

# 비소세포성 폐암에서 VEGF, HIF-1 $\alpha$ 의 발현과 병기의 상관성

송호승\*, 김철웅\*\*, 이무식\*\*, 나백주\*\*, 임남구\*\*\*

\*건양대학교 보건복지대학원 보건학과, \*\*건양대학교 예방의학교실,  
\*\*\*대전보건대학 의무행정과  
e-mail:ing1973@hit.ac.kr

## Relationship between the Expression of VEGF, HIF-1 $\alpha$ and Stage in Non-Small Cell Lung Carcinoma

Ho-Seung Song\*, Chul-Woung Kim\*\*, Moo-Sik Lee\*\*, Bak-Ju Na\*\*, Nam-Gu Lim\*\*\*

\*Dept of Public Health, The Graduate School of Public Health and Welfare, Konyang University

\*\*Dept of Preventive Medicine, College of Medicine, Konyang University

\*\*\*Dept of Medical Administration, Daejeon Health Sciences College

### 요약

**목적** : 비소세포 폐암에서 HIF-1 $\alpha$ , VEGF의 발현과 예후와 관련된 여러 임상적 표지자 및 병리학 적 표지자와의 상관관계를 조사하고자 하였다. **방법** : 이들의 예후인자로서의 의미를 알아보기 위하여 외과적으로 절제한 44예의 비소세포 폐암종을 대상으로 VEGF, HIF-1 $\alpha$ 에 대한 면역조직화학염색을 시행하였다. **결과** : WHO 분류에 의한 조직학적인 형태인 편평세포암종 28예, 선암종 16예의 비소세포성 폐암이 이 연구에 포함되었다. 비소세포성 폐암 24예와 16예에서 VEGF 및 HIF-1 $\alpha$ 이 발현되었다. **결론** : 이 연구에서 VEGF 발현과 병기와의 상관관계, HIF-1 $\alpha$ 의 과발현과 병기 사이에서 통계적으로 유의한 상관관계를 볼 수 없었다. 또한 HIF-1 $\alpha$ 의 과발현과 VEGF의 발현 사이에 통계학적으로 유의한 관련성이 없었다.

### 1. 서론

폐암종은 침습성과 전이성이 매우 높은 종양으로 우리나라 뿐만 아니라 전세계적으로 사망률이 매우 높은 암종이다. 소세포 폐암종은 진단 당시 이미 다른 장기에 전이가 되어 있는 성장이 빠른 미분화 암종으로 수술이 불가능하지만, 비소세포 폐암종은 병기가 IIIA 이하인 경우 수술로 치료하는 것이 원칙이다. 비소세포 폐암은 수술 후에도 재발률이 높고 화학요법과 방사선 치료를 병행한다고 해도 생존률이 낮아 수술 후 예후 예측이나 화학요법 및 방사선 치료 여부를 결정하는데 도움이 될 인자들에 관한 연구가 중요시 되고 있다.

종양이 발생, 성장, 진행하는 데는 세포의 증식과 세포자멸사 사이의 불균형이 크게 영향을 끼친다<sup>1)</sup>.

세포의 증식이나 세포자멸사에 관여하는 여러 가지 유전자의 변화가 종양의 발생이나 진행과 관련이 있다는 사실이 연구를 통해서 밝혀지고 있다. 한편, 종양이 일정 한계를 넘어 증식하고 전이 능력을 갖게 되는데는 종양 주변 조직의 반응이 필수적이다. 즉, 종양세포와 혈관계, 면역계, 결합조직 간의 상호작용이 매우 중요하다. 특히, 원발 종양에서 신생혈관 형성은 종양이 성장하는데 필요한 영양분과 산소를 신생혈관을 통해서 쉽게 공급 받고 노폐물을 신속히 제거할 수 있게 할 뿐만 아니라, 다른 장기로 전이할 수 있도록 혈행 경로에 쉽게 도달할 수 있게 하며, 전이한 종양이 성장하고 증식하는 데도 큰 역할을 한다. 지금까지 발표된 여러 연구를 보면 종양세포에서 분비되는 여러 맥관형성 인자가 신생혈관 형성에 관여하는 것을 알 수 있다<sup>2)</sup>.

