

정상 난소, 양성 난소종양, 상피성 난소암에서의 Angiopoietin-1, Angiopoietin-2, Tie-2와 Vascular Endothelial Growth Factor mRNA 발현에 관한 연구

이화여자대학교 의과대학 산부인과학교실
조운숙 · 문혜성 · 정혜원 · 김승철 · 전선희

목적 : Vascular endothelial growth factor는 맥관형성에 관여하며 또 다른 맥관형성인자인 angiopoietin-1은 정상 혈관의 성숙에 관여하고 angiopoietin-2는 수용체 Tie-2와의 결합에 의해 angiopoietin-1의 작용을 억제하는 것으로 알려져 있다. 최근 이러한 인자들이 암화과정에 관여하는 것으로 알려지고 있다. 따라서 본 연구에서는 정상 난소와 양성 난소종양, 난소암에서 이들의 mRNA 발현을 측정하여 이들의 관련성을 알아보고 이들의 mRNA 발현이 난소암화과정에 관여하는지 알아보고자 하였다.

연구 방법 : 1999년 5월부터 2003년 4월까지 이화여자대학교 의과대학부속 목동병원을 내원하여 난소암으로 진단받은 환자 29예와 양성난소종양으로 진단받은 환자 16예를 대상으로 하였으며 정상 난소를 가진 자궁근종 환자 18예에서 난소를 절제하는 경우 대조군으로 하였다. Angiopoietin-1 (Ang-1), Angiopoietin-2 (Ang-2), Tie-2, and vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA 발현은 Quantitative Competitive polymerase chain reaction (PCR)으로 시행하였으며 이들의 발현은 ANOVA test와 Spearman correlation test로 분석하였다.

결과 : 정상 난소에서의 Ang-1 mRNA 발현은 양성 난소종양과 난소암에 비해 통계적으로 유의하게 높았으며($p < 0.05$) Tie-2 mRNA 발현은 정상 난소와 난소암에서보다 양성 난소종양에서 통계적으로 유의하게 높았다($p < 0.05$). VEGF mRNA 발현은 정상 난소와 양성 난소종양보다 난소암에서 유의하게 높았으며 난소암에서 Ang-2 mRNA 발현은 VEGF mRNA의 발현과 Tie-2 mRNA 발현과 통계학적으로 유의한 상호관련성이 있었다.

결론 : Ang-1 mRNA 발현의 감소와 VEGF mRNA 발현의 증가가 난소암화과정에 역할을 하며 난소암에서의 Ang mRNA 발현은 Tie-2와 VEGF mRNA 발현에 영향을 받는 것으로 생각된다. 맥관형성에 관여하는 인자들의 상호작용이 중요함을 반영하는 결과로 앞으로 많은 예에서 계속 연구가 이루어져야 하겠다.

중심단어 : 상피성 난소암, Angiopoietin, Tie-2, Vascular endothelial growth factor

서 론

혈관내피세포가 모여 여러 축진 또는 억제 인자의 영향 하에 모세혈관을 이루며 뚫어나가는 맥관형성(angiogenesis)과정은 고형암이 산소 및 영양분을 받아 성장하기 위해 꼭 필요하다고 알려져 있다.¹⁻³ 이러한 맥관형성을 위해서는 맥관형성인자와 그 수용체, 그리고 세포내 신호전달체계 등이 동시에 작용하는 일련의 단계적 과정이 필요하며⁴ 맥관형성 인자의 전구 단계 물질이 증가

하게 되면 맥관형성이 촉진된다고 보고되었다.⁵

최근까지 밝혀진 맥관형성인자들 중 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor; VEGF)와 angiopoietin family는 유일하게 혈관의 내피세포에 특이적이라고 알려진 성장인자로서 종양의 맥관형성 과정에서 가장 중요한 역할을 할 것으로 생각되고 있다.⁶

Angiopoietin (Ang)는 혈관내피세포 특이 성장인자로서,^{7,8} Ang-1, Ang-2는 Tie-2라는 수용체에 결합한다.⁹ Angiopoietin과 Tie 체계는 종양혈관생성과 더불어 초기 배아에서의 혈관형성 및 성인에서의 정상혈관구조 유지에 있어서도 중요하다고 알려져 있다.¹⁰

Ang-1은 혈관내피세포와 주위의 지지세포 간의 상호작용을 촉진시킴으로써 성숙된 혈관을 안정화시키는 역

논문접수일 : 2006년 3월 20일 채택일 : 2006년 3월 31일
교신저자 : 문혜성, 158-710 서울시 양천구 목동 911-1
이화여자대학교 의과대학부속 목동병원 산부인과
전화 : 02) 2650-5274 · 전송 : 02) 2647-9860
E-mail : mhsmhs@ewha.ac.kr

