

유방암종에서 Vascular Endothelial Growth Factor-C 발현

정명자 · 양선호¹ · 장규윤 · 문우성
강명재 · 이동근

전북대학교 의과대학 병리학교실
재활의학과교실

접 수 : 2004년 11월 22일
게재승인 : 2005년 8월 31일

책임저자 : 장 규 윤
우 561-180 전북 전주시 덕진구 금암동 산
2-20
전북대학교병원 병리과
전화: 063-270-3136
Fax: 063-270-3135
E-mail: kyjang@chonbuk.ac.kr

*본 연구는 전북대학교 연구비 지원으로 이
루어졌음.

전이는 암종의 예후를 결정하는 데 매우 중요하며 암 환자 사망의 주요 원인이다. 암세포는 직접적인 파급 또는 혈관이나 림프관을 통해 전이된다. 종양의 성장과 전이와 관련해서 신생혈관형성에 관한 연구가 많이 이루어지고 있으며 vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A)가 이와 관련된 주요 성장인자로 알려져 있다.¹ VEGF-C는 VEGF family에 속하는 성장인자로 림프관 형성에 관여하는 주요 인자로 알려져 있다.² VEGF-C는 처음에 vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3)의 리간드로 밝혀졌는데² VEGFR-3는 배아 시기에는 혈관과 림프관의 내피세포에서 모두 발현되나 성인에게서는 림프관 내피세포에서만 발현되는 특징이 있다.³ 이러한 이유로 VEGF-C는 림프관 형성과 관련이 있는 성장인자일 것으로 생각되었고 이를 뒷받침하는 연구결과가 보고되고 있다.^{4,5} VEGF-C는 VEGF-A의 주요 수용체인 VEGFR-2와도 반응하여 신생혈관형성에도 관여할 것으로 알려져 있으나 그 중요성은 아직 밝혀지지 않았다.²

Joukov 등²은 VEGF-C가 58 kDa 형태로 합성되고 이것이

Expression of Vascular Endothelial Growth Factor-C in Breast Carcinoma

Myoung Ja Chung, Sun Ho Yang¹, Kyu Yun Jang, Woo Sung Moon, Myoung Jae Kang and Dong Geun Lee

Department of Pathology and ¹Rehabilitation, Chonbuk National University Medical School and Institute for Medical Sciences, Jeonju, Korea

Background : Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) is a novel growth factor that regulates lymphangiogenesis and/or angiogenesis via binding to the vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) or VEGFR-2. Recent studies have suggested that VEGF-C may play a role in lymph node metastasis. This study was conducted to examine whether the expression of VEGF-C is associated with the clinicopathologic parameters, and especially lymph node metastasis, of invasive ductal carcinoma. **Methods :** Immunohistochemical staining was performed for VEGF-C and CD31 in the surgically resected specimens from 83 patients with invasive breast carcinoma. **Results :** Of the 83 breast carcinomas, 61 (74%) cases showed cytoplasmic VEGF-C immunoreactivity. VEGF-C expression was associated with lymph node metastasis ($p=0.03$), but it did not correlate with tumor size, the histologic grade, and the presence of estrogen receptor or progesterone receptor. The mean microvessel density in the cases without VEGF-C expression was 51.9 ± 30.1 and it was 72.9 ± 33.0 in the cases with 2+ expression for VEGF-C ($p=0.07$). **Conclusions :** This study suggests that VEGF-C expression may have an association with lymph node metastasis in the patients with breast carcinoma.

Key Words : Breast Carcinoma; VEGF-C

이합체(dimer)를 형성하거나 작은 크기로 분해되어 다양한 형태(15, 21, 29-30, 31-32, 43, 60, 80, 120 kDa 형태)로 존재하고, 이 중 29 kDa이나 31 kDa이 주로 VEGFR-3와 작용을 하고 21 kDa은 VEGFR-2를 활성화시킨다고 보고하였다. 최근 암종에서 VEGF-C 발현과 신생 림프관 형성, 림프절 전이 사이의 관련성에 대한 연구가 이루어지고 있으며, 종양세포에서 VEGF-C 발현과 림프절 전이 사이에 관련성이 있다는 보고도 있다.⁶⁻⁸ 유방암종에서 겨드랑 림프절 전이 유무는 환자의 예후 결정에 가장 중요한 인자이고, VEGF-C 발현과 겨드랑 림프절 전이 사이에 관련이 있음을 보여주는 보고도 있다.⁹⁻¹² 하지만 아직까지 그 수가 적고 특히 환자에게서 얻은 조직을 대상으로 한 연구는 매우 드물었다.

