

갑상선 유두암 원발 조직과 재발된 림프절 전이 조직에서 Retinoic Acid Receptor β 단백질 발현의 임상적 의의

한림대학교 의과대학 내과학교실, 해부병리학교실¹

한재필 · 이성진 · 최경찬¹ · 박영의¹ · 이해리 · 강준구 · 류옥현 · 김철식
이병완 · 홍은경 · 김현규 · 김두만 · 유재명 · 임성희 · 유형준 · 최문기

The Clinical Significance of Retinoic Acid Receptor β Expressions in Primary and Recurred Metastatic Lymph Node Papillary Thyroid Carcinomas

Jae Pil Han, Seong Jin Lee, Kyung-Chan Choi¹, Young-Euy Park¹, Hae Ri Lee, Jun Goo Kang, Ohk Hyun Ryu, Chul Sik Kim, Byung Wan Lee, Eun Gyung Hong, Hyeon Kyu Kim, Doo-Man Kim, Jae Myung Yoo, Sung-Hee Ihm, Hyung Joon Yoo, Moon Gi Choi

Department of Internal Medicine, Department of Diagnostic Pathology¹, College of Medicine, Hallym University

ABSTRACT

Background: The present study was designed to investigate the correlations of retinoic acid receptor β (RAR β) expression for primary and recurred metastatic lymph node (LN) papillary thyroid carcinoma (PTC) tissues and the correlations of RAR β expression with the uptake of I¹³¹ as detected on a whole body scan (WBS).

Methods: Primary and metastatic LN PTC tissues were examined by immunohistochemical methods. Staining positivity was calculated, and staining intensity was graded as negative (0), weak (1+), moderate (2+) and strong (3+). Nuclear staining intensity (NSI) of cells from tissues was also examined.

Results: Seventeen patients who had regional cervical LN metastasis without distant metastasis were included in the study, and 13 patients had the abnormal uptake of I¹³¹ as detected on a WBS. In primary PTC tissues, RAR β staining positivity and intensity of carcinoma cells were significantly higher than those of normal cells but NSI was significantly higher in normal cells than carcinoma cells. Between primary and metastatic LN PTC tissues, RAR β staining intensity was correlated after controlling for age. Primary PTC tissues from 14 (82.4%) out of 17 patients were concordant between NSI and the uptake of I¹³¹ as detected on a WBS. NSI predicted the I¹³¹ uptake as detected on a WBS with 81.3% positive predicted value (PPV) and 100% negative predicted value. Metastatic LN PTC tissues from 13 (76.5%) out of 17 patients were concordant between NSI and the uptake of I¹³¹ as detected on a WBS. NSI predicted the uptake of I¹³¹ as detected on a WBS with 76.5% PPV. When the results of NSI taken either as positive or negative were correlated with those of the uptake of I¹³¹ as detected on a WBS in primary and metastatic LN PTC tissues, the correlation was not significant after controlling for age.

Conclusion: Our results demonstrate that nuclear RAR β expression may be decreased in PTC tissues than

접수일자: 2007년 7월 28일

통과일자: 2007년 10월 15일

책임저자: 이성진, 한림대학교 의과대학 내과학교실

normal thyroid tissues, and RAR β expression in primary PTC tissues as well as in recurred metastatic LN PTC tissues may predict the uptake of I¹³¹ as detected on a WBS. (J Kor Endocr Soc 22:419~427, 2007)

Key Words: papillary thyroid carcinoma, RAR β , whole body scan

서 론

Retinoid는 비타민 A의 유도체로 스테로이드 호르몬 수용체군에 속하는 retinoic acid (RA) 수용체(RAR) 또는 retinoid X 수용체(RXR)와 결합하여 유전자 발현을 조절하며[1~3] 태아기에는 성장, 분화, 형태 형성, 성인기에는 각 조직의 기능 유지에 관여한다[4]. RAR와 RXR은 각각 α , β , γ 의 이성질체를 가지며 발생시기와 조직에 따라 다르게 발현하는데 예를 들어 RAR α 는 모든 조직에서 발현하는 반면 RAR β 와 RAR γ 는 특정 조직에서만 발현한다. RAR 발현의 변화가 악성 종양에서 관찰되는데 예를 들어 비정상적인 RAR α 와 RAR β 는 쥐의 피부암[5], RAR β 는 B형 간염 바이러스와 상호작용하여 사람의 간암 발생에 관여한다[6]. RAR β 는 자율기능성 갑상선종 등의 양성 종양과 갑상선 유두암, 두경부 편평상피세포암, 폐암, 유방암, 자궁경부암, 난소암 등의 악성 종양에서 감소되어 있으며[7~14] 누드마우스 모델에서 RAR β 를 발현시키면 표피양 폐암의 성장과 전이가 억제됨이 보고되어 있다[15]. RAR β 단백질은 핵 내에 있어야만 정상적으로 기능할 수 있는데 두경부 편평상피세포암, 폐암, 유방암 암세포에서 전체 RAR β 단백질 발현은 증가함에도 불구하고 RAR β 단백질의 표적화 및 세포 내 분포 이상으로 인하여 핵 내 RAR β 단백질 발현은 감소한다는 연구 결과들이 보고된 바 있으며[7~9] 이는 갑상선암에서도 동일하게 나타날 가능성이 있으나 갑상선암 암세포의 전체 및 핵 내 RAR β 단백질 발현을 분석한 연구 결과는 아직까지 보고된 바 없다.

최근 갑상선 분화암에서 RA를 투여하였을 때 갑상선 세포 내 Na⁺/I symporter (NIS) 발현이 증가하며 NIS 유전자 촉진부위 내 비정상 RAR 반응요소가 존재함이 보고되면서[16] 갑상선 분화암에서 RAR β 단백질 발현이 NIS 단백질 발현 및 방사성요오드 섭취 여부와 밀접하게 관련되어 있을 가능성이 제시되고 있으나 갑상선 분화암에서 원발 조직과 전이 병변 조직 사이의 RAR β 단백질 발현을 비교하여 RAR β 단백질 발현과 방사성요오드 섭취 여부의 관련성을 검토한 연구는 아직까지 없는 실정이다.

