

대장 및 직장 암종에서 신생혈관 형성과 전이 및 종양세포 증식능과의 상관관계

인하대학교 인하병원 해부병리과

주 영 채 · 김 준 미

Correlation between Tumor Angiogenesis (Microvessel Density), Metastasis and Tumor Cell Proliferation in Colorectal Carcinomas

Young Chae Chu, M.D. and Joon Mee Kim, M.D.

Department of Anatomical Pathology, Inha hospital, Inha University

Tumor angiogenesis has been shown to be associated with metastatic potentials in breast, lung and prostatic carcinomas. The relation between tumor angiogenesis and metastatic potentials in colorectal cancer has not been established to date. We analysed 66 selected patients with colorectal carcinomas (37 with and 29 without nodal metastases) for the microvessel density, tumor proliferation activity, and the clinicopathologic parameters including size, stage, histologic grade, growth pattern, presence of angioinvasion, perineural invasion and lymph node metastasis. For evaluation of microvessel density and tumor proliferative activity, the primary tumors were immunohistochemically stained for CD31 and PCNA. The mean microvessel counts (MVC) per 200X field were 99.27 ± 23.28 and 131.35 ± 31.48 in node-negative and node-positive patients, respectively. The PCNA index was $39.41 \pm 5.63\%$ and $56.60 \pm 7.09\%$ in node-negative and node-positive patients, respectively. MVC and PCNA index were higher in tumors with nodal metastasis ($p=0.002$, $p<0.001$), and also correlated each other ($sr=0.33$, $p=0.007$). Higher microvessel counts were seen in tumors with advanced stage ($p=0.016$). Tumor proliferation activity assessed by PCNA immunostaining was significantly higher in tumors with advanced stage, perineural invasion, angioinvasion, poor differentiation and larger size. From these results, MVC and PCNA index in colorectal carcinomas are assumed to be valuable prognostic parameters. Thus assessment of tumor angiogenesis and tumor cell proliferation in colorectal carcinomas may be helpful for the patients in need of aggressive therapy. (Korean J Pathol 1997; 31: 517~526)

Key Words: Colorectal carcinoma, Tumor angiogenesis(CD31), PCNA, Prognostic factor

접 수: 1997년 2월 10일, 게재승인: 1997년 3월 29일

주 소: 성남시 수정구 태평동 7336, 우편번호 461-192

인하대학교 인하병원 해부병리과, 주영채

*이 연구는 1995년도 인하대학교 교수연구비로 이루어졌음.

서 론

암종이 유발되어 성장하고 전이하는 데는 종양세포의 증식 뿐만 아니라 종양이 자라는 숙주의 주변 조직의 반응이 필수적이다. 암종이 전이하려면 종양세포와 비종양성 혈관, 면역계 및 결합조직 간에 여러 가지 중요한 상호작용이 일어나게 된다. 따라서 종양의 신생혈관 형성은 종양의 증식 및 전이에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{1,2}.

종양이 유발되어 성장하기 위해서는 신생혈관 형성에 의존하게 되는데 그 근거로는 생체 밖이나 혈관이 없는 토끼의 각막에서는 종양이 1~2 mm 정도의 크기 이상으로는 더 성장하지 않으며 또한 맥관 형성 억제제는 생체 내에서 종양의 성장을 억제한다는 실험적 증거가 있다¹⁻³. 즉 종양의 증식에는 반드시 신생혈관의 증식이 선행되어야 하는데 이를 위해서는 종양세포가 직접 맥관 형성 촉진물질(tumor angiogenesis factor)을 만들어 분비하거나 대식세포를 유인해서 대식세포에서 맥관 형성 촉진물질을 방출하도록 활성화한다⁴. 어떤 종양은 collagenase와 heparanase를 분비하여 세포 밖 기질에 저장되어 있는 맥관 형성 촉진물질을 방출하게 하거나 혈관 투과성 물질을 분비해서 세정맥에서 fibrinogen을 누출시켜 맥관 형성을 촉진한다⁴. 또 어떤 종양은 한 가지 이상의 맥관 형성 촉진물질을 분비하기도 한다. 현재까지 알려진 맥관 형성 촉진물질로는 활성화된 대식세포에서 분비되는 transforming growth factor-alpha (TGFA), angiotropin, tumor necrosis factor-alpha (TNF α)와 basic fibroblast growth factor(bFGF)가 있고 그 외에 acidic fibroblast growth factor(aFGF), vascular endothelial growth factor(VEGF), platelet-derived endothelial cell growth factor(PD-ECGF), vascular permeability factor(VPF), folliculo-stellate-derived growth factor (FSDGF), angiotropin, angiogenin 등이 있다^{4,5}. 최근에는 암이 발생하는 동안 종양 억제 유전자의 불활성화로 인해 혈관 내피세포의 분열을 억제하는 thrombospondin 생성이 감소되어 신생혈관 형성이 촉진되고 이것이 결국 종양 성장과 비례하게 된다고 한다^{6,7}. 신생혈관은 분절된 기저막을 가지고 있어 매우 누출되기 쉽고 또 신생혈관의 내피세포에서 collagenase와 plasminogen 활성체를 분비해서 내피세포의 침윤성 화학주성활동이 촉진된다. 또 이 분해효소는 종양세포가 신생혈관으로 침투하는 것을 용이하도록 한다⁸. 따라서 신생혈관은 종양의 전이 과정에 깊이 관여

하게 된다. Folkman등^{1,2}은 종양세포가 성장하기 전에 반드시 신생혈관 형성이 선행된다고 하였고 종양의 성장과 미세혈관 수 사이에 상관관계가 있는 것을 밝혔고 이러한 상관관계는 인체에 발생한 악성 흑색종⁹⁻¹¹, 유방암¹²⁻¹⁵, 폐암¹⁶, 전립선암^{17,18}, 두경부 편평상피세포암^{19,20} 등에서 신생혈관 형성이 활발할수록 재발 및 전이를 잘 하는 것으로 증명되고 있다.

대장 및 직장 암종의 예후는 같은 병기에서도 각 종양의 특이한 생물학적 성상에 따라 달라지며 따라서 예후에 관계하는 인자들은 병의 경과를 예측하는데 도움이 될 뿐 아니라 치료 방침을 정하는데도 필요하다²¹. 대장 및 직장 암종의 예후인자로는 Dukes 병기가 가장 중요하지만 그 이외에 환자의 연령, 종양의 크기, 장천공의 유무, 장폐쇄의 유무와 같은 임상 소견과, 조직학적 유형 및 분화도, 종양의 성장 양상, 종양 주위의 림프구 침윤, 혈관, 림프관 및 신경조직 침윤과 같은 조직 소견이 있고 그 외에 DNA ploidy pattern, c-myc 암유전자 발현, 혈청 CEA 등이 알려져 있다. 최근에는 신생혈관 형성 정도가 예후와 관계있다는 보고²²가 있으나 아직 대장 및 직장암종에서의 신생혈관 형성 정도와 예후와의 관계에 대한 연구는 활발하지 않다.

