

자궁경부종양의 임상병리학적 특성에 따른 VEGF와 PD-ECGF의 발현과 Ki-67의 활성화도

경북대학교 의과대학 산부인과학교실
이명기 · 구태본 · 박일수

=Abstract=

Expression of VEGF and PD-ECGF, and Proliferative Activity of Ki-67 according to Clinicopathologic Feature in Cervical Tumor

Myung Gi Lee, M.D., Tae Bon Koo, M.D., Il Soo Park, M.D.

Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine Kyungpook National University, Taegu Korea

Objective: The objective of this study is to evaluate the expressions, microvessel counts and angiogenic pathway of VEGF and PD-ECGF and proliferative activity of Ki-67 according to clinicopathologic feature of cervical tumor.

Methods: Two hundred three cervical specimens were evaluated; among these 20 were designated normal epithelium, 36 mild dysplasia, 28 moderate dysplasia, 36 severe dysplasia, 28 carcinoma in situ, 17 microinvasive carcinoma and 38 invasive cervical carcinoma (21 squamous cell carcinoma and 17 adenocarcinoma). Microvessel count was determined by immunohistochemical staining using anti-factor VIII-related monoclonal antibody. The expression of VEGF (vascular endothelial growth factor) and PD-ECGF (platelet-derived endothelial cell growth factor) were evaluated by immunohistochemical staining with anti-human VEGF monoclonal antibody and anti-dThdPase monoclonal antibody. The proliferative activity was examined using a Ki-67 equivalent monoclonal antibody (MIB1).

Result: There was no statistical significance on microvessel count except invasive cancer comparing with mild dysplasia including normal tissue, but there was a little increase in microvessel counts according to severity of tumor. The intensity of VEGF and PD-ECGF expression was significantly correlated with severity of cervical tumor. And the microvessel density was significantly higher in the positive expression of VEGF and PD-ECGF than in the negative expression. The intensity of PD-ECGF expression in invasive adenocarcinoma was significantly lower in comparison with VEGF expression. The intensity of Ki-67 expression had no correlation with severity of cervical tumor and was significantly higher in moderate and severe dysplasia than in microinvasive and invasive carcinoma. Ki-67 expression had no statistical correlation with VEGF and PD-ECGF.

Conclusion: The VEGF and PD-ECGF are important angiogenic factors and associated with progression of cervical tumor. The VEGF may be involved in the progressions of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma, but the PD-ECGF may not be involved or be minimally involved in the progression of adenocarcinoma. There seems to be a different angiogenic pathway pertaining

to the histologic difference of cervical cancer. There was no difference of Ki-67 expression according to severity of cervical tumor.

Key words: Cervical tumor, VEGF, PD-ECGF, Ki-67

책임저자 : 박일수

서 론

혈관신생은 인체의 성장과 분화, 배란, 염증, 상처치유 및 면역반응 등에 중요하며,^{1,3} 종양의 성장, 진행 및 전이에도 필수요건이고,^{4,5} 특히 종양에서는 침습력의 기본 조건이 된다. 여러 학자들의 연구에 의하면 혈관신생의 강도가 악성종양, 즉 두경부의 편평상피암, 악성 흑색종, 폐, 유방, 위, 방광, 전립선암, 그리고 자궁경부상피내종양과 침윤성 편평상피암에서 예후 인자로서 역할을 한다고 보여주고 있다.^{6,7}

혈관신생과정에서 종양은 그 주위에 새로운 혈관 형성을 촉진시키는 혈관신생인자들(angio-genic factors)을 분비하는데 여기에 속하는 인자들로는 acidic fibroblast growth factor, basic fibroblast growth factor, transforming growth factor- α , transforming growth factor- β , vascular endothelial growth factor(VEGF), interleukin-8, tumor necrosis factor- α , 그리고 platelet-derived endothelial cell growth factor(PD-ECGF)/thymidine phosphorylase(dThdPase) 등이 있다.⁸⁻¹⁰ 이들 중 VEGF와 PD-ECGF는 생체에서 혈관신생에 활성도가 있다고 널리 알려져 있다.

VEGF는 내피세포(endothelial cell)의 선택적 성장 인자로 알려져 있고,⁵ PD-ECGF는 dThdPase와 동일한 것으로 핵산대사에 관여하는 효소이며 실험실에서 내피세포의 화학주성(chemotaxis)을 자극하고 생체에서 혈관신생의 활성도를 보여준다고 알려져 있다.^{12,13}

최근에는 종양의 증식능력을 평가하여 종양의 성장 정도와 악성도를 간접적으로 알아보려는 시도가 활발하게 이루어지고 있으며,¹⁴ 이들 중 Ki-67은 G0와 G1기의 세포를 제외한 모든 세포의 핵에 존재하며 종양의 악성도나 증식활성도와 관련이 있는 것으로 알려져 있다.¹⁵ Ki-67 항원에 대한 MIB1 단백

론 항체의 혈관강도를 조사해서 종양의 증식 활성도를 평가하므로 악성 종양에서 예후 인자로서 사용될 수 있다는 주장이 많이 있다. 실제 유방암, 전립선암, 구강 및 인후두암, 직장암, 신장암 그리고 뇌종양 등 인체에서 생길 수 있는 많은 종류의 종양에서 연구되었고, 최근 자궁경부종양에서의 연구들도 발표되어 있다.¹⁶

본 연구는 자궁경부종양에서 임상병리학적 특성에 따른 미세혈관수, VEGF와 PD-ECGF의 발현 양상과 혈관신생경로 그리고 Ki-67을 이용한 증식 활성도를 알아 볼 목적으로 시행하였다.

