갑상선 유두암에서 석회화와 Bone Morphogenetic Protein-4 발현

정현주, 최영식

고신대학교 의과대학 내과학교실

Calcification and Expression of Bone Morphogenetic Protein-4 in Papillary Thyroid Carcinoma

Hyun Joo Jung, Young Sik Choi

Department of Internal Medicine, Kosin University College of Medicine, Busan, Korea

Background/Aim: The purpose of this study was to investigate whether bone morphogenetic protein (BMP)-4 expression differs according to the presence of calcification in papillary thyroid carcinoma and to investigate if calcification and BMP-4 expression are associated with metastasis of papillary carcinoma.

Methods: We performed the study using paraffin-embedded tissues of 55 patients who underwent thyroidectomy in Kosin University Gospel Hospital. Of those 55 cases, 36 were papillary thyroid carcinomas, and 19 were benign tumors. Immunohistochemical staining with BMP-4 antibody was performed on the paraffin-embedded tissues.

Results: Among the 36 papillary thyroid carcinomas, 20 (55.6%) of extrathyroidal invasion and 21 (58.3%) of lymph node metastasis were observed. The presence of calcification was significantly different according to incidence of extranodal invasion ($p = 0.02$), lymphovascular invasion ($p < 0.001$), and lymph node metastasis ($p = 0.04$). BMP-4 expression was weakly positive in benign tumors and strongly positive in papillary thyroid carcinoma ($p < 0.001$). BMP-4 expression was significantly different by TNM stage ($p < 0.001$).

Conclusion: In the present study, the presence of calcification in thyroid papillary carcinoma was associated with tumor metastasis. BMP-4 was strongly expressed in papillary thyroid carcinoma and was associated with the stage of papillary thyroid carcinoma.

Keywords: Papillary thyroid carcinoma; Calcification; Bone morphogenetic protein-4

서론

갑상선 결절에서 석회화는 19.8-32.1%에서 동반되며[1,2], 양성결절과 악성결절 모두에 동반될 수 있다. 갑상선 결절에 동반

되는 석회화의 형태로는 미세석회화(microcalcification), 결절 내 거친 석회화(intranodular coarse calcification), 단독 점상석회화(single calcified spot), 초승달 석회화(crescent type calcification), 원형 석회화(annular type calcification) 등이 있

Address for Correspondence: Young Sik Choi, M.D.

Department of Internal Medicine, Kosin University College of Medicine,
262 Gamcheon-ro, Seo-gu, Busan 49267, Korea
Tel: +82-51-990-6102, Fax: +82-51-248-5686
E-mail: yschoi@kosinmed.or.kr

Received : 2021. 7. 2.

Revised : 2021. 9. 24.

Accepted : 2021. 9. 25.

다. Kim 등[3]은 갑상선 결절의 석회화 중 미세석회화와 결절 내 (intranodular) 석회화와 악성결절 사이에 교차비(odds ratio)를 각각 3.5, 2.4로 보고하였다. 또한 Lee 등[4]은 갑상선 미세암에서 외측 림프절 전이와 관련이 있는 초음파 소견으로 현저한 저에코와 석회화를 보고하였다. 이처럼 갑상선암에서 석회화는 악성도를 나타낼 뿐 아니라 암의 전이를 예측할 수 있는 인자로도 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

Bone morphogenetic protein (BMP)-4는 transforming growth factor- β 계통(superfamily)의 한 종류로서, 생체 내에서 정상 골 조직 이외의 장소에서 연골 및 골 생성을 하는 기능을 할 뿐 아니라, 최근에는 세포의 증식, 자가사멸, 세포 운동 등 다양한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[5,6]. 또한 BMP-4는 유방암, 폐암, 간세포암, 췌장암 등의 침습과 전이에 연관이 있다고 보고되어 있으나[7,8], BMP-4 발현과 갑상선암의 전이에 관한 연구는 Meng 등[8]의 연구 외에는 보고가 드문 실정이며, Takeda 등[9]은 석회화를 동반한 갑상선 유두암에서 BMP-2의 발현이 증가되어 있으며, 이 경우 예후가 불량하다고 보고하였다. 본 연구는 갑상선 유두암에서 석회화 동반 여부에 따라 BMP-4 발현이 차이가 있는지를 알아보고 또한 석회화 동반 여부와 BMP-4 발현이 갑상선 유두암의 전이와 연관이 있는지를 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