본 연구는 대장 및 직장 암종을 대상으로 파라핀 절편에서 면역조직화학적 염색으로 CD31을 이용하여 단위 면적당 미세혈관 수를 측정하여 PCNA로 측정된 세포증식능과 기존의 예후인자와의 상관관계를 알아보려고 하였다.

CD31은 PECAM-1(platelet/endothelial cell adhesion molecule) 또는 endoCAM(endothelial cell adhesion molecule)으로 불리우는 분자량 140 kD의 membrane glycoprotein인 cell adhesion molecule로서 단핵구와 과립구에도 있지만 내피세포에서 가장 뚜렷히 나타난다. CD31은 여러 혈관 내피세포 표지자 중에서 가장 예민하여 모든 혈관 내피세포에 특이하게 반응하여 미세혈관 수를 측정하는데 가장 좋은 표지자이다²³. Proliferating cell nuclear antigen(PCNA)은 cyclin이라고도 불리우며 분자량 36 kD의 비히스톤계의 핵단백질로 DNA polymerase δ 의 보조인자로 DNA 합성에 관여함으로써 세포 증식에 꼭 필요한 물질이다^{24,25}. 주로 세포 증식 주기의 G1 후기부터 기초기에 걸쳐 세포핵 내에 축적되고 따라서 정지기의 세포에서는 발견되지 않기 때문에 세포 증식지수로 이용되고 있다²⁶.

이에 저자는 대장 및 직장 암종에서 종양내 신생

혈관 형성 정도를 측정하여 암세포의 세포증식능과 다른 예후인자들과의 상관관계를 확인함으로써 신생혈관 형성 정도가 예후인자로 사용될 수 있는지 규명해 보고자 본 연구를 시도하였다.

재료 및 방법

1. 연구재료

인하대학교 인하병원에서 외과적으로 절제된 대장 및 직장 암종 중 파라핀 포매체의 보관 상태가 양호한 66례를 대상으로 하였다.

2. 연구방법

1) **임상기록 재검토:** 연구 대상 환자들의 임상 기록과 병리진단지를 재검토하여 성별, 연령, 종양의 위치, 종양의 크기, 임상적 병기, 치료 방법(수술외의 항암 화학요법 및 방사선 치료의 여부), 수술 후의 병의 진행 과정(재발 및 전이 여부)을 추적 조사하였다.

2) **병리조직학적 검색:** 조직학적 분류, 조직학적 분화도, 림프절 전이 유무 및 그 수, 다른 장기로의 원격 전이, 수정된 Dukes 병기, TNM 분류, Jass의 새로운 예후 분류에 의한 grouping, 종양의 성장 양상, 선모양의 규칙성, 핵의 방향성, 기질 섬유화 정도, 암종 주위의 림프구 침윤 정도, Crohn양 림프구 침윤, 혈관, 림프관 및 신경조직 침윤 정도, 암종 주위의 염증 반응 정도, 괴사 정도 및 점액분비 정도를 관찰하였고 이와같은 조직학적 소견에 대해 각 그 정도에 따라 3등급 또는 4등급으로 분류하였다.

3) 면역조직화학적 검색:

(1) **미세혈관 수 계산:** 대장 및 직장 암종을 10% 중성 완충 포르말린에 고정한 후 제작한 파라핀 포매체 중 가장 적합한 파라핀 블록을 골라서 4 um 두께로 박절하여 슬라이드에 부착시켜 절편을 xylene과 알코올을 사용하여 탈파라핀 및 합수를 시키고 암세포 표면의 비특이성 항체 수용체를 제거하기 위해 blocking 항체액 100 ul를 조직에 떨균 후 상온에서 10분간 반응시켰다. 슬라이드를 가볍게 턴 후 혈관 내피세포의 표지자로 CD31항체(DAKO)를 1 : 20으로 희석하여 100 ul를 가한 다음 상온에서 한 시간 동안 반응시켰다. pH7.6의 Tris 완충액으로 세척한 후 이차 항체인 biotinylated antibody(DAKO)를 100 ul 가하고 상온에서 15분간 배양하였다. Tris 완충액으로 세척하고 streptavidin(DAKO)을 가한 다음 상온에서 15분간 배양하였다. Tris 완충액으로 세척

한 후 발색제인 AEC 용액을 2~3방울 가하고 5~10분간 발색시키면서 현미경으로 관찰하여 적절한 정도로 발색시켰다. Tris 완충액으로 세척하고 공기 중에서 건조시킨 다음 hematoxylin으로 대조염색을 하고 crystal mount(Biomed)로 봉입하였다.

① **판 정.** 광학현미경 200배 배율로 단위 면적당 미세혈관 수가 가장 활발한 3시야를 선택하여 혈관 수를 계산하고 그 평균값을 산출하여 대표값으로 사용하였다.

(2) **Proliferating cell nuclear antigen(PCNA);** PCNA에 대한 면역조직화학적 검색은 모세혈관수 계산에 사용한 파라핀 블록을 4 um 두께로 박절하여 슬라이드에 부착시켜 탈파라핀과 합수 과정을 거쳐 blocking 항체액 100 ul를 조직에 떨균 후 상온에서 10분간 반응시켰다. 슬라이드를 가볍게 턴 후 PCNA 단클론성 항체(DAKO)를 1 : 200으로 희석하여 100 ul를 가한 다음 상온에서 한 시간 동안 반응시켰다. pH7.6의 Tris 완충액으로 세척한 후 이차 항체인 biotinylated antibody(DAKO)를 100 ul 가하고 상온에서 15분간 배양하였다. Tris 완충액으로 세척하고 streptavidin(DAKO)을 가한 다음 상온에서 15분간 배양하였다. Tris 완충액으로 세척한 후 발색제인 AEC 용액을 2~3방울 가하고 5~10분간 발색시켰다. Tris 완충액으로 세척하고 공기 중에서 건조시킨 다음 hematoxylin으로 대조염색을 하고 crystal mount(Biomed)로 봉입하였다.

① **판 정.** 광학현미경 100배 배율로 임의로 5시야를 골라서 400배 배율로 200개씩 종양세포를 모두 1000개 세어 그 중 핵이 갈색으로 염색된 세포를 양성으로 간주하고 이 세포들의 100분율을 계산해서 표시하였다.

