

유두상 갑상선암에서 VEGF, HIF-1 α , E-cadherin, p53의 발현과 병기의 관련성 연구

김종삼¹, 나백주^{2*}, 이무식², 김철웅², 정계림³
¹건양대학교 보건복지대학원 보건학과, ²건양대학교 의과대학 예방의학교실,
³건양대학교 일반대학원 보건학과

Relationship between the Expression of VEGF, HIF-1 α , E-cadherin, p53 and Stage in Papillary Thyroid Carcinoma

Jong-Sam Kim¹, Baeg-Ju Na^{2*}, Moo-Sik Lee², Chul-Woung Kim²
and Gye-Rim Jeong³

¹Department of Public Health, The Graduate School of Public Health and Welfare Konyang
University,

²Department of Preventive Medicine, College of Medicine, Konyang University,

³Department of Public Health, The Graduate School of Konyang University

요약 이 연구는 갑상샘 유두암 환자에서 VEGF, HIF-1 α , E-cadherin, p53의 발현 정도와 병기와의 상관관계를 알아보고자 하였다. 2000년부터 2007년까지 갑상샘 절제술을 시행받은 101명의 환자의 의무기록을 후향적으로 검토하였다. VEGF, HIF-1 α , E-cadherin, p53의 발현은 면역화학적으로 조사되었다. 갑상샘 유두암으로 진단된 45세 이상의 환자 중 54명을 대상으로 하여 VEGF, HIF-1 α , E-cadherin, p53의 발현이 분석되었다. E-cadherin의 발현소실과 병기 사이에는 유의한 상관관계가 있었다. VEGF의 발현과 HIF-1 α 의 과발현 사이에는 유의한 관련성이 관찰되었다($p < 0.05$). E-cadherin의 발현소실은 통계적인 유의성은 없었다. HIF-1 α 의 높은 발현이 HIF-VEGF 경로를 통해 종양간 맥관형성과 관련된 것으로 여겨진다.

Abstract The purpose of our study was to evaluate the correlation between expression of VEGF, HIF-1 α , E-cadherin, and p53 and pathologic stage. We retrospectively reviewed the medical records of the 101 patients who underwent surgery of thyroid nodules from 2000 to 2007. Expression of VEGF, HIF-1 α , E-cadherin, and p53 were examined immunohistochemically. Papillary thyroid carcinoma in this study included 54 cases of more than 45 years old. Each expression of VEGF, HIF-1 α , E-cadherin, and p53 was analysed. Only expression loss of E-cadherin was associated with the stage. High HIF-1 expression was significantly associated with VEGF immunoreactivity ($p < 0.05$). Expression loss of E-cadherin was independent unfavorable factors. It is suggested that high HIF-1 α expression may be associated with intratumoral neovascularization possibly through HIF-VEGF pathway.

Key Words : Papillary Thyroid Carcinoma, VEGF, HIF-1 α , E-Cadherin, p53

1. 서론

갑상샘암(thyroid cancer)은 내분비암 중에서 발생 빈도가 가장 높은 질환으로, 미국에서는 매년 10만명당 8명

의 환자가 진단을 받고 약 10만명당 0.5명이 질환 자체로 사망한다. 국내에서는 갑상샘암의 빈도가 악성 종양 중 6번째이고, 여성에서는 4번째이다[1]. 최근 초음파, 세침흡인세포검사 등의 진단법의 발달로 진단율과 수술의 빈도

*교신저자 : 나백주(skqw@konyang.ac.kr)

접수일 09년 07월 16일

수정일 (1차 09년 12월 09일, 2차 10년 01월 07일)

게재확정일 10년 03월 18일

가 증가하고 있다[2,3].

갑상샘암은 조직병리학적 소견에 따라 크게 유두암(papillary carcinoma), 소포암(follicular carcinoma), 수질암(medullary carcinoma), 역형성암(anaplastic carcinoma) 등으로 구분된다. 그 중 유두암이 가장 흔히 발견되며, 75-85%의 빈도를 나타낸다[4]. 갑상샘의 유두암은 예후가 비교적 좋지만, 주변 림프절로 전이를 잘하는 것으로 알려져 있고 경부림프절로의 전이는 20~50% 정도의 환자에서 발견되는 것으로 보고된다[5]. 그리고 잘 분화된 갑상샘암 환자의 약 9-18%에서 원격 전이가 나타나는 것으로 보고된다[6].