유전자의 전사와 해독, 세포 내 소기관에 대한 표적화와 분포 등에 대한 연구는 적용되는 방법론에 따라 상이한 결과들을 보일 수 있다. 면역조직화학염색법은 이미 보관된 표본을 이용할 수 있으며 표본의 양이 적더라도 시행이 가능하고 같은 표본에서 종양 조직과 정상 조직을 함께 분석할 수 있으며 반정량적으로 특정 단백질 발현 정도를 알 수

있고 세포 내 분포에 대한 정보를 알 수 있다는 장점이 있다[17].

저자들은 갑상선 유두암의 원발 조직과 재발한 림프절 전이 조직을 대상으로 각 조직의 RAR β 단백질 발현 정도 및 관련성을 분석하는 한편 RAR β 단백질 발현과 방사성요오드 섭취 여부의 관련성을 분석함으로써 갑상선 유두암에서 원발 조직의 RAR β 단백질 발현이 재발한 림프절 전이 조직의 RAR β 단백질 발현을 예측할 수 있는지 여부와 각 조직의 RAR β 염색 여부가 방사성요오드 섭취 여부를 예측할 수 있는지 확인하고자 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 갑상선 조직

본 연구는 한림대학교의료원 윤리위원회의 가이드라인에 의거하여 계획되었다. 갑상선 조직은 2003년 1월부터 2005년 3월까지 춘천성심병원에서 시행된 갑상선 수술에 의하여 획득되었으며 10% 포르말린으로 고정된 후 파라핀에 포매되었다. 갑상선 유두암은 세계보건기구 분류에 따라 조직형을 전형적 아형(classic type)과 여포변이형(follicular variant type)으로 나누었으며[18] 종양 크기, 국소 림프절 전이, 원격 전이에 따라 TNM 병기를 나누었고[19] 원격 전이, 나이, 완전절제, 침윤, 종양 크기에 따라 MACIS 점수를 계산하였다[20]. 갑상선 수술 후 시행한 혈청 갑상선글로불린 측정, 전신 방사성요오드 스캔, 경부 초음파검사, 미세침

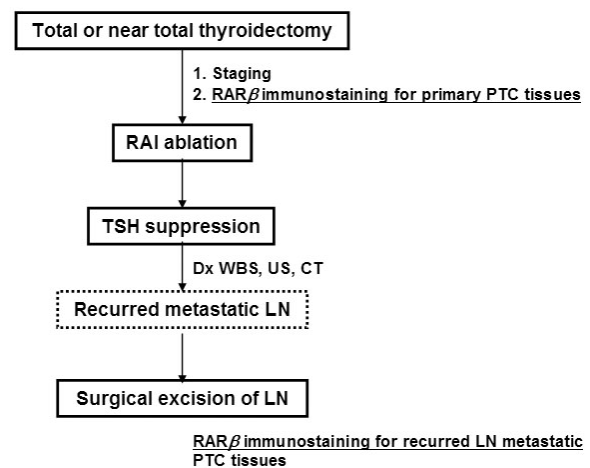


Fig. 1. Diagram of the study. Dx WBS: diagnostic I¹³¹ whole body scan; US, neck ultrasonography.

흡인세포검사에서 재발한 림프절 전이 조직이 발견된 경우 외과적 절제로 재발한 림프절 전이 조직을 얻었으며 절제 후 전신 방사성요오드 스캔과 경부 초음파검사를 다시 시행하여 완전 절제 여부를 확인하였다(Fig. 1).

2. 전신 방사성요오드 스캔

전신 방사성요오드 스캔 시행 전 6주 동안 갑상선호르몬 투여를 중단하였으며 시행 직전 갑상선자극호르몬 수치가 30 mIU/L 이상임을 확인하였고 방사성요오드 3 mCi를 투여한 후 48시간이 경과한 뒤 전신영상을 얻었다.

3. 혈청 총 T₄, 갑상선자극호르몬, 갑상선글로불린, 항갑상선글로불린 항체 측정

총 T₄와 갑상선자극호르몬은 갑상선 수술 전과 전신 방사성요오드 스캔 전 각각 측정하였다. 갑상선글로불린과 항갑상선글로불린 항체는 전신 방사성요오드 스캔 전 측정하였다. 총 T₄는 AxSYM Total T₄ Kit (Abbott, USA)를 이용하여 형광면역측정법(fluorescence polarization immunoassay)으로 측정하였으며 갑상선자극호르몬은 AxSYM TSH Kit (Abbott, USA)를 이용하여 미세입자효소면역측정법(microparticle enzyme immunoassay)으로 측정하였다. 갑상선글로불린은 Tg-S IRMA CT Kit (Radim, Italy)를 이용하여 면역방사계수측정법(immunoradiometric assay)으로 측정하였으며 항갑상선글로불린 항체는 Serodia-ATG Kit (Fujirebio, Japan)를 이용하여 미량입자응집법(microtiter particle agglutination test)으로 측정하였다. 각 검사의 정상 범위는 총 T₄ 4.5~12.0 ug/dL, 갑상선자극호르몬 0.4~4.7 mIU/L, 갑상선글로

불린 0~30 ng/mL, 항갑상선글로불린 항체 1:27 이하이었다.

