

췌장암에서 맥관형성과 p53 단백질 발현의 의의

동아대학교 의과대학 외과학교실, ¹병리학교실

김 상 순 · 김 민 찬 · 홍 숙 희¹

Significance of Tumor Angiogenesis and p53 Protein Expression in Pancreatic Adenocarcinoma

Sang Soon Kim, M.D., FACS, Min Chan Kim, M.D. and Sook Hee Hong, M.D.¹

Purpose: This study was designed to examine the microvessel count and p53 protein expression level in pancreatic adenocarcinoma patients and to determine how they correlate with the clinicopathologic factors and prognosis. In addition, the relationship between angiogenesis and p53 protein expression in pancreatic adenocarcinoma patients was investigated.

Methods: Paraffin-embedded tumor tissues from 30 patients with pancreatic adenocarcinomas that were completely removed by a radical resection were retrieved and analyzed. The vessels were immunostained with anti-factor VIII polyclonal antibodies, and 5 areas with the most discrete microvessels were counted under a $\times 200$ field. The mean was calculated, which was defined as the angiogenesis score (AS). p53 protein expression was detected by the immunohistochemical stain method.

Results: The mean AS was 37.7 ± 13.6 . There were no significant differences in sex, age, tumor size, histologic grade, T category (depth of invasion), N category (lymph node metastasis), pathologic stage and recurrence between the high and low AS group. The p53 protein expression rate was 73.3%, which did not correlate with the clinicopathologic factors and AS. However, recurrence was significantly related to the histologic grade and pathologic stage ($p=0.040$ and $p=0.029$). Among the various clinicopathologic factors, the N category (lymph node metastasis), the AS and recurrence ($p=0.025$, $p=0.029$ and $p=0.003$) were statistically significant according to a univariate survival analysis. In the

Cox regression analysis, the N category (lymph node metastasis) and recurrence were independent prognostic factors (odds ratio=4.344, 4.263).

Conclusion: Although the survival rate in the high AS group was significantly lower than that in low AS group ($p=0.029$), the angiogenesis assessed by the microvessel count using immunohistochemical staining was not an independent prognostic factor in the Cox regression analysis. (*J Korean Surg Soc* 2001;61:86-94)

Key Words: Pancreatic adenocarcinoma, Tumor angiogenesis, p53 protein, Prognosis, Recurrence

중심 단어: 췌장선암종, 종양맥관형성, p53 단백질, 예후, 재발

Departments of Surgery and ¹Pathology, Dong-A University College of Medicine, Busan, Korea

서론

췌장암의 발생 빈도는 미국에서 드물지 않아 매년 약 28,000명이 새로이 진단되고,⁽¹⁾ 한국에서는 암발생 순위 10위에 해당하는 악성 종양이지만⁽²⁾ 국내에서도 서구화된 식생활 양식으로 인하여 점점 증가 추세에 있다. 그러나 임상적으로 췌장암은 해부학적 위치와 생리학적으로 인하여 조기 진단이 힘들고 근치적 절제술을 시행한 후에도 국소 재발이나 원격 전이가 흔하여 외과 영역의 악성 종양 중에서 예후가 매우 나쁜 질환 중의 하나이다.

맥관형성은 정상적으로 개체의 발생, 배란, 염증 및 치유 등의 경우에 관찰되나, 보통은 체내에서 엄격히 통제되므로 관찰하기 힘들다.⁽³⁾ 이러한 맥관형성은 당뇨병성 망막증을 비롯한 몇가지 비종양성 병변의 병인 기전으로 중요한 역할을 하며⁽⁴⁾ 특히 종양의 성장 및 전이에 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.^(5,6) 즉 종양의 성장 및 전이에는 맥관형성이 필수적이며 종양 내 혈관의 밀도가 높을수록 전이가 흔히 발생하여 유방암,⁽⁷⁾ 폐암,⁽⁸⁾ 전립선암⁽⁹⁾ 그리고 직장암⁽¹⁰⁾ 등에서 생존율 및 예후에 영향을 미친다는 보고가 있으나 췌장암에 대한 연구는 드물

책임저자 : 김민찬, 부산시 서구 동대신동 3가 1번지
☎ 150-020, 동아대학교 의과대학 외과학교실
Tel: 051-240-5146, 5147, Fax: 051-247-9316
E-mail: 67kmc@hanmail.net

접수일 : 2001년 1월 19일, 게재승인일 : 2001년 6월 18일
이 논문은 동아대학교 2000년도 교내학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

다. 종양의 발생에 관여하는 유전자 중 p53 종양억제 유전자는 17번 염색체의 단완에 존재하는데 위암, 췌장암, 유방암, 전립선암, 폐암 등 대부분의 인체 암 발생에 관여하는 것으로 알려져 있다.(11,12) p53 유전자는 정상적으로 세포의 생성을 조절하고 세포자멸(apoptosis)을 유도하는 기능을 가지고 있는데 이 유전자의 변이는 이러한 두 조절 능력을 상실하게 되고 그로 인하여 암이 유발되는 것으로 알려져 있다.(12,13) 최근 p53 종양억제 유전자가 맥관형성 억제물질의 하나인 thrombospondin의 형성에 관여한다는 보고와 함께(14) 동물 실험에서 유도된 췌장암이 항 맥관 신생 치료제로 암 크기가 감소했다는 보고가 있다.(15)

이에 저자들은 췌장암에서 맥관형성과 p53 단백질 발현의 상관관계를 알아보고 종양 내 맥관형성과 p53 단백질 발현이 췌장암의 임상 및 병리학적 예후인자, 종양 재발 및 생존율에 어떠한 영향을 미치는가를 알아보고자 하였다.

