

# 난소암 환자에서 혈청 VEGF(vascular endothelial growth factor) 측정의 유용성에 관한 연구

이화여자대학교 의과대학 산부인과학 교실  
문혜성 · 김승철

=Abstract=

## Clinical value of Serum Vascular Endothelial Growth Factor(VEGF) in Ovarian Cancer Patients

Hye-Sung Moon M.D., Seung-Cheol Kim M.D.

Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Ewha Womans University, Seoul, Korea

**Objectives:** Angiogenesis is a critical factor in the growth, progression, and metastatic spread of solid tumors. Angiogenic factors are soluble molecules released by the tumor itself and are able to induce an angiogenic response. Vascular endothelial growth factor(VEGF) is a multifunctional cytokine that has been shown to be an important regulator of tumor angiogenesis. The aim of this study was to determine the value of serum VEGF levels in the diagnosis of ovarian cancer and in the differential diagnosis of adnexal masses. And we questioned whether the serum VEGF levels are related to cancer stages and prognosis of patients.

**Methods:** Serum samples were taken from 85 patients; healthy women(n=15), the patients with benign ovarian cyst(n=36), and the patients with ovarian cancer(n=34). The concentration of VEGF, CA-125, and CA 19-9 were determined in the serum of each patients before and after treatment with an enzyme linked immunoassay(EIA).

**Results:** There are statistical differences among the serum VEGF levels in patients with ovarian cancer( $491.5 \pm 335.6$  pg/ml), and benign ovarian cyst ( $247.7 \pm 183.6$  pg/ml)( $p < 0.05$ ). The patients undergoing cancer therapy had lower values than those without cancer therapy( $p < 0.05$ ). The serum VEGF levels were not correlated with the cancer stages and histologic types( $p > 0.05$ ).

**Conclusion:** The serum VEGF level appears to be a helpful tool in the differential diagnosis of ovarian cancer and may help in predicting the therapeutic effects of patients with ovarian cancer.

**Key Words:** Serum VEGF, Ovarian cancer, Angiogenesis

## I. 서 론

맥관형성(angiogenesis)은 기존에 존재하는 혈관에서부터 신생혈관이 형성되는 과정으로<sup>1,3)</sup> 이 과정은 내피세포의 이동, 증식, 분화와 함께 세포의 기질

의 단백질 분해과정 등 다양한 과정에 의해 일어나며 생리적이거나 병리적, 양측에서 일어나는 생물학적 과정에 중요한 역할을 담당한다.<sup>4)</sup>

암화과정에서는 맥관형성 자극요소와 저해요소의 균형이 깨지면서 빠른 혈관형성이 유도된다.<sup>5)</sup> 암의 성장은 두 단계의 과정을 거치는데<sup>3,6,7)</sup> 첫 단계는

암의 성장이 제한된 종양에 해당하는 혈관형성 전 단계로 수년간 지속되며 전이되지 않는다. 둘째 단계는 혈관형성 단계로 암의 빠른 성장과 전이로 특징지어진다. 따라서 고형성 암의 침윤과 전이에서 맥관형성은 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.<sup>7)</sup> 난소암에서 맥관형성의 기전은 정확히 알려져 있지 않지만<sup>8)</sup> 난소암 종괴를 형성하기 위해서는 맥관형성이 필요하다고 하며 난소암의 맥관형성의 정도는 난소암 환자의 예후와 관계있다고 보고되었다.<sup>9,10)</sup>

VEGF(vascular endothelial growth factor, vascular permeability factor, VPF)는 분자량 46,000의 이중체 단백질로서 내피세포에 특이하게 작용하는 유사분열물질이다.<sup>11,12)</sup> VEGF는 미세혈관의 투과성을 증가시켜 혈장 단백질의 혈관의 유출과 기질의 변화에 관여한다.<sup>12)</sup> 유방암이나 뇌암, 폐암 등의 악성종양에서 VEGF 발현이 증가함을 발견함으로써 암의 성장에 관여한다고 하였다.<sup>13,14)</sup> nude mice에 흑색종(melanoma) 세포를 투여시 암세포의 VEGF 발현이 증가함으로써 암의 성장, 맥관형성, 전이 등의 과정이 활성화시킨다는 것이 보고되었다.<sup>15)</sup>

