

침윤성 자궁경부암에서의 Angiopoietin-1과 -2 mRNA 발현

이화여자대학교 의과대학 산부인과학교실
유민영 · 문혜성 · 박한희 · 정혜원 · 김승철

Expression of Angiopoietin-1 & -2 mRNA in Invasive Cervical Cancer

Min Young Yoo, M.D., Hye Sung Moon, M.D., Han Moie Park, M.D.,
Hye Won Chung, M.D., Seung Cheol Kim, M.D.

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

Objective : The angiopoietins (Ang) are recently described as one of growth factors for vascular endothelium. This study was aimed to investigate the Ang-1 and Ang-2 mRNA expression between in cervical cancer and in normal cervix and to assess the relationships among their expression and other prognostic factors of cervical cancer.

Patients and Methods : Ang-1 and Ang-2 mRNA expression were investigated by quantitative competitive PCR between in cervical cancer of 34 cases and in normal cervix of 14 cases at Ewha Womans University Mokdong Hospital from March 1998 to June 2000.

Results : Both in cervical cancer and normal cervical tissue, 612 bp sized Ang-1 mRNA and 518 bp sized Ang-2 mRNA were expressed. In comparison to normal cervix, their expression was significantly elevated in cervical cancer ($p < 0.05$). A definite correlation was found between Ang-1 mRNA expression and clinical stage of cervical cancer ($p < 0.05$). There was significant correlation among Ang-2 mRNA expression and clinical stage, tumor sizes, SCC-Ag levels, lymph node metastasis of cervical cancer ($p < 0.05$).

Conclusion : The expression of Ang-1 & -2 mRNA could be associated with the progression and metastasis of cervical cancer and might have a role as a prognostic parameter in cervical cancer.

Key Words : Cervical cancer, Angiopoietin

서 론

맥관형성(angiogenesis)은 기존에 존재하는 혈관에서부터의 신생혈관이 형성되는 과정으로¹⁻³ 이 과정은 내피세포의 이동, 증식, 분화와 함께 세포와 기질의 단백질 분해과정 등의 다양한 과정에 의해 일어나며, 생리적이거나 병리적으로 일어나는 생물학적 과정에 중요한 역할을 담당한다.⁴

가임기 정상 여성에서 월경주기마다 맥관형성이 일

어나며⁵ 이는 초기배아발생,⁶ 창상치유, 종양성장에 있어 필수적인 과정이고, 동맥경화증(atherosclerosis), 당뇨병 망막병증, 혈전증 등⁷ 상처 치유과정이나 다른 내분비 질환, 암성장에도 관여하는 것으로 알려져 있다.⁸

암화과정에서는 맥관형성 자극요소와 저해요소의 균형이 깨지면서 빠른 혈관형성이 유도된다.⁹ 암의 성장은 두 단계의 혈관형성과정을 거치는데^{3,10,11} 첫 단계는 암의 성장이 제한된 상피내 종양에 해당하는 혈

관형성 전단계로 수년간 지속되며 전이되지 않는다. 둘째 단계는 혈관형성 단계로 암의 빠른 성장과 전이로 특징지어진다. 이는 자궁경부암을 포함한 고형성 종양(solid tumor)의 성장 및 전이에 있어 매우 중요한 과정이며, 종양세포 및 종양주위의 기질세포에서 분비되는 다양한 맥관형성인자들이 관여하여 혈관 내피세포의 증식과 이동을 유도, 신생혈관을 유도한다.¹²

맥관형성인자들로는 현재까지 vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factors (FGFs), platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factor-beta (TGF-β) 등이 알려졌다, 최근 Angiopoietin(이하 Ang로 칭함)이라 불리워지는 내피세포에 특이적인 새로운 성장인자가 발견되었다.¹² Ang은 최근에 연구되기 시작한 혈관내피에 작용하는 성장인자로 이전까지 많이 연구된 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor)와는 다르게 맥관형성에 관여하는 것으로 알려졌다. Ang-1은 내피세포의 이동과 발생을 유도하며, 과발현이 된 경우에는 혈관 과밀(hypervascularization)이 되고, Ang-2는 Ang-1과 경쟁적으로 작용하여 혈관내피성장인자의 존재하에 혈관을 불안정하게 만들어 종양혈관의 재구성을 유도한다.

