

## 갑상선 미세유두암에서 MMP-2, MMP-9과 HIF-1 $\alpha$ 발현의 임상적 의의

가톨릭대학교 의과대학 의정부성모병원 외과학교실, <sup>1</sup>임상의학연구소, <sup>2</sup>병리학교실

최재영 · 배자성 · 김영애<sup>1</sup> · 장은덕<sup>2</sup> · 조항주 · 김기환 · 안창혁 · 박우찬 · 김정수

### Clinical Significance of MMP-2, MMP-9 and HIF-1 $\alpha$ Expression in Thyroid Micropapillary Cancer

Jae Young Choi, M.D., Ja Seong Bae, M.D., Young Ae Kim, M.S.<sup>1</sup>,  
Eun Deok Chang, M.D.<sup>2</sup>, Hang Joo Cho, M.D., Ki Hwan Kim, M.D.,  
Chang Hyeok Ahn, M.D., Woo Chan Park, M.D., Jeong Soo Kim, M.D.

Department of Surgery, <sup>1</sup>Clinical Research Laboratory, <sup>2</sup>Department of Pathology,  
Uijeongbu St. Mary's Hospital, The Catholic University of Korea College of Medicine, Uijeongbu, Korea

**Purpose:** Papillary Thyroid Microcarcinoma (PTMC) is rapidly increasing due to increased interests in the public health care system and improvements in ultrasonographic instruments and fine-needle-aspiration technique. The aim of this study is to investigate relationships between clinicopathologic features and molecular markers of PTMC and to help in developing therapeutic strategies in PTMC.

**Methods:** Tissue samples from patients with 38 PTMC and 21 benign thyroid tumors that were operated on from Jan. 2006 to Nov. 2008 were used to make microarrays and immunohistochemical staining for ER- $\alpha$ , E-CD, VEGF, MMP-2, MMP-9, and HIF-1  $\alpha$  were performed. Clinicopathologic features of each immunohistochemical staining group were analyzed retrospectively.

**Results:** There is no immunohistochemistry staining in cases with benign thyroid lesions. The expression rate of ER- $\alpha$ , E-CD, VEGF, MMP-2, MMP-9, and HIF-1  $\alpha$  in PTMC group was 66%, 58%, 82%, 66%, 71% and 63%, respectively. Bilateral tumor was statistically significant (48.0% vs 7.7%, P=0.015) related to MMP-2(+) PTMC group than in MMP-2(-) group. Bilateral tumor (44.4% vs 9.1%, P=0.060) and lymphovascular invasion (25.9% vs 0%, P=0.084) seemed to have greater relation to MMP-9(+) PTMC group than to MMP-9(-) group, but there is no statistically significant difference. Bilateral tumor (50.0% vs 7.1%, P=0.012), lymph node metastasis (45.8% vs 0%, P=0.003) and lymphovascular invasion (29.2% vs 0%, P=0.033) were significantly related to HIF-1  $\alpha$  (+) PTMC group compared to HIF-1  $\alpha$  (-) group.

**Conclusion:** Our findings suggest that MMP-2, MMP-9 and HIF-1  $\alpha$  expression could be used as a prognostic marker in PTMC. Larger studies are needed to assess its prognostic value in PTMC. (J Korean Surg Soc 2010;78:157-164)

**Key Words:** Thyroid carcinoma, Papillary microcarcinoma, MMP-2, MMP-9, HIF-1  $\alpha$   
중심 단어: 갑상선암, 미세유두암, MMP-2, MMP-9, HIF-1  $\alpha$

책임저자: 김정수, 경기도 의정부시 금오동 65-1  
☎ 480-717, 가톨릭대학교 의정부성모병원 외과  
Tel: 031-820-3048, Fax: 031-847-2717  
E-mail: drbreast@catholic.ac.kr

접수일 : 2009년 11월 9일, 게재승인일 : 2009년 12월 1일

### 서 론

갑상선암은 내분비선에서 발생하는 암종 중 가장 흔한

암으로 미국에서 현재 연간 백만 명당 87명이 발생하며, 전체 암 환자의 1~2% 정도를 차지한다.(1) 한국에서는 연간 만 명 정도의 새로운 환자가 발생하고, 전체 암 환자의 5% 정도를 차지하며, 남성보다 여성에서 3~5배 정도 많이 발생한다.(2) 갑상선암의 95%는 유두암, 여포암, 수질암 등의 분화암이고, 이 중에서도 유두암이 70~80%로 가장 흔하다.(3) 최근 건강검진에 대한 관심의 증가와 갑상선 초음파 검사장비 및 초음파 유도 하 세침흡인검사 기술의 발달로 그 발생률이 해마다 증가하고 있으며, 한국 뿐 아니라 미국에서도 갑상선암은 빠르게 증가하고 있다.(1,2,4) 특히 초음파 검사장비의 발달로 직경 1 cm 이하의 미세유두암의 진단 건수는 빠르게 증가하고 있는데,(5) 미세유두암은 1 cm 이상의 유두암에 비해 침습성이 적고, 원격전이가 드물어 그 치료방침, 즉 수술적 절제범위, 림프절 절제범위 등에 대해 이견이 있다. 유두암의 2가지 특징은 다른 갑상선암에 비해 좋은 예후를 보이는 것과, 림프절 전이를 잘 하지만 림프절 전이가 예후와는 관계가 없다는 것이다.(6) 이로 인해 유두암의 예후인자 또는 재발 인자로서 분자생화학적인 표지자들을 찾기 위한 노력이 이루어져 왔다. 최근 Estrogen Receptor- $\alpha$  (ER- $\alpha$ ), E-cadherin (E-CD), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), 그리고 Hypoxia Inducible Factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) 등 다른 암에서 연구가 많이 진행된 표지자들에 대한 연구가 갑상선 암에서도 행해지고 있지만 아직 임상적으로 적용하기에는 연구 결과가 뚜렷하지 않다.(7-9) 이에 저자들은 갑상선 미세유두암의 임상병리학적 특성과 분자생화학적 표지자들과의 연관성을 밝혀 그 치료계획을 수립하는데 도움을 주고자 이 연구를 시행하였다.