VEGF는 용해성 성장인자로 조직병리적 성격이 다른 여러 부위의 암에서 발현된다고 알려져 있을 뿐만 아니라 특히, 혈청 VEGF를 유방암 환자에서 측정함으로써 정상인에 비해 의미있게 증가되었다고 보고되었다.<sup>16)</sup> 난소암 세포주 뿐만 아니라 난소암에서 VEGF mRNA와 단백질의 발현이 증가한다고 하였으며<sup>17,18)</sup> 난소암의 복수와 악성 삼출액에서도 VEGF가 발견됨을 보고하였다.<sup>19)</sup>

따라서 본 연구에서는 난소암 환자와 양성 난소종양 환자에서 혈청 VEGF를 측정하고 난소암 환자의 진단에 유용한지를 알아보고 난소암 환자의 치료 전과 치료 후에 혈청 VEGF를 연속적으로 측정함으로써 난소암의 치료를 예측하는 데에 유용하게 이용될 수 있는지 알아보고자 하였다.

## II. 연구 대상 및 방법

### 1. 연구대상군 수집

본 연구는 1994년 3월부터 1997년 8월까지 이화여자대학교 목동 병원 산부인과를 내원한 환자 중에서 정상인 15명과 난소 종양 진단 하에 골반경 수

술이나 개복수술을 시행 받은 환자 36명(장액성 난소종양 16명, 점액성 난소종양 13명, 기형종 3명, 자궁내막종 1명, 난포막세포 종양 3명), 난소암으로 자궁 적출술 및 양측 난소난관 절제술 등의 난소암 절제술을 시행 받은 난소암 환자 34명(I기 10명, II기 5명, III기 16명, IV기 3명)을 대상으로 하였다. 각각의 환자에서 혈액을 5cc 채취하여 원심 분리한 후 혈청을 -20℃에 저장하였으며 또한 치료 후에 같은 방법으로 혈액을 채취하여 저장하였다.

난소암 환자의 임상적 자료들, 연령, 병기, 조직병리학적 유형, 분화도 등은 입원기록을 기초로 수집하였다.

### 2. 혈청 VEGF 측정

혈청 VEGF 측정은 EIA kit(R & D, Minneapolis, U.S.A)를 이용한 quantitative sandwich enzyme immunoassay 방법으로 시행하였다.

먼저 준비한 microplate의 각각의 well안에 각각의 200μL coating solution(coating murine monoclonal antibody : coating buffer= 1: 99)을 분주한 후 4℃ 상태에서 밤새 반응시켰다.

각 well안에 있는 내용물을 흡입하여 제거한 후 200μL 차단 완충제(blocking buffer)를 넣은 후 37℃에서 2시간 동안 보온(incubation)하였다. PBS(Phosphate buffered saline) 완충제로 microplate를 3회 반복하여 세척하였다.

각 well안에 100μL 완충제를 각각의 well에 넣은 후 희석된 표준액(2000 pg recombinant human VEGF) 및 각 연구군의 검체(sample)를 각각 100μL씩 넣은 후 덮어 실온(20-30℃)에서 2시간 동안 놓아두었다. 각 well의 내용물을 제거한 후 세척용 완충제 400μL로 세척과정을 3회 반복하였으며 세척액을 완전히 제거한 후 각 well 안으로 VEGF conjugate 200μL씩 분주하고 실온에서 2시간 동안 보온하였다.

보온이 끝난 후 세척용 완충제의 세척과정을 5회 반복하였으며 희석된 substrate 용액을 각 well 안으로 200μL씩 분주한 후 실온에서 25분간 두었다. Stop 용액을 각각의 well안에 50μL씩 넣었으며 변색되지 않으면 용액을 혼합하도록 가볍게 두들겨주었다. 30분내에 450nm 분광광도계(spectrophotometer, Pharmacia, Head Office, Uppsala, Sweden)에서 optical density(O.D.)값을 읽고, 측정된 표준에 대한 검체의

농도를 산출하였다.

### 3. 통계적 분석

통계적 분석은 software program SPSS 9.0으로 시행하였는데 정상인과 난소종양, 난소암 환자에서의 혈청 VEGF 차이와 각 병기별 난소암의 통계적 유의성은 ANOVA with multiple comparison 방법으로 분석하였고 치료전후의 혈청 VEGF 연관성은 paired t-test로, 기존의 예후인자와 혈청 VEGF와의 상관관계는 multiple logistic regression 방법으로 분석하였다.