저산소증 상태에서 맥관형성유도와 같은 세포적응의 과정에는 hypoxia-inducible factor-1(HIF-1) 단백질이 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 세포의 산소분압이 떨어지면 HIF-1 유전자 발현, mRNA의 전사와 단백질합성의 증가가 일어난다<sup>3)</sup>. HIF-1 단백질은 HIF-1 $\alpha$ 와 HIF-1 $\beta$ 의 두 아단위로 구성된 이질이량체의 전사인자로서 저산소증에 노출된 세포에서 산소의 항상성 유지에 중요한 역할을 한다<sup>3)</sup>. HIF-1 $\beta$ 는 aryl hydrocarbon nuclear translocator(ARNT)로 불리기도 하며, 세포내에서 정상적으로 존재하는 단백질이지만, HIF-1 $\alpha$  단백질은 세포가 저산소증에 노출되었을 때만 핵내에 급속히 축적되는 단백질이다<sup>4)</sup>. 세포가 저산소증에 빠지면 다양한 단백질, 즉 혈관내피세포성장인자, 당원수송체, 당분해효소 등이 발현되어 적응하게 되는데, HIF-1 $\alpha$ 의 활성화가 저산소증에 대한 세포적응에서 대단히 중요한 단계로 여겨진다<sup>5) 6)</sup>.

혈관 형성인자인 VEGF(Vascular Endothelial Cell Growth Factor: 혈관내피세포성장인자)는 미세혈관의 투과성을 증가시키는 다양한 기능을 가진 cytokine으로 처음에는 VPF(vascular permeability factor)로 명명되었다. VEGF가 혈관 투과성을 증가시키는 정도는 히스타민의 5만배 정도이다. VEGF는 내포세포에 특이적인 유사분열 촉진제로서 내피세포의 증식과 이동, 세포외 기질의 재형성, 신생혈관 생성 등에도 관여한다<sup>7)</sup>. VEGF는 family로 구성되어 있는데, VEGF-A, PlGF(placenta growth factor), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E가 알려져 있다. 이러한 VEGF는 세포표면의 수용체와 결합함으로써 그 기능을 나타낼 수 있다.

본 연구에서는 비소세포 폐암에서 HIF-1 $\alpha$ , VEGF의 발현과 예후와 관련된 여러 임상적 표지자 및 병리학적 표지자와의 상관관계를 조사하고, 비소세포 폐암 환자의 수술 후 예후와의 관계를 알고자 하였다.

## 2. 자료와 방법

### 2.1. 대상

대전 K대학교병원에서 2000년부터 2007년까지 개흉 수술을 시행하여 폐의 원발성 비소세포 폐암으로 진단된 환자 중 파라핀 포매조직의 보관 상태가 양호한 44 예를 대상으로 하였다. WHO 분류에 의한 조직학적인 형태는 편평세포암종 28예, 선암종 16예, 그리고 대세포암종 0예이었다.

### 2.2. 임상 및 조직학적 검색

연구 대상 환자의 임상 기록과 병리 검사결과 보고지를 재검토하여 환자의 연령, 종양의 조직학적 유형, 종양의 크기, 림프절 전이 유무, 병기 및 생존 여부를 조사한다.

### 2.3. tissue microarray(TMA)를 제작

44명 환자의 수술한 조직 H&E slide를 재검토하여 종양이 있는 슬라이드 중에서 대표적인 부분을 골라 펜을 이용하여 5mm 직경의 원을 그린다. 이 부분을 Bee-Cher arrayer를 사용하여 punching한다. Punched tissue를 recipient block에 넣어 다시 포매한다.

### 2.4. 면역조직화학 염색

Tissue microarray 종양 조직을 사용하여 통상적인 면역조직화학 염색을 시행한다. 일차 항체는 vascular endothelial growth factor(VEGF, Zymed), hypoxic induced factor-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ , DAKO)를 사용한다.

