

## 세포검사로 유두갑상샘암종이 의심되는 갑상샘 결절의 Galectin-3 발현과 BRAF 돌연변이 분석

김도경 · 김현기 · 곽진영<sup>1</sup> · 김민주  
정형재 · 구지승 · 임범진 · 정찬권<sup>2</sup>  
홍순원

연세대학교 의과대학 병리과 및 <sup>1</sup>영상의학과  
<sup>2</sup>가톨릭대학교 의과대학 서울성모병원 병리과

### Galectin-3 Expression and BRAF Mutation in Cases of Cytologically Suspicious Papillary Thyroid Carcinoma

Dokyung Kim · Hyunki Kim · Jinyoung Kwak<sup>1</sup> · Minju Kim · Hyung Jae Jung  
Ja Seung Koo · Beom Jin Lim · Chankwon Jung<sup>2</sup> · SoonWon Hong

Departments of Pathology and <sup>1</sup>Radiology, Yonsei University College of Medicine; <sup>2</sup>Department of Pathology, Seoul St. Mary's Hospital, The Catholic University of Korea College of Medicine, Seoul, Korea

**Background :** Fine needle aspiration, which is known as the most accurate and cost-effective method for diagnosis of thyroid nodule, still may result in indeterminate cases that are pauci-cellular and show minor nuclear atypia, but most cases are associated with suspicion of papillary thyroid carcinoma (PTC). A B-type Raf kinase (*BRAF*) mutation was found in about half of PTCs and galectin-3 was expressed by malignant tumors, helping us to differentiate malignancies from benign lesions. **Methods :** Cases studied included histologically 44 confirmed PTC cases and 18 benign cases previously diagnosed as suspicious of PTC using cytologic examination. Cases were analyzed for galectin-3 expression by immunohistochemical staining and *BRAF* mutation by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) with a new restriction enzyme. **Results :** All 44 cases of PTC and 8 of 18 benign controls expressed galectin-3. *BRAF* mutations were found in only 9 of the 44 PTC cases. Assessment of galectin-3 expression demonstrated high sensitivity but low specificity. Evaluation of *BRAF* mutation revealed high specificity and low sensitivity. **Conclusions :** This study suggests that the combined application of these two methods for PTC of suspicious cytology is complementary.

**Key Words :** Suspicious cytology; Biopsy, fine needle; BRAF mutation; Galectin-3

접 수 : 2009년 7월 3일  
게재승인 : 2010년 1월 28일

책임저자 : 홍 순 원  
135-720 서울시 강남구 도곡1동 712  
강남세브란스병원 병리과  
전화: 02-2019-3543  
Fax: 02-3463-2103  
E-mail: soonwonh@yuhs.ac

\*본 논문은 2009년 연세대학교 의과대학  
교수연구비(6-2009-0120) 후원으로 연구  
되었음.

갑상샘암은 내분비종양 중 가장 많은 비율을 차지하는 악성종양으로, 그 발병률은 우리나라뿐 아니라 전 세계적으로 빠르게 증가하고 있다. 이는 초음파를 통한 갑상샘 결절의 발견이 증가되면서 미세암의 진단이 증가하였기 때문인데, 그 중 유두암종은 전체 갑상샘 종양의 80% 정도를 차지하고, 1 cm 미만 미세암의 거의 대부분을 차지하고 있다.<sup>1,2</sup>

초음파에서 갑상샘 결절이 관찰되는 경우, 가장 정확하고 비용 대비 효율적인 진단 방법은 세침흡인 세포검사인데, 그 결과에 따라 치료 방향 및 수술적 절제 여부를 결정하게 된다. 문헌에 따르면, 세침흡인 세포검사에 의한 진단의 민감도와 특이도는 각각 70-98%와 55-100% 정도로 보고되어 있으며, 약 15-30%의 경우에서 악성 또는 양성의 판단이 어렵다고 알려져 있다.<sup>3,4</sup>

이는 검체 채취, 표본, 병리학자의 숙련도에 의한 영향을 배제하고, 노련한 병리학자에 의해서 현미경적 세포학적 특성만으로 진단이 어려운 경우를 말하는데, 이처럼 미결정으로 분류되는 세포 소견에는 '유두암종의 의심', '소포 병변', '소포 종양' 등이 포함된다. 특히 '유두암종의 의심'으로 분류되는 경우에 대부분의 환자는 진단 및 치료를 위한 수술을 받게 된다.

수술 전 세침흡인 세포검사에서 진단의 정확성을 높이기 위하여 지금까지 많은 연구자들의 노력이 있었는데, 이중 대표적인 것이 분자 표지자 연구이다. 가장 민감도가 높은 것으로 알려진 galectin-3는 lectin group의  $\beta$ -galactosyl-binding protein으로 세포 사이 또는 세포와 기질 사이에 영향을 주며, 세포 주기 조절, 세포 사멸의 억제 등에 관여한다.<sup>5,6</sup> 이것은 악성종양의 갑상샘 세포 표면에서 발현되지만, 양성 또는 정상 갑상샘 세포에서

는 발현되지 않기 때문에 좋은 종양 표지자로 사용될 수 있다고 보고되어 있다.<sup>7-9</sup>

최근 갑상샘암의 발생에 관여하는 몇 가지 종류의 유전자 변이가 밝혀졌는데, 이는 갑상샘암의 종류와 그 조직학적 특성에 따라 차이가 있다. 세포의 증식, 분화, 세포 사멸 등의 기능을 조절하는 세포 간 신호 전달 체계인 mitogen-activated protein kinase (MAPK)/extracellular signal-regulated kinase (ERK) 전달 체계의 이상은 여러 종류의 악성종양에서 관찰되는데, 유두암종에서도 약 70% 경우에 MAPK 전달 체계의 이상이 동반되고, 이에 RET/PTC 재배열, B-type Raf kinase (BRAF)와 RAS 유전자의 점 돌연변이 등이 포함된다. 특히 문헌 보고에 따르면, 유두암종에서 이들은 각각 20%, 45%, 10% 정도 비율로 나타난다.<sup>10,11</sup>

한편 가장 많은 비율을 차지하는 BRAF 돌연변이는 대부분이 T1799A 점 돌연변이이며, BRAF 단백질 중 V600E 아미노산의 변화를 초래한다. 이것은 BRAF kinase를 구조적으로 활성화시키고, ERK 인산화를 지속시켜 MAPK 전달 체계의 기능에 이상을 보이게 된다. BRAF 돌연변이는 체세포 유전자 변형(somatic genetic alteration)이며, 갑상샘에서는 특징적으로 유두암종과 유두암종에서 파생된 미분화암에서 제한적으로 발현된다.<sup>10,12,13</sup> BRAF 돌연변이를 보이는 유두암종은 BRAF 돌연변이를 보이지 않은 유두암종에 비해 높은 병기, 갑상샘 주변 조직으로의 침범, 림프절 전이의 빈도가 높은 것과 관련되어 있어 예후가 나쁜 것으로 알려져 있다.<sup>13,14</sup> 이는 BRAF 돌연변이가 종양 억제 유전자(TIMP3, DAPK 등)를 억제시키고, 신생혈관 생성을 촉진(VEGF, MMPs, NF- $\kappa$ B 등)하는 등 이차적인 유전자 변화를 가져오기 때문이다.

