

간 전이를 동반한 대장암에서의 VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2 발현 양상과 미세혈관 밀도의 비교

정은희 · 김 영 · 민병우 · 이경화
김현수¹ · 이재혁

전남대학교 의과대학 병리학교실 및
¹내과학교실 소화기분과

접 수 : 2010년 3월 23일
게재승인 : 2010년 8월 13일

책임저자 : 이 재 혁
우 519-809 전남 화순군 화순읍 일심리 160
화순전남대학교병원 병리과
전화: +82-61-379-7073
Fax: +82-61-379-7099
E-mail: jhlee@chonnam.ac.kr

*본 논문은 보건복지부 암정복추진연구
개발사업의 지원에 의해 연구되었음(과
제번호: 0720570).

Differences in Expression of VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2 and Microvessel Density in Colorectal Cancer with Liver Metastasis

Eun Hui Jeong · Young Kim · Byeong Woo Min · Kyung Hwa Lee
Hyun Soo Kim¹ · Jae Hyuk Lee

Departments of Pathology and ¹Division of Gastroenterology, Department of Internal Medicine, Chonnam National University Medical School, Hwasun, Korea

Background : Colorectal cancer (CRC) is one of the most common malignant neoplasms and is a leading cause of mortality worldwide. Metastasis to the liver is a frequent event in patients with CRC. An essential step in the metastatic cascade is angiogenesis. **Methods :** This study included 45 patients who underwent a partial colectomy with hepatic resection for CRC with hepatic metastases. Immunohistochemistry was performed using vascular endothelial growth factor (VEGF)-A, VEGF receptor (VEGFR)-1, VEGFR-2, and CD34 antibodies to examine the relationship between CRC with liver metastases and angiogenesis. **Results :** CRC showed significantly stronger expression of VEGF-A, VEGFR-1, and VEGFR-2 than liver metastases ($p < 0.05$). Microvessel density was also higher in CRC than in liver metastases ($p < 0.05$). **Conclusions :** Compared with previous studies, we found a higher expression of VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2, and microvessel density in CRC than in liver metastases, which could be ascribed to a difference in vessel distribution and blood supply in each organ. Given its profuse blood supply and distinct cell populations, the liver might provide a rich milieu for tumor cell growth with less expression of angiogenesis-inducing agents.

Key Words : Thymus gland; Neoplasms; Immunohistochemistry; World Health Organization; Histological classification

대장암은 전 세계적으로 가장 흔한 암 중 하나이며, 현재 우리나라에서도 꾸준히 증가 추세에 있다.¹ 또한 대장암은 다른 장기로 전이를 잘 하는 암으로 알려져 있는데, 그중 간 전이가 흔하게 동반된다. 실제로 대장암 진단 당시 약 25%의 환자에서 간 전이가 동반되어 있다고 알려져 있고, 25% 이상의 환자가 진단 후 2년 이내에 간 전이가 발생한다고 보고되어 있다.² 또 이런 간 전이는 암 관련 사망의 중요 원인이 되고 있다.³

암세포가 원격전이를 하려면 암세포의 유리, 국소 침습, 이동, 신생혈관생성, 혈관 침습, 혈관 내 상피 세포로의 유착, 그리고 다른 장기 내에서의 성장 등 여러 단계를 거쳐야 하는데,⁴ 이 중 신생혈관생성은 2-3 mm³ 이상의 암이 성장을 하기 위해서는 반드시 필요한 과정이다.⁵ 신생혈관은 이미 만들어져 있는 혈관에서부터 새로운 모세혈관이 만들어지는 것인데, 이 과정은 혈

관형성유도인자(angiogenesis inducing agent)의 영향을 받고, 이렇게 만들어진 혈관은 암세포의 성장, 암세포의 혈관 침습과 전이 등에 도움을 준다.⁶

신생혈관생성에는 많은 혈관형성유도인자가 관여를 하는데 그 중에서도 혈관내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)가 매우 중요한 역할을 한다. 현재까지 VEGF에는 5가지의 아형(VEGF-A, -B, -C, -D, and F)이 밝혀져 있고, 각각의 아형과 반응하는 수용체는 3가지(VEGF receptor [VEGFR]-1, VEGFR-2, and VEGFR-3)가 존재한다고 알려져 있다.⁷

VEGF-A는 VEGFR-1, -2를 통해서 신호전달체계를 활성화시키는데, 이는 혈관내피세포의 증식, 이동, 생존을 촉진시킨다.⁸ 또 VEGF-C와 D는 VEGFR-2, VEGFR-3와 결합하여

신생 림프관 및 혈관 형성을 유도한다.⁹ 그리고 VEGF는 대장암에서 높게 나타나는데, 이 중 VEGF-A는 다른 아형에 비해 특히 더 높게 나타내며, 이렇게 높은 VEGF-A는 대장암의 침윤성이나 진행 정도에 큰 영향을 미친다.⁹⁻¹¹

본 연구에서는 간 전이가 없는 대장암과 간 전이가 있는 대장암에서 VEGF-A, VEGFR-1 및 VEGFR-2의 발현 양상 차이와 그에 따른 미세혈관 밀도의 연관성을 통해 각 단백질이 대장암에서 전이를 예측할 수 있는 표지자로서의 기능을 할 수 있는지 그 가능성에 대해 알아보고, 대장암의 원발 부위와 간 전이 부위에서 각 단백질의 발현 양상 차이와 그에 따른 미세혈관 밀도의 차이 및 연관성, 임상병리학적 변수 사이의 연관성을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

재료

전남대학교병원과 화순전남대학교병원에서 2002년 1월부터 2007년 12월까지 대장암의 간 전이로 간절제와 부분적 대장절제술을 시행한 45예와 간 전이가 없는 30예를 대상으로 임상적 특징을 조사하고 병리학적 소견을 검토하였다. 또한 World Health Organization (WHO) 분류에 근거하여 조직학적 분화도를 나누고, 고분화와 중등도 분화는 저등급으로, 저분화와 미분화는 고등급으로 분류하였다. 중앙 병기와 림프절 병기는 American Joint Committee on Cancer의 기준에 따라 분류하였다.¹²

면역조직화학염색

10% 중성 포르말린에 고정시킨 후 제작한 파라핀 포매괴로부터 3 μ m 두께의 절편을 만들고 이를 탈파라핀과 함수 과정을 거친 후 VEGF-A (A-20, Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA)는 펩신으로 10분간 반응시킨 후 완충액으로 세척하여 조직항원을 노출시켰고, VEGFR-1 (Y103, Abcam, Cambridge, UK), VEGFR-2 (KDR/EIC, Abcam), 그리고 CD34 (QBEND10, Dako, Carpinteria, CA, USA)는 가열처리 항원 유도(antigen retrieval) 방법을 사용하여 조직항원이 잘 노출되도록 하였다. 또 VEGFR-1, VEGFR-2는 EDTA buffer에서 125°C로 15분간 처리를 하였고, CD34는 citrate buffer에서 125°C로 15분간 처리하였다.