## III. 결 과

### 1. 각군의 VEGF 측정

난소암 환자, 양성 난소 종양 환자에서 분비한 혈청 VEGF는 Fig. 1과 같은 분포를 나타내었다. 혈청 VEGF는 난소암 환자에서  $491.5 \pm 335.6$  pg/ml, 양성 난소 종양 환자에서는  $247.7 \pm 183.6$  pg/ml이며 통계적으로 각 군과의 유의한 차이가 있었다.(Table 1, Fig.1,  $p < 0.05$ )

### 2. 난소암의 임상적 특징과 VEGF

난소암 환자의 평균 연령은  $54 \pm 15.2$ 세 이었고

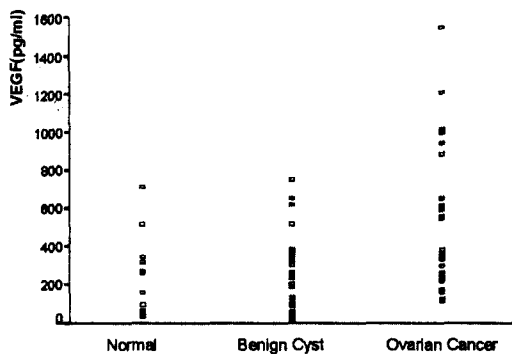


Fig 1. There were the serum VEGF levels in healthy women( $219.5 \pm 200.6$ pg/ml), with benign cyst( $247.7 \pm 183.6$ pg/ml) and with ovarian cancer( $491.5 \pm 335.6$ pg/ml). The serum VEGF levels in ovarian cancer were higher than those in benign ovarian cyst or healthy women ( $p < 0.05$ ).

각 병기별 혈청 VEGF는 통계적으로 유의한 차이는 없었으며(Fig. 2,  $p > 0.05$ ) 조직병리학적 유형, 분화도, 연령에 따른 혈청 VEGF도 유의한 차이가 없었다.(Table 2,  $p > 0.05$ )

또한 혈청 CA 125와 CA 19-9가 증가한 환자에서 혈청 VEGF 증가하는 통계적으로 유의한 상관관계는 없었다.(Fig. 3 & 4,  $p > 0.05$ )

### 3. 난소암 환자의 치료전 후 VEGF 측정

Table 1. Serum VEGF levels of each groups

	Case(n)	VEGF Level(Mean $\pm$ S.D.)
Normal Women	15	$219.5 \pm 200.6$ pg/ml
Ovarian cyst	36	$247.7 \pm 183.6$ pg/ml
Ovarian cancer	34	$491.5 \pm 335.6$ pg/ml

$p < 0.05$  Anova with multiple comparison

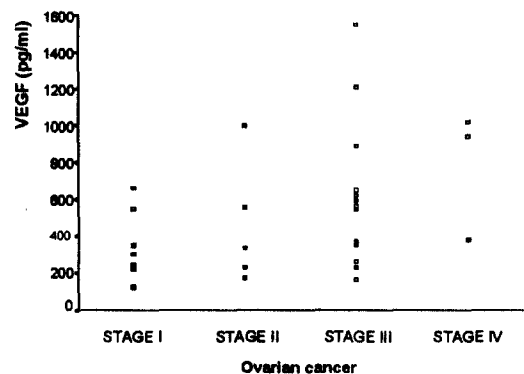


Fig 2. The serum VEGF levels in the patients with ovarian cancer were not correlated with the patient s each stages ( $p > 0.05$ ).

Table 2. The comparison of serum VEGF levels with clinicopathologic characteristics in ovarian cancer patients

	B	S.E	pvalue	O.R
Ages	-0.1454	1.2931	0.9105	0.8647
Stages	-0.8146	1.4779	0.5815	0.4428
Grades	2.8323	1.5536	0.0685*	16.9856
Histologies	2.3174	1.6508	0.1604	10.1496

\*  $p < 0.1$

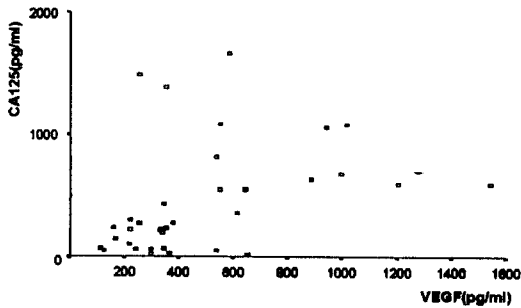


Fig 3. The serum VEGF levels were not correlated with the serum CA-125 levels ( $p > 0.05$ ).