방 법

1) 연구대상

1992년 1월부터 1999년 12월까지 동아대학교병원에서 췌장선암으로 진단 받은 후 외과에서 수술을 받은 51명 중 근치적 절제술을 시행하지 못한 자들과 수술 당시 원격 전이가 있었던 자 17명을 제외하고 추적 조사가 불가능한 2예와 수술 후 합병증으로 사망한 2예를 제외한 30예를 대상으로 후향적 연구를 시행하였다.

2) 연구방법

(1) 임상적 및 병리학적 분석: 임상 정보는 환자의 병력지, 암등록 기록지와 개인적 면담과 전화 통화를 통해서 수집되었으며 병리 기록을 통하여 종양의 크기, 위치, 분화도, 종양의 병기 등과 같은 종양의 특성을 상세히 조사하였다. 조직 절편은 종양의 이질적 성질을 감안하여 종양세포의 침습 변연부를 선택하여 hematoxylin-eosin (H-E) 염색과 면역조직화학적 염색을 시행하였다. 연구대상의 종양조직 표본은 우선 H-E 염색하에서 재검색하여 진단을 확인하였으며, 이들을 다시 고분화형, 중등도 분화형, 저분화형 선암으로 분류하였다. 종양의 병기는 1997년 AJCC (American Joint Committee on Cancer) 분류법을 기준으로 하였다. 추적 관찰 기간은 4개월부터 40개월까지이었다.

(2) 면역조직화학적 염색: 총 30명의 환자에서 절제한 췌장 조직을 10% 중성 포르말린 용액에 고정하고 파라핀에 포매하여 만든 H-E 염색표본을 재검색하고, 종양의 변연부 절편 조직에서 혈관과 p53에 대한 면역조직화학적 염색을 통상적인 avidin-biotin-peroxidase complex 방법으로 시행하였다. 이때 사용한 일차 항체는 혈관 염색에서는

factor VIII-related antigen/von Willebrand's factor에 특이한 antifactor VIII polyclonal antibody (Dako, USA)를 200배 희석하여 사용하였고, p53 염색에서는 정상형과 돌연변이형의 p53 단백질에 모두 반응하는 monoclonal mouse anti-human p53 protein (DO-7)(Dako, USA)를 50배 희석하여 사용하였다.

염색 과정은 파라핀에 포매한 암조직을 4 μ M 두께로 잘라 슬라이드에 부착하여 파라핀을 제거한 후 여러 단계의 알코올을 거쳐 합수시켰다. 종양조직 내 항원 단백을 회복하고 예민도를 높이기 위하여 전처리 과정으로 슬라이드를 0.01 M sodium citrate buffer (pH 6.0) 용액에 담구어 15분간 전자파로 가열하였다. 3% H₂O₂에 10분간 담구어 내인성 peroxidase 활동을 저지키시고, 비특이적 결합을 억제하기 위하여 non-immune serum으로 실온에서 20분간 반응시키고 TBS 완충액으로 20분간 수세하였다. 희석한 일차 항체와 4°C에서 하룻밤 반응시킨 후 TBS 완충액으로 10분간 씻었다. 이차 항체인 biotinylated polyvalent antibody (Histostain-plus, Zymed, San Francisco, CA, USA)와 10분간 반응시킨 후 TBS 완충액으로 씻고 HRP-streptavidine과 15분간 반응시켰다. 다시 TBS 완충액으로 씻고 AEC로 10분간 발색시킨 후 물로 세척하고 hematoxylin으로 3분간 대조염색을 한 후 물로 씻고 crystal mount로 봉입하여 현미경으로 검경하였다. 음성 대조군의 염색은 일차 항체 대신 일차 항체 희석액을 사용한 것 외에는 모든 과정에서 같은 시약을 사용하여 동일한 방법으로 시행하였다.

(3) 면역조직화학적 염색의 판독: Factor VIII 항원 발현에 대한 조직 표본의 판독은 환자의 임상 및 병리학적 정보를 모르는 두 병리 의사에 의해 이루어졌는데 두 사람이 동시에 접안경이 두 개인 현미경하에서 동일한 시야를 결정, 판독하면서 두 사람의 동의하에서 혈관의 수를 계산하는 방식으로 진행되었다. 우선 저배율($\times 40$)의 광학현미경 하에서 종양의 변연부 침습 병소 중 미세혈관 분포의 밀도가 가장 높은 곳을 선택한 후 이 부위를 200배율(대물 $\times 20$, 대안 $\times 10$; 0.785 mm²/field)하에서 염색된 혈관의 수를 헤아렸다. 양성으로 염색된 혈관 내피세포는 붉은 갈색으로 관찰되는데(Fig. 1), 이때 갈색으로 염색되는 어떠한 단일 세포 또는 세포 집단도 주위 혈관, 세포 그리고 결합 조직 구조와 명확히 구분되기만 하면 하나의 양성 혈관으로 간주하였으며, 200배의 배율하에서 최소한 5 곳을 무작위로 선택하여 혈관의 수를 헤아리고 평균하여 이를 맥관형성 점수(angiogenesis score, 이하 AS)로 하였다.

