

乳頭像 甲狀腺癌에서 VEGF, HIF-1 α , E-cadherin, p53의 發現과 病期の 關聯性 研究

김종삼*, 나백주**, 이무식**, 김철웅**, 정계림***

*건양대학교 보건복지대학원 보건학과, **건양대학교 의과대학 예방의학과, 건양대학교 일반대학원 보건학과
e-mail:bippo@kyuh.co.kr

Relationship between the Expression of VEGF, HIF-1 α , E-cadherin, p53 and Stage in Papillary Thyroid Carcinoma

Jong-Sam Kim*, Baeg-Ju Na**, Moo-Sik Lee**, Chul-Woung Kim**, Gye-Rim Jeong**

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

**Department of Preventive Medicine, College of Medicine,

***The Graduate School of Public Health Konyang University

요 약

본 연구에서는 HIF-1 α 의 과발현은 VEGF의 발현과 유의한 상관 관계가 있음을 보여 주었다. 그리고, HIF-1 α 의 과발현과 E-cadherin의 발현 사이에도 연관성은 있었지만 통계적인 유의성은 없었다. 종양의 병기와 VEGF, HIF-1 α , E-cadherin, p53의 상관성을 살펴본 결과 E-cadherin에서만 유의성이 관찰되었다. 갑상샘 유두암종에서 HIF-1 α 의 발현이 종양의 증식과 관련된 단백질, 특히 맥관형성과 관련된 단백질인 VEGF의 발현, p53의 축적 및 E-cadherin의 발현소실과의 관계, 그리고 병리학적 표지자와의 관련성을 조사하고, 갑상샘 유두암종 환자의 수술후 예후와의 관계를 알고자 하였다.

1. 서론

갑상샘암(thyroid cancer)은 내분비암 중에서 발생 빈도가 가장 높은 질환으로, 미국에서는 매년 10만명당 8명의 환자가 진단을 받고 약 10만명당 0.5명이 질환 자체로 사망한다. 국내에서는 갑상샘암의 빈도가 악성 종양 중 6번째이고, 여성에서는 4번째이다. 최근 초음파, 세침흡인세포검사 등의 진단법의 발달로 진단율과 수술의 빈도가 증가하고 있다.

갑상샘암은 조직병리학적 소견에 따라 크게 유두암(papillary carcinoma), 소포암(follicular carcinoma), 수질암(medullary carcinoma), 역형성암(anaplastic carcinoma) 등으로 구분된다. 그 중 유두암이 가장 흔히 발견되며, 75-85%의 빈도를 나타낸

다. 갑상샘의 유두암은 예후가 비교적 좋지만, 주변 림프절로 전이를 잘하는 것으로 알려져 있고 경부림프절로의 전이는 20~50% 정도의 환자에서 발견되는 것으로 보고된다. 그리고 잘 분화된 갑상샘암 환자의 약 9-18%에서 원격 전이가 나타나는 것으로 보고된다.

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. 신생혈관 생성에 있어서 종양세포에서 분비되는 여러 맥관형성 인자가 관여하는데, 이 중에 VEGF(Vascular Endothelial Cell Growth Factor: 혈관내피세포성장인자)는 내피

세포에 특이적인 유사분열 촉진제로서 내피세포의 증식과 이동, 세포외 기질의 재형성, 모세혈관의 형성과 같은 혈관 신생을 일으키는데 관여한다. VEGF는 정상 세포와 형질전환(transformation)된 세포에서 합성되는데, 이는 심장혈관계의 발생, 정상 혈관계의 생리적 현상 및 류마티스성 관절염이나 암 등에서 신생혈관 생성에 중요한 역할을 한다.

암세포의 성장과정에서 암세포는 과다분열의 결과 국지적인 저산소 상태를 유발하게 되고 이 과정에서 HIF-1 α (hypoxia inducible factor-1 α)가 활성화된다. HIF-1 α 는 신혈관 생성을 촉진시켜 산소공급을 원활히 할 뿐만 아니라 암세포의 전이에도 관여한다. 돌연변이에 의한 HIF-1 α 의 불활성화는 암 성장 및 신혈관 생성의 억제와 직접적으로 관련 있다고 보고된다.

E-cadherin은 세포표면의 당단백으로서 상동형태학적 칼슘의존성의 세포간 접착물질로 작용하고 배아발생, 형태학적 발달, 그리고 정상구조의 기능 유지에 중요한 역할을 한다. 만일 E-cadherin의 기능이 이상이 발생할 경우 형질변환을 일으킨 종양세포가 주변조직으로 침윤을 일으키게 된다.

p53은 손상된 DNA를 수복하고 세포성장을 조절하는 기능 이외에도 세포분화와 세포자멸사에도 관여하는 중요한 종양억제 유전자이다. 이 유전자가 소실되거나 변이가 일어나면 종양억제 기능을 잃어, 결국 종양 형성에 영향을 끼치게 된다. 실제로 p53 유전자의 변이는 여러 종양에서 가장 흔하게 발견되며, 여러 연구를 통하여 이들이 종양의 발생기전에 중요한 역할을 하는 것을 보여준다.

