABL showed the range of 0.485552651~10.82233683 (mean 3.782217131, SD 2.998052348), 0.005300395~0.29267494 (mean 0.056901315, SD 0.080131381) and 0.1293929~12.94826849 (mean 1.701935665, SD 2.200913158). The increase of AML1-ETO fusion gene transcripts preceded morphologic relapse in two patients. Quantification of fusion gene transcripts by RQ-PCR could detect

MRD in samples which were negative by in cytogenetic analysis or FISH. Our findings indicated that quantitative analysis of AML1-ETO, PML-RARa and BCR-ABL transcripts by RQ-PCR might be a useful tool for the monitoring of minimal residual disease in hematological malignancies.

Key Words : RQ-PCR, Leukemia, Minimal residual disease, AML1-ETO, PML-RARa, BCR-ABL

I. 서 론

혈액종양에서 미세잔존질환(minimal residual disease, MRD)은 임상적으로 관해상태에서 형태학적 방법 등과 같은 고식적인 검사법으로 검출되지 않은 잔류병소를 말한다. 미세잔존질환은 백혈병 환자의 완전관해상태 평가 및 재발을 조기에 발견하는 지표로서의 중요성이 점차 강조되고 있다. 이러한 미세잔존질환의 검출을 위해서는 염색체검사, 분자생물학적 방법, 형광동소보합교잡반응법(fluorescence in situ hybridization, FISH), 면역표지자 검사 등이 있으며, 예민도가 높은 면역표지자 검사와 역전사중합효소연쇄반응법(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)이 많이 이용되고 있다(Negrin와 Blume, 1991; Ito와 Miyamura, 1994; Campana와 Pui, 1995; Tobal와 Yin, 1996). 최근 형광양의 변화를 관측하는 것을 기초로 하는 정량적 실시간중합효소연쇄반응(real-time quantitative polymerase chain reaction, RQ-PCR)의 발달에 따라 RQ-PCR을 이용한 미세잔존질환 검출에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다(Bustin, 2002; van der Velden 등, 2003).

백혈병 환자의 진단 및 경과관찰에서 미세잔류병소측정을 통한 예후 평가와 재발 여부 검출에 AML1-ETO, CBF-MYH11, PML-RARa, MLL, BCR-ABL 등의 백혈병 융합유전자 정량검사가 실시되고 있다(Weisser 등, 2007; Santamaria 등, 2007). CML 환자의 대부분에서 BCR-ABL이 존재하고, AML 환자의 약 40%에서 AML1-ETO, CBF-MYH11, PML-RARa, MLL 등의 융합유전자를 가지고 있어 이들 융합유전자의 경우 RT-PCR로도 검출이 가능하나, 이러한 정성적인 분자생물학적 방법은 MRD를 추적하기에 상대적으로 민감도가 낮다고 보고되고 있다(Gameiro 등, 2001; Grimwade와 Lo Coco, 2002). 또한, 혈액종양 환자에서 임상적으로 재발이 진단되기 전에 융

합유전자의 양이 먼저 증가되기 시작한다고 보고가 있어, 미세잔존질환을 추적하기 위해 정량적 분자생물학적 검출이 요구되고 있다(Elmaagacli 등, 2001; Santamaria 등, 2007). 그러나 국내에서 백혈병 환자를 대상으로 한 이들 융합유전자에 대한 RQ-PCR의 검사적 유용성의 평가 및 검증에 대한 체계적인 연구보고는 아직 찾아보기 어려운 실정이다.

이에 AML1-ETO, PML-RARa 융합유전자 양성 급성골수구성백혈병과 만성골수구성백혈병 환자에서 AML1-ETO, PML-RARa, BCR-ABL 융합유전자의 RQ-PCR을 실시하여, RQ-PCR을 이용한 백혈병 융합유전자의 정량분석의 MRD검출의 유용성을 평가하였고, RQ-PCR 검사결과를 FISH, RT-PCR 및 염색체 검사결과와 비교 하였다.

II. 대상 및 방법

1. 대 상

2006년 1월부터 2008년 8월까지 화순전남대학교병원에서 골수검사를 시행하여 세포유전학적 및 분자생물학적 검사가 의뢰되어 AML1-ETO 융합유전자 양성 급성골수구성백혈병(n=14), PML-RARa 유전자재배열 양성 급성전골수구성백혈병(n=27) 및 만성골수구성백혈병(n=36)으로 진단받은 환자 중, RQ-PCR법을 시행한 환자를 대상으로 형광동소보합교잡반응, 역전사중합효소연쇄반응법 및 염색체 검사결과와 비교 분석하고, 진료기록을 검토하여 질병상태의 진행여부를 평가하였다.

2. 방 법

가. 세포유전학 검사

1) 세포배양법

RPMI 1640 배양액 8 mL(Invitro Corporation, GIBCO, USA), sodium bicarbonate 2.0 g/mL, fetal bovine serum 2 mL의 배양액에 약 1×10^6 개의 세포를 넣고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 각각 검체마다 직접법, 24 시간 배양법, 48 시간 배양법, 72 시간 배양법으로 나누어 실시하였다. Colcemid[®] 100 µL/10 mL를 넣고 37°C 1 시간 처리한 후 0.075 M KCl 저장용액에 넣어 37°C, 20 분간 반응시켰다. 고정액(methanol:glacial acetic acid=3:1)으로 고정단계를 거친 다음 슬라이드 표본을 제작하였다. 슬라이드는 60°C 건조기에서 하룻밤 둔 후 G-분염법 후 현미경 관찰하였다.

2) 핵형분석

핵형분석은 최소 20 개의 잘 퍼진 세포를 관찰하였고, ISCN 2005(Shaffer와 Tommerup, 2005)의 지침에 따라 비정상핵형을 분석하고 판독하였다.

3) FISH

AML1-ETO, PML-RAR α , BCR-ABL 융합유전자의 확인을 위한 형광표지자로 상품화된 표지자(Vysis, IL, USA)를 사용하였다. 골수와 말초혈액의 간기 및 분열중기 세포에서 최소 300 개의 세포를 분석하여 양성 세포의 백분율(%)을 구하였다.

나. 분자유전학 검사

1) Multiplex RT-PCR

가) RNA 분리

말초혈액과 골수검체에서 Lymphoprep[™] 비중원심법을 이용하여 백혈구만 따로 분리하여 -70°C에서 보관하였고, RNA추출은 RNAqueous[™] KIT(Ambion, Woodward Street, Austin, TX)을 이용하였다.

나) cDNA 합성

추출한 RNA 10 µL와 cDNA random primer 1 µL를 넣고 72°C에서 2 분간 반응시킨 후 5x First Strand buffer

(Invitrogen) 4 µL, 10 mM dNTP(Finnzymes) 1 µL, M-MLV RT(Invitrogen) 0.5 µL, RAase inhibitor(Takara) 0.5 µL, 증류수 3 µL와 반응액 9 µL을 넣고 37°C에서 1 시간 반응시킨 후 95°C에서 5 분간 효소를 불활성화하였다.

