

설암에서 신부가화학요법후 미세혈관밀도에 대한 종양관련 대식세포의 역할

박봉욱 · 정인교* · 김종렬* · 김육규* · 박봉수** · 김규천** · 변준호

경상대학교 의과대학 치과학교실, 경상대학교 건강과학연구원, 경상대학교 생명과학연구원,
*부산대학교 치과대학 구강악안면외과학교실, **부산대학교 치과대학 구강해부학교실

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2006;32:209-215)

THE ROLE OF TUMOR-ASSOCIATED MACROPHAGES ON MICROVESSEL DENSITY AFTER NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY IN TONGUE CANCER

Bong-Wook Park, In-Kyo Chung*, Jong-Ryoul Kim*, Uk-Kyu Kim*, Bong-Soo Park**,
Gyoo-Cheon Kim**, June-Ho Byun

*Department of Dentistry, College of Medicine and Institute of Health Science, Research Institute of Life Science,
Gyeongsang National University*

**Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Pusan National University*

***Department of Oral Anatomy, College of Dentistry, Pusan National University*

Preoperative neoadjuvant chemotherapy using cisplatin and 5-FU is generally given in oral and maxillofacial cancer. At tissue level both inflammation and fibrosis occur after chemotherapy. The cellular changes mimic those of a granulating wound, with activated macrophages and fibroblasts replacing the malignant cells as they are eradicated. Stromal cells, together with extracellular matrix components, provide the microenvironment that is pivotal for tumor cell growth, invasion, and metastatic progression. Vascular endothelial growth factor(VEGF), an important regulator of angiogenesis in cancer, induces mitogenesis of vascular endothelial cells, and vascular permeabilization and microvessel formation in a tumor are associated with tumor nutrition and oxygenation. Also, they are associated with chemotherapeutic drug delivery. Oxygen delivery to tumor appears to rely on a network of microvessels, On the other hand, the tumor microvessel is clearly an important factor in chemotherapeutic drug delivery to cancer cells, and the efficacy of drug delivery can be high in richly vascularized tumors. So, this study was conducted to evaluate the effect of neoadjuvant chemotherapy on microvessel density from 11 patients with tongue cancers. Our results showed that neoadjuvant chemotherapy was seemed to decrease VEGF expression in tumor cells, however, it did not significantly alter VEGF expression in tumor-associated macrophages. Also, Neoadjuvant chemotherapy had little effect on the microvessel density using CD34, and tumor-associated macrophage level using CD68. Thus, tumor-associated macrophages seem to be the key factor associated with the maintenance of microvessel density after neoadjuvant chemotherapy in tongue cancer.

Key words: Neoadjuvant chemotherapy, Vascular endothelial growth factor (VEGF), Microvessel density, Tumor-associated macrophage

I. 서 론

생존율의 면에서는 많은 논란이 있지만 미세전이를 예방하고 외과적 혹은 방사선에 의한 종양의 치료효과를 증가시키기 위해 cisplatin과 5-fluorouracil를 이용한 신부가화학요법(neoadjuvant chemotherapy)이 두경부종양의 치료에 흔히 이용된다. 신부가화학요법은 방사선 치료나 외과적 절제술과 같은 결정적

인 치료에 앞서 시행되므로 이에 의한 종양 혈관의 손상없이 적절한 약물 공급을 제공할 수 있어 효과적인 치료결과를 산출할 수 있다. 종양세포와 같이 빠른 분화를 나타내는 세포는 항암요법에 민감하므로 이러한 항암요법의 이상적인 반응은 종양세포의 분열활성감소 및 종양세포자멸사를 나타내어 조직학적으로는 염증과 섬유화를 형성하는 것으로 이를 통해 대식세포와 섬유모세포 등의 간질조직 세포들의 유입이 증가하게 된다¹⁻³⁾.

종양의 주요한 구성성분으로, 일부 종양에서는 수적으로 종양세포를 능가하는 간질조직 세포들은 종양세포와의 상호작용으로 혈관신생을 포함하여 종양의 생물학적인 면에서 중요한 역할을 한다. 종양환경에서의 간질조직은 그에 대응하는 비종양조직에서의 간질조직과 본질적으로 다르며 변형된 세포외기질 분포, 증가된 미세혈관밀도, 그리고 염증세포와 섬유

변준호

660-702 경상남도 진주시 칠암동 90번지
경상대학교 의과대학 치과학교실

June-Ho Byun

Dept. of OMFS, College of Medicine, Gyeongsang National University.
90 Chilam-dong, Jinju-city, Gyeongsangnam-do, 660-702, South Korea
Tel: 82-55-750-8264 Fax: 82-55-761-7024
E-mail: surbyun@nongae.gsnu.ac.kr

유모세포등 간질세포들의 활성화 표현형(activated phenotype)을 특징적으로 나타낸다. 이러한 간질조직 세포중 대식세포는 tissue-type plasminogen activator와 urokinase-type plasminogen activator등의 세포외기질 분해효소의 분비를 통해 혈관내피세포의 이동에 관여하며 혈관내피세포성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)를 포함한 다양한 혈관신생인자를 분비하여 종양의 혈관신생에서 중요한 역할을 한다⁴⁶⁾.

