

두경부 편평세포암종에서 VEGF(vascular endothelial growth factor)의 발현 및 신생혈관생성

한양대학교 의과대학 이비인후과학교실¹, 조직병리학교실²

정연기¹ · 이형석¹ · 박철원¹ · 강미정¹ · 박용욱² · 박찬금² · 장세진² · 태 경¹

= Abstract =

Expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma

Yeon-Gi Jeong, MD¹, Hyung-Seok Lee, MD¹, Chul-Won Park, MD¹, Mee-Jeong Kang, MD¹,
Yong-Uk Park, MD², Chan-Kum Park, MD², Se-Jin Jang, MD², Kyung Tae, MD¹.

Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery¹ and Pathology²,
College of Medicine, Hanyang University, Seoul, Korea

Background and Objectives : Angiogenesis within malignant tumors has been considered to be essential for the growth and expansion of cancer cells, especially for solid tumors, and has been implicated in the overall growth and metastases of tumors. Such angiogenesis within tumors depends upon the secretion of vascular growth factor to allow the growth of newly formed vessels from peripheral tissue into the malignant tumor. Thus, an exploration of the relations between cancer cells and vascular growth factors is absolutely critical to understanding the growth of malignant tumors. According to recent reports, vascular endothelial growth factor(VEGF) has been found to play a role in lymphatic metastases, tumor recurrence and survival in various human tumors. To evaluate the role of VEGF in head and neck squamous cell carcinoma(HNSCC) we performed this study.

Materials and Methods : We examined the expression of VEGF and microvessel density in 39 HNSCC by immunohistochemistry and correlated them with various clinical data such as stage, cervical lymphatic metastasis, recurrence, and overall survival.

Results : The expression of VEGF was not correlated with overall stage, T stage and N stage. There was no statistical correlation between the expression of VEGF and recurrence in the primary site, cervical lymph node, and the distant metastases. There was no statistical correlation between the expression of VEGF and microvessel density.

Conclusion : Based on these results, it is suggested that the expression of vascular endothelial growth factor is not a major prognostic factor for head and neck squamous cell carcinoma. Further studies are needed to evaluate significance of VEGF expression in head and neck squamous cell carcinoma.

Key Words : Vascular endothelial growth factor, Angiogenesis, Squamous cell carcinoma.

서 론

교신처 : 태경, 470-701 경기도 구리시 교문동 249-1

한양대학교 의과대학 이비인후과학교실

전화 : (031)560-2363 전송 : (031)566-4884

E-mail : kyttae@hanyang.ac.kr

신생혈관생성은 기존의 모세혈관에서 새로운 모세

혈관이 형성되는 것을 뜻하며 정상적으로는 배성장(embryonic development) 및 상처 치유의 과정에서 일어나며, 병적인 경우는 당뇨병성 망막장애, 건선, 류마티스성 관절염 및 암세포의 증식 과정에서 볼 수 있다¹⁾. 악성 종양, 특히 고형암에서 새로운 혈관의 생성은 암세포가 증식하고 성장하는데 필수적인 과정이며, 암세포의 성장과 전이에 관여하는 것으로 알려져 있다. 종양에서의 신생혈관생성은 종양조직에서 혈관 생성인자를 분비하여 종양주변의 조직에서 종양으로 혈관 생성을 촉진시켜 일어난다. 그러므로 종양의 성장을 위하여 신생혈관생성인자의 분비가 필수적이고 신생 혈관을 통하여 원격전이 일어날 수가 있다. 따라서 암의 증식과 신생혈관생성 및 혈관 생성을 촉진시키는 인자의 관계를 연구하는 것은 악성 종양의 진행 과정을 이해하는데 꼭 필요하다.

