

직장 결장암의 간전이 환자에서 VEGF-A, C, D 발현의 비교연구

충남대학교 의과대학 외과학교실, ¹의학연구소 병리학교실

전광식 · 이경하 · 송인상 · 김지연 · 김제룡 · 안문상
이상일 · 박종현 · 최송이¹ · 강대영¹ · 송규상¹

Comparative Analysis of Vascular Endothelial Growth Factor-A, C, D Expression in Colorectal Cancer with Liver Metastasis

Kwang-Sik Chun, M.D., Kyung-Ha Lee, M.D., In-Sang Song, M.D., Ph.D., Ji-Yeon Kim, M.D., Ph.D.,
Je-Ryong Kim, M.D., Ph.D., Moon-Sang Ahn, M.D., Sang-Il Lee, M.D., Ph.D., Jong-Hyun Park, M.D.,
Song-E Choi, M.D.¹, Dae-Young Kang, M.D., Ph.D.¹, Kyu-Sang Song, M.D., Ph.D.¹

Departments of Surgery and ¹Pathology, Research Institute for Medical Sciences,
College of Medicine, Chungnam National University, Daejeon, Korea

Purpose: We aimed to investigate the correlations between expressions of angiogenic cytokines VEGF-A, C, D of primary colorectal cancer and liver metastasis.

Methods: We examined paraffin-embedded primary colorectal cancer tissue from 45 patients who had liver resection due to colorectal liver metastasis (metastasis group) and 37 patients who had surgical resection due to colorectal cancer only (control group). In the control group, local recurrence and distant metastasis had not occurred. Immunohistochemical staining for VEGF-A, C and D was performed. We analysed the correlations between expression of VEGF-A, C and D in primary colorectal cancer tissues and clinicopathologic parameters.

Results: VEGF-A expressions of primary colorectal carcinoma were not different between the two groups. VEGF-C was more frequently expressed in the metastasis group (P=0.008) but VEGF-D was more expressed in the control group (P=0.003). Patients with VEGF-C negative and VEGF-D positive expression were predominant in the control group (P=0.020). Tumor location, T stage, lymph node metastasis and tumor differentiation were not related with the expressions of VEGF-A, C, D but only preoperative CEA was positively correlated with VEGF-A and C expression.

Conclusion: Expressions of VEGF-C in primary tumor were more frequent in metastatic colorectal cancer and expressions of VEGF-D were more frequent in nonmetastatic colorectal cancer. More large-scale prospective studies for VEGF-C and D expression in colorectal cancer are necessary. (J Korean Surg Soc 2009;76:307-315)

Key Words: VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, Colorectal cancer, Liver metastasis

중심 단어: VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, 직장, 결장암, 간전이

서 론

직장, 결장암은 적절한 수술적 치료에도 불구하고 5년 내 약 40~50%에서 간 내 혹은 간 외 재발이 발생한다고 알려져 있다.(1,2) 간 전이의 기전은 그 양상이 복잡하고 유전자 변형의 축적에 의하여 이루어지는 다단계 과정으로 암유전

책임저자: 송인상, 대전시 중구 대사동 640번지

☎ 301-721, 충남대학교병원 외과

Tel: 042-280-7183, Fax: 042-257-8024

E-mail: songis@cnuh.co.kr

접수일 : 2008년 12월 2일, 게재승인일 : 2009년 2월 4일

이 논문은 2006년도 충남대학교 학술연구비의 지원에 의하여 연구되었음.

자 및 억제 유전자의 돌연 변이, 혈관 신생, 세포외기질의 단백질 분해 및 부착분자, 성장 인자 및 효소들이 관련되어 있다고 알려져 있으나 정확한 기전은 밝혀지지 않았다.(3,4)

크기가 2~3 mm³ 이상의 종양은 성장에 있어서 조직 내 산소 분압이 단순 확산과정으로만 유지되지 않아 혈관 신생이 매우 중요하며 이 과정은 종양과 주변 정상조직내의 혈관 형성 인자(proangiogenic factor)와 혈관 형성 억제 인자(antiangiogenic factor) 간의 복잡한 과정에 의하여 이루어진다.(5,6) 이중 VEGF (vascular endothelial growth factor)는 내막 세포의 이동, 증식, 침윤과 혈관 투과성의 증가에 관련된 강력한 혈관 형성 인자로 VEGF-A, B, C, D, E 및 태반 성장 인자(placenta growth factor)로 이루어져 있다.(7,8) VEGF-A는 혈관 내막 세포에 발현된 VEGF-R1과 VEGF-R2와 결합하여 내막 세포의 활성화를 증가시키며, 비교적 최근에 발견된 VEGF-C, D는 VEGF-R2와 정상 성인 조직 중 림프 내피와 림프절의 세정맥 내피에서만 발현되는 VEGF-R3와 결합하여 혈관 형성(angiogenic property)뿐 아니라 림프관 신생 (lymphangiogenic action)을 촉진한다.(9-12) 최근 연구에서 VEGF-A, C, D가 폐암,(13) 위암,(14) 식도암(15) 등 고형암 및 직장, 결장암의 발생과 전이에 연관성이 있다고 하였으나 아직 논란의 여지가 있다.

