

위암조직의 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) mRNA 발현양상과 혈관형성능

영남대학교 의과대학 외과학교실, ¹응급의학과, ²해부병리학교실

이상춘 · 송석훈¹ · 김상운 · 김재황 · 윤성수 · 최준혁² · 송선교

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Expression and Angiogenesis in Gastric Cancer

Sang Choon Lee, M.D., Seok Hun Song, M.D.¹, Sang Woon Kim, M.D., Jae Hwang Kim, M.D., Sung Su Yun, M.D., Joon Hyuk Choi, M.D.² and Sun Kyo Song, M.D.

Purpose: This study was designed to evaluate the angiogenic activities of gastric cancer tissue and adjacent normal gastric tissue and to analyze the correlations between the clinicopathologic factors of gastric cancer and tumor angiogenic activity.

Methods: Sets of both tumor tissue and adjacent normal gastric tissue were sampled from 49 patients with gastric cancer at the time of gastrectomy. Each specimen was evaluated for the expression of VEGF mRNA by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). For the microvessel count of each tissue sample, immunohistochemical staining was done using antiCD31 antibody. As a control group, 10 paraffin blocks of normal gastric tissue from patients with benign disease were selected and stained with the same antibody in order to count the microvessels.

Results: The microvessel count of the tumor tissue was higher than that of normal tissue, with a mean \pm SD of 74.10 ± 30.33 and 24.69 ± 10.11 , respectively ($p < 0.001$). The microvessel count of the control group was 23.40 ± 6.77 and was not significantly different from that of normal tissue samples taken from patients with gastric cancer. VEGF/ β actin ratios measured from the results of RT-PCR were 0.70 ± 0.32 in tumor tissue and 0.51 ± 0.26 in normal tissue ($p < 0.001$). In each tissue sample, there was a significant correlation between the microvessel count and VEGF/ β actin ratio ($p < 0.01$ in the tumor tissue, $p < 0.05$ in normal tissue). Micro-

vessel count of tumor tissue was related with sex and types of Lauren's classification ($p < 0.05$, $p < 0.01$, respectively). The VEGF/ β actin ratio of tumor tissue was related to sex and degree of vascular invasion of tumor cells ($p < 0.05$). Other clinicopathologic factors, such as age, histologic type, TNM stage, tumor depth, lymph node metastasis, and perineural invasion, were not associated with the degree of microvessel count and the level of VEGF mRNA expression.

Conclusion: Gastric cancer shows marked angiogenic activity and the angiogenesis is related to some clinicopathologic factors. These results suggest that the clinical application of antiangiogenic agents may have a role in the treatment of gastric cancer. (*J Korean Surg Soc* 2001;60:288-296)

Key Words: Gastric cancer, angiogenic activity, VEGF (vascular endothelial growth factor), Microvessel count

중심 단어: 위암, 혈관형성능, 혈관내피세포 증식인자, 미세혈관 수

Departments of Surgery, ¹Emergency Medicine, ²Pathology College of Medicine, Yeungnam University, Daegu, Korea

서론

암세포가 발생하여 증식을 시작하는 초기단계에는 암세포의 신진대사에 필요한 물질이 주로 확산에 의해 공급되지만, 확산에 의한 공급량은 극히 제한되어 있기 때문에 암세포 수 혹은 종괴의 크기가 일정한 수준에 도달하게 되면 혈관형성이 동반되어야 암조직이 성장해 나갈 수 있고 혈관의 분포는 종양의 성장속도에 중요한 영향을 미친다.(1)

Folkman등(2)이 혈관내피세포의 증식과 혈관형성을 자극하는 물질을 암세포에서 처음으로 분리하여 종양혈관형성인자로 명명하였다. 그러나 혈관형성은 암세포뿐만 아니라 암과 연관된 염증세포, 혈관내피세포 등에서 분비되는 다양한 인자들의 상호작용에 의해 이루어지며, 염기성 섬유모세포 성장인자(bFGF), 전환 성장인자 β 1 (TGF-

책임저자 : 김상운, 대구광역시 남구 대명 5동 317-1
☎ 705-717, 영남대학교 의료원 일반외과학교실
Tel: 053-620-3589, Fax: 053-624-1213
E-mail: swkim@med.yu.ac.kr

접수일 : 2000년 12월 26일, 게재승인일 : 2001년 1월 5일
이 논문은 1999년 영남대학교 부설 임상의학연구소 연구비 지원에 의해 연구되었음.

β1), 혈소판유래 증식인자(PDGF), 혈관내피세포 성장인자(VEGF) 등의 여러 성장인자와 단백질효소, 단백질해역효소 등이 포함된다.(3-5)

활성화된 내피세포는 자극의 방향을 따라 혈관의 분지를 형성해 나가는 화학주성의 특성을 보이는데, 단백질효소와 단백질해역효소의 상호 조절된 작용이 혈관 기저막과 주변 조직의 적절한 용해를 유도함으로써 혈관내피세포의 분지형성과 침습을 용이하게 한다.(3)

암이 발생한 조직의 특성에 따라 성장인자의 발현증가가 관찰되더라도 관련 단백질효소들의 발현양상에 따라 실제 조직에서의 혈관형성이 달라질 수 있기 때문에, 암조직의 혈관형성능을 평가하기 위해서는 혈관형성에 관여하는 성장인자의 발현양상과 함께 면역조직화학검사를 이용한 조직내의 미세혈관 수를 측정하는 것이 타당하다.(6)