연구 대상 및 방법

1. 연구재료

연구 재료는 1997년 1월에서 1999년 9월까지 경북대학교 병원에서 자궁적출술 또는 원추생검술로 적출된 자궁경부조직 중 상태가 양호하며 검사에 충분한 양의 종양 조직을 포함한 예를 대상으로 하였다. 각각의 증례는 경도 이형증 36예, 중등도 이형증 28예, 고도 이형증 36예, 상피내암 28예, 미세침윤암 17예 그리고 침윤암 38예였다. 침윤암 38예 중 21예는 편평상피암, 17예는 선암으로 각각의 FIGO 병기는 Ib가 12와 8예, IIa가 4와 6예, 그리고 IIb는 5와 3예였다. 대조군으로는 자궁근종 등으로 적출된 자궁경부조직 중 염증 등의 변화가 없는 20예를 선정하였다. 절제된 종양 조직을 10% 중성 포르말린에 고정하고, 파라핀으로 포매한 후, 통상의 hematoxylin-eosin 염색을 시행하였다.

2. 면역조직 화학 염색 방법

파라핀에 포매된 조직을 4 μ m 두께로 박절하여 organosaline을 부착한 슬라이드(Probe-on plus slide, Fisher Scientific, USA)에 부착시켜 탈파라핀과 합수

과정을 거쳐 증류수로 세척하였다. microwave는 전자렌지를 이용하여 10 mM citrate buffer(pH 6.0)를 750 watt 전자렌지로 5분간 먼저 가온 후에 슬라이드를 넣고 5분간 2회 가온 처리하여 항원 표출 후 20분간 실온에 방치하여 온도를 서서히 낮추었으며 이어서 tris buffered saline(이하 TBS, 50mM, pH 7.4)으로 세척한 후 0.3% 과산화수소용액 처리 후 TBS로 세 차례 세척하였다. 조직 내 비특이 항원을 차단하기 위해 normal horse serum에 30분간 반응시켰다. 단클론 일차항체인 VEGF (Santa Cruz, Santa Cruz, USA), PD-ECGF (NeoMarkers, Union, USA), Ki-67 (DAKO, Copenhagen, Denmark), Factor-VIII (DAKO, Copenhagen, Denmark)을 1:100으로 희석하여 반응시킨 후 4 °C 수조에서 하룻밤 동안 반응을 시킨 후 TBS로 세 차례 세척하고 이차항체(Vector Elite kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA)를 30분간 반응시킨 후 ABC (avidin-biotin conjugate) reagent를 실온에서 30분간 반응시켰다. TBS에 세척 후 Tris-HCl (pH 7.6) buffer에 세척한 후 AEC chromogen (Zymed, San Francisco, USA)으로 발색하였다. 증류수에 수세한 후 Mayer hematoxylin으로 20초간 대조 염색한 후 봉입하여 슬라이드를 완성하였다.

면역조직학적 염색강도평가는 종양세포 내에서 완전한 음성 반응을 (-), 10% 미만의 종양세포에 약한 양성 반응을 보일 때 (+), 10 - 50% 사이의 양성 반응을 (++) , 50% 이상의 양성반응을 (+++)로 하였으며, 같은 표본에 대해 2명의 검사자가 염색강도를 평가하였다.

미세혈관 수의 측정은 세정맥 및 모세혈관만을 포함시켰으며, Factor-VIII 항체에 양성이며 인접 세포군과 명백하게 분리되는 한 개의 내피세포 혹은 내피세포군을 하나의 혈관으로 하였다. 내강을 가진 경우 적혈구를 8개 이상 포함하거나 근육층을 가지는 큰 혈관은 제외하고, 섬유화가 심한 부위도 제외시켰다. 저배율 시야에서 탐색한 후 단위 면적당 미세혈관 수가 가장 많은 3시야를 선택하여 이 부위를 광학현미경 200배 배율($\times 20$ objective and $\times 10$ ocular, Olympus BX 50 microscope, 0.74 mm³ per field)에서 혈관의 수를 셈하고 그 평균치를 산출하여 대표치로 사용하였다.

3. 통계방법

분석은 PC-SAS(Window version 6.12)를 이용하여 각각 대상에 따라 ANOVA test, Chi-Square(χ^2) test, 및 Fisher's exact probability test들을 적용하였고, $p < 0.05$ 를 통계적으로 유의 있다고 간주하였다.

결 과

1. 자궁경부종양의 중증도에 따른 미세혈관수

자궁경부종양의 이형성 정도에 따라 미세혈관수는 증가하나, 침윤암 특히 편평상피암의 경우에서만 정상상피나 경도 이형증에 비해 통계적 의의가 있었다. 병의 중증도에 따른 미세혈관수의 증가는 통계적 의의가 없었다(Table 1, Fig. 1).

Table 1. Microvessel counts according to severity of cervical tumor

Histology	N	Microvessel counts	95% CI
		(mean \pm SD)	
Normal epithelium	20	25.50 \pm 10.82 ^a	20.57-30.43
Mild dysplasia	36	33.28 \pm 15.55 ^b	28.09-38.46
Moderate dysplasia	28	35.71 \pm 15.85	29.68-41.74
Severe dysplasia	36	37.56 \pm 17.39	31.76-43.35
In situ carcinoma	28	39.43 \pm 24.87	29.78-49.07
Microinvasive	17	43.88 \pm 28.20	29.38-58.38
Invasive	38	50.55 \pm 17.80 ^c	44.89-56.21
Squamous	21	53.10 \pm 21.80 ^d	43.17-63.02
Adeno	17	47.41 \pm 10.93	41.79-53.03

* a and c, a and d, b and c, and b and d have statistical significances.

