마우스에서 확립된 타액선 동위종양에서 혈관성 전이관련 인자의 발현

장재현 · 권광준 · 박영욱
강릉대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Abstract

EXPRESSIONS OF VASCULAR METASTASIS RELATED FACTORS IN MURINE ORTHOTOPIC TUMOR MODELS OF SALIVARY GLANDS

Jae-Hyun Jang, Kwang-Jun Kwon, Young-Wook Park
Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Kangnung National University

Background and Purpose : Some subtypes of malignant salivary gland tumors such as adenoid cystic carcinoma (ACC) frequently result in distant metastasis of vascular origin, which are main causes of treatment failure. The reasons for the affinity for vascular metastatic potential are unclear. Therefore, molecular characteristics that influence the dissemination of metastatic tumor 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 vascular metastasis related factors in orthotopic (parotid) murine models of parotid ACC and compared with those in ectopic (subcutis) tumors of athymic mice.

Experimental Design : Using specimens from murine parotid (orthotopic, experimental group) and subcutaneous (ectopic, control group) tumors, which have developed via transplantation of tumor cells, originated from human parotid ACC, we performed immunohistochemical assays with anti-vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF, FGF2), matrix metalloproteinase (MMP)-9, and interleukin (IL)-8 antibodies. We also performed immunohistochemical assays with VEGF receptor (VEGFR)-1, VEGFR-2, VEGFR-3, and phosphorylated VEGFR-2.

Results : Transplantation of human ACC tumor cell (5×10^5) into the parotid and subcutis successfully resulted in orthotopic (parotid) and ectopic (subcutaneous) tumors in athymic mice. Immunohistochemical staining demonstrated higher expression of major angiogenic factors (VEGF, bFGF, MMP-9) in the orthotopic tumors than in ectopic tumors ($P < 0.05$). But the expression level of angiogenic receptors were same in orthotopic and ectopic tumors of parotid ACC.

Conclusion : VEGF, bFGF, and MMP-9 could be a good candidates for antiangiogenic therapy for the contol of vascular metastatic lesions of salivary ACC.

Key words: Adenoid cystic carcinoma, Orthotopic murine model, Vascular metastasis related factors

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

Ⅰ. 서 론

타액선 선양낭성암종 (adenoid cystic carcinoma, ACC)은 이하선 등의 대타액선과 입천장의 소타액선에 발생하는 악성 종양으로, 임상적으로 강한 주변조직 침투능을 보이며 특히 높은 빈도의, 폐조직으로의 혈관성 원격전이를 주 특징으로 한다[1]. 결과적으로 광범위한 외과적 절제술 후 전형적으로 5년 생존율은 62-75%, 20년 생존율은 13% 정도로[2] 비교적 장기생존율이 불량하며 상당히 긴 disease-free interval을 보여준다. 또한 종양증식 속도가 느린 관계로 항암치료제에 대한 반응이 좋지 않아 재발병소나 전이병소에 대한 효과적인 치료법이 없는 실정으로 지금까지의 표준 치료책안 수술과 방사선 요법을 보강할 수 있는 새로운 치료법의 개발이 절실하다.

악성종양의 증식과 전이과정에서 신생혈관형성(neoangiogenesis)은 필수적이다. 측분비 방식으로 종양 세포에 의해 분비되는 혈관형성 인자 (angiogenic factor)가 악성종양의 신생혈관형성 과정을 촉진하는 것으로 알려져 있다[3-5]. 종양의 성장에 관여하는 혈관형성 인자들 중 가장 강력한 인자는 혈관내피성장인자(VEGF)로 내피세포상에 특이적으로 분열촉진 활동을 하는 것으로 알려져 있어 종양관련 혈관내피세포 (tumor-associated endothelial cell)에 대한 유사분열인자로 여겨진다[6]. 즉 종양세포에서 분비된 VEGF의 영향으로 정상혈관의 내피세포와는 달리 종물 내에 존재하는 종양관련 혈관내피세포의 경우 한 시점에서 10-12% 정도가 유사분열 활동을 하는 것으로 알려졌다[7]. 특히 VEGF는 내피세포의 이주(recruitment) 및 분화와 연관된, 혈관형성 과정의 개시 단계에 주로 영향을 미치는 것으로 연구되었으며[8] 동시에 혈관 투과성을 증가시키는 것으로 알려져 있다[9].

VEGF는 혈관내피세포상에 존재하는 특정수용체인 Flt-1 (VEGF receptor-1, 이하 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 하고, 정상 혈관계에서보다 종양의 혈관계에서 3-5배 정도 높게 발현된다[10]. 인산화 혈관내피성장인자 수용체 (phosphorylated VEGFR, pVEGFR)-2는 활성화된 형태이다.

기질금속단백분해효소 (matrix metalloproteinase, MMP)는 다양한 세포에서 분비되는 zinc-dependant endopeptidase로 특히 MMP-9은 많은 인간의 암종에서 침습 및 전이에 있어 결정적인 인자로 생각되고 있다[11-12]. 중성 섬유아세포 성장인자 (bFGF, FGF-2)는 섬유아세포 성장인자군의 하나로 Folkman에 의해 확인된 혈관형성인자로 혈관내피세포의 증식과 이주 그리고 분화를 촉진하고, 단백분해효소의 생성을 자극하는 것으로 연구되었다[13]. 인터루킨 (interleukin, IL)-8은 호중구 및 T-림프구를 견인하는 싸이토카인으로 백혈구의 화학주성을 포함한 많은 효능을 지녔으며 특히 신생물에 있어서 내피세포의 화학주성을 통하여 혈관형성을 촉진하는 것으로 알려져 있다[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 있으나[15], 그 밖의 혈관형성 인자들의 발현 및 선양낭성암종의 원격전이와 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 동물모델을 동위종양 모델과 피하종양(이소성 종양) 모델의 2가지로 설정하고 혈관성 전이관련 인자들이 이소성 부위에서 발생된 종물에서보다는 동위종양에서 과발현될 것이라는 가설을 설정하고 이를 검증하고자 하였다.