그리고 내재성 peroxidase를 억제하기 위해 3%의 hydrogen peroxidase를 반응시킨 다음 VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2를 각각 1:200으로 희석하여 일차항체로 약 90분간 작용을 시켰고, CD34는 1:100으로 희석하여 일차항체로 약 90분간 작용을 시킨 후 완충액으로 세척하였다. 이때 반응산물의 검출을 위해 바이오틴이 부착된 항마우스 IgG와 항래빗 IgG 및 strepta-

vidin-horseradish peroxidase를 각각 10분간 작용시켰으며, horseradish peroxidase의 발색은 diaminobenzidine을 이용하였다.

발색 반응이 끝난 다음 헤마톡실린 대조염색을 시행하였는데, 염색의 전 과정에 있어서 부치온도는 45°C로 하였고 음성 대조군은 일차항체 대신 항마우스 IgG와 항래빗 IgG 희석액을 반응시킨 슬라이드를 동일한 과정을 거쳐 실험에 이용하였다.¹³ VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2는 정상 대조염색이 되었던 혈관내피 세포에 비해 강하게 발현된 경우를 강양성(3+)으로 판단하였고, 대조염색과 비슷하게 발현된 경우는 중양성(2+), 대조염색보다 약하지만 양성을 확인할 수 있는 정도로 발현된 경우는 약양성(1+), 음성인 경우는 0으로 판단하였다.

Table 1. Clinicopathological characteristics of selected patients

Factors	Control group		Metastasis group	
	n	%	n	%
Age (yr)				
≤60	10	33.3	21	46.70
>60	20	66.7	24	53.30
Sex				
Male	17	56.7	31	68.9
Female	13	43.3	14	31.1
Primary cancer site				
Ascending colon	4	13.3	6	13.3
Transverse colon	3	10.0	3	6.7
Descending colon	1	3.3	3	6.7
Sigmoid colon	4	13.3	12	26.7
Rectum	18	60.0	21	46.7
Gross type				
Fungating	2	6.7	8	17.8
Ulcerofungating	21	70.0	26	57.8
Ulcerative	3	10.0	8	17.8
Infiltrative	4	13.3	3	6.7
Differentiation				
WD	5	16.7	12	26.7
MD	20	66.7	26	57.8
PD-UD	5	16.7	7	15.5
Lymphovascular invasion				
Absent	24	80.0	29	64.4
Present	6	20.0	16	35.6
T stage				
T2	0	0.0	2	4.4
T3	28	93.3	20	44.4
T4	2	6.7	23	51.1
N stage				
N0	7	23.3	11	24.4
N1	13	43.3	13	28.9
N2	10	33.3	21	46.7
Liver mass type				
Solitary	0	0.0	24	53.3
Multiple	0	0.0	21	46.7

WD, well differentiated; MD, moderately differentiated; PD, poorly differentiated; UD, undifferentiated.

광학현미경을 통한 미세혈관 밀도 측정

신생혈관 밀도의 측정은 Bosari 등¹⁴의 방법에 따라 세정맥 및 모세혈관만을 포함시켰는데, CD34에 양성되면서 인접한 큰 혈관과 떨어져 있고 명백하게 분리되어 있는 개개의 내피세포 또는 내피세포의 군집을 하나의 미세혈관으로 간주하였다. 그리고 100배의 광학현미경 시야에서 미세혈관 형성이 풍부한 부위 10 곳을 무작위로 선택하여 밀도를 측정하였는데, 이때 디지털 카메라가 부착된 광학현미경을 통해 얻어진 염색된 표본 슬라이드

Table 2. Comparison of vascular endothelial growth factor (VEGF)-A, VEGF receptor (VEGFR)-1, and VEGFR-2 expression in the control and metastasis groups

		Control group	Metastasis group	Total	p-value
VEGF	0	1	0	1 (1.3)	0.004*
	1	8	3	11 (14.7)	
	2	7	9	16 (21.3)	
	3	14	33	47 (62.7)	
	Total	30 (40.0)	45 (60.0)	75 (100)	
VEGFR-1	0	1	0	1 (1.3)	0.561
	1	6	13	19 (25.3)	
	2	15	14	29 (38.7)	
	3	8	18	26 (34.7)	
	Total	30 (40.0)	45 (60.0)	75 (100)	
VEGFR-2	0	2	0	2 (2.6)	< 0.001*
	1	28	22	50 (71.4)	
	2	0	13	13 (17.3)	
	3	0	10	10 (13.3)	
	Total	30 (40.0)	45 (60.0)	75 (100)	

Values are presented as number (%).

*p < 0.05.

의 미세혈관 단면적을 화상분석 소프트웨어 AnalySIS ver. 3.2 (Soft-Imaging Software GmbH, Munster, Germany)를 이용하여 측정하였다.

종양 내에 존재하는 미세혈관의 밀도를 100배로 관찰한 뒤 미세혈관의 형성이 가장 풍부한 부위를 선택하여 200배를 일정 배율로 10필드 이상을 이동하면서 측정하였고, 각 증례당 신생혈관의 밀도는 측정된 값을 전체면적으로 나눈 백분율(%)로 나타내어 평균값으로 표시하였다.¹³

통계학적 분석

SPSS ver. 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 대조군과 전이군의 대장암에서 VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2의 발현 정도를 linear-by-linear association test를 통해 비교하였고, 전이군 내에서 대장암과 간 전이에서의 VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2의 발현 정도를 Wilcoxon signed ranks test를 통하여 비교하였다.

면역화학염색 결과와 각 임상요소의 연관성은 Pearson chi-square test 또는 Fisher's exact test를 통해 평가하였고, 각 혈관형성인자들 간의 연관성은 대장암에 한해서 Kendall's tau-b test를 통해 평가하였다.