본 연구의 목적은 직장, 결장암 환자에서 원발 종양의 VEGF-A, C, D의 발현과 간 전이 및 임상 병리학적 예후인자와의 관련성을 분석하고자 하였다.

방 법

1) 대상

1999년 1월부터 2006년 8월까지 충남대학교병원에서 직장, 결장암의 간 전이로 간 절제술을 시행 받은 55명의 환자와 동일 기간 직장, 결장암으로 근치적 절제술을 받은 환자 중 24개월 이상 국소 재발과 원격 전이가 발생하지 않은 37명의 환자를 대상으로 본 연구를 시행하였다. 대상 환자의 직장, 결장암 원발 조직은 충남대학교병원 병리과에서 보관하고 있는 파라핀 블록(paraffin-embedded specimen)을 사용하였다. 간 전이가 있던 환자 55명 중 파라핀 블록 사용이 가능하지 않은 10명의 환자는 연구에서 제외되었다.

조직학적 등급은 분화도에 따라 고분화암(well differentiated adenocarcinoma), 중등도 분화암(moderate differentiated adenocarcinoma), 저분화암(Poorly differentiated adenocarcinoma)으로 나누었다. 원발 병소의 T, N병기는 AJCC/

UCC TNM staging system 제 6판을 기준으로 판정하였다.

2) 면역조직화학 염색

직장, 결장암 환자에서 얻은 원발 병소의 파라핀 블록을 VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D로 염색하였다. 항체는 anti-VEGF-A rabbit polyclonal antibody (Santa Cruz biotechnology, USA), anti-VEGF-C rabbit polyclonal antibody (Zymed, Carlsbad, CA, USA), anti-VEGF-D mouse monoclonal antibody (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 각각 사용하였다. 각각의 항체를 1 : 400, 1 : 50, 1 : 100으로 희석하여 사용하였고 대조염색은 Mayer's Hematoxylin으로 하였다.

면역조직화학 염색의 판정은 200배율에서 관찰하여 슬라이드에 포함된 전체 암 조직 중 염색된 면적의 비율과 강도를 고려하였다. 면적 등급은 1에서 4까지 적용하였다. 1: 암 세포의 세포질에 염색이 되지 않은 경우, 2: 암세포의 세포질에 33% 이하로 염색된 경우, 3: 암세포의 세포질에 66% 까지 염색된 경우, 4: 암세포의 세포질에 67% 이상 염색된 경우. 강도의 등급은 1에서 3까지 적용하였다. 1: 암세포의 세포질에 염색되지 않은 경우, 2: 약하게 염색된 경우, 3: 강하게 염색된 경우. 조직 염색의 판정은 면적 등급과 강도 등급의 합(VEGF score)으로 2점에서 7점까지 계수화하였고 4점 이상을 양성이라 판정하였다.

면역조직화학 염색의 판정은 2명의 병리 전문의가 참가하여 전체 슬라이드를 판독하였고 그 중 낮은 점수를 택하여 판정하였다. 판독 중 오류를 없애기 위하여 전체 대상 환자의 조직을 무작위로 배열하고 이중 맹검으로 판독하였다.

3) 임상 자료

대상 환자의 직장, 결장암 원발 병소의 조직을 면역조직화학 염색을 시행하여 판독하였고, 나이, 성별, 수술 전 CEA, 종양의 위치, 병기, 추적 조사 결과를 포함한 의무기록을 후향적으로 조사하여 간 전이가 있는 군(전이군)과 전이 및 재발을 보이지 않은 군(대조군)으로 나누어 두 군을 비교 분석하였다.

4) 통계

VEGF-A, C, D의 발현과 임상 병리학적인 인자의 연관성에 대한 통계분석은 95%의 유의 수준으로 Student t-test, Chi-square test (SPSS12.0K for window)로 수행하였고, VEGF-A, C, D의 발현에 따른 전체 생존 곡선은 Kaplan-Meier 생존

분석(SPSS12.0K for window)을 이용하였다.

결 과

1) 환자 성향

환자의 평균 나이는 전이군은 57.8세 대조군은 61.3세로 전이군에서 낮았으나 통계적으로 차이는 없었고($P=0.133$), 남녀 성비도 대조군이 1.27, 전이군이 1.47로 전이군에서 남성 비율이 다소 높았으나 통계적인 차이를 보이지 않았다($P=0.069$). 대조군은 24개월 이상(45~87개월) 무병생존 중인 환자이고, 전이군은 전체 생존의 중앙값은 51개월이었다($P=0.000$).