종양의 성장과 전이에 있어서 맥관 형성이 매우 큰 역할을 한다. 종양이 성장하기 위해서는 새로운 미세혈관의 증식이 촉진되어야 하고, 이런 종양 내의 신생혈관은 종양세포가 체순환계로 들어가 원격전이를 일으키는 역할을 하고 있다. 신생혈관 생성에 있어서 종양세포에서 분비되는 여러 맥관형성 인자가 관여하는데, 이 중에 VEGF(Vascular Endothelial Cell Growth Factor: 혈관내피세포성장인자)는 내피세포에 특이적인 유사분열 촉진제로서 내피세포의 증식과 이동, 세포의 기질의 재형성, 모세혈관의 형성과 같은 혈관 신생을 일으키는데 관여한다[2][3]. VEGF는 정상 세포와 형질전환(transformation)된 세포에서 합성되는데, 이는 심장혈관계의 발생, 정상 혈관계의 생리적 현상 및 류마티스성 관절염이나 암 등에서 신생혈관 생성에 중요한 역할을 한다[6]. 암세포의 성장과정에서 암세포는 과다분열의 결과 국지적인 저산소 상태를 유발하게 되고 이 과정에서 HIF-1α(hypoxia inducible factor-1α)가 활성화된다. HIF-1α는 신혈관 생성을 촉진시켜 산소공급을 원활히 할 뿐만 아니라 암세포의 전이에도 관여한다. 돌연변이에 의한 HIF-1α의 불활성화는 암 성장 및 신혈관 생성의 억제와 직접적으로 관련 있다고 보고된다[7].

E-cadherin은 세포표면의 당단백으로서 상동형태학적 칼슘의존성의 세포간 접착물질로 작용하고 배아발생, 형태학적 발달, 그리고 정상구조의 기능 유지에 중요한 역할을 한다. 만일 E-cadherin의 기능에 이상이 발생할 경우 형질변환을 일으킨 종양세포가 주변조직으로 침윤을 일으키게 된다[8].

p53은 손상된 DNA를 수복하고 세포성장을 조절하는 기능 이외에도 세포분화와 세포자멸사에도 관여하는 중요한 종양억제 유전자이다[9]. 이 유전자가 소실되거나 변이가 일어나면 종양억제 기능을 잃어, 결국 종양 형성에 영향을 끼치게 된다. 실제로 p53 유전자의 변이는 여러 종양에서 가장 흔하게 발견되며, 여러 연구를 통하여 이들이 종양의 발생기전에 중요한 역할을 하는 것을 보

여준다.

본 논문에서 갑상샘 유두암 환자에서 VEGF, HIF-1α, E-cadherin, p53의 발현 정도와 병기와 상관관계를 비교하여 VEGF, HIF-1α, E-cadherin, p53의 예후인자로서의 가치를 알아보고자 하였다.

2. 방법

2.1 대상

대전 일개 대학병원에서 2000년부터 2007년까지 갑상샘 전절제술, 아전절제술, 일엽절제술을 시행받고 갑상샘 유두암으로 진단된 45세 이상의 환자 중 파라핀 포매조직의 보관 상태가 양호한 54명을 대상으로 한다.

2.2 임상 및 조직학적 검색

연구 대상 환자의 임상 기록과 병리 검사결과 보고지들을 재검토하여 환자의 연령, 종양의 크기, 림프절 전이 유무, 병기를 조사한다.

2.3 Tissue microarray(TMA)를 제작

103명 환자의 수술한 조직 H&E slide를 재검토하여 종양이 있는 슬라이드 중에서 대표적인 부분을 골라 펜을 이용하여 5 mm 직경의 원을 그린다. 이 부분을 Bee-Cher arrayer를 사용하여 punching한다. Punched tissue를 recipient block에 넣어 다시 포매한다.

