

## 갑상선 종양세포 식별을 위한 염색질 텍스처의 디지털 화상해석에 관한 연구

전남대학교 의과대학 병리학교실, 소아과학교실\*,  
광주대학교 공과대학 전자공학과\*\*

정 상 우 · 이 재 혁 · 범 은 경\* · 김 창 원\*\*

= Abstract =

### A Study of Digital Image Analysis of Chromatin Texture for Discrimination of Thyroid Neoplastic Cells

Sang Woo Juhng, M.D., Jae Hyuk Lee, M.D., Eun Kyung Bum, M.D.\*,  
and Chang Won Kim, Ph.D.\*\*

Departments of Pathology and Pediatrics\*, Chonnam University, Medical School,  
and Department of Electronics, Kwangju University, College of Engineering\*\*

Chromatin texture, which partly reflects nuclear organization, is evolving as an important parameter indicating cell activation or transformation. In this study, chromatin pattern was evaluated by image analysis of the electron micrographs of follicular and papillary carcinoma cells of the thyroid gland and tested for discrimination of the two neoplasms. Digital grey images were converted from the electron micrographs; nuclear images, excluding nucleolus and intranuclear cytoplasmic inclusions, were obtained by segmentation; grey levels were standardized; and grey level histograms were generated. The histograms in follicular carcinoma showed Gaussian or near-Gaussian distribution and had a single peak, whereas those in papillary carcinoma had two peaks(bimodal), one at the black zone and the other at the white zone. In papillary carcinoma, the peak in the black zone represented an increased amount of heterochromatin particles and that at the white zone represented decreased electron density of euchromatin or nuclear matrix.

These results indicate that the nuclei of follicular and papillary carcinoma cells differ in their chromatin pattern and the difference may be due to decondensed chromatin and/or matrix substances.

---

**Key words:** Chromatin texture, Follicular carcinoma, Papillary carcinoma, Gaussian distribution, Image analysis

---

\*\*본 연구는 '92 대학교수 국비해외과건 연구 계획'의 지원에 의해 이루어졌음.

## 서 론

암세포는 일차적으로 세포와 핵의 크기 및 모양 등 기하학적 도형 관찰에 바탕을 둔 형태학적 해석에 의해 인지되어 왔다. 그러나 기하학적 도형의 해석만으로는 세포의 유형을 판별하기 어려운 경우가 많이 있으며 따라서 염색상과 구조물의 패턴 등에 대한 광계측학적 및 구조학적 특성의 관찰이 요구된다. 최근 화상 분석 장치의 발달로 인하여 종전까지는 어려웠던 특성의 객관적 분석이 가능하여 졌고, 그 결과 갑상선 종양의 감별<sup>1)</sup>, 자궁경부 암종의 세포학적 진단<sup>2)</sup>, diphthalate에 대한 간세포의 반응양태 판별<sup>3)</sup>, 또는 항암제에 대한 암세포의 내성 획득 여부 판별<sup>4)</sup>등을 위해서는 염색질 텍스취의 분석이 가장 적합하다고 보고되어 있다.

지금까지의 염색질 텍스취의 분석은 낮은 해상도를 갖는 광학현미경 화상의 처리에 의하여 주로 이루어져 왔으며<sup>1-4)</sup>, 높은 해상도를 갖는 전자현미경 화상을 대상으로 한 분석은 실험적 간암의 발생단계 추적<sup>5)</sup>과 자궁경부암종의 발생단계 추적<sup>6)</sup>등으로 많지 않다. 전자현미경 화상은 높은 해상도를 가질 뿐만 아니라 glutaraldehyde와 osmium tetroxide의 이중 고정 후 lead citrate와 uranyl acetate로 이중 염색한 세포핵에서는 이염색질과 전염색질이 뚜렷이 구분되며 염색질 패턴은 DNA에 특이적으로 반응하는 Feulgen 염색의 염색상과 잘 일치되므로<sup>7)</sup> 염색질의 패턴 분석에 유용함이 알려져 있다<sup>5-6)</sup>.