또한 BRAF 돌연변이는 요오드 대사 유전자(iodide-metabolizing gene: TSHR, NIS, TPO 등)를 억제함으로써 방사성 요오드 소작 치료(radioiodine ablation therapy)에 저항성을 보여 재발에도 관여하므로<sup>13,15</sup> 유두암종의 중요한 예후 인자일 뿐만 아니라, 앞으로 환자의 적절한 치료 방향을 결정하는 데에도 그 중요성이 강조되고 있다. 특히 BRAF 돌연변이는 유두암종에 특이도가 높기 때문에,<sup>10,12,13</sup> '유두암종의 의심'으로 진단된 갑상샘 결절에서 이를 확인하는 것은 진단적인 가치가 있을 것으로 생각한다.

한편, 국내의 BRAF 돌연변이에 대한 연구를 보면 그 발생률은 약 60-80% 이상으로 다른 나라에 비해 현저히 높은 것으로 보고되어 있는데, 이는 국내의 검체 검사에 좀 더 민감한 방법을 사용했다는 점을 고려할 수 있으나, 국내 증례의 특성을 고려해야 한다는 것이 보고자들의 의견이었다.<sup>14,16-19</sup>

유두암종에서 galectin-3의 발현과 BRAF 돌연변이는 많은 부분에서 중첩되지만 그 둘 사이에 유의할 만한 상관관계는 없으며, BRAF 돌연변이가 직접적으로 galectin-3 단백질 발현에 관여하지는 않는 것으로 보고되어 있다.<sup>20</sup> 본 연구에서는 세침흡인 세포검사서 '유두암종의 의심'으로 진단받은 세포의 galectin-3와 BRAF 돌연변이를 확인하여 이 두 검사의 민감도와 특이도

를 살펴보고, 이를 세포 진단에 활용할 수 있을지 그 방법에 대해 알아보고자 한다.

## 재료 및 방법

2002년 1월부터 2004년 12월까지 갑상샘 세침흡인 세포검사로 '유두암종의 의심'으로 진단받고 갑상샘 절제술을 시행한 사례 중 조직으로 유두암종이 확진된 44예와 소포 샘종(follicular adenoma) 5예, 샘종 증식(adenomatous hyperplasia) 11예, 림프구갑상샘염(lymphocytic thyroiditis) 2예를 포함한 양성 병변 18예를 대상으로 하였다. 세침흡인 세포검사는 22-gauge 바늘로 갑상샘 결절을 1-2회 흡인한 세포를 Papanicolaou로 염색하고, 두 명의 병리 의사가 현미경으로 관찰하였다. '유두암종의 의심'으로 진단받은 예들은 유두암종 핵의 특징(핵의 크기 증가, 간유리양 염색질, 핵고랑 및 핵 내 세포질 봉입체) 중 일부가 관찰되지만, 진단하기에 부족한 경우(9/62)와 유두암종 핵의 특징 다수가 관찰되지만 그 세포의 수가 적어 진단적이지 않은 경우(53/62)가 포함되었다.<sup>21,22</sup>

세포 도말 슬라이드는 세포 밀도에 따라 세개의 군, 즉 5-10개의 세포로 구성된 군집의 수에 따라서 그 수가 10개 이하인 경우, 10-30개인 경우 그리고 30개 이상인 경우로 분류하였다. 이때 절제된 갑상샘 조직은 10% 중성 포르말린에 고정한 다음, 파라핀으로 포매하고, 4  $\mu$ m 두께로 박절하여, hematoxylin-eosin 염색을 시행, 현미경으로 관찰하였다. 또한 표준 진단 기준을 적용하여 두 명의 병리의사가 유두암종의 아형을 분류하였고, 임상 정보와 기타 조직학적 특성(종양의 크기, 종양의 다발성, 갑상샘 주변 침윤, 림프절 전이 등)을 확인하였다.

면역조직화학염색을 이용한 galectin-3의 확인은 세침흡인 도말 세포로 시행하였고, 세포 블록이 있는 경우에는 이를 사용하였다. 또 파라핀으로 제작된 세포 블록을 5  $\mu$ m 두께로 박절하였으며, 60°C 오븐에서 1시간 건조시킨 후 탈파라핀 과정과 합수 과정을 거치고, 항원 부활 처리를 위해 10 mM 구연산 완충액(citrate buffer, pH 6.0)을 이용하였다. 그리고 내인성 과산화소 활성도를 저지하기 위해 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 15분간 처리하고, Tris-Buffered Saline (TBS)에 5분간 세척한 후, 1차 항체인 galectin-3 (Novocastra, Newcastle, UK)를 실온에서 2시간 처리하였다.

한편 일차 항체 처리가 끝난 슬라이드는 TBS로 세척한 후 이차 항체(peroxidase-conjugated polymer, EnVision Detection System, DAKO, Glostrup, Denmark)로 실온에서 30분간 반응시키고, TBS로 세척한 후 NovaRED substrate kit (VECTOR Laboratory, Burlingame, CA, USA)를 이용하여 현미경 검경 하에서 발색하였다. 이때 세포 블록이 없는 경우는 도말 슬라이드를 자일렌에 담궈 커버 슬라이드를 분리시킨 후 탈파라핀 과정을 제외한 상기 동일한 면역조직화학염색 과정을 거

쳤다. 대조 염색은 Harris hematoxylin으로 시행하고, 탈색과 현색 과정 후 탈수, 투명, 봉입 과정을 거쳐 현미경으로 관찰하였다. 결과의 평가는 비정형 소포세포의 세포질에 염색된 경우에 한해 양성으로 평가하고, 대식세포를 내부 양성 대조 세포로 하였다.

