

조기위암에서 E-cadherin, VEGF-C, VEGF-D의 발현과 Cytokeratin 18로 면역화학염색 한 림프절 전이와의 연관성

충북대학교 의과대학 외과학교실, ¹병리학교실, ²국립암센터 외과

김대훈 · 윤효영 · 송영진 · 류동희 · 민인철 · 성노현¹ · 이상억²

목적: VEGF-C와 VEGF-D는 맥관형성성 인자이고, E-cadherin의 비정상 발현은 위암의 진행에 중요한 역할을 한다. 이 연구의 목적은 조기위암에서 E-cadherin, VEGF-C, -D 그리고 cytokeratin 18를 이용하여 정확하게 측정된 림프절 전이와의 연관성을 연구하는데 있다.

대상 및 방법: 1997년 3월부터 2002년 12월까지 49명의 조기 위암환자들을 대상으로 E-cadherin, VEGF-C와 VEGF-D 면역화학염색을 시행하였다. 림프절 전이를 정확하게 측정하기 위하여 49명 환자들의 1,562개의 림프절을 cytokeratin 18을 사용하여 재검사 하였다.

결과: 11 (0.7%)개의 림프절이 12.2% (n=6)의 환자들로부터 새롭게 발견되었다. 정확한 림프절 전이는 점막암에서 3.6%였고, 점막하암에서 38.1%였다. 병기 이동은 3명(6.1%)의 환자에서 관찰되었다. E-cadherin의 비정상 발현은 36.7%에서 발견되었고, VEGF-C와 VEGF-D의 발현은 각각 16.3%와 36.7%에서 관찰되었다. E-cadherin의 비정상 발현은 종양의 분화도($P < 0.0103$)와 Lauren 분류($P < 0.0001$)와 뚜렷한 연관성이 있었다. VEGF-C와 VEGF-D는 조기위암에서 림프절 전이를 포함한 임상병리학적 연관성이 없었다. 그러나 E-cadherin이 비정상 발현되고 VEGF-C 또는 VEGF-D의 발현이 동반되는 환자들에서 림프절 전이의 빈도가 높았다($P=0.0031$).

결론: 본 연구에서 조기위암에서 림프절 전이와 VEGF-C, VEGF-D의 발현과의 관계를 증명할 수 없었다. 하지만 E-cadherin이 비정상 발현을 하면서 VEGF-C 또는 VEGF-D의 발현을 동반할 경우 림프절 전이와 연관성이 있었다.

중심 단어: E-cadherin, VEGF-C, VEGF-D, 림프절 전이, 조기 위암

미세전이의 정의 및 그 임상적 의의에 대해서 논란이 있으나 Yun 등은 조기위암에서 미세전이를 포함할 경우 점막암의 9.1%, 점막하암의 31.6%에서 림프절 전이가 발견되었고 조기위암환자의 6.7%에서 병기가 상향되었다고 하였다.(4)

암세포가 원격 전이가 되려면 암세포의 유리, 국소 침습, 이동, 신생혈관생성, 혈관 침습, 혈관내 상피 세포로의 유착, 다른 장기 내에서의 성장 등의 여러 단계를 거쳐야 하며 그 중 첫 단계로 세포간의 접착이 떨어져야 하고 이 과정에서 E-cadherin 등과 같은 세포 접착 분자가 중요한 역할을 한다.(5) VEGF-C와 VEGF-D는 VEGFR2와 VEGFR3와 결합하여 신생 림프관 및 혈관 형성을 유도 한다.(6,7) VEGF-C는 유방암, 자궁경부암, 대장암, 폐암, 전립선암과 위암에서 발현이 증가되고, VEGF-D는 유방암, 대장암, 위암과 갑상샘암에서 발현이 증가된다.(6) 위암에서 VEGF-C 발현은 종양의 T 병기 및 N 병기와 연관성이 있어 예후에 중요한 역할을 한다.(8) 또 Ishikawa 등은 VEGF-C와 VEGF-D의 발현이 미분화 조기위암에서 림프절 전이의 중요한 요인이라 하였다.(9)

본 연구는 조기위암에서 Cytokeratin 18을 이용한 면역화학염색으로 림프절 전이를 정확하게 진단하여, 림프절 전이와 암세포 전이의 여러 단계 중 초기 단계에 관여하는 E-cadherin, VEGF-C와 VEGF-D의 발현과의 연관성을 알아보고자 하였다.

서 론

위암의 조기검진에 대한 국민의식의 향상과 진단기술의 발달로, 우리나라에서 조기위암의 비율은 1995년 28.6%에서 2004년 47.7%로 증가하고 있다.(1) 조기위암은 진행성위암에 비해 그 예후가 매우 양호하며 림프절 전이 유무가 매우 중요한 예후 인자 중 하나이다.(2,3) 위암에서 림프절

책임저자: 윤효영, 충북 청주시 개신동 62번지
충북대학교병원 외과, 361-711
Tel: 043-269-6032, Fax: 043-266-6037
E-mail: yunhyo@chungbuk.ac.kr
접수일 : 2008년 3월 27일, 게재승인일 : 2008년 5월 26일

방 법

1) 연구대상

1997년 3월부터 2002년 12월까지 충북대학교 병원 외과에서 조기위암으로 근치적 절제술을 시행한 환자 중 파라핀 포매 보관상태가 양호한 49명을 대상으로 하였다. 대상 환자들은 모두 술 전 항암치료나 방사선치료를 받지 않았다. 환자의 재발 및 생존은 의무기록 및 전화조사로 확인하였다.