4) **통계학적 분석:** SPSS 통계 프로그램을 이용하여 림프절 전이 유무에 따른 신생혈관 증식 정도와 PCNA 발현도에 차이가 있는지는 Student's t-test로 검정하였고 그 외의 예후인자에 따른 신생혈관 증식 정도와 PCNA 발현도의 차이는 분산분석(One-way ANOVA)을 사용하였다. 신생혈관 증식 정도와 PCNA 발현도간의 상관관계가 있는지 알아보려고 Spearman 상관계수를 구하였다.

성 적

본 연구에 이용한 66례의 대장 및 직장 암종의 조직학적 유형은 선암종이 64례(97%)이었고, 점액암종이 1례(1.5%), 인환세포암종이 1례(1.5%)이었다.

선암종은 고분화 선암종이 32예(50%), 중등도분화 선암종이 27예(42.2%), 그리고 저분화 선암종이 5예(7.6%)이었다. 원발소에서 림프절로 전이한 경우는 모두 37예(56.1%)이었고 이 중 원격 전이를 한 예는 2예(3%)이었다. 암세포가 혈관이나 림프관에 침윤한 경우는 35예(53.0%)이었고 신경조직을 침윤한 경우는 21예(31.8%)이었다. 암종의 성장 양상은 침윤성이 38예(57.6%), 확장형이 12예(18.2%), 혼합형이 16예(24.2%)이었다. 암종 주위의 림프구 침윤은 심한 경우가 6예(9.1%), 중등도인 경우가 29예(43.9%), 없거나 미미한 경우가 31예(47%)이었고, Crohn양 림프구침윤이 중등도 이상 관찰된 경우는 10예(15.2%)이었다. 종양이 확장형의 성장 양상을 보이는 경우 수정된 Dukes 병기가 더 낮았고($p < 0.01$), 주위에 염증성 반응($p < 0.001$)과 림프구 침윤($p < 0.001$), Crohn양 림프구 침윤($p < 0.05$)이 더 현저하였다. 환자의 수술 당시 병기는 수정된 Dukes 병기로 C2가 34예(51.5%), B2가 22예(33.3%), A, C1, D병기가 각각 2예(3%)씩이었고 B1이 4예(6.1%)이었다. TNM분류상 III가 36예(54.5%)로 가장 많았고 II가 22예(33.3%)이었다. Jass의 new prognostic classification grouping으로는 Group IV가 27예(40.9%), III가 20예(30.3%), II가 11예(16.7%), I이 8예(12.1%)이었다.

1. 신생혈관 증식 정도를 보기위한 CD-31에 대한 면역조직화학적 검색

면역조직화학적 염색상 CD31의 양성 반응은 종양

내 미세혈관들의 내피세포에서 진한 갈색으로 관찰되었는데 미세혈관의 수는 종양의 주변부에서 종양의 중앙부에서보다 더 많이 관찰되었고 광학현미경 200배율 하에서 49개에서 213개까지 관찰되었는데 평균 117.3 ± 32.3 이었다. 미세혈관 수는 주위 림프절 전이가 있는 경우가 131.4 ± 31.5 로 전이가 없는 경우의 99.3 ± 23.3 에 비해 현저히 많았다($p = 0.002$)(Fig. 1). 수정된 Dukes 병기 A, B1, B2, C1, C2, D군에서 각각 미세혈관 수는 75.0 ± 11.3 , 100.8 ± 14.5 , 105.3 ± 24.4 , 130.5 ± 17.7 , 137.8 ± 30.9 , 135.0 ± 39.3 으로 Dukes 병기가 높을수록 미세혈관 수가 많았고($p = 0.016$) 특히 B2와 C2 병기 사이의 차이가 컸다(Table 1). 또 같

Table 1. Microvessel count, PCNA index and tumor stage

Stage	No. of Cases	MVC mean score $\times 200$	PCNA index mean score $\times 400$
A	2	75.0 ± 11.3	31.0 ± 2.9
B1	4	100.8 ± 14.5	40.2 ± 3.3
B2	23	105.3 ± 24.4	41.0 ± 5.6
C1	2	130.5 ± 17.7	49.4 ± 6.0
C2	33	137.8 ± 30.9	56.5 ± 5.7
D	2	135.0 ± 39.3	71.0 ± 5.7

$p = 0.016$ $p < 0.001$ by ANOVA

MVC: microvessel count

PCNA: proliferating cell nuclear antigen

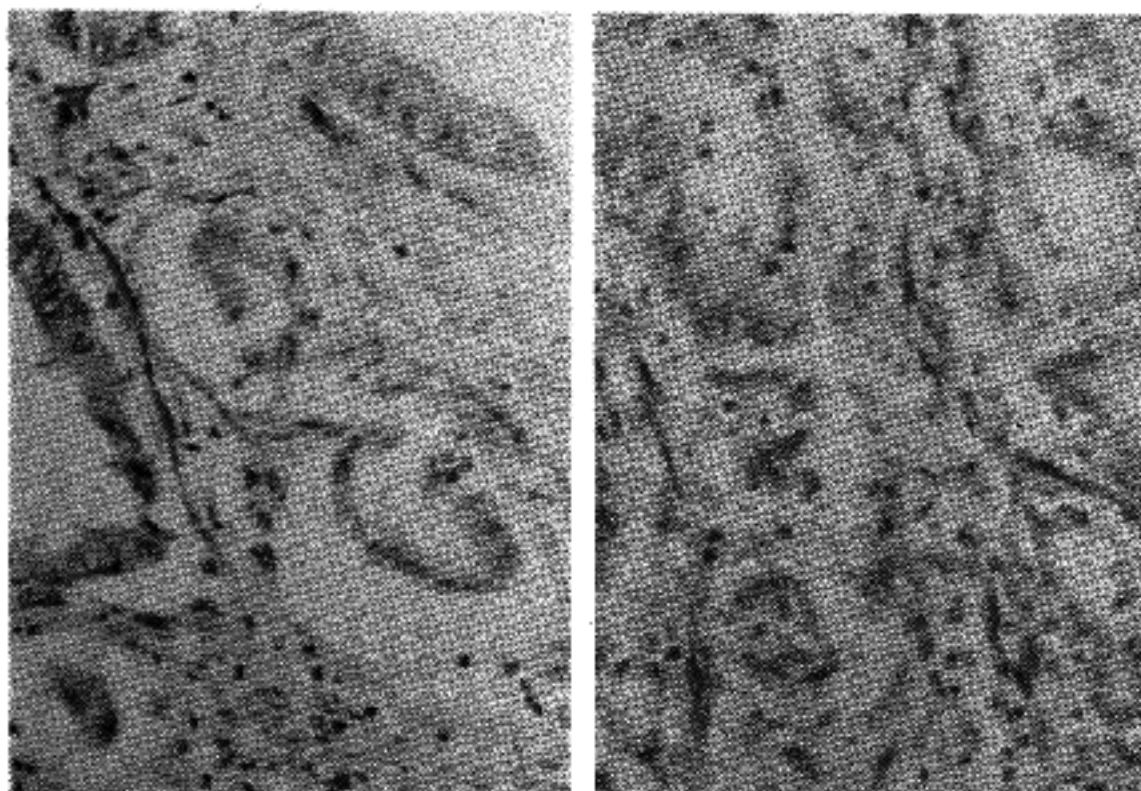


Fig. 1. Staining of colorectal adenocarcinoma with CD31. Blood vessels were highlighted by staining endothelial cells for CD31. Example of low vascularization(left) and high vascularization(right).