p53 단백질 발현의 분석은 염색된 췌장암 조직을 광학현미경에서 관찰하여 세포핵이 적갈색으로 염색되면 양성 반응으로 판독하였다(Fig. 2). 종양 주위 정상 췌장 조직의 세포핵이 음성인지를 확인하고, 각 종양조직에서 염색되는 종양세포가 전혀 염색되지 않거나 종양세포의 5% 미만에서 염색된 종양은 p53 단백질 발현 음성(-) 종양으로

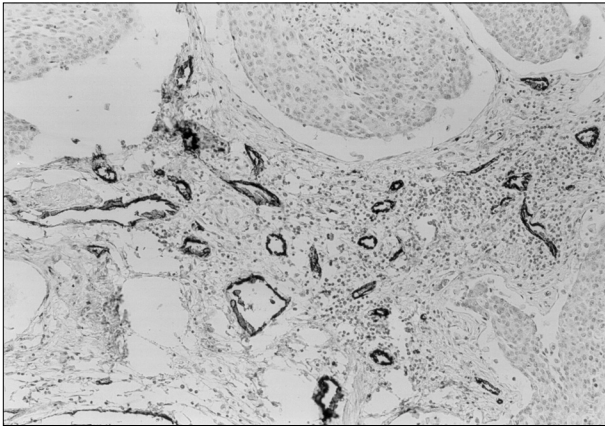


Fig. 1. The pancreatic carcinoma shows high number of microvessels positive for factor-VIII stain (Immunohistochemical stain for factor VIII-related antigen, $\times 100$).

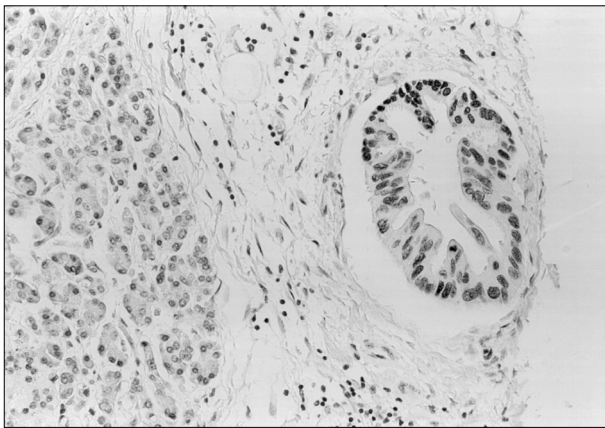


Fig. 2. The pancreas shows positive nuclear staining of a neoplastic duct for p53 (Immunohistochemical stain for p53, $\times 100$).

정의하였고, 5%에서 25%의 종양세포가 염색되면 (+), 25%에서 50%이면 (++) 그리고 50% 이상에서 염색되면 (+++)으로 판정하였으며 (+) 이상이면 p53 단백질 발현 양성종양으로 최종 판정하였다.

(4) 통계 분석: 통계학적 분석은 unpaired t-test, Fisher's exact test, chi-squared test, multiple regression를 이용하였으며 통계 처리는 GraphPad Prism[®] (version 3.0; GraphPad software Inc, San Diego, CA)을 이용하였다. 생존자료는 Kaplan-Meier 법으로 계산하였고 log-rank test로 생존율을 비교하였다. 다변량 생존분석은 Cox regression model로 산출하였고 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 수준의 경우로 하였다.

결 과

1) 임상 분석

총 30예 중 남자는 15예, 여자가 15예이었다. 환자의 연

령 분포는 39세에서 70세까지이며, 50대와 60대가 각각 10명(33.3%)으로 가장 많았다. 대상 환자의 평균 연령은 54.5세이었다. 종양의 TNM과 병기는 T category에서 T₁이 1예(3.3%), T₂가 4예(13.3%) T₃가 13예(43.3%) 그리고 T₄가 12예(40.0%)이었다. N category는 N₀가 15예(50.0%) pN_{1a}가 7예(23.3%) 그리고 pN_{1b}가 8예(26.7%)였다. 1병기는 5예(16.7%), 2병기는 5예(16.7%), 3병기는 8예(26.7%), 4A병기는 12예(40.0%)이었다(Table 1).

2) 종양의 위치별 수술방법

종양의 위치는 췌장 두부 21예(70.0%), 체부 3예(10.0%), 미부 6예(20.0%)이었고 수술은 두부인 경우 휘플서 수술 (Whipple's operation) 12예, 유문보존췌십이지장절제술 (pylorus preserving pancreaticoduodenectomy, PPPD) 6예, 전췌장절제술 3예를 시행하였고 그 중 3예에서 간문맥 절제를 동반하여 시행하였다. 췌장 체부 3예는 췌장아전절제술 2예를 시행하였고 1예에서는 원위부 췌장절제술과 위아전절제술을 동반하여 시행하였다. 췌장 미부 6예에서는 전 예에서 원위부 췌장절제술을 시행하였고 그 중 4예에서 대장 혹은 소장절제술이 동반되었다(Table 2).

