

구강 편평세포암종에서 Vascular Endothelial Growth Factor 발현과 미세혈관 밀도

서울대학교 치과대학 구강병리학교실

임지준 · 홍삼표 · 이재일 · 홍성두 · 임창윤

VEGF Expression and Microvessel Density in Oral Squamous Cell Carcinomas

Ji-Jun Lim, Sam-Pyo Hong, Jae-Il Lee, Seong-Doo Hong, and Chang-Yun Lim

Department of Oral Pathology, College of Dentistry, Seoul National University, Seoul 110-749, Korea

Angiogenesis is an essential process in tumor growth and metastasis. VEGF has been considered a leading candidate inducing tumor angiogenesis. VEGF expression was significantly correlated with clinical stage, lymph node metastasis, and prognosis of cancers of various parts of body. However, little has been known about the correlation between VEGF expression and clinicopathologic parameters in oral squamous cell carcinoma. The aim of this study was to correlate VEGF expression with the clinicopathological parameters and microvessel density. Forty six oral squamous cell carcinomas were analyzed using immunohistochemical method with primary antibodies to VEGF and CD31. VEGF expression was detected in 33 (71.7%) of the 46 cases. The microvessel density was significantly correlated with VEGF expression ($P=0.002$). There was no correlation between microvessel density and tumour size, clinical stage, and lymph node metastasis, respectively. VEGF expression did not correlate with the histological grade of tumour differentiation, tumour size, and clinical stages. The VEGF-positive rate seemed to be higher in patients with cervical lymph nodal metastasis than in those without it, but it was not statistically significant. In conclusion, the overexpression of VEGF in the oral squamous cell carcinoma seemed to be associated with a more aggressive course of the disease. Further study is necessary to define the role of VEGF in oral squamous cell carcinoma. (Korean J Pathol 2000; 34: 190~198)

Key Words: VEGF, Angiogenesis, Oral squamous cell carcinoma, Lymph node metastasis, Microvessel density

서 론

신생혈관 형성은 종양의 성장과 전이에 필수적인 과정이다.¹ 발생초기의 종양은 무혈관 상태이나 종양의 크기가 1~2 mm³ 이상이 되면,² 종양세포나, 침윤된 대식세포 혹은 비만세포에서 여러 혈관인자들을 생성하여 미세혈관을 증식시킨다. 증식된 미세혈관은 종양세포에

접 수: 2000년 1월 7일, 게재승인: 2000년 1월 28일

주 소: 서울시 종로구 연건동 28-2, 우편번호 110-749

서울대학교 치과대학 구강병리학교실, 홍삼표

E-mail: hongsp@plaza.snu.ac.kr

* 본 연구는 서울대학교병원 연구비(02-1996-267-0)의 지원에 의해 이루어졌다.

ISSN : 0379-1149

영양을 공급하고, 종양세포에서 생성된 노폐물이나 cytokine 등을 배출하며, 증식된 혈관의 내피세포는 basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin-growth factor-2, platelet-derived growth factor 등과 같은 성장인자들을 분비하여 종양을 성장시키고,³ collagenase, urokinase, plasminogen activator 등의 분해효소를 생성하여 종양세포가 주위조직으로 침윤되는 데 기여한다.^{4,5} 혈관형성인자로서 지금까지 밝혀진 것으로는 acidic fibroblast growth factor (aFGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), transforming growth factor- α (TGF- α), TGF- β , hepatocyte growth factor, tumor necrosis factor- α (TNF- α), angiogenin, interleukin-8, vascular endothelial growth factor (VEGF) 등이 있으며,^{6~9} 그 중에서도 VEGF는 혈관내피세포에 선택적으로 작용하여 강력한 유사분열을 일으키는 물질로서 vascular permeability

factor (VPF)로도 명명된다. VEGF는 1989년에 발견된 34~42 kDa의 cytokine으로 아미노산 수에 따라 VEGF 121, 165, 189, 206의 네 종류가 존재한다.^{6,10~12} VEGF는 주로 산소압저하에 의해 발현이 증가되며, 그 외 EGF, TGF- β , keratinocyte growth factor 등의 cytokine과 p53 등의 종양억제유전자에 의해 발현이 조절된다고 보고되고 있다.^{13~15} VEGF는 혈관내피세포 표면에 있는 flt-1이나 KDR과 같은 수용체와 결합하여 내피세포의 증식 이외에도 혈관내피세포에서 urokinase, collagenase, serine protease 등의 발현을 유도하여 세포외기질을 분해시켜 혈관내피세포나 종양세포의 침윤을 용이하게 한다. 또한 혈관의 투과성을 증가시켜 혈장단백이 혈관외로 빠져나오게 하고, 응고기전을 활성화시켜 fibrin이 풍부한 세포간질을 형성하여 종양세포나 혈관내피세포의 이주를 용이하게 한다. 그 외에 VEGF는 소혈관의 fenestration, VCAM-1, ICAM-1의 발현증가, 단핵구의 화학주성 및 혈관확장 등을 일으킨다.^{4,16~20} 이러한 VEGF의 특성으로 인해 여러 종양에서 VEGF 발현에 대한 연구가 시행되어 왔다. Ferrara 등²¹은 지금까지 다발성 교모세포종, 수막종, 혈관육종과 갑상선, 폐, 유방, 소화기계, 신장, 방광, 난소 및 자궁경부에서 발생하는 암종 등에서 VEGF mRNA가 과발현되었다고 보고하였다. 유방암종,²² 소화기계암종,^{23,24} 자궁경부암종 등에서는 대체적으로 VEGF 발현이 종양의 악성도, 임상적 병기, 림프절 전이 및 예후 등과 상관관계가 있다고 알려져 있다. 구강암종에 있어서 VEGF 발현과 관련된 연구는 매우 적으며, Moriyama 등²⁵은 VEGF발현이 림프절 전이와 상관관계가 있었으나, 미세혈관 밀도와는 상관관계가 없었다고 보고하였다. Maeda 등²⁶은 VEGF 발현군이 비발현군에 비해 5년 생존율이 낮았으며, 그 외의 조직학적 분화도, 임상병기, 림프절 전이 등과는 상관관계가 없다고 보고하였다.