신생 혈관 생성인자 중에서 가장 중요한 인자인 vascular endothelial growth factor(VEGF)는 혈관 내 피세포에 선택적으로 작용하는 성장인자로 유전자는 염색체 6p21.3에 위치하고 있다²⁾. VEGF는 heparin과 결합하는 glycoprotein으로 같은 유전자에서 alternative mRNA splicing에 의하여 121, 165, 189, 206 아미노산의 4가지 아형이 있게 되며 이중 VEGF121, VEGF165만이 확산성이 있으며 세포외로 분비되어 기능을 하는 것으로 알려져 있다. VEGF는 vascular permeability factor(VPF)로도 알려져 있으며 mitogenesis, permeability, vascular tone, vasoactive molecules의 생성, monocyte chemotaxis 등에 관여하고 있다. 유방암, 폐암, 전립선암, 자궁경부암, 식도암, 대장암 등 여러 인간의 암종에서 VEGF의 과발현이 관찰되며 VEGF의 과발현이 암의 재발, 원격전이, 나쁜 예후 등과 연관이 있다³⁾⁻⁶⁾.

본 연구에서는 두경부 편평세포암 환자에서 면역조직화학적 방법으로 VEGF의 발현과 미세 혈관 밀도를 측정하고 의무 기록의 후향적 고찰을 통해 성별, 연령, 흡연력, 병기, 경부 림프절 전이, 재발, 생존율 등의 임상 양상과 비교 분석하여 두경부 편평세포암에서 VEGF의 의의 및 신생혈관 생성과의 연관 관계를 알아보려고 하였다.

연구 대상

1995년부터 1999년까지 한양대학교 이비인후과학교실에서 두경부 편평세포암으로 치료받은 환자 중 파라핀 종괴의 보관이 양호하고 추적 관찰이 가능하였던 39례를 연구대상으로 하였다. 환자의 성별은 남자가 36명, 여자가 3명이었다. 연령은 34세에서 82세이며, 평균연령은 59.9세였다. 후두암이 25명으로 가장 많았으며, 하인두암이 5명, 편도암이 3명, 설암이 3명, 구인두암이 1명, 구강저암이 1명과 협부암이 1명이었다. 연구대상 환자 39명 중 34명에서 흡연력이 있었으며, 흡연량은 15-120 pack*year이었으며, 평균 흡연량은 49.6 pack*year이었다. 음주는 연구대상 환자 39명 중 28명에서 음주력이 있었다. T 병기는 T1이 14명, T2는 12명, T3는 6명, T4가 8명이었다. N 병기는 N0가 27명, N1이 6명, N2가 5명, N3가 2명이었다.

대상자 39명의 의무기록을 후향적으로 고찰하여 성별, 나이, 원발 부위, 병기(TNM Stage, AJCC-1997 edition에 의함), 흡연력, 경부 림프절 전이, 재발, 3년 생존율 등을 조사하여 VEGF 발현과의 상관관계를 알아보았다.

연구 방법

1. 면역조직화학적 염색

VEGF의 발현과 미세혈관밀도는 면역조직화학적 염색을 통해 측정하였다. 10% 중성 포르말린에 고정 후 파라핀에 포매되어 있는 조직표본을 4 μm 두께의 연속 절편을 만들어 L-lysine coated slide에 고정하여 사용하였다. 면역조직화화학적 염색은 파라핀에 포매되어 있는 슬라이드를 65°C 보온기에서 밤새 incubation을 시행하였으며, xylene에 20분간 2회 처리하여 탈파라핀 과정을 거쳤다. 그 후 100%, 90%, 70%, 30%의 ethyl alcohol에 각 10분, 5분, 5분, 5분씩 처리하여 합수화를 유도하였다. 내인성 과산화효소의 활성을 억제시키기 위하여 hydrogen peroxidase와 methanol을 1:4로 혼합한 용액에 15분간 반응시킨 후 phosphate-buffered saline(이하 PBS, pH 7.0)에 3회 세척하였다. 이후 슬라이드를 pH 6.0 citric acid 용액에 담그고 microwave에서 10분 정도 가열하여