한편 BRAF T1799A의 확인은 polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)법을 사용하였고, 이를 위한 DNA 검출 또한 세침흡인 도말 세포에서 시행하였다. 도말 슬라이드 중 비정형 소포세포가 있는 부위의 바닥 면에 다이아몬드 펜슬로 표시한 후 자일렌을 이용하여 커버 슬라이드를 제거하고, 함수 과정을 거친 후 증류수에 2분간 두었다. 그리고 이를 완전히 마르게 한 다음 다이아몬드 펜슬로 표시한 비정형 세포 부위를 면도칼로 긁어내고 소형관에 담았다. 그런 다음 QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Chatsworth, CA, USA)를 이용하여 안내서에 따라 DNA를 추출하고, spectrophotometer (NanoDrop, Wilmington, DE, USA)에서 DNA 양을 측정, 그 양이 PCR을 하는 데 적당하지 알아보았다.

PCR은 추출한 DNA와 5U Taq polymerase, 각 0.25 mM dNTP, 20 pmole of primers, 10×Ex Taq buffer로 조성하여 총량을 50  $\mu$ L로 하였는데, 이때 추출한 genomic DNA의 양은 100 ng/ $\mu$ L에 맞추었고, genomic DNA의 양이 적은 경우에는 증류수의 양을 줄이고, genomic DNA의 양을 늘려 총량에 맞추었다. 한편 exon 15의 BRAF 유전자를 확인하기 위해서 primer를 고안하였는데, 이것은 증폭 산물에 Bsp EI 제한 효소 자리를 만들기 위한 것으로, 이에 두 개의 불일치 염기를 포함하였다(forward primer 5'-ATA GGT GAT TTT GGT CTA GCT CCG G 3', reverse primer 5' GAT TTT TGT GAA TAC TGG GAA CT 3') (Fig. 1). 이때 PCR의 조건은 95°C에서 10분 후, 94°C에서 30초, 45°C에서 30초, 72°C에서

Wild type	FNAB	Mutant type
5'-ATA-GCTACAGTG-3'	Genome DNA	5'-ATA-GCTACAGAG-3'
5'-ATA-GCT <u>CCG</u> G-3'	PCR	5'-ATA-GCT <u>CCG</u> G-3'
5'-ATA-GCTCCGGTG-3'	5' primer	5'-ATA-GCTCCGGAG-3'
3'-TAT-CGAGGCCAC-5'	PCR	3'-TAT-CGAGGCCTC-5'
5'-ATA-GCTCCGGTG-3'	Cut with	5'-ATA-GCT <u>▼</u> CCGGAG-3'
3'-TAT-CGAGGCCAC-5'	Bsp E1	3'-TAT-CGAGGCC <u>▼</u> TC-5'
Product size: 210 bp		Digested products size: 189 bp

Fig. 1. Strategy underlying the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method for detection of B-type Raf kinase (BRAF)<sup>T1796A</sup> mutations. DNA extracted from fine-needle aspiration samples is amplified by PCR using a mismatched forward primer. Amplified products are digested with Bsp E1 for 1-2 hours, and then electrophoresed in a 4% agarose gel. Underlined nucleotides are the artificial mismatched bases in the PCR primer. ▼ indicates the restriction site of the Bsp E1 enzyme. FNAB, fine needle aspiration biopsy.

30초의 순환을 40회 반복하고 마지막으로 72°C에서 10분으로 하였다. 증폭 산물은 MinElute PCR purification kit (QIAGEN)를 이용하여 정제하고, 10 unit의 Bsp EI (Takara, Tokyo, Japan)을 37°C에서 2시간 정도 반응시켜 mutant DNA를 절단하였다. 결과물은 4% agarose gel과 TAE buffer를 이용하여 전기 영동을 시행하고 ethidium bromide로 1시간 정도 염색하였으며, 염색된 젤은 UV light transilluminator를 이용하여 사진 촬영하였다. 이때 양성 대조군은 이형 집합 BRAF<sup>V600E</sup> 돌연변이(heterozygous BRAF<sup>V600E</sup> mutation)를 갖는 사람의 유두갑상샘암증 배양 세포계(human papillary thyroid carcinoma cell line)인 HT29과 ARO를 사용하였고, 음성 대조군은 야생형 사람의 유두갑상샘암증 배양 세포계인 DLD-1을 사용하였다(Fig. 2).

한편 악성종양의 진단에 있어서 BRAF 돌연변이와 galectin-3의 민감도, 특이도, 정확도, 양성 예측률, 음성 예측률 및 종양 및 세포의 특성을 비교하는 데에는 기술 통계와 카이제곱 통계량을 이용한 교차 분석을 시행하였으며, 이 분석에는 SPSS ver. 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하였다.

## 결 과

조직으로 확인된 44예의 유두암증은 전형적인 유두암증(con-

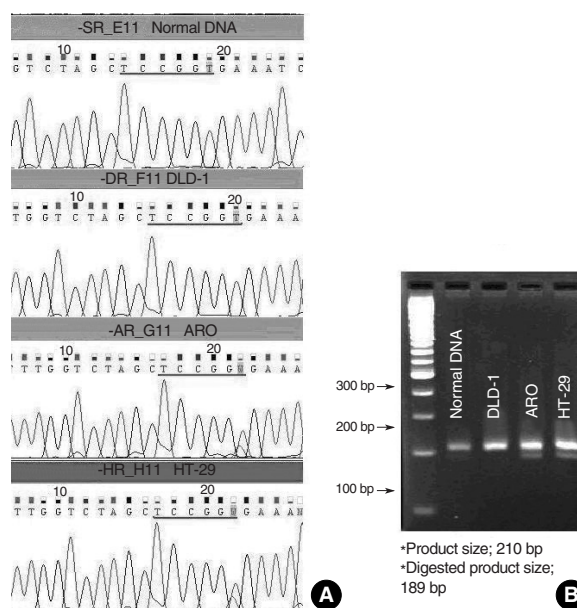


Fig. 2. The use of complementary DNA sequencing (A) corroborates the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). (B) The method is consistent with detection of the B-type Raf kinase (BRAF) mutation. ARO and HT-29, human papillary carcinoma cell lines heterozygous for the BRAF<sup>V600E</sup> mutation; DLD-1, a human papillary carcinoma cell line that harbored only wild type BRAF<sup>V600E</sup>; normal DNA, human blood used as a negative PCR control.

ventional papillary carcinoma) 40예, 소포성 아형(follicular variant) 2예, 소공질-상실양 아형(ciribiform morular variant) 1예, 미만성 경화성 아형(diffuse sclerosing variant) 1예로 최종 진단되었다. 대상 환자의 평균 나이는 44.7세로 22세부터 71세까지의 넓은 분포를 보였고, 남녀 비율은 5:39로 여자에게서 호발하였다. 종양의 평균 크기는 14.7 mm였고, 다발성으로 존재하는 경우가 13예(29.5%), 주변 조직으로의 침윤이 있는 경우가 25예(56.8%) 그리고 림프절 전이가 있는 경우가 23예(52.3%)였다(Table 1).

