

## 갑상선 결절에 동반된 퇴행성 낭종의 재발과 낭액내 VEGF의 관련성

아주대학교 의과대학 외과학교실, <sup>1</sup>내분비내과학교실

조은호 · 박희봉 · 김현만<sup>1</sup> · 이관우<sup>1</sup> · 정윤석<sup>1</sup> · 소의영

### Vascular Endothelial Growth Factor in Cystic Fluid of Degenerative Cysts of Thyroid and Its Significance of Reaccumulation of Cystic Fluid Following Aspiration

Eun Ho Cho, M.D., Hee Boong Park, K.D., Hyun Man Kim, M.D.<sup>1</sup>, Kwan Woo Lee, M.D.<sup>1</sup>, Yun Suk Jung, M.D.<sup>1</sup> and Euy Young Soh, M.D.

**Purpose:** VEGF, a potent angiogenic factor, increases vascular permeability and induces the fluid accumulation in the peritoneal and pleural cavities. This study is designed to know whether the VEGF concentration are associated with the formation of cystic fluid of thyroid nodules and the results of treatment.

**Methods:** To know whether thyroid follicular cells produce VEGF, we measured the VEGF concentration in the conditioned medium after primary culture of the normal thyroid follicular cells (NT 1.0). Thirty seven patients, who had visited Ajou University Medical Center, were divided into two groups; group A (n=19) is patients whose cystic nodules disappeared completely with 1 or 2 times fine needle aspirations. In Group B (n=18), the cystic nodules recurred rapidly and required aspiration more than 3 times. Clinical records of patients were analyzed and compared with TSH and VEGF levels in cystic fluids.

**Results:** The VEGF concentration in basal conditioned medium were  $8.2 \pm 1.2$  ng/ml in NT 1.0 and  $8.2 \pm 0.6$  ng/ml in thyroid cancer cell line (FTC-133). NT 1.0 was not affected by TSH stimulation. Mean concentration of TSH of all cystic fluids was  $4.36 \mu\text{IU/ml}$  ( $0.13 \sim 21.7$ ) and there was no difference between 2 groups. Mean concentration of VEGF of all cystic fluids was  $140.7$  ng/ml ( $11.1 \sim 688.8$ ). The VEGF concentration ( $287.9 \pm 289.6$  ng/ml) in group B was significantly higher than that ( $104.2 \pm 97.1$  ng/ml) in group A ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** This study suggests that thyroid follicular cells produce and secrete VEGF, and VEGF is related with the accumulation of cystic fluid in degenerative cysts of thyroid. Cysts with high VEGF concentration promote rapid reaccumulation of the cystic fluid and possibly necessitate operation in selected patients. (Korean J Endocrine Surg 2002;2:25-30)

**Key Words:** Thyroid cyst, Vascular endothelial growth factor, Fine needle aspiration, Thyroid stimulating hormone

**중심 단어:** 갑상선 낭종, 혈관내피성장인자, 세침흡입천자, 갑상선자극호르몬

Departments of Surgery and <sup>1</sup>Endocrinology, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea

### 서론

갑상선 결절은 보고자에 따라 차이가 있으나 6~25%에서 낭성변화를 일으킨다.(1) 갑상선 낭종은 드물게는 갑상선암에서도 발견되나 대부분 선종성 갑상선 비대나 갑상선 선종에서 나타나는 소견으로 진단 및 치료의 목적으로 세침흡입천자를 이용하여 낭액을 제거한다.(2) 보고에 의하면 69~94%의 환자에서는 1~2차례의 천자로 낭액의 완전 소실이 있으나 어떤 경우는 계속적으로 낭액의 재축적이 이루어져 경화요법이나 수술을 시행하는 경우가 있다.(1,3,4) 이러한 낭종의 형성에 대해서는 명확히 알려진 바는 없으나 결절내로 분포하는 혈관 및 혈관의 투과성과 밀접한 관계가 있는 것 같다.

혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor; VEGF), 일명 혈관투과인자(vascular permeability factor; VPF)는 34~42 KDa의 당단백질로서 혈관내피세포에만 특이적으로 작용하는 분열유발인자(mitogen)로 종양의 신생혈관유도에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.(5-8) VEGF의 수용체는 tyrosine kinase 수용체군에 속한 것으로 세포막 표면에 면역글로불린과 유사한 5~7개의 고리를 가지면서 세포내 구조를 공유하며, 그 대표적인 수용체로 *flt-1*/KDR과 *flt-1*이 있다. VEGF는 세포막 수용체에 작용, pho-

책임저자 : 소의영, 경기도 수원시 팔달구 원천동 5번지  
☎ 442-721, 아주대학교 의과대학 외과학교실  
Tel: 031-219-5202, Fax: 031-219-5755  
E-mail: sohey@madang.ajou.ac.kr

게재승인일 : 2002년 6월 5일

본 논문은 2002년도 제8차 아시아내분비외과학회에서 발표하였음.

spholipase C system을 활성화시켜 혈관내피세포를 증식시키고 미세혈관의 투과성을 증가시켜 혈장단백을 배출시키고 섬유소를 침착시켜 새로운 혈관이 형성되는 것을 돕는다. 또한 가장 강력한 혈관투과인자의 하나로 히스타민에 비해 1,000배에 달하는 투과도 증가효과를 보인다고 하며,<sup>(9)</sup> Senger등<sup>(9)</sup>과 Yano등<sup>(10)</sup>은 VEGF가 혈관의 투과성을 증가시켜 복강과 흉강 내에서 체액의 축적을 증가시킴을 보고한 바 있다.

따라서 본 연구자는 갑상선 결절 내의 낭액축적에 VEGF가 관여할 수 있다는 가정하에, 낭종을 동반한 양성 갑상선 종양 환자를 대상으로 낭액의 VEGF를 측정하여 이의 임상적인 의의를 조사하여 보았다.

## 방 법

### 1) 연구 대상

아주대학교병원에 내원한 갑상선 결절 환자들 중 초음파검사 결과 낭성변화를 동반한 환자들을 대상으로 하였다. 이들 환자들 중 현재 갑상선호르몬 억제요법 중이거나 경화요법을 받은 적이 있는 경우, 조직검사 결과 악성인 경우는 대상환자에서 제외하고 총 37명을 대상으로 하였다. 환자는 초진 시 혈청 내 T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, 갑상선자극호르몬(thyroid stimulating hormone; TSH), 초음파검사 또는 갑상선 주사(thyroid scan)를 시행하였고, 낭액 또는 종양에 대한 세침흡입조직검사를 시행하여 악성의 유무를 확인하였다.

대상 환자를 세침천자흡입술 후 낭액소실의 유무에 따라 두 군으로 나누었는데, 1~2회의 시술로 낭액이 완전히 소실된 군을 A군으로, 낭액의 재발로 3회 이상의 시술이 필요하거나 경화술이 필요한 경우를 B군으로 하였다. 낭액의 재발여부에 대한 판정에 있어서 추적기간은 1년 이상으로 하였으며, 신체검진 결과 낭종이 축적되지 않거나 초음파 검사에서 낭종이 소실된 경우는 완전한 소실로 판정하였다. 각 군의 분류에 있어서 추적관리가 되지 않았거나 낭액의 재발판정이 모호한 경우는 제외되었다.

### 2) 연구의 방법

먼저 갑상선세포에서 VEGF가 분비되는지를 확인하기 위하여 정상갑상선세포인 NT 1.0을 일차 배양하여 배지내의 VEGF 농도를 측정하였고, 양성대조군으로 갑상선세포상세포주인 FTC-133 (Goretzki 제공, Germany)와 대장암세포주인 Colo-201 (ATCC, USA)을 비교하였으며, 아울러 TSH가 첨가된 배지에서의 변화를 비교하였다. 실제 연구의 대상이 되는 A군과 B군 환자들의 낭액내에서는 VEGF와 TSH를 각각 측정하여 비교하여 보았다.

