

갑상선 유두상암의 핵산분석

고려대학교 의과대학 이비인후-두경부외과학교실, 해부병리과*
주형로 · 정도광 · 우정수 · 최종욱 · 김인선*

= Abstract =

Flow Cytometric DNA Analysis of Thyroid Papillary Carcinoma

Hyung Ro Chu, M.D., Do Kwang Jung, M.D., Jeong Su Woo, M.D.,
Jong Ouck Choi, M.D., In Sun Kim, M.D.*

Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery and Pathology
Korea University, College of Medicine, Seoul, Korea*

The indolent course of most thyroid papillary carcinomas, even the presence of regional lymph node metastasis, make them unique among human malignant head and neck cancers. Age, sex, extracapsular invasion and anaplastic change are known to be correlated with prognosis.

The purpose of this study is to clarify the significance of DNA content analysis as a prognostic factor.

Twenty five thyroid papillary carcinomas were possible to be examined by flow cytometric analysis using fresh surgical specimens and three nodular hyperplasias and seven follicular adenomas were included as control group.

The results were as follows :

- 1) All of twenty five thyroid papillary carcinomas showed diploidy.
- 2) S-phase fraction was $1.94 \pm 2.77\%$ in normal control group and $2.60 \pm 2.66\%$ in papillary carcinoma group. The proliferation index was $8.44 \pm 3.89\%$ in normal control and $7.70 \pm 3.63\%$ in papillary carcinoma group with even low value.
- 3) Age, sex, extracapsular spread and lymph node metastasis showed no significant difference.

In conclusion, low proliferative activity of thyroid papillary carcinomas are thought to be related with good prognosis.

KEY WORDS : Thyroid papillary carcinoma · Flow cytometric analysis · Cell cycle analysis.

서 론

갑상선 유두상암은 다른 두경부 악성종양과는 달리 예후가 비교적 양호하고 국소 림프절 전이의

존재 여부가 생존율에 크게 영향을 미치지 않는 특성이 있으며, 진단당시의 연령, 성별, 피막외 침습, 원격전이, 분화도 등이 예후에 관계가 있다고 알려져 있다. 그러나 임상적 또는 병리조직학적

분석만으로는 예후를 추정하는데 한계가 있어 악성도를 반영하는 객관적인 지표가 있으면, 이것은 매우 유용하게 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

저자들은 갑상선 유두상암에서 핵산지수 및 세포주기분석을 통하여 예후인자로서 유용한가를 알아보고 종양세포의 특성을 파악하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

본원 이비인후-두경부외과학 교실에서 1992년 1월 부터 2년간 갑상선 수술을 시행하여 유두상암으로 진단되었던 환자 중 신신조직에서 유세포 분석이 가능하였던 35례를 대상으로 하였다. 대조군으로는 결절성 갑상선종 3례와 여포성선종 7례를 동일한 방법으로 검사하였다.

대상의 연령은 16세에서 72세로 평균 43.5 ± 17.43 세이었고, 남녀비는 1 : 5.3 이었다.

2. 연구방법

술후 적당량의 신신조직을 citrate buffer에 넣고 잘게 부수어 세포부유액을 만든 다음 35 micron 크기의 구멍으로 이루어진 나이론 그물망에 통과시킨다. 이때 여과액의 세포수를 2.5×10^6 cell/ml가 되도록 맞춘다. 핵산염색은 Cycle TEST 시약(Becton Dickinson, San Jose, CA)를 이용하였다.

먼저 세포부유액 200 μ l를 citrate buffer에서 취하여 트립신 완충제가 함유된 A시약 1.8 ml를 가한 후 실온에서 10분간 반응시킨다. 여기에 트립신억제제와 리보핵산분해 효소가 들어있는 B시약 1.5 cc를 가하여 실온에서 10분간 반응시키고 propidium iodide가 함유된 C시약 1.5cc를 첨가하여 암소에서 10분간 반응시킨다. 반응이 완료되면 특수 제작된 Falcon 튜브에 옮겨 유세포분석기(FAC Scan flow cytometer, Becton Dickins, San Jose, CA)를

이용하여 핵산분석을 시행하였다.

