

결직장암 환자의 예후평가에서 종양의 맥관신생이 가지는 의의에 대한 연구

동아대학교 의과대학 외과학교실 및 해부병리학교실*

현문수 · 최홍조 · 정갑중 · 김상순 · 홍숙희*

= Abstract =

Tumor Angiogenesis as a Prognostic Assay for Patients with Colorectal Carcinoma

Moon Soo Hyun, M.D., Hong Jo Choi, M.D., Ghap Joong Jung, M.D.,
Sang Soon Kim, M.D. and Sook Hee Hong, M.D.*

*Departments of Surgery and *Pathology, Dong-A University
College of Medicine, Pusan, Korea*

The growth and maintenance of solid tumors are dependent on new capillary ingrowth: a process called "angiogenesis." Thus, after a new tumor has attained a small size of a few millimeters in diameter (about 10^6 cells), further expansion of the tumor-cell population requires the induction of new capillary blood vessels. These new vessels also increase the opportunity for hematogenous or lymph node metastasis. Thus this study was designed to examine the microvessel count at the invasive margin in colorectal carcinoma to determine how angiogenesis correlates with clinicopathologic factors and prognosis. Paraffin-embedded tissues from 127 patients with primary colorectal carcinomas that had been completely removed were retrieved and analyzed for angiogenesis. Vessels were immunostained with anti-factor VIII polyclonal antibody, and areas with the most discrete microvessels were counted in a $200\times$ field, which were defined as angiogenesis score (AS).

The mean AS for anti-factor VIII antibody in this study was 55 ± 08 ; therefore, cases were classified into two subgroups: AS high group ($n=67$), for which AS was greater than 55 and AS low group ($n=60$), for which AS was equal to 55 or less. There were no significant intergroup difference regarding sex ratio, histologic grade, depth of invasion, or lymphatic invasion. AS was, however, significantly related to tumor size, venous invasion, lymph node metastasis, and liver metastasis ($P=0.000$, $P=0.001$, $P=0.021$, and $P=0.004$, respectively). The incidence of high AS group in Astler-Coller D was significantly greater than that in Astler-Coller A and B, and Astler-Coller C ($P<0.05$, respectively). The recurrence rate in high AS group was 32.0%, which was, though statistically insignificant, higher

than that in low AS group(17.2%). The 3 year survival rates of high AS group were significantly ($P=0.004$ both for overall cases and curatively-resected ones) worse than those of low AS group.

This study suggests that the growth of colorectal carcinoma is dependent on ingrowth of new blood vessels, and that angiogenesis assessed by the microvessel count using immunohistochemical staining is an important predictor of tumor behavior and may identify patients at higher risk for recurrence and early death.

Key Words: Colorectal carcinoma, Tumor angiogenesis, Prognosis

서 론

한국인의 결직장암의 발생 빈도는 서구에 비해서는 적지만 매년 증가하는 추세에 있는데, 특히 문화 수준의 향상, 경제 성장과 더불어 식생활이나 습관이 점차 서구화됨에 따라 결직장암의 발생률과 그에 의한 사망율이 점차 증가하는 것으로 보고되고 있다^{1,3-6)}. 1993년 통계를 토대로 보면 인구 10만명당 10명의 빈도로 발생한다고 보고되고 있으며²⁾, 미국에서는 1996년 한해동안 133,500예의 새로운 결직장암이 발생하며 약 54,900명이 이 질환으로 사망할 것으로 예상된다고 한다³⁸⁾.

종양학적 측면에서 여러 인자들이 결직장암 환자의 예후와의 관계를 평가하기 위해 연구되어 왔다. 현재 결직장암 환자의 예후를 예측하고 보조요법의 선택에 도움이 되기 위한 여러 임상 및 병리학적 기준 중 50여년동안 본질적으로 변화되지 않고 이용되고 있는 Dukes씨 병기분류법¹²⁾이 가장 보편적으로 이용되고 있으며, 주요 사망 원인으로서는 간 또는 폐로의 혈행성 전이와 다발성 임파절 전이가 거론된다.

고형성 종양에서 종양이 성장하기 위해서는 맥관신생(angiogenesis)이라는 과정이 필수적으로 요구된다고 한다⁹⁾. 즉 어떠한 새로운 종양이 발생하여 수 millimeter의 작은 크기(약 10^6 개의 세포수에 해당)에 도달하면 이 종양이 계속 성장하기 위해서는 모세혈관의 신생이 요구된다. 그리고 이

러한 신생 혈관은 종양 세포들이 순환내에 유입될 수 있는 기회를 증가시킴으로서 종양세포의 전이에도 관여한다고 한다^{31,33)}. 뿐만 아니라 증식하는 혈관 내피세포는 종양의 성장을 촉진하는 성장인자들과도 관계가 있는 것으로 여겨지고 있다¹⁵⁾. 최근까지 맥관신생에 관여하는 물질에 대한 연구가 매우 활발하게 진행되고 있으나 종양에서 혈관신생이 유발되는 기전은 아직도 명확히 밝혀지지 않고 있다. 그러나 많은 고형 종양에서 맥관 형성이 관찰되지 않으며 확산에 의해서 영양과 대사물의 교환이 이루어지는 혈관전상(prevascular phase)에서 혈관신생이 활발하게 진행되는 혈관상(vascular phase)으로 이행됨으로써 종양의 성장이 급속히 진행되고 전이의 가능성이 높아지는 사실은 명백히 밝혀졌다^{17,18)}.

최근의 면역조직화학적 방법을 이용한 여러 연구를 통해 맥관신생의 정량적 밀도와 여러 종양-피부 흑색종⁴²⁾, 유방암^{26,46,47)}, 전립선암⁴⁵⁾, 폐암^{35,51)}의 예후는 서로 통계학적으로 유의성이 있다고 보고되고 있다. 결직장암에서도 최근의 한 보고⁴²⁾에 의하면 혈관신생과 종양의 재발 및 예후는 서로 통계학적 유의성이 있다고 한다.

종양의 생물학적 특성 즉 종양의 악성도(malignancy potential)에 대한 평가는 임상 종양학적 관점에서 대단히 큰 의의를 가진다고 할 수 있다. 즉 이를 통하여 개개 종양의 생물학적 특성을 평가함으로써 비록 동일한 병기를 나타낸 종양들일지라도 임상적 경과 또는 예후는 서로 상이할 수 있음을 예측할 수 있으며, 따라서 보다 체계적인

추적과 적극적인 보조요법을 결정하는데 실질적인 도움이 될 수 있을 것이다. 종양의 생물학적 공격도를 평가하는 방법으로서 종양의 증식능(proliferative activity)을 파악하는 방법들^{6,25,51)}이 현재까지 가장 보편적으로 이용되어 오고 있는데, 이러한 관점에서 볼 때 정량적 검사를 통한 종양의 맥관신생에 대한 정보도 종양의 임상적 경과 즉 재발과 전이의 위험을 예측하는데 도움이 될 수 있을 것이다.