또한 혈관형성인자들과 미세혈관 밀도와의 관계는 미세혈관 밀도를 평균값을 기준으로 두 그룹으로 구분한 후 linear-by-linear association test를 통해 비교하였으며, 대장암과 간 전이에서 미세혈관 밀도는 paired t-test로 비교하였고, 각 임상요소와 미세혈관 밀도의 연관성은 independent-samples t-test를 이용하여 분석하였는데, 이때 p값이 0.05 이하인 경우를 통계학적으로

Table 3. Comparison of vascular endothelial growth factor (VEGF)-A, VEGF receptor (VEGFR)-1, and VEGFR-2 expression in colorectal cancer and liver metastases

		Liver					Total	p-value
		0	1	2	3			
Colon	VEGF	0	0	0	0	0	0 (0.0)	< 0.001*
		1	0	1	1	1	3 (6.7)	
		2	0	5	1	3	9 (20.0)	
		3	2	15	9	7	33 (73.3)	
		Total	2 (4.4)	21 (46.7)	11 (24.4)	11 (24.4)	45 (100.0)	
	VEGFR-1	0	0	0	0	0	0 (0.0)	< 0.001*
		1	3	7	3	0	13 (28.9)	
		2	3	8	3	0	14 (31.1)	
		3	1	15	2	0	18 (40.0)	
		Total	7 (15.6)	30 (66.7)	8 (17.8)	0 (0.0)	45 (100.0)	
	VEGFR-2	0	0	0	0	0	0 (0.0)	< 0.001*
		1	8	13	1	0	22 (48.9)	
		2	4	8	1	0	13 (28.9)	
		3	2	8	0	0	10 (22.2)	
		Total	14 (31.1)	29 (64.4)	2 (4.4)	0 (0.0)	45 (100.0)	

Values are presented as number (%).

*p < 0.05.

로 의미있는 것으로 판정하였다.

결 과

임상병리학적 특성

75예 환자의 연령 분포는 29세에서 85세까지였으며, 평균 연령은 전이군이 60.7 ± 10.9 세 대조군이 62.5 ± 12.6 세이며, 남녀 성비는 전이군이 2.21, 대조군이 1.30으로 남성 비율이 더 높았다. 또한 대장암의 위치를 상행결장, 횡행결장, 하행결장, S자결장, 직장 등으로 구분하였을 때 대조군과 전이군 모두 직장에서 발생한 예가 각각 18예, 21예로 가장 많았다.

육안상 표본의 모양에 따라 대장암을 구분하였을 때 궤양성 용기형 타입이 전이군에서 57.8%, 대조군에서 70.0%로 가장 많았고, 조직학적 분화도를 보았을 때는 양쪽 모두 중등도 분화 타입이 가장 많았다(Table 1). 그리고 대조군 대장암의 평균 크기

는 4.93 ± 2.0 cm, 전이군에서 원발 대장암의 평균 크기는 4.7 ± 1.9 cm, 간 전이의 평균 크기는 3.1 ± 2.6 cm이었으며, 간 전이가 있는 45예 중 40예가 동시성 전이였고, 5예가 이시성 전이였다.

VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2의 발현 및 미세혈관형성의 비교

VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2의 발현은 종양의 침윤 부위에서 제일 강한 발현 정도를 보였고 주변 비종양성 샘조직에서는 발현이 되지 않거나 미약하게 발현되는 양상을 보였으며, 간세포의 경우 전이된 종양보다 강한 발현 정도를 보였다. 종양의 침윤 부위를 대상으로 대조군과 전이군의 대장암에서 VEGF-A의 발현 정도를 비교하였을 때, 전이군에서 강양성(+3)을 보이는 예의 비율이 73.3%로 대조군보다 높게 나타났으며, VEGFR-2 역시 전이군에서 더 높게 나타나 통계학적으로 유의한 차이가 있었다($p=0.004$, $p<0.001$)(Table 2).

전이군 내에서 원발 대장암과 간 전이암에서 VEGF-A의 발현 정도를 비교하였을 때는 원발 대장암에서 강양성(+3)을 보

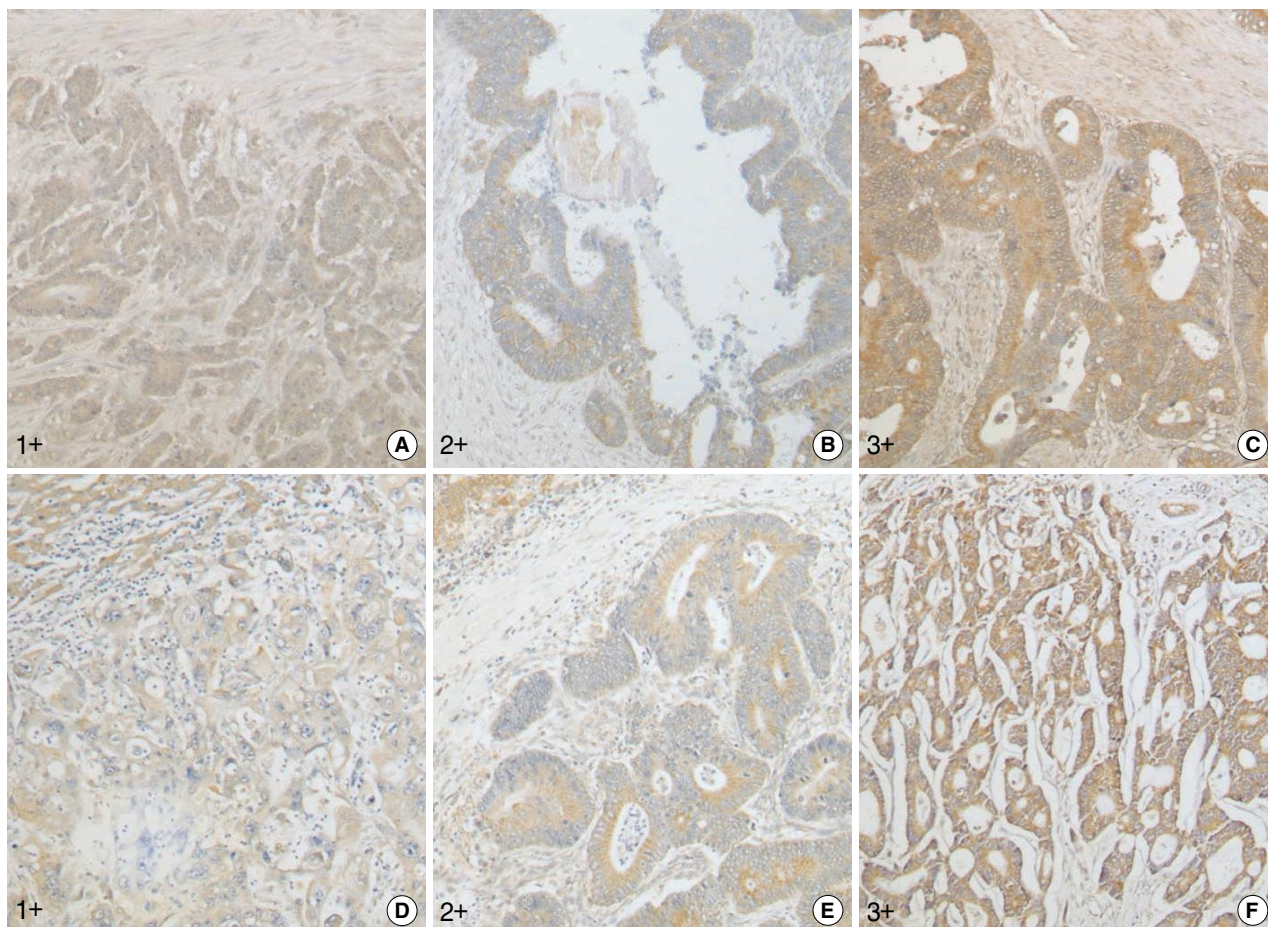


Fig. 1. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-A in colorectal cancer and liver metastasis. VEGF-A is expressed in tumor epithelial cells. (A-C) VEGF-A expression in colorectal cancer along with increasing immunoreactivity intensity. (D-F) VEGF-A expression in liver metastases along with increasing immunoreactivity intensity.