## 방 법

2006년 1월부터 2008년 11월까지 외과학교실에서 미세갑상선 유두암으로 진단받고 수술을 시행받은 38명과 같은 기간 갑상선의 양성질환으로 수술을 시행 받은 21명의 조직을 무작위 선정하여 ER- $\alpha$ , E-CD, VEGF, MMP-2, MMP-9, 그리고 HIF-1 $\alpha$ 에 대한 면역조직화학염색을 실시하고, 각 군의 임상병리학적 특성을 후향적으로 비교 분석하였다. 미세갑상선유두암 수술은 갑상선전절제 및 근전절제술과 중앙림프절확청술을 시행을 원칙으로 하였으며, 측경부림프절전이가 의심이 될 경우에는 변형경부림프절확청술을

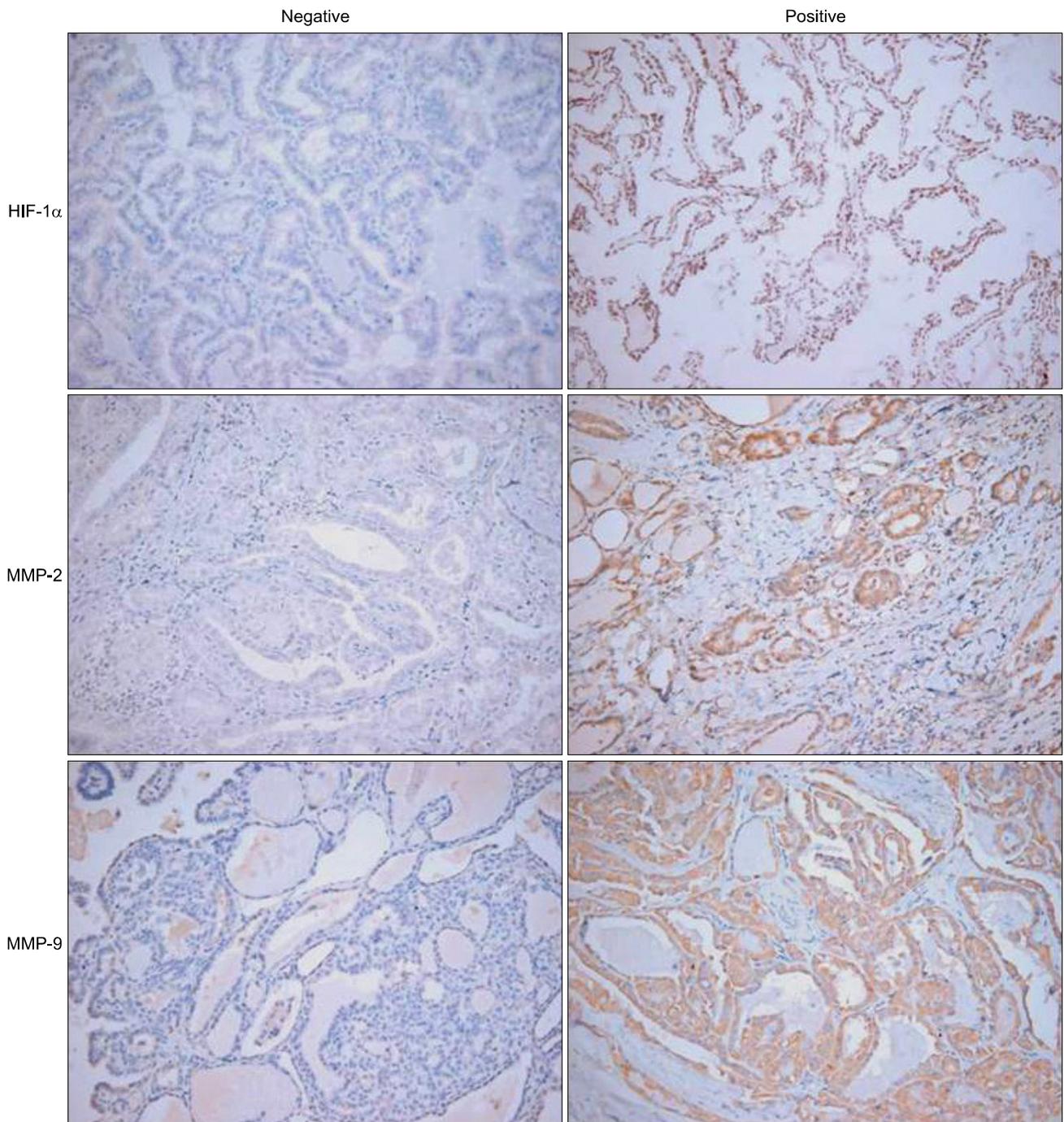
시행하였다. 갑상선양성질환의 수술은 세침흡인검사상 여포성 병변으로 판명된 경우, 크기가 큰 갑상선 결절인 경우, 그리고 미용상으로 문제가 있는 갑상선결절인 경우 수술을 시행하였다. 통계검정 프로그램 SPSS (version 13.0, Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 Chi-square test와 Fisher's exact test상 P-value가 0.05 미만인 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