3) 맥관형성과 임상 병리학적 인자들과의 관계

총 30예의 췌장암 환자에서의 맥관형성 점수는 13.0에서 65.7까지이었으며, 평균 맥관형성 점수는 37.7이었다 (Table 3). 평균값을 기준으로 고 맥관형성군과 저 맥관형성군으로 나누었을 때 고 맥관형성군은 12예(40.0%) 그리고 저 맥관형성군은 18예(60.0%)이었다. 두 군간에서 여러 임상 및 병리학적 인자, 즉 나이, 성별, 종양의 크기, 조직학적 분화도, TNM 병기, 재발 유무의 빈도별 차이가 통계학적 유의성이 있는지를 조사하였는데 두 군간에 모든 비교 인자들의 분포의 차이는 통계학적으로 유의성이 없었다($p > 0.05$)(Table 1, 3).

4) p53 단백질 발현과 임상 병리학적 인자들과의 관계

면역조직화학적 염색에서 p53 단백질 양성군은 22예(73.3%) 음성군은 8예(26.7%)이었다. 두 군간에 모든 비교 인자들의 분포의 차이는 통계학적 유의성이 없었다($p > 0.05$)(Table 1).

5) 맥관형성과 p53 단백질 발현의 상관관계

p53 단백질 양성군과 음성군에서 맥관형성 점수를 비교하여 보았는데 평균 맥관형성 점수는 각각 36.5와 40.9로 p53 단백질 양성군에서 맥관형성 점수가 약간 낮았으나 통계학적 유의성은 없었다($p > 0.05$)(Table 4).

6) 재발과 병리적 인자들과의 상관관계

환자의 추적 조사 결과 30예 중 14예(46.6%)에서 재발

Table 1. Comparison of angiogenesis score and p53 protein expression with clinicopathologic factors

	No. of cases (%)	Angiogenesis score		p value	p53 protein expression		p value
		High	Low		Positive	Negative	
Sex							
Male	15 (50)	7	8	NS	10	5	NS
Female	15 (50)	5	10		12	3	
Age (years)							
30~39	3 (10.0)	1	2	NS	3	0	NS
40~49	6 (20.0)	1	5		4	2	
50~59	10 (33.3)	5	5		7	3	
60~69	10 (33.3)	5	5		7	3	
70~79	1 (3.3)	0	1		1	0	
Tumor size (cm)							
<2	1 (3.3)	1	0	NS	1	0	NS
2~4	9 (30.1)	3	6		5	4	
>4	20 (66.6)	8	12		16	4	
Histologic grade							
Well	11 (36.6)	3	8	NS	8	3	NS
Moderate	13 (43.3)	5	8		10	3	
Poor	6 (20.0)	4	2		4	2	
T category							
T1	1 (3.3)	1	0	NS	1	0	NS
T2	4 (13.3)	0	4		2	2	
T3	13 (43.3)	5	8		11	2	
T4	12 (40.0)	6	6		8	4	
N category							
N0	15 (50.0)	6	9	NS	10	5	NS
N1 pN1a	7 (23.3)	3	4		6	1	
pN1b	8 (26.6)	3	5		6	2	
Stage							
I	5 (16.6)	0	5	NS	3	2	NS
II	5 (16.6)	3	2		4	1	
III	8 (26.6)	3	5		7	1	
IV A	12 (40.0)	6	6		8	4	
Recurrence							
Positive	14 (46.6)	7	7	NS	11	3	NS
Negative	16 (53.4)	5	11		11	5	
Total	30 (100)	12 (40)	18 (60)		22 (73.3)	8 (26.7)	

NS = not significant.

이 확인되었는데 재발군과 비재발군에서의 종양의 분화도, T category, N category 그리고 병기와의 상관관계를 조사한 결과 조직 분화도가 나쁠수록 또 병기가 높을수록 재발의 빈도가 높은 것으로 나타났는데, 이 차이는 통계학적으로 유의하였다(p=0.040, p=0.029)(Table 5).

7) 맥관형성과 생존율

본 연구대상 환자의 중앙 생존기간은 10.5개월이며, 저 맥관형성군의 중앙 생존기간은 12.5개월이며 고 맥관형성군의 중앙 생존기간은 7.0개월로 저 맥관형성군이 고 맥관형성군에 비해 생존 기간이 약 5.5개월 더 길었는데 이

차이는 통계적으로 유의하였다(p=0.029)(Fig. 3).

8) p53 단백질 발현과 생존율

p53 단백질 음성군은 7.0개월, p53 단백질 양성군은 11.0개월로 p53 단백질 양성군이 p53 단백질 음성군에 비해 중앙 생존기간이 약간 더 길었으나 통계적으로 유의한 상관관계는 보이지 않았다(p>0.05)(Fig. 4).

Table 2. Tumor location and operation

	Whipple's op	PPPD*	TP†	SP‡	DP§
Head (n=21)	12 (2)	6	3 (1)		
Body (n=3)				2	1 [¶]
Tail (n=6)					4**/6

*PPPD = pylorus preserving pancreaticoduodenectomy; †TD = total pncreatectomy; ‡SP = subtotal pancreatectomy; §DP = distal pancreatectomy; ^{||} = with portal vein resection; [¶] = with subtotal gastrectomy; ** = with colectomy or with colectomy and small bowel resection.

Table 3. Distribution of angiogenesis score in pancreatic adenocarcinoma

Angiogenesis score	No. of cases (%)
10~19	3 (10)
20~29	7 (23.3)
30~39	8 (26.6)
40~49	4 (13.3)
50~59	6 (20.0)
60~69	2 (6.6)
Mean ± SD*	37.7 ± 13.6

*SD = standard deviation.