할을 하는 반면,⁸ Ang-2는 Ang-1에 의한 작용을 방해하여 VEGF의 혈관생성반응을 촉진시키나, VEGF가 없는 경우에는 혈관을 퇴행시킨다고 알려져 있다.^{9,11,12} 따라서 Ang-2가 높게 발현된 경우에는 혈관세포의 안정성과 혈관재배열에 장애가 생긴다고 하였다.^{8,9}

맥관형성과정의 가장 초기에 작용하는 신호로써 VEGF의 발현이 가장 먼저 증가된다고 보고되었으며¹³ 이러한 VEGF는 혈장 단백질이 혈관 밖으로 투과되기 용이하도록 혈관의 투과성을 증가시키고 종양세포와 혈관내피세포의 증식을 유도한다고 알려져 있다.¹⁴⁻¹⁶

VEGF는 자궁경부의 전암성 변화(premalignant change) 및 침윤성 편평상피세포암의 맥관형성에도 기여할 것으로 추정된다고 하였다.^{17,18} 이와 같은 맥관형성인자의 발현에 대한 연구는 혈관내피세포의 발현이 증가하는 정상 조직이나 양성 질환에서 뿐만 아니라 고형암의 암화 과정에서도 시도되고 있다.

이에 본 연구에서는 정상 난소와 양성 난소종양, 난소암 조직에서 Ang-1, Ang-2, Tie-2 및 VEGF 등의 유전자의 발현을 관찰함으로써 양성 난소종양과 난소암에서의 각 인자들의 발현과 이들 인자들의 발현간의 상호 연관성을 분석하고자 하였다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

1999년 5월부터 2003년 4월까지 이화여자대학교 의과대학부속 목동병원을 내원하여 조직생검으로 난소암으로 진단받은 환자 29예와 양성난소종양으로 진단받은 환자 16예를 대상으로 하였으며(Table 1) 조직은 개복술이나 골반경을 시행하여 채취하여 -70°C 액화 질소 탱크에 보관하였다. 대조군은 자궁내막증이나 자궁근종으로 자궁적출술을 시행 받은 환자 18예에서 난소를 절제하는 경우로 하였으며 조직은 수술 시 채취하여 Total RNA를 추출하여 -20°C 냉동고에 보관하였다.

2. 연구 방법

1) Quantitative Competitive Polymerase Chain Reaction

(1) Total RNA 추출

정상 난소 및 난소종양, 난소암 생검 조직에서 다음과 같이 total RNA를 분리하였다. 조직의 혈액 제거를 위하

Table 1. Patient's characteristics

Disease	Number
Normal ovary	18
Benign ovarian cyst	16
Pathology	
Serous cystadenoma	8
Mucinous cystadenoma	3
Benign cystic teratoma	3
Hemorrhagic corpus luteal cyst	2
Ovarian cancer	29
Stage	
I	6
II	4
III	10
IV	9
Pathology	
Serous cystadenocarcinoma	21
Mucinous cystadenocarcinoma	1
Endometrioid adenocarcinoma	1
Clear cell carcinoma	2
Undifferentiated	4
Differentiation	
Well differentiated	5
Moderate differentiated	2
Poorly differentiated	22

여 phosphate buffered saline (PBS)으로 세척한 후 조직 100 mg당 1 ml RNA-STAT-60 (Tel-Test "B" Inc., Friendswood, TX, USA)를 넣은 후 균질화하였다. RNA-STAT-600 ml당 500μl의 chloroform을 넣고 원심분리 후 상층액을 isopropanol 500μl에 넣어 침전시킨 후 침전물을 75% ethanol로 한번 세척한 후 공기 중에서 말려 diethylpyrocabonate (DEPC)로 처리한 물로 녹였다. Total RNA의 순도 및 양은 분광광도 분석기(Beckman coulter Inc., Fullerton, CA, USA)로 파장 260 nm에서 측정하였다.

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

Ang-1과-2, Tie-2과 VEGF-1의 염기서열을 National Institute of Health 산하의 National Cancer for Biotechnology Information의 Gene Bank Database에서 얻은 후 OLIGO 5.0 primer analysis software (National Bioscience, Plymouth, MN, USA)을 이용하여 올리고 뉴클레오타이드 시발체를 고안하여 주문 제작하였다(Atman Bioscience, Korea). 올리고 뉴클레오타이드 시발체의 염