2.4 면역조직화학 염색

Tissue microarray 종양 조직을 사용하여 통상적인 면역조직화학 염색을 시행한다. 일차 항체는 VEGF(Zymed, San Francisco, USA), HIF-1α (Dakocytomation, Glostrup, Denmark), E-cadherin(Dakocytomation, Glostrup, Denmark), p53(Dakocytomation, Glostrup, Denmark)을 사용한다.

면역조직화학염색을 위하여 80°C 오븐에서 1시간 건조시킨 다음, xylene으로 실온에서 2분간 4회 탈파라핀화하였다. 100% 알코올로 10초간 3회 처리하고, 10% citrate buffer에 담가 120°C의 고압멸균기에서 15분간 가열한 후 실온에서 20분간 방치하였다. 45°C의 세척 완충액으로 3분씩 3회 세척하고 조직내의 내인성 과산화효소를 제거하기 위하여 3% 과산화수소수에 실온에서 5분간 반응시켰다. 이어서 세척 완충액으로 3회 수세하였다. 실온에서 각각의 일차항체와 60분간 반응시킨 후, 세척 완충액으로 3회 수세하였다. 이후 Envision kit(Dakocytomation,

Glostrup, Denmark)를 이용하여 이차 항체를 10분간 반응시킨 후 세척 완충액으로 3회 수세하고, 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride를 이용하여 3분간 도포하여 발색시키고 Meyer's hematoxylin으로 대조 염색한 후 광학 현미경으로 관찰하였다. VEGF, E-cadherin은 세포질에 갈색으로 염색되면 양성으로 판정하고, HIF-1 α , p53은 핵에 갈색으로 염색되면 양성으로 판정하였다. 면역조직화학염색의 결과 평가는 고배율 시야(X400)에서 5 시야를 검경하여 전체종양 세포 수에 대한 양성 종양 세포 수를 백분율로 표시하였다. 종양세포의 10% 이상에서 발현이 되는 경우를 양성으로 판정하였다.

2.5 통계학적 분석

통계학적 분석은 Window용 SPSS version 14.0(SPSS Inc., Chicago, U.S.A.)프로그램을 이용하여 chi-square test로 각 단백질의 발현 유무와 예후인자와의 관련성을 검정한다.

3. 결과

3.1 임상병리학적 특징

총 54예의 유두상 암종에서 남자가 3명, 여자가 51명으로 남녀비는 1 : 17이었고, 연령층은 45세에서 73세로 다양하였으며 평균연령은 54.5세였다.

종양의 크기는 2 mm부터 80 mm까지 측정되었다. 병기 I기는 7예, 병기 II기는 2예, 병기 III기는 45예였다. 종양의 주변조직으로 침윤여부를 조사한 결과 45예에서 주변조직으로의 침윤을 보였다. 주변 림프절 전이는 18예에서 림프절 전이를 보였다.

54예에서 VEGF의 발현은 35예(64.8%)에서 관찰되었고 병기 I기에서는 5예(71.4%), 병기 II+III기에서는 30예(63.8%)에서 양성을 보였다. VEGF 발현과 병기 사이에는 유의한 관계가 관찰되지 않았다($P>0.05$). HIF-1 α 의 과발현은 22예(40.7%)에서 관찰되었고 병기 I기에서는 4예(57.1%), 병기 II+III기에서는 18예(38.3%)에서 양성을 보였다. HIF-1 α 과발현과 병기 사이에서도 유의한 관계가 관찰되지 않았다($P>0.05$). E-cadherin의 발현은 13예(24.1%)에서 관찰되었고 병기 I기에서는 4예(57.1%), 병기 II+III기에서는 9예(19.0%)에서 양성을 보여, 병기가 높을 수록 발현이 감소되는 결과를 보여주었다. E-cadherin의 발현소실과 병기 사이에는 유의한 관계가 있었다($P<0.05$). p53 발현은 27예(50.9%)에서 관찰되었고 병기 I기에서는 3예(42.9%), 병기 II+III기에서는 24예

(52.2%)에서 양성을 보였다. p53 발현과 병기 사이에는 유의한 관계가 관찰되지 않았다($P>0.05$). 종양의 TNM 병기와 VEGF, HIF-1 α , E-cadherin, p53의 면역조직화학염색 결과의 관련성을 살펴본 결과 E-cadherin에서만 유의성이 관찰되었다[표 1].

