

## 위암의 재발양상에 따른 혈관내피성장인자의 발현

가톨릭대학교 의과대학 외과학교실

성기영 · 박일영 · 이도상 · 김 욱 · 백종민 · 신동준 · 원종만 · 이재학

### Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Correlated with Recurrence in Gastric Carcinomas

Gi Young Sung, M.D., Il Young Park, M.D., Do Sang Lee, M.D., Wook Kim, M.D., Jong Min Baek, M.D., Dong Jun Shin, M.D., Jong Man Won, M.D. and Jai Hak Lee, M.D.

Department of Surgery, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

**Purpose:** Angiogenesis is essential for tumor growth and metastasis and depends on the production of angiogenic factors that are secreted by tumor cells. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is the most significant angiogenic factor and a selective mitogen for endothelial cells. VEGF, also known as the vascular permeability factor, acts on endothelial cells to increase microvascular permeability and directly stimulate the growth of new blood vessels. Several studies have reported that the expression of VEGF is correlated with hematogenous recurrence via angiogenesis in gastric carcinomas. This research evaluated the relationship between the expression of VEGF and hepatic and peritoneal recurrence in gastric carcinomas.

**Materials and Methods:** Thirty specimens resected from patients with primary gastric carcinomas who had undergone curative resections were divided into three group: Group I, early gastric carcinomas without recurrence; Group II, advanced gastric carcinomas with hepatic recurrence; and Group III, advanced gastric carcinomas with peritoneal recurrence. The expression of VEGF and the density of the microvessel count were examined using immunohistochemistry.

**Results:** 1) The expression of VEGF in Group II and Group III (63.2±24.3%) was stronger than that in Group I (7±4.2%). The expression of VEGF in Group II (76.5±13.2%)

was stronger than that of the Group III (50±14.2%) ( $P < 0.05$ ). 2) The microvessel count in Group II (49.9±14.5) was more than that in Group I (8.6±2.6) and Group III (29.1±18.1) ( $P < 0.05$ ). 3) The microvessel count was increased significantly with increasing the expression of VEGF.

**Conclusions:** The expression of VEGF is associated with advanced stomach cancer and hepatic recurrence has a higher expression of VEGF than peritoneal recurrence with neovascularization. Thus the expression of VEGF can be considered to be a useful indicator of recurrence in gastric carcinoma and especially in hepatic recurrence. (J Korean Gastric Cancer Assoc 2002;2:195-199)

**Key Words:** Gastric carcinoma, Angiogenesis, Vascular endothelial growth factor, Recurrence

**중심 단어:** 위암, 혈관신생, 혈관내피성장인자, 재발

## 서 론

위암은 한국인에서 가장 흔한 암의 하나로 암 사망 원인의 1위를 차지하며, 진행된 위암 환자의 반 수 이상은 근치적 절제 후에도 암의 재발로 사망한다.(1) 암의 재발은 수술 당시 잠복해 있던 미세 전이세포가 성장하여 발생하므로 원발성 종양의 전이 및 재발 가능성에 대한 예후인자를 찾는 것은 환자의 치료 방침 결정에 중요한 역할을 한다.

위암의 재발은 간류위, 국소부위, 림프절, 복막, 혈행성 전이로 발생하는데, 그중 복막 전이가 가장 많고 그 다음이 혈행성 전이이다.(2) 암세포가 혈행성 전이를 하기 위하여서는 암세포 주변에 풍부한 혈관이 분포되어야 하는데 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)는 이러한 신생혈관의 생성을 자극하는 필수적인 인자이다. Maeda 등(3)은 강력한 혈관형성인자인 혈관내피성장인자가 암의 진행과 예후에 밀접한 관계가 있음을 보고하였고, Tanigawa 등(4)도 위암에서 신생혈관이 혈행성 전이와 밀접한 관계가 있음을 보고하였다. 본 실험에서는 위암절제조직에서 혈관내피성장인자의 발현이 재발을 예측할 수 있는 지를 알아보려고 하였다.