은 C2 병기에서도 국소 림프절 전이가 4개 이하인 군과 5개 이상인 군의 미세혈관 수는 각각 123.6 ± 26.9 와 150.0 ± 35.2 로 유의한 차이가 있었다($p=0.002$) (Table 2). 또한 TNM 분류와 Jass의 new prognostic classification grouping에서도 병기가 높아질수록 미세혈관수가 증가하였다($p=0.005$, $p=0.004$). 종양이 침윤형 성장 양상을 보이는 경우와 혈관 및 림프관 내 침윤이 있는 경우 및 신경조직 침윤이 있는 경우 미세혈관수가 더 많은 경향은 있었으나 통계학적으로 의의는 없었다. 그 외에 환자의 연령, 부위, 종양의 크기, 분화도, 선모양의 규칙성, 핵의 방향성, 종양 주변의 림프구 침윤 정도 및 섬유화 정도의 차이에 따른 유의한 차이는 없었다.

Table 2. Microvessel count, PCNA index and Status of lymph node metastasis

Nodal status	No. of Cases	MVC mean score $\times 200$	PCNA mean score $\times 400$
0	29	99.3 ± 23.3	39.4 ± 5.6
1-4	26	123.6 ± 26.9	56.4 ± 6.5
>5	11	149.7 ± 35.2	58.1 ± 7.5

$p=0.002$ $p<0.001$ by ANOVA

MVC: microvessel count

PCNA: proliferating cell nuclear antigen

2. PCNA에 대한 면역조직화학적 검색

면역조직화학적 염색상 PCNA의 양성 반응은 핵에 국한되어 나타났고 PCNA의 염색 반응은 암종 주위의 정상 점막세포에서도 부분적으로 약한 양성 반응이 관찰되었다. 종양세포의 양성도는 $49.0 \pm 10.8\%$ 로 주위 조직으로 침윤하고 있는 부위의 종양 세포에서 PCNA 반응도가 더 높았다. 종양의 발생 부위에 따른 PCNA 반응도는 우측 부위가 다소 높게 나타났으나 통계학적 의의는 없었다. 종양의 크기에 따른 PCNA 반응도는 5 cm 미만은 $48.3 \pm 10.9\%$, 5 cm 이상 10 cm 미만은 $50.5 \pm 11.5\%$, 10 cm 이상은 $52.4 \pm 2.7\%$ 로 종양의 크기가 클수록 PCNA 반응도가 높았고 통계학적으로 5 cm 미만과 10 cm 미만의 경우 유의한 차이가 없었으나 10 cm 이상인 경우와는 유의한 차이가 있었다($p<0.05$). 조직학적 유형에 따른 PCNA 반응도는 선암종이 $49.2 \pm 11.0\%$, 집액암종이 39.9% , 인화세포암종이 43.1% 이었고 선암종은 분화도에 따라 고분화 선암종이 $45.1 \pm 10.1\%$, 중등도 분화 선암종이 $52.1 \pm 8.5\%$, 저분화 선암종이 $55.8 \pm 8.5\%$ 로 분화도가 낮은 선암종에서 높게 나타났고 ($p=0.009$)(Fig. 2), 같은 종양 내에서도 역형성이 심한 핵에서 좀 더 강한 양성 반응을 보였다. 림프절 전이 및 원격 전이에 따른 PCNA 반응도는 림프절 전이가 있는 경우가 $56.6 \pm 7.1\%$ 로 전이가 없는 경우의 $39.4 \pm 5.6\%$ 에 비해 높았다($p<0.001$)(Table 2). 암세포