저자는 발생빈도가 높고, 생물학적 양태가 다르기 때문에 감별이 필요하며, 또한 감별진단에 있어서 병리조직학적 염색질의 텍스취의 특징이 중요시 되고 있는, 갑상선의 여포성 암종과 유두상 암종을 대상으로 전자현미경 소견상 염색질 패턴의 차이를 계량적으로 실현하고, 차이가 나는 이유를 검토하기 위하여 본 연구를 시도하였다.

## 재료 및 방법

갑상선의 미소침윤성 여포성 암종 8예와 유두상 암종 10예를 연구대상으로 하였다.

### 1. 표본제작

신선 조직을 1×1×1mm크기 정도의 조직편으로 잘라 4℃에서 2.5% glutaraldehyde로 4시간 고정한 후 1% osmium tetroxide로 1시간 더 고정하여 cacodylate buffer로 세척하였다. 고정된 조직을 ethanol로 탈수시켰고 propylene oxide를 거쳐 epoxy resin으로 포매하였다. Epoxy resin 포매피에서부터 1 $\mu$ m 두께의 절편을 만들어 toluidine blue로 염색하였고 광학현미경으로 관찰하여 병변을 확인하였다. 확인된 병변 부위에서 약 80nm 두께의 절편을 얻어 lead citrate와 uranyl acetate로 이중 염색 후 JEOL 1200EX II 전자현미경으로 가속전압 80kV, 배율 3000배에서 관찰하였다. 각 예당 일정거리 간격으로 무작위 촬영하여 얻은 암종 세포의 전자현미경 사진 10매를 염색질 텍스취의 분석에 이용하였다.

### 2. 염색질 패턴 분석

전자현미경사진의 화상으로부터 화상분석장치(IBAS 2000, Kontron, Germany)의 TV 카메라와 analog-digital 변환기를 통하여 digital grey image를 얻었고 shading 보정을 하였다. Digital grey image의 화소수는 512x512 pixel이었고 각 pixel은 256가지 중의 한가지 grey level로 표시되었다. Digital grey image에서부터 교호적 방법으로 세포질, 핵소체 및 봉입체를 제거하여 대상 핵화상을 추출하였고 최소 및 최대 휘도값을 구하였다. 표본제작에 따른 편차를 제거하기 위하여 최소 및 최대 휘도값을 0 (black)과 255(white)의 휘도값으로 하고 그 사이의 휘도값을 선형화시켜 표준화된 휘도 histogram을 구하였고 평균 및 표준편차를 각각

구하였다.

### 3. 통계분석방법

여포성 암종과 유두상 암종에서 평균 휘도값과 표준편차의 차이를 유의수준 0.05로 설정하여 Wilcoxon의 순위합 검정<sup>8)</sup>으로 조사하였다.