【표 1】 Relationship between Expression of VEGF, HIF-1 α , E-cadherin, p53과 병기와의 관계

	병기		p값	
	I	II+III		
VEGF	-	2 (28.6%)	17 (36.2%)	p=0.526
	+	5 (71.4%)	30 (63.8%)	
HIF-1 α	-	3 (42.9%)	29 (61.7%)	p=0.293
	+	4 (57.1%)	18 (38.3%)	
E-cadherin	-	3 (42.9%)	38 (80.9%)	p=0.049
	+	4 (57.1%)	9 (19.1%)	
p53	-	4 (57.1%)	22 (47.8%)	p=0.478
	+	3 (42.9%)	24 (52.2%)	

본 연구에서 VEGF의 발현과 HIF-1 α 의 과발현 사이에는 유의한 관계가 관찰되었고($P<0.01$) [표 2], HIF-1 α 의 발현과 E-cadherin의 발현사이에서도 연관성은 있었지만 통계적인 유의성은 없었다($P>0.05$).

【표 2】 Expression of VEGF와 HIF-1 α 의 발현 관계

	VEGF		
	-	+	
HIF-1 α	-	16 (84.2%)	16 (45.7%)
	+	3 (15.8%)	19 (54.3%)

($p<0.01$)

4. 고찰

종양의 성장과 전이에 있어서 맥관 형성이 매우 중요한 역할을 한다. 일반적으로 저산소증에 빠진 세포는 erythropoietin, glucose transporters, glycolytic pathway enzymes, VEGF, transferrin, heme oxygenase, inducible nitric oxide synthase 등과 같은 다양한 단백질 발현을 통해 적응하게 되는데, 이들 단백질 발현과 관계되는 유전자들 중 다수는 암에서도 활성화되는 것으로 알려져 있다 [10]. 많은 종양 조직의 내부에는 저산소증의 부위가 존재하는 것으로 알려져 있으며, 이러한 종양 내 저산소증의 범위는 예후에도 영향을 줄 수 있다[11]. 종양이 성장하기 위해서는 새로운 미세혈관의 증식이 필요하고, 종

양내에서 이러한 신생혈관은 종양세포가 체순환계로 들어가 원격전이를 일으키는데 한몫을 담당한다[12]. 맥관형성을 유발하는 인자 중에 가장 강력하고 중요한 것 중의 하나가 VEGF이다. 이중 VEGF-C는 종양세포에서 미세혈관의 투과성을 증가시키고, 혈관내피세포의 증식을 촉진시켜 맥관형성에 중요한 역할을 한다. Bunone 등[13]은 국소 림프절에 전이가 있는 갑상샘암에서 VEGF-C의 발현이 증가함을 보고 하였고, 이를 통해 맥관형성 인자가 종양의 성장과 악화를 반영하는 인자임을 발표하였다.

저산소증 상태에서 맥관형성의 유도과 같은 세포적응의 과정에는 HIF-1 단백질이 중요한 역할을 한다. 세포의 산소분압이 떨어지면 HIF-1 유전자의 발현, mRNA의 전사와 단백질 합성 증가가 일어난다[14]. 이러한 이유로 HIF-1 단백질의 세포 내 농도는 조직내 저산소증의 간접적인 지표로 이용할 수 있다. 종양세포의 높은 증식능은 산소와 에너지대사의 증가를 요구하며, 그 결과로써 HIF 경로가 활성화되고 신생혈관이 생성되어 산소의 공급이 증가한다. 또 HIF-1에 의하여 조절되는 유전자의 활성화는 최근 Semenza[15]는 HIF-1 단백질이 종양의 진행에 기여할 수 있다고 한다.

암종의 침윤성과 전이성은 세포간 또는 세포와 기질의 상호 작용에 의하여 발생된다. 세포표면의 당단백질인 E-cadherin은 상피세포에서 특이적으로 발견되며 세포간 결합을 매개한다. Naito 등[16]은 갑상샘 유두암종에서 E-cadherin의 발현이 정상 갑상샘조직이나 소포암종보다 낮게 나타난다고 하였다.