($p < 0.05$), by ANOVA test

2. 자궁경부종양의 중증도에 따른 VEGF의 발현
 편평상피종양의 경우 중증도에 따라 VEGF의 발현 강도가 통계적으로 유의 있게 증가하였다. 침윤성 편평상피암과 선암의 발현강도는 통계적 차이는 없었다(Table 2, Fig. 2).

3. 자궁경부종양의 중증도에 따른 PD-ECGF의 발현

편평상피종양의 중증도에 따라 PD-ECGF의 발현 강도가 통계적으로 유의 있게 증가하였으나, VEGF와는 달리 침윤성 선암의 경우 편평상피암과 비교할 때 발현강도가 통계적으로 유의 있게 낮았다(Table 3, Fig. 3).

4. 자궁경부종양의 중증도에 따른 Ki-67의 발현

Ki-67은 중등도 이형증, 고도 이형증 및 자궁경부 상피내암에서 유의 있게 발현했으며, 중증도에 따

른 Ki-67의 발현의 증가는 관찰되지 않았다. 침윤암과 미세 침윤암에서 오히려 발현강도가 낮은 양상을 보였다(Table 4, Fig. 4).

5. 미세혈관수와 VEGF간의 관계

미세혈관수는 VEGF발현 음성군에 비해 양성군(1 positive 이상)에서 통계적으로 유의 있게 많았다(Table 5).

6. 미세혈관수와 PD-ECGF간의 관계

미세혈관수는 PD-ECGF발현 음성군에 비해 양성군(1 positive 이상)에서 통계적으로 유의 있게 많았다(Table 6).

7. Ki-67발현과 미세혈관수와와의 관계

Ki-67의 발현이 2 positive 이상에서 미세혈관수는 통계적으로 유의 있게 많았고, 2 positive 이상 발현

Table 2. VEGF expressions according to severity of cervical tumor

Histology	N	VEGF expression				mean \pm SD
		-	+	++	+++	
Normal epithelium	20	14	6	0	0	0.30 \pm 0.48
Mild dysplasia	36	22	14	0	0	0.39 \pm 0.50
Moderate dysplasia	28	8	12	8	0	1.00 \pm 0.78
Severe dysplasia	36	6	18	12	0	1.17 \pm 0.70
Carcinoma in situ	28	5	15	8	0	1.11 \pm 0.69
Microinvasive	17	1	8	8	0	1.41 \pm 0.62
Invasive	38	5	14	18	1	1.39 \pm 0.75
Squamous	21	3	6	11	1	1.47 \pm 0.81
Adeno	17	2	8	7	0	1.29 \pm 0.69

p < 0.05, by Chi-Square(χ^2) test

Table 3. PD-ECGF expressions according to severity of cervical tumor

Histology	N	PD-ECGF expression				mean \pm SD
		-	+	++	+++	
Normal epithelium	20	20	0	0	0	-
Mild dysplasia	36	22	12	2	0	0.44 \pm 0.62
Moderate dysplasia	28	13	8	7	0	0.79 \pm 0.89
Severe dysplasia	36	26	6	4	0	0.39 \pm 0.70
Carcinoma in situ	28	18	9	1	0	0.39 \pm 0.57
Microinvasive	17	5	6	6	1	1.12 \pm 0.93
Invasive	38	12	13	11	2	1.08 \pm 0.91
Squamous	21	1	9	9	2	1.57 \pm 0.75
Adeno	17	11	4	2	0	0.47 \pm 0.72

p < 0.05, by Fisher's exact probability test.

Table 4. Ki-67 Expressions according to severity of cervical tumor

Histology	N	Ki-67 expression				mean \pm SD
		-	+	++	+++	
Normal epithelium	20	20	0	0	0	-
Mild dysplasia	36	36	0	0	0	-
Moderate dysplasia	28	20	8	0	0	0.29 \pm 0.47 *
Severe dysplasia	36	27	8	1	0	0.28 \pm 0.57 *
Carcinoma in situ	28	19	8	1	0	0.21 \pm 0.50 *
Microinvasive	17	15	2	0	0	0.12 \pm 0.33
Invasive	38	34	4	0	0	0.11 \pm 0.31
Squamous	21	18	3	0	0	0.14 \pm 0.36
Adeno	17	16	1	0	0	0.06 \pm 0.24

* means statistical significance, $p < 0.05$, by Fisher's exact probability test

Fig 1. Immunohistochemical stain for Factor-VIII. The example of invasive squamous cell carcinoma shows high microvessel count ($\times 200$).

Fig 2. Immunohistochemical stain for VEGF. The tumor cells show strong positive reactivity in invasive squamous cell carcinoma ($\times 200$).

Fig 3. Immunohistochemical stain for PD-ECGF. The tumor cells show moderate positive nuclear reactivity in invasive squamous cell carcinoma ($\times 200$).

Fig 4. Immunohistochemical stain for Ki-67. The tumor cells show focal positive nuclear reactivity in the mild dysplastic squamous epithelium ($\times 200$).

한 경우는 3예 뿐 이었다(Table 7).

고 찰

8. VEGF발현과 PD-ECGF발현과의 관계

VEGF와 PD-ECGF간의 발현강도는 서로 비례하였다 (Table 8).

