

갑상선 유두상 암종에서 종양혈관형성 및 혈관내피성장인자 발현의 예후인자적 의의

인제대학교 의과대학 부산 백병원 외과학교실,* 병리과학교실,** 구포성심병원 외과***
강헌대* · 김성배*** · 김태현* · 오상훈* · 김상효* · 윤혜경**

= Abstract =

The Prognostic Significance of Tumor Angiogenesis and Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Papillary Carcinomas of the Thyroid Gland

Hun Dae Kang, M.D.,* Seong Bae Kim, M.D.,*** Tae Hyun Kim, M.D.,*
Sang Hoon Oh, M.D.,* Sang Hyo Kim, M.D.,* Hye Kyong Yoon, M.D.**

Department of Surgery* and Department of Pathology,** Inje University College of Medicine, Busan, Korea
Department of Surgery, Gupo Sung Sim Hospital,*** Busan, Korea

Objectives : The purpose of this study was to evaluate for prognostic significance of VEGF expression and tumor angiogenesis in papillary carcinomas of the thyroid.

Materials and Methods : The materials were 79 cases of papillary thyroid carcinomas, and age, sex, tumor size, multiplicity of tumor, capsular invasion, lymph node metastasis, recurrence, TNM stage, DeGroot stage and AMES scale were evaluated. An immunohistochemical stains for CD 34 to estimate microvessel density (MVD), and VEGF were done. MVD was defined as an average count of vessels per $\times 400$ power field in the most vascularized area. VEGF expression was interpreted as 1+ and 2+ according to staining intensity and percentages of positive cells.

Results : Mean score of MVD was 39.7 ± 16.9 . MVD were significantly higher in cases with capsular invasion ($p=0.0001$), lymph node metastasis ($p=0.0001$), TNM stage III ($p=0.0022$), DeGroot stage III ($p=0.0163$) and high risk group by AMES scale ($p=0.0001$). VEGF 2+ expression rate was significantly increased in cases with capsular invasion and lymph node metastasis ($p=0.0006$, $p=0.0013$), and in cases with TNM stage III, DeGroot stage III and high risk group by AMES scale ($p=0.0236$, $p=0.0003$, $p=0.0293$). In VEGF 2+ expression group, MVD was significantly higher than in VEGF 1+ group ($p=0.0008$), and MVD showed positive relation to VEGF 2+ expression ($r=0.4616$).

Conclusion : VEGF expression and high MVD were significantly correlated to capsular invasion, lymph node metastasis, TNM stage III, DeGroot stage III and high risk group by AMES scale. The expression of VEGF and high MVD could be considered to be one of prognostic factor in papillary thyroid carcinomas.

KEY WORDS : Papillary thyroid carcinoma · Angiogenesis · VEGF.

서 론

신생혈관형성(angiogenesis)은 정상조직에 이미 존재하

는 혈관에서 모세혈관들이 새로 자라는 것으로 정상적인 생리 과정인 태아의 성장과 신체성장, 여성의 월경주기, 임신, 모양의 주기 변화, 상처의 치유과정 및 수복 등에 나타나며, 류마티스 관절염, 당뇨병성망막증과 같은 병적 상태에서도

관찰된다¹⁾. 또한 신생혈관형성은 종양의 성장, 침윤 및 전이에 관련이 있다²⁾.

신생혈관형성은 종양세포나 종양에 침윤한 염증세포에서 분비되는 혈관형성인자나 혈관형성억제인자의 소실에 의해 유도된다. 혈관형성인자로는 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF), 섬유모세포성장인자(bFGF), 전화성장인자(TGF- α , β), 표피성장인자(EGF), 혈소판유래내피성장인자(PD-ECGF), 종양괴사인자(TNF- α) 등이 있다³⁾. 혈관형성인자의 작용으로 혈관의 기저막과 세포외기질이 분해되고, 내피세포가 혈관형성 자극원을 향해 이동, 증식, 성숙하여 새로운 모세혈관이 만들어진다. 신생혈관은 기존의 혈관과는 달리 기저막이 불완전하여 종양세포가 혈관내로 들어가는 것이 용이하다. 종양세포수가 10^6 개인 $1\sim 2\text{mm}^3$ 까지는 혈관이 없어도 종양이 자랄 수 있으나 그 이상의 크기로 성장하기 위해서는 필요 영양분과 산소 공급 및 노폐물의 제거를 위해 신생혈관형성이 필수적이다^{3,4)}. 따라서 종양의 신생혈관 형성은 종양의 성장과 전이과정에 필수 불가결한 요소이다. 자궁경부, 유방, 소화기, 전립선, 피부, 난소, 신장, 방광, 간, 췌장 등에서 발생한 악성 종양에서는 종양의 혈관 형성이 많을수록 예후가 나쁘다고 보고 되었으며, 신생혈관형성의 정도는 종양의 주위조직으로의 침투, 재발 및 악성도와 관련이 있어 종양의 신생혈관형성이 중요한 예후 인자로 제시되었다⁵⁾.

혈관형성인자 중 대표적인 VEGF는 혈관내피세포에만 특이적으로 작용하는 혈관투과인자로 $34\sim 42\text{kDa}$ 의 당단백질이며 세포막에 있는 VEGFR-1(Flt-1), VEGFR-2(Flk1/KDR) 수용체에 작용하여 인지질효소 C를 활성화시켜 혈관내피세포를 증식시키고 혈관 투과성을 증가시켜, 혈장단백을 배출시키고 섬유소를 침착시킴으로 새로운 혈관의 형성을 돕는다⁶⁾. 저산소증, bFGF, TGF- α , β 및 ras 종양유전자와 p53 종양억제유전자 등이 VEGF 분비 과정에 직접, 간접적으로 관여한다고 알려져 있다⁴⁾. VEGF 발현은 유방암, 폐암, 위암 등의 예후와 연관성이 있다고 보고 되었다⁷⁾.

