

타액선 종양에서 혈관형성 인자의 발현에 관한 면역조직화학적 비교 연구

인연수 · 김성민 · 박영욱

강릉대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Abstract

COMPARATIVE IMMUNOHISTOCHEMICAL ASSAYS FOR THE EXPRESSION OF ANGIOGENIC FACTORS IN TUMORS OF HUMAN SALIVARY GLANDS

Yeon-Soo In, Soung-Min Kim, Young-Wook Park

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry,

Kangnung National University

Hallmarks of clinical behaviors of adenoid cystic carcinoma(ACC) of salivary glands are the delayed onset of vascular metastasis and poor responses to classical chemotherapeutic agents. Poor prognoses from salivary ACC are caused by lung metastases that are resistant to conventional therapy. Therefore, cellular and molecular characteristics that influence the dissemination of metastatic cells are important for the design of more effective treatment of salivary ACC. Tumor angiogenesis has been known to be essential for the distant metastasis of malignant cells. So, we determined expressions of angiogenic proteins in benign (pleomorphic adenoma) and malignant (ACC, mucoepidermoid carcinoma) tumors of salivary glands and compared each other and to those in oral squamous cell carcinoma. Using surgical specimens, we performed immunohistochemical assays with anti-vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptor-2 (VEGFR-2), phosphorylated VEGFR-2 (pVEGFR-2), matrix metalloproteinase (MMP)-9, and interleukin (IL)-8 antibodies. Most angiogenic factors were overexpressed in malignant salivary tumors than in pleomorphic adenoma which is benign nature. Moreover, ACC demonstrated more expression of VEGFR-2 than that of squamous cell carcinoma which used as control. Conclusively, these data show those angiogenic factors produced by salivary gland tumors may affect the propagation and metastasis of malignant cells of salivary tumors, and could be used as biomarkers for the malignant transformation of salivary gland tumors. Prospectively, although further studies will be needed, these biomarkers related to angiogenesis can be molecular targets for the therapy of salivary ACC, which has propensity for delayed vascular metastasis.

Key words: Adenoid cystic carcinoma, Angiogenic factor, Vascular metastasis, Molecular target

I. 서 론

선양낭성암종 (adenoid cystic carcinoma, ACC)은 대 타액선 악성종양의 4.4%, 그리고 소타액선 악성종양의

1.2%의 비율을 차지해 악성 타액선 종양 중 점액표피암종 (mucoepidermoid carcinoma, MEC)에 이어 두 번째로 빈발하는 종양이다¹⁾. 주로 50대 후반에서 발생하며 이하선과 악하선에서 주로 발생하고, 구강내의 구개부와 구강저의

※ 본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임. (과제고유번호 : A060174)

소타액선에서도 종종 발생한다²⁾. 조직학적으로 관구조의 단면과 유사하여 원주세포종 (cylindroma)으로 지칭되기도 한 선양낭성암종은 외과적 절제술 후 비교적 높은 재발률을 보인다²⁾. 즉 임상적으로 수술과 방사선 치료로 비교적 양호한 5년 생존율을 보이거나¹⁾ 초기 치료 후 10~15년 내에 신경주변으로의 국소전이와 폐로의 혈관성 전이로 인하여 약 40%이상의 재발을 보여 증례에 따라서는 그 경과와 예후가 성공적이지 못한 경우가 있다¹⁾. 대부분의 환자 사망은 기존의 항암 요법으로 치료되지 않는 폐전이 병소 때문에 혈관성 전이 병소의 차단과 관련된 개선된 치료 전략이 필요한 실정이다.

종양의 성장은 새로운 혈관의 형성을 요하며, 이 신생혈관형성 (neoangiogenesis) 과정은 기존의 혈관상 (vascular bed)으로부터 새로운 혈관의 발생으로 정의되는, 종양의 성장과 전이를 진행시키는데 있어 결정적인 병리생리학적 단계이고, 악성종양의 표현형을 유지하는데 필수요소이다. 즉 분비 방식으로 종양 세포에 의해 분비되는 혈관형성 인자 (angiogenic factor)가 악성종양의 신생혈관형성 과정을 촉진하는 것으로 알려져 있다³⁻⁵⁾. 종양의 성장에 관여하는 혈관형성 인자들 중 가장 강력한 인자는 헤파린 결합성 이량체 펩티드 (heparin binding, dimeric polypeptide)인 혈관내피성장인자 (vascular endothelial growth factor, VEGF)로 내피세포상에 특이적으로 분열촉진 활동을 하는 것으로 알려져 있어 종양관련 혈관내피세포 (tumor-associated endothelial cell)에 대한 유사분열인자 (mitogen)이다. 즉 종양세포에서 분비된 VEGF의 영향으로 정상혈관의 내피세포와는 달리 종물 내에 존재하는 종양관련 혈관내피세포의 경우 한 시점에서 10-12% 정도가 유사분열 활동을 하는 것으로 보고되었다. 특히 VEGF는 내피세포의 이주 (recruitment) 및 분화와 연관된, 혈관형성 과정의 개시 단계에 주로 영향을 미치는 것으로 연구되었으며⁶⁾ 동시에 혈관 투과성을 증가시키는 것으로 알려져 있다.

VEGF는 혈관내피세포상에 존재하는 특정수용체인 Flt-1 (VEGFreceptor-1, VEGFR-1)과 flk-1/KDR (VEGFR-2)와 결합하는데 특히 VEGFR-2는 혈관내피세포의 성장, 증식, 이주와 분화를 위한 주 수용체이다. VEGFR-2는 강한 타이로신 인산화효소 활성을 가지며 혈관형성에 대한 생리학적, 병리학적 주신호를 변환하는 역할을 한다. 이는 정상 혈관계에서보다 종양의 혈관계에서 3-5배 정도 높게 발현된다⁷⁾. 인산화 혈관내피성장인자 수용체-2 (phosphorylated VEGFR-2, pVEGFR-2)는 종양의 혈관형성에 관여하는 활성화된 형태이다.

기질금속단백분해효소 (matrix metalloproteinase, MMP)는 다양한 세포에서 분비되는 zinc-dependant endopeptidase이다⁸⁾. MMP는 세포의 이주, 신경의 성장,

창상의 치유 및 타액선과 같은 상피기관의 형태형성의 기능을 할 뿐만 아니라 많은 인간의 암종의 침습 및 전이에 있어 결정적인 요소로서 생각되고 있다⁹⁻¹¹⁾. 인터루킨-8 (Interleukin-8, IL-8)은 호중구를 활성화시키고 호중구 및 T-림프구를 견인하는 사이토카인이다. 이는 백혈구의 화학주성을 포함한 많은 효능을 지녔으며¹²⁾ 특히 신생물에 있어서 내피세포의 화학주성을 통하여 아마도 혈관형성을 강화하는 것으로 알려져 있다^{13,14)}.

타액선 암종에서는 아직까지 종양의 성장 및 전이에 관여하는 다양한 혈관형성 인자의 발현에 관한 연구가 미약한 상태이다. 선양낭성암종에서 종양의 진전과 VEGF의 발현 정도가 상관관계가 있는 것으로 보고되고는 있으나¹⁵⁾, 그 밖의 혈관형성 인자들의 발현 및 현재 선양낭성암종의 원격 전이와 연관된 종양 세포학적, 분자 생물학적 기전에 대해서는 밝혀진 바가 많지 않아 이에 대한 지식이 요구되고 있다. 이에 본 연구에서는 강한 혈관성 폐전이 경향을 보이는 선양낭성암종의 수술표본에서 혈관형성 인자들의 발현이 양성 타액선 종양이나 타 암종에서보다 강할 것이라는 가설을 설정하고, 면역조직화학염색을 통하여 이를 검증하고자 한다.

II. 연구재료 및 연구방법

1. 타액선 종양 증례 수집 및 절편제작

2002-2005년까지 강릉대학교 치과병원 구강악안면외과에 내원한 악안면부의 대타액선과 소타액선에 원발성 종양을 가진 30명의 환자에서 종물의 광범위 절제 수술시 채취된 조직으로부터 표본을 제작하였다 (Table 1). 본 연구의 대상이 된 환자의 연령은 21-79세였으며 남자환자는 20명, 여자환자는 10명이었다. 대상이 된 모든 환자는 수술 전에 항암약물 치료를 시행받은 적이 없었다. 다형성 선종 6례, 점액표피암종 9례, 선양낭성암종 8례, 구강 편평상피세포암종 7례로 총 30증례에서 절제된 조직의 일부를 떼어 통상적인 방법에 의해 포르말린으로 고정하고 파라핀으로 포매하였다. 이 표본으로부터 조직학적 슬라이드를 제작하여 먼저 Hematoxyline & Eosin (H&E)염색을 통하여 종물의 조직학적 소견을 전반적으로 검색하였다. 이후 제작된 파라핀 블록을 4-6mm로 세절하여 이를 각 혈관형성 인자의 발현을 측정하기 위한 면역조직화학적 염색에 이용하였다.