2) 면역조직화학 염색

10% 중성 포르말린에 고정된 후 제작된 환자의 파라핀

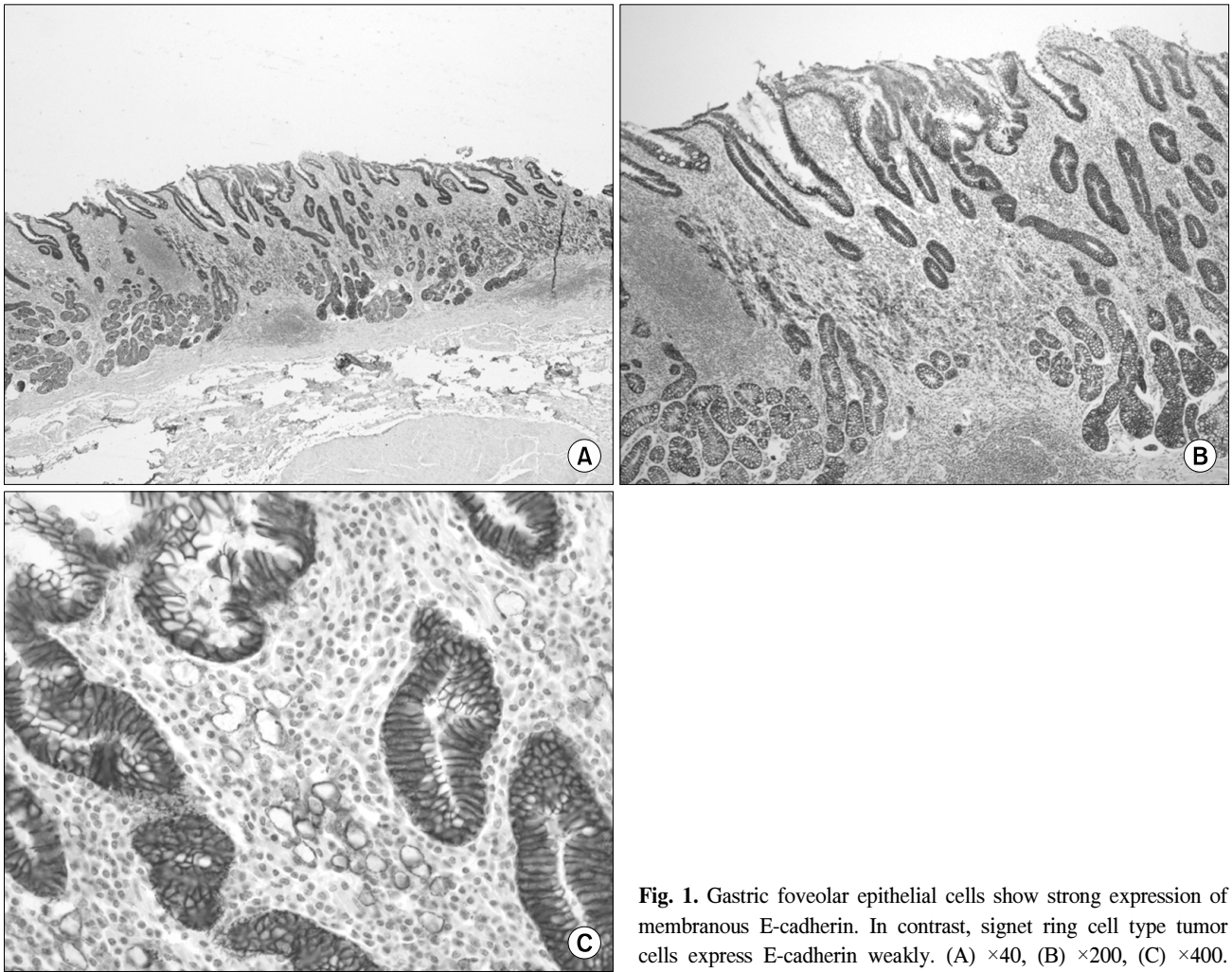


Fig. 1. Gastric foveolar epithelial cells show strong expression of membranous E-cadherin. In contrast, signet ring cell type tumor cells express E-cadherin weakly. (A) $\times 40$, (B) $\times 200$, (C) $\times 400$.

포매조직을 $4\mu\text{m}$ 두께로 박절하였다. Xylene으로 10분간 4회 탈파라핀 과정을 거친 후 무수알코올 90%, 70% 및 50% 에탄올에 각 2분씩 처리하여 함수시켰다. Antigen retrieval을 위하여 PH9.0 EDTA buffer solution에 담가서 50watt microwave oven에 10분간 처리한 후 Phosphate buffer solution로 5분간 3회 세척하였다. 그 후 내인성 과산화 효소의 활성을 억제하기 위하여 3% hydrogen peroxide ethanol에 10분간 처리하고 Phosphate buffer solution으로 세척하였다. 1:100으로 희석된 E-cadherin 일차항체(Zymed Inc., South San Francisco CA, USA), 1:100으로 희석한 VEGF-C (Zymed Inc., South San Francisco, CA, USA), 1:50으로 희석한 VEGF-D (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)와 1:800으로 희석한 CK18 (Dinon A Inc., Korea)를 각각 40분간 incubation 한 후, Phosphate buffer solution으로 5분간 5차례 세척한 뒤, 이차항체(histofine simplestain MAX PO)를 30분간 처리 한 후, Phosphate buffer solution으로 수세하였다. DAB (3·3'-diaminobenzidine) solution (Lab vision Freemount., CA, USA)을 이용하여 5분간 실온에서 발색시키고 Mayer's hemato-

xilin으로 대조염색하고 봉입하였다.

3) 결과 판정방법

E-cadherin, VEGF-C & VEGF-D의 판독은 환자의 임상정보에 대하여 모르는 1명의 병리의에 의하여 시행되었으며, 방법은 정상 대조군을 위암 주변의 정상에 가까운 상피세포로 하였다. E-cadherin, VEGF-C & VEGF-D 면역염색의 발현의 평가는 반정량적 분석 방법을 통하여 시행하였다. 면역염색 된 농도에 따라서 0점, 1점, 2점, 3점으로 나누었고, 염색된 면적에 따라서 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1로 나누어 두 점수를 곱하여 계산하였다. 소수점 아래 첫째 자리를 유효숫자로 하여 계산하였고, 각각의 점수는 0, 1, 2, 3으로 나누었다. E-cadherin은 주변 정상 발현되는 군을 3점으로 하였고, 면역염색의 발현이 정상 점막조직보다 떨어지는 0, 1, 2을 비정상 발현군으로 하였다(Fig. 1). VEGF-C와 VEGF-D는 0점인 것을 비발현군으로 하였고, 1점 이상을 정상 발현군으로 하였다(Fig. 2). 림프절의 미세전이의 정의는 윤 등(4)의 연구에서와 같이 통상적인 H&E 염색에서 발견되지 않았으나

