

## 간세포암종에서 Thrombospondin-1 및 -2의 발현: 종양 혈관신생 및 p53 과발현과의 연관성

정재신 · 박호성 · 손현진 · 강명재  
문우성

전북대학교 의과대학 병리학교실

접 수 : 2004년 9월 8일  
게재승인 : 2005년 5월 4일

책임저자 : 문 우 성  
우 561-180 전북 전주시 덕진구 금암동  
산 2-20  
전북대학교 의과대학 병리학교실  
전화: 063-270-3071  
Fax: 063-270-3135  
E-mail: mws@chonbuk.ac.kr

\*본 연구는 계남 김재정 연구기금에 의하여 이루어졌음.

### Thrombospondin-1 and -2 Expressions in Hepatocellular Carcinomas: an Association with Tumor Angiogenesis and p53 Overexpression

Jae Sin Chung, Ho Sung Park, Hyun Jin Son, Myoung Jae Kang and  
Woo Sung Moon

Department of Pathology and Institute for Medical Sciences, Chonbuk National University  
Medical School, Jeonju, Korea

**Background :** It has been suggested that thrombospondin (TSP) is a p53-dependent negative regulator of tumor angiogenesis. TSP expression and localization in hepatocellular carcinomas (HCCs) and its association with overexpression of p53 protein were investigated. **Methods :** TSP-1 and -2 expressions were examined in 40 HCC specimens by immunohistochemical staining and in 4 HCC cell lines by Western blotting. In addition, p53 protein expression and microvessel density (MVD) were correlated with the TSP expression. **Results :** Strong immunopositivity for TSP-1 was observed in fibroblasts, vascular endothelial cells, and some vascular smooth muscle cells of the stroma in 18 cases (45%), and in tumor cells in 3 cases (7.5%) of 40 cases of HCC. Immunoreactivity for TSP-2 was observed in only the sinusoidal lining cells of the tumor in 15 cases (46%), and in tumor cells in 2 cases (6%) of 32 cases of HCC. TSP-1 expression was inversely correlated with MVD ( $p=0.028$ ), but TSP-2 expression did not show any correlation with MVD. Although p53 was overexpressed in 17 cases, there was no significant correlation between TSP and p53 expressions. None of the HCC cell lines expressed TSP-1 or -2. **Conclusions :** These findings indicate that TSP-1 is mainly derived from non-parenchymal cells, and may decrease tumor angiogenesis in HCC.

**Key Words :** Thrombospondins; Carcinoma, hepatocellular; Angiogenesis inhibitors; Protein, p53

혈관신생(angiogenesis)은 상처의 치유나 종양의 성장 과정에서 영양분과 산소를 공급하고 노폐물을 제거하기 위한 필수적인 과정이다.<sup>1</sup> 특히 악성 종양의 혈관신생은 종양 세포의 성장과 전이를 결정짓는 중요한 요소이며, 많은 종류의 악성 종양에서 혈관신생의 정도가 종양의 진행 및 전이와 관계가 있다고 알려져 있다.<sup>1,2</sup> 간세포암종은 국내에서 가장 많이 발생하는 악성 종양 중 하나로 많은 혈관을 형성하는 대표적인 종양이다. 혈관신생의 정도는 종양 내 혈관형성 촉진인자와 혈관형성 억제인자 간의 균형에 의해 결정된다.

현재까지 20가지 이상의 혈관형성 촉진인자가 알려져 있는데, 그 중 혈관내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)는 많은 종류의 종양세포에서 분비되며, 가장 강력한 혈관형성 촉진인자로 알려져 있다.<sup>3</sup> VEGF는 혈관투과인

자(vascular permeability factor)로도 알려져 있으며, 그의 수용체인 VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk-1/KDR)와 결합하여 내피세포 증식을 유발하고 혈관 투과성을 증가시켜, 종양의 성장과 전이에 관여하는 것으로 알려져 있다.<sup>3</sup> 혈관 내피세포 증식을 억제하여 종양 내 혈관신생과 종양의 성장 및 전이를 억제하는 인자로 angiostatin,<sup>4</sup> endostatin,<sup>5</sup> Thrombospondin-1 (TSP-1),<sup>6</sup> TSP-2<sup>7</sup> 등이 알려져 있다.

Thrombospondin (TSP)은 고분자량의 여러 기능을 가진 당단백으로 세포와 바탕질사이의 상호작용을 조절한다. TSP 아형 중에서 TSP-1과 TSP-2는 분자구조학적으로 유사하여 혈관신생에 관여할 것으로 생각되며,<sup>6,7</sup> TSP-1은 종양의 침습과 진행을 조절하거나 억제한다.<sup>8,9</sup> 또한, 최근 연구에서 TSP-1의 발현이 종양의 혈관신생을 억제하는 효과가 있거나,<sup>9-11</sup> 방광암과 대

장암에서 환자의 좋은 예후와 연관이 있는 것으로 보고되었다.<sup>11,12</sup> 그러나 TSP-1의 발현이 대장암,<sup>13</sup> 유방암<sup>14</sup> 및 위암<sup>15</sup>에서 혈관신생을 촉진하거나 종양의 침습 또는 전이를 촉진한다는 상반된 보고도 있다. 더욱이 TSP-1을 발현하는 세포에 대해서도 일부 연구는 TSP-1이 종양세포에서 발현된다고 보고하였고,<sup>15,16</sup> 다른 연구에서는 종양의 기질에서 발현된다고 보고하여<sup>12,14</sup> 여전히 논란의 대상이 되고 있다.

