

타액선 종양에서 혈관내피성장인자와 von Willebrand 인자 유전자 발현에 관한 연구

정지훈 · 김지혁 · 박영욱

강릉대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Abstract

EXPRESSION OF THE GENES OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR AND VON WILLEBRAND FACTOR IN SALIVARY GLAND TUMORS

Ji-Hun Chung, Ji-Hyuk Kim, Young-Wook Park

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Kangnung National University

Mucoepidermoid carcinoma (MEC) is the most common malignant salivary gland tumor which compromises about 6~8% of all tumors followed by the adenoid cystic carcinoma (ACC) and adenocarcinoma. Most deaths from salivary carcinomas are caused by recurrent or metastatic lesions that are resistant to conventional therapy. Therefore, knowledge of cellular properties and tumor-host interactions that influence the vascular metastasis is important for the design of more effective therapy of salivary carcinomas.

Neoangiogenesis is essential for tumor growth, which is postulated to be fundamentally dependent on the induction of stromal neovascularization. However, how neovascularization takes place in live tissue has not been fully established, especially in recruitment and differentiation of endothelial cells in the salivary gland tumors. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a heparin-binding, dimeric polypeptide growth factor known to exert its mitogenic activity specifically on endothelial cells. VEGF has been shown to be directly involved in angiogenesis, which is essential for the pathogenesis of many solid tumors. von Willebrand factor (vWF) is a large multimeric protein synthesized by megakaryocytes and endothelial cells that enable platelets to adhere to exposed subendothelium and, as well, to respond to changes in the blood flow. Recent studies suggest that increased levels of vWF correlate with progression of disease, metastasis, or survival time and thus may have a prognostic significance. vWF is explained as an acute phase proteins which is increased in cancer or as a result of increased endothelial cell synthesis associated with tumor-induced angiogenesis. Due to adhesive properties of vWF, its increased concentrations may also contribute metastasis of tumor.

In this study, we determined the mRNA expression of VEGF and vWF in salivary ACC, MEC and pleomorphic adenoma by *in situ* hybridization. As a result, stronger expression of VEGF and vWF was seen in salivary ACC and MEC which has more invasive nature than the salivary benign tumor.

Key words: Salivary gland tumors, Vascular endothelial growth factor, von Willebrand factor, *In situ* hybridization

I. 서 론

선양낭성암종 (adenoid cystic carcinoma, ACC)은 비교적 드물게 발생하며, 느리게 성장하는 상피성 타액선 종양으로 전체 타액선 종양의 5%-10% 정도를 차지하며, 구강악안면영역의 악성 종양 중에서 2%-4%의 빈도를 차지한다¹⁾. 선양낭성암종은 높은 재발율을 보이고, 발생 초기에 말초신경이나 혈관을 통한 강한 침습성을 보인다. 신경주위의 침윤 (perineural invasion)이 특징적으로 관찰되어 전체 증례 중 60%정도에서 보고되었다²⁾. 임상적으로 경부 임파절로의 전이는 드물게 나타나 8-13%에서 보고되는 반면 폐와 골조직으로의 원격 전이는 50%까지 빈발하는 것으로 알려져 있다³⁾. 주로 50대 후반에 호발하며, 이하선, 악하선에서 가장 흔한 발병을 나타내고, 구강내의 구개부, 구강저의 소타액선에서도 발생한다⁴⁾. 조직학적으로 선양낭성암종은 사상형 (cribriform), 관형 (tubular), 충실형 (solid)의 3가지 성장 양식을 보이며¹⁾ 수술과 방사선 치료로 비교적 양호한 5년 생존율을 보이나 신경조직 침투와 특히 폐조직으로의 원격 전이로 인하여 증례에 따라서는 그 치료에 대한 예후가 성공적이지 못하여,⁵⁾ 초기 치료 후 10-15년 내에 약 40%이상의 재발률이 보고되기도 하였다⁴⁾.

점액표피암종 (mucoepidermoid carcinoma, MEC)은 두경부에 발생하는 악성종양 중 3-4%를 차지하며,⁶⁾ 전체 타액선에 발생하는 악성 종양 중에서 42-47.9%로 가장 호발하고, 남성보다 여성에서 빈발하는 경향을 보인다^{7,8)}. 조직학적으로 점액세포와 표피세포로 이루어져 있으며 낭강 형성과 고형성 종물의 성장정도, 종양세포의 비율, 세포학적 형태학적 분화 유무 등에 따라 악성도는 low, intermediate, high grade로 분류되어, 악성도가 높을수록 원격전이 경향이 강하고 예후도 불량하다⁹⁾. 원격전이를 보이는 경우 선양낭성암종과 더불어 괴사성 (necrotic), 역형성 (anaplasia), 신경주위 침윤, 혈관주위 침윤 등의 조직병리학적 소견이 관찰된다¹⁰⁾. 외과적 수술 방법 중 보존적인 치료에서 약 40%의 재발율을 나타내고, 근치적인 치료 (radical treatment)에서도 약 13%의 재발율을 나타낸다^{11,12)}.