갑상선의 유두상 암종 중 상당수에서 병기가 낮거나 저위험군임에도 불구하고 갑상선내 다발성으로 전파되거나 피막을 침윤하여 주위 조직으로 파급되기도 하고, 림프절 전이, 국소재발 및 원격전이가 되는 예가 있다. 갑상선 유두상 암종의 형성과 진행 과정에도 종양의 성장과 전이 과정에 필수적인 신생혈관형성과 VEGF가 중요한 역할을 할 것으로 추정할 수 있다. 갑상선의 유두상 암종에서 면역조직화학염색을 이용하여 신생혈관형성과 VEGF 발현을 조사하고, 암종의 크기, 다발성, 주변 조직 침윤, 림프절 및 원격 전이, 재발 유무 및 TNM 병기, DeGroot 병기 및 AMES scoring system에 의한 위험도와의 연관성을 분석함으로써 신생혈관형성 및 VEGF발현이 갑상선 유두상 암종의 예

후인자로서의 가능성을 알아보려고 하였다.

대상 및 방법

1. 연구대상

1990년 1월부터 1993년 12월까지 부산백병원 외과에서 갑상선 유두상 암종으로 갑상선절제술을 시행 받은 환자 중 슬라이드 재검이 가능하고, 추적관찰이 되었던 79예를 대상으로 하였다.

2. 연구방법

1) 임상 및 병리조직학적 검색

79예 환자의 병리지에서 나이, 성별, 암종의 크기, 다발성 유무, 주위 조직 침윤 유무, 전이 유무, 재발 유무 등을 조사하였으며, 병리 슬라이드 소견을 재검하여 주위 조직 침윤과 림프절 전이 유무를 확인하였다. TNM 병기, DeGroot 병기 및 AMES 체계에 따른 위험군을 정하였다⁸⁾. 환자의 나이는 TNM 병기에 사용되는 45세를 기준으로 45세 미만 군과 45세 이상 군으로 나누었고, 종양의 크기도 1cm 이하, 1cm 초과~4cm 이하, 4cm 초과 군으로 나누었다. AMES 체계에 따라 저위험군과 고위험군으로 나뉘었으며, DeGroot 병기에 따라 1~4기로 나누었다.

2) 면역조직화학염색

신생혈관형성은 종양 내 미세혈관의 수를 계측하는 방법을 택하였고, 혈관에 특이적으로 염색되는 CD34를 이용하여 면역조직화학염색을 실시하였다. 각 증례에서 종양 부위가 포함된 파라핀 블록을 선정하여, $4\mu\text{m}$ 두께의 절편을 aminoprophyl-triethoxysilane(Sigma, St. Louis, USA)이 도포된 슬라이드에 부착시키고 60°C 에서 1시간 파라핀을 녹인 후 100% xylene에서 10분간 2회 탈 파라핀 과정과 90%, 85%, 80%, 70%, 60%, 50% 계열 알코올로 10분간 함수 과정을 거친 후 증류수로 씻었다. 항원성 회복을 위하여 1% zinc sulfate(Sigma, St. Louis, USA)가 포함된 10mM citrate 완충액(pH 6.0)에 넣고 초음파 오븐을 이용하여 5분간 3회 가열하였다. 항체에 대한 비특이적 반응을 억제하기 위하여 0.5% 정상 말 혈청을 함유한 Tris buffered saline(10mM Tris, 150mM NaCl, pH 7.2, 이하 TBS로 명함) 용액에 30분간 실온에서 반응시켰다. 메탄올과 30% 과산화수소수가 9:1의 비율로 섞인 용액에 10분간 처리하여 내인성 과산화효소를 차단한 후 TBS로 3회 씻었다. 이후의 과정은 LSAB(Labeled streptavidin biotin) kit(DAKO, Glostrup, Denmark)를 이용하여 시행한 후 15분간 정상 염소 혈청을 처리하였다. 일차항체인 CD34(Neomark, California, USA)를 1:300으로, VE-

GF 발현은 anti-VEGF 다세포균향체(Santa cruz, California, USA)를 1 : 200으로 희석하여 실온에서 18시간 반응시켰다. TBS로 10분간 3회 씻은 후 2차 항체인 horse biotinylated anti-rabbit IgG(1 : 50 in TBS, Sigma, St. Louis, USA)을 실온에서 30분간 반응시켰다. TBS로 다시 3회 씻은 후 peroxidase-conjugated streptavidin(1 : 500 in TBS, DAKO, Glostrup, Denmark)과 실온에서 30분간 반응시킨 후 TBS로 씻고 amino-ethyl-carbazole (AEC)로 10~20분간 실온에서 발색시켰다. 다시 TBS로 3회 씻은 후 Mayer's hematoxylin으로 대조 염색하고 crystal mount를 사용하여 봉입한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

3) 면역조직화학염색의 판정

CD34 면역조직화학염색에서 미세혈관수가 가장 많은 부위를 택하여 광학현미경 400배 시야(Olympus BX51, UPlanFl 40x/0.75 X WH 10x) 세 군데의 미세혈관수를 측정하여 그 평균값을 미세혈관밀도(microvessel density, MVD)로 표시하였다. 혈관 중에서 6~8개 이상의 적혈구가 들어갈 만한 큰 직경의 혈관, 두꺼운 근층이 있는 혈관, 괴사 및 경화가 있는 부위는 수복반응으로 인한 이차적인 혈관의 증식은 제외하였으며⁹⁾¹⁰⁾, 한 개의 혈관 내피세포 또는 내강이 없는 내피세포의 소군집은 군집하나를 각각 한 개의 혈관으로 간주하여 계산하였다⁹⁾.

