

침윤성 유방암에서 CD34 염색을 이용한 미세혈관의 양적 측정 및 그 유용성 평가

충북대학교 의과대학 병리학교실

정 화 숙 · 성 노 현

Microvessel Quantitation and Assessment of its Utility by CD34 Staining in Invasive Breast Carcinoma

Hwa Sook Jeong, M.D. and Rohyun Sung M.D.

Department of Pathology, College of Medicine, Chungbuk National University

Tumor angiogenesis, the development of new blood vessels by tumor, is a widely observed phenomenon associated with the growth of human solid tumors. To investigate how tumor angiogenesis correlates with other prognostic features i.e. menopause status, tumor size, lymph node metastasis, mitosis, angioinvasion, estrogen receptor (ER), p53 protein expression, histologic grade and clinical stage, we counted microvessels by immunohistochemistry using antibody for CD34 antigen in 56 cases of invasive breast carcinoma (27 with and 29 without axillary lymph node metastases) and 20 cases of non-inflammatory benign breast lesion. CD34 antigen is expressed on the surface of hematopoietic progenitor cells and more sensitively expressed than factor VIII in vascular endothelial cells. Microvessel count (MVC) was performed at a single hot field of $200\times$ magnification (0.74 mm^2 per field). The results are summarized as follows; 1) The mean MVC of invasive carcinoma and benign breast lesion were 92.0 ± 54.4 (range, 7-237) and 20.7 ± 16.6 (range, 4-73), respectively ($p < 0.0001$). 2) Although MVC had no correlation with all other prognostic factors i.e. menopause status, tumor size, lymph node metastasis, mitosis count, angioinvasion, ER, p53 protein expression, histologic grade, and clinical stage ($p > 0.05$), MVC had a tendency to increase in tumors with axillary LN metastasis or without ER expression. 3) Without correlation with MVC, ER (-), angioinvasion (+) and higher histologic grade correlate to significantly higher mitosis count ($p < 0.0005$). Also, angioinvasion correlate to a significantly higher histologic grade ($p < 0.05$). In conclusion, angiogenesis is related to tumorigenesis, but MVC may not be related to other clinicopathologic factors. (*Korean J Pathol* 1997; 31: 298-307)

Key Words: Invasive breast carcinoma, CD34, Microvessel count, Angiogenesis, Tumorigenesis

접 수: 1996년 10월 22일, 게재승인: 1997년 1월 8일
주 소: 청주시 흥덕구 개신동 산 62번지, 우편번호 360-240
충북대학교 의과대학 병리학교실, 정화숙

서 론

고형성 종양의 성장에는 혈관 형성이 필수임이 이미 여러 실험에서 증명된 바 있다. 종양 자체에 혈관 형성이 없는 경우에, 종양은 생체 내에서는 장경 1~2 mm(약 10^6 개 세포), 실험관 내에서는 3~4 mm 까지 증식하여 더 이상 자라지 않는다^{1,2}. 결국 종양 세포의 급속한 증식에는 선행조건으로 신생혈관이 형성된 경우에만 가능하며, 이 신생혈관 형성에는 몇몇 종류의 성장인자 및 사이토카인 등의 혼합물이 필요하다. 종양세포의 전이 기전으로서, 종양세포는 기존의 성숙한 혈관에 비해 신생혈관 안으로 쉽게 침습하여 들어가는 경향이 있고 따라서 종양 내에 혈관이 많을수록 종양세포가 순환기로 들어갈 수 있는 더 많은 기회를 가지게 된다. 이것은 성장하는 혈관 침투의 내피세포에서 분해효소가 분비될 뿐 아니라, 이 혈관에는 성숙한 기저막이 존재하지 않아서 종양세포가 쉽게 혈관벽을 뚫고 혈관 내로 들어가고 또 빠져나가 다른 장기로 전이된다³⁻⁵. 여러 보고에서 악성흑색종, 피부의 기저세포암, 전립선암, 폐암 및 두경부의 편평상피암 등에서 신생혈관 형성은 암의 급속한 성장 뿐만 아니라 전이에 있어서 매우 중요한 요소로 알려져 있다⁶⁻⁸.

유방암은 현재 세계적으로 여성에서 그 발생 빈도가 점점 높아지는 추세로 서양에서는 여성의 암 중 가장 많고 우리나라에서는 세번째로 많은 암으로 조기발견, 예후인자 및 치료방법에 관하여 많은 연구가 이루어지고 있다^{9,10}. 지금까지 유방암의 예후인자로는 림프절 전이 유무를 가장 중요한 요소로 꼽고 있으며, 림프절 전이 유무에 따라 외과적 절제 후 전신치료 여부에 영향을 주고 있다. 유방암에서의 신생혈관 형성은 최근에 중요한 관심사로 연구되어, 유방암의 신생혈관 형성이 림프절 전이와 특히 밀접한 관계가 있다고 보고되었거나, 림프절 전이와는 전혀 무관하게 단독적으로 중요한 예후인자로 보고되어 있기도 하며, 또 여러 예후인자와 연관성도 없을 뿐 아니라 더 이상 예후인자로서의 가치가 없다고도 보고되어 있는 등 신생혈관 형성이 종양의 예후에 미치는 영향에는 아직도 논란이 많으므로 좀 더 많은 연구가 이루어져야 될 부분이다¹²⁻²³.

본 연구에서는 지금까지 유방암에서 예후인자로 거론되고 있는 환자의 폐경 여부, 종양의 크기, 림프절 전이 유무, 유사분열수, 혈관 침윤 유무, 에스트로겐 수용체(ER)의 존재 여부, p53 단백질 발현 여부,

조직학적 등급 및 임상 병기 등이 유방암 내의 혈관 형성과 어떤 관계가 있는지 밝히기 위하여, 혈관 내피세포 표지자로 기존에 많이 사용된 factor VIII 항원보다는 더 민감하다고 알려져 있는 CD34 항원에 대한 항체를 사용하여 면역조직화학적 염색을 시행하여 비교 분석하였다²²⁻²⁸.

재료 및 방법

1. 연구 재료

1991년 1월부터 1995년 10월까지 충북대학교 병원 해부병리과에서 검색된 유방조직 중에서 파라핀 포매 조직의 상태가 양호하고, 임상 정보가 갖추어져 있고, 적어도 10개월 이상(평균 23 개월) 추적 관찰된 유방의 침윤성 관암 56예와 대조군으로 비-염증성 양성 유방병변 20예를 대상으로 하였다. 침윤성 관암 56예는 모두 변형된 근치적 유방 절제 및 액와 림프절 절제가 시행되었고, 충분한 검사 후 임상적 병기가 결정되었으며, 모두 이미 ER 및 p53 단백질 발현 유무가 검사된 예들이다.

