

종양세포 검출을 위한 MAGE A1-6 역전사 이중 증합효소연쇄반응법의 민감도 및 특이도 평가

전창호 · 이상채¹ · 현대성¹ · 홍석일² · 홍영준² · 장윤희² · 이강대³ · 정만홍⁴ · 장희경⁵ · 박창권⁶ · 박종욱⁷

대구가톨릭대학교 의과대학 진단검사의학교실, 내과학교실¹, 원자력병원 진단검사의학과², 고신대학교 의과대학 이비인후과교실³, 내과학교실⁴, 병리학교실⁵,
계명대학교 의과대학 흉부외과학교실⁶, 면역학교실⁷

Evaluation of Sensitivity and Specificity of MAGE A1-6 RT-nested PCR as a Cancer Detection Method

Chang-Ho Jeon, M.D., Sang-Chae Lee, M.D.¹, Dae-Sung Hyun, M.D.¹, Seok-Il Hong, M.D.², Young-Joon Hong, M.D.²,
Yoon-Hwan Chang, M.D.², Kang-Dae Lee, M.D.³, Man-Hong Jung, M.D.⁴, Hee-Kyung Chang, M.D.⁵,
Chang-Kwon Park, M.D.⁶, and Jong-Wook Park, M.D.⁷

Departments of Laboratory Medicine and Internal Medicine¹, School of Medicine, Catholic University of Daegu, Daegu; Department of
Laboratory Medicine², Korean Cancer Center, Seoul; Departments of Otolaryngology³, Internal Medicine⁴ and Pathology⁵,
School of Medicine, Kosin University, Busan; Departments of Thoracic Surgery⁶, and Immunology⁷, School of Medicine,
Keimyung University, Daegu, Korea

Background : The aim of this study is to evaluate the sensitivity and specificity of MAGE (Melanoma Antigen Gene) A1-6 RT-nested PCR as a detection method for cancer cells.

Methods : From February 2001 and December 2002, various samples [cancer tissue, sputum, induced sputum, broncho-alveolar lavage (BAL), blood, urine and cervical brush] were obtained from 355 cancer patients. Moreover, 316 samples, including cancer adjacent normal tissue, blood, urine and sputum were collected for the negative controls. MAGE A1-6 RT-nested PCR was performed and the results were evaluated with clinical diagnosis. The sensitivity of the MAGE assay was compared with that of the telomerase assay and cytologic examination using 26 sputa of lung cancer patients.

Results : The average sensitivity of the MAGE assay in cancer tissues was 79% (85% in squamous carcinoma and 70% in adenocarcinoma). The sensitivity in body fluids was 57% (9-27% in blood, 59% in sputum, 68% in urine, more than 70% in induced sputum and BAL, and 87% in pleural fluid and cervical brush). In the negative controls, the positive rates were less than 8.9% in normal tissues and 2% in blood, sputum and urine. The average sensitivity of the MAGE RT-PCR, telomerase assay and cytologic examination was 61.5%, 26.9% and 15.4%, respectively.

Conclusions : The MAGE A1-6 RT-PCR showed excellent sensitivity and specificity. Therefore, it could be effectively utilized as a cancer detection method in the clinical laboratory. (*Korean J Lab Med* 2003; 23: 357-62)

Key Words : MAGE, RT-PCR, Sensitivity, Specificity, Cancer, Detection Method

접 수 : 2003년 8월 4일

접수번호 : KJCP1692

수정본접수 : 2003년 9월 15일

교신저자 : 전 창 호

우 705-718 대구시 남구 대명 4동 3056-6

대구가톨릭의료원 진단검사의학과

전화 : 053-650-4144, Fax : 053-622-4142

E-mail : chjeon@cu.ac.kr

서 론

현재 임상진단에 활용되고 있는 종양표지자는 초기 암을 검출한다는 의미보다는 진단된 암을 치료한 뒤 치료반응 예측이나 경

과관찰에 많이 활용되고 있는 실정이다[1]. 이는 종양표지자가 정상세포에서 발현되기 때문이며 암세포에만 특이적으로 나타나는 종양표지자는 매우 드문 실정이다. 최근 각종 유전자를 이용한 암 검출법이 개발되어 임상적 활용을 위해 연구되고 있으나 임상검사실에서 사용하기에 용이하지 않다[2-4].