### 1) 면역조직화학염색법(Immunohistochemistry)

파라핀 포매된 종양조직을 가지고 직경 3.5 um의 oligo chip을 만든 후 4 $\mu$ m 두께로 박절하여 xylene에 3분씩 3번 반복하여 파라핀을 제거한 후 100%, 90%, 70%, 50% ethanol로 함수과정을 거친 다음 10 mM citrate buffer (pH 6.0)에 15분간 끓인 후에 3% 과산화수소수를 처리하여 내인성 peroxidase 활성을 저지시킨 후 TBST buffer로 씻어냈다. 비특이 단백질의 결합을 제거하기 위하여 blocking solution (Histo-Plus kit, Zymed, San Francisco, CA, USA)을 사용하여 실온에서 10분간 반응시키고 primary antibody는 VEGF (Zymed, San Francisco, CA, USA) 1 : 100으로 희석하여 4°C에서 overnight으로 반응시키고 HIF-1 $\alpha$  (Novus biologicals, Inc., Littleton, USA) 1 : 25, MMP-2 (Chemicon International, Inc., Temecula, CA, USA) 1 : 100, MMP-9 (Chemicon International, Inc., Temecula, CA, USA) 1 : 1,000, E-CD (Zymed, San Francisco, CA, USA) 1 : 50으로 희석하여 실온에서 1시간 30분간 반응시켰다. 각 조건 별로 반응시킨 후 TBST buffer로 씻어내고 biotin이 부착된 2차 항체(secondary antibody, Histo-Plus kit, Zymed, San Francisco, CA, USA)를 10분간 반응시킨 후 세척 완충액으로 3분씩 3회 수세하고 HRP-streptavidin (Histo-Plus kit, Zymed, San Francisco, CA, USA)으로 실온에서 10분간 방치하여 biotin-avidin 특이 결합을 유도하고 다시 수세 후 DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride solution, Histo-Plus kit, Zymed, San Francisco, CA, USA)로 10분간 발색한 후 증류수로 세척한 다음 Mayer's hematoxylin (Zymed, San Francisco, CA, USA)으로 15초간 대조염색하고 알코올과 Xylene으로 탈수시켜 canada balsam으로 봉입하였다.

### 2) 면역조직화학염색법(Immunohistochemistry)의 판정

각각의 분자생물학적 표지자에 대한 면역조직화학염색의 판독은 저자들 중 2명이 각각 반정량적으로 판독하여 그 결과가 일치하는 경우는 그대로 판정하였고, 일치하는



**Fig. 1.** Results of immunohistochemical staining of MMP-2, MMP-9 and HIF-1  $\alpha$  ( $\times 200$ ).

않는 경우에는 재검을 하여 판정하였으며, 2차 검사에도 결과가 일치하는 않는 경우에는 실험결과에서 배제하였다. 염색의 정도는 0, 염색되지 않음; 1, 연노랑 정도의 염색; 2, 연갈색 정도의 염색; 3, 진갈색 정도의 염색으로 판독하였고, 염색된 세포의 개수는 0, 염색된 갑상선세포가 없음; 1, 염색된 갑상선세포의 개수가 30%보다 적음; 2, 염색된 갑상

선세포의 개수가 30%보다 많고 60%보다 적음; 3, 염색된 갑상선세포의 개수가 60%보다 많음으로 판독하여 두 숫자를 곱해 0, 음성; 1~2, 약양성; 3~4, 중등도 양성; 6~9, 강양성으로 판독하여 이 중 음성과 약양성은 다시 면역조직화학염색 음성군, 중등도 양성군과 강양성은 면역조직화학염색 양성군으로 판정하였다(Fig. 1).(10)

**결 과**

1) 연령 및 성별분포

미세유두암군(PTMC군)은 38명이며, 평균연령은 51세였고, 종양의 평균 크기는 0.75 cm (0.1~1)였다. 양성 질환군은 21명이며 평균연령은 41세였고, 종양의 평균 크기는 3.1 cm였다. 림프절 전이는 11명(30.6%)에서 있었으며 평균 제거된 림프절 개수는 7.1개이고 전이된 림프절 개수는 2.5개였다. 수술은 PTMC 환자의 경우 갑상선전절제 및 근전절제술과 중앙림프절삭출술을 시행하였고 양성질환의 경우에는 대부분 갑상선 엽절제술을 시행하였다. 양성질환의 경우 20명에서 갑상선결절이었으며 1명에서 여포성 선종이었다(Table 1).