유세포분석기의 보정은 닭의 적혈구핵을 propidium iodide 염색하여 사용하였으며 이때, 변이계수(coefficient of variant, CV)는 3.0이하를 기준으로 하였다.

3. 통계학적 검증

각 군간의 세포주기분획율에 대한 비교는 unpaired t-test를 시행하였으며, 통계학적 유의수준은 95% 이상($p < 0.05$)으로 정하였다.

결 과

핵산분석 결과 핵산지수는 유두상암과 대조군 전례에서 이배수성을 나타내었으며, 합성기분획(S-phase fraction) 암종에서 $2.60 \pm 2.66\%$ 로 대조군보다 높았으나 증식지수(proliferation index)는 오히려 대조군에서 높게 나타났다(Table 1).

1. 환자측 인자

대상군의 성별과 연령에 따라 분석하였으며 연령은 AJCC 병기분류에 따라 45세를 기준으로 구분하였다²⁾.

남성은 4례로 대상례가 적어 통계학적으로 비교하기에는 적당하지 않았으나 오히려 여성에서보다 합성기분획과 증식지수에서 낮게 나타났으며 연령에 따른 차이에서는 고 연령군에서 합성기분획과 증식지수가 높게 나타났으나 통계학적으로 유의한 차이는 없었다(Table 2).

2. 종양측 인자

종양의 피막의 침습 여부와 림프절 전이여부에 따라 구분하였으며, 피막의 침습이 있었던 경우와 림프절 전이가 있었던 경우 증식지수는 높았으나 S기 합성기분획은 더 낮았으며 통계학적으로 유의한 차이는 없었다(Table 3)

Table 1. Flow cytometric DNA analysis

Group	Ploidy		SPF (%)	P.I.(%)	C.V.
	Diploidy	Aneuploidy			
Carcinoma(N=25)	25	—	2.60 ± 2.66	7.70 ± 3.63	4.95 ± 1.65
Control (N=10)	10	—	1.94 ± 2.77	8.44 ± 3.89	4.00 ± 1.34

*P.I. proliferation index(S+G2, M phase)

C.V. coefficient of variation

SPF S-phase fraction

P>0.05

Table 2. DNA content analysis according to the age and sex

Factors		SPF (%)	P.I. (%)	P value
Sex	Male (N= 4)	0.08± 0.36	4.83± 0.76	<0.05
	Female(N=21)	2.99± 2.78	8.31± 3.72	
Age	>45 years(N=12)	2.58± 2.74	7.64± 4.30	>0.05
	<45 years(N=13)	2.62± 2.75	7.76± 3.41	

Table 3. DNA content according to the lymph node and tumor status

Factors		SPF (%)	P.I. (%)	P value
Lymph node metastasis	Yes(N=12)	2.40± 2.89	7.74± 3.91	>0.05
	No (N=13)	2.78± 2.60	7.67± 3.60	
Extracapsular invasion	Yes(N= 7)	2.40± 3.22	7.92± 4.38	>0.05
	No (N=18)	2.71± 2.46	7.58± 3.39	

고 찰

갑상선 유두상암은 림프전이 빈번하지만 예후는 다른 악성종양에 비하여 양호하며 10년 생존율이 60%에서 95%까지 보고되고 있다⁶⁾. 중요한 예후인자로는 진단시 환자의 연령, 성별, 세포의 이형성 정도, 종양의 피막의 침습, 림프절 전이, 원격전이 등이 알려져 있다⁶⁾¹⁴⁾¹⁵⁾.

최근 핵산분석에 대한 연구결과 몇몇의 악성종양에서 이배수성인 경우 비배수성보다 생존율이 양호하다고 알려져 있으며⁷⁾, 특히 전립선암, 유방암, 연골육종 등에서는 핵산분석이 일반적인 임상적, 병리조직학적 검사에 따른 예후의 추정보다 더 유용한 것으로 보고되어 있다¹⁾.