본 연구에 사용되는 일차 항체들은 VEGF(Zymed), HIF-1 $\alpha$ (DAKO)이었다. 실온에서 각각의 일차항체와 60분간 반응시킨 후, 세척 완충액으로 3회 수세하였다. 이후 Universal LSAB2 kit(DAKO)를 이용하여 이차항체를 10분간 반응시킨 후 세척 완충액으로 3회 수세하고, streptavidin peroxidase detection system을 이용하여 biotin-avidin 특이 결합을 유도하였다. 다시 완충액으로 수세한 후 3-amino-9-ethylcarbazole(AEC)를 이용하여 10분간 도포하여 발색시키고 Meyer's hematoxylin으로 대조 염색한 후 광학 현미경으로 관찰하였다. VEGF는 세포질에 갈색으로 염색되면 양성으로 판정하였고, HIF-1 $\alpha$ 는 핵에 갈색으로 염색되면 양성으로 판정하였다. 면역조직화학염색의 결과 평가는 고배율 시야(X400)에서 5 시야를 검경하여 전체종양 세포 수에 대한 양성 종양 세포 수를 백분율로 표시하였다. 종양세포의 10% 이상에서 발현이 되는 경우를 양성으로 판정하였다.

### 2.5 통계학적 분석

통계학적 분석은 Window용 SPSS version 14.0E 프로그램을 이용하여 chi-square test로 각 단백질 발현 유무와 예후인자와의 상관성을 검정하였다. 유의수준은  $p < 0.05$  로 설정하였다.

## 3. 결 과

### 3.1. 임상적 특징

전체 44명 중 남자가 32명, 여자가 12명으로 남녀

비는 2.7 : 1이었고, 평균연령은 61.2세였다.

#### 4. 고찰

### 3.2. HIF-1a, VEGF 면역조직화학 염색 결과

HIF-1a 과발현은 44예중에서 16예(36.4%)에서 관찰되었고, 종양세포의 핵 또는 세포질에 발현되었다. HIF-1a의 과발현은 병리학적 TNM 병기에서 1기는 25예중 11예(44.0%), II기는 19예중 5예(26.3%)에서 보였으나 통계학적으로 유의성은 관찰되지 않았다(p=0.227)(표 2). VEGF는 44예중 24예(54.5%)에서 발현되었고, 종양세포의 핵 또는 세포질에 발현되었다(Fig. 2). VEGF의 과발현은 병리학적 TNM 병기에서 1기는 25예중 12예(48.0%), II기는 19예중 12예(63.2%)에서 보였으나 통계학적으로 유의성은 관찰되지 않았다(p=0.327)(표 3).

종양의 성장과 전이에 있어서 맥관 형성이 매우 큰 역할을 한다. 종양이 성장하기 위해서는 새로운 미세혈관의 증식이 촉진되어야 하고, 이런 종양 내의 신생혈관은 종양세포가 체순환계로 들어가 원격 전이를 일으키는 역할을 하고 있다<sup>8)</sup>. 종양의 성장과 전이에 있어서 맥관 형성이 매우 큰 역할을 한다. 종양이 성장하기 위해서는 새로운 미세혈관의 증식이 촉진되어야 하고, 이런 종양 내의 신생혈관은 종양세포가 체순환계로 들어가 원격전이를 일으키는 역할을 하고 있다<sup>8)</sup>. 맥관형성을 유발하는 인자 중에 가장 강력하고 중요한 VEGF는 1983년 Senger 등<sup>9)</sup>에 의해 혈중 거대분자의 미세혈관 밖으로 유출을 촉진시키는 물질이라는 의미로 VPF로 처음 알려졌고, 1989년 Ferrara와 Henzel<sup>10)</sup>은 소의 뇌하수체 여포세포의 배양액에서 혈관내피세포에 특이적으로 작용하여 성장을 촉진시키는 인자를 발견하고 혈관내피성장인자(VEGF)로 명명하였다.