2) 양성 질환군과 PTMC군의 IHC 결과

양성 질환군에서는 각각의 IHC에 대해 양성인 예가 없었고, PTMC군에서는 ER- $\alpha$ , E-CD, VEGF, MMP-2, MMP-9, 그리고 HIF-1  $\alpha$  에서 각각 66%, 58%, 82%, 66%, 71% 그리고

**Table 1.** Clinicopathological characteristics of patients with PTMC or benign thyroid disease

	PTMC* (n=38)	Benign thyroid disease (n=21)	P-value
Age	51.13±10.81	40.76±12.25	0.001
Gender			
Male	4 (10.5%)	2 (9.5%)	1.000
Female	34 (89.5%)	19 (90.5%)	
Size of mass (cm)	0.75±0.22	3.10±1.13	<0.001
Histologic type			
Papillary carcinoma	38	1	
Nodular hyperplasia	—	20	
Follicular adenoma			
Multiplicity			
No	25 (65.8%)	—	
Yes	13 (34.2%)	—	
Operative method			
Total thyroidectomy	34	1	
Near total thyroidectomy	3	20	
Lobectomy	1	—	
Lymph node metastasis			
No	25 (69.4%)	—	
Yes	11 (30.6%)	—	
Number of retrieved LN <sup>†</sup>	7.1±6.2	—	
Number of metastatic LN	2.5±2.1	—	

\*PTMC = papillary thyroid microcarcinoma; <sup>†</sup>LN = lymph node.

63%에서 양성을 보여 두 군 간에 모두 유의한 차이를 보였다(Table 2, 3).

3) PTMC 군에서의 ER- $\alpha$ , E-CD, VEGF, MMP-2, MMP-9, 그리고 HIF-1  $\alpha$  염색 결과에 따른 임상적 특성의 차이

(1) ER- $\alpha$ : ER- $\alpha$  양성인 군은 음성인 군보다 양측성 (P=0.73), 림프절 전이(P=0.44), 피막침윤(P=0.45)은 차이가 없었으며 림프관 침윤은 양성인 군에서 확률적으로 많았으나 통계적 유의성은 없었다(P=0.07)(Table 4).

(2) E-CD: E-CD 양성인 군은 음성인 군에 비해 양측성 (P=0.74), 림프절 전이(P=1.00), 피막침윤(P=1.00), 림프관침윤(P=0.68) 모두 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다 (Table 4).

(3) VEGF: VEGF 양성인 군은 음성인 군에 비해 양측성

**Table 2.** Results of Immunohistochemical scores for benign tumors and PTMC\*

	Benign (n=21)	PTMC (n=38)	P-value
ER- $\alpha$ <sup>†</sup>	0.33±0.48	1.84±0.86	<0.001
E-CD <sup>‡</sup>	0.58±0.50	1.63±0.81	<0.001
VEGF <sup>§</sup>	0.6±0.50	2.02±0.63	<0.001
MMP-2 <sup>  </sup>	0.60±0.50	1.81±0.76	<0.001
MMP-9 <sup>¶</sup>	0.26±0.45	1.89±0.95	<0.001
HIF-1 $\alpha$ <sup>**</sup>	0.26±0.45	1.76±1.05	<0.001

\*PTMC = papillary thyroid microcarcinoma; <sup>†</sup>ER- $\alpha$  = estrogen receptor- $\alpha$ ; <sup>‡</sup>E-CD = E-cadherin; <sup>§</sup>VEGF = vascular endothelial growth factor; <sup>||</sup>MMP-2 = matrix metalloproteinase-2; <sup>¶</sup>MMP-9 = matrix metalloproteinase-9; <sup>\*\*</sup>HIF-1  $\alpha$  = hypoxia inducible factor-1  $\alpha$ .

**Table 3.** Summary of immunohistochemical staining results in PTMC\* patients

	Positive (%)	Negative (%)
ER- $\alpha$ <sup>†</sup> (+)	25 (66)	13 (34)
E-CD <sup>‡</sup> (+)	22 (58)	16 (42)
VEGF <sup>§</sup> (+)	31 (82)	7 (18)
MMP-2 <sup>  </sup> (+)	25 (66)	13 (34)
MMP-9 <sup>¶</sup> (+)	27 (71)	11 (29)
HIF-1 $\alpha$ <sup>**</sup> (+)	24 (63)	14 (37)

\*PTMC = papillary thyroid microcarcinoma; <sup>†</sup>ER- $\alpha$  = estrogen receptor- $\alpha$ ; <sup>‡</sup>E-CD = E-cadherin; <sup>§</sup>VEGF = vascular endothelial growth factor; <sup>||</sup>MMP-2 = matrix metalloproteinase-2; <sup>¶</sup>MMP-9 = matrix metalloproteinase-9; <sup>\*\*</sup>HIF-1  $\alpha$  = hypoxia inducible factor-1  $\alpha$ .