9) 생존율 및 예후인자

췌장암 환자의 생존율에 영향을 주는 예후인자를 알아보기 위하여 성별, 나이, 종양의 크기, 종양의 분화도, T category, N category, 종양의 위치, 술 후 수혈량, p53 단백질 발현 여부, 맥관형성 정도, 재발 등을 단변량 생존 분석을 시행한 결과 임파절 전이(N category, p=0.025), 맥관형성

Table 5. Comparison of pathologic factors between recurrence and no recurrence groups

	No. of cases (%)	Recurrence group	No recurrence group	p value
Histologic grade				0.040
Well	11 (36.6)	2	9	
Moderate	13 (43.3)	9	4	
Poor	6 (20.0)	3	3	
T category				NS
T1	1 (3.3)	0	1	
T2	4 (13.3)	0	4	
T3	13 (43.3)	7	6	
T4	12 (40.0)	7	5	
N category				NS
N0	15 (50.0)	5	10	
N1 pN1a	7 (23.3)	3	4	
pN1b	8 (26.6)	6	2	
Stage				0.029
I	5 (16.6)	0	5	
II	5 (16.6)	1	4	
III	9 (26.6)	6	2	
IV A	11 (36.6)	7	5	
Total	30 (100)	14 (46.6)	16 (53.4)	

NS = not significant.

Table 4. Correlation of p53 protein expression with angiogenesis score

		Total (%)	Angiogenesis score (%)		Mean angiogenesis score	p value
			High	Low		
p53 protein expression	Positive	22 (73.3)	8 (26.7)	14 (46.7)	36.5	NS
	Negative	8 (26.7)	4 (13.3)	4 (13.3)	40.9	
Total		30 (100)	12 (40.3)	18 (60.0)		

NS = not significant.

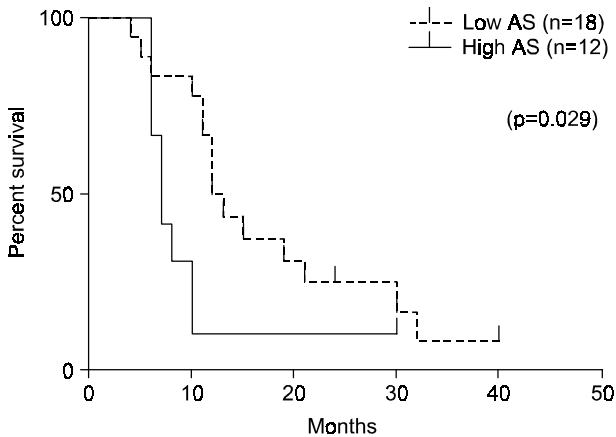


Fig. 3. Survival curves of high and low angiogenesis score (AS) patients with pancreatic adenocarcinoma after curative resection.

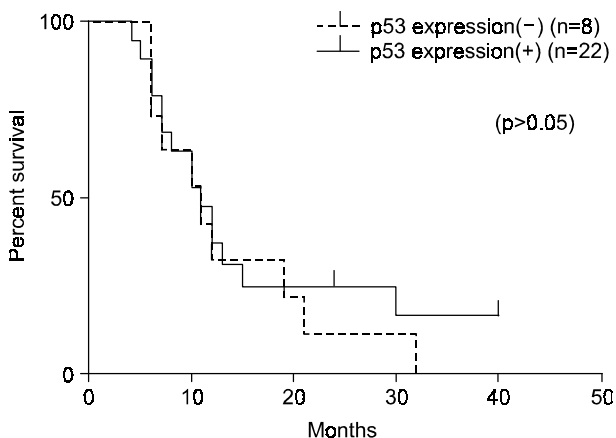


Fig. 4. Survival curves of p53 protein positive and negative patients with pancreatic adenocarcinoma after curative resection.

정도(p=0.029)와 재발(p=0.003)이 유의한 예후인자였다 (Table 6). 생존율에 영향을 미치는 각각의 독립적인 예후인자를 알아보기 위하여 단변량 생존분석에 사용하였던 인자들을 Cox proportional hazard regression model을 이용하여 다변량 생존분석을 시행한 결과 임파절 전이와 재발이 예후에 영향을 미치는 독립적인 인자였다(Table 7).

고 찰

췌장암은 치료가 어려운 대표적인 암으로 확대수술과 집약적 치료로 치료 성적을 향상시키려 하고 있으나 진단 당시 수술이 가능한 경우는 전체 췌장암 환자의 약 17% 정도이고 근치적 절제술을 받은 환자들에서 중앙 생존 기간은 14.3개월이며 5년 생존율은 10.2%에 불과하다.(16)

Table 6. Univariate survival analysis in pancreatic adenocarcinoma

Factors	p value
Sex	0.117
Age	0.160
Tumor size	0.891
Tumor grade	0.165
T category	0.111
N category	0.025*
Tumor location	0.241
Postop. transfusion	0.059
p53 protein expression	0.109
High AS	0.029*
Recurrence	0.003*

* = statistically significant.