책임저자 : 김 욱, 경기도 원미구 소사동 2번지  
가톨릭대학교 성가병원 외과, 420-717  
Tel: 032-340-7022, Fax: 032-340-2668  
E-mail: kimwook@hfhcuk.ac.kr

접수일 : 2002년 10월 7일, 게재승인일 : 2002년 11월 23일

방 법

1) 실험군

1995년 1월부터 1999년 12월까지 가톨릭대학교 의과대학 성가병원 외과에서 위암 진단을 받고 위절제술을 시행하여 병리조직학적으로 위암으로 최종 진단이 되고, 파라핀 포매의 보관상태가 양호한 조직을 갖고 있는 추적 가능한 환자를 대상으로 하였다. 재발하지 않은 조기위암 조직을 대조군, 진행위암으로 복막에 재발을 한 조직을 복막재발군, 간에 재발한 한 조직을 간재발군으로 하여 각각 10예를 대상으로 하여 비교하였다. 이들은 모두 수술 전 항암 요법이나 방사선 치료를 받지 않았으며 근처적 위절제술을 시행하였다. 추적 관찰 중 재발 여부는 컴퓨터단층촬영 등의 방사선검사와 재발된 조직을 얻어 병리조직학적으로 확진하였다. 평균 추적기간은 30.5개월이었다.

2) 혈관내피성장인자의 발현

(1) 면역조직화학적 염색: 위암절제조직을 10% 포르말린 용액에 고정하여 파라핀케를 만들고 4µm 두께의 절편을 만들어 슬라이드를 제작하였으며, 면역조직화학적 염색은 streptavidin-biotin방법으로 시행하였다. 조직 슬라이드는 xylene으로 탈파라핀 과정을 거친 후 에탄올로 수화하였고, 조직 자체의 내인성 과산화 효소의 활동을 억제시키기 위해 3% 과산화수소가 포함된 완충액으로 처리하였다. 또한 비특이성 항체들의 결합을 방지하기 위해 10% normal horse serum으로 20분간 처리하였다. 일차항체는 상용화된 monoclonal anti-VEGF (Pharmingen, San Diego, CA)를 1 : 50으로 희석하여 조직 슬라이드와 반응시킨 후 4°C에서 하룻밤 동안 반응시킨 후 ABC kit (Vector Laboratories., Burlingame, CA)를 이용하여 avidin-biotin immunoperoxidase법으로 염색하였다. 음성 대조를 위해 일차 항체를 반응시키지 않고 다른 과정은 동일하게 시행한 후 관찰하였다. 마지막으로 phosphate-buffered saline으로 3번 세척한 후 Aminoethylcarbazole로 10분간 반응시켜 발색한 다음 hematoxylin으로 대조 염색하였다.

(2) 평가방법: 면역조직화학적 염색을 시행한 슬라이드를 광학현미경에서 검색하여 암세포의 세포질이나 세포막의 발현을 관찰하여 암세포에서 혈관내피성장인자의 발현을 발견할 수 없는 경우를 -, 30% 미만인 경우를 +, 30~60%인 경우를 ++, 60% 이상인 경우를 +++라고 분류하여 판정하였다.(5)

3) 신생 미세혈관

미세혈관의 숫자는 내피세포를 선택적으로 염색하는 물질 중 하나인 Factor VIII을 이용하였고, 상용화된 anti-Factor VII related antigen monoclonal antibody (BioGenex., San

Ramon, CA)를 1 : 50으로 희석하여 사용하였다. 면역조직화학적 염색은 혈관내피성장인자와 동일하게 실시하였다. 미세혈관은 주변의 혈관이나 중양세포 또는 기질의 연결조직과 구별되는 적색을 띤 세포 또는 내피세포의 군락으로 정의하였고, 적혈구의 크기보다 8배 이상의 직경을 갖거나, 근육 내에 있는 혈관은 제외하였으며, 내강이 없더라도 양성을 보이는 단일 내피세포나 내피세포들의 군락은 한 개의 혈관으로 인정하였다. 저배율에서 다섯 군데의 가장 혈관 분포가 밀집한 곳을 찾은 후 200배로 다시 관찰하여 미세혈관수를 세어 그 평균치를 해당 환자의 미세혈관수로 정의하였다.

4) 통계적 분석

통계적 처리방법으로 SPSS를 이용하여 각 군의 혈관내피성장인자의 발현과 신생미세혈관수의 차이는 일원배치 분산분석을 사용하였고, 혈관내피성장인자의 발현과 미세혈관과의 관계는 Pearson 상관계수를 사용하여 비교하였다. 통계치리상 유의수준은 P 값이 0.05 이하인 경우로 하였다.