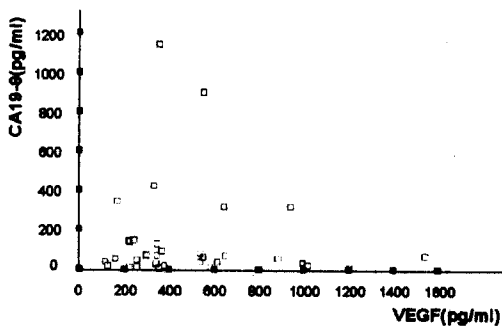


Fig 4. The serum VEGF levels were not correlated with the serum CA19-9 levels ( $p > 0.05$ ).

난소암 환자 34명 중에서 기존의 예후인자로 이용하는 종양표지물질인 CA 125가 장액성 난소암 환자 16명의 치료 전과 치료 후 의미있게 감소하였으며(Fig. 5,  $p < 0.05$ ) CA 19-9은 점액성 난소암 환자 13명의 치료 전과 치료 후 통계적으로 의미있게 감소하였다(Fig. 5,  $p > 0.05$ ) 혈청 VEGF는 이 두 난소암 환자에서도 치료 전과 치료 후에 통계적으로 유의하게 감소한 결과를 나타내었다.(Fig. 6,  $p < 0.05$ )

#### IV. 고 찰

맥관형성은 혈관내피세포의 증식 및 이동, 분화 과정을 포함하며 암세포의 증식 및 침윤, 전이에 매우 중요한 역할을 한다.<sup>1,3)</sup> 고형성 암이 성장하기 위해서는 암세포 및 혈관내피세포의 상호작용에 의한 새로운 미세 혈관의 발달이 필요하며<sup>20)</sup> 암이 침윤하

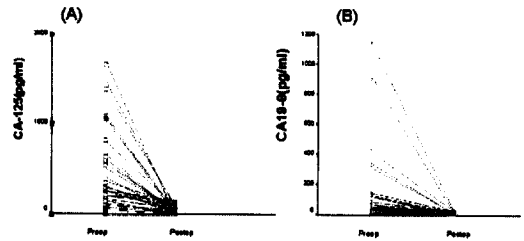


Fig 5. The postoperative serum CA-125(A) and CA 19-9 levels(B) were significantly decreased in comparison with the preoperative serum CA-125 and CA19-9 levels( $p < 0.05$ ).

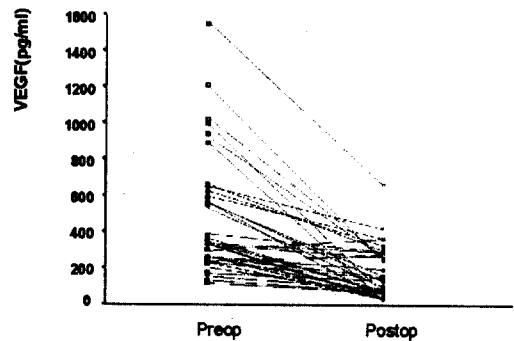


Fig 6. The postoperative VEGF levels were significantly decreased in comparison with the preoperative VEGF levels ( $p < 0.05$ ).

기 위해서는 기존의 혈관에서부터 이동한 혈관내피 세포가 세포의 기질을 파괴하는 과정이 선행되어야<sup>21)</sup> 혈행성으로 전이하기 위해서는 암 조직내에 미세 혈관이 발달하여야 한다.<sup>22)</sup> 암 종괴가 크게 성장하고 혈관이 발달됨에 따라 암세포가 원래의 위치에서 이탈하여 순환체계로 유입됨으로써 전신적으로 전이하게 된다.<sup>3)</sup> 따라서 일차적으로 발생한 고형성 암에서 생성된 맥관형성 조절인자 등은 암의 전이 과정에 중요한 역할을 한다는 것이 보고되었다.<sup>23)</sup>

난소암은 혈관분포가 적은 부위로 전이가 가능하지만 난소암 종괴를 형성하기 위해서는 맥관형성이 필요하다. 따라서 암 종괴내 맥관형성의 정도는 난소암 환자의 예후와 관계있다고 하겠다.<sup>9,10)</sup> 난소암의 맥관형성 기전은 정확히 밝혀지지지는 않았으나 초음파 도플러 검사로 난소암과 양성 난소 종양에서 맥관형성이 차이가 있음이 보고되었다.<sup>8,24)</sup>