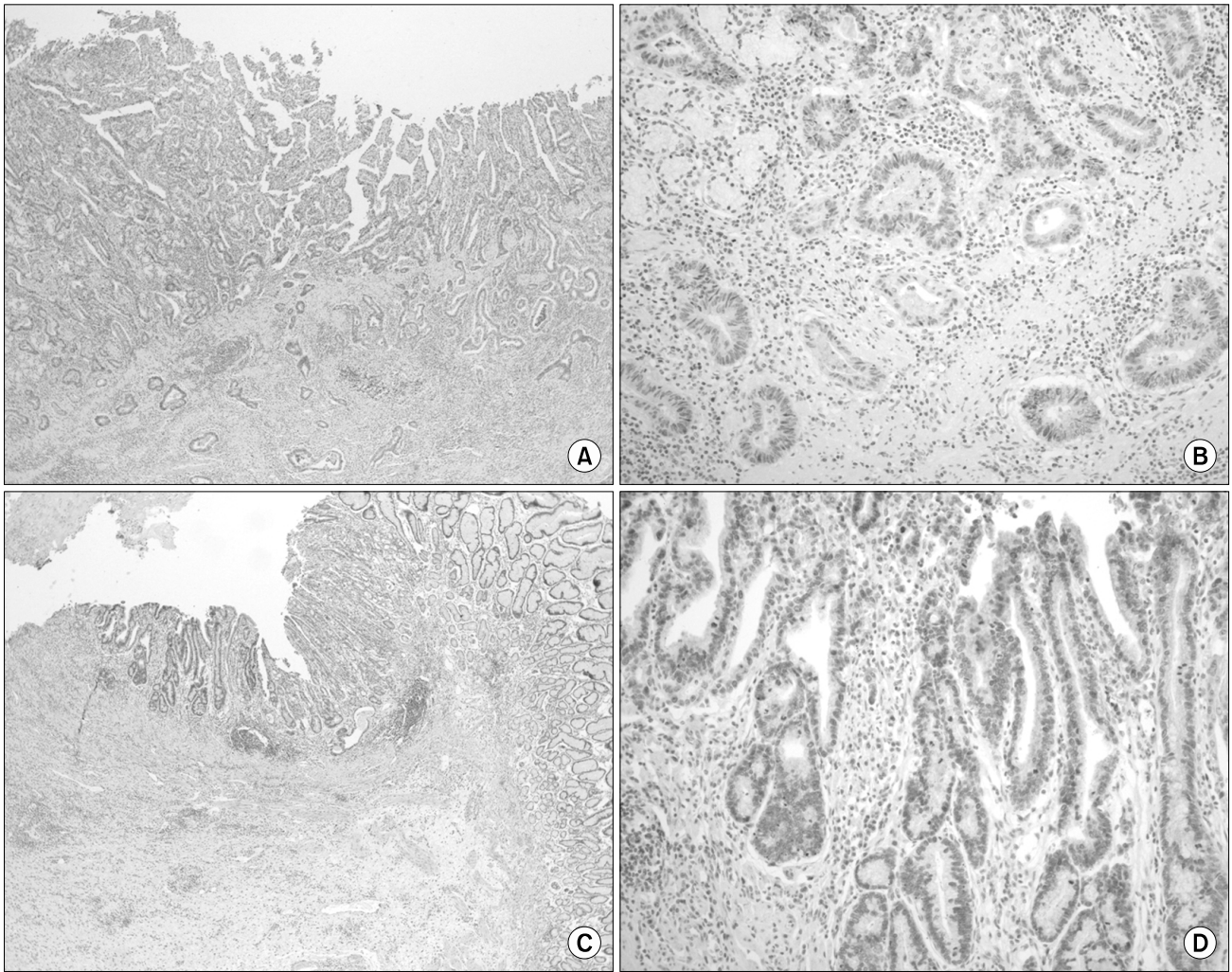


Fig. 2. Gastric cancer cells show cytoplasmic expression of VEGF-C & VEGF-D. (A), (B) VEGF-C $\times 40$, $\times 200$. (C), (D) VEGF-D $\times 40$, $\times 200$.

cytokeratin 18을 이용한 면역화학염색에서 발견된 것으로 하였다(Fig. 3).

4) 통계분석

통계처리는 SPSS 12.0 프로그램(SPSS inc. Illiosis, USA)으로, Pearson Chi square test 또는 Fisher's exact test를 이용하여 임상병리학적 특성 및 림프절 전이와 E-cadherin, VEGF-C & VEGF-D발현 관계를 검정하였으며, 유의 수준은 $P < 0.05$ 로 정의하였다.

결 과

1) 임상 병리학적 특성

49명 환자의 성별 분포는 남자 29명(59.2%), 여자는 20명(49.8%)이었다. 연령은 34세부터 76세까지 분포 하였고 평균연령은 58.6 ± 11.3 세이었다. 점막침윤은 28명(57.1%), 점

막하침윤은 21명(42.9%)이었다. 종양의 크기는 0.5 cm에서 6 cm까지 분포하였으며, 평균 $2.34 \text{ cm} \pm 1.3$ 이었다. 조직학적 분류상 분화형(고분화형 24명, 중등도분화형 10명)은 34명(69.4%), 미분화형(인환세포암)은 15명이었다(30.6%). Lauren 분류상 장형이 32명(65.3%), 혼합형이 2명(4.1%), 미만형이 15명이었다(30.6%).