2. 면역조직화학염색을 위한 항체 및 시약

면역조직화학염색에는 다음의 일차항체들이 사용되었다: monoclonal anti-mouse VEGF (R&D systems, Inc.),

Table 1. Clinical Features of the Specimens

Identification Number	Age/Sex	Site	Pathologic diagnosis
1	21/F	Lt. palatal area	Pleomorphic adenoma
2	55/M	Lt. parotid gland	Pleomorphic adenoma
3	45/F	Lt. hard palate	Pleomorphic adenoma
4	71/M	Lt. palatal area	Pleomorphic adenoma
5	44/F	Rt. soft palatal posterior area	Pleomorphic adenoma
6	57/M	Lt. parotid gland	Pleomorphic adenoma
7	61/F	Lt. palatal area	Mucoepidermoid carcinoma
8	65/F	Lt. palatal area	Mucoepidermoid carcinoma
9	79/F	Lt. hard palate	Mucoepidermoid carcinoma
10	75/F	Lt. hard palate	Mucoepidermoid carcinoma
11	79/F	Lt. hard palate	Mucoepidermoid carcinoma
12	39/M	Lt. Maxillary molar area	Mucoepidermoid carcinoma
13	41/M	Lt. Maxillary molar area	Mucoepidermoid carcinoma
14	73/F	Lt. hard palate	Mucoepidermoid carcinoma
15	59/F	Lt. palatal area	Mucoepidermoid carcinoma
16	75/M	Lt. buccal cheek	Squamous cell carcinoma
17	64/M	Rt. buccal cheek	Squamous cell carcinoma
18	62/M	Lower lip	Squamous cell carcinoma
19	74/M	Rt.lateral tongue	Squamous cell carcinoma
20	56/M	Soft palate	Squamous cell carcinoma
21	66/M	Floor of mouth	Squamous cell carcinoma
22	58/M	Lower lip	Squamous cell carcinoma
23	36/M	Sublingual gland	Adenoid cystic carcinoma
24	45/M	Sublingual gland	Adenoid cystic carcinoma
25	55/M	Sublingual gland	Adenoid cystic carcinoma
26	32/M	Sublingual gland	Adenoid cystic carcinoma
27	31/M	Sublingual gland	Adenoid cystic carcinoma
28	40/M	Sublingual gland	Adenoid cystic carcinoma
29	39/M	Sublingual gland	Adenoid cystic carcinoma
30	42/M	Sublingual gland	Adenoid cystic carcinoma

epitope specific rabbit VEGFR-2 (Labvision corporation), pVEGFR-2 (R&D systems, Inc.), MMP-9 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA), IL-8 (Novus Biologicals, Inc.) antibodies. 이차항체로는 biotinylated linked IgG (goat anti-rabbit & goat anti-mouse immunoglobulins, DakoCytomation, Inc, USA) 가 사용되었다. 그 외의 시약으로는 streptoavidine-HPR (horseradish peroxidase, DakoCytomation, Inc., USA), DAB (3,3-diaminobenzine, Research Genetics, Huntsville, USA)이 사용되었다.

3. 면역조직화학염색 기법

(1) VEGF, pVEGFR-2, MMP-9, IL-8 염색
조직절편 중 검체 30례, 음성대조 표본 (타액선 암종) 1례를 각 항체별로 적용하였다. 조직절편은 15분간 2차례 자

일렌에 담구어 파라핀을 제거하였다. 계열 알코올 용액 (100%, 95%, 70% 에탄올 순서로 각각 10분간)에 담구어 재수화시킨후 10분간 phosphate buffered solution (PBS)에 담구어 조직절편이 건조되지 않도록 하였다. 내인성 과산화효소 (endogenous peroxidase)의 활성을 억제하기 위하여 0.3% H₂O₂ 용액을 30분간 적용하였다. 조직절편을 다시 PBS로 5~10분간 수세 후 동결된 1차 항체를 정상 혈청으로 녹여 상온에서 각 조직슬라이드에 약 2시간 정도 반응시켰다. 음성대조 표본에는 일차항체 대신 PBS만을 적용하였다. 그 후 PBS에 5~10분간 담구어 수세하고 이차항체인 biotinylated IgG를 상온에서 30분간 반응시켰다. 조직절편을 PBS로 5~10분간 수세 후 streptoavidine-HPR을 상온에서 약 20~30분간 결합시키고 다시 PBS로 15분간 3차례 수세하였다. 발색반응을 위하여 DAB를 적용하였다. 발색반응의 정도를 확인해가며 적정 시간 시행하였다. 증류수로 3차례 수세하되 마지막에는 약

5분간 수세하였다. DAB에 의한 발색반응만을 분석하기 위하여 대조염색은 시행하지 않았고, 고정을 효과적으로 하기 위하여 계열 알코올 (70%, 95%, 100% 에탄올 순서로 각각 10~20분간)에 적용시키고 자일렌에 담군 후 커버 슬라이드로 고정하였다.

(2) VEGFR-2 염색

포르말린으로 고정하여 파라핀 포매한 조직절편을 항원성 노출을 위하여 10분간 10mM citrate buffer에 담구어 끓인 후 약 5분간 PBS에 담구어 식히고 전술한 방법대로 면역조직화학적 염색을 시행하였다.

4. 혈관형성 인자의 발현정도 분석 및 통계처리

구강 편평상피세포암종의 조직을 동일조건하에서 반응시켜 대조 표본으로 삼았으며, 음성대조 표본으로는 각 항체별로 타액선 암종 표본 한개를 선택하여, 일차항체 대신 PBS를 대체 반응시켰다. 혈관형성 인자의 양성반응을 분석하기 위하여 ×400의 현미경 시야에서 각 슬라이드로부터 혈관형성 인자들에 대한 면역조직화학적 염색이 대표적으로 이루어졌다고 판단되는 영역을 3부위씩 선택하였다. 이후 VEGF, VEGFR-2, pVEGFR-2, MMP-9, IL-8에 대한 종양조직에서의 면역조직화학적 양성반응의 강도를 -, no staining; ±, staining or not; +, weak staining; ++, moderate staining; +++, strong staining의 5단계로 나누었다. 병리학자에 의해 양성반응 강도 판별 후 이를 객관화하기 위하여 각 단계별로 0, 1, 2, 3, 4점을 부여하여 점수화한 후 종양간 발현정도의 차이를 비모수 검정 (Wilcoxon's rank sum test)으로 비교하였다. 통계 분석 시 0.05 이하의 P값을 유의성 있는 차이로 인정하였다.

또한 6례의 다형성 선종에서는 도관종양세포, 근상피종양세포, 기질결합조직 및 혈관내피세포를, 9례의 점액표피암종에서는 표피양종양세포, 무신분비 종양세포, 침윤성 종양세포, 기질결합조직, 혈관내피세포를 관찰하였다. 또한 8례

의 선양낭성암종에서는 충실형 종양세포, 사상형 종양세포, 침윤성 종양세포, 기질결합조직, 혈관내피세포를, 구강 편평상피세포암종에서는 고분화형 종양세포, 중등도 분화형 종양세포, 저분화형 종양세포, 기질결합조직, 혈관내피세포를 검색하여 관찰하였다.

Ⅲ. 연구결과

1. 조직학적 소견

H&E염색이 이루어진 타액선 종양과 구강 편평상피세포암종의 조직학적 사진은 Fig. 1과 같다.

2. 구강 편평상피세포암종에서 혈관형성 인자들의 발현

구강 편평상피세포암종에서 각 표본당 400배의 현미경 시야에서 다른 3부위를 선택하여 총 21부위에 대해 각 혈관형성 인자들의 양성 반응의 강도를 평가한 결과는 Table 2와 같았다. 이를 점수화하여 Fig. 2-A에서와 같이 구강 편평상피세포암종에서는 VEGF와 MMP-9의 발현이 현저하였다. 또한 각 표본에서 살펴본 5종류의 조직 및 세포 중 항체들에 대한 발현 정도를 살펴본 결과 Fig. 3에서와 같이 저분화된 종양세포에서 혈관형성 인자들의 발현이 강하였다.

3. 다형성선종에서 혈관형성 인자들의 발현

6례의 표본의 18영역 중, 각 항체의 발현 강도는 Table 3과 같고 이를 점수화하여 Fig. 2-B와 같은 결과를 얻었다. 즉 구강 편평상피세포암종이나 타액선 악성종양과 비교하여 모든 인자들의 발현이 아주 미약하였다. 다형성선종의 종양세포들을 관찰한 결과 근상피종양세포에서보다 도관종양세포에서 MMP-9이 더 강하게 발현되었다 (Fig. 4).