4. 면역조직화학염색

RAR β 단백질에 대한 면역조직화학염색은 파라핀으로 포매된 갑상선 조직과 림프절 조직 절편(5 μ m), 항 RAR β 단클론항체(Cat. No. MS-1342-P0, Labvision, Fremont, CA, USA)를 이용하여 Rochaix 등이 기술한 방법으로 시행되었다[13]. 절편을 Tris-citrate 완충제(pH 9.5)로 탈파라핀, 재수(rehydration), 전처리 하였으며 1% 소 혈청 알부민(bovine serum albumin, BSA)이 추가된 인 완충 생리식염수(phosphate buffered saline, PBS)로 세척한 후 정상 양 혈청(normal goat serum, 1:50 희석)이 포함된 PBS-BSA로 실온에서 60분 동안 반응시켰고 일차 항체를 적용한 뒤 4℃에서 다음 날 아침까지 반응시켰다. 절편을 PBS-BSA로 3회 세척한 후 실온에서 60분 동안 과산화효소-표지 중합체(peroxidase-labeled polymer; Dako, Glostrup, Denmark)가 부착된 이차 항체로 반응시킨 뒤 PBS-BSA로 3회 세척한 후 3-amino-9-ethylcarbazole substrate (Dako, Glostrup, Denmark)로 과산화효소 활성도를 측정하였다. 절편을 Mayer's hematoxylin으로 대조 염색한 후 Paramount (Dako, Glostrup, Denmark)로 표본 제작하였다. 일차 항체가 없는 표본을 음성 대조군으로 설정하여 비특이적 반응 유무를 점검하였다.

5. 면역조직화학염색의 평가

250 배율로 10개 시야 내 각 조직 표본의 RAR β 염색 양성 세포 수를 센 후 양성세포의 백분율로 염색 양성도(staining positivity)를 계산하였으며 이와 별도로 음성(0), 약한 양성

Table 1. Clinical characteristics of patients with PTC

Patient No.	Sex	Age	Op	Type	Size (cm)	TNM	Stage	MACIS	TSH at WBS (mIU/L)	Tg (off) (ng/mL)	Tg Ab	WBS
1	F	33	NT	C	5.5	T4aN1aM0	I	5.75	57.9	18.7	1:27	+
2	F	43	NT	C	2.5	T4aN1aM0	I	5.19	60.3	34.2	1:27	+
3	F	63	NT	C	2.0	T1N1bM0	IVA	5.64	35.1	105.6	1:27	+
4	M	38	NT	C	2.8	T4aN1aM0	I	4.94	47.1	40.4	1:27	+
5	F	27	NT	C	2.0	T4aN1aM0	I	4.70	58.3	22.9	1:27	+
6	F	39	NT	C	3.9	T4aN1aM0	I	5.27	63.7	131.3	1:400	-
7	F	29	NT	C	1.4	T4aN1aM0	I	4.52	41.2	30.1	1:27	-
8	F	35	NT	C	1.0	T4aN1aM0	I	4.40	49.6	4.6	1:27	+
9	F	65	NT	C	2.5	T2N1bM0	IVA	5.95	77.1	23.5	1:27	-
10	F	29	NT	C	3.0	T4aN1aM0	I	5.00	64.4	31.0	1:27	+
11	F	39	T	C	1.4	T1N1bM0	I	3.52	68.8	1.6	1:100	+
12	F	42	NT	FV	1.6	T4aN1aM0	I	4.84	39.7	10.9	1:27	+
13	F	59	NT	FV	2.0	T4aN1aM0	IVA	6.32	44.5	74.4	1:400	-
14	F	45	NT	FV	2.5	T4aN1aM0	IVA	5.35	33.6	2.8	1:27	+
15	F	43	NT	FV	3.0	T4aN1aM0	I	5.34	59.8	126.5	1:27	+
16	F	21	T	FV	1.0	T4aN1bM0	I	4.40	72.1	0.8	1:27	+
17	F	47	T	FV	3.0	T4aN1aM0	IVA	5.66	82.3	2.1	1:27	+

NT, near total thyroidectomy; T, total thyroidectomy; C, classic type; FV, follicular variant type; Tg (off), serum thyroglobulin after T₄ withdrawal.

(1+), 중등도 양성(2+), 강한 양성(3+)으로 염색 강도 (staining intensity)를 나누었다. 모든 조직 표본은 2명의 해부병리와 전문의가 임상 자료를 모르는 상태에서 독립적으로 평가하였다.

6. 통계 분석

SPSS 10.0 프로그램을 이용하여 통계 처리하였으며 원발 조직에서 정상세포와 암세포 사이의 염색 양성도는 paired *t*-test, 염색 강도는 Wilcoxon signed ranks test를 이용하여 비교하였다. 원발 조직 암세포와 재발한 림프절 전이 조직 암세포 사이의 염색 양성도는 Pearson's analysis, 염색 강도는 Spearman rank order analysis로 상관 분석하였으며 나이 제한 후 부분 상관 분석을 함께 시행하였다. 염색 양성도 또는 강도와 임상 변수사이의 상관관계는 Pearson's analysis 또는 Spearman rank order analysis로 분석하였다. *P*값이 0.05 미만인 경우를 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. 임상적 특징 (Table 1)

17명의 갑상선 유두암 환자가 포함되었으며 국소 경부 림프절 전이 이외의 원격 전이는 없었다. 갑상선전절제술은 3명, 갑상선아전절제술(near total thyroidectomy)은 14명에서 시행되었다. 조직형은 11명이 전형적 아형, 6명이 여포변이형 이었으며 TNM 병기는 12명이 stage I, 5명이 stage IVA 이었고 평균 MACIS 점수는 5.11 ± 0.68 (3.52~6.32) 이었다. 모든 환자에서 갑상선 수술 전 총 T₄와 갑상선자극

호르몬 수치는 정상 범위이었으며(총 T₄ 수치 분포, 5.1~10.2 ug/dL; 갑상선자극호르몬 수치 분포, 0.8~3.7 mIU/L) 항갑상선제 또는 갑상선호르몬을 복용한 과거력은 없었다. 수술 직후 잔여 갑상선제거술을 시행한 뒤 전신 방사성요오드 스캔과 경부 초음파검사를 시행하여 완전 관해되었음을 확인하였다. 경과 관찰 동안 재발 여부를 알기 위하여 전신 방사성요오드 스캔을 시행하였을 때 13명에서 경부 내 비정상적인 섭취가 관찰되었으며 경부 초음파검사를 시행하였을 때 전신 방사성요오드 스캔 음성이었던 4명에서 경부 림프절 종대가 관찰되었다. 갑상선 수술 및 잔여 갑상선제거술 후 재발된 국소 경부 림프절 전이 병변이 발견되었을 때까지의 기간은 평균 34 ± 11 개월(22~45개월)이었다.