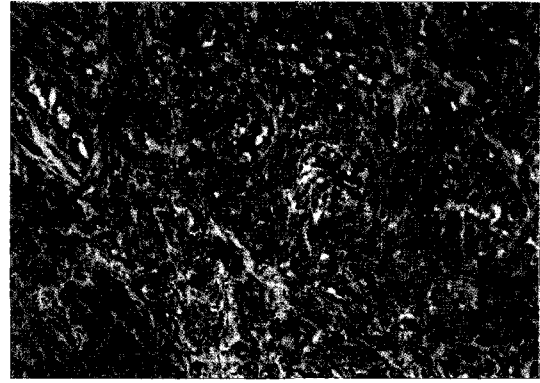


Fig 1. Immunohistochemical demonstration of VEGF expression in head and neck squamous cell carcinoma a) VEGF (-) b) VEGF (+) (X 100, light microscope)

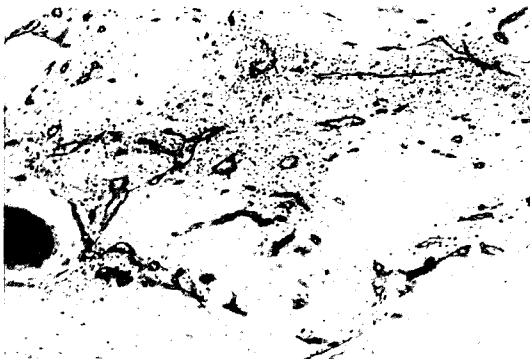


Fig 2. Immunohistochemical demonstration of microvessel with anti-CD34 antibody in head and neck squamous cell carcinoma (X 100, light microscope)

항원 복구를 시행하였다. 30분 정도 상온에서 방치하여 식힌 후 PBS에 3회 세척하였다. Blocking 항체 (Vector Laboratories, Burlingame, CA)를 도포하여 37°C에서 30분을 반응시킨 후 PBS용액에 3회 세척하였다. VEGF (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)와 CD34 (Neo Markers, Fremont, CA)에 대한 항체를 슬라이드에 도포하고 VEGF는 4°C에서 밤새, CD34는 37°C에서 2시간동안 반응시킨 후 PBS에 세척하였다. 이차 항체를 도포하여 37°C에서 30분을 반응시킨 후 재차 세척하였다. Avidin-biotin complex (Vector Laboratories, Burlingame, CA)를 도포하여 37°C에서 30분을 반응시킨 후 VEGF는 3-amino-9ethylcarbazole(AEC), CD34는 3,3'-diamino-benzidine (DAB)으로 발색시키고 헤마톡실린으로 대조 염색한 후 봉입하였다.

2. VEGF 발현 및 미세혈관밀도의 측정

동일한 조직 표본에 대하여 헤마톡실린-에오신 염색을 시행하여 종양이 있는 부분을 슬라이드에 표시한 후 면역조직화학적으로 염색한 슬라이드를 겹쳐서 종양이 있는 부분을 표시하여 광학 현미경 100배 시야에서 관찰하였다. VEGF의 발현은 종양세포의 세포질이 붉게 염색되는 것을 양성반응으로 판정하였으며 전체 암세포에서 VEGF 발현이 있는 세포의 백분율을 측정하였다. VEGF의 발현율이 30%미만인 경우를 음성이라 하였고, 30%이상인 경우를 VEGF 양성으로 판정하여 비교하였다(Fig. 1). 미세혈관밀도 (microvessel density, MVD)는 CD34의 염색에 의해 혈관 내피 세포의 세포막이 갈색으로 염색된 혈관의 갯수를 세어 측정하였다(Fig. 2). MVD가 가장 높은 부위를 찾아 100배 시야에서 한 시야 내의 모든 혈관의 갯수를 측정하였고(maximal MVD), 100배 시야에서 무작위로 5개의 시야를 골라 혈관의 갯수를 측정한 후 그 평균값을 구하였다(average MVD).

3. 통계 처리

연령, 성별, 흡연력, 원발 병소나 경부 림프절 재발 유무, 경부 림프절 전이의 유무, 생존율의 경우에는 Fisher's Exact test를, 흡연량, 전체적인 병기, T 병기, N 병기의 경우에는 Chi-square test를, 미세혈관 밀도의 경우에는 t-test를, VEGF에 따른 생존율의 비교에는 Log Rank 방법을 이용하였다.