이는 예의 비율이 73.3%로, 간 전이암에서의 24.4%에 비해 훨씬 높게 나타났으며 이는 통계학적으로도 유의한 차이가 있었다($p < 0.001$) (Fig. 1). VEGFR-1의 경우에도 중양성과 강양성을 보이는 예의 비율이 원발 대장암에서 각각 31.1%와 40.0%로 간 전이에서의 17.8%와 0.0%에 비하여 유의하게 높았으며($p < 0.001$), VEGFR-2 역시 비슷하게 통계적으로 유의한 차이를 보였다($p < 0.001$) (Table 3, Figs. 2, 3).

면역조직화학염색상 CD34에 염색되는 미세혈관은 200배 시야에서 쉽게 확인되었으며 대부분 풍부한 미세혈관들을 관찰할 수 있었다(Fig. 4). 대조군과 전이군의 대장암에서 광학현미경과 화상분석장치를 이용하여 측정한 미세혈관 밀도에 있어서 대조군의 미세혈관 밀도는 $2.21 \pm 1.27\%$, 전이군의 미세혈관 밀도는 $4.45 \pm 2.28\%$ 로 전이군의 미세혈관 밀도가 통계학적으로 유의하게 높았다($p = 0.001$). 또한 전이군의 원발 부위와 간 전이에서 측정한 미세혈관 밀도는 각각 $4.45 \pm 2.28\%$, $2.24 \pm 0.84\%$ 로 원발 대장암에서의 미세혈관 밀도가 통계학적으로 유의하게 높았다($p = 0.001$) (Fig. 5).

혈관형성인자들 간의 연관성 및 혈관형성인자와 미세혈관 밀도와의 연관성

대조군과 전이군의 대장암 총 75예를 대상으로 발현된 혈관형성인자들 간의 연관성을 비교해보았을 때 VEGF-A의 발현 증가는 VEGFR-1, VEGFR-2 발현 증가와 유의한 관계를 보였으며($p = 0.013$, $p = 0.023$), VEGFR-1과 VEGFR-2의 발현 역시 통계학적으로 유의한 것으로 나타났다($p = 0.016$) (Table 4). 또한 혈관형성인자들의 발현이 증가할수록 미세혈관 밀도도 증가하는 경향을 보였다(Table 5).

혈관형성인자들과 임상병리학적 변수 간의 연관성

임상병리학적 변수에 따른 혈관형성인자들의 연관성을 확인하기 위한 비교에서 통계학적 편의를 위하여 VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2의 발현 정도를 두 그룹, 즉 약양성 이하(0-1+)를 저발현(low expression) 그룹, 중양성 이상(2+-3+)을 고발

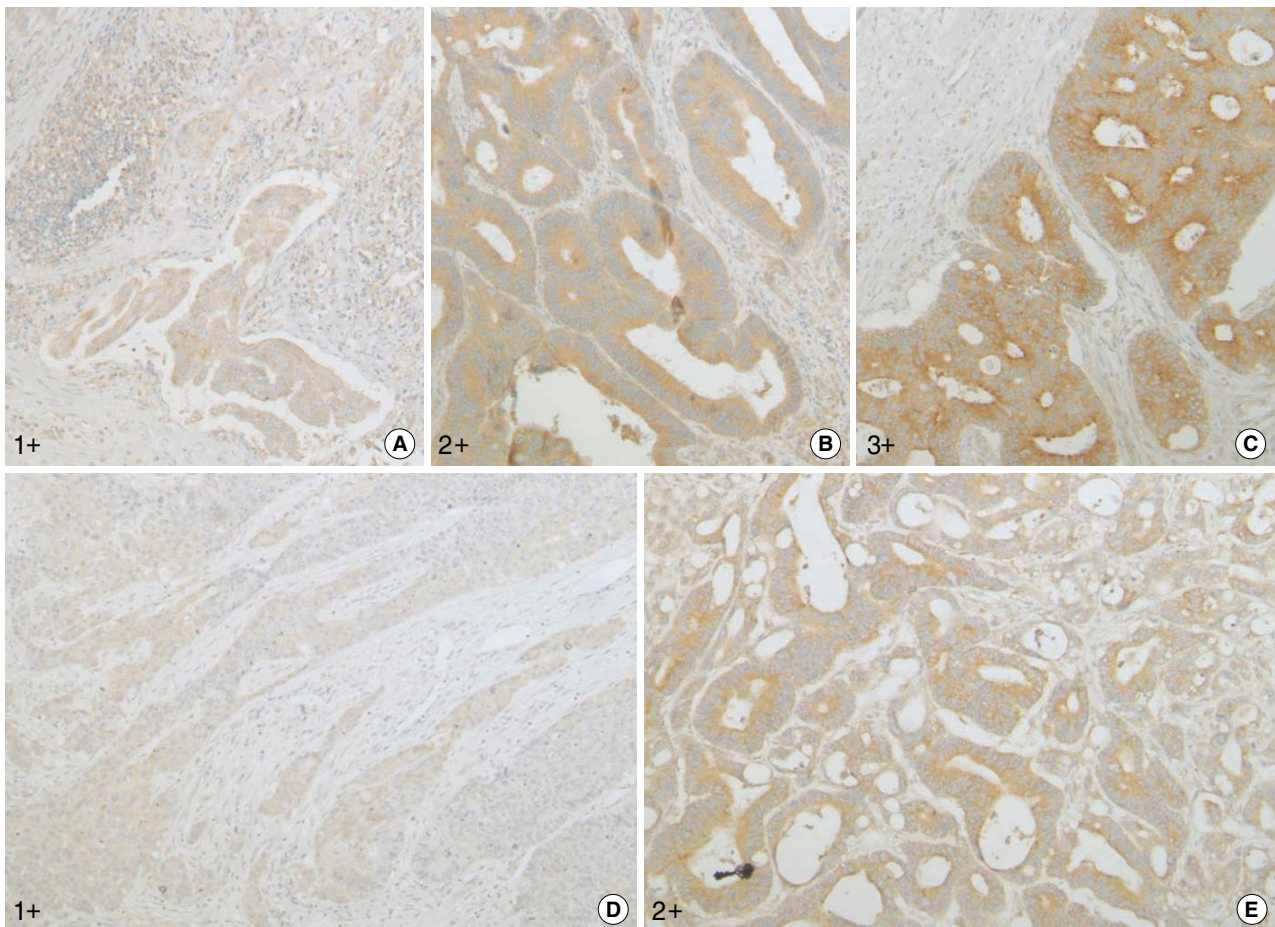


Fig. 2. Expression of vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-1 in colorectal cancer and liver metastases. (A-C) VEGFR-1 expression in colorectal cancer along with increasing immunoreactivity intensity. (D, E) VEGFR-1 expression in liver metastases along with increasing immunoreactivity intensity.

