

암 세포주의 확산강조영상과 병리학적 관계에 관한 연구

— A Study on the DWI and Pathologic Findings of Cancer Cells —

한서대학교 방사선학과¹⁾ · 국립암센터 영상의학과²⁾

성재구^{1,2)} · 임청환¹⁾

— 국문초록 —

고자장 실험용 자기공명영상장치를 이용하여 인간의 췌장암 세포를 이종 이식한 쥐에서 확산강조영상을 획득하였으며, 동물 실험에서 밝혀진 종양특성과 비교 분석을 하여 보고 현성확산계수영상이 췌장암 이종 이식 모형의 종양세포의 내부 구조에 관하여 비교 분석하고자 한다.

무모 생쥐 13마리에 각각 2개의 종양을 전형적으로 이식한 뒤, 종양의 직경이 5~10 mm를 성장하였을 때 영상화하였다. 7.0T 자기공명영상장치(Bruker, BioSpin, GmbH, Rheinstetten, Germany)를 사용하여 T2강조 영상을 얻었다, 확산강조영상은 single-shot EPI sequence 사용하여 b값을 0, 200, 500, 1,000, 2,000 sec/mm²로 증가하면서 영상을 획득하였다. 종양은 H&E 염색과 CD-31의 면역화학염색을 이용하여 종양의 세포밀도와 미세혈관 밀도, 종양 내 괴사 정도를 평가하였다. 암 세포주에 대하여 연속함수간의 연관성 검사는 스피어만 순위 상관계수(Spearman Rank correlation statistic)를 사용하였으며 연속변수간의 선형 관계성 여부를 구하기 위해 regression model을 적용하였다.

췌장암 세포주의 현성확산계수는 평균 $0.7327 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ 표준편차 $0.1075 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ 였으며, T2영상의 신호강도는 평균 624,656, 표준편차 62,608.5로 나타났다. 췌장암 세포주의 조직학적 분석의 결과 고배율 사진에서 세포의 개수는 평균 122개, 미세혈관밀도는 평균 18개, 종양의 괴사정도는 26.5%였다. 현성확산계수와 종양내의 괴사정도와와의 상관계수가 유의한 관계를 나타냈다($R=0.7417, p < 0.01$). 이와 같이 고자장 실험용 자기공명영상장치를 이용한 췌장암 세포주 이종 이식 쥐의 확산강조영상에서 현성확산계수는 종양 내 괴사 정도 등의 현미경적 구조 변화를 반영하는 대리인자로 사용될 수 있음을 확인하였다.

중심 단어: 확산강조영상, 현성확산계수, 췌장암 세포주

I. 서 론

암은 생물학적 특성이 매우 불균일한 질환군이지만 모두 혈관신생 항진이라는 공통적인 특성을 지니고 있다¹⁾.

*접수일(2011년 7월 31일), 심사일(2011년 8월 17일), 확정일(2011년 9월 4일)
- 이 논문은 2010년도 한서대학교 교내 연구비 지원에 의해 연구되었습니다.

교신저자: 임청환, (356-706) 충남 서산시 해미면 대곡리 360번지
한서대학교 방사선학과
TEL : 041-660-1056, E-mail : lch116@hanseo.ac.kr

따라서 암의 생존과 성장, 전이를 매개하는 혈관신생 현상을 효과적으로 억제할 수 있다면 기존 항암요법의 표적 접근성과 내성, 부작용 등을 해결하는데 도움이 될 수 있다. 현재 혈관신생에 대한 기준으로 이용되고 있는 조직학적 미세혈관 밀도는 직접적인 평가지표이지만 표본추출 오차와 침습성의 제약이 있다²⁾. 이에 비교하여 자기공명영상은 직접적인 지표이면서 임상 연구에서 쉽고 반복적으로 시행할 수 있는 바이오 마커라 할 수 있다. 이중 현성확산계수를 포함한 확산강조영상은 조직의 상태에 따라