Table 1. Expression of VEGF according to primary site

	Larynx (n=26)	Oral cavity (n=5)	Oropharynx (n=4)	Hypopharynx (n=4)
VEGF (-)	14	4	3	1
VEGF (+)	12	1	1	3

결 과

전체 39례 중 VEGF 발현 음성군은 22례(56%)였고, VEGF 발현 양성군은 17례(44%)였다. VEGF 양성군 중에서 30~60%의 VEGF 발현율을 보인 경우를 저발현군으로 하고, 60% 이상인 경우를 고발현군이라 하였을 때 VEGF 저발현군은 9례(23%)였고, VEGF 고발현군은 8례(21%)였다.

1. 연령별 차이

65세를 기준으로 65세 미만과 65세 이상으로 나누어 비교하였다. 총 39례 중 65세 미만인 경우가 28명이었으며 65세 이상인 경우가 11명이었다. 65세 미만에서 VEGF 음성은 17명, VEGF 양성은 11명이었으며, 65세 이상에서 VEGF 음성은 5명, VEGF 양성은 6명이었다. 연령은 VEGF의 발현과 통계적으로 유의한 연관관계가 없었다($p=0.482$).

2. 성별에 따른 차이

남자에서 VEGF 음성은 19명, VEGF 양성은 17명이었으며, 여자는 모두에서 VEGF 음성으로 나타났다. 성별과 VEGF의 발현은 통계적으로 유의한 연관관계가 없었다($p=0.243$).

3. 흡연력에 따른 차이

흡연력과 VEGF의 발현과는 통계적으로 유의한 연관관계가 없었다($p=1.000$). 흡연력의 정도에 따라 40 pack*year를 기준으로 40pack*year 미만인 경우를 경한 흡연력으로, 그 이상인 경우를 심한 흡연력으로 나누어 VEGF의 발현을 비교하였다. 흡연량과 VEGF의 발현은 통계적으로 유의한 연관관계가 없었다($p=0.203$).

Table 2. Expression of VEGF according to stage

	Stage I, II(n=22)	Stage II, III(n=17)
VEGF (-)	11	11
VEGF (+)	11	6

($p=0.358$)

Table 3. Expression of VEGF according to T satge

	T1, T2(n=26)	T3, T4(n=13)
VEGF (-)	15	7
VEGF (+)	11	6

($p=0.819$)

4. 원발 병소의 위치에 따른 차이

원발병소의 위치에 따른 상호 비교는 할 수 없었으며 후두에 발생한 경우가 VEGF의 발현이 높은 경향을 보였다(Table 1).

5. 병기에 따른 차이

TNM 병기(AJCC, 1997)에 의해 병기를 결정하였으며, 전체적인 병기(Stage)와 각각의 T 및 N 병기에 대하여 VEGF의 발현을 비교하였다. M 병기의 경우 M1에 해당하는 대상자가 1명 뿐 이어서 통계적 비교는 하지 않았다.

1) 전체적인 병기에 따른 차이

병기 I, II, III, IV 에 해당하는 대상자는 각각 12, 10, 5, 12명 이었으며, 병기를 I, II와 III, IV를 묶어 두 그룹으로 하여 VEGF의 발현율과 비교하였으나 통계적으로 유의한 차이를 보이지는 않았다($p=0.358$)(Table 2).

2) T 병기에 따른 차이

T1, T2, T3, T4에 해당하는 대상자는 각각 14, 12, 5, 8례 이었으며 T1 및 T2 병기, T3 및 T4 병기로 두 군으로 나누어 비교하였을 때 VEGF의 발현은 통계적으로 유의한 연관관계를 보이지 않았으나, T3, T4병기에서 VEGF의 발현율이 높았다($p=0.819$)(Table 3).