본 연구에서는 침윤성 유방암종을 대상으로 VEGF-C에 대한 western blot을 시행하였고, VEGF-C의 면역조직화학적 발현과 림프절 전이를 포함한 여러 가지 예후 결정 인자들 사이의 관련성을 알아보았다. 또한 CD31에 대한 면역염색을 통해 신생혈관형성 정도와 VEGF-C 발현 사이의 관련성을 알아보았다.

재료와 방법

연구 대상

2000년 1월부터 2002년 12월까지 전북대학교 병원에서 침윤성 관암증으로 유방과 주변 림프절 절제술을 받은 83예를 대상으로 하였다. 환자의 평균 연령은 48.9세였다. 이 중 12예에서는 포르말린에 고정하기 전에 신선한 상태의 종양 부위에서 조직을 채취하였고, western blotting 검사를 위해 -80°C에 보관하였다.

면역조직화학염색

포르말린 고정 후 통상의 방법에 따라 제작된 파라핀 블럭을 이용하여 VEGF-C (R&D system, MN, USA)와 CD31 (DAKO, Denmark)에 대한 면역조직화학염색을 시행하였다. 파라핀 포매괴를 4 µm 두께로 박절한 조직편을 Probe on Plus Slide (Fisher Scientific, Pittsburg, USA)에 부착하고 58°C 오븐에서 30분 동안 방치하였다. 그런 다음 100% xylene으로 파라핀을 제거하고 100%, 90%, 75% 알코올로 처리한 후 증류수에 담가 두었다. 감추어진 항원을 노출시키기 위해 VEGF-C를 citrate buffer (pH 6.0)에 담가 microwave oven에 10분간 처리하는 과정을 3회 반복하였다. 내인성 과산화효소를 억제시키기 위해 3% 과산화수소로 10분간 처리한 후 증류수로 씻어냈다. 비특이적 염색을 감소시키기 위하여 정상 말의 혈청과 30분간 반응시킨 후 일차 항체를 처리하여 실온에서 두 시간 반응시킨 다음 Tris-buffered Saline (TBS, DAKO)으로 씻어냈다. 비오틴이 부착된 이차 항체에 10분간 반응시키고 씻어낸 후 스트렙타비딘 과산화효소(Peroxidase-labelled streptavidine)에 10분간 반응시키고 TBS로 씻어냈다. 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC)로 5-10분간 발색시키고 Meyer's 헤마톡실린으로 대조염색한 후 봉입제로 봉입하였다.

Western blotting

유방암종 조직을 용해용액(150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris, pH 8.0, 1% NP40, 0.001 g/mL aprotinin, 0.001 g/mL leupeptin, 0.001 g/mL pepstatin, and 0.01 M PMSF)에 넣고 간 다음 14,000 rpm에서 30분 간 원심분리하여 상층액을 얻었다. Bio-Rad Protein Assay Kit (BIO-RAD, CA, USA)를 이용하여 단백질 정량을 한 후 면역침전(immunoprecipitation)법을 시행하였다. 방법은 단백질을 500 ng의 anti-VEGF-C 항체(R&D system, MN, USA)와 반응시킨 후 protein A/G plus agarose beads로 면역복합체를 포획하였다. 15% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide 겔로 변성 분리하였고 이를 nitrocellulose membrane (Hybond-C Amersham, Piscataway, NJ, USA)에 80 V에서 두 시간 동안 전기적으로 이동시켰다.