**Table 4.** Comparison of clinicopathologic characteristics according to results of immunohistochemical staining

		Bilaterality			Lymph node metastasis			Capsular invasion			Lymphatic invasion		
		No	Yes	P-value	No	Yes	P-value	No	Yes	P-value	No	Yes	P-value
ER- $\alpha$ *	-	8	17	0.73	9	16	0.44	11	18	0.45	13	18	0.07
	+	5	8		2	9		2	7		0	7	
E-CD <sup>†</sup>	-	10	15	0.74	10	15	1.00	12	17	1.00	14	17	0.68
	+	6	7		4	7		4	5		2	5	
VEGF <sup>‡</sup>	-	6	19	0.39	4	21	1.00	6	23	1.00	7	24	0.31
	+	1	12		1	10		1	8		0	7	
MMP-2 <sup>§</sup>	-	12	13	0.01	9	16	0.44	12	17	0.13	13	18	0.07
	+	1	12		2	9		1	8		0	7	
MMP-9 <sup>  </sup>	-	10	15	0.06	8	17	0.22	10	19	0.23	11	20	0.08
	+	1	12		1	10		1	8		0	7	
HIF-1 $\alpha$ <sup>¶</sup>	-	13	12	0.01	12	13	0.006	11	18	1.00	14	17	0.03
	+	1	12		0	11		3	6		0	7	

\*ER- $\alpha$  = estrogen receptor- $\alpha$ ; <sup>†</sup>E-CD = E-cadherin; <sup>‡</sup>VEGF = vascular endothelial growth factor; <sup>§</sup>MMP-2 = matrix metalloproteinase-2; <sup>||</sup>MMP-9 = matrix metalloproteinase-9; <sup>¶</sup>HIF-1  $\alpha$  = hypoxia inducible factor-1  $\alpha$ .

(P=0.39), 림프절 전이(P=1.00), 피막침윤(P=1.00), 림프관침윤(P=0.31) 모두 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다 (Table 4).

(4) MMP-2: MMP-2 양성인 군은 음성인 군보다 양측성(P=0.01)이 많았으며, 림프절 전이(P=0.44)는 차이가 없었고, 피막 침윤(P=0.13)도 차이가 없었으며, 림프관 침윤(P=0.07)은 양성인 군에서 확률적으로 많았으나 통계적 유의성은 없었다(Table 4).

(5) MMP-9: 양측성 분류에서 MMP-9 양성인 군이 음성인 군보다 확률적으로 높았으나 통계적 유의성은 없었으며(P=0.06), 림프절 전이(P=0.22), 피막 침윤(P=0.23)은 차이가 없었으며, 림프관 침윤은 MMP-9 양성인 군에서 확률적으로 높았으나 통계적 유의성은 없었다(P=0.08)(Table 4).

(6) HIF-1  $\alpha$ : HIF-1  $\alpha$  양성인 군은 음성인 군보다 피막 침윤(P=1.00)만 차이가 없었고, 양측성(P=0.01), 림프절 전이(P=0.006), 림프관 침윤(P=0.03)은 통계적으로 유의하게 많았다(Table 4).

## 고 찰

최근 미국 뿐 아니라 한국에서도 건강검진에 대한 사회적 관심의 증가와 함께 갑상선 초음파검사장비의 발달 및 초음파 유도 하 세침흡인검사 기술의 발달로 갑상선암의 발생건수는 빠르게 증가하고 있으며, 특히 갑상선암의 대부분을 차지하는 유두암, 그 중에서도 직경 1 cm 이하의 미

세유두암의 발생은 두드러지게 증가하고 있다.(5) 현재 미세유두암은 전체 유두암의 30% 정도로 보고되고 있으며, 진단장비의 발달과 함께 이 비율은 점차 증가할 것으로 보인다. 미세유두암의 특징은 덜 침습적이며 원격전이가 적다는 것이지만, 15% 정도에서 국소적 재발이 나타나고, 드물긴 하지만 원격전이도 나타나며, 이와 관련하여 사망률이 보고되고 있기도 하다.(11,12) Hay 등(11)은 50년 동안 535명의 미세유두암 환자를 분석한 결과 2가지 독립된 예후인자로 첫째 진단 당시 림프절 전이와 둘째로 초기수술범위를 의미 있는 인자로 보고했으며, Baudin 등(12)은 189명의 미세유두암에 대한 7.3년의 추적결과, 3.9%의 재발을 관찰하였고, 2가지 독립된 예후인자로서 종양의 다발성과 초기수술범위를 중요한 인자로 보고하여 미세유두암에서의 초기 수술범위가 환자의 예후를 결정지을 수 있음을 알 수 있다. 경부림프절에 대해서는 미세유두암이라 할지라도 경부 림프절로의 전이 가능성이 있고, 특히 다발성 병변의 경우와 술 전 경부초음파 검사상 전이로 의심되는 림프절이 있을 경우, 림프절 전이 및 국소재발, 원격전이 등의 가능성이 높아 다른 유두암과 같이 갑상선 전절제술과 림프절 수술을 해야 한다는 주장이 많다. 하지만, 합병증이 동반되는 이런 광범위한 수술의 필요성을 줄이기 위해 미세유두암에 있어서 다발성과 림프절 전이 예측인자를 찾아 저위험군에 대해서는 내시경적 갑상선 절제술이나 감시림프절 생검 등의 제한된 수술을 시행하고, 고위험군 환자의 경우에는 전절제술 뿐 아니라, 추적기간의 단축이나 방사성

요드 동위원소 치료 등의 적극적 치료방법이 시행되어져야 이상적인 치료전략이라 할 것이다. 따라서 미세유두암에 있어서 이러한 다발성과 림프절 전이 등을 예측할 수 있는 분자생물학적 표지자에 대한 연구가 활발히 시행되어지고 있다.