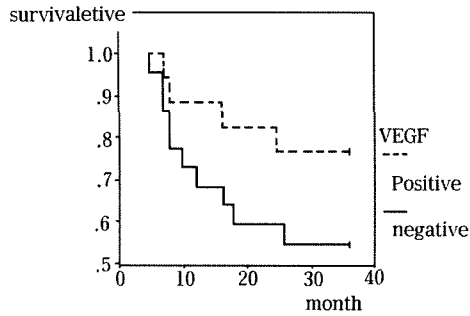


Fig 3. Survival curve of VEGF (-) and VEGF (+)

3) 경부 림프절 전이(N 병기)에 따른 차이

경부 림프절 전이가 없는 27례와 경부 림프절 전이를 동반한 12례에 있어서 경부 림프절 전이의 유무에 따라 VEGF의 발현을 비교하였을 때 경부림프절 전이가 없는 그룹에서 VEGF의 발현이 높았으나 경부 림프절 전이와 VEGF의 발현을과는 통계적으로 유의하지 않았다($p < 0.494$)(Table 4).

6. 재발과 원격 전이에 따른 차이

추적 관찰 중에 원발 병소나 경부 림프절에 재발이 확인된 10례와 폐와 늑골에 각각 원격 전이가 발생한 2례, 재발이 없는 27례에 대하여 VEGF의 발현을 비교하였으며 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

7. 생존율에 따른 차이

추적 관찰 중 36개월 이상 생존한 26례과 36개월 이전에 사망한 13례 두 군에 대하여 VEGF의 발현을 비교하였다. 진단 후 36개월 이전에 사망한 13례의 생존 기간은 5개월에서 24개월이었으며 평균 12.4개월이었다. 36개월 추적 관찰 결과 환자의 생존과 VEGF의 발현은 유의한 차이를 보이지 않았다($p = 0.318$)(Fig. 3).

8. VEGF 발현과 미세혈관밀도와와의 관계

VEGF의 음성군의 경우 maximal MVD는 28.86 ± 11 이며, average MVD는 22.19 ± 10.51 이었고 VEGF 양성군의 경우 maximal MVD는 23.24 ± 11 이며, average MVD는 17.39 ± 10.51 이었다. VEGF의 발현은

Table 4. Expression of VEGF according to cervical LN metastasis

	N(-)(n=27)	N(+)(n=12)
VEGF (-)	14	8
VEGF (+)	13	4

($p=0.494$)

Table 5. Expression of VEGF according to MVD

	Case	Maximal MVD	Average MVD
VEGF (-)	22	28.86 ± 11.39	22.19 ± 10.51
VEGF (+)	17	23.24 ± 11.25	17.39 ± 10.51

($p=0.133, p=0.165$) *MVD : microvessel density

maximal MVD와 average MVD와 비교하여 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다($p=0.133, p=0.165$)(Table 5).

고 찰

암의 신생혈관생성은 암종괴를 향하여 기존의 미세혈관들로부터 모세혈관이 뻗어나가는 여러 단계의 과정을 통해 이루어진다. 신생혈관생성이 없으면 대부분의 고형암은 1 내지 2mm^3 이상으로 자라지 못하고⁷⁾⁸⁾, 원발 위치에 국소화된 채로 남아있을 것이다. 악성 종양에서의 새로운 혈관의 생성은 특히 고형암에서 암세포가 확장하고 성장하는데 필수적인 과정이며, 암세포의 성장과 전이에 관여하는 것으로 여겨진다⁹⁾. 악성 종양의 성장이 신생혈관의 생성에 의존한다는 것은 Folkman 등⁸⁾¹⁰⁾¹¹⁾에 의해 처음 보고된 이래 많은 연구자들에 의해 주장되어져 왔으며, 신생혈관생성의 여러 조건들을 변화시켜 악성 종양의 성장을 제어하려는 시도들이 계속되어지고 있다.

혈관생성을 촉진시키는 인자로는 basic fibroblast growth factor(b-FGF), vascular endothelial growth factor(VEGF), interleukin-8, platelet-derived endothelial cell growth factor와 hepatocyte growth factor 등이 있으며¹²⁾, 억제하는 인자로는 thrombospondin-1, platelet factor-4, angiostatin, endostatin, IFN- α 와 tissue inhibitors of metalloproteinases(TIMPs) 등이 밝혀졌다. 두경부 편평세포암의 경우 정확하고도 특징적인 예후 인자가 존재하지 않으며¹³⁾¹⁴⁾ 생존율에

가장 중요한 영향을 미치는 인자가 경부 림프절 전이인 것으로 알려져 있으나¹²⁾¹⁵⁾¹⁶⁾, 경부 림프절 전이를 동반하지 않은 초기 두경부 편평세포암의 경우에도 상당히 다양하고 예측할 수 없는 경과를 나타내는 경우가 드물지 않아 두경부 편평세포암의 생물학적 특성, 특히 예후 인자로서의 VEGF의 발현과 미세 혈관 밀도에 대한 연구가 주목받고 있다.