Table 7. Multivariate survival analysis in pancreatic adenocarcinoma

Factors	Significance	Odds ratio
N category (lymph node metastasis)	0.0016	4.344
Recurrence	0.0055	4.263
High AS	0.0797	1.153

또한 수술 후 조기에 다발성 간전이나 복강내 범발성 전이가 잘되는 질환이기도 하다. 따라서 현재까지도 췌장암의 생존에 영향을 주는 예후인자에 대한 연구가 활발한데, Gebhardt 등(17)은 종양의 크기, 조직학적 분화도, 림프절 및 혈관 침윤 등이 중요한 예후인자임을 주장하였고, Magistrelli 등(18)은 림프절 전이가 췌장암 환자의 생존에 영향을 미치는 유일한 인자라고 주장하였다. 또한 최근 만성 췌장염과 췌장암에서 맥관형성을 조사하여 맥관형성도가 정상 췌장에서보다 상대적으로 높음을 밝혀내고 항 맥관형성적 치료가 췌장암의 치료와 예방에 도움이 될 것이라는 연구 발표도 있다.(19)

혈관내피세포는 정상적으로는 대단히 안정되어 있기 때문에 보통 증식을 위한 유사분열을 하기까지 수년이 걸릴 수도 있으나,(3) 발생과정이나 염증 및 치유과정, 비종양성 병변의 발병(4) 및 종양의 성장과정 중에는 내피세포가 자극을 받아 빠른 속도로 증식하여 대개 2~3일 이내 유사분열을 하므로 맥관형성이 활발하다.(6) 특히 종양의 성장에 있어 맥관형성의 역할은 대단히 중요하여(6) 종양이 주위 조직으로부터 혈관을 획득하여 혈액성분을 받기 시작하면 그 크기가 증가하고(20) 반대로 맥관형성의 증식이 억제되면 종양의 크기는 줄어든다.(21) 뿐만 아니라

종양의 전이가 이루어지기 위해서도 맥관형성이 반드시 선행되어야 하므로 악성종양에서 맥관형성의 변화와 림프절 전이와는 밀접한 상관관계가 있는 것으로 보고되고 있다.(22,23) 또한 이러한 맥관형성은 대부분 세정맥, 세동맥 및 모세혈관 등의 미세혈관으로 나타나므로 미세혈관 수가 전이와 밀접한 상관관계가 있다는 것으로 생각할 수 있다. 악성 종양의 성장 및 전이에 있어 중요한 역할을 하는 맥관형성의 기전은 주로 종양세포 자체에서 분비되는 여러 가지 성장인자들이 관여하는데 여기에는 fibroblast growth factor (FGF),(24) vascular endothelial growth factor (VEGF),(25) platelet endothelial growth factor (PDGF),(26) transforming growth factor (TGF)(26,27) 및 angiogenin 등 (28)이 있으며 이들은 맥관형성 능력에 있어 정도의 차이는 있으나 그 기전은 대개 유사하다. 즉 이들은 혈관 내피세포를 자극하여 내피세포의 증식을 초래하고 운동성을 증가시켜 기존 혈관으로부터 세포의 기질로 맥관형성을 유도하거나 혈관형성 유도물질을 분비할 수 있는 대식세포나 비만세포를 집합시켜 이런 물질의 분비를 초래하게 하여 맥관형성을 자극한다.(26,28) 또 종양세포나 자극받은 내피세포는 직접 collagenase 등과 같은 단백질 분해효소를 분비하므로 맥관형성의 기저막이 용해되어 불완전해지고 증식된 맥관형성 때문에 혈류량도 증가되어 종양세포가 쉽게 혈관내로 침입할 수 있게 되어 전이의 가능성이 높아진다.(21) 그리고 혈류를 따라 종양세포가 이동된 부위에서는 맥관형성이 왕성하여 많은 미세혈관을 보이는 종양은 그렇지 못한 종양에 비해 쉽게 정착이 가능해질 수 있으므로 전이가 완성될 수 있다.(29) 맥관형성과 병기, 전이 및 생존율에 대한 연구는 다양한 종양에 대해서 광범위하게 시행되어졌으며,(7-10) 이들을 통해 종양의 혈관 밀도는 종래의 예후인자들과 다변량 분석을 통해 비교한 결과 독립적인 예후인자로서 의의가 있음이 밝혀졌다. 췌장암에 대한 맥관형성에 대한 연구는 국내외적으로 매우 드물고 최근 실험동물에서 인간의 췌장암을 유도하고 항 맥관신생 약물을 투여하여 췌장암의 성장과 전이를 효과적으로 막았다는 보고가 있다.(30) 저자들의 췌장암 환자에서 맥관형성 점수는 13.0에서 65.7로 평균 37.7이었으며 고 맥관형성군과 저 맥관형성군 사이에서 종양의 크기, 분화도, T category, N category, 병기 및 재발빈도는 유의한 차이가 없었으나 생존기간에 있어서는 저 맥관형성군과 고 맥관형성군의 중앙 생존기간이 각각 12.5개월과 7.0개월로 저 맥관형성군에서 생존기간이 약 5.5개월 정도 더 길었고 이는 통계적으로 유의하게 큰 차이를 보였다. 저자들의 환자군에서 중앙 생존기간이 문헌들의 생존기간보다 짧은 것은 병기가 높은 환자들이 많은 것이 원인일 것으로 생각된다. 그러나 다변량 생존분석에서는 췌장암의 독립적인 예후인자로서 맥관형성이 통계학적으로 의미가 없었고 임파절 전이(N category)와 재발이 의미