2. 원발 조직과 림프절 전이 조직의 RAR β 단백질 발현 분석 (Table 2)

RAR β 단백질은 조직 내 여포마다, 여포 내 세포마다 다르게 염색되었으며 정상 세포의 경우 핵 내에 국한되어 염색되었으나 암세포의 경우 핵 내와 세포질 모두에서 염색되었다(Fig. 2). 원발 조직에서 정상 세포와 암세포의 RAR β 염색 양성도는 각각 $11.5 \pm 6.7\%$ 와 $66.8 \pm 14.6\%$ ($P < 0.001$), RAR β 염색 강도는 각각 1.53 ± 0.62 와 2.35 ± 0.70 ($P < 0.001$)이었으며 유의한 차이가 있었다. 림프절 전이 조직에서 암세포의 RAR β 염색 양성도 및 강도는 각각 $73.1 \pm 15.3\%$, 2.53 ± 0.51 이었으며 원발 조직 암세포의 RAR β 염색 양성도 및 강도와 차이가 없었다. 원발 조직에서 정상 세포와 암세포의 핵 내 RAR β 염색 강도는 1.53 ± 0.62 와 0.94 ± 0.50 으로 유의한 차이가 있었으나($P = 0.01$) 원발

Table 2. RAR β staining positivity and intensity in primary and metastatic LN PTC tissues

Case No	RAR β						WBS
	Primary PTC tissues			Metastatic LN PTC tissues			
	Positivity (%)	Intensity		Positivity (%)	Intensity		
		Nucleus	Cytoplasm		Nucleus	Cytoplasm	
1	74	1+	2+	91	1+	2+	+
2	62	1+	0	71	1+	1+	+
3	90	1+	2+	92	1+	1+	+
4	75	1+	2+	77	1+	1+	+
5	76	1+	1+	74	1+	1+	+
6	53	1+	2+	52	1+	2+	-
7	55	1+	1+	42	1+	1+	-
8	65	1+	1+	75	1+	2+	+
9	62	0	1+	55	1+	1+	-
10	55	2+	1+	91	2+	3+	+
11	85	1+	1+	63	1+	1+	+
12	43	1+	1+	62	1+	2+	+
13	91	1+	3+	86	1+	3+	-
14	71	2+	3+	85	1+	3+	+
15	65	1+	3+	91	1+	1+	+
16	42	1+	1+	73	1+	3+	+
17	71	1+	1+	62	1+	2+	+

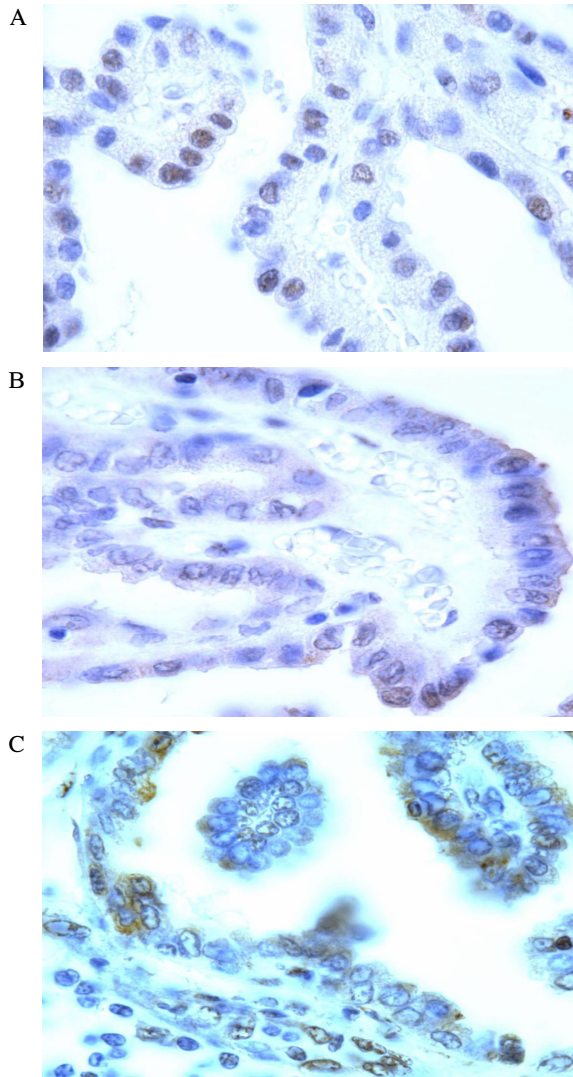


Fig. 2. RAR β immunostaining. A. Normal thyroid cells in primary PTC tissues with positive RAR β staining at nucleus (brown color, $\times 1000$). B. Carcinoma cells in primary PTC tissues with positive RAR β staining in cytoplasm as well as at nucleus (brown color, $\times 1000$). C. Carcinoma cells in metastatic LN PTC tissues with positive RAR β staining (brown color, $\times 1000$). Immunoperoxidase RAR β , hematoxylin counterstaining.

조직과 림프절 전이 조직 암세포 사이의 핵 내 RAR β 염색 강도는 차이가 없었다. 원발 조직 내 전형적 아형과 여포변이형 사이의 RAR β 염색 양성도, 강도, 핵 내 강도는 각각 차이가 없었으며 림프절 전이 조직 내에서도 조직형 사이의 RAR β 염색 양성도, 강도, 핵 내 강도는 각각 차이가 없었다.