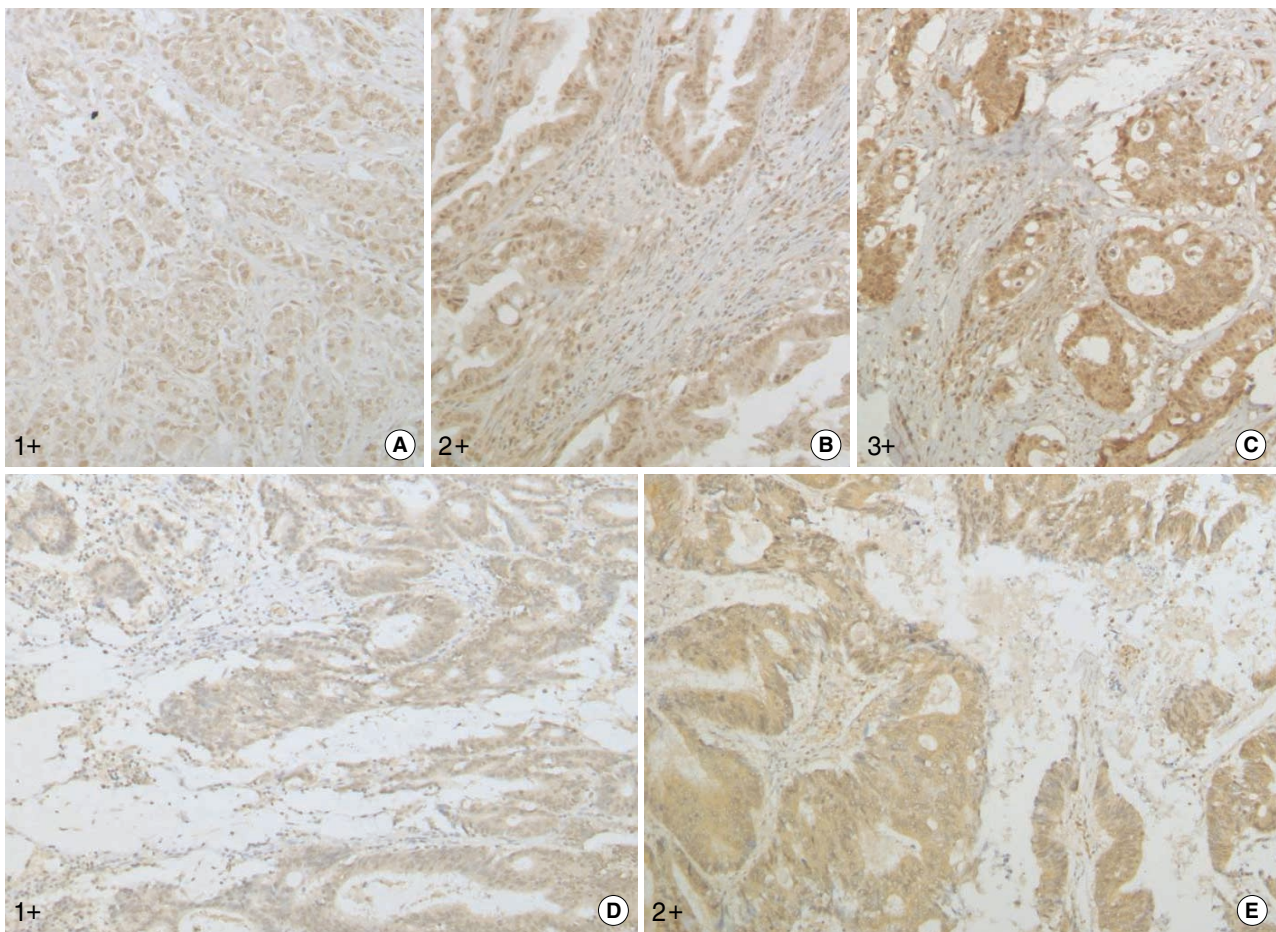


Fig. 3. Expression of vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-2 in colorectal cancer and liver metastases. (A-C) VEGFR-2 expression in colorectal cancer along with increasing immunoreactivity intensity. (D, E) VEGFR-2 expression in liver metastases along with increasing immunoreactivity intensity.

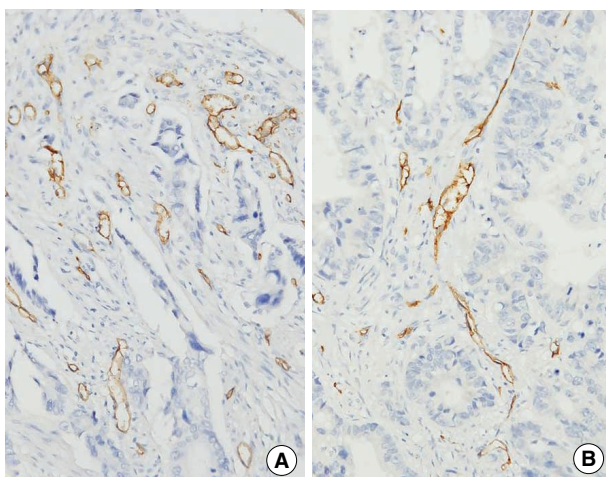


Fig. 4. Microvessel density in colorectal cancer and liver metastases. Microvessel distribution is manifested by CD34 immunohistochemical staining in colorectal cancer (A) and liver metastases (B). This photomicrograph reveals a higher number of microvessels in colorectal cancer than in liver metastases.

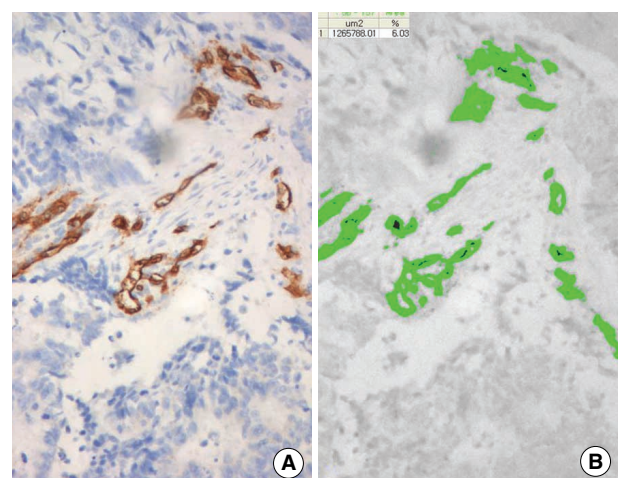


Fig. 5. Measure of microvessel density by the AnalySIS 3.2 program. (A) Vascular endothelial cells are CD34 positive. (B) Microvessels are highlighted in green fluorescent color and are calculated as a percentage of microvessel density per unit area.

