

## Genistein을 투여한 햄스터 협낭 구강암 모델에서의 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) 발현 변화에 대한 면역조직화학적 연구

명 훈 · 김영연 · 최상묵\* · 정종평\* · 김명진

서울대학교 치과대학 구강악안면외과학교실, 서울대학교 치과대학 치주과학교실\*

**Abstract** (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2002;28:147-154)

### IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF THE VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF) EXPRESSION IN GENISTEIN TREATED HAMSTER BUCCAL POUCH ORAL CARCINOMA MODEL

Hoon Myoung, Young-Yun Kim, Sang-Mook Choi\*, Chong-Pyoung Chung\*, Myung-Jin Kim

*Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Department of Periodontology\**

*College of Dentistry, Seoul National University*

Genistein that is a component of soy has been reported to have a protective effect on the carcinogenesis of various tumors and to inhibit the growth of a wide variety of tumor cell *in vitro*. Angiogenesis is an essential process for the carcinogenesis, growth, invasion and metastasis of cancer and genistein has been suggested to act as natural anti-angiogenic agent.

The purpose of this study was to evaluate the effects of genistein on the vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in hamster buccal pouch oral carcinogenesis model induced by 9, 10-dimethyl 1,2-benzanthracene (DMBA). Experimental group that were supplied with 0.1mg/day genistein were sacrificed by time schedules and routinely processed for immunohistochemical examination of VEGF.

In genistein treated group, carcinogenesis was retarded with respect to the acanthosis, hyperkeratosis, and epithelial dysplasia. Immunohistochemical study showed that the VEGF protein of genistein group was less expressed than that of the control group. ( $p < 0.05$ ) Thus, it is postulated that genistein has chemopreventive effect on the oral carcinogenesis, and this chemopreventive effect, at least partly, is originated from the anti-angiogenic effect of genistein

**Key words** : Oral squamous cell carcinoma, Genistein, Anti-angiogenesis, VEGF

## I. 서 론

식생활과 암 발생에 관한 역학 조사 결과 콩을 많이 섭취하는 동양인 (20~80mg/day)은 서양인 (1~3mg/day)에 비해 유방암, 전립선암에 의한 사망률이 현저히 낮았고 미국으로 이주한 아시아인들의 경우 콩 섭취가 줄어들면서 암발생율이 증가하는 것으로 알려져 있다<sup>1,2</sup>. 이에 따라서 콩의 생리활성 물질에 대한 연구

가 많이 이루어졌는데 그 중에서 estrogen과 유사한 구조를 가진 genistein은 다양한 생리 활성을 가지고 있음이 밝혀 졌으며<sup>3</sup> 또한 여러 세포주와 동물 실험 모델에서 암예방 효과가 있는 것으로 밝혀졌다<sup>4,11</sup>.

신생혈관형성 (angiogenesis)은 종양의 형성 (carcinogenesis), 성장 (growth), 침습 (invasion) 및 전이 (metastasis)에 꼭 필요한 과정이다<sup>12</sup>. 종양에서 신생혈관형성이 비정상적으로 많다고 알려진 이래, 고형암의 혈관화 정도에 따른 전이의 가능성과 생존율의 차이에 대한 연구가 이루어져 왔다<sup>13,16</sup>. 이미 유방암에서 종양의 혈관화는 임상적 예후와 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있으며, 두경부 종양에서도 신생혈관화가 종양의 재발과 밀접한 연관이 있으며 예후인자로서의 의미를 가지고, 종양의 진행과도 직접적인 관련이 있다고 보고된 바 있다. 따라서 아직 논란의 여지가 있으나 항신생혈관화 (anti-angiogenesis)는 새로운 치료개념

### 김 명 진

110-744, 서울특별시 종로구 연건동 28-2

서울대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Myung-Jin Kim

Dept. of OMFS, School of Dentistry, Seoul National Univ.

28-2 Yeongun-Dong, Chongro-Gu, Seoul, 110-744, Korea

Tel: 82-2-760-2632 Fax: 82-2-766-4948

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

\*본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임.(01-PJ5-PG3-20507-0029)

으로서 중요하다고 할 수 있다<sup>17,20</sup>. 최근 Shipitzer 등<sup>21</sup>은 초기 설암에서 혈관화는 임파선전이와 유의한 관계를 보였다고 보고하였는데, 설암이외의 두경부종양에서도 신생혈관화는 종양의 진행, 침습, 전이와 밀접한 관련이 있을 것으로 보는 것이 타당할 것이다. 이미 유방암과 전립선암과 같은 고형암에 있어서 여러 항신생혈관화 물질의 적용이 연구되어져 왔다<sup>22,23</sup>. 항신생혈관화 요법은 두경부 종양에서도 충분히 적용 가능성이 있는 항암요법이라고 추측된다.