생물학적 예후인자의 하나로 최근 관심을 끌고 있는 혈관신생 즉 모세혈관의 증식은 고형종양의 성장과 증식 그리고 전이에 깊이 관여되는 것으로 알려져 있다. 고형종양은 종양 주위에 혈관신생이 되지 않은 전혈관기 상태에서는 성장이 제한되어

Table 5. Microvessel count and VEGF expression

VEGF expression	N	Vessel counts
		(mean \pm SD)
-	61	31.30 \pm 15.80 ^a
+	87	41.85 \pm 21.26 ^b
++	54	41.24 \pm 19.56 ^c
+++	1	54

* 'a and b' and 'a and c' have statistical significances.
(p < 0.05), by ANOVA test

Table 6. Microvessel count and PD-ECGF expression

PD-ECGF expression	N	Vessel counts
		(mean \pm SD)
-	117	34.32 \pm 17.83 ^a
+	52	42.27 \pm 21.13 ^b
++	31	49.23 \pm 20.33 ^c
+++	1	54

* 'a and b' and 'a and c' have statistical significances.
(p < 0.05), by ANOVA test

직경 1-2mm 이상 성장을 할 수 없으며, 이후 신생혈관의 증식이 일어나면 종양은 급속하게 성장한다.^{4,5} 또한 전이할 능력을 갖추게 되며,¹⁷ 이제까지 알려진 혈관신생의 기전은 종양세포에서 여러 종류의 혈관신생인자들을 분비하며 이들은 종양주위에 신생혈관 형성을 증진시킨다. 이러한 과정에 관여하는 인자들로서는 acidic fibroblast growth factor, basic fibroblast growth factor, transforming growth factor- α , transforming growth factor- β , vascular endothelial growth factor(VEGF), interleukin-8, tumor necrosis factor- α , 그리고 platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF) / thymidine phosphorylase (dThdPase) 등이 있다.⁸⁻¹⁰

분비된 인자들은 기질분해효소에 의해 혈관내로 쉽게 침투하게 되어 혈관 내피세포에 존재하는 수용체와 결합하여 신생혈관 생성을 자극하게 되면, 종양세포와 내피세포에서 분비된 단백분해효소에 의해 기저막이 분해되고 내피세포가 종양 쪽으로 이동하게 된 후 증식하여 관을 형성하게 함으로써 새로운 모세혈관이 생성된다고 알려져 있다.¹⁸

혈관신생이 종양의 성장에 필수적이라는 증거는 여러 연구들에서 보고되고 있으며,¹⁹ 위암,²⁰ 유방암,⁹ 폐암²¹ 등에서 혈관신생이 증가 할 수록 림프절

Table 7. Microvessel count and Ki-67 expression

Ki-67 expression	N	Vessel counts
		(mean \pm SD)
-	176	37.21 \pm 19.65 ^a
+	24	43.21 \pm 11.96 ^b
++	3	81.67 \pm 28.87 ^c
+++	0	-

* 'a and c' and 'b and c' have statistical significances.
(p < 0.05), by ANOVA test

Table 8. Association between VEGF expression and PD-ECGF expression

VEGF expression	PD-ECGF expression		
	-	+	++
-	54	6	1
+	48	31	8
++	15	15	25

p < 0.05, by Chi-Square
consistency rate = 0.715 by Gamma test

전이 및 원격전이가 많았음을 보고했다. 이는 혈관신생의 증가로 종양의 성장이 있게 되고 암세포가 신생혈관 내로 들어가 전이될 확률이 높아지게 되는 것으로 믿고 있으며 이러한 신생혈관은 세포학적 구성이나 기저막의 구성 차이로 인해 정상 혈관에 비해서 투과성이 증가되어 있는 것으로 보고되고 있으며,²² 이는 신생혈관내로 암세포의 유입을 용이하게 하는 것으로 생각된다.

자궁경부 종양도 이러한 전혈관기 단계의 상피내 종양에서 혈관신생의 과정을 거쳐 종양세포에 일정 수준 이상의 혈관형성과 더불어 침윤암이 발생한다고 생각하는데,²³ 본 연구에서 자궁경부의 침윤성편평상피암 조직내의 혈관신생의 정도가 상피내종양에 비해서 의미 있게 증가한 것은 이러한 사실을 뒷받침한다고 할 수 있다. 그리고 자궁경부 상피내종양의 혈관신생에도 동일한 병변 내에서의 혈관신생 정도의 차이가 있을 수 있고, 상피내종양의 병변정도가 심할수록 혈관신생 정도가 의미 있게 증가했다는 보고들이 있다.^{24,25}

본 연구는 자궁경부 상피내종양에서부터 침윤암까지의 점진적인 진행 과정에 혈관신생이 관여함을 확인하였으며, 동일한 병변을 가진 상피내종양내에서의 혈관신생의 차이가 상피내종양의 진행과 관련

하여 어떤 임상적 의미가 있는지에 대해서는 앞으로 더 연구해 볼 가치가 있다고 생각한다.

혈관신생의 정도가 위장관암,²⁰ 유방암,²⁶ 방광암²⁷과, 폐암²¹ 등의 악성 종양에서 독립적인 예후인자로서의 가능성이 증명되었고, 자궁경부암에서도 독립적인 예후인자로 인정한 여러 연구가 있으나,^{7,23,28} 자궁경부암에 미세혈관수가 적을 수록 예후가 나쁘다는 상반된 의견도 있고,²⁹ 예후인자로서의 가치가 없다는 주장도 있다.³⁰

VEGF는 VPF (vascular permeability factor) 라고도 하며, 내피세포의 선택적 성장인자로 알려져 있고,³¹ 네 가지의 molecule이 다른 이형체가 mRNA의 변형적인 쇠분에 의해 206, 189, 165 및 121 amino acid residues 들이 있다.¹¹ 짧은 이소체인 VEGF 165와 VEGF 121은 확산 인자(diffusible agents)로 역할을 하는 단백질이며, 반면 긴 이소체인 VEGF 206과 VEGF 189는 세포간 결합에 관여한다고 알려져 있다.³¹

PD-ECGF는 처음 혈소판에서 추출되어졌고 dThdpase와 같은 효소 물질로 핵산대사에 관계하고¹² 내피세포에 화학주성을 자극하여 혈관신생활성을 보여준다.¹³

현재 상기 두 가지의 혈관신생인자를 이용한 자궁경부 및 여성생식기종양의 혈관신생경로에 대한 연구가 활발히 되어지고 있다.