Table 2. The sequences of Ang-1, Ang-2, Tie-2, and VEGF oligonucleotide primer

	mRNA	Primer 5'-3'	Size (bp)	Position
Ang-1	Upstream	5'-GCT-TAC-CAG-ATT-CAC-ACT-GTT-CC-3'	612	1771-1793
	Downstream	5'-TTG-CTA-CCT-TGC-CAA-CAA-CAA-CTG-3'		2382-2362
	Competitor	5'-TTG-CTA-CCT-TGC-CAA-CAA-CAA-CTG-ATT-GCC-TAA-GGG-AAT-GGA-CTG-3'	276	2025-2005 2382-2362
Ang-2	Upstream	5'-TGG-ACA-ATT-ATT-CAG-CGA-CGT-G-3'	518	1313-1334
	Downstream	5'-GCT-GGT-CGG-ATC-ATC-ATG-GTT-G-3'		1830-1809
	Competitor	5'-GCT-GGT-CGG-ATC-ATC-ATG-GTT-GGT-CCC-TGT-AAG-TCC-TTT-AAG-GTG-3'	284	1575-1553 1830-1809
Tie2	Upstream	5'-TGG-AAT-GAC-CTG-CCT-GAC-TG-3'	395	2413-2432
	Downstream	5'-GAT-GAT-GTT-TGG-ATG-GTG-TCC-3'		2786-2806
	Competitor	5'-TGG-AAT-GAC-CTG-CCT-GAC-TGA-ACG-TGA-GGG-AAG-AAC-CAG-C-3'	320	2413-2432 2507-2526
VEGF	Upstream	5'-CCG-AAA-CCA-TGA-ACT-TTC-TGC-3'	350	149-169
	Downstream	5'-GCC-TTG-GTG-AGG-TTT-GAT-CC-3'		498-517
	Competitor	5'-GCC-TTG-GTG-AGG-TTT-GAT-CCA-CCA-GGG-TCT-CGA-TTG-GAT-G-3'	204	498-517 332-348

기서열 및 mRNA에서의 위치는 Table 2와 같다.

(3) 역전사

역전사 증합요소 연쇄반응에는 Gen Amp RNA PCR kit를 이용하였으며 5 mmol/L MgCl₂, 1XPCR buffer II, 1 mmol/L deoxy-NTP, 2.5 ml/L oligodeoxy-thimidine, 20 IU ribonuclease inhibitor, 100 IU Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA)를 포함한 역전사용 혼합물 19μl에 1μl당 1μg이 되게 희석한 RNA 1μl를 넣은 후 역전사하였다. 역전사는 DNA thermal cycler 9,600 (Perkin-Elmer Foster City, CA, USA)을 이용하여 42°C에서 15분, 99°C에서 5분 반응시켜서 4°C로 냉각시킨 후 사용 전까지 -20°C에 보관하였다. 음성 대조는 RNA 1μl 대신 DEPC로 처리한 물 1μl를 넣고 역전사하였다.

(4) Competitive와 Target cDNA의 합성

정상 난소를 포함하여 난소 종양, 난소암 조직에서 추출한 RNA로부터 역전사 후 정상의 3', 5'-시발체를 넣고 증합효소연쇄반응을 통하여 612 bp의 Ang-1, 518 bp의 Ang-2, 395 bp의 Tie-2, 350 bp의 VEGF의 target DNA를 얻은 후 agarose gel에 전기영동시키고 Promega사의 DNA purification kit으로 cDNA를 추출하였다. Competitive cDNA를 만들기 위하여 정상 3', 5'-시발체 접합부

위 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-1 276 bp, Ang-2 284 bp, Tie-2 320 bp, VEGF 204 bp의 크기가 되었다.

(5) Standard curve 작성과 competitive PCR

Ang-1, Ang-2, Tie-2, VEGF의 표준곡선(standard curve)은 일정한 양의 competitive cDNA와 점차 감소시킨 양의 target cDNA를 동시에 증폭하여 만든다. 표준곡선은 1.9 mmol/L MgCl₂, 10× PCR buffer II, 0.2 mmol/L deoxy-NT, 2.5 Utaq-polymerase을 포함한 100μl PCR 혼합용액에 0.2 μmol/L의 시발체를 넣고 반응시켜 Perkin elmer사의 DNA thermal cycler 9,600으로 95°C 5분간 모든 단백질을 변성(denaturation)시켜서 VEGF와 Ang-1의 경우에는 94°C 1분, 62°C 45초, 72°C 1분, Ang-2의 경우 94°C 1분, 58°C 45초, 72°C 1분, Tie-2의 경우 94°C 45초, 64°C 45초, 72°C 1분으로 35주기 반응시키고 72°C 7분 연장(elongation)시킨 후 4°C로 냉각시켰다. Ethidium Bromide (ETB)로 염색한 1% agarose gel에 표준곡선 및 표본 PCR 산물 25μl씩을 1,000 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 5% 미만이었다.

결 과

1. 정상 난소, 난소종양, 난소암에서 Ang-1, Ang-2, Tie-2, VEGF mRNA의 발현

RT-PCR을 한 결과 정상 난소, 난소종양, 난소암 조직 모두에서 612 bp 크기의 Ang-1 mRNA, 518 bp 크기의 Ang-2 mRNA, 그리고 395 bp 크기의 Tie-2 mRNA와 350 bp 크기의 VEGF mRNA가 발현되었다.

2. Ang-1, Ang-2, Tie-2, VEGF mRNA의 정량 분석
QC-PCR을 한 결과 모든 정상 난소와 난소종양, 난소암 표본에서 Ang-1와 Ang-2, Tie-2, 그리고 VEGF 각각의 target-cDNA와 competitive c-DNA 두 개의 band가 보였다.

