

Table 4. PCNA index and microvessel density of tumors[#]

Group	Response	PCNA	Microvessel density
Test Control	PR(n=2)	47.0±2.8	42.3±1.9
	NR(n=5)	50.3±3.9	50.2±14.3 [#]
	PD(n=20)	52.1±3.4	64.2±13.4 [#]
	Total	51.4±3.6	60.2±14.7
TMX	PR(n=20)	42.6±11.3	46.6±9.6
	NR(n=9)	49.8±7.0 [◇]	47.1±12.3
	PD(n=7)	53.5±3.4 [◇]	63.1±14.6 [#]
	Total	46.5±10.2	50.0±12.9
PPS	PR(n=10)	47.9±5.4	29.4±8.5
	NR(n=9)	47.4±3.7	38.2±8.6 ^{†*}
	PD(n=9)	45.8±6.0	43.5±16.2 ^{†*}
	Total	47.1±5.0	36.7±12.4 [*]

PR: partial response, NR: no response, PD: progressive disease, TMX: tamoxifen, PPS: pentosan polysulfate

#: Values are mean ± standard deviation

*: Significant difference when compared with the test control group(p<0.05)

†: Significant difference when compared with the test control and TMX groups(p<0.05)

◇: Significant difference when compared with the PR of the TMX group(p<0.05)

※: Significant difference when compared with the other response(s) of the same group(p<0.05)

Table 5. Estrogen receptor positivity of rat mammary carcinomas in the test control group

% of ER-positive cells	Number of tumors(%)
< 10	5(20)
10 ~ 20	1(4)
20 ~ 30	2(8)
> 30	17(68)
Total	25(100)

4. 종양의 PCNA표지지수 및 미세혈관밀도

종양의 PCNA 표지지수는 실험군 전체로 보면, 실험대조군에 비해 TMX군 및 PPS군에서 약간 적었으나 각 군간에 유의있는 차이는 없었다(Table 4, Fig. 7). 각 군내에서 반응도에 따른 PCNA 표지지수를 보면, 실험대조군과 TMX군에서는 PD반응군 및 NR반응군에서 PR반응군에 비해 PCNA 표지지수가 높은 경향을 보였으나 이 중 TMX군에서만 통계학적 의의가 있었다. 그러나 PPS군에서는 PR반응군, NR반응군 및 PD반응군 사이에 모두 PCNA 표지지수의 차이가 별로 없었다(Fig. 8). 미세혈관밀도는 실험군 전체로 보면, TMX군은 실험대조군과 비교시 미세혈관 밀도가 경미하게 낮은 경향을 보였으며 통계

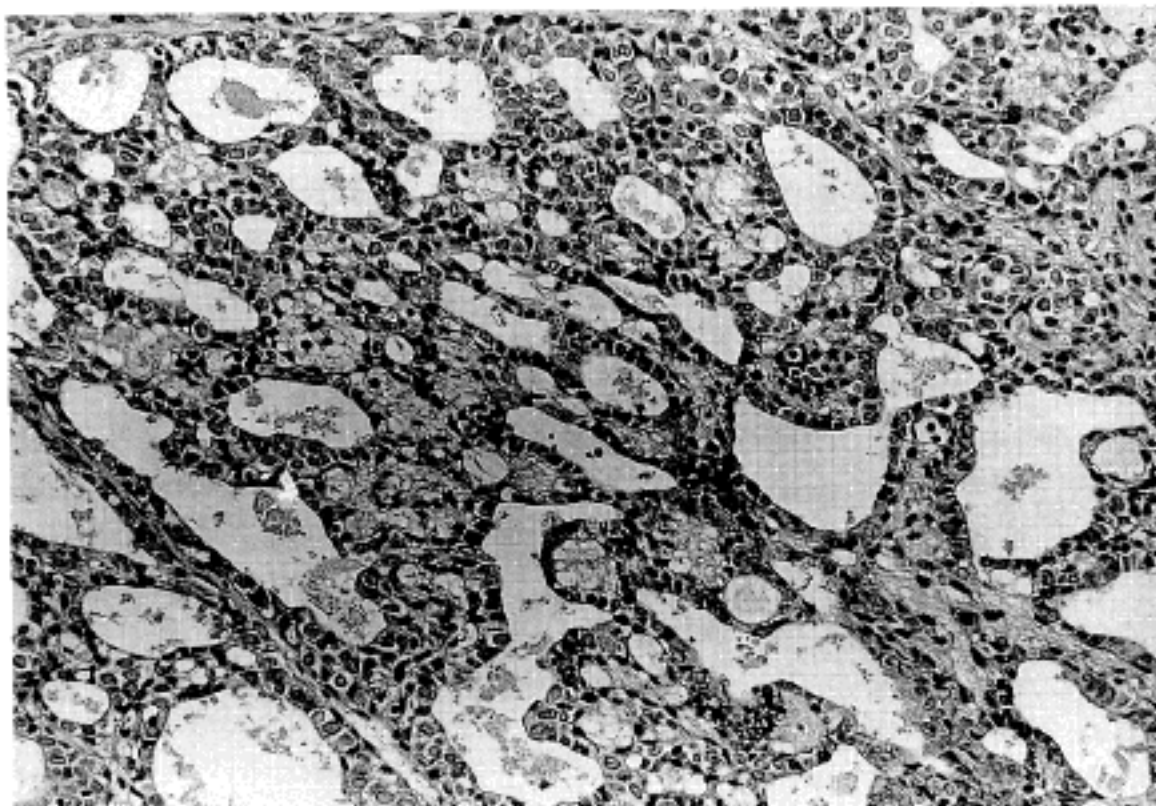


Fig. 5. A rat mammary tumor belonging to histologic grade I. Many definite tubules are present in the tumor.

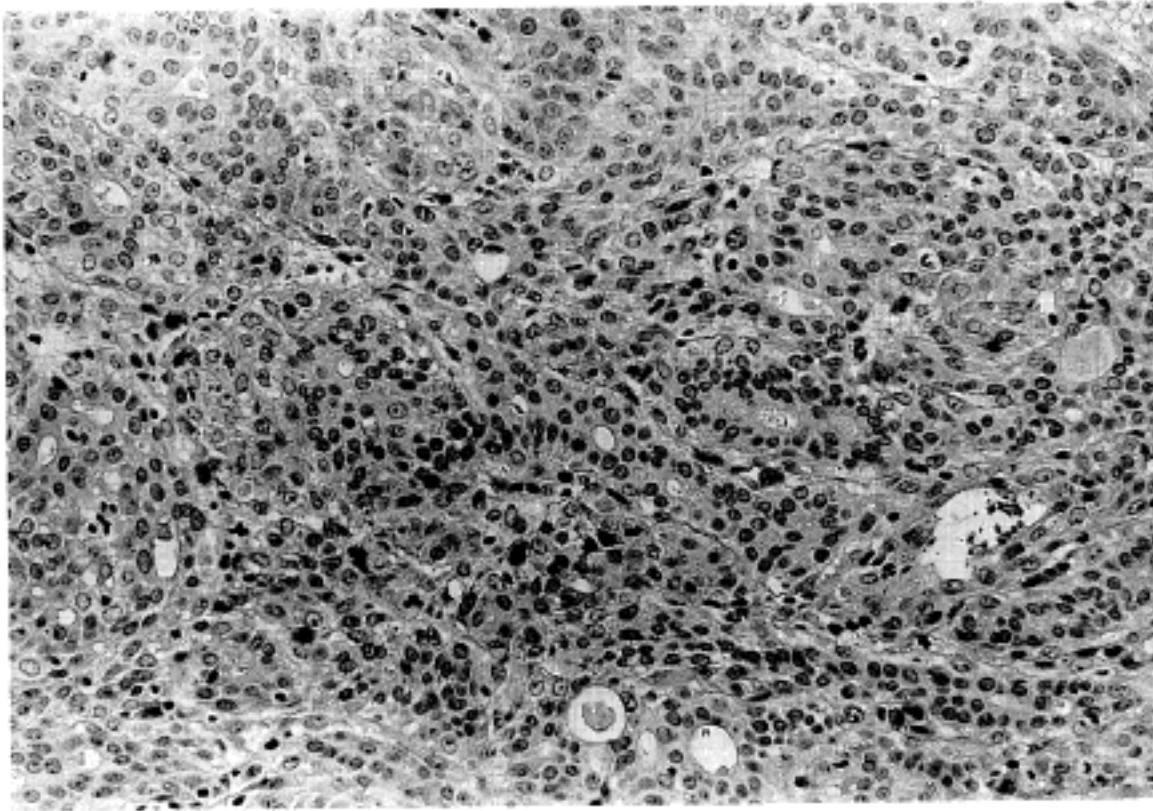


Fig. 6. A rat mammary tumor belonging to histologic grade II. A large area of solid tumor exists and definite tubules are almost invisible.