원발 종양의 위치는 전이군에서 직장에 위치한 경우가 53.3%로 대조군보다(45.9%) 많았으나 통계적인 차이를 보이지 않았다. T stage의 분포는 T3 이상의 병소가 대조군은 75.7%, 전이군은 93.3%로 전이군에서 진행된 병기의 환자가 많았으나 통계적인 차이를 보이지 않았다($P=0.072$). 림프절 전이는 N1 이상이 전이군 77.2%로 대조군 34.3%에 비하여 통계적으로 많았다($P=0.000$). 원발 종양은 두 군의 대부분이 조직학적으로 중등도의 분화를 보여 통계적인 차이

를 보이지 않았다. 수술 전 혈액 검사에서 CEA는 전이군은 평균 33.2 ng/ml로 7.09 ng/ml인 대조군에 비해서 통계적으로 높았으나($P=0.029$), 5 ng/ml 이상으로 증가한 환자의 비율은 전이군과 대조군 사이에 차이가 없었다($P=0.177$) (Table 1).

간 전이가 있는 환자 45명 중 29명은 동시성 전이였고, 16명에서 이시성 전이였다. 양쪽 간엽에 발생한 환자는 6명(13.3%)이었고 좌, 우측 간엽 중 한쪽에만 국한된 환자는 39명(86.7%)이었다. 단일 종괴로 간 전이가 나타난 환자는 34명(75.6%), 2개는 5명(11.1%), 3개 이상은 6명(13.3%)이었다. 간 전이 환자 45명 중 31명(68.9%)은 비해부학적 절제술을, 12명(26.7%)은 우엽절제술, 좌엽절제술 및 좌외구역절제술 등 해부학적 절제술을, 2명(4.4%)은 해부학적 절제술과 비해부학적 절제술을 시행 받았다. 환자 중 26명(57.8%)에서 간 및 간 외 재발이 발생하였다.

2) 임상, 병리적 요인에 따른 VEGF A, C, D의 발현

(1) VEGF-A: VEGF-A의 면역조직화학 염색은 전체 대상 환자의 64.6%에서 양성으로 나타났으며 VEGF score는 평균 4.10점(표준편차 1.719)이었다. VEGF score는 전이군에서 4.20점으로 대조군의 3.97점보다 높았으나 통계적으로 차이를 보이지 않았고, 양성 판정을 받은 환자는 대조군 62.2%, 전이군 66.7%로 두 군의 차이가 없었다($P=0.817$) (Table 2). 원발 종양의 위치, TNM 병기에 의한 T 병기, N 병기에 따른 VEGF-A의 면역조직화학 염색의 양성률은 차이가 없었다. 수술 전 혈중 CEA가 5 ng/ml 미만인 군에서 VEGF-A의 양성률은 54.2%였으나 5 ng/ml 이상인 군에서는 79.4%로 통계적으로 높은 양성률을 보였으며($P=0.018$)

Table 1. Patients characteristics

	Control group	Metastasis group	P-value
Location of primary cancer			0.506
Rectum	17	24	
Colon	20	21	
T stage			0.072
T1	2	0	
T2	7	3	
T3	28	40	
T4	0	2	
N stage			0.000
N0	23	10	
≥N1	12	34	
Differentiation			0.410
Well	1	0	
Moderate	35	42	
Poor	0	2	
Other	1	1	
CEA			
Mean (ng/ml)*	7.09	33.2	0.029
<5 ng/ml	24	23	0.132
≥5 ng/ml	12	22	

*analyzed by student t-test.

Table 2. VEGF-A, C, D expression of primary colorectal cancer

	Control group	Metastasis group	P-value
VEGF A			
Positive expression (%)*	62.2	66.7	0.671
VEGF score [†] (SD [‡])	3.97 (1.69)	4.20 (1.75)	0.555
VEGF C			
Positive expression*	37.8	66.7	0.008
VEGF score [†] (SD)	3.19 (1.63)	4.09 (1.73)	0.018
VEGF D			
Positive expression*	70.3	37.8	0.003
VEGF score [†] (SD)	3.86 (1.41)	2.98 (1.38)	0.006

*analyzed by Chi-square test; [†]analyzed by student t-test; [‡]SD = standard deviation.

VEGF score도 3.62와 4.76으로 수술 전 CEA가 5 ng/ml 이상 이었던 환자에서 높았다($P=0.003$). 전이군에서 간 전이 압 의 개수가 1개인 환자와 2개 이상인 환자의 VEGF-A의 양 성률은 2개 이상인 환자에서 좀 더 높게 나타났으나 통계적 인 차이를 보이지 않았다($P=0.220$) (Table 3). 전이군의 중앙 생존은 VEGF-A의 면역화학 염색이 양성인 군이 42개월(범 위 7~78개월)로 음성인 군(30개월, 범위 5~87개월)보다 길지만 전체 생존의 통계적인 차이는 없었다($P=0.098$) (Fig. 1).