저자들은 맥관신생에 대한 정량적 평가가 결직장암의 악성도를 예측하는데 도움을 줄 수 있을 것이라는 가설을 입증하기 위해, 혈액 응고인자 VIII에 대한 면역조직화학적 연구를 시행하여 맥관신생의 밀도와 기존 임상 및 병리학적 인자들과의 상관 관계를 조사하고 또한 맥관신생의 정량적 정도가 전이, 재발, 그리고 예후에 미치는 영향을 후향적으로 분석하였다.

연구대상 및 방법

1) 연구대상

1990년부터 1994년까지 결직장암으로 동아대학교 병원 일반외과에서 외과적 절제술을 받은 127명의 환자와 해부병리과에 보관중인 이들의 외과 병리표본을 대상으로 연구를 시행하였으며 임상적으로 타 부위에 악성 종양이 동반된 환자, 술전 화학 요법 또는 방사선 요법을 받은 환자 그리고 술후 결직장암과 직접적인 관계가 없는 원인으로 사망한 환자는 연구대상에서 제외시켰다.

환자의 성별분포는 남자 73예, 여자 54예이었고 평균연령은 56세이었다.

조직 절편은 종양의 heterogeneity를 감안하여 종양세포의 침습 변연부(invasive tumor margin)를 선택하여 hematoxylin-eosin 염색과 면역조직화학적 염색을 시행하였다.

모든 연구대상의 종양은 우선 hematoxylin-eosin 염색하에서 검사를 시행하여 모두가 선암(adenocarcinoma)임을 다시 확인하였으며 이들을 다시 세계 보건기구 기준²⁹⁾에 의거하여 분화형(well dif-

ferentiated), 중등도 분화형(moderately differentiated), 미분화형(poorly differentiated) 그리고 점액성(mucinous) 선암으로 분류하였다. 그리고 혈관 또는 임파관 침습의 유무를 자세히 조사하였으며, 종양의 침습 범위 및 전이 유무는 Astler-Coller 병기 분류법⁸⁾을 기준으로 하였다.

2) 면역조직화학적 염색

Immunoperoxidase procedure²⁹⁾(Vectastatin Elite ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)의 원리를 적용하여 결직장암의 혈관에 대한 면역 염색을 시행하였는데 이때 factor VIII-related antigen/von Willebrand's factor(F8RA/vWF)에 특이한 antifactor VIII polyclonal antibody(Dako Polyclonal; Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA)를 1차 항체로 사용하였다.

우선 paraffin 포매괴를 4 μ m 두께로 잘라 xylene에서 paraffin을 제거하고 일련의 ethanol을 이용한 함수 과정을 거친 후 methanol에서 0.3% 과산화수소와 함께 상온에서 30분간 배양시켜 endogenous peroxidase activity를 차단시킨다. 그 다음 비특이적 항체 결합을 최소화하기 위해 표본을 10%의 normal rabbit serum에 상온에서 30분간 배양시킨 후, 1 : 200으로 희석시킨 antifactor VIII polyclonal antibody에 4°C에서 하룻밤 동안 배양시킨다. 다음날 표본을 상온으로 회복시킨 후 phosphate-buffered saline(PBS)에서 10분간 세차레 세척한다. 표본을 다시 1 : 200으로 희석된 biotinylated rabbit antimouse immunoglobulin G(IgG)에 30분간 배양시킨 다음 PBS에 세차레 세척한 후 avidin-biotin peroxidase reagent에 30분간 반응시킨다. 그후 표본을 PBS에 15분간 세차레 세척하고, 마지막으로 diaminobenzidine과 1% 과산화수소가 포함된 PBS와 10분간 반응시킨 후, hematoxylin을 이용하여 대조 염색을 시행하여 봉입한 후 현미경으로 검경하였다.

염색 방법의 정확성 여부를 검증하기 위해 대조군 표본을 제작하였으며 양성 대조군으로서 편도선 조직을 이용하여 동일한 일차 항체를 이용

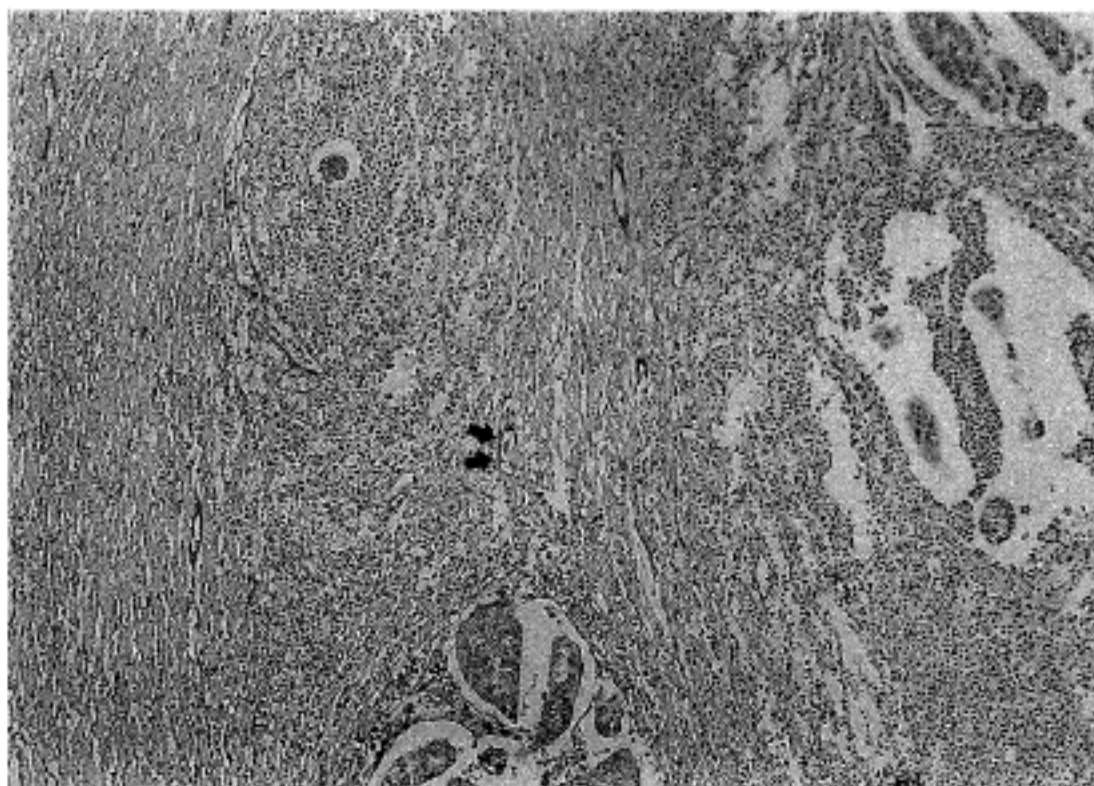


Fig. 1. Immunohistochemical staining for factor VIII-related antigen(F8RA) in cancer tissue of the colorectum. Double arrows point to a higher vascular spot at a marginal elevation and a downward slope toward a cancerous ulceration in the colorectal tumor(original magnification $\times 100$).