Galectin-3 면역조직화학염색의 결과는 유두암종 44예 모두(100%)에서 양성 반응을 보였고, 양성 병변 18예 중 샘종 증식 5예(5/11), 소포 샘종 2예(2/5) 그리고 림프구 감상염 1예(1/2) 등 총 8예(44%)에서 양성 반응을 보였다(Table 2, Fig. 3). 또한 양성 병변 중 galectin-3가 발현되는 예들의 세포 특징을 살펴본 결과, 높은 세포 밀도(5예), 핵의 중첩(1예), Hürthle 세포 변화(1예), 림프구 염증의 동반(1예) 등이 관찰되었다(Table 3).

PCR-RFLP를 통한 *BRAF* 돌연변이의 확인 결과는 총 44예

**Table 1.** Clinicopathological characteristics of papillary thyroid carcinoma

Clinicopathological characteristics	No. of patients (n = 44)
Range of age (yr)	22-71 (44.7) <sup>a</sup>
Sex (Male : Female)	5 : 39
cPTC	40 (90%)
fvPTC	2 (4.4%)
Variant of PTC dsPTC	1 (2.3%)
cmPTC	1 (2.3%)
Size of tumor (mm)	5-53 (14.7) <sup>b</sup>
Multiplicity	13 (29.5%)
Perithyroidal soft tissue extension	25 (56.8%)
Lymph node metastasis	23 (52.3%)

<sup>a</sup>Mean age; <sup>b</sup>Mean size.

PTC, papillary thyroid carcinoma; cPTC, conventional papillary thyroid carcinoma; fvPTC, follicular variant papillary thyroid carcinoma; dsPTC, diffuse sclerosing variant papillary thyroid carcinoma; cmPTC, cribriform morular variant papillary thyroid carcinoma.

**Table 2.** Expression of galectin-3 by immunohistochemical staining in cytology specimens

Histologic diagnosis (n)	Galectin-3	
	Positive (%)	Negative (%)
cPTC (40)	40 (100)	0
fvPTC (2)	2 (100)	0
dsPTC (1)	1 (100)	0
cmPTC (1)	1 (100)	0
Benign (18)	8 (44)	10 (56)

cPTC, conventional papillary thyroid carcinoma; fvPTC, follicular variant papillary thyroid carcinoma; dsPTC, diffuse sclerosing variant papillary thyroid carcinoma; cmPTC, cribriform morular variant papillary thyroid carcinoma.

의 유두암종 중 9예에서 *BRAF* 돌연변이가 있는 것으로 판명되었고, 양성 병변 18예는 모두 음성이었다(Table 4, Fig. 4). 이 결과를 바탕으로 galectin-3의 발현 결과와 *BRAF* 돌연변이 유무를 각각 또는 조합하여 그 예민도, 특이도, 정확도, 양성 예측률, 음성 예측률 등을 살펴보았다. 즉 galectin-3를 단독으로 시행했을 때 예민도, 특이도, 정확도, 양성 예측률, 음성 예측률은 각각 100, 55.5, 87, 84.6, 100(%)이었고, *BRAF* 돌연변이를 단독으로 시행했을 때는 20.4, 100, 43.5, 100, 33.9(%) 그리고 galectin-3와 *BRAF* 돌연변이를 동시에 시행했을 때는 100, 100, 100, 100(%)으로 확인되었다(Table 5).

또 세포 도말 슬라이드의 세포 밀도에 따른 분류를 살펴보면, 유두암종으로 확인된 44예 중 10개 이하의 군집을 보인 예가 20예, 10-30개의 군집을 보인 예가 18예, 30개 이상의 군집을 보인

**Table 3.** Correlation of galectin-3 expression with cytologic features of benign thyroid nodules

Histologic diagnosis (n)	Cytologic feature (n)	Galectin-3	
		Positive	Negative
Adenomatous hyperplasia (11)	High cellularity (5)	4	1
	Low cellularity (5)	0	5
	Hürthle cell change (1)	1	0
Follicular adenoma (5)	High cellularity (2)	1	1
	Low cellularity (3)	1 <sup>a</sup>	2
Lymphocytic thyroiditis (2)	Overlapping with lymphocytes (2)	1	1

<sup>a</sup>This case shows low cellularity but the galectin-positive clusters with nuclear overlapping.

**Table 4.** Prevalence of positivity for galectin-3 and *BRAF* mutation in cytology specimens

Category (n)	Galectin-3 (+)		Galectin-3 (-)	
	<i>BRAF</i> (+)	<i>BRAF</i> (-)	<i>BRAF</i> (+)	<i>BRAF</i> (-)
cPTC (40)	8	32	0	0
fvPTC (2)	0	2	0	0
dsPTC (1)	0	1	0	0
cmPTC (1)	1	0	0	0
Benign (18)	0	8	0	10