(2) VEGF-C: VEGF-C의 면역조직화학 염색은 전체 대상 환자의 53.7%에서 양성으로 나타났으며 VEGF score는 평균 3.68점(표준편차 1.735)이었다. VEGF score는 전이군에서 4.09점으로 대조군의 3.19점보다 높게 나타났고($P=0.018$), 양 성 판정을 받은 환자는 대조군 37.8%, 전이군 66.7%로 전이 군에서 많았다($P=0.008$) (Table 2). 원발 종양의 위치, TNM 병기에 의한 T 병기, N 병기에 따른 VEGF-C의 면역조직화

학 염색의 양성률은 차이가 없었다. 대장암 세포의 분화도 에 따른 VEGF-C의 양성률은 분화가 좋을수록 양성률이 높

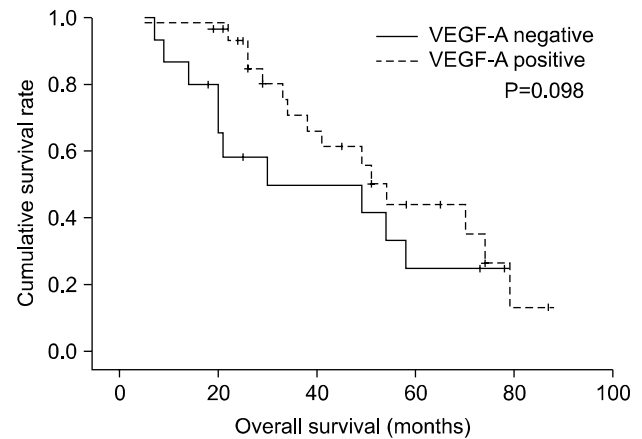


Fig. 1. Overall survival of metastatic group according to expression of immunohistochemical staining of VEGF-A.

Table 3. Correlation between clinicopathologic parameter and expression of VEGF-A

	VEGF-A*		P-value	VEGF score [†] (SD [‡])	P-value
	Negative (%)	Positive (%)			
Overall	35.4	64.6			
Location of primary cancer			0.817		0.702
Rectum	36.6	63.4		4.02 (1.68)	
Colon	34.1	65.9		4.17 (1.77)	
T stage			0.505		0.863
T1	0	100		5.0 (1.41)	
T2	40.0	60.0		4.20 (2.04)	
T3	36.8	63.2		4.04 (1.71)	
T4	0	100		4.05 (0.71)	
N stage			0.675		0.366
N0	39.4	60.6		3.85 (1.70)	
≥N1	34.8	65.2		4.22 (1.76)	
Differentiation			0.151		0.191
Well	0	100		5.0	
Moderate	35.1	64.9		4.10 (1.71)	
Poor	100	0		0	
Other	0	100		5.0 (1.41)	
CEA			0.018		0.003
<5 ng/ml	45.8	54.2		3.62 (1.63)	
≥5 ng/ml	20.7	79.4		4.76 (1.63)	
Chronology			0.746		0.889
Synchronous	31.0	69.0		4.17 (1.67)	
Metachronous	37.5	62.5		4.25 (1.94)	
Metastatic liver nodule			0.220		0.124
Single	38.2	61.8		3.97 (1.76)	
≥2	18.2	81.8		4.91 (1.57)	

*analyzed by Chi-square test; [†]analyzed by student t-test; [‡]SD = Standard deviation.

게 나타났지만 통계적인 차이는 없었다($P=0.481$). 수술 전 혈중 CEA가 5 ng/ml 미만인 군에서 VEGF-C의 양성률은 39.6%였으나 5 ng/ml 이상인 군에서는 73.5%로 통계적으로 높은 양성률을 보였으며($P=0.002$), VEGF score도 3.19와 4.38으로 수술 전 CEA가 5 ng/ml 이상이었던 환자에서 높았다($P=0.002$). 전이군에서 간 전이 암의 개수가 1개인 환자와 2개 이상인 환자의 VEGF-C의 양성률은 2개 이상인 환자에서 좀 더 높게 나타났으나 통계적인 차이를 보이지 않았다($P=0.319$) (Table 4). 전이군의 중앙 생존은 VEGF-C의 면역화학 염색이 음성인 군이 58개월(범위 9~87개월)로 양성인 군(51개월, 범위 5~79개월)보다 길지만 전체 생존의 통계적인 차이는 없었다($P=0.876$) (Fig. 2).