따라서 저자들은 VEGF와 관련된 보고가 매우 적은 구강 편평세포암종에서 면역조직화학염색을 통하여 VEGF 발현과 미세혈관 밀도 및 종양의 조직학적 등급, 임상병기, 림프절 전이 등과의 상관관계를 분석하여, 구강 편평세포암종에서 VEGF 발현이 신생혈관 형성능과 밀접한 관련이 있는지를 확인하고, 예후인자로서 가치가 있는지를 평가하기 위해 본 연구를 시행하였다.

재료 및 방법

1. 연구재료

1994년 6월부터 1998년 2월까지 서울대학교병원 치과진료부 구강병리과에서 진단된 구강 편평세포암종 중 슬라이드의 재검토가 가능하고, 파라핀 블록이 충분한 46예를 대상으로 하였다.

2. 연구방법

1) 조직병리학적 검사: 구강 편평세포암종 46예의 HE

염색 슬라이드를 재검토하여 WHO 분류²⁷에 따라 종양을 저등급, 중등급, 고등급 암종으로 재분류하였다.

2) 면역조직화학적 검사: 각 종례의 파라핀 포매조직을 4 μm 두께로 박절표본을 제작하여 Silane이 입혀진 유리슬라이드에 부착하여 탈파라핀시킨 후 함수시켰다. 이들을 조직내 과산화효소의 작용을 억제하기 위하여 3% H₂O₂에서 30분간 처리하고, 배경의 비특이적인 반응을 방지하기 위하여 3% normal swine serum으로 1시간동안 처리하였다. 일차항체로서 VEGF 다클론항체 (A-20, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, U.S.A.)를 1 : 400으로 희석하여 사용하였고, 4°C에서 밤새 반응시켰다. DAKO-LSAB kit를 이용하여 biotinylated antibody와 peroxidase가 부착된 streptavidin을 결합시킨 후, 발색은 DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride)으로 하였으며, 대조염색은 Mayer's hematoxylin을 이용하였다. 매 염색시 간질조직의 혈관내피세포를 VEGF 발현의 양성대조로 삼았으며, 음성 대조군은 1차항체를 정상 rabbit serum으로 대체한 것으로 하였다. 미세혈관 밀도를 측정하기 위하여 혈관내피세포 표지자인 CD31 (JC70A, DAKO, Denmark)에 대한 항체를 1 : 20으로 희석하여 VEGF에서와 같은 방법으로 면역조직화학염색을 시행하였다.

3. 염색결과의 판독 및 통계분석

1) VEGF 발현 판독: VEGF와 CD 31 항체에 대한 면역조직화학염색 판독은 임상적 지표의 결과를 모르는 두 명의 구강병리의사에 의해 시행되었다. VEGF의 양성기준은 구강 편평세포암종에서 Maeda 등²⁸이 사용한 기준에 따라, 세포막에 갈색으로 염색되는 세포가 종양세포의 5% 이상이면 염색 강도에 상관없이 양성으로 판정하였다.²⁹

2) 미세혈관 밀도 측정: 미세혈관 측정은 Bosari 등³⁰이 시행한 방법을 사용하였다. 즉, 저배율 시야 (40배 또는 100배)에서 CD 31항체에 염색된 혈관 밀도가 가장 높은 세 부위를 찾아서 고배율 (200배, 0.785 mm²)로 확대하여 미세혈관 수를 세어 그 중 수가 높은 2개 부위의 평균을 내어 기록하였다. 미세혈관 계산시 균율 층을 가지거나, 적혈구의 직경보다 8배 이상의 직경을 가진 큰 혈관은 제외하였으며, 혈관내강의 유무와 상관없이 CD31 항체에 양성이고 인접세포군과 명백하게 분리되어 있는 내피세포 집락은 한 개의 혈관으로 인정하였다.³¹ 염증에 의한 혈관증식을 제외하기 위해, 종양근처에서 혈관 수가 많더라도 염증이 심한 부분은 혈관 수 측정부위에서 제외시켰다.

3) 통계학적 분석: 통계처리는 SPSS (ver 9.0) 통계프로그램을 사용하여 VEGF 발현과 임상적 및 병리학적 예후인자와의 상관관계 비교는 Pearson의 chi-square 검정과 Fisher의 정확화를 검정으로 분석하였으며, VEGF 발현과 미세혈관 밀도와의 상관관계비교는 Mann-Whitney U 검정을 사용하였다. 미세혈관 밀도와 임상적

Table 1. Summary of VEGF expression and microvessel density of oral squamous cell carcinomas