혈관형성인자중 vascular endothelial growth factor (VEGF)는 혈관 내피세포에 직접 작용해서 혈관내피세포를 증식시키고, 투과도를 증가시켜 병적인 상황과 생리적인 상황에서 혈관형성을 유도한다<sup>24</sup>. VEGF는 구강편평세포의 심한 이형성증과 침습성이 강한 구강편평세포암종에서 두드러지게 발현된다고 보고되었다<sup>25</sup>.

본 연구는 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene(DMBA)에 의해 유도된 햄스터 협낭 구강암 모델에서 genistein이 구강암 발생과정에 미치는 암예방 효과를 면역화학염색법을 이용한 VEGF의 발현도와 연관하여 분석하고자 계획되었다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 햄스터 협낭 구강암발생 및 genistein 투여

체중 100gm 내외의 생후 4주에서 6주 사이의 햄스터를 물과 사료에 자유롭게 접근할 수 있는 동일 조건하에서 사육하고 DMBA(Sigma Chemical Co., St. Luise, USA)를 0.5% 농도로 mineral oil(Sigma Chemical Co., St. Luise, USA)에 용해 시킨 후 우측 협낭 점막에 1주일에 3회 면봉으로 도포하였다. 실험군 (n=24)은 DMBA를 도포하면서 genistein (Sigma, USA) 20mg을 100% 에탄올 10ml에 녹인 후 증류수로 희석하여 1ml를 매일 위관을 통해 경구 복용시켰다. 대조군은 genistein을 함유하지 않은 동일한 용매만 동일한 방법으로 경구 복용시켰다.

### 2. 동물의 희생 및 면역화학적 염색

실험 시작 2주 후 4주 간격으로 16주까지 무작위로 6마리씩 희생시키고 협낭을 적출한 후 즉시 10% 중성 포르말린 용액에 고정시켜 통법에 따라 탈수하고 파라핀에 포매하였다. 이후 4-5 $\mu$ m 두께의 파라핀 절편을 제작하여 Hematoxilin-Eosin(H&E) 중염색을 시행하여 대조군과 실험군에서 광학현미경 관찰을 시행하여 암예방효과를 판정하였다.

VEGF 면역조직화학 염색을 위해 박절편을 xylene으로 탈파라핀하고 각 단계의 알콜을 거쳐 함수시켰다. 증류수로 3회 세척한 후 전처치로 10mM sodium citrate buffer 용액에 담근 상태에서 microwave로 5분씩 2회 처리하였다. 내인성 peroxidase의 활성을 억제시키기 위하여 3% 과산화수소수 용액으로 5분간 처리한 후 증류수와 phosphate buffered saline(PBS)로 세척하였다. 이후 30분간 blocking하여 비특이적 IgG 결합을 방지한 후, VEGF 다클론 항체(A-20, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)를 1:400 으로 희석하여 적용하였고, 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 반응시켰다. Streptavidin-biotin-

peroxidase complex를 결합시킨 후 발색은 3,3-diaminobenzidine hydrochloride (DAB)으로 하였고, 대조염색은 Mayer's hematoxylin을 이용하였다. 혈류 공급이 풍부하다고 이미 알려져 있는 유방암종의 조직을 양성대조로 삼았으며, 음성대조는 일차항체를 정상 swine serum으로 대체하여 같은 조건에서 반응시킨 조직을 이용하였다.

### 3. 조직병리학적 관찰 및 VEGF 발현 평가

각각의 군의 H&E 염색상을 관찰하여 과각화 (hyperkeratosis), 이형성 (acanthosis), 유사 분열상 (mitotic figure), 핵농염 (nuclear pleomorphism) 등을 평가하였다. 각 평가는 -: negative,  $\pm$ : trace, +: mild, ++: moderate, +++: marked 까지 5등급으로 나누어 시행하였다.

VEGF 발현도 측정은 3인의 관찰자가 각 증례를 맹검 후 평가하였는데 결과가 서로 다른 경우 제3의 관찰자가 재검하여 최종 결정하였다. VEGF 발현강도는 Takahasi 등<sup>26</sup>이 제시한 0에서 3+까지의 단위로 등급(grade)을 적용한 후 VEGF의 발현강도에 따라 발현이 전혀 안 되었거나, 약하게 되었을 경우(grade 0 or 1+)와 발현의 강도가 중등도이거나, 강하게 되었을 경우(grade 2+ or 3+)로 나누었다<sup>30</sup>.