다) Nested RT-PCR

cDNA 10 µL과 stock solution 즉, 10x buffer(Finnzymes) 5 µL, 10 mM dNTP(Finnzymes) 1 µL, 2 U/µL DNA polymerase(Finnzymes) 1 µL, 증류수 30 µL, primer mixture (Table 1) 3 µL를 혼합하여, Mastercycler(Eppendorf, Hamburg, Germany)를 이용하여 1차 PCR을 시행하였다.

94°C에서 5 분간 초기변성 후 94°C 1 분, 61°C 1 분 30 초 반응주기를 26 회 반복하고, 72°C에서 7 분간 반응시켰다. Internal control의 반응은 시발체 혼합액만 다르고 다른 조건은 동일하게 유지하였다. 1차 반응물 0.5 µL 과 2차 시발체와 증류수 39.5 µL를 첨가하여 1차 PCR과 동일한 조건으로 94°C 5 분간 초기변성시키고, 94°C 1 분, 68°C 1 분 30 초의 반응주기를 30 회 반복, 72°C 7 분간 유지하고 정지시켰다. 2차 PCR의 internal control의 시발체 혼합액 반응은 만 다르고 다른 조건은 동일하게 반응시켰다.

2) 실시간 역전사 중합효소연쇄반응법을 이용한 정량 가) RNA 분리 및 cDNA 합성

말초혈액과 골수검체에서 Lymphoprep[™] 비중원심법을 이용하여 백혈구만 따로 분리하여 -70°C에 보관하였다. 분리한 백혈구로부터 RNAqueous[™] Kit(Ambion)을 이용하여 제조사의 지침에 따라 RNA를 추출하였고, NanoDrop ND-1000(NanoDrop Technologies, Wilmington, USA)를 사용하여 RNA 농도 및 순도를 측정하였다. 추출된 총 RNA의 1 µg을 SuperScript[™] III First-Strand Synthesis System for RT-PCR(Invitrogen, Carlsbad, USA) kit 를 이용하여 cDNA를 합성하였다.

나) 실시간 역전사 중합효소연쇄반응법을 이용한 정량 RQ-PCR을 위한 real-time PCR 기기는 Rotor-Gene[™] 6000(Corbette Research, NSW, Australia)을 사용하였고, Rotor-Gene 소프트웨어 1.7을 이용하여 결과를 분석하였다. 융합유전자 정량을 위한 시약은 Real-Q[™] BCR-ABL

Table 1. Oligonucleotide primers for RT-PCR

Gene rearrangements	1st PCR primers	2nd PCR primers
	Sequence 5' to 3'	Sequence 5' to 3'
BCR-ABL of t(9;22)(q34;q11.2)		
A1-1	ATCTGCCTGAAGCTGGTGGGCT	
A1-2	GCAGCAGCTTGAAAAGTACTT	
A2		AGTGAAGCCGCTCGTTGGAACTCCAA
A3	TGATTATAGCCTAAGACCCGGA	
A4		ATCTCCACTGGCCACAAAATCATACA
B1	GAAGTGTTTCAGAAGCTTCTCC	
B2		TGGAGCTGCAGATGCTGACCAACTCG
B3	ACCATCGTGGGCGTCCGCAAGA	
B4		AGATCTGGCCCAACGATGGCGAGGGC
PML-RaRa of t(15;17)(q21;q22)		
A	CCACAAGGCTGACGCTGTATT	GTGGGCATGAAGTCAGAGAGC
B	CAAGAAAGCCAGCCAGAG	GCCAGTGTACGCCTTCTCCAT
C	GTGCGCCAGGTGGTAGCTC	CAGCGGACTACGAGGAGAT
ABCE	AAGCCCTTGACGCCCTCAC	CCCATAGTGGTAGCCTGAGGAC
AML1-ETO of t(8;21)(q22;q22)		
AB	GATGGCCACTCTGGTCACTGTG	TGGCTGGCAATGATGAAAAC
A	TCTCCTATCTCGGGTGAAATGTC	CGTTGTCGGTGTAATGAACTG
1*	TTCTCGTCCAGCCCTTCTACC	CTACGADGGGGGTCTCCAC
2*	TTTTCTCTTCTCGCCGTTTCA	AGGTTCCGCTCTCGCACTT

Quantification Kit, Real-Q™ PML-RARa Quantification Kit 및 Real-Q™ AML1-ETO Quantification Kit (Bio-Sewoom Inc., Seoul, Korea)를 이용하였다. 대조유전자로는 ABL 유전자를 사용하였다.

반응액은 2 µL의 cDNA, 2x PCR reaction mixture 10 µL, 멸균수 4 µL와 BCR-ABL, PML-RARa 또는 AML-ETO probe와 primer mixture 4 µL로 구성하여 모두 20 µL로 하였다. 또한, 대조유전자인 ABL 반응 혼합물 역시 2 µL의 cDNA에 10 µL의 2x PCR reaction mixture와 멸균수를 4 µL 첨가하고 ABL probe 와 primer mixture를 4 µL 첨가하여 총 20 µL의 반응물을 준비하였다.

중합효소연쇄반응은 50°C에서 2 분간 반응시킨 후 95°C에서 10 분간 초기변성 시키고 95°C 10 초, 60°C 10 초, 72°C 30 초에서 반응주기를 45 회 반복하였다

III. 결 과

1. 대상환자의 임상 및 검사적 특성

AML1/ETO 융합유전자 양성 급성골수구성백혈병으로 진단받은 환자는 14 예로 평균나이 43.8(24~62) 세, 남자 6 예, 여자 8 예였다. 진단당시 염색체 검사를 시행한 경우는 13 예로, 이상을 보인 경우는 12 예였으며, 이들 모두 t(8;21)(q22;q22)을 보였고, Y 및 X 염색체 소실이 각각 2 예, 복합적 염색체 이상을 보인 경우는 2 예였다 (Table 2). PML/RARa 융합유전자 양성 급성골수구성백혈병 환자는 27 명으로 평균나이 42.2(5~75) 세, 남자 14 예, 여자 13 예였다. 염색체 검사는 24 예에서 시행되었고, 22 예에서 t(15;17)(q22;q21)이 관찰되었고, 2 예에서 각각 +22,del(16)(q13)를 동반하였다. RT-PCR에서 PML-RARa 융합유전자를 확인하였으나 염색체 검사에서 t(15;17)(q22;q11)을 관찰할 수 없었던 예는 2 예로 정상