Melanoma antigen gene (MAGE)은 종양세포와 남성의 생식기 세포 및 태반에서만 발현되며 정상세포는 발현되지 않는 매우 특이적인 유전자이다[5, 6]. 따라서 지금까지 종양의 면역요법이나 종양세포 검출에 활용되어 왔다. MAGE 유전자는 많은 아형이 존재하고 있으며[5-8], 이 중 A 유전자가 각종 종양에서 많이 연구되었다[9, 10]. A 유전자는 1-12까지의 아형으로 구분되며 각 아형에 따라 종양세포에서 20-40%까지의 발현율을 보이는 것으로 연구되어 왔다[11-15].

중합효소연쇄반응법(polymerase chain reaction, PCR)은 1개의 암세포에서 유리된 유전자를 100만 배 정도 증폭할 수 있는 민감도를 가졌지만, 위양성의 위험으로 인하여 종양세포의 검출에 여러 번 PCR을 시행하는 것은 바람직하지 않다[16]. 이에 저자들은 MAGE A 유전자중 1-6까지의 아형을 동시에 증폭할 수 있는 공동 시발체를 개발하였다. 이 시발체를 이용한 역전사 이중 중합효소연쇄반응을 이용한 예비실험을 시행한 결과, 위암, 폐암, 두경부암 및 자궁암 등의 종양세포주에서 평균 78.6%에 달하는 양성률을 보였으며 정상 조직에서는 거의 발현되지 않았다.

이에 공동 MAGE 시발체를 이용한 역전사 중합효소연쇄반응을 사용하여 각종 종양 조직 및 임상 검체에서 양성률과 특이도를 평가하여, 초기검출을 위한 종양표지자로서의 이용 가능성을 검토하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상

2001년 2월부터 2002년 12월까지 대구가톨릭 의료원, 동산의료원, 고신의료원 및 원자력병원에 내원하여 조직소견상 암으로 확진된 194명의 환자를 대상으로 각종 암 조직(폐암 53예, 위암 27예, 대직장암 15예, 유방암 16예, 자궁경부암 40예, 두경부암 27예, 난소암 16예)을 채취하였으며, 261명의 각기 다른 암 환자로부터 객담 46예, 유도객담 33예, 기관지 세척액 40예, 흉곽액 15예(이상 폐암), 혈액 60예(폐암 15예 및 위암 45예), 방광암 환자의 소변 38예 및 자궁암 환자의 자궁경부 도말 검체 15예 등을 채취하였다. 음성 대조검체로 정상조직 92예, 정상인의 혈액 50예와 소변 34예 및 객담 140예 등 총 316예의 검체를 대상으로 하였다.

2. 각종 검체에서 RNA 추출 및 중합효소연쇄반응 실시

수술실에서 얻어진 조직은 냉동보관용 시험관에 넣어서 영하

20°C 보관함에 설치하여 검사실로 이송하였으며 검사 당일까지 영하 70°C 냉동고에 보관하였다. 절제된 위조직은 즉시 병리과로 보낸 다음 병리과 전문의의 육안관찰에서 암 조직으로 판정되는 부위를 절제하여 RNA later (Ambion, Austin, TX, USA) 1 mL가 들어있는 시험관에 주입하여 영하 20°C에서 보관하였다. 보관된 암 조직에서 RNA 추출은 Trizol 시약(GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA)을 사용하여 GIBCO사의 방법을 따랐다.

객담에서의 RNA 보존과 추출은 Sputum mRNA Extraction Kit (iC&G, Daegu, Korea)을 사용하였다. 즉 객담에 객담보존제를 첨가하여 잘 혼합한 다음 검사일까지 영하 20°C에서 보관하였고 검사당일 시약설명서를 따라 RNA를 추출하였다. 흉곽액, 기관지 세척액, 자궁경부 도말 및 소변 등은 채취후 즉시 진단검사의학과로 이송하여 원심하였고, 침사층을 수거한 다음 Trizol 1 mL를 첨가하여 냉동 보관하다가 검사 당일 RNA를 분리하였다. 혈액은 원심한 다음 백혈구 및 혈소판 층을 충분히 수거하고, RNA/DNA stabilization reagent for Blood/Bone Marrow (Roche Applied Science, Mannheim, Germany)를 첨가하여 혼합한 뒤 영하 70°C에 보관하였으며 mRNA isolation kit for Blood/Bone Marrow (Roche Applied Science)로 추출하였다.

분리된 RNA를 대상으로 역전사 중합효소연쇄반응 및 MAGE A1-6 이중 중합효소연쇄반응은 Cancer Hunter Core Kit (iC&G)를 사용하였으며 공동시발체의 염기서열은 Table 1에 요약하였다. 중합효소연쇄반응 조건은 94°C 30초, 58°C 30초, 72°C 1분으로 30회 증폭한 다음, 이중 중합효소연쇄반응 혼합액을 동일 시험관에 첨가하여 94°C 30초, 60°C 30초, 72°C 45초의 30회 증폭으로 2차 반응을 시행하였다.