## III. 결 과

### 1. 조직병리학적 소견 (Table 1)

실험 4주군은 대조군과 마찬가지로 각화층이 두꺼워지고 극세포증을 보이기 시작하여 대조군과 별다른 차이를 나타내지 않았다 (Fig. 1-a, b). 그러나 대조 8주군에서 과각화층이 더욱 두꺼워지고 저세포층의 핵/세포질 비율이 커지며 경도의 상피이형성 소견이 전반적으로 보이기 시작한 반면 (Fig. 1-c) 실험 8주군에서는 일부에서만 극세포증이 관찰되었으며 기저세포들은 농염되고 다소 배열이 불규칙하였으나 대조군에 비해서는 미약하였다. 또 대조군에서 보이던 상피 이형성의 소견은 보이지 않았다 (Fig. 1-d). 대조 12주군은 상피층 내 불규칙한 이형성 세포들의 배열과 더욱 커진 핵/세포질 비율 및 유사 분열상이 관찰되었고 상피 이형성은 더욱 심해졌다 (Fig. 1-e). 실험 12주군은 대조 12주군에 비해 미약한 이형성의 소견을 보였다 (Fig. 1-f). 대조 16주군은 분화도가 좋은 편평상피세포암의 소견과 실험군보다 심한 하부 결체조직으로의 침투상과 주변에 심한 염증 세포의 소견을 보였다 (Fig. 1-g). 실험 16주군 역시 편평세포암종의 소견을 보였으나 결합조직내로의 분화도가 높은 상피세포의 침투와 관찰되었고 암진주 형성을 보였다 (Fig. 1-h).

### 2. VEGF의 발현도 (Table 2)

VEGF는 종양세포의 세포질에 갈색으로 염색되었는데, 각 주별로 대조군에서 실험군에 비해 많이 관찰되었다 (Fig. 2). 대조군

**Table 1.** Progression of DMBA induced carcinoma

	Control group				Experimental group			
	4w	8w	12w	16w	4w	8w	12w	16w
Hyperkeratosis	+	++	+++	+++	+	++	++	+++
Acanthosis	±	+	+++	+++	±	+	++	+++
Mitotic figures	-	+	+++	+++	-	-	+	+++
Nuclear pleomorphism	-	+	++	+++	-	-	+	+++

w: week, -: negative, ±: trace, +: mild, ++: moderate, +++: marked

**Table 2.** Correlations of VEGF expression in each group

Group	week	Number of VEGF-rich tumor(%)
Control group (N=24)	4w	4/6 (66.7%)
	8w	3/6 (50.0%)
	12w	4/6 (66.7%)
	16w	4/6 (66.7%)
Genistein treated group (N=24)	4w	2/6 (33.3%)
	8w	1/6 (16.7%)
	12w	1/6 (16.7%)
	16w	1/6 (16.7%)

은 4, 12, 16주군에서 66.7%, 8주군에서 50%의 개체에서 중등도 이상의 발현강도를 보인 반면, 실험군에서는 4주군에서 33.3%에서 중등도의 발현강도를 보였고 8, 12, 16주군에서는 16.7%에서만 중등도 이상의 발현도를 보였다 (Table 2). 실험군에서의 VEGF의 발현은 통계적으로 유의성 있게 감소했다 ( $p<0.05$ ).

#### IV. 총괄 및 고안

콩추출물질은 지방암, 간암, 폐암, 방광암, 피부암에 예방효과가 있는 것으로 알려져 있으며 콩이 암 유발 위험을 증가시킨다는 보고는 없었다<sup>49</sup>. Genistein은 콩에 풍부하게 함유되어 있는 isoflavone의 일종인데 다양한 활성을 가진 것으로 알려졌으며, 암세포에 대한 치료효과는 주로 항산화작용(antioxidation)과 항염증작용, tyrosine kinase활성 억제에 의한 것으로 알려져 있다<sup>31-32</sup>. 특히 genistein이 특이적으로 tyrosine kinase의 효과를 억제하는 것이 밝혀진 이후 세포 내부에서 각종 성장인자간의 신호 전달에 있어서 중요한 역할을 담당하는 tyrosine kinase의 억제에 의한 항암기전설이 유력하게 제시되고 있는데 이는 tyrosine kinase와 암세포의 세포막에 있는 수용체 결합이 세포 성장과 분화에 필수적이기 때문이다<sup>33-35</sup>. 한편 암발생에 있어서 활성 산소의 발생이 중요한 역할을 하는 것으로 받아들여지고 있는데, genistein은 종양 세포와 면역 세포에 의한 활성 산소의 생성을 감소시킬 수 있고 agonist에 의해 유발된 활성 산소의 생성을 직접적으로 저해할 수도 있고 고농도의 활성 산소를 유발시키는 조건을 억제할 수도 있는 것으로 알려져 있다<sup>36</sup>. 본 연구에서는 genistein이 구강암 발생에 있어 과각화증, 극세포증, 상피 이형성증 등에서

발암과정을 지연시키는 양상을 보였으며 햄스터 협낭의 DMBA 발암 모델에 관련된 많은 연구에서 이미 보고된 바와 같이 본 실험의 발암과정에서 보이는 조직학적 소견은 기존의 연구와 유사했다. 즉 초기의 기저막 비후 등의 염증소견을 거쳐 상피 이형성의 조직학적 특징을 보이며 이어 이형 세포의 출현이 있어 상피 내암의 소견을 보이게 되고 DMBA 도포 16주 후에는 개체별로 약간의 차이가 있으나 유두상의 증식이 있는 편평세포암종의 형성에 이르게 된다. 이 모델은 시간적 진행에 따라 발암 과정을 잘 보이기 때문에 발암과정에 대한 연구 뿐만 아니라 암화학예방법에 사용되는 약제의 치료 효과를 보기 위한 동물 모델로도 유용하다고 판단되었다.