Ⅱ. 연구재료 및 연구방법

1. 세포주 및 세포배양

타액선 선양낭성암 세포주는 49세 남자환자의 이하선 선양낭성암종으로부터 확립된 ACC3가 실험에 이용되었다. 선양낭성암 세포주는 15% 우태혈청, L-glutamine, 비타민 (Life Technologies, Inc., Grand Island, NY, U.S.A.), 페니실린-스트렙토마이신(Flow Laboratories, Rockville, MD, U.S.A.)이 함유된 RPMI-1640 배양액에서 단일배양층으로 유지되었으며 5% CO_2, 95% 공기 상태로 37℃에서 배양되었다.

2. 실험동물과 세포접종액 처리

생후 6-8주된 누드 마우스가 실험에 이용되었다. 누드 마우스는 병원성 미생물이 존재하지 않는 환경에서, 방사선 멸균처리된 사료로 사육하였다. 생체내 이종이식을 위한 세포 부유액 (cell suspension)을 만들기 위하여 배지에 포화상태에 이르지 않은 암세포를 트립신 처리 (0.25% 트립신 +0.02% EDTA) 후 정해진 수만큼을 30㎕의 Ca^{2+}과 Mg^{2+}가 함유되지 않은 HBSS(Hanks' balanced salt solution)에 부유시켰다.

3. 이하선에의 종양세포 이식술

이하선 확인 후, 본 연구진의 이전 실험에서 마우스에서 100% 종양발생능을 보인 최소 세포수인[16] 5×10^5 개의 선양낭성암 세포를 5마리의 누드 마우스의 이하선에 이종이식하였다. 즉 쏘디움 펜토바비탈 복강내 마취 (50mg/kg body weight) 후 협부를 알코올 솜으로 소독하였다. 미세가위로 전이개 부위에 절개선을 가하고 절개부의 하방에 위치하는 이하선에 손가락으로 가벼운 압력을 가하여 이하선 조직을 절개 부위로 노출시킨 후, 30게이지의 피하 주사침을 이용하여 암세포 부유액 30㎕를 새지 않도록 조심스럽게 주입하였다. 암세포 부유액 주입 후 절개부는 염증반응의 관여를 최소화하기 위하여 세밀하게 미세봉합하였다.

4. 피하조직에의 종양세포 이식술

같은 수인 5×10^5개의 선양낭성암 세포를 5마리의 누드 마우스의 옆구리 피하조직에 이종이식하였다. 즉 특별히 마취상태는 유도하지 않았고 정해진 수의 암세포를 30㎕의 HBSS에 부유시켜 1ml 시린지와 30게이지 주사침을 이용하여 누드 마우스의 우측 옆구리 부위의 피하조직층 내에 주입하였다. 암세포 이종이식 후 실험동물은 종양이 인지될 때까지 매일 관찰되었고, 종양 발생 후에는 1주일에 2회 종양의 증식상태를 파악하였다.

5. 실험동물의 희생

실험동물의 희생시점은 유도된 종물이 충분히 성장하되 중심성 괴사로 인한 염증반응이 확장되는 시점을 고려하여 암세포 이식 5주 후에 희생하였다. CO_2를 이용하여 안락사시킨후 원발성 종양을 절제하여 그 무게를 측정하였다. 종물을 이등분하여 반은 헤마톡실린-에오신 염색을 위하여 포르말린 고정 후 파라핀에 포매하였고, 나머지 반은 추후 연구를 위하여 OCT 화합물(Miles Inc., Elkhart, IN, U.S.A.)에 포매하여 액체질소로 급냉 후 -70℃에 보관하였다.

6. 면역조직화학염색을 위한 항체 및 시약

면역조직화학염색에는 다음의 일차항체들이 사용되었다: polyclonal rabbit anti-VEGFR-1,2,3 (Santa Cruz Biotechnology)/anti-phospho-VEGFR-2 (Oncogene), polyclonal rabbit anti-VEGF/anti-MMP-9 (Santa Cruz Biotechnology), polyclonal rabbit anti-interleukin (IL)-8 (Biosource International), polyclonal rabbit anti-basic fibroblast growth factor (bFGF; Sigma Chemical). 이차항체로는 goat anti-rabbit HRP (horseradish peroxidase, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove. USA), DAB (3,3-diaminobenzine, Research Genetics, Huntsville, USA)이 사용되었다.

7. 면역조직화학염색 기법

1) VEGF, bFGF, IL-8, MMP-9 염색

파라핀 포매된 조직을 4-6 ㎛로 세절하여 생긴 조직절편을 양성 전하를 띤 슬라이드 위에 올려놓고, 57-60℃정도의 열을 30-40분 정도 가하여 왁스성분의 제거를 용이하게 하였다. 자일렌 용액으로 왁스를 제거하고 계열 알코올 용액으로 재수화시킨 후 PBS (phosphate buffered solution)를 이용하여 마르지 않게 하였다. 항원성 회복(antigen recovery)을 위하여 MMP-9의 경우 물에 담근 상태에서 전자렌지에서 마이크로웨이브를 이용하여 5분간 가열후 10분간 식혔으며, VEGF, bFGF, IL-8 염색의 경우 PBS를 제거하고 펩신 (Biomeda, Foster City, CA, USA)을 37℃에서 20분간 적용하였다. 펩신을 제거하기 위하여 PBS로 3분간 3차례 수세 후, 내인성 과산화효소 (endogenous peroxidase)의 활성을 억제하기 위하여 3% H_2O_2 메탄올 용액에서 12분간 두었다. 조직절편을 다시 PBS로 3분간 3차례 수세 후, 상온에서 비특이 단백의 결합을 차단하기 위하여 5% 정상 말혈청과 1% 정상 양혈청을 PBS에 섞은 단백 차단액에 20분간 반응시켰다. 단백 차단액 제거 후 단백 차단액에 괄호안의 비율로 희석시킨 일차항체인 rabbit anti-human VEGF (1:500), -bFGF (1:1,000), -IL-8 (1:50), -MMP-9 (1:50)을 4℃에서 밤새 결합시켰다. PBS로 3분간 3차례 수세하고 단백 차단액을 10분간 적용한 후, 단백 차단액을 제거하고 단백 차단액에 1:500으로 희석시킨 이차항체인 goat anti-rabbit HRP를 상온에서 1시간동안 반응시켰다. 슬라이드를 PBS로 3분간 3차례 수세 후 브리지 용액 (50ml PBS에 brij용액 1방울을 떨군 후 pH를 7.6으로 맞춤)으로 린스하고, 발색반응을 위하여 DAB을 적용하였다. 이때 발색반응을 현미경으로 확인해가며 적정시간 적용하되 10분을 넘지 않도록 한다. 증류수로 3분간 3회 수세 후 브리지 용액 (50ml 증류수에 brij 용액 1방울을 떨굼)으로 린스하고, 헤마톡실린 (Gill's hematoxylin, Sigma, St. Louis, MO, USA)으로 대조염색을 10-20초간 시행하였다. 흐르는 증류수로 대조염색을 중지시키고 세포핵을 푸른 색으로 강조하기 위하여 PBS를