Table 4. Association between vascular endothelial growth factor (VEGF)-A, VEGF receptor (VEGFR)-1, and VEGFR-2

	VEGF				Total	p-value
	0	1	2	3		
VEGFR-1						0.013*
0	0	1	0	0	1 (1.3)	
1	0	5	5	9	19 (25.3)	
2	1	3	7	18	29 (38.7)	
3	0	2	4	20	26 (34.7)	
Total	1 (1.3)	11 (14.7)	16 (21.3)	47 (62.7)	75 (100)	
VEGFR-2						0.023*
0	0	2	0	0	2 (2.6)	
1	1	9	10	30	50 (71.4)	
2	0	0	3	10	13 (17.3)	
3	0	0	3	7	10 (13.3)	
Total	1 (1.3)	11 (14.7)	16 (21.3)	47 (62.7)	75 (100)	
	VEGFR-1				Total	p-value
	0	1	2	3		
VEGFR-2						0.016*
0	0	0	1	1	2 (2.6)	
1	1	16	20	13	50 (71.4)	
2	0	3	5	5	13 (17.3)	
3	0	0	3	7	10 (13.3)	
Total	1 (1.3)	11 (14.7)	16 (21.3)	47 (62.7)	75 (100)	

Values are presented as number (%).

*p < 0.05.

현(high expression) 그룹으로 묶었으며, 임상병리학적 변수들도 두 그룹으로 단순화하여 분석하였다.

Table 5. Association between microvessel density and the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-A, VEGF receptor (VEGFR)-1, and VEGFR-2

	Microvessel density		Total	p-value
	≤ 3.5	> 3.5		
VEGF				0.028*
0	1	0	1 (1.3)	
1	10	1	11 (14.7)	
2	10	6	16 (21.3)	
3	26	21	47 (62.7)	
Total	47 (62.7)	28 (37.3)	75 (100)	
VEGFR-1				0.017*
0	1	0	1 (1.3)	
1	15	4	19 (25.3)	
2	19	10	29 (38.7)	
3	12	14	26 (34.7)	
Total	47 (62.7)	28 (37.3)	75 (100)	
VEGFR-2				0.019*
0	2	0	2 (2.6)	
1	36	14	50 (71.4)	
2	4	9	13 (17.3)	
3	5	5	10 (13.3)	
Total	47 (62.7)	28 (37.3)	75 (100)	

Values are presented as number (%).

*p < 0.05.

Table 6. Association between clinicopathological variables and the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-A, VEGF receptor (VEGFR)-1, and VEGFR-2 in colorectal cancer

		No. of cases	C-VEGF			C-VEGFR-1			C-VEGFR-2		
			Low	High	p - value	Low	High	p - value	Low	High	p - value
			12	63		20	55		52	23	
Age (yr)	≤ 60	31	4	27	0.75	6	25	0.23	19	12	0.21
	> 60	44	8	36		14	30		33	11	
Sex	Male	48	6	42	0.27	15	33	0.23	31	17	0.23
	Female	27	6	21		5	22		21	6	
Colon mass size (cm)	≤ 4.0	39	4	35	0.21	9	30	0.46	24	15	0.13
	> 4.1	36	8	28		11	25		28	8	
Primary cancer site	Proximal colon	16	1	15	0.42	6	10	0.27	13	3	0.36
	Distal colon	59	11	48		14	45		39	20	
Gross type	Fungating	57	10	47	0.72	12	45	0.05	38	19	0.56
	Infiltrative	18	2	16		8	10		14	4	
Differentiation	LG	63	11	52	0.68	16	47	0.72	43	20	0.75
	HG	12	1	11		4	8		9	3	
Lymphovascular invasion	Absent	53	10	43	0.49	14	39	0.94	39	14	0.22
	Present	22	2	20		6	16		13	9	
T stage	T2 + T3	50	8	42	1.00	11	39	0.20	36	14	0.60
	T4	25	4	21		9	16		16	9	
N stage	N0	18	2	16	0.72	2	16	0.13	9	9	0.04*
	N1 + N2	57	10	47		18	39		43	14	

*p < 0.05.

C-VEGF, colorectal cancer VEGF; LG, low grade; HG, high grade.

Table 7. Association between clinicopathological variables and the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-A, VEGF receptor (VEGFR)-1, and VEGFR-2 in liver metastases

		No. of cases	L-VEGF			L-VEGFR-1			L-VEGFR-2		
			Low (n = 23)	High (n = 22)	p - value	Low (n = 37)	High (n = 8)	p - value	Low (n = 43)	High (n = 2)	p - value
Age (yr)	≤ 60	21	12	9	0.45	16	5	0.32	21	0	0.49
	> 60	24	11	13		21	3		22	2	
Sex	Male	31	18	13	0.17	26	5	0.69	30	1	0.53
	Female	14	5	9		11	3		13	1	
Colon mass size (cm)	≤ 4.0	26	16	10	0.10	21	5	1.00	26	0	0.17
	> 4.1	19	7	12		16	3		17	2	
Liver mass size (cm)	≤ 2.5	23	15	8	0.053	20	3	0.46	22	1	1.00
	> 2.6	22	8	14		17	5		21	1	
Primary cancer site	Proximal colon	9	5	4	1.00	9	0	0.18	8	1	0.36
	Distal colon	36	18	18		28	8		35	1	
Gross type	Fungating	34	18	16	0.67	28	6	1.00	33	1	0.43
	Infiltrative	11	5	6		9	2		10	1	
Differentiation	LG	38	18	20	0.41	30	8	0.32	36	2	1.00
	HG	7	5	2		7	0		7	0	
Lymphovascular invasion	Absent	29	13	16	0.26	22	7	0.23	28	1	1.00
	Present	16	10	6		15	1		15	1	
T stage	T2 + T3	22	16	6	0.005*	20	2	0.24	22	0	0.49
	T4	23	7	16		17	6		21	2	
N stage	N0	11	8	3	0.17	9	2	1.00	11	0	1.00
	N1 + N2	34	15	19		28	6		32	2	
Liver mass type	Solitary	24	13	11	0.66	22	2	0.12	22	2	0.49
	Multiple	21	10	11		15	6		21	0	

*p < 0.05.

L-VEGF, liver metastases VEGF; LG, low grade; HG, high grade.