암조직의 혈관형성이 진행되는 과정에서 암세포의 분리가 동반되고 미생숙단계의 신생맥관은 단속적인 기저막을 형성하고 있으므로 암세포가 쉽게 혈관내로 침투할 수 있을 뿐만 아니라, 혈관형성은 암세포가 접촉하는 혈관면적을 증가시키기 때문에 조기에 혈행성 전이가 이루어질 수 있는 환경이 조성된다. 따라서 암조직 내의 혈관형성은 형성시거나 분포양상에 따라 종양의 성장속도와 형태를 결정할 뿐만 아니라, 암세포 전이의 시기와 정도에 영향을 미친다.(7) 이와 같은 현상은 고형암의 혈관형성능이 종양의 악성도 및 환자의 예후에 영향을 미치는 요소가 될 수 있다는 것을 시사하기 때문에 각종 악성종양을 대상으로 혈관형성능과 임상결과와의 관계에 대한 분석이 보고되고 있다. 전립선암, 폐암, 식도암, 위암, 유방암, 두경부상피세포암, 악성 흑색종 등의 다양한 암 조직에서 혈관 수는 환자의 예후 및 암세포의 전이에 영향을 미치는 것으로 보고되고 있으며, 조직내 혈관 수는 환자의 예후를 정하는 독립적 인자로서 임상적 의의가 있다고 하였다.(5,8,10-14)

암조직의 혈관형성능이 종양의 성장과 전이에 영향을 미친다는 연구결과를 바탕으로 최근에는 암조직의 혈관형성을 억제할 수 있는 방법에 관한 연구결과들이 소개되기 시작하였고, 이를 응용한 임상 치료법의 개발도 함께 진행중이다.(15,16) 혈관형성을 억제하기 위한 방법을 보다 효율적으로 개발하고 임상에 적용하기 위해서는, 치료대상이 되는 각각의 암조직에서 혈관형성의 발현양상과 특성이 가지는 임상적 의의에 대한 분석이 병행되어야 할 것으로 여긴다.

위암은 한국에서 가장 흔한 악성종양이며 특히 암세포의 전이가 활발한 종양인데, 이와 관련된 혈관형성능의 특성에 대한 연구는 아직 미흡하다. 수술과 항암화학요법이 위암의 주된 치료방법이지만, 진행성 위암인 경우 치료성적이 만족스럽지 못하기 때문에 새로운 치료방법의

모색이 절실히 요구되고 있다. 이러한 시점에서 혈관형성억제제를 이용한 새로운 치료방법을 위암에 시도해 보는 것은 임상적으로 큰 의의가 있다고 사료되며, 이를 위한 기초연구로서 저자는 위암환자의 위암조직과 정상 위장조직에서 혈관형성에 관여하는 인자인 VEGF 유전자 발현과 조직내의 미세혈관 분포를 조사하여 위장조직의 혈관형성능의 양상을 분석하고, 위암조직의 혈관형성능이 병리학적 소견과 어떠한 연관성을 가지는지 조사함으로써 위암에서 혈관형성능이 가지는 임상적 의의에 대하여 연구하고자 한다.

방 법

1) 재료

영남대학교 의과대학 부속병원에서 1997년 11월 이후 근치적 혹은 고식적 위장절제술로 얻은 위암 49예를 실험재료로 사용하였다. RNA 추출을 위한 재료는 위절제술 직후 종양조직과 동결절편생검상 종양세포가 없는 것으로 확인된 부위의 정상 위점막조직을 동일 환자로부터 각각 200~300 mg씩 채취하여 액체질소 탱크에 초저온 냉동상태로 보관하였다.

면역조직화학 검사는 술 후 시행하는 병리조직검사와 정에서 만들어진 파라핀 포매조직을 이용하였다. 위암환자의 정상위조직에 대한 대조군으로서 병리조직실에 보관중인 정상 위의 파라핀 포매조직 10개를 이용하여 면역조직화학검사를 시행하였다.

2) RNA 분리

각각의 냉동조직을 냉동상태가 지속적으로 유지된 상태에서 입자상태로 분쇄하여 Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform method를 이용하여 total RNA를 추출하였다. 추출된 RNA의 농도와 질을 평가하기 위해서, 각각의 RNA 분리용액을 100배 및 200배 희석하여 UV spectrophotometer를 이용해 260 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정하여 비교 확인하였고, 또한 1% 한천-포름알데하이드 변성 겔 상에서 전기영동하여 28S와 18S의 라이보솜 RNA (rRNA) 및 도말상의 전령 RNA (mRNA)를 확인한 뒤 first strand cDNA 합성을 위한 재료로 사용하였다.

3) 역전사 종합효소 연쇄 반응법(Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)

First strand cDNA를 합성하기 전 각각의 RNA 표본을 DNase I digestion을 시행하여 오염가능한 DNA를 제거하였다. 1μg의 total RNA를 정량하여 oligodT priming에 의한 first strand cDNA를 합성하였다(First strand cDNA kit, GibcoBRL, USA). 합성된 first strand cDNA 용액은 PCR을 실시할 때까지 -20°C에서 보관하였다. 시발체(primer)는

Table 1. Correlation between clinicopathologic factors and parameters associated with angiogenesis in gastric cancer tissues