Table 2. Clinicopathologic characteristics of patients at diagnosis

Variables		AML with t(8;21) (n=14)	AML with t(15;17) (n=27)	CML (n=36)		
Age (years)	Mean	43.8	42.2	46.6		
	Range	(24-62)	(5-75)	(13-74)		
Sex	Male/Female	6/8	14/13	21/15		
	Median	8,730	4,410	100,100		
WBC (/μL)	Range	(3,130-122,210)	(500-144,000)	(30,560-481,900)		
	Median	7.0	8.0	10.6		
Hgb (mg/dL)	Range	(5.6-10.6)	(4.4-13.3)	(6.4-15.4)		
	Median	24,500	49,000	491,000		
Platelet count (/μL)	Range	(3,000-135,000)	(5,000-135,000)	(154000-2999000)		
	Karyotypic abnormality	t(8;21)(q22;q22)	6	t(15;17)(q22;q21)	20	t(9;22)(q34;q11.2)
	t(8;21)(q22;q22) with -Y	2	t(15;17)(q22;q21) with +22	1	t(9;22)(q34;q11.2) with additional abnormality	2
	t(8;21)(q22;q22) with -X	2	t(15;17)(q22;q21) with del(16)(q13)	1		
	t(8;21)(q22;q22) with ≥3 additional abnormalities	2	Hyperdiploidy	1		
	Normal karyotype	1	Normal karyotype	1		

a One patient with t(8;21) AML, three patients with t(15;17) AML and two patient with CML were diagnosed by the detection of fusion genes using reverse transcriptase-polymerase chain reaction or FISH

핵형 1 예, hyperdiploidy 1 예였다. 만성골수구성백혈병 환자는 36 명으로 평균나이 46.6(13~74) 세, 남자 21 예, 여자 15 예였다. 염색체 검사는 34 예에서 시행되었

고, 모든 환자에서 t(9;22)(q34;q11.2)가 관찰되었으며, 이 중 2 예에서는 각각 der(9)del(9)(q34), -12 등이 동반되었다(Table 2).

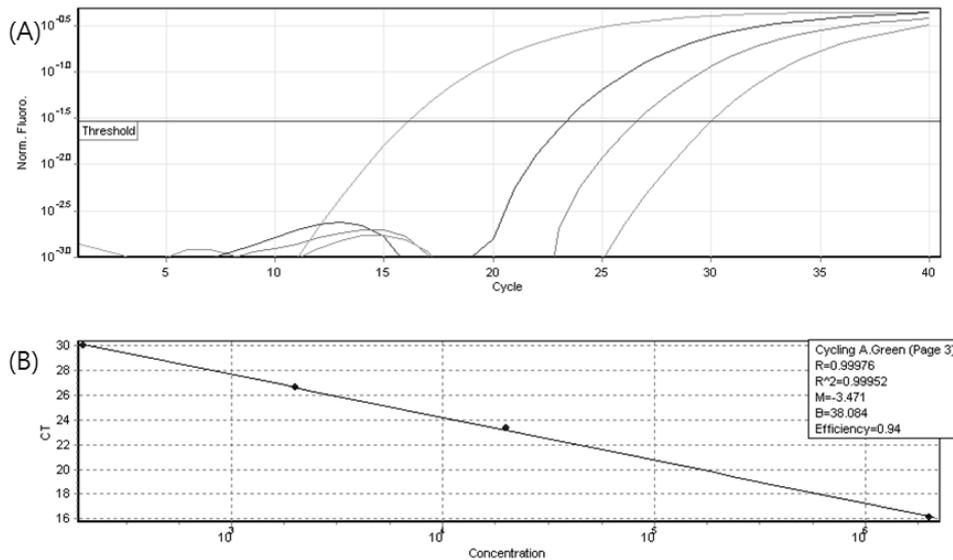


Fig. 1. The Amplification plot and standard curve of AML-ETO. (A) Amplification plot. The standard materials from each fusion transcript were clearly amplified and there no significant background noise. Red bar indicated threshold in order to define CT value. (B) Standard curve. Linearity was plotted by cycle number (y-axis) and the concentration of each fusion transcripts (x-axis). Correlation (R), slope (M) and efficiency showed 0.99976, -3.471, and 0.94 respectively.

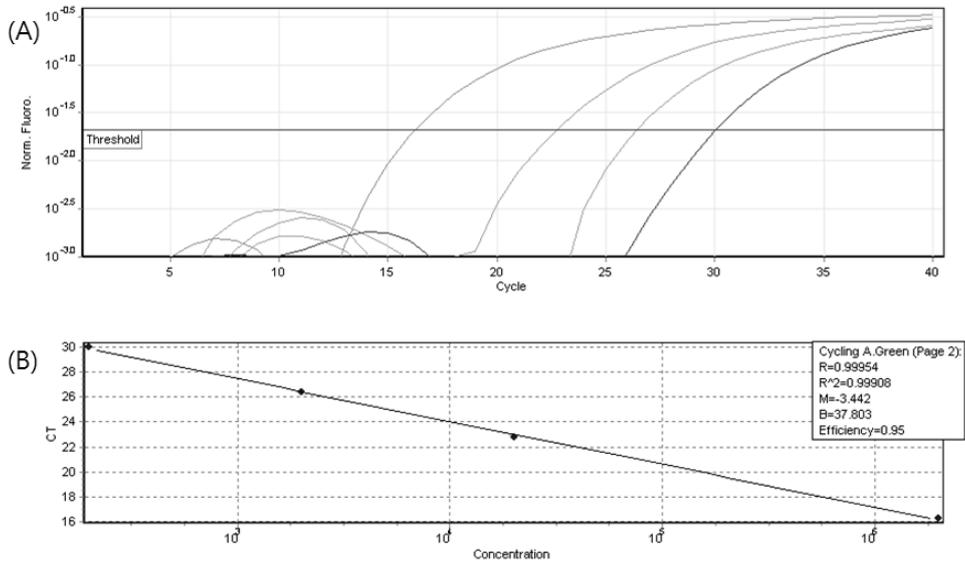


Fig. 2. The Amplification plot and standard curve of PML-RARa. (A) Amplification plot. The standard materials from each fusion transcript were clearly amplified and there no significant background noise. Red bar indicated threshold in order to define CT value. (B) Standard curve. Linearity was plotted by cycle number (y-axis) and the concentration of each fusion transcripts (x-axis). Correlation (R), slope (M) and efficiency showed 0.99954, -3.442, and 0.95 respectively.

2. 실시간역전사중합효소반응법의 표준물질 및 증폭 반응 결과
표준곡선 생성을 위해서 농도값을 알고 있는 2×10^6 ,

2×10^4 , 2×10^3 , 2×10^2 copy number의 AML1-ETO, PML-RARa, BCR-ABL, ABL plasmid DNA 표준물질을 사용하였다. 증폭주기가 증가함에 따라 표적 중합효소연쇄반