Case number	Age	Sex	Site	Grade	Stage	VEGF expression	Microvessel density
1	72	F	Lip, lower	low	T1N0M0	+	20.5
2	62	F	Gingiva, Mn	low	T4N1M0	+	15.5
3	53	M	Buccal mucosa	int.	T2N0M0	+	52.5
4	49	M	Soft palate	low	T4N1M0	+	61.5
5	66	F	FOM	low	T2N0M0	-	57.0
6	53	M	Buccal mucosa	low	T2N0M0	+	69.0
7	50	M	Tongue	low	T2N0M0	+	24.5
8	60	M	Gingiva, Mn	low	T4N1M0	+	41.5
9	49	F	Tongue	low	T2N2M0	+	52.5
10	41	M	Tongue	low	T4N0M0	-	28.5
11	52	F	Gingiva, Mx	int.	T2N0M0	+	41.0
12	41	M	Gingiva, Mn	low	T1N0M0	+	74.5
13	55	M	Tongue	low	T1N0M0	+	56.0
14	68	M	Gingiva, Mn	low	T1N0M0	+	53.5
15	66	M	Retromolar area	low	T4N1M0	-	14.5
16	62	M	Gingiva, Mx	int.	T4N1M0	+	25.5
17	67	M	Soft palate	low	T4N1M0	-	17.0
18	58	M	Gingiva, Mx	low	T1N0M0	-	17.0
19	43	F	Retromolar area	low	T2N1M0	+	42.5
20	67	F	Soft palate	int.	T2N0M0	-	14.5
21	68	M	Retromolar area	low	T2N0M0	+	26.0
22	65	M	Lip, lower	low	T1N0M0	+	33.5
23	66	F	FOM	low	T4N1M0	+	21.5
24	40	M	Tongue	low	T1N0M0	+	58.0
25	59	M	Gingiva, Mn	low	T4N1M0	-	42.5
26	59	M	FOM	low	T2N0M0	+	66.0
27	46	F	Gingiva, Mn	low	T2N0M0	-	42.0
28	55	F	FOM	low	T4N1M0	+	35.0
29	71	M	Tongue	low	T1N1M0	+	68.0
30	60	M	Oropharynx	low	T4N2M0	+	47.0
31	47	F	Tongue	low	T2N0M0	+	64.0
32	58	M	Gingiva, Mn	low	T2N1M0	+	33.5
33	65	M	FOM	low	T4N1M0	-	19.0
34	64	M	Gingiva, Mx	low	T3N0M0	-	16.0
35	75	M	Gingiva, Mx	high	T4N0M0	+	41.0
36	51	F	Hard palate	low	T1N0M0	+	27.5
37	41	F	Retromolar area	low	T4N1M0	+	24.0
38	48	F	Tongue	low	T1N0M0	+	27.5
39	66	M	Buccal mucosa	low	T4N0M0	+	29.0
40	46	F	Oropharynx	low	T4N1M0	+	43.5
41	42	F	Retromolar area	low	T4N1M0	+	29.5
42	68	M	Hard palate	low	T1N0M0	-	24.5
43	65	M	Tongue	low	T2N0M0	+	72.5
44	74	M	Retromolar area	low	T4N0M0	+	23.5
45	61	M	Tongue	int.	T1N0M0	+	47.0
46	66	M	Gingiva, Mn	low	T4N0M0	-	18.0

FOM: floor of mouth, Mx: maxilla, Mn: mandible, int.: intermediate

및 병리학적 예후인자와의 상관관계 비교는 t-test와 Kruskal-Wallis test를 사용하였다. 유의수준은 P 값이 0.05 이하인 것을 의의있는 것으로 하였다.

결 과

1. 조직병리학적 및 임상적 소견

환자의 연령분포는 40세부터 75세까지였으며, 평균연령은 57.8세였다. 남녀비는 약 1.9 : 1이었으며, 위치분포는 혀 (21.7%), 하악치은 (17.3%), 후구치부 (13.0%), 상악치은 (10.9%), 구강저 (10.9%) 등의 순이었다 (Table 1). 종양 크기는 2 cm 이하인 T1이 11예, 2~4 cm인 T2가 14예, 4 cm 이상인 T3가 1예, 종괴가 심부근육층이나 층판골 등의 인접조직으로 침윤된 경우인

T4가 19예였으며, 46예 중 18예에서 경부 림프절 전이가 있었다. AJCC (American Joint Committee on Cancer)의 분류에 의한 임상병기는 stage I이 11예, stage II가 11예, stage III가 4예, stage IV가 20예였다. 조직학적 소견상 분화도에 따른 분류에서는 저등급이 40예, 중등급이 5예, 고등급이 1예였다.

2. VEGF 발현 양상

VEGF는 주로 종양세포의 세포질에 갈색의 과립상으로 염색되었으며, 주변 혈관내피세포, 평활근 세포, 림프구, 다형핵백혈구, 섬유모세포, 조직구 등에 약하게 염색되었으며, 종괴 인접부위에 있는 정상점막의 편평상피세포에는 아주 약하게 염색되었다 (Fig. 1). 염색강도는 부위에 따라 다양하였으며, 표층의 피사부위 주변부나 종양세포의 침윤부가 아주 강하게 염색되었다.