VEGF는 분자량 46,000의 이중체 단백질로서 내피세포에 특이하게 작용하는 유사분열물질이다.<sup>11,12)</sup> VEGF는 내피세포의 수용체 flt-1, KDR에 결합하여 내피세포의 증식과 이동에 관여하며 유전자 발현을 변화시킨다.<sup>25-27)</sup> VEGF는 미세 혈관의 투과성을 증가시키고 암세포에서 분비되어 이웃하는 내피세포에 작용함으로써 암의 맥관형성에 관여한다.<sup>28)</sup> 암 조직내의 혈관은 암세포에 의한 VEGF의 분비에 의한 기질혈관에서부터 형성되기 때문에 맥관형성 과정을 거치는 악성 암 환자에서는 암조직의 병리조직의 종류에 상관없이 VEGF가 발현된다고 한다.<sup>29)</sup>

VEGF는 저산소 상태에서의 배양된 세포에서 증가하며 유방암이나 뇌암, 폐암 등의 악성종양에서 VEGF 발현이 증가함을 발견함으로써 암의 성장에 관여한다고 하였다.<sup>13,14)</sup> nude mice에 흑색종(melanoma) 세포를 투여하면 암세포의 VEGF 발현이 증가됨으로써 암의 성장, 맥관형성, 전이 등의 과정이 활성화시킨다는 것이 보고되었다.<sup>15)</sup> VEGF는 유방암이나 신장암, 신경계 암에서 증가되는 것으로 보고되고 있으며<sup>30)</sup> VEGF는 종양이외에 상피세포의 염증성 변화, 즉 표피의 상처 치유과정이나 건선, 접촉성 피부염 등에서도 발현될 수는 있으나 그 정도가 약한 것으로 보고되었다.<sup>28)</sup> 자궁경부암 뿐만아니라 고도의 자궁경부 이형성증에서 맥관형성이 관계된다고 하였다.<sup>31-33)</sup> 양성 상피세포나 경도의 자궁경부 이형성증세포에서는 VEGF를 전사하는 mRNA가 부분적으로 발현되는데 반해 자궁경부암세포에서는 VEGF mRNA가 강하게 발현된다고 하여 VEGF mRNA 발현의 증가가 자궁경부암의 맥관형성과 밀접한 관계가 있다.<sup>34)</sup>

최근 연구에서 암 환자의 흉강, 복강 삼출액 등에서 VEGF가 증가한다는 것이 보고되었다.<sup>35,36)</sup> 암 환자의 혈청에서 VEGF를 측정하여 정상인과 비교한 결과 암 환자에서 혈청 VEGF가 증가함을 보고하였고 특히 암이 국소적으로 국한되어 있는 환자에 비해 전신적으로 퍼진 상태의 암 환자에서 혈청 VEGF가 더 많이 증가함을 보고하였다.<sup>29)</sup>

혈청 VEGF는 암세포 뿐만 아니라 암 주위의 염증세포나 혈소판에서도 유리되는 것으로 알려졌다.<sup>37,38)</sup> 따라서 암환자 외에 정상인의 혈액에서도 VEGF가 측정된다고 하였으며<sup>16)</sup> 민감한 화학발광 효소면역검사법(chemiluminiscence EIA)에 의해 검

사하면 정상인의 혈액에서 0.1 pg/ml의 VEGF 121까지 측정할 수 있다고 하였다.<sup>39)</sup> 또한 간 기능장애 환자에서 신생혈관형성 과정에 반응하여 혈청 VEGF치가 증가되는 것으로 보고되었다.<sup>16)</sup>

암 전이과정과 암 침윤과정에서 혈청 VEGF의 생물학적인 역할은 매우 중요하다. 순환하는 VEGF는 암 혈관세포의 증식을 자극하고 혈관의 투과성을 증가시켜 암세포의 혈관 외 유출과 전이하는데 중요한 역할을 수행한다. 따라서 혈액 내에 순환하는 VEGF는 고형성암의 자체의 내분비성장인자로 기능한다고 하겠다. VEGF의 반감기는 3시간으로 고형성암 조직의 저산소성 세포에서 VEGF가 과다 분비되어 빠른 제거과정을 거치게되나 암 조직에서는 계속적인 VEGF의 생성으로 혈액에서 측정된 VEGF가 높은 수준으로 유지된다.<sup>40)</sup> 따라서 높은 수준의 혈청 VEGF는 암 종괴가 크게 형성되었음을 시사하거나 암조직의 빠른 맥관형성을 반영한다고 하겠다.