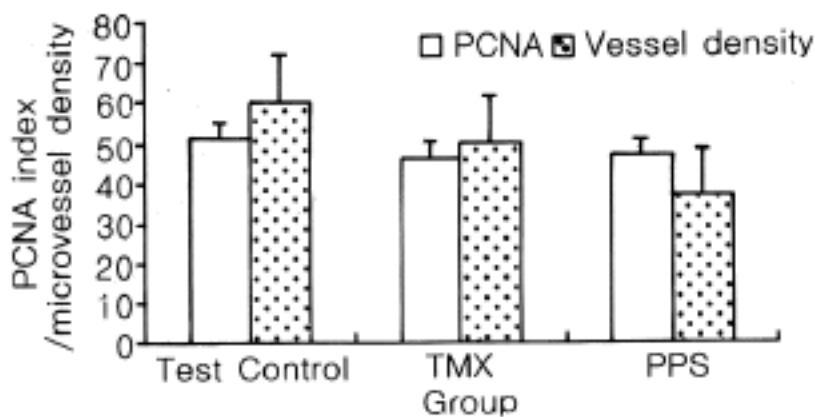


Fig. 7. PCNA index and microvessel density of the tumors as a whole

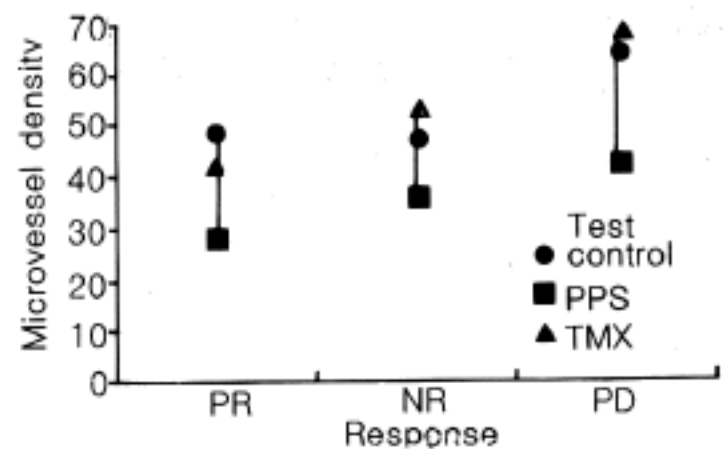


Fig. 9. Microvessel density of the tumors. PR: partial response, NR: no response, PD: progressive disease

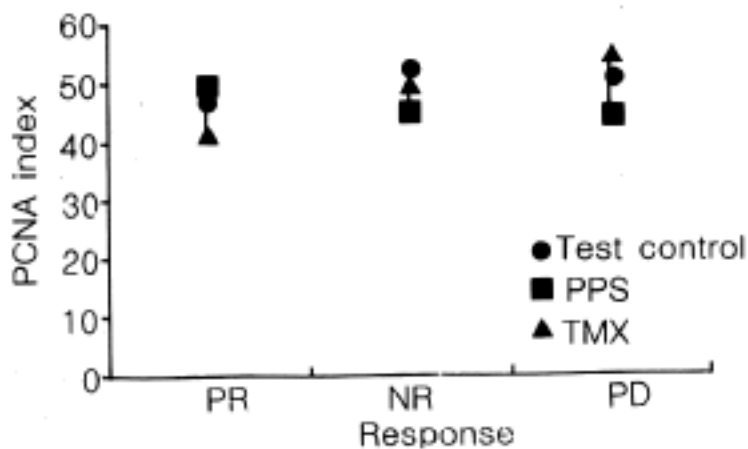


Fig. 8. PCNA index of the tumors. PR: partial response, NR: no response, PD: progressive disease

미세혈관밀도의 차이를 보면 PPS군에서는 PR반응군, NR반응군 및 PD반응군 모두에서 대조군과 TMX군에 비해 미세혈관밀도가 낮았으며 이 중 NR반응군 및 PD반응군에서 통계학적 의의가 있었다 ($p < 0.05$). 각 군내에서 반응에 따른 미세혈관밀도는 TMX군에서는 PD반응군이 PR반응군 및 NR반응군에 비해 의의있게 높았으며 ($p < 0.05$) PPS군과 실험대조군에서는 PD반응군 및 NR반응군이 PR반응군에 비해 의의있게 높았다 ($p < 0.05$) (Fig. 9).

5. 에스트로겐 수용체 양성률

실험대조군 종양 25개 중 유방암종세포의 10% 이상이 ER 양성을 보인 예가 20개로서 80%의 ER양성률을 보였으며 30% 이상이 양성을 보인 예는 17예 (68%)였다 (Table 5).

학적으로 의의가 없었다. PPS군에서는 실험대조군에 비해 미세혈관밀도가 아주 낮았으며 통계학적으로 의의있었다 ($p < 0.05$) (Fig. 7). 각 군간의 반응도에 따른

고 찰

본 연구에서 유발된 유방종양의 조직학적 유형을 보면 선암종이 94.7%(198개)로서 대부분을 차지하였으며 선암종 외의 것으로 섬유선종이 6, 편평상피암종이 3, 그리고 선종이 2이었다. 발암제에 의해 유발되는 유방종양은 대부분이 암종이며 그외 섬유육종, 섬유선종, 선종 등으로서²⁹ 본 실험 결과와 유사하다. 본 연구에서는 편평상피암종이 2예 있었는데 조직학적 소견을 보면 유방조직에서 유래되었다기보다 피부에서 유래된 것으로 생각되었다.

선암종이 처음 발생한 시기는 DMBA 투여 후 12주였으며 이 후 여러 주에 걸쳐 종양이 발생하였는데, 다른 연구들과 비교시 종양의 첫 발생시기가 며칠 늦으나 큰 차이는 없어 Huggins등²⁹은 본 실험에서와 같은 용량인 DMBA 20 mg을 1회 위내 투여시 74일째에 처음 발생하여 167일 제까지 발생하였다고 하였다. 또한 그들은 DMBA 50 mg을 1회 투여하면 44일째에 처음 종양이 발생하여 83일 제까지 발생하였다고 하여 용량을 증가하면 발생시기가 빨라지며 또한 발생종양 수도 많아진다고 하였다. Geyer등³⁰과 Scholler 및 Carnes³¹는 쥐에 DMBA를 정맥주사하면 가장 빨리 유방암을 유발할 수 있으며 평균발생 기간이 59일이라고 하여 빠른 시일내에 종양을 유발하고자 할 때에는 위내 투여보다는 정맥내 주사를 이용하는 것이 좋겠다.

