

## 실험동물에서 Lipopolysaccharide와 Thalidomide에 의한 Vascular Endothelial Growth Factor와 Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ 발현의 변화

대구가톨릭대학교 의과대학 외과학교실, <sup>1</sup>병리학교실, <sup>2</sup>동아대학교 의과대학 병리학교실, <sup>3</sup>경북대학교 의과대학 병리학교실

최동락 · 조창호<sup>1</sup> · 정진숙<sup>2</sup> · 홍숙희<sup>2</sup> · 윤길숙<sup>3</sup>

### Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ in Angiogenesis Induced by Lipopolysaccharide and Thalidomide in CT26 Murine Colon Cancer of BALB/c Mouse

Dong Lak Choi, M.D., Chang Ho Cho, M.D.<sup>1</sup>, Jin Sook Jeong, M.D.<sup>2</sup>, Sook Hee Hong, M.D.<sup>2</sup>, Ghil-Suk Yoon, M.D.<sup>3</sup>

Departments of Surgery and <sup>1</sup>Pathology, Catholic University of Daegu School of Medicine, Daegu, <sup>2</sup>Department of Pathology, Dong-A University Medical College, Busan, <sup>3</sup>Department of Pathology, Kyungpook National University Medical School, Daegu, Korea

**Purpose:** The growth, progression, and metastasis of malignant neoplasms are influenced by the environment of the tumor and by proliferation of the tumor itself. Angiogenesis of a malignant neoplasm is a very important environmental factor of tumor growth and metastasis. Also, it is a prognostic factor for malignant neoplasms. The mechanism of angiogenesis, such as the effects of cytokines and angiogenesis-promoting factors, is incompletely understood.

**Methods:** This study was designed to define the role of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and the vascular endothelial growth factor (VEGF) in angiogenesis induced by lipopolysaccharide (LPS) and thalidomide (anticytokine drug) in CT26 murine colon cancer transplanted to BALB/c mice.

**Results:** The tumor size in the LPS-treated group (n=3, 2.1 $\pm$ 0.26 cm) was larger than it was in the LPS thalidomide-treated group (n=4, 1.95 $\pm$ 0.19 cm) and in the control group (n=3, 1.6 $\pm$ 0.20 cm) (P<0.05). The microvessel density determined by CD31 immunostaining was lowest for the control group and highest for the LPS-treated group, but the differences were not statistically

significant. An immunohistochemical study showed that the expressions of TNF- $\alpha$  (P<0.01) and VEGF (P<0.05) were higher in the experimental groups than they were in the control group. Also, the LPS thalidomide-treated group had lower expressions of TNF- $\alpha$  (P<0.01) and VEGF (P<0.05) than the LPS-treated group. Western blots revealed that the TNF- $\alpha$  and the VEGF levels semiquantitatively increased from the control group to the LPS thalidomide-treated group to the LPS-treated group.

**Conclusions:** Our study revealed that low doses of LPS stimulated angiogenesis through increased expression of TNF- $\alpha$  and VEGF. Thalidomide decreased angiogenesis, probably through suppression of TNF- $\alpha$  with a decreased expression of VEGF. We conclude that TNF- $\alpha$ , suppressed by thalidomide, in the model of transplanted colon cancer may inhibit angiogenesis through coincident decrease in the expression of VEGF. *J Korean Soc Coloproctol* 2004;20:125-132

**Key Words:** Angiogenesis, Colorectal cancer, Vascular endothelial growth factor, Tumor necrosis factor- $\alpha$ , 미세혈관생성, 결장직장암, VEGF, TNF- $\alpha$

## 서 론

종양의 성장, 침윤 그리고 전이에는 종양세포의 증식뿐만 아니라 종양이 자라는 주위의 환경에 의해서도 영향을 받으며 특히 종양과 비종양성 혈관조직의 연결은 종양의 성장에 매우 중요하다. 발생한 종양의 크기가 1 mm 내지 2 mm에 도달하면 새로운 혈관이 만들어져야만 성장이 지속된다고 잘 알려져 있다.<sup>1</sup> 새로 생긴 혈관은 종양에 산소와 영양분을 공급할 뿐만 아니라, 혈관내피세포에서 분비되는 각종 성장인자인 Platelet-derived growth factor (PDGF), Granulocyte monocyte-colony growth factor (GM-CSF)나 Interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) 등을 공급하여 종양세포의 성장을 촉진시킨다.<sup>1,2</sup> 또한 새로 형성된 혈관을

책임저자: 윤길숙, 대구광역시 중구 동인2가 101번지  
경북대학교 의과대학 병리학교실(우편번호: 700-422)  
Tel: 053-420-4855, Fax: 053-422-9774  
E-mail: gsyoon@knu.ac.kr

통하여 종양세포가 혈류로 들어갈 기회가 높아지므로 결국 종양의 전이를 돕는다.<sup>3</sup> 그러므로 미세혈관생성 자체는 종양의 성장과 전이에 아주 중요한 요소이며, 미세혈관생성 여부는 종양의 예후를 판정하는 데 도움을 줄 수 있다.<sup>4</sup> 종양의 예후인자로서의 신생혈관에 대한 연구는 주로 종양내 미세혈관의 밀도와 종양의 악성도 및 예후와의 상관관계에 대한 연구가 많다.<sup>4,5</sup> 최근에는 종양의 미세혈관생성을 조절하는 인자들의 규명과 기전에 대한 관심이 증가하고 있다.