결 과

1) 혈관내피성장인자의 발현과 위암의 재발양상

혈관내피성장인자는 암세포의 세포질이나 세포막에 고르게 발현이 되었다(Fig. 1). 대조군인 조기위암의 혈관내피성장인자의 발현은 7+4.2% (평균 +), 재발한 진행성 위암의 발현은 63.2+24.3%로 재발한 경우 혈관내피성장인자의 발현이 매우 유의하게 많았으며, 또한 간재발군에서 혈관내피성장인자의 발현이 76.5+13.2%로 복막전이군의 50+14.2%보다 유의하게 높았다(P<0.05, Fig. 2).

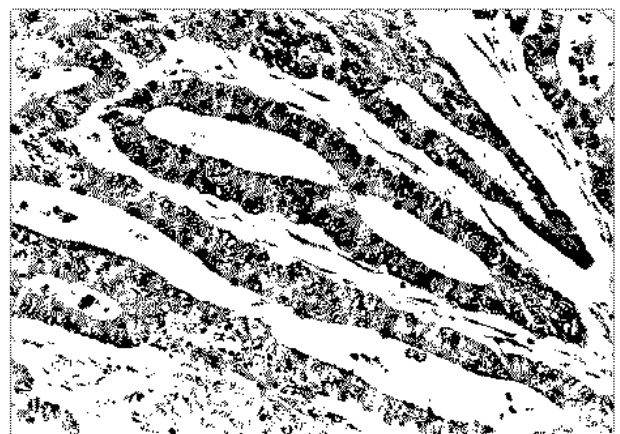


Fig. 1. Positive reaction to VEGF antibody in gastric carcinoma (×200). VEGF was mainly localized to the cytoplasm or membrane of the carcinoma cell.

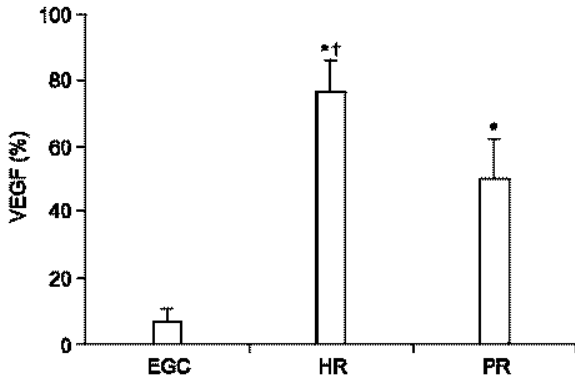


Fig. 2. The expression of VEGF according to mode of recurrence. Expression of VEGF significantly correlated with hepatic recurrence. \* =  $p < 0.05$  compared to EGC; † =  $p < 0.05$  compared to PR; EGC = early gastric ca.; HR = hepatic recurrence; PR = peritoneal recurrence.

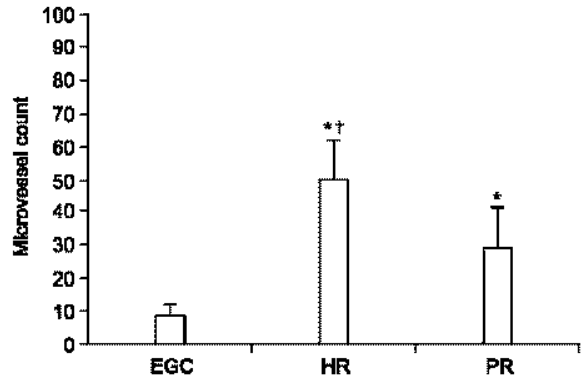


Fig. 4. The microvessel count according to mode of recurrence. The microvessel count significantly correlated hepatic recurrence. \* =  $p < 0.05$  compared to EGC; † =  $p < 0.05$  compared to PR; EGC = early gastric ca.; HR = hepatic recurrence; PR = peritoneal recurrence.