혈관신생이란 기존에 존재하는 혈관망에서 새로운 혈관이 형성되는 것으로 이에 다양한 혈관신생인자가 관여하나 혈관투과성에 있어서 히스타민보다 약 5만배 더 강력한 기능을 나타내어 혈관투과인자(vascular permeability factor, VPF)로도 불리는 혈관내피세포성장인자가 종양의 성장과 전이에 관여하는 가장 강력한 혈관신생인자중 하나이다⁷⁾. 종양세포 및 종양 간질조직의 다양한 세포들에서 발견되는 혈관내피세포성장인자는 혈관내피세포에 특이적으로 작용하는 유사분열촉진제로 신생혈관의 성장, 분화, 그리고 성숙 등의 단계를 거쳐 결론적으로 미세혈관밀도(microvessel density)의 증가를 가져와 직접적으로 종양의 성장에 기여할 뿐 아니라 미세혈관의 투과성을 증가시키는 혈관투과인자로서의 역할을 통하여 간접적으로도 이에 기여한다. 혈관내피세포성장인자의 혈관투과인자로서의 기능은 섬유소원과 같은 혈장단백질이 혈관의 유출되어 국소적 응고기전을 통하여 섬유소 응괴가 형성되는 것으로, 이는 종양세포 및 혈관내피세포의 성장을 위한 기질을 제공할 뿐 아니라 대식세포와 섬유모세포 등 간질조직 세포들의 유입을 유도한다. 유입된 간질조직 세포들은 proteoglycan과 glycosaminoglycan 등의 기저물질을 분비하여 성숙한 종양간질을 형성하게 하며 기질 금속단백분해효소(matrix metalloproteinase) 등의 세포외기질 분해효소의 분비에도 관여한다. 혈관내피세포성장인자의 이러한 혈관투과인자로서의 기능 또한 종양세포뿐 아니라 간질조직 세포들과 밀접한 관계를 가지며 종양의 성장, 침습 및 전이에 많은 영향을 미치게 되는 것이다⁸⁾.

혈관내피세포성장인자 발현에 대한 항암요법의 효과에 대해서는 아직 정확한 기전이 알려져 있지 않으며 여러 문헌에서 상반된 결과가 보고 되고 있다^{8,10)}. 일반적으로 산소 및 영양소 공급에 주된 역할을 하는 혈관내피세포성장인자를 미세혈관의 형성은 종양의 성장과 전이에 중요하지만 이는 또한 항암제에 의한 약물 전달 효과에도 중요하게 작용하여 미세혈관 밀도가 높을 경우 외과적 치료보다 항암방사선치료가 효과적일 수도 있다.

최소한의 침습양상을 보이는 편평상피세포암일지라도 특히 잘 발달된 혈관분포를 가지는 혀에 존재할 경우 대부분 근치적 절제술로 치료를 하지만 그 치료 및 예후가 불량하여 국소적 재발 혹은 원격전이 등으로 생명에 위협을 초래하는 경우가 많은 관계로, 분자학적 접근법을 포함하여 다양한 연구가 설암에서 진행되고 있으며 혈관내피세포성장인자의 발현 또한 보고되고 있다. 그러나 설암 환자에서도 흔히 실시되는 신부가화학요법에 대하여 이에 따른 혈관내피세포성장인자 발

현 및 미세혈관밀도의 변화에 대해서는 거의 알려진 것이 없다. 그리하여 본 연구에서는 조직검사를 통하여 설암으로 진단받고 cisplatin과 5-fluorouracil을 이용한 신부가화학요법을 적어도 1회 이상 실시한 후, 근치적 절제술을 실시한 11명의 환자들에서 조직표본을 획득하여 신부가화학요법에 따른 혈관내피세포성장인자 발현의 변화와 미세혈관밀도의 변화를 관찰하고자 한다. 또한 다양한 혈관신생인자를 산생한다고 알려져 있으며 혈관내피세포성장인자 및 항암요법과 밀접한 관련이 있는 간질조직의 종양관련 대식세포(tumor-associated macrophages) 수준의 변화 및 이의 미세혈관밀도에 대한 영향도 관찰하여 설암 종양환경에서 혈관신생과 관련된 항암요법의 효과를 연구하고자 한다.

II. 연구재료 및 방법

1. 연구재료

1998년 11월부터 2003년까지 9월까지 조직검사를 통하여 설암으로 진단받고 cisplatin과 5-fluorouracil을 이용하여 최소한 1회 이상의 neoadjuvant chemotherapy를 실시한 후근치적 절제술(radical excision)을 시행받은 환자들의 biopsy 조직과 radical excision 조직에서 paraffin-embedded tumor specimens을 획득하였다. 모든 환자들은 조직검사시기에 인지할 만한 원격전이(distant metastasis)는 없었으며 어떠한 환자도 이전에 방사선 치료등의 치료를 받은 과거력은 없었다. Cisplatin은 70mg/m² 용량으로 하루에 주입(infusion)하였고 5-fluorouracil은 1000mg/m² 용량으로 4일 연속으로 주입하였으며, 2회 이상 실시할 경우 이러한 일정은 매 3주 다시 실시되었다.