지금까지 알려진 미세혈관생성의 촉진인자로는 Vascular endothelial growth factor (VEGF)를 포함하여, basic fibroblast growth factor (bFGF), angiogenin, transforming growth factor (TGF), placental growth factor, Interleukin-8 (IL-8), Hepatocyte growth factor (HGF), GM-CSF, platelet-derived endothelial cell growth factor, angiopoietin, thrombospondin, p53 등이 있다.<sup>4,6</sup>

이 중 VEGF는 45 kD 내외의 당단백질로서 혈관내피세포에 직접 작용하여 미세혈관을 만드는 데 관여하는 물질이다. VEGF는 종양의 진행과정에서 일어나는 미세혈관생성뿐만 아니라 태아발생단계, 창상치유 및 월경주기에 따른 자궁내막의 변화 등에서 보이는 혈관형성에도 관여한다고 알려져 있다.<sup>7,8</sup> VEGF는 미세혈관의 투과성을 증가시키는 역할과, 직접 혈관내피 세포를 자극하여 증식시키는 두 가지 역할을 한다.<sup>7,9</sup> VEGF는 많은 정상조직에서도 발현되며, 증식성 망막병증, 건선, 류마티스관절염<sup>4,6,10</sup> 신장암, 유방암, 대장암, 식도암, 위장암 및 폐암 등에서도 발현된다.<sup>11,12</sup>

원발성 종양을 수술로 제거한 후에 잠복 중이던 미세전이병소의 성장이 촉발될 수 있다는 사실이 잘 알려져 있는데 이는 수술 중 외과적 손상으로 인한 내독소, 즉 그람음성균의 세포막에 있는 lipopolysaccharide (LPS)의 침범과 이로 인한 단핵계 세포들의 활성화, 그리고 활성화된 단핵계 세포들이 분비하는 cytokine이나 VEGF의 작용으로 미세혈관신생이 촉발되어 전이병소의 성장이 일어난다고 설명하고 있다.<sup>13</sup> 내독소의 공급원으로는 체내 위장관 내의 세균이나 수술 도중 노출된 복강으로 오염된 공기 내의 그람음성균으로 생각하고 있다. 그러나 VEGF와 염증세포와의 관계에 대한 연구는 많지 않다.

Thalidomide (N-phthalimidoglutarimide)는 처음에는 진정제로서 사용되었으나 기형성의 부작용으로 사용이 감소하였다. 그러나 최근에 이 물질의 면역조절 및 항염증 작용에 대하여 다시 관심을 갖기 시작하였다.<sup>14</sup> Thalidomide의 면역조절 및 항염증 작용기전은 활성화된 대식세포에 의해 분비되는 Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )의

mRNA 분해를 촉진시킴으로서 TNF- $\alpha$ 의 발현을 억제하여 일어난다고 알려져 있다.<sup>14</sup> 또한 thalidomide는 bFGF 혹은 VEGF에 의해 유도되는 토끼 각막의 신생혈관화 분석연구에서 미세혈관신생을 강력하게 억제한다는 사실이 밝혀졌고, thalidomide에 의한 기형은 태아 사지 발생 과정에서 혈관형성 억제와 관련이 있다고 설명된다. 하지만 다른 보고에 의하면 이러한 미세혈관생성 억제는 thalidomide가 TNF- $\alpha$ 의 발현을 억제하는 기전과는 무관하게 이루어진다고도 하였다.<sup>15</sup>

자궁내막증 환자의 복강액을 대상으로 한 연구나 악성 피부 흑색종을 대상으로 한 연구에 따르면 대식세포의 증가 및 활성화와 LPS로 활성화된 단핵계 세포들이 분비하는 각종 cytokine 즉 TNF- $\alpha$ 나 IL-1 $\alpha$  등이 강력한 미세혈관생성인자인 IL-8 또는 VEGF의 생성을 촉진하여 미세혈관생성과 종양성장을 증가시키는 것으로 알려져 있다.<sup>16,17</sup>

이상의 보고들을 종합하면, LPS는 대식세포 등에서 TNF- $\alpha$  등의 발현을 증가시키고, 생성된 TNF- $\alpha$ 는 혈관형성인자인 VEGF의 발현을 촉진시켜 종양의 전이에 필수적인 미세혈관생성을 왕성하게 할 것이라는 가정을 세울 수 있다. 그러나 아직까지 LPS가 어떤 과정을 거쳐 미세혈관생성에 관여하는지 잘 알려져 있지 않으며, thalidomide 역시 TNF- $\alpha$ 를 매개체로 하여 혈관신생을 억제하는지 혹은 다른 cytokine을 매개체로 하여 미세혈관생성을 억제하는지 잘 알려져 있지 않다. 더욱이 지금까지의 연구들은 주로 in vitro에서 LPS의 투여 후 혈장내 cytokine이나 VEGF의 농도측정으로 미세혈관신생 능력을 알아보는 방식으로 연구되었다.

본 연구는 murine 대장암 세포주를 BALB/c mouse에 피하 주사하여 만든 종양동물모델에서 LPS를 투여하여 미세혈관생성을 유발한 다음, 혈관형성 억제물질인 thalidomide를 복강 내로 주입하여 미세혈관 생성의 정도의 차이를 알아보려고 하였다. 먼저 종양조직에서 미세혈관 밀도를 측정 후 VEGF의 발현양상과 정도를 관찰하여 미세혈관 생성의 촉진과 억제 정도를 확인하였다. 중간 매개체 역할을 하리라고 생각되는 TNF- $\alpha$ 의 발현정도를 측정하여 LPS와 thalidomide에 의하여 유도된 미세혈관생성촉진과 억제과정에서 어떤 역할을 하는지를 확인하고자 하였다.