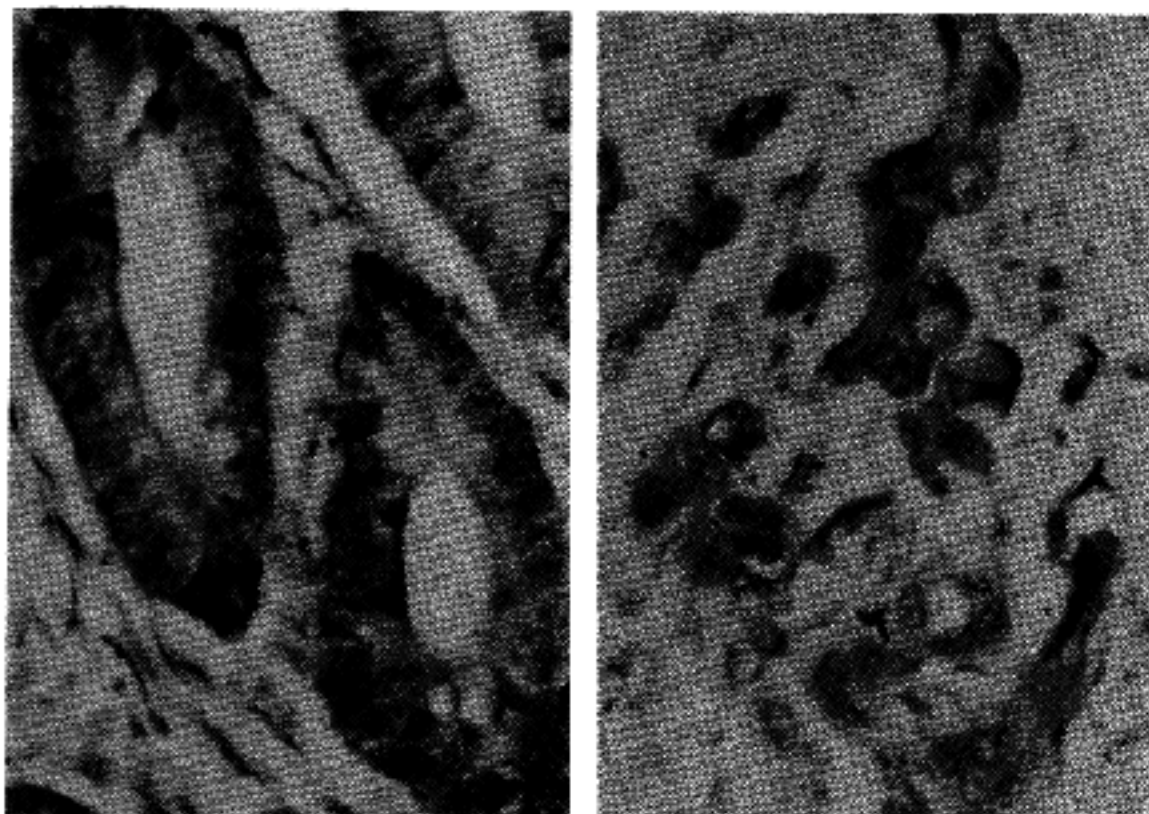


Fig. 2. Staining of colorectal adenocarcinoma with PCNA in well differentiated adenocarcinoma(left) and in poorly differentiated adenocarcinoma(right).

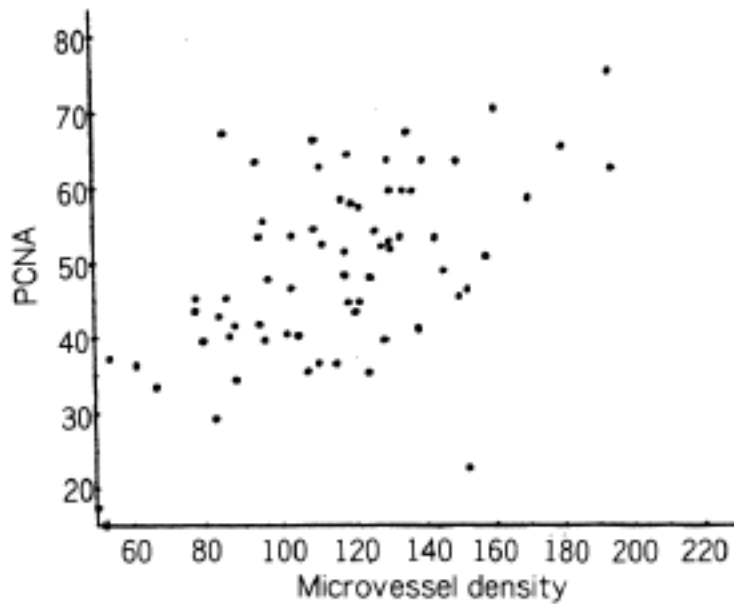


Fig. 3. Scatter diagram shows PCNA expression rate versus angiogenesis.

의 림프관 및 혈관내 침윤이 있는 경우는 $52.2 \pm 9.8\%$ 로 침윤이 없는 경우의 $45.4 \pm 10.8\%$ 에 비하여 높았고($p=0.033$), 특히 림프관과 혈관 내에 침윤되어 있는 종양세포에서 PCNA반응도가 높았다. 신경조직 침윤이 있는 경우 $54.0 \pm 9.5\%$ 로 없는 경우 $46.0 \pm 10.4\%$ 에 비해 높았다($p=0.026$). 암종의 성장 양상이 확장형인 경우 PCNA반응도는 $45.2 \pm 8.2\%$, 혼합형인 경우 $47.8 \pm 9.2\%$, 침윤형인 경우 $50.8 \pm 11.8\%$ 로 침윤형에서 좀더 높게 나타났으나 통계학적 의의는 없었다. 암종 주위의 림프구 침윤이 심한 경우 PCNA 반응도는 $41.8 \pm 6.9\%$ 로, 림프구 침윤이 중등도인 경우 $49.3 \pm 9.2\%$, 림프구 침윤이 없거나 미약한 경우 $50.3 \pm 12.3\%$ 에 비해 PCNA 반응도가 낮았고, Crohn 양 림프구 침윤이 중등도 이상인 경우 PCNA반응도는 $47.2 \pm 9.6\%$ 로, 없거나 미약한 경우의 $49.4 \pm 11.0\%$ 보다 더 낮게 나타났으나 통계학적 의의는 없었다. 종양 주변의 섬유화 정도가 미약한 경우 PCNA 반응도는 $42.1 \pm 8.6\%$, 중등도인 경우 $48.6 \pm 9.8\%$, 심한 경우가 $54.2 \pm 11.9\%$ 로 섬유화가 심할수록 높게 나타났다($p=0.015$). 수정된 Dukes 병기 A, B1, B2, C1, C2, D군에서 각각 PCNA 반응도는 $31 \pm 2.9\%$, $40.2 \pm 3.3\%$, $41.0 \pm 5.6\%$, $49.4 \pm 6.0\%$, $56.5 \pm 5.7\%$, $71.0 \pm 5.7\%$ 로 Duke 병기가 높을수록 PCNA 반응도가 높았고($p < 0.001$) 특히 B2와 C2 병기, C2와 D 병기 사이의 차이가 컸다(Table 1). TNM 분류에 따른 PCNA 반응도와 Jass의 new prognostic classification grouping에 따른 PCNA 반응도는 병기가 높아질수록 증가하였다($p < 0.001$). 추적 조사하여 재발이 확인된 9예의 경우 PCNA 반응도가 $59.9 \pm 7.9\%$ 로 그렇지 않은 경

우 $47.3 \pm 10.2\%$ 보다 높게 나타났다($p=0.002$). 그러나 환자의 연령, 부위, 선모양의 규칙성, 핵의 방향성, 종양 주위의 염증반응 정도, 점액분비 정도, 괴사 정도에 따른 유의한 차이는 없었다.

3. 신생혈관 형성과 PCNA 양성률의 비교

대장 및 직장 암종에서 미세혈관 수와 PCNA 양성률사이에는 통계학적으로 상관분석한 결과 상관계수가 0.33으로 상관관계가 있었다($p=0.007$)(Fig. 3).