가 있는 것으로 나타났다. 재발군과 비재발군에서 병리학적인 인자과의 상관관계에서 종양의 조직분화도가 나쁘고 병기가 높을수록 재발이 많아 조직학적 분화도와 병기와 유의한 관련성을 보여 주었다.

p53 종양억제유전자는 세포의 복제를 조절하는 인자로 세포주기의 G1기에 작용하여 세포의 증식을 조절하고 게놈의 안정을 유지하는 기능이 있으며, 이 유전자의 변이가 있을 때 세포조절 기능의 상실로 인하여 암을 유발하는 것으로 알려져 있다.(11,12) p53 유전자 변이 때 생성된 p53 단백질은 정상형 단백질보다 효소의 소화 작용에 안정적이므로 단백질의 반감기의 증가와 함께 세포 내 단백질 농도도 증가한다. 이것은 면역조직화학적 염색 때 측정된 p53 단백질에 의하여 양성반응으로 나타나므로 p53 유전자의 돌연 변이가 있음을 암시한다.(13) 췌장암에서 p53 단백질 발현에 대한 연구는 Pellegata 등(31)과 Berrozpe 등(32)이 보고하고 있으나 각각 p53 단백질의 검출 방법이 상이하여 직접적인 비교는 곤란하다. 본 연구에서는 면역화학적 방법을 이용하여 p53 단백질 발현여부를 알아보았는데 73.3% (22/30)로 나타났다. p53 단백질 발현과 췌장암의 임상조직학적 예후인자와의 비교에서 Sato 등(33)은 단백질 발현과 임상 및 병리학적인 예후인자들과는 무관하다고 주장한 반면, Pellegata 등(31)과 Berrozpe 등(32)은 분화도가 낮은 암과 진행된 암에서 p53 단백질 발현이 높다고 보고하였다. 또한 Berrozpe 등(32)은 전이된 췌장암에서 p53 단백질 발현율이 높았다고 한 반면, Yokoyama 등(13)은 p53 단백질 발현이 암의 침윤성을 증가시키기는 하나 전이와는 무관하다고 주장하는 등 췌장암에서 p53 단백질 발현과 임상 및 병리학적인 예후인자와의 상관성은 아직까지 불명확한 상태이다. 저자들의 연구결과에서 p53 단백질 발현빈도는 임상 및 병리학적인 예후인자들과는 유의한 상관관계가 없었고, 맥관점수와 p53 단백질 발현과의 상관관계에서 p53 단백질 음성군보다 양성군에서 맥관점수가 낮게 나타났다. 그러나 그 차이는 통계학적 유의성을 가지지는 못하였다. p53 단백질 발현이 환자의 생존에 미치는 영향에 대한 연구에서 Dergham 등(34)은 p53 단백질 발현이 병기의 진행과는 연관성이 있으나 생존율과는 무관한 것으로 보고하였으나, K-ras 변이와 함께 p53 단백질 발현된 경우에는 생존율이 낮아지는 것으로 보고하였다.(35) 그들은 또한 화학치료와 방사선치료 등의 보조요법을 시행한 환자군의 생존율은 p53 단백질 발현된 경우에는 p53 단백질 발현되지 않은 군보다 불량하다고 보고하였다. 저자들의 경우에서는 p53 단백질 양성군에서 p53 단백질 음성군보다 생존기간이 약간 길었으나 통계학적 의의는 없었다.

결론

췌장암에서 맥관형성 정도와 p53 단백질 발현을 면역조

직화학적 검사로 검색하고 임상 및 병리학적 예후인자와 재발 및 생존율과의 상관관계를 알아보았다. 수술 후 환자의 중앙 생존기간이 저 맥관환자군에서 고 맥관환자군보다 통계학적으로 유의하게 길었으나 맥관형성 정도의 차이는 기존의 임상 및 병리학적 예후인자들과 상관관계를 보이지 않았고 다변량 생존분석 결과 독립적인 예후인자로서의 통계학적 의의는 없었다. 맥관형성과 p53 단백질 발현과의 상관관계도 통계학적으로 의의가 없었다. 전체 췌장암 환자의 재발은 맥관형성과 p53 단백질 발현보다 전통적 개념인 종양의 조직학적 분화도와 병기가 보다 더 관련이 있는 것으로 나타났다.