2. 연구방법

1) 혈관내피세포성장인자 발현에 대한 면역조직화학적 검사 통상의 방법으로 제작한 H-E 염색표본에 대한 광학현미경학적 관찰 후, 각 증례에서 보존 상태가 양호한 한개의 파라핀 포매조직을 선택하여 5µm 두께로 수개의 절편을 얻어 먼저 종양 세포에서 혈관내피세포성장인자에 대한 면역염색을 실시하였다. 탈 파라핀한 조직절편을 증류수에 수화시킨 후 내인성 과산화효소를 제거하기 위해 메칠 알콜에 0.3% 과산화수소를 첨가시킨 용액에서 20분간 처리한 다음, 0.01M 인산염 식염수(phosphate buffered saline, PBS)에서 10분간 3회 세척하고 5% normal horse serum에서 30분간 두었다. 그 후 조직절편을 세척하지 않고 부드럽게 blotting한 후, 1:400으로 희석된 1차 항체인 mouse monoclonal antihuman VEGF(Santa Cruz, CA, USA)를 4°C에서 14시간 내지 16시간동안 적용하였다. 그리고 나서 PBS로 10분씩 3회 세척한 후 2차 항체인 biotinylated horse anti-mouse IgG(Vector Lab, CA, USA)를 1:200으로 희석하여 실온에서 1시간 동안 각각 적용하였다. 조직절편을 PBS로 10분씩 3회 수세한 다음, 30분전에 미리 만들어 실온에 방치해 놓은 ABC

(avidin-biotin horseradish peroxidase complex) 용액 (A;10 μ l, B;10 μ l in 1 ml PBS, Vector lab, CA, USA)을 1시간동안 적용시켰다. 조직절편을 PBS로 10분씩 3회 세척한 후, 0.05M Tris-HCL buffer(pH 7.6)에 0.05% DAB(diabimobenzine, Sigma, St. Louis, USA)와 0.01% 과산화수소 혼합용액에서, 약 10분동안 실온에서 발색반응을 시켰다. 그 후 tris buffer, PBS 및 증류수에서 각각 10분간 순서대로 세척한 후, Harris hematoxylin으로 대조염색을 하고 통상적인 방법으로 그 이후의 과정을 거쳐 Permount (Polysciences, PA, USA)로 봉입하였다.

2) 면역조직화학검사의 평가

임상적 정보를 전혀 인지하지 못하는 2명의 병리학자를 통하여 종양세포에서의 혈관내 피세포성장인자의 발현은 염색강도(staining intensity)를 통하여 평가하였다. 0에서 3까지 4등급으로 나누었으며 0은 인지할 만한 염색강도가 나타나지 않은 경우를, 1은 저발현군, 2는 중발현군으로, 그리고 3은 가장 강한 염색정도를 나타내는 고발현군으로 표기하였다.

3) 미세혈관밀도 및 종양관련 대식세포 수준의 평가

미세혈관밀도와 종양관련 대식세포는 각각 CD34와 CD68을 이용한 형광면역염색으로 그 수를 분석하였다. 탈 파라핀한 조직절편을 증류수에 수화시킨 후, 1%의 normal horse serum에 1시간 동안 반응시켜 비특이적인 반응을 억제했다. 1:200으로 희석된 1차 항체인 mouse monoclonal antihuman CD34(Santa Cruz, CA, USA)와 mouse monoclonal antihuman CD68(Santa Cruz, CA, USA)를 4°C에서 16시간 동안 적용하였다. 그리고 PBS로 10분씩 3회 세척한 후 2차 항체인 fluorescein isothiocyanate(FITC)-conjugate IgG와 rhodamine-conjugate IgG를 1:200으로 희석하여 실온

에서 1시간 동안 반응시켰다. PBS로 세척한 후 50% 글리세롤을 조직위에 떨어뜨리고 봉입한후 형광현미경(AxiSkop, Carl Zeiss, Germany)으로 관찰하였다. 먼저 저배율에서 혈관 밀도가 높은 3개의 지역을 선택하여 200배 시야에서 형광현미경카메라(AxioCam MRc5, Carl Zeiss, Germany)로 사진촬영을 한 후 영상분석장치(AxioVision 4.3, Carl Zeiss, Germany)를 통하여 면역양성인 혈관수를 계산하고 평균치를 구하였으며 소수점 이하는 생략하였다. 종양관련 대식세포의 수준도 미세혈관밀도와 유사한 방법으로 평가 하였다.

4) 통계학적 분석

술전 조직검사표본과 신부가화학요법후 근치적 절제술을 실시한 표본에서 종양세포에서의 혈관내피세포성장인자 발현양상의 변화, 미세혈관밀도 및 종양관련 대식세포 수준의 변화는 윌콕슨의 부호순위 검정(Wilcoxon's signed rank test)을 통하여 분석하였으며 유의 수준은 p<0.05로 하였다.

III. 연구결과

1. 신부가화학요법에 따른 종양세포에서의 혈관내피세포 성장인자 발현의 변화

술전 조직검사표본과 신부가화학요법후 근치적 절제술을 실시한 표본에서 종양세포에서의 혈관내피세포성장인자의 발현의 변화, 미세혈관밀도의 변화 및 종양관련 대식세포 수준의 변화를 평가하였다(Table 1).