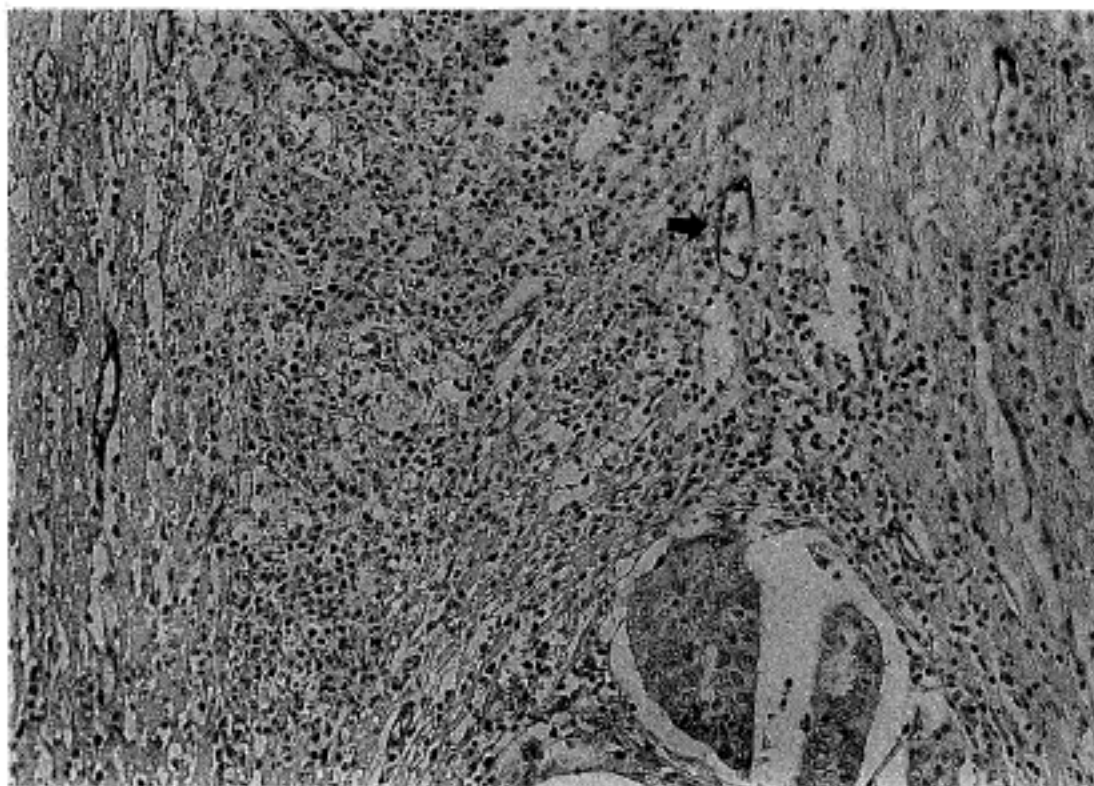


Fig. 2. Immunohistochemical staining for factor VIII-related antigen(F8RA) in cancer tissue of the colorectum. Microvessels are represented by brown capillaries or small clusters, which stand out sharply from other tissue. The arrows point to a few representative capillaries(original magnification $\times 200$).

하여 조직화학적 염색을 시행하였으며, 음성 대조군으로서는 일차 항체를 사용하지 않고 대신에 rabbit serum을 이용하였다. 대조군 염색은 10개의 종양을 조직 염색할 때마다 시행하였다.

3) 평가

항원 발현에 대한 조직 표본의 판독은 환자의 임상 및 병리학적 정보를 모르는 두사람에 의해 이루어졌는데 두사람이 동시에 점안경이 두개인 현미경하에서 동일한 시야를 결정, 판독하면서 두사람의 동의하에서 혈관의 수를 계산하는 방식으로 진행되어졌다.

우선 저배율($\times 100$)의 광학 현미경 하에서 종양의 변연부 침습 병소 중 미세혈관 분포의 밀도가 가장 높은 곳(=hot spot)을 선택한 후(Fig. 1) 이 부위를 200배율(대물 $\times 20$, 대안 $\times 10$; $0.785 \text{ mm}^2/\text{field}$)하에서 염색된 혈관의 수를 계산하였다. Hot spot의 분포는 이론적으로는 종양 침습부의 어느 곳에서도 관찰이 가능하나 실제로는 종양의 변연부에서 가장 두드러졌다. 양성으로 염색된 혈관 내피 세포는 붉은 갈색(reddish brown)으로 관찰되는데, 이때 갈색으로 염색되는 어떠한 단일 세포 또는 세포 집단도 주위 혈관, 세포 그리고 결합 조직 구조와 명확히 구분되기만 하면 하나의 양성 혈관으로 간주하였으며(Fig. 2), 200배의 배율하에서 최소한 hot spot의 5곳을 무작위로 선택하여 혈관의 수를 계산하여 이를 면적 1.0 mm^2 당 혈관수로 환산한 값을 종양의 맥관신생 점수(angiogenesis score, 이하 AS)로 간주하였다. 임상 정보는 환자의 병록지, 암등록 기록지와 개인적 면담과 전화 통화를 통해서 수집되었으며, 병리 기록을 통하여 종양의 크기, 위치, 분화도, 장벽의 침습 범위 그리고 혈관 및 임파선 침습 등과 같은 종양의 특성을 상세히 조사하였다.

4) 분석 및 통계학적 처리

맥관신생 점수와 임상·병리학적 인자 사이의 관계는 두군간의 비교일 때에는 Mann-Whitney U test를 그리고 세개 이상의 군사이에서의 비교일

때에는 Kruskal-Wallis test를 이용하여 유의성을 검정하였다. 맥관신생 점수에 따른 재발률의 차이도 chi-square test를 통하여 검정하였으며, 생존 곡선은 Kaplan-Meier 법을 이용하여 계산하여 log rank test로써 분석하였다. 통계 처리는 SAS/STAT 6.08을 이용하여 시행되어졌으며 $P < 0.05$ 인 경우를 통계학적 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결 과

1) 맥관 신생 밀도와 임상·병리학적 인자와의 관계

총 127예의 결직장암 환자에서의 평균 맥관신생 점수는 55 ± 08 이었다. 저자들은 이 평균값을 기준으로 고 맥관신생군(high angiogenesis score group)과 저 맥관신생군(low angiogenesis score group)으로 나누어 이들 두군간에서 여러 임상 및 병리학적 인자, 즉 남녀성비, 종양의 크기, 조직학적 분화도(well, moderate, poor), 장벽의 침습정도(T1, T2, T3, T4), 임파관 침습유무, 종양내 혈관 침습 유무, 임파절 전이의 유무, 간전이의 유무의 빈도별 차이가 통계학적 유의성이 있는지를 조사하였다(Table 1). 고 맥관신생군은 67예 그리고 저 맥관신생군은 60예로 분류되었으며, 두 군간에서 남녀 성비, 조직학적 분화도, 종양의 장벽 침습정도, 임파관 침습유무의 분포차이는 통계학적으로 유의성이 관찰되지 않았으나, 종양의 크기, 종양내 혈관 침습유무, 임파절 전이 유무 그리고 간 전이 유무에 대한 두군간의 분포의 차이는 통계학적 유의성이 확인되었다(각각 $P=0.000$, $P=0.001$, $P=0.021$, $P=0.004$).