전세계적으로 남성에 비해 여성에서 갑상선암이 많은 것은 갑상선암의 발생과 진행이 여성호르몬의 영향을 받는다는 것을 의미한다.(13) Lee 등(14)과 Zeng 등(15)의 연구에 따르면 갑상선암 세포에는 ER- $\alpha$ 와 ER- $\beta$ 가 존재하고 에스트로겐이 갑상선 세포의 증식을 유도하며, 둘 사이의 불균형이 ERK pathway를 통해 갑상선암의 발생과 증식을 유도한다고 보고하였다. 갑상선 수질암에서도 ER- $\alpha$ 와 ER- $\beta$ 가 암세포의 증식과 사멸에 역할을 한다는 보고가 있다.(16) 그러나 갑상선 유두암에서 ER- $\alpha$ 의 발현이 증가된다는 보고도 있으나,(17) 아직은 mRNA 발현 정도에서 보면 정상 갑상선조직과 비교해서 볼 때 차이가 없다는 연구결과를 보여 갑상선 유두암에서 ER- $\alpha$ 의 역할은 아직 불확실하다.(18) 본 연구에서는 미세유두암의 면역조직염색상 ER- $\alpha$ 가 66% 발현되었으며, 증례 수가 적어 통계적 유의성은 없지만, 림프관침윤(28.0% vs 0%, P=0.072)이나 림프절 전이(36.0% vs 15.4%, P=0.268)가 음성인 군보다 많은 것으로 보이고 있다.

세포와 세포 사이의 유착에 관여하는 cadherin system (cadherin,  $\alpha$ -,  $\beta$ -catenin) 중 대부분의 상피세포에 존재하는 E-cadherin은 대표적인 종양 억제 단백질이며, 유전적 또는 후천적 원인에 의한 불활성화는 암발생, 진행, 전이 등 여러 단계에서 중요한 역할을 한다.(19) Kapran 등(20)에 의하면 갑상선 유두암에 있어 E-cadherin의 expression은 예후인자로서의 가치는 없는 것으로 보고하였다. 본 연구에서도 E-cadherin 양성인 군과 음성인 군과의 양측성 림프절 전이 등의 임상적 특성은 유의한 차이를 보이지 않았다.

세포의 구조를 이루는 세포외 기질(extracellular matrix)을 분해하는 matrix metalloproteinases (MMPs)에는 구조와 기질의 특성에 따라 여러 종류가 있으며, 암세포의 성장, 신생혈관생성, 혈관으로의 암세포의 진입(intravasation)과 조직으로의 진출(extravasation) 등의 전이에 관여하는 것으로 알려져 있다.(21) MMPs 중에서도 MMP-2 (gelatinase A), MMP-9 (gelatinase B)은 유방암과 폐암을 비롯한 여러 암에서 연구가 많이 되었고,(22,23) 최근에는 갑상선암과의 관련성에 대한 연구결과도 보고되고 있다.(24) Tian 등(25)은 림프절 전이가 있는 유두상암에서 VEGF-C와 MMP-2의 발현율이 높

다고 보고하였고, Yeh 등(24)은 MMP-2의 발현과 활성화 이전 가운데 하나가 epidermal growth factor receptor (EGFR)에 의한다고 보고하고, 갑상선암에서의 EGFR의 단일항체나 MMP-2의 길항제에 관한 임상연구가 갑상선암의 새로운 치료 영역을 여는데 전망을 제시했다. 본 연구 결과 미세유두상암에서 MMP-2, MMP-9의 발현율은 각각 66%와 71%로 나타났고, MMP-2 양성인 군은 종양의 양측성에 있어서 음성인 군보다 통계적으로 유의하게 높았으며(48.0% vs 7.7%, P=0.015), 림프절 전이와 피막 침범은 통계적으로 유의하게 차이는 없었지만 양성군에서 많았고, 통계적 유의성은 약하나 림프관 침윤 역시 양성인 군에서 많았다(P=0.072). MMP-9에 있어서도 통계적 유의성은 약하나 양측성(P=0.060)과 림프관 침윤(P=0.084)에서 역시 양성인 군이 음성인 군보다 많았으며, 림프절 전이(P=0.124)와 피막 침윤(P=0.237)에서는 통계적 유의성은 없었다. 비록 통계적 유의성이 부족하다 하더라도, 본 연구결과는 기존의 MMPs의 연구결과를 뒷받침하는 것으로 생각된다.