Table 2. Expressions of the Biomarkers in Specimens of Squamous Cell Carcinoma

n	VEGF	VEGFR-2	pVEGFR-2	MMP-9	IL-8
1	±, +, +	±, ±, ±	±, -, -	±, ±, ±	-, -, ±
2	++, ++, +++	-, -, -	±, ±, +	++, ++, +++	±, ±, ±
3	+, ++, +	±, ±, +	±, ±, -	++, +, ++	-, -, -
4	++, ++++, +	-, ±, +	±, -, -	++, +, ±	-, +, ±
5	+, ++, +++	±, ±, -	-, ±, -	±, ±, +	±, ±, -
6	±, ++, +	+, +, ±	±, ±, -	++, +, ±	±, -, ±
7	++, +, +	+, ±, +	-, -, ±	±, +, +	-, -, ±

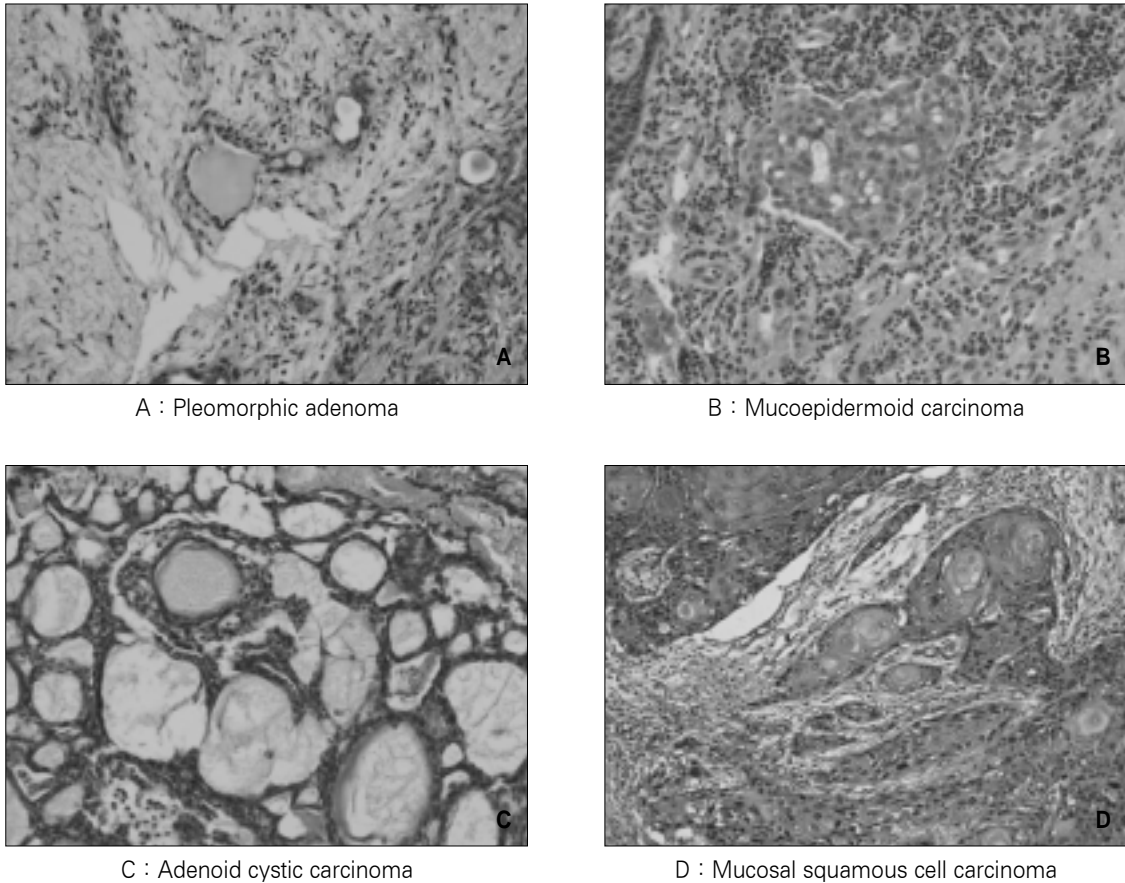


Fig. 1. Histological features of the experimental and control tumors (Hematoxyline & Eosin staining, ×400 magnification).

A.

Antibody \ Score	0	1	2	3	4
VEGF	0	0	2	3	1
VEGFR-2	3	3	0	0	0
pVEGFR-2	2	3	1	0	0
MMP-9	0	3	0	2	1
IL-8	2	4	0	0	0

B.

Antibody \ Score	0	1	2	3	4
VEGF	15	2	1	0	0
VEGFR-2	16	2	0	0	0
pVEGFR-2	17	1	0	0	0
MMP-9	14	4	0	0	0
IL-8	15	3	0	0	0

C.

Antibody \ Score	0	1	2	3	4
VEGF	4	9	11	3	0
VEGFR-2	4	22	1	0	0
pVEGFR-2	6	20	1	0	0
MMP-9	0	14	5	2	6
IL-8	22	5	0	0	0

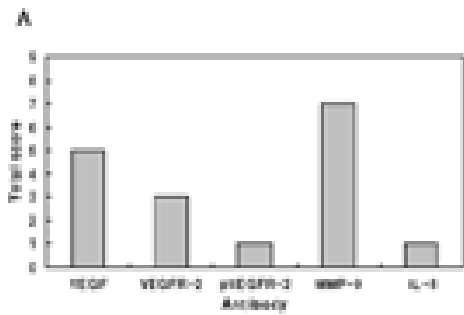
D.

Antibody \ Score	0	1	2	3	4
VEGF	1	11	8	4	0
VEGFR-2	8	9	3	4	0
pVEGFR-2	1	23	0	0	0
MMP-9	2	10	9	3	0
IL-8	15	9	0	0	0

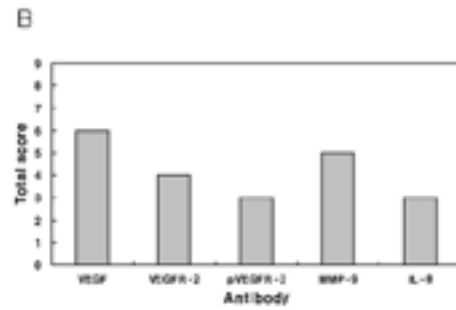
Fig. 2. Number of areas which are evaluated as given scores in expressions of neoangiogenesis-related proteins. A : Squamous cell carcinoma, B : Pleomorphic adenoma, C : Mucoepidermoid carcinoma, D : Adenoid cystic carcinoma

Table 3. Expressions of the Biomarkers in Specimens of Pleomorphic Adenoma

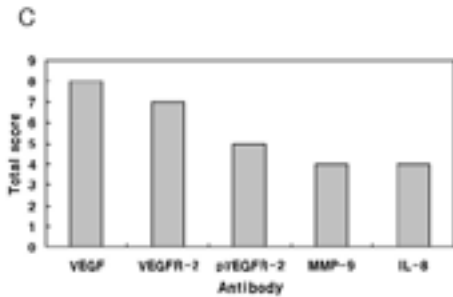
n	VEGF	VEGFR-2	pVEGFR-2	MMP-9	IL-8
1	±, ±, ±	±, ±, ±	±, ±, ±	++, ++, +++	-, -, -
2	±, +, +	±, ±, ±	±, ±, +	±, ±, ±	-, -, -
3	±, ±, ±	±, ±, ±	±, ±, ±	±, ±, ±	±, ±, ±
4	+, +, ++	±, ±, ±	±, ±, ±	±, ±, +	-, -, -
5	++, ++, +++	+, ++, ++	±, ±, ±	++, ++, +++	-, -, -
6	-, -, ±	±, ±, ++	±, ±, ±	±, ±, ±	-, -, -



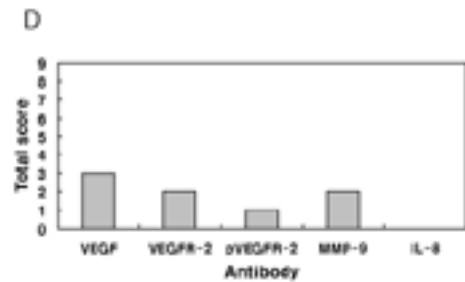
A : Well-differentiated tumor cell



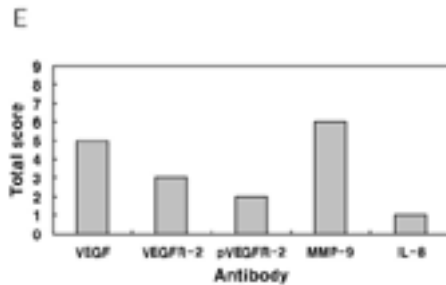
B : Moderately-differentiated tumor cell



C : Poorly-differentiated tumor cell



D : Stromal cells



E : Vascular endothelial cell

Fig. 3. Expressions of neoangiogenesis-related proteins in various cell types of squamous cell carcinoma.