TSP-2는 420 kDa의 동중삼합체(homotrimeric) 당단백으로 세포와 세포, 세포와 바탕질 사이의 상호 조절에 중요한 역할을 하며, 섬유모세포 성장인자(fibroblast growth factor)의 혈관형성 효과를 억제한다고 한다.<sup>7</sup> 그러나 종양의 성장과 혈관신생과 관련한 TSP-2의 역할은 잘 알려져 있지 않다. 섬유모세포에서 종양억제 유전자인 p53은 TSP-1의 합성을 조절함으로써 혈관신생을 저해한다고 보고되었고,<sup>10</sup> 방광암에서 TSP-1의 발현과 p53의 돌연변이 및 혈관신생의 연관성에 관한 보고가 있다.<sup>11</sup> 간세포암종에서 TSP-1의 발현과 VEGF의 발현 및 혈관신생의 관계를 조사한 연구는 있지만,<sup>17</sup> TSP의 발현과 p53의 돌연변이 및 혈관신생의 관계를 조사한 연구는 찾아볼 수 없다.

저자들은 과거 간세포암종 조직을 이용한 연구에서 혈관형성 촉진인자인 VEGF와 angiopoietin-2의 발현이 혈관신생의 증가와 연관이 있으며,<sup>18</sup> 혈관형성 억제인자인 angiostatin과 바탕질 금속단백분해효소 12 (matrix metalloproteinase, MMP-12)의 발현이 혈관신생의 감소와 관련이 있음을 보고하였다.<sup>19</sup> 본 연구에서는 절제된 간세포암종 조직을 이용하여 종양 혈관신생의 억제제로 생각되는 TSP-1과 TSP-2의 발현과 혈관신생의 관계를 조사하고자 하였다. TSP-1의 발현이 종양억제 유전자인 p53에 의하여 조절되므로 이들의 발현과 p53의 돌연변이의 관계를 조사하였다. 또한 간세포암종 세포에서 TSP의 발현 유무를 확인하기 위해 간세포암종 세포주인 HepG2, HLE, HLF 및 Huh-7에서 TSP-1과 TSP-2단백질의 발현을 웨스턴블롯을 이용하여 측정하였다.

## 재료와 방법

### 대상

1990년 1월부터 1999년 12월까지 전북의과대학교병원에서 간세포암종 진단을 받은 환자 중 수술 전에 다른 치료를 받지않은 40명에게서 적출한 간세포암종 조직을 대상으로 하였다. 환자의 평균연령은 54세(29-76세), 남녀 수는 각각 31명과 9명이었다. 혈액 검사 결과 HBV 항원과 HCV 항체에 29명과 4명이 각각 양성 반응을 보였다. 간세포암종 세포주인 HLE, HLF, HuH-7은 Health Science Research Resources Bank (Osaka, Japan)에서 구입하였고 HepG2는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. HepG2, HLE 및 HuH-7 세포주는 비 활성화한 10% 소 태아혈청(fetal

bovine serum)을 포함하는 Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM; Cellgro, Herndon, VA, USA)에, HLF 세포주는 5% 소태아혈청을 포함하는 DMEM에 5% CO<sub>2</sub>, 37°C의 조건에서 배양하였다.

### 방법

#### 면역조직화학 염색

간세포암종에서 종양조직과 인접한 비종양 간 조직을 포함한 파라핀 블록을 선정하여, 4 μm 두께로 자르고, 유리 슬라이드에 부착한 후 크실렌과 알코올로 탈파라핀 과정과 함수 과정을 거쳤다. 항원성 회복을 위해 10 mM 구연산 완충액(pH 6.0)에 담가 10분간 극초단파 처리 후 실온에서 냉각시키고 인산염 완충액(DAKO, Carpinteria, CA, USA)으로 세척하였다. 간세포에 존재하는 내인성 비오틴에 의한 비특이 반응을 방지하기 위해 중합체를 이용한 Envision system (DAKO, Carpinteria, CA, USA)으로 면역조직화학 염색을 시행하였다. 과산화수소수로 내인성 과산화효소를 소비시킨 후, Serum free Protein Block (DAKO, Carpinteria, CA, USA)으로 10분간 처리하였다.

그런 다음 일차 항체로 TSP-1 단클론 항체(HB8482, Neomarkers, Fremont, CA, USA, 1:100)와 TSP-2 다클론 항체(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, 1:100)를 4°C에서 16시간 반응시켰고, p53 단클론 항체(DO-7, DAKO, Carpinteria, CA, USA, 1:50)와 CD34 단클론 항체(QBEnd 10, DAKO, Carpinteria, CA, USA, 1:50)는 실온에서 2시간 반응시켰다. 인산염 완충액으로 씻은 후, 중합체와 과산화효소가 부착되어 있는 이차 항체에 37°C에서 30분간 반응시켰다. 3-amino-9-ethyl-carbazole (AEC)로 발색 후 Mayer's hematoxylin으로 대조 염색하였다.