## 방 법

### 1) 연구 대상

(1) 대장암 동물 모델: 생후 약 7 내지 8주 된 20 내지

25 g 정도의 BALB/c female mouse를 사용하였다. 한국세포주 은행에서 구입한 CT26 murine colon cancer cell을 RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, USA)을 기본 배양액으로 이용하여 10% 우태아 혈청과, penicillin 100 unit/ml와 streptomycin 0.1 mg/ml이 함유된 세포배양용 배지에 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 항온항습배양기에서 배양하였다. 배양된 세포주 1×10<sup>6</sup>개를 실험동물의 우측 배부에 피하 주사하여, 크기가 장경 1 내지 2 cm 정도로 되었을 때 실험대상으로 하였다.

**(2) LPS 및 thalidomide 처치**

① 대조군; 3마리의 실험동물의 배부에 상기한 종양세포를 피하 주사한 후 LPS 와 thalidomide 주입 없이 7일째 희생하였다.

② LPS 처치(1군); 3마리의 실험동물의 배부에 상기한 종양세포를 피하 주사한 후 1일째에 LPS (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 500 $\mu$ g/kg의 농도로 증류수에 녹여 복강 내에 주사한 후 7일째에 희생하였다.

③ LPS-thalidomide 처치(2군); 4마리의 실험동물의 배부에 상기한 종양세포를 피하 주사한 후 1일째에 LPS를 500 $\mu$ g/kg의 농도로 증류수에 녹여 복강 내에 주사하고, 동시에 1, 2, 3, 4 및 5일째에 thalidomide (racemic form)를 200 mg/kg의 농도로 0.5% carboxymethyl cellulose에 녹여 실험동물의 복강 내에 매일 주사한 후, 7일째에 희생하였다.

**2) 연구 방법**

(1) 광학현미경적 관찰: 주변 정상 조직을 일부 포함하여 종양을 완전 절제하였다. 일부 종양 조직을 떼어 영하 70°C에 급속 냉동하여 보관하였다. 나머지 조직은 10% 중성 포르말린용액에 고정된 후 파라핀에 포매하였다. 파라핀에 포매된 조직을 4 $\mu$ m 두께로 박절한 후 H-E 염색을 실시하여 일반 광학 현미경으로 통상의 검사를 하였다.

(2) 면역조직화학적 염색: 파라핀 블록을 4 $\mu$ m 두께로 박절하여 organosaline을 부착한 슬라이드 (probe-on plus slide, Fisher Scientific, USA)에 부착시켜 탈파라핀 후 증류수로 재흡수하였다. 10 mM citrate buffer, pH 6.0을 750 watt 전자레인지로 5 분간 가열한 후 슬라이드를 넣고 5 분간 2회 가열 처리하여 항원을 표출하였다. 20분간 실온에 방치하여 온도를 서서히 낮춘 뒤, TBS, 50 mM, pH 7.4 로 세척한 후, 0.3% 과산화수소용액에 처리한 후 TBS로 세 차례 세척하였다. 조직 내 비특이 항원을 차단하기 위하여 normal horse serum에 30분간 반응시키고, CD31 (Pharmingen, USA, 1 : 20), VEGF (Santa Cruz Biotechnology,

USA, 1 : 60) 및 TNF- $\alpha$  (Calbiochem, San Diego, CA, USA, 1 : 60)를 각각 희석하여 반응시킨 후 4°C 수조에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 다시 TBS로 세 차례 세척하고 이차항체(Vector Elite kit, Vector Laboratories, USA)를 30분간 반응시킨 후 avidin-biotin conjugate reagent를 실온에서 45 분간 반응시켰다. TBS에 세척 후 diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma, USA)로 발색시킨 후 증류수에 수세하고, Mayer hematoxylin으로 20초간 대조 염색한 후 봉입하여 관찰하였다.

(3) 면역조직화학염색 결과의 판정: 종양세포 내에서 염색성의 정도(0; 음성, 1; 약한 양성, 2; 중등도 양성, 3; 강한 양성)를 판정하였는데, 대조군에서의 염색성 정도를 1 (약한 양성)로 하였다.<sup>14</sup>

혈관증식 정도의 판정은 광학현미경으로 200 배율에서 CD31 양성인 미세혈관이 가장 많은 시야 3군데를 선택하여 단위면적당 혈관 수를 계산하고 그 평균값을 산출하여 대표 값으로 사용하였다.

**(4) Western blotting**

① Protein extraction 및 SDS-PAGE electrophoresis; 채취된 종양조직 0.5 g에 lysis buffer (20 mM tris-HCL pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 mM benzamide)를 첨가하여 조직을 완전히 풀어 동질화한 후 Teflon-glass homogenizer로 조직을 파쇄하였다. 단백정량 후 sample loading buffer (0.0625 M tris-HCL pH 6.8, 10% (v/v) glycerol, 5% (v/v)  $\beta$ -mercaptoethanol, 2% SDS, 0.001% bromophenol blue)와 섞어 5분간 끓여 단백시료를 준비한 다음 12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel에 한 줄에 20 $\mu$ g씩 단백을 loading하고, 40 mA로 2시간 동안 전기영동을 하였다.