VEGF의 발현은 종양세포의 세포질에 염색된 강도에 따라 0~3점으로(0 : 음성, 1점 : 약함, 2점 : 중등도, 3점 : 강함) 구분하였고, 발현정도에 따라 0~3점으로(0점 : 음성,

1점 : 10% 미만의 발현, 2점 : 10~50% 발현, 3점 : 50% 이상의 발현) 산정하여 합한 수가 4점 이하인 경우를 1+, 5점 이상은 2+로 나누었다¹⁰⁾.

4) 결과 분석 및 통계처리

각 자료들의 통계학적 분석은 SPSS/PC 프로그램을 이용하였다. 유두상 암종의 임상적 및 병리학적 소견과 미세혈관밀도 및 VEGF 발현과의 연관성은 t-test 및 chi-square(χ^2) test로 검정하였으며 p값이 0.05 미만인 경우 통계학적으로 유의하다고 하였다.

결 과

1. 임상 및 병리조직학적 소견

환자의 나이가 45세 미만인 군은 39예(49.4%), 45세 이상인 군은 40예(50.6%)이었으며, 여자가 71예(89.9%), 남자는 8예(10.1%)이었다. 종양의 크기는 0.5cm에서 8.4cm까지였으며, 1cm 이하인 미세유두상암종(micro papillary carcinoma)은 14예(17.7%), 1.1~4.0cm 미만인 군은 58예(73.4%), 4.0cm 이상인 군은 7예(8.9%)이었다. 재발한 경우는 79예 중 3예(3.8%)이었고, 원격전이 된 예는 없었다. 갑상선내 다발성 병소를 보인 경우는 31예(39.2%)이었고, 종양이 피막을 침범하여 주위조직으로 침윤한 경우 피막 침범군은 50예(63.3%)였으며, 주위 림프절 전이가 있었던 예는 55예(69.6%)이었고, 피막을 침범하거나 림프절 전이가 있는 경우는 63예(79.8%), 갑상선에 국한된 종양은 16예(20.2%)이었다.

Table 1. Comparison of clinicopathologic parameters

	Total No. of case	Multiplicity	Capsular invasion	Lymph node metastasis	Recurrence
		No. of positive (%)	No. of positive (%)	No. of positive (%)	No. of positive (%)
Age (years)					
<45	39	11(28.2%)	22(56.4%)	25(64.1%)	2(5.1%)
≥45	40	20(50.0%)	28(70.0%)	30(75.0%)	1(2.5%)
p value		p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05
Size (cm)					
≤1.0	14	5(35.7%)	7(50.0%)	8(57.1%)	0(0.0%)
1.1~4.0	58	22(37.9%)	39(67.2%)	42(72.4%)	3(100%)
>4.0	7	4(57.1%)	4(57.1%)	5(71.4%)	0(0.0%)
p value		p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05
TNM					
Stage I	41	12(29.3%)	21(51.2%)	24(58.5%)	2(4.9%)
Stage II	2	1(50.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)
Stage III	36	18(50.0%)	29(80.6%)	31(86.1%)	1(2.8%)
p value		p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05
AMES					
Low risk	55	17(30.9%)	27(49.1%)	32(58.2%)	3(5.5%)
High risk	24	14(58.3%)	23(95.8%)	23(95.8%)	0(0.0%)
p value		p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05

Table 2. Correlation between microvessel density (MVD) and clinicopathologic parameters in papillary thyroid carcinomas

Parameters	No. of cases	*MVD (mean±SD)	p value	
Age (years)	<45	39	35.7±15.3	
	≥45	40	43.6±17.7	p=0.0354
Sex	Woman	71	38.3±16.3	
	Man	8	51.9±18.2	p=0.0296
Size (cm)	≤1.0	14	42.3±17.8	
	1.1~4.0	58	40.1±17.2	
	>4	7	31.2±10.9	p>0.05
Multiplicity	Negative	48	35.2±15.7	
	Positive	31	46.6±16.6	p=0.0028
Capsular invasion	Negative	29	30.1±10.2	
	Positive	50	45.2±17.6	p=0.0001
Lymph node metastasis	Negative	24	30.8±10.4	
	Positive	55	43.6±17.8	p=0.0001
TNM stage	Stage I	41	34.6±12.9	
	Stage II	2	21.8± 9.2	§NS
	Stage III	36	46.5±18.4	†p=0.0022
DeGroot stage	Stage I	16	38.2± 8.2	
	Stage II	13	32.4±12.2	§NS
	Stage III	50	45.2±17.6	†p=0.0163
AMES scale	Low risk	55	34.9±14.5	
	High risk	24	50.7±17.1	P=0.0001
Recurrence	Negative	76	40.1±17.0	
	Positive	3	30.1± 9.7	p>0.05

* : MVD ; microvessel density
 † : Result of comparison by chi-square test between stage III and stage I or stage II
 ‡ : Result of comparison by chi-square test between stage III and stage I or stage II
 § : NS ; not significant

TNM 병기에 따라 병기 I은 41예(51.9%)이었고, 병기 II는 2예(2.5%)이었으며, 병기 III은 36예(45.6%)이었다. AMES 체계에 따른 저위험군은 55예(69.6%)이고, 고위험군은 24예(30.4%)이었다. DeGroot 병기에 따르면 1기는 16예(20.2%), 2기는 13예(16.5%), 3기는 50예(63.3%)이었다(Table 1, 2).

45세 이상인 군에서 다발성은 20예(50.0%)이었고, 피막 침범은 28예(70.0%), 림프절 전이는 30예(75.0%), 국소재발은 1예(2.5%)이었다. 반면 45세 미만인 군에서 다발성 병소가 11예(28.2%)에서 관찰되었고, 피막 침범은 22예(56.4%), 림프절 전이는 25예(64.1%), 국소재발은 2예(5.1%)에서 관찰되었으며, 나이 분포에 따른 다발성, 피막 침범, 림프절 전이, 국소재발 등의 유의한 차이는 없었다(Table 1).