VEGF는 결장암, 간세포암, 난소암 등 여러 종양에서 연구되어 종양의 미세혈관밀도 증가와 밀접한 관련이 있다는 연구들을 기초로 종양의 재발과 원격 전이 진단에 중요한 역할을 하고 있다<sup>11) 12)</sup>. VEGF는 종양세포의 세포질과 혈관내피세포 주위 선상피세포, 염증세포와 섬유모세포에서 발현되는 것으로 알려져 있다<sup>21)</sup>. 국소림프절 전이와 VEGF 발현과의 관계는 Kleine 등<sup>13)</sup>, Lennard 등<sup>14)</sup> 여러 연구에서 유의한 상관관계가 있다고 발표하였다. 이는 맥관형성인자가 종양의 성장과 악화를 반영하는 인자임을 시사하는 것이다.

종양세포는 증식능이 매우 높기 때문에 산소와 에너지대사의 증가가 요구된다. 저산소증 상태에서 맥관형성의 유도과 같은 세포의 적응 과정에는 HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1) 단백질이 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. HIF-1a와 HIF-1β의 두 아단위로 구성된 이질이량체의 전사인자인 HIF-1 단백질은 저산소증에 노출된 세포에서 산소의 생체내 항상성 유지에 중요한 역할을 한다<sup>5)</sup>. ARNT(Aryl hydrocarbon nuclear receptor translocator)로 불리는 HIF-1β 단백질은 세포내에서 정상적으로 존재하는 단백질인 데 반해<sup>16)</sup>, HIF-1a 단백질은 세포가 저산소증에 노출되었을 때만 핵내에 급속히 축적되는 단백질이다. HIF-1a 단백질은 저산소증에서 세포의 적응을 돕는 단백질의 발현과 관련된 유전자의 hypoxia response elements 부위에 결합하여 이들 유전자를 활성화시킨다. 핵내에 축적

[표 1] 연구 대상의 일반적 특성

		환자수(명)	비중(%)
성별	남	32	72.7
	여	12	27.3
연령	30대	1	2.3
	40대	5	11.4
	50대	11	25
	60대	20	45.5
	70대	7	15.9
병기	I	25	56.8
	II	19	43.2
HIF-1a	+	16	36.4
	-	28	63.6
VEGF	+	40	54.5
	-	20	45.5

\* HIF (Hypoxia Inducible Factor-1) : 저산소증 유도인자  
 \*\* VEGF(Vascular Endothelial Cell Growth Factor) : 혈관내피세포성장인자

[표 2] HIF-1a와 병기의 상관 관계

		HIF-1a		소계	
		-	+		
병기	I	환자수	14	11	25
		%	56.0	44.0	100.0
	II	환자수	14	5	19
		%	73.7	26.3	100.0
소계		환자수	28	16	44
		%	63.6	36.4	100.0

(P=0.227)

[표 3] VEGF와 병기의 상관 관계

		VEGF		소계	
		-	+		
병기	I	환자수	13	12	25
		%	52.0	48.0	100.0
	II	환자수	7	12	19
		%	36.8	63.2	100.0
소계		환자수	20	24	44
		%	45.5	54.5	100.0

(P=0.327)

된 HIF-1 $\alpha$  단백질은 일단 세포의 재산소화가 이루어지면 세포내 ubiquitin-proteasome 경로에 의해 신속히 분해되므로, HIF-1 단백질의 활성은 HIF-1 $\alpha$ 에 의해 결정된다고 볼 수 있다<sup>17)</sup>.

조성래 등<sup>18)</sup>이 발표한 논문에 따르면 HIF-1 $\alpha$ 의 과발현은 비소세포폐암에서 종양의 증식과 림프절 전이에 영향을 미친다고 하였다. 일부의 연구자들은 두경부암과 구강, 인두암 등의 다른 인체암에서 HIF-1 $\alpha$ 의 과발현이 임상적 표지자 및 병리학적 표지자와 유의한 상관성은 없다고 하였으나<sup>19)</sup>, 양일중 등<sup>20)</sup>은 식도암중에서 HIF-1 $\alpha$ 의 과발현과 림프절 전이가 유의한 상관관계가 있으며 술전 원발암 병소의 조직검사에서 림프절 전이 유무의 표지자로서의 유용성을 제시하고 있다.