(1) 갑상선세포주의 배양과 보존: 세포배양에 필요한 갑상선 조직은 수술 중 1 gm 정도의 조직을 얻어 실온 상태의 Dulbecco's Modified Eagle's Media (DMEM)가 들어있는

멸균된 culture tube에 넣은 후 10분 이내에 1차배양을 시행하였다. 갑상선 조직을 멸균된 petri dish에서 약 0.5 cm<sup>3</sup>의 크기로 자른 후 3 ml PBS buffer를 넣은 petri dish에 자른 조직절편을 옮기고 1 mm<sup>3</sup>의 크기로 잘게 잘랐다. 자른 조직과 PBS를 15 ml sterile polyethylene tube로 옮기고 사용한 petri dish를 다시 7 ml PBS로 씻은 후 같은 tube에 옮겼다. 2,000 rpm에서 5분간 원심분리 후 상층액을 버리고 남아있는 pellet을 10 ml PBS로 재분탕 후에 2,000 rpm에서 5분간 다시 원심분리하고 상층액은 버렸다. 10 ml collagenase 용액으로 재분탕 후에 magnetic stir bar가 있는 sterile erlenmeyer flask로 옮긴 후 37°C water bath에서 stir/incubation하였다. 배양 후 15 ml polyethylene tube로 옮긴 후 2,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상층액을 제거하고 pellet을 10 ml 시작배지(starting media)로 재분탕하였다. Culture flask로 옮긴 후 항온기(incubator) 내에서 24~48시간 배양 후 flask 바닥에 세포의 유착이 있으면 배양액을 버리고 보존배지(maintenance media)로 교환한 후 계속 배양하였다. 갑상선세포들은 일반적인 배양 조건인 5%CO<sub>2</sub>, 95% 습도, 37°C 항온기 내에서 배양하였으며 80~90%의 confluency에 이르면 계대배양시키거나 dimethyl sulfoxide 처리 후 액화질소내에 보관하였다.

Maintenance media: DME/F-12+10% FBS+TSH (10 mU/ml)+Insulin (10µg/ml)+Penicillin (50 mU/ml)+Streptomycin (50µmole/ml)+Fungizone (250µg/ml)

Starting media: Same with maintenance media except 20% FBS instead of 10% FBS

(2) 조건화배지(conditioned medium)의 조성: TSH의 영향을 배제하기 위하여 갑상선 세포주를 TSH가 포함되지 않은 각 well당 200µl의 10% FCS+DMEM/F12 배양액을 넣은 96well plate에 1×10<sup>5</sup> cell/well 분주하고 24시간 배양하였다. 다음에 10% FCS, insulin, glutamine이 포함된 DMEM/F12에 10 mIU/ml TSH를 첨가한 배양액과 첨가하지 않은 배양액 내에서 배양하였다. 7일 후 배양액을 채취하여 12,000 rpm/min에서 원심분리 후 상층액을 얻어 실험에 이용하였다.

(3) VEGF의 측정: VEGF를 측정하기 위하여 Quantitative human VEGF immunoassay kit (R&D system, Minneapolis, USA)를 이용하였다. Assay diluent 50µl을 각 well에 분주 후 VEGF standard와 보관된 표본 200µl을 각 well에 옮겼다. 실온에서 2시간 방치 후 wash buffer 400µl로 3회 세척 후 VEGF conjugate 200µl을 각 well에 분주하였다. 실온에서 2시간 방치 후 3회 세척한 후 200µl의 substrate solution (hydrogen peroxide mixed with equal volume of chromogen)을 각 well에 분주하고 실온에서 20분간 방치 후 stop buffer (2N sulfuric acid) 50µl을 각 well에 분주 후 450 nm에서 OD 값을 측정하였다. 모든 표본은 3배수로 측정을 하였다.