2) 림프절 전이

절제된 림프절 수는 1,562개이었고, 평균 31.8 ± 13.8 개였다. 림프절 전이는 64개의(4.1%) 림프절에서 있었고, H&E 검사에서 49명중 7명(14.3%), 점막하에서 1명(3.6%), 점막하암에서 6명(28.6%)에서 관찰되었다. UICC병기(1997, 5판)상 N1은 점막하 1명(3.6%), 점막하암 3명(14.1%)으로 총 4명(8.2%), N2는 점막하암에서 2명(4.1%), N3는 점막하암에서 1명(2.0%)이었다. 면역화학염색 후 새로이 발견된 림프절 전이는 단일 전이세포는 없었으며, 작은 군집의 림프절 전

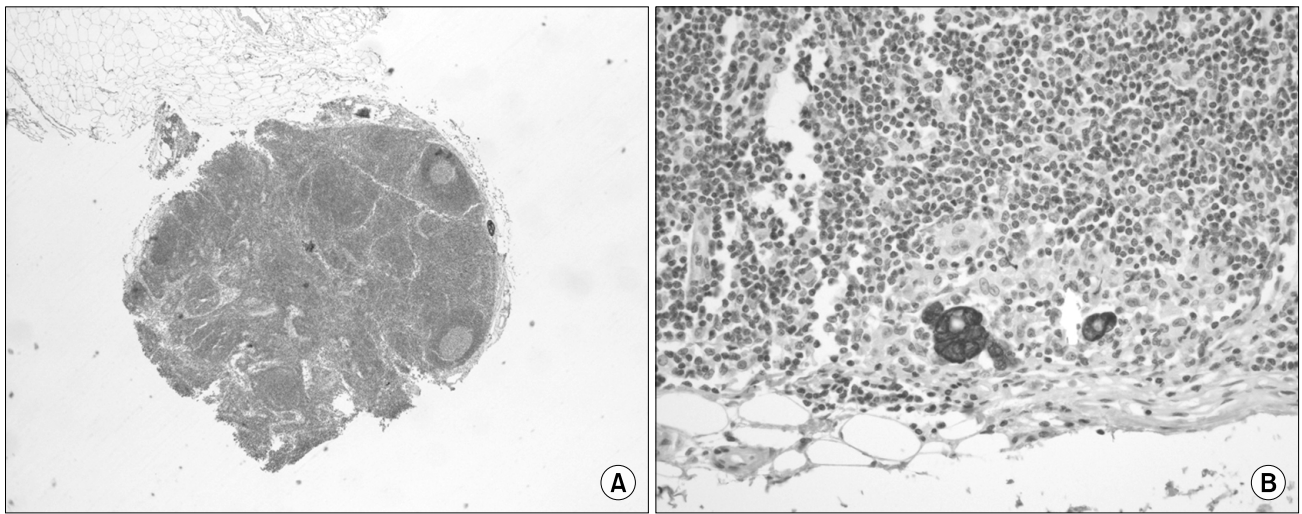


Fig. 3. Micrometastasis in the cortex of lymph node (A) ×40. There are two micrometastatic tumor cell nests in the cortex of lymph node (B) ×400.

Table 1. Expression of E-cadherin, VEGF-C and -D in lymph node metastases, lymphatic invasion (ly) and recurred case in EGC

Case	Sex/Age	Histology	Gross type	Depth	Total dissected LN	RLNM	Newly detected LNM	E-cad	VEGF-D	VEGF-C	Lauren Class	Ly	Survival (Mo)	Size (cm)
1	F/39	Signet	Ic	sm	46	30	2	Abnormal	N	P	Diffuse	P	Alive (65)	4
2	M/55	Signet	Ic + III	sm	42	14	0	Abnormal	P	N	Diffuse	N	Alive (65)	6
3	F/60	WD	I	sm	45	8	2	Normal	N	N	Diffuse	N	Alive (84)	1
4	F/65	Signet	Ic	sm	39	8	0	Normal	P	N	Diffuse	P	Alive (79)	5
5	F/46	Signet	Ic + III	sm	73	4	2	Abnormal	P	P	Diffuse	N	Alive (66)	3
6	F/64	WD	Ic + IIb	sm	36	3	0	Normal	N	N	Intestinal	P	Alive (72)	0.6
7	F/64	MD	Ic + III	sm	29	3	3	Abnormal	P	N	Intestinal	N	Alive (66)	1.8
8	M/72	WD	IIb + Ic	m	46	3	1	Abnormal	N	N	Intestinal	N	Alive (62)	4
9	M/69	MD	I	sm	34	1	1	Abnormal	P	N	Mixed	N	Alive (68)	2.5
10	F/53	Signet	Ic	sm	46	0	0	Abnormal	N	N	Diffuse	P	Alive (65)	2.5
11	M/70	WD	Ic	m	15	0	0	Normal	P	N	Intestinal	P	Dead (64)*	1.5
12	F/70	WD	IIb + IIa	sm	28	0	0	Abnormal	N	P	Intestinal	N	Dead (54) [†]	4.5

RLNM = real extent of lymph node metastases including newly detected LNM using cytokeratin 18; Signet = signet ring cell type; WD = well differentiated; MD = moderated differentiated; N = negative; P = positive. *dead (64) = other cause, [†]dead (54) = recur (liver metastasis).

이가 6명중(12.2%) 11개(0.7%)에서 관찰되었으며, 1명은 점막암, 5명은 점막하암이었다. 병기 이동은 3명(6.1%)에게서 있었으며 N0에서 N1은 2명(4.1%), N1에서 N2는 1명(2.0%)이었다. 림프절의 면역화학염색 후 실제 림프절 전이는 점막암에서는 변화가 없었으나 점막하암은 8명(38.1%)으로 증가하여 총 9명에서 림프절 전이가 관찰되었다. 림프관 침습은 5명에서 관찰되었으며 이중 2명은 림프절 전이가 없었다(Table 1).