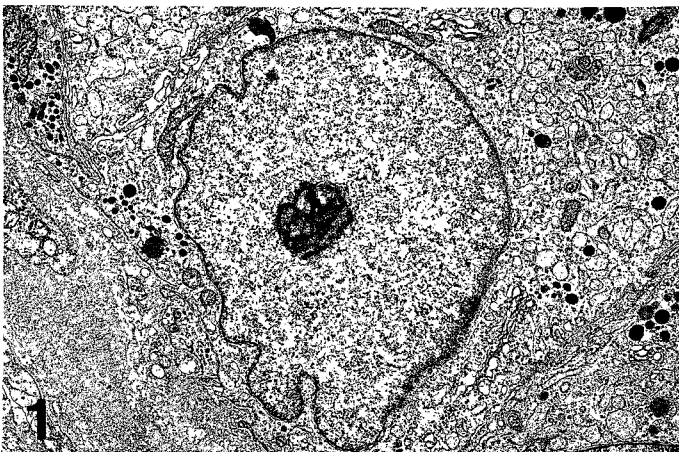
## 결 과

갑상선의 여포성 암종세포는 다각형이었으며 세포질이 풍부하였고 핵은 여포의 주변부에 위치하였다. 암종세포는 연속된 기저막에 의하여 주위 간질과 경계되었다. 세포질은 여포 강내로 소수의 돌기를 내고 있었으며 잘 발달된 Golgi장치, 많은 수의 팽대된 조면내형질망과 폴리솜, 그리고 소수의 용해소체와 사립체를 가지고 있었다. 핵은 대체로 원형이었으며 굴곡을 보이는 경우도 있었으나 굴곡의 정도는 약하였다. 핵소체가 잘 발달되어 있는 경우가 많았으며 세포질 봉입체 등은 관찰되지 않았다. 염색질은 대체로 섬세한 과립상이었고 핵막에 따라 다소의 이염색질이 출현하였다(Fig. 1).

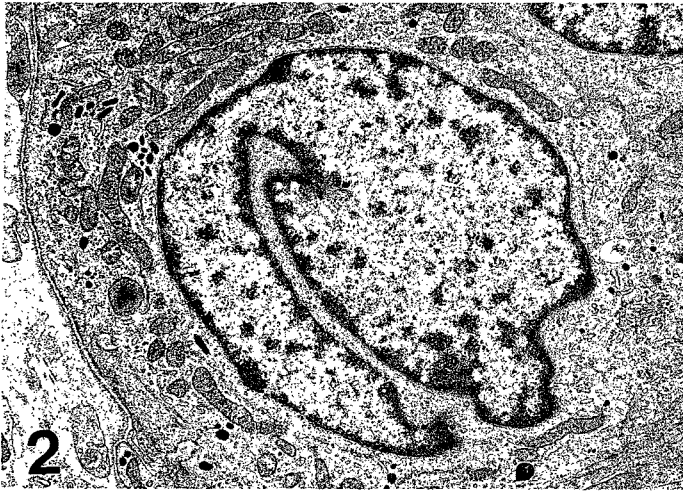
유두상 암종세포는 대체로 여포강을 형성하

지 않았으며 세포질이 풍부하였고 핵은 세포의 중앙에 위치하는 경향이였다. 암종세포는 주위 간질과는 연속된 기저막에 의해 경계되어 있었다. 여포성 암종세포에 비하여 세포질 내에는 대체로 더 많은 수의 사립체와 필라멘트가 출현하였으나 그렇지 않은 세포도 상당 수 있었다. 소수의 조면내형질망과 핵소체를 관찰할 수 있었으며 폴리솜이 풍부하였다. 핵은 대체로 심한 굴곡을 보였고 일부 세포핵은 심한 굴곡 때문에 다엽상으로 관찰되기도 하였으며, 핵내로 세포질이 함입되어 봉입체를 형성하기도 하였다. 핵소체는 잘 발달되어 있는 경우가 많았다. 여포성 세포보다 이염색질이 더 풍부하였고 이염색질은 주로 핵막에 따라 분포되었으나 핵의 중간부에서도 산재되어 출현하였다(Fig. 2).

