J. Biomed. Lab. Sci. 9 (2003) 171-175

# The Frequency of MSI in Unselected Korean Colorectal Adenocarcinomas

**Hye Myung Ryu†, Myung Hoon Lee and Han Ik Bae**

*Department of Pathology, Kyoung Pook National University Hospital, Daegu 700-721, Korea*

Microsatellite instability (MSI), which is caused by a deficient mismatch repair system, is seen in most of the hereditary non-polyposis colon cancers (HNPCC) and a portion of sporadic colorectal cancers. Forty unselected colorectal cancer patients were analyzed for MSI using silver stain plus kit. The overall incidence of MSI in studied cases was 17% (7/40). The incidence is similar result with previous study. MSI in colorectal carcers was more prevalent in moderative differentiated adenocarcinoma than well differentiated adenocarcinoma

**Key Words:** HNPCC, MSI, Silver stain

## 서 론

대장암은 염색체 불안정성 (chromosomal instability: CIN)과 현미부소체불안정성 (microsatellite instability:MSI)의 두 가지 genomic instability 기작이 연구되어 왔다. 이중 MSI-H는 초기 대장암의 10~20%에서 발견되고 돌연변이 또는 mismatch repair (MMR) gene의 이상과 연관되어 있다[7,8]. MSI-H인 암종에서 MMR pathway에 이상이 생겨 돌연변이가 DNA 복제 동안 다시 회복되지 못함에 따라 현미부소체에서 회복되지 않는 유전자가 축적되게 된다. 대장암의 임상소견에서 MSI-H인지 아닌지를 명시하는 것은 환자 처치의 효율성을 증가시키는데 뚜렷한 효용성을 가지고 있다. 연구 결과에 의하면 대장암의 10~15% 정도가 MSI-H인 것으로 알려져 있으며 유전성비용종성 대장암 (HNPCC: hereditry nonpolyposis colon cancer) 환자의 85% 이상에서 MSI-H인 것으로 알려져 있다[1]. 현재 MSI-H 검사는 연구수단으로 많이 사용되고 있으나 이러한 임상적 측정이 대장암 환자를 치료하는데 도움이 될 수 있다. MSI-H는 임상소견이나 가족력만으로는 측정할 수 없는 MMR 유전자에서 유전되는 돌연변이를 가진 환자를 선별할 수 있다. 또한 MSI는 MSI-H를 가진 대장암 환자가 외과수술 후 더 좋은 예후를 나타내므로 중요한 예후인자로 사용할 수 있다. 더욱이 MSI-H를 가진 대장암 환자의 약물요법은 microsatellite stable (MSS)인 환자들과 다르게 시행된다[6,11]. 따라서 초기 대장암 환자에서 MSI-H를 지속적으로 측정하는 것은 특히 화학적인 약물요법을 시행하려는 환자에게 중요하다.

MMR 기능을 상실한 대장암 환자를 분석하는데 있어서 표지인자로써 MSI-H의 정확성은 분석의 세밀한 기법에 달려 있다. MSI-H의 분자적 진단은 PCR 방법을 사용하며, 비록 기술적으로 어렵지는 않으나 완전히 정립되지는 않은 상태다. MSI-H 분석은 사용된 microsatellite marker, allele size instability (ASI) 검사, MSI-H의 양성인지를 분석하는데 필요한 size instability를 갖는 microsatellite의 위치와 수에 따라 결정된다. MSI-H의 분자 정의를 표준화하기 위해서 1997년 National Cancer Institute (NCI) 워크샵에서 다섯 종류의 microsatellite marker를 제시했다. 이들의 loci는 *hMSH2* 또는 *hMLH1* 발현이 소실된 colorectal adenocarcinom 환자를 분석하는데 효과적인 것으로 선별되었다[3]. 이들 표지 marker는 mononucleotide marker (BAT25, BAT26), 그리고 세 개의 dinucleotide marker (D2S123, D5S346, D17S250)로 이루어져 있다. MSI-H 암종은 NCI 워크샵에서 다섯 종류의 microsatellite marker 중 적어도 두 개 이상에서 instability를 나타내는 것으로 규정하였다. 낮은 빈도의 low microsatellite instability (MSI-L)와 MSS는 instability가 각각 하나 또는 하나도 없을 때로 규정하였다.