② Western blotting; 전기영동이 끝난 후 nitrocellulose membrane으로 transfer한 다음 TTBS buffer (25 mM Tris-Cl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% (v/v) Tween 20)에 2.5% bovine albumin을 녹인 용액으로 차단한 후 일차항체인 VEGF (Santa Cruz Biotechnology, USA, 1 : 1000) 및 TNF- $\alpha$  (Calbiochem, San Diego, CA, USA, 1 : 500)와 반응시키고 이차항체로 alkaline phosphatase-conjugated IgG를 사용하였다. TBS, 0.1% Tween 20으로 수세 후 NBT/BCIP를 약 5분간 반응시켰다.

(5) 통계처리: 처치군 간의 종양의 크기와 미세혈관 밀도에 관해서는 비모수적 접근방법인 Kruskal-Wallis 검정을 이용하여 유의수준 0.05 이하일 경우에 통계적으로 유의한 것으로 하였고, VEGF와 TNF- $\alpha$ 의 염색 결과에 대해서는 Fisher's exact test를 이용하여 유의수준 0.05 이하일 경우에, 통계적으로 유의한 것으로 정의하였다.

결 과

1) 육안 검사 소견

실험동물의 우측 배부에 자란 종양에서 육안적으로 종괴 내에서 괴사와 출혈은 관찰되지 않았다. 종양의 크기는 대조군은 1.6±0.2 cm, 1군은 2.1±0.26 cm, 2군은 1.95±0.19 cm이었다. 1군은 대조군과 2군보다 컸으며, 이는 통계적으로 유의한 차이가 있었다(Table 1)(Fig. 1A-C) (P < 0.05).

**Table 1.** Tumor sizes and microvessel density in colon cancer model, treated with LPS and LPS-thalidomide

Group	No. of cases	Tumor size (cm) (mean±SD)	Microvessel density* (mean±SD)
Control	3	1.6±0.2	27±2.7
LPS	3	2.1±0.26	33.3±5.3
LPS-thalidomide	4	1.95±0.19	30.3±2.0

SD = standard deviation.

\*No. of microvessel/×200; † P < 0.05; ‡ P > 0.05

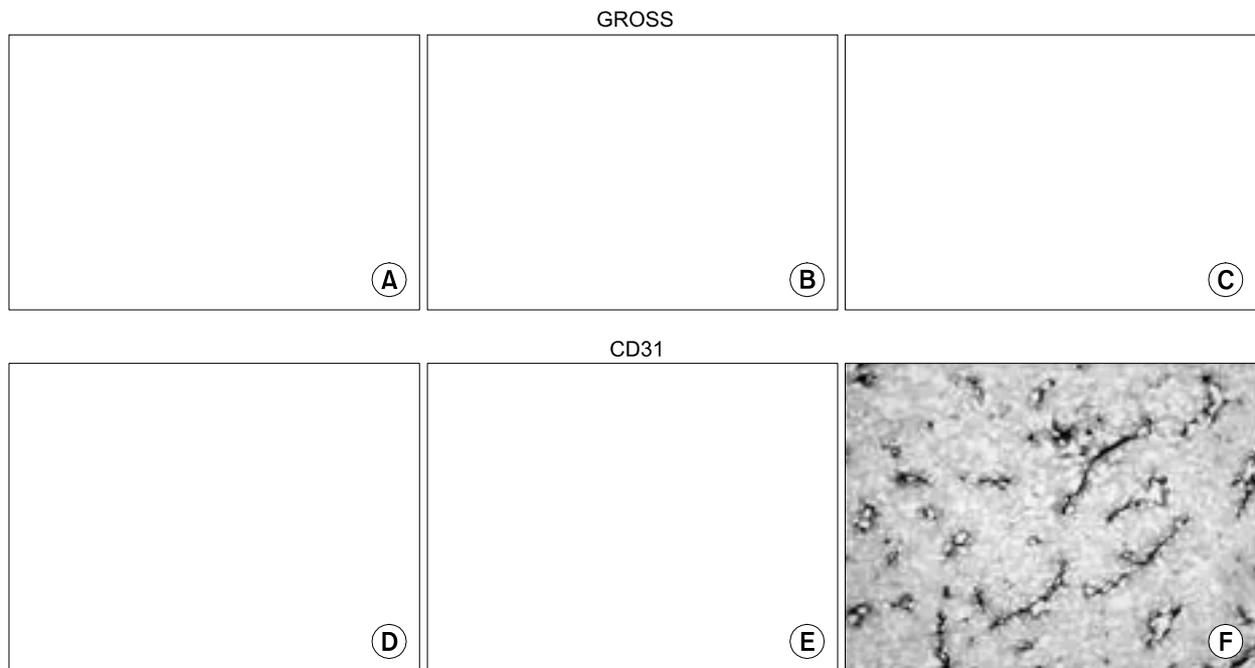
2) 광학 현미경적 검사

자라난 종양의 조직학적 소견은 짧은 방추형 또는 원형의 종양세포로 구성되어 있었고, 종양세포 사이에 미세혈관이 관찰되었다. 그리고 대조군의 2예에서 광학 현미경적 검사상 미세한 괴사와 출혈이 관찰되었다. 미세혈관은 주로 모세혈관으로 종양세포 사이에서 관찰되었다. 종양에서 대식세포를 포함한 염증세포는 거의 관찰되지 않았다.