30-60초간 적용하였다. 증류수로 모든 염기 성분이 제거되도록 철저히 수세한 후 마운트를 2-3방울 적용하고 50-60℃의 열판에서 5-10분 정도 중합시켜 고정하였다.

2) VEGFR-1,2,3 염색

포르말린으로 고정하여 파라핀 포매한 조직절편을 전술한 방법으로 파라핀을 제거하고, 계열알코올로 재수화시켰다. 항원부위 노출을 통해 항원성을 노출시키기 위하여 10mM citrate 완충용액 (pH 6.0)에 담근 상태에서 전자렌지에서 마이크로웨이브를 이용하여 10분간 가열하되 먼저 2분 30초간 강하게 가열한 후 7분 30초간 약하게 가열하였다. PBS로 수세 후, 내인성 과산화효소의 활성을 억제하기 위하여 3% H_2O_2 메탄올 용액에 12분간 두었다. PBS로 수세 후 상온에서 단백 차단 후 단백 차단액에 1:200으로 희석시킨 일차항체인 rabbit polyclonal anti-VEGFR-1,2,3를 4℃에서 밤새 결합시켰다. PBS로 3분간 3차례 수세하고 단백 차단액을 10분간 적용한 후, 단백 차단액을 제거하고 단백 차단액에 1:500으로 희석시킨 이차항체인 goat anti-rabbit HRP를 상온에서 1시간동안 반응시켰다. 슬라이드를 PBS로 3분간 3차례 수세 후 전술한 바와 같이 DAB을 이용하여 양성반응을 가시화하였다. 헤마톡실린으로 대조염색을 시행한 후 universal mount를 이용하여 고정하였다. 음성대조 표본은 이차항체만을 적용하였다.

3) Phosphorylated VEGFR-2 염색

포르말린으로 고정하여 파라핀 포매한 조직절편을 이용하였으며, 항원-항체반응의 항원성을 증가시키기 위하여 10mM citrate 완충용액 (pH 6.0)에 담근 상태에서 전자렌지에서 위에서와 같이 10분간 가열하였다. PBS로 수세 후, 내인성 과산화효소의 활성을 억제하기 위하여 3% H_2O_2 메탄올 용액에 12분간 두었다. PBS로 수세 후, 상온에서 단백 차단을 위하여 5% 정상 말혈청과 1% 정상 양혈청을 PBS에 섞은 단백 차단액에 20분간 반응시켰다. 단백 차단액 제거 후 단백 차단액에 1:50으로 희석시킨 일차항체인 rabbit polyclonal anti-phospho-VEGFR-2 (pVEGFR-2)를 4℃에서 밤새 결합시켰다. PBS 수세 후 위에서와 같이 면역효소법 (immunoenzyme technique)을 적용하여 이차염색을 시행하고 DAB을 이용하여 발색하였다. 음성대조 표본은 이차항체만을 적용하였다.

8. 혈관성 전이관련 인자들에 대한 양성반응의 판독 및 정량화, 통계분석

VEGFR-1,2,3와 pVEGFR-2 염색에 대한 양성반응의 강도는 -, no staining; +, weak staining; ++, strong staining의 3단계로 나누어 비교, 분석하였다. VEGF, bFGF, IL-8, MMP-9의 이하선 종양과 피하 종양에서의 발현 정도, 즉 면역조직화학적 염색의 강도를 비교하기 위하여 대조염색을 시행하지 않은 슬라이드를 이하선 종양군과 피하 종양군에서 각각 5개씩 제작하였다. ×200 현미경야에서 5개 슬라이드로부터 1개 슬라이드당 4부위씩 종양조직의 20부위 (1부위는 0.039mm^2)를 선택하였다. 선택된 화상을 CCD 카메라 (Hamamatsu Corp., Bridgewater, NJ, USA)를 이용하여 컴퓨터에 입력하였다. Optimas 영상분석 소프트웨어에서 DAB에 의한 양성반응의 강도를 OD (optical density)값으로 수치화한 후, 비모수 검정 (Wilcoxon's non-parametric method)으로 비교하였다. OD값 측정시에는 실험내용을 모르는 계측자에 의해 대표적인 염색이 시행되었다고 생각되는 부위를 무작위적으로 설정 후, 목표지점에서의 수치를 측정하고 해당 슬라이드에서의 배경 염색 (background staining)된 수치를 빼서 데이터로 이용하였다. 통계 분석시 0.05 이하의 P값을 유의성 있는 차이로 인정하였다.