종양의 크기가 4cm 이상인 7예 중 4예(57.1%)에서 다발성 병소가 관찰되었고, 피막 침범 역시 4예(57.1%), 림

프절 전이는 5예(71.4%)에서 관찰되었으며 재발한 경우는 없었다. 종양의 크기가 1cm 이하인 미세유두상암종군 14예 중 5예(35.7%)에서 다발성 병소를 보였고, 피막 침범은 7예(50.0%), 림프절 전이는 8예(57.1%)에서 관찰되었고, 재발한 경우는 없었다. 종양의 크기가 1.1~4.0cm 인 군 58예 중 22예(37.9%)에서 다발성 병소를 보였고, 피막 침범은 39예(67.2%), 림프절 전이는 42예(72.4%)에서 관찰되었고, 3예(5.2%)에서 국소재발이 있었다. 그러나 종양 크기에 따른 다발성 병소, 피막 침범, 림프절 전이, 재발 등의 유의한 차이는 없었다(Table 1).

TNM 병기 I 군과 AMES 저위험군에서도 다발성 병소가 각각 12예(29.3%)와 17예(30.9%)가 있었고, 피막침범은 21예(51.2%)와 27예(49.1%)에서, 림프절 전이는 24예(58.5%)와 32예(58.2%)에서, 재발은 2예(4.9%)와 3예(5.5%)에서 관찰되었으며, TNM 병기 III 및 AMES 고위험군인 경우 다발성 병소가 50.0%, 58.3%에서 관찰되었고, 피막침범은 80.6%, 95.8%에서, 림프절 전이는 86.1%, 95.8%에서 관찰되었으나 재발된 경우는 없었다. TNM 병기 III와 AMES 고위험군에서 다발성 병소, 피막침범, 림프절 전이가 다소 많았으나 유의한 차이가 아니었다. 재발되었던 3예 중 2예는 TNM 병기 I 이었고, 3예 모두 AMES 저위험군에 속하였다(Table 1).

2. 미세혈관밀도로 나타낸 종양혈관형성도

1) 임상양상에 따른 미세혈관밀도

전체 갑상선 유두상 암종에서 미세혈관밀도는 최소 10에서 최대 86개의 미세혈관수를 보였고(Fig. 1A) 평균값은 39.7±16.9, 중앙값은 36.3이었다. 갑상선 유두상 암종 환자의 나이가 45세 미만에서는 미세혈관밀도가 35.7±15.3 이었고 45세 이상에서는 43.6±17.7로 높게 나타나 통계학적으로 유의한 차이를 보였다(p=0.0354). 여성에서는 38.3±16.3이었고 남성에서는 51.9±18.2로 여성에 비해 유의하게 높았다(p=0.0296). 종양의 크기가 1cm 이하인 군에서는 42.3±17.8, 1.1~4.0cm 군에서는 40.1±17.2, 4cm 이상군에서는 31.2±10.9로 오히려 크기가 작은 군에서 높은 미세혈관밀도를 보였으나 통계학적으로 유의한 차이는 없었다(p=0.3481). 갑상선 유두상 암종이 갑상선내 다발성으로 발생한 군의 미세혈관밀도는 46.6±16.6으로 단발성인 경우의 35.2±15.7에 비해 유의하게 높았다(p=0.0028). 재발이 없었던 군은 40.1±17.0으로 재발이 있는 군의 30.1±9.7에 비해 오히려 높게 나타났으나 통계학적으로 유의한 차이는 없었다(Table 2).

2) 피막침범과 림프절 전이에 따른 미세혈관밀도

갑상선 유두상 암종이 피막을 침범하여 주위조직으로 침

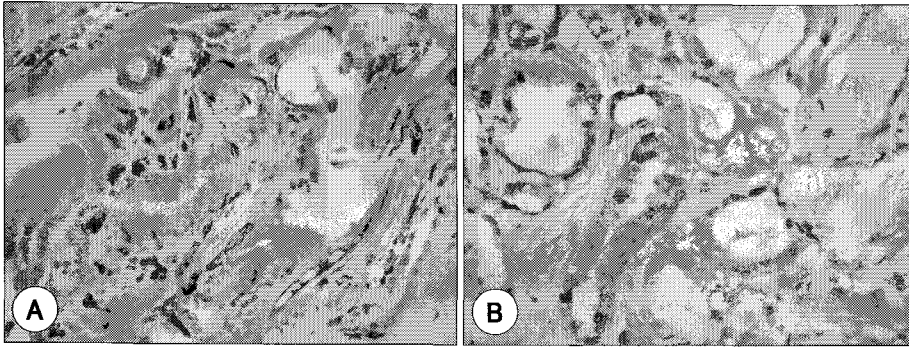


Fig. 1. Immunohistochemical staining for CD34 and VEGF in papillary carcinoma of the thyroid gland. Increased microvessels are noted as brown color in supporting stroma of papillary thyroid carcinoma (A, $\times 400$). The papillary carcinoma tissue reveals strong positive reaction for VEGF in invasive focus (B, $\times 400$).

운한 군의 미세혈관밀도는 45.2 ± 17.6 이었으며, 갑상선내에 국한된 군은 30.1 ± 10.2 로 피막을 침범한 경우 통계학적으로 높은 미세혈관밀도를 보였다($p=0.0001$). 국소 림프절 전이가 있는 경우의 미세혈관밀도는 43.6 ± 17.8 이었으며, 전이가 없는 경우 30.8 ± 10.4 로 림프절 전이가 있는 경우 통계학적으로 유의하게 높은 미세혈관밀도를 나타내었다($p=0.0001$) (Table 2).