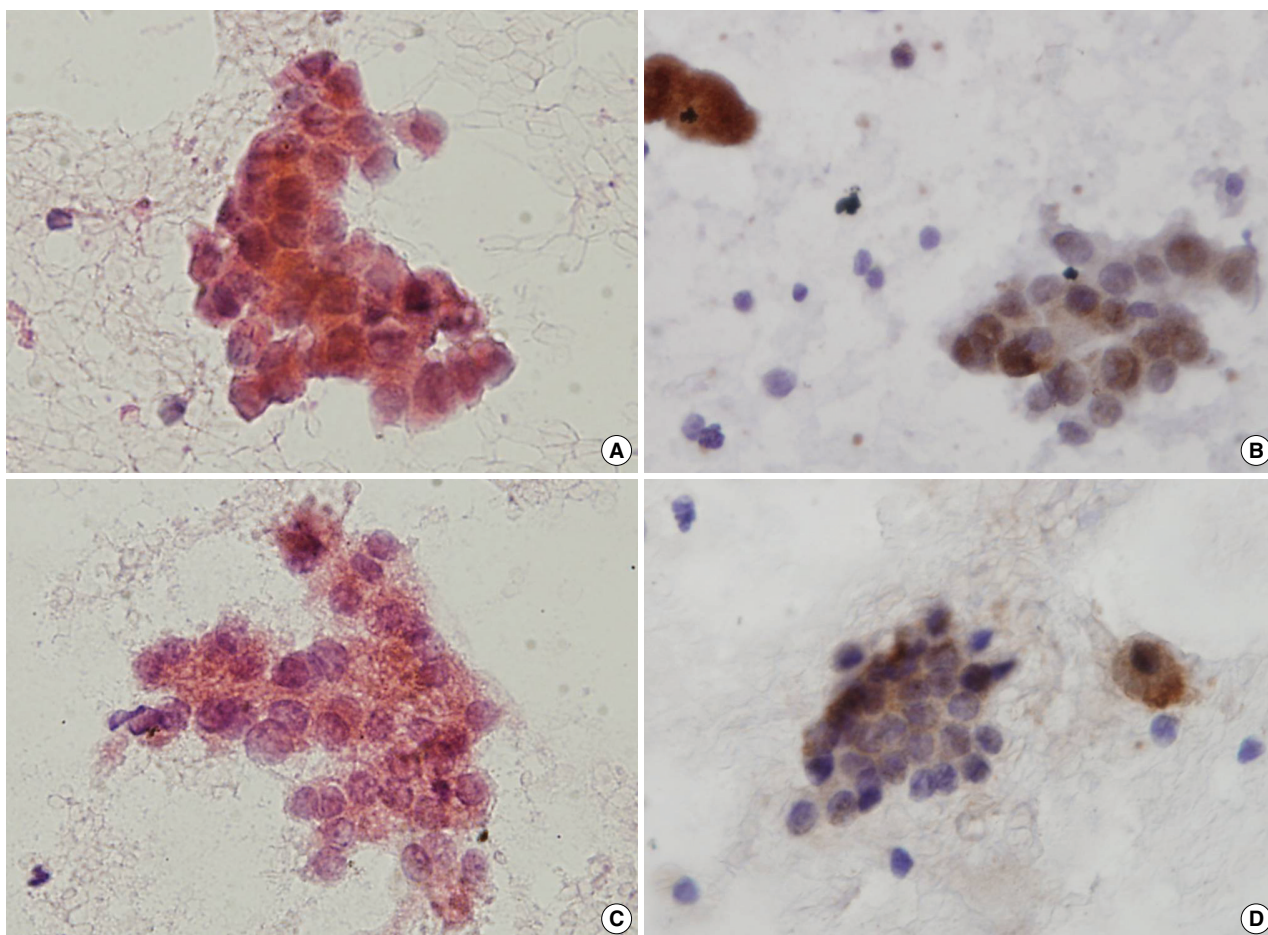
*BRAF*, B-type Raf kinase; cPTC, conventional papillary thyroid carcinoma; fvPTC, follicular variant papillary thyroid carcinoma; dsPTC, diffuse sclerosing variant papillary thyroid carcinoma; cmPTC, cribriform morular variant papillary thyroid carcinoma.

**Table 5.** Statistical analysis of single and combined galectin-3 expression and *BRAF* mutation in cytology specimens

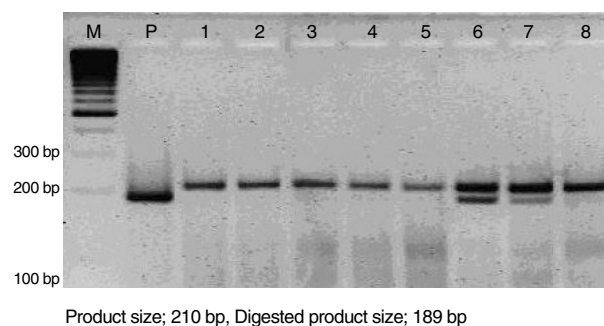
	Sensitivity	Specificity	Accuracy	PPV	NPV
<i>BRAF</i> <sup>600E</sup>	20.4	100	43.5	100	33.9
Galectin-3	100	55.5	87	84.6	100
Galectin-3 and <i>BRAF</i> <sup>600E</sup>	100	100	100	100	100
Galectin-3 or <i>BRAF</i> <sup>600E</sup>	100	55.5	87	84.6	100

*BRAF*, B-type Raf kinase; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value.





**Fig. 3.** Cytology and immunocytochemical staining of samples that are suspicious for papillary thyroid carcinoma (PTC). (A) The cytology of a case confirmed as PTC, reveals a tight cellular cluster showing nuclear overlapping, nuclear clearing and nuclear grooves (Papanicolaou). (B) A PTC case showing strong cytoplasmic reactivity for galectin-3 (immunocytochemical stain for galectin-3). (C) The cytology of a case confirmed as adenomatous hyperplasia (AH) reveals a relatively loose cellular cluster showing nuclear overlapping, nuclear grooves and abundant cytoplasm (Papanicolaou). (D) An AH case that shows relatively weak cytoplasmic reactivity for galectin-3 (immunocytochemical stain for galectin-3).



**Fig. 4.** A representative result showing the detection of B-type Raf kinase (*BRAF*<sup>T1796A</sup>) mutations in fine-needle aspirates by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Samples in lane P, 6 and 7 are *BRAF*<sup>T1796A</sup>-positive and samples in lane 1, 2, 3, 4, 5, and 8 are *BRAF*<sup>T1796A</sup>-negative. A human papillary carcinoma cell line (ARO) is used as a positive PCR control (lane P). Lane M, 100 bp DNA markers.

예가 6예였다. 각 군에서 *BRAF* 돌연변이의 양성률은 각각 15% (3/20), 22.2% (4/18), 33.3% (2/6)로 세포 밀도가 증가할수록 *BRAF* 돌연변이의 빈도가 증가하는 경향을 보였다.