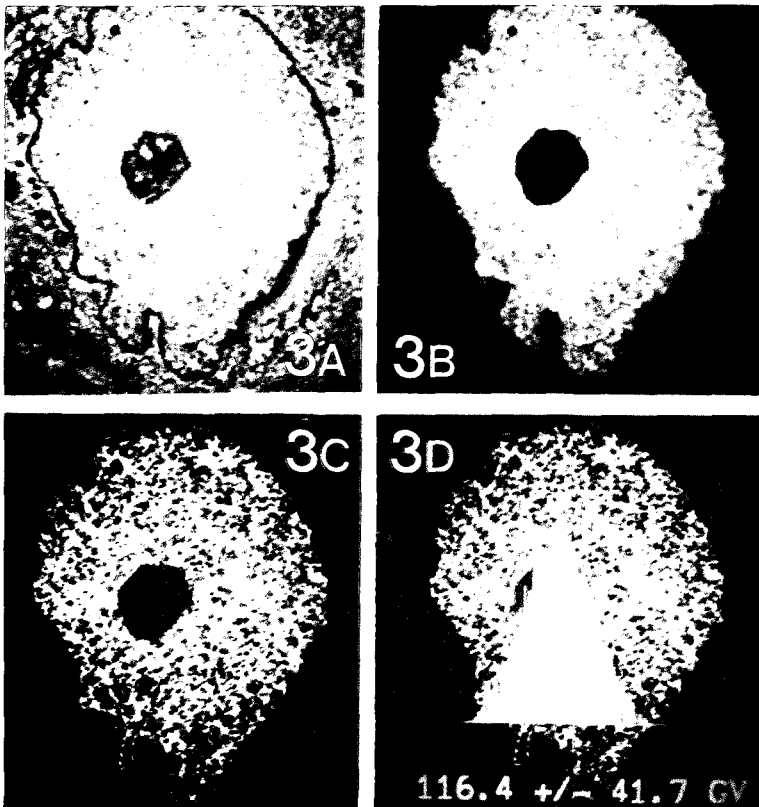
여포성 암종세포의 digital grey image, 핵화상, 휘도분포를 표준화시킨 핵화상 및 그의 휘도분포 histogram은 그림 3과 같다(Fig. 3). 휘도분포 histogram은 1개의 peak를 이루었으며 peak를 중심으로 좌우가 거의 대칭이었고, 최대빈도는 거의 중간 휘도에 위치하였다(Fig. 3D). 여포성 암종세포핵의 평균 휘도는 120.7 이었고 표준편차는 43.0 휘도이었다.



**Fig. 1.** The nucleus of a follicular carcinoma cell has fine chromatin pattern, formed mostly by euchromatin and small amount of heterochromatin along the nuclear membrane. A nucleolus is prominent at the center(Original magnification  $\times 3,000$ ; Final magnification  $\times 8,500$ ).



**Fig. 2.** A deep indentation characterizes the nucleus of a papillary carcinoma cell. Heterochromatin particles, both membrane-bound and free, make chromatin pattern coarse (Original magnification  $\times 3,000$ ; Final magnification  $\times 8,500$ ).



**Fig. 3.** Texture analysis of the nucleus in Fig. 1. A digital grey image is captured by TV camera and digital-analog converter (3A). Interactive editing of the grey image makes the target nuclear image (3B). The target image is standardized (3C) and a grey level histogram is generated (3D). The abscissa represents the grey levels and the ordinate number of pixels. The histogram is Gaussian or near-Gaussian.

고찰

유두상 암종세포의 digital grey image, 핵화상, 휘도분포를 표준화시킨 핵화상 및 그의 휘도분포 histogram은 그림 4와 같다(Fig. 4). 휘도분포 histogram은 흑영역과 백영역에서 2개의 peak를 이루었으며 상호 중첩된 휘도를 감안한다면 각각의 peak는 거의 좌우 대칭이었다. 대체로 백영역의 peak보다는 흑영역의 peak가 중간 휘도에서부터 더 멀리 치우쳐 있었다. 백영역의 peak는 여포성 암종세포핵의 휘도분포 histogram이 갖는 peak보다도 더 백영역쪽으로 치우쳐 위치하였다. 유두성 암종세포핵의 평균 휘도는 115.3, 표준편차는 56.1의 휘도로서 두 종양 사이의 평균은 유의한 차이는 보이지 않았으나 분산은 유의한 차이를 보였다( $p < 0.05$ ).