2) 맥관 신생밀도와 Astler-Coller 병기와의 관계

Astler-Coller 병기 분류를 기준으로 환자를 임파절 전이가 없는 A와 B, 임파절 전이가 확인된 C, 그리고 타장기 전이가 관찰된 D의 세군으로 나누어 이들 세군에서의 고 맥관신생군과 저 맥관신생군의 분포 차이를 관찰한 결과, D병기군에

Table 1. Clinicopathologic factors and angiogenesis score

	Angiogenesis score		P
	High(n=67)	Low(n=60)	
Mean age ± SD(yrs)	56.23 ± 11.65	56.05 ± 12.61	0.930
Sex			
Male	36	37	0.366
Female	31	23	
Tumor size(cm)	4.89 ± 1.63	7.03 ± 1.84	0.000
Histologic grade			
Well	51	37	0.121
Moderate	13	13	
Poor	2	5	
Mucinous	1	5	
Depth of invasion			
≤ T1	4	1	0.455
T2	9	9	
≥ T3	54	50	
Lymphatic involvement			
Negative	47	34	0.115
Positive	20	26	
Venous involvement			
Negative	63	29	0.001
Positive	5	30	
Lymph node metastasis			
Negative	40	20	0.021
Positive	31	36	
Liver metastasis			
Negative	66	48	0.004
Positive	2	11	

SD=standard deviation

서의 고 맥관신생군의 빈도가 A, B병기군과 C병기군에서 보다 유의하게 높았으나, A, B병기군과 C병기군사이에서의 고 맥관신생군의 빈도차이는 통계학적으로 의의는 없었다(Fig. 3). 즉 D병기군 18예중 14예(77%)가 고 맥관신생군으로 분류되어 A, B병기군의 55예 중 19예(35%) 및 C병기군의 54예중 27예(50%)에 비하여 통계학적으로 월등히 높았다(각각 $P < 0.05$).

3) 간전이와 임상·병리학적 인자 및 맥관신생과의 관계

Table 2는 술전 및 술중 진단된 간전이의 유무와 종양의 특성과의 관계를 나타낸 것이다. 종양의 크기는 간전이가 동반되었던 예에서는 평균 7.61 ± 1.02 cm, 간전이가 없었던 예에서는 평균 5.70 ± 2.02 cm로서 간전이유무와 종양의 크기는 서로 통계학적 유의성이 관찰되었으며($P=0.000$), 임파관 및 혈관 침습 그리고 임파절 전이의 빈도 차이도 양군간에 차이가 있어 간전이가 있었던

군에서 그 빈도가 통계학적으로 유의하게 높았다 (각각 $P=0.014$, $P=0.000$, $P=0.001$). 평균 맥관신생 점수도 간전이군에서 75.76 ± 15.33 , 간전이 없이 있던 군에서 53.14 ± 24.50 으로서 간전이군에서 의

의있게 높은치를 나타내었다($P=0.002$).

4) 맥관신생 밀도와 재발과의 관계

127예중 114예에서는 근치적 목적하에 수술이 시행되어 졌다. 저자들은 이들을 역시 평균 맥관신생 점수를 기준으로 고 맥관신생군과 저 맥관신생군으로 분류하여 이들 군 사이의 재발률 및 재발 부위의 차이를 분석하였다(Table 3). 재발률은 고 맥관신생군에서 50예중 16예로 32.0% 그리고 저 맥관신생군에서 64예중 11예로 17.2%로서 이들 두군사이에서의 재발률은 거의 2배 차이가 났으나 통계학적 유의성은 없었다($P=0.06$). 그리고 전이 유형별 차이도 고 맥관신생군에서 혈행성 전이 경로인 간, 폐 그리고 골에로의 전이가 16예중 10예로 62.5% 이었던 반면 저 맥관신생군에서는 11예중 4예 36.4%로서 고 맥관신생군에서 혈행성 전이에 의한 재발률이 높았으나 통계학적 유의 수준에는 미치지 못하였다($P=0.06$).

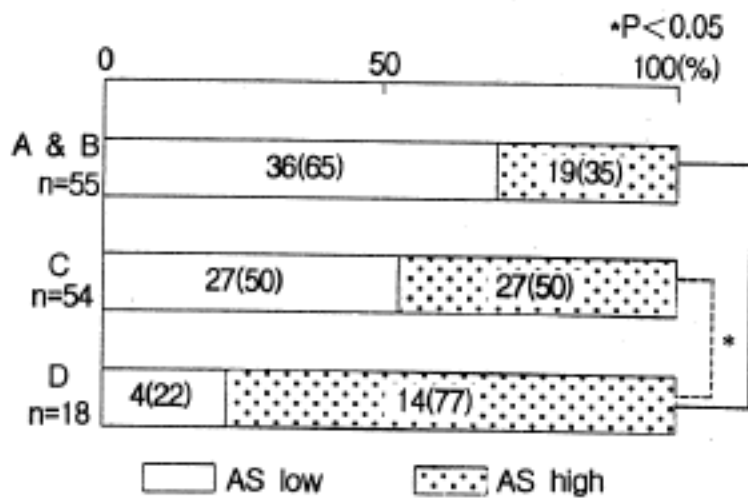


Fig. 3. Angiogenesis density and Astler-Coller staging. Astler-Coller D disease showed a significantly greater incidence of high AS(77%) than either Astler-Coller A and B, or C disease(35%, 50%, $P<0.05$).

Table 2. Liver metastasis and clinicopathologic factors

	Liver metastasis		
	Negative(n=114)	Positive(n=13)	
Tumor size \pm SD(cm)	5.70 \pm 2.02	7.61 \pm 1.02	0.000
Depth of invasion			
< T1	5	0	0.303
T2	17	1	
\geq T3	92	12	
Lymphatic invasion			
Negative	77	4	0.014
Positive	37	9	
Venous invasion			
Negative	90	3	0.000
Positive	24	10	
Lymph node metastasis			
Negative	56	0	0.001
Positive	58	13	
AS	53.14 \pm 24.50	75.76 \pm 15.33	0.002

SD=standard deviation

AS=angiogenesis score

Table 3. Recurrent cases after curative resection in relation to angiogenesis density

AS density	Rate of recurrence(%)	Location
≤55	17.2(11/64)	Liver(1/11)
		Local(6/11)
		Peritoneum(1/11)
		Bone(2/11)
		Lung(1/11)
>55	32.0(16/50)	Liver(8/16)
		Local(3/16)
		Peritoneum(3/16)
		Lung(2/16)