3. MAGE A1-6 중합효소연쇄반응법의 민감도 및 특이도 평가

폐암 53예, 위암 27예, 대장암 15예, 유방암 16예, 자궁경부암 40예, 두경부암 27예 및 난소암 16예 등 194예의 암조직과 폐암, 위암, 방광암 및 자궁경부암 환자들에서 채취한 261예의 체액 혹은 혈액을 사용하여 민감도를 확인하였다. 또한 폐암, 위암, 두경부암 환자들의 정상조직과 건강인 및 양성 폐질환자들로부터 채취한 소변, 객담 등을 대상으로 MAGE A1-6의 특이도를 관찰하였다.

Table 1. Primer sequences used for melanoma antigen gene A1-6 RT-nested PCR

Primers	Usage	Sequence	Size (bp)
C1	Outer sense	CTGAAGGAGAAGATCTGCC	831-855
C2	Outer antisense	CTCCAGGTAGTTTCTGCAC	
C3	Inner sense	CTGAAGGAGAAGATCTGCCW*	469-493
		GTG	
C4	Inner antisense	CCAGCATTTCTGCCTTTGTGA	

*A or T.

4. MAGE 역전사 중합효소 연쇄반응법과 세포진 검사법 및 Telomerase 활성도 검출법과 비교

MAGE 역전사 중합효소 연쇄반응법의 결과를 평가하기 위하여, 객담을 대상으로 기존의 세포진 검사법과 민감도와 특이도가 높은 중앙검출법으로 알려진 telomerase 검사를 함께 시행하여 그 결과를 각각 비교하였다. 객담의 분비가 많은 26예의 폐암환자들을 대상으로 3회의 객담을 채취하고 각각의 방법으로 폐암 검출률을 비교하였다. Telomerase 검사는 TRAP법(Roche Applied Science)으로 시행하였고, 세포진 검사법은 Papanicolau 염색법을 사용하였다.

결 과

1. MAGE 민감도 평가

194예의 각종 암 조직에서 MAGE A1-6 역전사 중합효소연쇄

Table 2. Positive rates of melanoma antigen gene A1-A6 RT-PCR in the tissues of cancers

Cancer	Institutes	Number	Specimen	Positive rate
Lung cancer	DCMC*	53	tissue	83.3%
Squamous ca		(36)		(86.1%)
Adeno ca		(13)		(69.2%)
Small cell ca		(4)		(100.0%)
Stomach ca	DCMC	27	tissue	66.7%
Colorectal ca	DCMC	15	tissue	73.0%
Breast cancer	DCMC	16	tissue	75.0%
Cervical ca	KCC†	40	tissue	85.0%
Head & Neck ca	KMC‡	27	tissue	70.4%
Ovary ca	DSMC§	16	tissue	93.8%
Total		194		78.9%

*Daegu Catholic Medical Center, †Korea Cancer Center, ‡Kosin Medical Center, §Dongsan Medical Center.

Table 3. Positive rates of melanoma antigen gene A1-A6 RT-PCR in the body fluids of cancer patients

Specimens	Institutes	Diagnosis	Number	Positive rates
Sputum	DCMC*	Lung cancer	46	58.8%
Induced sputum	KMC†	Lung cancer	33	72.7%
Broncho-alveolar lavage	KMC	Lung cancer	40	70.0%
Pleural fluids	DCMC	Lung cancer	24	87.5%
Blood	DCMC	Lung cancer	15	26.7%
Blood	DCMC	Stomach ca	45	8.9%
Urine	DSMC‡	Bladder ca	38	68.4%
Cervical brush	DCMC	Cervical cancer	15	86.7%
Total			261	57.4%

*Daegu Catholic Medical Center, †Kosin Medical Center, ‡Dongsan Medical Center.

반응법의 평균 양성률은 78.9%였다. 난소암(16예)은 90% 이상의 양성률을 보였고, 자궁경부암(40예), 폐암(53예) 등은 84%, 대장직장암(15예), 유방암(16예), 두경부암(27예) 등은 73%, 위암(27예)은 67%의 양성률을 나타내었다. 폐암 및 자궁경부암의 편평상피암 76예에서는 85% 이상의 양성률을 나타내었고, 폐암, 위암, 대장직장암 및 유방암 등의 선암 71예에서는 약 70%의 양성률을 나타내었다(Table 2, Fig. 1).