3) 병기에 따른 미세혈관밀도

TNM 병기 I, II, III인 경우의 미세혈관밀도는 34.6 ± 12.9 , 21.8 ± 9.2 , 46.5 ± 18.4 로서 병기 II인 2예를 제외하고 병기 III군과 I군을 비교하면 병기 III인 경우 통계학적으로 유의하게 미세혈관밀도가 높았다($p=0.0022$). DeGroot 병기에 따른 미세혈관밀도의 평균은 병기 1군은 38.2 ± 8.2 , 병기 2군은 32.4 ± 12.2 , 병기 3군은 45.2 ± 17.6 으로 병기 3군에서 현저히 높은 미세혈관밀도를 보였다($p=0.0163$). AMES 체계에 따른 저위험군에서는 미세혈관밀도가 34.9 ± 14.5 이었고, 고위험군에서는 50.7 ± 17.1 로 높게 나타나 고위험군에서 미세혈관밀도가 유의하게 높았다($p=0.0001$) (Table 2).

3. 혈관내피성장인자(VEGF) 발현

1) 임상양상에 따른 VEGF 발현

총 79예 모두에서 VEGF가 발현되었고, 1+는 36예(45.6%), 2+는 43예(54.5%)였다(Fig. 1B). 갑상선 유두상 암종 환자의 나이가 45세 미만인 경우 1+발현은 20예(51.3%), 2+발현은 19예(48.7%)이었고, 45세 이상에서는 1+발현은 16예(40.0%), 2+발현은 24예(60.0%)로 연령에 따른 VEGF 발현 정도의 뚜렷한 차이는 없었다. 여성에서 VEGF 발현은 1+가 33예(46.5%), 2+는 38예(53.5%)이었고, 남성에서 1+는 3예(37.5%)이었고 2+는 5예(62.5%)로서 성별에 따른 VEGF 발현의 차이는 없었다. 종양의 크기가 1cm 이하인 군에서 1+발현은 6예(42.9%), 2+발현은 8예(57.1%), 1.1~4.0cm 군에서 1+발현은 26예(44.8%), 2+발현은 32예(55.2%), 4.0cm 이상인 경우 1+발현은 4예(57.1%), 2+발현은 3예(42.9%)

로, 종양의 크기에 따른 VEGF 2+발현율의 통계학적으로 유의한 차이는 아니지만 크기가 작을수록 2+발현이 오히려 많았다.

갑상선 유두상 암종이 갑상선내 다발성으로 발생한 경우 1+발현은 12예(38.7%), 2+발현은 19예(61.3%)였고, 단발성인 군에서 1+발현과 2+발현은 각각 24예(50.0%)로서 다발성 유무에 따른 VEGF 발현의 뚜렷한 차이가 없었다. 재발이 없었던 경우 1+발현은 35예(46.1%), 2+발현은 41예(53.9%)였고, 재발이 있는 군에서 1+발현은 1예(33.3%), 2+발현은 2예(66.7%)로 재발 유무에 따른 VEGF 발현의 차이가 없었다(Table 3).

2) 피막침윤과 림프절 전이에 따른 VEGF 발현

갑상선 유두상 암종이 피막을 침범하여 주위조직으로 침윤한 경우 1+발현이 15예(30.0%), 2+발현은 35예(70.0%)였고, 갑상선내에 국한된 군에서 1+발현은 21예(72.4%), 2+발현은 8예(27.6%)로 피막을 침범한 경우 VEGF 발현 2+인 빈도가 유의하게 높았다($p=0.0006$). 국소 림프절 전이가 있는 경우 1+발현은 18예(32.7%), 2+발현은 37예(67.3%)인 반면 전이가 없는 경우 1+발현은 18예(75.0%), 2+발현은 6예(25.0%)로서 림프절 전이가 있는 경우 VEGF 2+발현은 높았으며, 통계학적으로 유의한 차이를 보였다($p=0.0013$) (Table 3).

3) 병기에 따른 VEGF 발현

TNM 병기 I군에서 1+발현은 23예(56.1%)이며 2+발현은 18예(43.9%)였고, 병기 II군 2예는 1+발현을 보였다. 병기 III군에서 1+발현은 11예(30.6%), 2+발현은 25예(69.4%)로, 병기 I군과 II군에 비해 병기 III군에서 VEGF 2+발현율이 높았으며 통계학적 유의성을 보였다($p=0.0236$). DeGroot 병기에 따라서 병기 1군에서 1+발현은 14예(87.5%), 2+발현은 2예(12.5%)였고, 병기 2군의 1+발현은 7예(53.9%), 2+발현은 6예(46.2%)였고, 병기 3군의 1+발현은 15예(30.0%), 2+발현은 35예(70.0%)로서 병기가 높을수록 VEGF 2+발현율이 높았으며, 통계학적 유의성이 있었다($p=0.0003$). AMES 체계에

Table 3. Correlation between expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and clinicopathologic parameters in papillary thyroid carcinomas