(4) 낭액의 채취 및 보관: 24 gage 주사침을 이용하여 초음파 유도하에서 종양내의 낭액을 모두 추출한 후 3,000 rpm에서 15분간 원심분리 후 상층액은 -20°C에 보관하고, 침전물은 병리조직검사를 위하여 이용하였다.

(5) 통계분석: 통계처리는 SPSS 프로그램을 이용하여 단변량분석에서 범주형 변수는 chi square test, 연속변수는 student t-test를 시행하였고, 각 수치는 평균±표준편차로 표시하였으며, 유의수준은 0.05로 하였다.

결 과

1) 갑상선 낭종 환자의 임상 특성

대상환자 37명 중에서 A군은 19명(남 : 여=4 : 15), B군은 18명(남 : 여=3 : 15)였으며, 나이는 A군은 42.6±13.4세, B군은 41.8±12.6세로 두 군 간의 성별과 나이의 통계학적인 차이는 없었다. 혈청 TSH는 A군이 1.47±0.8μIU/ml, B군이 1.59±1.1μIU/ml였고, 세침천자흡입술 또는 수술을 통한 진단에서 A군은 갑상선 선종성 비대와 갑상선 선종이 각각 17예와 2예, B군은 각각 15예와 3예로 진단상의 유의한 차이가 없었다. 갑상선 결절의 크기는 A군은 2.84±1.17 cm, B군은 3.50±1.50 cm이었고, 흡입된 낭액의 양은 A군은 7.42±7.58 ml, B군은 8.89±7.32 ml로 두 군 간의 결절의 크기나 낭액의 양에 있어서도 통계학적인 유의성은 없었다(Table 1).

Table 1. Clinical features between groups

Variables	Group A <sup>a</sup>	Group B <sup>b</sup>	Significance
Sex (Male : Female)	4 : 15	3 : 15	NS*
Age	42.6±13.4	41.8±12.6	NS
Cyst size (cm)	2.84±1.17	3.50±1.50	NS
Aspiration amount (ml)	7.42±7.58	8.89±7.32	NS
Diagnosis (AG <sup>c</sup> : TA <sup>d</sup> )	17 : 2	15 : 3	NS

\* = statistically not significant (P>0.05); a = complete disappearance of cyst with 1~2 aspirations; b = recurrent cyst after aspirations more than 3 times; c = adenomatous goiter; d = thyroid adenoma.

Table 2. VEGF secretion of thyroid cells

	NT 1.0	FTC-133	Colo-201
TSH (-)	8.2±1.2	8.2±0.6	1.9±0.2
TSH (+) <sup>a</sup>	9.8±2.1	17.9±0.7*	2.0±0.2

Values are mean±SD (ng/ml). a = 10μIU/ml TSH in culture medium. \* = P<0.01 compared with TSH-negative culture medium.

2) 각 세포주의 VEGF의 분비

갑상선여포세포에서 VEGF가 분비되는지를 확인하기 위하여 NT-1과 양성대조군인 FTC-133와 Colo-201의 조건화 배지 내의 VEGF의 농도를 측정하였다. NT 1.0과 FTC-133은 Colo-201에 비하여 모두 높은 농도의 VEGF가 분비되었다. TSH의 자극이 없는 경우 NT 1.0과 FTC-133 간의 VEGF의 농도는 유의있는 차이가 없었으나, TSH의 자극이 있는 경우 FTC-133가 NT-1.0에 비하여 유의 있게 높았다(Table 2).

3) 낭액내 VEGF의 농도

A군과 B군의 VEGF는 각각 104.2±97.1 ng/ml, 287.9±269.6 ng/ml로 통계학인 차이가 있었다(Fig. 1).