각종 체액에서 MAGE A1-6의 평균 양성률은 57.4%였다. 폐암환자들의 혈액(15예)에서 26.7%, 객담(46예)에서는 58.8%의 양성률을 보였으며, 유도객담(33예), 기관지세척액(40예) 등에서는 70% 이상의 양성률을 나타내었고, 흉곽액(24예) 및 자궁경부도말 검체(15예)에서는 87%의 양성률을 나타내었다. 위암환자들의 혈액(45예)에서는 8.9%의 양성률을 보였으며, 방광암 환자의 소변(38예)에서는 68.4%의 양성률을 나타내었다(Table 3).

2. MAGE 역전사 중합효소 연쇄반응법의 특이도 평가

폐암, 위암 및 두경부암의 정상조직 92예를 대상으로 0~8.9%의 양성률을 나타내었으며, 정상인의 혈액(50예) 및 양성폐질환자의 객담(140예)에서 2%, 정상인의 소변(34예)에서는 0%의 양성률을

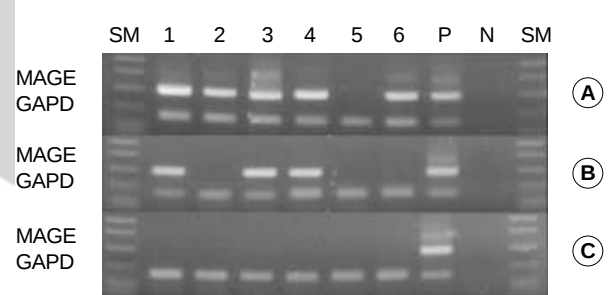


Fig. 1. Amplification of melanoma antigen (MAGE) A1-6 genes (490 bp) and glyceraldehyde phosphodehydrogenase (GAPD) gene (233 bp) from cancer tissues (A) and the sputa (B) of lung cancer patients (1-6). The same amplifications of the sputa of 6 healthy individuals are shown in C. MAGE genes were amplified by RT-nested PCR, and GAPD gene by RT-PCR. SM: Size marker, P: Positive control, N: Blank control.

Table 4. Specificity of melanoma antigen gene A1-A6 RT-PCR according to the specimens

Specimen	Number	Diagnosis	Positive rate	Specificity
Normal tissue	46	Lung cancer	8.9%	91.1%
Normal tissue	26	Stomach cancer	3.8%	96.2%
Normal tissue	20	Head and neck ca	0.0%	100.0%
Blood	50	Healthy people	2.0%	98.0%
Urine	34	Healthy people	0.0%	100.0%
Sputum	140	Benign lung diseases*	2.1%	97.9%
Total	316		2.9%	97.1%

*36 tuberculosis, 28 pneumonia, 20 COPD, 15 asthma, 13 bronchiectasis, 5 traumatic lung injury, 23 other diseases.

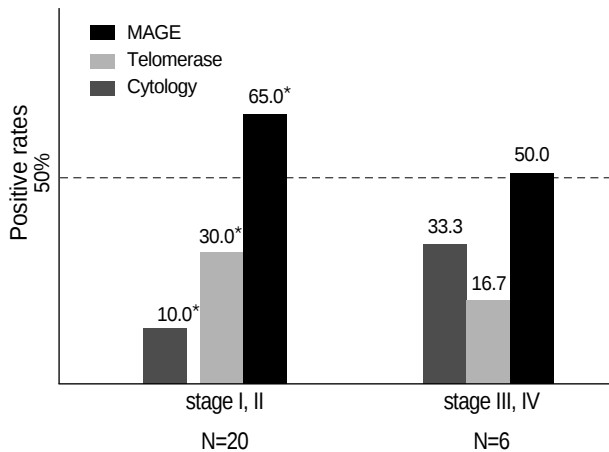


Fig. 2. Comparison of detection rates of cancer cells among the sputum cytology, telomerase and the melanoma antigen gene (MAGE) A1-6 RT-PCR. Three different sputa of same lung cancer patients were collected and tested by cytology examination, telomerase assay and MAGE RT-PCR. * $P < 0.01$ by chi square test.

나타내어, MAGE A1-6 중합효소연쇄반응법의 특이도는 97.1%로 산출되었다(Table 4, Fig. 1).

3. MAGE 역전사 중합효소 연쇄반응법과 telomerase 활성도 검출법 및 세포진 검사법과 비교

26예의 객담을 대상으로 세가지 종양 검출법의 민감도를 비교한 결과 제 1 및 2병기 환자들의 객담(20예)에서 65.0%, 30.0% 및 10.0%의 양성률을 각각 나타내었으며, 제 3 및 4병기 환자들의 객담(6예)에서는 50.0%, 16.7% 및 33.3%의 양성률을 나타내어 평균 61.5%, 26.9% 및 15.4%의 양성률을 각각 나타내었다(Fig. 2).