Ang은 혈관신생인자로 Ang-1, -2, -3과 -4로 분류되어지며,¹³ Ang-1과 -2는 Tie2에 결합된다.¹⁴ Ang-1과 -2는 약 60% 정도의 동일성을 갖는 유사한 구조로 Tie2 수용체에 대해 비슷한 정도의 친화력을 가진다.¹⁵ Ang/Tie system은 종양혈관신생뿐만 아니라 초기배아에서의 혈관형성 및 성인에서의 정상혈관구조 유지에 있어서도 중요하다고 알려져 있다.^{16,17}

Ang-1은 amino-terminal secretory signal sequence를 포함한 498 아미노산으로 이루어져 있으며, 혈관내피세포내의 수용체의 Tie2 tyrosine phosphorylation를 유도하여 맥관형성에 관여하는 것으로 알려졌다. Ang-2는 Ang-1의 길항제(antagonist)로 496 아미노산으로 이루어져 있으며, 혈관내피세포에서 Ang-1에 의해 유도되어지는 Tie2 phosphorylation을 억제함으로써 맥관형성에 관여한다고 한다.¹⁸

Ang-1은 혈관내피세포와 주위의 지지세포와의 상호작용을 촉진시킴으로서 성숙된 혈관을 안정화시키는 역할을 하기 때문에 Ang-1이 과발현된 경우에는 혈관생성이 증가하게 된다.¹² Ang-2는 Ang-1에 의한 작용을 방해하여 VEGF의 혈관생성반응을 촉진시키나, VEGF가 없는 경우에는 혈관을 퇴행시킨다고 알

려졌으며,^{14,19,20} 따라서 Ang-2가 과발현된 경우에는 혈관세포의 안정성과 혈관재배열에 장애가 생긴다고 하였다.^{12,14}

최근에 Ang-2 mRNA는 혈관분포가 많은 glioblastoma, Kaposi 육종, 피부혈관육종, 혈관종, 갑상선암, 위암, 대장암 등에서 과발현되며,^{12,17,18,21-24} Ang-2는 종양세포에서만 아니라 고형암내의 미세혈관내피세포에서도 과발현된다고 하였다.¹⁸ 따라서 고형성 암에서의 Ang-2 발현이 중요한 역할을 할 것으로 생각되어 지고 있다.

Ang-1은 종양세포종류에 따라 혈관생성에 대한 촉진작용을 하거나 방해작용을 하기도 한다고 알려졌다. 인간 자궁경부암을 이용한 이종이식(xenograft) 모델에서 Ang-1 antisense oligonucleotide를 주입한 결과 nude mice의 종양세포 성장과 종양신생혈관형성을 지연시킨다고 보고함으로써,²⁵ Ang-1 발현이 고형성 암의 진행에 관여함을 시사하였다. 반면에 유방암에서의 Ang-1 과발현은 종양의 성장을 억제시키는 방해작용을 한다고 보고되었다.²⁶

이에 본 연구에서는 정상 자궁경부와 자궁경부암 조직에서 Ang-1과 -2 mRNA의 발현을 연구함으로써 Ang-1과 -2 mRNA 발현이 자궁경부암의 암화과정에 관여하는지를 알아보고자 하였으며 또한 자궁경부암에서의 Ang-1과 -2 mRNA 발현의 상호연관성과 다른 자궁경부암의 예후인자, 즉 자궁경부암의 임상적 병기나 조직학적 유형, 임파절 전이, SCC-Ag 수치 등과 상관관계가 있는 지를 알아보고자 하였다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

1998년 3월부터 2000년 6월까지 이화의료원 부속 목동 병원 산부인과를 내원하여 조직생검으로 자궁경부암으로 진단받은 환자 34예를 대상으로 하였으며 조직은 조직생검 및 원추생검술에 의해 채취하였다. 대조군은 자궁내막증이나 자궁근종으로 자궁적출술을 시행받은 환자 14예로 자궁경부암 세포진 검사가 정상인 경우로 하였으며 조직은 수술시 채취하였다. 자궁경부암 환자의 임상적 특징은 의무기록을 참조하였다.

2. 연구 방법

1) RNA 추출

정상 자궁경부 및 경부암 생검 조직에서 다음과 같이 total RNA를 분리하였다. 조직의 혈액제거를 위하여 phosphate buffered saline(이하 PBS)으로 세척한 후 조직 100 mg당 1 ml의 RNA-STAT-60 (Tel-Test “B” Inc., Friendswood, TX)를 넣은 후 균질화하였다. RNA-STAT-60 1 ml당 500 μ l의 chloroform을 넣고 원심분리 후 상층액을 isopropanol 500 μ l에 넣어 침전시킨 후 침전물을 75% ethanol로 한번 세척한 후 공기중에서 말려 diethylpycarbonate (DEPC)로 처리한 물에 녹였다. RNA의 순도 및 양은 분광광도 분석기로 측정하였다.

2) 역전사 중합효소 연쇄 반응(RT-PCR)을 위한 올리고 뉴클레오타이드 시발체(oligonucleotide primer)의 설계

Ang-1과 -2의 염기서열을 National Institute of Health 산하의 National Center for Biotechnology Information의 Gene Bank Database에서 얻은 후 OLIGO 5.0 primer analysis software (National Bioscience, Plymouth, MN)을 이용하여 올리고 뉴클레오타이드 시발체(oligonucleotide primer)를 고안하였다. 올리고 뉴클레오타이드 시발체의 염기서열 및 mRNA에서의 위치는 Table 1과 같다.