(3) VEGF-D: VEGF-D의 면역조직화학 염색은 전체 대상 환자의 52.4%에서 양성으로 나타났으며 VEGF score는 평균 3.38점(표준편차 1.46)이었다. VEGF score는 전이군에서 2.98점으로 대조군의 3.86점보다 낮게 나타났고($P=0.006$),

면역조직화학 염색의 양성 판정은 대조군 70.3%, 전이군 37.8%로 대조군에서 많았다($P=0.003$) (Table 2). 원발 중앙

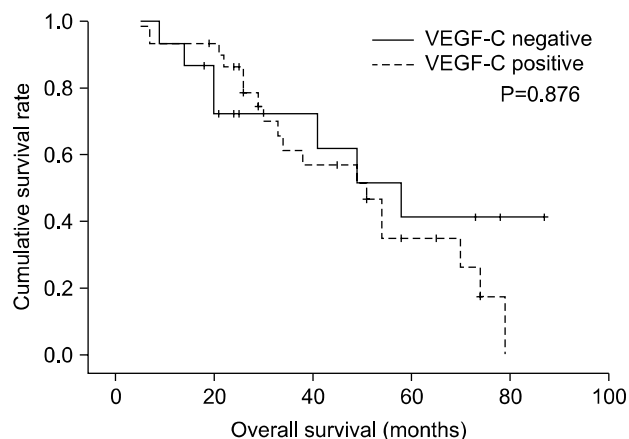


Fig. 2. Overall survival of metastatic group according to expression of immunohistochemical staining of VEGF-C.

Table 4. Correlation between clinicopathologic parameter and expression of VEGF-C

	VEGF-C*		P-value	VEGF score [†] mean (SD [‡])	P-value
	Negative (%)	Positive (%)			
Overall	46.3	53.7			
Location of primary cancer			0.658		0.254
Rectum	48.8	51.2		3.46 (1.58)	
Colon	43.9	56.1		3.90 (1.86)	
T stage			0.614		0.759
T1	50.0	50.0		3.50 (2.12)	
T2	50.0	50.0		3.70 (1.95)	
T3	47.1	52.9		3.65 (1.72)	
T4	0	100		5.00 (1.41)	
N stage			0.835		0.669
N0	45.5	54.5		3.76 (1.77)	
≥N1	47.7	52.2		3.59 (1.72)	
Differentiation			0.360		0.481
Well	0	100		5.00	
Moderate	45.5	54.5		3.71 (1.74)	
Poor	50.0	50.0		3.51 (2.12)	
Other	100	0		0 (0)	
CEA			0.002		0.002
<5 ng/ml	60.4	39.6		3.19 (1.62)	
≥5 ng/ml	26.5	73.5		4.38 (1.66)	
Chronology			0.331		0.801
Synchronous	27.6	72.4		4.14 (1.59)	
Metachronous	43.8	56.3		4.00 (2.0)	
Metastatic liver nodule			0.624		0.319
Single	35.3	64.7		3.94 (1.66)	
≥2	27.3	72.7		4.55 (1.91)	

*analyzed by Chi-square test; [†]analyzed by student t-test; [‡]SD = Standard deviation.

의 위치, TNM 병기에 의한 T 병기, N 병기에 따른 VEGF-D의 면역조직화학 염색의 양성률은 차이가 없었다. 대장암 세포의 분화도에 따른 양성률은 통계적인 차이가 없었다 ($P=0.054$). 수술 전 혈중 CEA 농도에 따른 VEGF-D의 양성률은 5 ng/ml 미만과 이상인 군에서 각각 50.0, 55.9%로 차이가 없었다($P=0.529$). 전이군에서 간 전이 암의 개수가 1개인 환자 2개 이상인 환자의 VEGF-D의 양성률은 2개 이상인 환자에서 좀 더 높게 나타났으나 통계적인 차이를 보이지 않았다($P=0.295$) (Table 5). 전이군의 중앙 생존은 VEGF-D의 면역조직화학 염색이 양성인 군이 51개월(범위 7~78개월)로 음성인 군(49개월, 범위 5~87개월)보다 길지만 전체 생존의 통계적인 차이는 없었다($P=0.768$) (Fig. 3).

(4) VEGF-C, VEGF-D 발현의 비: VEGF-C 면역조직화학 염색이 양성이고 VEGF-D 면역조직화학 염색은 음성인 환자는 전체 환자 82명 중 15명(18.3%)이나 이 중 14명은 간 전이가 있는 환자였다. VEGF-C가 음성이고 VEGF-D가 양

성인 환자는 전체 환자 중 14명(17.1%)이나 이 중 13명은 간 전이 없이 24개월 이상 생존한 대조군에 속한 환자였다

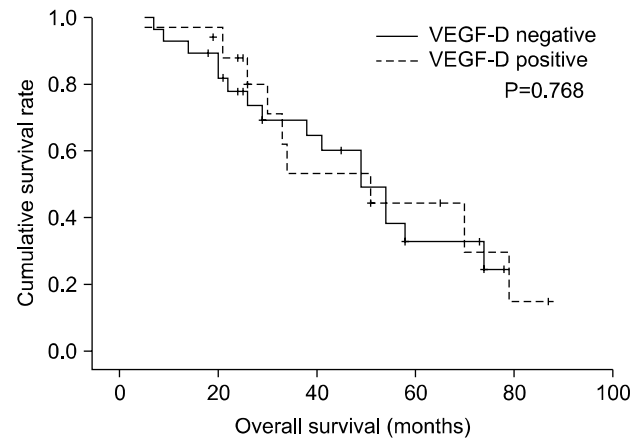


Fig. 3. Overall survival of metastatic group according to expression of immunohistochemical staining of VEGF-D.