고 찰

종양의 조기 검출을 위하여 많은 종양표지자가 개발되었으며 이 중 CEA, AFP 등이 매우 유용하게 사용되고 있다. 그러나 항원을 이용한 종양표지자는 조기암 검출에는 한계가 있고 위양성의 빈도가 높아[1], 많은 연구자들이 분자생물학적 표지자를 개발하여왔다. 분자생물학적 표지자 중에는 microsatellite instability[4, 17] methylation specific PCR[18, 19] 등이 종양의 검출에 유용한 것으로 알려져 있다. 하지만 임상검사에서 쉽게 사용할 수 있으며, 민감도와 특이도가 우수한 진단법은 아직 개발되지 않고 있다. 따라서 많은 수의 종양유전자나 종양단백을 한꺼번에 검출할 수 있는 DNA chip[20]이나 protein chip[21]의 개발에 초점이 모아지고 있다. 이러한 진단법이 상용화되기 위해서는 위양성 결과 등, 아직도 해결해야 할 사항들이 많고 또한 상당기간의 임상시험이 요구된다. 중합효소연쇄반응법은 현재 임상검사에서 많이 사용하고 있고, 정상세포가 많이 혼재되어 있는 채강액에서 종양 세포를 검출하는데 적합하다[2-4].

MAGE 유전자는 종양고환항원(Cancer testis antigen)의 일종으로 1991년 Bruggen 등에 의하여 melanoma 세포주에서 발견되었다[5]. 이 유전자는 인간백혈구 항원에 의하여 표현되지만, 고환, 태반 및 종양세포에서 특이적으로 발현되고, A, B, C, D, E, H, I, J, K, L 등 많은 아형을 가지고 있으며[5-8], 3번, 15번 및 X 염색체 등에 유전자가 존재하고 있다[8]. MAGE 아형 중에서 A1-12, B1-6, 10, 16, 17 및 C1-4 등[8]이 종양세포에서 특이적으로 발현되며, 그 외의 아형은 정상조직에서도 발현된다. 아직 이 유전자의 기능에 대해서는 확실히 알려지지 않고 있으나, 정상세포의 창상치유 시에 나타나고[22], 정자형성에 관여하며 세포사멸을 유도하는 것[23]으로 추측되고 있다. 이 유전자의 발현에는 전사조절인자가 promoter 부위에 결합해야 하는데, 정상조직에서는 promoter 부위가 메틸화되어 있어 조절인자가 결합할 수 없으며, 탈메틸화되면 조절인자가 결합하여 MAGE 유전자가 발현되는 것으로 알려져 있다[23]. MAGE 유전자와 유사한 유전자로 알려진 Necdin은 분열이 종료된 신경세포에서 발현되며 신경세포의 과도한 성장을 억제하는 것으로 알려져 있다[8, 23]. 그러므로 아직 증명되지는 않았지만 종양세포에서 MAGE 유전자가 발현되는 것은 종양세포의 사멸을 유도하기 위한 것으로 유추할 수 있다. MAGE 유전자는 각 아형에 따라 종양세포에서 발현되는 빈도가 20-40%로서[11-15], 연구자는 MAGE A1-6 아형을 동시에 증폭할 수 있는 공통시발체를 개발하여 종양 검출률을 높이고자 하였다.

종양세포에 특이적이며, 검출률이 높은 시발체를 이용한 중합효소연쇄반응법은 임상검체에 미량으로 존재하는 종양세포 검출에 매우 효율적인 방법으로 사용될 수 있다. 이에 저자들은 각 종양세포 및 임상검체를 대상으로 MAGE 공통시발체를 사용한 중합효소연쇄반응법을 활용하여 종양검출률과 특이도에 관하여 연구하였다.