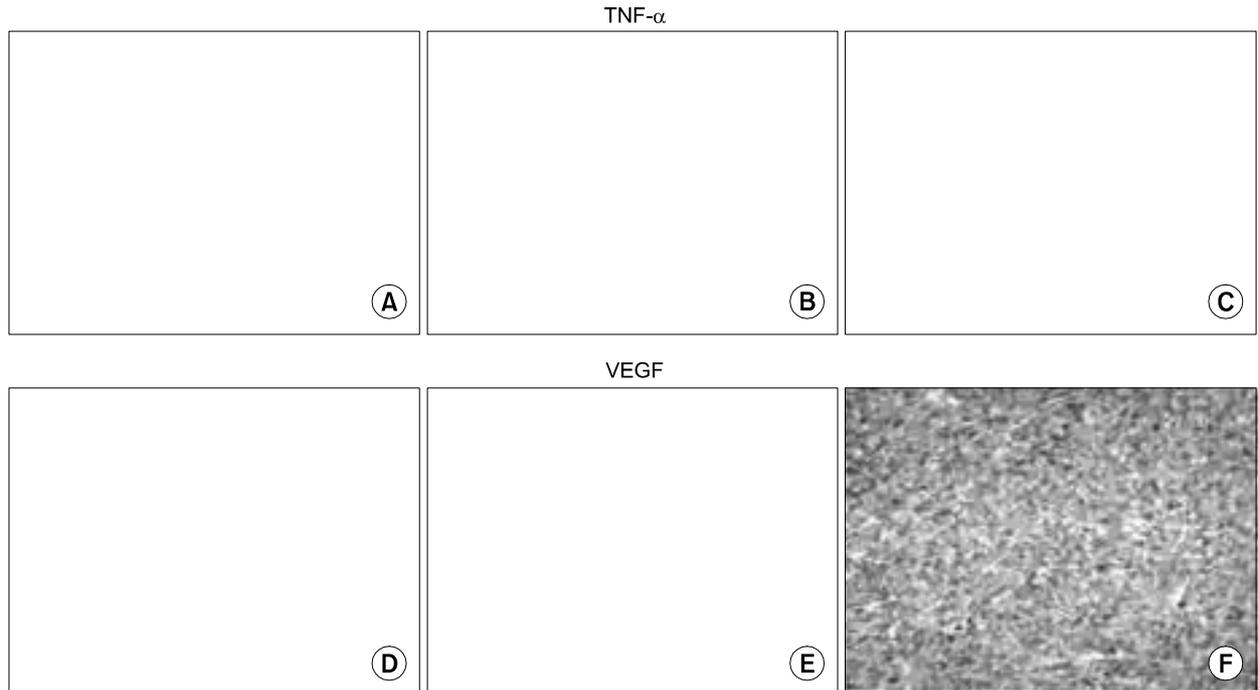
미세혈관은 대조군에서는 주로 종양의 변연부에서 관찰되었으며, 미세혈관의 직경이 비교적 큰 경향을 보였다. 그에 비해 1군과 2군에서는 종양의 변연부뿐만 아니라 중심부까지 신생혈관이 골고루 분포되어 있었으며, 종양의 변연부보다 중심부에서는 신생혈관의 직경이 비교적 작은 경향을 보였다.

3) 면역조직화학 염색법에 의한 분석

(1) 미세혈관 증식: CD31의 면역조직화학검사 후 200배율의 광학 현미경적 검사에서 측정된 종양조직의 혈관 밀도는 대조군은 27±2.0개, 1군은 33.3±5.3개, 2군에서 30.3±2.0개로 1군에서 가장 높았고, 2군, 대조군 순으로 혈관 밀도가 측정되었다. 그러나 처치군 간의 미세혈관 밀도는 통계적 유의성은 없었다(Table 1)(Fig. 2A-C)(P > 0.05).



**Fig. 1.** Gross finding of tumor in BALB/c mouse reveals that the tumor size is increased from control group (A) to LPS-thalidomide treated mouse group (C) to LPS treated mouse group (B). Also, microvessel density is increased from control group (D) to LPS-thalidomide treated mouse group (F) to LPS treated mouse group (E) (CD31, immunohistochemical stain, ×200).



**Fig. 2.** TNF- $\alpha$  and VEGF expression of tumor in BALB/c mouse shows weak reactivity in control group (A, D), moderate reactivity in LPS treated mouse group (C, F), and marked reactivity in LPS-thalidomide treated mouse group (B, E) (A, B, C: TNF- $\alpha$ , D, E, F: VEGF, immunohistochemical stain,  $\times 200$ ).

**Table 2.** Semiquantitation of VEGF and TNF- $\alpha$  expression in colon cancer model, treated with LPS and LPS-thalidomide

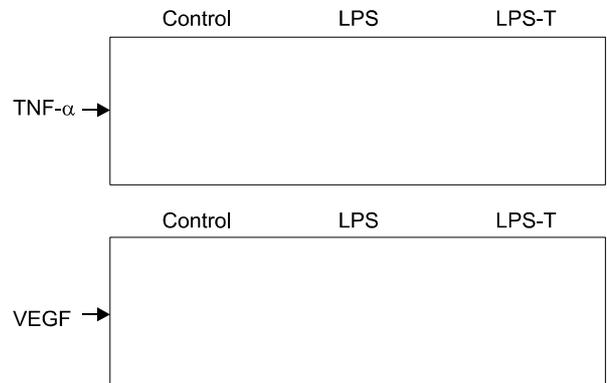
Group	No. of cases	Degree of expression	
		TNF- $\alpha$	VEGF
Control	3	1+ ] <sup>†</sup> ] <sup>†</sup>	1+ ] <sup>‡</sup> ] <sup>‡</sup>
LPS	3	3+ ] <sup>†</sup> ] <sup>†</sup>	3+ ] <sup>‡</sup> ] <sup>‡</sup>
LPS-thalidomide	4	2+ ] <sup>†</sup> ] <sup>†</sup>	2+ ] <sup>‡</sup> ] <sup>‡</sup>