3) E-cadherin, VEGF-C, VEGF-D의 발현과 임상병리학적 연관성

E-cadherin은 18명의(36.7%) 환자에서 비정상발현 되었다. VEGF-C와 D는 각각 8명(16.3%), 18명(36.7%)에서 발현 되었다. E-cadherin의 비정상 발현은 점막하암, 2 cm 이상의 종양에서 빈도가 높았으나 통계적 유의성은 없었으며 연령, 조직학적 분류, Lauren 분류에서만 유의하였다(P=0.013, P=0.0103, P<0.0001). VEGF-C와 D의 발현은 점막하암에서 빈도가 높았으나 다른 임상병리학적 인자와 같이 통계적으

Table 2. Expression of E-cadherin, VEGF-C and VEGF-D correlation with Clinicopathologic features

Characteristics	E-cadherin		P-value	VEGF-C		P-value	VEGF-D		P-value
	Abnormal	Normal		Positive	Negative		Positive	Negative	
Sex									
Male (n=29)	9 (31.0%)	20 (69.0%)	0.4869	3 (10.3%)	26 (89.7%)	0.3316	9 (31.0%)	20 (69.0%)	0.4869
Female (n=20)	9 (45.0%)	11 (55.0%)		5 (25.0%)	15 (75.0%)		9 (45.0%)	11 (55%)	
Age									
60 < (n=18)	11 (61.1%)	7 (38.9%)	0.013	3 (16.7%)	15 (83.3%)	0.01	6 (33.3%)	12 (66.7%)	0.945
60 ≥ (n=31)	7 (22.6%)	24 (77.4%)		5 (16.1%)	26 (83.9%)		12 (38.7%)	19 (61.3%)	
Hystologic type									
Differentiated (n=34)	8 (23.5%)	26 (76.5%)	0.0103	5 (14.7%)	29 (85.3%)	0.6869	12 (35.3%)	22 (64.7%)	1
Undifferentiated (n=15)	10 (66.7%)	5 (33.3%)		3 (20.0%)	12 (80.0%)		6 (40.0%)	9 (60.0%)	
Lauren classification									
Intestinal (n=32)	6 (18.8%)	26 (81.3%)	<0.0001	5 (15.6%)	27 (84.4%)	0.945	11 (34.4%)	21 (65.6%)	0.596
Mixed (n=2)	2 (100.0%)	0 (0.0%)		0 (0.0%)	2 (100.0%)		1 (50.0%)	1 (50.0%)	
Diffuse (n=15)	10 (66.7%)	5 (33.3%)		3 (20.0%)	12 (80.0%)		6 (40.0%)	9 (60.0%)	
RLNM*									
Positive (n=9)	6 (66.7%)	3 (33.3%)	0.0583	2 (22.2%)	7 (77.8%)	0.6279	5 (55.6%)	4 (44.4%)	0.2587
Negative (n=40)	12 (30%)	28 (70.0%)		6 (15.0%)	34 (85.0%)		13 (32.5%)	27 (67.5%)	
Depth of invasion									
Mucosa invasion (n=28)	7 (25.0%)	21 (75.0%)	0.073	2 (7.1%)	26 (92.9%)	0.06	9 (32.1%)	19 (67.9%)	0.441
Submucosa invasion (n=21)	11 (52.4%)	10 (47.6%)		6 (28.6%)	15 (71.4%)		9 (42.9%)	12 (57.1%)	
Lymphatic invasion									
Positive (n=5)	2 (11.11%)	3 (9.68%)	1	1 (12.50%)	4 (9.76%)	1	2 (11.11%)	3 (9.68%)	1
Negative (n=44)	16 (88.89%)	28 (90.32%)		7 (87.50%)	37 (90.24%)		16 (88.89%)	28 (90.32%)	
Tumor size									
2 cm < (n=22)	6 (27.3%)	16 (72.7%)	0.346	1 (4.5%)	21 (95.5%)	0.0592	8 (36.4%)	14 (63.6%)	1
2 cm ≥ (n=27)	12 (44.4%)	15 (55.6%)		7 (25.9%)	20 (74.1%)		10 (37.0%)	17 (63.0%)	

*RLNM = real extent of lymph node metastases including newly detected LNM using cytokeratin 18.

Table 3. Correlation between lymph node metastases (LNM) and expression of E-cadherin, VEGF C and D

	(+) LNM	(-) LNM	P-value
Abnormal E-cad expression with VEGF-C or D expression	5 (45.5%)	6 (54.5%)	0.031
Abnormal E-cad expression or VEGF-C or D expression	2 (10.5%)	17 (89.5%)	
Normal E-cad expression without VEGF-C and D expression	2 (10.5%)	17 (89.5%)	

로 유의하지 않았다(Table 2).

4) E-cadherin, VEGF-C, VEGF-D의 발현과 림프절 전이

E-cadherin의 이상 발현, VEGF-C 및 D의 발현은 림프절 양성 군에서 음성군에 비해 그 빈도가 높았으나 통계적으로 유의하지 않았다(Table 2). 9명의 림프절 전이 환자 중 5명(55.6%)의 환자가 E-cadherin의 비정상적인 발현이 있으면서 VEGF-D 혹은 VEGF-C의 발현이 관찰되었다(Table 1). E-cadherin의 이상발현이 있으면서 VEGF-C 혹은 VEGF-D 중에서 적어도 하나 이상의 발현이 관찰된 군(n=11), E-cadherin의 정상발현이면서 VEGF-C와 -D가 모두 음성인

군(n=19), 상기 두 군을 제외한 나머지 환자군(VEGF-C 혹은 VEGF-D가 적어도 하나에서 양성이면서 정상적인 E-cadherin 발현군, E-cadherin의 이상 발현이 있으면서 VEGF-C와 VEGF-D 모두 음성인 군) 등으로 3분하였을 때 림프절 전이와 통계적으로 유의하였다(P=0.031)(Table 3).