#### 면역조직화학 염색의 판정과 종양미세혈관의 정량

종양세포내의 염색의 강도를 세 등급(1: 약양성, 2: 양성, 3: 강양성)으로 하고 전체 종양세포 중 양성반응을 보이는 종양세포의 비율을 10-30%, 30-70%, 70% 이상으로 나누어 각각 1, 2, 3점을 매겼다.<sup>20</sup> 염색의 강도와 범위의 점수를 곱한 후 그 수치가 3 이상인 경우를 TSP-1과 TSP-2 항체에 대하여 간암세포 양성으로 판독하였다. TSP-1과 TSP-2는 종양세포보다는 종양 주변의 버팀질 조직 또는 버팀질 세포에 양성 소견을 더 많이 보여, 10% 이상의 간질조직 또는 간질세포에 발현된 경우도 양성으로 간주하였다. p53 단백질은 10% 이상의 종양세포 핵에 강하게 염색된 경우를 양성으로 판정하였다. 간세포암종 조직에서 미세혈관이 형성된 정도는 영상분석기(Soft Imaging System, GmbH)를 이용하여 정량하였다. 한 종양 내에서도 종양 미세혈관의 분포가 다양하여 광학현미경 40배율에서 미세혈관 밀도가 가장 높은 부위를 찾은 후, 200배율에서 4구역을 측정하였다. 미세혈관 밀도는 검사한 총 종양의 면적에 대해 CD34 항체에 양

성을 보인 혈관 내피세포의 백분율로 표시 하였다.<sup>18</sup>

#### 웨스턴블롯 분석

간세포암종 세포주인 HepG2, HLE, HLF 및 Huh-7에서 TSP-1과 TSP-2 단백질의 발현을 확인하고자 웨스턴블롯을 이용하여 측정하였다. 배양접시에 키운 간세포암종 세포를 50 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.5% Nonidet p-40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 2  $\mu$ g/mL leupeptin, 2  $\mu$ g/mL aprotinin, 5 mM sodium fluoride 및 1 mM sodium orthovanadate을 함유한 완충액에 녹인 후, 30분 동안 얼음으로 냉각시키고 14,000 g로 10분 동안 원심 분리한 후 상청액을 분리하여 사용하였다. 정량은 bicinchoninic acid protein assay kit (Pierce Chemical, Rockford, IL, USA)을 이용하였으며, 150  $\mu$ g의 단백을 10% SDS-polyacrylamide 겔에 전기영동한 후 니트로셀룰로오스막에 이동시켰다. 전기이동된 막을 차단우유로 1시간 반응시킨 후, 면역 염색에 사용하였던 항체와 동일한 TSP-1 및 TSP-2 항체를 실온에서 1시간 반응시켰다. 0.1% Tween 20을 함유한 Tris 완충액에 15분 간격으로 세 번 세척한 후 각각 1차 항체에 대한 2차 항체에 실온에서 1시간 반응시키고, 화학발광제(Amersham Life Science, Arlington Heights, IL, USA)를 이용하여 검출하였다. Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC)에서 추출한 단백질을 양성 대조군으로 사용하였다.

#### 통계학적 처리

미세혈관 밀도는 평균±표준오차로 표시하였다. 각 단백질의 발현 유무에 따른 종양 내 미세혈관 밀도의 차이를 분석하는 데

는 Mann-Whitney rank sum 검사를 이용하였고, 이들 단백질 발현과 p53 과발현의 상관관계를 분석하는 데는 카이제곱검정( $\chi^2$  test)을 이용하였다. TSP-1과 TSP-2의 발현과 종양의 크기 사이의 관계를 분석하는 데는 student's t-test를 이용하였다. TSP-1과 TSP-2의 발현 사이의 연관성은 카이제곱검정을 이용하여 조사하였고, TSP-1과 TSP-2의 발현이 모두 나타난 간세포암종의 경우 미세혈관 밀도와와의 관련성은 ANOVA test를 이용하여 조사하였다. p 값이 0.05 미만인 경우 통계학적으로 유의하다고 판정하였다.

## 결 과

### TSP-1, TSP-2, p53 및 CD34에 대한 면역조직화학 염색의 발현

TSP-1은 40예의 간세포암종 중 18예(45%)에서 종양 주변과 종양 내의 버팀질조직, 즉 종양내부를 가로지르는 사이막과 종양을 둘러싸고 있는 섬유성 막의 간질조직에서 강하게 발현되었다. 버팀질조직 내에서 TSP-1을 발현하는 세포 성분은 주로 섬유모세포, 혈관의 내피세포 및 민무늬근육세포였다(Fig. 1A-D). 간암세포 내에서 TSP-1이 발현된 예는 단 3예에 불과하였다(Fig. 1E). 간암세포에서 음성 반응을 보인 예는 대부분 염색이 약하거나 국소적인 TSP-1 발현을 보인 예들이었다(염색 점수: <3). 간세포암종 주변 간경변의 섬유성 피막의 버팀질에서도 TSP-1은 양성소견을 보였고, 2예에서는 간경변의 재생결절 내 간세포에서 양성 소견을 보였다.