Parameters	No. of cases	*VEGF		p value	
		1	2		
Age (years)	<45	39	20 (51.3%)	19 (48.7%)	p>0.05
	≥45	40	16 (40.0%)	24 (60.0%)	
Sex	Woman	71	33 (46.5%)	38 (53.5%)	p>0.05
	Man	8	3 (37.5%)	5 (62.5%)	
Size (cm)	≤1.0	14	6 (42.9%)	8 (57.1%)	p>0.05
	1.1-4.0	58	26 (44.8%)	32 (55.2%)	
	>4.0	7	4 (57.1%)	3 (42.9%)	
Multiplicity	Negative	48	24 (50.0%)	24 (50.0%)	p>0.05
	Positive	31	12 (38.7%)	19 (61.3%)	
Capsular invasion	Negative	29	21 (72.4%)	8 (27.6%)	p=0.0006
	Positive	50	15 (30.0%)	35 (70.0%)	
Lymph node metastasis	Negative	24	18 (75.0%)	6 (25.0%)	p=0.0013
	Positive	55	18 (32.7%)	37 (67.3%)	
TNM stage	Stage I	41	23 (56.1%)	18 (43.9%)	†p=0.0236
	Stage II	2	2 (100%)	0 (0.0%)	
	Stage III	36	11 (30.6%)	25 (69.4%)	
DeGroot stage	Stage I	16	14 (87.5%)	2 (12.5%)	†p=0.0003
	Stage II	13	7 (53.9%)	6 (46.1%)	
	Stage III	50	15 (30.0%)	35 (70.0%)	
AMES scale	Low risk	55	30 (55.5%)	25 (45.5%)	p=0.0293
	High risk	24	6 (25.0%)	18 (75.0%)	
Recurrence	Negative	76	35 (46.1%)	41 (53.9%)	p>0.05
	Positive	3	1 (33.3%)	2 (66.7%)	
Total		79	30	43	

* : VEGF ; vascular endothelial growth factor
 † : Result of comparison by chi-square test between stage III and stage I
 ‡ : Result of comparison by chi-square test between stage III and stage I

Table 4. Relationship between microvessel density and VEGF expression

		*MVD	p value
†VEGF	1	32.9±13.9	P=0.0008
	2	45.4±17.2	

* : MVD ; microvessel density
 † : VEGF ; vascular endothelial growth factor

서 저위험군의 1+발현은 30예 (54.6%), 2+발현은 25예 (45.5%)였고, 고위험군의 1+발현은 6예 (25.0%), 2+발현은 18예 (75.0%)로 고위험군에서 통계학적으로 유의하게 높은 VEGF 2+발현율을 보였다 (p=0.0293) (Table 3).

4. 미세혈관밀도와 VEGF 발현의 연관성

VEGF 발현이 1+인 군에서 미세혈관밀도는 32.9±13.9이며 2+ 군에서는 45.4±17.2로 통계적으로도 유의한 차이를 보여 VEGF가 강하고 미만성으로 발현된 경우 미세혈관밀도가 높게 나타났다 (p=0.0008) (Table 4). 즉 VEGF 발현과 미세혈관밀도는 밀접한 상관관계를 보였다 (r=0.4616, p=0.0001).

고 찰

유두상 암종은 갑상선의 악성 종양 중 가장 많은 빈도를 차지하며 대부분 성장이 느리고 예후가 좋은 것으로 알려져 있다. 임상병기가 높거나 고위험군에서 수술 후 재발, 사망 등의 위험성을 보일 수 있으나 병기가 낮으며 저위험군인데도 불구하고 상당수에서 병소가 다발성으로 갑상선내 전파되거나, 피막을 침범하여 주위 조직으로 침윤되기도 하고, 림프절 전이, 국소재발 및 원격전이가 되는 경우가 있다. 본 연구에서 TNM 병기 I 군과 AMES 저위험군에서 다발성 병소가 각각 29.3%와 30.9%에서 보였고, 피막침범은 51.2%와 49.1%에서 나타났으며, 림프절 전이는 58.5%와 58.2%였다. 또한 재발된 3예는 병기가 낮거나 저위험군이어서 갑상선 유두상 암종 환자를 치료하는데 도움이 되는 기존의 예후인자와 더불어 이를 보완할 수 있는 예후인자가 필요하다.

최근 종양유전자 분석을 통해 갑상선 유두상 암종의 예후를 추정하려는 연구가 보고 되고 있다¹¹⁾. p21의 과발현이 갑상선 유두상 암종 환자의 생존과 밀접한 관계가 있다고 보고도 있고¹²⁾, p53과 bcl-2 단백질의 과발현이 갑상선암종 환자의 예후와 연관성이 없다는 등 여러 연구 결과가 밝혀져 있으나, 아직까지 독립된 예후인자를 제시하지 못하고 있다⁶⁾⁹⁾¹³⁾.

종양 내 신생혈관 형성은 악성 종양의 성장 및 전이에 있어 필수요건으로 알려지고 있다²⁻⁴⁾. 종양의 크기가 1~2mm까지는 혈관이 없어도 자랄 수 있으나 그 이상의 크기로 성장하기 위해서는 필요한 영양분과 산소 공급 및 노폐물의 제거를 위해 신생혈관이 필요하다³⁾⁴⁾. 신생혈관형성은 첫째, 단백질효소에 의한 기저막이 분해되고 둘째, 내피세포의 이동과 증식이 있는 후 셋째, 관구조를 형성하는 단계를 거쳐 이루어진다⁴⁾. 전이된 종양에서도 동일한 기전으로 신생혈관 형성이 동반된다¹⁴⁾. 따라서 종양의 신생혈관 형성 정도가 암종의 성장, 주위로의 침윤, 전이 등을 예측할 수 있는 생물학적 지표로써 사용될 수 있을 것으로 추정되며, 악성흑색종, 유방암, 자궁경부암, 대장암, 직장암, 전립선암, 방광암, 두경부암, 폐암, 연부조직종양, 위암 등에서 신생혈관 형성도와 예후와 상관성이 있다고 보고 되었다⁵⁾¹⁴⁾.