VEGF는 자궁경부상피내종양의 진행정도에 따른 발현강도가 의의 있게 증가하고, 전구암의 아주 초기 반응으로써 혈관신생에 관여한다. 또한 VEGF의 발현이 높을수록 미세혈관 밀도가 높으며,²⁴ 침윤암에서도 침윤정도에 비례하여 VEGF의 발현정도가 높다고 보고하고 있다.²⁵ 자궁경부침윤암에서 편평상피암보다 선암에서 VEGF의 발현이 높게 나타난다는 보고도 있으며,³² 난소의 상피암에서도 대망에 전이가 있는 경우 VEGF발현 및 미세혈관 밀도가 높다고 한다.³³

또한 VEGF항체를 이용한 치료시도도 이루어지고 있다.³⁴ 본 연구에서도 종양의 중증도에 따른 VEGF의 발현이 강해지고, 비례하여 혈관수도 증가하며, 침윤성 편평 상피암이나 선암 모두에서 비슷한 강도로 발현함을 관찰했다.

PD-ECGF는 부인종양에 대한 연구는 많이 되어 있지 않으나, 구강암,³⁵ 유방암,³⁷ 위장관계암³⁶과 방

광암³⁸등 여러 장기의 종양에서 연구 된 바 있다. 자궁경부침윤암에서 PD-ECGF의 발현정도는 미세혈관밀도와 관계가 없고, 예후와도 관계가 없다는 보고들³³이 있으며, 반대의 견해로 PD-ECGF는 자궁경부암 병리적 진행의 모든 과정에 관계한다는 주장도³⁹ 있다. 또한 자궁경부침윤암 중에도 선암보다 편평상피암에서 발현이 강하게 나타난다는 보고도 있다.³² 본 연구에서 PD-ECGF의 발현강도는 혈관수와 관계 있었고, 침윤암을 포함한 자궁경부종양의 중증도에 따른 발현강도의 차이는 비례하였다. 그러나 침윤성 편평상피암에 비해 선암에서 발현강도는 현격히 낮았으며, 이것은 PD-ECGF가 자궁경부 선암의 진행에는 크게 관여하지 않기 때문이라 생각된다.

Ki-67 항원은 G0와 G1기를 제외한 세포주기 중에 증식세포의 핵에서 발현된다.⁴⁰ 항 Ki-67항체는 신선한 조직에서만 사용될 수 있어 파라핀포매조직을 이용한 후향성 연구는 불가능했으나, 단일클론 항체 MIB1은 이를 가능하게 했다.⁴¹

Ki-67의 발현정도에 따라 여러 장기의 종양에 따른 예후인자로서의 가치에 대한 의견은 다양하며, 구강편평상피암,⁴² 유방암,⁴³ 뇌종양,⁴⁴ 담관담낭암,⁴⁵ 그리고 악성난소종양에 대한 예후인자로서 가치가 보고되었다.⁴⁶ 경계성 장액성 난소종양,⁴⁷ 투병세포 선암,⁴⁸ 장액성난소암,⁴⁹ 그리고 자궁경부종양 중 선암⁵⁰에서는 예후인자로서 가치를 인정하는 경향이 있다. 자궁경부 편평상피암에서는 Ki-67의 발현정도가 높을 수록 조기재발을 일으킨다고 하고, 정상 조직에 비해 그 발현정도가 유의하게 높으나 조직학적 유형에 따른 차이가 없다는 보고들¹⁴도 있으나, 자궁경부 편평상피암에서는 예후인자로 인정하지 않는 보고들도 있다.^{7,52} 그리고, 편평상피 외음암에서 예후인자로서 가치를 보고한 연구도 있다.⁵³

자궁경부 상피내종양에서 MIB1을 이용한 연구들에서 MIB1의 형상분석은 이형증 변화의 믿음만한 분류에의 객관적 방법이 될 수 있다고 하는 보고도 있고,⁵⁴ 자궁경부이형정도에 따른 MIB1의 발현 차이를 연구한 보고들도⁵⁵ 있다. 본 연구에서는 고등급편평상피내병변(HSIL, high grade squamous intraepithelial lesion)군에서만 Ki-67의 발현이 의의 있게 강하였고 미세 침윤암과 침윤암에서는 발현정도가 오히려 미미했다. 병변의 중증도와 비례하는

활성도의 증가는 관찰 할 수 없었으나, 발현이 강한 군에서 미세혈관 수가 많았음을 관찰할 수 있었고, 이것은 같은 등급의 상피내암이나 혹은 침윤암에서도 발현강도에 따른 향후 병변의 진행정도에 차이가 있을 것으로 생각되며, 앞으로 이 방면에도 연구가 더 필요하리라 생각된다.

본 연구에서는 자궁경부에 염증성 반응이나 종양성 병변이 없는 정상자궁경부조직 20예, 경도 이형증 36예, 중등도 이형증 28예, 고도 이형증 36예, 상피내암 28예, 미세침윤암 17예 그리고 침윤암 38예를 대상으로 미세혈관수, VEGF와 PD-ECGF의 발현양상과, 혈관신생경로, 그리고 Ki-67을 이용한 증식활성도를 평가하였다.