Table 5. Correlation between clinicopathologic parameter and expression of VEGF-D

	VEGF-D*		P-value	VEGF score [†] mean (SD [‡])	P-value
	Negative (%)	Positive (%)			
Overall	35.4	64.6			
Location of primary cancer			0.507		0.708
Rectum	43.9	56.1		3.44 (1.41)	
Colon	51.2	48.8		3.32 (1.51)	
T stage			0.600		0.437
T1	0	100		5.0 (1.41)	
T2	50.0	50.0		3.50 (1.71)	
T3	48.5	51.5		3.32 (1.42)	
T4	47.6	52.4		3.00 (1.41)	
N stage			0.392		0.368
N0	42.4	57.6		3.52 (1.50)	
≥N1	52.2	47.8		3.22 (1.39)	
Differentiation			0.177		0.054
Well	0	100		6.00	
Moderate	48.1	51.9		3.34 (1.43)	
Poor	100	0		0 (0)	
Other	0	100		5.00 (0)	
CEA			0.599		0.528
<5 ng/ml	50.0	50.0		3.29 (1.44)	
≥5 ng/ml	44.1	55.9		3.50 (1.50)	
Chronology			0.541		0.938
Synchronous	58.6	41.4		2.97 (1.23)	
Metachronous	68.8	31.3		3.00 (1.67)	
Metastatic liver nodule			0.546		0.295
Single	64.7	35.3		2.85 (1.28)	
≥2	54.5	45.5		3.36 (1.69)	

*analyzed by Chi-square test; [†]analyzed by student t-test; [‡]SD = Standard deviation.

Table 6. Correlation between liver metastasis of colorectal carcinoma and expression of VEGF-C and D

		Control	Metastasis	P-value
VEGF-C	VEGF-D			
Negative	Negative	10	14	0.02
	Positive	13	1	
Positive	Negative	1	14	0.01
	Positive	13	16	

(Table 6). VEGF-D와 VEGF-C의 VEGF score 비(ratio)의 범위는 0.29에서 3.0이었고 대조군에서 평균 1.38 (표준편차 0.62)로 전이군 0.82 (표준편차 0.38)보다 높게 나타났다 (Table 6).

고 찰

VEGF군은 VEGF-A, B, C, D, E와 태반 성장 인자로 구성된다.(7,8) 이중 VEGF-A가 가장 잘 알려져 있고, 가장 강력한 혈관 형성 인자이다. VEGF-A는 각기 다른 네 가지의 isoform을 가지는데 그 중 VEGF 165가 가장 많이 나타나는 형태이다.(16,17) Cheung 등(18)은 VEGF-A의 isoform이 각기 다른 조직에서 특징적으로 발현하며 VEGF 165와 VEGF 121이 직장, 결장암과 폐암에서 발현하여 암 발생에 영향을 준다고 하였다. George 등(19)은 VEGF 121과 VEGF 165가 정상 대장 점막보다 대장암 조직에서 증가되어 있고, 대장암의 선종-암 연속(Adenoma-carcinoma sequence)에 영향을 준다고 하였다. Cascinu 등(20)은 T2 대장 직장암에서 림프절 전이가 없는 군보다 림프절 전이가 있는 군에서 증가를 보여 VEGF-A가 림프절 전이와 관련이 있다고 하였다. 본 연구에서는 직장, 대장암 조직에서 VEGF-A가 전체 대상 환자 64.6%에서 면역조직화학 염색에서 양성으로 나타났다. 간 전이를 보인 전이군과 대조군에서 VEGF-A의 면역조직화학 염색이 양성률과 VEGF score의 차이가 없었다. 또한 원발암의 세포 분화도를 제외한 원발 종양의 위치, T-stage, N-stage, 간 전이 발생 시기 및 간 전이 종양의 개수와 VEGF-A의 면역화학조직 염색의 양성률은 통계적인 의미를 보이지 않아 VEGF-A가 직장, 결장암의 발생에는 의미 있는 영향을 주지만, 림프 전이나 원격전이에는 영향이 적을 것으로 판단되었다. 대장암 세포의 분화도에 따른 VEGF-A의 양성률은 분화가 좋을수록 양성률이 높게 나타났다지만 전체 환자의 90% 이상에서 중등도 분화를 보였고 고분화 암이나 저분화 암은 전체의 10% 미만으로 통계적인

의의를 찾기 힘들었다.