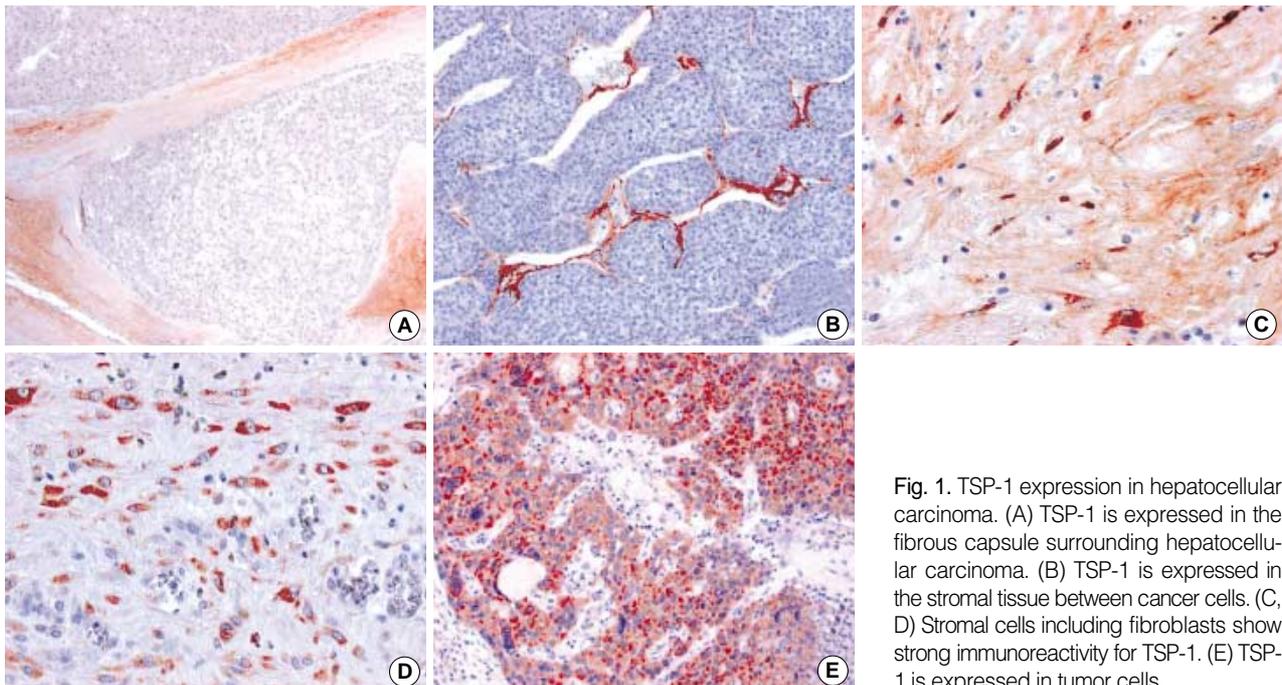


Fig. 1. TSP-1 expression in hepatocellular carcinoma. (A) TSP-1 is expressed in the fibrous capsule surrounding hepatocellular carcinoma. (B) TSP-1 is expressed in the stromal tissue between cancer cells. (C, D) Stromal cells including fibroblasts show strong immunoreactivity for TSP-1. (E) TSP-1 is expressed in tumor cells.

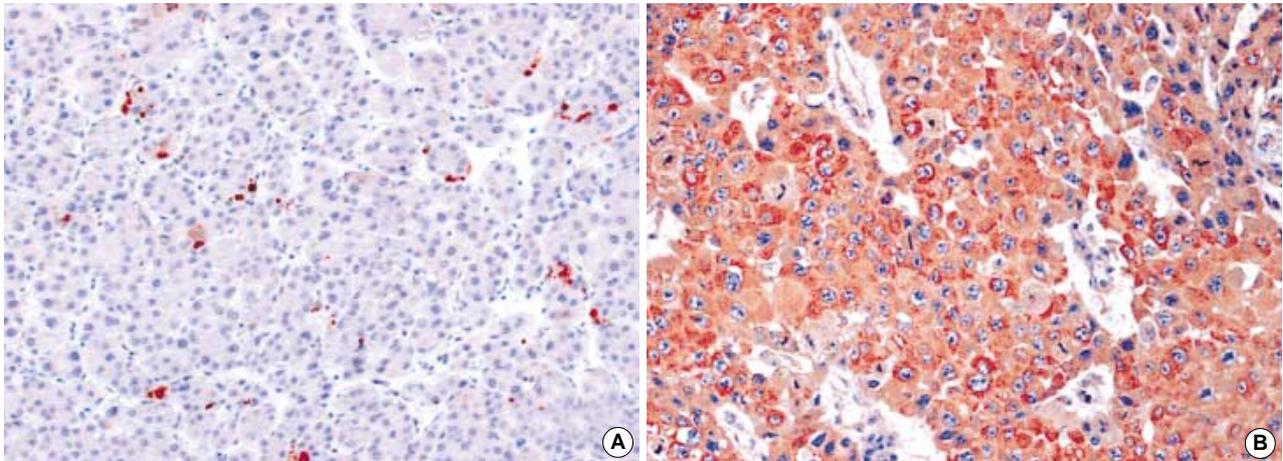


Fig. 2. TSP-2 expression in hepatocellular carcinoma. (A) Sinusoid lining cells show immunoreactivity for TSP-2. (B) TSP-2 is expressed in tumor cells.