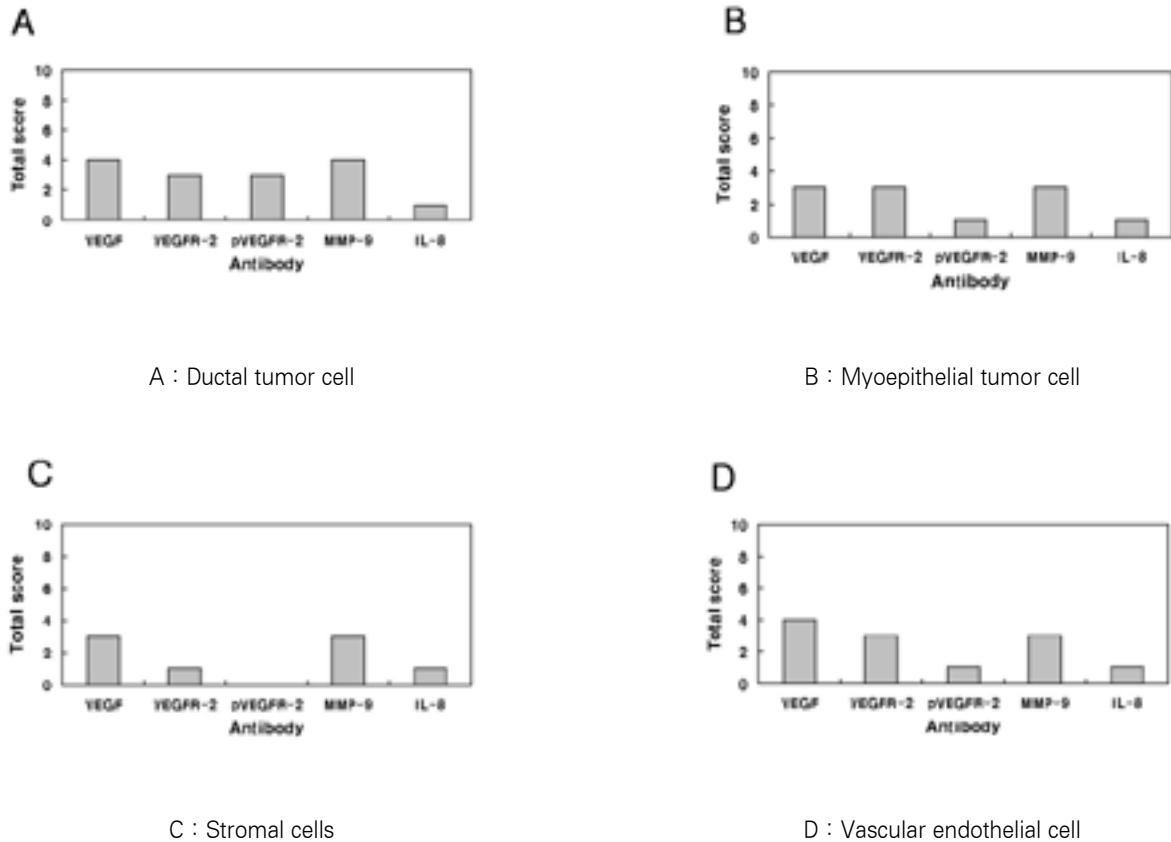


Fig. 4. Expressions of neoangiogenesis-related proteins in various cell types of pleomorphic adenoma.

Table 4. Expressions of the Biomarkers in Specimens of Mucoepidermoid Carcinoma

n	VEGF	VEGFR-2	pVEGFR-2	MMP-9	IL-8
1	+, +, +	±, ±, ±	±, ±, ±	±, ±, ±	-, -, -
2	+, +, ++	±, ±, ±	±, ±, ±	+++ , +++ , +++	-, ±, ±
3	+, ++, ±	±, ±, ±	-, ±, ±	±, ±, ±	-, -, -
4	+, +, ++	±, ±, ±	±, ±, ±	±, +, +	-, -, -
5	±, ±, ±	±, ±, ±	-, ±, ±	±, ±, ±	-, -, -
6	-, -, ±	-, ±, ±	-, ±, ±	+, ++, ++	-, -, -
7	-, -, ±	-, -, -	-, ±, ±	±, ±, ±	-, -, -
8	±, ±, ±	±, ±, ±	-, -, ±	+++ , +++ , +++	-, -, -
9	+, +, +	±, ±, +	±, ±, +	±, +, +	±, ±, ±

4. 점액성유표피암종에서 혈관형성 인자들의 발현

9례의 표본에서 나타난 각 항체의 발현 강도는 Table 4와 같았다. 각 표본에서 선정한 총 27부위 중, 각 항체별로 나타난 발현의 정도를 Fig. 2-C에서와 같이 점수화하여 객관

화하였다. 이를 분석한 결과 점액성유표피암종에서는 MMP-9의 발현이 현저하였다. 또한 종물을 구성하는 중앙 세포에서의 혈관형성 인자들의 발현정도를 분석해 본 결과 표피양중양세포에서 각 혈관형성 인자들이 더 우세하게 발현되었다 (Fig. 5).

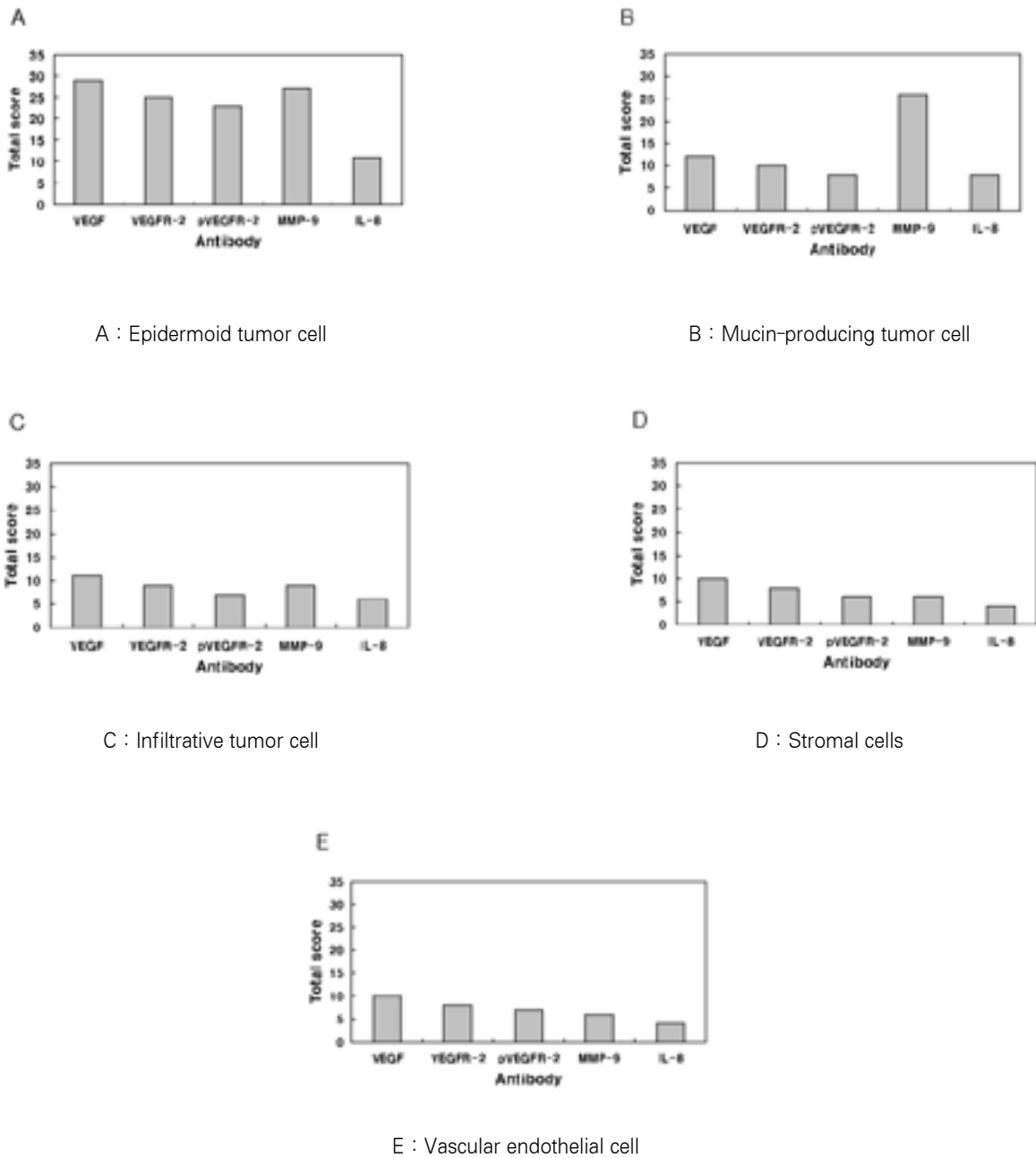


Fig. 5. Expressions of neoangiogenesis-related proteins in various cell types of mucoepidermoid carcinoma.