술전 생검조직과 비교하여 종양세포에서의 혈관내피세포성장인자 발현은 Cisplatin과 5-FU를 이용한 신부가화학요법후 근

Table 1. Relationship of VEGF expression in tumor cells, microvessel density, and tumor-associated macrophages level in biopsy and radical excision specimens

| Tissue number | VEGF expression | | MVD* | | TAM* | |
|---------------|-----------------|------------------|--------|------------------|--------|------------------|
| | biopsy | radical excision | biopsy | radical excision | biopsy | radical excision |
| 1 | low | low | 28 | 29 | 56 | 63 |
| 2 | low | low | 32 | 26 | 51 | 57 |
| 3 | low | low | 38 | 43 | 67 | 72 |
| 4 | low | low | 21 | 22 | 42 | 48 |
| 5 | low | low | 27 | 24 | 43 | 52 |
| 6 | moderate | low | 51 | 56 | 74 | 79 |
| 7 | moderate | low | 44 | 48 | 63 | 77 |
| 8 | moderate | moderate | 37 | 34 | 68 | 74 |
| 9 | high | low | 49 | 54 | 84 | 93 |
| 10 | high | low | 62 | 67 | 104 | 117 |
| 11 | high | moderate | 55 | 52 | 96 | 104 |

* Data are given as positive immunofluororeactivity number

VEGF; vascular endothelial growth factor, MVD; microvessel density, TAM; tumor-associated macrophage.

치적 절제술을 실시한 표본에서 감소의 경향을 나타내나 통계적으로 유의하지는 않았다($p=0.0625$). 그러나 생검조직에서 3경우의 고발현군은 근치적 절제술후 2경우는 저발현군으로, 1경우는 중발현군으로, 생검조직에서 3경우의 중발현군은 근치적 절제술후 2경우는 저발현군으로, 1경우는 중발현군 그대로 나타나 생검조직에서 혈관내피세포성장인자의 발현이 높을수록 근치적 절제술 표본에서는 그 발현양상이 뚜렷이 감소함을 알 수 있었으나 이러한 표본들에서 종양관련 대식세포를 포함하여 간질세포들에서는 신부가화학요법에 따른 변화가 나타나지 않았다(Fig. 1). 또한 CD34 항체를 이용한 미세혈관밀도는 술전 생검조직표본에서 혈관내피세포성장인자의 발현이 높을수록 그 수치가 증가함을 알 수 있었으며 이러한 현상

은 CD68 항체를 이용한 종양관련 대식세포에서도 나타났다(Fig. 2, 3). 술전 생검조직과 근치적 절제술을 시행한 표본에서 미세혈관밀도와 종양관련 대식세포 수준은 신부가화학요법 후 큰 변화를 나타내지 않았다. 특히, 혈관내피세포성장인자의 발현이 뚜렷이 저하되는 표본에서도 이와 동반되어 나타날 것으로 예상된 미세혈관밀도의 감소는 관찰하지 못하였으며 통계적으로 유의성은 없었으나 오히려 약간 증가함을 관찰하였으며 이는 종양관련 대식세포 수준에서도 관찰되었다.

술전 생검조직의 종양세포에서 혈관내피세포성장인자의 발현정도에 따라 미세혈관밀도 및 종양관련 대식세포 수준의 변화를 관찰하였다. 술전 생검조직의 종양세포에서 혈관내피세포성장인자의 발현정도가 낮은 경우, 신부가화학요법후 근치

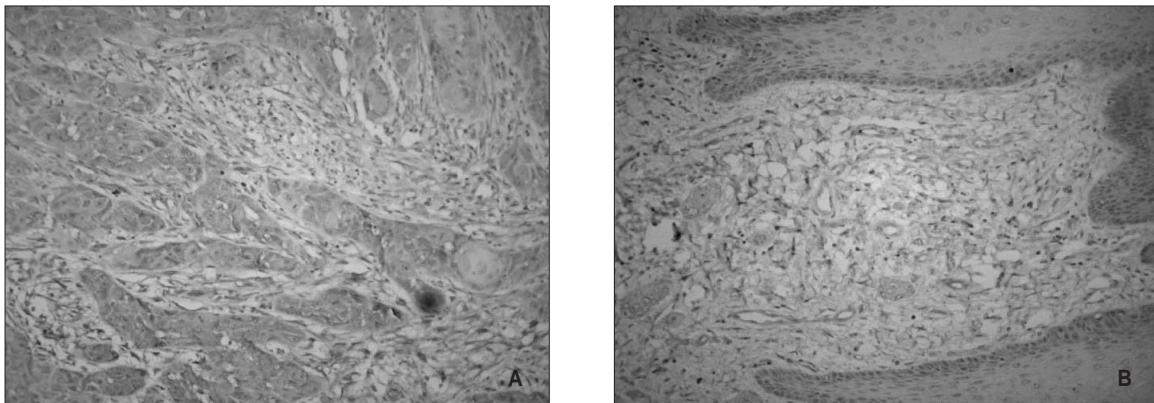


Fig. 1. Representative photomicrographs of staining for vascular endothelial growth factor (VEGF) in biopsy (A) and radical excision specimen (B).

A, VEGF positivites was seen in tumor cells, stromal fibroblasts, and tumor-associated macrophages of biopsy specimen (immunohistochemical stain, original magnification $\times 200$).

B, VEGF immunostaining was seen in stromal fibroblasts and tumor-associated macrophages of radical excision specimen, however, it demonstrated lack of staining in tumor cells of radical excision specimen (immunohistochemical stain, original magnification $\times 200$).