Factors	No. of patients	Microvessel counts	VEGF/ β actin ratio
Age in years (range=21~77, median=58)			
20~39	5	50.80±20.12	0.701±0.218
40~59	24	81.31±34.56	0.711±0.389
60~79	20	74.06±30.33	0.695±0.242
Sex			
Female	18	63.43±25.48*	0.563±0.283*
Male	31	80.24±31.57*	0.785±0.308*
Tumor location			
Cardia	6	78.56±40.30	0.752±0.428
Body	15	71.00±22.11	0.691±0.347
Antrum	28	74.76±32.72	0.700±0.283
Histologic type			
Well differentiated	8	72.21±12.88	0.804±0.153
Moderately differentiated	12	85.50±38.83	0.731±0.341
Poorly differentiated	20	74.72±30.68	0.698±0.311
Undifferentiated	4	71.33±23.40	0.542±0.333
Signet ring cell type	5	49.13±23.13	0.628±0.485
Tumor depth			
T2	7	79.43±23.75	0.689±0.339
T3	41	72.44±31.48	0.702±0.318
T4	1	103.00±00.00	0.863±0.000
Lymph node metastasis			
N0	4	94.42±13.23	0.960±0.143
N1	24	74.89±36.19	0.728±0.284
N2	10	60.83±14.53	0.554±0.269
N3	11	76.88±28.46	0.695±0.413
Stage of disease			
Ib	2	95.00±18.86	1.068±0.122
II	6	75.11±22.18	0.589±0.265
IIIa	20	76.72±38.72	0.781±0.268
IIIb	10	60.83±14.53	0.554±0.269
IV	11	76.88±28.46	0.695±0.413
Vascular invasion			
Negative	14	77.10±37.11	0.868±0.226*
Positive	35	72.85±27.69	0.638±0.325*
Perineural invasion			
Negative	16	78.71±33.14	0.708±0.356
Positive	33	71.81±29.14	0.701±0.300
Lauren's classification			
Intestinal type	13	95.64±33.57 [†]	0.837±0.299
Mixed type	15	67.62±23.08 [†]	0.653±0.252
Diffuse type	21	65.30±27.29 [†]	0.657±0.354

*p<0.05 compared with the other subgroup; [†]p<0.01 compared with other subgroups.

조사대상인 VEGF 유전자와 내부 표준 유전자(internal-standard)로서 β actin 유전자를 사용하였는데 각 시발체의 감각쇄(sense) 및 항감각쇄(antisense)의 염기배열은 다음과 같다.

VEGF:

sense: 5'-AAGGGATCCCAGGCTGCACCCATGG-3',

antisense: 5'-GGCGAATTCCTCCTGCCCGGCTCAC-3',

β actin:

sense: 5'-CCAGAGCAAGAGAGGTATCC-3',

antisense: 5'-CTGTGGTGGTGAAGCTGTAG-3'

PCR reagent system (Gibcobral, USA)을 사용하여 PCR을 실시하였으며 PCR 산물에 대한 전기영동은 1.5% 한천 겔 상에서 100볼트의 전압 하에 50분간 실시하고 ethidium bromide 염색과정을 거친 후 자외선 투사기(ultraviolet transilluminator)위에서 mRNA의 발현유무를 확인하였다. 상기 시발체들에 의한 PCR 산물의 크기는 VEGF, β actin 이 각각 534염기쌍(base pairs, bp), 435 bp이므로, 전기영동 후 이 위치에서 각 유전자의 발현정도를 computerized image analyser를 이용하여 측정한 후 그 수치로서 조사대상 유전자와 β actin 유전자의 비를 구하여 각 환자간 상대적 비교자료로 이용하였다.

4) 면역조직화학적 염색

CD31에 대한 면역조직화학적 염색은 각 환자의 파라핀 포매조직에서 얻은 4 μ m 두께의 절편으로 시행하였다. 각각의 파라핀 포매조직 절편을 100% xylene에 방치하여 파라핀을 제거한 뒤, 100%, 95%, 85% 에탄올용액에서 단계적으로 함수화하였다. 3% 과산화수소수에 10분간 처리하

여 내인성 과산화효소의 작용을 억제시킨 뒤 극초단파 오븐에서 5분간 처리하고 Tris 완충액으로 3회 세척하였다. 차단 항체액을 조직에 도포한 후 상온에서 30분간 방치시킨 후 일차항체를 사용하였다. 일차항체는 antiCD31 antibody (Dako-CD31, DAKO, USA)를 1 : 20으로 희석하여 사용하였으며 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후 이차항체인 link antibody (DAKO, USA)를 상온에서 30분간 도포한 다음 Tris 완충액으로 3회 세척하였다. Streptavidin (DAKO, USA)으로 30분간 도포한 후, 발색제인 AEC (3-amino-9-ethyl-carbazole)를 가하여 10분간 발색시킨 뒤 Mayer's hematoxylin으로 대조 염색하였다.

염색결과와 판정은 200배 배율의 광학현미경으로 단위면적당 미세혈관 수가 가장 활발한 세개의 시야를 선택하여 혈관 수를 계산하고 그 평균값을 산출하여 대표값으로 사용하였다.

5) TNM 병기

위암의 해부병리학적 소견 및 병기는 병리조직보고서를 바탕으로 정리하였으며, 병기는 1997년도에 개정된 UICC (Union Internationale Contre le Cancer) TNM 분류법을 기준으로 하여 결정하였다.(17)

6) Statistical analysis

통계학적 분석은 paired t-test, Spearman's correlation analysis, Kruskal-Wallis test, Mann-Whitney test 및 chi-square test를 이용하였으며, 모든 통계처리는 SPSS/PC-WINDOW, VERSION 9.0 통계처리 프로그램을 이용하였다. 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 로 정의하였다.