혈관 생성은 종양의 성장과 전이에 중요한 인자이며, 이 과정에서 VEGF는 가장 강력한 신생혈관 촉진인자로서 VEGF의 과발현은 유방암, 폐암, 결장암 등 여러 암에서 전이와 재발의 위험을 증가시켜 예후가 좋지 않음이 보고되었다.(26,27) 갑상선암에서도 마찬가지로 VEGF의 과발현이 나타나며,(10) 병기의 진행, 침습성, 무재발 생존기간의 감소 등과 관련이 있는 것으로 보고되고 있다.(7,28) 또한 VEGF 수용체 억제제인 Motesanib (AMG706) 등이 진행성, 방사성 요드 치료저항성, 전이된 갑상선암의 치료제로서 효과가 있을 것으로 기대가 되고 있다.(29) 본 연구에서는 미세유두암에서 VEGF의 발현율은 82%로 높게 나타났으나 양측성, 림프절 전이, 피막침윤, 림프관침윤 모두에서 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 이것은 유두암의 초기 단계에 신생혈관생성에 VEGF가 관계가 있으나 림프절 전이나 양측성 등의 진행은 유두암의 후기 단계의 과정임을 의미하는 것으로 생각된다. 실제로 현재 갑상선암과의 관련 연구는 대부분 진행된 갑상선암에서 이루어져 왔다.

VEGF와 함께 종양의 성장에 따른 저산소 환경에 대해 혈관생성을 촉진해 종양의 성장을 지속적으로 유도하는 중요 인자는 DNA 전사인자인 hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)이다. 정상 산소농도에서는 쉽게 분해되는 HIF-1 $\alpha$ 은 저산소 환경에서 활성화되어 종양의 신생혈관생성을 촉진하게 된다.(30) 여러 고형암에서 HIF-1 $\alpha$ 의 과발현이 나타나며, 이는 종양의 진행, 전이와 재발의 증가, 불량한 예

후와 관련 있는 것으로 보고되고 있으나 갑상선암에서의 연구는 미비한 상황이다. 최근 Scarpino 등(8)의 연구에 따르면 갑상선암에서 Met 단백질의 과발현과의 상관관계가 보고되었으며, Met 단백질과 HIF-1의 과발현시 증양은 영양과 산소가 풍부한 주위 혈관이나 주위 조직으로의 침투를 잘 하는 것으로 보고되었다. 본 연구에서는 미세유두암에서 HIF-1  $\alpha$ 의 발현율은 71%로 나타났으며, HIF-1  $\alpha$  양성인 군은 음성인 군보다 피막 침윤만 차이가 없었고, 양측성(50.0% vs 7.1%, P=0.012)과 림프절 전이(45.8% vs 0%, P=0.003), 림프관 침윤(29.2% vs 0%, P=0.033)은 모두 통계적으로 유의하게 많은 것으로 나타나 향후 미세갑상선유두암을 포함한 갑상선암에서의 예후인자로서 HIF-1  $\alpha$ 에 관한 전향적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

본 연구에서는 샘플의 수가 부족하여 통계학적 유의성을 나타내는 결과는 많지 않았지만 미세갑상선유두암에서 MMP-2, MMP-9, 그리고 HIF-1  $\alpha$  양측성, 림프관 침윤 그리고 림프절 전이와의 연관성을 확인하였다. 향후 이들 분자생물학적 지표의 전향적 연구를 통해 독립된 예후인자로서 어떠한 가치가 있는지 알아보는 것이 중요하다 하겠다.

## 결 론

미세갑상선유두암에서 ER- $\alpha$ , E-CD, VEGF, MMP-2, MMP-9, 그리고 HIF-1  $\alpha$  면역조직화학 검사를 통해 임상병리학적 지표와의 연관성을 살펴보았다. 이 중 MMP-2, MMP-9, HIF-1  $\alpha$ 의 과발현이 양측성, 림프관 침윤, 림프절 전이와의 연관성을 보여 향후 독립된 예후인자로서의 가치를 알기 위한 전향적 연구가 필요하다고 생각된다.