갑상선의 암종은 여포성 암종과 유두상 암종으로 대별되며 전자는 혈행성 전이를 잘하고<sup>9)</sup>, 후자는 림프성 전이를 잘한다<sup>10)</sup>. 병리조직학적으로 양자는 여포 형성 또는 유두 형성이라는 구조적 특징에 의해 주로 감별된다. 그러나 여포성 암종도 분화도가 낮은 경우에는 여포 형성이 뚜렷하지 않으며 부분적으로는 유두상 성장을 하는 경우도 있고, 유두상 암종도 유두 형성이 뚜렷치 않거나 심지어는 여포성 성장을 하는 경우가 있다<sup>11)</sup>. 따라서 양자의 감별은 구조적 특성 외에도 핵구<sup>12)</sup>, 핵내 봉입체<sup>13,14)</sup>, 염색질 패턴<sup>15)</sup>, 또는 사중체<sup>16)</sup> 등의 출현 여부에 의존하게 된다. 유두상 암종세포핵의 염색질 패

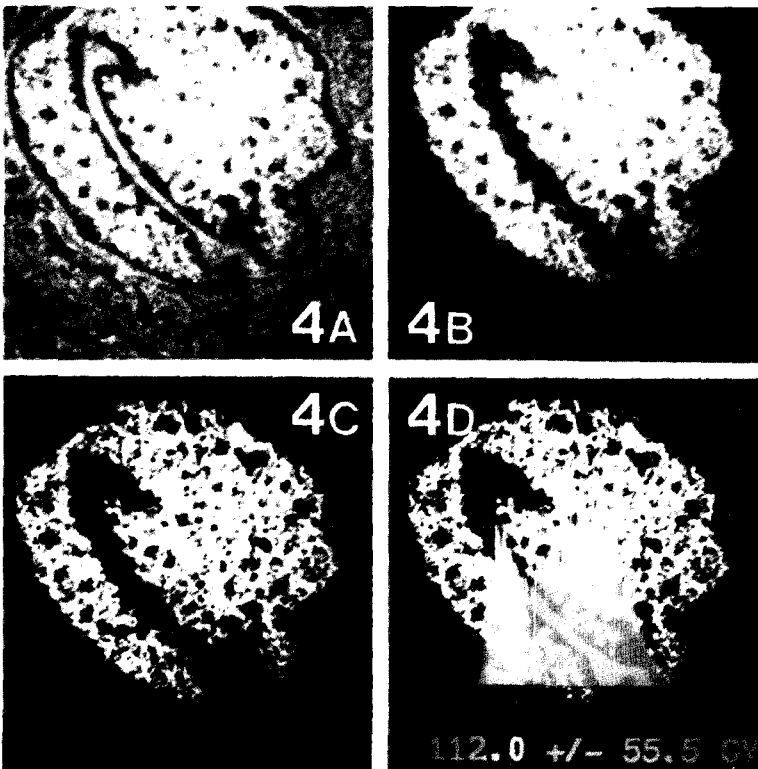


Fig. 4. Texture analysis of the nucleus in Fig. 2. For generation of the images(4A-4D), see the explanation of Fig. 3. The grey level histogram is bimodal, forming one peak(left) at the black zone and the other(right) at the white zone(4D). The peak at the white zone is shifted more to the right compared to the peak of the histogram in Fig. 3D.

턴은 'ground glass' 또는 'optically clear'로 나타나며, 이러한 핵 소견은 핵구나 핵내 봉입체 또는 사중체 등이 반드시 출현하는 것이 아니므로 유두상 암종의 진단에 중요한 기준으로 간주되고 있다. 그러나 이와같은 염색질 패턴이 어떤 기전에 의하여 형성되는지는 아직 알려져 있지 않다.