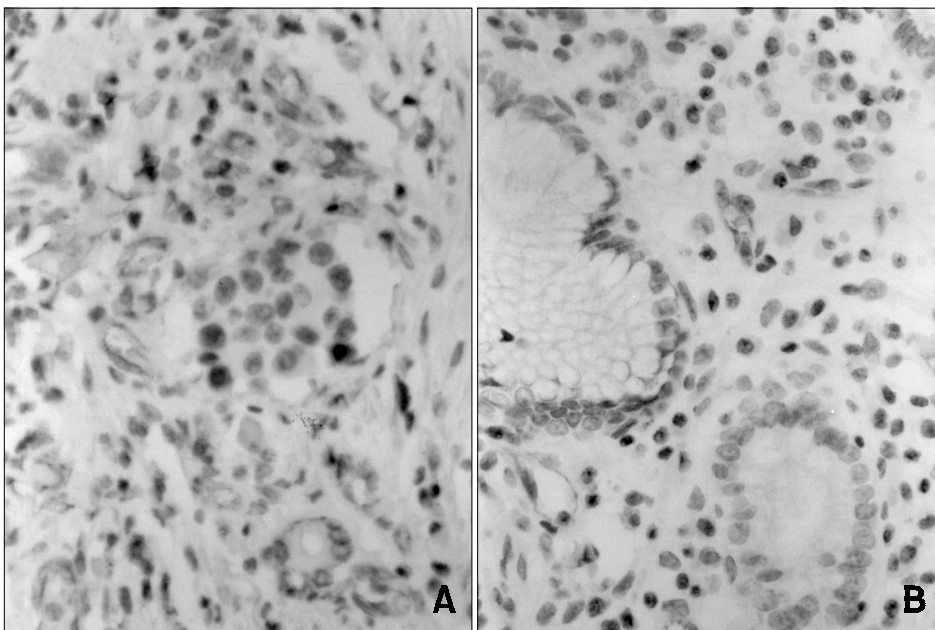


Fig. 1. Immunohistochemical stain for CD31. A) Gastric cancer tissue. B) Normal gastric tissue. Microvessels are markedly increased in gastric cancer tissue (A) than in normal gastric tissue (B).

Table 2. Comparison of microvessel count and VEGF/ β actin ratio between gastric cancer tissue and adjacent normal gastric tissue

	Gastric cancer tissue	Normal gastric tissue
Microvessel counts (No/ \times 200 microscopic field)	74.10 \pm 30.33*	24.69 \pm 10.11
VEGF/ β actin ratio	0.70 \pm 0.32*	0.51 \pm 0.26

Values are mean \pm standard deviation.

VEGF = vascular endothelial growth factor.

*p < 0.001 compared with normal gastric tissue.

결 과

대상이 된 49명의 환자는 남자 31명, 여자 18명이었으며, 연령은 21세에서 77세의 분포를 보였으며 중간연령은 58세였다. TNM 병기에 따른 환자의 분포는 stage Ib 2명, stage II 6명, stage IIIa 20명, stage IIIb 10명, stage IV 11명이었다(Table 1).

CD31 항체를 이용하여 염색한 위암조직 및 정상 위조직의 혈관내피세포는 Fig. 1과 같았다.

위암조직의 미세혈관 수는 평균 74.1 \pm 30.33 (mean \pm SD)개, 정상 위조직은 24.69 \pm 10.11개로 위암조직이 정상 위조직보다 미세혈관 수가 많았고(p < 0.001), 양성질환환자 10명의 정상 위조직은 23.40 \pm 6.77개의 미세혈관 수를 나타내어 위암환자의 정상 위조직과 차이를 보이지 않았다(Table 2, Fig. 2).

RT-PCR을 이용하여 측정된 VEGF/ β actin ratio는 위암조직이 평균 0.70 \pm 0.32 (mean \pm SD), 정상 위조직이 0.51 \pm 0.26으로서 유의한 차이를 보였다(p < 0.001, Table 2).

각 환자의 위암조직에서 측정된 VEGF/ β actin ratio와 미세혈관 수는 상관관계를 보였으며(p < 0.01, Fig. 3), 정상조직에서도 유사한 상관관계를 보였다(Spearman's correlation coefficient=0.346, p < 0.05).

위암조직의 미세혈관 수는 남성이 80.2 \pm 31.57개로서 여성의 63.4 \pm 25.48개보다 많았고(p < 0.05), Lauren 분류법에 따른 장형이 미만형보다 많은 미세혈관 수를 보였다(p < 0.01). VEGF/ β actin ratio는 남성이 여성보다 높았으며(p < 0.05), 혈관침습 유무에 따라 유의한 차이를 보였다(p < 0.05). 환자의 연령, 종양의 발생위치, 조직의 분화도, TNM분류법에 의한 병기, 종양의 위벽침습정도, 림프절전이정도, 신경주위침습 정도에 따른 미세혈관 수 및 VEGF/ β actin ratio의 차이는 관찰되지 않았다(Table 1).

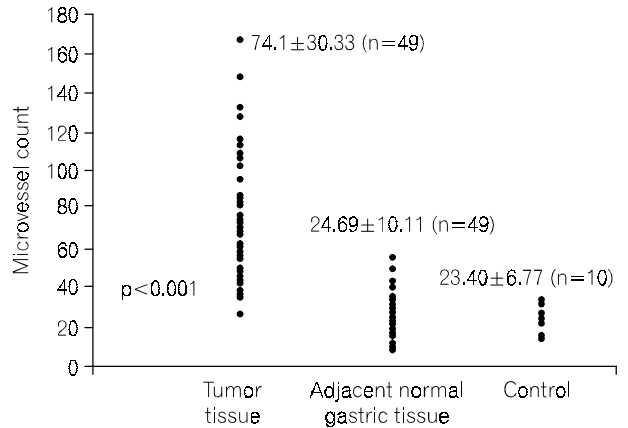


Fig. 2. Comparison of microvessel counts among the groups representing tumor tissue and adjacent normal gastric tissue from gastric cancer patients and normal gastric tissues from patients without gastric cancer (Mean \pm SD of each group is indicated. P-value means the significance of difference with other groups).