Genistein의 항신생혈관화 작용에 대한 보고가 있는데 Fotsis 등<sup>37</sup>은 genistein이 혈관내피세포 증식과 혈관생성을 억제한다고 하였다. 그들의 연구에 의하면 collagen gel을 이용한 체외 실험 모델에서 genistein이 혈관생성을 억제한다고 하였는데 그 기전에 대해서는 명확한 가설이 수립되어 있지 않은 상태이므로 이에 대한 연구가 더욱 필요한 상태이다.

고형성 종양의 발생, 성장, 침투 및 전이에 있어서 혈관형성은 필수적인데 종양세포는 혈관형성인자들을 분비하여 혈관형성을 유도한다<sup>38-39</sup>. 이러한 혈관형성인자에는 aFGF, bFGF, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-8, TNF, PD-ECGF 그리고 본 연구에서 다룬 VEGF (vascular endothelial growth factor) 등이 있다. 특히 VEGF는 in vivo상에서 강력한 혈관형성능력을 가지고 있다고 알려져 있으며 최근에는 혈관내피세포의 분열촉진인자 (mitogen)로서 종양의 혈관형성을 핵심적으로 조절한다고 보고되고 있다<sup>40</sup>. 여러 연구에서 VEGF의 특이적 혈관내피세포의 분열 유도가 보고되었으며 혈관 투과도 (vascular permeability)를 증가시키고, 혈관내피세포의 분화, 이동 및 생존을 촉진시켜 종양세포의 성장을 증진시키는 작용을 하는 것으로 나타났다<sup>41</sup>. VEGF가 발현되지 않은 경우 미세혈관 밀도와 혈관투과도가 감소하고 세포사 (apoptosis)의 증가가 보고되기도 하였다<sup>42</sup>. 본 연구에서는 genistein이 VEGF의 발현을 유의하게 억제하였으며 이는 발암과정의 지연에 있어서 VEGF에 의한 신생혈관화의 억제가 하나의 기전으로서 작용하였음을 시사한다고 할 수 있다. 각 시기별로 대조군과 실험군간의 VEGF 발현은 뚜렷한 차이를 보였고 이는 16주까지 지속되었다. 그러나 16주의 H&E 염색결과에서 나타났듯이 genistein을 투여한 실험군에서도 구강암종의 소견을 보여 이는 genistein의 항신생혈관화작용이 지속적인 발암과정을 완전 차단할 수는 없었음

을 알 수 있었다. 이는 생체의 항상성유지와 연관지어 추측을 해 보면, genistein에 의해 차단된 VEGF대신 다른 혈관화인자의 발현이 촉진되어 결과적으로 계속적인 발암과정을 진행할 가능성이 있다.

혈관형성이 고형성 종양의 성장, 침투 및 전이에 꼭 필요한 과정이기 때문에, 종양의 치료를 위해 여러 가지 혈관형성억제제가 제시되었으며 여러 혈관형성억제제를 이용한 항암작용연구가 이루어졌다<sup>22,26)</sup>. 그러나 구강암에서는 이러한 시도가 미미했으며 현재까지 항신생혈관화 요법의 적용 가능성에 대한 논란이 있다. 강력한 항신생혈관화 약제인 thalidomide를 이용한 연구에서도 토끼에 발생시킨 구강암에 55%의 항암효과를 보였다고 한 보고가 있는가 하면<sup>43)</sup>, 전혀 항암효과가 없었다는 보고도 있다<sup>44)</sup>. 저자 등도 이전 연구에서 강력한 혈관형성 억제제라고 알려져 있는 thalidomide가 누드마우스(BALB/c/nu)에 이종이식된 구강편평상피세포암종의 성장을 억제하는지를 평가하고, thalidomide에 의한 구강암의 치료가 향후 전략적인 치료방법에 포함될 수 있는지를 평가하였는데 thalidomide는 종양의 vascular endothelial growth factor (VEGF)를 억제하고 미세혈관수를 현저히 감소시켰음에도 불구하고 종양의 성장을 억제하지 못하여 일차적 치료효과에 있어서 한계를 보였음을 보고한 바 있다<sup>45)</sup>. 또한 항신생혈관화 작용을 보인다고 하여도 thalidomide와 같이 인체에 사용시 부작용이 많은 약제는 임상적용가능성이 적다고 할 수 있어 콩추출물과 같이 식품으로서 부작용이 적으면서도 쉽게 적용이 가능한 물질을 연구하는 것은 의미있는 일이라 할 수 있으며 또한 genistein이 발암과정에 있어서 VEGF의 발현을 지속적으로 억제하는 효과를 보였다는 것은 genistein의 암예방효과차원을 넘어서 항신생혈관화작용을 통한 항암치료제로서의 가능성을 보였다고 할 수 있어 향후 이에 대한 적극적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## V. 결 론