3. 미세혈관 밀도 (Table 2, 3)

Table 2. Correlation between VEGF expression and microvessel density

	Microvessel density		<i>P</i> -value
	Mean \pm SD	Range	
VEGF expression			
Positive (n=33)	43.0 \pm 17.2	14~94	0.002 ^a
Negative (n=13)	25.8 \pm 13.3	14~60	

^a: Mann whitney U test, SPSS program, mean MVD: 38.2 \pm 17.9, VEGF: vascular endothelial growth factor

Table 3. Correlation between clinicopathologic parameters and microvessel density

Variables	Microvessel density		<i>P</i> -value
	Mean \pm SD	Range	
Clinical stage			
I (n=11)	39.8 \pm 18.9	15~94	NS ^a
II (n=11)	48.1 \pm 19.9	16~92	
III (n= 4)	40.0 \pm 21.7	18~82	
IV (n=20)	31.5 \pm 17.9	14~75	
Histologic grade			
Low grade (n=40)	38.4 \pm 18.5	14~94	NS ^a
Int. grade (n=5)	36.1 \pm 15.7	19~58	
High grade (n=1)	41.0	41	
LN. metastasis			
Positive (n=18)	33.3 \pm 14.0	14~94	NS ^b
Negative (n=28)	41.3 \pm 19.6	16~79	

NS: not significant, ^a: Kruskal-Wallis test, ^b: t-test, SPSS program, mean MVD: 38.2 \pm 17.9, LN: lymph node, int.: intermediate

Table 4. Correlation between VEGF expression and clinicopathologic parameters

Variables	Number	VEGF expression		<i>P</i> -value
		No. of patients (%)	No. of patients (%)	
Differentiation				
Low grade	40	28 (70.0)	12 (30.0)	NS
Int. grade	5	4 (80.0)	1 (20.0)	
High grade	1	1 (100.0)		
Tumour size				
T1	12	9 (75.0)	3 (25.0)	NS
T2	14	11 (78.6)	3 (21.4)	
T3	1	1 (100.0)		
T4	19	13 (68.4)	6 (31.6)	
Clinical stage				
I	11	8 (72.7)	3 (27.3)	NS
II	11	8 (72.7)	3 (27.3)	
III	4	3 (75.0)	1 (25.0)	
IV	20	14 (70.0)	6 (30.0)	

NS: not significant, χ^2 test, SPSS program, VEGF: vascular endothelial growth factor, int.: intermediate

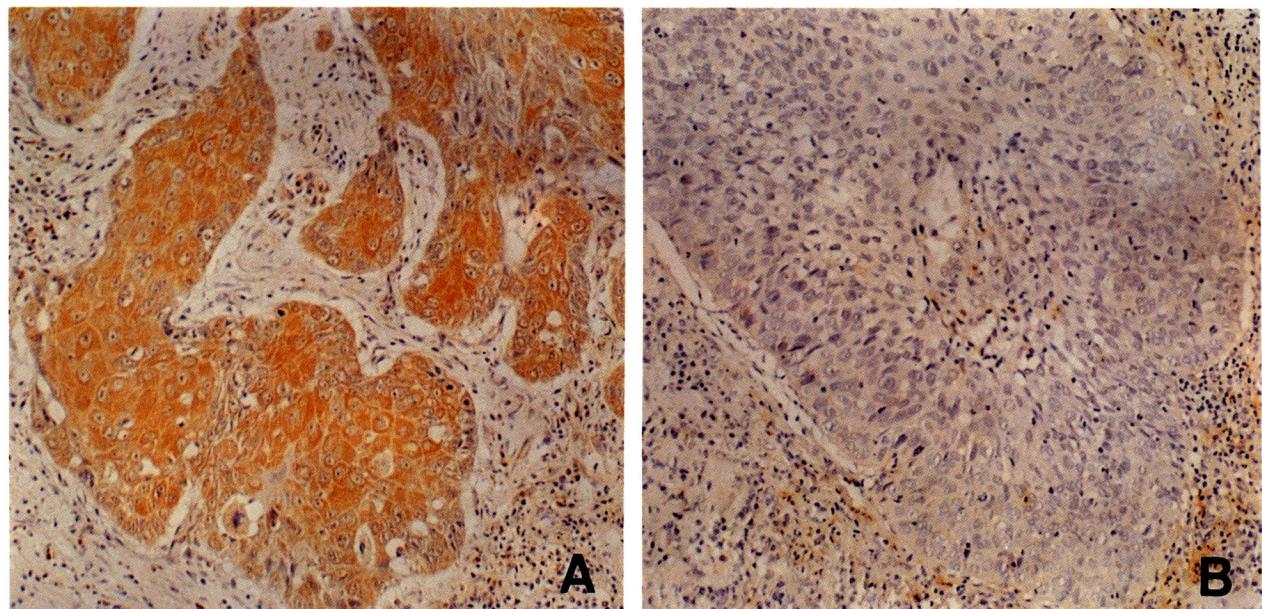


Fig. 1. A. VEGF immunostaining in cancer cells of oral squamous cell carcinoma. Cytoplasm shows strong granular immunoreactivity. B. VEGF immunostaining in cancer cells of oral squamous cell carcinoma. Cytoplasm shows negative immunoreactivity.