Ⅲ. 연구결과

1. 마우스에서의 종양발생 소견

5×10^5개의 선양낭성암 세포를 5마리의 누드 마우스의 이하선과 5마리의 누드 마우스의 옆구리 피하조직에 이종이식한 결과 10마리 모두에서 종양이 발생되었다. 즉 이하선 종양군 5마리에서는 성공적으로 선양낭성암의 이하선 동위종양이 이하선 조직내에 유도되었으며 (Fig. 1-A,B,C), 피하종양군 5마리 모두에서 이소종양이 유도되었다 (Fig. 1-D).

2. 동위종양과 이소성 종양에서 혈관성 전이관련 인자의 발현

이소성 부위에서는 존재하지 않거나 약하게 영향을 미칠 것으로 여겨지는 종양과 숙주 조직의 원발 기관간의 특정 상호연관성 (organ-specific interaction)을 결정하기 위하여 이하선 동위종양 조직과 이소성 피하종양 조직에서 혈관성 전이관련 인자인 VEGF, bFGF, MMP-9, IL-8의 발현을 비교하였다. 단백 발현의 강도를 정량분석한 결과 VEGF, bFGF, MMP-9은 동위종양 조직에서 과발현 되었으나 ($P < 0.05$) IL-8의 발현정도는 차이가 없었다 (Table 1, Fig. 2).

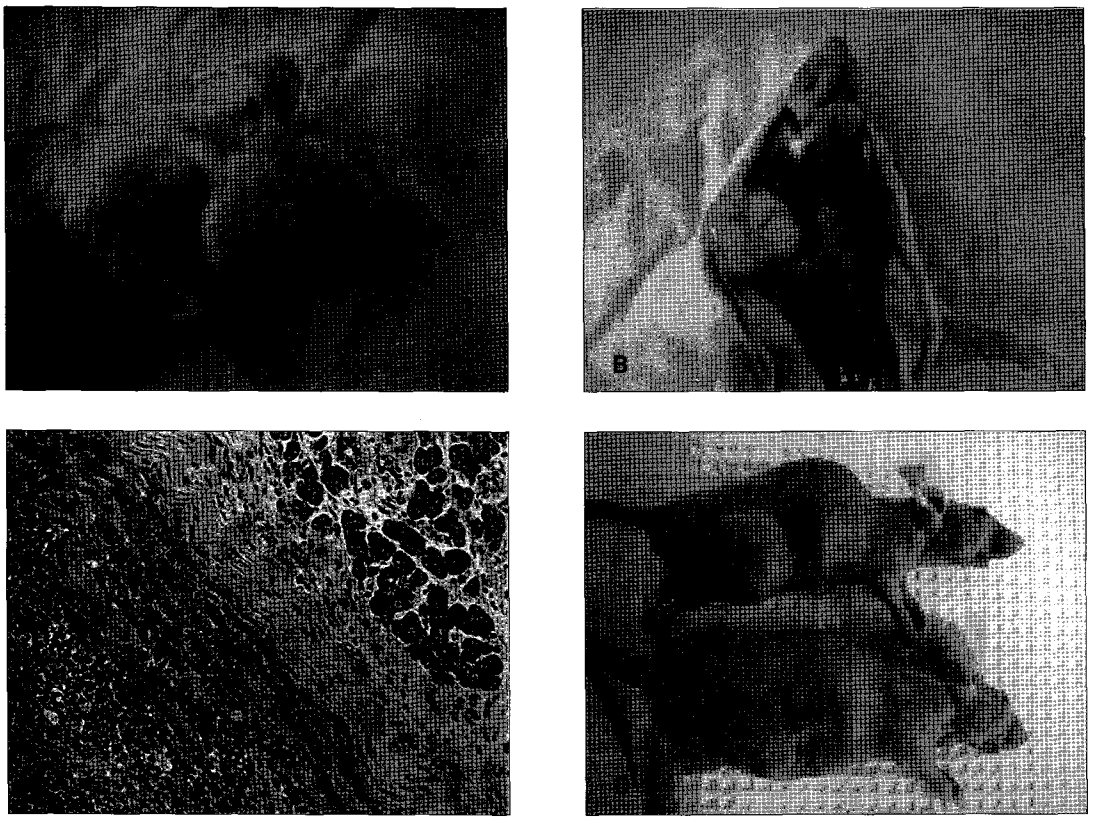

Fig. 1. Gross and histological features of the experimental (orthotopic parotid) and control (ectopic subcutaneous) tumors.
A : Transplantation of 5×10^5 cells of human parotid adenoid cystic carcinoma, successfully induced orthotopic tumors in a athymic mouse.
B : Dissected view of a orthotopic parotid tumor.
C : In a histological view, we can see the normal parotid tissues at the peripheral area, which means the tumor mass was induced within the parotid gland (Hematoxyline & Eosin staining, original magnification ×100).
D : Transplantation of 5×10^5 cells of human parotid adenoid cystic carcinoma, induced subcutaneous tumors in the flank areas of athymic mice.

Table 1. Immunohistochemical Analysis of Orthotopic and Ectopic Parotid Tumors of Athymic Mice

	VEGF	bFGF	MMP-9	IL-8
Orthotopic salivary tumors	1.12±0.13†	1.43±0.12†	1.27±0.14†	1.12±0.17
Ectopic salivary tumors	0.74±0.1	0.68±0.15	0.98±0.13	1.08±0.15

Adenoid cystic carcinoma cells (5×10^5) were injected into the parotid glands and subcutis of athymic mice. Specimens were processed for immunohistochemical analyses 5 weeks after the transplantation of tumor cells.
Immunohistochemical positivity (absorbance) was quantitated as described in "Materials and Methods."
†$P < 0.05$ between orthotopic(experimental) and ectopic(control) tumor groups (Wilcoxon non-parametric method)