Table 1. Correlation between microvessel density and the expressions of thrombospondins and p53 protein

	Number of patient	MVD (mean $\pm$ SE)	p value
Thrombospondin-1			
Positive	18 (45%)	3.46 $\pm$ 0.36	0.028
Negative	22 (55%)	5.26 $\pm$ 0.41	
Thrombospondin-2			
Positive	15 (46%)	3.85 $\pm$ 0.33	0.546
Negative	17 (54%)	4.55 $\pm$ 0.60	
p53			
Positive	17 (42%)	4.32 $\pm$ 0.50	0.764
Negative	23 (58%)	4.55 $\pm$ 0.54	

MVD, microvessel density; SE, standard error.

\*Mann-Whitney rank sum test.

TSP-2 항체에 대해 면역조직화학 염색을 시행한 32예 중 15예(47%)에서 굴모양혈관을 피복하는 세포의 일부에서 양성 소견을 보였다(Fig. 2A). 종양세포에서 TSP-2가 발현된 예는 2예(Fig. 2B)였으며, 종양 주변 간경변의 재생결절 내 간세포에서도 2예가 발현되었다. 간암세포에서 TSP-1 또는 TSP-2가 양성인 예들은 각각 버팀질과 굴모양혈관을 피복하는 세포에서도 양성이었다. TSP-2를 발현하는 굴모양혈관을 피복하는 세포 중 일부는 항민무늬근육 액틴 항체에 양성반응을 보이는 활성화된 별세포였다.

CD34는 종양의 굴모양혈관 내피세포에서는 발현되었으나 정상 간 조직의 굴모양혈관 내피세포에는 발현되지 않거나, 간경변 결절에서는 결절 주변부의 굴모양혈관 내피세포에서 국소적으로 양성반응을 보였다. 간세포암종 조직에서의 미세혈관 밀도는 1.16-10.64% (4.45  $\pm$  0.4%)의 분포를 보여 주었다.

p53 유전자의 돌연변이는 p53 단백질의 반감기를 연장하므로 핵에 양성반응을 보이는 경우 p53 유전자의 돌연변이 또는 p53 단백질의 과발현을 의미한다. p53 단백질 항체에 대한 면역조직화학 염색에서 40예 중 17예(43%)에서 양성이었다고 모든 예에서

Table 2. Correlation between microvessel density and the expressions of thrombospondins and p53 protein

	p53 positive (n)	p53 negative (n)	Total number of patients
Thrombospondin-1			
Positive (n)	7	11	18
Negative (n)	10	12	22
Total number of patients	17	23	40
n: number of patients. p=0.676 (chi-square test).			
	p53 positive (n)	p53 negative (n)	Total number of patient
Thrombospondin-2			
Positive (n)	8	7	15
Negative (n)	5	12	17
Total number of patient	13	19	32

n: number of patients. p=0.169 ( $\chi^2$  test).

핵에 염색되었다.

네 개의 각각 다른 간암세포주를 이용한 웨스턴블롯 분석에서 양성대조군으로 사용한 HUVEC에서만 TSP-1과 TSP-2의 발현이 확인되었고, 간암세포주에서는 TSP-1과 TSP-2가 관찰되지 않았다.

TSP-1에 양성인 종양의 미세혈관 밀도(3.46  $\pm$  0.36)는 음성인 종양의 미세혈관 밀도(5.26  $\pm$  0.41)에 비하여 통계학적으로 유의하게 낮았다(p=0.028). TSP-2에 양성인 종양의 미세혈관 밀도(3.85  $\pm$  0.33)는 음성인 종양의 미세혈관 밀도(4.55  $\pm$  0.60)와 통계학적으로 유의한 차이가 없었다(Table 1). TSP-1 또는 TSP-2의 발현과 p53의 과발현 사이에 통계학적으로 유의한 연관성은 관찰되지 않았으며(Table 2), p53 단백질의 과발현과 혈관신생의 정도 사이에서도 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 1). TSP-1에 양성인 종양(3.67  $\pm$  0.43 cm)은 음성인 종양(4.56  $\pm$  0.51 cm)에 비해 크기가 작은 경향이 있었으나 통계학적으로

**Table 3.** Correlation between Thrombospondin-1 and Thrombospondin-2 expressions

	Thrombospondin-2 positive (n)	Thrombospondin-2 negative (n)	Total number of patient
Thrombospondin-1 Positive (n)	7	8	15
Negative (n)	8	9	17
Total number of patient	15	17	32

n: number of patients.  $p=0.982$  ( $\chi^2$  test).

유의한 차이는 없었다( $p=0.20$ ). TSP-1과 TSP-2의 발현 간에는 유의한 연관성이 없었고(Table 3), TSP-1과 TSP-2의 발현이 모두 나타난 간세포암종의 경우 미세혈관 밀도와 유의한 연관성이 없었다.