고 찰

암세포가 전이되기 위해서는 여러 복잡한 과정이 필요하나 우선적으로 상피세포조직 변이의 활성화가 필요하며 이후 신생혈관의 형성이 중요하다. Cadherin은 칼슘의존성 막

전위 당단백으로 E-cadherin (epithelial), P-cadherin (placental), N-cadherin (neural)과 L-CAM (liver) 등의 아형으로 분류된다. E-cadherin은 상피조직의 구성과 유지에 중요한 역할을 하며 발현 소실은 상피세포조직 변이를 유발하여 세포와 세포간의 결합기능의 결함을 초래하고 결국 종양의 침윤과 전이가 유발된다.(10) 이러한 이유로 세포와 세포 간의 중요한 접착분자인 E-cadherin은 종양억제 유전자로 불린다.(4,11) 위암에서 E-cadherin의 이상발현은 병기 및 관독 방법에 따라 차이가 있으나 27~57%로 보고되고 있어,(12-14) 저자들의 36.7%와 유사하였다. 본 연구에서는 Lauren 분류상 17명의 미만형 혹은 혼합형 중 12명(70.6%)이 E-cadherin의 이상발현이 관찰된 반면 32명의 장형 중 6명(18.8%)에서 E-cadherin의 이상발현이 발견되어($P \leq 0.0001$) 다른 연구자들과 유사한 결과를 관찰할 수 있었다.(10,13,15) 이런 연관성을 Blok 등(10)은 E-cadherin의 이상발현은 탈분화에 영향을 주어 종양의 샘형성(glandular formation)을 못하게 하기 때문이라고 설명하였다. 본 연구에서는 E-cadherin의 이상발현과 종양의 침윤 정도(점막암 Vs 점막하암)에서 유의한 차이가 없었는데, E-cadherin의 이상 발현과 종양의 침윤 정도의 연관성에 대해서 Kim 등(15)은 점막암과 점막하암에서 차이가 없었다고 하였고, 양 등(12)은 T2 병변내에서는 차이가 없다고 하였다. Yonemura 등(10)은 E-cadherin의 이상발현은 장막의 침윤 정도에서 차이가 있으며 복막전이와 연관성이 있다 하였고, Chen 등(16)은 조기 위암과 진행성암 사이에서 유의한 차이가 없었으나 주변 장기와의 침습과는 연관성이 있다 하였다.

VEGF-C와 VEGF-D는 VEGFR2와 VEGFR3와 결합하여 혈관 내피세포의 유사분열과 이동을 자극하고, 혈관의 투과성을 증가시키고, 그 중 VEGF-C는 위암세포에서 VEGFR-3와 결합하여 림프관 증식을 유도하고 림프절 전이와 연관이 있는 것으로 알려져 있다.(17) Stacker 등(18)에 의하면 VEGF-D를 293EBNA 세포에 주입해서 배양에서 림프관 전이를 촉진시켰다고 하였다. Yonemura 등(19)은 VEGF-C와 VEGF-D가 VEGFR-3를 발현을 유도하여 위암에서 신생 림프혈관 형성을 한다고 보고하였고, Kabashima 등(20)은 조기위암에서 VEGF-C 발현은 점막과 점막하의 림프관 형성을 유도하여 암세포가 침윤 할 수 있는 기회가 증가한다고 하였다. Ongogawa 등(17)은 점막하암에서 VEGF-C와 -D의 발현은 각각 22.9%, 8.6%라 보고하였고, 김 등(21)은 83예의 점막하암에서 각각 32.5%, 24.0%, Shida 등(22)은 각각 32%, 30%이었다고 보고하여 저자들의 16.3%, 36.7%와 유사하였다. Yonemura 등(8)은 위암에서 VEGF-C 발현이 종양의 침윤도, 림프절 전이와 같이 중요한 예후 인자라 하였고, Tsutsumi 등(23)은 위암의 T2 병변에서 VEGF-C 발현은 림프절 전이와 예후에 매우 중요한 인자라 하였다. Jüttner 등(24)은 VEGF-D의 발현은 위암에서 림프절 전이 및 예후와 연관성이 있다 하였지만 본 연구에서는 대상을 조기위암에

국한하고 모집단 수가 적어 예후와의 연관성을 분석할 수 없었지만 추적 기간 중 E-cadherin의 비정상 발현이 있으면서 VEGF-C의 발현이 동반된 점막하암 1명(증례 11)이 재발하여 사망하였다(Table 1).

앞서 저자들은 100예의 T2 병변에서 E-cadherin의 발현이상을 분석하였을 때 림프절 전이 및 생존율과는 연관성을 찾지 못하였다고 보고한 바 있다.(12) 본 연구에서도 저자들은 E-cadherin의 이상 발현 시 림프절 전이가 66.7%에서 관찰되었으나 통계적으로 유의하지 않았다($P=0.0583$). E-cadherin의 이상 발현에 대해서 Kim 등(15), Wu 등(13)은 조기 위암에서 림프절 전이와 밀접한 관계가 있다 하였으나 Blok 등(10), Chen 등(18)은 림프절 전이와 생존율과의 연관성을 찾는데 실패하였다. Onogawa 등(17)은 VEGF-C의 발현은 림프절 전이와 연관이 있었으나 VEGF-D의 발현과는 연관성이 없다 하였고, Shida 등(22)은 VEGF-C와 VEGF-D의 발현은 림프관 침윤이나 림프절 전이와 연관이 있음을 보고 하였다. Shida 등(25)은 143명의 위암 환자를 분석한 결과 VEGF-D의 발현은 림프절 전이와 연관성이 있으며 다변량 분석에서 생존율을 예측할 수 있는 독립적인 예후인자라 하였다. 반면 Kondo 등(26)은 80명의 조기위암에서 VEGF-C와 VEGF-A의 발현을 분석하였을 때 VEGF-C의 발현과 림프절 전이와의 연관성은 없었으며, Ishikawa 등(9)은 VEGF-C의 발현은 종양의 분화도와 림프관 침습과 연관성이 있으나 림프절 전이와는 무관하며 VEGF-D의 발현은 종양의 분화도, 림프관 침습, 림프절 전이와 연관성이 있다 하였다. 이상과 같은 VEGF-C 및 VEGF-D의 발현과 림프절 전이에 대한 연관성의 차이는 대상군, 실험 방법, 림프절 전이의 정확도에 따라 차이가 있을 것으로 생각되어 저자들은 절제된 림프절을 cytokeratin 18 면역화학염색을 이용하여 재검사하였다. 위암에서 림프절의 미세전이에 대한 정의 및 임상적 중요성에 대해서는 논란의 여지가 있지만, 저자들은 위암에서의 미세전이의 임상적 의미보다는 H&E 염색에서 간과한 림프절 전이를 쉽고 정확하게 파악하고자 면역화학염색을 이용하였고 실제로 6.1%에서 병기 이동이 관찰되었다. Yun 등(4)에 의하면 355명의 위암 환자에서 절제된 림프절을 cytokeratin 18으로 면역화학염색을 통해 재확인한 결과 T1, T2, T3, T4 병변에서 각각 6.7%, 14.8%, 2.4%, 0%의 병기 이동이 있었고 T1, T2 병변에서 생각보다 많은 림프절 전이가 새롭게 발견되었다고 하였다. 저자들은 본 연구에서 면역화학염색을 통해 재검사한 림프절과 VEGF-C 및 VEGF-D의 발현과의 연관성을 찾을 수 없었지만 흥미롭게도 E-cadherin의 비정상 발현이 있으면서 VEGF-C 혹은 VEGF-D 발현이 동반된 경우에 림프절 전이의 빈도가 높은 것을 발견할 수 있었다($P=0.031$). 저자들은 암세포가 전이를 하기 위해서는 단지 종양 내 혹은 주변에 신생 혈관 및 림프관 생성이 있다고 하여 전이가 시작된다고 생각되지 않으며 이를 만족하는 여러 조건이 필요하다고 생각되며