본 연구의 전자현미경 소견상 감상선의 여포성 암종세포핵과 유두상 암종세포핵은 심한 굴곡, 즉 핵구의 형성 정도에 있어서 큰 차이를 보였다. Johannessen 등<sup>14)</sup>도 전자현미경상 두 종양의 큰 차이는 핵구와 그에 따른 핵내 세포질 봉입체 또는 다염상 핵의 출현이라고 보고하였다. 그러나 본 연구에서 시도한 전자현미경 사진의 화상분석 결과는 핵의 굴곡이라는 기하학적 특성 외에도 두 종양이 염색질 패턴에 있어서 차이가 있음을 보여주고 있다. 여포성 암종세포핵에 비하여 유두상 암종세포핵은 휘도분포 histogram상 peak가 두 개인 bimodal 형태의 휘도분포를 가졌으며 두 peak가 각각 흑영역과 백영역 쪽으로 치우쳐 있었다. 유두상 암종세포핵의 휘도분포 histogram과 전자현미경사진을 비교하여 보면 흑영역의 peak는 이염색질을 표현하며 백영역의 peak는 진염색질과 핵기질을 표현한다고 볼 수 있다. 따라서 유두상 암종세포핵은 여포성 암종세포핵에 비하여 이염색질의 양이 증가되어 있고 진염색질의 양은 상대적으로 감소되어 있음을 알 수 있다. 또한 진염색질 또는 핵기질의 전자밀도가 낮아져 있음을 알 수 있다.

본 연구에서 관찰한 유두상 암종세포핵의 진염색질 또는 핵기질의 전자밀도가 낮아져 있는 현상은 자궁경부의 침윤성 암종세포에서 광학현미경 소견상 관찰되는 parachromatin space의 개방(opening)<sup>17)</sup>과 연관지어 생각할 수 있다. 또한 자궁경부 상피내종양 세포핵의 전자현미경사진을 대상으로 화상분석한 결과, 암종세포로 진행함에 따라 이염색질의 양이 증가하

고 진염색질의 전자밀도가 낮아짐을 보고한 Juhng 등<sup>6)</sup>의 보고와도 연관지어 볼 수 있다. 아직 세포핵의 염색질 패턴이나 분자생물학적 구조에 대한 연구보고가 적어 이염색질의 양이 증가되고 진염색질과 핵기질의 전자밀도가 낮아지는 것이 활성화 또는 종양화 단계에 있는 세포에서 공통적으로 관찰되는 현상인지에 대해서는 알 수 없으며, 유두상 암종세포가 여포성 암종세포보다 더 활성화되어 있다는 증거는 없으나 추구하여 볼 가치가 있다고 사료된다.

핵기질은 생화학적으로 DNA를 추출한 후에 남는 핵내 물질로 정의되어 있으나<sup>18)</sup>, 그 정확한 본태는 알려져 있지 않다. 그러나 핵기질은 염색질의 구조, 유전자의 위치, DNA의 복제와 전사 등에서 중요한 역할을 하리라는 것이 분자생물학의 최근 지견이다. DNA의 복제나 전사는 복제 또는 전사를 위한 기구(machinery)가 유전자 조절부위(regulatory DNA)에 작용하여야 하므로, 진염색질이나 핵기질의 전자밀도가 낮아지는 것을 기구의 접근성의 관점에서 유추해 볼 수 있다. Lim<sup>19)</sup>은 유전자의 전사에 필요한 RNA polymerase II가 주로 진염색질에 소재함을 보고하고 진염색질은 전사기구의 접근이 용이한 상태로 DNA가 이완되어 존재하고 있을 가능성을 시사하였다.

현대의 분자생물학 분야에서도 DNA의 복제나 유전자의 전사조절에 관한 연구는 중심과제의 하나이다. 유전자 조절은 주로 in vitro의 방법이나 transfection에 의한 in vivo assay의 방법에 의하여 연구되고 있다. 즉, footprinting<sup>20)</sup>, poly(ADP-ribosylation)<sup>21)</sup>, DNA에 대한 acridine orange binding<sup>22)</sup>, supercoiling<sup>23)</sup>, DNA 응축<sup>24, 25)</sup>, DNA methylation<sup>26)</sup>, histone acetylation 등을 조사함으로써 유전자 조절을 연구하거나 DNA transfer를 이용하여 전사조절을 연구하는 경향이다. 그러나 염색질 패턴을 DNA의 복사기구나 유전자의 전사기구와 결부시켜 세포핵의 형태를 유지한 상태에서(in

situ) 유전자 조절을 연구하는 것이 궁극적으로 필요할 것이다.