TMX은 에스트로겐 수용체에 경쟁적으로 결합하여 항에스트로겐 효과를 일으키는 것으로 알려져 있으나 그 명확한 작용기전은 아직 분명하지 않다^{18,19}. 그러나 최근 일부 연구에서 TMX이 종양혈관형성을 저지한다고 보고하고 있으며 에스트로겐 수용체 음성인 유방암 환자를 TMX으로 치료하였을 때 내피세포의 세포분열을 저하시켜 혈관형성을 저지하는 것으로 알려져 있는 beta-transforming growth factor가 증가되는 것으로 보아 TMX이 종양혈관형성 억제에도 관여할 가능성이 있다고 주장하고 있다²¹. 최근 유방종양내 미세혈관 밀도가 침윤성 유방암종 환자의 중요하고 독립적인 예후인자로 알려져 있음을 볼 때^{23,24,32,33} TMX이 종양 혈관형성에 어떠한 영향을 미치는가가 중요한 과제로 생각되어 본 연구에서는 TMX이 혈관형성 저지능력이 있는지, 그리고 저지능력이 있다면 기왕에 알려진 혈관형성저지제인 PPS와 어떠한 차이가 있는가를 알아 보고자 하였다.

본 연구 결과에서는 실험군 전체적으로 비교시

실험대조군에 비해 TMX군이 미세혈관밀도가 다소 낮은 경향을 보였으나 통계학적인 의의는 없었다. PPS군에서는 실험대조군에 비해 미세혈관밀도가 현저히 낮았으며 통계학적인 의의가 있어 종양 혈관형성 저지능력이 PPS군에서는 확인되었다. 반응군 별로 비교하여도 단지 TMX군의 NR반응군이 실험대조군과 비교시 낮은 수치를 보였을 뿐이며 의의도 없었으나, PPS군에서는 각 반응군 모두에서 실험대조군과 TMX군에 비해 미세혈관밀도가 낮아 PPS의 종양 혈관형성 저지능력이 각 반응군에서 공히 나타남을 알 수 있었다. TMX과 PPS가 혈관형성 저지능력은 서로 차이가 있으나 이들 약제 투여에 대한 유방암종의 반응률은 대조군의 18%에 비해 각각 66.1%, 45.1%로서 유방종양의 크기가 TMX군과 PPS군 모두에서 유의있게 감소하였다. DMBA에 의해 유발된 유방암종의 대부분이 에스트로겐 의존성이므로^{34,35} 이러한 소견은 TMX군의 종양크기 감소가 이미 잘 알려져 있는 항에스트로겐 효과에 기인되는 것을 암시해 준다고 생각된다. 본 연구에서도 실험대조군의 종양 25개에서 ER에 대한 면역염색을 시행해 본 결과, 80%가 ER양성(종양세포수의 10% 이상 양성인 경우)이었다. 그러나 본 실험에서는 TMX군에서 ER염색을 시행하지 않았으므로 TMX에 대한 반응과 ER양성 여부의 관계를 명확히 알수는 없다고 본다. 이를 확인하기 위해서 차후 종양 발생 초기에 세침흡인을 이용, 종양에서 세포도말을 얻어 ER 양성을 확인한 후 TMX을 투여하는 방법의 실험을 계획하고 있다. 또한 본 실험에서 TMX과 PPS를 투여한 시기의 종양 크기가 평균 1.5 cm 정도로서 인체에서는 작은 크기이나 쥐의 체중에 비하면 대단히 큰 종괴에 해당되므로, 이미 진행된, 큰 크기의 유방암종에서는 TMX의 혈관형성 저지능력이 발휘되지 못 할 가능성도 배제할 수는 없다고 생각된다. 이에 대한 연구로서 0.5 cm 정도 크기인, 발생 초기의 작은 종괴에 본 연구와 같은 실험을 시도해보는 것이 필요하다고 본다.

각 군내에서 반응별 미세혈관밀도를 보면 TMX군에서는 PD반응군이 PR반응군 및 NR반응군에 비해 유의있게 높아 종양의 크기가 증가되면 미세혈관밀도가 증가되는 것을 시사하였으나 PPS군과 실험대조군에서는 공히 PD반응군 및 NR반응군이 PR반응군에 비해 유의있게 높은 수치를 보여 이들 군에서는 종양의 크기 감소가 미세혈관밀도와 관련이 있음을 시사하였다. 이러한 소견으로 보아 TMX군에서의 부분반응은 미세혈관밀도와 관련이 없는 것으로 생각된다.

본 실험에서 유방암종의 PCNA 표지지수를 보면 실험군 전체적으로 비교시 실험대조군에 비해 TMX군 및 PPS군에서 낮은 경향이 있었으나 각 군간에 유의있는 차이는 없었다. 각 군의 반응별 PCNA 표지지수를 보면 대조군과 TMX군은 공히 PD반응군 및 NR반응군이 PR반응군에 비해 PCNA 표지지수가 높은 경향을 보였으나 이 중 TMX군에서만 의미가 있어 TMX투여에 의한 종양크기의 감소가 세포증식능의 저하와 관련이 있거나 또는 TMX치료에 듣지 않는 종양에서는 세포증식이 항진될 가능성을 시사하였다. Daly³⁶와 Fendl 및 Zimmiski²⁷에 의하면 장기간 TMX 투여시 ER양성인 종양이 ER음성인 종양으로 되어 더 공격적인 종양으로 변화될 수 있다고 하며, Gottardis 및 Jordan³⁷은 TMX치료시 종양세포 성장을 저지하던 것이 나중에는 성장을 촉진하게 된 연구를 보고하고 있다. 본 연구에서도 TMX의 투여기간이 8주로서 장기간에 해당되는 것을 고려하면 TMX치료에 반응하지 않는 종양에서 세포증식이 항진되었을 가능성이 있다고 생각된다. Osborne등³⁸은 이러한 종양세포의 TMX 저항이 종양의 비정상적인 약물대사로 인해 에스트로젠 대사물이 과다하게 생성된 것에 기인된다고 보고하고 있다.

대조군 및 TMX군과 달리 PPS군에서는 각 반응군 사이에 PCNA 표지지수의 차이가 별로 없어 종양의 크기가 증가했음에도 불구하고 PCNA 표지지수는 별 변화가 없음을 알 수 있었다. 어떤 이유로 PPS군에서만 이러한 현상이 나타났는지는 본 실험결과만으로는 알 수 없으나, 세포증식능은 증가하지 않더라도 세포의 생존력(viability)이 증가하는 경우라면 가능하며 예를 들면 apoptosis가 억제되는 상황을 생각해 볼 수 있겠다. Apoptosis는 세포가 죽을 때 사전에 이미 마련된 사망 프로그램에 따라 죽는 능동적인 사망기전으로서³⁹ apoptosis 조절에 영향을 미치는 것은 bcl-2, myc, p53 등의 유전자^{40, 42}와 여러 항암제⁴³가 있다. 이 중 bcl-2는 apoptosis를 차단함으로써 세포의 생존력을 연장시키는 대표적 종양유전자로서 정상적으로 유방, 갑상선 및 섬유선의 기저상피세포, 중추신경계의 뉴우론, 장관 소낭선(crypt)의 상피세포, 표피의 기저세포 등에서 발현된다⁴⁴. 본 연구에서는 bcl-2 발현에 대한 염색은 시행하지 않았으나 PPS투여 과정 중에 bcl-2의 과발현이 유도된 종양에서 그러한 현상이 초래되었을 가능성도 생각해 볼 수 있다.