위암이나 결장암, 간암, 식도암, 폐암 환자 등에서 혈청 VEGF가 정상인에 비해 의미있게 증가함을 보고하였다.<sup>16)</sup> 본 연구에서는 난소암 환자 뿐 아니라 양성 난소 종양 환자에서 혈청 VEGF를 측정함으로써 난소암 환자의 VEGF를 정상인과 또는 양성 난소 종양 환자의 VEGF와 비교하였으나 양성 질환에 비해 난소암에서 혈청 VEGF가 통계적으로 유의하게 증가하였다. 따라서 본 연구 결과에 의하면 혈청 VEGF를 측정하는 것이 난소종양과 난소암을 감별진단하는데 도움이 된다고 하겠다.

국소적인 유방암 환자에서는 정상인에 비해 혈청 VEGF 농도가 통계적인 차이가 없다고 보고한 바 있다.<sup>12)</sup> 유방암 13%에서는 혈청 VEGF가 180 pg/ml 이상으로 증가하였고 암의 진행에 따라 혈청 VEGF가 계속 증가되는 것으로 보고되었다. 혈청 VEGF는 조기 유방암에 비해 진행된 경우에서 증가한다고 하였다.<sup>16)</sup> 그러나 본 연구에서는 각 병기별 난소암에서 혈청 VEGF를 비교하였으나 병기별 통계적 유의한 차이는 없었다. 따라서 난소암의 진행에 따라 혈청 VEGF가 유의하게 변화하지 않는 것으로 사료된다.

결장암 환자에서 수술 전 혈청 VEGF가 매우 증가되어 있지는 않았으나 수술 후 대부분의 환자에서 정상범위로 감소한 보고가 있다.<sup>41)</sup> 높은 혈청

bFGF와 VEGF는 진행된 결장암에서 암 종괴의 배가시간이 짧다는 것을 의미한다고 하였고<sup>41)</sup> 암의 병리조직학적인 종류에 상관없이 혈청 VEGF는 임상적으로 암 치료의 추적관리에 유용하게 이용될 수 있음을 시사하였다.<sup>29)</sup> 본 연구에서 난소암 환자에서 치료 전과 치료 후에 측정된 혈청 VEGF가 통계적으로 의미있게 감소하였으므로 치료후의 효과 판정에 혈청 VEGF가 사용될 수 있어서 기존의 종양표지물질인 CA 125와 CA 19-9와 함께 난소암의 치료 후 추적관리에 유용하다고 하겠다.

유방암에서 혈관형성에 관한 인자에 관한 역할이 연구되어 신생혈관의 수와 예후와 밀접한 관계가 있다고 보고되었으며<sup>42,43)</sup> 전립선암과 신장암에서도 혈관형성에 관여하는 인자의 발현이 전이와 상당히 밀접한 관계가 있으며 예후와도 상관관계가 있다고 하였다.<sup>44,45)</sup> 결장암에서도 혈관형성에 관여하는 인자 VEGF와 그 수용체 KDR 등의 발현이 암의 전이에 중요한 인자로서 전이를 예측하는 인자가 될 수 있다고 보고하였다.<sup>46)</sup> 본 연구에서는 기존에 알려진 예후인자인 조직병리학적 유형과 병기, 연령과 혈청 VEGF는 직접적인 상관 관계가 없었고 분화도만이 관계가 있었으며 본 연구 결과에는 언급하지는 않았지만 재발한 난소암 환자에서 혈청 VEGF가 다시 증가함으로써 혈청 VEGF는 독립적인 예후인자가 될 수 있다고 하겠다. 따라서 암 환자에서 추적관리시 계속적인 혈청 VEGF 측정은 임상적인 증상 발현 전에 진단이 가능하다고 하겠으며 또한 암의 재발에 관련되어 증가하는 표지물질의 측정은 추가 치료를 결정하는데 도움이 된다고 하겠다.