일어나는 분자 확산운동의 정도를 수치화 및 영상화하는 기법으로 암세포질과 괴사성 부분 및 종양 신생혈관형성의 정보를 제공한다³⁾. 자기장의 세기가 커지면 영상의 해상도와 신호대 잡음비가 좋아지기에 특히 작은 동물을 대상으로 한 자기공명영상에서는 고자장의 필요성이 더욱 크다. 본 연구에는 7.0T 실험용 자기공명영상장치를 이용하여 인간의 췌장암 세포인 CFPAC-1를 이종 이식한 쥐에서 자기공명영상을 획득하여 최적화된 검사 Protocol을 정립하며, 동물 실험에서 밝혀진 종양특성과 확산강조영상과의 비교 분석을 해보고 현성확산계수영상이 췌장암 이종 이식 모형의 종양 세포 내부 구조에 관하여 어떠한 정보를 제공할 수 있는지 알아보려고 한다.

II. 연구대상 및 방법

1. 연구대상

체중 20~28 g의 흉선샘이 없는 무모(nude) 수컷 생쥐 13마리(각 개체 당 2개의 종양 26개)를 병원체가 없는 조건인 동물 시설에서 멸균된 물과 사료의 섭취를 자유롭게 하였다. 사육실 온도는 20~24℃를 유지시켰고, 12시간 간격의 소등각성 주기(18:00~06:00)를 유지하였다. 동물 실험실 및 실험동물의 관리는 국립보건원(National Institute of Health)의 지침을 준수하며, 국립암센터 동물 실험 윤리위원회(Institutional Animal Care and Committee, IACUC)의 승인 하에 실험되었다.

2. 실험방법

13마리의 쥐의 26개의 췌장암 세포주 CFPAC-1 (American Type Culture Collection, Manassas, VA USA)는 무모 생쥐의 양쪽 옆구리에 피하(subcutaneous)로 췌장암 세포주를 이식 한 후에 종양의 직경이 5~10 mm 정도로 성장하였을 때 MR영상을 획득하였다. 그리고 조직학 분석을 위해 CO₂에 의해 안락사 시켰으며, 조직 슬라이드는 국립암센터 조직학 센터에서 만들어졌다. MR영상은 7.0 T MR장치(Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Germany)를 사용하였으며, 생쥐는 Isofluran gas anesthesia를 이용하여 마취하고, T1-weighted(RARE sequence, Bruker) 영상은 FOV = 3×2.5 cm, Matrix = 256×256, slice thickness = 1.0 mm, TR = 1,300 ms, TE = 9.0 ms로 획득하였다. T2-weighted(RARE se-

quence, Bruker) 영상은 FOV = 3×2.5 cm, Matrix = 256×256 slice thickness = 1.0 mm, TR = 2,500 ms, TE = 36.0 ms로 종양 전체를 횡단면 영상으로 얻었다.

확산강조영상(DWI)은 single-shot EPI sequence로 TR = 2,500 msec, TE = 26 msec, flip angle = 90°, 여기 횟수 = 3, matrix size = 128×96으로 b-values는 0, 200, 500, 1,000, 그리고 2,000 sec/mm²로 종양 전체를 횡단면으로 얻었다. ADC map은 확산강조영상의 정량적 분석을 통해 pixel마다 자동적으로 계산되었다. ADC 값의 측정에는 ROI를 종양의 낭종이나 괴사부분을 제외한 부위에 한 slice당 3번씩 반복 측정하여 평균 ADC 값을 측정하였다(Fig. 1).

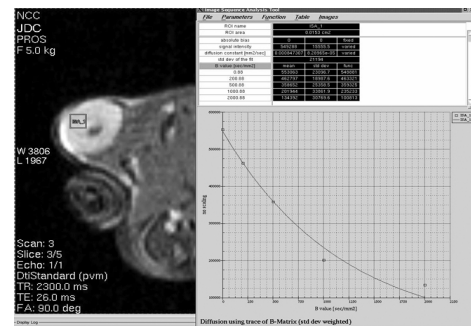


Fig. 1. Consol program show the process of the ADC

종양은 H&E 염색과 미세혈관의 표현을 알아보기 위해서 CD-31에 대한 면역조직화 염색을 하여 종양의 cellularity와 microvessel density(MVD), 종양 내 괴사 정도를 평가하였다(Fig. 2, Fig. 3).