3) 역전사(Reverse Transcription)

역전사 중합효소 연쇄반응에는 Gen Amp RNA PCR kit (Perkin-Elmer, Foster City, CA)을 사용하였다. 5 mmol/L MgCl₂, IX PCR buffer II, dNTP 1 mmol/L, 2.5 μ l/L oligo deoxythymidine, 20 IU ribonuclease inhibitor, 50 IU Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase(이상 Perkin Elmer)를 포함한 역전사용 혼합물 19 μ l에 1 μ l당 1 μ g이 되게 희석한 RNA 1 μ l를

넣은 후 역전사하였다. 역전사는 Perkin-Elmer사의 DNA thermal cycler 9600을 이용하여 42℃에서 15분, 99℃에서 5분 반응시켜서 4℃로 냉각시킨 후 사용 전까지 -20℃에 보관하였다. 음성대조는 RNA 1 μ l 대신 DEPC로 처리한 물 1 μ l를 넣고 역전사하였다.

4) Angiopoietin-1과 -2 competitive와 target cDNA의 합성

자궁경부암 조직에서 추출한 RNA로부터 역 전사 후 정상의 3', 5'- 시발체(primer)를 넣고 중합효소연쇄 반응을 통하여 612 bp의 Ang-1, 518 bp의 Ang-2 target DNA를 얻은 후 agarose gel에 전기영동시키고 Promega사의 DNA purification kit으로 cDNA를 추출하였다. competitive cDNA를 만들기 위하여 정상 3', 5'- 시발체 접합부위 사이의 염기 서열 중에서 3'- floating primer를 고안한 후 정상 5'- 시발체와 함께 반응시켜서 target cDNA를 얻는 방법과 같은 방법으로 cDNA를 추출하였다. 이렇게 만들어진 competitive cDNA는 Ang-1의 경우 276 bp, Ang-2의 경우 285 bp의 크기가 되었다.

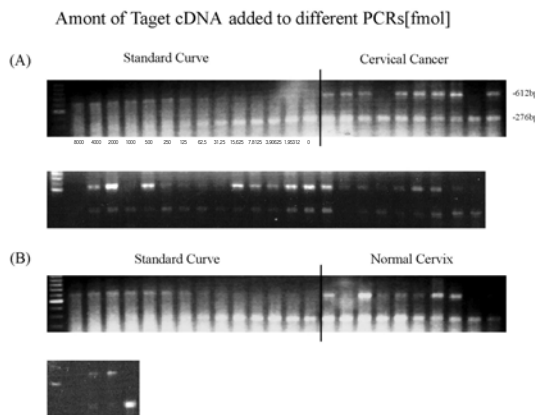
5) Standard curve 작성과 competitive PCR

Ang-1 & -2의 표준곡선(standard curve)은 일정한 양의 competitive cDNA (5 f, 10 f)와 점차 감소시킨 양의 target cDNA를 동시에 증폭하여 만든다(Fig. 1). 표준 곡선은 1.9 mmol/l MgCl₂, 10X PCR buffer II, 0.2 mmol/l deoxy-NT, 2.5 U Taq-polymerase을 포함한 100 μ l PCR 혼합용액과 0.2 μ mol/L의 시발체를 반응시킨 후 Perkin Elmer사의 DNA thermal cycler 9600으로 95℃ 5분간 모든 단백질을 변성(denaturation)시켜서 Ang-1의 경우 94℃ 1분, 62℃ 45초, 72℃ 1분, Ang-2의 경우 94℃ 1분, 58℃ 45초, 72℃ 1분으로 35주기 반응

Table 1. The sequences of Ang-1 & -2 oligonucleotide primer

mRNA	5' end to 3' end		size (bp)	position on mRNA
Ang-1	Upstream	GCTTACCAGATTCACACTGTTCC	612	1771-1793
	Downstream	TTGCTACCTTGCCAACAACCTG		2382-2362
	Competitor	TTGCTACCTTGCCAACAACCTGATTGCCTAAGGGAATG GACTG	276	2025-2005, 2382-2362
Ang-2	Upstream	TGGACAATTATTCAGCGACGTG	518	1313-1334
	Downstream	GCTGGTCGGATCATCATGGTTG		1830-1809
	Competitor	GCTGGTCGGATCATCATGGTTGGTCCCTGTAAGTCCT TTAAGGTG	285	1575-1553, 1830-1809