먼저 본 검사법의 민감도를 폐암, 위암, 유방암, 대장암, 자궁경부암, 두경부암, 난소암 등의 종양조직을 대상으로 평가한 결과, 편평상피암에서는 85% 이상의 양성률을 나타내었고, 선암에서는 약 70%의 양성률을 나타내었다. 따라서 MAGE A1-6을 동시에 증폭할 수 있는 시발체를 이용한 중합효소연쇄반응법은 종양세포 검출에 매우 유용하게 사용할 수 있을 것으로 사료되었다. 또한 혈액, 객담, 흉곽액, 소변 등 각종 체액을 대상으로 양성률을 조사한 결과 9-88%의 다양한 양성률을 보였다. 혈액에서는 검출률이 낮았으나, 소변, 유도객담 등에서는 70%, 흉곽액, 자궁경부암체 등에서는 85%의 양성률을 보였다. 검체 내에 존재하는 암세포의 수에 따라 임상검체에서의 양성률이 좌우될 것이며, 혈액은 조기암 검출에 적합한 검체가 아닐 것이다. 객담은 검체의 상태에 따라서 양성률이 다양하여, 폐에서 나오는 객담을 올바르게 채취하느냐에 따라 양성률이 달라진다. 대부분의 사람은 객담이 잘 나오지 않지만, 폐암으로 입원한 환자들 중 객담이 많이 나오는 사람들을 대상으로 아침 객담을 모아 MAGE 유전자를 검출한 결과 80%의 양성률을 나타내었다. 반면 소변, 유도객담 등은 쉽게 채취할 수 있는 검체이며, 양성률 또한 70%에 달하여 방광암 및 폐

암 등의 조기 검출에 유용하게 사용될 수 있을 것이다. 흉곽액 및 자궁경부 검체에서의 높은 양성률은 폐암, 자궁경부암 및 전이성 암 등의 검출에 활용될 수 있다. 특히 흉곽액이 생긴 환자가 내원할 경우 한국에서는 결핵과의 감별진단이 반드시 요구되므로 이 경우 MAGE 유전자 검사는 매우 유용하게 사용될 수 있다.

MAGE 유전자 검사의 특이도 평가에서 정상조직을 대상으로 0-8.9%의 양성률을 나타내었다. 종양조직 주위에 있는 정상조직은 종양세포가 숨어있을 가능성을 완전히 배제할 수 없으며, 또한 구역의 종양화(field cancerization) 개념에[24] 의하여 육안으로 정상인 조직에서 유전적 변이가 이미 존재할 수 있으므로, MAGE 유전자가 발현될 가능성이 있다. 양성 폐질환자들의 객담에서 관찰된 2%의 위양성률은 모두 결핵환자에서 관찰되었다. 결핵은 만성 염증성 질환으로 지속적인 자극에 의하여 유전자 변이가 발생할 수 있고, 중국[25] 및 일본[26]에서의 보고에 의하면 결핵환자에서 폐암이 동반되는 예가 0.8-2%로 정상인에 비하여 매우 높은 폐암발생률을 보였다. 따라서 결핵환자에서 MAGE 유전자 양성은 1) 유전자 변이, 2) 숨겨진 폐암인 경우 등으로 해석될 수 있다. 조직을 제외한 경우 MAGE A1-6 중합효소연쇄반응법의 특이도는 98%로서 종양표지자로 사용하기에 매우 적합하였다.

객담을 대상으로 MAGE 유전자 검사의 결과비교에서 기존의 세포진 검사에 비하여 4배, telomerase 검사에 비하여 2배 정도 높은 민감도를 보였다. Telomerase 활성화 검출법은 지금까지 알려진 분자생물학적 진단법 중 종양검출에 가장 많이 사용되었으며[27, 28], 폐암검출에도 연구된 바 있다[29, 30]. 저자들의 실험에서 telomerase 활성화는, 세포진 검사법에 비하여 2배 정도 높은 민감도를 보였지만 MAGE 유전자 검출법보다 낮은 민감도를 나타내었다. 저자들이 사용한 MAGE A1-6 시발체는 더 많은 표적 유전자를 증폭시키고, 객담처리과정에서 telomerase 검출법은 많은 시간이 소요되어 RNA가 변성될 가능성이 높기 때문에, MAGE 유전자 검출법에 비하여 낮은 민감도가 산출된 것으로 사료된다. 또한 telomerase 검사는 반드시 음성대조 실험을 병행해야 하는 등 검사과정이 복잡하여, 임상검사에 사용하기에는 적합하지 않을 것이다.

MAGE 유전자 검사를 병원 검사실에서 사용하려면 검체에서 RNA를 안정적으로 보존해야 한다. 최근 RNA를 쉽게 보존할 수 있는 시약들이 개발되어있어, 용이하게 혈액 및 조직 등을 대상으로 MAGE 유전자 및 RNA 검사를 시행할 수 있다. 보존제를 사용하지 않아도 검체를 1시간 이내에 검사실로 이송하여 즉시 원심하여 세포층을 분리한 다음, RNA 추출시약을 주입하여 냉동고에 보관하면 검사당일까지 매우 안정적으로 RNA를 분리할 수 있다.