자궁경부종양에서 중증도에 따른 미세혈관수가 증가는 되었으나, 통계적 유의성은 정상조직과 경증 이형증에 대한 침윤암(미세침윤암 이상)과의 비교에서만 관찰되었다.

VEGF와 PD-ECGF는 자궁경부상피내종양의 중증도에 따라 통계적으로 의의 있게 발현강도의 증가가 관찰되었다. 또한 미세혈관수와 비교에서도 발현양성군과 발현음성군간의 차이가 통계적인 유의성을 보였다.

VEGF와 PD-ECGF의 발현은 상호간에 통계적으로 의의 있는 연관관계가 관찰되었다. VEGF의 발현강도는 침윤성편평상피암과 선암에서 큰 차이가 없었으나, PD-ECGF는 VEGF와 달리 선암에서 통계적으로 유의성 있게 발현강도가 낮았다.

Ki-67은 자궁경부종양의 중증도에 따른 발현강도는 통계적으로 의미가 없었으나, 중등도 이상의 자궁경부 이형증에서는 미세침윤암과 침윤암에 비해 통계적으로 의의 있게 발현이 강하였다. 정상 및 경증 이형증에서는 발현을 관찰 할 수 없었고, 발현강도가 아주 높은 경우에서만 미세혈관수가 통계적으로 유의성 있게 높았다. 그러나 Ki-67 발현강도와 VEGF나 PD-ECGF 발현강도와의 비교에서는 통계적으로 의의가 없었다.

이상의 결과를 종합하면 VEGF와 PD-ECGF는 자궁경부종양의 중증도에 비례하여 발현강도가 강해지며, 발현양성군에서 미세혈관수가 의의 있게 증가함을 볼 수 있었고, 자궁경부종양에 혈관신생이 필수적이었다. VEGF와 PD-ECGF는 혈관신생에 관여함을 관찰 할 수 있었으며, VEGF의 발현은 침윤

성 편평상피암과 침윤성 선암으로의 진행에 관여함을 시사하나, PD-ECGF의 발현강도가 침윤성 선암에서 통계적으로 의의 있게 낮은 것을 볼 때 PD-ECGF가 침윤성 선암의 진행에는 크게 관여하지는 않는 것으로 생각된다. 이것은 조직학적 특성에 따라서 관여하는 혈관신생인자가 서로 다를 수 있지 않는가를 의심해 볼 수 있다.

Ki-67에 있어서는 자궁경부종양의 중증도에 따른 발현강도의 차이는 볼 수 없었으나, Ki-67의 발현이 강한 군에서는 미세혈관 수도 통계적으로 의의 있게 높았음을 관찰 할 수 있었다. 이것은 같은 등급의 병변에서도 그 활성도에 따라 병의 진행정도가 다를 것으로 생각되며 앞으로 더욱 연구되어야 할 것으로 생각된다.

- 참고문헌 -

1. Folkman J. How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue?. *Cancer Res* 1986; 46:467-73.
2. Folkman J. Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res* 1985;43:175-203.
3. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992; 267:10931-4.
4. Kaplan HS. The biology of neoplasia. In: Smith CH, Thier SO, eds. *Pathophysiology*. Philadelphia: WB Saunders, 1981;300-7.
5. Folkman J. What is the evidence that tumor are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990; 82:4-6.
6. Kainz C, Speister P, Wanner C, Obermair, Tempfer C, Sliutz G, et al. Prognostic value of tumor microvessel density in cancer of the uterine cervix stage IB to IIB. *Anticancer Res* 1995;15:1549-52.
7. Dellas A, Moch, H, Schultheiss E, Feicher G, Almendral AC, Gudat F, et al. Angiogenesis in cervical neoplasia: microvessel quantitation in precancerous lesion and invasive carcinomas with clinicopathological correlations. *Gynecol Oncol* 1997; 67:27-33.
8. Folkman J, Klagsburn M. Angiogenesis Factors. *Science* 1987;235:442-7.
9. Weider N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis: correlation in invasive breast carcinoma. *N Eng J Med* 1991;324:1-8.