REFERENCES

- 1) Trede M. Surgery of the pancreas. 1st ed. New York: Churchill Livingstone; 1993. p.405-14.
- 2) Ministry of health and welfare. Annual report of the central cancer registry in Korea. 1997.
- 3) Denekamp J. Vascular endothelium as the vulnerable element in tumors. *Acta Radiol Oncol* 1984;23:217-25.
- 4) Folkman J. XIth Congress of thrombosis and hemostasis. Leuven: leuven Univ Press; 1987. p.583-96.
- 5) Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;285:1182-6.
- 6) Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990;82:4-6.
- 7) Folkman J. Angiogenesis and breast cancer. *J Clin Oncol* 1994;12:441-3.
- 8) 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.
- 9) Fregene TA, Khanuja PS, Noto AC, Gehani SK, van Egmont EM, Luz DA, et al. Tumor-associated angiogenesis in prostate cancer. *Anticancer Res* 1993;13:2377-82.
- 10) Saclarides TJ, Speziale NJ, Drab E, Szeluga DJ, Rubin DB. Tumor angiogenesis and rectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 1994;37:921-7.
- 11) Vogelstein B, Kinzler KW. p53 function and dysfunction. *Cell* 1992;70:523-6.
- 12) Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancer. *Science* 1991;253:49-53.
- 13) Yokoyama M, Yamanaka Y, Friess H, Buchler M, Korc M. p53 expression in human pancreatic cancer correlates with enhanced biological aggressiveness. *Anticancer Res* 1994;14:2477-83.
- 14) Nagayama Y, Shigematsu K, Namba H, Zeki K, Yamashita S, Nizva M. Inhibition of angiogenesis and tumorigenesis, and induction of dormancy by p53 in a p53 null thyroid carcinoma cell line in vivo. *Anticancer Res* 2000;20:2723-8.
- 15) Shishido T, Yasoshima T, Denno R, Mukaiya M, Sato N, Hirata K. Inhibition of liver metastasis of human pancreatic carcinoma by angiogenesis inhibitor TNP-470 in combination with cisplatin. *Jpn J Cancer Res* 1998;89:963-9.
- 16) Conlon KC, Klimstra DS, Brennan MF. Long-term survival after curative resection for pancreatic ductal carcinoma. Clinicopathologic analysis of 5-year survivors. *Ann Surg* 1996;223:273-9.
- 17) Gebhardt C, Mayer W, Reichel M, Wunsch PH. Prognostic factors in the operative treatment of ductal pancreatic carcinoma. *Langenbecks Arch Surg* 2000;385:14-20.
- 18) Magistrelli P, Antinori A, Crucitti A, La Greca A, Coppola R, Nuzzo G, et al. Surgical resection of pancreatic cancer. *Tumori* 1999;85:S22-S26.
- 19) Kuehn R, Lelkes PI, Bloechle C, Niendorf A, Izbicki JR. Angiogenesis, angiogenic growth factors and cell adhesion molecules are upregulated in chronic pancreatic disease: angiogenesis in chronic pancreatitis and in pancreatic cancer. *Pancreas* 1999;18:96-103.
- 20) Knighton D, Ausprunk D, Tapper D, Folkman J. Avascular and vascular phase of tumor growth in the chick embryo. *Br J Cancer* 1977;35:347-56.
- 21) Fidler IJ, Gersten DM, Hartr IR. The biology of cancer invasion and metastasis. *Adv Cancer Res* 1978;28:149-250.
- 22) Srivastava A, Laider P, Davies RP, Horgan LE. The prognostic significance of tumor vascularity in intermediate-thickness skin melanoma: a quantitative histologic study. *Am J Pathol* 1988;133:419-23.
- 23) Herlyn M, Clark WH, Rodeck V, Mancianti ML, Jambrosic J, Koprowski H. Biology of tumor progression in human melanocytes. *Lab Invest* 1987;56:461-74.
- 24) Folkman J, Klagsbrun M, Sasse J, Wadzinski M, Ingber D, Vlodavsky I. A heparin-binding angiogenic protein - basic fibroblast growth factor - is stored within basement membrane. *Am J Pathol* 1988;130:393-400.
- 25) Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992;267:10931-4.
- 26) Pierce GF, Tarpley JE, Yamagihara D, Mustoe TA, Fox GM, Thomason A. Platelet derived growth factor (BB homodimer), transforming growth factor-B1 and basic fibroblast growth factor in dermal wound healing: neovessel and matrix formation and cessation of repair. *Am J Pathol* 1992;140:1375-88.
- 27) Merrilees MJ, Sodek J. Synthesis of TGF-B1 by vascular endothelial cells is correlated with cell spreading. *J Vasc Res* 1992;29:376-84.
- 28) Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987;235:442-7.
- 29) 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.
- 30) Zhang L, Yu D, Hu M, Xiong S, Lang A, Ellis LM, et al. Wild-type p53 suppresses angiogenesis in human leiomyosarcoma and synovial sarcoma by transcriptional suppression of vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Res*

- 2000;60:3655-61
- 31) Pellegata NS, Sessa F, Renault B, Bonata M, Leone E, Solcia E, Ranzani GN. K-ras and p53 gene mutations in pancreatic cancer: ductal and nonductal tumors progress through different genetic lesions. *Cancer Res* 1994;54:1556-60.
- 32) Berrozpe G, Schaeffer J, Peinado MA, Real FX, Perucho M. Comparative analysis of mutations in the p53 and K-ras genes in pancreatic cancer. *Int J Cancer* 1994;58:185-91.
- 33) Sato Y, Nio Y, Song MM, Sumi S, Hirahara N, Minari Y, Tamura K. p53 protein expression as prognostic factors in human pancreatic cancer. *Anticancer Res* 1997;17:2779-88.
- 34) Dergham ST, Dugan MC, Kucway R, Du W, Kamarauskiene DS, Vaitkevicius VK, et al. Prevalence and clinical significance of combined K-ras mutation and p53 aberration in pancreatic adenocarcinoma. *Int J Pancreatol* 1997;21:127-43.
- 35) Dergham ST, Dugan MC, Sarkar FH, Vaitkevicius VK. Molecular alteration associated with improved survival in pancreatic cancer patients treated with radiation or chemotherapy. *J Hepatobiliary Pancreatol Surg* 1998;5:269-72.
-