Membrane을 5% skim milk가 함유된 TBS 용액에서 blocking 시킨 후 anti-VEGF-C 항체를 1:1000으로 희석하여 한 시간 동안 반응시켰다. 이차 항체로는 HRP (horse radish peroxidase)가 결합된 anti-goat IgG (Zymed, CA, USA)를 1:2,500으로 희석하여 상온에서 한 시간 반응시켰다. TBS로 씻어낸 다음 ECL 기질(Santa Cruz, CA, USA)과 1분 30초 반응시킨 후 X-ray 필름에 감광시켰다.

면역조직화학염색 결과 판독

VEGF-C는 종양세포의 세포질에 염색되었다(Fig. 1). 염색 강도와 염색 범위를 고려하여 반정량적으로 염색 결과를 정하였다. 염색 강도는 음성인 경우는 0, 약하게 염색되는 경우는 1, 중등도로 염색되는 경우는 2, 강하게 염색되는 경우는 3으로 판독하였다. 염색 범위는 종양 내에 양성세포가 없는 경우는 0, 종양 세포의 1-15%가 양성 반응을 보일 경우는 1, 16-50%에서 양성 반응을 보일 경우에는 2, 51% 이상에서 양성 반응을 보일 경우에는 3으로 판독하였다. 염색 강도와 염색 범위의 합계가 2점 이하이면 음성, 3점이나 4점이면 1+, 5점이나 6점이면 2+로 판독하였다. 미세혈관 밀도는 CD31 염색을 통하여 알아보았으며 기존의 미세혈관 판정 기준을 적용하여 염색되는 모든 관 구조와 단일 세포의 수를 세었다. 혈관밀도가 가장 높은 세 부위를 택하여 200배를 광학현미경으로 양성인 혈관을 수를 세어 평균치를 구하였다. 6개나 8개 이상의 적혈구가 들어갈 만큼 큰 혈관, 두꺼운 근층이 있는 혈관은 제외하였고 괴사, 염증 및 경화가 있는 부위도 수복반응으로 인한 이차적인 혈관의 증식이 나타나므로 제외하였다. 한 개의 혈관내피세포 또는 내강이 없는 내피세포의 소집단은 세포 하나를 한 개의 혈관으로 간주하여 계산하였다(Fig. 2).

통계학적 검증

종양의 크기, 조직학적 분화도, 호르몬 수용체 발현 유무, 거드랑이 림프절 전이 유무에 따른 VEGF-C 발현 양상은 χ^2 검정법을 이용하여 분석하였다. 미세혈관 밀도와 VEGF-C의 관계는 ANOVA test를 이용하여 통계학적인 유의성을 알아보았다. p 값이 0.05 미만일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

면역조직화학염색

유방의 침윤성 관암증에서 VEGF-C 발현 정도와 유방암종의 임상병리학적 예후 인자들 사이의 관련성은 Table 1에 요약하였다. VEGF-C는 종양세포의 세포질에 염색되었는데 83예의