## REFERENCES

- 1) Davies L, Welch HG. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002. *JAMA* 2006;295:2164-7.
- 2) Ministry of Health and Welfare. Annual Report of the Korea Central Cancer Registry 2002. 2007.
- 3) Sherman SI. Thyroid carcinoma. *Lancet* 2003;361:501-11.
- 4) Hodgson NC, Button J, Solorzano CC. Thyroid cancer: is the incidence still increasing? *Ann Surg Oncol* 2004;11:1093-7.
- 5) Choi YJ, Park YL, Koh JH. Prevalence of thyroid cancer at a medical screening center: pathological features of screen-detected thyroid carcinomas. *Yonsei Med J* 2008;49:748-56.
- 6) Beasley NJ, Lee J, Eski S, Walfish P, Witterick I, Freeman JL. Impact of nodal metastases on prognosis in patients with well-differentiated thyroid cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2002;128:825-8.
- 7) Kilicarslan AB, Ogus M, Arici C, Pestereli HE, Cakir M, Karpuzoglu G. Clinical importance of vascular endothelial growth factor (VEGF) for papillary thyroid carcinomas. *APMIS* 2003;111:439-43.
- 8) Scarpino S, Cancellario d'Alena F, Di Napoli A, Pasquini A, Marzullo A, Ruco LP. Increased expression of Met protein is associated with up-regulation of hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) in tumour cells in papillary carcinoma of the thyroid. *J Pathol* 2004;202:352-8.
- 9) von Wasielewski R, Rhein A, Werner M, Scheumann GF, Dralle H, Potter E, et al. Immunohistochemical detection of E-cadherin in differentiated thyroid carcinomas correlates with clinical outcome. *Cancer Res* 1997;57:2501-7.
- 10) Klein M, Picard E, Vignaud JM, Marie B, Bresler L, Toussaint B, et al. Vascular endothelial growth factor gene and protein: strong expression in thyroiditis and thyroid carcinoma. *J Endocrinol* 1999;161:41-9.
- 11) Hay ID, Grant CS, van Heerden JA, Goellner JR, Ebersold JR, Bergstralh EJ. Papillary thyroid microcarcinoma: a study of 535 cases observed in a 50-year period. *Surgery* 1992; 112:1139-46; discussion 46-7.
- 12) Baudin E, Travagli JP, Ropers J, Mancusi F, Bruno-Bossio G, Caillou B, et al. Microcarcinoma of the thyroid gland: the Gustave-Roussy Institute experience. *Cancer* 1998;83:553-9.
- 13) Manole D, Schildknecht B, Gosnell B, Adams E, Derwahl M. Estrogen promotes growth of human thyroid tumor cells by different molecular mechanisms. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:1072-7.
- 14) Lee ML, Chen GG, Vlantis AC, Tse GM, Leung BC, van Hasselt CA. Induction of thyroid papillary carcinoma cell proliferation by estrogen is associated with an altered expression of Bcl-xL. *Cancer J* 2005;11:113-21.
- 15) Zeng Q, Chen GG, Vlantis AC, van Hasselt CA. Oestrogen mediates the growth of human thyroid carcinoma cells via an oestrogen receptor-ERK pathway. *Cell Prolif* 2007;40:921-35.
- 16) Cho MA, Lee MK, Nam KH, Chung WY, Park CS, Lee JH, et al. Expression and role of estrogen receptor alpha and beta in medullary thyroid carcinoma: different roles in cancer growth and apoptosis. *J Endocrinol* 2007;195:255-63.
- 17) Yane K, Kitahori Y, Konishi N, Okaichi K, Ohnishi T, Miyahara H, et al. Expression of the estrogen receptor in human thyroid neoplasms. *Cancer Lett* 1994;84:59-66.
- 18) Egawa C, Miyoshi Y, Iwao K, Shiba E, Noguchi S. Quantitative analysis of estrogen receptor-alpha and -beta messenger RNA expression in normal and malignant thyroid tissues by real-time polymerase chain reaction. *Oncology* 2001; 61:293-8.
- 19) Hirohashi S, Kanai Y. Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. *Cancer Sci* 2003;94:575-81.
- 20) Kapran Y, Ozbey N, Molvalilar S, Sencer E, Dizdaroglu F, Ozarmagan S. Immunohistochemical detection of E-cadherin,

- alpha- and beta-catenins in papillary thyroid carcinoma. *J Endocrinol Invest* 2002;25:578-85.
- 21) Stamenkovic I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol* 2000;10:415-33.
- 22) Duffy MJ, Maguire TM, Hill A, McDermott E, O'Higgins N. Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. *Breast Cancer Res* 2000;2:252-7.
- 23) Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* 2000;18:1135-49.
- 24) Yeh MW, Rougier JP, Park JW, Duh QY, Wong M, Werb Z, et al. Differentiated thyroid cancer cell invasion is regulated through epidermal growth factor receptor-dependent activation of matrix metalloproteinase (MMP)-2/gelatinase A. *Endocr Relat Cancer* 2006;13:1173-83.
- 25) Tian X, Cong M, Zhou W, Zhu J, Liu Q. Relationship between protein expression of VEGF-C, MMP-2 and lymph node metastasis in papillary thyroid cancer. *J Int Med Res* 2008; 36:699-703.
- 26) Jiang JB, Li XM, Zhang WD, Zhu M, Shou NH. Relationship of vascular endothelial growth factor-C and lymphangiogenesis with the development and prognosis of colon cancer. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi* 2005;8:516-9.
- 27) Linderholm BK, Lindahl T, Holmberg L, Klaar S, Lennerstrand J, Henriksson R, et al. The expression of vascular endothelial growth factor correlates with mutant p53 and poor prognosis in human breast cancer. *Cancer Res* 2001;61: 2256-60.
- 28) Lennard CM, Patel A, Wilson J, Reinhardt B, Tuman C, Fenton C, et al. Intensity of vascular endothelial growth factor expression is associated with increased risk of recurrence and decreased disease-free survival in papillary thyroid cancer. *Surgery* 2001;129:552-8.
- 29) Sherman SI, Wirth LJ, Droz JP, Hofmann M, Bastholt L, Martins RG, et al. Motesanib diphosphate in progressive differentiated thyroid cancer. *N Engl J Med* 2008;359:31-42.
- 30) Semenza GL. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol Med* 2002;8:S62-7.