모든 환자에서 원발 조직과 림프절 전이 조직 암세포 사이의 RAR β 염색 양성도는 나이 제한 후 상관관계가 없었으나 RAR β 염색 강도는 나이 제한 후 유의한 상관관계가 있었다($P = 0.024$, $\rho = 0.545$). 조직형 또는 나이(45세)에 따라 환자를 나누었을 때 각 군 환자에서 원발 조직과 림프절 전이 조직 암세포 사이의 RAR β 염색 양성도 및 강도는 각각

Table 3. Results of nuclear RAR β staining (NSI) and I^{131} WBS uptake in primary PTC tissues

		I^{131} WBS uptake		Total
		+	-	
NSI	+	13	3	16
	-	0	1	1
Total		13	4	17

Table 4. Results of nuclear RAR β staining (NSI) and I^{131} WBS uptake in metastatic LN PTC tissues

		I^{131} WBS uptake		Total
		+	-	
NSI	+	13	4	17
	-	0	0	0
Total		13	4	17

상관관계가 없었다. 모든 환자에서, 그리고 조직형 또는 나이(45세)에 따라 환자를 나누었을 때 각 군 환자에서 원발 조직과 림프절 전이 조직 암세포 사이의 핵 내 RAR β 염색 강도는 각각 상관관계가 없었다.

원발 조직 암세포의 조직형, RAR β 염색 양성도, 강도, 핵 내 강도는 환자의 나이, 종양 크기, TNM 병기, MACIS 점수, 전신 방사성요오드 스캔 전 갑상선글로불린 수치와 상관관계가 없었다.

3. RAR β 단백질 발현과 전신 방사성요오드 스캔 섭취 사이의 관련성 분석

전신 방사성요오드 스캔 시 림프절 전이 조직의 섭취가 있었던 13명 모두 원발 조직 암세포의 핵 내 RAR β 염색이 양성, 림프절 전이 조직의 섭취가 없었던 4명 중 1명에서 원발 조직 암세포의 핵 내 RAR β 염색이 음성이어서 전체 17명 중 14명(82.4%)이 원발 조직 암세포의 핵 내 RAR β 염색 여부와 전신 방사성요오드 스캔 섭취 여부가 일치하였다(Table 3). 전신 방사성요오드 스캔에 대한 원발 조직 암세포의 핵 내 RAR β 염색의 예민도, 특이도, 양성예측도, 음성예측도는 각각 100% (13/13), 25% (1/4), 81.3% (13/16), 100% (1/1)이었다.

전체 17명 중 13명(76.5%)에서 림프절 전이 조직 암세포의 핵 내 RAR β 염색 여부와 전신 방사성요오드 스캔 섭취 여부가 일치하였으며 전신 방사성요오드 스캔에 대한 림프절 전이 조직 암세포의 핵 내 RAR β 염색의 예민도, 특이도, 양성예측도는 각각 100%, 0%, 76.5%이었으며 음성예측도는 계산할 수 없었다(Table 4).

고 찰

다양한 종양에서 RAR β 단백질 발현은 RAR β 유전자 기능

조절 이상으로 인하여 감소되는데[6~14] 갑상선 악성 종양에서 RAR의 mRNA와 단백질 발현은 각각 다르며 이는 자연적으로 존재하는 retinoid (all-trans RA, 9-cis RA, 13-cis RA)의 다양한 효과와 관련되어 있다[12,13,21~25]. Haugen 등[26]은 갑상선암 세포주와 조직에서 RAR β 와 RXR γ 이 각각 다르게 발현하며 RAR β 의 경우 9-cis RA 투여 전후 mRNA 양의 변화가 없는 것으로 미루어 볼 때 RAR β 발현의 증가가 갑상선암의 성장을 억제하는 주요 기전이 아니고 RXR γ 의 경우 정상 갑상선 조직에서 발현하지 않으나 갑상선암 세포주와 조직에서 높게 발현하는 것으로 미루어 볼 때 RXR γ 발현이 갑상선암 발생에 중요한 역할을 한다는 연구 결과를 보고하면서 갑상선암에서 RAR β 와 RXR γ 발현을 확인하는 것이 RA를 이용한 치료 효과를 예측하는데 도움이 될 수 있음을 제시한 바 있다. Rochaix 등[13]은 Western blot법과 면역조직화학염색법으로 갑상선 유두암에서 RAR β 단백질 발현이 감소됨을 보고한 반면 저자들은 Rochaix 등이 사용한 RAR β 단클론항체를 그대로 적용하여 면역조직화학염색법을 시행하였음에도 불구하고 정상 갑상선 세포보다 갑상선 유두암 암세포에서 전체 RAR β 염색 양성도와 강도가 오히려 높게 나타나 RAR β 단백질 발현이 증가됨을 확인할 수 있었다. 이와 같이 연구 결과들이 상반된 이유는 아직까지 확실하지 않으나 본 연구와 Rochaix 등의 연구가 서로 실험 조건이 달랐기 때문이거나 분화도가 다른 갑상선 유두암 암세포를 분석하였기 때문일 가능성이 있다. Hoque 등[27]은 갑상선 양성 및 악성 종양에서 RAR β 유전자 촉진부위가 과메틸화되며 이는 BRAF 돌연변이와 양의 상관관계가 있음을 보고하였는데 한국인의 갑상선 유두암에서 BRAF 돌연변이 빈도가 상대적으로 높음을 고려하여 볼 때 본 연구와 Rochaix 등의 연구에 포함된 갑상선 유두암의 BRAF 돌연변이 빈도와 RAR β 유전자 촉진부위의 과메틸화가 연구 결과들의 차이와 관련되었을 가능성도 있으며 향후 한국인 갑상선 유두암의 RAR β 유전자 촉진부위 과메틸화, BRAF 돌연변이, RAR β 단백질 발현에 대한 추시 연구가 반드시 필요하리라 생각된다.