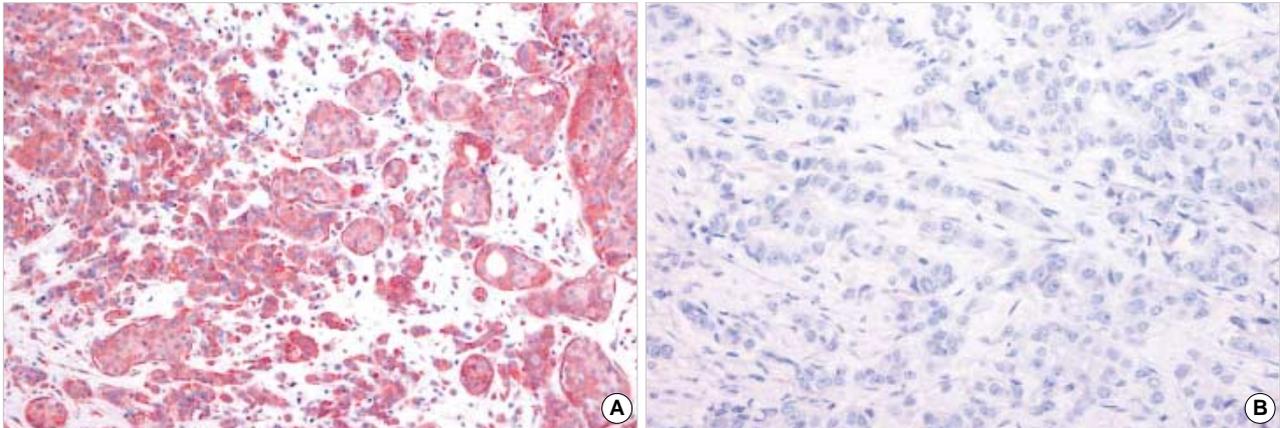


Fig. 1. Vascular endothelial growth factor-C expression in invasive ductal carcinoma. (A) Tumor cells show strong cytoplasmic immunoreactivity. (B) Tumor cells show no immunoreactivity.

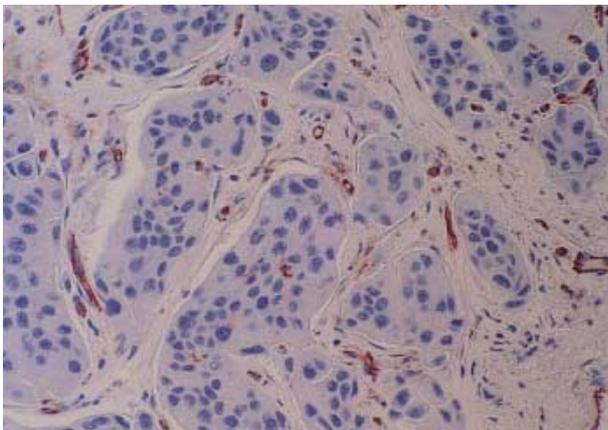


Fig. 2. Microvessel density is evaluated by CD31 immunostaining.

침윤성 관암종 중 61예(74%)에서 양성 반응을 보였으며, 이 중 24예(29%)가 1+, 37예(45%)가 2+였다. 겨드랑이 림프절 전이에 따른 VEGF-C 발현은 림프절 전이가 있는 37예 중 32예(89%)에서 VEGF-C가 발현되었고, 5예(11%)에서는 음성이었다. 림프절 전이가 없는 46예에서는 29예(63%)에서 VEGF-C가 발현되었고 17예(37%)에서는 VEGF-C가 발현되지 않았다. 즉 림프절 전이가 있는 경우 VEGF-C 발현율이 높았으며 통계학적인 의미가 있었다($p=0.03$). 종양 내 미세혈관 밀도와 VEGF-C 발현 사이의 관계는 VEGF-C 음성인 군에서 미세혈관 밀도의 평균값은 51.9 ± 30.1 , VEGF-C가 1+군에서는 71.4 ± 26.4 , VEGF-C가 2+인 군에서는 72.9 ± 33.0 이었다. 즉 VEGF-C 발현이 높은 경우 미세혈관 밀도가 높았으나 통계학적으로 의의는 없었다($p=0.07$). 종양의 크기, 조직학적 등급, 핵 등급, 에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체 발현 유무에 따른 VEGF-C 발현에 차이는 없었다.

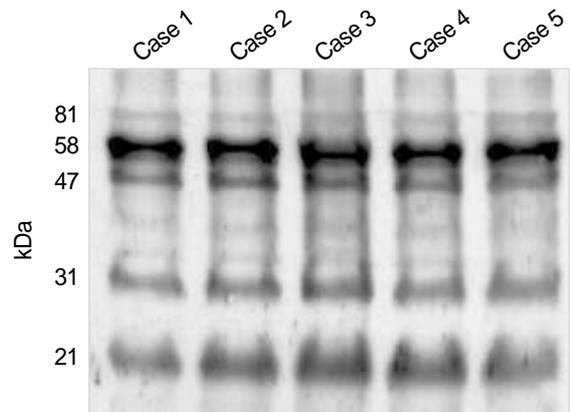


Fig. 3. Western blotting of VEGF-C in invasive ductal carcinoma. VEGF-C proteins are detected as several polypeptides (predominant molecules: 58, 47, 31, and 21 kDa).