본 연구 결과 전이된 난소암 환자에서 혈청 VEGF는 예후인자로 이용될 수 있었으며 임상적으로, 기존의 난소암 종양표지물질 CA 125가 난소암 치료효과와 예후를 반영하는 것과 같이 혈관형성에 관여하는 성장인자, VEGF도 효과적으로 난소암 예후를 측정하는데 이용될 수 있음을 시사하였다. 앞으로 난소암 전이에 VEGF 이외의 다른 혈관형성인자들이 관여하는지 연구를 계속한다면 난소암에서 혈관형성인자의 임상적 의미와 함께 이러한 혈관형성을 저해하는 약제가 난소암 치료에 도움이 될 수 있는 치료의 새로운 시도가 가능하리라 사료된다.

## IV. 결 론

1994년 3월부터 1997년 8월까지 이화여자대학교 목동 병원 산부인과를 내원한 정상인 15 명과 양성 난소 종양 환자 36명, 난소암 환자 34명을 대상으로 하여 혈청 VEGF를 측정하였으며 난소암 환자에서 치료 전과 치료 후에 혈청 VEGF를 연속적으로 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

혈청 VEGF는 난소암 환자에서  $491.5 \pm 335.6$  pg/ml, 양성 난소 종양 환자에서는  $247.7 \pm 183.6$  pg/ml로 통계적으로 각 군과의 유의한 차이는 있었다. 난소암 환자에서 치료 전과 치료 후에 측정된 혈청 VEGF가 통계적으로 의미있게 감소함을 나타내었으므로 치료후의 암 종괴의 감소를 혈청 VEGF가 반영한다고 할 수 있겠다.

본 연구 결과 전이된 난소암 환자에서 혈관형성 인자가 예후인자로 이용될 수 있었으며 임상적으로, 기존의 자궁경부암 종양표지물질 CA-125와 CA 19-9이 난소암 치료효과와 예후를 반영하는 것과 같이 혈관형성에 관여하는 성장인자, VEGF도 효과적으로 난소암 예후를 측정하는데 이용될 수 있다고 사료되는 바이다.

## -참고문헌-

1. Folkman J: What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? J Natl Cancer Inst, 1990;82:4-6.
2. Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG: cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. Cell, 1991;64:327-36.
3. Weidner N, Semple JP, Welch WR et al: Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. N Engl J Med, 1991;324:1-8.
4. Moscatelli D, Rifkin DB: Membrane and matrix localization of proteases; a common theme in tumor cell invasion and angiogenesis. Biochem Biophys Acta, 1988;948:67-85.
5. Hanahan D, Folkman J: Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. Cell 1996;86:353-64.
6. Folkman J Klagsbrun M: Angiogenic factors. Science 1987;235:444-7.