통계학 분석은 MR영상에서 측정되어진 평균 ADC값과 T2 SI(signal intensity)값과 종양의 세포주에 대하여 연속함수간의 연관성 검사는 Spearman correlation statics를 사용하였으며, 연속변수간의 선형 관계성 여부를 구하기 위해 regression model을 적용하였다.

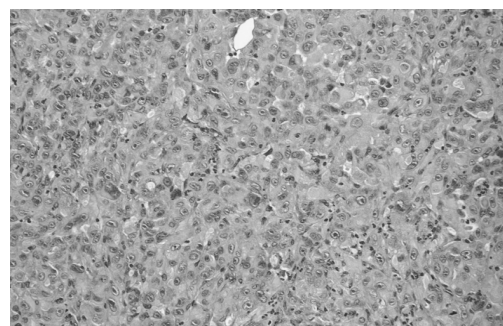


Fig. 2. Pathologic specimen stained with H&E

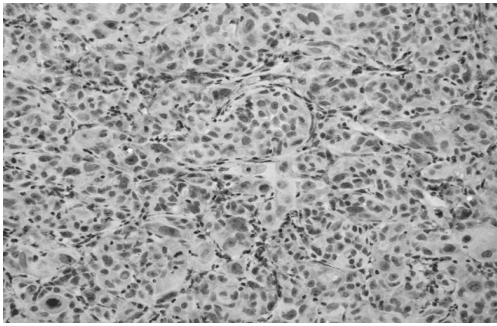


Fig. 3. Immunohistochemical staining for CD31

통계적 유의성은 95%($p < 0.05$)인 경우를 유의성이 있다고 판단하였으며, 모든 분석은 Window 기반 통계 소프트웨어인 STATA 10.0(Stata, College Station, Tx USA; S-PLUS 6.2 Insightful, Seattle, WA USA)을 사용하였다.

III. 연구 결과

1. 확산강조영상과 종양 조직값의 관계

췌장암 세포주의 확산강조영상의 현성확산계수와 조직학적 분석의 비교한 결과 다음과 같다.

췌장암 세포주의 ADC value는 $0.61 \sim 1.01 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ 의 범위에서 평균 $0.7327 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ 표준편차 $0.1075 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ 였으며, T2영상에서 신호강도 값은 468,175 ~ 852,626의 범위에서 평균 624,656 표준편차 62,608.5로 나타났다.

췌장암 세포주의 조직학 분석의 결과 고배율 사진상에서 측정되어진 세포의 개수는 63~275 범위에서 평균 122개이며, 미세혈관밀도는 3~19개 범위에서 18개, 종양의 괴사정도는 0~65% 범위에서 평균 26.5%로 나타났다 (Table 1).

2. 확산강조영상과 췌장암 세포주의 조직분석과의 상관관계

확산 강조영상의 현성확산계수 값과 췌장암 세포주의 조직분석과의 상관관계를 알아본 결과 ADC value와 종양내의 괴사와의 상관관계가 $R = 0.7417$, $p = 0.0001$ 로 나타나 ADC value와 종양내의 괴사와의 상관관계는 유의함을 알 수 있었다.

하지만 ADC value와 종양의 세포밀도, MVD, tumor volume과의 관계는 유의한 상관관계를 나타내지 않았다 (Table 2).

ADC값과 종양내의 괴사의 회귀분석의 선형관계식은 (linear relationship)는 $\text{ADC}(\text{mm}^2/\text{s}) = 0.75 \times 10^{-3} + (0.56 \times 10^{-5} \times \text{tumor necrosis}(\%))$ 로 표현되며 결정계수 $R^2 = 0.697$, $p < 0.001$ 로 나타났다(Fig. 4).