5. 선양낭성암종에서 혈관형성 인자들의 발현

8례의 표본에서 선정한 총 24부위에서 각 항체들의 발현 강도는 Table 5와 같았고 Fig. 2-D에서와 같이 객관화 하였다. 선양낭성암종에서는 VEGF, MMP-9, VEGFR-2의 발현이 현저하였다. 또한 사상체형 종양세포에서보다 충실

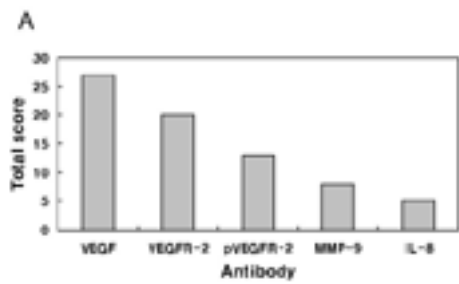
형 종양세포에서 VEGF, MMP-9이 더 강하게 발현되었다 (Fig. 6).

6. 각 타액선 암종간의 혈관형성 인자별 발현도 비교

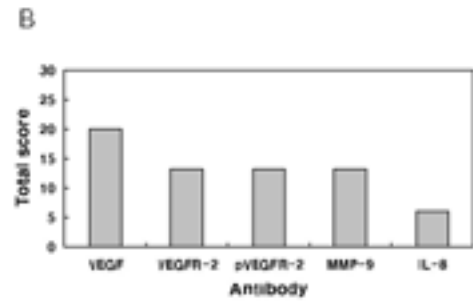
타액선 종양과 구강 편평상피세포암종 표본에서 각 인자

Table 5. Expressions of the Biomarkers in Specimens of Adenoid Cystic Carcinoma

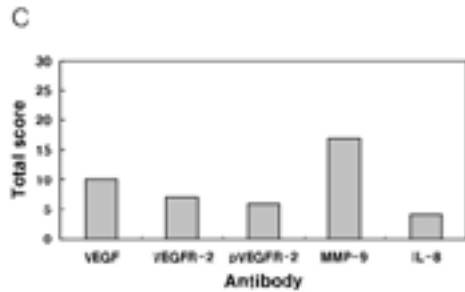
n	VEGF	VEGFR-2	pVEGFR-2	MMP-9	IL-8
1	+, +, ++	±, ±, +	-, ±, ±,	+, +, +	-, -, -
2	+, +, +	+, +, ++	±, ±, ±	+, +, +	±, ±, ±
3	±, ±, ±	-, -, -	±, ±, ±	±, +, +	±, -, -
4	++, ++, ++	++, ++, ++	±, ±, ±	++, ++, ++	-, -, ±
5	+, +, +	-, -, ±	±, ±, ±	±, ±, ±	±, ±, ±
6	-, ±, ±	±, ±, ±	±, ±, ±	±, ±, ±	-, ±, ±
7	±, ±, ±	-, -, -	±, ±, ±	±, ±, +	-, -, -
8	±, ±, ±	±, ±, ±	±, ±, ±	-, -, ±	-, -, -



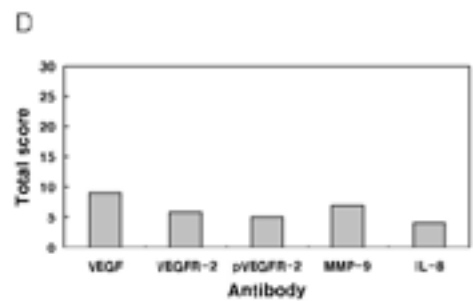
A : Solid tumor cell



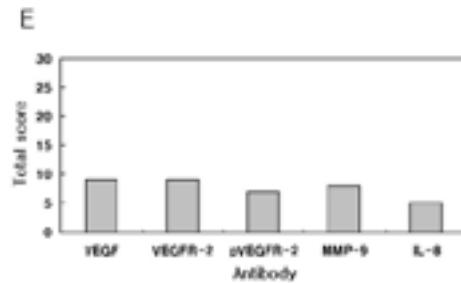
B : Cribriform tumor cell



C : Infiltrative tumor cell



D : Stromal cells



E : Vascular endothelial cell

Fig. 6. Expressions of neoangiogenesis-related proteins in various cell types of adenoid cystic carcinoma.

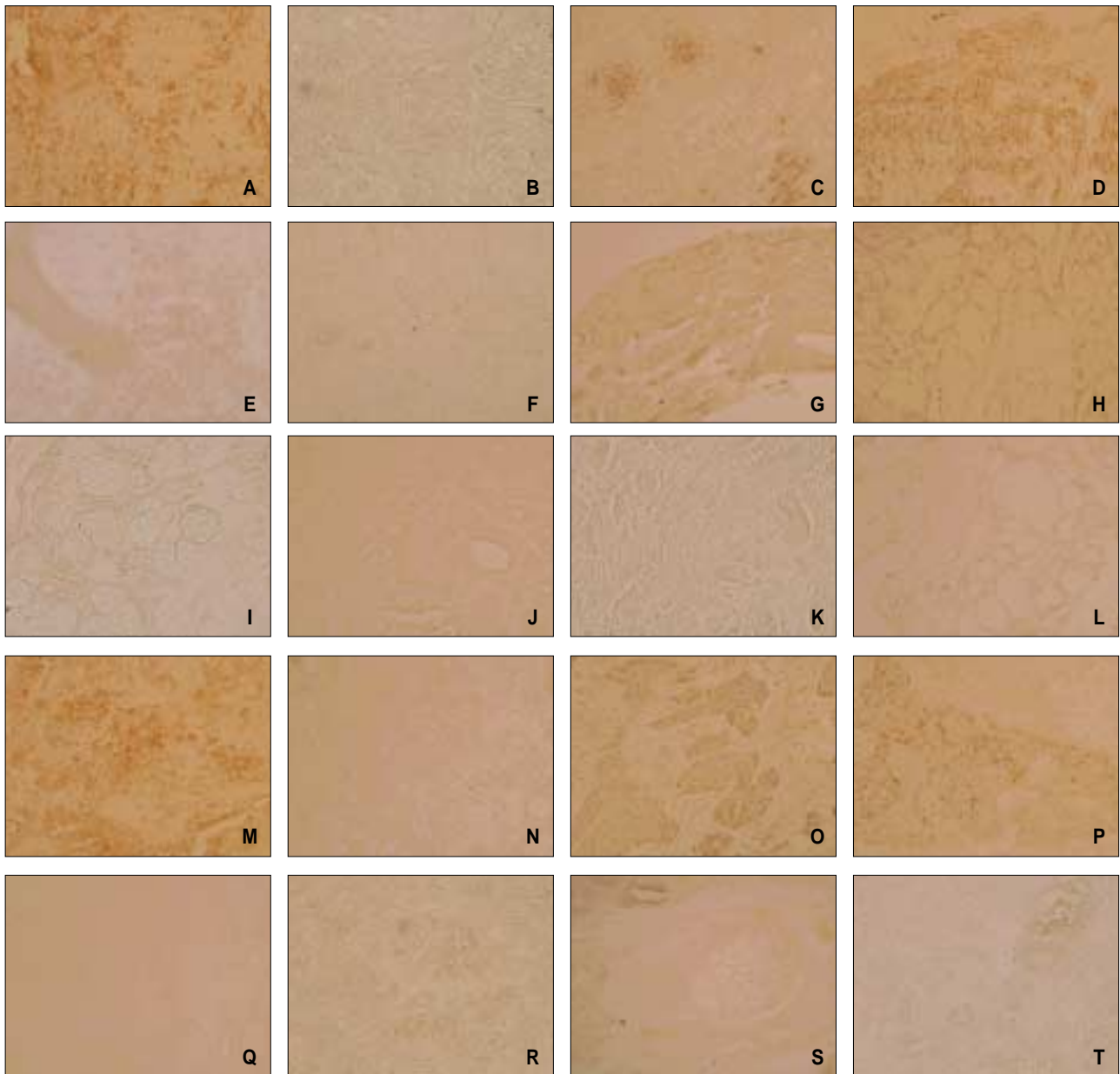


Fig. 7. VEGF, VEGFR-2, phosphorylated VEGFR-2, MMP-9, and IL-8 expressions in experimental and control tumors ($\times 400$ magnification).