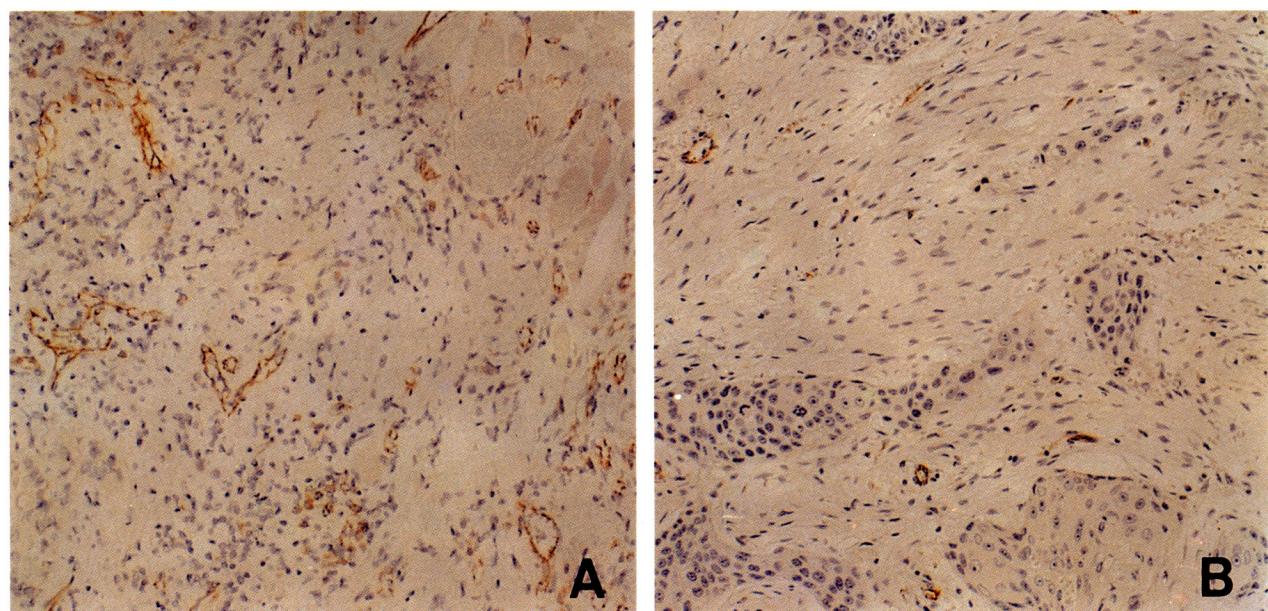


Fig. 2. CD 31 immunostaining. Microvessel density in VEGF positive oral squamous cell carcinoma (A) is higher than that in VEGF negative one (B).

없었다.

4. 종양 크기와 임상병기 및 조직학적 분화도에 따른 VEGF 발현 (Table 4)

종양 크기에 따른 VEGF 양성군의 수는 T1에서 총 12예 중 9예 (75.0%), T2에서 총 14예 중 11예 (78.6%),

T4에서 총 19예 중 13예 (68.4%)이었고, 임상병기에 따른 VEGF 양성군의 수는 병기 I에서 총 11예 중 8예 (72.7%), 병기 II에서 총 11예 중 8예 (72.7%), 병기 III에서 총 4예 중 3예 (75.0%), 병기 IV에서 총 20예 중 14예 (70.0%)로 유의한 차이가 없었다. 조직학적 분화도에 따라서는 VEGF 양성군의 비율이 저등급에서 70.0%,

Table 5. Correlation between VEGF expression and lymph node metastasis

Lymph node metastasis	VEGF expression No. of patients (%)		P-value
	Positive	Negative	
Negative (n=28)	19 (67.8)	9 (32.2)	NS
Positive (n=18)	14 (77.8)	4 (22.2)	

NS: not significant, χ^2 test, SPSS program, VEGF: vascular endothelial growth factor

중등급에서 80.0%, 고등급에서 100.0%로 분화도가 나빠짐에 따라 VEGF 양성군의 비율이 증가하는 경향을 보였지만 통계학적 유의성은 없었다 ($P > 0.05$).

5. 경부 림프절 전이에 따른 VEGF 발현 (Table 5)

림프절 전이군과 비전이군에서 원발성 종양의 VEGF 양성군의 비율은 77.8%, 67.8%로 림프절 전이군에서 더 높았으나, 통계학적으로 유의한 차이는 없었다 ($P > 0.05$).

고 찰

본 연구에서 VEGF는 주로 종양세포의 세포질에 과립상으로 염색이 되었으며, 인접 혈관의 내피세포 및 평활근세포와 섬유모세포 그리고 대식세포, 다형핵 백혈구, 림프구 등의 염증세포에도 종양세포보다는 약하지만 염색되었으며, 종양세포 주변의 정상점막 상피세포는 아주 약하게 염색되거나 염색되지 않았다. 일반적으로 저산소증 시 평활근세포, T림프구, 다형핵 백혈구, 대식세포, 섬유모세포에서 VEGF가 발현된다고 알려져 있다.³²⁻³⁵ Namiki 등³⁶은 혈관내피세포의 경우 뇌, 망막, 제대 등에서 VEGF가 발현된다고 세포배양실험을 통하여 보고하였으나, 아직 정확한 결론이 나지 않은 상태이다. 본 연구에서 혈관내피세포에 VEGF가 염색된 것은 혈관내피세포의 자체적인 발현에 의한 것이라기보다는 종양세포를 포함한 여러 세포에서 생성된 VEGF가 혈관내피세포의 수용기인 flt-1이나 KDR에 결합된 것으로 생각했다. 그 이유는 Brown 등³⁷이 VEGF mRNA와 flt-1 및 KDR mRNA에 대한 *in situ* hybridization을 소화기계 종양세포와 혈관내피세포에 대해 시행한 결과, VEGF mRNA는 종양세포에만, flt-1 및 KDR mRNA는 혈관내피세포에 국한되어 나타났기 때문이다. VEGF 발현 조절에 대해서는 아직 정확히 알려지지 않았지만, 산소압 저하가 생체내 및 생체외 실험에서 가장 중요한 VEGF 유전자 발현증가의 원인이라고 알려져 있다.^{38,39} 그 외 EGF, TGF-β, keratinocyte growth factor, IL-1β, PGE₂, IGF-I 등의 cytokine에 의해 VEGF 발현이 증가