지금까지 나타난 결과에서 MAGE A1-6 역전사 중합효소연쇄반응법은 종양조직에서 평균 79%의 양성률을 보였고, 혈액을 제외한 각종 체강액에서 70% 이상의 양성률을 나타내었으며, 평균 98%의 특이도를 보여, 지금까지 알려진 검사법 중 암세포 검출에 가장 높은 민감도와 특이도를 나타내었다. 검체에서 RNA 보존이 간편하게 잘 이루어진다면, MAGE A1-6 역전사 중합효소연쇄

반응법은 인체 내의 각종 조기암 검출에 매우 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

요 약

MAGE A1-6 아형을 동시에 검출할 수 있는 공통 시발체를 이용한 역전사 이중 중합효소연쇄반응법을 사용하여, 종양검출법으로서의 민감도와 특이도를 평가하고자 하였다. 또한 본 방법의 민감도를 기존의 telomerase 측정법 및 세포진 검사법과 비교하였다. 2001년 2월부터 2002년 12월까지 암으로 확진된 355명의 환자를 대상으로 각종 암조직과 객담, 유도객담, 기관지 세척액, 흉곽액, 혈액, 소변 및 자궁경부 도말 검체 등을 채취하여 민감도를 평가하였고, 정상조직, 혈액, 소변, 객담 등 총 316예의 검체를 대상으로 특이도를 평가하여 다음과 같은 성적을 나타내었다.

1. 각종 암조직에서 MAGE A1-6 역전사 중합효소연쇄반응법의 평균 양성률은 79%였다. 편평상피암에서는 85% 이상의 양성률을 나타내었고, 선암에서는 약 70%의 양성률을 나타내었다
 2. 암환자들의 각종 체액에서 MAGE A1-6의 평균 양성률은 57%였다. 검체에 따라 혈액 9-27%, 객담 59%, 소변 68%, 유도객담 및 기관지세척액 70% 이상, 흉곽액 및 자궁경부 도말 87%의 양성률을 각각 나타내었다.
 3. 폐암, 위암 및 두경부암의 정상조직에서 MAGE A1-6 검사법은 0-8.9%의 양성률을 나타내었으며, 정상인의 혈액 및 양성 폐질환자의 객담에서 2%, 정상인의 소변에서는 0%의 양성률을 나타내었다.
 4. 26예의 객담을 대상으로 MAGE 역전사 중합효소 연쇄반응법과 telomerase 활성화 검출법 및 세포진 검사법을 비교하여 평균 61.5%, 26.9% 및 15.4%의 양성률을 각각 나타내었다.
- 이와 같이 MAGE A1-6 역전사 중합효소연쇄반응법은 지금까지 알려진 검사법 중 암세포 검출에 가장 높은 민감도와 특이도를 나타내었다. 임상검체에서 RNA 보존이 잘 이루어진다면, MAGE A1-6 역전사 중합효소연쇄반응법은 각종 암세포 검출에 매우 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

참고문헌

1. Diamandis EP, Fritsche HA, Lilja H, Chan DW, Schwartz MK. Tumor Markers, Physiology, Pathobiology, Technology, and Clinical Applications. Washington DC: AACR Press, 2002: 3-8.
2. Raj GV, Moreno JG, Gomella LG. Utilization of polymerase chain reaction technology in the detection of solid tumors. Cancer 1998; 82: 1419-42.
3. Burchill SA and Selby PJ. Molecular detection of low-level disease in patients with cancer. J Pathol 2000; 190: 6-14.