콩추출물인 genistein의 구강암 발생과정에 미치는 암예방 효과 및 신생혈관화억제효과를 알아보기 위하여 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene(DMBA)에 의해서 유도된 햄스터 협낭 구강암 모델에서 면역조직화학적 염색방법으로 VEGF의 발현도를 평가하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Genistein을 투여한 실험군과 대조군은 4주까지는 조직학적으로 별다른 차이를 나타내지 않았으나 대조 8주군에서 과각화층이 더욱 두꺼워지고 저세포층의 핵/세포질 비율이 커지며 경도의 상피이형성 소견이 전반적으로 보이기 시작한 반면 실험 8주군에서는 일부에서만 극세포층이 관찰되었고 대조군에서 보이던 상피 이형성의 소견은 보이지 않았다. 대조 12주군은 상피층 내 불규칙한 이형성 세포들의 배열과 더욱 커진 핵/세포질 비율 및 유사 분열상도 관찰되었고 상피 이형성은 더욱 심해졌으나 실험 12주군은 대조군에 비해 미약한 이형성의 소견을 보여 genistein의 구강편평세포암종 예방효과를 확인할 수 있었다.

2. VEGF의 발현은 대조군의 50%이상에서 중등도 이상의 발현강도를 보인 반면 실험군에서는 40%이하에서 중등도의 발현강도를 보여 실험군에서의 VEGF의 발현이 통계적으로 유의성 있게 감소했음을 알 수 있었다.

이상의 결과를 종합해보면 genistein은 구강편평세포암종의 발암과정을 지연시키는 효과를 보였고, VEGF의 발현을 지속적으로 억제하는 효과를 보여 genistein의 항신생혈관화작용을 통한 항암치료제로서의 가능성을 보였으며 향후 이에 대한 적극적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## References

- Messina M, Barnes S : The role of soy products in reducing risks of certain cancers. *J Natl Cancer Inst* 83:541-546, 1991.
- Messina M, Persky V, Setchell KDR, Barnes S : Soy intake and cancer risk:a review of the in vitro and in vivo data. *Nutr Cancer* 21:113-131, 1994.
- Steele VE, Pereira MA, Sigman CC, Kelloff GJ : Cancer chemoprevention agent development strategies for genistein. *J Nutr* 125:713S-716S, 1995.
- Sharma OP, Adlercreutz H, Strandberg JD, Zirkin BR, Coffey DS : Soy of dietary source plays a preventive role against the pathogenesis of prostatitis in rats. *J Steroid Biochem Mol Biol* 43:557-564, 1992.
- Mokhtar NM, El-Asser AA, El-Bolkainy MN, Ibrahim HA, El-din NB, Moharram NZ : Effect of soybean feeding on experimental carcinogenesis-III. Carcinogenicity of nitrite and dibutylamine in mice: a histopathological study. *Eur J Cancer Clin Oncol* 24:403-411, 1988.
- Helms JR, Gallaher JJ : The effect of dietary soy protein isolate and genistein on the development of preneoplastic lesions (aberrant crypts) in rats. *J Nutr* 125:802S(abs.), 1995.
- Makela S, Pylkkanen L, Santti R, Adlercreutz H : Effects of foods on the immune and hormonal systems, University of Zurich and Swiss Federal Institute of Technology, Switzerland, P.135-139, 1991.
- Troll W, Wiesner R, Belman S, Shellabarger CJ : Inhibition of carcinogenesis by feeding diets containing soybeans. *Proc Am Assoc Cancer Res* 20:265(abs), 1979.
- Kim JP, Park JG, Lee MD, Han MD, Park ST, Lee BH, Jung SE : Co-carcinogenic effects of several Korean foods on gastric cancer induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in rats. *Jap J Surg* 15:427-437, 1985.
- Shao ZM, Wu J, Shen ZZ, Barsky SH : Genistein exerts multiple suppressive effects on human breast carcinoma cells. *Cancer Res* 58:4851-4857, 1998.
- Kuo SM. Antiproliferative potency of structurally distinct dietary flavonoids on human colon cancer cells. *Cancer Lett* 110:41-48, 1996
- Folkman J, Cotran RS : Relationship of vascular proliferation to tumor growth. *Int Rev Exp Pathol* 16 : 207-248, 1976.
- Dickinson AJ, Fox SB, Persad J : Quantification of angiogenesis as an independent predictor of prognosis in invasive bladder carcinomas. *Br J Urol* 74 : 762-766, 1994.
- Jaeger TM, Weidner N, Chew K : Tumor angiogenesis correlates with lymph node metastasis in invasive bladder cancer. *J Urol* 154 : 69-71, 1995.
- Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD : Expression of vascular endothelial cell growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res* 55 : 3964-3968, 1995.
- Tanigawa N, Amaya H, Matsumura M : Extent of tumor vascularization correlates with the prognosis and hematogenous metastasis in gastric carcinomas. *Cancer Res* 56 : 2671-2676, 1996.
- Gasparini G, Harris AL: Clinical importance of the determination of tumor angiogenesis in breast carcinoma: Much more than a new