Table 8. Comparison of microvessel density in colorectal cancer and liver metastasis

		Colon			Liver		
		No. of cases	Mean	p-value	No. of cases	Mean	p-value
Total cases		75			45		
Age (yr)	≤ 60	31	3.49 ± 2.38	0.32	21	2.27 ± 0.91	0.78
	> 60	44	3.59 ± 2.12		24	2.20 ± 0.80	
Sex	Male	48	3.89 ± 2.38	0.033*	31	2.26 ± 0.85	0.81
	Female	27	2.96 ± 1.78		14	2.19 ± 0.87	
Colon mass size (cm)	≤ 4.0	39	3.60 ± 2.06	0.96	26	2.18 ± 0.85	0.61
	> 4.1	36	3.50 ± 2.40		19	2.31 ± 0.85	
Primary cancer site	Proximal colon	16	2.94 ± 2.08	0.82	9	2.00 ± 0.53	0.35
	Distal colon	59	3.72 ± 2.24		36	2.30 ± 0.90	
Gross type	Fungating	57	3.53 ± 2.28	0.90	34	2.22 ± 0.86	0.83
	Infiltrative	18	3.64 ± 2.07		11	2.29 ± 0.82	
Differentiation	LG	63	3.63 ± 2.30	0.48	38	2.29 ± 0.88	0.34
	HG	12	3.14 ± 1.78		7	1.95 ± 0.58	
Lymphovascular invasion	Absent	53	3.48 ± 2.08	0.28	29	2.37 ± 0.79	0.16
	Present	22	3.73 ± 2.58		16	2.99 ± 0.90	
T stage	T2 + T3	50	2.79 ± 1.54	0.001*	22	1.83 ± 0.48	0.001*
	T4	25	5.08 ± 2.60		23	2.63 ± 0.94	
N stage	N0	18	3.01 ± 1.80	0.23	11	1.98 ± 0.60	0.25
	N1 + N2	57	3.73 ± 2.32		34	2.32 ± 0.90	
Liver mass type	Solitary				24	2.08 ± 0.88	0.18
	Multiple				21	2.42 ± 0.79	

*p < 0.05.

LG, low grade; HG, high grade.

비교 결과 총 75예의 대장암에서 림프절 전이만이 VEGFR-2의 고발현과 연관이 있었으며($p=0.041$), 다른 임상병리학적 변수와 혈관형성인자들 간의 유의성은 보이지 않았다(Table 6). 또 45예의 간 전이에서는 종양병기(T stage)만이 VEGF-A의 고발현과 유의한 상관관계를 보였으며($p=0.005$)(Table 7), 전이군 내 원발 대장암의 경우 간 전이의 크기가 작은 그룹일수록 VEGFR-1과 VEGFR-2의 고발현 비율이 높게 나타났다($p=0.003$, $p=0.002$).

또한 종양병기 3인(T3, $n=48$) 예에서 대조군과 전이군의 혈관형성인자 발현은 VEGF-A, VEGFR-2가 전이군에서 고발현을 보였고($p=0.01$, $p=0.00$), 림프절병기 2인(N2, $n=31$) 예에서는 VEGF-A가 전이군에서 고발현을 보였는데($p=0.046$), VEGFR-2의 경우 통계적 유의성은 보이지 않았으나($p=0.058$) 전이군에서 더 높은 발현을 보이는 경향성이 있는 걸로 나타났다.

한편 임상병리학적 변수에 따른 대장암 미세혈관 밀도의 차이를 보았을 때 남성이 더 높은 미세혈관 밀도를 보였으며($p=0.03$), 종양병기가 높은 그룹에서 미세혈관 밀도가 더 높았다($p=0.001$). 간 전이에서 미세혈관 밀도의 경우도 종양병기가 높은 그룹에서 유의하게 높게 나타났다($p=0.001$)(Table 8). 그리고 종양병기가 3인 예(T3)에서 전이군의 미세혈관 밀도가 더 높았으며($p=0.016$), 림프절병기가 2인 예(N2)에서도 전이군의 미세혈관 밀도가 높았다($p=0.004$).

고 찰

대장암은 현재 우리나라에서 증가 추세에 있는 암 중 하나로 다른 장기로 전이를 잘 하는 암이다. 이 대장암은 주로 60 내지 70대에 호발하며, 50세 이전에 대장암이 발생하는 경우는 20% 미만으로 알려져 있다. 본 연구에서도 대조군과 전이군의 평균 연령이 각각 62.5세와 60.7세로 노년층에서 발생한 예가 다수 포함되어 있었고, 알려진 바와 같이 직장암과 S자 결장에서 발생한 예가 주로 많았다.

대장암은 주변 장기로 직접 침윤할 뿐 아니라 림프관과 혈관을 따라 간, 폐, 뼈 등으로 흔하게 원격 전이를 한다. 간은 두 가지 이유에서 원격 전이가 잘 되는데 그 이유는 첫째, 간으로 하부 식도, 위, 비장, 소장 등 복부 장기들의 정맥 혈류가 유입되어 여과되는데, 간이 차지하는 심장 박출량은 30%로 폐 다음으로 여과되는 혈류량이 많다는 것이다.

둘째, 생리학적으로 암세포 성장에 충분한 환경을 제공할 수 있는 간세포, 혈관내피세포, 쿠퍼(Kupffer)세포, 섬유모세포, 혈관주위세포, 염증세포 등이 다양하게 구성되어 있다는 것이다.¹⁵ 혈류에서 파괴되지 않은 암세포는 간에 도달해 성장을 하고, 이 전이된 암세포 주변의 동모양혈관 내피세포의 모세혈관화가 일어나는 과정을 거쳐 전이된 세포가 성장하게 된다.^{16,17} 이런 일련의 과정에 영향을 미치는 인자들에 대한 다양한 연구가 이루어

지고 있고 본 연구의 경우 혈관형성인자가 대장암이 간으로 전이할 때의 연관성 및 예후를 예측할 수 있는 표지자로서의 가능성을 확인하고, 대장암과 간 전이에서 혈관형성인자와의 연관성 뿐만 아니라 미세혈관 밀도와도 관계도 알아보려 하였다.