VEGF-C는 VEGFR-2와 Flt/VEGFR-3을 통해 작용하여 신혈관 형성 작용(angiogenic effect)과 림프관 신생(lymphangiogenesis)에 관여한다고 알려져 있고,(9-11) 폐암,(13) 위암,(14) 전립샘암(21) 및 식도암(15)에서 발현이 관찰된다고 보고되고 있으나 대장암에서의 발현과 임상 병리학적인 인자 및 예후와의 관련성에 대해서는 아직 논란의 대상이 되고 있다. Akagi 등(22)은 VEGF-C가 임상, 병리학적으로 불량한 예후와 관련이 있다고 하였고, Furudoi 등(23)은 면역조직화학 염색에서 VEGF-C 발현이 대상환자의 47%에서 관찰되었으며 림프 및 혈관 전이, 림프절 전이, Dukes 병기, 간 전이 등과 관련이 있다고 하였다. George 등(19)은 VEGF-C의 mRNA수준이 대장암에서 용종에 비하여 높게 나타났으나 림프절 전이와는 관련이 없다고 하였고, 면역조직화학 염색에서도 림프절 전이와 관련성이 없다고 하였다. 본 연구에서는 전체 대상 환자의 53.7%에서 면역화학염색에서 양성으로 나타났고 전이군에서 66.7%로 대조군보다 의미 있게 많은 수에서 양성을 보여 VEGF-C가 직장, 결장암의 간 전이에 영향을 줄 것으로 판단되었다. 그러나 원발 종양의 T병기, 림프절 전이 유무 및 세포의 분화도와 관련이 없었다.

아직 VEGF-D에 대한 보고는 적지만 최근 연구에 따르면 VEGF-D가 종양의 신혈관 형성(angiogenesis)과 림프관 신생(lymphangiogenesis)을 증가시켜 종양의 림프 전이(lymphatic spread)를 촉진시킨다고 하였다.(24-26) 그러나 몇몇 임상 연구에서는 종양 조직내의 VEGF-D 발현이 주위의 정상조직에 비하여 현저하게 낮게 나타난다고 보고하고 있어 논란의 여지가 있다.(13,19) George 등(19)은 VEGF-D의 발현이 Duke D 환자에서 보다 Duke B, C 환자에서 높은 결과를 보였으나 정상 점막에서의 발현이 더 높았다고 하였다. 본 연구에서는 대조군에서 VEGF-D의 면역화학 염색의 양성 비율이 70.3%로 전이군에 비하여 현저히 많은 수에서 발현을 보여 비슷한 결과를 얻었다. 그러나 원발 종양의 T병기, 림프절 전이, 분화도 등 다른 임상, 병리학적 인자들과는 관련성을 보이지 않았다.

본 연구에서 대상 환자 전체 중 VEGF-C가 양성이면서 VEGF-D가 음성이었던 환자는 15명으로 이중 1명을 제외한 14명이 전이군이고 VEGF-C가 양성이면서 VEGF-D가 양성인 환자는 14명으로 이중 13명이 대조군이였다. 이러한 결과는 아직 입증된 바는 없으나 진행된 종양에서 VEGF-D와 VEGF-C의 경쟁적 억제에 의한 것으로 생각되었다. VEGF-

D와 VEGF-C의 VEGF score 비(ratio)의 범위는 0.29에서 3.0 이었고 대조군에서 전이군보다 높게 나타났다. 이는 Niki 등(13)이 폐암 환자에서 VEGF-D : VEGF-C의 비율이 낮은 환자에서 림프절 전이가 많았다는 결과와 유사하다.

본 연구에서는 대장암 환자에서 원발암의 VEGF-A, C, D의 발현과 간 전이 및 임상 병리학적 예후인자와의 관련성을 분석하고자 간 전이가 발생하여 간 절제술을 시행 받은 45명의 환자를 24개월 이상 무병 생존을 보인 직장, 결장암 환자를 대상으로 연구를 시행하였다. 전이군과 대조군은 수술 전 CEA와 N 병기의 차이를 보였다. N 병기는 VEGF-A, C, D의 발현과의 연관성이 의미를 보이지 않아 본 연구에서의 편견으로 작용할 가능성이 적은 것으로 보였다.

결 론

본 연구에서 직장, 결장암의 원발 조직의 VEGF-C의 발현이 간 전이와 의미 있는 연관성을 보였다. 특히 VEGF-D : VEGF-C의 비율이 낮은 환자에서 대장암의 간 전이가 많았고, 비율이 높은 환자에서 24개월 이상의 무병 생존을 보였다.

이상의 결과로 미루어 직장, 결장암 환자에서 원발 종양의 VEGF-C, D의 발현이 간 전이를 예측할 수 있는 인자가 될 수 있는 가능성을 보였다. 향후 더 많은 환자를 대상으로 전향적인 연구가 필요하겠다.