## 고 찰

TSP-1은 혈소판의 알파 과립에서 발견된 450 kDa의 고분자량의 당단백질로, 혈소판뿐 아니라 혈관내피세포, 섬유모세포, 민무늬근육세포, 큰 포식세포와 단핵세포 및 종양세포에서도 유리되는 것으로 보고되었다.<sup>6,8,9</sup> TSP-2는 420 kDa 크기의 당단백으로 세포와 세포 사이, 세포와 바탕질 사이의 생물학적 상호 조절 작용에 관여한다고 알려져 있으나, 종양에서 신생혈관이 형성되는 데 어떠한 역할을 하는지에 대해서는 연구가 부족하다.<sup>7</sup>

본 연구에서는 여러 종류의 암종에서 혈관형성 억제인자로 알려진 TSP-1과 혈관형성 억제 효과가 있으리라 추정되는 TSP-2가 간세포암종 조직에서는 어떻게 발현되는지 조사하고 종양의 미세혈관 밀도와 종양의 크기 사이의 상관관계를 알아보고자 하였다. 또한 TSP의 발현이 p53 단백질의 과발현과 연관이 있는지를 조사하였다.

본 연구 결과 TSP-1의 발현은 간세포암종에서 혈관신생을 억제하나, TSP-2의 발현과 p53 단백질의 과발현은 혈관신생에 별 영향을 주지 못하는 것으로 나타났다. 또한 p53 유전자의 돌연변이로 생각되는 p53 단백질의 과발현과 TSP 발현은 유의한 상관관계가 없었다. 본 연구 결과는 TSP-1의 발현이 방광암,<sup>11</sup> 대장암<sup>12</sup> 및 갑상선암<sup>6</sup>에서 미세혈관 밀도의 감소와 관련이 있다는 보고들과 부합된다. 그러나 TSP-1의 발현이 폐암,<sup>21</sup> 난소암,<sup>22</sup> 전립선암<sup>23</sup> 등 다른 종류의 암종에서 혈관신생과 관련이 없거나, 오히려 혈관신생을 증가시킨다는 보고도 찾을 수 있다.<sup>15</sup>

간세포암종 조직에서 TSP-1의 발현을 조사한 연구로는 TSP-1의 발현이 VEGF 발현과 연관되어 혈관신생에 관여한다는 보고,<sup>17</sup> 담관암종에서 간세포암종에 비해 TSP-1 발현이 유의하게 증가되며 이는 담관암종의 낮은 혈관신생과 관련 있다는 보고<sup>24</sup> 그리고 간세포암종 조직에서 TSP-1과 신생혈관의 관련성을 조사하지는 않았으나 간세포암종 조직 내에서 TSP-1을

발현하는 세포를 조사한 Hayashi 등<sup>25</sup>의 논문이 있다. TSP-1의 발현과 종양의 혈관신생의 관계에 대해 상반된 연구 결과가 나오는 이유는 확실하지 않다. 이는 종양의 혈관신생과 성장에서 TSP-1이 하는 역할이 다른 혈관신생 조절인자와의 균형 및 TSP-1의 발현 정도에 따라 결정되는 복잡한 과정에서 기인하는 것으로 생각된다. 다른 이유로는 연구에 사용된 암종의 종류에 기인하는 것으로 보이며, 더욱 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

TSP-1을 발현하는 세포에 대해서는 종양세포에서 발현된다는 보고들<sup>15,16,25</sup>과 종양 주변의 버팀질과 버팀질세포에서만 발현된다는 보고들<sup>12,14,22,23</sup>로 논란이 많다. 특히 Poon 등<sup>17</sup>은 간세포암종에서 TSP-1의 발현이 종양세포에서 51.7%, 버팀질세포에서 65%가 나타났으며 인접한 비종양성 조직에서는 버팀질세포에서 28.3%가 발현되었으나 간세포에서는 발현되지 않는다고 보고하였다.

본 연구에서 TSP-1은 종양을 둘러싸는 섬유성 피막 또는 종양 내 사이막에 존재하는 버팀질조직과 섬유모세포, 혈관내피세포와 일부의 민무늬근육세포 등의 버팀질세포에서 대부분 발현되었다. 이러한 결과는 과거 TSP-1이 버팀질조직에서 주로 발현된다는 보고들<sup>12,14,22,23</sup>과 일치한다. TSP-1이 종양 주변의 섬유모세포와 혈관내피세포에서 강하게 발현된 저자들의 결과는 Hayashi 등<sup>25</sup>의 보고와 같다.