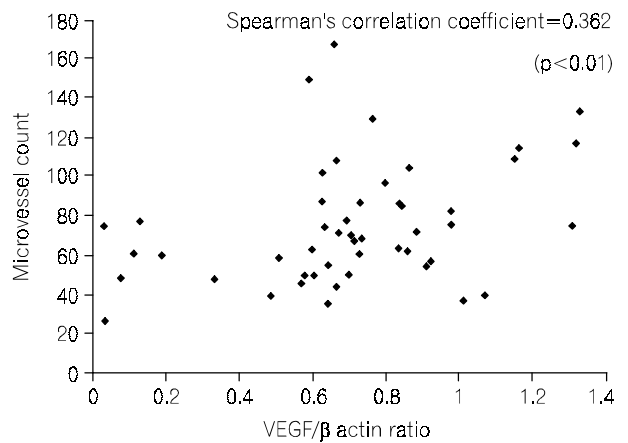


Fig. 3. Correlation between VEGF/ β actin ratio and microvessel count in gastric cancer tissue (n=49).

고 찰

정상 생리적 환경 하에서 혈관형성은 상처치유나 배란, 태아발육 등의 경우를 제외하고 극히 제한적인데, 이는 신체 내에서 발생하는 자극인자와 억제인자 사이의 적절한 균형유지에 의하며 고휘암이 발생하는 과정 중에 이러한 균형이 파괴되면서 혈관형성이 유도되는 것으로 여겨진다.(3) 한 예로서 혈관형성 억제단백인 thrombospondin의 유전자는 종양억제 유전자로서 암성변이과정에서 발현이 억제되며 이 과정에서 혈관형성이 유도된다.(8,18)

종양조직과 정상조직에서 관찰되는 혈관형성은 본 연구에서도 뚜렷한 차이를 보였는데, 200배 시야에서 관찰

한 미세혈관 수는 위암조직에서 74.1 ± 30.33 (mean \pm SD) 개, 정상조직에서 24.69 ± 10.11 개였으며, VEGF mRNA/ β actin비는 위암조직이 0.70 ± 0.32 , 정상조직이 0.51 ± 0.26 으로서 위암조직의 혈관성장인자의 발현과 미세혈관 수가 현저히 증가하였다($p < 0.001$). 위암이 없는 양성질환환자 10명을 대조군으로 하여 이들의 정상 위조직과 위암환자에서 채취한 정상 위조직을 미세혈관 수로서 비교한 결과, 양성질환 환자의 정상 위조직이 23.40 ± 6.77 개로서 위암환자의 정상 위조직과 차이를 보이지 않아 위암조직의 혈관형성에 관련된 인자들은 암조직내에서 국소적 작용을 하는 것으로 판단된다. Tahara 등(19)도 위암에서 분비되는 다양한 성장인자들은 주로 촉진기능을 가진다는 것을 소개한 바 있다. 그러나 Jensen 등(20)은 유방암 환자와 양성유방 질환 환자로부터 분리한 정상 유방조직을 암컷 뉴질랜드 백토의 홍체에 각각 이식하여, 이식된 조직으로부터 혈관형성이 형성되는 것을 비교한 결과 유방암 환자의 정상 유방조직이 혈관형성을 보다 적극적으로 유도하는 것을 확인한 바 있기 때문에, 악성종양 주위의 정상조직이 가지는 혈관형성능에 대한 분석은 각각의 악성종양을 대상으로 보다 광범위한 연구가 필요할 것이다.

암세포는 혈관형성을 자극하는 다양한 인자들을 분비함으로써 주위 염증세포 및 혈관내피세포의 증식과 활성화 유도를 하는데, 혈관형성은 이들 세포에서 분비되는 다양한 인자들의 상호작용에 의해 이루어지며, 염기성 섬유모세포 성장인자(bFGF), 전환 성장인자 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), 혈소판유래 증식인자(PDGF), 혈관내피세포 성장인자(VEGF) 등의 성장인자와 여러 가지 단백질분해효소 및 단백질분해억제효소 등이 관여한다.(3-5) 위암조직에서는 TGF- $\beta 1$, PDGF, FGF 등의 과발현에 관해 이미 보고된 바 있으며, 특히 세포의 분화도가 나쁜 경우나 침윤성이 강한 위암에서 발현빈도가 높게 관찰되어, 혈관형성과 관련된 인자의 발현이 위암의 병리적 특성에 영향을 미칠 수 있는 가능성을 시사한다.(19-21) 본 연구에서 조사된 VEGF mRNA도 정상조직에 비해 높게 측정되어 위암조직에서는 혈관형성에 관련된 다양한 인자들이 과발현하는 것으로 여겨진다.

혈관형성과 관련된 인자들 중에서 VEGF는 혈관내피세포의 증식을 자극하는 물질로서 혈관형성의 중요한 조절인자로 알려져 왔는데, VEGF의 수용체는 혈관내피세포에만 발현됨으로써 혈관내피세포의 유사분열을 선별적으로 유도하는 것으로 알려지고 있다.(22-24) Inoue 등(14)은 식도암에서 VEGF의 발현과 종양의 미세혈관 수를 조사한 결과 비례적인 관계가 있다고 하였는데, 본 연구에서도 위암조직에서 VEGF mRNA의 발현과 실제 측정된 미세혈관 수가 연관성을 가지는 것으로 나타나(Spearman's correlation coefficient=0.362, $p < 0.01$), VEGF의 발현은 조직의 혈관형성능과 밀접한 관계가 있는 것으로 여겨진다. 조직내의 미세혈관을 확인하기 위하여 일반적으로 사용되는

면역조직화학적 염색법은 신생혈관과 기존의 혈관을 정확히 구분하기 힘든 단점이 있기 때문에 암조직에서 발현되는 혈관성장인자에 대한 조사나 정상조직의 혈관분포양상을 같이 조사하여 비교하는 것이 결과해석에 도움이 될 것으로 판단된다. 본 연구에서는 위암 및 인근 정상 위조직의 VEGF mRNA의 발현정도와 미세혈관 수를 동시에 측정하여 위암환자의 혈관형성능을 분석하였다.