본 연구에서는 이들 다섯 marker를 이용하여 MSI의 정확한 검사를 위하여 실험시 적정 조건을 확립하고 한국인의 대장암에서 MSI-H의 빈도와 각각 marker와 MSI-H 환자의 연관성을 알아보고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 환자 샘플 및 DNA 분리

암종과 정상조직은 경북대학교 병원에서 2002년에서 2003

*논 문 접 수: 2003년 8월 28일
수정재접수: 2003년 9월 17일
†별책 요청 저자: 류혜명, (우) 700-721, 대구광역시 중구 삼덕 2가 50번지, 경북대학교 병원, 병리과
Tel: 053-420-5253, Fax: 053-426-1525
e-mail: naya101@hanmail.net

**Table 1.** Primer sequence of MSI markers

| Marker | Sequence (5'-3') |
|---|---|
| D2S123-F | AAACAGGATGCCTGCCTTTA |
| D21S123-R | GGACTTTCCACCTATGGGAC |
| D5S346-F | ACTCACTCTAGTGTAAATCGGG |
| D5S346-R | AGCAGATAAGACAGTATTACTAGTT |
| D17S250-F | GGAAGAATCAAATAGACAAT |
| D17S250-R | GCTGGCCATATATATATTTAAACC |
| BAT25-F | TCGCCTCCAAGAATGTAAGT |
| BAT25-R | TCTGCATTTTAACTATGGCTC |
| BAT26-F | TGACTACTTTTGACTTCAGCC |
| BAT26-R | AACCATTCAACATTTTTAACCC |

년에 걸쳐 대장암으로 진단받고 수술을 시행받은 40명의 환자를 대상으로 하였다. 절제된 대장조직은 파라핀 절편을 만들어 보관하였다. 포르말린 고정된 파라핀 조직으로부터 6 μm의 두께로 슬라이드 2장씩을 만들어 H-E 염색을 시행한 후 각각의 정상조직과 대응하는 암조직을 정밀하게 긁어낸 다음 DNA 추출 용액 (10 mM Tris-HCl: pH 8.0, 1 mM EDTA, 5% Tween 20, 400 μg/ml Proteinase K)에 넣어 55℃에서 3일간 반응하였다. 반응이 끝난 시료는 95℃에서 5분간 proteinase K를 불활성화하였으며 원심분리하여 상층액만 새로운 튜브로 옮겨 냉장 보관하면서 이중 1 μl를 주형 DNA로 사용하였다.

2. PCR

MIS-H를 측정하기 위한 marker로는 NCI에서 제시한 5종류인 BAT25, BAT26, D2S123, D5S346, D17S250을 사용하였다 (Table 1). PCR은 primer를 각 10 pmoles, 주형 DNA 1 μl를 Bioneer의 PCR premix에 넣고 최종 양을 20 μl로 하여 반응하였다. 프로그램은 95℃에서 10분간 전변성과정을 거친 후 95℃에서 30초, 50℃에서 30초, 72℃에서 30초로 모두 40 cycle을 수행하였고, 마지막으로 72℃에서 10분 반응시킴으로써 종결하였다. PCR 증폭산물은 ethidium bromide가 함유된 2% agarose gel에서 전기영동한 다음 UV transilluminator로 확인하였다.

3. PAGE

PCR 증폭산물 2~5 μl를 동량의 loading dye (80% formamide, 10 mM NaOH, 1 mM EDTA, 0.1% xylene cyanol FF, 0.1% bromophenol blue)와 혼합하여 95℃에서 5분간 변성한 다음 얼음에 5분 방치하였고, 7% polyacrylamide gel (7 M Urea)에서 300 V로 2~4시간 동안 전기영동하였다.