AS=angiogenesis score

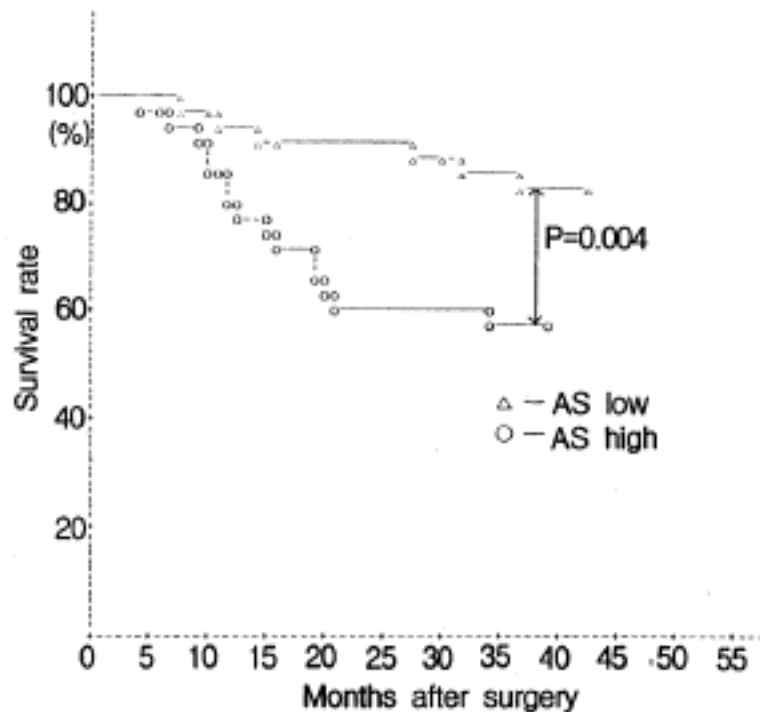


Fig. 4. Cumulative 36-month survival rate in the patient with colorectal carcinoma. There is statistical difference between AS low and AS high group.

5) 맥관신생 밀도와 생존율과의 관계

Fig. 4는 조사대상 전체 환자를 고 맥관신생군과 저 맥관신생군으로 나누어 비교한 Kaplan-Meier 생존곡선이다. 3년 생존율은 저 맥관신생군에서는 83% 그리고 고 맥관신생군에서는 56%로 맥관신생이 활발할수록 환자의 생존율은 불량하였으며, 이러한 생존율의 차이는 통계학적으로

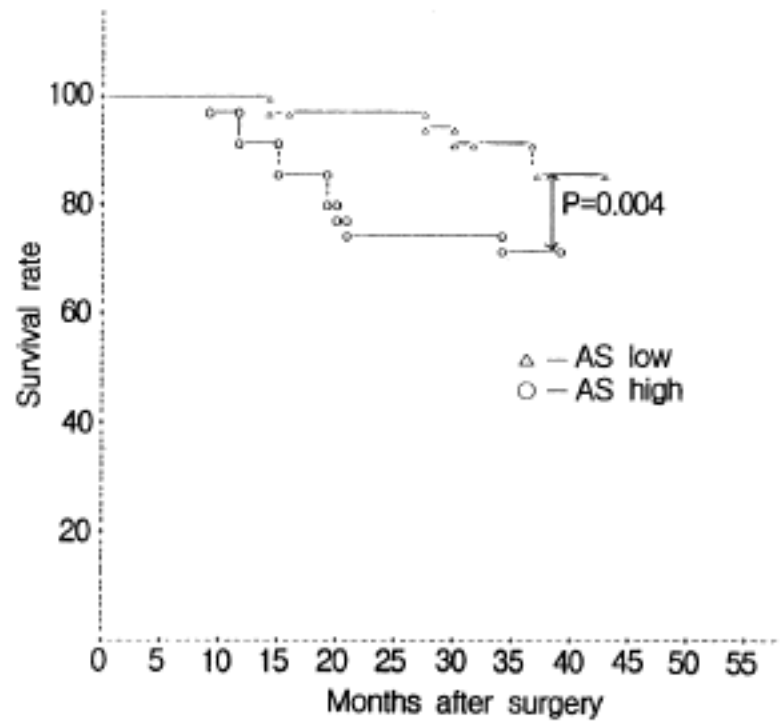


Fig. 5. Cumulative 36-month survival rate in patients with colorectal carcinoma after curative resection. There was statistical difference between AS low and AS high group.

유의성이 관찰되었다($P=0.004$). Fig. 5는 근치적 절제술이 시행된 환자만을 대상으로 한 생존곡선으로서 역시 양군에서의 3년 생존율은 각각 89% 및 68%로서 통계학적으로 유의한 생존율의 차이를 보였다($P=0.004$).

고 찰

악성 종양이 계속적인 성장과 전이를 하기 위해서는 혈관의 형성 즉 맥관 신생이 요구된다는 사실은 잘 알려져 있다^{15,16}. 즉 초기의 종양은 겨우 몇개의 세포층 또는 기껏해야 크기가 1 mm^3 정도에 불과하나¹⁵, 종양이 이만한 작은 크기 이상으로 성장하기 위해서는 종양 조직내로 새로운 혈관이 형성되어 자체의 혈액 공급 체계를 갖추어야 한다^{28,29}. 혈액 공급이 없으면 종양은 수동적 확산을 통한 영양 공급과 노폐물의 배설이 가능한 크기 이상으로는 성장할 수 없게 된다. 일단 종양 조직내에 혈관 신생이 이루어지면 종양은 충분한 영양을 얻게되어 지수적으로(exponentially) 성장하게 되며, 궁극적으로는 전이를 일으

키게 된다^{15,16,22,30}).

맥관 신생이 종양의 성장을 촉진시키는 기전으로서 신생 혈관이 종양으로의 영양 공급을 용이하게 하는 점 이외에도 내피 세포의 촉진비 기능(paracrine function)과 침습성 주화 기능(invasive chemotactic function)과 관여할 것이라는 사실이 점차 명백해지고 있다. 즉 내피세포는 basic fibroblast growth factor(bFGF), insulin 성장인자 I 및 II, platelet derived growth factor(PDGF) 그리고 colony-stimulating factors와 같은 촉진비 기능을 가진 물질들을 종양세포내로 분비하여 종양의 성장을 촉진하며^{15,26,43}, collagenase, urokinase 그리고 plasminogen activator와 같은 분해성 효소를 분비함으로써 종양 세포들이 주위 기질로 확산되는 것을 용이하게 하여 전이의 잠재력을 높이는 것으로 생각되고 있다^{38,42}.