약물 투여후에 본 종양에서 관찰된 조직학적 소견 중 초자양 변화는 TMX군에서 독특하게 많았으며 특히 PR반응군에서 더욱 심한 경향이 있었다. 이

러한 변화는 난소절제나 안드로젠 투여에 의해 유방종양이 변형될 때 자주 보이는 것으로서²⁹ 이는 본 연구에서 투여한 TMX의 항에스트로젠 효과에 의한 것으로 설명된다. 초자양 변화는 종양상피세포의 심한 위축 및 소실과 동반되는 것으로 보아 TMX에 의해 ER 양성인 종양세포의 성장이 저지된 후 생기는 이차적인 변성의 결과로 생각된다. 본 연구에서는 종양세포의 분화도와 종양의 반응도의 관계를 알아 보고자 Bloom 및 Richardson²⁸의 기준에 의해 조직학적 등급을 분류해 본 결과 투여 약물에 따른 분화도의 차이는 없었으나, 실험군 모두에서 등급 II에 속하는 종양이 PD반응군에 더 많은 경향을 보여 분화가 나쁜 종양이 불량한 반응을 보이는 경향이 있었다. 유방암종에 있어 Bloom 및 Richardson기준²⁸의 등급은 유방암종의 주요 예후인자들과 관련이 있어 높은 등급의 종양일수록 불량한 예후를 보인다⁴⁵⁻⁴⁷. 본 연구에서는 종양의 거의 대부분이 등급 I에 속하였으며 등급 III에 속하는 종양이 4개 뿐으로 너무 적어서 이들이 PD반응군에 속하긴 하였으나 큰 의미를 두기는 어려운 것으로 생각된다.

결 론

Sprague-Dawley계 암컷 흰쥐에 DMBA를 위내로 투여하여 유방암을 유발한 후 TMX과 PPS를 투여하여 이들의 병리조직학적 변화, 종양성장 억제효과, 항혈관형성작용 유무 및 세포증식능과의 관계를 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 유방종양 발생률은 80.1%였으며 이 중 선암종이 약 95%에 해당하였다.

2) TMX과 PPS 투여에 대한 유방 선암종의 반응률은 TMX 투여군은 66.1%, PPS투여군은 45.1%로 실험대조군(18.0%)에 비하여 유의있는 반응률의 증가를 보였다. TMX투여군과 PPS투여군의 반응률 비교시 TMX투여군이 PPS투여군에 비해 반응률이 높은 경향을 보였으나 통계학적 유의는 없었다.

3) TMX 및 PPS 투여 후 종양의 병리조직학적 소견을 보면 괴사는 실험대조군에 비해 TMX군 및 PPS군에서 현저히 많았다. 초자양 변화는 TMX군에서 다른 군에 비해 현저히 많았으며 그 정도도 더 심한 경향이 있었고 종양상피세포의 위축이 동반되었다.

4) 종양의 PCNA표지지수는 각 군간에 유의있는 차이는 없었으나 반응도에 따른 차이에서는 TMX군의 NR반응군 및 PD반응군이 PR반응군에 비해

PCNA표지지수가 의의있게 높아 TMX치료에 반응하지 않는 종양에서 세포증식이 높은 경향을 보여 주었다. 이와 달리 PPS군에서는 각 반응군 사이에 PCNA표지지수의 차이가 없었다.

5) 종양의 미세혈관밀도는 실험대조군과 TMX군에 비해 PPS군에서 의의있게 낮았으며 이러한 양상은 반응도와 무관하게 나타났으나 TMX군은 실험대조군과 비교시 미세혈관밀도에서 의의있는 차이가 없었다.

6) 반응별 미세혈관밀도는 3군 모두에서 PD반응군이 PR반응군에 비해 의의있게 높아 종양 크기의 증가가 미세혈관밀도와 관련이 있음을 암시하였다.

이상의 결과로 보아 TMX과 PPS는 실험적으로 유발된 유방의 선암종에 대해 항종양 효과가 있으며 PPS에 의한 항종양효과는 혈관형성 억제와 관계가 있으나 TMX에 의한 항종양효과는 혈관형성 억제와는 관계가 없는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- Folkman J. Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res* 1985; 43: 175-203.
- Maiorana A, Gullino PM. Acquisition of angiogenic capacity and neoplastic transformation in the rat mammary gland. *Cancer Res* 1978; 38: 4409-4414.
- Pawletz N, Knierim M. Tumor-related angiogenesis. *Crit Rev Oncol Hematol* 1989; 9: 197-242.
- Folkman J. The vascularization of tumors. *Sci Am* 1976; 234: 58-64.
- Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 18: 1182-1186.
- Folkman J. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg* 1972; 175: 409-416.
- Lee A, Langer R. Shark cartilage contains inhibitors of tumor angiogenesis. *Science* 1983; 221: 1185-1187.
- Eisenstein G, Kuettner KE, Neapolitan C, Soble LW, Sorgente N. The resistance of certain tissues to invasion. *Am J Pathol* 1975; 81: 337-347.
- Taylor S, Folkman J. Protamine is an inhibitor of angiogenesis. *Nature* 1982; 297: 307-312.
- Wellstein A, Zugmaier G, Califano III JA, Kern F, Paik S, Lippman ME. Tumor growth dependent on Kaposi's sarcoma-derived fibroblast growth factor inhibited by pentosan polysulfate. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83: 716-720.
- Gross J, Azizkhan RG, Biswas C, Bruns RR, Hsieh DST, Folkman J. Inhibition of tumor growth, vascularization, and collagenolysis in the rabbit cornea by medroxyprogesterone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 1176-1180.
- Ziche M, Ruggiero M, Pasquali F, Chiarugi VP. Effects of cortisone with and without heparin on angiogenesis induced by prostaglandin E1 and by S180 cells, and on growth of murine transplantable tumors. *Int J Cancer* 1985; 35: 549-552.
- Lee K, Erturk E, Mayer Robert, Abraham TK Cockett. Efficacy of antitumor chemotherapy in C3H mice enhanced by the antiangiogenesis steroid, cortisone acetate. *Cancer Res* 1987; 47: 5021-5024.
- Atiba JO, Meyskens FL. Chemoprevention of breast cancer. *Semin Oncol* 1992; 19: 220-229.
- Elledge RE, McGuire WL, Osborne CK. Prognostic factors in breast cancer. *Semin Oncol* 1992; 19: 244-253.
- Gelber RD, Goldhirsch A, Coates AS. Adjuvant therapy for breast cancer: understanding the overview. *J Clin Oncol* 1993; 11: 580-585.
- Jordan VC. The role of tamoxifen in the treatment and prevention of breast cancer. *Curr Probl Cancer* 1992; 16: 131-176.
- Kon OL. Estrogen, antiestrogen and cell proliferation. *BioEssays* 1989; 10: 210-214.
- Wiseman H. Tamoxifen: new membrane mediated mechanisms of action and therapeutic advances. *Trends Pharmacol Sci* 1994; 15: 83-89.
- Jordan VC. Long-term adjuvant tamoxifen therapy for breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1990; 15: 125-136.
- Knabbe C, Zugmaier G, Schmahl M, Diemel M, Lippman ME. Induction of transforming growth factor beta by the antiestrogens, droloxifene, tamoxifen, and toremifene in MCF-7 cells. *Am J Clin Oncol* 1991; 14(Suppl 2): S15-S20.
- Schultz GS, Grant MB. Neovascular growth factors. *Eye(Lond.)* 1991; 5: 178-180.
- Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 324: 1-8.
- Bosari S, Lee KC, Delellis RA, Wiley BD, Heatley GJ, Silverman ML. Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma. *Hum Pathol* 1992; 23: 755-761.
- Tanaka NG, Sakamoto N, Korenaga H, Inoue K, Ogawa H, Osada Y. The combination of a bacterial polysaccharide and tamoxifen inhibits angiogenesis and tumor growth. *Int J Radiat Biol* 1991; 60: 79-83.
- Gagliardi A, Collins DC. Inhibition of angiogenesis by