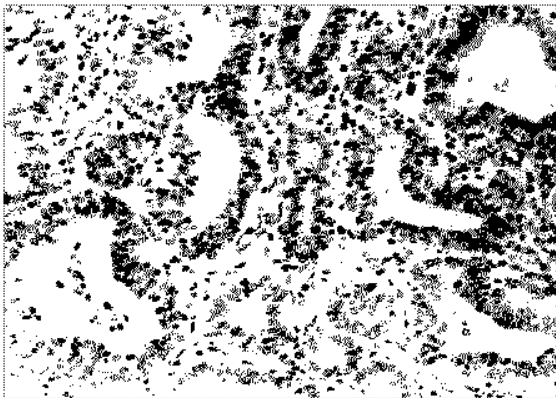


Fig. 3. Positive reaction of the microvessels for factor VIII ( $\times 200$ ). Microvessel was mainly located around carcinoma cells.

### 2) 신생미세혈관과 재발양상

신생미세혈관들은 주로 암세포 주변에 많이 분포하였고 (Fig. 3), 신생미세혈관수는 조기위암군에서  $8.6 \pm 2.6$ 개, 간재발군에서  $49.9 \pm 14.5$ 개, 복막재발군에서  $29.1 \pm 18.1$ 개로 간재발군에서 가장 유의하게 많았다 ( $P < 0.05$ , Fig. 4).

### 3) 혈관내피성장인자의 발현과 신생미세혈관과의 관계

신생미세혈관수는 혈관생성인자의 발현이 (-)인 경우  $3.5 \pm 1.7$ 개, (+)인 경우  $12.9 \pm 5.1$ 개, (++)인 경우  $26 \pm 5.3$ 개, (+++)인 경우  $53.6 \pm 18.1$ 개로 혈관내피성장인자의 발현이 강할수록 미세혈관이 유의하게 많이 생성되었다 ( $r=0.843$ ,  $P < 0.05$ , Fig. 5).

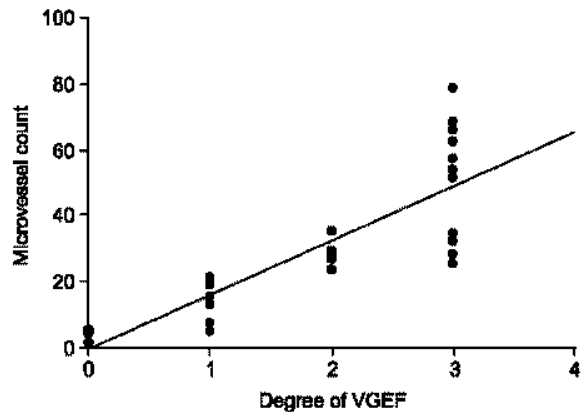


Fig. 5. Correlation between the microvessel count and the expression of VEGF.

### 고 찰

암의 전이는 사망의 중요한 원인이므로 원발병소에서 암 전이의 가능성을 예측할 수 있다면 환자의 치료에 많은 도움이 되리라는 것은 명백하다. Folkman(6)은 악성 종양이 성장과 전이를 하기 위해서 혈관형성이 필요하며 중요한 역할을 한다고 하였다. 혈관형성의 정도가 암의 전이 및 예후와 관련이 있다는 것은 위, 식도, 유방, 폐, 난소 및 대장 등의 여러 장기의 악성종양에서 보고되고 있다.(7-12)

이러한 종양의 혈관형성은 종양세포에서 분비되는 혈관형성인자에 의해 조절되는데 이러한 인자로는 transforming growth factor (TGF), tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), basic fibroblast growth factor (bFGF), hepatocyte growth factor (HGF), VEGF 등이 알려져 있다. 이러한 인자들이 종양세포

자체에서 분비되어 혈관내피세포의 이동과 증식을 유발하며 대표적으로 bFGF와 VEGF가 있다.(13)