시키고 72℃ 7분 연장(elongation)시킨 후 4℃로 냉각시켰다. Ethidium Bromide (ETB)로 염색한 1% agarose gel에 표준곡선 및 표본 PCR 산물 25 µl씩을 100 bp의 DNA ladder와 함께 전기 영동시킨 후 Bio-Rad사의 Gel-Doc 1000 system의 자외선(UV) 농도계로 gel blot을 분석하였다. 표준곡선에 사용한 각각의 target cDNA의 양과 target cDNA/competitive cDNA의 gel blot 농도의 비를 log로 전환하여 표준곡선을 얻었다. 이 표준곡선은 반복해서 얻어졌으며, $y=b+mx$ 로 표현될 수 있어서 이로부터 농도를 알 수 없는 표본의 cDNA 양을 계산해 내었다. 각 환자에서 얻어진 두 개 이상의 RT 표본을 QC PCR 하였는데 두 개의 오차는 $\pm 5\%$ 미만이었다.



도, 임파절 전이에 따라서는 통계적으로 유의한 차이는 없었다($p>0.05$, Table 3). 자궁경부암에서 Ang-2 mRNA의 발현은 각 병기별, 암종의 크기, SCC-Ag 농도, 임파절 전이에 따라 통계적으로 유의한 차이를 보였으나($p<0.05$, Table 3), 조직병리학적 유형에 따른 통계적인 유의한 차이는 없었다($p>0.05$, Table 3).

Ang-1과 Ang-2 mRNA 발현간에는 유의한 상관관계가 있었다($p<0.05$, data not shown).

고 찰

맥관형성, 즉 새로운 혈관을 만들어 내는 과정은 성인에 있어서 세포수복이나 생리주기동안 여성의 생식세포에서도 정상적으로 일어나지만, 종양세포의 성장과 전이 과정에 있어 매우 중요하다.¹⁴ 고형성 종양은 종양주위의 이미 존재하고 있던 혈관에서 신생혈관을 형성하여 성장에 필요한 성분들을 공급받고, 구조적으로 취약한 신생혈관을 종양세포가 쉽게 침윤하여 전이된다.¹

맥관형성을 촉진하기 위해서 맥관형성인자는 종양세포와 주위기질 및 염증세포에서 분비되어 종양의 성장에 중요한 영향을 주는데, 조직내 발현 정도와 혈장내 농도가 증가할수록 종양의 재발 및 전이가 많고 그 종양의 악성도 및 예후와 밀접한 관련이 있다고 알려져 있다.²⁴ 실제 유방암, 폐암, 전립선암, 식도암,

대장암, 위암, 흑색종에서 맥관형성인자가 과발현될수록 혈관밀도가 높고 전이가 많이 발생한다.²⁴

자궁경부암은 한국 여성의 암중에서 가장 높은 빈도를 차지하는 고형성 암으로 여러 가지 진단방법에 의해 조기 진단 및 치료가 가능해지고 있다. 자궁경부암의 발생 및 진행에는 임상적 병기, 병소의 크기, 간질조직 및 자궁방 결합조직의 침윤 정도, 임파절 전이 등이 관여하며, 이러한 인자들을 정확히 파악하여 치료하는 것이 자궁경부암의 예후를 증진시키는데 도움이 된다. 최근 자궁경부암의 발생 및 전이에 맥관형성이 중요하며,²⁷ 이러한 맥관형성인자들이 관여함이 연구되어 지고 있다.

맥관형성에 관여하는 인자로는 20여종이 알려지고 있으며, 그 중에도 VEGF, FGF, PDGF, TGF- β 등에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 자궁경부암 환자의 혈청내 VEGF (sVEGF)가 상피내종양 환자의 sVEGF 보다 증가하였으며, 자궁경부암 치료 후에는 sVEGF가 감소한다고 하였다.²⁸ 또한 자궁경부 상피내종양에서도 등급이 진행됨에 따라 조직내 VEGF 발현이 점차로 증가하는 양상을 보인다고 하였다.²⁷ 따라서 자궁경부암의 진행에 맥관형성인자가 관여함이 시사되고 있다.

고형성암에서의 맥관형성에 대한 연구는 VEGF와 FGF와 같은 polypeptide growth factor에 편중해 있었으나 최근 VEGF와 함께 작용하는 Ang에 대한 연구

Table 3. Association between the clinicopathologic factors and the expression of Ang-1 & -2 mRNA in cervical cancer

Clinicopathological factors	Finding	Cases (n=34)	Ang-1 mRNA (p-value)	Ang-2 mRNA (p-value)
Age		53.86±1.97		
Stage	I	14		
	II	13	0.005	0.001
	III	4		
	IV	3		
Pathology	Squamous, Large cell keratinizing	5		
	nonkeratinizing	22	NS	NS
	Adenocarcinoma	5		
	Small cell	2		
Tumor size	<4 cm	18	NS	0.001
	>4 cm	16		
Lymph node	Negative	21	NS	0.001
	Positive	13		
SCC-Ag (ng/ml)	<2	18	NS	0.003
	>2	16		

*p value<0.05 by logistic regression analysis.