*BRAF* 돌연변이의 유무를 유두암종의 아형에 따라 비교해 보면 전형적인 유두암종은 8예(20%), 소공질-상실양 아형은 1예(100%)에서 *BRAF* 돌연변이를 갖고 있었고, 미만성 경화성 아형 1예와 소포성 아형 2예는 *BRAF* 돌연변이가 관찰되지 않았다(Table 6). 다른 조직학적 특성을 *BRAF* 돌연변이 유무로 분류해 비교해 보면, *BRAF* 돌연변이가 있는 경우의 평균 종양 크기는 19.8 mm, 없는 경우의 평균은 13.9 mm이고, 다결절을 보이는 것은 양성인 경우가 3예(33.3%), 음성인 경우가 12예(38.7%)였으며, 주변 조직으로의 침윤을 보이는 것은 *BRAF* 돌연변이가 있는 경우가 4예(44.4%), 없는 경우가 20예(64.5%)였다. 그리고 림프절 전이는 *BRAF* 돌연변이가 존재하는 경우가 4예(44.4%)에서, *BRAF* 돌연변이가 없는 경우는 18예(58%)

**Table 6.** Correlation of *BRAF* mutation with a histologic variant of papillary thyroid carcinoma

Histologic type (n)	<i>BRAF</i> mutation	
	Positive (%)	Negative (%)
cPTC (40)	8 (20)	32 (80)
fvPTC (2)	0 (0)	2 (100)
dsPTC (1)	0 (0)	1 (100)
cmPTC (1)	1 (100)	0 (0)
Total (44)	9 (20.4)	35 (79.6)

*BRAF*, B-type Raf kinase; cPTC, conventional papillary thyroid carcinoma; fvPTC, follicular variant papillary thyroid carcinoma; dsPTC, diffuse sclerosing variant papillary thyroid carcinoma; cmPTC, cribriform morular variant papillary thyroid carcinoma.

**Table 7.** Correlation of *BRAF* mutation with histopathologic characteristics of papillary thyroid carcinoma

Histopathologic characteristics	<i>BRAF</i> mutation	
	Positive	Negative
Size of tumor (mm)	5-42 (19.8) <sup>a</sup>	5-52 (13.9) <sup>a</sup>
Multiplicity	3 (33.3%)	12 (38.7%)
Perithyroidal soft tissue extension	4 (44.4%)	20 (64.5%)
Lymph node metastasis	4 (44.4%)	18 (58%)
Total	9	35

<sup>a</sup>Mean size.

*BRAF*, B-type Raf kinase.

에서 관찰되었다(Table 7). 끝으로 *BRAF* 돌연변이 유무에 따라 조직학적 특징의 차이가 있는지를 교차 분석한 결과는 각 항목 모두에서 유의한 상관 관계가 없는 것으로 나타났다.

## 고 찰

세침흡인 세포검사에서 유두암증이 의심되는 경우 galectin-3의 면역조직화염색은 민감도는 높으나 특이도는 낮고, *BRAF* 돌연변이 검사는 민감도는 낮으나 특이도는 높은 것을 알 수 있었다. 또한 두 검사를 조합한 결과는 민감도와 특이도가 현저히 증가함을 확인하였다. 세침흡인 세포검사에서 유두암증이 의심되고, 조직으로 유두암증이 확인된 44예에서 세침흡인 도말 세포의 galectin-3 면역조직화염색은 100% 양성 결과를 보였고, *BRAF* 돌연변이는 20.9%에서 확인되었다. 세침흡인 세포검사에서 유두암증이 의심되었으나, 조직에서 양성 병변임이 확인된 18예에서는 galectin-3가 44%에서 양성이었고, *BRAF* 돌연변이는 전 예에서 관찰되지 않았다.

Galectin-3는 세포 사멸의 억제와 관련된 단백질로 이미 많은 연구를 통해 악성종양에서 특이적으로 발현하고 양성 병변에서는 발현하지 않는 것으로 알려져 있으나, 그 특이도는 70-90% 정도로 다양하게 보고되어 있다.<sup>23,24</sup> 본 연구에서는 galectin-3가

44%의 위양성 결과를 보여, 이를 양성과 악성을 판단하는 단일 항체로 사용하기에는 제한점이 있다는 것을 알 수 있었다. 또 이차 항체로 EnVision Detection system을 사용하였으므로 내인성 바이오틴에 의한 비특이적 위양성의 결과는 배제할 수 있었다. 또한 양성 병변 중 galectin-3가 발현된 예들의 세포들을 재검토한 결과, 이들은 galectin-3 음성인 세포들에 비해 높은 세포 밀도, Hühle 세포 변화, 세포들 간의 겹침 및 림프구와의 혼성 등의 특징을 보이고 있었는데, 이들의 세포 소견은 galectin-3가 양성이라 하더라도 유두암증으로 진단하기에는 부족한 소견으로 galectin-3의 양성을 비특이적인 소견으로 보는 것이 합당할 것으로 생각한다. 따라서 세포 소견을 우선 병리의사가 판단하고, galectin-3의 염색 결과를 참고하여 적용해야 할 것으로 생각한다.

외국문헌에 따르면 갑상샘 유두암의 *BRAF* 돌연변이는 약 40%가 발현된다고 보고되었으나<sup>10,11</sup> 국내 검체를 분석한 문헌에서는 *BRAF* 돌연변이가 60%에서 높게는 80%까지 검출되어 다른 지역보다 발생률이 현저히 높은 것으로 보고되어 있다.<sup>14,16-19</sup> 이런 보고의 차이는 연구된 종양의 발생 지역이 다르다는 것과, 사용된 검체의 채취 방법 및 검출 방법이 다르다는 점 등을 원인으로 생각해 볼 수 있다. 본 연구의 *BRAF* 돌연변이 양성률은 20.9%로 국내 자료들과 비교하면 낮은 것이었으나, 몇몇 외국의 문헌들은 이와 비슷한 정도의 *BRAF* 돌연변이 양성률을 보고하였다.<sup>14</sup>

본 연구가 다른 문헌과 다른 점은 세가지 정도로 설명할 수 있다. 첫째, 본 연구의 대상으로 사용된 검체는 제작된 지 약 5년에서 7년의 시간이 지난 것으로 검체 자체의 손상이 있을 수 있고, 검체를 사용하기 위해 커버 슬라이드를 제거하는 것 또한 많은 조작이 필요한 과정이므로 이렇게 채취된 검체량, 즉 세포수의 절대량이 적었다는 것이다. 둘째는 이 실험에 포함된 예들이 세침흡인 세포검사에서 유두암증이 의심되었으나 악성의 가능성이 확실치 않았던 증례였다는 점이고, 셋째는 검출 방법으로 염기서열 분석 방법 등 좀 더 검출 가능성이 높은 방법을 사용하지 않고, 비용 효율적인 PCR-RFLP 방법을 사용했다는 점이다.