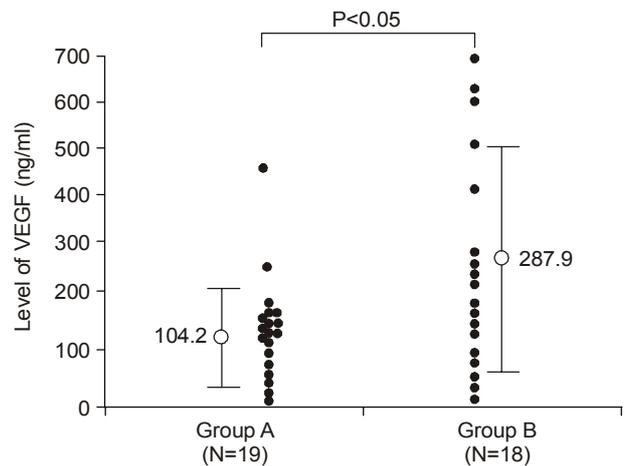


Fig. 1. VEGF concentrations in cystic fluid of regressing group (A) and recurrent group (B).

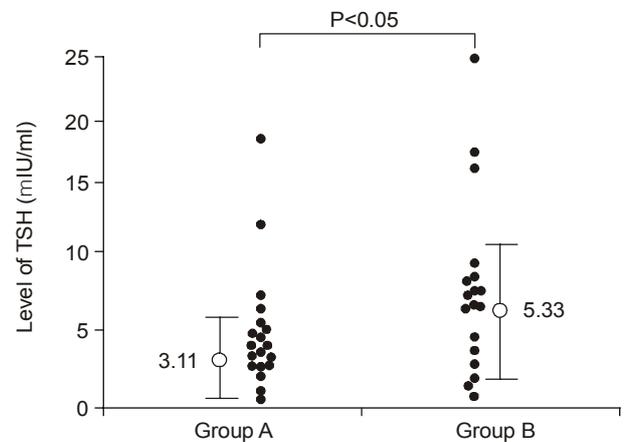


Fig. 2. TSH concentrations in cystic fluid of regressing group (A) and recurrent group (B).

4) 낭액내 TSH의 농도

A군과 B군의 TSH는 각각  $3.11 \pm 4.54 \mu\text{IU/ml}$ ,  $5.33 \pm 6.19 \mu\text{IU/ml}$ 로 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 2).

고 찰

Viglieto등(11)은 갑상선여포세포에서 VEGF-mRNA가 발현되며 anti-VEGF antibody를 이용한 면역조직화학염색 결과 갑상선암 조직이 정상조직에 비하여 더욱 강하게 표현됨을 보고하였다. 본 연구에서 일차 배양한 NT 1.0에서 측정된 VEGF는  $8.2 \pm 1.2 \text{ ng/ml}$ 로 FTC-133와는 유사하였으나 Colo-201에 비하여는 의의 있게 높게 분비됨을 관찰할 수 있었다. 또한 TSH로 자극 시 NT 1.0은 FTC-133와는 달리 VEGF의 분비에 영향을 받지 않았다. 낭성변화를 일으킨 양성종양이 정상세포와 같이 VEGF의 분비에 있어 TSH의 영향을 받지 않는지 악성종양과 같이 영향을 받는지는 확실치 않으나 정상갑상선, 양성갑상선종양, 갑상선암에서 면역조직화학염색을 이용하여 VEGF의 발현을 보고한 Soh등(12)의 결과를 보면 양성종양은 정상조직과 유사하게 VEGF가 표현되어 양성종양 세포의 VEGF 분비도 정상 갑상선 조직과 같이 TSH의 영향을 받지 않는 것으로 생각된다.