종양에서 맥관 신생을 일으키는 인자 또는 세포들에 대해서도 명백히 규명되지는 않았으나 현재까지 bFGF³⁹와 VEGF¹⁴가 가장 유력하게 거론되고 있다. 최근의 연구에 의하면 bFGF에 대한 항체를 종양에 실험적으로 투여하였더니 맥관신생과 종양의 성장이 저해되었으며²⁹, 반대로 bFGF를 투여하였더니 맥관신생, 종양의 성장 그리고 전이가 촉진되었다고 보고되었다¹⁶. 그리고 VEGF를 특이한 항체로써 억제시켰더니 미세혈관의 밀도가 감소되고 종양의 성장이 극적으로 감소하였다고 한다³³. 그러나 혈관 생성을 촉진하는 맥관신생 인자의 역할은 종양이 맥관형성 표현형(angiogenic phenotype)으로 이행되기 위한 필요 조건이긴 하나 충분 조건은 될 수 없다. 즉 종양이 맥관형성 표현형으로 되어 전이를 일으키게 되는 것은 혈관 성장에 관여하는 양성 및 음성 조절 인자들의 균형의 결과로 이루어지는 것이다. 맥관신생 없이는 종양 세포는 순환내로 거의 유입될 수 없으며 이로 미루어 맥관신생이 전이를 일으키기 위해서는 필수적으로 보인다. 따라서 종양의 혈관의 수가 많을수록 종양세포가 순환내로 유입될 기회는 많아지게 되는데 이러한 사실은 Liotta 등^{34,35}의 mouse fibrosarcoma model을

이용한 실험을 보면 보다 명확해 진다. 그들의 보고에 의하면 종양 이식 5일째의 혈액내로의 종양 세포 유입량은 24시간당 1.4×10^3 이었던데 비해 15일째에는 24시간당 1.5×10^5 으로 증가되었으며 이러한 증가는 종양내 미세혈관 밀도의 증가와 매우 밀접하다고 하였으며, 또한 폐전이는 순환내로 유입되는 세포수와 비례하였다고 하였다. 이러한 사실은 종양내 미세혈관 밀도가 종양의 악성도와 상관관계가 있음을 암시한다고 할 수 있다.

종양내 미세혈관의 밀도가 종양 분화도 및 악성도와 상관 관계가 있음을 처음으로 암시한 이는 Brem 등¹³으로서 이들은 이런 목적으로서 현미경적 맥관신생 등급법(microscopic angiogenesis grading system: MAGS)을 고안하였다. 그러나 고형 종양에서 종양의 맥관신생이 전이의 가능성을 높인다는 명백한 증거는 피부 흑색종을 대상으로 한 Srivastava 등⁴⁵에 의한 연구가 최초이다. 그의 보고에 의하면 중등도 두께의 피부 흑색종(intermediate-thickness skin melanoma) 20예 중 전이를 보였던 10예에서 그렇지 않은 10예에 비해 혈관의 분포가 2배 이상이었다고 하여 종양의 혈관 밀도와 전이의 위험은 서로 관계 있음을 나타내고 있다.

종양의 맥관신생과 병기, 전이 혹은 생존율과 같은 악성도와 관계에 대한 연구는 이 이외에도 유방암^{23,28}, 전립선암^{10,49}, 두경부 편평세포암^{22,53}, 폐암^{37,54}, 악성 흑색종²⁵, 자궁 경부암⁵², 그리고 방광암¹⁰ 등과 같은 다양한 종양에 대해서 광범위하게 시행되어졌으며, 이들을 통해 종양의 혈관 밀도는 종래의 예후 인자들과 다변량 분석을 통해 비교한 결과 독립적인 예후 인자로서 의의가 있음이 밝혀졌다. 대장암에서의 맥관신생의 예후와의 관계에 대한 연구를 보면, 임파절 전이가 없었던 결장암 환자만을 대상으로 한 Frank 등⁵³과 직장암만을 대상으로 한 Saclarides 등⁴⁴의 연구에 의하면 맥관 신생은 재발의 위험과 생존율을 저하시키는 인자로 의의가 있었다고 보고하였으며, 결직장 환자 모두를 대상으로 한 Takebayashi 등⁴⁶

의 보고에 의하면 종양 미세혈관 밀도는 독립적인 예후 인자로서 의미가 있었다고 하였다. Takebayashi 등⁴⁶⁾의 연구에 의하면 여러 임상 병리학 적 인자 중 암세포의 침습정도, 임파절 전이, 임파관 및 혈관 침습 그리고 Dukes씨 병기에서 혈관 밀도가 통계학적으로 유의하게 차이가 관찰되었다고 한다. 저자들의 예에서는 암세포의 혈관침습, 임파절전이, Dukes씨 병기 그리고 간전이에서 혈관밀도가 통계학적으로 유의한 차이가 있었다. 이러한 결과는 혈행성 전이는 종양 세포가 혈관 미세 구조에 유입되어야 초래될 수 있다는 실험적 증거^{34,36)}를 뒷받침하는 것으로 여겨지며, 맥관신생과 임파절 전이와의 정확한 기전은 명확치는 않으나 맥관신생이 전이의 위험을 높이는 것은 확실한 것으로 보인다.

재발과 혈관 밀도와의 관계도 통계학적으로 유의성은 관찰되지 않았으나 저자들의 경우에서도 확인되었다. 더욱이 임상 병리학 인자 중 혈관/임파관 침습 예에서 혈관의 밀도가 유의성있게 높았다는 사실로써도 재발과 혈관 밀도와의 상관관계는 보다 명확히 설명되어질 수 있을 것이다.

종양내 미세혈관 밀도를 평가하기 위한 방법으로 면역조직화학적 기법이 보편적으로 많이 이용되고 있으나 몇가지 점은 언급되어야 할 정도로 주의를 요한다. 우선은 종양의 병소부의 선택이다. 즉 종양내 이질성(intratumor heterogeneity)이 비교적 흔하기 때문에 한 종양내의 어디에서 병리 절편을 채취하느냐가 미세혈관 밀도와 종양의 임상적 경과를 보다 정확히 규명하는데 결정적일 수 있다. 저자는 종양의 침습 변연부에서 혈관의 밀도가 가장 많은 곳을 선택하여 맥관신생 점수를 부과하였는데, 이에 대한 이론적 근거는 암이 성장함에 따라 여러 clonal subpopulation들이 발달하여 보다 악성을 띤 clone들이 나타나게 되며^{40,21)}, 이질성이 존재하는 종양내에서 종양세포가 침습하고 국소적으로 확산하며 궁극적으로는 전이를 일으키는 등 종양의 생물학적 특성을 가장 잘 반영하는 병소부는 종양의 가장 심부인 침습 변연부(the deepest invasive tumor margin)이기 때문

이다^{47,48)}. 또한 실제로도 Weidner 등⁵¹⁾에 의하면 종양의 변연부에서 혈관의 밀도가 가장 높게 존재하였다고 하였다. 다음 문제로서 혈관 밀도를 측정하는 방법으로서, 저자는 혈관의 수를 직접 현미경하에서 수작업으로 계산하였다. Brawer 등¹¹⁾의 보고에 따르면 수작업과 자동화된 계산법(=Optimas Image Analysis) 사이에는 큰 차이가 없었다고 한다. 그러나 자동화된 면역 염색과 전산화된 분석법을 이용하면 계산법이 표준화될 수 있고 경험 부족 및 hot spot 선택의 편견과 같은 분석자간 또는 개인의 변수를 없애는 장점이 있으며⁹⁾, 이를 통해 혈관 밀도 측정법이 고품 종양에서 간편하고 신뢰성이 있을뿐만 아니라 재현될 수 있는 예후 인자로서의 가치를 지닐 것으로 보인다.