표준곡선을 이용하여 mRNA를 정량한 결과 정상 난소에서의 Ang-1 mRNA 발현이 양성 난소종양과 난소암에 비해 통계적으로 유의하게 높았으며 양성 난소종양, 난소암순으로 감소되었다(Fig. 1, $p<0.05$). Ang-2 mRNA 발현은 정상 난소, 양성 난소종양, 난소암에서 통계적으로 유의한 차이는 없었다(Fig. 2, $p>0.05$).

Tie-2 mRNA 발현의 경우는 양성 난소종양에서 통계적으로 가장 유의하게 높았으며 정상 난소, 난소암 순으로 그 발현이 감소되었다(Fig. 2A, $p<0.05$).

VEGF mRNA 발현은 난소암의 경우 가장 통계적으로 유의하게 높았으며 양성 난소종양, 정상 난소순으로 그

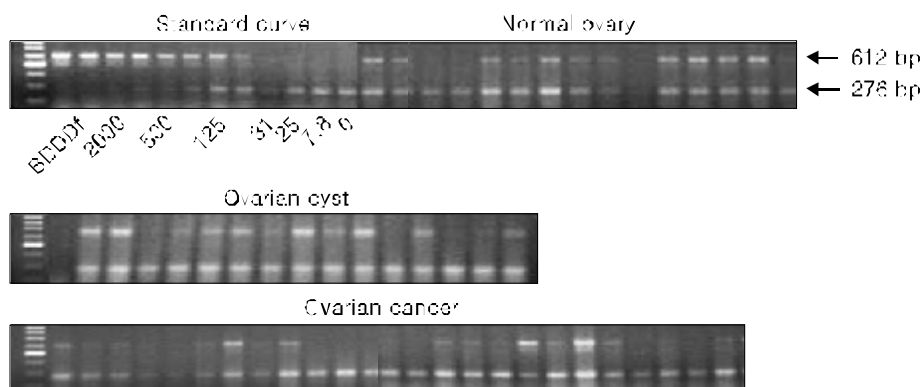


Fig. 1. QC PCR of Ang-1 in normal ovary, ovarian cyst and ovarian cancer. It shows agarose gel stained with ethidium bromide. Declining amounts of target cDNA in standard curve were co-amplified with 100 fmol of competitive cDNA.

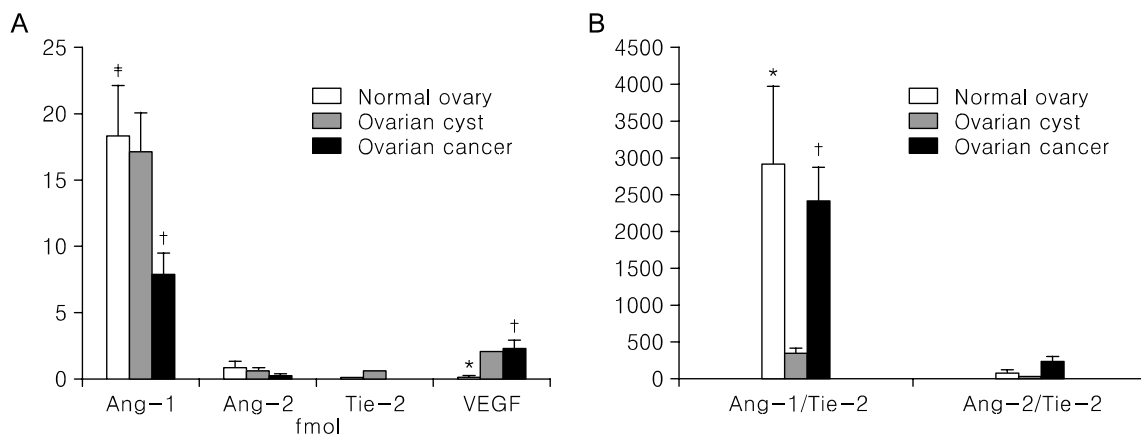


Fig. 2. (A) The expression of Ang-1 mRNA, Ang-2 mRNA, Tie-2 mRNA, and VEGF mRNA in normal ovary, ovarian cyst and ovarian cancer. (B) The expression of Ang-1 mRNA/Tie-2, and Ang-2 mRNA/Tie-2 mRNA in normal ovary, ovarian cyst and ovarian cancer. * $p<0.05$ between normal ovary and ovarian cyst, † $p<0.05$ between ovarian cyst and ovarian cancer, ‡ $p<0.05$ between normal ovary and ovarian cancer.