본 연구에서 전체 RAR β 염색 양성도와 강도는 정상 세포보다 암세포에서 높았으나 핵 내 RAR β 염색 강도는 정상 세포보다 암세포에서 낮았는데 유발 기전으로 RAR β 단백질의 표적화 및 세포 내 분포 이상이 유력하게 제시되고 있으며[7~9] RAR β 단백질은 핵 내에 있어야만 정상적으로 기능할 수 있음을 고려하여 볼 때 RAR β 단백질의 핵 내 이동을 증가 시킴으로써 RAR β 리간드인 RA를 이용한 치료 효과를 높일 수 있는지 연구되어야 할 것으로 생각된다. 본 연구의 경우 원발 조직의 핵 내 RAR β 염색이 양성되었던 16명 모두에서 재발된 림프절 전이 조직의 핵 내 RAR β 염색이 양성이었으며 원발 조직과 재발된 림프절 전이 조직 암세포 사이의 RAR β 염색 강도는 유의한 상관관계가 있었는데 이는

원발 조직의 RAR β 단백질 발현이 재발된 림프절 전이 조직의 RAR β 단백질 발현을 부분적으로 예측할 수 있으며 원발 조직의 RAR β 염색 여부를 확인하는 것이 재발된 국소 림프절 전이 조직에 대한 RA 치료 효과를 예측하는데 유용할 수 있음을 시사한다고 하겠다.

NIS 단백질은 갑상선 세포 기저막 내 13개의 막통과영역을 가지는 당단백으로 Na⁺-K⁺ ATPase에 의한 Na⁺ 이온 농도 경사를 이용하여 요오드를 포획, 운반하는 기능을 가지고 있다[28~31]. 전이 또는 재발 갑상선 분화암을 치료하는 경우 반드시 갑상선 전절제술을 시행한 후 방사성요오드를 투여해야 하는데 이는 갑상선 분화암의 방사성요오드 섭취가 정상 갑상선 조직에 비해 현저하게 감소되어 있기 때문이며 이에 대한 분자생물학적 기전으로 갑상선 분화암의 NIS 발현 감소 등이 제시되고 있다[32~34]. 갑상선암의 분화 치료에 사용되는 RA가 정상 갑상선 세포의 NIS 단백질 발현을 감소시키는 반면 갑상선 분화암 암세포의 NIS 단백질 발현을 증가시키며 NIS 유전자 촉진부위가 비정형 RAR 반응요소를 포함하고 있다는 연구 결과들[16,35]을 종합하여 볼 때 RA가 갑상선 분화암 암세포의 핵 내 RAR β 단백질과 결합하여 NIS 단백질 발현을 증가시킬 것으로 추측되나 RA가 RAR β 이외의 다른 아형을 통해서도 NIS 유전자를 조절할 가능성이 있으므로 향후 갑상선 분화암 암세포의 NIS 유전자 촉진부위 내 비정형 RAR 반응요소에 대한 RAR 단백질 아형의 역동학 연구가 필요하리라 생각된다. 저자들은 갑상선 분화암에서 RAR β 단백질 발현이 NIS 단백질 발현과 관련되어 있을 수 있으며 NIS 단백질 발현은 방사성요오드 섭취 여부와 밀접하게 관련되어 있음에 착안하여 갑상선 유두암에서 RAR β 단백질 발현과 방사성요오드 섭취 여부와와의 상관관계를 분석하였는데 원발 조직과 재발된 림프절 전이 조직에서 방사성요오드 섭취에 대한 핵 내 RAR β 염색의 양성예측도는 각각 81.3%와 76.5%로 나타나 재발된 림프절 전이 조직뿐 아니라 원발 조직의 핵 내 RAR β 염색 여부가 방사성요오드 섭취 여부를 예측하는데 유용함을 알 수 있었으며 이는 재발된 림프절 전이 조직의 핵 내 RAR 염색 여부를 확인하는 것이 향후 반복적인 재발 시 림프절 전이 조직의 방사성요오드 섭취 여부를 예측하는데 도움이 될 수 있음을 시사한다고 하겠다. 한편 대다수의 원발 조직(16명)과 재발된 림프절 전이 조직(17명)에서 핵 내 RAR β 염색이 양성이었기 때문에 방사성요오드 섭취에 대한 핵 내 RAR β 단백질 발현의 예측성을 임상적으로 적용하기 위해서는 향후 관련 연구들이 좀 더 이루어져야 할 것으로 생각된다.

본 연구에서 원발 조직과 림프절 전이 조직 암세포의 조직형, RAR β 염색 양성도, 강도, 핵 내 강도는 환자의 나이, 종양 크기, TNM 병기, MACIS 점수, 전신 방사성요오드 스캔 전 갑상선글로불린 수치와 상관관계가 없었는데 RA를 투여하지 않은 상태에서 RAR β 단백질 발현과 변수들을 분석

하였기 때문에 갑상선 유두암에서 임상적 변수들 및 예후 인자들과 RAR β 단백질 발현 사이의 연관성에 대한 연구들이 필요할 것으로 생각된다.

결론적으로 갑상선 유두암에서 원발 조직의 RAR β 단백질 발현이 재발된 림프절 전이 조직의 RAR β 단백질 발현을 부분적으로 예측할 수 있으며 재발된 림프절 전이 조직뿐 아니라 원발 조직의 핵 내 RAR β 염색 여부가 전신 방사성요오드 스캔 섭취 여부를 예측하는데 도움이 될 것으로 생각된다. 이와 함께 향후 갑상선 유두암에서 RAR β 단백질의 핵 내 이동을 증가시킴으로써 RA를 이용한 치료 효과를 높일 수 있는지 검토되어야 할 것이다.