이 중 하나가 E-cadherin이라 추정할 수 있었다. 접착 분자인 E-cadherin의 발현 소실은 세포간의 결합기능의 결함을 초래하고, E-cadherin의 이상 발현이 분화도 및 Lauren 분류와 연관성이 있는 것으로 볼 때 조직의 탈분화 및 상대적으로 분화암에 비해 맥관 분포가 적은 섬유화를 유도하여 신생 림프관의 생성에 더 의존적이기 때문일 것이라고 생각해 볼 수 있다.(9,10) Kondo 등(26)은 VEGF-A의 발현은 종양의 분화도와 맥관침습과 연관성이 있었으며 VEGF-C와 VEGF-A가 동시에 발현된 경우 림프절 전이, 종양의 침윤도, 분화도, 맥관 및 림프관 침습과 밀접한 연관성이 있다 하여 본 연구 결과같이 VEGF-C 발현 자체만으로 림프절 전이가 일어나지 않으며 종양의 탈분화가 동반된 경우 VEGF-C의 발현이 림프절 전이와 강한 연관성이 있다 하였다.

본 연구에서 비록 모집단 수는 적었지만 조기위암에서 E-cadherin의 비정상 발현이 있으면서 VEGF-C 혹은 VEGF-D 발현이 동반된 경우에 림프절 전이의 빈도가 높은 것을 발견할 수 있었다. 향후 E-cadherin, VEGF-C 및 VEGF-D의 발현과 조기위암의 림프절 전이에 대한 예측인자로 활용하기 위한 대단위의 전향적 연구가 필요할 것으로 생각된다

결 론

조기위암 환자에서 E-cadherin의 비정상 발현은 조직학적 분류 및 Lauren 분류와 연관이 있었으나 림프절 전이와는 통계적으로 유의하지 않았다. VEGF-C와 VEGF-D 발현은 림프절 전이를 포함한 임상병리학적 특성과 연관성은 없었다. 조기위암에서 E-cadherin의 비정상발현이 VEGF-C 혹은 VEGF-D 발현과 동반된 경우 림프절 전이와 강한 연관성이 있었다.

REFERENCES

- 2004 nation wide gastric cancer report in Korea. The information community of the Korean Gastric Cancer Association. *J Korea Gastric Cancer Assoc* 2007;7:47-54.
- Ahn JS, Bang HY, Lee JI, Noh WC, Hwang DY, Choi DW, Paik NS, Moon NM, Choi TI. Recurrence of early gastric cancer. *J Korean Surg Soc* 2001;61:491-497.
- Hyung WJ, Cheong JH, Kim J, Chen J, Choi SH, Noh SH. Analyses of prognostic factor and gastric specific survival rate in early gastric cancer patient and its clinical implication. *J Korean Surg Soc* 2003;65:309-315.
- Yun HY, Bandou E, Kawamura T, Kojima N, Itoh I, Kameya T, Yonemura Y. Influence of Micrometastasis on N stage in Gastric Cancer and Clinical Application. *J Exp Clin Cancer Res* 2005;24:531-539.
- Liu YN, Lee WW, Wang CY, Chao TH, Chen Y, Chen JH. Regulatory mechanism controlling human E-cadherin gene expression. *Oncogen* 2005;24:8277-8290.
- Roskoski R Jr. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. *Critical Review in Oncology & Hematology* 2007;62:179-213.
- Li X, Eriksson U. Molecules in focus Novel VEGF family members: VEGF-B, VEGF-C and VEGF-D. *The International Journal of Biochemistry & Cell biology* 2001;33:421-426.
- Yonemura Y, Endo Y, Fujita H, Fushida S, Ninomiya I, Bandou E, Taniguchi K, Miwa K, Ohoyama S, Sugiyama K, Sasaki T. Role of vascular endothelial growth factor C expression in the development of lymph node metastasis in gastric cancer. *Clin Cancer Res* 1999;5:1823-1829.
- Ishikawa M, Kitayama J, Kazama S, Nagawa H. Expression of vascular endothelial growth factor C and D (VEGF-C and -D) is an important risk factor for lymphatic metastasis in undifferentiated early gastric carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 2003;33:21-27.
- Blok P, Craanen ME, Dekker W, Tytgat GN. Loss of E-cadherin expression in early gastric cancer. *Histopathology* 1999;34:410-415.
- Yonemura Y, Endou Y, Kimura K, Fushida S, Bandou E, Taniguchi K, Kinoshita K, Ninomiya I, Sugiyama K, Heizmann CW, Schafer BW, Sasaki T. Inverse expression of S100A4 and E-cadherin is associated with metastatic potential in gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6:4234-4242.
- Yang HY, Koo BU, Yun HY, Ryu DH, Song YJ, Kim SH, Eom SY, Kim H. Expression of E-cadherin in pT2 Lesion of Gastric Cancer. *J Korean Surg Soc* 2006;70:91-97.
- Wu ZY, Li JH, Zhan WH, He YL, Wan J. Expression of E-cadherin in gastric carcinoma and its correlation with lymph node micrometastasis. *World J Gastroenterol* 2005;11:3139-3143.
- Cai J, Ikeguchi M, Tsujitani S, Maeta M, Liu J, Kaibara N. Significant correlation between micrometastasis in the lymph nodes and reduced expression of E-cadherin in early gastric cancer. *Gastric Cancer* 2001;4:66-74.
- Kim DY, Joo JK, Park YK, Ryu SY, Kim HS, Noh BK, Lee KH, Lee JH. E-cadherin expression in early gastric carcinoma and correlation with lymph node metastasis. *J Surg Oncol* 2007;96:429-435.
- Chen HC, Chu RY, Hsu PN, Hsu PI, Lu JY, Lai KH, Tseng HH, Chou NH, Huang MS, Tseng CJ, Hsiao M. Loss of E-cadherin expression correlates with poor differentiation and invasion into adjacent organs in gastric adenocarcinomas. *Cancer Lett* 2003;201:97-106.
- Onogawa S, Kitadai Y, Amioka T, Kodama M, Cho S, Kuroda T, Ochiuimi T, Kimura S, Kuwai T, Tanaka S, Chayama K. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF-D in early gastric carcinoma: correlation with clinicopathological parameters. *Cancer Letters* 2005;226:85-90.
- Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, Thornton GE, Williams