4. Silver statining

1) 매뉴얼 염색 방법

전기영동이 끝난 gel은 10% acetic acid 용액으로 고정하였으며, 증류수로 10분간 3회 세척하였다. 준비된 staining 용액 (1% silver nitrate, formaldehyde 1.5 ml/L)을 붓고 30분간 염색한 다음 증류수로 10초간 짧게 세척한 후 develop 용액 (3% sodium carbonate, formaldehyde 1.5 ml, sodium thiosulfate: 10 mg/ml 300 μl/L)을 넣어 발색하였으며, 밴드가 원하는 강도로 보이면 처음 사용하였던 10% acetic acid를 부어 반응을 종료하였다. 젤을 보관하기 위해서는 증류수로 10분간 2회 세척한 다음 투명 셀로판용지에 gel을 넣고 집게로 고정하여 공기 건조하였다.

2) kit을 이용한 염색방법

Bio-rad의 silver stain plus kit을 사용하여 제시한 방법에 따라 염색하였다. 짧게 기술하면, 먼저 5% acetic acid와 methanol 75 ml, fixative enhancer solution 15 ml, 3차 증류수 45 ml의 조성으로 제조하여 잘 섞어준 후 적당한 용기에 붓고, 전기영동이 끝난 gel 조각을 넣어 20분간 고정하였다. 3차 증류수로 10분간 두 번 흔들어 주면서 세척하였으며, 증류수 28 ml과 kit에 포함된 silver complex solution 4 ml, reduction moderator solution 4 ml, image deveopment reagent 4 ml을 잘 섞어준 다음 붓기 직전 development accelerator solution 40 ml을 넣고 잘 섞은 용액을 gel에 부어 주었다. 젤에서 밴드가 원하는 정도의 강도로 염색이 되면 5% acetic acid를 부어 반응을 멈추었다.

5. MSI 분석

MSI 분석을 위해 다섯 종류의 프라이머를 사용하였다. 5개의 marker들 중 2개 이상에서 instability가 보이는 경우를 MSI-H라 하며 1개에서만 instability가 보이는 경우를 MSI-L, instability가 보이는 marker가 없는 경우를 MSS로 하였다.

## 결 과

1. MSI 마커를 이용한 PCR

대장암 환자의 암종과 정상조직을 H-E 염색한 다음 암세포가 80% 이상이 포함되도록 정밀하게 긁어내어 분리한 DNA를 각각 주형으로 사용하여 PCR한 결과 각각 뚜렷한 증폭산물을 확인할 수 있었다 (Fig. 1). 증폭산물의 차이가 큰 경우 agarose gel 상에서도 정상조직과 암종간에 밴드의 차이를 확인할 수 있었으나, 좀더 정밀한 분석을 위하여 polyacrylamide gel에 전기영동하였다.

2. PAGE와 silver staining의 적정 조건 결정

7 M urea를 함유하는 7% polyacrylamide gel에 PCR 증폭 산물을 전기영동하여 silver 염색한 결과 각각의 밴드 차를 뚜렷하게 관찰할 수 있었다. Fig. 2에서 다섯 종류의 marker 모두 instabillity를 나타내는 MSI-H의 예와 다섯 종류 모두 instability가 없는 MSS의 예를 보여주고 있다. 이때 mononucleotide marker인 Bat25와 Bat26의 경우는 각각 밴드 간격이 좁아 xylene cyanol dye가 젤의 아래 끝에 걸렸을 때 전기영동을 멈추고 염색하였다. 또한 staining 용액의 민감도가 높아 전기영동시 양을 많이 하였을 때 밴드가 더 겹쳐 구분이 용이하지 않으므로 Bat25, Bat26과 같이 밴드 간격이 좁은 marker를 사용한 반응물은 1.5~2 μl의 PCR 반응물을 사용하였다. Polyacrylamide gel 농도는 12%에서 7%까지 낮춰서 전기영동한 결과 7%에서 밴드간의 간격이 적당하였다 (data not shown).