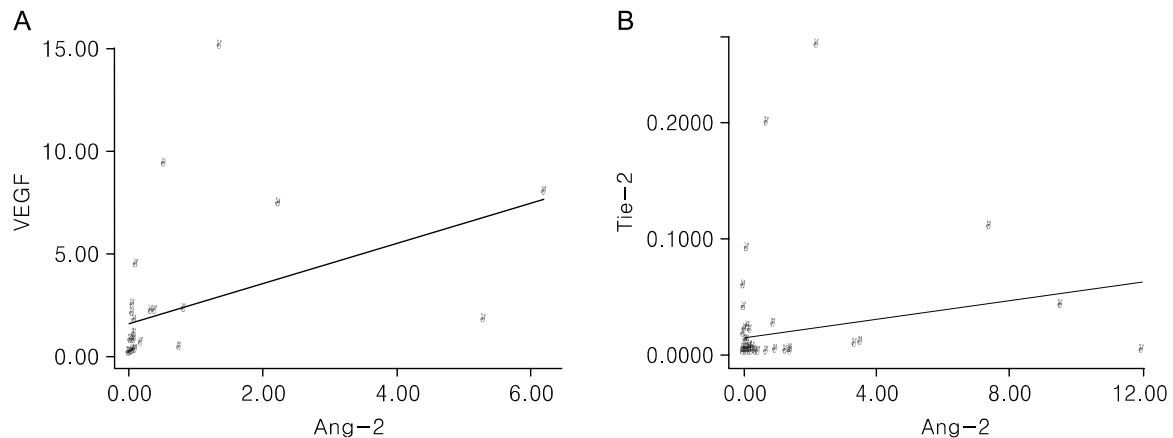


Fig. 3. Correlation curve of Ang-2 mRNA and VEGF mRNA (A), Ang-2 mRNA and Tie-2 mRNA (B) and VEGF mRNA in ovarian cancer.

발현이 감소되었다(Fig. 2A, $p < 0.05$).

Ang-1 mRNA/Tie-2 mRNA비는 정상 난소와 양성 난소 종양, 양성 난소종양과 난소암에서 통계적으로 유의한 차이가 있었다(Fig. 2B)

3. 난소암에서 Ang-1, Ang-2, Tie-2, VEGF mRNA 발현의 상호관련성 분석

난소암에서의 Ang-2 mRNA 발현은 VEGF mRNA의 발현과 Tie-2 mRNA 발현과 통계학적으로 유의한 상호관련성이 있었다(Fig. 3, $p < 0.05$).

고 찰

고형암이 성장하기 위해서는 종양세포 및 혈관내피세포의 상호작용에 의한 새로운 미세혈관의 발달이 필요하며, 암이 침윤하기 위해서는 기존의 혈관에서부터 이동한 혈관내피세포가 세포외 기질을 파괴하는 과정이 선행되어야 하며, 혈행성으로 전이하기 위해서는 암 조직내에 미세혈관이 발달되어야 한다. 따라서 일차적으로 발생한 고형암에서 생성된 맥관형성 조절인자 등은 맥관형성을 이루어 암의 침윤이나 전이에 중요한 역할을 한다.^{1,2,19}

난소암은 여성암의 5%를 차지하는 암으로 부인암 사망의 가장 주요한 원인이 되는 질환이다. 미국에서는 한 해동안 23,300명의 신환이 발생하며 13,900명이 난소암으로 사망하는 것으로 보고되고 있다.²⁰ 우리나라에서는 난소암이 악성 종양의 3.6%를 차지하며 2002년 한해 동

안 약 1,572명의 신환이 발생하여 부인암 중에서 유방암, 자궁 경부암에 이어 세번째로 많은 악성 종양이다.²¹ 난소암의 사망률이 높은 것은 대개 이미 진행된 상태에서 난소암이 진단되기 때문이며, 주로 초기에는 특별한 증상이 발현되지 않아 난소암을 조기 진단하기가 어렵기 때문에 난소암 조기 진단의 중요성이 강조되고 있으며 이에 따른 난소암의 조기 진단 및 예방에 대한 연구가 계속 진행 중에 있다.

최근 고형암의 성장과 전이에 관여하는 것으로 알려진 맥관형성이 자궁경부의 전암성 변화에도 기여할 것으로 추정된다고 연구보고 되었다.^{17,18,22} 이러한 인자들의 정상 조직과 암조직에서의 발현에 대한 비교연구가 진행됨으로써 고형암의 발생에 맥관형성이 미치는 영향에 대한 연구가 시도되고 있다.