된다는 연구가 있으며, 종양억제유전자인 p53과 관련하여 p53의 돌연변이가 protein kinase C의 활성화에 의한 VEGF mRNA의 발현증가에 관여한다고 하였으며,¹⁴ Mukhopadhyay 등¹⁵은 wild type의 p53이 VEGF mRNA의 형성을 억제하나 돌연변이형에서는 영향을 받지 않아 VEGF의 발현이 상대적으로 더 많이 나온다고 하였다. 본 연구에서 VEGF 양성군의 비율은 71.7%로 나타났는데, Maeda 등^{23,25}과 Uchida 등⁴⁰이 식도암종 (61.6%), 위 암종 (43.4%), 구강 편평세포암종 (42.4%) 등에서 보고한 수치보다 높게 나왔다. 본 연구의 경우, 임상병기가 높은 환자군의 수가 전체적으로 많았으며, 구강 편평세포암종의 경우 염증양상이 다양하고, p53 종양억제유전자의 돌연변이가 많은 것으로 보고되고 있어서,^{41,42} 다른 종양과의 VEGF 발현정도와의 단순비교보다는 염증양상과 p53 돌연변이 정도에 따른 VEGF 발현정도의 비교가 이루어져야 될 것으로 생각된다.

VEGF 발현이 실제 혈관형성능과 관련이 있는가를 확인하기 위하여 본 연구에서는 VEGF 양성군과 음성군간에 미세혈관 밀도를 검사하였으며, 미세혈관 수를 세기 위해 혈관내피세포를 JC-70A 항체로 면역조직화학 염색을 시행하였다. 지금까지 혈관 수를 측정하기 위해 일반적으로 Factor VIII 항체를 많이 사용하여 왔는데, 이 항체는 림프관의 내피세포에도 염색되며, 면역활성이 떨어진다고 알려져 있다. 이에 반해 JC-70A 항체는 림프관의 내피세포에는 염색되지 않고, 안정적인 면역조직화학 활성을 가지며, 파라핀포매 조직에서도 쉽게 미세혈관이 인지될 수 있어서 본 연구에 사용되었다.^{43,44} 본 연구에서 VEGF 발현과 관련한 미세혈관 밀도는 VEGF 양성군에서 음성군보다 유의성있게 높게 나와 VEGF가 실제 신생혈관형성에 관여함을 확인할 수 있었다. Moriyama 등²⁵은 구강 편평세포암종에서 VEGF, KDR, flt-1 및 flt-4의 발현과 미세혈관 밀도와의 상관관계를 분석한 바, flt-4에서만 양성군에서 미세혈관 밀도가 유의성있게 높게 나왔으며, 그 외 미세혈관 밀도와 종양 크기 및 조직학적 분화도와는 유의한 차이가 없다고 하였다. 본 연구에서도 조직학적 분화도 및 임상병기와 미세혈관 밀도 사이에는 유의한 차이가 없었다. 본 연구에서 VEGF 발현과 종양의 크기, 임상병기와의 비교에서는 유의성있는 상관관계는 없었으며, 이는 Maeda 등²⁶과 Moriyama 등²⁵의 연구결과와도 일치하였다. 구강암종의 경우, 유방, 위장 및 전립선 암종과 다르게 종양 크기, 임상병기와 VEGF 발현이 상관관계가 없게 나오는 것은 구강조직내의 기존의 혈관발달이 다른 곳에 비해 많이 되어 있어서, 초기 종양성장이 신생혈관 형성에 크게 영향을 받지 않는다고 생각할 수 있으나,⁴⁵ 아직 정확한 이유는 밝혀지지 않았다. 본 연구에서 기존 혈관발달과 관련하여 구강조직 중 혀, 협점막과 같이 혈관발달이 많은 곳과 이보다 적은 곳사이에 VEGF와 종양 크기 등을 비교하여 보았으나, 위치별로 실험군 수가 적어 유의성있는 결론을 얻지 못하였다.

VEGF 발현과 분화도와의 상관관계에 있어서는 분화도가 나빠짐에 따라 VEGF 양성의 비율이 증가하였으나, 유의한 차이는 보이지 않았다. 본 연구의 경우, 분화도 별로 실험군의 수가 저등급 40예, 중등급 5예, 고등급 1 예로 중등급과 고등급의 실험군 수가 적어 정확한 결론을 내릴 수 없었다. 분화도와의 연관성을 규명하기 위하여 각 군별로 좀 더 많은 수의 실험군으로 연구가 시행되어져야 될 것이다.

VEGF 발현과 림프절 전이 유무와의 상관관계에서는 림프절 전이군에서 VEGF 양성군 (77.8%)이 음성군 (67.8%) 보다 높게 나왔으나, 통계학적 유의성은 없었다. 그러나 림프절 전이에 따른 미세혈관 밀도의 경우, 림프절 비전이군 (41.3 ± 19.6)에서 전이군 (33.3 ± 14.0) 보다 높게 나왔다. Moriyama 등²⁵의 결과에서도 구강 편평세포암종에서 림프절 비전이군에서 미세혈관 밀도가 더 높게 나왔으며, Gleich 등⁴⁶의 결과에서는 유의성이 없었다. Gleich 등⁴⁶은 미세혈관 밀도 측정이 구강 편평세포암종에서 림프절 전이와 밀접하게 관련되지 못하는 이유를 다음과 같이 정리하였다. 우선 두경부영역은 혈관발달이 많고, p53 등의 여러 유전자 변이가 많이 일어나,⁴⁷ 저산소 상태에서도 종양세포의 성장을 가능하게 하여 종양의 성장이 신생혈관형성에 적게 영향을 받으며, 두 번째는 크기가 큰 종양의 혈관수 측정시, 전체를 확인하기 힘들어, 미세혈관 수가 많아서 실제 전이가 일어난 부위를 측정에서 제외할 가능성이 있으며, 세 번째는 현재 사용하고 있는 염색법이 신생혈관과 기존의 혈관을 감별할 수 없다는 것이다. 본 연구에서 림프절 전이 여부와 관련하여서, 미세혈관 밀도보다는 VEGF 발현이 더 밀접한 상관성을 나타내었는데, 이는 VEGF가 신생혈관의 증식 뿐만 아니라, serine protease, plasminogen activator, matrix metalloproteinase 등의 발현을 유도하여 세포외기질을 파괴하며,⁴⁸ 혈관의 투과성 증가로 혈장 단백을 간질로 유출시켜 fibrin이 풍부한 기질을 형성함으로써 혈관내피세포와 종양세포의 이주를 용이하게 하는데^{48,49} 기인하는 것으로 생각된다.