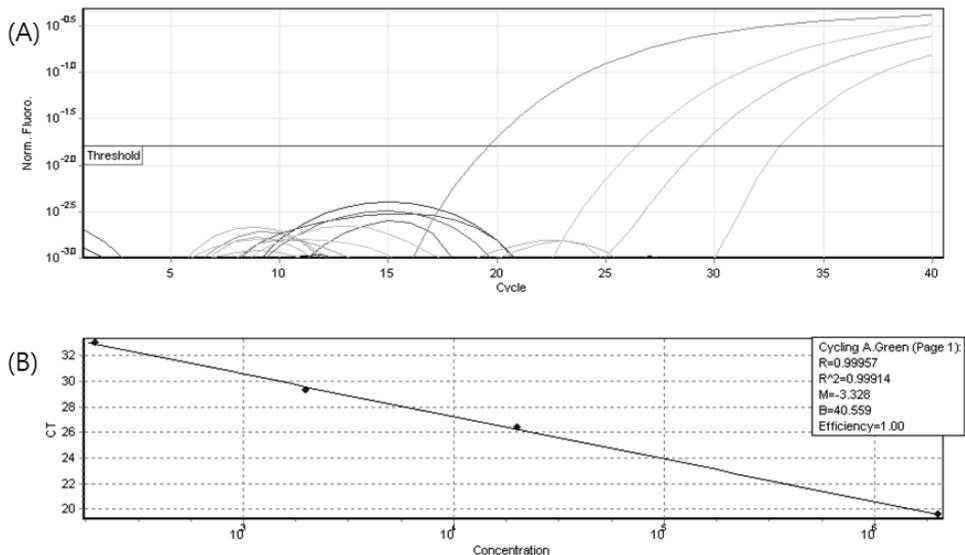


Fig. 3. The Amplification plot and standard curve of BCR-ABL. (A) Amplification plot. The standard materials from each fusion transcript were clearly amplified and there no significant background noise. Red bar indicated threshold in order to define CT value. (B) Standard curve. Linearity was plotted by cycle number (y-axis) and the concentration of each fusion transcripts (x-axis). Correlation (R), slope (M) and efficiency showed 0.999146, -3.328, and 1.00 respectively.

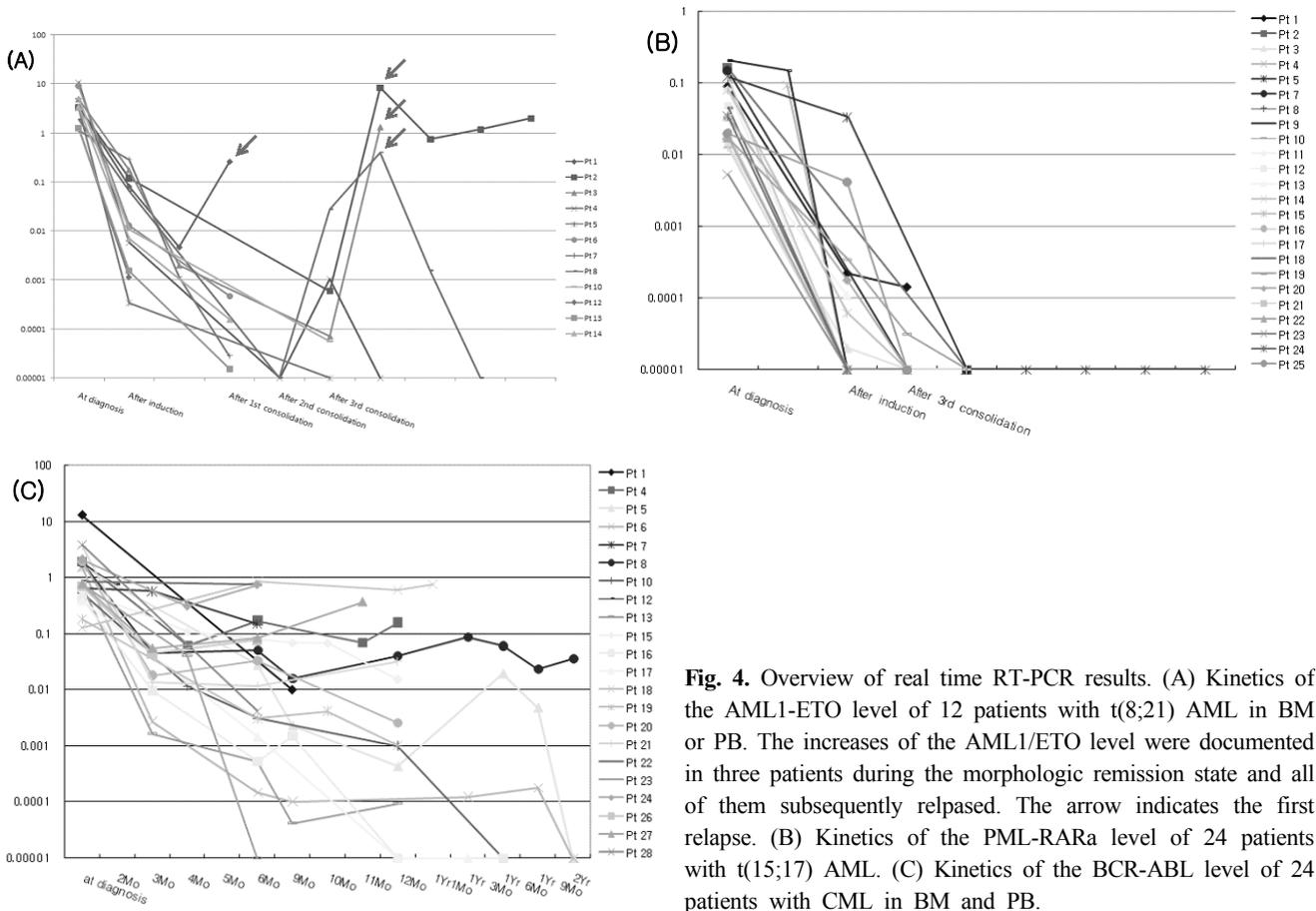


Fig. 4. Overview of real time RT-PCR results. (A) Kinetics of the AML1-ETO level of 12 patients with t(8;21) AML in BM or PB. The increases of the AML1/ETO level were documented in three patients during the morphologic remission state and all of them subsequently relapsed. The arrow indicates the first relapse. (B) Kinetics of the PML-RARa level of 24 patients with t(15;17) AML. (C) Kinetics of the BCR-ABL level of 24 patients with CML in BM and PB.

용 산물의 양에 비례하여 형광 강도가 증가하였다. 각 표준물질들의 농도의 로그값과 threshold cycle(CT) 값 사이에는 좋은 상관관계를 보였다. AML1-ETO의 표준곡선은 직선성 0.99976, 기울기 -3.471, 효율 0.94를 보였다(Fig. 1), PML-RARa의 표준곡선은 직선성 0.99954, 기울기 -3.442, 효율 0.95였으며(Fig. 2), BCR-ABL의 표준곡선은 직선성 0.99957, 기울기 -3.328, 효율 1.00을 보여(Fig. 3) 우수한 표준곡선 양상을 보였다. 또한 모든 증폭곡선에서 background noise는 관찰되지 않았다.

3. 실시간 역전사 중합효소반응을 이용한 융합유전자 정량 결과

AML1-ETO 융합유전자 양성 급성골수구성 백혈병 환자 14 예의 진단 당시 AML1-ETO/ABL ratio 값은 0.48552651에서 10.82233683(평균 3.782217131, 표준편차 2.998052348)까지의 다양한 값을 보이고 있었다. 완전관해 시의 34 검

체는 0에서 0.260653646(평균 0.018249135, 표준편차 0.050335329)의 범위를 보였다. 이 중 2 예에서 임상적, 혈액학적 관해상태에서 0.260653646, 0.02783900으로 RQ 결과의 증가가 관찰되었고, 2 예에서 모두 1 개월 후 재발로 판정되었다.