맥관형성에 관여하는 인자로는 20여종이 알려지고 있으며, 그 중에도 vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblastic growth factor (FGF), platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factor- β (TGF- β) 등이 촉진인자로, thrombospondin-1 (TSP-1), angiostatin, endostatin 등이 억제인자로 알려져 있다.²³

최근 VEGF와 함께 작용하는 것으로 알려진 새로운 맥관형성인자인 angiopoietin (Ang)과 Tie-2 체계에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. VEGF와 마찬가지로 혈관내피세포에 작용하는 Ang-1과 Ang-2의 작용은 Tie-2 세포 수용체와의 결합에 의해 이루어지며 VEGF와 유사한 양상을 나타낸다. Ang과 Tie-2 체계가 종양의 맥관형성에 중요한 작용을 한다고 보고되어 있지만, Ang-1

과 Ang-2의 생물학적 작용에 대해서는 아직까지 정확히 밝혀져 있지 않다. 혈관 발생에 있어 Ang과 Tie-2는 초기의 혈관형성 시기에는 관여하지 않지만, 후기 혈관 발아, 혈관재배열, 혈관성숙에 중요한 역할을 한다고 한다. 이러한 후기 발생시기에는 Ang과 Tie-2가 안정된 세포학적, 생화학적 작용을 위해 내피세포와 주위결합세포에서 결합하게 된다.⁹

고형암 발생에 있어 Ang 발현정도와 Tie-2 발현, VEGF 발현과의 상관관계에 대한 임상적인 연구는 많지 않으며,¹³ 특히 악성질환과 양성질환의 맥관형성인자들의 발현을 비교하는 연구는 많지 않다. 이에 저자는 난소암과 정상 난소, 양성 난소종양에서 이들 인자의 발현과 상호관련성을 알아보려고 하였다.

Ang-1 mRNA는 정상 난소에서 양성 난소종양보다, 양성 난소종양에서 난소암보다 높게 발현됨이 관찰되었다. 본 연구에서처럼 난소암에서 Ang-1 mRNA 발현이 정상 난소보다 감소함으로써 종양 종류에 따라 Ang-1 mRNA이 다르게 발현됨을 알 수 있었으며 이는 여러 고형암에서 Ang-1이 다르게 작용할 수 있으며 Ang-1 자체의 발현이외에 다른 맥관형성 인자와의 상호작용이 더 중요하게 영향 미칠 수 있음이 시사된다.

Ang-2 mRNA는 갑상선암, 위암 및 대장암, 방광암 등에서 높게 발현되거나 다른 인자들과 상호관련 되어 있었으며,^{8,12,13,24} 침윤성 유방암에서 정상유방과 상피내암보다 Ang-2 mRNA 발현이 증가하였다고 보고하였다.²⁵ 그러나 본 연구에서는 난소암에서 Ang-2 mRNA 발현이 정상 난소나 난소종양에 비해 증가하지 않은 것으로 보아 난소암에서의 Ang-2 단독 작용은 중요하지 않을 것으로 생각된다. 이는 Ang-1과 더불어 Ang-2 발현이 더 흔하게 상향 조절되며 Ang-2/Ang-1 비가 증가할수록 종양의 맥관형성이 진행되어 Ang-2가 맥관형성의 유발에 중요한 역할을 한다는 연구보고와는²⁶ 상반된 결과로 Ang과 결합하여 반응하는 Tie-2가 영향을 줄 것으로 생각되었다.

합성된 수용성 Tie-2를 이용해 Tie-2 경로를 봉쇄한 결과 쥐의 유선암과 흑색종에서 종양의 성장속도가 현저히 저하되며 폐암 전이도 억제됨이 관찰되는 것이 보고되었고²⁷ 난소암의 암화과정에서 Tie-2의 역할을 알아보기 위해 본 연구에서는 Ang와 함께 Ang의 수용체인 Tie-2 mRNA와 단백질 발현을 동시에 연구한 결과 Tie-2

발현이 오히려 난소암에서보다 양성 난소종양에서 가장 높게 관찰되었으며 Ang-1 mRNA/Tie-2 mRNA 비가 난소암에서 높게 나타남이 관찰되었다. 이는 난소암의 암화 과정에는 Ang-2 발현 자체보다 Ang과 Tie-2의 비가 중요하다고 생각되는 것을 뒷받침하는 결과였다. 본 연구에서 난소암의 암화과정에 Ang 단독적인 작용보다는 Ang와 Tie-2의 상호작용이 의미 있음을 보여주는 결과였다.

VEGF는 다양한 고형암에서 발현이 증가되며, 종양 발생과 성장에 맥관형성이 필수적인 고형암에서는 VEGF 발현이 증가한다고 하였다.²⁸ 자궁경부암 전암단계인 자궁경부 상피내종양에서도 등급이 진행됨에 따라 조직내 VEGF 발현이 점차로 증가하는 양상을 보였다고 하였으며²⁹ VEGF mRNA의 발현이 정상 자궁경부에 비해 자궁경부암에서 높게 발현되어 자궁경부 암화과정에서의 VEGF발현이 중요함이 보고되었다.^{18,30} 본 연구에서도 정상 난소에 비해 양성 난소종양에서, 양성 난소종양에 비해 난소암에서 VEGF mRNA 발현이 증가함으로써 난소암의 발생에 VEGF 발현이 관여할 것으로 시사되었다.