혈관 밀도를 현미경 하에서 평가할 때 관찰 배율도 주의를 요한다. 즉 Weidner 등⁵¹⁾은 시야의 크기가 0.74 mm^2 미만, 즉 200배 미만인 경우에는 혈관 밀도의 정확한 계산이 실제로는 힘들기 때문에 이 이상의 배율하에서 밀도 측정을 할 것을 권하고 있으며 면역조직화학적 염색은 혈관 내피 세포에 특이하게 반응하기 때문에 단일의 세포로 염색되는 부분도 하나의 혈관으로 인정하여 계산하는 것이 타당하다고 하였다.

맥관신생이 가지는 예후면에서의 의의뿐만 아니라, 이는 치료적 측면에서도 이용의 가능성이 높을 것으로 보인다. 예를 들면 국소 절제의 적응이 임상적인 기준으로 되는 직장암의 경우 술전 생검 또는 절제 표본의 병리학 적 평가상 맥관신생 점수가 높은 것으로 진단되었을 경우에는 보다 광범위한 수술 또는 화학방사선 요법을 고려할 수 있을 것이다. 결장암의 다른 예를 보면 Astler-Coller 병기상 B2로 진단된 환자의 약 30%에서는 재발을 경험하나 아직 이 병기에서 화학요법을 일률적으로 시행하고 있지는 않고 있다. 이때 맥관신생 점수와 같은 인자를 적용하여 재발의 고위험군으로 분류가 된 예에서는 조기에 적극적인 화학요법과 같은 보조요법을 고려할 수 있을 것이다.

이상으로서 저자들은 본 연구를 통해 결직장암

에서의 맥관신생이 종양의 성장, 전이의 발달, 절환의 재발, 그리고 환자의 예후와 유의한 관계를 가진다는 사실을 관찰할 수 있었다. 물론 종양의 맥관신생 혼자만이 전이 및 절환의 재발에 관여하지는 않더라도 이 연구는 결직장암에서의 종양의 전이에 있어서이 맥관신생의 역할을 이해하는데 도움이 되고 최소한 종양의 성장이 맥관신생과 밀접한 관계를 가진다는 사실을 인지하여 종양의 악성도와 맥관신생과의 관계를 보다 폭넓게 이해하는데 도움이 되리라 생각된다. 물론 혈관 밀도로 결정된 맥관신생이라는 인자가 종양 환자의 재발과 생존을 예측하는 인자로 확정되어 임상 종양학에서 보편적인 예후 측정 인자로 이용되기 전까지는 광범위한 전향적인 임상 연구가 선행되어야 할 것으로 사료된다.

결 론

저자들은 1990년 1월부터 1994년 12월까지 결직장암으로 동아대학교병원 일반외과에서 외과적 절제술을 시행받은 127예의 환자와 해부병리과에 보관중인 이들의 외과 병리포본을 대상으로 결직장암의 종양조직에서 혈관을 구성하고 있는 혈관 내피세포에서 발현되는 혈액 응고 인자 VIII에 대한 면역조직학적 염색을 시행하여 맥관신생의 밀도를 관찰하고 이를 기존의 임상 및 병리학적 예후 인자들과의 상관관계를 분석하여 다음의 결론을 얻었다.

1) 남녀성비, 조직학적 분화도, 종양의 장벽침범에 따른 맥관신생점수와는 통계적으로 유의한 차이는 없었으나 종양의 크기($P=0.000$) 종양내 혈관침습($P=0.001$), 임파절 전이유무($P=0.021$), 간전이($P=0.004$), 병기별 비교($P=0.001$)에 있어서는 통계적 유의성이 있었다.

2) 맥관신생 점수의 평균값인 55점을 기준으로 구분한 고 맥관신생 점수군과 저 맥관신생 점수군으로 나누어 재발률을 비교했을 때 각각 32.0% 및 17.2%로서 이들 두 군사이에서의 재발률은 거의 2배 차이가 났으나 통계학적 유의성은 없었다

($P=0.06$)

3) 전제 환자를 대상으로 한 3년 생존율 비교에서 저 맥관신생 점수군에서는 83% 그리고 고 맥관신생 점수군에서는 56%으로 통계적 유의성($P=0.004$)이 관찰되었다. 근치적 수술이 시행된 환자만을 대상으로 한 3년 생존율 비교에서도 저 맥관신생 점수군이 89% 그리고 고 맥관신생 점수군이 68%로 통계적 유의성($P=0.004$)이 관찰되었다.

이상의 결과를 종합하면 결직장암에서의 맥관신생이 종양의 성장, 전이, 재발, 그리고 환자의 예후와 유의한 상관관계를 가진다는 사실을 알 수 있지만, 혈관 밀도로 결정된 맥관신생이라는 인자가 종양환자의 재발과 생존을 예측하는 인자로 결정되며 임상 종양학에서 보편적인 예후 측정인자로 이용되기까지는 광범위한 임상연구가 선행되어야 할 것으로 사료된다.

REFERENCES

- 1) 김광연, 박은호, 한원근: 대장암. 대한외과학회지 31: 191, 1986
- 2) 대한민국 보건복지부: 한국인 암등록 조사 자료 분석보고서. 1993
- 3) 박성대, 박영관, 채종민 등: 한국과 일본의 대장·직장암의 비교 연구. 대한대장항문병학회지 3: 29, 1987
- 4) 배진한, 정봉화, 이재정 등: 결장 및 직장암에 대한 임상적 고찰. 대한대장항문병학회지 9: 39, 1993
- 5) 임경신, 강운중, 박주승: 대장 및 직장암 261예에 대한 임상적 고찰. 대한외과학회지 49: 212, 1995
- 6) 최정훈, 정용환, 최진필: 대장 및 직장암의 임상적 고찰. 대한외과학회지 46: 985, 1994
- 7) Armitage NC, Robins RA, Evans DF, et al: The influence of tumour cell DNA abnormalities on survival in colorectal cancer. Br J Surg 72: 828, 1985
- 8) Astler VB, Coller FA: The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. Ann Surg 139: 846, 1954
- 9) Barbareschi M, Gasparini G, Weidner N, et al: Microvesseldensity quantification in breast carcinomas: assessment by manual vs. computer assisted image analysis system. Appl Immunohistochem 3: 75, 1995
- 10) Bochner BH, Cote RJ, Weidner N, et al: Tumor angiogenesis is an independent prognostic indicator of