- prognostic tool. *J Clin Oncol* 13:765-782, 1995.
18. Leedy DA, Trune DR, Kronz JD, Weidner N, Cohen JI: Tumor angiogenesis, the p53 antigen, and cervical metastasis in squamous cell carcinoma of the tongue. *Otolaryngol Head Neck Surg* 111:417-422, 1994.
  19. Williams JK, Carlson GW, Cohen C, Derose PB, Hunter S, Jurkiewicz MJ: Tumor angiogenesis as a prognostic factor in oral cavity tumor. *Am J Surg* 168:373-380, 1994.
  20. Pazouki S, Chisholm DM, Adi MM, Carmichael G, Farquharson M, Ogden GR, Schor SL, Schor AM: The association between tumour progression and vascularity in the oral mucosa. *J Pathol* 183:39-43, 1997.
  21. Shpitzer T, Chaimoff M, Gal R, Stern Y, Feinmesser R, Segal K: Tumor angiogenesis as a prognostic factor in early oral tongue cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 122:865-868, 1996.
  22. Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, Ferrara N: Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* 362 : 841-844, 1993.
  23. Barinaga M : Designing therapies that target tumor blood vessels. *Science* 24(275) : 482-484, 1997.
  24. Coleman KR, Braden GA, Willingham MC, Sane DC : Vitaxin, a humanized monoclonal antibody to the vitronectin receptor (alpha<sub>v</sub>beta<sub>3</sub>), reduces neointimal hyperplasia and total vessel area after balloon injury in hypercholesterolemic rabbits. *Circ Res* 84 : 1268-1276, 1999.
  25. Matsumoto K, Ninomiya Y, Inoue M, Tomioka T : Intra-tumor injection of an angiogenesis inhibitor, TNP-470, in rabbits bearing VX2 carcinoma of the tongue. *Int J Oral Maxillofac Surg* 28 : 118-124, 1999.
  26. Schiller JH, Bittner G : Potentiation of platinum antitumor effects in human lung tumor xenografts by the angiogenesis inhibitor squalamine : effects on tumor neovascularization. *Clin Cancer Res* 5 : 4287-4294, 1999.
  27. Moriyama M, Kumagai S, Kawashiri S, Kojima K, Kakihara K, Yamamoto E : Immunohistochemical study of tumour angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 33 : 369-374, 1997.
  28. Denhart BC, Guidi AJ, Tognazzi K, Dvorak HF, Brown LF : Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptors in oral and laryngeal squamous cell carcinoma and dysplasia. *Lab Invest* 77 : 659-664, 1997.
  29. Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, Cleary KR, Ellis LM : Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res* 55 : 3964-3968, 1995.
  30. Obermair A, Kohlberger P, Bancher-Todesca D, Tempfer C, Sliutz G, Leodolter S, Reinhaller A, Kainz C, Breitenacker G, Gitsch G : Influence of microvessel density and vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor expression on prognosis in vulvar cancer. *Gynecol Oncol* 63 : 204-209, 1996.
  31. Wei H, Wei L, Frenkel K, Bowens R, Barnes S : Inhibition of tumor promoter-induced hydrogen peroxide formation in vitro and in vivo by genistein. *Nutr Cancer* 20:1-12, 1993.
  32. Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe SI, Itoh N, Shibuya M, Fukami Y : Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem* 262:5592-5595, 1987.
  33. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, et al : Molecular biology of the cell, 3rd ed. Garland Publishing, Inc, 1994, P.759-770.
  34. Peterson TG, Barnes S : Genistein inhibition of the growth of human breast cancer cells: independence from estrogen receptors and the multi-drug resistance gene. *Biochem Biophys Res Commun* 179:661-667, 1991.
  35. Akimura K, Utsumi T, Sato EF, Klostergaard J, Inoue M, Utsumi K : Role of tyrosyl phosphorylation in neutrophil priming by tumor necrosis factor-alpha and granulocyte colony stimulating factor. *Arch Biochem Biophys* 298:703-709, 1992.
  36. Fotsis T, Pepper M, Adlercreutz H, Hase T, Montesano R, Schweigerer L : Genistein, a dietary ingested isoflavonoid, inhibits cell proliferation and in vitro angiogenesis. *J Nutr* 125(3 Suppl):790S, 1995.
  37. Folkman J, Shing Y : Angiogenesis. *J Biol Chem* 267 : 10931-10934, 1992.
  38. Folkman J : What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 82 : 4-6, 1990.
  39. Tokumo K, Kodama J, Seki N, Nakanishi Y, Miyagi Y, Kamimura S, Yoshinouchi M, Okuda H, Kudo T : Different angiogenic pathways in human cervical cancers. *Gynecol Oncol* 68 : 38-44, 1998.
  40. Winlaw DS : Angiogenesis in the pathobiology and treatment of vascular and malignant diseases. *Ann Thorac Surg* 64 : 1204-1211, 1997.
  41. Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD : Expression of vascular endothelial cell growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res* 55 : 3964-3968, 1995.
  42. Verheul HM, Panigrahy D, Yuan J, D' Amato RJ : Combination oral antiangiogenic therapy with thalidomide and sulindac inhibits tumour growth in rabbits. *Br J Cancer* 79 : 114-118, 1999.
  43. Kotoh T, Dhar DK, Masunaga R, Tabara H, Tachibana M, Kubota H, Kohno H, Nagasue N : Antiangiogenic therapy of human esophageal cancers with thalidomide in nude mice. *Surgery* 125 : 536-544, 1999.
  44. Myoung H, Hong SD, Kim YY, Hong SP, Kim MJ: Evaluation of the anti-tumor and anti-angiogenic effect of paclitaxel and thalidomide on the xenotransplanted oral squamous cell carcinoma. *Cancer Letters* 163:191-200, 2001.