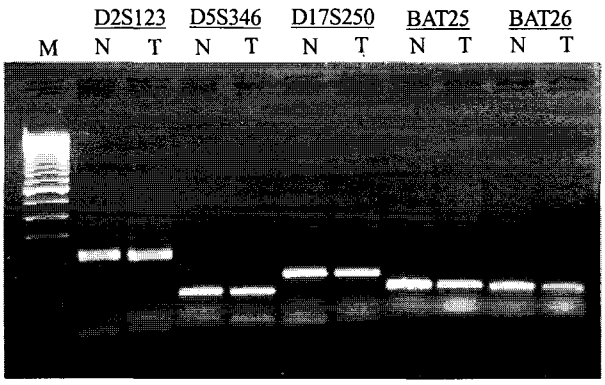


**Fig. 1.** 2% agarose gel electrophoresis of PCR products which were amplified with MSI marker. M is 100 bp size marker. N and T indicate the normal and tumor, respectively.

또한 silver staining을 매뉴얼대로 실시한 결과 온도와 사용된 증류수의 순도에 따라 염색 결과에 큰 차이를 보였으므로, Bio-rad사의 silver stain plus kit을 사용하여 염색한 결과 매뉴얼에 따르면 3시간 소요되었던 염색시간을 1시간으로 줄일 수 있었으며, 민감도 역시 높일 수 있었다.

3. MSI 분석

무작위로 선별된 총 40명의 환자에서 분리한 대장암 조직으로부터 MSI를 시행한 결과 MSS는 40예 중 24예에서 관찰되었으며 (60%), MSI-L가 9예 (23%), MSI-H가 7예 (17%)로 나타났다. 대장암종을 조직학적 양상에 따라 poorly differentiated (PD), moderate differentiated (MD), well differentiated (WD), mucinous adenocarcinoma 타입으로 구분하였을 때 PD 환자는 선별된 대장암 종에 없었으며, MD 환자에서 MSS가 59% MSI-L가 19%, HSI-H가 22%로 전체 결과와 비슷한 양상을 보였으며, WD 타입의 경우 6명 모두 MSS를 나타내었다. Mucinous 타입에서는 2예 중 한 예에서 MSI-L, 나머지 한 예에서 MSI-H를 보였으나, 그 수가 작아 유의한 결과를 얻을 수는 없었다 (Table 2).

## 고 찰

대장암은 국내 4대 암 중 하나로 유전 기작에 대한 연구가

**Table 2.** MSI status according to histological characteristics

| | AC MD (n=32) | AC WD (n=6) | Mucinous (n=2) |
|---|---|---|---|
| MSS | 19 (59%) | 6 (100%) | 0 |
| MSI-L | 6 (19%) | 0 | 1 (50%) |
| MSI-H | 7 (22%) | 0 | 1 (50%) |