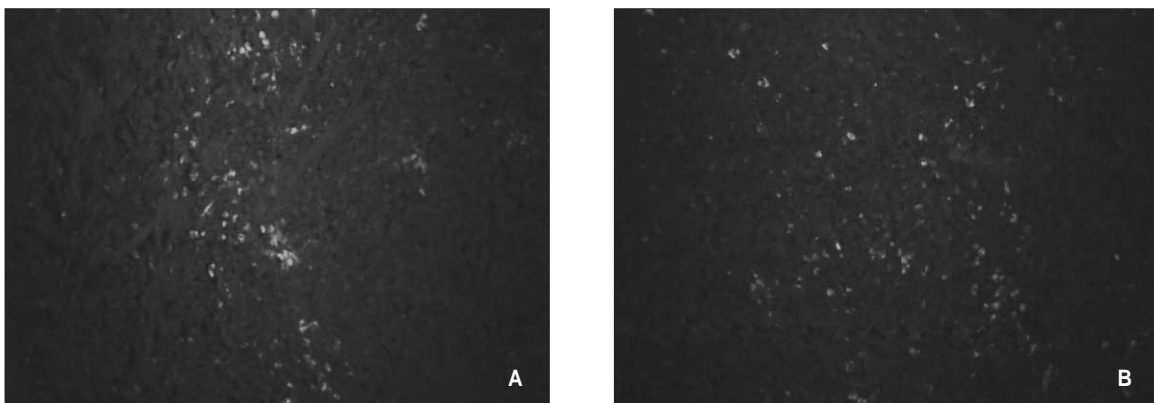


Fig. 2. Representative photomicrographs of immunofluorescence staining for CD34 in biopsy (A) and radical excision specimen (B).

No significant difference of number of positive immunofluorescence staining for CD34 in biopsy and radical excision specimen (immunofluorescence stain, original magnification $\times 200$).

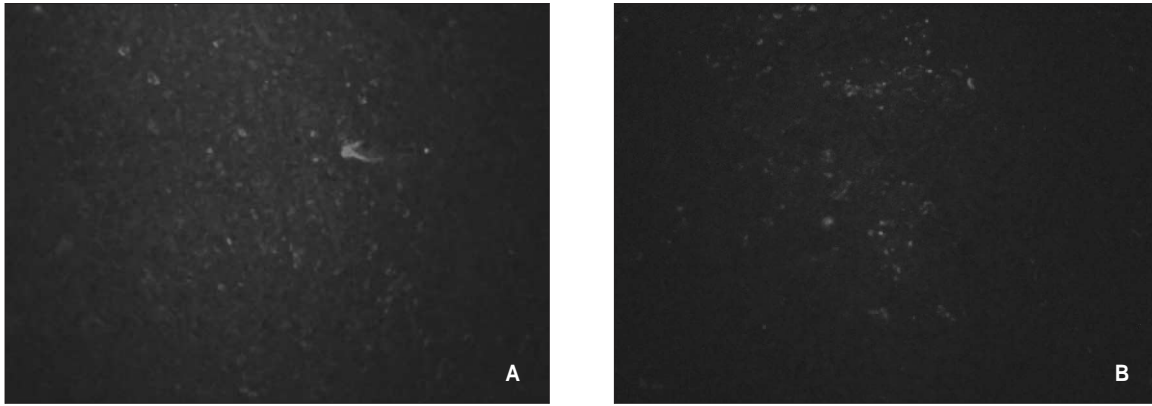


Fig. 3. Representative photomicrographs of immunofluorescence staining for CD68 in biopsy (A) and radical excision specimen (B). No significant difference of number of positive immunofluorescence staining for CD68 in biopsy and radical excision specimen (immunofluorescence stain, original magnification × 200).

Table 2. The change of microvessel density and tumor-associated macrophage level after neoadjuvant chemotherapy*

| VEGF expression in biopsy specimen | MVD | TAM |
|------------------------------------|--------|------|
| Low | 0.0625 | 1 |
| Moderate | 0.5 | 0.25 |
| High | 0.5 | 0.25 |

* Data are given as p-value using Wilcoxon’s signed rank test.

VEGF; vascular endothelial growth factor, MVD; microvessel density, TAM; tumor-associated macrophage.

적 절제술을 실시한 표본에서 미세혈관밀도는 감소하였고 종양관련 대식세포 수준은 증가하는 양상을 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았다. 술전 생검조직 표본의 종양세포에서 혈관내피세포성장인자의 발현이 중정도로 나타난 경우, 근치적 절제술을 실시한 표본에서 미세혈관밀도와 종양관련 대식세포 수준 모두 증가하는 양상을 나타내었으나 통계적으로 유의하지는 않았다. 술전 생검조직 표본의 종양세포에서 혈관내피세포성장인자의 발현이 높은 경우, 근치적 절제술의 표본에서 마찬가지로 미세혈관밀도와 종양관련 대식세포 수준 모두에서 증가하는 양상을 나타내었으나 통계적으로 유의하지는 않았다(Table 2).

IV. 총괄 및 고찰

정상조직과 유사하게 종양은 종양세포로 이루어진 실질조직과 혈관내피세포, 염증세포 및 섬유모세포 등의 다양한 세포성분과 결합조직 등으로 이루어진 간질조직으로 구성되어 있으며 산소와 영양소를 제공하는 새로운 혈관의 공급이 없을 경우 저산소상태를 야기하며 1-2 mm 이상 성장할 수가 없다²⁾.

일반적으로 이러한 간질조직은 종양세포에 대한 지지-영양계로 인식되어 왔으나 종양 혈관신생을 포함한 종양의 생물학적인 면에서 그 중요성이 인식되면서 종양치료에 대한 새로운 대상으로도 여겨지고 있다. 종양환경에서 간질조직은 활성화된 표현형을 나타내는 세포들의 기능적인 면과 세포의 기질 분포 등에서 비종양조직에서의 간질조직과는 다르다⁶¹⁵⁾.