현재까지 갑상선 암종에서 신생혈관 형성도와 예후와의 연관성에 대한 연구는 다양한 결과를 보이고 있다⁹⁾¹³⁾¹⁵⁾¹⁶⁾. Fontanini 등¹⁷⁾은 여러 갑상선 암종의 예후와 신생혈관 형성도의 상관관계를 연구한 결과 수질상 암종에서는 유의성이 있었으나 갑상선 유두상 암종, 갑상선 여포성 암종, 갑상선 미분화 암종에서는 유의성이 없었다고 하였다. 류 등¹³⁾도 갑상선 유두상 암종 환자의 예후와 신생혈관 형성도의

상관성을 찾지 못하였고, Akslen 등¹⁵⁾은 오히려 신생혈관 형성 정도가 종양의 크기, 나이, 등급 및 사망률과도 반비례의 결과를 보였다고 하였다. 하지만 박 등⁹⁾은 갑상선 유두상 암종의 사망군에서 유의한 차이는 아니지만 중앙혈관 형성도가 높았다고 하였고, 병기가 높을수록, 고위험군일수록 높은 수치를 보였으며, 재발이 있는 군에서 높은 수치를 보여 신생혈관 형성도가 갑상선 유두상 암종의 진행과 관련성이 있을 것으로 보고하였다.

본 연구에서는 다발성 병소가 있는 경우 현저히 높은 미세혈관밀도를 보여 갑상선 유두상 암종의 갑상선 내 전과 과정이 신생혈관 형성 증가와 밀접한 관련성이 있음을 추정할 수 있었다. 1cm 이하의 잠재유두암종에서 4.0cm 이상인 경우에 비해 오히려 높은 수치를 보여 갑상선 유두상 암종 초기 단계에서 신생혈관 형성이 활발한 것으로 생각되었으나 통계학적 의의는 없었다. 미세혈관밀도는 피막을 침범하며 주위 조직으로 침윤하였거나 림프절 전이가 있는 경우 그렇지 않은 경우에 비해 현저히 증가하여 갑상선 유두상 암종의 침윤성 성장 및 전이 과정에 중요한 인자임을 나타내었다. TNM 병기 III, DeGroot 병기 3기, AMES 체계에 따른 고위험군에서 그렇지 않은 군에 비해 미세혈관 밀도가 증가한 경우가 유의하게 많으므로 갑상선 유두상 암종 조직에서 미세혈관밀도를 평가하는 것이 예후인자로서의 의의가 있다고 생각되었다. 그러나 재발된 경우는 3예로 적고, 원격전이 되었거나 암으로 인한 사망한 경우가 포함되지 않아 예후인자로서의 의의를 정확하게 판단할 수 없었다. 박 등⁹⁾은 원격전이가 있는 병기 4에서 미세혈관밀도가 높으므로 갑상선 유두상 암종의 원격전이를 예측할 수 있는 새로운 위험인자일 것이라고 제시하였다.

중앙혈관형성은 여러 가지 성장인자들에 의해 유발되며 이중 혈관내피성장인자(VEGF)가 대표적이다. VEGF는 일차적으로 혈관내피세포에 작용하여 미세혈관의 증식과 혈관 투과성을 변화시킴으로 신생혈관형성을 돕는다⁶⁾. VEGF 발현은 유방암, 폐암, 위암 등에서 예후와 관련성이 있다고 보고 되었고⁷⁾, Maeda 등¹⁸⁾은 위암에서 림프절 전이나 원격 전이가 있을 때 VEGF 발현이 높으며 위암의 독립적인 예후인자로서 가치가 있다고 보고하였다. 한편, Takahashi 등¹⁹⁾은 대장암에서 원격전이가 있을 때 VEGF 발현율이 높았지만 대장암의 병기와는 관련이 없었다고 하였으며, Eisma 등²⁰⁾도 두경부 편평상피암에서 종양의 분화도와 관련성이 있으나 병기와는 관련성이 없었다고 하였다.

Soh 등²¹⁾은 세포배양 실험에서 갑상선암 세포주에서 정상 세포주보다 VEGF가 높게 발현된다고 보고하였고, 류 등¹³⁾도 선종보다 갑상선 암종에서 VEGF 발현율이 높았다고 하였다. 또한 미분화 갑상선 암종에서 VEGF 발현율이 높아 분화가 나쁠수록 암의 성장이 빨라 조직 내 저산소증

이 잘 발생되어 이로 인해 VEGF가 분비되어 신생혈관 형성이 유발된다고 추정하였다¹³⁾. 하지만 유두상 암종과는 연관성이 없었고, 갑상선 암종의 주위 조직 침윤과 림프절 전이 유무와의 연관성도 없다고 하였다¹³⁾. Klein 등²²⁾은 갑상선 암종에서 전이가 있을 경우 VEGF가 더 많이 발현되어 전이 가능성을 시사하는 표지자로 유용하다고 하였으며, Lennard 등¹⁶⁾은 갑상선 유두상 암종에서 VEGF가 미만성으로 강한 발현을 보이면 원격전이와 재발과 관련성이 있다고 보고하였다.

본 연구에서 VEGF 2+발현과 미세혈관밀도 증가가 유의한 상관관계를 보였으며, 신생혈관 형성에 VEGF가 관여할 것임을 시사하였다. 1cm 이하의 잠재유두암종에서 통계학적으로 유의한 차이는 아니었으나 4.0cm 이상인 경우에 비해 VEGF 발현은 오히려 강하고 미만성으로 관찰되어 미세혈관밀도 증가와 마찬가지로 VEGF 발현이 갑상선 유두상 암종의 초기 성장 단계에 관여하는 것으로 추정되었다. 또한 VEGF 2+발현율이 피막을 침범하며 주위 조직으로 침윤하거나 림프절 전이가 있는 경우 유의하게 높으므로 VEGF 발현이 갑상선 유두상 암종의 진행에 관여할 것으로 생각되었고, TNM 병기 III, DeGroot 병기 3기, AMES 체계에 따른 고위험군에서 그렇지 않은 경우에 비해 현저히 높은 VEGF 2+발현율을 보여 VEGF 2+발현이 갑상선 유두상 암종 환자에서 예후인자로서 가능성이 있음을 제시하였다. 그러나 중앙조직 내 미세혈관밀도 증가 혹은 VEGF 발현은 수술 후 알 수 있는 인자이므로 수술 전 수술 범위 결정에 도움이 되지 못하며, 수술 전에 고위험인자 혹은 예후를 판정할 수 있는 인자를 규명하기 위한 연구가 필요할 것이다.