- antiestrogens. *Cancer Res* 1993; 53: 533-535.
27. Fendl KC, Zimmiski SJ. Role of tamoxifen in the induction of hormone-independent rat mammary tumors. *Cancer Res* 1992; 52: 235-237.
 28. Bloom HJG, Richardson WW. Histologic grading and prognosis. *Br J Cancer* 1957; 11: 359-377.
 29. Huggins C, Briziarelli G, Sutton H. Rapid induction of mammary carcinoma in the rat and the influence of hormones on the tumors. *J Exp Med* 1959; 109: 25-42.
 30. Geyer RP, Bleisch VR, Brayant JE, Robbins AN, Saslaw IM, Stare FJ. Tumor production in rats injected intravenously with oil emulsions containing 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene. *Cancer Res* 1951; 11: 474-478.
 31. Scholler J, Carnes RE. Preliminary studies with mammary tumors in the rat induced by 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene(DMBA). *Proc Am Assn Cancer Res* 1958; 2: 343.
 32. Weidner N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Allred EN, Moore DH, Meli S, Gasparini G. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 1875-1887.
 33. Vartanian RK, Weidner N. Correlation of intratumoral endothelial cell proliferation with microvessel density (tumor angiogenesis) and tumor cell proliferation in breast carcinoma. *Am J Pathol* 1994; 144: 1188-1194.
 34. Bradley CJ, Kledzik GS, Meities J. Prolactin and estrogen dependency of rat mammary carcinoma at early and late stages of development. *Cancer Res* 1976; 36: 319-324.
 35. Huang FL, Cho-Chung YS. Hormone-regulated expression of cellular ras^H oncogene in mammary carcinoma in rats. *Biochem Biophys Res Comm* 1984; 123: 141-147.
 36. Daly MJ. Tamoxifen prophylaxis. *Lancet* 1986; I (8475): 263-264.
 37. Gottardis MM, Jordan VC. Development of tamoxifen-stimulated growth of MCF-7 tumors in athymic mice after long-term antiestrogen administration. *Cancer Res* 1988; 48: 5183-5187.
 38. Osborne CK, Coronado EB, Wiebe VJ. Antiestrogen sensitivity and resistance [abstract]. In *Proceedings of the 74th Annual Meeting of the Endocrine Society*. San Antonio, 1992.
 39. Kerr JFR, Wyllie AAH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-257.
 40. Korsmeyer SJ. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: Regulation of cell death. *Blood* 1992; 80: 879-886.
 41. Bissonnette RP, Echeverri F, Mahboudi A, Green DR. Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. *Nature* 1992; 359: 552-554.
 42. Debbas M, White E. Wild-type p53 mediates apoptosis by E1A, which is inhibited by E1B. *Genes Dev* 1993; 7: 546-554.
 43. Tritton TR. Cell death in cancer chemotherapy: The case of adriamycin. In Tomei LD, Cope FO eds.: *Apoptosis: The molecular basis of cell death*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1991: 121.
 44. Hockenbery D, Zutter M, Hickey W, Nahm M, Korsmeyer SJ. Bcl-2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 6961-6965.
 45. Elston CW, Gressham GA, Rao GS, Zebro T, Haybittle JL, Kearney G. The Cancer Research Campaign trial for early breast cancer, clinico-pathologic aspects. *Br J Cancer* 1982; 45: 655-669.
 46. Davis BW, Gelber RD, Goldhirsch A, Hartmann WH, Locher GW, Reed R, Golouch R, Save-Soderbergh J, Holloway L, Russel I, Rudenstam M. Prognostic significance of tumor grade in clinical trials of adjuvant therapy for breast cancer with axillary lymph node metastasis. *Cancer* 1986; 58: 2662-2670.
 47. Simpson JF, Page DL. Prognostic value of histopathology in the breast. *Semin Oncol* 1992; 19: 254-262.
-

Tamoxifen과 Pentosan Polysulfate가 Dimethylbenzanthracene으로 유발된 흰쥐 유방암종의 혈관형성 및 종양세포증식에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 병리학교실 및 한림대학교 의과대학 외과학교실*

박 찬 훈* · 박 철 · 이 광 길

The Effect of Tamoxifen and Pentosan Polysulfate on the Microvessel Density and Cell Proliferation of Dimethylbenzanthracene-Induced Rat Mammary Carcinoma

Chan Heun Park, M.D.*, Zhe Piao, M.D. and Kwang Gil Lee, M.D.

Department of Pathology, Yonsei University College of Medicine and
Department of Surgery, Hallym University Medical College*

Antiestrogen tamoxifen (TMX) is thought to elicit its therapeutic effect by competing with endogenous estrogens for the estrogen receptor. Several more recent studies asserted that the antitumor effect of TMX is not due solely to the inhibition of estrogen receptor-mediated action, but due partly to its capacity to inhibit angiogenesis and impair neovascularization. Despite extensive research and clinical experience with this drug, its exact mode of action in inducing tumor regression is still not clear.

The present study is aimed toward the investigation of the effects of TMX on dimethylbenzanthracene-induced rat mammary carcinomas with respect to the tumor response to the drugs, histological changes, cell proliferative activity and angiogenesis inhibition, and if TMX has antiangiogenic action, to compare it with that of pentosan polysulfate (PPS), an already known antiangiogenic substance. Female Sprague-Dawley rats, aged 50 days, were divided into normal control, test control (tumor induction by dimethylbenzanthracene), TMX (TMX administration after tumor induction), and PPS (PPS administration after tumor induction) groups. Tumor response to the drug administration was classified according to changes of tumor volume as follows; complete response (CR), partial response (PR), no response (NR), and progressive disease (PD). The response rate of rat mammary carcinomas to the drug administration was significantly higher ($p < 0.05$) in the TMX and PPS groups as compared with the test control group. There was, however, no statistical significance between the TMX and PPS groups. Necrosis was considerably frequent in tumors of the TMX and PPS groups. Hyaline change of the stroma was strikingly more common and marked in the TMX group and it was associated with atrophy of epithelial cells of the tumor glands. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-

접 수 : 1995년 12월 1일, 게재승인 : 1996년 1월 17일
주 소 : 서울시 서대문구 신촌동 134, 우편번호 120-752
연세대학교 의과대학 병리학교실, 이광길

labeling index of the tumors was significantly higher ($p < 0.05$) in the tumors with NR and PD of the TMX group when compared with those with PR of the same group, which suggested a higher cell proliferative activity in these response groups. In the PPS group, however, there was no significant difference in PCNA index according to response. Microvessel density of the tumors was significantly lower ($p < 0.05$) in the PPS group as compared with the test control and TMX groups and it was not related with response. The TMX group, however, did not show any significant difference in microvessel density when compared with the test control group. Microvessel density was significantly higher ($p < 0.05$) in tumors with PD than those with PR in all 3 groups, which suggested a positive relation of increase in tumor size and angiogenesis.

Based on these results it is thought that TMX and PPS inhibit growth of chemically-induced rat mammary carcinomas. It seems that the antitumor action of PPS is related with its antiangiogenic capability, but that of TMX does not have a relationship with angiogenesis inhibition. (Korean J Pathol 1996; 30: 94 ~ 105)

Key Words: Breast cancer, Tamoxifen, Pentosan polysulfate, Angiogenesis

서 론

발생초기의 종양은 무혈관 상태이나 크기가 작으므로 주변 삼투현상만으로도 필요한 물질의 공급이 가능하다¹. 그러나 종양이 성장하여 일정한 크기를 넘어서면 종양세포는 혈관형성인자(angiogenic factor)를 생산하며 이로 인해 종양에 인접한 정상 혈관들이 종양내로 자라 들어감으로써 종양의 성장에 필요한 미세혈관이 공급된다^{2,3}. 혈관이 증식하게 되면 종양은 더욱 성장하고 전이능력을 갖게 된다. 즉 종양의 성장 및 전이는 혈관형성(vascularization)의존성이 있다¹. 예를 들면 자궁경부, 방광 및 유방의 상피내암종은 수년간 작은 크기로 지속되다가 종양내에 혈관형성이 시작되면 빠른 속도로 성장하며 국소성 침윤 및 전이를 하는 경향을 보인다⁴. 이와 유사한 현상은 피부의 악성흑색종에서도 볼 수 있어 Clark 수준 I인 표재성 흑색종이 성장이 빠른 침윤성 흑색종으로 전환되는 것은 종양내의 신혈관형성(neovascularization)과 밀접한 관련이 있다⁵. 이러한 사실에 근거하여 종양혈관형성(tumor angiogenesis) 억제로 종양의 성장을 억제 내지 조절할 수 있음이 주장된 이래⁶, 연골추출물^{7,8}, protamine⁹, pentosan polysulfate(이하 PPS)¹⁰, medroxyprogesterone¹¹, cortisone acetate^{12,13} 등이 항혈관형성작용이 있음이 알려졌고 이들이 동물에서 실험적으로 유발된 종양의 퇴화를 일으킨다는 보고도 있다¹.