- invasive transitional cell carcinoma of the bladder. J Natl Cancer Inst* 87: 1603, 1995
- 11) Brawer MK, Deering RE, Brown M, et al: *Predictors of pathologic stage in prostatic carcinoma. Cancer* 73: 678, 1994
 - 12) Brem S, Cotran R, Folkman J: *Tumor angiogenesis: a quantitative method for histologic grading. J Natl Cancer Inst* 48: 347, 1972
 - 13) Dukes CE: *The classification of cancer of the rectum. J Pathol Bacteriol* 35: 323, 1932
 - 14) Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, et al: *Vascular permeability factor /vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. Am J Pathol* 146: 1029, 1995
 - 15) Folkman J: *Angiogenesis and breast cancer. J Clin Oncol* 12: 441, 1994
 - 16) Folkman J: *The role of angiogenesis in tumor growth. Semin Cancer Biol* 3: 65, 1992
 - 17) Folkman J: *Tumor angiogenesis, therapeutic implications. N Engl J Med* 285: 1182, 1971
 - 18) Folkman J, Watson K, Ingber D, et al: *Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. Nature* 339: 58, 1989
 - 19) Folkman J: *What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? J Natl Cancer Inst* 82: 4, 1990
 - 20) Frank RE, Saclarides TJ, Leurgans S, et al: *Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence and survival in patients with node-negative colon cancer. Ann Surg* 222: 695, 1995
 - 21) Frost P, Levin B: *Clinical implications of metastatic process. Lancet* 339: 1458, 1992
 - 22) Gasparin G, Weidner N, Berilacqua P: *Intratumoral microvessel density and p53 protein: correlation with metastasis in head-and-neck squamous cell carcinoma. Int J Cancer* 55: 739, 1993
 - 23) Gasparini G, Weidner N, Bevilacqua P, et al: *Tumor microvessel density, p53 expression, tumor size and peritumoral lymphatic vessel invasion are relevant prognostic markers in node-negative breast carcinoma. J Clin Oncol* 12: 454, 1994
 - 24) Gilbrone M, Leapmans S, Cotrans R, et al: *Tumor dormancy in vitro by prevention of neovascularization. J Exp Med* 136: 261, 1972
 - 25) Graham CH, Rivers J, Kerbel RS, et al: *Extent of vascularization as a prognostic indicator in thin (< 0.76 mm) malignant melanoma. Am J Pathol* 145: 510, 1994
 - 26) Hamada J, Cavanaugh PG, Lotan O: *Separable growth and migration factors for large-cell lymphoma cells secreted by microvascular endothelial cells derived from target organs for metastasis. Br J Cancer* 66: 349, 1992
 - 27) Hedley DW, Freidland ML, Taylor IW: *Application of DNA flowcytometry of paraffin embedded tissue. Cytometry* 5: 660, 1984
 - 28) Horak ER, Leek R, Klenk N, et al: *Angiogenesis assessed by platelet-derived cell adhesion molecular antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. Lancet* 34: 1120, 1992
 - 29) Hori A, Sasada R, Matsutani E, et al: *Suppression of solid tumor growth by immunoneutralizing monoclonal antibody against human basic fibroblast growth factor. Cancer Res* 51: 6180, 1991
 - 30) Hsu SM, Raine L, Fanger AH: *A comparative study of the peroxidase method and an Avidin-Biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibody. Am J Clin Pathol* 75: 734, 1981
 - 31) Jass JR, Sobin LH: *World Health Organization international histological classification of tumors: histological typing of intestinal tumors. 2nd edition. New York: Springer-Verlag, 1989*
 - 32) Kim KJ, Li B, Winer J, et al: *Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth in vivo. Nature* 362: 841, 1993
 - 33) Knighton D, Ausprunk D, Tapper D, et al: *Avascular and vascular phases of tumor growth in the chick embryo. Br J Cancer* 35: 347, 1977
 - 34) Liotta LA, Kleinerman J, Saidel GM: *Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastasis following tumor implantation. Cancer Res* 34: 997, 1974
 - 35) Liotta LA, Saidel G, Kleinerman J: *The significance of hematogenous tumor cell clumps in the metastatic process. Cancer Res* 36: 889, 1976
 - 36) Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG: *Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. Cell* 64: 327, 1991
 - 37) Macchiarini P, Fontanini G, Hardin MJ, et al: *Relation of neovascularization to metastasis of non-small-cell lung cancer. Lancet* 340: 145, 1992
 - 38) Moscatelli D, Gross J, Rifkin D: *Angiogenic factors stimulate plasminogen activator and collagenase production by capillary endothelial cells. J Cell Biol* 91: 201a, 1981
 - 39) Nguyen M, Watanabe H, Budson AE, et al: *Elevated levels of the angiogenic peptide basic fibroblast*

- growth factor in urine of bladder cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 85: 241, 1993
- 40) Nowell PC: *Mechanisms of tumor progression. Cancer Res* 46: 2203, 1986
- 41) Parker SL, Tong T, Bolden S, et al: *Cancer statistics, 1996. CA* 46: 5, 1996
- 42) Pepper MS, Vassalli JD, Montesano R, et al: *Urokinasetype plasminogen activator is induced in migrating capillary endothelial cells. J Cell Biol* 105: 2535, 1987
- 43) Rak JW, Hegmann EJ, Lu C, et al: *Progressive loss of sensitivity to endothelium-derived growth inhibitors expressed by human melanoma cells during disease progression. J Cell Physiol* 159: 245, 1994
- 44) Saclarides TJ, Speziale NJ, Drab E, et al: *Tumor angiogenesis and rectal carcinoma. Dis Colon Rectum* 37: 921, 1994
- 45) Srivastava A, Laidler P, Davies RP, et al: *The prognostic significance of tumor vascularity in intermediate-thickness(0.76-4.0 mm thick) skin melanoma: a quantitative histologic study. Am J Pathol* 133: 419, 1988
- 46) Takebayashi Y, Akiyama SI, Yamada K, et al: *Angiogenesis as an unfavorable prognostic factor in human colorectal carcinoma. Cancer* 78: 226, 1996
- 47) Talbot IC, Ritchie S, Leighton M, et al: *Invasion of veins by carcinoma of rectum: method of detection, histologic features and significance. Histology* 5: 141, 1981
- 48) Teixeira CR, Tanaka S, Haruma K, et al: *The clinical significance of the histologic subclassification of colorectal carcinoma. Oncology* 50: 495, 1990
- 49) Weidner N, Carroll PR, Flax J, et al: *Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. Am J Pathol* 143: 401, 1993
- 50) Weidner N, Folkman J, Pozza F, et al: *Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. J Natl Cancer Inst* 84: 1875, 1992
- 51) Weidner N, Semple JP, Welch WR, et al: *Tumorangiogenesisandmetastasis-correlation in invasive breast carcinoma. N Engl J Med* 324: 1, 1991
- 52) Wiggins DL, Granai CO, Steinhoff MM, et al: *Tumor angiogenesis as a prognostic factor in cervical carcinoma. Gynecol Oncol* 56: 353, 1995
- 53) Williams JK, Carlson GW, Cohen C, et al: *Tumor angiogenesis as a prognostic factor in oral cavity tumors. Am J Surg* 168: 373, 1994
- 54) Yamazaki K, Abe S, Takekawa H, et al: *Tumor angiogenesis in human lung adenocarcinoma. Cancer* 74: 2245, 1995
- 55) Yu CC-W, Woods AL, Levison DA: *The assessment of cellular proliferation by immunohistochemistry: a review of currently available methods and their applications. Histochemical J* 24: 121, 1992