2. 연구 방법

유방의 침윤성 관암 56예에서는 종양의 변연부가 포함되어 있는 파라핀 블록 한 개를 무작위로 선택하였고, 대조군으로는 섬유선종, 여성형 유방, 섬유낭성 질환, 관상 선종, 유즙성 선종, 관성 과증식 및 유관내 유두종 등 비-염증성 양성 유방병변으로서 2차적 염증반응이 없는 20예를 임의로 선택하였다. 염증성 유방병변은 육아조직 내에 신생혈관 형성이 왕성하므로 대조군에서 제외시켰다. 환자의 성별 및 나이를 조사하였고 유방암에서는 폐경 여부, 종양의 크기, 림프절 전이 유무, 유사분열수, 혈관 침윤 유무, 에스트로겐 수용체(ER)의 존재 여부, p53 단백질 발현 여부, Bloom과 Richardson 방법³⁴에 따른 조직학적 등급 및 AJCC(American Joint Committee on Cancer)에 의거한 임상 병기 등을 조사하였다. 면역조직화학적 염색은 파라핀 포매 블록을 4 μ m로 박절하여 알부민 슬라이드에 부착시켜 60°C 항온기에서 충분히 건조시키고 탈파라핀과 함수과정을 거친 후 실험에 이용하였다. 내인성 과산화효소의 활성을 억제시키기 위하여 3% 과산화수소수를 처리하였고, 비특이적 조직반응을 막기 위하여 단백질 억제제제를 가하였다. 일차항체는 혈관내피세포 표지자로 알려진 CD34 항원에 대한 단클론항체(QBEND/10, Novocastra)를 점적시켜 ABC(avidin-biotin conjugate)법으로

염색하였고 발색제로는 AEC(3-amino-9-ethylcarbazole)를 사용하였다. 양성 대조군은 신생혈관이 풍부한 육아조직을 사용하였고, 음성 대조군은 1차항체 대신 생리식염수를 사용한 후 동일한 방법으로 염색하였다. ER과 p53 단백발현에 대한 검사는 항원성을 살리기 위해 탈파라핀 및 합수과정 후에 750 W의 전자렌지를 이용한 과정을 거쳤고 일차항체는 각각 단클론성 anti-estrogen receptor(ER 1D5, DAKO)와 단클론성 anti-p53 protein(DO7, Novocastra)을 이용하였으며, 그 후의 과정은 위에서와 동일하였다. 양성 대조군으로 ER에 대한 검사에서는 증식기의 자궁내막 조직을, p53 단백발현 검사에 대해서는 p53 단백발현이 잘 되었던 유방암 조직을 사용하였다.

1) 면역 조직화학적 염색 판독:

(1) CD34 antigen; 100배 시야에서 염색밀도(미세혈관수)가 가장 높은 부위를 찾은 후, 3부위의 200배 시야(0.74 mm)에서 미세혈관수를 세었고 그 중 가장 높은 수를 선정하였다. 혈관 내강의 존재 유무와는 상관없이, 분명히 주위 미세혈관과 분리되어 적색으로 염색된 한 개 혹은 군집의 내피세포를 한 개의 미세혈관으로 세었다.

(2) ER과 p53 단백질; 종양세포 중 5% 이상의 세포들의 핵이 갈색으로 염색된 경우를 양성으로 판정하였다.

2) 통계학적 분석: 양성 유방질환과 침윤성 유방암을 분리하여 나이 및 미세혈관수를 비교하였다. 유방암 56예에서는 임상·병리적 지표 각각의 상관관계 유무를 검사하였고, 임상·병리적 지표와 미세혈관수가 관련이 있는지 검사하였다. 통계학적 처리에는 각 지표에 따라 t-test, Wilcoxon rank-sum test, ANOVA, Kruskal-Wallis, chi-square test를 사용하여, p값이 0.05 이하인 경우를 통계학적으로 의미가 있는 경우로 판정하였고, ANOVA의 다중비교법은 Duncan 와 Turkey법으로 검정하였다.

연구 결과

1. 임상 소견

유방의 침윤성 관암 환자는 모두 여자였고, 양성 유방병변 환자는 여성형 유방으로 진단된 5예만이 남자였다. 연령 분포는 각각 32세에서 77세(평균 50세)와 18세에서 44세(평균 32세)이었다. 폐경기 이전에 발견된 유방암은 27예이며, 양성병변은 모두 폐경기 이전의 환자였다. 유방암 환자를 10개월 이상

(평균 23개월) 추적관찰한 결과 53예는 재발하지 않았고, 2예에서 수술 후 각각 18개월과 12개월에 모두 뼈에 다발성으로 전이되었고 사망하였다.

2. 병리 소견 및 에스트로겐과 p53의 면역조직 화학 염색

유방의 침윤성 관암 56예 중에서 종양의 크기는 대부분(71%) 2 cm 이상 5 cm 미만이었다. 종양세포의 조직학적 등급은 대부분 등급 I(57%)과 등급 II(30%)에 속했으며 유사분열은 대부분(66%)에서 10개의 400배 시야당 9개 이하가 관찰되었다. 종양세포의 혈관 침윤은 20예(36%)에서, 액와 림프절 전이는 약 반수에서 관찰되었다. 임상적 병기는 등급 II가 70%로 높은 비율을 차지하였다. ER은 28예(50%)에서, p53 단백질은 18예(38%)에서만 발현되었다. 상관관계 유무를 관찰하기 위하여 t-test와 Wilcoxon rank-sum test로 검토한 결과 ER양성보다는 ER음성에서, 종양세포가 혈관에 침윤 안할 때 보다는 할 때와, 조직학적 등급이 높을수록 통계학적으로 유의하게 높은 유사분열수를 보였다($p < 0.0005$). 또한 종양세포의 혈관 침윤이 있을 때 통계학적으로 유의하게 높은 조직학적 등급을 보였다($p < 0.05$)(Table 1).