근자에 여성유방암의 빈도가 증가하고 있어 이의 진단, 치료 및 예후예측에 대한 관심이 점증하고 있다¹⁴⁻¹⁶. 비스테로이드계 항에스트로겐에 의한 내분비 치료는 투여방법이 간단하고 부작용이 적어 유방암 재발 예방 및 치료에 중요한 위치를 차지하고 있으며 tamoxifen(이하 TMX)이 대표적인 약제이다¹⁷. TMX은 에스트로겐 수용체(estrogen receptor, ER)에 경쟁적으로 결합하여 항에스트로겐 효과를 일으키는 것으로 알려져 있으나 그 명확한 작용기전은 아직 완전히 규명되지 않고 있다^{18,19}. 그러나 최근 일부 연구결과는 TMX이 ER음성인 유방암에서도 치료효과가 있다고 보고하고 있을 뿐 아니라²⁰, ER음성인 유방암의 TMX 치료시 beta-transforming growth factor(TGF- β)가 증가된다고 보고하고 있다²¹. TGF- β 는 내피세포의 세포분열을 저하시켜 혈관형성을 저지하는 것으로 알려져 있으므로²² TMX이 종양혈관형성 억제에도 관여할 가능성이 있다. 더욱이 최근 유방종양내 미세혈관 밀도가 침윤성 유방암종 환자의 중요하고 독립적인 예후인자로서 주장되고 있음을 볼 때^{23,24} TMX이 종양 혈관형성에 미치는 영향 유무는 향후 이 약제의 적용에 있어 의미가 크다고 생각된다. TMX이 종양 혈관형성에 미치는 영향에 관한 연구는 소수 있으나 아직은 논란이 있으며^{25,26} 동물에서 발암제로 유발한 유방암종에 적용하여 TMX이 혈관형성에 미치는 영향을 형태학적으로 관찰하고 다른 혈관형성 저지제의 영향과 함께 비교한 연구는 보고된 바 없다.

따라서 본 연구에서는 쥐에 발암제인 dimethylbenzanthracene(DMBA)를 투여하여 유방암을 유발한 후 TMX과 혈관형성 저지제로 알려진 PPS를 투여하여 TMX과 PPS의 종양성장 억제효과를 비교 관찰하고 이들이 종양혈관형성에 미치는 영향을 미세혈관 밀도 측정을 비롯한 형태학적인 관점에서 알아보며 이들의 종양성장억제 효과가 종양내 미세혈관밀도 및 세포증식능과 어떠한 관계가 있는지를 알아 보 고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 실험군

실험동물로는 생후 50일 된 Sprague-Dawley계 암컷 흰쥐를 사용하여 1주간 동일조건에서 사육 후 3군으로 나누어 실험하였다. 유방암 유발군(실험대조군)은 21마리로서 이들에서 얻은 39개의 종양을 대상으로 하였으며 유방암 유발 후 TMX 투여군은 44마리로서 59개의 종양을, 유방암 유발 후 PPS 투여군은 39마리로서 51개의 종양을 대상으로 하였다. 정상대조군은 7마리였다.

2. 실험방법

1) **유방암 유발:** 생후 42일된 실험동물을 1주간 적응, 사육후 생후 50일째에 DMBA 투여를 시작하였다. 유방종양 유발을 위해 DMBA(Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA)을 참기름에 10mg/ml 농도로 녹인 후 DMBA용액 1 ml를 1주 간격으로 2회 관을 통하여 위내에 투여하였다. 정상대조군은 참기름 1 ml를 동일한 방법으로 투여하였다.

2) **Tamoxifen 및 pentosan polysulfate 투여:** 종괴 측지가 확실할 때(평균 1.5 cm 직경) 약물 투여를 시작하였다. TMX(Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA)은 에탄올과 올리브 기름에 녹여 0.1 ml(1,500 ug/kg)를 1주 5회, 8주 동안 피하 주사하였으며 PPS(Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA)는 생리식염수에 녹여 0.5 ml(12 mg/kg)를 1주 5회, 8주 동안 복강내로 주사하였다. 실험대조군은 0.5 ml의 생리식염수를 근육 및 복강내로 1주 5회, 8주 동안 주사하였다.

3) **육안관찰:** 체중은 1주에 1회 측정하였으며 유방종괴 발견을 위한 측정은 DMBA 투여 첫 12주 동안은 1주 1회, 그 후에는 1주 2회씩 측정하였다. 유방종괴의 수, 위치, 크기 및 모양 유무 등을 개체에 따라 조사하였다. 종괴의 장경과 단경을 caliper로 측정하였으며 종괴의 부피를 $V=(4/3)\pi R_1^2 R_2$ (반경 R_1

< R_2 > 공식²⁷에 의거하여 산출하였다.

약물 투여에 대한 종양의 반응은 종양 크기의 변화에 따라 완전 반응(complete response, CR), 부분 반응(partial response, PR), 무반응(no response, NR), 질환 진행(progressive disease, PD)으로 나누었다. 완전반응은 종양이 완전히 소실된 경우이며, 부분반응은 종괴의 부피가 50% 이상 감소한 경우이고, 무반응은 부피가 50% 이하 감소한 경우나 증가하더라도 25% 이하인 경우이며 종괴의 부피가 25% 이상 증가한 경우를 질환진행으로 하였다. 반응률은 '반응종양수(CR+PR)/ 검색 종양수×100'으로 산정하였다.

4) **표본 채취:** TMX과 PPS를 8주 투여한 후 모두 희생하였으며 대조군은 실험군의 해당일에 희생하였다. 유방종괴의 수, 크기 및 육안조건상 특기 사항을 조사한 후 유방종괴를 절제하였다.

5) **광학현미경 관찰:** 일반적인 조직학적 검색을 위하여 채취한 조직을 10% 중성 포르마린 용액에 고정된 다음 소편을 절취하여 파라핀에 포매한 후 6 um의 절편을 만들어 hematoxylin-eosin(H-E) 염색을 하였다. 각 종양의 조직학적 유형 및 등급, 염증 세포 침윤 및 괴사 유무, 기질의 변화 등을 관찰하였다. 조직학적 등급은 Bloom과 Richardson의 방법²⁸에 의거하여 I, II, III으로 구분하였다.

6) **혈관 염색 및 미세혈관 밀도 측정:** 각 종양에서 종양의 대표적인 부위가 포함된 파라핀 포매 조직 1개를 선정하여 xylene으로 파라핀을 제거한 후 증류수에 재 함유하였다. 내인성 과산화효소의 작용을 억제시키기 위해 0.3% 과산화수소용액에 10분간 반응시킨 후 5분간 세수하고 trypsin용액에 37°C에서 30분간 방치하였다. 그 후 phosphate buffered saline (PBS)(pH 7.5)에 5분간 담근 후 항 factor VIII-related antigen 항체(Dako, Santa Barbara, CA, USA)로 4°C에서 overnight incubation한 후, 2차 항체(biotinylated anti-mouse IgG)와 15분간 반응시키고 5분간 PBS로 세척하여 peroxidase-labeled streptavidin과 15분간 반응시켰다. 그 후 PBS에 5분간 세척한 후 aminoethyl-carbazole로 발색시키고 hematoxylin으로 대조염색하여 glycerine jelly로 봉입한 후 관찰하였다.