- RA, Prevo R, Jackson DG, Nishikawa S, Kubo H, Achen MG. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat Med* 2001;7:186-191.
19. Yonemura Y, Endo Y, Tabata K, Kawamura T, Yun HY, Bandou E, Sasaki T, Miura M. Role of VEGF-C and VEGF-D in lymphangiogenesis in gastric cancer. *Int J Clin Oncol* 2005;10:318-327.
 20. Kabashima A, Maehara Y, Kakeji Y, Sugimachi K. Overexpression of vascular endothelial growth factor C is related to lymphogenous metastasis in early gastric carcinoma. *Oncology* 2001;60:146-150.
 21. Kim JG, Choi MG, Park WS, Lee SC, Lee DH, You YK, Ahn CJ, Park CH. The expression of vascular endothelial growth factor (VEGF-C) and VEGF-D in early gastric cancer that's invaded the submucosa. *J Korean Surg Soc* 2008;74:48-53.
 22. Shida A, Fujioka S, Kobayashi K, Ishibashi Y, Nimura H, Mitsumori N, Yanaga K. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and -D in gastric carcinoma. *Int J Clin Oncol* 2006;11:38-43.
 23. Tsutsumi S, Kuwano H, Shimura T, Morinaga N, Mochiki E, Asao T. Vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) expression in pT2 gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 2005;52:629-632.
 24. Jüttner S, Wissmann C, Jöns T, Vieth M, Hertel J, Gretschel S, Schlag PM, Kemmner W, Höcker M. Vascular endothelial growth factor-D and its receptor VEGFR-3: two novel independent prognostic markers in gastric adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 2006;24:228-240.
 25. Shida A, Fujioka S, Ishibashi Y, Kobayashi K, Nimura H, Mitsumori N, Suzuki Y, Kawakami M, Urashima M, Yanaga K. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor D in gastric carcinoma. *World J Surg* 2005;29:1600-1607.
 26. Kondo K, Kaneko T, Baba M, Konno H. VEGF-C and VEGF-A synergistically enhance lymph node metastasis of gastric cancer. *Biol Pharm Bull* 2007;30:633-637.

= Abstract =

The Correlation between the Expression of E-cadherin, VEGF-C, VEGF-D and the Real Extent of Lymph Node Metastases using Cytokeratin 18 in Early Gastric Cancer

Dae Hoon Kim, M.D., Hyo Yung Yun, M.D., Young Jin Song, M.D., Dong Hee Ryu, M.D., In Choel Min, M.D., Rohyun Sung, M.D.¹ and Sang Eok Lee, M.D.²

Departments of Surgery, ¹Pathology, Chungbuk National University College of Medicine, Cheongju, ²Gastric Cancer Branch, Research Institute and Hospital, National Cancer Center, Seoul, Korea

Purpose: VEGF-C and VEGF-D are angiogenetic factors, and abnormal expression of E-cadherin has a role in the progression of gastric carcinoma. The aim of this study was to evaluate the relationship between the expression of E-cadherin, VEGF-C and VEGF-D with the presence of lymph node metastases (LNM) using cytokeratin 18 in early gastric cancer (EGC).

Materials and Methods: Immunohistochemical staining for E-cadherin, VEGF-C and VEGF-D was performed in 49 EGC patients from March 1997 to December 2002. To evaluate the real extent of LNM, 1,562 lymph nodes from 49 patients were re-examined with the use of cytokeratin 18.

Results: Eleven (0.7%) LNM were newly found in 12.2% (n=6) of patients. The real LNM rate was 3.6% in mucosal invasive (m) cancer and 38.1% in submucosal invasive (sm). Stage migration was seen in three patients (6.1%). Abnormal expression of E-cadherin was detected in 36.7% of the patients and expression of VEGF-C and VEGF-D was detected in 16.3% and 36.7% of the patients, respectively. Abnormal expression of E-cadherin was significantly correlated with tumor differentiation (P=0.0103) and Lauren classification (P<0.0001). There was no positive relationship of VEGF-C and VEGF-D expression with the clinicopathological findings for EGC including LNM. However, the frequency of lymph node metastases was significantly higher in patients that demonstrated abnormal expression of E-cadherin with positive immunoreactivity of VEGF-C or VEGF-D (P=0.031).

Conclusion: In present study, we could not demonstrate a relationship between the presence of LNM and expression of VEGF-C and VEGF-D in EGC. However, VEGF-C or VEGF-D expression, in addition to the abnormal expression of E-cadherin, was correlated with the real extent of LNM in EGC. (**J Korean Gastric Cancer Assoc 2008;8:70-78**)

Key Words: E-cadherin, VEGF-C, VEGF-D, Lymph node metastasis, Early gastric cancer