본 연구에서는 VEGF 발현과 병기와의 상관관계, HIF-1 $\alpha$ 의 과발현과 병기 사이의 유의한 상관관계를 볼 수 없었다. 또한 HIF-1 $\alpha$ 의 과발현과 VEGF의 발현 사이에 유의한 상관관계도 관찰되지 않았다. 반면 조성래 등<sup>18)</sup>이 2006년에 대한 흉부외과학회지에 발표한 논문에 따르면 HIF-1 $\alpha$ 의 과발현은 비소세포 폐암에서 종양의 증식 및 림프절 전이와 관련이 있다고 하였다. 조성래 등<sup>8)</sup>의 연구결과가 본 연구결과와 차이를 보이는 이유는 본 연구에는 포함하지 않은 TNM 병기의 3기의 예까지 포함한 차이에서 비롯된 것이라 생각된다.

### 참고문헌

- [1] Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994; 73: 2013-6.
- [2] Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992;267:10931-4.
- [3] Wang GL, Semenza GL. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:4304-8.
- [4] Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 4604-13.
- [5] Wiesener MS, Turley H, Allen WE, et al. Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1 alpha. *Blood* 1998;92:2260-8.
- [6] Jung F, Palmer LA, Zhou N, Johns RA. Hypoxic regulation of inducible nitric oxide synthase via hypoxia inducible factor-1 in cardiac myocytes. *Circ Res* 2000;86:319-25.
- [7] Neufeld G., Cohen T., Gengrinovitch S., and Poltorak A. *FASEB J*. 1999;13:9-22.
- [8] Norrby K. Angiogenesis: new aspects relating to its initiation and control. *APMIS* 1997;105:417-37.
- [9] Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Devorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983;219: 983-5.
- [10] Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;161:851-8.
- [11] Tokunga T, Oshika Y, Abe Y, Ozeki Y, Sadshiro S, Kijima H, et al. Vascular endothelial growth factor mRNA isoform expression pattern is correlate with liver metastases and poor prognosis in colon cancer. *Br J Cancer* 1998;77:998-1002.
- [12] Takakashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, Cleary KR, Ellis LM. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastases and proliferation of human cancer. *Cancer Res* 1995;55:3964-8.
- [13] Klein M, Vignaud JM, Hennequin V, Toussaint B, Bresler L, Pleant F, et al. Increased expression of the vascular endothelial growth factor is a pejorative prognosis marker in papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:656-8.
- [14] Lennard CM, Patel A, Wilson J, Reinhardt B, Tuman C, Fenton C, et al. Intensity of vascular endothelial growth factor expression is associated with increased risk of recurrence and decreased disease-free survival in papillary thyroid cancer. *Surgery* 2001;129:552-8.
- [15] Talks KL, Turley H, Gatter KC, et al. The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 and HIF-2 in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol* 2000; 157: 411-21.
- [16] Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 5510-4.
- [17] Salceda S, Caro J. Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem* 1997; 272: 22642-7.
- [18] Sung Rae Cho, Jounghun Byun, Jong In Kim, Bong Geun Lee, Bong Kwon Chun. Expression of Hypoxia-inducible Factor-1 $\alpha$  in Non-small Cell Lung Cancer: Relationship to Prognosis and Tumor Biomarkers *Korean J Thorac Cardiovasc Surg* 2006;39:828-83.
- [19] Aebbersold DM, Burri P, Beer KT, et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer. *Cancer Res* 2001;61:2911-6.
- [20] Yang IJ, Cho SR, Kim JI, Lee HY, Chun BK. Expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in esophageal squamous cell carcinoma: Relationship to prognosis and tumor biomarkers. *Korean J Thorac Cardiovasc Surg* 2004;37:691-701.
- [21] Guidi AJ, Abu-Jawdeh G, Berse B : "Vascular permeability factor(vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in cervical neoplasia" *J Natl Cancer Inst*. 1995;87:1237-45.