## 사진부도 설명

Fig. 1. Photomicrography in H&E staining

- a. Photomicrography of control group 4 weeks ( $\times 100$ , H&E)
- b. Experimental group 4 weeks ( $\times 100$ , H&E)
- c. Photomicrography of control group 8 weeks ( $\times 100$ , H&E)
- d. Experimental group 8 weeks ( $\times 100$ , H&E), The acanthosis in the experimental group is weaker than that of the control group
- e. Photomicrography of control group 12 weeks ( $\times 100$ , H&E), note the mitotic figures and basal hyperplasia
- f. Experimental group 12 weeks ( $\times 100$ , H&E), mild epithelial dysplasia is shown
- g. Photomicrography of control group 16 weeks ( $\times 200$ , H&E), note the invasion to the connective tissue
- h. Experimental group 16 weeks ( $\times 200$ , H&E)

Fig. 2. Immunohistochemical expression of VEGF

- a. Brown stained cytoplasm of cells were shown markedly in the 8week control group ( $\times 200$ )
- b. VEGF expression in the 8 week genistein-treated group ( $\times 200$ ) note the brown stained cytoplasm were shown rarely or sparsely.

사진부도 ①

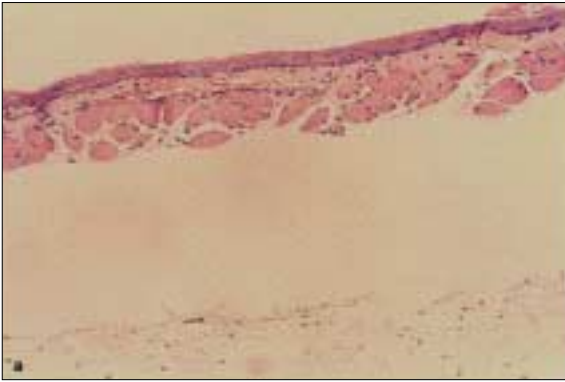


Fig. 1-a

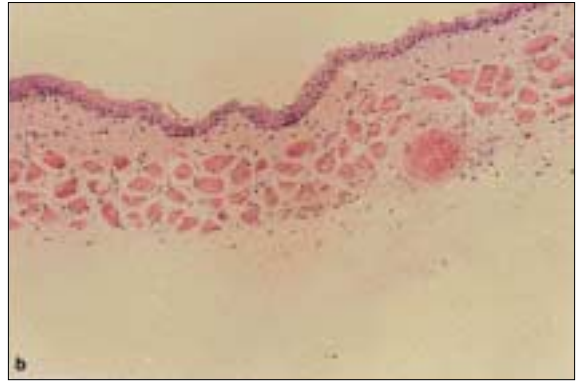


Fig. 1-b

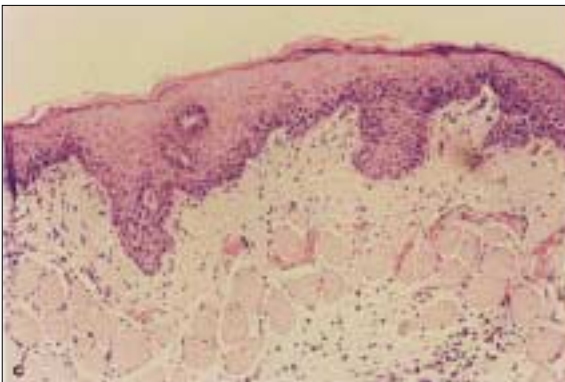


Fig. 1-c

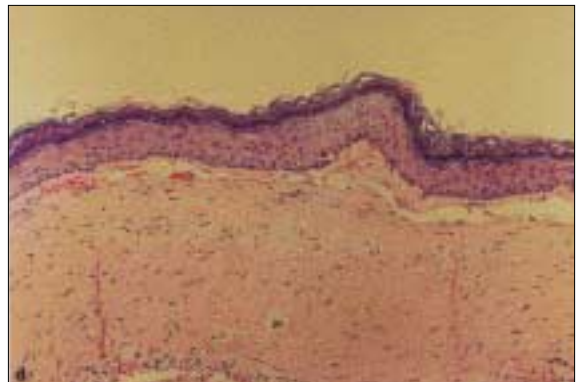


Fig. 1-d

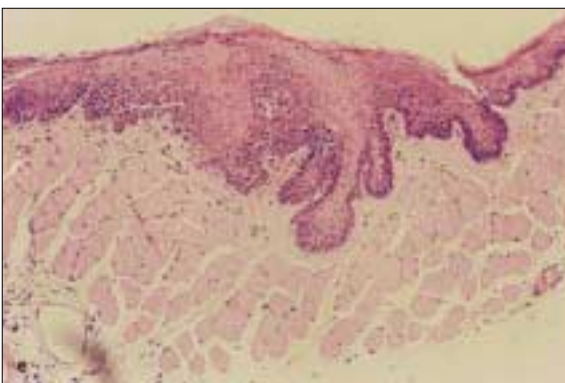


Fig. 1-e

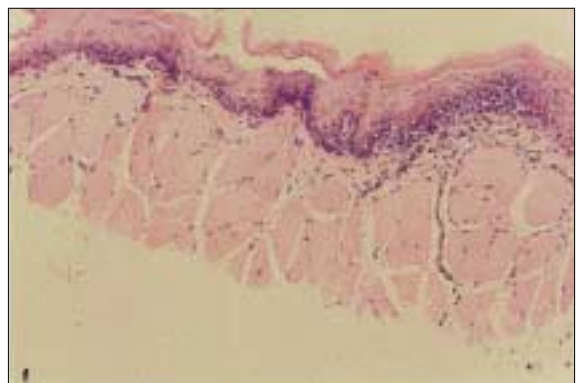


Fig. 1-f

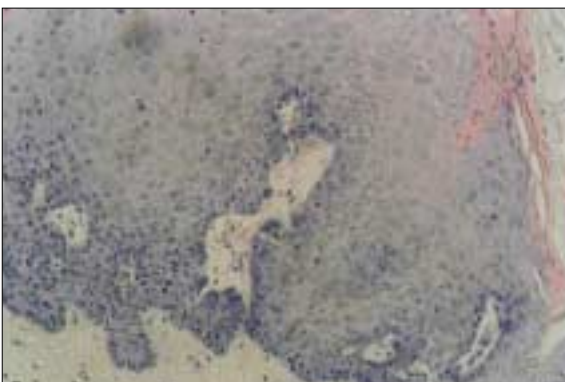


Fig. 1-g

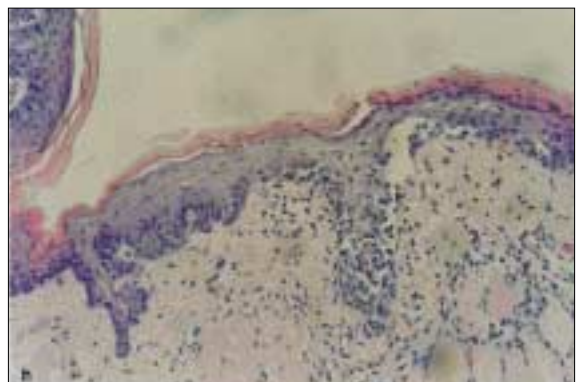


Fig. 1-h

사진부도 ②

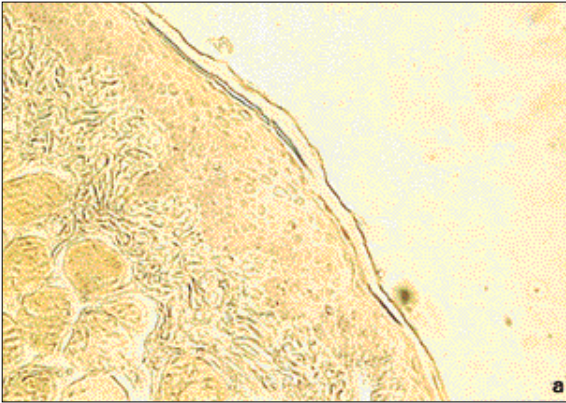


Fig. 2-a

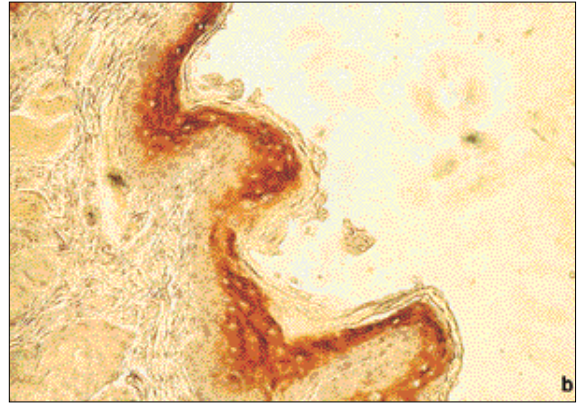


Fig. 2-b