3. CD34의 면역조직화학적 검색

CD34항원에 대한 단클론성 항체에 양성반응을 보인 것은 모두 혈관내피세포였다. 56예의 침윤성 유방암에서는 MVC가 7내지 237개(평균 92개)를 보였고, 20예의 양성 유방병변에서는 미세혈관수가 4내지 73개(평균 21개)였다. 양성병변과 유방암은 통계학적으로 유의한 MVC의 차이를 보였다($p < 0.0001$)(Table 2). 유방암의 미세혈관은 내강을 형성하지 않고 내피세포가 한 개 혹은 여러 개가 군집으로 관찰되는 경우가 빈번한 반면(Fig. 1), 양성 유방병변 경우에는 특히 종말관 소엽단위에 주로 몇몇 미세혈관이 관찰되었는데 대부분이 적혈구가 들어있는 뚜렷한 내강을 형성하였다(Fig. 2). 한 예의 섬유낭성 질환에서는 200배 시야에서 73개의 MVC를 보였다. 양성 유방병변의 진단의 종류에 따른 MVC의 차이는 없었다. 침윤성 유방암은 중앙부위보다 변연부에서 높은 MVC를 보였고, 유방암 가장자리에 존재하는 비침윤성 관내암종에는 미세혈관이 종양세포의 집락주위에 레이스 모양으로 분포되어 있었다(Fig. 3). 특히 유방의 침윤성 관암을 포함한 대부분 장기의 관암에서 파라핀 조직처리 과정 중에 흔히 보이는 artifact로, 종양세포 군집이 주위의 결합조직

Table 1. Clinicopathologic features of cases of invasive duct carcinoma.

	Cases	Mean			
		Age (years)	Size (cm)	Mitosis (mf/10 hpf)	H.G.
Total	56	49.6	3.4	16.6	1.6
LN metastasis					
positive	27	49.6	3.6	16.3	1.6
negative	29	49.6	3.2	13.4	1.3
Menopausal status					
premenopause	27	40*	3.4	12.1	1.7
postmenopause	29	58.4	3.4	17.3	1.5
ER					
positive	26	49.7	3.4	10.2	1.4
negative	30	49.4	3.3	18.9*	1.7
p53					
positive	18	53.8	2.9	12	1.8
negative	38	47.5	3.6	16.1	1.5
Angioinvasion					
positive	20	49.8	3.3	23.9*	2**
negative	36	49.4	3.4	9.7	1.3
Tumor size(cm)					
<2	9	50.1	1.4	12.4	1.4
≥2 ~ <5	40	49.9	3.2	16.9	1.6
≥5	7	48.9	7.6	20	1.4
Mitosis count					
0~9	37	49.3	3.6	5.1	1.2
10~19	9	52.1	2.8	13.4	2
20~	10	48.2	2.9	57.5	2.5
Histologic grade					
I	32	49.1	3.6	5.0*	1
II	17	49.9	3.2	22.9	1.9
III	7	50.6	2.6	39.7	2.6
Clinical stage					
I	7	50.4	1.7	7.1	1.1
IIA	22	50.3	3.1	20.3	1.5
IIB	17	47.6	3.6	6.9	1.4
IIIA	5	46.4	4.8	36	2.4
IIIB	3	47	4.1	35.3	2.3
IV	2	67	4	30.5	1.5

H.G.: histologic grade mf: mitotic figure

Statistics: t-test, or Wilcoxon rank-sum test.

*: p value: <0.0005 **: p value: <0.05

과 분리되어 종양세포의 혈관침윤으로 오인되는 경우가 있는데, CD34로 염색함으로써 쉽게 감별할 수 있었다(Fig. 4). 뼈로 다발성 전이가 있었던 환자 2예의

MVC는 각각 72개와 63개로 유방암 평균 MVC보다 상당히 적었다. 모든 임상·병리적 지표에 따른 분류와 MVC와의 차이를 ANOVA, Kruskal-Wallis와

Table 2. Comparison of microvessel count between invasive breast carcinoma and non-inflammatory benign breast lesion

	Mean		
	Cases	Age(years)	MVC
Benign lesion	20	32.2 ± 7.1	20.7 ± 16.6(4 ~ 73)
Invasive carcinoma	56	49.6 ± 11.9	92.0 ± 54.4(7 ~ 237)
p value		0.2185	<0.0001

Statistics: t-test or Wilcoxon rank-sum test.

chi-square test로 비교 결정하였고, 평균 MVC보다 높은군과 낮은군으로 분리하여 결정하였지만 통계학적인 유의한 차이를 발견할 수 없었다($p > 0.05$). 그러나 림프절 전이가 존재하거나 ER이 없을때 더 많은 미세혈관이 존재하는 양상이었다(Table 3).

고 찰

암세포가 전이되기 위해서는 여러 단계를 거쳐야 한다. 먼저 원발성 종양 내의 혈관에 접근하여야 하고, 빔어벽을 뚫고 혈관 내로 들어간 다음, 순환기 내에서 생존하여 표적 장기의 미세혈관에 도달한 후 이 혈관에서 빠져나와 증식하여야 비로소 전이

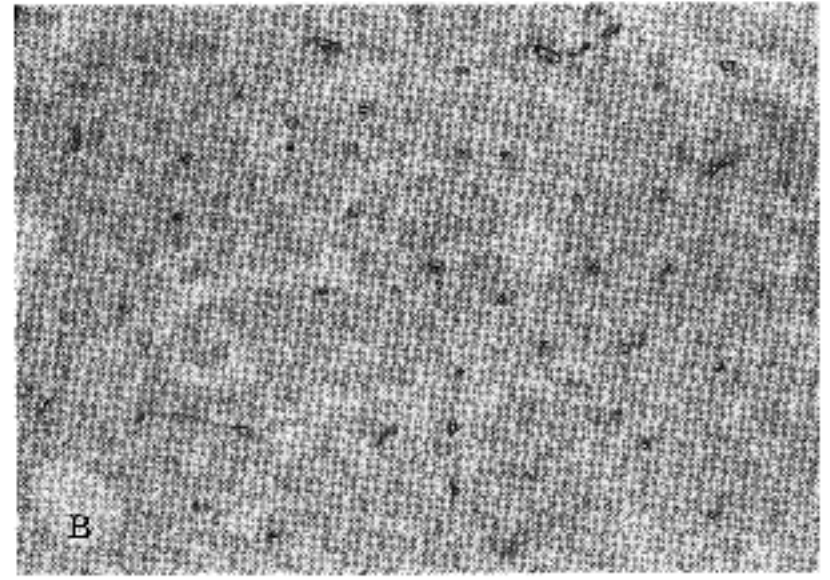
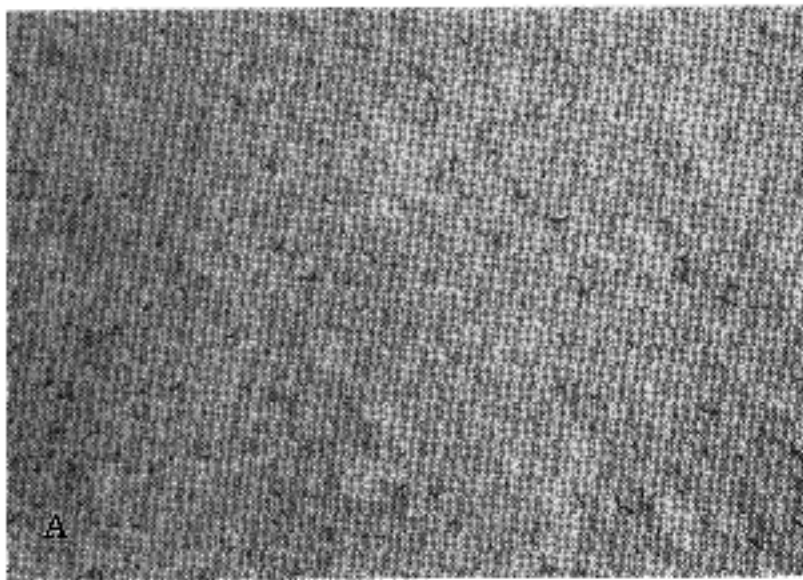