혈관내피성장인자는 분자량이 32~42 Kd의 당단백질로, 혈관내피세포 표면에 있는 수용체인 Flt-1 (쥐)이나 KDR (사람)에 결합하며 혈관내피세포를 증식시키는 유사분열물질로서 작용하여 신생혈관의 증식을 촉진시키고,(14) 또한 미세혈관의 투과성을 증가시켜 혈장단백을 혈관 외로 방출시켜(15) 세포간질에 섬유소원이나 fibronectin이 섬유소 응괴에 혼합되도록 하여 섬유소 모세포, 내피세포와 다른 세포가 이동할 수 있는 세포간질을 형성한다.(16) 특히 혈관내피성장인자의 과발현이 종양의 생물학적 악성도와 연관이 있다고 알려져 있는데 Senger 등(13)과 Warren 등(17)은 쥐에서 단세포중화항체와 같은 혈관내피성장인자의 길항제를 사용함으로써 종양의 성장을 억제할 수 있었으며, 또한 인체의 여러 장기에서 종양의 진행과 혈관내피성장인자의 발현이 밀접한 관계가 있었다.(5)

본 연구에서는 재발이 일어난 위암절제조직에서는 혈관내피성장인자의 발현이 대조군에 비해 유의하게 높았으며, 간재발군에서 복막재발군보다 유의하게 높았다. 이는 혈관내피성장인자의 발현이 양성인 위암 환자에서 재발 및 전이 특히 간전이를 포함한 혈행성 전이가 호발한다는 Maeda 등(3)의 보고와 일치한다. Saito 등(1)과 Takahashi 등(5)도 위암 환자에서 혈관내피성장인자의 발현과 신생혈관수가 복막전이 보다는 혈행성전이와 밀접한 관계가 있다고 하였다.

또한 본 연구에서는 혈관내피성장인자의 발현이 강할수록 신생혈관의 분포가 많음을 확인할 수 있었는데 이는 혈관내피성장인자에 의해 신생혈관의 밀도가 높아지면서 위암의 전이가 진행됨을 시사한다고 하겠다. 종양의 신생혈관은 기저막이 분절되어 있어 기존의 종양혈관보다 종양세포가 들어가기 쉬우며 이러한 혈관이 과다하게 형성된 암은 신생혈관으로부터 새어나온 암세포의 혈관 전이가 증가된다.(18) 그러나 신생혈관수와 혈관내의 종양세포와의 관계는 아직 명확하게 밝혀지지 않았다. 혈관내피성장인자는 수상돌기세포의 기능적 성숙을 방해하여 종양에 대한 인체의 면역기능을 저하시키는데 이것이 혈행성 전이와 관계가 있다.(19)

Jeltsch 등(20)은 혈관내피성장인자에 의해 혈관이 아닌 림프관의 증식이 유도됨을 관찰하였는데 그들은 혈관내피성장인자에 의해 선택적으로 유도된 림프관의 증식이 염증과 면역 기능을 관여하며 종양의 전이를 촉진할 것이라고 주장하였다. 혈관내피성장인자의 발현이 복막전이와는 연관이 없다고 알려져 있으나 본 연구에서는 복막전이군에서도 혈관내피성장인자의 발현이 많이 나타났는데 이는 위암에서 혈관내피성장인자의 발현이 림프절 전이와 유사한 상관 관계를 보인 Maeda 등(3)과 Takita 등(21)의 보고와 같이 실험 대상조직이 모두 진행성 위암이고 이중 대부분이 림

프절 전이가 있었기 때문이라고 생각된다.

Moriguchi 등(22)은 고분화암이 혈행성 전이가 많고 미분화암에서 복막전이가 많음을 보고하였는데 본 연구에서는 분화도에 따른 혈관내피성장인자의 발현과 신생혈관의 밀도의 유의한 차이는 없었다.

이는 작은 대상군의 수에 의한 것이라 생각되며 더 많은 연구가 필요하리라 생각된다.

## 결 론

30명의 위암환자를 대상으로 VEGF의 발현정도를 관찰한 결과 VEGF의 발현정도가 강할수록 종양주변의 신생혈관의 밀도가 높아지고 재발 특히 간에 재발할 가능성이 높음을 알 수 있었다. 이는 다른 예후인자와 적용한다면 VEGF의 발현정도가 위암 수술 후 재발 특히 간재발의 고위험군을 구분할 수 있을 것으로 생각된다.