10. Kuwano M, Ushiro S, Ryuto M, Samoto H, Izumi H, Ito K, et al. Regulation of angiogenesis by growth factors. *Gann Monogr Cancer Res* 1994;42:113-5.
11. Ferrara N, leung DW, Cachianes G, Winer J, Henzel WJ. Purification and cloning of vascular endothelial growth factor secreted by pituitary folliculostellate cells. *Methods Enzymol* 1991;198:391-405.
12. Sumizawa T, Furukawa T, Haraguchi M, Yosimura A, Takeyasu A, Ishizawa M, et al. Thymidine phosphorylase activity associated with platelet-derived endothelial cell growth factor. *J Biochem* 1993;114:9-14.
13. Haraguchi M, Miyadera K, Uemura K, Sumizawa T, Furukawa T, Yamada K, et al. Angiogenic activity of enzymes. *Nature* 1995;368:198.
14. Chung TK, Chung TH, Wong FW, Wong YF. Ki-67 and AgNORs staining in squamous cell carcinoma of the cervix; A comparison. *Gynecol Obstet Invest* 1994;37:127-9.
15. Ng IO, Na J, Lai EC, Fan ST, Ng M. Ki-67 antigen expression in hepatocellular carcinoma using monoclonal antibody MIB1. A comparison with proliferating cell nuclear antigen. *Am J Clin Pathol* 1995;104:313-318.
16. McCluggage WG, Buhidma, Tang L, Maxwell P, Bharucha H. Monoclonal antibody MIB1 in the assessment of cervical intraepithelial lesions. *Int J Gynecol Pathol* 1996;15(2):131-6.
17. Liona L, Kleinerman J, Saldel G. Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessel, and pulmonary metastases following tumor implantation. *Cancer Res* 1974;34:997-1004.
18. Folkman J, Haudenschild CC. Angiogenesis in vitro. *Nature(London)* 1980;188:551-6.
19. Gimbrone MA Jr, Cotran RS, Leapman SB, Folkman J. Tumor growth and neovascularization: An experimental model using the rabbit cornea. *J Natl Cancer Inst* 1974;52:413-23.
20. Maeda K, Chung YS, Takatsuka S, Ogawa Y, Sawada T, Yamashita Y, et al. Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence in gastric carcinoma. *J Clin Oncol* 1995;13:477-81.
21. Fontanini G, Bigini D, Bignati S, et al. Microvessel count predicts metastatic disease and survival in non-small cell lung cancer. *J Pathol* 1995;177:57-63.
22. Nagy JA, Brown LF, Senger DR, Lanir N, Van de Water L, Dvorak AM, et al. Pathogenesis of tumor stroma generation: critical role for leaky blood vessels and fibrin deposition. *Biochem Biophys Acta* 1989;948:305-26.
23. Wiggins DL, Granai CO, Steinhoff MM, et al. Tumor angiogenesis as a prognostic factor in cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 1995;56:353-6.
24. Obermair A, Bancher-Todesca D, Biligi S, Kohlberger P, Mullauer-Ertl S, Leodolter S, et al. Correlation of vascular endothelial growth factor expression and microvessel density in cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1997;89(16):1212-7.
25. Ravazoula P, Zolota V, Hatjicondi O, Sakellaropoulos G, Kourounis G, Maragoudakis ME. Assessment of angiogenesis in human cervical lesions. *Anticancer Res* 1996;16(6B):3861-4.
26. Gasparini G, Weidner N, Bevilacqua P, et al. Tumor microvessel density, P53 expression, tumor size, and peritumoral lymphatic vessel invasion are prognostic markers in node-negative breast carcinoma. *J Clin Oncol* 1994;12:454-66.
27. Jaeger TM, Weicher N, Chew K, et al. Tumor angiogenesis correlates with lymph node metastases in invasive bladder cancer. *J Urol* 1995;154:69-71.
28. Bremer GL, Tiebosch AT, van der Putten HW, Schouten HJ, de Haan J, Arends JW. Tumor angiogenesis: an independent prognostic parameter in cervical cancer. *Am J Obstet Gynecol* 1996;174:126-31.
29. Kainx C, Speiser P, Wanner C, et al. Prognostic value of tumor microvessel density in cancer of the uterine cervix stage IB to IIB. *Anticancer Res* 1995;15:1549-52.
30. Avall-Lundqvist EH, Silfversward C, Aspenblad U, Nilsson BR, Auer GU. The impact of tumor angiogenesis, p53 overexpression and proliferative activity (MIB-1) on survival in squamous cervical carcinoma. *Eur J Cancer* 1997;33(11):1799-804.
31. Guidi AJ, Abu-Jawdeh G, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Dvorak HF, et al. Vascular permeability factor(vascular endothelial growth factor) expression and angiogenesis in cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1995;87(16):1237-45.
32. Keizo T, Junichi K, Noriko S, Yoshie N, Yasunari M, Shigehito K, et al. Different Angiogenic Pathways in Human Cervical Cancers. *Gynecol Oncol* 1998;68:38-44.
33. Abulafia O, Triest WE, Sherer DM. Angiogenesis in malignancies of the female genital tract. *Gynecol Oncol* 1999;72(2):220-31.
34. Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* 1993;362(6423):841-4.
35. Alcalde RE, Terakado N, Otsuki K, Matsumura T. Angiogenesis and expression of platelet-derived endothelial cell growth factor in oral squamous cell carcinoma. *Oncology* 1997;54(4):324-8.