T2 SI와 췌장암 세포주의 cellularity 상관관계가 $R = 0.6914$, $p < 0.001$ 로 유의한 상관관계를 나타냈으며, 회귀분석의 선형관계식은 다음과 같다.

$T2 \text{ SI} = 3.821 \times 10^4 + (1.409 \times 10^3 \times \text{cell count})$ 로 표현되며 결정계수 $R^2 = 0.478$, $p < 0.001$ 로 나타났다(Fig. 5).

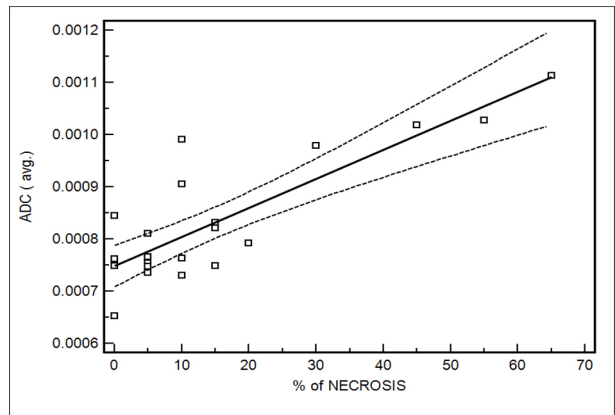


Fig. 4. Scatter plot with a regression line between tumor necrosis(%) and mean ADC value in tumor. There was a linear relationship between the ADC value and tumor necrosis ($R^2 = 0.697$, $p < 0.001$).

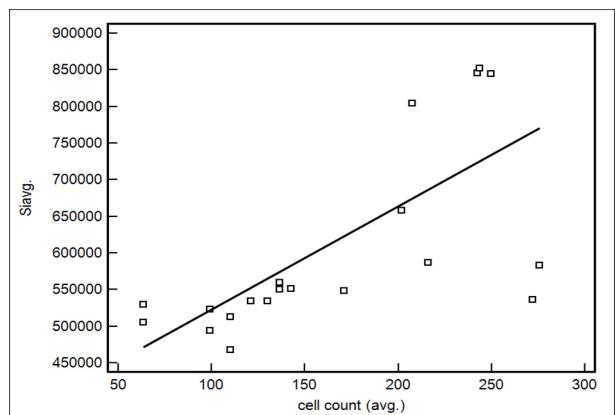


Fig. 5. Scatter plot with a regression line between cellularity and mean T2 SI in tumor ($R^2 = 0.478$, $p < 0.001$).

Table 1, Tumor characteristics of DW MR and pathologic specimen

	Mean value	Range	SD
DW MR parameter			
Mean ADC ($\times 10^{-3}$ mm ² /s)	0.732	0.61 ~ 1.01	0.107
Mean T2SI	624,656	468,75 ~ 852,626	62,608.5
Pathologic specimen			
Long diameter(mm)	5.226	3.44 ~ 7.50	
Cell count(Number)	122	63 ~ 275	
MVD(Number)	18	3 ~ 19	
Necrosis(%)	26.5	0 ~ 65	
Volume(mm ³)	98.18	6.18 ~ 114.26	

Table 2, Correlation coefficients between DW MR parameters and pathologic findings

	Mean ADC ($\times 10^{-3}$ mm ² /s)	Mean T2SI
Cellularity	0.159 (p=0.50)	0.691 (p=0.00004)*
MVD	0.208 (p=0.352)	0.246 (p=0.270)
Necrosis	0.741 (p<0.0001)*	0.300 (p=0.1748)
Volume	0.777 (p=0.724)	-0.150(p=0.4924)

IV. 고 찰

확산강조영상에서 현성확산계수는 단순히 새로운 음영 대조를 만드는데 그치지 않고, 오차발생의 근원주에 하나 인 측정시간을 줄이면서 계산되는 각 영상 화소들의 확산 계수 값의 정확성을 개선시키며, 이를 이용한 인체의 질병 진단에 적용 시 병변에 의해 변화된 조직의 특성을 조직검사처럼 정량적으로 분석할 수 있게 한다. 즉 조직의 특성 분석의 도구로서 이용될 수 있다⁴⁾.