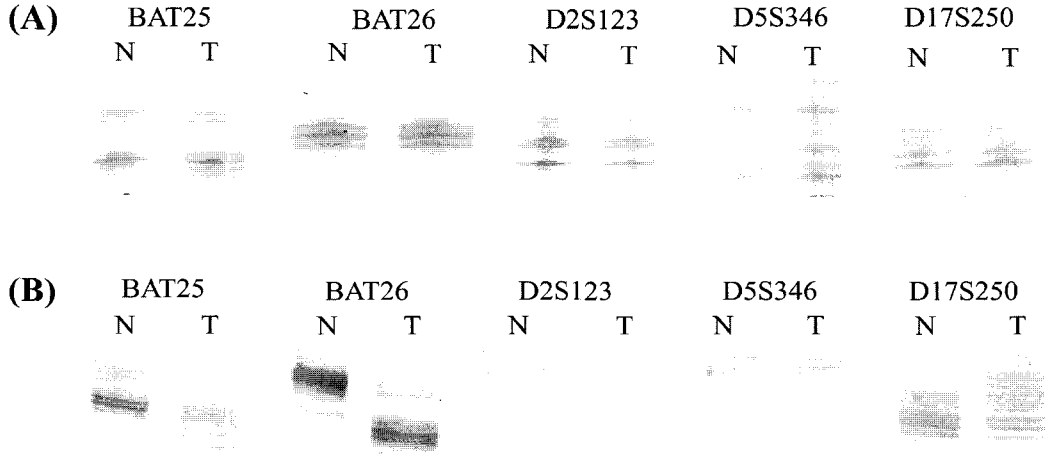


**Fig. 2.** Representatives of microsatellite stable case **(A)** and high microsatellite instability case **(B)**.

활발히 진행되고 있는 분야이다. 특히 유전성비용종 대장암에서 높은 빈도로 MSI-H를 보이는 것으로 알려져 있다. 이러한 결과는 환자의 정상조직과 암조직의 염기서열을 비교하였을 때 삽입, 결손 등의 이유로 길이의 변화가 생기는데서 기인한다. 따라서 본 연구에서는 대장암 환자를 대상으로 MSI 검사를 시행함으로써, 검사시 적당한 조건을 확립하고, 이들의 빈도와 질병 상호간의 연관관계를 검사하고자 하였다.

먼저 각 대장암 환자에서 정상조직과 이에 대응하는 암조직에서 MSI를 정확하게 분석하기 위해서 H-E 염색한 다음 미세절제술을 시행하여 암세포가 80% 이상이 함유되도록 하였으며, 다섯 종류의 MSI marker를 사용하여 PCR을 실시할 때 비특이적인 밴드가 나타나지 않도록 하였다. 염색시 증류수의 순도와 주변 온도에 따라 결과의 민감도에 차이를 보였으며, Bio-rad의 silver stain plus kit을 사용하여 소요 시간을 단축하는 동시에 민감도를 향상 시킬 수 있었다. 비용적인 문제를 해결하기 위해서는 매뉴얼 방법에 따라 전체 젤을 염색해 본 후 각각의 marker별 위치를 전기영동 dye와 비교하여 측정한 다음 그 부위만을 포함하는 gel을 절단해 염색함으로써 소요되는 용액의 양들을 줄일 수 있었다. 비록 최근에 ABI377 등의 기계를 이용한 MSI 검사가 많이 시행되고 있으나 아직까지는 고가의 장비이므로 처음 MSI 검사를 시작하는데 있어서 이용하기에는 어려움이 있다. 따라서 MSI 검사의 정확성을 높이기 위해서 정밀한 실험 조건의 확립이 선행되어야 한다.

무작위로 선정된 2002년에서 2003년 사이의 총 40명의 대장암 환자를 대상으로 MSI를 시행한 결과 MSS는 60%, MSI-L 23%, MSI-H가 17%로 나타났다. 이러한 결과는 선별되지 않은 대장암 환자에서 8%에서 18%의 빈도로 MSI가 발생한다는 연구와 유사한 결과이다. 기존에 보고된 연구들에 의하면 mononucleotide marker들이 dinucleotide marker보다 더 민감도와 특이성이 높은 것으로 알려져 있으며[10] 이러한 결과는 본 연구에서도 뒷받침하고 있다. 특히 MSI-H를 가진 환자 모두 Bat26 마커에서 instability를 나타내었다. 일부 연구자들은 Bat26만으로도 MSI를 측정하기에 충분하다고 하는 의견도 있으나[2] MMR 결손을 가지는 대장암 환자를 진단하는데 있어서 하나의 microsatellite marker만으로는 그 정확성 면에서 떨어질 것으로 생각된다. 본 연구에서 분석된 대장암 환자를 조직학적으로 분류하였을 때 PD 환자는 없었으며, MD 환자가 32예로 가장 많았고, WD는 6예, mucinous 환자는 2예였다. 이중 MD 환자의 MSI 빈도는 MSS가 59%, MSI-L가 19%, HSI-H가 22%로 전체 결과와 비슷한 빈도였으나, WD 환자 6예 모두 MSS로 나타났다. 이러한 결과는 조직학적인 분화 양상과 MSI가 밀접한 관계를 가지고 있음을 시사해 준다.