우리는 갑상샘 유두암 환자에서 VEGF, HIF-1 α , E-cadherin, p53의 발현 정도와 병기와의 상관관계를 비교하여 VEGF, HIF-1 α , E-cadherin, p53의 예후인자로서의 가치를 알아보고자 하였다.

2. 방법

2.1. 대상

대전 일개대학병원에서 2000년부터 2007년까지 갑상샘 전절제술, 아전절제술, 일엽절제술을 시행받고 갑상샘 유두암으로 진단된 45세 이상의 환자 중 파라핀 포매조직의 보관 상태가 양호한 54명을 대상으로 한다.

2.2 임상 및 조직학적 검색

연구 대상 환자의 임상 기록과 병리 검사결과 보고지들을 재검토하여 환자의 연령, 종양의 크기, 림

프절 전이 유무, 병기를 조사한다.

2.3 Tissue microarray(TMA)를 제작

103명 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, San Francisco, USA), hypoxic induced factor-1 α (HIF-1 α , Dakocytomation, Glostrup, Denmark), E-cadherin(Dakocytomation, Glostrup, Denmark), p53(Dakocytomation, Glostrup, Denmark)을 사용한다.

면역조직화학염색을 위하여 80°C 오븐에서 1시간 건조시킨 다음, xylene으로 실온에서 2분간 4회 탈파라핀화 하였다. 100% 알코올로 10초간 3회 처리하고, 10% citrate buffer에 담가 120°C의 고압멸균기에서 15분간 가열한 후 실온에서 20분간 방치하였다. 45°C의 세척 완충액으로 3분씩 3회 세척하고 조직내의 내인성 과산화효소를 제거하기 위하여 3% 과산화수소수에 실온에서 5분간 반응시켰다. 이어서 세척 완충액으로 3회 수세하였다. 실온에서 각각의 일차항체와 60분간 반응시킨 후, 세척 완충액으로 3회 수세하였다. 이후 Envision kit(Dakocytomation, Glostrup, Denmark)를 이용하여 이차 항체를 10분간 반응시킨 후 세척 완충액으로 3회 수세하고, 3,3'-diaminbenzidine tetrahydrochloride를 이용하여 3분간 도포하여 발색시키고 Meyer's hematoxylin으로 대조 염색한 후 광학 현미경으로 관찰하였다. VEGF, E-cadherin은 세포질에 갈색으로 염색되면 양성으로 판정하고, HIF-1 α , p53은 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

14.0(SPSS Inc., Chicago, U.S.A.)프로그램을 이용하여 chi-square test로 각 단백질의 발현 유무와 예후인자와의 상관성을 검정한다.

3. 결과

3.1 임상병리학적 특징

총 54예의 유두상 암종에서 남자가 3명, 여자가 51명으로 남녀비는 1 : 17이었고, 연령층은 45세에서 73세로 다양하였으며 평균연령은 54.5세였다.

종양의 크기는 2mm부터 80mm까지 측정되었다. 병기 I기는 7예, 병기 II기는 2예, 병기 III기는 45예였다. 종양의 주변조직으로 침윤여부를 조사한 결과 45예에서 주변조직으로의 침윤을 보였다. 주변 림프절 전이는 18예에서 림프절 전이를 보였다.

54예에서 VEGF의 발현은 35예(64.8%)에서 관찰되었고 병기 I기에서는 5예(71.4%), 병기 II+III기에서는 30예(63.8%)에서 양성을 보였다. VEGF 발현과 병기 사이에는 유의한 상관관계가 관찰되지 않았다

($P>0.05$). HIF-1 α 의 과발현은 22예(40.7%)에서 관찰되었고 병기 I기에서는 4예(57.1%), 병기 II+III기에서는 18예(38.3%)에서 양성을 보였다. HIF-1 α 과발현과 병기 사이에서도 유의한 상관관계가 관찰되지 않았다($P>0.05$). E-cadherin의 발현은 13예(24.1%)에서 관찰되었고 병기 I기에서는 4예(57.1%), 병기 II+III기에서는 9예(19.0%)에서 양성을 보여, 병기가 높을수록 발현이 감소되는 결과를 보여주었다. E-cadherin의 발현소실과 병기 사이에는 유의한 상관관계가 있었다($P<0.05$). p53 발현은 27예(50.9%)에서 관찰되었고 병기 I기에서는 3예(42.9%), 병기 II+III기에서는 24예(52.2%)에서 양성을 보였다. p53 발현과 병기 사이에는 유의한 상관관계가 관찰되지 않았다($P>0.05$). 종양의 TNM 병기와 VEGF, HIF-1 α , E-cadherin, p53의 면역조직화학 염색 결과의 상관성을 살펴본 결과 E-cadherin에서만 유의성이 관찰되었다(Table 1).