Western blotting

유방암종 조직을 용해 용액에 넣고 간 후 얻은 단백질을 이용하여 VEGF-C에 대한 western blotting 검사를 시행하였다. 유방암종 조직에서 VEGF-C는 다양한 형태로 관찰되었다. 주요 형태는 처음에 합성되는 전구체 형태인 58 kDa와 단백질 분해 과정이 부분적으로 일어난 형태인 43 kDa, VEGF-C의 신생 림프관 형성 및 신생혈관 형성 기능에 관여하는 형태인 31, 21 kDa였다(Fig. 3).

고찰

본 연구는 유방의 침윤성 암종을 대상으로 VEGF-C 발현과 이들의 임상병리학적 예후 인자들 사이의 관련성을 알아보고자 하였다. 그 결과 VEGF-C 발현이 림프절 전이와 관련이 있음

Table 1. Correlation between clinicopathologic parameters and expression of vascular endothelial growth factor-C in invasive ductal carcinoma

	No	VEGF-C			p value
		0	1+	2+	
Tumor size					0.22
≤2.0 cm	37	13	9	15	
2.1-5.0 cm	43	9	13	21	
>5.1 cm	3		2	1	
Histologic grade					0.90
Grade 1	12	2	4	6	
Grade 2	56	17	15	24	
Grade 3	15	3	5	7	
Nuclear Grade					0.49
Grade 1	9	3	3	3	
Grade 2	54	13	18	23	
Grade 3	20	6	3	11	
Estrogen receptor					0.52
Negative	35	7	11	17	
Positive	48	15	13	20	
Progesterone receptor					0.26
Negative	27	6	11	10	
Positive	56	16	13	27	
Lymph node metastasis					0.03
Negative	46	17	12	17	
Positive	37	5	12	20	
MVD					0.07
		51.9±30.1	71.4±26.4	72.9±33.0	

을 알 수 있었다.

신생 림프관 형성(lymphangiogenesis)은 새로운 림프관 형성을 일컫는 용어로, 종양세포가 전이를 할 수 있는 경로를 제공해 줌으로써 종양의 전이를 촉진할 수 있으며 특히 림프절 전이와 관련이 있을 것으로 생각된다.⁹ 이러한 개념은 림프관을 통한 전이는 기존의 림프관을 통해서 이루어지고 종양에서 신생 림프관이 형성되지는 않을 것이라는 이전의 생각과는 상반된 것이다.^{13,14} 최근 종양세포에서 신생 림프관 형성을 일으킬 수 있는 성장 인자를 분비해서 림프관이 새롭게 생성되고 이를 통해 림프절 전이가 잘 일어날 수 있다는 연구 결과가 보고된 바 있다. 그리고 VEGF-C와 VEGF-D가 림프관 생성에 관련된 대표적인 성장 인자로 알려져 있다.^{2,15} VEGF-C mRNA는 정상적으로 림프절, 심장, 태반, 골격근, 난소, 내분비 장기와 소장에서 검출되고² VEGF-C 발현율을 증가시키는 물질로는 platelet-derived growth factor, epidermal growth factor, transforming growth factor β , tumor promotor phorbol myristate 12, 13 acetate 등으로 알려져 있다.¹⁶ 반면 VEGF-A의 중요한 분비 인자인 저산소증에 의해서는 증가되지 않는 것으로 알려져 있다.¹⁶

본 연구에서 VEGF-C는 83예의 침윤성 관암중 중 61예(74%)에서 발현되었고 발현 정도는 다른 연구자의 연구 결과와 비슷하였다.¹⁰ 유방암종의 예후 결정 인자와의 관계는 VEGF-C 발현과 림프절 전이 사이에 밀접한 관련성이 있었고 종양의 크기,