가 활발히 이루어지고 있다. 혈관내피세포에 대한 Ang의 특이한 작용은 Tie2 세포수용체와의 결합에 의해 이루어지며 VEGF와 유사한 양상을 나타낸다. Ang/Tie2 system이 종양의 맥관형성에 중요한 작용을 한다고 보고되어 있지만, Ang-1과 Ang-2의 생물학적 작용에 대해서는 아직까지 정확히 밝혀지지 않았다. 혈관발생에 있어 Ang과 Tie2는 초기의 혈관형성 시기에는 관여하지 않지만, angiogenic outgrowth, 혈관재배열(vessel remodeling), 혈관성숙(maturation)에는 중요한 역할을 한다고 한다. 이러한 후기 발생시기에는 Ang과 Tie2가 안정된 세포학적, 생화학적작용을 위해 내피세포와 주위결합세포에서 결합하게 된다.¹⁴

고형성암 발생에 있어 Ang 발현도와 종양침윤과의 상관관계에 대한 임상적인 연구는 극소수에 불과하다.²⁴ 이에 저자는 정상자궁경부와 자궁경부암에서의 Ang-1과 -2 mRNA의 발현에 대해 연구하였으며 자궁경부암에서 정상 자궁경부에서보다 Ang-1과 -2 mRNA가 과발현되었음을 발견하였다. Ang-1 mRNA는 종양종류에 따라 발현되는 정도가 다른데, 비소세포성 폐암에서는 정상 폐조직에 비해 Ang-1 mRNA가 과발현되지만,²⁹ 간세포암에서는 Ang-1 mRNA와 정상 간조직과 유사하게 발현된다.³⁰ Ang-2 mRNA는 과혈관성 종양인 신경아세포종(glioblastoma), Kaposi 육종, 피부혈관육종, 혈관종, 갑상선암, 위암, 및 대장암에서 과발현된다.^{12,17,18,21-24} 본 연구에서도 정상 자궁경부에 비해 자궁경부암에서 Ang-1과 -2 mRNA가 모두 과발현됨으로써 자궁경부암의 암화과정에 Ang mRNA 발현이 중요한 역할을 함을 시사하였다.

In situ hybridization에 의해 신경아세포종에서는 Ang-1 mRNA가 종양세포에서 주로 발현되는 반면, Ang-2 mRNA는 신경아세포종의 혈관내피세포에서 발현되며 특히 작은 모세혈관에서 발현이 강하게 된다고 하였다.²¹ 이는 Ang-1 mRNA가 종양세포에서 주로 발현되어 내피주위세포에 주로 분포하고 발현기전이 정확히 밝혀져 있지 않은 반면, Ang-2 mRNA는 종양세포뿐만 아니라 주로 내피세포에 분포하며 몇몇 성장인자와 감소된 산소분압에 의해 발현이 조절된다고 하였다. 이는 Ang-1과 Ang-2 mRNA를 주로 발현하는 세포가 다르기 때문에 종양에 따라 발현정도도 달라질 수 있음을 시사한다고 하겠다.^{15,31,32} 그러나 본 저자는 Ang-1과 -2 mRNA 발현만을 연구하였기 때문에 자궁경부암 세포, 암주위의 혈관내피세포에서의 Ang-1과 -2 mRNA의 분포에 대한 연구가 진행된다면

자궁경부암에서의 Ang-1과 -2 mRNA에 대한 역할을 좀 더 정확히 규명할 수 있으리라 생각된다.

또한 glioblastoma에서 Ang-1과 -2 단백질 발현에 대한 연구 결과, Ang-1은 저등급에서 약하게 발현되는 반면 등급이 높아질수록 과발현되는 양상을 보이며 모든 종양세포에서 발현되지만, Ang-2는 고등급 신경교종의 혈관세포에서만 발현되는 양상을 나타낸다고 하였다.²¹ 이는 vascular sprouting 과정으로 유도되어지는 종양의 맥관형성과정에 Ang-1과 Ang-2가 공동으로 관여하는 것을 의미한다고 하겠다. 따라서 본 연구의 자궁경부암에서도 Ang-1과 -2 mRNA가 과발현됨은 자궁경부암의 맥관형성에 함께 관여함을 시사한다고 하겠다.

유방암세포주 MCF-7에서의 Ang-1 과발현은 종양성장을 저해한다고 하였으나 그 기전은 정확히 밝혀지지 않았다.²⁶ Antisense oligonucleotide 주입을 통한 연구에서, 종양세포의 Ang-1 mRNA와 Ang-1 단백질 발현을 억제시킨 결과 면역결핍설치류(immunodeficient mice)에서 종양의 성장이 저해되고, 반대로 Ang-1이 과발현될 경우 종양성장에 가속화된다고 하였다.²⁵ 그러므로 종양에 따라 Ang-1 발현은 서로 다른 영향을 미침을 알 수 있다.