[Table 1] Relationship between Expression of VEGF, HIF-1 α , E-cadherin, p53, and stage.

		stage		p-value
		I	II+III	
VEGF	-	2 (28.6%)	17 (36.2%)	p=0.526
	+	5 (71.4%)	30 (63.8%)	
HIF-1 α	-	3 (42.9%)	29 (61.7%)	p=0.293
	+	4 (57.1%)	18 (38.3%)	
E-cadherin	-	3 (42.9%)	38 (80.9%)	p=0.049
	+	4 (57.1%)	9 (19.1%)	
p53	-	4 (57.1%)	22 (47.8%)	p=0.478
	+	3 (42.9%)	24 (52.2%)	

본 연구에서 VEGF의 발현과 HIF-1 α 의 과발현 사이에는 유의한 상관 관계가 관찰되었고($P<0.01$) (Table 2), HIF-1 α 의 발현과 E-cadherin의 발현사이

에서도 연관성은 있었지만 통계적인 유의성은 없었다($P>0.05$).

[Table 2] Relationship between Expression of VEGF and HIF-1 α .

		VEGF	
		-	+
HIF-1 α	-	16 (84.2%)	16 (45.7%)
	+	3 (15.8%)	19 (54.3%)

($p<0.01$)

4. 고찰

본 연구에서는 HIF-1 α 의 과발현은 VEGF의 발현과 유의한 상관 관계가 있음을 보여 주었다. 갑상샘암에서 HIF-1 α 와 VEGF의 관계를 밝힌 논문은 아직 없지만, 조성래 등은 폐의 비소세포성 폐암에서 HIF-1 α 의 과발현과 VEGF의 발현이 유의한 상관관계가 있음을 보여주었다. 이는 저산소증의 미세환경에서 신생혈관의 생성으로 산소와 에너지원의 공급

을 통한 세포적응을 시사한다고 할 수 있다. 그리고, HIF-1 α 의 과발현과 E-cadherin의 발현에도 연관성은 있었지만 통계적인 유의성은 없었다. 하지만 HIF-1 α 와 E-cadherin의 상관관계에 대해 발표한 논문이 아직 없고 우리 연구의 대상군이 적었기 때문에 이를 토대로 더욱 많은 대상군에 적용한다면 좀 더 유의성 있는 결과를 얻을 수 있을 것 같다.

종양의 병기와 VEGF, HIF-1 α , E-cadherin, p53의 상관성을 살펴본 결과 E-cadherin에서만 유의성이

관찰되었다. 대상군을 더 많이 선정하고 지속적인 추적관찰을 하면 갑상샘암의 병기와 VEGF, HIF-1 α , p53 발현과의 상관관계가 좀더 유의한 차이가 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

[1] Haigh PI, Urbach DR, Rotstein LE: Extent of thyroidectomy is not a major determinant of survival in low-or high-risk papillary thyroid cancer. *Ann Surg Oncol* 2005;12:8189.

[2] Park HL, Kwak JY, Kang SS, Kim DY, Kang HG, Shim JY, et al. The analysis of tumor aggressiveness according to tumor size in occult papillary thyroid carcinoma. *J Korean Surg Soc* 2007;73:470-75

[3] Besic N, Pilko G, Petric R, Hocevar M, Zgajnar J. Papillary thyroid microcarcinoma: prognostic factors and treatment. *J Surg Oncol* 2008;97:221-5.

[4] Bilimoria KY, Bentrem DJ, Ko CY, et al.: Extent of surgery affects survival for papillary thyroid cancer. *Ann Surg* 2007, 246(3):375384.

[5] Hedinger C, Williams ED, Sobin LH. The WHO histological classification of thyroid tumors: a commentary on the second edition. *Cancer* 1989;63:908-11.

[6] Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992;267:10931-4.

[7] Bos R, van Diest PJ, de Jong JS, van der Groep P, van der Valk P, van der Wall E. Hypoxia-inducible factor-1 α is associated with angiogenesis, and expression of bFGF, PDGF-BB, and EGFR in invasive breast cancer. *Histopathology* 2005;46:31-6.

[8] Pignattelli M, Ansari TW, Gunter P : "Loss of membranous E-cadherin expression in pancreatic cancer correlation with lymph node metastasis, high grade, and advanced stage." *J Pathol.* 1994;174:243-48.

[9] Dobashi Y, Sakamoto A, Sugimora H, et al : Overexpression of p53 as a possible prognostic factor in human thyroid carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1993;17:375-81.

[10] Hamming JF, van de Velde CJ, Goslings BM, et al.: Preoperative diagnosis and treatment of metastases to the regional lymph nodes in papillary carcinoma of the thyroid gland. *Surg Gynecol Obstet.* 1989 Aug; 169(2): 107-14.

[11] Norrby K. Angiogenesis: new aspects relating to its initiation and control. *APMIS* 1997;105:417-37.

[12] Brechot C. Primary liver cancer—etiological and progression factor. CRC Press, Boca raston 1994. p.249-51.