Fig. 1 A: Area with high density of microvessel staining for CD34 antigen in invasive duct carcinoma of breast. B: Any red-staining endothelial cell or cluster is considered as a single microvessel in high power view.

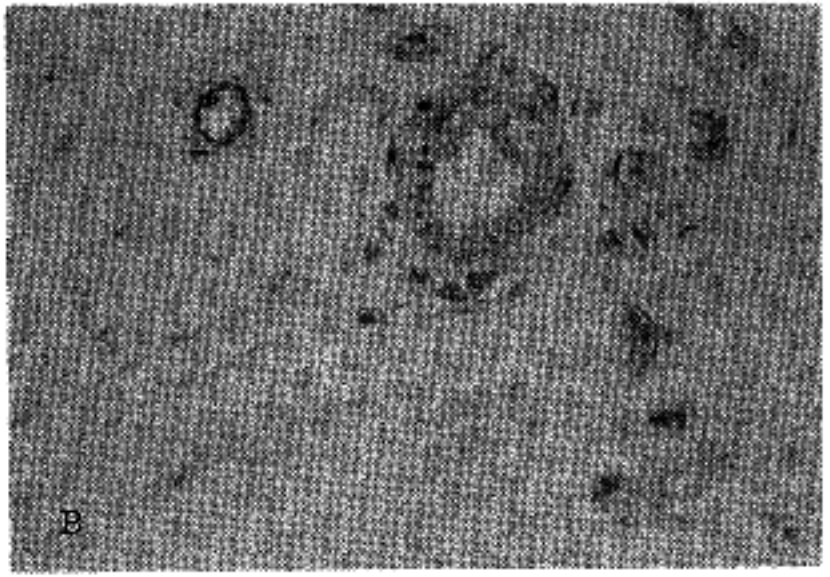
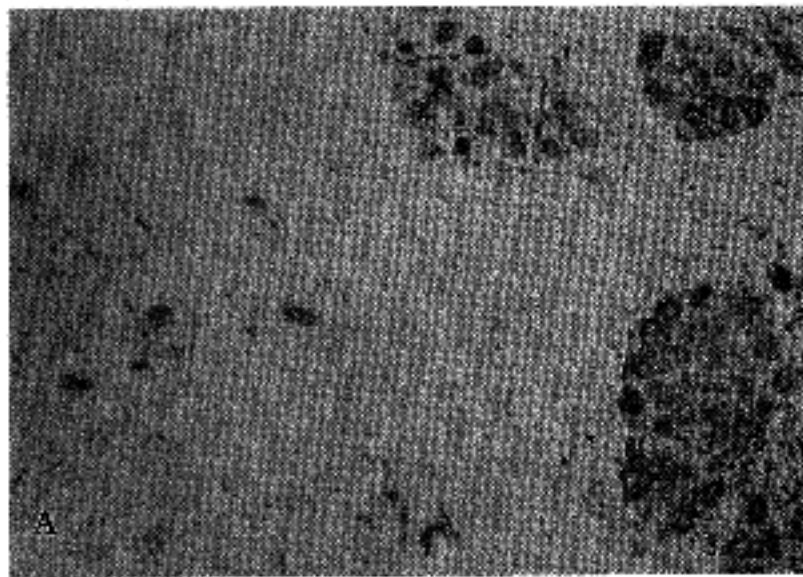


Fig. 2. A: Benign breast lesion. Only a few microvessels are reactive for CD34 in terminal lobular units. B: Microvascular lumina are usually opened and contain RBCs in high power view.