암은 생물학적 특성이 매우 불균일한 질환군이지만 모

두 혈관신생 항진이라는 공통적인 특성을 지니고 있다¹⁾. 즉 암은 세포가 백여 개 늘어날 때마다 새 혈관도 생겨야 성장을 지속할 수 있다. 따라서 암의 생존과 성장, 전이를 매개하는 혈관생성 현상 및 종양의 특징을 파악한다면 암의 성장을 억제할 수 있을 것이다⁴⁾. 본 실험에서는 현성확산계수와 MVD(microvessel density), 종양 내 괴사 정도를 비교하고자 하였다. 최근 일부 연구자들에 의해 발표된 유방암환자와 전립선암환자를 대상으로 한 논문에서는 종양의 cellularity와 ADC값 간에 역 상관관계가 있다고 보고되었다⁹⁾. 하지만 7.0T 고자장 실험용 자기공명

영상장치를 이용하여 종양을 이중 이식한 본 실험에서는 상관관계가 없는 것으로 나타났다. 이는 환자의 경우 비 종양 세포 및 조직, 그리고 섬유조직, Stromal cells 등이 확산에 제한적으로 영향을 주었을 것으로 사료된다. 또한 종양의 양상에 따라 ADC값이 넓은 분포를 보이기 때문에 서로 종양의 양상 값들이 겹치게 되는 부분이 많게 되었을 것으로 사료된다.

이처럼 조직 안에서의 확산은 세포막, 섬유조직, macro molecules 같은 많은 조직 구성요소들과의 교차나 상호작용에 의해 결정되며 확산을 현미경적 수준으로 관찰하기 위해선 더 강한 자기장을 이용하면 가능하지만 위험성으로 인해 환자를 대상으로 하기는 어려운 현실이며 동물실험을 통해 실험이 가능하다⁸⁾. 본 실험 결과와 같이 고자장 실험용 자기공명영상장치를 이용한 종양의 현성확산계수는 암 조직 내 괴사 정도와 연관성을 보였으나 조직 내 세포밀도, 현미경적 미세혈관밀도 등과는 연관성을 보이지 않았다.

미세혈관밀도를 형태학적으로 관찰하기 위하여 CD-31 등의 혈관내피세포의 표면 항원을 이용하였는데 일반적인 경우 CD-31은 조직 내 혈관 내피세포에만 반응하는 특성을 보인다. 본 실험에도 미세혈관밀도와는 연관성을 보이지 않았다. 이는 '허숙희' 등의 연구와 일치하는 결과이다¹⁾.

본 실험의 제한점으로는 종양 세포주를 다양화하여 비교하지 못해 고밀도 세포질 종양과 저밀도 세포질 종양의 현성확산계수의 비교 분석이 이루어지지 못했다는 점과 종양 내 괴사 정도에 따른 현성확산계수와의 관계를 비교하지 못한 점이다.

V. 결 론

본 연구에서는 고자장 실험용 자기공명영상장치를 이용하여 무모 생쥐에 취장암 세포주를 주입하여 확산강조 영상을 얻었으며 현성확산계수와 종양 조직의 세포 밀집도, 괴사 정도 및 혈관내피성장인자의 발현과의 연관성을 밝히고자 하였으며 다음과 같이 나타났다.

첫째, 취장암 세포주의 평균 현성확산계수의 값은 $0.61 \sim 1.01 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ 의 범위에서 평균 $0.7327 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$, 표준편차 $0.1075 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ 였으며, mean T2SI는 468,175 ~ 852,626의 범위에서 평균 624,656 표준편차 62,608.5로 나타났다.

둘째, 취장암 세포주의 현성확산계수와 종양내의 괴사 정도와의 상관관계가 유의한 상관관계를 나타냈다(R =

0.7417, $p = 0.0001$).