VEGF = vascular endothelial growth factor; TNF- $\alpha$  = Tumor necrosis factor- $\alpha$ ; 1+ = weak expression, defined as the degree of expression in cancer cells of control group; 2+ = moderate expression; 3+ = marked expression.

<sup>†</sup> P < 0.05; <sup>‡</sup> P < 0.05

(2) TNF- $\alpha$  및 VEGF의 발현: TNF- $\alpha$ 는 종양세포의 세포질에 염색되었으며, 염색정도는 대조군 및 실험군 모두에서 종양세포의 80 내지 90%에서 발현되었다. 염색 강도는 대조군에 비하여 1군과 2군에서 강하게 발현되었다(Table 2)(Fig. 2A-C). 그리고 1군에 비하여 2군의 발현 강도는 덜 현저하였다(Fig. 2B, C).

또한 VEGF 역시 종양세포의 세포질에 염색되었다. 염색 정도는 대조군 및 실험군에서 종양세포의 80 내지



**Fig. 3.** Western blot of tumor in BALB/c mouse reveals that TNF- $\alpha$  and VEGF level is semiquantitatively increased from control group to LPS-thalidomide treated mouse group (LPS-T) to LPS treated mouse group (LPS).

90%에서 발현되었으며, 염색 강도는 1군에서 가장 강하게 발현되었고, 2군, 대조군 순으로 발현되었다(Table 2) (Fig. 2D-F).

통계분석 결과, 대조군, 1군 및 2군 간에 TNF- $\alpha$  (P < 0.05)와 VEGF (P < 0.05)의 발현정도는 유의성이 있었다.

#### 4) TNF- $\alpha$ 및 VEGF 항체를 이용한 western blot

TNF- $\alpha$  및 VEGF의 발현은 실험군에서 대조군보다 증

가하였고, 실험군에서는 LPS-thalidomide 병행 투여한 2군이 LPS를 단독투여한 1군보다 발현이 덜 현저하였다(Fig. 3).

## 고 찰

현재까지 종양의 미세혈관생성과 종양의 증식 및 전이 정도에 대한 많은 연구가 진행되어 왔다. 종양의 성장은 종양세포가 주위에 있는 정상 혈관내피세포를 직접 자극하거나, 종양세포가 분비하는 VEGF에 반응한 내피세포가 분비하는 여러 종양성장인자와의 상호 작용에 의한 종양세포의 증식으로 이루어진다고 알려져 있다.<sup>3</sup> 혈관생성인자와 전이에 대한 조사를 위하여 흔히 환자의 혈액이나 체액에서 혈관생성인자나 혈관생성억제인자를 측정하는 방법을 이용하고 있다. 예를 들면 암세포를 주입한 실험쥐의 혈액에서 혈관생성억제인자인 angiostatin을 측정하는 것이다.<sup>3</sup> 또한 면역조직화학적 방법에 의하여 혈관내피세포에 특이성이 있는 항체를 이용하여 종양 조직의 혈관 밀도를 측정함으로써 비교적 쉽고 신속하게 혈관밀도를 측정할 수 있다.<sup>5</sup> 그러나 결과의 해석이 주관적이고 검사의 예민도가 낮은 문제점이 있다. 최근에는 종양 세포의 혈관생성인자들, 즉 VEGF, bFGF, PDGF 등을 직접 면역조직화학 검사로 염색하여 검출하거나 Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) 혹은 정량적 polymerase chain reaction (PCR) 을 통하여 종양세포의 혈관형성 능력을 알아보는 시도가 이루어지고 있다.<sup>5,8</sup> 현재까지는 악성흑색종, 유방암, 폐암, 대장암 및 전립선암을 포함한 거의 모든 고형암의 초기 병기 환자에 있어서 혈관밀도가 증가되어 있는 경우에 예후가 불량한 것으로 알려져 있다.<sup>12</sup> 일부 연구에서 암조직 내 혈관밀도가 독립적인 예후인자로 보고되고 있으나, 혈관생성에 관여하는 다른 인자들에 대한 이해가 부족하고, 실제 임상적 유용성을 가지기에는 더 연구가 필요한 실정이다.

본 연구에서처럼 BALB/c mouse에 CT-26 대장암 세포주를 피하에 주입하는 것은 관찰이 용이하다는 장점이 있다. 그러나 대장암이 피부로 거의 전이되는 경우가 없으며, 또한 피부는 대장암 전이가 잘 되는 간이나 폐와 같은 혈관 밀집도가 높은 장기와는 전혀 다른 미세환경(microenvironment)이라는 점을 고려할 때, 본 실험의 결과를 임상적으로 유용한 간증이 모델에서 적용하기에는 다소의 상이점을 보이리라 생각된다.<sup>18</sup>

본 연구는 CT26 murine 대장암 세포주를 BALB/c mouse에 피하 주사하여 만든 대장암 동물모델에서 저농도 LPS 투여로 인한 종양의 미세혈관생성 촉진의 정도와

VEGF와 TNF- $\alpha$ 의 관련 유무를 알고자 하였다. 동시에 thalidomide가 종양의 혈관생성에 억제작용을 하는지, 그리고 TNF- $\alpha$ 가 관련이 있는지를 알아보하고자 하였다.