결론

갑상선 유두상 암종 79예에서 면역조직화학염색법을 이용하여 미세혈관밀도와 혈관내피성장인자의 발현을 조사하여 분석하였다.

미세혈관밀도는 환자의 연령, 성별, 다발성 유무, 피막침범 유무, 림프절전이 유무, TNM 병기, DeGroot 병기, 및 AMES 위험군 여부에 따라 차이가 유의성을 보였다. 즉 45세 이상인 군, 남성, 다발성 병소군, 피막 침범군, 림프절 전이군, TNM 병기 III, DeGroot 병기 3기, 및 AMES 고위험군에서 높은 미세혈관밀도를 나타내었다.

혈관내피성장인자의 발현은 피막 침범군, 림프절 전이군, TNM 병기 III, DeGroot 병기 3기, 그리고 AMES 고위험군에서 높은 빈도를 보여, 대조군과 통계학적으로 유의한 차이를 보였다. 또한 혈관내피성장인자가 과발현된 경우에 미세혈관밀도가 높았다.

갑상선 유두상 암종에서 중앙혈관형성에 혈관내피성장인자가 관여하는 것으로 보이며, 신생혈관형성도와 혈관내피성장인자의 발현은 각각 종양의 피막침범, 림프절전이, TNM 병기 III, DeGroot 병기 3기 및 AMES 고위험군과 유의한 연관성을 보인다. 결론적으로 유방암, 폐암, 위암 등에서도 같이 신생혈관형성도 및 혈관내피성장인자가 갑상선 유두상 암종에서도 예후인자로서의 개연성이 충분해 보이며, 차후에 재발, 원격전이 등의 예를 확인한 연구를 통하여 예후와의 직접적인 분석 및 고찰이 필요하리라 생각된다.

중심 단어 : 갑상선 유두상 암종 · 신생혈관생성 · 혈관내피성장인자.

References

- 1) Folkman J: *Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. Nat Med.* 1995;1:27-31
- 2) Folkman J, Shing Y: *Angiogenesis. J Biol Chem.* 1992;267:10931-10934
- 3) Folkman J, Klagsburn M: *Angiogenic factors. Science.* 1987;235:442-447
- 4) Cotran RS, Kumar V, Collins T: *Robbins pathologic basis of disease. 6th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1999:301-302*
- 5) Bremer GL, Tiebosch AT, van der Putten HW, Schouten HJ, de Haan J, Arends JW: *Tumor angiogenesis: an independent prognostic parameter in cervical cancer. Am J Obstet Gynecol.* 1996;174:126-131
- 6) Shibuya M: *Role of VEGF-flt receptor system in normal and tumor angiogenesis. Adv Cancer Res.* 1995;67:281-316
- 7) Jeong SJ, Park SJ, Cha SJ, et al: *VEGF expression and MVD in ductal carcinoma of breast. J Korean Cancer Assoc.* 1999;31:1168-1678
- 8) Cady B, Rossi R: *An expanded view of risk-group definition in differentiated thyroid carcinoma. Surgery.* 1988;104:947-953
- 9) Park CS, Chung WY, Suh JH, Kim HG: *An immunohistochemical study of tumor angiogenesis and EMA reactivity in papillary thyroid carcinoma. J Korean Cancer Assoc.* 1997;29:454-465
- 10) Jeon MY, Sol MY, Park KS, Yoon HK: *Microvessel density and vascular endothelial growth factor expression in invasive breast carcinomas. Korean J Pathol.* 2000;34:138-144
- 11) Cohn K, Backdahl M, Forsslund G, Auer G, Lundell G, Lowhagen T: *Prognostic value of nuclear DNA content in papillary thyroid carcinoma. World J Surg.* 1984;8:474-480
- 12) Basolo F, Pinchera, Fugazzola L, et al: *Expression of p21 ras protein as a prognostic factor in papillary thyroid cancer. Eur J Cancer.* 1994;30:171-174
- 13) Ryu KS, Sol MY, Yim HE, Kim MW: *Correlations of the aggressiveness of thyroid cancer with microvessel density, expression of vascular endothelial growth factor and its receptors. J Korean Surg Soc.* 2000;58:205-212
- 14) Bosari S, Lee AK, Delellis RA, Wiley BD, Heatler GJ, Silveanu ML: *Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma. Hum Pathol* 1992;23:755-761
- 15) Akslen LA, Livolsi VA: *Increased angiogenesis in papillary carcinoma but lack of prognostic importance. Hum Pathol.* 2000;31:439-442
- 16) Lennard CM, Patel A, Wilson J, 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;129:552-558
- 17) Fontanini G, Vignati S, Pacini F, Pollina L, Basolo F: *Microvessel count: an indicator of poor outcome in medullary thyroid carcinoma but not in other types of thyroid carcinoma. Mod Pathol.* 1996;9:636-641
- 18) Maeda K, Chung YS, Ogawa Y, et al: *Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma. Cancer* 1996;77:858-863
- 19) Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, Cleary KR, Ellis LM: *Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. Cancer Res.* 1995;55:3964-3968
- 20) Eisma RJ, Spiro JD, Kreutzer DL: *Vascular endothelial growth factor expression in head and neck squamous cell carcinoma. Am J Surg.* 1997;174:513-517
- 21) Soh EY, Sobhi SA, Wong MG, et al: *Thyroid-stimulating hormone promotes the secretion of vascular endothelial growth factor in thyroid cancer cell lines. Surgery.* 1996;120:944-947
- 22) Klein M, Picard E, Vignaud JM, et al: *Vascular endothelial growth factor gene and protein: strong expression in thyroiditis and thyroid carcinoma. J Endocrinol.* 1999;161:41-49