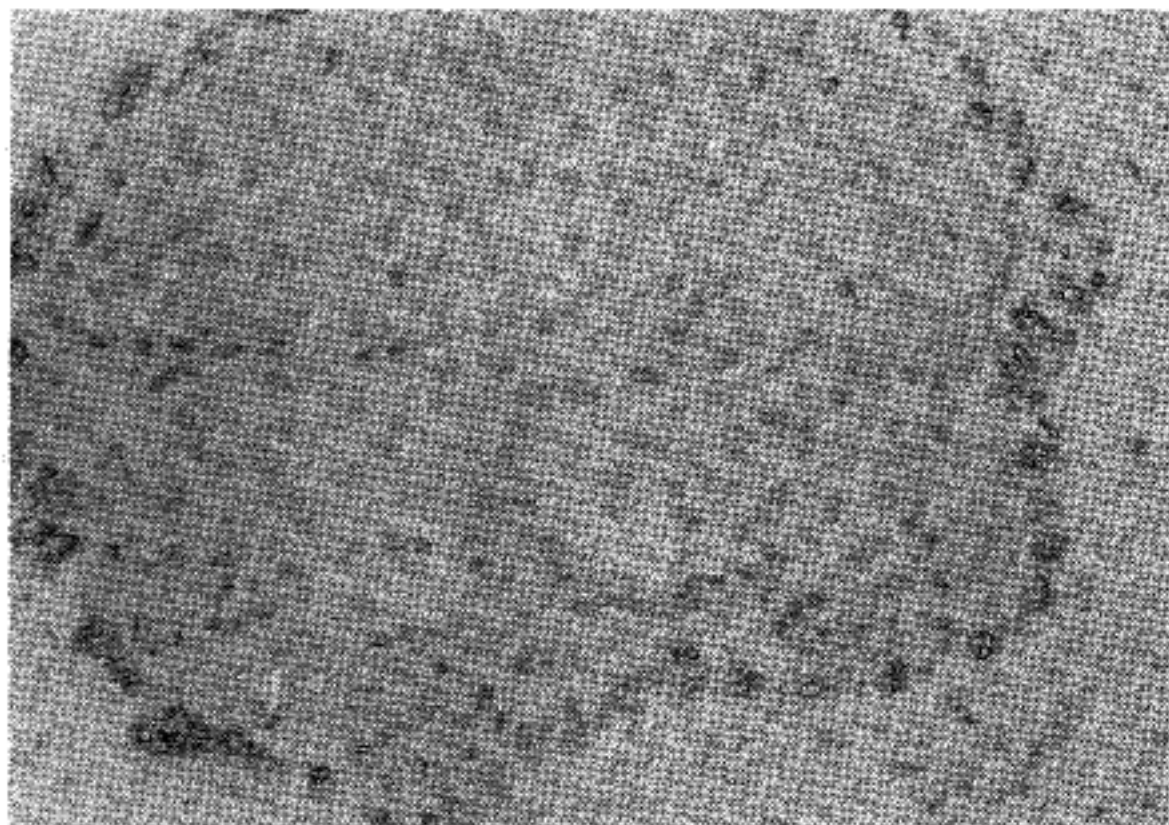


Fig. 3. A focus of ductal carcinoma in situ surrounded by lace-like pattern of microvessels.

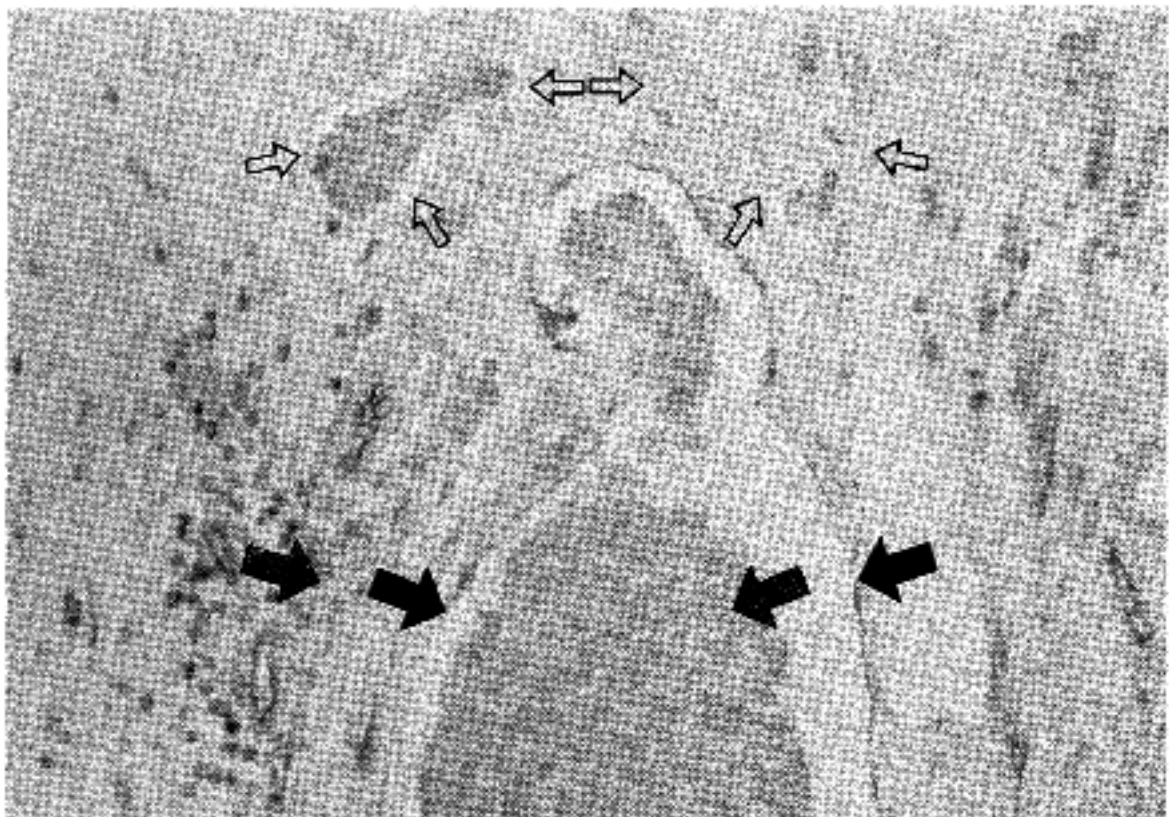


Fig. 4. Open arrows indicate tissue processing artifact resembling angioinvasion and solid arrows indicate CD34 stained vessel wall.

가 이루어진다²⁴⁻⁵. Liotta등²⁶은 원발성 병소에 신생 혈관이 증식하지 않은 경우, 종양세포는 순환기로 들어가지 못하여 전이가 이루어지지 않고 원발성 병소에만 국한된다고 하였다. 그러나 신생혈관 형성이 전이의 증폭을 유도하는 필수적인 요소일 것으로 생각되지만 아직까지 그 기전이 자세히 밝혀져 있지 않다. 혈관형성인자로 증명된 것은 angiogenin, angiotropin, epidermal growth factor, tumor growth factor,

vascular endothelial growth factor 및 tumor necrosis factor- α 등으로 몇몇 성장인자와 사이토카인이 대부분이었는데 최근에 혈관형성에 새롭게 확인된 매개체로 혈관내피세포에 있는 세포유착분자(cellular adhesion molecule, CAM)의 중요성이 새롭게 거론되고 있으며 특히 E-selectin과 integrin이 혈관내피세포의 폭발적인 증식을 유도한다³⁰. 혈관유도인자로 사이토카인과 CAM이 생체 내에서 서로 밀접한 관련성이