7. Burke TW, Hoskins WJ, Heller PB et al: Prognostic factors associated with radical hysterectomy failure. *Gynecol Oncol*, 1987;26:153-9.
8. Karlan BY, Platt LD: Ovarian cancer screening : The role of ultrasound in early detection. *Cancer*, 1995;76: 2011-5.
9. Hollingsworth HC, Kohn EC, Steinberg SM et al: Tumor angiogenesis in advanced stage ovarian carcinoma. *Am J Pathol*, 1995;147:33-41.
10. Van Diest PJ, Zevering JP, Zevering LC et al: Prognostic value of microvessel quantitation in cisplatin treated FIGO 3 and 4 ovarian cancer patients. *Pathol Res Pract*, 1995;191:25-30.
11. Ferrara N, Houch KA, Jakeman LB et al: The vascular endothelial growth factor family of polypeptides. *J Cell Biochem*, 1991;47:211-8.
12. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M et al: Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol*, 1995;146:1029-39.
13. Senger DR, van de Water L, Brown LF et al: Vascular permeability factor(VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer Metastasis Rev*, 1993;12:303-24.
14. Ferrara N: The role of vascular endothelial growth factor in pathological angiogenesis. *Breast Cancer Res Treat*, 1995;36:127-37.
15. Claffey KP, Brown LF, Aguila L et al: Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by melanoma cells increases tumor growth, angiogenesis, and experimental metastasis. *Cancer Res*, 1996;56:172-81.
16. Yamamoto Y, Toi M, Kondo S et al: Concentration of vascular endothelial growth factor in the sera of normal controls and cancer patients. *Clin Cancer Res*, 1996;2:821-6.
17. Boockock DA, Chanock-Jones S, Sharkey AM et al: Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors flt and KDR in ovarian carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 1995;87:506-16.
18. Olson TA, Mohanraj D, Carson LF et al: Vascular permeability factor gene expression in normal and neoplastic human ovaries. *Cancer Res*, 1994;54:276-80.
19. Yeo KT, Wang HH, Nagy JA et al: Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) in guinea pig and human tumor and inflammatory effusions. *Cancer Res*, 1993;53:2912-8.
20. Folkman J: Tumor angiogenesis and tissue factor. *Nature Med*, 1996;2:167-8.
21. Mahadevan V, Hart JR: Metastasis and angiogenesis. *Acta Oncol*, 1990;29:97-103.
22. Liotta LA, Kleinerman J, Saidel GM: Quantitative relationship of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation. *Cancer Res*, 1974;34:997-1004.
23. Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman et al: Dormancy of micrometastasis: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med* 1995;1:149-53.
24. Mackey SE, Creasman WT: Ovarian cancer screening. *J Clin Oncol*, 1995;13:576-9.
25. de Vries C, Escobedo JA, Ueno H et al: The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science*, 1992;255:989-91.
26. Conn G, Bayne ML, Soderman DD et al: Amino acid and cDNA sequences of a vascular endothelial cell mitogen that is homologous to platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990;87:2628-32.
27. Pepper MS, Ferrara N, Orci L et al: Vascular endothelial growth factor(VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991;181:902-6.
28. Barbareschi M, Gasparini G, Morelli L et al: Novel methods for the determination of the angiogenic activity of human tumors. *Breast Cancer Research and Treatment*, 1995;36: 181-92.
29. Salven P, Maenpaa H, Orpana A et al: Serum vascular endothelial growth factor is often elevated in disseminated cancer. *Clin Cancer Res*, 1997;2:647-51.
30. Birkfalvi A: significance of angiogenesis in tumour progression and metastasis. *Eur J Cancer*, 1995;31:1101-4.
31. Stafl A, Mattingly RF: Angiogenesis of cervical neoplasia. *Am J Obstet Gynecol*, 1975;121:845-52.
32. Chromette G, Auriol M, Tranbaloc P et al: Intraepithelial neoplasm of the uterine cervix and angiogenesis: morphologic study. *Arch Anat Cytol Pathol*, 1989;37: 73-9.
33. Smith-McCune KK, Weidner N: Demonstration and characterization of the angiogenic properties of cervical dysplasia. *Cancer Res*, 1994;54:800-4.
34. Guidi AJ, Abu-Jawdeh G, Berse B et al: Permeability Factor(Vascular Endothelial Growth Factor) Expression and Angiogenesis in Cervical Neoplasia. *J Natl Cancer Inst*, 1995;87:1237-45.
35. Yeo KT, Wang HH, Nagy JA et al: Vascular permeability factor(vascular endothelial growth factor) in guinea pig and human tumor and inflammatory effusions. *Cancer Res*, 1993;53:2912-8.
36. Kondo S, Asano M, Matsuo K et al: Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is detectable in the sera of tumor bearing mice and cancer patients. *Biochim Biophys Acta*, 1994;1221:211-4.

37. Freeman MR, Schneck FX, Gagnon ML et al: Peripheral blood T lymphocytes and lymphocytes infiltrating human cancers express vascular endothelial growth factor: a potential role for T cells in angiogenesis. *Cancer Res*, 1995;55:4140-5.
38. Berse B, Brown LF, van de Water L et al: Vascular permeability factor(vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *Mol Biol Cell*, 1992;3:211-20.
39. Hanatani M, Tanaka Y, Kondo S et al: sensitive chemiluminescence enzyme immunoassay for vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in human serum. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1995;59: 1958-9.
40. Folkman J: Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995;1:27-31.
41. Drix LY, Vermeulen PB, Huben 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.
42. Harris AL, Fox S, Leek R et al. Breast cancer angiogenesis: therapy target and prognostic factor. *Eur J Cancer*, 1995;31:831-2.
43. Horak ER, Leek R, Klenk N et al: Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet*, 1992;340:1120-4.
44. Weidner N, Carroll PR, Flax J et al: Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol*. 1993;143:401-9.
45. Duensing S, Grosse J, Atzpodien J: Increased serum levels of basic Fibroblast Growth Factor(aFGF) are associated with progression lung metastases in advanced renal cell carcinoma patients. *Anticancer Research*, 1995;15:2331-4.
46. Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD et al: Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Research*, 1995;55:3964-8.