대상

2013년 6월 이후 고신대학교 복음병원 외과에서 갑상선 절제술을 받은 환자 중 일부의 파라핀 포매된 조직을 이용하여 연구를 시행하였다. 총 대상 조직은 55예였으며, 이 중 갑상선 유두암이 36예, 양성종양은 19예였다. 대상 환자의 나이는 47.7 ± 11.5 세(범위 21-75세), 양성종양의 평균나이는 51.2 ± 12.6 세(범위 21-75세)였고, 갑상선 유두암의 평균나이는 46.2 ± 10.6 세(범위 29-68세)였으며, 남자 12예, 여자 43예였다. 본 연구는 고신대학교 복음병원의 임상시험윤리위원회(Institutional Review Board)의 승인을 받았다(2017-03-017).

방법

병기 분류

갑상선암의 병기 분류는 2009년 발표된 American Joint Committee on Cancer 분화암의 병기분류법을 이용하였다.

초음파 검사에서 석회화 평가

초음파 검사에서 석회화 형태는 그 모양에 따라 미세석회화(microcalcification), 결절내 거친 석회화(intranodular coarse

Figure 1. Transverse ultrasound image of thyroid nodules with calcification. (A) Microcalcification. (B) Intranodular coarse calcification. (C) Single calcified spot. (D) Crescent type calcification. (E) Annular type calcification.

calcification), 단독 점상석회화(single calcified spot), 초승달 석회화(crescent type calcification), 원형 석회화(annular type calcification) 5개로 분류하였다. 석회화 형태의 정의는 다음과 같다. 미세석회화는 2 mm 이하의 다발성 점상의 밝은 에코의 석회화, 결절 내 거친 석회화는 결절 내에 2 mm를 초과하는 크기의 석회화 음향음영(acoustic shadow)을 동반한 석회화, 단독 점상석회화는 5 mm 이상의 거친 석회화가 단독으로 존재할 경우, 초승달 석회화는 결절을 둘러싼 석회화가 초승달 모양을 보이는 경우, 원형석회화는 석회화는 결절을 둘러싼 석회화 형태가 둥근 모양을 보일 경우이다(Fig. 1).

BMP-4 면역조직화학 검사

파라핀 블록을 4 μ m 두께로 박절하여 탈파라핀 과정과 함수 처리를 거친 후 Bond-Max autostainer (Leica, Wetzlar, Germany)와 Bond Polymer Refine Detection Kit (Leica, Wetzlar, Germany)를 사용하여 염색하였다. 일차항체는 BMP-4 (Abcam, San Francisco, CA, USA; 1:100)를 이용하였다. 면역조

직화학 염색 결과의 판정은 세포질에 종양세포의 5% 이상에서 세포질에 분명한 갈색의 과립을 보이는 경우를 양성으로 판정하였고, 염색의 정도에 따라 약양성(+)과 강양성(++)으로 분류하였다(Fig. 2).

통계 분석

모든 자료는 평균 $\pm$ 표준편차 또는 수(%)로 나타내었다. 대상 환자의 나이, 결절의 크기에 대한 자료가 정규분포를 보이지 않아 임상적 특징의 차이는 Mann-Whitney test를 이용하여 검정하였다. 갑상선 유두암에서 석회화 유무, BMP-4, 발현 정도에 따른 임상병리학적 특성의 차이는 χ^2 검정 또는 Fisher's 정확한 검정을 이용하여 분석하였다. 갑상선 유두암과 양성종양에서 BMP-4, 발현 정도는 선형 대 선형 결합 방법으로 분석하였다. 통계 분석은 SPSS software (version 23.0, IBM Corp., Armonk, NY, USA)를 이용하여 분석하였고, $p < 0.05$ 인 경우를 유의한 것으로 하였다.

Figure 2. Examples of immunohistochemical staining of bone morphogenetic protein-4 in (A) normal thyroid tissue. Papillary thyroid carcinoma samples showing (B) negative (-) expression, (C) weak-positive (+) expression, and (D) strong-positive expression (++). All images are obtained at x200 magnification.

결 과

대상군의 임상병리학적 특징

갑상선 결절의 평균 크기는 13.9 ± 20.6 mm (범위 4.0–67.0 mm) 였으며, 양성종양은 평균 크기가 29.9 ± 15.5 mm (범위 6.0–67.0 mm), 유두암은 15.1 ± 9.6 mm (범위 4.0–48.0 mm)로 양성종양이 유의하게 컸다($p < 0.001$). 갑상선 유두암 36예 중 갑상선외로 침습은 20예(55.6%), 림프절 전이는 21예(58.3%)에서 관찰되었다.