종양 간질조직의 주요한 구성요소인 대식세포는 단핵세포/대식세포계의 한 구성성분으로 혈관내피세포성장인자를 포함한 다양한 혈관신생인자를 발현하며 tissue-type plasminogen activator와 urokinase-type plasminogen activator 등의 세포외기질 분해효소 분비를 통해 혈관내피세포의 이동에도 관여하는 등, 종양의 혈관신생에 직접적으로 참여하여 종양의 성장과 전이에 기여한다^{14,15)}. 이에 관하여 흑색종, 신경아교종 및 유방암등 여러 종양관련 문헌에서 대식세포의 침윤과 종양의 미세혈관 밀도가 밀접한 관련이 있음이 보고되고 있다^{16,18)}. 인간두경부 편평상피암세포주를 이용하여 혈관신생과 관련된 종양관련 대식세포의 역할을 연구한 Liss 등¹⁹⁾에 의하면 종양세포에 의해 생산된 화학주성인자인 단핵세포화학주성단백-1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)과 전환성장인자-베타1(transform-

ing growth factor- $\beta 1$)에 의하여 종양환경으로 유입된 종양관련 대식세포가 종양세포를 자극하여 혈관내피세포성장인자 등의 혈관신생인자를 분비시킨다고 하며 항혈관신생관련 치료에 있어서 대식세포의 종양환경으로의 유입을 막는 전략이 필요함을 강조하였다.

혈관신생과 관련하여 최근에 가장 각광을 받고 있는 것이 혈관내피세포성장인자이다. 염기모세포성장인자(basic fibroblast growth factor), 혈소판유래성장인자 (platelet-derived growth factor) 등을 포함하여 여러 인자들이 혈관신생을 유도하는 것으로 알려져 있으나 이들은 다양한 세포들에 분열촉진인자 역할을 하는 반면, 혈관내피세포성장인자는 혈관내피세포에 특이적으로 작용하여 혈관내피세포의 증식과 이동, 세포의 기질의 재형성 및 신생모세혈관 형성을 통한 미세혈관밀도의 증가를 가져온다. 종양이라는 환경에서는 빠른 성장이 특징적으로 나타나므로 이에 동반되어야 혈관 및 산소공급이 부족하게 되면 저산소 지역이 나타나게 되고 이에 반응하여 혈관내피세포성장인자 전령 리보핵산 전사 및 안정의 가역적인 증가를 가져와 종양내에서 이의 발현의 증가가 나타나게 된다. 따라서 저산소에 의한 이러한 혈관내피세포성장인자의 과발현은 조직이 혈관증식을 통하여 산소의 증가를 이룰 수 있도록 보상적인 기전으로 작용하는 것이다. 또한 혈관내피세포성장인자는 혈관투과인자로도 불리며 혈관투과성의 증가에 기여한다. 이러한 효과를 통하여 형성되는 혈관의 섬유소 응고는 종양세포와 혈관내피세포의 성장을 위한 지지역할을 할 뿐 아니라 성장하는 종양으로 대식세포 등의 다양한 간질조직 세포들의 유입을 증가시키게 된다⁴⁷⁾. 혈관신생에 관한 정량산물이라고 할 수 있는 미세혈관밀도는 이미 여러 문헌에서 침습적인 임상적 양상과 깊은 관련이 있으며 일부 종양에서는 독립적인 예후인자로도 알려져 있다^{20,21)}.

혈관내피세포성장인자의 발현 및 이에 동반하는 미세혈관밀도에 대한 항암치료의 효과에 관해서는 아직 정확한 기전이 알려져 있지 않으며 여러 상반된 결과가 보고되고 있다^{8,11)}. 일반적으로는 종양의 산소 및 영양소공급과 관련이 있는 혈관내피세포성장인자를 통한 미세혈관의 형성은 항암제의 약물 전달과 밀접한 관련이 있으므로 미세혈관 증식이 종양의 성장에 중요하게 작용하지만 이는 항암제의 종양세포로의 약물 전달에도 매우 중요하게 작용한다. 따라서 고도로 혈관화된 종양에서 항암제의 약물 전달 효과가 높은 것 또한 사실이며 Hironaka 등¹⁰⁾은 항암방사선요법을 통한 식도암의 치료에서 미세혈관밀도의 증가가 생존율에 크게 영향을 미치는 유용한 예후인자라고 하며 외과적으로 종양을 제거할 때와는 달리, 미세혈관밀도가 높을 경우 외과적 방법에 의한 치료보다 항암방사선요법에 의한 치료가 효과적이라고 주장하였다. 하지만 항암치료와 방사선치료는 세포자멸사를 통하여 효과를 나타내는 반면, 혈관내피세포성장인자는 종양세포자멸사를 저해하는 작용이 있으므로 종양에서 혈관내피세포성장인자가 발현되는 것은 항암방사선치료의 효과를 저해할 수 있다^{8,9,22)}. 이러한 상반된 결과가 보고되는 상황에서 본 연구에서는 신부가화