REFERENCES

- 1) Park JK, Kim NK, Lee KY, Lee WJ, Kim BR, Sohn SK, et al. Prognostic factors affecting survival rate following hepatic resection for metastatic colorectal cancer. *J Korean Surg Soc* 2001;61:583-7.
- 2) Jenkins LT, Millikan KW, Bines SD, Staren ED, Doolas A. Hepatic resection for metastatic colorectal cancer. *Am Surg* 1997;63:605-10.
- 3) Yang Y, Forslund A, Remotti H, Lonnroth C, Andersson M, Brevinge H, et al. P53 mutations in primary tumors and subsequent liver metastases are related to survival in patients with colorectal carcinoma who undergo liver resection. *Cancer* 2001;91:727-36.
- 4) De Jong KP, Stillema R, Karrenbeld A, Koudstaal J, Gouw AS, Sluiter WJ, et al. Clinical relevance of transforming growth factor alpha, epidermal growth factor receptor, p53, and Ki67 in colorectal liver metastases and corresponding primary tumors. *Hepatology* 1998;28:971-9.
- 5) Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990;82:4-6.
- 6) Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;285:1182-6.
- 7) Veikkola T, Alitalo K. VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin Cancer Biol* 1999;9:211-20.
- 8) Peters KG, De Vries C, Williams LT. Vascular endothelial growth factor receptor expression during embryogenesis and tissue repair suggests a role in endothelial differentiation and blood vessel growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:8915-9.
- 9) Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, Chilov D, Lahtinen I, Kukk E, et al. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 1996;15:290-8.
- 10) Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, van Hinsbergh VW, Fang GH, Dumont D, et al. Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:3566-70.
- 11) Achen MG, Jeltsch M, Kukk E, Makinen T, Vitali A, Wilks AF, et al. Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:548-53.
- 12) Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995;146:1029-39.
- 13) Niki T, Iba S, Tokunou M, Yamada T, Matsuno Y, Hirohashi S. Expression of vascular endothelial growth factors A, B, C, and D and their relationships to lymph node status in lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2000;6:2431-9.
- 14) Amioka T, Kitadai Y, Tanaka S, Haruma K, Yoshihara M, Yasui W, et al. Vascular endothelial growth factor-C expression predicts lymph node metastasis of human gastric carcinomas invading the submucosa. *Eur J Cancer* 2002;38:1413-9.
- 15) Kitadai Y, Amioka T, Haruma K, Tanaka S, Yoshihara M, Sumii K, et al. Clinicopathological significance of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C in human esophageal squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 2001;93:662-6.
- 16) Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, et al. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 1991;266:11947-54.
- 17) Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 1991;5:1806-14.
- 18) Cheung N, Wong MP, Yuen ST, Leung SY, Chung LP.

- Tissue-specific expression pattern of vascular endothelial growth factor isoforms in the malignant transformation of lung and colon. *Hum Pathol* 1998;29:910-4.
- 19) George ML, Tutton MG, Janssen F, Arnaout A, Abulafi AM, Eccles SA, et al. VEGF-A, VEGF-C, and VEGF-D in colorectal cancer progression. *Neoplasia* 2001;3:420-7.
- 20) Cascinu S, Staccioli MP, Gasparini G, Giordani P, Catalano V, Ghiselli R, et al. Expression of vascular endothelial growth factor can predict event-free survival in stage II colon cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6:2803-7.
- 21) Salven P, Lymboussaki A, Heikkila P, Jaaskela-Saari H, Enholm B, Aase K, et al. Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C are expressed in human tumors. *Am J Pathol* 1998;153:103-8.
- 22) Akagi K, Ikeda Y, Miyazaki M, Abe T, Kinoshita J, Maehara Y, et al. Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) expression in human colorectal cancer tissues. *Br J Cancer* 2000;83:887-91.
- 23) Furudoi A, Tanaka S, Haruma K, Kitadai Y, Yoshihara M, Chayama K, et al. Clinical significance of vascular endothelial growth factor C expression and angiogenesis at the deepest invasive site of advanced colorectal carcinoma. *Oncology* 2002;62:157-66.
- 24) Stacker SA, Achen MG, Jussila L, Baldwin ME, Alitalo K. Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nat Rev Cancer* 2002;2:573-83.
- 25) Stacker SA, Stenvers K, Caesar C, Vitali A, Domagala T, Nice E, et al. Biosynthesis of vascular endothelial growth factor-D involves proteolytic processing which generates non-covalent homodimers. *J Biol Chem* 1999;274:32127-36.
- 26) Onogawa S, Kitadai Y, Tanaka S, Kuwai T, Kimura S, Chayama K. Expression of VEGF-C and VEGF-D at the invasive edge correlates with lymph node metastasis and prognosis of patients with colorectal carcinoma. *Cancer Sci* 2004;95:32-9.