갑상샘의 미분화암종에서는 p53 유전자의 변이에 의한 p53 단백질의 과발현이 일관성 있게 나타나지만, 유두암종이나 소포암종과 같이 분화가 좋은 갑상샘암종에서는 p53의 발현이 아주 낮은 것으로 되어 있어, 0-26% 정도의 양성률이 보고되고 있다[17].

본 연구에서는 HIF-1 α 의 과발현은 VEGF의 발현과 유의한 관계가 있음을 보여 주었다. 갑상샘암에서 HIF-1 α 와 VEGF의 관계를 밝힌 논문은 아직 없지만, 조성래 등은 폐의 비소세포성 폐암에서 HIF-1 α 의 과발현과 VEGF의 발현이 유의한 관계가 있음을 보여주었다. 이는 저산소증의 미세환경에서 신생혈관의 생성으로 산소와 에너지의 공급을 통한 세포적응을 시사한다고 할 수 있다. 그리고, HIF-1 α 의 과발현과 E-cadherin의 발현에도 연관성은 있었지만 통계적인 유의성은 없었다. 하지만 HIF-1 α 와 E-cadherin의 관계에 대해 발표한 논문이 아직 없고 본 연구의 대상군이 적었기 때문에 이를 토대로 더욱 많은 대상군에 적용한다면 좀 더 유의성 있는 결과를 얻을 수 있을 것 같다.

종양의 병기와 VEGF, HIF-1 α , E-cadherin, p53의 상관

성을 살펴본 결과 E-cadherin에서만 유의성이 관찰되었다. 대상군을 더 많이 선정하고 지속적인 추적관찰을 하면 갑상샘암의 병기와 VEGF, HIF-1 α , p53 발현과의 관계가 좀더 유의한 차이가 있을 것으로 생각된다.

5. 결론

본 연구에서는 HIF-1 α 의 과발현은 VEGF의 발현과 유의한 관계가 있음을 보여 주었다. 그리고, HIF-1 α 의 과발현과 E-cadherin의 발현 사이에도 연관성은 있었지만 통계적인 유의성은 없었다. 종양의 병기와 VEGF, HIF-1 α , E-cadherin, p53의 관련성을 살펴본 결과 E-cadherin에서만 유의성이 관찰되었다.

참고문헌

- [1] Haigh PI, Urbach DR, Rotstein LE "Extent of thyroidectomy is not a major determinant of survival in low-or high-risk papillary thyroid cancer", *Ann Surg Oncol*, pp. 12:8189, 2005.
- [2] Park HL, Kwak JY, Kang SS, Kim DY, Kang HG, Shim JY, et al. "The analysis of tumor aggressiveness according to tumor size in occult papillary thyroid carcinoma", *J Korean Surg Soc*, pp. 73:470-75, 2007.
- [3] Basic N, Pilko G, Petric R, Hocevar M, Zgajnar, "J. Papillary thyroid microcarcinoma: prognostic factors and treatment", *J Surg Oncol*, pp. 97:221-5, 2008.
- [4] Bilimoria KY, Bentrem DJ, Ko CY, et al. "Extent of surgery affects survival for papillary thyroid cancer", *Ann Surg*, pp. 246(3):375384, 2007.
- [5] Hedinger C, Williams ED, Sobin LH, "The WHO histological classification of thyroid tumors", a commentary on the second edition *Cancer*, pp. 63:908-11, 1989..
- [6] Folkman J, Shing Y, "Angiogenesis" *J Biol Chem*, pp. 267:10931-4, 1992.
- [7] Bos R, van Diest PJ, de Jong JS, van der Groep P, van der Valk P, van der Wall E, "Hypoxia-inducible factor-1 α is associated with angiogenesis, and expression of bFGF, PDGF-BB, and EGFR in invasive breast cancer", *Histopathology*, pp. 46:31-6, 2005.
- [8] Pignattelli M, Ansari TW, Gunter P, "Loss of

membranous E-cadherin expression in pancreatic cancer correlation with lymph node metastasis, high grade, and advanced stage", J Pathol, pp .174:243-48, 1994.