염색질 패턴과 복제 또는 전사활동과의 관계가 구명된다면 병리학적 진단상 중요한 기준 중의 하나인 염색질 패턴을 분자생물학적으로 해석함으로써 염색질 패턴의 변화를 보다 이론적으로 뒷받침하는 진단기준을 제시할 수 있을 것이다. 또한 RNA polymerase II 외에도 복제나 전사조절에 관여하는 물질들의 핵내 topology를 조사함으로써 진행세포의 핵구조에 대한 in vivo 상태에서의 정보를 제공할 수 있을 것이며, in vitro가 아닌 in vivo에서 적용되는 분자생물학적 기법을 찾게되어 현상의 기술에 머물러 있는 형태학(descriptive morphology)을 해석 형태학(inferential morphology)으로 확장시키는 한가지 예가 될 수 있을 것이다.

## 결 론

병리조직학상 염색질 패턴이 감별에 중요한 갑상선의 여포성 암종과 유두상 암종을 대상으로 전자현미경 소견상 염색질 패턴의 차이를 계량적으로 표현하고 차이가 나는 이유를 검토하기 위하여 본 연구를 시도하였다.

갑상선의 여포성 암종과 유두상 암종 세포의 미세구조를 전자현미경으로 관찰하였으며, 전자현미경 사진을 디지털화상으로 변환시킨 후 핵소체와 봉입체 등을 제외한 세포핵만의 화상 정보를 얻었다. 그리고 세포핵만의 디지털 화상을 표준화시킨 후, 핵화상을 구성하는 화소의 휘도 분포와 분산을 조사하여 염색질의 패턴을 해석하였다.

전자현미경 소견상 여포성 암종세포의 핵은 유두상 암종세포의 핵에 비하여 더 규칙적이었고 보다 균질한 텍스처의 염색질을 보였다. 이에 비하여 유두상 암종세포핵은 굴곡을 보였으며 가끔 봉입체를 가졌다. 유두상 암종세포핵에서는 이염색질이 증가되었으며 진염색질의

전자밀도는 더 낮았다. 여포성 암종세포의 핵은 단일 peak의 휘도분포를 보였고 유두상 암종세포핵은 뚜렷한 bimodal 형태의 휘도 분포를 보였다. 휘도 분포의 분산도는 유두상 암종에서 더 컸다.

이상의 소견으로 갑상선의 여포성 암종세포핵과 유두상 암종세포핵은 핵의 굴곡 정도, 봉입체의 출현 차이 외에도 염색질 패턴에 차이가 있음을 알 수 있었으며, 염색질 패턴의 차이는 주로 이염색질의 증가와 진염색질 또는 핵기질의 전자밀도가 낮아지기 때문이라고 추정되었다.

## 참 고 문 헌

1. Kriete A, Schaffer R, Harms H, Aus HM: Computer-based cytophotometric classification of thyroid tumors imprints. *J Cancer Res Clin Oncol* 109:252-256, 1985
2. Tanaka N, Ueno T, Ikeda H, Ishikawa A, Yamachi K, Okamoto Y, Hosoi S: CYBEST Model 4. Automated cytologic screening system for uterine cancer utilizing image analysis processing. *Anal Quant Cytol Histol* 9:449-454, 1987
3. Komitowski D, Schemerzer P, Schmitt B, Muto S: Image analysis of hepatocyte nuclei in assessing di (2-ethylhexyl)-phthalate effects eluding detection by conventional microscopy. *Toxicology* 41:11-19, 1986
4. Komitowski D, Sonka J, Schmitt B, Muto S: Quantitative description of nuclear morphology in assessing resistance of sarcoma 180 to adriamycin. *Cytometry* 8:625-631, 1987
5. Danielsen HE, Farrants G, Reith A: Characterization of chromatin structure by image analysis-A method for the assesment of changes in chromatin organization. *Scanning Micros(Suppl)* 3:297-302, 1989
6. Juhng SW, Yoon JG, Park JT, Lee MC, Choi HR, Cho KH: An image analytical study of chromatin pattern in cervical intraepithelial neoplasia of the uterus. *Chonnam J Med Sci* 5:115-122, 1992