- A : Representative features of the expression of VEGF in SCC
- B : Representative features of the expression of VEGF in pleomorphic adenoma
- C : Representative features of the expression of VEGF in MEC
- D : Representative features of the expression of VEGF in ACC
- E : Representative features of the expression of VEGFR-2 in SCC
- F : Representative features of the expression of VEGFR-2 in pleomorphic adenoma
- G : Representative features of the expression of VEGFR-2 in MEC
- H : Representative features of the expression of VEGFR-2 in ACC
- I : Representative features of the expression of pVEGFR-2 in SCC
- J : Representative features of the expression of pVEGFR-2 in pleomorphic adenoma
- K : Representative features of the expression of pVEGFR-2 in MEC
- L : Representative features of the expression of pVEGFR-2 in ACC
- M : Representative features of the expression of MMP-9 in SCC
- N : Representative features of the expression of MMP-9 in pleomorphic adenoma
- O : Representative features of the expression of MMP-9 in MEC
- P : Representative features of the expression of MMP-9 in ACC
- Q : Representative features of the expression of IL-8 in SCC
- R : Representative features of the expression of IL-8 in pleomorphic adenoma
- S : Representative features of the expression of IL-8 in MEC
- T : Representative features of the expression of IL-8 in ACC

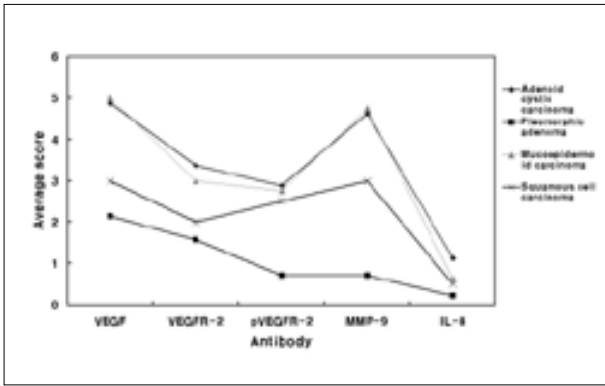


Fig. 8. Comparative expressions of neoangiogenesis-related proteins in experimental and control tumors.

들에 대한 면역조직화학염색 결과는 Fig. 7과 같다. 각 항체별 발현도의 평균 점수를 낸 결과 Fig. 8에서처럼 검색된 혈관형성 인자들들이 양성종양인 다형성 선종보다 악성종양인 점액표피암종, 선양낭성암종에서 더 강하게 발현되었다. 또한 모든 타액선 암종에서 VEGF, VEGFR-2, pVEGFR-2 순으로 약하게 발현되었고 IL-8은 모든 타액선 암종에서 발현 정도가 미약하였다.

IV. 총괄 및 고찰

본 연구를 통하여 저자는 혈관성 폐전이를 원격전이의 주 기전으로 하는 선양낭성암종을 비롯한 타액선 악성종양에서 혈관내피성장인자 수용체와 혈관형성 촉진인자들이 타액선 양성종양과 비교하여 과발현됨을 보고하는 바이다. 즉 혈관형성 관련 단백질의 발현 정도를 타액선 양성종양과 악성종양, 그리고 대표적 구강암이며 비교적 연구결과가 축적되어 있는 구강점막 편평상피세포암종에서 비교, 분석하여 의미있는 결과를 제시하였다.

악성종양과 같이 신생물의 성장을 요하는 질환에서 혈관형성이 증가된다고 알려진 이래로, 고형암의 성장 및 전이와 신생혈관화 정도와의 상호관계에 관한 많은 연구가 이루어져 왔다. 그 결과 현재에는 고형성 종양의 성장, 침투 및 전이에 있어서 신생혈관 형성과정이 필수적 단계라는 것이 잘 알려져 있다¹⁶⁾. 또한 종물의 혈관화 정도에 따른 전이 및 생존율과의 의미있는 상관관계도 많은 악성종양에서 검증되었다¹⁷⁻²⁰⁾. Gasparini 등은 유방암에서 종양의 혈관화는 임상적 예후가 밀접한 관계가 있으며, 항신생혈관화 개념은 암종 치료에 있어 혁신적인 개념으로서 중요하다고 밝힌 바 있다²¹⁾.

본 연구진은 선행 연구를 통하여 타액선 선양낭성암종에서 미세혈관농도를 측정하여 종양관련 신생 혈관이 활동적으로 형성되며, 또한 혈관형성 신호전달 단백질이 정상 타

액선 조직에 비교하여 과발현됨을 보고한 바 있다²²⁾. 본 연구에서는 수종의 타액선 종양에서 혈관형성을 포함한 다양한 기전을 통해 암세포의 생존과 전이능을 증가시키는 VEGF, VEGFR-2, pVEGFR-2, MMP-9, 그리고 IL-8의 발현정도를 대상 종양간에 또한 구강 편평상피세포암과 비교, 분석하였다.

VEGF는 실험적, 임상적으로 강력한 혈관형성 능력을 가지고 있다고 알려져 있으며 최근에는 혈관내피세포의 분열 촉진인자로서 종양의 혈관 형성을 핵심적으로 조절한다고 보고되고 있다²³⁾. 여러 연구에서 VEGF의 특이적 혈관내피세포의 분열 유도가 보고되었으며, 그 외에도 혈관투과도 (vascular permeability)를 증가시키고, 혈관내피세포의 분화, 이동 및 생존을 촉진시켜 종양세포의 성장을 증진시키는 작용을 하는 것으로 여겨진다²⁴⁾. VEGF가 발현되지 않은 경우 미세혈관농도와 혈관투과도가 감소하고 암세포의 아포토시스 증가가 보고되기도 하였다²⁵⁾. 또한 암세포의 종류에 따라서 VEGF 신호전달 물질들의 발현은 종양 전이능의 한 지표인 미세혈관농도와 밀접한 관련이 있으며, VEGF의 과발현은 종양의 재발과 원격전이의 증가, 그리고 불량한 환자생존율과 연관이 있는 것으로 보고되었다^{26,27)}. 본 연구결과와 가설한 바와 같이 VEGF는 양성 타액선 종양인 다형성선종에서보다는 타액선 암종에서 과발현되었으나 검색된 악성종양 간, 즉 선양낭성암종과 점액성유표피암종간에는 그 발현정도에서 유의한 차이가 없었다.

고형성 구강암의 대표적 표현형인 편평상피세포암종 (squamous cell carcinoma, SCC)에서는 이미 다양한 혈관형성 인자들의 발현이 SCC의 성장 및 진행과 관련되어 있다는 보고가 있어 왔다. Kleespies 등은 SCC에서 VEGF의 발현과 연관되어 있어 종양의 진행 및 림프절 전이가 주요한 예후인자임을 보여주었다²⁸⁾. 또한 Petruzelli 등은 VEGF의 차단이 SCC의 혈관형성을 상당히 감소시켰음을 보고하였다²⁹⁾. 또한 Moriyama 등은 VEGFR-3가 미세혈관농도와 관련되어 있음을 보고하였고, VEGFR-3의 발현은 특히 림프절 전이와 관련되어 있다고 하였다³⁰⁾. 한편 SCC에서 IL-8이 종양세포와 내피세포에 의해 발현되고³¹⁾ 이는 SCC에서의 VEGF의 발현정도, 국소 재발율, 종양의 병기, 그리고 치료후 무병기간과 의미있는 상호관련성이 있음이 밝혀졌다³²⁾. Sedivy 등에 의하면 VEGF-C의 발현은 상승된 림프 미세혈관밀도 (lymphatic microvessel density), 림프절 전이, 종양의 병기, 국소전이 및 원격전이와 상당한 연관이 있음을 보여 주었다³³⁾.

또한 두경부 편평상피세포암종에서 미세혈관화 정도와 임상적 예후지표간의 관련성에 대한 몇 가지 연구가 이루어졌다. Leedy 등의 연구에서와 같이 구강암에서 혈관화과 종양의 림프절 전이 사이에는 유의한 관계를 보이지 않았다고 보고된 바도 있었으나³⁴⁾, Williams 등은 신생혈관화가 두경

부 편평상피세포암종의 재발과 유의한 연관성이 있으며 독립적인 예후인자로서의 가치를 가진다고 하였다³⁵⁾. 그리고 Pazouki 등은 종물의 혈관화와 두경부 편평상피세포암종의 진행간에 유의한 관련성이 있다고 보고하였다³⁶⁾. Sion-Vardy 등도 59례의 원발성 후두 암종에서 factor VIII-related antigen과 CD-31의 발현이 종양의 침습도와 유의한 상관관계를 보였다고 하였으며³⁷⁾ Shipitzer 역시 초기 설암의 혈관화는 림프절 전이와 유의한 관계를 보인다고 보고하였다³⁸⁾. 이 외에도 Gasparini 등이 보고한 바에 의하면 두경부 악성종양의 전이와 미세혈관농도는 양의 상관관계를 보인다고 하여³⁹⁾ 두경부 종양에서도 종물의 신생혈관화는 종양의 진행, 침습, 전이와 밀접한 관련이 있는 것으로 여겨진다.