전체 AML1-ETO 융합유전자 양성 급성골수구성백혈병 환자 14 예 중 2 예는 관해유도요법 이후 각각 1 개월, 2 개월 후 사망하여 추적관찰이 불가능하였고 12 예에서 2 회에서 6 회에 걸쳐 추적검사를 시행하였다. 4 예에서 완전관해 후 재발하였으며, 이 중 2 예에서 임상적으로 재발이 진단되기 전에 AML1-ETO 융합유전자의 양이 증가하기 시작하였다. 나머지 6 예는 재발없이 지속적인 혈액학적 관해상태를 유지하고 있었다(Fig. 4A).

PML-RARa 융합유전자 양성 급성골수구성백혈병 환자 27 예의 진단시 PML-RARa/ABL ratio 값은 0.005300395에서 0.29267494(평균 0.056901315, 표준편차 0.080131381)

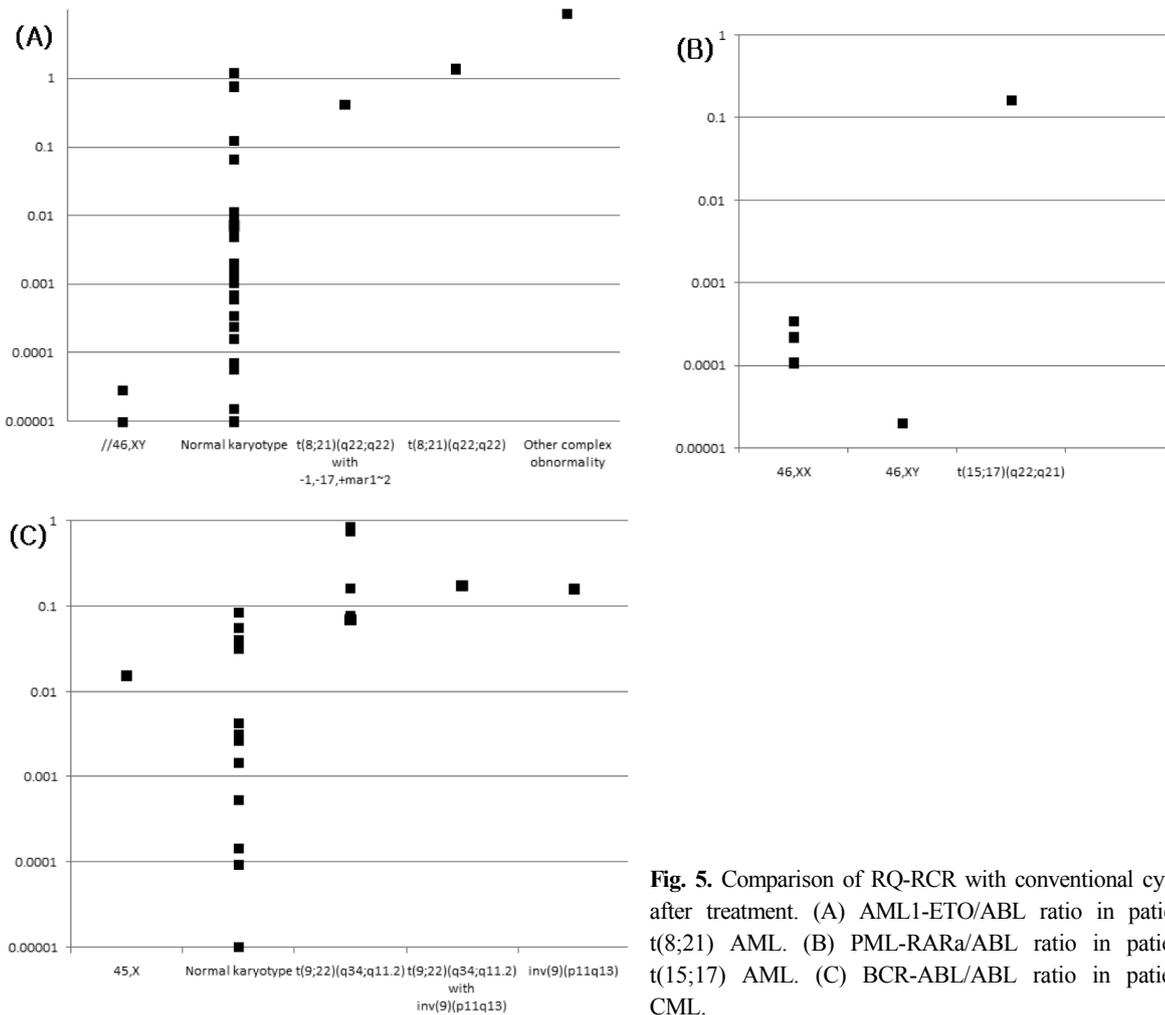


Fig. 5. Comparison of RQ-RCR with conventional cytogenetics after treatment. (A) AML1-ETO/ABL ratio in patients with *t(8;21)* AML. (B) PML-RARa/ABL ratio in patients with *t(15;17)* AML. (C) BCR-ABL/ABL ratio in patients with CML.

까지 범위를 보였다. 27 예의 환자 중, 3 예는 추적관찰하지 못하였고, 4 예의 환자에서 관해유도요법 이후 1 차례, 20 예의 환자에서 관해유도요법과 공고유법 이후에 2 차례에서 6 차례까지 추적관찰하였다. 추적관찰 중 형태학적으로 완전관해를 보였던 52 검체의 PML-RARa/ABL ratio 값은 0에서 0.147487478(평균 0.003644274, 표준편차 0.021067347)의 범위를 보였다. 추적관찰하였던 24 예의 환자에서 모두 RML-RARa 융합유전자의 양이 감소하였으며 재발은 없었다(Fig. 4B).

만성골수구성백혈병 환자 36 예의 진단 시 BCR-ABL/ABL ratio 값은 0.1293929부터 12.94826849(평균 1.701935665, 표준편차 2.200913158) 범위였고, 22 예의 환자에서 1 회에서 8 회까지 추적검사를 시행하였다. 18 예의 환자에서

다양한 정도로 BCR-ABL 융합유전의 양이 감소하였고, 4 예의 환자에서 BCR-ABL 융합유전자 양이 증가하였다(Fig. 4C).

4. 실시간 역전사 증합효소반응과 세포유전학적 검사의 비교

AML1-ETO 양성 급성골수구성백혈병환자에서 추적관찰 중에 RQ-PCR과 염색체검사를 동시에 시행한 경우는 11 예의 29 검체였다. 23 검체에서 RQ-RCR에서는 AML1-ETO/ABL ratio 값이 0.000015598에서 1.190409414까지 다양한 범위로 검출되었으나 염색체 이상소견은 발견할 수 없었으며, 5 검체에서 RQ-PCR과 염색체 검사에서 일치한 결과를 보였고 1 검체에서 RQ-RCR에서는 높은 농도

의 양성을 보였으나 염색체검사에서 클론성 염색체 이상은 보였으나 t(8;21)(q22;q22)는 관찰되지 않았다(Fig. 5A).