Table 3. MVCs among clinicopathologic factors

Clinicopathologic factor	Cases	MVC (Range)	Low MVC (< 92.0) No.(%)	High MVC (≥ 92.0) No.(%)
Total	56	92.0 ± 54.4(7 ~ 237)	32(57.1)	24(42.9)
LN metastasis				
positive	27	100.0 ± 60.5(17 ~ 237)	15(55.6)	12(44.4)
negative	29	84.6 ± 47.9(7 ~ 232)	14(48.3)	15(51.7)
Menopausal status				
premenopause	27	88.7 ± 58.3(7 ~ 237)	17(63)	10(37)
postmenopause	29	95.1 ± 53.7(19 ~ 196)	15(51.7)	14(48.3)
ER				
positive	28	82.1 ± 50.4(7 ~ 196)	18(64.3)	10(35.7)
negative	28	100.6 ± 55.7(19 ~ 237)	16(57.1)	12(42.9)
p53				
positive	21	85.0 ± 42.8(19 ~ 177)	12(57.1)	9(42.9)
negative	35	95.3 ± 59.7(7 ~ 237)	21(60)	24(68.6)
Angioinvasion				
positive	20	94.0 ± 53.4(19 ~ 196)	11(55)	9(45)
negative	36	90.9 ± 55.6(7 ~ 237)	20(55.6)	16(44.4)
Tumor size(cm)				
< 2	9	110.5 ± 66.3(20 ~ 232)	3(33.3)	6(66.7)
≥ 2 ~ < 5	40	92.4 ± 49.7(19 ~ 237)	24(60)	16(40)
≥ 5	7	73.9 ± 69.7(7 ~ 192)	5(71.4)	2(28.6)
Mitosis count				
0 ~	37	87.3 ± 54.1(7 ~ 237)	23(62.2)	14(37.8)
10 ~ 19	8	106.8 ± 71.9(19 ~ 196)	5(62.5)	3(37.5)
20 ~	11	97.0 ± 42.6(20 ~ 170)	4(36.4)	7(63.6)
Histologic grade				
I	31	87.4 ± 55.2(7 ~ 237)	20(64.5)	11(35.5)
II	18	102.4 ± 55.0(20 ~ 196)	9(50)	9(50)
III	7	87.7 ± 44.9(19 ~ 170)	3(42.9)	4(57.1)
Clinical stage				
I	7	105.9 ± 74.6(20 ~ 232)	3(42.9)	4(57.1)
IIA	22	77.5 ± 30.0(35 ~ 132)	14(63.6)	8(36.4)
IIB	17	93.6 ± 64.4(7 ~ 237)	10(58.8)	7(41.2)
IIIA	5	97.0 ± 44.9(51 ~ 170)	3(60)	2(40)
IIIB	3	154.0 ± 69.3(74 ~ 196)	1(33.3)	2(66.7)
IV	2	111.0 ± 55.2(72 ~ 150)	1(50)	1(50)

MVC: microvessel count

There was no significant difference in MVCs among various clinicopathologic factors. by ANOVA, Kruskai-Wallis or chi-square test.

있는 것이 실험적으로 밝혀졌다. 즉, 사이토카인의 자극하에 내피세포에서 CAM이 분비되어 각각의 내피세포 바깥의 수용체와 결합하여 신생혈관 형성을 촉진시킨다. 또한 CAM은 수용체와 함께 암세포가

특정 표적 장기나 조직으로 전이하는데 필요함이 증명되었다^{30,31}.

종괴 내에서 만들어진 신생혈관은 혈관내피세포에 특이적으로 존재하는 항원인 factor VIII이나 CD34

및 CD31에 대한 항체를 사용하여 면역조직화학 염색을 하고 염색정도를 수치화함으로써 정량분석할 수 있다. 혈관내피세포 염색에 factor-VIII 관련 항원에 대한 면역조직화학 검사가 가장 보편화되어 있지만 이 다클론성항체는 민감성이 상대적으로 떨어진다. 즉, 모든 내피세포에서 다 표현되지 못할 뿐 아니라, 특히 미성숙 종양세포는 염색되지 않는 경향이 있다. 반면에 CAM인 CD31이나 CD34는 아직 논란의 여지는 있지만 factor VIII보다 더 민감하게 발현되는 혈관 표지자로 주장되고 있다²¹⁻²⁵. 본 연구에 혈관내피세포 표지자로 사용된 CAM인 CD34는 115-kd 단백질로 1번 염색체의 장완에 위치하며, 처음에는 골수의 림프계 및 골수성계 조혈전구세포나 몇몇 급성 백혈병의 암세포 표면에서 표현되는 것으로 알려졌으나 그 밖에 특히 활동적인 혈관 형성중에 있는 혈관내피세포에서 발현되고, 또한 용기성 피부섬유육종, solitary fibrous tumor, 피부의 결합조직세포, 신경종양 및 그와 연관성있는 병변 등에 비교적 민감하게 발현됨이 밝혀져 있다²⁵⁻²⁷.

종양 내에서의 혈관형성 정도가 환자의 예후와 밀접한 관계를 갖는다고 피부의 기저세포암, 악성흑색종, 폐암, 전립성암, 결장암 및 유방암 등에서 보고된 바가 있다^{6-8,13-23}. 특히 유방암은 여성의 암 발생 및 암으로 인한 사망원인으로 전 세계적으로 1위를 기록함으로써 그 치료와 예후에 대한 관심이 매우 높다⁹. 아직까지 유방암의 가장 중요한 예후인 자로는 액와 림프절 전이 유무이지만, 유방암의 다양한 예후를 림프절 전이 유무만으로 충분히 설명하지 못하고 있는 실정이다. 즉, 림프절에 전이가 없는 유방암도 약 20~30%는 재발하고 또한 10년 사망율도 높다고 보고되어 있다^{31,32}. Ogawa등¹⁴은 유방암에서 MVC의 증가가 종괴의 크기, 림프절 전이, 조직학적 등급과 상관없이 재발을 및 사망율이 높다고 하였다. 그들은 저 및 고 MVC군으로 각각 분리하여 임상·병리적 지표와 비교하였는데 서로 유의한 상관관계가 없었고, 추적관찰한 결과 고-MVC군에서 재발율 및 사망율이 통계학적으로 유의하게 증가함을 관찰할 수 있었다. Weidner등¹⁵은 혈관수가 림프절 전이 유무 뿐 아니라, 종괴의 크기, 조직학적 등급과 매우 유의한 관계를 가진다고 하였고, Toi등²¹은 종괴의 크기, 에스트로겐 수용체 유무, p53 단백질발현과 MVC는 관계가 없고, 단지 림프절 전이 유무와는 밀접한 관계를 가지는 것을 보았다. 김등¹³은 101예의 유방의 침윤성 관암에서 MVC가 림프절 전이, 종양의 크기 및 임상적 병기와 관련이