학요법후 설암 종양세포에서 혈관내피세포성장인자의 발현이 감소 경향을 나타내는 것을 관찰하였으나 이는 통계적으로는 유의하지 않았다. 이는 조직표본 수의 적음과 함께 특히, 조직검사표본에서 이미 혈관내피세포성장인자의 발현이 낮은 저발현군에서 신부가화학요법후 완전히 인지할 만한 발현이 나타나지 않은 표본은 없었기 때문인 것으로 사료된다. 그러나 본 연구에서 술전 조직검사표본에서 3경우의 혈관내피세포성장인자 고발현군은 신부가화학요법후 근처적 절제술을 실시한 표본에서 2경우는 저발현군으로, 1경우는 중발현군으로 나타났으며 술전 3경우의 혈관내피세포성장인자 중발현군은 근처적 절제술후 2경우는 저발현군으로, 1경우는 중발현군으로 나타나 어느정도 감소됨을 확인할 수 있었다. 하지만 이렇게 혈관내피세포성장인자의 발현이 뚜렷이 저하되는 표본에서도 이와 동반되어 나타날 수 있는 미세혈관밀도의 감소는 관찰하지 못하였으며 통계적으로 유의성은 없었으나 오히려 약간 증가함을 관찰하였다. 또한 이러한 표본에서 간질세포들에서의 혈관내피세포성장인자 발현도 신부가화학요법에 따른 의미있는 변화는 관찰되지 않았다.

항암요법후 종양조직에서는 종양세포자멸사와 괴사를 초래하여 염증과 섬유성 반응이 나타나고 세포학적으로는 육아종창상과 유사하게 대식세포와 섬유모세포 등의 침윤이 증가하게 된다는 점과 종양 혈관신생이라는 것이 종양세포 뿐 아니라 간질세포들에서 생산되는 혈관신생인자에도 좌우된다는 점을 인식하고 또한 최근 혈관내피세포성장인자의 또다른 원천으로 종양관련 대식세포에 관하여 어느 정도 보고되고 있으므로 본 연구에서는 상기결과와 같이 혈관내피세포성장인자의 종양세포내 발현이 뚜렷이 저하되는 표본에서도 이에 따른 미세혈관밀도의 변화가 나타나지 않음에 대하여 종양환경으로 유입되어 활성화된 종양관련 대식세포 수준을 관찰하였다. 이의 수준은 미세혈관밀도와 마찬가지로 술전 생검조직에서 보다 신부가화학요법후 근처적 절제술을 실시한 조직에서 통계학적으로 유의성은 없었으나 약간 증가함을 알 수 있었다. 이러한 결과들은 종양세포에 의해 생성되는 혈관내피세포성장인자를 통한 직접적인 혈관신생자극과는 달리, 혈관내피세포성장인자의 발현이 낮은 종양에서는 대식세포-매개 혈관신생경로(macrophage-mediated angiogenic pathways)에 의한 혈관신생을 보고한 Leek 등¹⁵⁾의 연구결과와 일치하였다. 이 연구에서 대식세포의 종양환경으로의 유입에는 저산소상태가 중요한 역할을 하며 일단 유입된 종양관련 대식세포는 혈관신생과 관련된 표현형을 발현하여 혈관내피세포성장인자, 종양괴사인자-알파(tumor necrosis factor- α , TNF- α)와 같은 사이토카인을 생산한다고 하였다. 이와 유사하게 Pakala 등²³⁾의 연구결과에서도 비활성화된 대식세포의 경우 혈관내피세포의 성장을 방해하나 저산소 등과 같은 경우로 활성화된 대식세포의 경우 다양한 혈관신생관련 인자를 발현한다고 보고하였다. 이러한 점들을 고려하고 혈관내피세포성장인자가 혈관투과인자로도 역할함을 인식하여 본 연구에서도 술전 조직검사에서 혈관내피세포성장인자의 발현이 높을수록 침윤된 종양관련 대식세포

의 수가 많았고 이와 비례하여 미세혈관밀도의 증가가 나타났음을 알 수 있었다. 또한 신부가화학요법후 종양세포자체에서의 혈관내피세포성장인자 발현 감소 및 이에 따른 종양에서의 저산소상태가 대식세포 등의 간질세포유입과 이의 활성화를 유발시켜 미세혈관밀도의 유지에 기여한 것으로 추정된다.

V. 결 론

조직검사를 통하여 설암으로 진단받고 적어도 1회이상의 신부가화학요법을 실시한 후 근치적 절제술을 시행받은 11명의 환자에게서 조직절편을 획득하여 설암에서 신부가화학요법이 혈관신생에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 술전 조직검사표본과 비교하여 신부가화학요법후 근치적 절제술을 실시한 표본에서 종양세포내 혈관내피세포성장인자 발현은 통계적으로 유의하지는 않았으나 감소하는 경향을 나타내었다. 그러나 술전 조직검사표본에서 혈관내피세포성장인자의 발현이 높을수록 근치적 절제술을 실시한 표본에서 그 발현정도가 뚜렷하게 감소하였으나 이러한 표본들의 간질세포들에서의 의미있는 발현 변화는 관찰되지 않았다.
2. CD34항체를 이용한 미세혈관밀도와 CD68항체를 이용한 종양관련 대식세포 수준은 술전 조직표본에서 혈관내피세포성장인자의 발현이 높을수록 그 수치가 증가하였으며 신부가화학요법에 따른 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았으나 약간 증가하는 양상을 나타내었다. 상기 결론을 통하여 항암치료는 종양세포자체에서의 혈관내피세포성장인자 발현 감소를 유발할 수 있으나 항암치료에 따른 종양의 반응인, 대식세포의 간질조직으로의 유입과 종양 저산소상태는 종양관련 대식세포가 혈관신생과 관련된 활성화된 표현형을 발휘하여 혈관내피세포성장인자의 산생 및 미세혈관밀도의 유지에 적극적으로 참여하는 것으로 여겨진다.