본 연구에서 알게 된 것은 검사에 포함되는 세포 수에 따라 *BRAF* 돌연변이 검출률이 다르다는 것이다. 즉 검체의 채취 방법에 있어 슬라이드에서 세포를 채취하는 것은 DNA를 얻는 데는 문제가 없었으나, 세포 군집이 적을수록 *BRAF* 돌연변이의 검출 빈도가 낮아지는 것을 알 수 있었다. 유두암증이 의심되나 확실치 진단하기에는 양적 또는 질적으로 부족하여 미결정으로 분류된 세침흡인 세포검사는 62예 중 53예가 결정적인 세포수의 부족 때문이고, 9예가 유두암증 진단에 부족한 핵의 특징 때문이었다. 비정형 세포의 수는 최소 20개 정도였고, 이를 포함한 모든 예에서 DNA 검출 및 PCR-RFLP가 가능하였다. 또한 도말 세포의 수가 증가할수록 *BRAF* 돌연변이의 검출 빈도가 증가하는 것을 확인할 수 있었고, *BRAF* 돌연변이의 양성률은 5-10개의 세포로 구성된 군집의 수가 10개 미만일 때 15%

(3예), 군집의 수가 10개에서 30개 사이일 때 22.2% (4예), 그 이상인 경우가 33.3% (2예)로 나타났다.

슬라이드의 세포를 채취하여 검체로 사용한 보고는 Sapio 등<sup>20</sup>과 Kim 등<sup>19</sup>의 연구 등이 있었지만, 본 연구와는 대상과 방법에서 차이가 있었다. 전자의 경우는 대상으로 선정된 슬라이드가 본 연구에서와 같이 진단용으로 제작된 것이 아니라, 연구 목적으로 다시 제작된 것이었고, 염기서열 분석 방법으로 BRAF 돌연변이를 확인한 것이었다. 후자는 세침흡인 세포검사의 진단과 관계없이 수술한 모든 예를 대상으로 하였고 pyrosequencing 방법을 이용하였다.

결국 본 연구와 다른 문헌들의 보고들을 종합하면 적은 세포로도 검사가 가능하지만, 충분한 세포 확보가 진단에 있어 필수적인 사항인 것을 알 수 있다.

BRAF 돌연변이를 검출하는 방법들 중 본 연구에서 시행한 PCR-RFLP은 간편하고 경제적이며 검출력이 높은 검사 방법이다. 현재 BRAF 돌연변이를 확인하는 방법은 매우 다양하게 소개되어 있는데, 가장 널리 쓰이는 방법은 염기서열 분석법이고, 그 외에도 pyrosequencing, 용해점 분석법, PCR-RFLP 등이 있다.

세침흡인 세포검사 도말에는 종양세포뿐 아니라 정상 소포세포, 적혈구, 혈관 내피세포 그리고 간질세포들이 혼재해 있고, 종양세포도 대부분 이형 접합체(heterozygote)이며, 종양세포의 일부만이 돌연변이를 갖고 있기 때문에 실제로 돌연변이를 갖는 DNA의 양은 극히 일부에 지나지 않는다. 따라서 돌연변이를 확인하기 위해서는 검출력이 높은 방법을 사용해야 한다. 돌연변이를 갖는 대립 인자를 검출할 수 있는 종양의 최소 용적 비율을 나타내는 검출 한계는 염기서열 분석이 20%, pyrosequencing이 6%, 용해 곡선 분석이 10%, PCR-RFLP가 3% 정도로 각각 보고된 바 있다.<sup>23-25</sup> 이중 PCR-RFLP는 고가의 장비 없이 간편하게 사용할 수 있으며, 검출력이 높아 임상에서 진단 목적으로 사용하기에 가장 적합한 방법 중 하나이다.

PCR-RFLP의 제한 효소는 돌연변이형의 대립인자를 절단하거나 야생형의 대립인자를 절단하게 되는데, 후자의 경우에는 효소 반응이 불충분할 때 위양성의 결과를 얻게 되는 단점이 있다. 본 연구는 돌연변이형의 대립인자를 절단하는 *Bsp E1* 제한효소를 이용하였는데, 이는 이전에 사용되지 않았던 제한효소로서 다른 문헌에서 사용된 제한효소에 비해 돌연변이의 검출률이 더 높은 것을 확인하였다.

유두암종의 변이에 따른 차이를 보기 위해 계획된 연구는 아니었으나, 분석된 결과를 보면 전형적인 유두암종에서 20%, 소공질-상실양 아형에서 100%의 BRAF 돌연변이가 나타났고, 미만성 경화성 아형과 소포성 아형에서는 BRAF 돌연변이가 나타나지 않았다. 이 결과는 각 아형의 수가 적지만 기존의 보고와 유사한 빈도를 보이는 것이며,<sup>25,26</sup> 전형적인 형태 또는 예후가 나쁜 아형에서 BRAF 돌연변이가 관련되어 있음을 시사한다. 소공질-상실양 아형의 BRAF 돌연변이에 대한 연구는 지금까지

보고된 것이 없어 비교할 수 없었고, 본 연구에 포함된 예가 적어서 결론을 내리기는 어렵지만, 드물게 발생하는 아형이므로 본 예의 결과도 보고할 가치가 있다고 생각한다.