본 연구에서 측정된 갑상선낭액의 VEGF는 평균  $140.7 \text{ ng/ml}$ 로 증식성 또는 비증식성 당뇨병성 망막증 환자의 안액(각각  $3.3 \pm 6.3 \text{ ng/ml}$ ,  $0.1 \pm 0.1 \text{ ng/ml}$ )이나,(13) 류마티즘 환자의 활액( $6.9-180.5 \times 10^{-12} \text{ M}$ ) 등(14) 다른 체액에서의 보고보다 높았으며, 낭종성 뇌종양에서의 낭액내 농도( $20 \sim 163 \text{ ng/ml}$ )와(15) 유사한 결과를 보였다. 이와 같은 결과는 갑상선 낭종의 형성에 VEGF가 관련될 가능성이 있음을 시사한다.

갑상선 낭종의 형성과정에 대해서는 명확히 알려진 바는 없으나 결절 내로 분포하는 혈관과 밀접한 관계가 있는 것 같다. 첫째, 갑상선 결절 내로 분포하는 혈관들은 혈관벽이 얇고 결절조직의 지지가 없기 때문에(16) 결과적으로 결절 내의 혈관은 쉽게 터져 결절의 중심부에 혈성변성(hemorrhagic degeneration)을 일으켜 낭종을 형성하는 것으로 여겨진다. 둘째, 종양이 생존성(viability)을 유지하고 계속 성장하기 위해서는 이에 필요한 산소와 영양분의 공급이 있어야 하며, 불필요한 대사산물을 배출하여야 한다. 따라서 지속적으로 종양 내로 새로운 혈관의 형성이 있어야 한다. 그러나 종양의 성장이 신생혈관의 증식에 비하여 빠른 경우 혈관분포가 적은 부위에 산소, 포도당 및 PH가 감소하고 젖산염(lactate)이 증가하는 등 대사성 긴장(metabolic stress)부위가 생기게 되며 이 부위의 종양세포는 증식이 억제된다.(17) 이러한 허혈이 지속되면 지속적인 대사성 긴장으로 인해 종양세포가 생존하지 못

하고 apoptosis 또는 괴사를 일으키며 이로 인하여 낭종을 형성할 수 있을 것으로 보인다. 일단 형성된 낭종은 주위에서 계속적인 체액의 유출과 흡수가 일어나게 되며 흡수에 비하여 유출이 많은 경우 낭종의 크기가 증가한다. 이러한 체액의 유출은 결절 내 혈관의 투과성(permeability)과 밀접한 관계가 있는 것으로 생각된다.

Senger등(18)은 guinea pig에서 혈관투과를 증가시키는 단백질을 부분적으로 정제(purification)하여 이를 혈관투과인자(vascular permeability factor)라 명명하였으며, 이는 후에 Keck등(19)이 VEGF와 같은 물질임을 밝혀냈다. VEGF가 갑상선낭종의 형성에 미치는 영향에 대한 직접적인 연구보고는 없었지만, 여러 가지 각각 다른 낭종의 형성에 관련된 연구보고들이 있다. Gordon 등(20)은 난소낭종에 관한 연구에서 성선자극호르몬의 주기적인 변화에 따라 반복적으로 증가되는 VEGF가 난소 내의 혈관형성과 혈관투과도를 증가시키며 이로 인하여 낭종이 형성된다고 하였으며, 이와 함께 난소낭종 환자에서 종종 나타나는 복강 내 삼출액의 형성도 이와 관련이 있다고 하였다. Leung등(21)은 모낭성상세포종의 연구에서 괴사된 조직 주변의 종양세포군에서 VEGF mRNA가 높게 발현되고, 분비된 VEGF는 낭종 및 종양의 성장을 촉진한다고 하였다.