편평세포암세포주 A431에서 맥관형성에서의 Ang 기능을 연구한 보고에서 Ang-1에 의한 Tie2 수용체의 활성화가 종양혈관을 성숙시킨 반면, 종양세포성장의 70% 이상을 방해하였다고 하였다.²⁰ 과발현된 Ang-1이 편평세포암내의 내피세포와 내피주위세포와의 결합을 증강시키고 종양내 성숙된 혈관세포의 비율을 증강시켰다고 하였다. 이처럼 Ang-1 mRNA와 단백질이 과발현되는 경우에는 Ang-1/Tie2의 안정성이 붕괴되면서 종양내 혈관과밀을 유도한다. 그러나 혈관종의 내피세포에서는 Tie2 수용체의 발현이 증가하고, Ang-1의 반응도 항진된다고 하였다.¹⁷ 본 연구에서는 Tie2 발현을 연구하지 않았으나 Ang가 기능하는데는 수용체인 Tie2와의 상호작용이 중요하다고 생각되며 추후에 Tie2 발현을 확인하는 것이 필요하다고 하겠다.

Ang-2는 Ang-1의 맥관형성을 안정화시키는 작용을 억제함으로써 불안정한 혈관이 VEGF와 같은 맥관형성인자들의 반응에 좀더 민감하게 작용하도록 하여 종양혈관형성에 도움을 주지만, 이런 맥관형성인자들이 없는 경우에는 혈관을 퇴행시키는 작용을 하기도 한다.^{20,21} Ang-2는 Kaposi 육종 및 피부혈관종에서 처

럼 VEGF 및 KDR 수용체가 있는 경우에는 혈관신생을 촉진하는 작용을 하며 과발현된다고 한다.¹² 따라서 Ang-2는 혈관세포의 재배열과 종양의 비정상적인 성장을 일으킨다고 할 수 있겠다.

Ang-1과 Ang-2와의 상관관계에 대한 연구를 보면, 정상 혈관에서는 Ang-1의 발현이 Ang-2의 발현을 초과하는 반면, 종양의 혈관생성에서는 이와 역현상이 발생한다고 하였다.²¹ 본 연구에서도 Ang-1과 -2 mRNA의 과발현이 함께 동반되었지만, Ang-2 mRNA의 과발현이 더욱 현저하게 나타남으로써 위의 연구와 동일한 결과를 얻었다. 이는 과발현된 Ang-1으로 인해 종양혈관의 안정성이 방해받고, Ang-2의 과발현으로 Ang-1의 작용이 억제됨으로써 종양내 혈관들이 더욱 미성숙되어 악성화에 영향을 미친다고 하겠다.

위암에서 Ang-2의 과발현 정도는 암의 침윤 및 진행된 병기와 상관관계가 있다고 하였다.²⁴ 갑상선암의 경우에서도 Ang-2의 과발현 정도는 암의 병기, 전이 정도와 상관관계가 있다고 하였다.²² 본 연구에서도 Ang-2 mRNA의 과발현은 임파절 전이, 종양 크기, 병기, 증가된 SCC-Ag 농도와 통계적으로 의미있는 상관관계를 나타내었다. Ang-1의 과발현은 종양의 혈관내피세포의 sprouting을 통한 혈관과밀과 관계되고, 종양의 성장이 진행될수록 Ang-2의 과발현이 혈관미숙과 관련되어 종양세포가 더욱 쉽게 침윤되고 전이될 수 있는 환경을 제공하는 것으로 사료된다. 따라서 Ang-2 과발현이 자궁경부암의 진행에 있어 Ang-1의 과발현보다 나쁜 예후를 예측하는 인자로 더욱 유용하다고 하겠다.

Ang-1가 혈관내피세포의 sprouting을 유도하는 과정에는 focal adhesion kinase와 plasmin 분비가 관련된다고 하였다.³² Ang-1은 plasmin과 matrix metalloproteinase (MMP)-2의 분비를 촉진시키며 tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP)-2의 분비를 저해한다고 연구보고 되었다.^{18,33} Ang과 MMP, VEGF와의 상호작용에 대해 규명한 위암에서의 연구 결과에 따르면 Ang-2는 VEGF와 함께 혈관내피세포에서 MMP의 발현을 유도한다고 하였다.²⁴ 갑상선암의 경우에도 VEGF와 Ang-2가 동시에 상승할 때 종양성장을 가속화시켰으며, 임파절의 전이가 증가한다고 하였다.²² 종양의 혈관생성과정에서 혈관내피세포내의 VEGF, Ang-2의 MMP 분비 촉진은 autocrine 방법뿐만 아니라 Ang/Tie pathway의 paracrine 방법으로도 이루어진다고 하였다.²⁴ 본 연구에서 MMP, VEGF와 Ang-1 및