요 약

연구배경: 갑상선 유두암의 원발 조직과 재발된 림프절 전이 조직을 대상으로 각 조직의 RAR β 단백질 발현 정도 및 관련성을 분석하는 한편 RAR β 단백질 발현과 방사성요오드 섭취 여부와의 관련성을 분석하고자 본 연구를 시행하였다.

방법: 갑상선 유두암 원발 조직과 림프절 전이 조직에서 RAR β 단백질에 대한 면역조직화학염색을 시행하였다. RAR β 단백질의 염색 양성도를 각각 계산하였으며 염색 강도를 음성(0), 약한 양성(1+), 중등도 양성(2+), 강한 양성(3+)으로 나누었고 핵 내 RAR β 염색을 확인하였다.

결과: 17명의 갑상선 유두암 환자가 포함되었으며 국소 경부 림프절 전이 이외의 원격 전이는 없었다. 전신 방사성요오드 스캔을 시행하였을 때 13명에서 경부 내 비정상적인 섭취가 관찰되었다. 원발 조직에서 정상 세포와 암세포의 RAR β 염색 양성도는 각각 $11.5 \pm 6.7\%$ 와 $66.8 \pm 14.6\%$, RAR β 염색 강도는 각각 1.53 ± 0.62 와 2.35 ± 0.70 이었으며 유의한 차이가 있었다. 림프절 전이 조직에서 암세포의 RAR β 염색 양성도 및 강도는 각각 $73.1 \pm 15.3\%$, 2.53 ± 0.51 이었으며 원발 조직 암세포의 RAR β 염색 양성도 및 강도와 차이가 없었다. 원발 조직에서 정상 세포와 암세포의 핵 내 RAR β 염색 강도는 1.53 ± 0.62 와 0.94 ± 0.50 으로 유의한 차이가 있었으나 원발 조직과 림프절 전이 조직 암세포 사이의 핵 내 RAR β 염색 강도는 차이가 없었다. 모든 환자에서 원발 조직과 림프절 전이 조직 암세포 사이의 RAR β 염색 강도는 나이 제한 후 유의한 상관관계가 있었으나 RAR β 염색 양성도와 핵 내 RAR β 염색 강도는 상관관계가 없었다. 17명 중 14명(82.4%)이 원발 조직 암세포의 핵 내 RAR β 염색 여부와 전신 방사성요오드 스캔 섭취 여부가 일치하였으며 전신 방사성요오드 스캔에 대한 원발 조직 암세포의 핵 내 RAR β 염색의 양성예측도는 81.3%, 음성예측도는 100%이었다. 17명 중 13명(76.5%)에서 림프절 전이 조직 암세포의 핵 내 RAR β 염색 여부와 전신 방사성요오드 스캔 섭취 여부가 일치하였으며 전신 방사성요오드

스캔에 대한 림프절 전이 조직 암세포의 핵 내 RAR β 염색의 양성예측도는 76.5%이었다.

결론: 갑상선 유두암에서 정상 갑상선 조직보다 핵 내 RAR β 단백질 발현이 감소되어 있으며 원발 조직의 RAR β 단백질 발현이 재발된 림프절 전이 조직의 RAR β 단백질 발현을 부분적으로 예측할 수 있고 재발된 림프절 전이 조직뿐 아니라 원발 조직의 핵 내 RAR β 염색 여부가 전신 방사성요오드 스캔 섭취 여부를 예측하는데 도움이 될 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Petkovich M, Brand NJ, Krust A, Chambon P: A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature* 330:444-450, 1987
2. Mangelsdorf DJ, Ong ES, Dyck JA, Evans RM: Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature* 345:224-229, 1990
3. Chambon P: A decade of molecular biology of retinoic acid. *FASEB J* 10:940-954, 1996
4. Roberts AB, Sporn MB: Cellular biology and biochemistry of retinoids. In: *The Retinoids*. pp209, Orlando, Academic Press, 1984
5. Darwiche N, Scita G, Jones C, Rutberg S, Greenwald E, Tennenbaum T, Collins SJ, De Luca LM, Yuspa SH: Loss of retinoic acid receptors in mouse skin and skin tumors is associated with activation of the rasHa oncogene and high risk for premalignant progression. *Cancer Res* 56:4942-4949, 1996
6. Dejean A, Bougeleret L, Grzeschik KH, Tiollais P: Hepatitis B virus DNA integration in a sequence homologous to v-erb-A and steroid receptor genes in a hepatocarcinoma. *Nature* 332:70-72, 1986
7. Gebert JF, Moghal N, Frangioni JV, Sugarbaker DJ, Neel BG: High frequency of retinoic acid receptor abnormalities in human lung cancer. *Oncogene* 6:1859-1868, 1991
8. Hu L, Crowe DL, Rheinwald JG, Chambon P, Gudas U: Abnormal expression of retinoic acid receptors and keratin 19 by human oral and epidermal squamous cell carcinoma cell lines. *Cancer Res* 51:3972-3981, 1991
9. Swisshelm K, Ryan K, Lee X, Tsou HC, Peacocke M, Sager R: Down-regulation of retinoic acid receptor β in mammary carcinoma cell lines and its up-regulation in senescing normal mammary epithelial cells. *Cell*