갑상선 유두상암에 대한 핵산분석은 1983년 Hedly등¹⁰⁾에 의하여 파라핀 포매조직에서 유세포 분석이 가능하여지면서 후향적인 분석을 통하여 생존율과의 관계 및 예후 인자로서의 가능성 여부를 판단하고자 하는 노력이 있어 왔다.

Cohn등⁴⁾은 90명의 갑상선 유두상암 환자들을 대상으로 시행한 연구에서 80명이 10년 이상 생존하였으며 10명은 사망하였는데, 사망한 레에서 핵산수치가 의미있게 증가 되어 있었다고 보고하였다.

Joensuu등¹¹⁾은 분화성 갑상선암 환자 125명을 대상으로 핵산분석을 시행하여 유두상암은 24%, 여포성암은 56%, 수질암은 57%에서 비배수성 결과를 관찰하였으며, 비배수성인 경우에 고연령, 미분화, 피막의 침습, 생존율의 저하 등과 관계가 있다고 하였다. Schellhout¹³⁾의 연구에서 비배수성

의 출현 빈도는 미분화암이 72%, 여포암이 64%, 유두상암과 여포선종이 각각 24%로 나타났으며, 다배수성은 유두상암의 4%와 여포상암의 36%에서 관찰되었다.

Hamming등⁸⁾은 113례의 갑상선 유두상암과 여포암을 대상으로 종양의 분화도, 피막의 침습, 림프절 전이, 원격전이, 핵산함량, 진단 당시 환자의 연령 등의 인자를 기준으로 분석한 결과에서, 핵산의 함량이 갑상선 유두상암에서 종양의 분화도와 의미있게 관련이 있으며 가장 중요한 예후인자는 원격전이였고 원격전이가 없었던 91례에서 생존율과 가장 관계가 있었던 인자는 핵산 함량으로 다배수성인 경우에 생존율이 낮았다. 또한 무병생존율에서는 진단 당시의 나이가 가장 관계가 깊고 그 다음으로는 다배수성이 관계가 있었으며 원격전이가 있었던 22례에서 다배수성을 나타내었던 경우는 6례 모두 사망하였고 그 외의 16례는 8례(50%)만이 사망하였다.

파라핀 포매조직을 이용한 유세포분석은 신선조직에 비하여 몇가지 문제점들이 있다⁵⁾¹⁰⁾. 포르말린에 고정을 한 경우, 핵염색 과정에서 핵산의 형광도가 감소할 수 있는데 이러한 감소정도를 예측하기가 어렵기 때문에 각 블록마다 이배수성 세포의 핵산형광도에 차이가 있을 수 있다. 또한 탈파라핀 과정에서 생긴 불순물로 인하여 변이계수(coefficient of variation)이 커지게 되므로 세포주기의 분석에 있어서 신선조직보다 정확성이 떨어질 가능성이 크다⁹⁾.

Johannessen등¹²⁾은 22례의 갑상선 유두암에서 동결조직을 이용하여 핵산분석과 함께 세포주기분

석을 시행하였는데 1례에서만 비배수성을 보였으며 S7 세포분율이 매우 낮게 나타났을 뿐만 아니라 정상 대조군보다 더 낮은 결과를 보였다.

저자들의 연구에서도 세포주기분석의 정확도를 기하기 위하여 신전조직을 이용하였는데, 전례에서 이배수성을 나타내었으며 합성기분획 및 증식지수 (G2기+M기)가 매우 낮게 나타났으며 정상 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이가 없었다.

핵산함량의 분석을 통하여 볼때 이배수성 및 낮은 증식지수는 갑상선 유두상암의 생물학적 특성을 대변하여 준다고 생각된다.