고 찰

대장 및 직장 암종에서의 예후인자는 많은 저자들에게 의해 연구되어 그 임상적, 조직학적 예후인자들에 관해서는 이미 명확히 밝혀진 바이다. 그러나 병기 및 기타 중요한 예후인자가 같은 경우에도 예후가 현저히 나쁜 경우가 있어 최근에는 이러한 위험군을 알아내어 그 예후를 추정하고 또 적절한 치료 방법을 강구하기 위해서 종양의 다양한 생물학적 특성에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 즉 암유전자의 증폭이나 과발현, 종양 억제 유전자의 비활성화²⁷, DNA ploidy²⁸ 및 암세포의 증식능과 예후와의 상관성에 대해 다양한 연구가 시도되고 있다. 1971년 Folkman²⁹이 실험적 근거에 의해 종양 성장은 신생혈관 형성에 의존한다는 것을 발표한 이후 신생혈관 형성이 전이와 관계가 있음을 주장하였는데 신생혈관은 분절된 기저막을 가지고 있고 신생혈관의 내피세포가 단백질 분해효소를 분비하기 때문에 종양세포가 성숙 혈관보다 침입하기가 쉽기 때문이다⁸. 또 종양이 전이한 후에도 종양이 성장하기 위해서는 신생혈관 형성이 필수적인 것으로 알려져 있다. 인체에 발생한 종양에서 신생혈관 형성 정도로 전이 가능성을 예측할 수 있다고 하는 첫 정량적인 증거는 피부에 발생한 악성 흑색종에 대한 것이었다⁹⁻¹¹. 이 보고는 악성 흑색종에서 신생혈관 형성이 거의 없으면서 전이가 없는 시기와 신생혈관 형성이 증가되면서 전이가 증가되는 시기 사이에 분명한 경계선이 있다는 것이었다. 그러나 모든 종양에서 신생혈관 형성 정도와 생태학적 악성도가 비례하는 것은 아니다³⁰. 종양의 신생혈관 형성 정도가 전이와 관계있다고 밝혀진 종양은 흑색종 이외에 유방암, 전립선암, 두경부의 편평상피세포암종, 폐의 비소세포암종 정도이다⁹⁻²⁰. 침윤성 유방암과 같이 신생혈관 형성이 전이와 밀접한 관계가 있다고 밝혀진 종양에서는 국소 림프절 전이가 없는

환자에서 조기에 전이 가능성을 발견하고 보조적 화학요법의 사용 여부를 결정하는데 미세혈관 수의 측정이 유용할 것으로 기대되고 있고 또한 보조적 화학요법에서도 fumagillin과 같은 신생혈관 형성 억제물질을 사용하여 적은 부작용으로 효과적으로 종양 성장을 억제할 수 있다는 보고들이 있다³¹.

따라서 본 연구에서는 대장 및 직장 암종에서 임상 병기와 림프절 전이 유무 및 기타 예후와 관련된 조직학적 소견과 신생혈관 형성의 정도를 비교해서 그 의미를 알아보고 신생혈관 형성과 종양세포의 증식능을 비교함으로써 상관관계가 있는지 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

신생혈관 수를 측정하기 위해서는 파라핀 조직에서 맥관 형성 촉진물질들에 대한 면역조직화학적 염색이나 in situ hybridization으로 간접 측정하는 방법이 있고 factor VIII 관련 항원, Ulex uropaeus, CD31에 대해 면역조직화학적 염색을 시행하여 미세혈관 수를 정량적으로 측정하는 방법이 있다. 이 중 CD31이 가장 예민하여 같은 조직에서 factor VIII 관련 항원을 이용한 경우와 CD31을 이용한 경우 미세혈관 수에 상당한 차이가 있어 CD31로 검사한 경우에 미세혈관 수가 훨씬 많다¹³. 그러나 CD31은 섬유모세포와 일부 종양세포와도 경한 교차반응을 보이고 형질세포와 강한 교차반응을 보이기 때문에 종양 주변에 심한 염증 반응이나, 괴사 및 심한 섬유화가 있는 부위는 미세혈관 수를 측정할 때 피해야 한다. 종양에서 신생혈관을 형성하는 정도는 부위에 따라 달라서 모든 세포가 다 신생혈관을 형성할 수 있는 것이 아니다. 또 어떤 종양세포는 맥관형성 촉진물질을 조금 분비하고 어떤 종양세포는 많이 분비하는데 한 종류 이상의 물질을 분비하기도 하며¹⁰ 이런 종양세포들이 주위에 많은 신생혈관을 만들고 전이를 잘 하며 또 전이한 부위에서도 계속 성장할 가능성이 크다³². 따라서 종양 내에서 미세혈관을 측정할 때 신생혈관 형성이 가장 활발한 부위를 골라야 한다. 또한 이때 미세혈관 수를 측정하는 범위에 따라 미세혈관 수의 의미가 달라지는데 0.19 mm²(×400) 이하의 작은 범위에서 미세혈관 수를 측정하면 그 의미가 떨어진다. 따라서 0.74 mm²(×200) 범위 내의 미세혈관 수를 측정해서 이용하는 것이 보편적이다¹². 본 연구에서 미세혈관 수는 종양의 가장자리가 종양 내보다 더 많았고 종양 중심부에는 괴사가 흔히 관찰되었는데 이 소견은 여러 다른 연구에서도 이미 기술된 것으로 이 미세혈관들은 종양 주위의 기질이 풍부한 부위의 기존 혈관의 기저막이

파괴되고 혈관 내피세포의 세포외 기질의 이동 및 증식, 혈관 기저막의 재형성 등의 과정을 거쳐 만들어진 것으로 그 과정에서 종양에 끌려들어간 것으로 생각되며 종양의 중심부는 혈관이 적고 또 간질의 높은 압력으로 인해 작은 혈관들이 눌러서 흔히 괴사를 보인다고 한다¹⁴. 결과적으로 이 소견에 따르면 종양에서 가장 심한 신생혈관 형성을 보이는 부위는 종양 성장의 선도적인 부위로 종양세포 증식과 전이의 근간을 이룬다고 사료된다. 따라서 여러 연구자들이 신생혈관 형성 정도가 예후와 관계있다고 밝혀진 종양에서 신생혈관 형성 정도는 그 어떤 예후인자보다도 중요한 독립적 예후인자라고 하였다³³. Saclarides 등²²은 암과 신생혈관 형성과의 관계에 대한 연구에서 장벽을 통과한 직장암이나 직장암으로 5년 이내에 사망한 경우 그렇지 않은 경우보다 미세혈관 수가 유의하게 많았고 종양의 크기 및 전이가 있는 경우 미세혈관 수가 더 많은 경향이 있었으나 통계학적 의의는 없다고 하였다. 즉 미세혈관 수는 국소 림프절 전이나 원격 전이보다는 장벽에 침윤한 깊이와 더 관계된다고 하였다. 본 연구 결과 대장 및 직장 암종에서 미세혈관 수는 병기가 높을 수록 많았는데 수정된 Dukes 병기 B1과 B2병기에서의 차이는 의미없었고 B 병기와 C 병기에서 미세혈관 수의 차이가 의미있었는데 특히 B2 병기와 C2 병기의 차이가 컸다(Table 1). 또한 같은 C2 병기에서도 국소 림프절 전이가 4개 이하인 군과 5개 이상인 군 사이에 유의한 차이가 있었다(Table 2). 종양이 침윤성 성장 양상을 보이는 경우와 혈관 및 림프관 내 침윤이 있는 경우 및 신경조직 침윤이 있는 경우 미세혈관 수가 더 많은 경향이 있었으나 통계학적 의의는 없었다.