갑상선종양에서 석회화 유무와 양성

석회화는 양성종양 3/19 (15.7%), 유두암 14/36 (38.9%)에서 동반되었다. 석회화가 동반된 17예 중 14예가 악성이었으나 양 군 간에 유의한 차이는 없었다($p = 0.07$) (Table 1). 석회화 결절 17예의 석회화 형태는 다양하였다(Table 1).

갑상선 유두암에서 석회화 유무에 따른 임상병리학적 특징

갑상선 유두암에서 초음파 검사상 석회화 동반 유무는 나이, 종양의 크기, 다발성 여부, TNM 병기와는 유의한 차이가 없었으나, 갑상선의 침습($p = 0.02$), 림프혈관 침습($p < 0.001$), 림프절 전이($p = 0.04$)에 유의한 차이를 보였다(Table 2).

갑상선종양에서 BMP-4 면역조직화학 검사

면역조직화학 검사 결과 BMP-4의 발현은 양성종양 8/19

(42.1%)에서 음성을 보였다. 갑상선 유두암 1/36 (2.8%)에서 음성을 보였고, 약양성은 11/36 (30.6%)에서, 강양성은 24/36 (66.7%)에서 보였다(Table 3).

Table 2. Clinicopathologic features according to the presence of calcification on US of papillary thyroid cancer

Clinicopathologic feature	Calcification in US		p value
	Negative (n = 22)	Positive (n = 14)	
Age (years)	47.4 $\pm$ 9.0	44.3 $\pm$ 12.9	0.44
Sex (male:female)	3:19	4:10	
Tumor size (mm)	13.1 $\pm$ 9.8	18.4 $\pm$ 8.6	0.40
Multifocality			
Single	15 (68.2)	6 (42.9)	0.13
Multiple	7 (31.8)	8 (57.1)	
ETE			
Yes	9 (40.9)	11 (78.6)	0.02
No	13 (59.1)	3 (21.4)	
Lymphovascular invasion			
Yes	0	8 (57.1)	<0.001
No	22 (100)	6 (42.9)	
Nodal metastasis			
N0	12 (54.5)	3 (21.4)	0.04
N1a	6 (27.3)	3 (21.4)	
N1b	4 (18.2)	8 (57.1)	
pTNM staging			
I	14 (63.6)	10 (71.4)	0.79
III	5 (22.7)	2 (14.3)	
IV	3 (13.7)	2 (14.3)	

Values are presented as mean $\pm$ standard deviation or number (%).

US, ultrasonography; ETE, extrathyroidal extension; pTNM, pathological tumor node metastasis.

Table 1. Ultrasound patterns of calcification of the subjects

Type of calcification	Benign (n = 19)	PTC (n = 36)	p value
No calcification	16 (84.3)	22 (61.1)	0.07
Calcification	3 (15.7)	14 (38.9)	
Microcalcification	2 (66.7)	4 (28.6)	
Annular	1 (33.3)	2 (14.3)	
Crescent		2 (14.3)	
Single calcified spot		0	
Intranodular		6 (42.8)	

Values are presented as number (%).

PTC, papillary thyroid carcinoma.

Table 3. BMP-4 expression in benign tumor and papillary thyroid carcinoma

	BMP-4 expression pattern			p value
	Negative (n = 9)	Weak (n = 22)	Strong (n = 24)	
Benign	8 (88.9)	11 (50.0)	0	<0.001
PTC	1 (11.1)	11 (50.0)	24 (100)	

Values are presented as number (%).

BMP, bone morphogenetic protein; PTC, papillary thyroid carcinoma.

갑상선 유두암에서 BMP-4 발현에 따른 임상병리학적 특징

BMP-4 면역조직화학 검사에서 BMP-4가 석회화, 갑상선외 침습, 림프절 전이 등에서 발현됨을 알 수 있었다. 그러나 BMP-4 발현이 약양성을 보인 11예와 강양성을 보인 24예 사이에 임상 병리학적으로 TNM 병기($p < 0.001$) 외에는 유의한 차이는 보이지 않았다.

고 찰

갑상선 결절에서 석회화는 악성결절 뿐 아니라 양성결절 모두에서 동반될 수 있으며, 연구자마다 차이가 있으나 악성결절에서 양성결절보다 석회화가 더 흔히 동반된다. Kim 등[3]은 악성결절에서는 약 40.2%에서 석회화가 동반되고, 양성결절에서는 22.2%에서 석회화가 동반된다고 보고하였다. 본 연구에서도 석회화는 양성종양 뿐 아니라 유두암에도 동반되어 석회화 유무와 석회화 양상만으로는 양성, 악성을 감별할 수는 없었다.