맥관형성이 활발한 종양에서 VEGF와 Ang 그리고 각각의 수용체의 발현이 상호간의 조절을 통해 맥관형성을 촉진한다는 것이 밝혀졌으며 종양에서 VEGF/Ang-2의 비율이 높으면 신생혈관의 성장은 지속되며 반대의 경우에는 신생혈관의 퇴행이 관찰되었다.³¹ VEGF와 Ang-2의 이러한 상호작용은 태생기 혈관 생성과 난소의 혈관 생성, 상처치유과정 등에서도 공통적으로 보고되었다.

자궁육종에서는 자궁내막암에 비해 VEGF와 Ang-2이 과발현된다고 하였으며³² 이는 암의 악성화와 전이에 VEGF와 Ang-2가 상호 작용함을 나타내는 것이다

종양세포로부터 분화된 VEGF는 저산소증, 성장인자, 유전인자 등의 영향으로 종양 근처의 혈관내피세포에서 VEGFR-2/KDR을 통해 Ang-2의 발현을 촉진시키며, 내피세포에서 Ang-2의 분비가 증가됨에 따라 Ang-1과 Tie-2 간의 균형이 깨지게 됨으로써 결과적으로 혈관주위세포의 소실과 혈관벽의 불안정성이 유도된다는 가설이 제기되고 있다.³³

따라서 VEGF와 Ang, Tie-2 체계의 상호작용이 맥관형성에 중요하게 관여함을 의미하며 본 연구에서도 난소암에서 Ang-2 발현은 VEGF 발현 및 Tie-2 발현과 상호

관련이 있으므로 난소암의 맥관형성에 이들 인자의 상호작용이 중요하다는 결론을 얻을 수 있다.

본 연구에서는 난소암에서 이들 인자들의 발현을 관찰함으로써 난소암에서의 Ang-2 발현은 VEGF 발현 및 Tie-2 발현과 통계학적으로 유의한 상호관련성이 있었다. 이는 고형암에서 맥관형성에 관여하는 이들 인자들의 상호작용이 중요함을 반영하는 결과로 앞으로 더 많은 예에서 계속 연구가 이루어져야 하겠다.

참고문헌

- Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis-dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 4-6.
- Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995; 1: 27-31.
- Ye F, Florian M, Magder SA, Hussian SNA. Regulation of angiopoietin and Tie-2 receptor expression in nonreproductive tissues by estrogen. *Steroids* 2002; 67: 305-10.
- Asarah T, Chen D, Takahashi T, Fusikawa K. Tie 2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2, modulate VEGF-induced postnatal revascularization. *Circ Res* 1998; 83: 233-40.
- Diaz-Flores L, Gutierrez R, Varela H. Angiogenesis: An update *Histol. Histopathol* 1994; 9: 807-43.
- Carmeliet P. Mechanism of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000; 6: 389-95.
- Folkman J, D'Amore PA. Blood vessel formation: What is its molecular basis? *Cell* 1996; 87: 1153-5.
- Brown LF, Dezube BJ, Tognazzi K, Dvorak HF, Yancopoulos GD. Expression of Tie1, Tie 2, and angiopoietins 1, 2, and 4 in Kaposi's sarcoma and cutaneous angiosarcoma. *Am J Pathol* 2000; 156: 2179-83.
- 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.
- 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.
- 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.
- Hawighorst T, Skobe M, Streit M, Hong YK, Velasco P, Brown LF. Activation of the Tie 2 receptor by angiopoietin-1 enhances tumor vessel maturation and impairs squamous cell carcinoma growth. *Am J Pathol* 2002; 160: 1381-92.
- Carmeliet P, Jain R. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature (Lond.)* 2000; 407: 249-57.
- Esser S, Wolburg K, Wolburg H, Breier G, Kurzchalia T, Risau W. Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestration in vitro. *J Cell Biol* 1998; 140: 947-59.
- Roberts WG, Palade GE. Neovascutature induced by vascular endothelial growth factor are fenestrated. *Cancer Res* 1997; 57: 765-72.
- Dvorak AM, Kohn S, Morgan ES, Fox P, Nagy JA, Dvorak HF. The vesiculo-vacuolar organelle (VVO): A distinct endothelial cell structure that provides a transcellular pathway for macromolecular extravasations. *J Leukocyte Biol* 1996; 59: 100-15.
- Cheng WF, Chen CA, LEE CN, Wei LH, Hsieh FJ, Hsieh CY. Vascular endothelial growth factor and prognosis of cervical cancer. *Obstet Gynecol* 2000; 96: 721-6.
- Park HM, Jeong HY, Ahn JJ, Kim SC, Moon HS. Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 & -2 mRNA expressions in invasive cervical carcinoma. *Korean J Obstet Gynecol* 2004; 47: 1492-9.
- Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastasis: Balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med* 1995; 1: 149-53.
- Jemal A, Thomas A, Murray T, Thun M. Cancer statistics 2002. *CA Cancer J Clin* 2002; 52: 23-47.
- Annual Report of Gynecologic Cancer Registry Program in Korean for 2002 (Jan. 1, 2002-Dec. 31, 2002). *Korean J Obstet Gynecol* 2005; 48: 1130-80.
- Moon HS, Kim SC. Clinical value of serum vascular endothelial growth factor in cervical cancer patients. *Korean J Obstet Gynecol* 1998; 41: 168-76.
- Paley PJ. Angiogenesis in ovarian cancer; Molecular pathology and therapeutic strategies. *Gynecologic Cancer* 2002; 4: 165-74.
- Quentin T, Schlott T, Korabiowska M, Kathei N, Zoller G, Glaser F, et al. Alteration of the vascular endothelial growth factor angiopoietin-1 and -2 pathways in transitional cell carcinomas of the urinary bladder associated with tumor progression. *Anticancer Res* 2004; 24: 2745-56.
- Calvo A, Yokoyama Y, Smith LE, Ali I, Shih SC, Feldman AL, et al. Inhibition of the mammary carcinoma angiogenic switch in C3 (1)/SV40 transgenic mice by a mutated form of human endostatin. *Int J Cancer* 2002; 101: 224-34.
- Tait CR, Jones PF. Angiopoietins in tumours; The angiogenic switch. *J Pathol* 2004; 204: 1-10.
- Lin P, Baxton JA, Acheson A, Radziejewski C, Maisonpierre PC, Yancopoulos GD, et al. Antiangiogenic gene therapy targeting the endothelium-specific receptor tyrosine kinase Tie-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 93: 8829-34.
- Warren RS, Yuan H, Matli MR, Gillett NA, Ferrara N. Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis. *J Clin Invest* 1995; 95: 1789-97.
- Seoh JG, Moon HS, Kim SC, Min BJ, Seong SH. The expression of vascular endothelial growth factor, kinase domain region and transforming growth factor-beta in cervical