혈관형성능이 종양의 성장과 암세포의 조기전이에 관여할 수 있다는 이론적 배경을 바탕으로, 특정 고형암에서 혈관형성인자의 발현정도 및 미세혈관 수가 종양의 병리적 소견, 예후, 혹은 재발률 등 임상 결과에 미치는 영향에 대한 분석결과가 보고되고 있다. Sillman 등(7)은 자궁경부암환자에서 질경을 이용하여 신생혈관으로 보이는 비정상적 혈관의 분포상태를 조사한 결과, 비정상적 혈관이 관찰된 환자의 82%에서 침윤성 병변을 확인하였다. Srivastava 등(10)은 피부에서 발생한 흑색종 환자를 대상으로 종양기저부의 혈관 분포를 조사한 결과 종양기저부의 혈관분포가 주변의 정상부위보다 유의하게 많았고, 비재발환자보다 재발환자에서 혈관면적이 2배 이상 큰 것으로 나타나, 종양부위의 혈관형성정도는 종양의 두께와는 독립적으로 종양의 전이와 재발 등 예후에 영향을 미칠 수 있는 요인이 될 수 있을 것이라고 하였다. Weidner 등(8)은 유방암 환자의 혈관형성능은 암세포의 림프절 전이와 연관이 있으며 200배 시야에서 혈관수가 100개 이상인 경우 림프절전이가 모두 관찰되었다고 하였다. Bosari 등(25)은 종양의 미세혈관 수가 종양의 악성도, 암세포의 혈관침윤 정도와 연관성을 가지지만, 종양의 크기, ploidy status, 종양의 proliferative S-phase fraction 등과는 연관성이 없다고 하였다. Weidner 등(9)은 전립선암에서 조직분화도가 나쁠수록 평균 혈관수가 많이 관찰되었으며 종양내 미세혈관 수의 측정은 임상에서 쉽게 이용할 수 있는 예후 관련검사로 의의가 있다고 하였다. Gasparini 등(12)은 폐암, 전립선암, 두경부상피세포암 등에서 혈관 수는 암세포의 전이 정도와 연관이 있어 환자의 예후에 중요한 정보를 제공해 줄 수 있을 뿐만 아니라 향후 임상적용이 예상되는 혈관형성 억제제의 효과판정을 위한 중요한 기준이 될 수 있기 때문에 암조직에서 혈관수의 측정은 임상적으로 중요한 의의를 가지게 될 것이라고 하였다. Maeda 등(13)은 124명의 환자로부터 얻은 위암조직에서 anti Factor VIII-related antigen (FVIII-RA) 항체를 이용하여 면역조직화학적 검사를 시행한 결과, 혈관 수는 병기, 림프절 전이, 예후에 영향을 미치며 특히, 독립적 예후인자로서 의의가 있다고 한다. Inoue 등(14)은 VEGF의 발현양상이 식도암의 분화도, 병기, 암세포의 혈관침습, 예후 등과 연관성을 가지는 것으로 보고한 바 있으며, Tanigawa 등(26)도 식도암 조직의 혈관수는 환자의 재발위험성을 구별할 수 있는 예후인자로서 의의가 있다고 하였다. 송 등(27)은 62명의 위암

환자에서 anti FVIII-RA 항체를 이용하여 암조직의 미세혈관 수를 측정된 결과, 미세혈관 수는 암의 위벽 침윤정도, 림프절 전이, 신경주위 침습정도와 상관관계를 가지며 예후인자로서의 의의는 없다고 하였다. 본 연구에서 위암조직의 미세혈관 수는 환자의 성별에 따른 차이를 보였는데 ($p < 0.05$), 남성에서 높은 수치가 관찰되었고 이는 VEGF mRNA의 측정치에서도 같은 결과가 나타나 성별에 따른 혈관형성능의 차이를 확인할 수 있었다($p < 0.05$). Lauren 분류법에 따른 조직형에서 장형이 미만형보다 미세혈관 수가 높은 것으로 측정되었으나($p < 0.01$), VEGF mRNA의 발현차이는 없었다. 성별 및 Lauren 분류법에 따른 혈관형성능의 차이에 관한 분석은 다른 문헌에서 보고되지 않아 비교검토할 수 없었다. VEGF mRNA의 발현은 암세포의 혈관침습 유무에 따라 유의한 차이를 보였고($p < 0.05$), 병기, 림프절 전이 정도에 따른 발현의 차이를 보이는 경향은 있었으나 통계적 의의는 없었다. 조직의 분화도, 병기, 발생부위, 종양의 크기, 림프절의 전이 정도, 신경주위 침습 등에 따른 미세혈관 수 및 VEGF mRNA의 발현차이는 관찰할 수 없어 앞서 보고된 문헌과는 차이를 보였다. 생체내의 암조직에서 미세혈관 수로 대표되는 혈관형성능이 종양의 성장과 전이에 영향을 미칠 수 있는 이론적 근거는 충분히 고려될 수 있지만 혈관형성능이 이와 같은 병리적 진행과정을 결정할 수 있는 충분한 조건은 아닌 것으로 보이며, 암조직이 성장하고 전이를 일으키는 특성을 규명하기 위해서는 혈관형성능뿐만 아니라 관련된 다른 인자들에 대한 종합적 분석도 필요할 것으로 여겨진다.