LPS를 단독 투여한 1군에서 종양의 크기가 가장 컸고, 종양에서의 미세혈관생성도 가장 많았다. 또한 면역조직화학적 방법과 western blot을 이용하여 TNF- $\alpha$  단백질의 발현을 반정량적 방법으로 측정된 결과, TNF- $\alpha$  단백질량도 LPS 투여군에서 가장 많이 발현되었다. 그에 비해 LPS와 thalidomide를 함께 투여한 2군에서는 종양의 크기가 LPS 투여군보다는 작은 경향을 보였고, TNF- $\alpha$  단백질도 LPS 투여군보다는 다소 적게 발현하는 경향을 보였다.

본 연구의 실험 결과를 종합해 보면, 종양에서의 미세혈관생성은 LPS에 의해서는 촉진되는 경향을 보였고, thalidomide와의 병행투여에 의해서는 감소되는 경향을 보였다. 또한 종양세포에 의해 생성되는 TNF- $\alpha$  단백질에 대한 반정량적 분석에서도 LPS에 의해 증가하는 경향을 보였고, thalidomide에 의해서 감소되는 경향을 보였다. VEGF 단백질발현은 LPS에 의해서는 증가되는 경향을 보였으나, thalidomide와 병행투여에 의해서는 LPS 단독투여보다는 감소하는 경향을 보였다. 본 연구에서 LPS와 thalidomide를 함께 투여한 2군에서는 TNF- $\alpha$  단백질이 LPS만 투여한 1군보다 다소 감소하는 경향을 보였는데, 이는 아마도 thalidomide가 TNF- $\alpha$  단백질에 직접 또는 간접적인 영향을 미친 것이라고 볼 수 있다. 이전 연구에서 thalidomide는 TNF- $\alpha$  mRNA의 분해를 촉진함으로써 TNF- $\alpha$  단백질량을 감소시키는 것으로 알려져 있는데,<sup>15</sup> 본 연구에서도 이에 상응하는 결과를 나타내었다. 향후 연구에서는 RT-PCR을 이용한 TNF- $\alpha$ 의 mRNA의 양을 측정해 보는 것이 필요하리라 생각된다.

또 다른 연구에 따르면 TNF- $\alpha$ 는 종양세포 혹은 대식세포를 포함한 염증세포에서 분비되는 것으로 알려져 있으나<sup>13,19</sup> 본 연구에서 유도한 종양에서는 대식세포를 포함한 염증세포는 거의 관찰되지 않았고 면역조직화학적 검사에서 종양세포에서 TNF- $\alpha$ 의 발현을 관찰할 수 있었다.

본 연구에서 저농도 LPS 투여로 인한 종양의 혈관생성 촉진의 정도와 기전은 종양에 의한 TNF- $\alpha$  생성으로 인하여 VEGF의 생성이 촉진되고, 이로 인하여 종양의 신생혈관생성이 촉진됨을 확인할 수 있었다. 동시에 항사이토카인 약제로 알려진 thalidomide가 TNF- $\alpha$ 의 단백질발현을 억제함으로써 종양의 신생혈관 형성을 억제하는 소견을 관찰할 수 있었다.

Thalidomide는 심각한 기형을 초래하는 약의 부작용 때문에 1962년 이후로는 치료 목적으로 사용되지 않다가, 최근 들어 TNF- $\alpha$ 의 생성을 방해함으로써 미세혈관 생성

을 억제하고, 면역조절기전에 관여하는 것으로 알려졌다. 1998년에 erythema nodosum leprosum의 치료약으로 FDA (USA Food and Drug Administration)의 공식 인정을 받았고, 다발성 골수종의 치료에도 사용되고 있으며,<sup>20,22</sup> 현재 thalidomide는 신세포암, 전립선암, 교세포종 및 카포시 육종의 치료약의 사용에 관하여 연구 중이다.<sup>19,21,22</sup>

본 실험을 요약하면 저농도 LPS 투여로 종양의 미세혈관 생성은 촉진되었고, thalidomide에 의해서는 종양의 미세혈관 생성은 억제되었다. LPS는 종양에서 VEGF의 발현을 증가시키고, thalidomide는 TNF- $\alpha$  발현을 억제함으로써 종양의 미세혈관 생성에 영향을 주는 것으로 생각된다. Thalidomide에 의해서 발현이 억제되는 TNF- $\alpha$ 는 VEGF의 발현과 연관하여 미세혈관 생성을 억제하는 데에 관여할 것으로 생각된다.

본 연구는 in vivo 동물 실험으로 LPS와 thalidomide에 의한 종양의 미세혈관생성 기전을 알아보기 위한 실험이며, 앞으로 미세혈관생성 억제기전을 이용할 종양 치료 분야에 있어서 기초 자료로 이용될 수 있기를 기대한다.