결 과

최근 2년간 본원 이비인후-두경부외과학교실에서 갑상선수술을 시행하여 유두상암으로 진단되었던 환자중 신전조직에서 유세포분석이 가능하였던 25례를 대상으로 핵산분석을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 핵산의 배수성은 전례에서 이배수성이었다.

2) 합성기분획은 대조군이 $1.94 \pm 2.77\%$, 유두상암종이 $2.60 \pm 2.66\%$ 이었고, 증식지수는 대조군이 $8.44 \pm 3.89\%$, 유두상암종이 $7.70 \pm 3.63\%$ 로 오히려 대조군보다 높았으나 통계학적으로 유의한 차이는 없었다.

3) 환자의 연령, 피막의 침습, 림프전이질의 유무도 각 군간에 통계학적으로 유의한 차이가 없었다.

따라서 갑상선 유두상암종은 낮은 증식능을 나타내었으며, 림프전이질, 고연령 및 피막의 침습 등에서도 증식능의 차이가 없는 것으로 보아 비교적 양호한 예후를 나타내는 이유로 사료된다.

Reference

- 1) Auer G, Zetterberg A : *The prognostic significance of nuclear DNA content in malignant tumors of breast, prostate and cartilage. Advances in clinical cytology, Vol. 2, edited by Koss LG and Coleman DV, New York, Masson 123-134, 1985*
- 2) Beahrs CH, Hensen EB, Hutter RVP, et al : *Manual for staging of cancer. American Joint Committee on Cancer. 4th ed. Philadelphia JB Lippincott Co, 1992*

- 3) Byar DP, Green SB, Dor P, et al : *A Prognostic index for thyroid carcinoma : A study of the E.O.R. T.C. thyroid cancer cooperative group. Eur J Cancer 15 : 1033-1041, 1979*
- 4) Cohn K, Bäckdahl M, Forsslund G, et al : *Prognostic value of nuclear DNA content in papillary thyroid carcinoma. World J Surg 8 : 474-480, 1984*
- 5) Coon JS, Landy AL, Weinstein RS : *Flow cytometric analysis of paraffin embeded tumors. Implications for diagnostic pathology. Human Pathol 117 : 435-437, 1986*
- 6) Franssila Ko : *Prognosis in thyroid carcinoma. Cancer 36 : 1138-1146, 1975*
- 7) Friedlander ML, Hedley DW, Taylor IW : *Clinical and biological significance of aneuploidy in human tumors. J Clin Pathol 37 : 961-974, 1984*
- 8) Hamming LF, Schelfhout LJD, Cornelisse CJ, et al : *Prognostic value of nuclear DNA content in papillary thyroid cancer. World J Surg 12 : 503-508, 1988*
- 9) Hedley DW : *Flow cytometry using paraffin-embeded tissue : five year on. Cytometry 10 : 229-241, 1989*
- 10) Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW, et al : *Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embeded pathological material using flow cytometry. J Histochem Cytochem 31 : 1331-1335, 1983*
- 11) Joensuu H, Klemi P, Eerola E, et al : *Influence of cellular DNA content on survival in differentiated thyroid cancer. Cancer 58 : 2462-2476, 1986*
- 12) Johannessen JV, Sobrinho-Simoes M, Tangen Ko, et al : *A flow cytometric deoxyribonucleic acid analysis of papillary thyroid carcinoma. Lab Invest 45 : 336-341, 1991*
- 13) Schelfhout LJD, Cornelisse CJ, Goslings BM, et al : *Frequency and degree of aneuploidy in benign and malignant thyroid neoplasms. Int J Cancer 45 : 16-20, 1990*
- 14) Tennvall J, Björklund A, Möller T, et al : *Prognostic factors of papillary, follicular and medullary carcinomas of the thyroid. Acte Radiol Oncol 24 : 17-24, 1985*
- 15) Tubina M, Schlumberger M, Rougier P, et al : *Long-term results and prognostic factors in patients with differentiated thyroid carcinoma. Cancer 55 : 794-804, 1985*