PML-RARa 양성 급성골수구성백혈병환자에서 추적 관찰 중, RQ-PCR과 염색체 검사를 동시에 시행한 검체는 16 예 24 검체로, 19 검체는 RQ-PCR과 염색체 검사에서 모두 음성소견과 정상 핵형을 보였다. 0.160925456의 값을 보였던 1 검체는 t(15;17)(q22;q21)의 염색체 이상소견을 보였으나, RQ-PCR에서 0.00002에서 0.000341207까지의 낮은 값을 보인 4 검체에서는 정상핵형을 보였다(Fig. 5B).

만성골수구성백혈병으로 진단받고 추적관찰 시 RQ-PCR과 염색체 검사를 함께 시행한 경우는 총 20 예, 27 검체였다. 0.069094332에서 0.839677425까지의 범위를 보인 6 검체에서는 t(9;22)(q34;q11.2)의 염색체 이상소견을 보이고, 3 예에서는 RQ-PCR과 염색체 검사에서 모두 음성소견을 보여 일치하였으나, 0.000532486에서 0.08402112까지의 값을 보인 16 검체에서는 1 예서 X 염색체 소실을 보였으나 (9;22)(q34;q11.2)은 보이지 않았고, 15 검체는 정상핵형을 보였다. 나머지 두 검체는 동일 환자로 RQ-PCR 값이 각각 0.170336419, 0.157978066로 비슷한 결과를 보였으나 염색체검사에서는 46,XY,inv(9)(p11q13), t(9;22)(q34;q11.2)과 46,XY, inv(9)(p11q13)의 결과를 보였다(Fig. 5C).

AML1-ETO/ABL ratio 값을 구한 AML1-ETO 융합유

전자 양성 급성골수구성백혈병 환자 중 진단 시와 치료 후 FISH를 시행한 환자는 13 예, 22 검체였다. 검사의뢰 시기별로는 진단받은 당시 13 검체(재발진단 2 검체 포함), 관해유도화학요법 후 7 검체, 관해유지 화학요법 후 두 검체였다. FISH 검사상 AML1-ETO 융합유전자 양성률과 AML1-ETO/ABL ratio 값과의 상관관계는 Fig. 6A와 같다. FISH에서 0.40809125까지의 AML1-ETO 융합유전자는 검출을 할 수 있었으나 0.175163217에서 0.00059648까지의 낮은 농도를 보인 융합유전자는 검출하지 못하였다.

PML-RARa 양성 급성골수구성백혈병환자 중 진단시와 치료 중 RQ-PCR과 FISH 결과를 비교할 수 있었던 환자는 27 예, 62 검체로 검사의뢰 시기별로는 진단 시 27 검체, 추적관찰 검체 35 검체였다. PML-RARa/ABL ratio 값과 FISH 검사상 PML-RARa 융합유전자 양성률과의 상관관계는 Fig. 6B와 같았다. 0.0001 미만의 RML-RARa/ABL ratio 값은 FISH 검사에서는 검출하지 못하였고, 0.033342576 이상의 RQ-PCR 결과를 보인 융합유전자는 FISH 에서도 모두 양성을 보였다. 0.033154722에서 0.004116766사이의 14 검체(진단시 12 검체, 추적관찰 중의 검체 2 검체) 중 11 검체에서는 FISH에서 양성을 보였으나, 진단시 1 검체, 추적관찰 2 검체에서 음성을 보였다. CML 환자는 36 예, 37 검체에서 FISH 결과와 비교할 수 있었고, 모두 양성소견을 보였다.

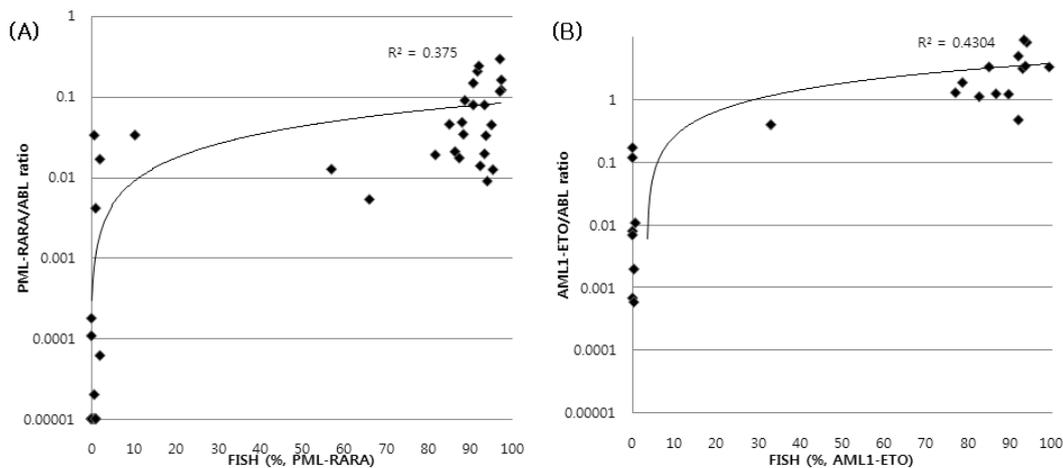


Fig. 6. The correlation between the percentage of fusion gene in FISH and fusion gene/ABL ratio in RQ-PCR. Modest correlation was observed. (A) AML1-ETO/ABL ratio and FISH result. (B) PML-RARa/ABL ratio and FISH result.

Table 3. Conventional RT-PCR versus real-time RT-PCR in the detection of the AML1-ETO, PML-RARa and BCR-ABL transcripts.

Conventional RT-PCR	Real-time RT-PCT					
	AML1-ETO		PML-RARa		BCR-ABL	
	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative
Positive	18 ^a	0	28 ^b	0	26 ^c	0
Negative	0	1	0	3	0	0

^a AML1-ETO/ABL ratio (mean 2.827788969, range 0.013069338-10.82233683)

^b PML-RARa/ABL ratio (mean 0.064933945, range0.005300395-0.29267494)

^c BCR-ABL/ABL ratio (mean 1.897374321, range0.39664386-12.94826849)

5. 고식적 RT-PCR과 RQ-PCR의 비교

기존의 RT-PCR 방법과 실시간 역전사 증합효소연쇄 반응법의 비교가 가능했던 검체는 AML1-ETO 양성 급성 골수구성백혈병 19 검체(진단시 14 예, 추적관찰시 5 예), PML-RARa 양성 급성골수구성 백혈병 31 검체(진단시 27 예, 추적관찰시 4 예), 만성골수구성백혈병 26 검체(진단시 26예)였다. 정성적인 기존방법과의 불일치는 보이지 않았고 모두 일치한 결과를 보였다(Table 3).