Cascinu 등¹⁸의 연구에 의하면 T2 대장 직장암에서 림프절 전이가 없는 군보다 림프절 전이가 있는 군에서 VEGF 증가를 보여 혈관형성인자가 림프절 전이와 관련이 있다고 하였다. 일부 연구에서는 VEGF-A가 직장, 결장암의 발생에 의미 있는 영향을 주지만, 림프절 전이나 원격 전이에는 영향이 적을 것이라고 보고하고 있다. 그러나 본 연구에서는 간 전이의 여부와 VEGF-A, VEGFR-2의 고발현이 연관이 있었으며, 미세혈관 밀도 역시 간 전이와 관련이 있는 것으로 나타났다.¹⁹

또한 Duff 등²⁰의 연구에 따르면 원발 대장암과 림프절 전이 사이에 VEGF-A, VEGFR-2의 발현은 연관성이 없고 간 전이에서 종양의 침윤 부위보다 VEGFR-2의 발현이 감소됨을 보고하고 있는데, 본 연구에서도 전이군의 원발 대장암과 간 전이 간 혈관형성인자와의 발현 차이는 간 전이가 아닌 원발 대장암에서 더 높게 나타났고, 미세혈관 밀도 역시 원발 대장암에서 더 높게 나타났다. Cascinu 등¹⁸의 연구에서도 다른 복부의 전이보다 간 전이의 경우 VEGF의 발현이 낮게 나타나는 것을 보여주었고, Dirix 등²¹은 대장암의 전이 양상에 따라 VEGF의 혈장 농도를 측정하여 전이 장소 간에 혈관형성인자 발현의 이형성이 있음을 확인하였다. 이런 이형성은 전이 장소에 따른 혈관 분포와 혈류량, 산소 공급 등 미세환경 상태에 따라 차이가 있기 때문으로 생각된다.²⁰ 특히 저산소 상태의 경우 VEGF의 발현이 높아지는데, 앞서 언급했듯 간은 폐 다음으로 여과되는 혈류량이 많은 장기이고, 암세포가 성장할 수 있는 산소와 영양분을 정맥과 동맥에서 동시에 공급을 받을 수 있으며 또 원래 구성되어 있는 동모양혈관 조직의 변형이 궁극적으로는 일반적인 신생혈관 등을 생성하여 산소와 영양분을 공급할 수 있는 다양한 기전을 가진 독특한 혈관구조를 가지고 있다. 따라서 저산소 상태라는 자극의 부족으로 VEGF의 합성이 억제되어 간 전이의 성장에 혈관형성인자가 끼치는 영향이 복막이나 림프절 등의 다른 전이 장소에 비해 감소되는 것으로 생각된다.^{18,22-24} 또한 임상병리학적 인자와 혈관형성인자와의 발현 연관성을 보았을 때, 종양병기가 높을수록 VEGF의 발현이 높고 미세혈관 밀도가 더 높게 나타나 혈관형성인자가 대장암의 성장 및 침윤과 연관이 있음을 알 수 있다.

본 연구 결과, 간 전이가 동반된 대장암의 경우 혈관형성인자나 미세혈관 밀도가 간 전이의 진행 정도를 확인할 수 있게 하는 연관성이 없어 간 전이 후 예후를 가늠할 수 있는 표지자로서의 가능성이 없는 것으로 생각된다. 그러나 간 전이의 여부에 따라 혈관형성인자나 미세혈관 밀도가 큰 차이를 보임으로써 낮은 병기의 대장암에서 높은 혈관형성인자의 발현이나 미세혈관 밀도가 전이를 예측하거나 나쁜 예후를 보여주는 표지자로서의 사용이 가능하다고 판단된다.

참고문헌

1. Shin MH, Oh HK, Ahn YO. Ten year trend of cancer incidence in Seoul, Korea: 1993-2002. *J Prev Med Public Health* 2008; 41: 92-9.
2. Bird NC, Mangnall D, Majeed AW. Biology of colorectal liver metastases: a review. *J Surg Oncol* 2006; 94: 68-80.
3. Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol* 2001; 2: 533-43.
4. Liu YN, Lee WW, Wang CY, Chao TH, Chen Y, Chen JH. Regulatory mechanisms controlling human E-cadherin gene expression. *Oncogene* 2005; 24: 8277-90.
5. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 4-6.
6. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; 86: 353-64.
7. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9: 669-76.
8. George ML, Tutton MG, Janssen F, *et al.* VEGF-A, VEGF-C, and VEGF-D in colorectal cancer progression. *Neoplasia* 2001; 3: 420-7.
9. Roskoski R Jr. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007; 62: 179-213.
10. Ono T, Miki C. Factors influencing tissue concentration of vascular endothelial growth factor in colorectal carcinoma. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 1062-7.
11. Wong MP, Cheung N, Yuen ST, Leung SY, Chung LP. Vascular endothelial growth factor is up-regulated in the early pre-malignant stage of colorectal tumour progression. *Int J Cancer* 1999; 81: 845-50.
12. Greene FL, Page DL, Fleming ID, *et al.* *AJCC cancer staging manual*. 6th ed. New York: Springer-Verlag, 2002.
13. Lee KH, Kim JH, Shim MK, *et al.* Expression of VEGF, MMP-9 and neovascularization in relationship to the clinical behavior of giant cell tumors of bone. *Korean J Pathol* 2006; 40: 420-6.
14. Bosari S, Lee AK, DeLellis RA, Wiley BD, Heatley GJ, Silverman ML. Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma. *Hum Pathol* 1992; 23: 755-61.
15. Takeda A, Stoeltzing O, Ahmad SA, *et al.* Role of angiogenesis in the development and growth of liver metastasis. *Ann Surg Oncol* 2002; 9: 610-6.
16. Terayama N, Terada T, Nakanuma Y. An immunohistochemical study of tumour vessels in metastatic liver cancers and the surrounding liver tissue. *Histopathology* 1996; 29: 37-43.
17. Terayama N, Terada T, Nakanuma Y. Histologic growth patterns of metastatic carcinomas of the liver. *Jpn J Clin Oncol* 1996; 26: 24-9.
18. Cascinu S, Graziano F, Catalano V, *et al.* Differences of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression between liver and abdominal metastases from colon cancer: implications for the treatment with VEGF inhibitors. *Clin Exp Metastasis* 2000; 18: 651-5.
19. Chun KS, Lee KH, Song IS, *et al.* Comparative analysis of vascular endothelial growth factor-A, C, D expression in colorectal cancer with liver metastasis. *J Korean Surg Soc* 2009; 76: 307-15.
20. Duff SE, Jeziorska M, Rosa DD, *et al.* Vascular endothelial growth factors and receptors in colorectal cancer: implications for anti-angiogenic therapy. *Eur J Cancer* 2006; 42: 112-7.
21. Dirix LY, Vermeulen PB, Hubens G, *et al.* Serum basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor and tumour growth kinetics in advanced colorectal cancer. *Ann Oncol* 1996; 7: 843-8.
22. Beckner ME. Factors promoting tumor angiogenesis. *Cancer Invest* 1999; 17: 594-623.
23. Dachs GU, Chaplin DJ. Microenvironmental control of gene expression: implications for tumor angiogenesis, progression, and metastasis. *Semin Radiat Oncol* 1998; 8: 208-16.
24. Fukumura D, Yuan F, Monsky WL, Chen Y, Jain RK. Effect of host microenvironment on the microcirculation of human colon adenocarcinoma. *Am J Pathol* 1997; 151: 679-88.