조직학적 등급, 호르몬 수용체 등과는 관련성이 없었다. 인체의 암종을 대상으로 VEGF-C 발현과 림프절 전이 사이의 관련성에 관한 연구들에서 많은 경우 VEGF-C 발현과 림프절 전이가 밀접한 관련성이 있음을 보여주었다.⁶⁻⁸ 유방암종에서는 VEGF-C를 과발현시켜 유도된 유방암 조직을 대상으로 한 실험 결과 VEGF-C 발현이 신생 림프관 형성 및 림프절 전이와 밀접한 관련이 있는 것으로 나타났다.⁹ 뿐만 아니라 유방암 환자의 조직에서도 유방암종 내 VEGF-C의 발현이 신생 림프관 형성 및 림프절 전이와 밀접한 관련이 있을 뿐 아니라 환자의 생존율과도 밀접한 관련이 있었다.¹⁰⁻¹² 그러나 VEGF-C의 발현이 신생 림프관 형성이나 림프절 전이와 관련이 없다는 보고도 있었다.¹⁷⁻²⁰

VEGF-C가 림프절 전이를 조장하는 기전으로는, VEGF-C가 림프관 내피세포의 표면적이나 투과력을 증가시켜, 림프관 내피세포의 유착 성질을 변화시키거나 chemokine/cytokine 발현을 변화시키는 것으로 생각되고 있다.²¹ VEGF-C에 의해서 림프관이 새롭게 만들어지는지 여부는 아직까지 밝혀지지 않았다. 최근 VEGF-C를 MCF-7 유방암세포에 전달 후 종양을 발생시킨 실험 결과 VEGF-C가 신생 림프관 형성을 유도하여 림프관 침윤의 가능성을 높이는 것으로 나타났다.^{8,9,22} 반면 일부 연구에서는 종양 주변에서 관찰되는 림프관의 형태는 새롭게 증식하는 림프관이라기보다는 기존에 있던 성숙한 림프관과 닮아 있고 내피세포에서 증식이 확인되지 않았다고 보고하고 있다.²³ 최근 VEGFR-3나 lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1 (LYVE-1)이 림프관 염색에 이용되고 있다.^{24,25} 하지만 VEGFR-3의 경우 종양 내에서 새롭게 생성된 혈관 및 림프관에 모두 발현되는 것으로 밝혀졌다.²⁶

VEGF-C는 VEGFR-3의 리간드로 작용하여 림프관 형성에 관여하는 것으로 알려져 있다. 하지만 VEGF-C가 과발현된 종양에서는 림프관 증식뿐 아니라 혈관의 증식 현상이 관찰되었고⁹ VEGF-C가 VEGFR-3뿐 아니라 VEGFR-2와도 밀접한 관련이 있다는 보고도 있다.² 본 연구에서는 CD31로 염색되는 미세혈관과 VEGF-C 사이의 관련성을 알아보았다. 비록 통계학적으로 의의는 없었지만($p=0.07$) VEGF-C가 음성인 군에서 미세혈관 수는 51.9 ± 30.1 , 2+인 군에서는 72.9 ± 33.0 으로 VEGF-C 양성인 군에서 미세혈관 수가 많은 경향을 보였다. VEGF-C는 처음에 58 kDa 형태의 전구체로 분비되는데, 그 이유는 불필요한 혈관형성을 억제하기 위함이고 특정 상황에서 단백질 분해 과정을 통해 VEGFR-3와 VEGFR-2를 활성화시킬 수 있는 형태로 변한다고 알려져 있다.² VEGF-C는 림프관 증식뿐 아니라 혈관증식에도 관여할 수 있다고 알려져 있다. VEGF-C가 VEGF-A와 같은 정도의 혈관내피세포에 효과를 나타내기 위해서는 VEGF-A보다 50배 정도 농도가 높아야 하고 VEGF-A와 같이 혈관의 투과도 증가, 혈관내피세포 이주 및 증식에 관여한다고 알려져 있다.² 본 연구에서는 VEGF-C 발현군에서 미세혈관 밀도가 높은 기전을 설명할 수는 없으나 VEGF-C에 대한 western blot상 다양한 크기의 VEGF-C 형태가 존재하였

다. 이 중 21 kDa 형태가 상당량 관찰된 점으로 미루어 VEGF-C가 VE- GFR-2의 활성화를 통해 신생혈관 형성에 관여했을 수도 있을 것으로 생각하였다.