혈관형성에 관한 문헌고찰에서 같은 종류의 암조직에서 미세혈관 수를 측정하더라도 연구자에 따라 결과가 서로 다른 경우가 있다. 이는 방법론적인 차이가 중요한 요인이 되는 것으로 보이며, 사용한 단클론 항체의 종류에 따라, 혹은 염색된 혈관을 판정하는 방법에 따라 결과가 다르게 나타나는 것으로 보인다.(12) 최근에 이용되기 시작한 CD31 (platelet endothelial cell adhesion molecule)항원 혹은 CD34 항원에 대한 단클론항체는 anti FVIII-RA 항체처럼 사용하기가 용이하고 anti FVIII-RA 항체보다 혈관내피세포에 대한 민감성과 정확도가 뛰어난 장점이 있으나 형질세포와 교차 반응을 보여 판독시 주의를 요하는 단점이 있다.(8,11,28) 본 연구에서는 CD31 항체를 사용하여 위암조직의 미세혈관을 염색한 결과, 200배 시야의 암조직에서 평균 72개의 혈관분포가 관찰되었는데 이는 송등(27)이 anti FVIII-RA 항체를 이용하여 측정한 평균 62개보다 높았고, Maeda등(13)이 위암조직에서 anti FVIII-RA 항체를 이용하여 측정한 평균 17.3개와는 큰 차이를 보이고 있다. Gasparini등(12)도 유방암조직에서 CD31 항체와 anti FVIII-RA 항체를 각각 사용하여 미세혈관 수를 측정하였을 때 중앙값이 각각 82개, 56개로 역시 CD31 항체의 민감성이 높은 것으로 나타났다. Tanigawa등(26)은 식도암에

서 anti FVIII-RA 항체와 CD34 항체를 각각 사용하여 측정한 결과 혈관 수가 약 3배정도의 차이를 보였다고 한다. 이와 같이 측정된 혈관수의 차이는 이후의 분석과정에 영향을 미칠 수 있게 되므로, 연구기법의 차이에 따른 결과의 차이를 극복하고 연구간 비교가 정확하게 이루어지기 위해서는 실험방법의 표준화 논의가 필요할 것으로 보인다.

악성종양의 종류에 따라 차이는 있지만 암조직의 혈관형성능이 가지는 임상적 의의가 확인되면서 최근에는 혈관형성을 억제하는 방법들이 소개되고 있어 이를 응용한 임상 치료법에 대한 연구가 활기를 띠고 있다.(16,18) Crum등(29)은 모세혈관의 기저막을 용해함으로써 혈관의 퇴화를 유도하는 angiostatic steroids를 발견하여 비정상적인 혈관형성이 주된 병리역할을 하는 질환에 대한 새로운 치료법의 개발 가능성을 제시하였는데, 고형암의 혈관형성능을 억제하여 얻을 수 있는 임상적 효과에 대해서는 아직 구체적인 연구결과가 없으나, 최근 AGM-1470 혹은 TNP-470 등으로 알려진 angiostatin이 별다른 부작용 없이 종양의 성장을 억제하는 것으로 보고되기도 하여, 향후 악성종양에 대한 새로운 임상적 치료법으로서 긍정적인 평가를 받고 있다.(30)

지금까지 진행성 위암에 대한 수술적 치료 후 기존의 보조요법들이 만족할 만한 성적을 보이지 못하고 있기 때문에, 위암의 치료율을 높이기 위해서는 새로운 형태의 치료법이 개발되어야 할 필요성이 크다. 본 연구의 결과에서 확인한 것처럼, 정상조직에 비해 위암조직 내의 미세혈관 수 및 VEGF mRNA의 발현이 크게 증가하고 암조직의 일부 병리소견과 연관성을 보인 점은 진행성 위암에 대한 혈관형성 억제제의 임상 효과를 기대할 수 있게 하며, 이는 향후 위암의 치료에 대한 새로운 접근방법으로서 중요한 의미를 가질 것으로 생각한다.

결론

위암 환자의 위암조직과 정상 위장조직에서 혈관형성에 관여하는 인자인 VEGF 유전자 발현과 조직내의 미세혈관 분포를 조사하여 위장조직의 혈관형성능의 양상을 분석하고, 위암조직의 혈관형성능이 병리학적 소견과 어떠한 연관성을 가지는지 조사함으로써 위암에서 혈관형성능이 가지는 임상적 의의를 확인하고자 본 연구를 수행하였다.

대상이 된 49명의 환자는 남자 31명, 여자 18명이었으며, 연령은 21세에서 77세의 분포를 보였으며 중간연령은 58세였다. TNM 병기에 따른 환자의 분포는 stage Ib 2명, stage II 6명, stage IIIa 20명, stage IIIb 10명, stage IV 11명이었다.

위암조직이 정상 위조직보다 미세혈관 수가 많았고($p < 0.001$), 양성질환 환자 10명의 정상 위조직은 위암환자의

정상 위조직과 차이를 보이지 않았다. RT-PCR을 이용하여 측정된 VEGF/ β actin ratio는 위암조직이 정상 위조직보다 강하게 발현하였고($p < 0.001$), 각 환자의 위암조직에서 측정된 VEGF/ β actin ratio와 미세혈관 수는 상관관계를 보였으며($p < 0.01$), 정상조직에서도 유사한 상관관계를 보였다($p < 0.05$).