이상과 같은 연구결과로 구강 편평세포암종에서 VEGF 발현은 신생혈관형성과 밀접한 관련이 있으며, 림프절 전이나 분화도 등의 예후인자와도 미세혈관 밀도보다 더 높은 상관성이 있음을 확인하였다. 그러나 구강 편평세포암종에서 VEGF를 유효한 예후인자로서 사용하기 위해서는 VEGF와 다른 혈관형성인자와의 상호작용 및 VEGF 발현조절에 관여하는 인자들에 대한 연구가 보충되어야 되며, 생존율과의 상관관계에 대한 연구도 앞으로 시행되어야 할 것이다.

결 론

구강 편평세포암종에서 VEGF 발현이 신생혈관 형성능과 밀접한 관련이 있는지를 확인하고, 예후인자로서 가치가 있는지를 평가하기 위하여 서울대학교병원 치과

진료부 구강병리과에서 구강 편평세포암종으로 진단받은 46예를 대상으로 VEGF와 CD31에 대한 면역조직학 염색을 시행하여 VEGF발현과 미세혈관 밀도 및 조직학적 분화도, 임상병기, 림프 전이 등과의 상관관계를 통계학적으로 분석하여, 다음과 같은 결론을 얻었다.

VEGF 양성군에서 미세혈관 밀도가 통계학적으로 유의성 있게 높게 나왔으나 ($P=0.002$), 임상병기, 조직학적 분화도 및 림프절 전이와 미세혈관 밀도 사이에는 통계학적으로 유의한 차이가 없었다. VEGF 발현과 조직학적 분화도와의 상관관계 비교에서 분화도가 나빠짐에 따라 VEGF 양성군의 수가 증가하는 경향을 보였으나, 통계학적인 유의성은 없었다 ($P>0.05$). 종양 크기, 임상병기와 VEGF 발현사이에서는 상관관계가 없었다. VEGF 발현과 경부 림프절 전이 유무와의 상관관계 비교에서 림프절 전이군에서 VEGF 양성군의 수가 높게 나왔으나, 통계학적 유의성은 없었다 ($P>0.05$).

이상의 결과로 구강 편평세포암종의 경우, VEGF 발현이 신생혈관형성능과 밀접한 관련이 있었고, 분화도 및 림프절 전이와 상관성이 있었다. 그러나 VEGF 발현이 종양 크기 및 임상병기와 상관성이 없었으며, 림프절 전이 및 분화도와도 통계학적으로 유의한 차이는 없었다. 따라서, VEGF 발현이 구강 편평세포암종의 악성도 및 진행정도를 예측할 수 있는 예후표지자로 사용되기 위해서는 VEGF 발현조절에 관여하는 인자들에 대한 연구 및 생존율과의 상관관계에 대한 연구가 앞으로 시행되어야 할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- Folkman J. What is the evidence that tumours are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 4-6.
- Moscatelli D, Gross J, Rifkin D. Angiogenic factors stimulate plasminogen activator and collagenase production by capillary endothelial cells. *J Pathol* 1993; 170 (suppl): 388a.
- Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N Eng J Med* 1991; 324: 1-8.
- Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor type 1 in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 181: 902-6.
- Mandriota SJ, Seghezzi G, Vassalli JD, et al. Vascular endothelial growth factor increases urokinase receptor expression in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 9709-16.
- Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, et al. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 1989; 246: 1309-12.
- Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, et al. Tumour cells

- secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascitic fluid. *Science* 1983; 219: 983-5.
8. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992; 267: 10931-4.
 9. Dvorak HF, Orenstein NS, Carvalho AC, et al. Induction of a fibrin-gel investment: an early event in line 10 hepatocarcinoma growth mediated by tumour secreted products. *J Immunol* 1979; 122: 166-74.
 10. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246: 1306-9.
 11. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, et al. The human gene for vascular endothelial cell growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 1991; 266: 11947-54.
 12. Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 1991; 5: 1806-14.
 13. Frank S, Hubner G, Breier G, Longaker MT, Greenhalgh DG, Werner S. Regulation of VEGF expression in cultured keratinocytes. Implication for normal and impaired wound healing. *J Biol Chem* 1995; 270: 12607-13.
 14. Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin 1. *Science* 1994; 265: 1582-4.
 15. Kieser A, Weich HA, Brandner G, Marmer D, Kolch W. Mutant p53 potentiates protein kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression. *Oncogene* 1994; 9: 963-9.
 16. Senger DR, Perruzzi CA, Feder J, Dvorak HF. A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines. *Cancer Res* 1986; 46: 5629-32.
 17. Roberts WG, Palade GE. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J Cell Sci* 1995; 108: 2369-79.
 18. Melder RJ, Koenig GC, Witwer BP, et al. During angiogenesis, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor regulate natural killer cell adhesion to tumour endothelium. *Nat Med* 1996; 2: 992-7.
 19. Broxmeyer HE, Cooper S, Li ZH, et al. Myeloid progenitor cells regulatory effects of vascular endothelial growth factor. *Int J Hematol* 1995; 62: 203-15.
 20. Ku DD, Zaleski JK, Liu S, Brock TA. Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation of coronary arteries. *Am J Physiol* 1993; 265: H586-92.
 21. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997; 18: 4-25.
 22. Toi M, Hoshina S, Takayanagi T, Tominaga T. Association of VEGF expression with tumor angiogenesis and with early relapse in primary breast cancer. *Jpn J Cancer Res* 1994; 85: 1045-9.
 23. Maeda K, Chung YS, Ogawa Y, et al. Prognostic value of VEGF in gastric carcinoma. *Cancer* 1996; 77: 858-63.
 24. Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res* 1995; 55: 3964-8.
 25. Moriyama M, Kumagai S, Kawashiri S, et al. Immunohistochemical study of tumour angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 1997; 33: 369-74.
 26. Maeda T, Matsumura S, Hiranuma H, et al. Expression of vascular endothelial growth factor in human oral squamous cell carcinoma: its association with tumour progression and p53 gene status. *J Clin Pathol* 1998; 51: 771-5.
 27. Pindborg JJ, Reichart PA, Smith CJ, Waal van der I. Histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa, 2nd edition. World Health Organization: Springer, 1997; 11-3.
 28. Maeda T, Matsumura S, Hiranuma H, et al. Expression of VEGF in human oral squamous cell carcinoma: its association with tumour progression and p53 gene status. *J Clin Pathol* 1998; 51: 771-5.
 29. Kim KK, Kim JR. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), phospholipase C-γ1 and Ki-67 in squamous cell carcinoma and high grade squamous intraepithelial lesion of the uterine cervix. *Korean J Pathol* 1998; 32: 290-7.
 30. Bosari S, Lee AK, DeLellis RA, et al. Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma. *Hum Pathol* 1992; 23: 755-61.
 31. Jang TJ, Kim JR. Immunohistochemical study of the vascular endothelial growth factor in gastric carcinoma. *Korean J Pathol* 1997; 31: 401-9.
 32. Freeman MR, Schneck ML, Gagnon ML, et al. Peripheral blood T lymphocytes and lymphocytes infiltrating human cancers express vascular endothelial growth factor: a potential role for T cells in angiogenesis. *Cancer Res* 1995; 55: 4140-5.
 33. Gaudry M, Olivier B, Valerie A. Intracellular pool of vascular endothelial growth factor in human neutrophil. *Blood* 1997; 90: 4153-61.
 34. Xiong M, Elson G, Legarda D, Leibovich SJ. Production of vascular endothelial growth factor by murine macrophages: regulation by hypoxia, lactate, and the inducible nitric oxide synthase pathway. *Am J Pathol* 1998; 153: 587-98.
 35. Steinbrech DS, Longaker MT, Mehrara BJ, et al. Fibro-

- blast response to hypoxia: The relationship between angiogenesis and matrix regulation. *J Surg Res* 1999; 84: 127-33.
36. Namiki A, Brogi E, Kearney M, et al. Hypoxia induces vascular endothelial growth factor in cultured human endothelial cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 31189-95.
 37. Brown LF, Berse G, Jackman RW, et al. Expression of vascular permeability factor and its receptors in adenocarcinomas of gastrointestinal tract. *Cancer Res* 1993; 53: 4727-35.
 38. Minchenko A, Bauer T, Salceda S, Caro J. Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vivo and in vitro. *Lab Invest* 1994; 71: 374-9.
 39. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992; 359: 843-5.
 40. Uchida S, Shimada Y, Watanabe G, et al. In esophageal squamous cell carcinoma vascular endothelial growth factor is associated with p53 mutation, advanced stage and poor prognosis. *Br J Cancer* 1998; 77: 1704-9.
 41. Portugal LG, Goldenberg JD, Wenig BL, et al. Human papillomavirus expression and p53 gene mutations in squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1997; 123: 1230-4.
 42. Raybaud-Diogene H, Tetu B, Morency R, Fortin A, Montteil RA. p53 overexpression in head and neck squamous cell carcinoma: review of the literature. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1996; 32: 143-9.
 43. Parums DV, Cordell JL, Micklem K, et al. JC 70: A new monoclonal antibody that detects vascular endothelium associated antigen on routinely processed tissue sections. *J Clin Pathol* 1990; 43: 752-7.
 44. Mukai K, Rosai J, Burgdorf WH. Localization of Factor VIII-related antigen in vascular endothelial cells using an immunoperoxidase method. *Am J Surg Pathol* 1980; 4: 273-6.
 45. Petruzzeli GJ. Tumor angiogenesis. *Head and Neck* 1996; 18: 283-91.
 46. Gleich LL, Biddinger PW, Duperier FD, Gluckman JL. Tumor angiogenesis as a prognostic indicator in T2-T4 oral cavity squamous cell carcinoma: A clinical-pathologic correlation. *Head and Neck* 1997; 19: 276-80.
 47. Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, et al. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumors. *Nature* 1996; 379: 88-91.
 48. Dvorak HF, Harvey VS, Extrella P, et al. Fibrin containing gels induce angiogenesis: implications for tumor stroma generation and wound healing. *Lab Invest* 1987; 57: 673-86.
 49. Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarity between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 1986; 315: 1650-8.