석회화는 조직에 칼슘이 침착하는 것으로 골(bone)이 형성되는 시기에는 정상적으로 석회화가 일어나지만, 비정상적으로 연부조직이나 세포에서 석회화가 발생할 수 있다. 종양에서 발생하는 석회화는 이영양형(dystrophic type)으로 대부분 괴사된 부분이나 사종체(psammoma body)와 관련이 있다[10]. 사종체는 칼슘 인화석(calcium apatite)에 의해 형성된 동심원적으로 층화된 모양(concentrically laminated bodies)을 보이는 석회화로 갑상선 유두암, 수막종, 난소암에 흔히 동반된다[11]. 이영양형 석회화는 기시(initiation)와 전파(propagation) 두 개의 과정을 통해 형성되는데, 세포 내에서 기시는 사멸된 미토콘드리아 또는 사멸세포 내에서 석회화가 시작되고, 세포외 석회화는 세포막에 있는 인지질 등에서 석회화가 시작되어 점점 증화된다고 한다. 본 연구에서 갑상선 유두암에서 초음파 검사상 석회화가 동반된 경우 갑상선외 침습($p = 0.02$), 림프혈관 침습($p < 0.001$), 림프절 전이($p = 0.04$)에 유의한 차이를 보였다. 석회화 유무와 갑상선암의 예후인자와의 연관성에 관한 연구는 드물며, Bai 등[12]은 갑상선 유두암의 병리조직에서 사종체가 발견되는 경우 림프절 전이와 TNM 병기와 관련이 있다고 하였다.

본 연구에서 BMP-4가 강하게 발현된 24예는 모두 갑상선 유두암이었고, 양성종양에서는 BMP-4가 강하게 발현되지 않았다. Kallioniemi [13]은 BMP-4가 세포의 증식, 분화, 자가사멸, 혈관신생, 이동, 침습 등 다양한 역할을 하는 것을 보고하였다.

이외에도 BMP-4는 유방암, 폐암, 간세포암, 췌장암 등의 침습과 전이에도 연관이 있다고 한다[7]. 본 연구에서 BMP-4가 석회화결절, 갑상선외 침습, 림프절 전이 등에서 발현되었으나, BMP-4 발현이 약양성을 보인 경우와 강양성을 보인 경우 사이에 임상적으로 TNM 병기($p < 0.001$) 외에는 유의한 차이는 보이지 않았다. BMP-4 발현과 갑상선암의 전이에 관해 처음으로 보고한 Meng 등[8]의 연구에서는 BMP-4 발현이 약양성을 보인 경우와 강양성을 보인 경우 사이에 종양의 크기($p = 0.019$), 갑상선외 침습($p = 0.002$), TNM 병기($p = 0.004$)는 유의한 차이를 보여 본 연구와는 차이가 있었으나, 림프절 전이는 양 군 사이에 차이를 보이지 않아($p = 0.44$) 저자의 연구와 유사한 결과를 보였다.

결론적으로 본 연구를 통하여 갑상선 유두암에서 석회화 동반 여부는 종양의 전이와 연관이 있음을 알 수 있었다. BMP-4가 갑상선 유두암에서 강하게 발현되어 향후 갑상선 중심부 바늘생검 시에 갑상선 유두암의 진단에도 활용할 수 있을 가능성을 알게 되었고, BMP-4 발현은 갑상선 유두암의 병기와 관련이 있음도 알 수 있었다.

요 약

목적: 갑상선암에서 석회화는 악성도를 나타낼 뿐 아니라 암의 전이를 예측할 수 있는 인자로도 활용될 수 있다고 한다. 최근 골형성에 관여하는 bone morphogenetic protein (BMP)-4가 갑상선암의 전이에도 연관이 있다는 연구가 보고되었다. 이에 본 연구는 갑상선 유두암에서 석회화 동반 여부에 따라 BMP-4 발현이 차이가 있는지를 알아보고 또한 석회화 동반 여부, BMP-4 발현 정도와 갑상선 유두암의 전이와 연관이 있는지를 알아보고자 하였다.