미세혈관 밀도측정을 위한 관찰부위는 광학현미경하에서 H-E염색 표본상 가장 대표적인 암종의 소견을 보이는 부위를 택하였다. 혈관형성이 가장 많은 부위 3개를 선정하여 미세계측자를 부착한 광학현미경 200배 시야에서 미세혈관의 수를 세었다. 오차를 최소화하기 위해 2인이 함께 관찰하였으며 동의를 얻어진 경우에만 혈관으로 인정하였다. 직경이 적혈구 크기 8배 이상인 혈관과 두터운 근육층을

가진 혈관은 제외하였으며 경화성 변화가 있는 부위도 관찰에서 제외하였다.

7) 종양세포의 증식세포핵항원 염색 및 증식세포핵항원 표지지수 산정: 파라핀에 포매된 조직절편을 이용, 일차항체로 항 증식세포핵항원(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)항체(Dako, Santa Babara, CA, USA)를 이용하여 혈관염색과 동일하게 labeled streptavidin biotin(LSAB) 방법으로 염색한 후 미세계측자를 부착한 광학현미경 1,000배 시야 10개를 선정하여 종양세포 1,000개를 세어 총 종양세포수에 대한 PCNA 양성세포의 백분율을 구하여 PCNA 표지지수를 구하였다. 2인이 산출한치의 평균을 최종치로 결정하였다.

8) 에스트로겐 수용체 염색 및 결과판정: 실험대조군의 유방암종의 에스트로겐 수용체 양성률을 보기 위해 25개 종양의 파라핀에 포매된 조직절편을 이용, 일차항체로 항 에스트로겐 항체(Dako, Santa Babara, CA, USA)를 이용하여 혈관염색과 동일하게 LSAB peroxidase 방법으로 시행하였다. 미세계측자

를 부착한 광학현미경 400배 시야 5개를 선정하여 종양세포 500개를 세어 총 종양세포수에 대한 ER 양성세포의 백분율을 구하였다.

9) 통계적 유의성 검정: 실험군 측정치의 통계적 유의성을 검정하기 위해, 반응률에 대하여는 Chi-square 검정, 각 군간의 혈관밀도 및 PCNA 표지지수에 대하여는 one-way Anova 검정, 그리고 반응도에 따른 각 군간의 혈관밀도 및 PCNA 표지지수에 대하여는 Kruskal-Wallis 검정을 이용하였다.

결 과

1. 종양발생률, 발생 부위, 발생 시기 및 조직학적 유형

총 191마리 중(예비실험 포함) 153마리(80.1%)에서 종양이 발생하였으며 총 발생 종양 수는 209개로서 마리당 평균 1.37개였다. 선암종이 처음 발생한 시기는 DMBA 투여 후 12주였으며 16주에 42마리(64개), 20주에 27마리(31개), 24주에 9마리(12개), 30주에 11마리(22개), 그 후 15마리(20개)에서 종양이 발생하였다. 종양의 발생부위별 분포를 보면 우측 제 1~3 유방이 30.1%, 좌측 제 1~3 유방이 36.9%로 제 1~3 유방에 66.9%가 발생하였다(Table 1). 조직학적 유형을 보면 선암종이 198개(144마리)였으며 선암종 외의 종양으로는 섬유선종(6개/4마리), 편평상피암종(3개/3마리), 그리고 선종(2개/2마리)이 있었다.

2. Tamoxifen 및 pentosan polysulfate 투여에 대한 반응

TMX 및 PPS 투여 후 유선암종 크기의 변화는 다음과 같다(Table 2, Fig. 1). 실험대조군에서는 총 39

Table 1. The location of mammary tumors in rats

발생 부위	종양개수 (%)	발생 부위	종양개수 (%)
우측 제 1 유방	24 (11.5)	좌측 제 1 유방	35 (16.7)
우측 제 2 유방	13 (6.2)	좌측 제 2 유방	21 (10.1)
우측 제 3 유방	26 (12.0)	좌측 제 3 유방	21 (10.1)
우측 제 4 유방	5 (2.4)	좌측 제 4 유방	8 (3.8)
우측 제 5 유방	20 (9.6)	좌측 제 5 유방	9 (4.3)
우측 제 6 유방	12 (5.7)	좌측 제 6 유방	15 (7.2)
합 계	100 (47.8)	합 계	109 (52.2)

Table 2. Changes of tumor volume after administration of tamoxifen and pentosan polysulfate

Response	Number of tumors(number of animals)					Response rate(%)
	CR	PR	NR	PD	Total	
Test control	3(2)	4(4)	8(5)	24(10)	39(21)	7/39(17.95)
TMX	19(13)	20(14)	11(10)	9(7)	59(44)	39/59(66.10)*
PPS	9(7)	14(10)	11(8)	17(14)	51(39)	23/51(45.09)*†

CR: complete response, PR: partial response, NR: no response,

PD: Progressive disease, TMX: tamoxifen, PPS: pentosan polysulfate

*: Significant difference when compared with the experimental control group(p<0.05)

†: Insignificant difference when compared with the TMX administration group(p=0.15)

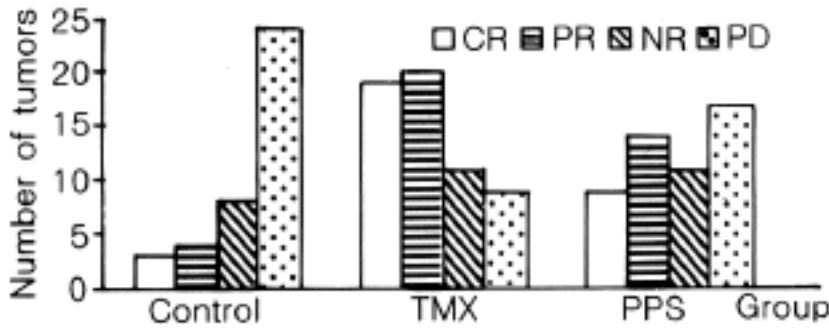


Fig. 1. Changes of tumor volume after administration of tamoxifen and pentosan polysulfate. CR: complete response, PR: partial response, NR: no response, PD: progressive disease

종양 중 7개가 완전 또는 부분반응으로 반응률 18.0%(7/39)였으나 TMX 투여군에서는 66.1%(39/59), PPS투여군에서는 45.1%(23/51)로 유의있는 반응률의 증가를 보였다. TMX투여군과 PPS투여군의 반응률 비교시 TMX 투여군이 PPS투여군에 비해 반응률이 높은 경향을 보였으나 통계학적 의의는 없었다.

3. Tamoxifen 및 pentosan polysulfate 투여 후 종양의 조직학적 소견

병리조직학적 변화는 변화가 있는 경우와 없는



Fig. 2. A rat mammary tumor with partial response to pentosan polysulfate administration. A large area of necrosis is present.