악성종양의 증식을 측정하는 종양의 생물학적 악성도를 판정하는 독립적인 지표로 이용되고 있다. 여기에는 여러 방법이 있으나 이 중 면역조직화학적 염색으로 세포증식능을 측정하는 방법으로 PCNA (proliferating cell nuclear antigen)은 파라핀 조직에서의 검색이 가능하고 임상 소견 및 조직 형태와 대응되는 세포증식능을 관찰하여 종양의 생물학적 특성과 비교할 수 있는 장점이 있다³⁴. PCNA는 핵의 DNA polymerase- δ 의 보조 단백질로서 정상적으로도 소량 존재하지만 암세포 내에서 다량 검출된다고 한다^{24,25}. 이는 PCNA가 핵내 DNA 합성에 보조인자로서의 정상적 기능 외에 비계획성 DNA 합성에도 관여하기 때문이다³⁵. 세포 성장 주기 중에 특별히 S기에 심한 변동이 일어나 실제 DNA 합성에

필요한 양보다 훨씬 더 많은 양의 PCNA가 S기의 핵에 나타나므로 다양한 악성 종양에서 높은 양성율을 나타내는 것으로 보고되고 있고 유사분열 수가 높거나 역형성이 심한 경우 양성율이 더욱 높아진다고 한다^{35,36}. 따라서 종양세포의 증식능이 증가할 경우 예후에 나쁜 영향을 미치는 것은 유방암이나 폐암 등에서 잘 밝혀진 사실이다. Bosari등¹⁴은 유방암에서 미세혈관 수가 종양의 크기, 증식 분획 및 ploidy 상태는 연관성이 없고 단지 종양 주위의 혈관침입과 상관관계가 있다고 하였다. 따라서 미세혈관 수, 종양의 혈관 침입 및 전이 사이에는 생물학적인 연관성이 있다고 하였다. Kaldjian등³⁷은 유방암에서 종양 내의 미세혈관 수와 PCNA 사이에 상관관계가 있다고 하였으나 Weidner¹⁵와 Horak등¹³은 종양 내 미세혈관 수와 Ki67 항원 발현을 사이에 상관관계가 없다고 하였다. Vartanian³⁸과 Fox등³⁹은 유방암에서 종양내의 미세혈관 수와 내피세포의 증식과는 서로 관계가 없고 또 이 두가지와 종양세포의 증식율 사이에도 아무 연관이 없다고 하고 이들은 각각 다른 기전에 의해 조절된다고 하였다.

그러나 대장 및 직장 암종에서 종양세포의 증식능과 예후와의 관계는 아직 명확하지 않은 상태이며 또 신생혈관 형성 정도와 종양세포 증식율 사이의 상관관계에 대한 연구는 매우 적다. 대장 및 직장 암종에서 PCNA 발현도와 여러 예후인자와의 관계는 저자에 따라 그 연구 결과가 상당한 차이가 있어서 Risio등⁴⁰은 PCNA 발현율이 림프절 전이나 기타 예후인자와 관계없다고 하였으나 Al-Sheneber등⁴¹은 PCNA는 다른 기존의 예후인자와 상관없이 독립된 예후인자로서 재발이나 생존 기간을 추정하는데 크게 도움이 된다고 하였고 Neoptolemos등⁴²은 Dukes 병기와는 상관성이 없지만 나이나 종양의 위치에 따라 예후와 관련이 있고 특히 림프절 전이가 없는 환자에서 예후인자로서 중요하다고 하였다. 본 연구에서는 PCNA 양성율이 기존의 예후인자인 Dukes 병기, Jass 분류나 TNM 분류와 의미있는 상관관계를 보여 종양세포의 증식능이 높을수록 전이를 잘 하는 것으로 생각되었다(Table 1, 2). 그 이외에 크기(10 cm 이상), 조직학적 분화가 낮을수록, 섬유화가 심할수록, 림프관 및 혈관 침윤, 신경조직 침윤이 있을 때 의미있게 더 높게 나타나서 이들 군에서 종양세포 증식이 좀 더 활발하고 예후가 불량한 것으로 생각되었다. 또한 종양 내 미세혈관 수와 PCNA 발현율 사이에 유의한 상관관계가 있었다(Fig. 3). 따라서 대장 및 직장 암종에서 미세혈관

수로 측정된 신생혈관 형성 정도와 PCNA 발현율로 측정된 종양세포 증식도는 재발이나 전이와 같이 불량한 예후와 관계된 생물학적인 지표로 예후를 추정하고 종양의 외과적 절제 후 시행되는 보강 화학요법을 예방적으로 적용할 대상을 선택하는데 좋은 지침이 될 것으로 사료된다.

결 론

대장 및 직장 암종에서 신생혈관 형성 정도가 예후인자로서 가치가 있는지 살펴보고자 66예의 대장 및 직장 암종을 대상으로 면역조직화학적 방법으로 CD31 항원을 이용하여 미세혈관 수를 측정하여 PCNA 발현율로 측정된 암세포의 증식능과 기존의 예후인자인 종양의 크기, 림프절 전이 유무 및 여러 조직학적 예후인자와의 상관관계를 분석하여 다음과 같은 성적을 얻었다.

1) 대장 및 직장 암종에서 림프절 전이군과 임상 병기가 높을 수록 신생혈관 형성이 많았다.

2) 림프절 전이군에서 전이된 림프절이 4개 이하인 군과 5개 이상인 군 사이에는 신생혈관 형성에 유의한 차이가 있었다.

3) 침윤성 성장 양상을 보이는 경우와 혈관 및 림프관 내 침윤이 있는 경우 및 신경조직 침윤이 있는 경우 신생혈관 형성이 더 많은 경향이 있었으나 통계학적 의의는 없었다.

4) 대장 및 직장 암종에서 신생혈관 형성과 종양 세포 증식능은 상관관계가 있었다.