## 결 론

종양의 성장, 침윤, 전이에는 종양세포의 증식과 종양이 자라는 주위의 환경에 의해서도 영향을 받는다. 특히 종양에서의 신생혈관 형성 자체는 종양의 성장과 전이에 아주 중요한 요소로서, 미세혈관 생성 정도는 종양의 예후를 판정하는 데 도움을 줄 수 있다. 본 연구는 CT26 murine 대장암 세포주를 BALB/c mouse에 피하 주사하여 만든 대장암 동물모델에서 저농도 LPS와 항사이토카인 약제인 thalidomide 투여로 종양의 미세혈관생성과 억제에 대한 기전을 이해하고자 하였다. 결론적으로, 저농도 LPS 투여는 종양세포의 TNF- $\alpha$ 와 VEGF 발현을 증가시켜 미세혈관생성을 촉진하였고, 종양의 성장도 증가시켰다. Thalidomide의 병행 투여는 TNF- $\alpha$ 의 발현을 억제하고, VEGF의 발현의 감소와 함께 미세혈관생성도 억제되는 경향을 보였다. 따라서 thalidomide는 종양에 의한 TNF- $\alpha$  발현을 감소시키고, VEGF의 발현 감소와 함께 종양의 신생혈관 생성과정을 억제함을 확인할 수 있었다.

## REFERENCES

1. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;285:1182-6.
2. Cortran RS, Kumar V, Collins T, editors. Robbins pathologic basis of disease, 6th ed. Philadelphia: WB Saunders; 1999.
3. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and

- other disease. *Nat Med* 1995;1:27-31.
4. Mesiano S, Ferrara N, Jaffe RB. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian cancer: inhibition of ascites formation by immunoneutralization. *Am J Pathol* 1998;13:1249-56.
5. 이진숙, 서강석. 자궁경부암중에서 VEGF 발현 및 혈관형성에 대한 면역 조직화학적 검색. *대한병리학회지* 1999;33:96-102.
6. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *Eur J Cancer* 1996;32A:2413-22.
7. Cheung N, Wong MP, Yuen ST, Leung SY, Chung LP. Tissue-specific expression pattern of vascular endothelial growth factor isoforms in the malignant transformation of lung and colon. *Hum Pathol* 1998;29:910-4.
8. Takanami I, Tanaka F, Hashizume T, Kodaira S. Vascular endothelial growth factor and its receptor correlate with angiogenesis and survival in pulmonary adenocarcinoma. *Anticancer Res* 1997;17:2811-4.
9. Fontanini G, Boldrini L, Chine S, Pisaturo F, Basolo F, Calcinai A, et al. Expression of vascular endothelial growth factor mRNA in non-small-cell lung carcinomas. *Br J Cancer*. 1999;79:363-9.
10. Berse B, Brown LF, Van de Water L, Dvorak HF, Senger DR. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *Mol Biol Cell* 1992;3:211-20.
11. Shibusu T, Shijubo N, Abe S. Tumor angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in stage I lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 1998;4:1483-7.
12. Mattern J, Koomagi R, Volm M. Coexpression of VEGF and bFGF in human epidermoid lung carcinoma is associated with increased vessel density. *Anticancer Res* 1997;17:2249-52.
13. Pidgeon GP, Harmey JH, Kay E, Da Costa M, Redmund HP, Bouchier-Hayes DJ. The role of endotoxin/lipopolysaccharide in surgically induced tumor growth in a murine model of metastatic disease. *Br J Cancer* 1999;81:1311-7.
14. Calabrese L, Fleischer AB. Thalidomide: current and potential clinical applications. *Am J Med* 2000;108:487-95.
15. Kenyon BM, Browne F, D'Amato RJ. Effects of thalidomide and related metabolites in a mouse corneal model of neovascularization. *Exp Eye Res* 1997;64:971-8.
16. Maas JW, Calhaz-Jorge C, ter Riet G, Dunselman GA, de Goeij AF, Struijker-Boudier HA. Tumor necrosis factor- $\alpha$  but not interleukin-1 $\beta$  or interleukin-8 concentrations correlate with angiogenic activity of peritoneal fluid from patients with minimal to mild endometriosis. *Fertil Steril* 2001;75:180-5.
17. Torisu H, Ono M, Kiryu H, Furue M, Ohmoto Y, Nakayama J, et al. Macrophage infiltration correlates with tumor stage and angiogenesis in human malignant melanoma: possible involvement of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\alpha$ . *Int J Cancer* 2000;85:

- 182-8.
18. Wilmanns C, Fan D, O'Brian CA, Bucana CD, Fidler IJ. Orthotopic and ectopic organ environments differentially influence the sensitivity of murine colon carcinoma cells to doxorubicin and 5-fluorouracil. *Int J Cancer* 1992;52: 98-104.
19. Richardson P, Hideshima T, Anderson K. Thalidomide: emerging role in cancer medicine. *Annu Rev Med* 2002;53:629-57.
20. Wu KL, Sonneveld P. Thalidomide: new uses for an old drug. *Ned Tijdschr Geneesk* 2002;146:1438-41.
21. Stebbing J, Benson C, Eisen T, Pyle L, Smalley K, Birdle H, et al. The treatment of advanced renal cell cancer with high-dose oral thalidomide. *Br J Cancer* 2001;85:953-8.
22. Katakai A, Scheid P, Piet M, Marie B, Martinet N, Martinet Y, et al. Tumor infiltrating lymphocytes and macrophages have a potential dual role in lung cancer by supporting both host-defense and tumor progression. *J Lab Clin Med* 2002; 140:320-8.
-