이와 같은 결과 확산강조영상에서 현성확산계수의 측정치는 종양 내 괴사 정도를 나타낼 수 있다는 것을 밝혀냈으며 이는 임상에서 전향적 수술 전 영상과 수술 후 조직 간의 비교의 문제점을 해결해 줄 수 있을 것이라 사료된다.

이로 인해, 현성확산계수 측정치는 종양 내의 현미경적 구조변화를 반영하는 대리인자로 사용될 수 있으며, 암세포의 특성을 평가하여 정확한 진단과 예후 판정, 치료방향 설정과 반응 평가 등에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. 허숙희, 간세포암의 세포밀집도 세포분화도 및 혈관내피성장인자의 발현 확산강조영상과의 연관성, 전남대학교 박사학위논문, pp.28~29, 2007
2. 문우경, 분자자기공명영상, 대한의사협회지, pp.133~138, 2004
3. 김우석, 이동엽, 후두 편평세포암종에서 Basic Fibroblast Growth Factor와 CD-31의 발현양상, 대한이비인후과학회지, 42:pp.744-749, 1999
4. 이진희, 3.0T MR기기를 이용한 확산강조 영상에서 b value의 증가에 따른 뇌의 신호강도의 변화, 대한방사선의학회지, pp.448~449, 2003
5. 서형석, 뇌신경질환 고자장 자기공명영상, 대한방사선의학회지, 12:53, pp.1086-1092, 2010
6. 대한자기공명의과학회, 자기공명영상학, 일조각, pp.93~125, 2008
7. 대한임상병리교수협회의, 조직검사학, 대학서림. pp.111~118, 2006
8. Provenzale JM, Mukundan S, Barboriak DP. Diffusion-weighted and perfusion MR imaging for brain tumor characterization and assessment of treatment response. Radiology. 239(3), pp.632-649. 2006
9. Woodhams R, Kakita S, Hata H, Diffusion-weighted imaging of mucinous carcinoma of the breast: evaluation of apparent diffusion coefficient and signal intensity in correlation with histologic findings. 193(1), pp.260-266, 2009
10. Wang XZ, Wang B, Gao ZQ, Diffusion-weighted imaging of prostate cancer: correlation between apparent diffusion coefficient values and

tumor proliferation, Journal Magnetic Resonance Imaging. 29(6), pp.1360–1366, 2009
11. Bealieu, The basis of anisotropic water diffusion

in the nervous system – a technical review, pp.435–455, 2002

• Abstract

A Study on the DWI and Pathologic Findings of Cancer Cells

Jae-Gu Seong^{1,2)} · Cheong-Hwan Lim¹⁾

¹⁾Department of Radiological Science, Hanseo University ·

²⁾Department of Radiology, National Cancer Center

In this study, we evaluated diffusion weighted imaging (DWI) to investigate whether the DWI parameters can predict characteristic parameters on pathologic specimens of tumor or not. CFPAC-1 was injected subcutaneously on the back flank of athymic nude mice (n=13) then two tumors were initiated on each mouse (2×13=26 tumors). The mice were sacrificed to make specimen immediately after initial MR imaging then were compared with the MR image. A dedicated high-field (7T) small-animal MR scanner was used for image acquisitions. A T1 and T2 weighted axial image using RARE technique was acquired to measure the T2 values and tumor size. DWI MR was performed for calculating ADC values. To evaluate tumor cellularity and determine the levels of MVD, tumor cells were excised and processed for H-E staining and immunostaining using CD31. T2 values and ADC values were computed and analyzed for each half of the tumors and compared to the correlated specimens slide. Median ADC within each half of mass was compared to the cellularity and MVD in the correlated area of pathologic slide. The mean of ADC value is $0.7327 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ and standard deviation is $0.1075 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$. There is a linear relationship between ADC value and tumor necrosis ($R^2=0.697$, $p < 0.001$). DW image parameters including the ADC values can be utilized as surrogate markers to assess intratumoral neoangiogenesis and change of the internal structure of tumor cells.

Key Words : Diffusion weighted image, Apparent diffusion coefficient, CFPAC-1