이상과 같은 결과로 대장 및 직장 암종에서 신생혈관의 형성 정도는 종양의 성장과 전이에 중요한 역할을 하며 예후를 추정하고 특히 치료 방침을 결정하는데 도움이 될 것으로 생각된다. 또한 PCNA 발현율은 기존의 다른 예후인자와 독립적인 요소로 생각된다. 그러나 본 연구에서 미세혈관 수와 PCNA 발현율을 치료의 방법이나 생존율과 비교할 수 없었으므로 이에 대해서는 더 연구가 되어야 할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 4-6.
2. Folkman J, Shing Y. Minireview, Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992; 267: 10931-4

3. Gimbrone MA, Cotran RS, Leapman SB, Folkman J. Tumor growth neovascularization: An experimental model using rabbit cornea. *J Natl Cancer Inst* 1974; 52: 413-27
4. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987; 235: 442-7
5. Burger MM, Folkman J. Tumor Angiogenesis. *Int J Cancer* 1994; 56: 311-3
6. Bond MD, Vallee BL. Replacement of residues of 8-22 of angiogenin with 7-21 of RNASE-A selectively affects protein-synthesis inhibition and angiogenesis. *Biochemistry* 1990; 29: 3341-9
7. Rastinejad F, Polverini P, Bouck NP. Regulation of the activity of a new inhibitor of angiogenesis by a cancer suppressor gene. *Cell* 1989; 56: 345-55
8. Nagy JA, Brown LF, Senger DR, et al. Pathogenesis of tumor stroma generation: A critical role for leaky blood vessels and fibrin deposition. *Biochem Biophys Acta* 1989; 948: 305-26
9. Srivastava A, Laidler P, Davies RP, Horgan K, Hughes LE. The prognostic significance of tumor vascularity in intermediate-thickness(0.76~4.0 mm thick) skin melanoma: A quantitative histologic study. *Am J Pathol* 1988; 133: 419-23
10. Herlyn M, Clark WH, Rodeck U, Mancianti ML, Jambrosic J, Koprowski H. Biology of tumor progression in human melanocytes. *Lab Invest* 1987; 56: 461-74
11. Srivastava A, Laidler P, Hughes LE, Woodcock J, Shedden EJ. Neovascularization in human cutaneous melanoma: a quantitative morphological and Doppler ultrasound study. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1986; 22: 1205-9.
12. 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
13. Horak ER, Leek R, Klenk N, et al. Angiogenesis assessed by platelet/endothelial adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet* 1992; 340: 1120-4
14. Bosari S, Lee AKC, DeLellis RA, Wiley BD, Heatley GJ, Silverman ML. Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma. *Hum Pathol* 1992; 23: 755-61
15. Weider 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. Macchiarini P, Fontanini G, Hardin MJ, Squartini F, Angeletti CA. Relation of neovascularization to metastasis of non-small cell lung cancer. *Lancet* 1992; 340: 145-6
17. Weider 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
18. Wakui S, Furusato M, Itoh T, et al. Tumor angiogenesis in prostatic carcinoma with and without bone marrow metastasis: A morphometric study. *J Pathol* 1992; 168: 257-62
19. Williams JK, Carlson GW, Cohen C, Derosé PB, Hunter S, Jurkiewicz MJ. Tumor angiogenesis as a prognostic factor in oral cavity tumors. *Am J Surg* 1994; 168: 373-80
20. Albo D, Granick MS, Jhala N, Atkinson B, Solomon MP. The relationship of angiogenesis to biological activity in human squamous cell carcinoma of the head and neck. *Ann Plast Surg* 1994; 32: 588-94
21. Wiggers T, Arends JW, Schutte B, Volovics L, Bosman FT. A multivariate analysis of pathologic prognostic indicators in large bowel cancer. *Cancer* 1988; 61: 386-95
22. Saclarides TJ, Speziale NJ, Drab E, Szeluga DJ, Rubin DB. Tumor angiogenesis and rectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 1994; 37: 921-6
23. 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: 752-57
24. Prelich G, Tan CK, Kostura M, et al. Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and DNA polymerase- δ auxiliary protein. *Nature* 1987; 326: 517-20
25. Bravo R, Frank R, Blundell PA, MacDonald-Bravo H. Cyclin-PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase. *Nature* 1987; 326: 515-7
26. Hall PA, Levison DA, Woods AL, et al. Rapid communication: proliferating cell nuclear antigen(PCNA) immunolocalization in paraffin sections: An index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol* 1990; 162: 285-94
27. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-67
28. Bauer KD, Lincoln ST, Vera-roman JM, et al. Prognostic implications of proliferative activity and DNA aneuploidy in colonic adenocarcinomas. *Lab Invest* 1987; 57: 329-35
29. Folkman J. Tumor angiogenesis: Therapeutic implications.

- N Engl J Med 1971; 285: 1182-6
30. Gould VE, Linnoila LI, Memoli VA et al. Neuroendocrine components of the bronchopulmonary tract: Hyperplasia, dysplasia, and neoplasm. *Lab Invest* 1983; 49: 519-37
 31. Ingber D, Fujita T, Kishimoto S, Katsuichi S, Kanamaru J, Brem H, Folkman J. Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumor growth. *Nature* 1990; 348: 555-7
 32. Weidner N. Tumor angiogenesis: Review of current applications in tumor prognostication. *Sem Diagn Pathol* 1993; 10: 302-13
 33. Toi M, Kashitani J, Tominaga T. Tumor angiogenesis is a powerful prognostic indicator of primary breast carcinoma. *Int J Cancer* 1993; 55: 371-4
 34. Hall PA, Woods AL. Immunohistochemical markers of cell proliferation: Achievements, problems and prospects. *Cell Tiss Kinet* 1990; 23: 505-22
 35. Toschi L, Bravo R. Changes in cyclin PCNA distribution during DNA repair synthesis. *J Cell Biol* 1988; 107: 1623-8
 36. Morris GF, Mathews MB. Regulation of proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle. *J Cell Biol* 1989; 264: 13856-64
 37. Kaldjian E, Jin L, Lloyd R. Immunohistochemical analysis of breast carcinomas: Correlation of estrogen and progesterone receptors, proliferative activity, tumor vascularity and lymph node metastasis. *Mod Pathol* 1992; 5: 14A(#74)
 38. 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: 1188-94
 39. Fox SB, Gatter KC, Bicknell R, et al. Relationship of endothelial cell proliferation to tumor vascularity in human breast cancer. *Cancer Res* 1993; 53: 4161-3
 40. Risio M, Rossini FP. Cell proliferation in colorectal adenomas containing invasive carcinoma. *Anticancer Res* 1993; 13: 43-7
 41. Al-Sheneber IF, Shibata HR, Sampalis J, Jothy S. Prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen expression in colorectal cancer. *Cancer* 1993; 71: 1954-9
 42. Neoptolemos JP, Oates GD, Newbold KM, Robson AM, MaConkey C, Powell J. Cyclin/proliferating cell nuclear antigen immunohistochemistry does not improve the prognostic power of Dukes' or Jass' classifications for colorectal cancer. *Br J Surg* 1995; 82: 184-7
-