일단 낭종이 형성되면 주위 갑상선세포에서 분비된 VEGF는 낭액내에 존재하게 되며, 이는 주위 혈관의 투과성을 증가시켜 지속적으로 낭액의 축적을 가져오게 된다.(22) 본 실험을 통하여 낭액내 VEGF가 높은 경우 지속적인 천자에도 계속 재발됨을 관찰할 수 있었다. 1회 내지 2회의 천자로 낭종이 소멸된 환자의 낭액내 평균 VEGF는  $104.2 \pm 97.1 \text{ ng/ml}$ 이었으나, 3회 이상 계속 천자를 하여도 재발한 환자의 평균 VEGF는  $287.9 \pm 296.6 \text{ ng/ml}$ 로 의의 있는 차이를 보였다. 이와 같은 결과는 낭종 내 VEGF의 농도에 따라 낭액의 축적에 차이가 있음을 보여주며 VEGF의 농도가 높을수록 낭액의 축적이 증가하여 통상적인 천자만으로는 치료가 되지 않음을 시사한다고 하겠다. 양성 갑상선낭종은 1회 내지 2회의 천자로 치료할 수 있다고 보고되나,(4,16) 다른 연구자는(23) 60% 이상에서 실패한다고 하였다. 또한 대부분의 갑상선낭종은 양성이나 3차례 이상 천자하여도 재발하는 경우는 악성의 가능성이 높다.(1) 따라서 갑상선낭종의 치료 시 재발가능성 유무를 판정할 수 있다면 불필요한 반복적인 천자를 피할 수 있으며, 본 연구 결과는 이러한 판정 근거의 하나로 제시될 수 있을 것으로 생각된다.

최근 종양의 예후인자로서 VEGF의 효용성에 대한 연구가 활발하다. 뇌, 난소, 유방, 폐 및 소화기 등의 종양에서 종양의 악성도는 VEGF의 발현과 비례한다고 보고되고 있으며, VEGF의 생성을 억제함으로써 종양의 성장과 전이를 억제하려는 시도들이 이어지고 있다. 이러한 점에 착안하여 낭종의 형성에 관여하는 VEGF의 역할에 대해

여도 더 많은 연구가 필요하다고 생각되며, VEGF가 유발하는 혈관투과도 증가를 차단하려는 시도 등은 향후 반복적인 낭성변화를 갖는 갑상선결절의 치료에 중요한 자료가 될 수 있을 것으로 보인다. 또한, 갑상선낭종의 초기 치료에 있어서 VEGF의 농도가 높을수록 재발의 가능성이 높으므로, 반복적인 세침천자흡입술보다는 수술 등의 적극적인 방법이 선택되어야 할 것으로 생각된다.

**결 론**

본 연구에서 VEGF는 갑상선여포세포에 의해 분비됨을 확인하였다. 낭성변화를 갖는 갑상선 결절의 낭액에서 VEGF의 높은 농도가 확인되었으며, 낭액의 재축적이 일어나는 군이 낭액소실이 쉽게 일어나는 군보다 유의하게 높은 VEGF의 농도를 보였다. 이러한 결과는 VEGF가 갑상선 결절의 낭액형성에 기여하며, 낭액의 재축적 여부에 대한 지표로 이용될 수 있음을 의미한다. 본 연구결과 갑상선 결절의 낭종 재발군에서 낭액내 VEGF 농도가 높으므로 낭액내 VEGF가 높다면 반복적인 세침천자흡입술보다는 수술 등의 적극적인 치료가 필요하다고 생각된다. 더 많은 증례를 통한 낭액에서의 VEGF에 대한 앞으로의 보다 많은 연구는 낭종을 동반한 갑상선 결절의 이해와 치료에 많은 도움이 될 것으로 생각된다.