- Growth Differ 5:133-141, 1994
10. Geisen C, Denk C, Gremm B, Baust C, Karger A, Bollag W, Schwarz E: High-level of the retinoic acid receptor β gene in normal cells of the uterine cervix is regulated by the retinoic acid receptor α and is abnormally down-regulated in cervical carcinoma cells. *Cancer Res* 57:1460-1467, 1997
11. Caliaro MJ, Marmouget C, Guichard S, Mazars P, Valette A, Moisand A, Bugat R, Jozan S: Response of four human ovarian carcinoma cell lines to all-trans-retinoic acid: relationship with induction of differentiation and retinoic acid receptor expression. *Int J Cancer* 56:743-748, 1994
12. Schreck R, Schnieders F, Schmutzler C, Köhrle J: Retinoids stimulate type 1 iodothyronine 5'-deiodinase activity in human follicular thyroid carcinoma cell lines. *J Clin Endocrinol Metab* 79:791-798, 1994
13. Rochaix P, Monteil-Onteniente S, Rochette-Egly C, Caratero C, Voigt JJ, Jozan S: Reduced expression of retinoic acid receptor beta protein (RAR β) in human papillary thyroid carcinoma: immunohistochemical and Western blot study. *Histopathology* 33:337-343, 1998
14. Widschwendter M, Berger J, Daxenbichler G, Muller-Holzner E, Widschwendter A, Mayr A, Marth C, Zeimet AG: Loss of retinoic acid receptor β expression in breast cancer and morphologically normal adjacent tissue but not in the normal breast tissue distant from the cancer. *Cancer Res* 57:4158-4161, 1997
15. Houlé B, Rochette-Egly C, Bradley WEC: Tumor-suppressive effect of the retinoic acid receptor β in human epidermoid lung cancer cells. *Proc Nat Acad Sci* 90:985-989, 1993
16. Schmutzler C: Regulation of the sodium/iodide symporter by retinoids-a review. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 109:41-44, 2001
17. Dohan O, Baloch Z, Banrevi Z, Livolsi V, Carrasco N: Predominant intracellular overexpression of the Na⁺/I⁻ symporter (NIS) in a large sampling of thyroid cancer cases. *J Clin Endocrinol Metab* 86:2697-2700, 2001
18. Hedinger C, Williams ED, Sobin LH: The WHO histological classification of thyroid tumors: a commentary on the second edition. *Cancer* 63:908-911, 1989
19. American Joint Committee on Cancer: Cancer staging manual. pp77-87, New York, Springer-Verlag, 2002
20. Hay ID, Bergstralh EJ, Goellner JR, Ebersold JR, Grant CS: Predicting outcome in papillary thyroid carcinoma: development of a reliable prognostic scoring system in a cohort of 1779 patients surgically treated at one institution during 1940 through 1989. *Surgery* 114:1050-1058, 1993
21. Del Senno L, Rossi R, Gandini D, Piva R, Franceschetti P, degli Uberti EC: Retinoic acid-induced decrease of DNA synthesis and peroxidase mRNA levels in human thyroid cells expressing retinoic acid receptor α mRNA. *Life Sci* 53:1039-1048, 1993
22. Bassi V, Vitale M, Feliciello A, De Riu S, Rossi G, Fenzi G: Retinoic acid induces intercellular adhesion molecule-1 hyperexpression in human thyroid carcinoma cell lines. *J Clin Endocrinol Metab* 80:1129-1135, 1995
23. Kurebayashi J, Tanaka K, Otsuki T, Moriya T, Kunisue H, Uno M, Sonoo H: All-trans-retinoic acid modulates expression levels of thyroglobulin and cytokines in a new human poorly differentiated papillary thyroid carcinoma cell line, KTC-1. *J Clin Endocrinol Metab* 85:2889-2896, 2000
24. Schmutzler C, Brtko J, Winzer R, Jakobs TC, Meissner-Weigl J, Simon D, Goretzki PE, Köhrle J: Functional retinoid and thyroid hormone receptors in human thyroid-carcinoma cell lines and tissues. *Int J Cancer* 76:368-376, 1998
25. Schmutzler C, Brtko J, Bienert K, Köhrle J: Effects of retinoids and role of retinoic acid receptors in human thyroid carcinomas and cell lines derived therefrom. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 104(Suppl 4):16-19, 1996
26. Haugen BR, Larson LL, Pugazhenth U, Hays WR, Kloppel JP, Kramer CA, Sharma V: Retinoic acid and retinoid X receptors are differentially expressed in thyroid cancer and thyroid carcinoma cell lines and predict response to treatment with retinoids. *J Clin Endocrinol Metab* 89:272-280, 2004
27. Hoque MO, Rosenbaum E, Westra WH, Xing M, Ladenson P, Zeiger MA, Sidransky D, Umbricht CB: Quantitative assessment of promoter methylation profiles in thyroid neoplasms. *J Clin Endocrinol Metab* 90:4011-4018, 2005
28. Carrasco N: Iodide transport in the thyroid gland. *Biochem Biophys Acta* 1154:65-82, 1993

29. Dai G, Levy O, Carrasco N: Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature* 379:458-460, 1996
30. Smanik PA, Liu Q, Furminger TL, Ryu K, Xing S, Mazzaferri EL, Jhiang SM: Cloning of the human sodium symporter. *Biochem Biophys Res Commun* 226:339-345, 1996
31. Eskandari S, Loo DDF, Dai G, Levy O, Wright EM, Carrasco N: Thyroid Na⁺/I⁻ mechanism, stoichiometry, and specificity. *J Biol Chem* 272:27230-27238, 1997
32. Schmutzler C, Kohrle J: Implication of the molecular characterization of the sodium-iodide symporter (NIS). *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 106:S1-S10, 1998
33. Filetti S, Bidart JM, Arturi F, Caillou B, Russo D, Schlumberger M: Sodium/iodide symporter: a key transport system in thyroid cancer cell metabolism. *Eur J Endocrinol* 141:443-457, 1999
34. Arturi F, Russo D, Giuffrida D, Schlumberger M, Filetti S: Sodium-iodide symporter (NIS) gene expression in lymph-node metastases of papillary thyroid carcinomas. *Eur J Endocrinol* 143:623-627, 2000
35. Schmutzler C, Winzer R, Meissner-Weigl J, Köhrle J: Retinoic acid increases sodium/iodide symporter mRNA levels in human thyroid cancer cell lines and suppresses expression of functional symporter in nontransformed FRTL-5 rat thyroid cells. *Biochem Biophys Res Commun* 240:832-838, 1997