36. Fujieda S, Sunaga H, Tsuzuki H, Tanaka N, Saito H. Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor in oral and oropharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res* 1998;4(7):1583-900.
37. Maeda K, Kang SM, Ogawa M, Onoda N, Sawada T, Nakata B, et al. Combined analysis of vacular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma. *Int J Cancer* 1997;74(5): L545-50.
38. Takahashi Y, Bucana CD, Akagi Y, Liu W, Cleary KR, Mai M, et al. Significance of platelet-derived endothelial cell growth factor in the angiogenesis of human gastric cancer. *Clin Cancer Res* 1998;4(2):429-34.
39. Fujimoto J, Sakaguchi H, Hirose R, Ichigo S, Tamaya T. Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF) and its mRNA in uterine cervical cancers. *Br J Cancer* 1999;79(7-8):1249-54.
40. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody associated with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983;31:13-20.
41. Key G, Becker MHG, Baron B, et al. New Ki-67-equivalent murine monoclonal antibodies(MIBI-3) generated against bacterially expressed parts of the Ki-67 cDNA containing three 62 base pair repetitive elements encoding for the Ki-67 epitope. *Lab Invest* 1993;68:629-36.
42. Piffko J, Bankfalvi A, Ofner D, Kusch F, Bocker W, Joos U, et al. In situ assessment of cell proliferation at the invasive front of oral squamous cell carcinomas. *Virchows Arch* 1996;429(4-5):229-34.
43. Imamura H, Haga S, Shimizu T, Watanabe O, Kajiwara T, Aiba M. Prognostic significance of MIB1-determined proliferative activities in intraductal components and invasive foci associated with invasive ductal breast carcinoma. *Br J Cancer* 1999;79(1):172-8.
44. Shim JW, Koh YC, Ahn HK, Park YE, Hwang DY, Chi JG. Expression of bFGF and VEGF in brain astrocytoma. *J Korean Med Sci* 1996;11(2):149-57.
45. Shrestha ML, Miyake H, Kikutsuji T, Tashiro S. Prognostic significance of Ki-67 and p53 antigen expression in carcinomas of bile duct and gallbladder. *J Med Invest* 1998;45(1-4):95-102.
46. Viale G, Maisonneuve P, Bonoldi E, Di Bacco A, Bevilacqua P, Panizzoni GA, et al. The combined evaluation of p53 accumulation and of Ki-67 (MIBI) labelling index provides independent information on overall survival of ovarian carcinoma patients. *Am Oncol* 1997;8(5):469-76.
47. Marcelli AR, Demopoulos RI, Goswami S, Mittal KR. Comparison of p53 and MIBI expression in benign and borderline areas of ovarian serous tumors. *Int J Gynecol Pathol* 1996;15(1):39-44.
48. Morimura Y, Hoshi K, Hang XL, Takano Y, Ohishi M, Honda T, et al. A. Evaluation with MIBI antibody of proliferative activity in ovarian clear cell adenocarcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 1996;15(4):315-9.
49. Garzetti GG, Ciavattini A, Goteri G, De Nicolis M, Stramazzotti D, Lucarini G, et al. Ki67 antigen immunostaining (MIB 1 monoclonal antibody) in serous ovarian tumors: index of proliferative activity with prognostic significance. *Gynecol Oncol* 1995;56(2):169-74.
50. Morimura Y, Yanagiea K, Hashimoto T, Takano Y, Watanabe F, Yamada H, et al. Evaluation of immunostaining for MIBI and nm23 products in uterine cervical adenocarcinoma. *Tohoku J Exp Med* 1998;185(3):185-97.
51. Brown DC, Cole D, Gatter KC, Mason DY. Carcinoma of the cervix uteri: an assessment of tumor proliferation using the monoclonal antibody Ki-67. *Br J Cancer* 1988;57:178-81.
52. Oka K, Arai T. MIB1 growth fraction is not related to prognosis in cervical squamous cell carcinoma treated with radiotherapy. *Int J Gynecol Pathol* 1996;15(1):23-7.
53. Hendricks JB, Wilkinson EJ, Kubilis P, Blaydes SM, Munakata S. Ki-67 expression in vulvar carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 1994;13(3):205-10.
54. Bulten J, van der Laak JA, Gemmink JH, Pahlplatz MM, de Wilde PC, Hanselaar AG. MIB1, a promising marker for the classification of cervical intraepithelial neoplasia. *J Pathol* 1996;178(3):268-73.
55. McCluggage WG, Buhidma M, Tang L, Maxwell P, Bharucha H. Monoclonal antibody MIB1 in the assessment of cervical squamous intraepithelial lesions. *Int J Gynecol Pathol* 1996;15(2):131-6.

= 국문 초록 =

목적 : 자궁경부종양에서 임상병리학적 특성에 따른 VEGF와 PD-ECGF의 발현 양상과 Ki-67의 증식 활성도를 평가하기 위함.

방법 : 정상 자궁경부 조직(20예), 경도 이형증(36예), 중등도 이형증(28예), 고도 이형증(36예), 상피내암종(28예), 미세침윤암(17예) 그리고 침윤암(38예, 21예는 편평상피암, 17예는 선암)에서 미세혈관밀도 측정을 위해 Factor VIII 관련 항원과 혈관신생인자인 VEGF와 PD-ECGF의 발현강도를 비교하기 위해 면역염색을 시행하고, 또한 종양의 증식 활성도를 평가하기 위해 Ki-67의 발현양상을 조사하였다.

결과 : 자궁경부종양에서 중증도에 따른 미세혈관수가 증가는 되었으나, 통계학적 유의성은 정상조직과 경증 이형증에 대해 침윤암과의 비교에서만 관찰되었다.

VEGF와 PD-ECGF는 자궁경부상피내종양의 중증도에 따라 통계학적으로 유의 있게 발현강도의 증가가 관찰되었다. 또한 미세혈관수와 비교에서도 발현양성군과 발현음성군간의 차이가 통계학적으로 유의성이 있었다. PD-ECGF는 VEGF와 달리 침윤성선암에서 통계학적으로 유의성 있게 발현강도가 낮았다. Ki-67은 자궁경부종양의 중증도에 따른 발현강도는 통계학적으로 의의가 없었으나, 중등도 자궁경부 이형증 이상에서는 미세침윤암과 침윤암에 비해 통계적으로 의의 있게 발현이 강하였다. Ki-67 발현강도와 VEGF나 PD-ECGF 발현강도와의 비교에서는 통계학적으로 의의가 없었다.

결론 : VEGF와 PD-ECGF는 중요한 혈관신생인자이며, 자궁경부종양의 진행과 연관이 있다. VEGF의 발현은 침윤성편평상피암과 침윤성선암의 진행에 관여하나, PD-ECGF는 침윤성선암의 진행에는 크게 관여하지 않는 것으로 생각되며 이것은 조직학적 특성에 따라 종양의 성장에 관여하는 혈관신생인자가 서로 다를 수 있지 않는가를 의심해 볼 수 있다고 생각한다.

Ki-67에 있어서는 자궁경부종양의 중증도에 따른 발현강도의 차이는 볼 수 없었다.

주요 단어 : 자궁경부종양, VEGF, PD-ECGF, Ki-67