참고문헌

- Senger DR, Van de Water L, Brown LF, *et al.* Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer Metastasis Rev* 1993; 12: 303-24.
- Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, *et al.* A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 1996; 15: 290-8.
- Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, *et al.* Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 3566-70.
- Kido S, Kitadai Y, Hattori N, *et al.* Interleukin 8 and vascular endothelial growth factor -- prognostic factors in human gastric carcinomas? *Eur J Cancer* 2001; 37: 1482-7.
- Tsurusaki T, Kanda S, Sakai H, *et al.* Vascular endothelial growth factor-C expression in human prostatic carcinoma and its relationship to lymph node metastasis. *Br J Cancer* 1999; 80: 309-13.
- Kurebayashi J, Otsuki T, Kunisue H, *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) family members in breast cancer. *Jpn J Cancer Res* 1999; 90: 977-81.
- Akagi K, Ikeda Y, Miyazaki M, *et al.* Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) expression in human colorectal cancer tissues. *Br J Cancer* 2000; 83: 887-91.
- Yonemura Y, Endo Y, Fujita H, *et al.* Role of vascular endothelial growth factor C expression in the development of lymph node metastasis in gastric cancer. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 1823-9.
- Mattila MM, Ruohola JK, Karpanen T, Jackson DG, Alitalo K, Harkonen PL. VEGF-C induced lymphangiogenesis is associated with lymph node metastasis in orthotopic MCF-7 tumors. *Int J Cancer* 2002; 98: 946-51.
- Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, *et al.* Clinicopathological significance of vascular endothelial growth factor-C in breast carcinoma with long-term follow-up. *Mod Pathol* 2003; 16: 309-14.
- Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, *et al.* Lymph vessel density correlates with nodal status, VEGF-C expression, and prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2005; 91: 125-32.
- Choi WW, Lewis MM, Lawson D, *et al.* Angiogenic and lymphangiogenic microvessel density in breast carcinoma: correlation with clinicopathologic parameters and VEGF-family gene expression. *Mod Pathol* 2005; 18: 143-52.
- Jain RK. Transport of molecules in the tumor interstitium: a review. *Cancer Res* 1987; 47: 3039-51.
- Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407: 249-57.
- Achen MG, Jeltsch M, Kukkk E, *et al.* Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 548-53.
- Enholm B, Paavonen K, Ristimaki A, *et al.* Comparison of VEGF, VEGF-B, VEGF-C and Ang-1 mRNA regulation by serum, growth factors, oncoproteins and hypoxia. *Oncogene* 1997; 14: 2475-83.
- Gunningham SP, Currie MJ, Han C, *et al.* The short form of the alternatively spliced flt-4 but not its ligand vascular endothelial growth factor C is related to lymph node metastasis in human breast cancers. *Clin Cancer Res.* 2000; 6: 4278-86.
- Koyama Y, Kaneko K, Akazawa K, Kanbayashi C, Kanda T, Hatakeyama K. Vascular endothelial growth factor-C and vascular endothelial growth factor-d messenger RNA expression in breast cancer: association with lymph node metastasis. *Clin Breast Cancer* 2003; 4: 354-60.
- Hoar FJ, Chaudhri S, Wadley MS, Stonelake PS. Co-expression of vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) and c-erbB2 in human breast carcinoma. *Eur J Cancer* 2003; 39: 1698-703.
- Watanabe O, Kinoshita J, Shimizu T, *et al.* Expression of a CD44 variant and VEGF-C and the implications for lymphatic metastasis and long-term prognosis of human breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2005; 24: 75-82.
- Nathanson SD. Insights into the mechanisms of lymph node metastasis. *Cancer* 2003; 98: 413-23.
- Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, *et al.* Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat Med* 2001; 7: 192-8.
- Williams CS, Leek RD, Robson AM, *et al.* Absence of lymphangiogenesis and intratumoural lymph vessels in human metastatic breast cancer. *J Pathol* 2003; 200: 195-206.
- Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, Alitalo K. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res* 2000; 60: 203-12.
- Banerji S, Ni J, Wang SX, *et al.* LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *J Cell Biol* 1999; 144: 789-801.
- Bando H, Brokelmann M, Toi M, *et al.* Immunodetection and quantification of vascular endothelial growth factor receptor-3 in human malignant tumor tissues. *Int J Cancer* 2004; 111: 184-91.