있다고 보고하였고, 이등¹⁶은 40예의 유방의 침윤성 관암에서 MVC가 림프절 전이 유무 및 임상 병기와 유의한 상관관계가 있음을 보고하였다. Costello등¹⁹ 및 Goulding²³등은 미세혈관 형성은 독자적으로 혹은 기존에 예후인자로 거론된 다른 모든 지표와 전혀 상관관계가 없으며, 따라서 혈관형성 자체는 더 이상의 임상적 예후지표가 되지 못한다고 하였다. 본 연구에서는 유방암이 양성병변보다는 MVC가 상당히 높으므로 미세혈관형성이 암 형성에 크게 기여하는 것을 확인시켜 주었다. 그러나 추적관찰 기간이 평균 23개월 정도이어서 정확한 예후판정은 할 수 없었고 다만 미세혈관 형성능력과 임상·병리적 지표와의 연관성만을 조사하였는데 나이, 폐경 여부, 종양의 크기, 림프절 전이 유무, 유사분열수, 혈관 침윤 유무, 에스트로겐 수용체의 존재 여부, p53 단백질발현 여부, 조직학적 등급 및 임상 병기 등과 상호 관련성이 없었고, 또한 저·고 MVC군으로 나누는 것과도 상호 관련성이 없는 것을 보았다. 본 연구에서 림프절에 전이한 경우에 보다 많은 미세혈관 형성을 관찰할 수 있었고, 에스트로겐 수용체가 있을때 보다는 없을때에 높은 MVC가 관찰되었다. Fox등²⁰은 MVC가 ER의 존재 여부와 관련이 없다고 하였고, Ogawa등¹⁴은 ER가 없을때 더 높은 MVC를 보였고 심한 악성도를 보였다고 하였다.

면역조직화학 염색법으로 미세혈관수를 세는 데에도 몇몇 문제가 있다. 첫째, 신생혈관 뿐만 아니라 기존 혈관까지 염색되어 이 둘을 확실히 구분할 수 없으므로 문제가 되는데, 특히 혈관 분포가 잘 되어 있는 지방조직 내로 종괴의 침윤이 있을때 혈관수의 측정치가 상당히 높게 된다. 둘째, 종양세포 뿐 아니라 염증세포 또한 혈관형성인자를 분비함으로써 이차적 염증이 동반되어 있는 경우에 측정치가 증가하며, 셋째, 단지 한 개의 파라핀 블록만을 선정하여 검사했기 때문에 생길 수 있는 오차가 있고, 넷째, 미세혈관수를 세는데 사용되는 시야의 크기에서 생길 수 있는 오차이며, 다섯째, 비만세포의 비특이적 염색반응을 양성으로 오인할 수 있다. 본 연구에서는 지방조직에 가까운 부위, 세침흡인이나 생검 후 조직반응으로 인한 염증과 육아조직이 생긴 부위, 그외에 괴사와 경화된 부위는 의도적으로 피하고 세었다^{11,10}. 미세혈관을 세는데 사용된 시야 넓이는 200배 시야(0.74 mm²)에서 세는 것이 적당하다고 생각되었으므로 그것에 따랐다^{11,14,16}. 대부분의 실험처럼 본 연구도 한 개의 블록만을 선정하였고 연구자에 따라 가장 많은 MVC를 보이는 3부위 시

야를 세어서 평균을 내든지 혹은 가장 많은 MVC만을 측정하든지 다양하였다. 본 연구에서는 후자에 따랐으나 가장 많은 MVC 시야를 찾기 위해서는 더 많은 파라핀 블록을 가지고 실험하여야 할 것으로 사료된다.

침윤성 관암의 중앙부와 변연부를 비교하여 본 결과 특히 변연부쪽에 더 많은 MVC를 보였는데 이것은 이등¹⁶의 보고와 일치하는 소견이었다. 또한 여러 예에서 유방의 침윤성 관암 주위에 있는 비침윤성 관내암종에서 미세혈관은 레이스 모양으로 종양의 가장자리를 싸고 있었으며, 침윤성암 부위에 비하여 상대적으로 적은 수의 MVC를 보였고, 또한 종양과 떨어진 부위의 정상부위의 유방 실질에도 적은 수의 MVC를 보였다. 대조군으로 사용한 20예의 양성 유방병변의 한 예인 섬유낭성 병변에서 MVC가 73개까지 관찰되었으나 이것은 종말관 소엽단위의 한 시야에서만 혈관수가 많은 것이었고 다른 부위는 매우 낮은 수치를 보였다. Bosari 등¹¹은 비침윤성 관내암종의 MVC를 저, 중, 고군으로 비교하였을 때, 각각 55%, 26% 및, 29%를 차지하였고 양성 유방조직에서는 각각 74%, 21% 및 6%를 차지한다고 하였다. 이들에 의한 연구에서도 양성 유방병변의 6%에서는 상당히 높은 MVC를 보인 것을 알 수 있으나 여기에서도 전체적으로 높은 밀도의 MVC를 보인 것이 아니라 한 시야에서만 높은 것이었다.

유방암에서 미세혈관수와 임상·병리적 지표의 관계가 통계학적으로 유의한 상관관계가 없게 나온 것에는 연구 재료수가 적은점이 어느 정도 영향을 끼친 것으로 생각되지만, 연구된 56예의 침윤성 유방암의 MVC가 7개부터 237개까지 다양하게 분포되어 있고, 각각 임상·병리적 지표에 따라 분리하였을 때에도 표준 편차가 상당히 높은 점으로 미루어 일단 암종으로 발현된 후에 미세혈관수는 기존의 예후인자로 언급되었던 많은 임상·병리적 지표와 연관성이 없는 것으로 생각된다.

결 론

본 연구에서 유방의 침윤성 관암 56예와 대조군으로 사용한 20예의 양성 유방병변의 미세혈관수를 비교하였을 때 현격한 차이가 나는 것을 관찰하였다 ($p < 0.0001$). 따라서 혈관형성이 암발생 이전에 중요한 요소로 작용하였음을 예측할 수 있었다. 유방의 침윤성 관암에서 종양의 미세혈관이 기존에 예후인

자로 알려져 있는 많은 임상·병리적 지표와 관련이 있는지에 대해 연구한 결과, 림프절 전이가 존재하거나 에스트로겐 수용체가 없을 때에 미세혈관수가 더 많이 존재하는 양상이었으나 모든 예후인자와 통계학적으로 유의한 상관관계가 없었다($p > 0.05$). 미세혈관수와는 상관없이 ER이 없을 때, 종양세포의 혈관침윤이 있을 때와 조직학적 등급이 높을수록 통계학적으로 유의하게 유사분열수가 증가하였고($p < 0.0005$), 또한 종양세포의 혈관침윤이 있을 때 조직학적 등급이 높은 경향이 있었다($p < 0.05$).