## REFERENCES

- Saito H, Tsujitani S, Kondon A, Ikeguchi M, Maeta M, Kaibara N. Expression of vascular endothelial growth factor correlated with hematogenous recurrence in gastric cancer. *Surgery* 1999;125:195-201.
- Koga S, Takebayashi M, Kaibara N, Nishidoi H, Kimura O, Kawasumi H, Makino M. Pathological characteristics gastric carcinoma that develop hematogenous recurrence, with special reference to the site of recurrence. *J Sur Oncol* 1987;36:239-242.
- Maeda K, Chung YS, Ogawa Y, Takatsuka S, Kang SM, Ogawa M, Sawada T, Sowa M. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma. *Cancer* 1996;77:858-863.
- Tanigawa N, Amaya H, Matsumura M, Shimomatsuya T, Horiuchi T, Muraoka R, Iki M. Extent of tumor vascularization correlated with prognosis and hematogenous recurrence in human gastric carcinoma. *Cancer Res* 1996;56:2671-2676.
- Takahashi Y, Cleary KR, Mai M, Kidagai Y, Bucana CD, Ellis LM. Significance of vessel count and vascular endothelial growth factor and its receptor (KDR) in intestinal-type gastric cancer. *Clin Cancer Res* 1996;2:1679-1684.
- Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990;82:4-6.
- Toi M, Hoshima S, Takayanagi T, Tominaga T. Association of vascular endothelial growth factor expression with tumor angiogenesis and early response in primary breast cancer. *Jpn J Cancer Res* 1994;85:1045-1049.
- Frank RE, Saclarides TJ, Leurgans S, Speziale NJ, Drab EA, Rubin DB. Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence and survival in patients with node-negative colon cancer. *Ann Surg* 1995;222:695-699.

9. Takebayashi Y, Akiyama S, Yamada K, Akiba S, Aikou T. Angiogenesis as a unfavorable prognostic factor in human colorectal carcinoma. *Cancer* 1996;78:226-231.
10. Inoue K, Ozeki Y, Surgiura Y, Tanaka S. Vascular endothelial growth factor expression in primary esophageal squamous carcinoma. *Cancer* 1997;79:206-213.
11. Fontanini G, Vignati S, Bodrini L, Chine S, Silvestri V, Lucchi M, Mucci A, Angeletti CA. Vascular endothelial growth factor is associated with neovascularization and influences progression of non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res* 1997;3:861-865.
12. Paley PJ, Staskus KA, Gebhard K, Moharaj D, Twiggs LB, Carson LF, Ramakrishnan S. Vascular endothelial growth factor in early stage ovarian carcinoma. *Cancer* 1997;80:98-106.
13. Senger DR, Van De Water L, Brwon LF. Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer Metastasis Rev* 1993;12:303-324.
14. Weinder N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Allred EN, Moore DH. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:1875-1887.
15. Senger DR, Connolly DT, Van De Water L, Feder J, Dvorak HF. Purification and NH2-terminal aminoacid sequence in guinea pig tumor-secreted vacular permeability factor. *Cancer Res* 1990;50:1774-1778.
16. Brown R, Lamir N, MaDonagh J, Toganazzi K, Dvorak HF, Dvorak AM. Fibroblast migration in fibrin gel matrices. *Am J Pathol* 1993;142:273-283.
17. Warren RS, Yuan H, Matli MR, Gillette NA, Ferrara N. Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumor genesis in mouse model of experimental liver metastasis. *J Clin Invest* 1995;85:1789-1797.
18. Weinder N. Tumoral vascularity as a prognostic factor in cancer patients: the evidence continuous to grow. *J Pathol* 1998;184:119-122.
19. Gavrilovch DI, Chen HL, Girgis KR, Cunningham HT, Meny GM, Nadaf S. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nature Med* 1996;2:1096-1103.
20. Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, Meng X, Lakso M, Rauvala H, Swartz M, Fukumura D. Hyperplasia lymphatic vessel in VEGF-C transgenic mice. *Science* 1997;276:1423-1430.
21. Takita M, Onda M, Tokunaga A. Immunohistochemical demonstration of angiogenic growth factor and EGF receptor in hepatic metastases and primary human gastric cancer. *J Nippon Med Sch* 1998;65 Suppl 5:358-366.
22. Moriguchi M, Kamakura T, Odaka T, Nose Y, Maehara Y, Korenaga D, Sugimachi K. Clinical features of the differentiated and undifferentiated types of the advanced gastric carcinoma: univariate and multivariate analyses. *J Surg Oncol* 1991;48: 202-206.