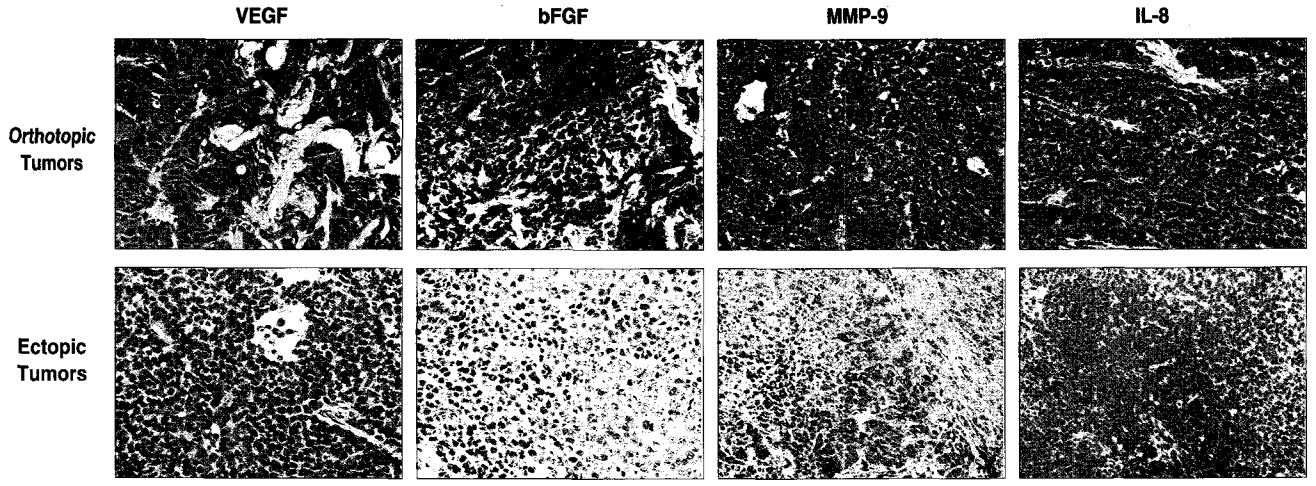

Fig. 2. Immunohistochemical staining of orthotopic and ectopic parotid tumors of salivary adenoid cystic carcinoma (original magnification ×100). Intensity of staining for VEGF, bFGF, and MMP-9 were higher in the orthotopic tumors than in ectopic tumors established in subcutis.

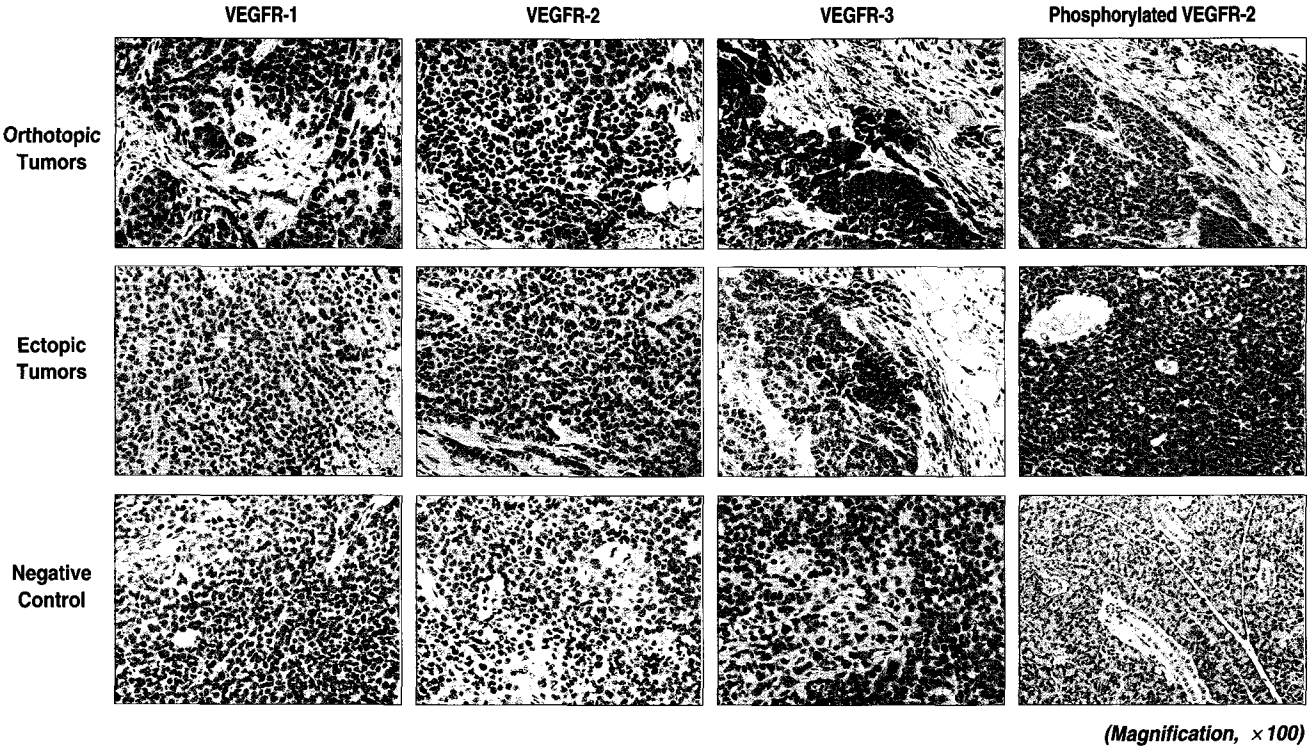

Fig. 3. Representative features of VEGFR-1, VEGFR-2, phosphorylated VEGFR-2, and VEGFR-3 expressions in experimental and control tumors (original magnification ×100). Intensity of staining for VEGFR-1,2,3, and phosphorylated VEGFR-2 were almost same in the orthotopic tumors than in ectopic tumors established in subcutis. Negative controls were without application of primary antibodies.