본 연구에서 혈관형성 관련 인자들의 타액선 종양에서의 발현 정도를 평가해 보기 위하여 수술 조직에서의 단백 발현정도를 면역조직화학염색 기법으로 감지하였다. 이번 연구를 통하여 타액선 악성종양과 양성종양에서의 혈관형성 인자의 발현 정도를 평가해 봄과 동시에 위의 문헌고찰에서 이미 밝혀진 바와 같이, 혈관형성 인자들이 임상적으로 상당히 중요하게 여겨지고 있는 구강 편평상피세포암과도 비교, 분석하고자 하였다. 본 연구진의 실험결과에서 특기할 만한 사항은 SCC에서 VEGFR-2의 존재 및 활성화 정도 (pVEGFR-2)가 타액선 악성종양인 ACC나 MEC에 비교하여 떨어진다는 점이다. 이는 SCC가 타액선 암종, 특히 선양낭성암종의 병리적 진행과정과는 다른 암생물학적 진행 양상을 갖기 때문인 것으로 생각된다. 즉 SCC의 악성도나 주 진행기전은 혈관성 전이에 의한 것이라기보다는 조직을 파괴시키면서 림프절로의 침습 위주로 종양이 진전되기 때문에 상대적으로 혈관성 폐전이를 야기시키는 ACC보다는 혈관형성 수용체가 약하게 발현된 것으로 고찰하였다.

또한 본 연구에서는 대상이 된 종양을 구성하는 다양한 암세포들과 종물 내의 간질에 존재하는 면역관련 세포들, 그리고 혈관내피세포에서의 혈관형성 인자들의 발현정도를 면밀히 평가하였다. 선양낭성암종은 조직학적으로 암세포군의 증식상에 따라 사상체형, 관형, 그리고 충실형으로 분류되며, 임상적으로 충실형의 선양낭성암종이 사상체형이나 관형 암종에 비교하여 그 예후가 불량한 것으로 알려져 있다⁶⁾. 본 연구결과 사상체형 종양세포에서보다 충실형 종양세포에서 혈관형성 인자들이 강하게 발현된 점은 위의 임상적 관찰들을 뒷받침하고 있다. 편평상피세포암종에서는 세포의 분화도가 떨어질수록 혈관형성 관련 단백질의 발현이 증가되는 양상을 보여, 종양세포의 분화도와 임상적 연관성을 시사하였다. 대형성선종에서는 MMP-9이외의 인자들은 발현이 미약하였으며, 특히 종물 내의 혈관내피세포의 활성화는 없는 것으로 관찰되었다. 점액성유표피암종에서는 상피성 종양세포와 혈관내피세포에서는 검색된 인자들의

발현이 비교적 강하였으나, 뮤신을 분비하는 종양세포에서 혈관형성 인자들의 발현이 미약하였다.

Ishibashi 등은 VEGF와 bFGF가 타액선 종양의 주 혈관형성 인자라고 하였고⁴⁾, Yu 등은 VEGF의 발현 정도와 미세혈관농도를 선양낭성암종의 원격 전이에 대한 예후인자라고 보고하였다. 또한 Jiali Zhang³⁾ 등에 의하면 선양낭성암종에 이환된 환자의 78.8%가 5년 이상 생존하였고 선양낭성암종이 다양한 변수들 즉, 조직학적 유형, 신경주위 침윤 여부, 혈관 침습, 재발, 전이, NF- κ B, iNOS, VEGF의 발현 및 미세혈관농도와 같은 불량한 예후 인자들과 상호관련이 있다는 것이 관찰되었다. 그리고 Lim 등의 면역조직화학염색에서 VEGF가 선양낭성암종에 이환된 환자 중 31.1%에서 낮은 정도로, 33.3%에서 중등도로, 35.6%에서 고도로 발현되어 VEGF 염색이 임상병리학적 예후인자, 예를 들어 환자의 나이, 종양의 크기, 림프절 전이, 임상적 병기, 신경주위 침윤, 혈관 침습, 재발, 장기 생존율과 분명한 관련이 있음을 보여주었다⁴⁰⁾.

본 연구결과 혈관형성 수용체와, 검색된 혈관형성 인자 중 VEGF와 MMP-9이 타액선 양성종양과 비교하여 타액선 악성종양에서 과발현되었다. 또한 구강 편평상피세포암종과 비교하여 타액선 암종에서 VEGFR-2가 상대적으로 과발현되고 활성화되어 있는 것으로 나타나 의미있는 결과가 제시되기도 하였다. 그러나 타액선 암종간에 있어서는 선양낭성암종과 점액성유표피암종에서 혈관형성 관련 물질들의 발현정도에서 유의한 차이 없는 것으로 나타났다. 본 연구에서는 대표적인 혈관형성 관련 물질들을 단백 수준에서 검색했으며, 면역조직화학적 염색에 적용되는 항체의 민감성이 다를 수 있고 실험결과와 엄격한 정량화 및 객관화가 이루어지지 못했다는 한계가 있어 위의 실험 결과들로부터 쉽게 어떤 결론을 이끌어낼 수는 없다.

즉 실험된 인자들 외에 종양의 혈관형성에 관여하고 있는 물질들이나 신호전달계가 있을 수도 있고, 종양 전이에는 혈관형성 인자 외에도 다양한 조절인자들이 관여하며, 종양마다 주된 혈관형성 인자가 있을 수도 있다. 따라서 명확하게 혈관형성 인자의 과발현 여부를 평가하기 위해서는 종양의 혈관형성을 미세하게 조절하는 주된 혈관형성 인자를 찾아서 평가할 필요가 있다⁴¹⁾. 따라서 선양낭성암종의 주된 혈관형성 인자를 찾아내는 연구가 필요할 것으로 보이며 앞으로 이에 대한 더 많은 연구가 뒤따라야 할 것으로 사료되는 바이다.

V. 요약 및 결론

타액선 양성종양인 대형성 선종, 타액선 악성종양인 점액성유표피암종과 선양낭성암종, 그리고 비교적 많은 연구결과가 축적된 구강 편평상피세포암종을 대상으로 혈관형성

촉진인자인 VEGF, MMP-9, IL-8과 종양혈관형성 수용체인 VEGFR-2/pVEGFR-2의 단백 발현정도를 비교, 분석한 결과 다음과 같은 결과를 도출하였다.

- 1) 검색된 혈관형성 인자들 중 VEGF와 MMP-9은 양성 타액선 종양인 다형성 선종에서보다 악성 타액선 종양인 점액성유포피암종과 선양낭성암종에서 강하게 발현되었다 ($P<0.05$).
- 2) 종양혈관형성 수용체인 VEGFR-2 역시 양성 다형성 선종에서보다는 악성 타액선 종양에서 강하게 발현되었으며, 활성화되어 있었다 ($P<0.05$).
- 3) 구강 편평상피세포암종에서는 세포의 분화도가 떨어질 수록 인자들의 발현이 증가하였고, VEGFR-2/pVEGFR-2가 타액선 암종보다 약하게 발현되었다 ($P<0.05$).
- 4) 점액성유포피암종에서는 뮤신을 분비하는 종양세포에서 혈관형성 인자들의 발현이 미약하였고, 혈관내피세포에서 강하게 발현되었다.
- 5) 선양낭성암종에서는 사상형 종양세포에서보다 충실형 종양세포에서 VEGF와 MMP-9이 강하게 발현되었다.
- 6) 점액성유포피암종과 선양낭성암종에서 혈관형성 관련 단백질의 발현정도 비교에서는 유의한 차이가 인정되지 않았다.

위의 결과들을 종합하여 보면 결론적으로, 타액선 암종인 점액성유포피암종과 선양낭성암종에서 VEGF/VEGFR-2와 MMP-9이 과발현되어 이들 암종의 악성 표현형 유지에 중요한 역할을 하는 것으로 여겨진다. 또한 구강 편평상피세포암종과 비교해볼 때 혈관형성 관련 수용체인 VEGFR-2가 타액선 암종의 악성 변환과 침습적 성장 및 전이에 영향을 미치는 인자로서 이용될 수 있음을 시사하였다. 향후에는 본 연구에서 확인된 혈관형성 인자들의 발현을 유전자 수준에서 검증하는 연구가 바람직하며 또한 실험적 선양낭성암종에서 혈관형성에 중요한 인자들을 억제하여 그 효과를 평가하는 치료 연구가 이루어져야 할 것이다.