**REFERENCES**

- 1) Clark OH. Commentary. In: HamburgerJI and Miller JM, editors. Controversies in clinical thyroidology. New York: Springer-Verlag; 1981. p.218-225.
- 2) Drose M. In: Cytologic Aspiration Biopsy of the Thyroid gland. 2nd ed. Stuttgart, F.K.Schattauer-Verlag, 1980. p.55-79.
- 3) Crile G. Treatment of thyroid cysts by aspiration. Surgery 1966;59:210-112.
- 4) Miller JM, Zafar SU, Karo JJ. The cystic thyroid nodule: Recognition and management. Radiology 1974;110:257-261.
- 5) Chaplin DJ, Trotter DJ, Dougherty GJ. Microregional tumor blood flow: heterogeneity and therapeutic significance. In: Bicknell R, Lewis CE and Ferrara N, editors. Tumor Angiogenesis. Oxford, Oxford University Press; 1997. p.61-71
- 6) Jakeman LB, Altar CA, Winter J, Bennett GL, Ferrara N. Binding sites for vascular endothelial growth factor are localized on endothelial cells in adult rat tissues. J Clin Invest 1992;89:244-253.
- 7) Shinbuya M. Role of VEGF-Flt receptor system in normal and tumor angiogenesis. Adv Cancer Res 1995;67:281-289.
- 8) Brock TA, Dvorak HF, Senger DR. Tumor-secreted vascular permeability factor increase cytosolic Ca<sup>2+</sup> and von-Willebrand factor release in human endothelial cells. Am J Pathol 1991; 138:213-220.

- 9) Senger DR, Galli SJ, Dvorak HF. Tumor cell secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascite fluid. Science 1983;219:983-986.
- 10) Yano S, Shinohara H, Kuniyasu H, Bucana CD, Ellis LM, Fidler IJ. Production of experimental malignant pleural effusion is dependent on invasion of pleura and expression of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor by human lung cancer cells. Am J Pathol 2000;157:1893-1903.
- 11) Viglietto G, Maglione D, Rambaldi M, Cerutti J, Romano A, Trapasso F, et al. Upregulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) and down regulation of placental growth factor (PLGF) associated with malignancy in human thyroid tumors and cell lines. Oncogene 1995;11:1569-1579.
- 12) Soh EY, Duh QY, Sobhi SA, Young DM, Epstein HD, Wong MG, et al. Vascular endothelial growth factor expression is higher in differentiated thyroid cancer than in normal and benign thyroid. J Clin Endocrinol Metab 1997;82:3741-3747.
- 13) Aiello LP, Avery RL, Arrig PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. N Engl J Med 1994;331:1480-1487.
- 14) Fava RA, Olsen NJ, Sopencer-Green G, Yeo KT, Berse B, Jackman RW, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF): accumulation and expression in human synovial fluids and rheumatoid synovial tissue. J Exp Med 1994;180:341-346.
- 15) Weindel K, Moringlane JR, Marine D, Weich HA. Detection and quantification of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in brain tissue cyst fluid: the key to angiogenesis? Neurosurgery 1994;35:439-449.
- 16) Goetsch E. Newer methods in the diagnosis of thyroid disorders: Pathological and clinical. N.Y State J Med 1918;18: 259-267.
- 17) Leung DW, Cachianes G, Kuang W-J, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial factor is a secreted angiogenic mitogen. Science 1989;246:1306-1309.
- 18) Senger DR, Connolly DT, Van de Water L, Feder J, Dvorak HF. Purification and NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequence of quinea pig tumor-secreted vascular permeability factor. Cancer Res 1990;50:1774-1778.
- 19) Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, et al. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. Science 1989;246:1309-1312.
- 20) Gordon JD, Mesiano S, Zaloudek CJ, Jaffe RB. Vascular endothelial growth factor localization in human ovary and fallopian tubes: possible role in reproductive function and ovarian cyst formation. J Clin Endocrinol Metab 1996;81: 353-359.
- 21) Leung SY, Chan Annie SY, Wong MP, Yuen ST, Cheung N, Chung LP. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor in pilocystic astrocytoma. Am J Surg Pathol 1997;21:941-950.

- 22) Sato K, Miyakawa M, Onoda N, Demura H, Yamashita T, Miura M, et al. Increased concentration of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in cyst fluid of enlarging and recurrent thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:1968-1973.
- 23) Miller JM, Hamburger JI, Taylor CI. Needle aspiration of cystic thyroid nodule: Effective and safe treatment? In: Hamburger JI and Millor JM, editors, *Controversies in clinical thyroidology*. New York, Springer-Verlag; 1981. p.209-217.
-