대장암 환자에서 MSI의 진단적 가치는 높은 것으로 생각되고 있다. 몇몇 연구들에 의하면 MSI+ 표현형을 갖는 대장암 환자가 더 좋은 회복을 보인다고 보고하였다[5,9]. 반면 일부 연구에서는 Duke's B와 C disease stage를 가진 대장암 환자에 adjuvant chemotherapy를 하는 경우에서만 생존률이 더 좋았으며 처치를 받지 않은 환자에 있어서는 MSI+ 표현형을 가진 환자와 그렇지 않은 환자간에 차이가 없다고 보고하였다[4]. 상반되는 연구 결과들에도 불구하고 MSI 검사는 고가의 비용이 수반되는 HNPCC 유전자 검사 이전에 위험 환자군을 선별할 수 있으며 산발성 대장암 (sporadic colorectal cancer)의 경우에도 환자의 예후 판단에 도움을 받을 수 있고 검사 결과에 따라 환자의 특정 항암제에 저항성을 예측할 수 있게 함으로써 고가의 비용이 수반되는 항암치료에 보다 합리적 근거를 제공할 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구는 MSI 검사를 시행하는데 있어서 실험 조건을 정리하고 MSI 검사시 대장암 환자의 조직학적 분류에 따른 MSI의 빈도를 조사하였다. 지속적으로 더 많은 환자의 검사를 통해 병리학적 소견에 따른 연관성을 조사함으로써 대장암 환자의 예후 판단과 약물치료 등에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌


1) Aaltonen LA, Peltomaki P, Mecklin JP, Jarvinen H, Jass JR, Green JS, Lynch HT, Watson P, Tallqvist G and Juhola M (1994): Replication errors in benign and malignant tumors from hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. *Cancer Res*, **54:** 1645-1648.

2) Cravo M, Lage P, Albuquerque C, Chaves P, Claro I, Gomes T, Gaspar C, Fidalgo P, Soares J and Nobre-Leitao C (1999): BAT-26 identifies sporadic colorectal cancers with mutator phenotype: a correlative study with clinico-pathological features and mutations in mismatch repair genes. *J Pathol*, **188:** 252-257.

3) Dietmaier W, Wallinger S, Bocker T, Kullmann F, Fishel R and Ruschoff J (1997): Diagnostic microsatellite instability: Definition and correlation with mismatch repair protein expression. *Cancer Res*, **57:** 4749-4756.

4) Elsaleh H, Shannon B and Iacopetta B (2001): Microsatellite instability as a molecular marker for very good survival in colorectal cancer patients receiving adjuvant chemotherapy. *Gastroenterology*, **120:** 1309-1310.

5) Gonzalez-Garcia I, Moreno V, Navarro M, Marti-Rague J, Marcuello E, Benasco C, Campos O, Capella G and Peinado MA (2000): Standardized approach for microsatellite instability detection in colorectal carcinomas. *J Natl Cancer Inst*,

**92:** 544-549.

6) Hemminki A, Mecklin JP, Jarvinen H, Aaltonen LA and Joensuu H (2000): Microsatellite instability is a favorable prognostic indicator in patients with colorectal cancer receiving chemotherapy. *Gastroenterology*, **119:** 921-928.
7) Lengauer C, Kinzler K and Vogelstein B (1998): Genetic instability in colorectal cancers. *Nature*, **396:** 643-649.
8) Lengauer C, Kinzler K and Vogelstein B (1997): Genetic instability in human cancers. *Nature*, **386:** 623-627.
9) Leung SY, Yuen ST, Chung LP, Chu KM, Chan AS and Ho JC (1999): hMLH1 promoter methylation and lack of hMLH1 expression in sporadic gastric carcinomas with high-frequency microsatellite instability. *Cancer Res*, **59:** 159-164.
10) Perucho M (*1999*): Correspondence re: C.R. Boland et al., A National Cancer Institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res*, **59:** 249-256.
11) Watanabe T, Wu TT, Catalano PJ, Ueki T, Satriano R, Haller DG, Benson AB 3rd and Hamilton SR (2001): Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med*, **344:** 1196-1206.