참고문헌

1. Park YW : Cellular and molecular characterization of adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. *J Kor Assoc Of Maxillofac Plast And Reconstr Surg* 27(2) : 110, 2005.
2. Son CW, Kim KW, Kim CH : Study on Expression of glycosaminoglycan in adenoid cystic carcinoma. *J Kor Oral Maxillofac Surg* 30 : 271, 2004.
3. Zhang J, Peng B, Chen X : Expressions of Nuclear Factor KB, Inducible Nitric Oxide Synthase, and Vascular Endothelial Growth Factor in Adenoid Cystic Carcinoma of Salivary Glands : Correlations with the Angiogenesis and Clinical Outcome. *Clin Cancer Res* 11(20) : 7334, 2005.
4. Ishibashi H, Shiratuchi T, Nakagawa K et al : Hypoxia-induced angiogenesis of cultured human salivary gland carcinoma cells enhances vascular endothelial growth fac-

- tor production and basic fibroblast growth factor release. *Oral Oncol* 37 : 77, 2001.
5. Lloyd RV, Vidal S, Horvath E et al : Angiogenesis in normal and neoplastic pituitary tissues. *Microsc ResTech* 60 : 244, 2003.
6. Airolidi M, Fornari G, Pedani F et al : Paclitaxel and carboplatin for recurrent salivary gland malignancies. *Anticancer Res* 20(5C) : 3781, 2000.
7. Masabumi S : Differential Roles of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 and Receptor-2 in Angiogenesis. *J Biochem Mol Biol* Vol. 39, No. 5 : 2006. p.469.
8. Nagel H, Laskawi R, Wahlers A et al : Expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors TIMP-1, -2, and malignant tumours of the salivary. *Histopathol* 44 : 2004. p.222231.
9. Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H et al : Tissue inhibitors of metalloproteinases : structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 74(2) : 111, 1997.
10. Dano K, Romer J, Nielsen BS et al : Cancer invasion and tissue remodeling cooperation of protease systems and cell types. *APMIS* 107(1) : 120, 1999.
11. Shiozawa J, Ito M, Nakayama T : Expression of matrix metalloproteinase-1 in human colorectal carcinoma. *Mod Pathol* 13(9) : 925, 2000.
12. Hebert CA, Baker JB : Interleukin-8 : A review. *Cancer Invest* 11(6) : 743, 1993.
13. Ferrer FA, Miller LJ, Andrawis RI et al : Angiogenesis and prostate cancer: in vivo and in vitro expression of angiogenesis factors by prostate cancer cells. *Urology* 51(1) : 161, 1998.
14. Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL et al : Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* 258(5089) : 1798, 1992.
15. Sauter ER, Nesbit M, Watson JC et al : Vascular endothelial growth factor is a marker of tumor invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 5 : 775, 1999.
16. Fox SB : Tumor angiogenesis and prognosis. *Histopathol* 30 : 294, 1997.
17. Dickinson AJ, Fox SB, Persad J : Quantification of angiogenesis as an independent predictor of prognosis in invasive bladder carcinomas. *Br J Urol* 74 : 762, 1994.
18. Jaeger TM, Weidner N, Chew K : Tumor angiogenesis correlates with lymph node metastasis in invasive bladder cancer. *J Urol* 154 : 69, 1995.
19. 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, 1995.
20. Tanigawa N, Amaya H, Matsumura M : Extent of tumor vascularization correlates with the prognosis and hematogenous metastasis in gastric carcinomas. *Cancer Res* 56 : 2671, 1996.
21. 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, 1995.
22. Park YW, In YS : Immunohistochemical assays for the expression of angiogenic signaling molecules and microvessel density in adenoid cystic carcinomas of human salivary glands. *J Kor Oral Maxillofac Surg* 32(6) : 530, 2006.
23. Myoung H, Kim YY, Choi SM : Immunohistochemical study of the vascular endothelial growth factor (vegf) expression in genistein treated Hamster buccal pouch oral carcinoma model. *J Kor Oral Maxillofac Surg* 28 : 147,

- 2002.
24. O-Charoenrat P, Rhys-Evans P, Eccles S : Expression of vascular endothelial growth factor family members in head and neck squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis. *Cancer* 92 : 556, 2001.
 25. Verheul HM, Panigrahy D, Yuan J et al : Combination oral antiangiogenic therapy with thalidomide and sulindac inhibits tumour growth in rabbits. *Br J Cancer* 79 : 114, 1999.
 26. Neuchrist C, Quint C, Pammer A et al : Vascular endothelial growth factor (VEGF) and microvessel density in squamous cell carcinomas of the larynx: an immunohistochemical study. *Acta Otolaryngol* 119(6) : 732, 1999.
 27. Obermair A, Kohlberger P, Bancher-Todesca D et al : Influence of microvessel density and vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor expression on prognosis in vulvar cancer. *Gynecol Oncol* 63(2) : 204, 1996.
 28. Kleespies A, Bruns CJ, Jauch KW : Clinical significance of VEGF-A, -C and -D expression in esophageal malignancies. *Onkologie* 28(5) : 281, 2005.
 29. Petruzzelli GJ, Benefield J, Taitz AD et al : Heparin-binding growth factors derived from head and neck squamous cell carcinomas induce endothelial cell proliferation. *Head Neck* 19(7) : 576, 1997.
 30. Moriyama M, Kumagai S, Kawashiri S et al : Immunohistochemical study of tumour angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 33(5) : 369, 1997.
 31. Richards BL, Eisma RJ, Spiro JD et al : Coexpression of interleukin-8 receptors in head and neck squamous cell carcinoma. *Am Surg* 174(5) : 507, 1997.
 32. Eisma RJ, Spiro JD, Kreutzer DL : Role of angiogenic factors : coexpression of interleukin-8 and vascular endothelial growth factor in patients with head and neck squamous carcinoma. *Laryngoscope* 109(5) : 687, 1999.
 33. Sedivy R, Beck-Mannagetta J, Haverkamp C et al : Expression of vascular endothelial growth factor-C correlates with the lymphatic microvessel density and the nodal status in oral squamous cell cancer. *J Oral Pathol Med* 32 : 455, 2003.
 34. Leedy DA, Trune DR, Kronz JD et al : Tumor angiogenesis, the p53 antigen, and cervical metastasis in squamous cell carcinoma of the tongue. *Otolaryngol Head Neck Surg* 111 : 417, 1994.
 35. Williams JK, Carlson GW, Cohen C et al : Tumor angiogenesis as a prognostic factor in oral cavity tumor. *Am J Surg* 168 : 373, 1994.
 36. Pazouki S, Chisholm DM, Adi MM et al : The association between tumour progression and vascularity in the oral mucosa. *J Pathol* 183 : 39, 1997.
 37. Sion-Vardy N, Fliss DM, Prinsloo I et al : Neoangiogenesis in squamous cell carcinoma of the larynx bio biological and prognostic associations. *Pathol Res Pract* 197(1) : 1, 2001.
 38. Shpitzer T, Chaimoff M, Gal R et al : Tumor angiogenesis as a prognostic factor in early oral tongue cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 122 : 865, 1996.
 39. Gasparini G, Weidner N, Maluta S et al : Intratumoral microvessel density and p53 protein : correlation with metastasis in head and neck carcinoma. *Int J Cancer* 55 : 739, 1993.
 40. Lim JJ, Kang S, Lee MR et al : Expression of vascular endothelial growth factor in salivary gland carcinomas and its relation to p53, ki-67 and prognosis. *J Oral Pathol Med* 32 : 552, 2003.
 41. Lee GC, Myoung H, Lim SS: The clinicopathological study on the relation of microvessel density And aggressiveness in oral squamous cell carcinoma. *J Kor Oral Maxillofac Surg* 28 : 155, 2002.

저자 연락처

우편번호 210-702
 강원도 강릉시 강릉대학로 120번지
 강릉대학교 치과대학 구강악안면외과학교실
박영욱

원고 접수일 2006년 11월 2일
 게재 확정일 2007년 1월 15일

Reprint Requests

Young-Wook Park

Dept. of OMFS, College of Dentistry, Kangnung National University
 Gangneung Daehangno 120, Gangneung, Gangwon-do, 210-702, South Korea
 Tel: 82-33-640-3183 Fax: 82-33-640-3103
 E-mail: ywpark@kangnung.ac.kr

Paper received 2 November 2006

Paper accepted 15 January 2007