다른 조직학적 특성을 BRAF 돌연변이 유무로 나누어 비교한 결과는 통계학적으로 의미 있는 것은 아니었으나, BRAF 돌연변이가 있는 경우 평균 종양의 크기가 좀 더 크고, 다결절의 빈도, 주변 조직으로의 침윤 빈도, 림프절의 전이 빈도 등이 낮은 것을 알 수 있었다. 이런 결과들은 아형과의 상관성과 유사한 결과라고 볼 수 있다.<sup>10</sup>

갑상샘 세침흡인 세포검사에서 '유두암종의 의심'으로 진단 받은 경우, BRAF 돌연변이 검사와 galectin-3 면역조직화학염색을 동시에 시행하는 것은 진단의 민감도, 특이도 및 정확도를 높일 수 있는 방법이다. 또한 BRAF 돌연변이 검사는 세침흡인 세포검사를 통해 이미 슬라이드에 도말된 세포라도 그 수를 충분히 얻을 수 있다면 진단을 하는 데 도움이 될 수 있다. 이러한 BRAF 돌연변이 검사 방법은 여러 가지가 있으나, PCR-RFLP법이 가장 경제 효율적인 것으로 생각되며 세침흡인 세포검사로 그 변이에 따라 다른 결과를 보일 수 있기 때문에 PCR-RFLP법을 이용한 검사법이 치료 계획을 세우는 데 도움이 될 것으로 기대한다.

## 참고문헌

1. Davies L, Welch HG. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002. *JAMA* 2006; 295: 2164-7.
2. Leenhardt L, Grosclaude P, Cheërié-Challine L. Increased incidence of thyroid carcinoma in France: a true epidemic or thyroid nodule management effects? Report from the French Thyroid Cancer Committee. *Thyroid* 2004; 14: 1056-60.
3. Gharib H, Goellner JR. Fine-needle aspiration biopsy of the thyroid: an appraisal. *Ann Intern Med* 1993; 118: 282-9.
4. Rowe LR, Bentz BG, Bentz JS. Utility of BRAF V600E mutation detection in cytologically indeterminate thyroid nodules. *Cytojournal* 2006; 3: 10.
5. Takenaka Y, Inohara H, Yoshii T, et al. Malignant transformation of thyroid follicular cells by galectin-3. *Cancer Lett* 2003; 195: 111-9.
6. Yoshii T, Inohara H, Takenaka Y, et al. Galectin-3 maintains the transformed phenotype of thyroid papillary carcinoma cells. *Int J Oncol* 2001; 18: 787-92.
7. Liu YY, Morreau H, Kievit J, Romijn JA, Carrasco N, Smit JW. Combined immunostaining with galectin-3, fibronectin-1, CITED-1, Hector Battifora mesothelial-1, cytokeratin-19, peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ , and sodium/iodide symporter antibodies for the differential diagnosis of non-medullary thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol* 2008; 158: 375-84.

8. Rydlova M, Ludvikova M, Stankova I. Potential diagnostic markers in nodular lesions of the thyroid gland: an immunohistochemical study. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2008; 152: 53-9.
9. Semenov Dlu, Pozharisskii KM, Boriskova ME, Pankova PA, Mukhina MS, Feshchenko NS. Galectin-3 in diagnosis of thyroid cancer. *Vopr Onkol* 2008; 54: 321-3.
10. Nikiforova MN, Nikiforov YE. Molecular genetics of thyroid cancer: implications for diagnosis, treatment and prognosis. *Expert Rev Mol Diagn* 2008; 8: 83-95.
11. Namba H, Nakashima M, Hayashi T, *et al.* Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 4393-7.
12. Adeniran AJ, Zhu Z, Gandhi M, *et al.* Correlation between genetic alterations and microscopic features, clinical manifestations, and prognostic characteristics of thyroid papillary carcinomas. *Am J Surg Pathol* 2006; 30: 216-22.
13. Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. *Endocr Rev* 2007; 28: 742-62.
14. Lee JH, Lee ES, Kim YS. Clinicopathologic significance of BRAF V600E mutation in papillary carcinomas of the thyroid: a meta-analysis. *Cancer* 2007; 110: 38-46.
15. Liu D, Hu S, Hou P, Jiang D, Condouris S, Xing M. Suppression of BRAF/MEK/MAP kinase pathway restores expression of iodide-metabolizing genes in thyroid cells expressing the V600E BRAF mutant. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 1341-9.
16. Lee JH, Lee ES, Kim YS, Won NH, Chae YS. BRAF mutation and AKAP9 expression in sporadic papillary thyroid carcinomas. *Pathology* 2006; 38: 201-4.
17. Jo YS, Li S, Song JH, *et al.* Influence of the BRAF V600E mutation on expression of vascular endothelial growth factor in papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 3667-70.
18. Kim KH, Kang DW, Kim SH, Seong IO, Kang DY. Mutations of the BRAF gene in papillary thyroid carcinoma in a Korean population. *Yonsei Med J* 2004; 45: 818-21.
19. Kim SK, Kim DL, Han HS, *et al.* Pyrosequencing analysis for detection of a BRAFV600E mutation in an FNAB specimen of thyroid nodules. *Diagn Mol Pathol* 2008; 17: 118-25.
20. Sapio MR, Guerra A, Posca D, *et al.* Combined analysis of galectin-3 and BRAFV600E improves the accuracy of fine-needle aspiration biopsy with cytological findings suspicious for papillary thyroid carcinoma. *Endocr Relat Cancer* 2007; 14: 1089-97.
21. Kelman AS, Rathan A, Leibowitz J, Burstein DE, Haber RS. Thyroid cytology and the risk of malignancy in thyroid nodules: importance of nuclear atypia in indeterminate specimens. *Thyroid* 2001; 11: 271-7.
22. Oertel YC, Oertel JE. Thyroid cytology and histology. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2000; 14: 541-57.
23. Saggiorato E, De Pompa R, Volante M, *et al.* Characterization of thyroid 'follicular neoplasms' in fine-needle aspiration cytological specimens using a panel of immunohistochemical markers: a proposal for clinical application. *Endocr Relat Cancer* 2005; 12: 305-17.
24. Prasad ML, Pellegata NS, Huang Y, Nagaraja HN, de la Chapelle A, Kloos RT. Galectin-3, fibronectin-1, CITED-1, HBME1 and cytokeratin-19 immunohistochemistry is useful for the differential diagnosis of thyroid tumors. *Mod Pathol* 2005; 18: 48-57.
25. Sheu SY, Schwertheim S, Worm K, Grabellus F, Schmid KW. Diffuse sclerosing variant of papillary thyroid carcinoma: lack of BRAF mutation but occurrence of RET/PTC rearrangements. *Mod Pathol* 2007; 20: 779-87.
26. Santarpia L, Sherman SI, Marabotti A, Clayman GL, El-Naggar AK. Detection and molecular characterization of a novel BRAF activated domain mutation in follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *Hum Pathol* 2009; 40: 827-33.