IV. 고찰

본 연구에서 실시간 역전사증합효소반응을 이용한 융합유전자 정량 결과, 진단시 융합유전자양은 AML1-ETO 융합유전자 양성 급성골수구성백혈병 환자 14 예에서 0.485552651에서 10.82233683(평균 3.782217131, 표준편차 2.998052348), PML-RARa 융합유전자 양성 급성골수구성백혈병 환자 27 예에서 0.005300395에서 0.29267494(평균 0.056901315, 표준편차 0.080131381), 만성골수구성백혈병 환자 36 예에서 0.1293929부터 12.94826849(평균 1.701935665, 표준편차 2.200913158)까지 다양한 값을 보이고 있었다. AML1-ETO 융합유전자 양성 급성골수구성백혈병 환자에서 치료 후 추적검사는 12 예 43 검체에서 시행하였고, 혈액학적 관해 상태를 유지하였던 시기 34 검체, 재발되거나 관해되지 않은 상태의 검체가 9 검체 포함되었다. 혈액학적, 형태학적으로 관해상태를 유지하였던 시기의 34 검체 중 2 예에서 이전의 결과(각각 0.008133362, 0)보다 융합유전자 정량결과가 각각 0.260653646, 0.02783900로 증가하였고, 2 예에서 모두 1 개월 후 재발

로 판정되었다. Hiroto 등(2008)도 AML1-ETO 융합유전자 양의 증가시 그 후 재발이 강하게 예측된다고 보고하였다.

PML-RARa 융합유전자 양성 급성골수구성백혈병 환자 27 예의 환자 중, 치료 후 추적검사는 24 예 52 검체에서 시행하였으며 융합유전자의 정량값은 0에서 0.147487478(평균 0.003644274, 표준편차 0.021067347)의 범위를 보였다. 추적관찰하였던 24 예의 환자에서 모두 RML-RARa 융합유전자의 양이 감소하였으며 지속적으로 혈액학적 관해상태를 유지하고 있었다.

만성골수구성백혈병 환자 36 예 중, 치료 후 추적검사는 22 예 72 검체에서 시행하였고, 18 예의 환자에서 다양한 정도로 BCR-ABL 융합유전의 양이 감소되었고, 4 예의 환자에서 글리백 등의 지속적인 약물 치료에도 불구하고 BCR-ABL 융합유전자 양이 0.1 이상 유지되어 주기적인 추적검사를 필요로 하였다.

진단시 염색체 검사에서는 정상핵형을 보였으나 RQ-PCR 및 RT-PCR에서 양성을 보인 환자는 AML1- ETO 양성 급성골수구성백혈병 1 예, PML-RARa 양성 급성골수구성백혈병 1 예였다. 정상핵형을 보였으나 RT-PCR 및 RQ-PCR에서 AML1-ETO 융합유전자를 확인할 수 있었던 환자는 dual color dual fusion probe를 사용한 FISH에서 fusion gene signal이 1 개만 관찰되어 complex translocation이 의심되었다. 정상핵형을 보인 PML-RARa 양성 급성골수구성백혈병은 FISH에서도 300 개의 간기세포 중에서 6 개의 간기세포에서만 PML- RARa 융합유전자 형광표지자가 관찰되었고, RT-PCR과 RQ-PCR에서는 양성을 보여 민감하고 특이적인 분자유전학검사가 급성골수구성백혈병을 진단하는데 꼭 필요함을 확인하

였다.

AML1-ETO 양성 급성골수구성백혈병환자에서 치료 후 11 예 29 검체에서 RQ-PCR과 염색체검사 결과를 비교할 수 있었다. 이 중 23 검체에서 AML1-ETO/ABL ratio 값이 0.000015598에서 1.190409414까지 다양한 범위로 검출되었으나 염색체 이상소견은 발견할 수 없었다. PML-RARa 양성 급성전골수구성백혈병환자에서 치료 후, RQ-PCR과 염색체 검사를 동시에 시행한 검체는 16 예 24 검체로, 10 검체는 결과가 일치하였으나(19 검체 음성, 1 검체 양성), 0.00002에서 0.000341207까지의 낮은 농도의 융합유전자가 검출된 4 검체에서는 정상핵형을 보였다.

만성골수구성백혈병으로 진단받고 치료 중 RQ-PCR과 염색체 검사를 함께 시행한 경우는 총 20 예, 27 검체였다. 11 검체에서 결과가 일치하였으나(8 검체 양성, 3 검체 음성), 0.000532486에서 0.08402112까지의 값을 보인 16 검체에서는 t(9;22)(q34;q11.2)을 관찰할 수 없었다. 이 중 1 예의 환자에서 진단 시 염색체검사서 46,XY,t(9;22)(q34;q11.2), RQ-PCR 결과 1.895998815였으나, 치료 6 개월, 1 년 후 추적검사서 RQ-PCR 값이 각각 0.170336419, 0.157978066로 진단시 보다는 감소하였으나 지속적으로 비슷한 농도로 BCR/ABL 융합유전자가 관찰되었고, 염색체검사서 46,XY,inv(9)(p11q13),t(9;22)(q34;q11.2)과 46,XY,inv(9)(p11q13)의 결과를 보여 추적 6 개월 검사상 clonal evolution을 보였고, 1 년째 추적검사서 RQ-PCR에서는 이전의 결과와 비슷한 정도로 BCR-ABL 융합유전자를 검출하였으나 염색체검사서 필라델피아 염색체는 관찰되지 않고 다른 추가적인 염색체 이상소견이 관찰되었다. 추적검사서 BCR-ABL 융합유전자의 검출 뿐 아니라 clonal evolution 등 다른 염색체 구조적 이상을 확인하기 위해서 분자유전학적 검사와 함께 염색체 검사를 상호보완적으로 시행해야 할 것으로 생각되었다.

AML1-ETO/ABL 양성 급성골수구성백혈병 22 검체 중 0.40809125까지의 높은 농도의 AML1-ETO 융합유전자는 검출할 수 있었으나 0.175163217에서 0.00059648까지의 낮은 농도를 보인 융합유전자는 검출하지 못하였다. PML-RARa 양성 급성골수구성백혈병 62 검체 중 0.0001 미만의 RML-RARa/ABL ratio 값은 FISH 검사에서는 검출하지 못하였고, 0.033342576 이상의 RQ-PCR

결과를 보인 융합유전자는 FISH 에서도 모두 양성을 보였다. 0.033154722에서 0.004116766사이의 14 검체(진단시 12 검체, 추적관찰 중의 검체 2 검체) 중 진단시 11 검체에서는 FISH에서 양성을 보였으나, 진단시 1 검체, 추적관찰 2 검체에서 음성을 보였다. 진단시의 융합유전자는 낮은 농도라도 FISH에서 잘 검출되었으나, 치료 후의 낮은 농도의 융합유전자는 FISH에서 제대로 검출이 되지 않았다. CML 환자는 36 예, 37 검체에서 FISH 결과와 비교할 수 있었고, 모두 양성소견을 보였다. 융합유전자를 직접 형광현미경으로 검출하는 FISH 검사법 또한, 많은 수의 간기 세포를 정량 분석할 수 있어 많이 이용되고 있으나, 민감도 측면에서 최소잔존질환을 모니터링하는 데에는 한계가 있었다.