그렇지만 60예 중 31예에서 간암세포에서도 TSP-1이 발현된 그들의 결과와는 달리, 종양세포에서 강하고 미만성으로 발현된 예는 3예에 불과하였다. 이러한 차이는 염색방법과 염색 결과의 판정 기준에 의한 것으로 생각된다. 간세포는 내인성 바이오틴이 매우 풍부한 세포로, 본 연구에서는 내인성 바이오틴에 의한 비특이 반응을 방지하기 위해 중합체(polymer)를 이용한 면역염색방법을 시행하였다. 그러나 과거의 연구<sup>25</sup>에서는 통상적인 avidin-biotin-peroxidase complex에 의한 염색방법을 시행하여 간세포에 풍부하게 존재하는 내인성 바이오틴에 의한 비특이 반응의 가능성을 완전히 배제할 수 없다. 또한 Hayashi 등<sup>25</sup>은 양성 예의 판정기준으로 종양세포에 대한 TSP-1의 염색 강도를 고려하지 않고 TSP-1 항체에 양성인 종양세포가 존재할 때 양성으로 판정하여, 염색의 강도와 양성반응을 보인 세포의 양을 모두 고려하여 판정한 본 연구와 차이를 보였다.

본 연구에서는 간세포암종 세포에서 TSP-1 발현이 음성으로 판정된 많은 예들이 대부분 TSP-1의 염색이 약하거나 발현이 국소적인 예들이었다. 더욱이 최근 제자리부합법을 사용하여 TSP-1의 mRNA의 발현을 연구한 보고에서 TSP-1 mRNA 발현이 종양 버팀질조직의 섬유모세포에 국한되어 있음은 본 연구 결과를 강하게 뒷받침하는 소견이다.<sup>12</sup> 또한 웨스턴블롯을 이용한 본 연구에서 검색에 사용된 네 가지의 간세포암종 세포주에서 TSP의 발현은 관찰되지 않았다. 이상의 소견을 종합하면, 간세포암종 조직에서 TSP-1의 주 생성 세포는 종양 주변의 버팀질조직내의 섬유모세포, 내피세포 등의 간질세포이며 간암세포

에서 일부 TSP-1의 생성을 담당한다 할 수 있겠다.

TSP-2는 내피세포에서 강하게 발현되며 내피세포의 증식과 이동을 억제함으로써 혈관신생을 조절한다.<sup>7</sup> TSP-2가 종양 내의 미세혈관 밀도와 종양의 크기를 감소시킨다는 보고가 있고,<sup>21</sup> 이와는 반대로 TSP-2 mRNA의 발현이 자궁 경부암에서 미세혈관 밀도와 통계학적으로 유의한 차이를 보여주지 않았다는 보고<sup>26</sup>도 있다. 본 연구 결과는 TSP-2가 발현된 간세포암종 예에서 미세혈관 밀도가 TSP-2 음성인 예에 비하여 낮은 듯하였으나 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 본 연구에서 TSP-2는 종양 내의 굴모양혈관을 피복하는 세포 중 일부에서 발현되었으며, 민무늬근육 액틴에 대한 면역조직화학 염색으로 확인해 본 결과 민무늬근육 액틴 양성 소견을 보이는 별세포의 일부에서도 발현되는 것으로 생각된다.

과거의 기술과 본 연구 결과를 종합하면 TSP-2를 발현하는 세포는 굴모양혈관을 피복하고 있는 내피세포의 일부와 활성화된 별세포의 일부로 생각된다. 정확한 TSP-2 발현세포를 알기 위해서는 추가 연구가 필요하리라 생각된다. TSP-2는 결합조직을 구성하는 세포에서 주로 발현되며, TSP-2 유전자를 없앤 누드마우스에서는 혈관신생이 항진되며 아교질 합성장애 등을 유발한다는 보고<sup>27</sup>가 있다. 따라서 TSP-2가 아교질 섬유를 형성하거나, 바탕질 세포와의 상호작용 및 혈관 형성에 중요한 역할을 할 것이라 생각된다. 또한 활성화된 별세포가 간조직에서 아교질 섬유를 형성하며 간경변 등의 병적인 상황에서 섬유화를 담당하는 주요 세포<sup>28</sup>로 알려져 있음을 고려할 때 일부 별세포에서 TSP-2가 하는 역할은 더 연구해야 할 과제로 생각된다.

과거 연구에서 TSP-1은 p53 단백질에 의존적인 혈관 형성 억제인자로 생각되었다.<sup>10</sup> 최근 난소암에서 p53 과발현이 TSP-1 발현의 감소와 미세혈관 밀도의 증가와 관련되어 있다고 보고하였으나,<sup>22</sup> 간세포암종과 담관암종에서는 유의한 연관성이 발견되지 않았다.<sup>24</sup> 본 연구에서도 p53 단백질의 과발현과 TSP-1의 발현 사이의 연관성을 찾을 수 없었다. 이러한 결과는 TSP-1 발현은 p53 단백질과는 무관하게 TSP-1 발현을 조절하는 c-jun, ras 또는 다른 유전자의 영향을 받을 수 있음을 시사한다.<sup>29</sup>

결론적으로 본 연구는 간세포암종에서 종양의 혈관신생은 혈관형성 억제인자인 TSP-1의 발현에 의해 조절될 수 있음을 보여준다. 또한 TSP-1의 발현은 종양 버팀질조직 내의 섬유모세포, 내피세포 등에서 기원하며, 특히 일부의 간암세포에서 유리될 수 있음을 시사한다.