- [9] Dobashi Y, Sakamoto A, Sugimora H, et al, "Overexpression of p53 as a possible prognostic factor in human thyroid carcinoma", Am J Surg Pathol, pp. 17:375-81, 1993.
- [10] Norrby K, "Angiogenesis: new aspects relating to its initiation and control", APMIS, pp. 105:417-37, 1997.
- [11] Tokunga T, Oshika Y, Abe Y, Ozeki Y, Sadshiro S, Kijima H, et al, "Vascular endothelial growth factor mRNA isoform expression pattern is correlate with liver metastases and poor prognosis in colon cancer", Br J Cancer, pp. 77:998-1002, 1998.
- [12] Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, et al, "Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDG", Science, pp. 246:1309-12, 1989.
- [13] Bunone G, Vigneri P, Mariani L, Buto S, Collini P, Pilotti S, et al, "Expression of angiogenesis stimulators and inhibitors in human thyroid tumors and correlation with clinical pathological features", Am J Pathol, pp. 155:1967-76, 1999.
- [14] Yu AY, Frid MG, Shimoda LA, Wiener CM, Stenmark K, Semenza GL, "Temporal, spatial, and oxygen-regulated expression of HIF-1 in the lung", Am J Physiol, pp. 275:L818-26, 1998.
- [15] Semenza GL, Jiang BH, Leung SW, et al, "Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for HIF- 1", J Biol Chem, pp. 271:32529-37, 1996.
- [16] Naito A, Iwase H, Kuzushima T, Nakamura T, Kobayashis, " Clinical significance of E-cadherin expression in thyroid neoplasm", Surg Oncol, pp. 76(3):176-80, 2001.
- [17] Ito T, Seyama T, Mizuno T, et al, "Unique association of p53 mutations with undifferentiated but not with differentiated carcinomas of the thyroid gland",. Cancer Res, pp. 52:1369-71, 1992.

김 종 삼(Jong-Sam Kim)

[정회원]



- 2007년 3월 ~ 2009년 2월 : 건양대학교 보건학 석사
- 2000년 11월 ~ 현재 : 건양대학 병원 병리과 임상병리사

<관심분야>
보건의료, 예방의학.

이 무 식(Moo-Sik Lee)

[정회원]



- 1992년 3월 ~ 1994년 2월 : 계명대학교 의과대학 의학석사
- 1994년 3월 ~ 1999년 2월 : 계명대학교 의과대학 의학박사
- 1995년 3월 ~ 1998년 4월 : 육군본부 의무감실군의학관(육군대위)
- 1999년 3월 ~ 현재 : 건양대학교 의과대학 부교수
- 2008년 10월 ~ 현재 : 건양대학교 임상시험센터 소장
- 2009년 3월 ~ 현재 : 건양대학교 보건복지대학원 부원장

<관심분야>
예방의학, 보건의료정책, 산업의학, 노인의학

나 백 주(Baeg-Ju Na)

[정회원]



- 1996년 3월 ~ 1998년 2월 : 전남대학교 의학석사
- 1998년 3월 ~ 2004년 2월 : 전남대학교 의학박사
- 1998년 4월 ~ 2001년 4월 : 국군군의학교교리장교
- 2001년 4월 ~ 2002년 2월 : 한 국보건산업진흥원 책임연구원
- 2002년 3월 ~ 현재 : 건양대학교 의과대학 부교수

<관심분야>
예방의학, 보건의료, 군진의학, 보건의료정책, 역학

김 철 웅(Chul-Woung Kim)

[정회원]



- 1996년 3월 ~ 1998년 2월 : 서울대학교석사
- 2000년 3월 ~ 2005년 2월 : 서울대학교박사
- 1999년 4월 ~ 2001년 4월 : 한국보건사회연구원연구원
- 2002년 5월 ~ 2007년 2월 : 한국보건산업진흥원 지역보건사업팀장
- 2007년 3월 ~ 현재 : 건양대학교 의과대학학 조교수

<관심분야>

예방의학, 보건의료, 건강형평성, 보건의료정책

정 계 림(Gye-rim Jeong)

[정회원]



- 1990년 2월 : 우석대학교 약학과 (약학사)
- 2005년 2월 : 건양대학교 사회복지행정대학원 사회복지행정학과 (행정학석사)
- 2007년 3월 ~ 현재 : 건양대학교 보건학과 박사과정

<관심분야>

보건의료, 병원관리,