Eisma, Smith, Mineta 등¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾은 두경부 편평세포암에서 VEGF의 발현이 암의 재발이나 생존율과 관련이 있어 VEGF의 과발현이 있는 경우 재발이 높고 무병생존기간이 짧다고 보고하였으며 O-charoenrat 등²⁰⁾은 두경부 편평세포암에서 VEGF-A와 VEGF-C의 과발현이 경부림프절전이를 예측할 수 있는 소견이라 보고하였다. 그러나 Artese 등²¹⁾은 구강암에서 VEGF의 발현이 암의 분화도나 경부 림프절 전이와 관계가 없다고 보고하였으며, Salven 등²²⁾은 두경부 편평세포암뿐만 아니라 정상조직 또는 과증식증, 이형성증 등에서도 VEGF의 발현이 있으며 VEGF의 과발현은 암의 재발이나 예후와 연관이 없다고 보고하였고, Todd 등²³⁾도 두경부 편평세포암에서 VEGF의 발현은 원격 전이, 원발 병소의 재발, 생존율과 연관이 없다 보고하였다. 또한 Tae 등²⁴⁾은 두경부 편평세포암 주위의 정상조직에서 VEGF가 발현되며 전구암병변을 거쳐 암으로 병변이 진행될수록 VEGF의 발현이 감소하며 VEGF의 과발현이 암의 병기, 재발 등과 연관이 없다 보고하였다.

Juergen 등²⁵⁾은 VEGF의 발현이 악성 종양의 성장에 따라 증가하는 것이 아니라 저산소증에 의해 신생혈관생성이 필요하게 되며 이것이 VEGF의 발현을 증가시키는 요인으로 작용하여 양성 종양이나 정상조직에서도 저산소증이 유발될 경우 VEGF의 발현이 악성 종양보다 증가된다고 보고하였다.

본 연구의 결과에 의하면 대상자의 연령과 성별은 VEGF의 발현과 모두 통계적으로 유의한 연관 관계는 보이지 않았으며 흡연력이나 흡연량과도 연관성이 없었다. 원발 병소의 위치에 따른 VEGF의 발현은 유의한 차이를 보이지 않았으며 T 병기, 경부 림프절 전이(N 병기)에 따라서도 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 1997 AJCC에 의한 전체적인 병기의 경우에서 통계학적 유의성은 없으나 VEGF의

발현이 병기 I, II에서 병기 III, IV보다 높은 양상을 보였다. 이것으로 VEGF가 종양의 말기보다는 초기 종양의 성장에 관여한다는 것을 예측할 수도 있겠다. 생존율과 VEGF의 관계에 있어 VEGF의 발현이 낮은 그룹에서 생존율이 높은 경향이 있었으나 통계적으로 유의하지는 않았다.

이미 발표된 여러 논문과 본 연구의 결과를 종합해 볼 때 두경부 편평세포암에서 VEGF의 예후 인자로서의 역할은 아직 논란이 있으며 향후 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론

두경부 편평세포암 환자의 원발병소의 조직 표본을 이용하여 VEGF의 발현을 면역조직화학적으로 염색하여 측정하고 환자의 임상 소견과 비교 분석한 결과 두경부 편평세포암에서 VEGF의 발현은 전체적인 병기, T 병기, N 병기, 재발, 생존율, 미세혈관밀도 등과 연관 관계가 없었다. 향후 좀더 많은 환자군을 대상으로 장기적인 추적관찰을 통한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