위암조직의 미세혈관 수는 남성이 여성보다 많았고($p < 0.05$), Laurens 분류법에 따른 장형이 미만형보다 많은 미세혈관 수를 보였다($p < 0.01$). VEGF/ β actin ratio는 여성보다 남성에게서 높았으며($p < 0.05$), 혈관침습 유무에 따라 유의한 차이를 보였다($p < 0.05$).

이상의 결과에서 위암조직의 VEGF 유전자 발현과 미세혈관 수가 정상조직에 비해 현저히 높게 나타나 위암조직에서 혈관형성능이 강하게 형성되는 것을 알 수 있었고, VEGF의 발현 정도는 조직에서의 미세혈관 수와 밀접한 연관성을 보여 위암조직에서 VEGF는 혈관형성능의 결정에 중요한 역할을 하는 한 가지 인자로 판단된다. 정상조직에 비해 위암조직내의 미세혈관 수 및 VEGF mRNA의 발현이 크게 증가하고 암 조직의 일부 병리소견과 연관성을 보인 점은 진행성 위암에 대한 혈관형성 억제제의 임상 효과를 기대할 수 있게 하며, 이는 향후 위암치료에 대한 새로운 접근방법으로서 중요한 의미를 가질 것으로 생각한다.

REFERENCES

- 1) Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990;82:4-6.
- 2) Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;18:1182-6.
- 3) Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987;235:442-7.
- 4) Pepper MS, Belin D, Montesano R, Orci L, Vassalli JD. Transforming growth factor-beta 1 modulates basic fibroblast growth factor-induced proteolytic and angiogenic properties of endothelial cells in vitro. *J Cell Biol* 1990;111:743-55.
- 5) Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. *Cancer: principles & practice of oncology*. 4th ed. Philadelphia: JB Lippincott Co; 1993. p.134-149.
- 6) Yamazaki K, Abe S, Takekawa H, Sukoh N, Watanabe N, Ogura S, et al. Tumor angiogenesis in human lung adenocarcinoma. *Cancer* 1994;74:2245-50.
- 7) Sillman F, Boyce J, Fruchter R. The significance of atypical vessels and neovascularization in cervical neoplasia. *Am J Obstet Gynecol* 1981;139:154-9.
- 8) 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.
- 9) 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.

- 10) Srivastava A, Laidler P, Davies RP, Horgan K, Hughes LE. The prognostic significance of tumor vascularity in intermediate-thickness (0.76~4.0 mm in thick) skin melanoma. *Am J Pathol* 1988;133:419-23.
- 11) Horak E, Leek R, Klenk N, LeJeune S, Smith K, Stuart 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.
- 12) Gasparini G, Weidner N, Bevilacqua P, Maluta S, Dala Palma P, Caffo O, et al. Tumor microvessel density, p53 expression, tumor size, and peritumoral lymphatic vessel invasion are relevant prognostic markers in node-negative breast carcinoma. *J Clin Oncol* 1994;12:454-66.
- 13) Maeda K, Chung YS, Takatsuka S, Ogawa Y, Sawada T, Yamashita Y, et al. Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence in gastric carcinoma. *J Clin Oncol* 1995;13:477-81.
- 14) Inoue K, Ozeki Y, Sukanuma T, Sugiura Y, Tanaka S. Vascular endothelial growth factor expression in primary esophageal squamous cell carcinoma-association with angiogenesis and tumor progression. *Cancer* 1997;79:206-13.
- 15) Fidler IJ, Ellis LM. The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. *Cell* 1994;79:185-8.
- 16) Anderson IC, Shipp MA, Docherdyt AJ, Teicher BA. Combination therapy including a gelatinase inhibitor and cytotoxic agent reduces local invasion and metastasis of murine Lewis lung carcinoma. *Cancer Res* 1996;56:715-8.
- 17) UICC. *TNM atlas*. 4th ed. Berlin: Springer; 1997. p.81-92.
- 18) Rastinejad F, Poverini PJ, Bouck NP. Regulation of the activity of a new inhibitor of angiogenesis by a cancer suppressor gene. *Cell* 1989;56:345-55.
- 19) Tahara E, Yokozaki H, Yasui W. Growth factors in gastric cancer. In: *Gastric cancer*. 1st ed. Springer-Verlag; 1993. p.209-17.
- 20) Jensen HM, Chen I, DeVault MR, Lewis AE. Angiogenesis induced by "normal" human breast tissue: a probable marker for precancer. *Science* 1982;218:293-5.
- 21) Yasui W, Sumiyoshi H, Hata J, Kameda T, Ochiai A, Ito H, et al. Expression of epidermal growth factor receptor in human gastric and colonic carcinomas. *Cancer Res* 1988;48:137-41.
- 22) Gospodarowicz D, Abraham JA, Schilling J. Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculostellate cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:7311-5.
- 23) Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989;246:1306-9.
- 24) De Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 1992;255:989-91.
- 25) Bosari S, Lee AK, DeLellis RA, Wiley BD, Heatley GJ, Sil-

- verman ML. Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma. *Hum Pathol* 1992;23:755-61.
- 26) Tanigawa N, Matsumura M, Amaya H, Kitaoka A, Shimomatsuya T, Lu C, et al. Tumor vascularity correlates with the prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 1997;79:220-5.
- 27) Song SH, Park KH, Joo DH, Lee HI, Park SH, Yoo YO, et al. Clinical significance of tumor angiogenesis in gastric carcinoma. *J Korean Surg Soc* 1999;56:84-90.
- 28) 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.
- 29) Crum R, Szabo S, Folkman J. A new class of steroids inhibits angiogenesis in the presence of heparin or a heparin fragment. *Science* 1985;230:1375-8.
- 30) Ingber D, Fujita T, Kishimoto S, Sudo K, Kanamaru T, Brem H, et al. Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumor growth. *Nature* 1990;348:555-7.
-