Table 2. Protein Expressions of the Vascular Endothelial Growth Factor Receptors in Orthotopic and Ectopic Salivary Tumors of Human Parotid Adenoid Cystic Carcinoma

		VEGFR-1	VEGFR-2	VEGFR-3	pVEGFR-2
Orthotopic salivary tumors	Tumor cells	-	-	++	+
	Endothelial cells	+	+	+	+
Ectopic salivary tumors	Tumor cells	-	-	++	+
	Endothelial cells	+	+	+	+

-, no staining; +, weak staining; ++, strong staining

3. 동위종양과 이소성 종양 세포에서 혈관내피세포 성장인자 수용체의 발현

동위종양과 이소성 피하종양 조직에서 종양관련 신생혈관 형성과 직접적인 관련이 있는 세포수용체인 VEGFR-2의 발현정도와 활성화상태, 그리고 VEGFR-1과 VEGFR-3의 발현정도를 면역조직화학염색으로 검색하였다. 그 결과 인간 타액선암 세포주를 이종이식하여 유도된 마우스 종양조직에서 혈관내피세포 성장인자 수용체의 발현정도와 그 활성화 정도는 동위종양과 이소성 피하종양 조직에서 차이가 없었다 (Fig. 3). 즉 음성대조군과 비교, 검색하여 보았을 때 VEGFR-1과 VEGFR-2는 종양조직의 간질에 존재하는 종양관련 혈관내피세포에서 미약하게 발현되었으며, VEGFR-3의 경우 종양관련 혈관내피세포뿐 아니라 종양세포, 특히 종물의 경계부에서 주변조직으로 침투해 들어가는 종양세포들에서 강하게 발현되는 양상을 보였다. 활성화된 상태인 인산화된 VEGFR-2의 경우 역시 종양관련 혈관내피세포뿐 아니라 종양세포에서도 발현되는 양상을 보였으나 모든 인자들에서 동위종양과 이소종양간의 차이는 없었다 (Table 2).

Ⅳ. 총괄 및 고찰

본 연구를 통하여 저자는 혈관성 전이를 주 기전으로 하는 타액선 선양낭성암종의 종양생물학적 특성을 파악하기 위하여 혈관성 전이관련 세포수용체와 혈관형성 인자들의 발현을 동물모델에서 정량적으로 분석하여 의미있는 결과를 제시하였다. 즉 인간 타액선암 세포주를 실험동물에 이종이식하여 동위종양과 비교군인 피하종양에서의 혈관형성 관련 유전자 발현을 단백 수준에서 검색하여 VEGF, bFGF, MMP-9이 동위종양에서 과발현됨을 보고하는 바이다.

저자는 선행연구를 통하여 혈관성 폐전이 성향이 재현된 인간 이하선 선양낭성암종 동위종양 모델을 제작, 보고하였다[16]. 또한 인간 타액선 선양낭성암종에서 혈관형성 신호전달 물질들과 일부 혈관형성 인자들이 정상 타액선 조직이나 양성 타액선 종양에서보다 과발현되며, 혈관성 전이에 중요한 역할을 하는 것으로 여겨지는 종양세포 주변의 미세혈관 농도가 증가되어 있음을 입증한 바 있다[17-20]. 본 연구에서는 마우스에 이종이식되어 유도된 동위종양에서 이소성 피하종양에서보다 혈관성 폐전이가 빈발한 기전을 규명하기 위하여, 동위종양과 피하종양에서의 혈관형성 인자와 혈관형성 신호전달 수용체의 발현을 단백수준에서 검증해 보고자 하였다.

본 실험을 위하여 먼저 마우스에서 인간 타액선 선양낭성암의 동위종양과 피하종양을 유도하였다. 선행실험 결과에서 100%의 종양발생능을 보인 최소 종양세포 수인 5×10^5개의 선양낭성암 세포를 5마리의 누드 마우스의 이하선과 5마리의 누드 마우스의 옆구리 피하조직에 이종이식한 결과 모든 개체에서 성공적으로 종물이 형성되었다. 혈관형성 인자들과 혈관형성관련 세포수용체의 발현을 객관적으로 평가하기 위해 종물의 증식으로 인한 피부층의 파괴나 종양괴사(tumor necrosis)가 발생하기 전에 실험동물을 희생하였다. 즉 종양세포 이종이식 후 5주 시점에서 면역조직화학염색을 위한 검체를 획득하였다.

혈관형성 과정에서 새로운 혈관이 만들어지기 위해서는 혈관내피세포가 새로운 간질상에 부착(attachment)후 이주, 침투에 이은 혈관내피세포의 증식과 혈관모양인 관형을 형성는 일련의 단계가 완성되어야 한다[21]. 종양관련 신생혈관 형성기전은 종물이 성장하면서 조직에 초래되는 저산소증이 자극이 되어 종양세포들이 혈관형성 인자들을 분비하면서 시작된다. 이 혈관형성 인자들이 종양관련 혈관내피세포의 세포막수용체인 VEGFR에 작용하여 타이로신 인산화효소 활성에 의해 혈관내피세포가 증식되면서 종양관련 신생혈관을 형성하게 되는 것으로 여겨진다.

지금까지 알려진 혈관형성 촉진인자는 20여 인자 이상이 확인되었으며, 본 실험에서 적용한 VEGF, bFGF, MMP-9, IL-8은 그 중에서도 혈관형성 촉진효과가 분명한 것으로 보고된 인자들이다. 즉 VEGF는 혈관내피세포의 증식을 유도하고 혈관투과성을 증가시키며, 혈관내피세포에 의한 urokinase plasminogen activator의 생성을 유도함으로써 신생혈관형성 과정에서 결정적인 역할을 한다[5]. bFGF는 혈관내피세포의 이주를 촉진하고 단백분해효소의 생성을 증가시키며 혈관 형태발생을 수행함으로써 혈관형성의 말기에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[13]. 본 실험적 연구결과 혈관형성의 일련의 과정중 초기와 말기에 중요한 혈관형성 인자인 VEGF와 bFGF가 피하종양의 암세포에서보다 동위종양의 암세포에서 과발현되어 결과적으로 혈관성 폐전이 병소의 형성에 이들 인자가 영향을 미친 것으로 생각된다.