7. Fawcett DW: The Cell. 2nd ed. Philadelphia, WB Saunders Co. 1981, pp 204-225
8. Norusis MJ: Statistical Package for Social Science SPSS Inc. *Chicago*, 1988
9. Massin J-P, Savoie JC, Gamier H, Guiraudon G, Leger FA, Bacourt F: Pulmonary metastases in differentiated thyroid carcinoma. Study of 58 cases with implications for the primary tumor treatment. *Cancer* 53:982-992, 1984
10. Carcangiu ML, Zampi G, Pupi A, Castagnoli A, Rosai J: Papillary carcinoma of the thyroid. A clinicopathologic study of 241 cases treated at the University of Florence, Italy. *Cancer* 55:805-828, 1985
11. Rosai J, Zampi G, Carcangiu ML: Papillary carcinoma of the thyroid. A discussion of its several morphologic expressions, with particular emphasis on the follicular variant. *Am J Surg Pathol* 7:809-817, 1983
12. Chan JKC, Saw D: The grooved nucleus. A useful diagnostic criterion of papillary carcinoma of the thyroid. *Am J Surg Pathol* 10:672-679, 1986
13. Albores-Saavedra J, Altamirano-Dimas M, Alcor-ta-Anguizola B, Smith M: Fine structure of human papillary thyroid carcinoma. *Cancer* 28:763-774, 1971
14. Johannessen JV, Gould VE, Jao W: The fine structure of human thyroid cancer. *Hum Pathol* 9:385-400, 1978
15. Gray A, Doniach I: Morphology of the nuclei of papillary carcinoma of the thyroid. *Br J Cancer* 23:49-51, 1969
16. Klinck GH, Winship T: Psammoma bodies and thyroid cancer. *Cancer* 12:656-662, 1959
17. Naib MN: Exfoliative Cytopathology. 2nd ed. Boston, Little Brown & Co. 1985, pp 15
18. Newport JW, Forbes DJ: The nucleus: structure, function, and dynamics. *Annu Rev Biochem* 56: 535-566, 1987
19. Lim JH: Chromatin pattern and localization of RNA polymerase II in the nucleus of HeLa cells. Doctoral thesis, Chonnam University Graduate School, 1994
20. Pfeifer GP, Riggs AD: Chromatin differences between active and inactive X chromosomes revealed by genomic footprinting of permeabilized cells using DNase I and ligation-mediated PCR. *Genes Dev* 5:1102-1113, 1991
21. Boulikas T: Relation between carcinogenesis, chromatin structure and poly(ADP-ribosylation). *Anticancer Res* 11:489-527, 1991
22. Hiroi M, Moriki T, Taniguchi T, Yamane T, Lehmann R, Hara HTI: Electron microscopic localization of acridine orange binding to euchromatin in human neuroblastoma cells. *Zentralbl Pathol* 137:20-28, 1991
23. Morse RH : Transcribed chromatin. *Trends Biochem Sci* 17:23-26, 1992
24. Izban MG, Luse DS: Factor-stimulated RNA polymerase II transcribes at physiological elongation rates on naked DNA but very poorly on chromatin templates. *J Biol Chem* 267:13647-13655, 1992
25. Hansen JC, Wolffe AP: Influence of chromatin folding on transcription initiation and elongation by RNA polymerase III. *Biochemistry* 31:7977-7988, 1992
26. Weissbach A, Ward C, Bolden A: Eukaryotic DNA methylation and gene expression. *Curr Top Cell Regul* 30:1-21, 1989