참고문헌

1. Kunzle CM, Kuhn H, Dvorak O, Kuhn R: A comparative histopathological study of the influence of chemo- and radiotherapy on human prostatic carcinoma grown in nude mice. *Exp Toxicol Pathol* 1997;49:249-252.
2. Guchelaar HJ, Vermes I, Koopmanns RP, Reuteligsperger CP, Haanen C: Apoptosis- and necrosis-inducing potential of cladribine, cytarabine, cisplatin, and 5-fluorouracil in vitro: a quantitative pharmacodynamic model. *Cancer Chemother Pharmacol* 1998;42:77-83.
3. Westra WH, Forastiere AA, Eisele DW, Lee DJ: Squamous cell granulomas of the neck: histologic regression of metastatic squamous cell carcinoma following chemotherapy and/or radiotherapy. *Head Neck* 1998;20:515-521.
4. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z: Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999;13:9-22.
5. Keyes K, Cox K, Treadway P, Mann L, Shih C, Faul MM, et al: An in vitro tumor model: analysis of angiogenic factor expression after chemotherapy. *Cancer Res* 2002;62:5597-5602.
6. Micke P, Ostman A: Tumour-stroma interaction: cancer-associated

- fibroblasts as novel targets in anti-cancer therapy?. *Lung Cancer* 2004;45:S163-175.
7. Feng D, Nagy JA, Hipp J, Dvorak HF, Dvorak AM: Vesiculo-vacuolar organelles and the regulation of venule permeability to macromolecules by vascular permeability factor, histamine, and serotonin. *J Exp Med* 1996;83:1981-1986.
8. Salven P, Ruotsalainen T, Mattson K, Joensuu H: High pre-treatment serum level of vascular endothelial growth factor (VEGF) is associated with poor outcome in small-cell lung cancer. *Int J Cancer* 1998;79:144-146.
9. Gasparini G, Toi M, Miceli R, Vermeulen PB, Dittadi R, Biganzoli E, et al: Clinical relevance of vascular endothelial growth factor and thymidine phosphorylase in patients with node-positive breast cancer treated with either adjuvant chemotherapy or hormone therapy. *Cancer J Sci Am* 1999;5:101-111.
10. Hironaka S, Hasebe T, Kamijo T, Ohtsu A, Boku N, Yoshida S, et al: Biopsy specimen microvessel density is a useful prognostic marker in patients with T(2-4)M(0) esophageal cancer treated with chemoradiotherapy. *Clin Cancer Res* 2002;8:124-130.
11. Teknos TN, Cox C, Yoo S, Chepeha DB, Wolf GT, Bradford CR, et al: Elevated serum vascular endothelial growth factor and decreased survival in advanced laryngeal carcinoma. *Head Neck* 2002;24:1004-1011.
12. Rak J, Filmus J, Finkenzeller G, Grugel S, Marme D, Kerbel RS: Oncogenes as inducers of tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 1995;14:263-277.
13. Mueller MM, Fusenig NE: Tumor-stroma interactions directing phenotype and progression of epithelial skin tumor cells. *Differentiation* 2002;70:486-497.
14. Ohta M, Kitadai Y, Tanaka S, Yoshihara M, Yasui W, Mukaida N, et al: Monocyte chemoattractant protein-1 expression correlates with macrophage infiltration and tumor vascularity in human esophageal squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 2002;102:220-224.
15. Leek RD, Hunt NC, Landers RJ, Lewis CE, Royds JA, Harris AL: Macrophage infiltration is associated with VEGF and EGFR expression in breast cancer. *J Pathol* 2000;190:430-436.
16. Shimizu T, Abe R, Nakamura H, Ohkawara A, Suzuki M, Nishihira J: High expression of macrophage migration inhibitory factor in human melanoma cells and its role in tumor cell growth and angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;264:751-758.
17. Nishie A, Ono M, Shono T, Fukushi J, Otsubo M, Onoue H, et al: Macrophage infiltration and heme oxygenase-1 expression correlate with angiogenesis in human gliomas. *Clin Cancer Res* 1999;5:1107-1113.
18. Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, Greenall M, Clarke J, Harris AL: Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res* 1996;56:4625-4629.
19. Liss C, Fekete MJ, Hasina R, Lam CD, Linggen MW: Paracrine angiogenic loop between head-and-neck squamous-cell carcinomas and macrophages. *Int J Cancer* 2001;93:781-785.
20. Bochner BH, Cote RJ, Weidner N, Groshen S, Chen SC, Skinner DG, et al: Angiogenesis in bladder cancer: relationship between microvessel density and tumor prognosis. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:1603-1612.
21. Inoue K, Slaton JW, Karashima T, Yoshikawa C, Shuin T, Sweeney P, et al: The prognostic value of angiogenesis factor expression for predicting recurrence and metastasis of bladder cancer after neoadjuvant chemotherapy and radical cystectomy. *Clin Cancer Res* 2000;6:4866-4873.
22. Pidgeon GP, Barr MP, Harmey JH, Foley DA, Bouchier-Hayes DJ: Vascular endothelial growth factor (VEGF) upregulates BCL-2 and inhibits apoptosis in human and murine mammary adenocarcinoma cells. *Br J Cancer* 2001;85:273-278.
23. Pakala R, Watanabe T, Benedict CR: Induction of endothelial cell proliferation by angiogenic factors released by activated monocytes. *Cardiovasc Radiat Med* 2002;3:95-101.