고식적인 RT-PCR과 비교가 가능했던 검체는 AML1-ETO 양성 급성골수구성백혈병 19 검체(진단시 14 예, 추적검사 5 예), PML-RARa 양성 급성골수구성 백혈병 31 검체(진단시 27 예, 추적검사 4 예)와 만성골수구성백혈병 26 검체(진단시 26 예)로, 정성적인 기준방법과의 불일치는 보이지 않았고 모두 일치한 결과를 보였다. 하지만 대부분 진단시의 검체였으며 RQ-PCR 에서 AML1-ETO/ABL ratio 평균 2.827788969 (0.013069338-10.82233683), PML-RARa/ABL ratio 평균 0.064933945 (0.005300395-0.29267494), BCR-ABL/ABL ratio 평균 1.897374321 (0.39664386-12.94826849)의 높은 농도의 값을 보인 검체만 RT-PCR을 시행하였고, 융합유전자 양이 낮은 농도를 보인 검체는 시행하지 않아 RT-PCR의 민감도는 확인할 수 없었다. 문헌보고에 의하면, 기존의 RT-PCR 방법의 민감도는 BCR-ABL의 경우 10^6 까지로 우수하게 검출하는 것으로 알려져 있으며, RQ-PCR 방법으로는 문헌보고마다 10^4 에서 10^7 이상까지 다양한 민감도를 보고하고 있었다(Emig 등, 1999; Preudhomme 등, 1999).

실시간 중합효소연쇄반응은 민감한 형광물질의 사용으로 정량이 편하고 실험 중에 증폭곡선을 확인할 수 있어 검체의 적절성이나 PCR 저해자 유무를 파악하는 등 실험의 결과를 예측할 수 있는 장점이 있다. 하지만 측정된 형광에너지 값으로 RNA의 copy수를 바로 얻을 수 없기 때문에 표준물질의 CT 값을 3 개 이상 얻어 표준곡선을 그려서, 정량값을 표준화하여야 정확한 값을 얻을 수 있다. 본 연구에 사용된 검사에서도 우수한 표준곡선 양성

을 보였다. 실시간 중합효소연쇄반응법은 위양성의 가능성, 검사실간의 시행 장비, 형광 탐식자 및 대조유전자의 차이에 따른 검사실간의 결과비교가 어렵다는 등의 단점이 있으나 융합유전자를 정량할 수 있고 미세잔존질환을 민감하게 검출할 수 있다는 장점이 있어 검사실에서의 사용이 증가되고 있다.

백혈병의 진단, 치료효과 판정, 예후추정 및 잔류병소 검출에 AML-ETO, PML-RARa, BCR-ABL 역전사정량융합유전자중합효소연쇄반응검사는 매우 예민하고 특이적으로 정량적 결과를 보여주었다. 한편 염색체 검사 및 FISH에서 검출하지 못하는 미세한 융합유전자를 검출할 수 있었으며, 임상 및 혈액학적으로 관해상태에서도 융합유전자의 양을 정확히 정량측정할 수 있어 백혈병의 재발을 예측할 수 있었다. 따라서 RQ-PCR을 이용한 백혈병융합유전자 정량 분석은 고식적인 방법에 의해 검출되지 않은 미세잔존질환의 모니터링을 통해 치료효과 판정 및 새로운 치료방침을 정하는데 매우 유용할 것으로 사료되었다.

참 고 문 헌

1. Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* 29:23-39, 2002.
2. Santamaria C, Chillón MC, Fernandez C, Martín-Jimenez P, Balanzategui A, Garcia Sanz R, San Miguel JF, Gonzalez MG. Using quantification of the PML-RARa transcript to stratify the risk of relapse in patients with acute promyelocytic leukemia. *Haematologica* 92:315-322, 2007.
3. Campana D, Pui CH. Detection of minimal residual disease in acute leukemia: Methodologic advances and clinical significance. *Blood* 85:1416-1434, 1995.
4. Elmaagacli AH, Freist A, Hahn M, Opalka B, Seeber S, Schaefer UW, Beelen DW. Estimating the relapse stage in chronic myeloid leukaemia patients after allogeneic stem cell transplantation by the amount of BCR-ABL fusion transcripts detected using a new real-time polymerase chain reaction method. *Br J*

- Haematol* 113:1072-1075, 2001.
5. Emig M, Saussele S, Wittor H, Weisser A, Reiter A, Willer A, Berger U, Hehlmann R, Cross NC, Hochhaus A. Accurate and rapid analysis of residual disease in patients with CML using specific fluorescent hybridization probes for real time quantitative RT-PCR. *Leukemia* 13:1825-1832, 1999.
6. Gameiro P, Vieira S, Carrara P, Silva AL, Diamond J, Botelhode Sousa A, Mehta AB, Prentic HG, Guimaras JE, Hoffbrand AV, Foroni L, Parreira A. The PML-RARa transcript in long-term follow-up of acute promyelocytic leukemia patients. *Haematologica* 86:577-585, 2001.
7. Grimwade D, Lo Coco F. Acute promyelocytic leukemia: a model for the role of molecular diagnosis and residual disease monitoring in directing treatment approach in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 16:1959-1973, 2002.
8. Hiroto N, Masaki I, Takuji I, Toshiya Y, Masaya H, Hitoshi K, Takaaki T, Akiyo S, Hiroatsu I, Motohiro T, Masamitsu Y, Tomoki N, Ritsuro S, Isamu S. Clinical significance of minimal residual disease in patients with t(8;21) acute myeloid leukemia in Japan. *Int J Hematol* 88:154-158, 2008.
9. Ito Y, Miyamura K. Clinical significance of minimal residual disease in leukemia detected by polymerase chain reaction: Is molecular remission a milestone for achieving a cure? *Leuk Lymphoma* 16:57-64, 1994.
10. Negrin RS, Blume KG. The use of the polymerase chain reaction for the detection of minimal residual malignant disease. *Blood* 78:255-258, 1991.
11. Preudhomme C, Revillion F, Merlat A, Hornez L, Roumier C, Duflos-Grardel N, Jouet JP, Cosson A, Payrat JP, Fenaux P. Detection of BCR-ABL transcripts in chronic myeloid leukemia (CML) using a "real time" quantitative RT-PCR assay. *Leukemia* 13:957-964, 1999.
12. Shaffer LG and Tommerup N. eds. ISCN, 2005: An international system for human cytogenetic nomen-

clature. 1st. Basel: Karger, 2005.

13. Tobal K, Yin JA. Monitoring of minimal residual disease by quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction for AML1-MTG8 transcripts in AML M2 with t(8;21). *Blood* 88:3704-3709, 1996.
14. van der Velden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, van Dongen JJ. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* 17:1013-1034, 2003.
15. Weisser M, Haferlach C, Hiddemann W, Schnittger S. The quality of molecular response to chemotherapy is predictive for the outcome of AML1-ETO-positive AML and is independent of pretreatment risk factors. *Leukemia*. 21:1177-1182, 2007