미세혈관 형성이 유방암의 예후에 밀접한 영향을 주는지에 대하여는 찬·반이 아직도 많아서, 혈관형성 억제치료를 시도하여야 할 것인지를 결정하기 위하여는 좀 더 합리적으로 정량화된 방법으로 MVC를 재거나, 혹은 기존에 있는 혈관은 제외하고 신생혈관에만 특이적으로 반응하는 항체를 개발하여 검사하든지, 또한 한꺼번에 많은 수의 블록을 선정하여 미세혈관을 재는 방법으로 검사하였을 때에도, 통계학적으로 유의한 예후인자로 작용할 때 혈관형성 억제 치료법이 유방암에서 성공적으로 이루어질 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Gimbrone MA, Leapman S, Cotran RS, Folkman J. Tumor growth neovascularization: An experimental model using rabbit cornea. *J Natl Cancer Inst* 1974; 52: 413-27.
2. Blood CH, Zetter BR. Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1990; 1032: 89-118.
3. Weidner N. Tumor angiogenesis: Review of current applications in tumor prognostication. *Semi Diag Pathol* 1993; 10: 302-13.
4. Bicknell R, Harris AL. Novel growth regulatory factors and tumor angiogenesis. *Eur J Cancer* 1991; 27: 781-5.
5. Hart IR, Saini A. Biology of tumour metastasis. *Lancet* 1992; 339: 1453-7.
6. Macchiarini P, Fontanini G, Hardin MJ, Squartini F, Angeletti CA. Relation of neovascularisation to metastasis of non-small-cell lung cancer. *Lancet* 1992; 340: 145-6.
7. Weidner N, Carroll PR, Flax J, Blumenfeld W, Folkman J. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol* 1993; 143: 401-9.

8. Staibano S, Boscaino A, Salvatore G, Orabona P, Palombini L, De Rosa G. The prognostic significance of tumor angiogenesis in nonaggressive and aggressive basal cell carcinoma of the human skin. *Hum Pathol* 1996; 27: 695-700.
9. Berg JW, Hutter RV. Breast cancer. *Cancer* 1995; 75: 257-69.
10. 이종석, 김사유. 한국인 유방암의 병리조직 형태와 이에 따른 임상양상. *대한암학회지* 1994; 26: 70-81.
11. Bosari S, Lee AK, DeLellis RA, Wiley BD, Heatley GJ, Silverman ML. Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma. *Hum Pathol* 1992; 23: 755-61.
12. Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 1989; 339: 58-61.
13. 김남훈, 박문향. 유방암의 종양 신생혈관형성과 전이의 연관성에 대한 연구. *대한병리학회지* 1995; 29: 740-5.
14. Ogawa Y, Chung YS, Takatsuka S, et al. Microvessel quantitation in invasive breast cancer by staining for factor VIII-related antigen. *Br J Cancer* 1995; 71: 1297-1301.
15. 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* 1992; 84: 1875-87.
16. 이태진, 조남복, 박연섭, 유재형, 박성준. 유방의 침윤성 관암종에서 TGF- β 의 발현 및 맥관 형성에 관한 면역조직화학적 분석. *대한병리학회지* 1996; 30: 557-69.
17. Hall NR, Fish DE, Hunt N, Goldin RD, Guillon PJ, Monson JR. Is the relationship between angiogenesis and metastasis in breast cancer real? *Surg Oncol* 1991; 1: 223-9.
18. Van Hoef ME, Knox WF, Dthesis SS, Howell A, Schor AM. Assessment of tumour vascularity as a prognostic factor in lymph node negative invasive breast cancer. *Eur J Cancer* 1993; 29A: 1141-5.
19. Costello P, McCann A, Carney DN, Dervan PA. Prognostic significance of microvessel density in lymph node negative breast carcinoma. *Hum Pathol* 1995; 26: 1181-4.
20. Fox SB, Leek RD, Smith K, Hollyer J, Greenall M, Harris AL. Tumour angiogenesis in node-negative breast carcinomas-relationship with epidermal growth factor receptor, estrogen receptor and survival. *Breast Cancer Res Treat* 1994; 29: 109-16.
21. Toi M, Kashitani J, Tominaga T. Tumor angiogenesis is an independent prognostic indicator in primary breast carcinoma. *Int J Cancer* 1993; 55: 371-4.
22. Horak ER, Leek R, Klenk N et al. Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet* 1992; 340: 1120-4.
23. Goulding H, Rashid NFNA, Robertson JF, et al. Assessment of angiogenesis in breast carcinoma: An important factor in prognosis? *Hum Pathol* 1995; 26: 1196-1200.
24. Kuzu I, Bicknell R, Harris AL, Jones M, Gatter KC, Mason DY. Heterogeneity of vascular endothelial cells with relevance to diagnosis of vascular tumors. *J Clin Pathol* 1992; 45: 143-8.
25. Parums DV, Cordell JL, Micklem K, Heryet AR, Gatter KC, Mason DY. JC70: a new monoclonal antibody that detects vascular endothelium associated antigen on routinely processed tissue sections. *J Clin Pathol* 1990; 43: 752-7.
26. Weiss SW, Nickoloff BJ. CD-34 is expressed by a distinctive cell population in peripheral nerve, nerve sheath tumors, and related lesions. *Am J Surg Pathol* 1993; 17: 1039-45.
27. Flint A, Weiss SW. CD-34 and keratin expression distinguishes solitary fibrous tumor(Fibrous mesothelioma) of pleura from desmoplastic mesothelioma. *Hum Pathol* 1995; 26: 428-31.
28. Fina L, Molgaard HV, Robertson D, et al. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood* 1990; 75: 2417-26.
29. Liotta LA, Saidel MG, Kleinerman J. The significance of hematogenous tumor cell clumps in the metastatic process. *Cancer Res* 1976; 36: 889-94.
30. Polverini PJ. Cellular adhesion molecules: Newly identified mediators of angiogenesis. *Am J Pathol* 1996; 148: 1023-9.
31. Brooks PC, Clark RA, Chersesh DA. Requirement of vascular integrin $\alpha_5 \beta_3$ for angiogenesis. *Science* 1994; 264: 569-71.
32. Osborne CK. Prognostic factors for breast cancer: have they met their promise? *J Clin Oncol* 1992; 10: 679-82.
33. Sigurdsson H, Baldetorp B, Borg A, et al. Indicators of prognosis in node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 1990; 322: 1045-53.
34. Bloom HJG and Richardson WW. Histologic grading and prognosis in the breast cancer. *Br J Cancer* 1957; 11: 359-77.