-2 mRNA와의 상호작용에 대해서는 실험하지 못하였으나 자궁경부암의 침윤과 전이에서의 MMP, VEGF의 역할이 중요함이 이미 밝혀진 바 VEGF의 존재하에 Ang-1과 -2 mRNA의 과발현이 MMP 분비를 촉진하여 종양혈관형성에 기여한다고 추정될 수 있다. 앞으로 MMP 및 VEGF와의 상호 작용 뿐 아니라 Ang과의 정량적인 상관관계에 대한 연구와 더불어 Ang 단백질과 mRNA와의 관계, Ang과 Tie2와의 상호작용에 대한 연구가 더 계속되어야 할 것으로 본다.

최근 VEGF와 Ang과의 상호작용에 대한 연구가 진행됨에 따라 최근 혈관 성장의 치료적인 조작으로 종양성장을 억제하는 것이 가능하다는 가설이 대두되고 있다.³⁴ Antisense oligonucleotide를 주입함으로써 종양세포에서의 Ang-1 단백질 생성을 감소시켜 종양맥관형성 및 종양성장을 저해하고 세포고사(cell apoptosis)를 증가시킬 수 있다는 연구보고가 있어,²⁵ 이를 자궁경부암을 포함한 고형성 암에서 anti-angiogenesis cancer therapy로 응용할 수 있는 연구가 계속되어야 할 것으로 사료된다.

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. 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. Ye F, Florian M, Magder SA, Hussain SNA. Regulation of angiopoietin and Tie-2 receptor expression in nonreproductive tissues by estrogen. Steroids 2002; 67: 305-10.
6. Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, David S, Sato TN, Yancopoulos GD. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the Tie2 receptor, during embryonic angiogenesis. Cell 1996; 87: 1171-80.
7. Huang YQ, Li JJ, Karparkin S. Identification of a family of alternatively spliced mRNA species of angiopoietin-1. Blood. 2000; 95: 1993-9.
8. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid

- and other disease. *Nat Med* 1995; 1: 27-31.
9. Hanahan D, and Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; 86: 353-64.
10. Burke TW, Hoskins WJ, Heller PB. Prognostic factors associated with radical hysterectomy failure. *Gynecol Oncol* 1987; 26: 153-9.
11. Folkman J, Nicosia S, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987; 235: 444-7.
12. Brown LF, Dezube BJ, Tognazzi K, Dvorak HF, Yancopoulos GD. Expression of Tie1, Tie2, and angiopoietins 1, 2, and 4 in Kaposi's sarcoma and cutaneous angiosarcoma. *Am J Pathol* 2000; 156: 2179-83.
13. Valenzuela DM, Griffiths JA, Rojas J, Aldrich TH, Jones PF, Zhou H, McClain J, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Huang T. Angiopoietins 3 and 4: diverging gene counterparts in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96: 1904-9.
14. Maisonpierre PC, Suri C, John PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, et al. Angiopoietin-2, A natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*, 1997; 277: 55-60.
15. Kim I, Kim J, Ryu YS, Jung SH, Nah JJ, Koh GY. Characterization and expression of a novel alternatively spliced human angiopoietin-2. *J Biol. Chem* 2000a; 275: 18550-6.
16. Hashimoto T, Lam T, Boudreau NJ, Bollen AW, Lawton MT, Young WL. Abnormal balance in the angiopoietin-Tie2 system in human brain arteriovenous malformations. *Circ Res*. 2001; 89: 111-3.
17. Yu Y, Varughese J, Brown LF, Mulliken JB, Bischoff J. Increased Tie2 expression, enhanced response to angiopoietin-1, and dysregulated angiopoietin-2 expression in hemangioma-derived endothelial cells. *Am J Pathol* 2001; 159: 2271-80.
18. Koh YG, Kim I, Kwak HJ, Yun M, Leem JC. Biomedical significance of endothelial cell specific growth factor, angiopoietin. *Experimental and Molecular Medicine* 2002; 34: 1-11.
19. Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD. New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene* 1999; 18: 5356-62.
20. Hawighorst T, Skobe M, Streit M, Hong YK, Velasco P, Brown LF. Activation of the Tie2 receptor by angiopoietin-1 enhances tumor vessel maturation and impairs squamous cell carcinoma growth. *Am J Pathol* 2002; 160: 1381-92.
21. Stratmann A, Risau W, Plate KH. Cell type-specific expression of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 suggests a role in glioblastoma angiogenesis. *Am J Pathol* 1998; 153: 1459-66.
22. Bunone G, Vigneri P, Mariani L, Butto S, Collini P, Pilotti S, Pierotti MA, et al. Expression of angiogenesis stimulators and inhibitors in human thyroid tumors and correlation with clinical pathological features. *Am J Pathol* 1999; 155: 1967-76.
23. Yoshida Y, Oshika Y, Fukushima Y, Tokunaga T, Hatanaka H, Kijima H. Expression of angiostatic factors in colorectal cancer. *Int J Oncol* 1999; 15: 1221-5.
24. Etoh T, Inoue H, Tanaka H, Barnard GF, Kitano S, Mori M. Angiopoietin-2 is related to tumor angiogenesis in gastric carcinoma: possible in vivo regulation via induction of proteases. *Cancer Research* 2001; 61: 2145-53.
25. Shim WS, Teh M, Mack PO, Ge R. Inhibition of angiopoietin-1 expression in tumor cells by an antisense RNA approach inhibited xenograft tumor growth in immunodeficient mice. *Int J Cancer* 2001; 94: 6-15.
26. Hayes AJ, Huang WQ, Yu J, Maisonpierre PC, Liu A, Klemm FG. Expression and function of angiopoietin-1 in breast cancer. *Br J Cancer* 2000; 83: 1154-60.
27. Suh JG, Moon HS, Kim SS, Min BJ, Sung SH. The expression of vascular endothelial growth factor, kinase domain region, and transforming growth factor- β 1 in cervical cancer. *Kor J Obstet Gynecol* 2000; 43: 1913-20.
28. Moon HS, Kim SC, Ahn JJ, Woo BH. Concentration of vascular endothelial growth factor(VEGF) and transforming growth factor- β 1(TGF- β 1) in the serum of patients with cervical cancer: prediction of response. *Int J Gynecol Cancer* 2000; 10: 151-6.
29. Takayama M, Tsutsumi M, Tsujiuchi T. Enhanced expression of Tie2, its ligand angiopoietin-1, vascular endothelial growth factor, and CD31 in human non-small cell lung carcinomas. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 2506-10.
30. Tanaka S, Mori M, Sakamoto Y. Biological significance of angiopoietin-2 expression in human hepatocellular carcinoma. *J Clin Invest* 1999; 103: 341-5.
31. Oh H, Takagi H, Suzuma K, Otani A, Matsumura M, Honda Y. Hypoxia and vascular endothelial growth factor selectively up-regulate angiopoietin-2 in bovine microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1999; 274: 15732-9.
32. Kim IJ, Kim HG, Moon SO, Chae SW, So JN, Koh KN, Ahn BC, Koh GY. Angiopoietin-1 induces endothelial cell sprouting through the activation of focal adhesion kinase and plasmin secretion. *Circ Res* 2000b; 86: 952-9.
33. Kim I, Kwak HJ, Moon SO, Oh JL, Koh GY. Angiopoietin-1 inhibits VEGF-induced tissue factor mRNA and proteins through PI 3'-kinase/Akt activation in endothelial cells. *FASEB J* 2002; 16: 126-8.
34. Lin P, Buxton JA, Acheson A, Radziejewski C, Maisonpierre PC, Yancopoulos GD, Channon KM, Hale LP,

Dewhirst MW, George SE, Peters KG. Antiangiogenic gene therapy targeting the endothelium-specific receptor

tyrosine kinase Tie2. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 8829-34.

국문초록

목적 : angiopoietin-1, 2는 최근 연구되어지고 있는 혈관내피성장인자로, 자궁경부암과 정상자궁경부조직에서의 Ang-1과 -2 mRNA 발현을 연구함으로써 자궁경부암의 암화과정에 관여하는지를 알아보고자 하였으며 또한 자궁경부암에서의 Ang-1과 -2 mRNA 발현의 상호연관성과 다른 자궁경부암의 예후인자와의 상관관계가 있는지를 알아보고자 하였다.

연구 방법 : 34예의 침윤성 자궁경부암 환자와 14예의 정상자궁경부 조직에서 QT-PCR을 이용하여 Ang-1과 -2 mRNA 발현을 비교하였다.

결과 : 자궁경부암과 정상자궁조직에서 Ang-1과 -2 mRNA가 발현되었으며 자궁경부암에서 통계적으로 의미있게 과발현되었다. Ang-1 mRNA는 임상병기와 관련이 있었으며, Ang-2 mRNA는 임상병기가 진행될수록, 종괴의 크기가 클수록, SCC-Ag 농도 및 임파절 전이와 관련이 있었다.

결론 : Ang-1과 -2 mRNA는 자궁경부암의 진행 및 전이와 관련이 되고, 특히 Ang-2 mRNA가 예후인자와 더 많은 상관관계가 있으므로 향후 자궁경부암의 예후인자로 가능성이 제시되어질 수 있을 것으로 사료된다.

중심단어 : 자궁경부암, Angiopoietin