4. Beau-Faller M, Gaub MP, Schneider A, Ducrocq X, Massard G, Gasser B, et al. Plasma DNA microsatellite panel as sensitive and tumor-specific marker in lung cancer patients. *Int J Cancer* 2003; 105: 361-70.
5. van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, van den Eynde B, et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 1991; 13: 1643-7.
6. De Plaen E, Arden K, Traversari C, Gaforio JJ, Szikora JP, De Smet C, et al. Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. *Immunogenetics* 1994; 40: 360-9.
7. Lucas S, De Smet C, Arden KC, Viars CS, Lethe B, Lurquin C, et al. Identification of a new MAGE gene with tumor-specific expression by representational difference analysis. *Cancer Res* 1998; 58: 743-52.
8. Chomez P, De Backer O, Bertrand M, De Plaen E, Boon T, Lucas S. An overview of the MAGE gene family with the identification of all human members of the family. *Cancer Res* 2001; 61: 5544-51.
9. Miyashiro I, Kuo C, Huynh K, Iida A, Morton D, Bilchik A, et al. Molecular strategy for detecting metastatic cancers with use of multiple tumor-specific MAGE-A genes. *Clin Chem* 2001; 47: 505-12.
10. Zammattio N, Lockman L, Brasseur F, De Plaen E, Lurquin C, Lobert PE, et al. DNA microarray to monitor the expression of MAGE-A genes. *Clin Chem* 2002; 48: 25-34.
11. 이강대, 이정삼, 이환호, 이영선, 장희경, 전창호 등. 두경부암에서 MAGE 1-6 mRNA를 검출하는 새로운 MAGE Common Primer의 의의. *Korean J Otolaryngol* 2001; 44: 736-43.
12. Lee KD, Eura M, Ogi K, Nakano K, Chikamatsu K, Masuyama K, et al. Expression of the MAGE-1, -2, -3, -4 and -6 genes in non-squamous cell carcinoma lesions of the head and neck. *Acta Otolaryngol* 1996; 116: 633-9.
13. Kim YM, Lee YH, Shin SH, Kim EH, Choi YW, Lee KM, et al. Expression of MAGE-1, -2 and -3 genes in gastric carcinomas and cancer cells lines derived from Korean Patients. *J Korean Med Sci* 2001; 16: 62-8.
14. Fujie T, Mori M, Ueo H, Sugimachi K, Akiyoshi T. Expression of MAGE and BAGE genes in Japanese breast cancers. *Ann Oncol* 1997; 8: 369-72.
15. Yamada A, Kataoka A, Shichijo S, Kamura T, Imai Y, Nishida T, et al. Expression of MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3/-6 and MAGE-4a/-4b genes in ovarian tumors. *Int J Cancer* 1995; 64: 388-93.
16. Ko Y, Klinz M, Totzke G, Gouni-Berthold I, Sachinidis A, Vetter H. Limitation of the reverse transcription-polymerase chain reaction method for the detection of carcinoembryonic antigen-positive tumor cells in peripheral blood. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 2141-6.
17. Beau-Faller M, Weber JC, Schneider A, Guerin E, Gasser B, Ducrocq X, et al. Genetic heterogeneity in lung and colorectal carcinoma as revealed by microsatellite analysis in plasma or tumor tissue DNA. *Cancer* 2003; 97: 2308-17.
18. Virmani A, Rath A, Sugio K, Sathyanarayana UG, Toyooka S, Kischel FC, et al. Aberrant methylation of TMS1 in small cell, non small cell lung cancer and breast cancer. *Int J Cancer* 2003; 106: 198-204.
19. Nakayama H, Hibi K, Takase T, Yamazaki T, Kasai Y, Ito K, et al. Molecular detection of p16 promoter methylation in the serum of recurrent colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 2003; 105: 491-3.
20. An HJ, Cho NH, Lee SY, Kim IH, Lee C, Kim SJ, et al. Correlation of cervical carcinoma and precancerous lesions with human papillomavirus (HPV) genotypes detected with the HPV DNA chip microarray method. *Cancer* 2003; 97: 1672-80.
21. Ahram M, Emmert-Buck MR. Approaches to proteomic analysis of human tumors. *Methods Mol Biol* 2003; 222: 375-84.
22. Becker JC, Gillitzer R, Brocker EB. A member of the melanoma antigen-encoding gene (MAGE) family is expressed in human skin during wound healing. *Int J Cancer* 1994; 58: 346-8.
23. Ohman Forslund K, Nordqvist K. The melanoma antigen genes-any clues to their functions in normal tissues? *Exp Cell Res* 2001; 265: 185-94.
24. Devita Jr VT, Hellman S, Rosenberg SA. *Cancer, principles & practice of oncology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997: 738.
25. Zheng W, Blot WJ, Liao ML, Wang ZX, Levin LI, Zhao JJ, et al. Lung cancer and prior tuberculosis infection in Shanghai. *Br J Cancer* 1987; 56: 501-4.
26. Kurasawa T. The coexistence of pulmonary tuberculosis and lung cancer. *Nippon Rinsho* 1998; 56: 3167-70.
27. Hess JL and Highsmith WE Jr. Telomerase detection in body fluids. *Clin Chem* 2002; 48: 18-24.
28. Soria JC, Gauthier LR, Raymond E, Granotier C, Morat L, Armand JP, et al. Molecular detection of telomerase-positive circulating epithelial cells in metastatic breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 971-5.
29. Hiyama K, Hiyama E, Ishioka S, Yamakido M, Inai K, Gazdar AF, et al. Telomerase activity in small-cell and non-small-cell lung cancers. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 895-902.
30. Albanell J, Lonardo F, Rusch V, Engelhardt M, Langenfeld J, Han W, et al. High telomerase activity in primary lung cancer: association with increased cell proliferation rates and advanced pathologic stage. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 1609-15.