IL-8은 마크로파지와 일부 표현형의 종양세포에서[22-24] 분비되어 신생혈관형성을 유도하고[14] 콜라겐분해효소 분비를 조절함으로써[11] 종양환경에서 종양세포의 침투성을 증가시키고 세포외기질의 재구조화를 통해 혈관성 전이에서 중요한 단계인 혈관형성, 종양세포의 이주, 그리고 침투에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 본 연구결과 IL-8의 발현정도는 동위종양과 피하종양에서 유의한 차이가 없는 것으로 밝혀졌다. 기존 연구들에 의하면 IL-8의 발현이 흑색종[25], 난소암[26], 전립선암[27], 그리고 위암[28] 세포의 전이능과 연관이 있다고 보고되었으나, 타액선 선양낭성암종에서는 혈관성 전이에 미치는 영향이 특별하지 않은 것으로 추론하였다.

신생 혈관형성 단계 중 세포외기질 성분에 대한 단백분해는 혈관내피세포로 하여금 이주할 수 있도록 하고 동시에 세포외기질로부터 저장된 혈관형성 신호전달 물질들을 분비하게 한다. 따라서 IV형 콜라겐 분해능과 젤라틴 분해능을 보이는 MMP-2와 MMP-9이 조직내에 높은 농도로 존재할 경우 신생혈관형성의 정도는 증가하는 것으로 보고되었다[29-30]. 본 연구에서는 악성종양의 진행과 연관되어 더 많은 연구결과가 축적된 MMP-9에 대한 발현정도을 마우스 동위종양과 피하종양에서 비교하여 본 결과, 동위종양에서 그 발현수준이 더 높게 조절되어 있었다. 따라서 선양낭성암에서 MMP-9은 암세포의 침투와 전이에 관련이 있는 것으로 생각된다.

VEGF 수용체는 혈관내피세포의 기능에 있어 결정적인 역할을 하는 것으로 입증되어 종물의 혈관형성능을 저하시키기 위한 가장 이상적인 표적물질로 여겨지고 있다[31]. 지금까지의 연구에 의하면 VEGFR-2(KDR)는 신생혈관형성을 증가시키며, VEGFR-3는 임파관의 혈관내피세포에 작용하는 것으로 여겨지고, VEGFR-1의 경우 그 기능이 뚜렷이 밝혀지지 않았지만 아마도 혈관형성과 관련이 있을 것으로 추정되고 있다. 실제로 KDR(kinase domain region) 타이로신 인산화효소의 활성을 억제하거나[32] KDR에 대한 항체를 적용할 경우[33] 원발종양의 성장이 억제될 뿐만 아니라, 결장암의 간전이가 감소된 것으로[34] 보고된 바 있다. 위의 고찰로부터 저자는 VEGFR 신호전달계의 발현이 피하종양에서보다 혈관성 원격전이 경향이 강한 동위종양에서 더 높을 것으로 가설하고 실험을 통해 검증하였으나, 연구결과에서와 같이 유의한 차이는 없는 것으로 나타났다.

Ⅴ. 요약 및 결론

타액선 악성종양인 선양낭성암 세포를 면역결핍 마우스의 이하선과 피하조직에 이종이식하여 동위종양과 이소성 종양을 유도한 후, 종양조직에서의 혈관성 전이관련 인자들의 발현을 면역조직화학염색으로 검색, 비교하여 다음과 같은 결과를 도출하였다.

1. 5×10^5개의 선양낭성암 세포(ACC3)를 실험군과 비교군 총 10마리의 면역결핍 마우스에 이종이식한 결과 100%의 종양발생능을 보였다.
2. 검색된 혈관형성 인자들 중 VEGF, bFGF와 MMP-9은 이소성 피하종양의 종양세포에서보다 이하선 동위종양의 종양세포에서 강하게 발현되었다 ($P<0.05$).
3. 검색된 혈관형성 인자들 중 종양세포에서의 IL-8의 발현은 이소성 피하종양과 이하선 동위종양간에 차이가 없었다.
4. 종양혈관형성 수용체인 VEGFR-2은 유도된 마우스 종양에서 비교적 그 발현이 미약하였으며, 활성화된 형태인 phosphorylated VEGFR-2는 비교적 그 발현이 강하였으나 이하선 동위종양과 이소성 피하종양간의 차이는 없었다.
5. VEGFR-1은 종양관련 혈관내피세포에서 매우 약하게 발현되었으며 이하선 동위종양과 이소성 피하종양간의 차이는 없었다.
6. VEGFR-3의 경우 유도된 종물의 종양세포에서, 특히 종물의 변연부에 존재하는 종양세포에서 강하게 발현되었으며 이하선 동위종양과 이소성 피하종양간의 차이는 없었다.

결론적으로, 이하선 선양낭성암 동위종양에서 대표적인 혈관형성 인자인 VEGF, bFGF와 MMP-9이 과발현되어 선양낭성암종의 전이과정에 중요한 역할을 하는 것으로 여겨진다. 즉 실험적 연구를 통하여 임상적으로 이하선 선양낭성암종이 혈관성 폐전이가 빈발하는 현상을 동물모델에

서 분자생물학적으로 설명할 수 있는 기전이 밝혀졌다고 사료되는 바이다.