방법: 고신대학교 복음병원 외과에서 갑상선 절제술을 받은 환자 중 일부의 파라핀 포매된 조직을 이용하여 연구를 시행하였다. 총 대상 조직은 55예였으며, 이 중 갑상선 유두암이 36예, 양성종양은 19예였다. 석회화 유무는 초음파 검사와 현미경 검사를 이용하여 판정하였다. 파라핀 포매된 조직에 대해 BMP-4 항체를 이용한 면역조직화학 검사를 시행하였다.

결과: 갑상선 유두암 36예 중 갑상선외 침습은 20예(55.6%), 림프절 전이는 21예(58.3%)에서 관찰되었다. 갑상선 유두암에서 초음파 검사상 석회화 동반 유무는 나이, 종양의 크기, 다발성 여부, TNM 병기와는 유의한 차이가 없었으나, 갑상선외 침습($p = 0.02$), 림프혈관 침습($p < 0.001$), 림프절 전이($p = 0.04$)에 유의한

차이를 보였고, 현미경적 석회화 병변은 림프절 전이($p = 0.04$)와 유의한 차이를 보였다. BMP-4의 면역조직화학 검사 결과 BMP-4 발현은 양성종양에서는 약양성으로, 악성종양에서는 강양성으로 발현되었다($p < 0.001$). BMP-4가 석회화 결절, 갑상선외 침습, 림프절 전이 등에서 발현됨을 알 수 있었으나 BMP-4 발현은 임상병리학적으로 TNM 병기($p < 0.001$) 외에는 유의한 차이는 보이지 않았다.

결론: 본 연구를 통하여 갑상선 유두암에서 석회화 동반 여부는 종양의 전이와 연관이 있음을 알 수 있었다. 또한 BMP-4가 갑상선 유두암에서 강하게 발현되고 갑상선 유두암의 병기와 연관이 있음도 알 수 있었다.

중심 단어: 갑상선 유두암; 석회화; Bone morphogenetic protein-4

REFERENCES

1. Lu Z, Mu Y, Zhu H, et al. Clinical value of using ultrasound to assess calcification patterns in thyroid nodules. *World J Surg* 2011;35:122-127.
2. Chen G, Zhu XQ, Zou X, et al. Retrospective analysis of thyroid nodules by clinical and pathological characteristics, and ultrasonographically detected calcification correlated to thyroid carcinoma in South China. *Eur Surg Res* 2009;42:137-142.
3. Kim BK, Choi YS, Kwon HJ, et al. Relationship between patterns of calcification in thyroid nodules and histopathologic findings. *Endocr J* 2013;60:155-160.
4. Lee YS, Lim YS, Lee JC, et al. Ultrasonographic findings relating to lymph node metastasis in single micropapillary thyroid cancer. *World J Surg Oncol* 2014;12:273.
5. Tsumaki N, Yoshikawa H. The role of bone morphogenetic proteins in endochondral bone formation. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16:279-285.
6. Koivuniemi R, Mäkelä J, Hokkanen ME, et al. Hepatocyte growth factor activator inhibitor-1 is induced by bone morphogenetic proteins and regulates proliferation and cell fate of neural progenitor cells. *PLoS One* 2013;8:e56117.
7. Guo D, Huang J, Gong J. Bone morphogenetic protein 4 (BMP4) is required for migration and invasion of breast cancer. *Mol Cell Biochem* 2012;363:179-190.
8. Meng X, Zhu P, Li N, et al. Expression of BMP-4 in papillary thyroid carcinoma and its correlation with tumor invasion and progression. *Pathol Res Pract* 2017;213:359-363.
9. Takeda M, Mikami T, Numata Y, Okamoto M, Okayasu I. Papillary thyroid carcinoma with heterotopic ossification is a special subtype with extensive progression. *Am J Clin Pathol* 2013;139:587-598.
10. Das DK, Mallik MK, Haji BE, et al. Psammoma body and its precursors in papillary thyroid carcinoma: a study by fine-needle aspiration cytology. *Diagn Cytopathol* 2004;31:380-386.
11. Goepel JR. Disorders of metabolism and homeostasis. In: Underwood JCE, Cross SS, ed. *General and systemic pathology*. 3rd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2000:125-147.
12. Bai Y, Zhou G, Nakamura M, et al. Survival impact of psammoma body, stromal calcification, and bone formation in papillary thyroid carcinoma. *Mod Pathol* 2009;22:887-894.
13. Kallioniemi A. Bone morphogenetic protein 4-a fascinating regulator of cancer cell behavior. *Cancer Genet* 2012;205:267-277.