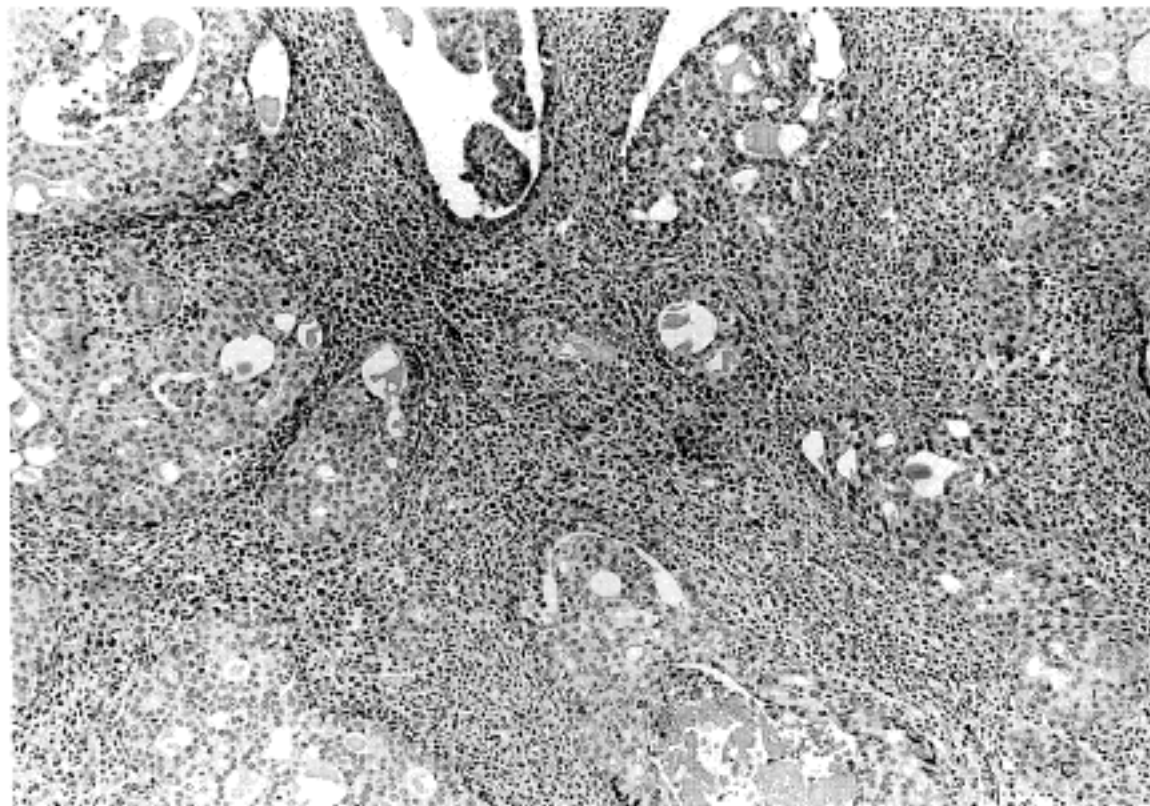


Fig. 3. A rat mammary tumor with no response after administration of pentosan polysulfate. The tumor shows marked inflammatory reaction. Most of the inflammatory cells are lymphocytes and plasma cells.

Table 3. Histopathologic changes of the tumors after administration of tamoxifen and pentosan polysulfate

Changes	Group	Test Control			Tamoxifen			Pentosan polysulfate		
		PR(n=2)	NR(n=5)	PD(n=20)	PR(n=20)	NR(n=9)	PD(n=7)	PR(n=10)	NR(n=9)	PD(n=9)
Necrosis		-	2	1	8	1	3	4	4	6
Inflammation		-	1	-	1	2	-	4	5	1
Hyaline change		1	2	6	14	5	3	4	1	1
Histologic grade	I	1	4	11	16	7	3	7	5	4
	II	-	1	6	4	2	3	3	4	5
	III	-	-	3	-	-	1	-	-	-

PR: partial response, NR: no response, PD: progressive disease
 TMX: tamoxifen, PPS: pentosan polysulfate

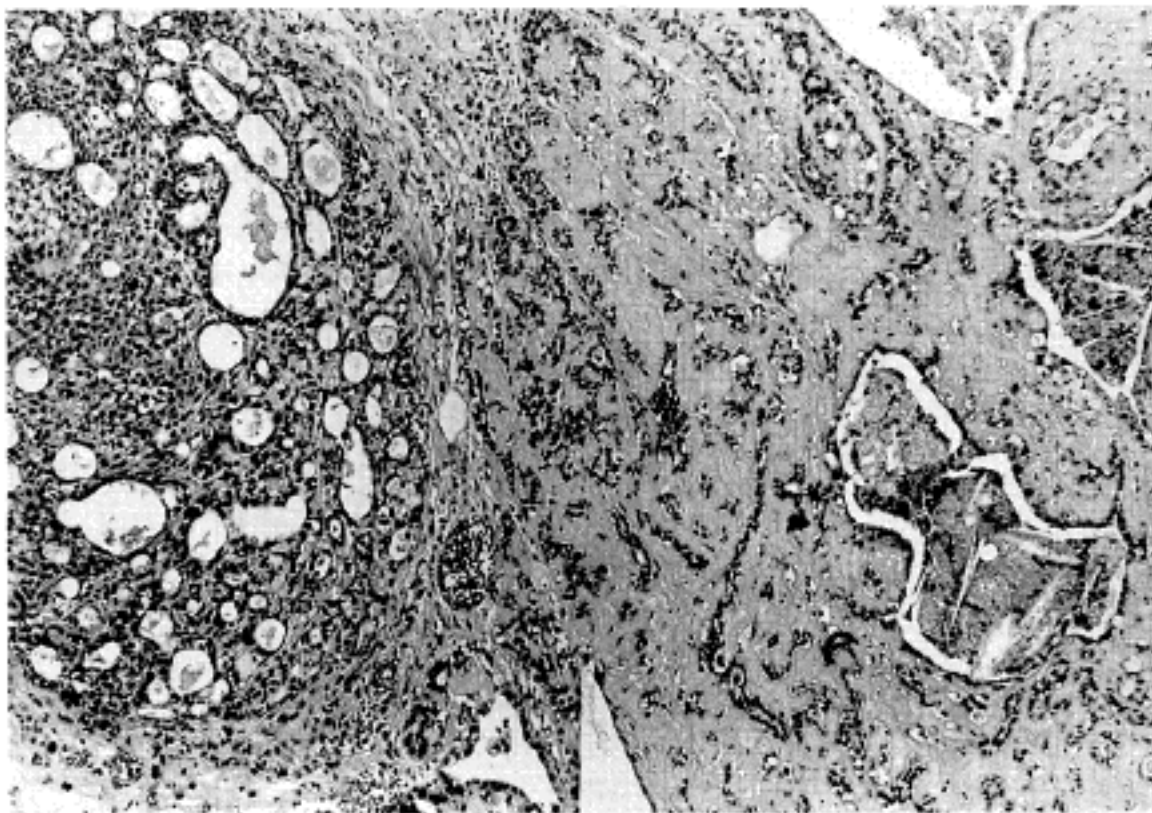


Fig. 4. A rat mammary tumor with partial response to tamoxifen administration. Marked hyaline change is associated with shrinkage of glands and atrophy of epithelial cells.

경우로 구분하였다(Table 3). 피사가 있는 종양은 실험대조군에서는 종양 27개 중 3개(11.1%)에 불과하였으나 TMX군에서는 36개 중 12개(33.3%), PPS군에서는 28개 중 14개(50%)에서 있어 TMX군과 PPS군에서 현저히 많았다. 피사의 유형은 모두 경색에 의한 응고성 피사였다(Fig. 2). 염증세포 침윤은 PPS군에서 자주 볼 수 있었으며 PR 및 NR반응군에 많았으며 주로 림프구와 형질구로 이루어져 있었다(Fig. 3). 초자양 변화는 실험대조군에서 종양 27개 중 9개(33.3%)에서, PPS군에서는 28개 중 6개(21.4%)에서 관찰되었으나, TMX군에서는 36개 중 22개(61.1%)에서 관찰되어 TMX군에 초자양 변화가 현저히 많았으며 그 정도도 더 심한 경향이 있었다. 초자양 물

질은 상피세포들 사이에 침착되어 있었으며 초자양 변화가 있는 부위의 종양 상피세포들은 위축되어 있었고 일부에서는 지질을 함유한 대식세포들이 집단으로 다핵성 거대세포와 함께 관찰되었다(Fig. 4).

종양의 조직학적 등급은 실험대조군에서는 등급 I이 가장 많았으나(Fig. 5), 보다 높은 등급인 등급 II(Fig. 6)와 III에 속하는 종양 10개 중 9개가 PD반응군에 몰려 있었다. TMX군과 PPS군에서는 등급 I과 II에 속하는 종양의 분포가 실험대조군과 비교시 별 차이가 없었으며 실험대조군에서와 마찬가지로 등급 II에 속하는 종양이 PD반응군에 더 많은 경향을 보였다.