참고문헌

1. Chen CH, Li BY, Wan JT et al : Expression of epidermal growth factor in salivary adenoid cystic carcinoma. Proc Natl Sci Counc Repub China B 25(2) : 90, 2001.
2. Hichman RE, Cawson RH, Duffy SW : The prognosis of specific types of salivary gland tumors. Cancer 54 : 1620, 1984.
3. de Jong JS : Expression of growth factors, growth-inhibiting factors, and their receptors in invasive breast cancer. II: Correlations with proliferation and angiogenesis. J Pathol 184 : 53, 1998.
4. 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 : 732, 1999.
5. 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 : 204, 1996.
6. Goldman CK : Epidermal growth factor stimulates vascular endothelial growth factor production by human malignant glioma cells: a model of glioblastoma multiforme pathophysiology. Mol Biol Cell 4 : 121, 1993.
7. Fidler IJ : Rationale and methods for the use of nude mice to study the biology and therapy of human cancer metastasis. Cancer Metastasis Rev 5: 29, 1986.
8. Bowden J, Brennan PA, Umar T et al : Expression of vascular endothelial growth factor in basal cell carcinoma and cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck. J Cutan Pathol 29 : 585, 2002.
9. Gille J, Swerlick RA, Caughman SW : Transforming growth factor-alpha-induced transcriptional activation of the vascular permeability factor (VPF/VEGF) gene requires AP-2-dependent DNA binding and transactivation. Embo J 16 : 750, 1997.
10. Yu F, Jiang XZ, Chen WT et al : Microvessel density and expression of vascular endothelial growth factor in adenoid cystic carcinoma of salivary gland. Shanghai Kou Qiang Yi Xue 12 : 443, 2003.
11. Luca M, Huang S, Gershenwald JE et al : Expression of interleukin-8 by human melanoma cells up-regulates MMP-2 activity and increases tumor growth and metastasis. Am J Pathol 151 : 41, 1997.
12. Bergers G, Brekken R, McMahon G et al : Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. Nat Cell Biol 2 : 737, 2000.
13. Myoken Y, Myoken Y, Okamoto T et al : Immunohistochemical study of overexpression of fibroblast growth factor-1 (FGF-1), FGF-2, and FGF receptor-1 in human malignant salivary gland tumours. J Pathol 178 (4): 429, 1996.
14. Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL et al : Interleukin-8 as a macrophage derived mediator of angiogenesis. Science 258 : 1798, 1992.
15. Ishibashi H, Shiratuchi T, Nakagawa K et al : Hypoxia-induced angiogenesis of cultured human salivary gland carcinoma cells enhances vascular endothelial growth factor production and basic fibroblast growth factor release. Oral Oncol 37 : 77, 2001.
16. Park YW, Chung SH : An experimental study for establishment of orthotopic salivary tumor models in mice. J Kor Oral Maxillofac Surg 33(2) : 81, 2007.
17. Park YW : Cellular and molecular characterization of adenoid cyctic carcinoma of the salivary glands. J Kor Assoc Of Maxillofac Plast And Reconstr Surg 27 : 110, 2005.
18. 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 Assoc Oral Maxillofac Surg 32 : 530, 2006.
19. In YS, Kim SM, Park YW: Comparative immunohistochemical assays for the expression of angiogenic factors in tumors of human salivary glands. J Kor Assoc Maxillofac Plast Reconstr Surg 29 : 10, 2007.
20. Park YW, Chung SH : An experimental study for establishment of orthotopic salivary tumor models in mice. J Kor Assoc Oral Maxillofac Surg 33 : 81, 2007.
21. Fidler IJ, Ellis LM : The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. Cell 79 : 185, 1994.
22. Arenberg DA, Keane MP, DiGiovine B et al : Epithelial-neutrophil activating peptide is an important angiogenic factor in non-small cell, lung cancer. J Clin Invest 102 : 465, 1988.
23. Brew R, Southern SA, Flanagan BF et al : Detection of interleukin-8 mRNA and protein in human colorectal carcinoma cells. Eur J Cancer 32 : 2142, 1996.
24. Green GF, Kitadai Y, Pettaway CA et al : Correlation of metastasis-related gene expression with metastatic potential in human prostate carcinoma cells Implanted in nude mice using an in situ messenger RNA hybridization technique. Am J Pathol 150 : 1571, 1997.
25. Singh R, Gutman M, Reich R et al : UVB irradiation promotes tumorigenic and metastatic properties in primary cutaneous melanoma via induction of IL-8. Cancer Res 54 : 3242, 1995.
26. Yoneda J, Kuniyasu H, Crispen MA et al : Expression of angiogenesis-related genes and progression of human ovarian carcinomas in nude. J Natl Cancer Inst 90 : 447, 1998.
27. Ferrer FA, Miller LJ, Andrawis RI et al : Angiogenesis and prostate cancer: In vivo and in vitro expression of angiogenesis factors by cancer cells. Urology 51 : 161, 1998.
28. Kitadai Y, Haruma K, Sumii K et al : Expressoin of interleukin-8 correlates with vascularity in human gastric carcinomas. Am J Pathol 152 : 93, 1998.
29. Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG : Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. Cell 64 : 327, 1991.
30. Aznavoorian S, Murphy AN, Stetler-Stevenson WG et al : Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis. Cancer 71 : 1368, 1993.
31. Folkman J : Angiogenesis in cencer, vascualr, rheumatoid, and other disease. Nature Med 1 : 27, 1995.
32. Fong TA, Shawver LK, SUN L, et al. : SU54116 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR)that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of

multiple tumor types. Cancer Res 59 : 99, 1999.
33. Prewett M, Huber J, Li Y et al. : Antivascular endothelial growth factor receptor(fetal liver kinase 1)monoclonal antibody inhibits tumor angiogenesis and growth of several mouse and human tumors. Cancer Res 59 : 5209, 1999.
34. Shaheen RM, Davis DW, Liu W et al. : Antiangiogenic therapy targeting the tyrosine kinase receptor for vascular endothelial growth factor receptor inhibits the growth of colon cancer liver metastasis and induces tumor and endothelial cell apoptosis. Cancer Res 59 : 5412, 1999.

저자 연락처
우편번호 210-702
강원도 강릉시 강릉대학로 120번지
강릉대학교 치과대학 구강악안면외과학교실
박 영 욱

원고 접수일 2007년 7월 20일
게재 확정일 2007년 10월 29일

Reprint Requests
Young-Wook Park
Dept. 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 20 July 2007
Paper accepted 29 October 2007