- neoplasia. Korean J Obstet Gynecol 2000; 43: 1913-20.
30. 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.
31. Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, Pode D, Keshet E. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. J Clin Invest 1999; 103: 159-65.
32. Emoto M, Charnock-Jones SD, Licence DR, Ishiguro M, Kawai M, Yanaihara A, et al. Localization of the VEGF and angiopoietin genes in uterine carcinosarcoma. Gynecologic Oncology 2004; 95: 474-82.
33. Zhang L, Yang N, Park JW, Katsaros D, Fracchioli S, Cao G, et al. Tumor-derived vascular endothelial growth factor up-regulates angiopoietin-2 in host endothelium and destabilizes host vasculature, supporting angiogenesis in ovarian cancer. Cancer Res 2003; 63: 3403-12.

The expression of angiopoietin-1, angiopoietin-2, Tie-2 and vascular endothelial growth factor mRNA in normal ovary, benign ovarian cyst, and epithelial ovarian cancer

Yoon Sook Jo, Hye-Sung Moon, Hye Won Chung, Seoung Cheol Kim, Sun Hee Chun

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

Objective : Vascular endothelial growth factor (VEGF) increases angiogenesis. It is known that one of angiogenetic factors, angiopoietin-1 (Ang-1) stabilizes maturity of normal vessels and angiopoietin-2 (Ang-2) antagonizes the action of angiopoietin-1 by binding Tie-2 that is their receptor. Recently those factors are known to be involved in carcinogenesis. The aim was to investigate the mRNA expression of those factors in epithelial ovarian cancer including normal ovary and ovarian cyst and to evaluate their role in ovarian carcinogenesis.

Methods : The tissue samples of 16 ovarian cyst, and 29 epithelial ovarian cancer patients who were diagnosed at Ewha Woman's University MokDong Hospital from 1997 to 2003, and 18 normal ovary subjects who had hysterectomy and salpingoophorectomy due to uterine myoma and confirmed as normal controls, were obtained. The mRNA expressions of Angiopoietin-1, Angiopoietin-2, Tie-2 and Vascular endothelial growth factor were measured by Quantitative Competitive polymerase chain reaction (PCR). Their expressions were analyzed with ANOVA test and Spearman correlation test.

Results : The expressions of Ang-1 mRNA were higher in normal ovary than those of ovarian cyst and ovarian cancer ($p < 0.05$). The expressions of Tie-2 mRNA were higher in ovarian cyst than those of normal ovary and ovarian cancer ($p < 0.05$). The expressions of VEGF mRNA were higher in ovarian cancer than those of normal ovary and ovarian cyst ($p < 0.05$). The expression of Ang-2 mRNA in ovarian cancer was related with the expression of VEGF and Tie-2 mRNA.

Conclusion : The lower expression of Ang-1 mRNA and higher expression of VEGF mRNA might be a role in ovarian carcinogenesis. The expression of Ang-1, Tie-2 and VEGF might be related to ovarian carcinogenesis, together. However, this study is based on limited number of cases and short-term period of follow up, further prospective studies on a larger population should be done.

Key Words : Epithelial ovarian cancer, Angiopoietin, Tie-2, Vascular endothelial growth factor