References

- 1) Folkman J: *Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid, and other disease. Nat Med.* 1995;1:27-31.
- 2) Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G: *Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to the human chromosome 6p21.3. Circulation.* 1996;93:1493-5.
- 3) 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.
- 4) Weidner N, Folkman J, Pozza F, et al: *Tumor angiogenesis : a new significant and independent prognostic indicator in early stage breast carcinoma. JNCI.* 1991;84:1875-87.
- 5) Macchiarini P, Fontanini G, Hardin M, Squartini F, Angeletti CA: *Relation of neovascularization*

- to metastasis of non-small-cell lung cancer. *Lancet*. 1991;340:145-6.
- 6) Wakui S, Furusato M, Itoi T, et al: Tumor angiogenesis in prostatic carcinoma with or without bone marrow metastasis : a morphometric study. *J Pathol*. 1992;168:257-62.
 - 7) Folkman J: How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? G. H. A. Clower Memorial Award Lecture. *Cancer Res*. 1986;46:467-473.
 - 8) Folkman J: What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *JNCI*. 1990;82:4-6.
 - 9) Hong DK, Kim KR, Lee HS, et al: Angiogenesis in the head and neck squamous cell carcinoma. *Korean J Otolaryngology*. 2002;45:601-7.
 - 10) Folkman J: Tumor angiogenesis : therapeutic implications. *N Engl J Med*. 1971;285:1182-6.
 - 11) Folkman J: Growth and metastasis of tumor in organ cultures. *Cancer*. 1962;16:453-67.
 - 12) Michelet R, Susan LJ, Prudence AES, Stephen F, Kenneth S, Russell L: Expression of the angiogenetic factor. vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor β -1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis. *Cancer Res*. 1997;57:963-9.
 - 13) Goldsmith MM, Cresson DH, Arnold LA, et al: DNA flow cytometry as a prognostic indicator in head and neck cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1987;96:307-18.
 - 14) Davis RK: Prognostic variables in head and neck cancer. *Otolaryngol Clin North Am*. 1985;18:411-9.
 - 15) Kalnins IK, Leonard AG, Sako K, Razack MS, Shedd DP: Correlation between prognosis and degree of lymph node involvement in carcinoma of the oral cavity. *Am J Surg*. 1977;134:450-4.
 - 16) Moore C, Kihns JG, Greenberg RA: Thickness as a prognostic aid in upper aerodigestive tract cancer. *Arch Surg*. 1986;121:1410-4.
 - 17) Eisma RJ, Spiro JD, Kreutzer DL: Vascular endothelial growth factor expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Am J Surg*. 1997;174:513-7.
 - 18) Smith BD, Smith GL, Carter D, Sasaki CT, Haffty BG: Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein levels in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2000;18:2046-52.
 - 19) Mineta H, Miura K, Ogino T, et al: Prognostic value of vascular endothelial growth factor (VEGF) in head and neck squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2000;83:775-81.
 - 20) O-charoenrat P, Rhys-Evans P, Eccles SA: Expression of vascular endothelial growth factor family members in head and neck squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis. *Cancer*. 2001;92:556-68.
 - 21) Artese L, Rubini C, Ferrero G, Fioroni M, Santinelli A, Piattelli A: Microvessel density (MVD) and vascular endothelial growth factor expression(VEGF) in human oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*. 2001;21:689-95.
 - 22) Salven P, Heikkila P, Anttonen A, Kajanti M, Joensuu H: Vascular endothelial growth factor in squamous cell head and neck carcinoma expression and prognostic significance. *Mol Pathol*. 1997;10:11128-33.
 - 23) Todd GD, Nicholas JH, Robert AS: Angiogenesis as a prognostic marker in early head and neck cancer. *Ann Otol Rhinol*. 1995;104:724-9.
 - 24) Tae K, El-Naggar AK, Yoo E, et al: Expression of vascular endothelial growth factor and microvessel density in head and neck tumorigenesis. *Clin Cancer Res*. 2000;6:2821-8.
 - 25) Juergen D, Peter S, Axel B, et al: Tumor hypoxia and systemic levels of vascular endothelial growth factor in head and neck cancers. *Strahlenther Onkol*. 2001;9:469-73.