## 참고문헌

- Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995; 1: 27-31.
- Fidler IJ, Ellis LM. The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. *Cell* 1994; 79: 185-8.
- Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997; 18: 4-25.
- O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, *et al.* Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 1994; 79: 315-28.
- O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, *et al.* Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997; 88: 277-85.
- Taraboletti G, Roberts D, Liotta LA, Giavazzi R. Platelet thrombospondin modulates endothelial cell adhesion, motility, and growth: a potential angiogenesis regulatory factor. *J Cell Biol* 1990; 111: 765-72.
- Volpert OV, Tolsma SS, Pellerin S, *et al.* Inhibition of angiogenesis by thrombospondin-2. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 217: 326-32.
- Tuszynski GP, Gasic TB, Rothman VL, Knudsen KA, Gasic GJ. Thrombospondin, a potentiator of tumor cell metastasis. *Cancer Res* 1987; 47: 4130-3.
- Weinstat-Saslow DL, Zabrenetzky VS, VanHoutte K, Frazier WA, Roberts DD, Steeg PS. Transfection of thrombospondin 1 complementary DNA into a human breast carcinoma cell line reduces primary tumor growth, metastatic potential, and angiogenesis. *Cancer Res* 1994; 54: 6504-11.
- Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 1994; 265: 1582-4.
- Grossfeld GD, Ginsberg DA, Stein JP, *et al.* Thrombospondin-1 expression in bladder cancer: association with p53 alterations, tumor angiogenesis, and tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 219-27.
- Miyana K, Kato Y, Nakamura T, *et al.* Expression and role of thrombospondin-1 in colorectal cancer. *Anticancer Res* 2002; 22: 3941-8.
- Yamashita Y, Kurohiji T, Tuszynski GP, Sakai T, Shirakusa T. Plasma thrombospondin levels in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 1998; 82: 632-8.
- Tuszynski GP, Nicosia RF. Localization of thrombospondin and its cysteine-serine-valine-threonine-cysteine-glycine-specific receptor in human breast carcinoma. *Lab Invest* 1994; 70: 228-33.
- Zhang J, Ito R, Oue N, *et al.* Expression of thrombospondin-1 is correlated with microvessel density in gastric carcinoma. *Virchows Arch* 2003; 442: 563-8.
- Tanaka K, Sonoo H, Kurebayashi J, *et al.* Inhibition of infiltration and angiogenesis by thrombospondin-1 in papillary thyroid carcinoma. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 1125-31.
- Poon RT, Chung KK, Cheung ST, *et al.* Clinical significance of thrombospondin 1 expression in hepatocellular carcinoma. *Clin*

- Cancer Res 2004; 10: 4150-7.
18. Moon WS, Rhyu KH, Kang MJ, *et al.* Overexpression of VEGF and angiopoietin 2: a key to high vascularity of hepatocellular carcinoma? *Mod Pathol* 2003; 16: 552-7.
  19. Kim S, Park HS, Son HJ, Moon WS. The role of angiostatin, vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase 9 and 12 in the angiogenesis of hepatocellular carcinoma. *Korean J Hepatol* 2004; 10: 62-72.
  20. Moon WS, Chang KJ, Majumdar AP, Tarnawski AS. Reduced expression of epidermal growth factor receptor-related protein in hepatocellular carcinoma: implications for cancer growth. *Digestion* 2004; 69: 219-24.
  21. Oshika Y, Masuda K, Tokunaga T, *et al.* Thrombospondin 2 gene expression is correlated with decreased vascularity in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 1785-8.
  22. Alvarez AA, Axelrod JR, Whitaker RS, *et al.* Thrombospondin-1 expression in epithelial ovarian carcinoma: association with p53 status, tumor angiogenesis, and survival in platinum-treated patients. *Gynecol Oncol* 2001; 82: 273-8.
  23. Grossfeld GD, Carroll PR, Lindeman N, *et al.* Thrombospondin-1 expression in patients with pathologic stage T3 prostate cancer undergoing radical prostatectomy: association with p53 alterations, tumor angiogenesis, and tumor progression. *Urology* 2002; 59: 97-102.
  24. Kawahara N, Ono M, Taguchi K, *et al.* Enhanced expression of thrombospondin-1 and hypovascularity in human cholangiocarcinoma. *Hepatology* 1998; 28: 1512-7.
  25. Hayashi K, Kurohiji T, Shirouzu K. Localization of thrombospondin in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1997; 25: 569-74.
  26. Kodama J, Hashimoto I, Seki N, *et al.* Thrombospondin-1 and -2 messenger RNA expression in invasive cervical cancer: correlation with angiogenesis and prognosis. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 2826-31.
  27. Kyriakides TR, Zhu YH, Smith LT, *et al.* Mice that lack thrombospondin 2 display connective tissue abnormalities that are associated with disordered collagen fibrillogenesis, an increased vascular density, and a bleeding diathesis. *J Cell Biol* 1998; 140: 419-30.
  28. Blomhoff R, Wake K. Perisinusoidal stellate cells of the liver: important roles in retinol metabolism and fibrosis. *FASEB J* 1991; 5: 271-7.
  29. Mettouchi A, Cabon F, Montreau N, *et al.* SPARC and thrombospondin genes are repressed by the c-jun oncogene in rat embryo fibroblasts. *EMBO J* 1994; 13: 5668-78.