종양의 성장은 새로운 혈관의 형성을 필요로 하며, 이 혈관형성 (angiogenesis) 과정 역시 전이와 같은 악성종양의 표현형을 유지하는데 필수 요소이다. 최소한 20여 인자가 악성종양의 신생 혈관형성 과정을 조절하는 것으로 알려져 있다. 구강 편평상피세포암 환자에서 종양의 진전과 VEGF와 VEGFR의 발현정도는 상관관계가 있는 것으로 보고되고 있으나, 타액선 암종에 대해서는 축적된 연구결과가 많지 않다^{5,13,14)}. 선양낭성암종의 원격전이 기전은 아직 명확히 밝혀지지 않았으나 혈관형성을 통한 전이가 중요한 작용을 한다고 생각된다.

헤파린 결합성 이량체 펩티드 (heparin-binding dimeric

polypeptide)인 혈관내피성장인자 (vascular endothelial growth factor, VEGF)는 내피세포 상에 특이적으로 분열 촉진 활동을 하는 것으로 알려져 있으며, 종양관련 혈관내피세포 (tumor-associated endothelial cell)에 대한 유사 분열인자 (mitogen)이다. VEGF는 종양의 발병기전에 있어서 필수적인 요소이며, 혈관형성에 직접적으로 관여하고, 종양 내부의 미세혈관 밀도와 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 또한 면역조직화학적 연구 결과 VEGF의 발현정도는 선양낭성암종에 있어서 치료 후 예후와 생존율과 연관이 있는 것으로 보고되었다¹⁵⁻¹⁸⁾.

von Willebrand factor (vWF)는 거대핵세포 (megakaryocyte)와 내피세포에서 합성되는 거대 단백질 중합체로써 혈전이 형성되는 부위에 혈소판이 침착되는 것을 촉진하며, 혈장내에서 혈액응고 전구물질로 작용하는 보조효소인 VIII 응고인자를 운반하는 역할을 한다¹⁹⁾. 종양의 혈관성 전이에 있어서 혈소판은 종양세포에 부착하여 다양한 면역 반응으로부터 보호막 역할을 하고, 종양 세포가 백혈구나 내피세포에 부착하는 것을 용이하게 하며, vWF는 혈소판과 내피세포를 연결하는 매개체 역할을 한다²⁰⁾. 최근 연구에 따르면 vWF 항체의 농도 증가는 병소의 진행 및 전이와 연관이 있으며, 환자의 생존 기간에도 영향을 주어 예후를 예측하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다²¹⁾. 그리고 악성 종양에 있어서 급성 상태의 단백질의 증가양상을 반영하며, 종물에 의해 유도되는 혈관형성과 연관되어 내피세포의 합성의 증가를 반영하는 지표를 나타낸다²²⁾. 또한 vWF는 다른 세포에 대한 부착성이 강하므로 vWF의 농도 증가는 종양의 원격전이와 연관이 있을 것으로 여겨진다²³⁾.

위와 같은 배경에서 본 연구진은 혈관성 전이율이 높고 술 후 장기생존율이 낮은 타액선 악성종양에서도 VEGF와 vWF가 혈관성 전이 과정에서 중요한 역할을 할 것이라는 가설을 설정하고 이를 유전자 수준에서 검증하고자 한다. 즉 타액선 선양낭성암종과 점액표피암종에서 VEGF와 vWF의 mRNA 발현정도를 제자리부합법 (*in situ* hybridization)으로 검색하여 타액선 양성종양인 다형성선종에서의 발현정도와 비교, 분석하고자 한다.

II. 연구재료 및 연구방법

1. 타액선 종양 증례 수집 및 절편제작

강릉대학교 치과병원 구강악안면외과에 내원한 환자중 신전한 상태의 다형성선종, 선양낭성암종, 점액표피암종을 채취한 후 조직을 두께 2mm 정도로 얇게 자르고 조직 크기의 50배 이상의 고정액을 넣은 용기에 담고, 이것을 shaker에서 4-6시간 가볍게 흔들어 줌으로써 고정액이 조직 내로

용이하게 침투할 수 있도록 하였다. 고정된 조직의 세척 및 탈수 과정에서 잔존된 RNase가 활성화되어 RNA가 심하게 분해될 수 있으므로 DEPC (diethylpyrocarbonate, Sigma, D-5758, ST. Louis, MO, U.S.A)으로 처리된 물을 사용하고, 각각의 조직을 별도의 용기를 사용하여 세척한 후 파라핀에 포매하였다. 이 표본으로부터 조직학적 슬라이드를 제작하여 먼저 Hematoxyline & Eosin (H&E) 염색을 통하여 종물의 조직학적 소견을 전반적으로 검색하였으며, 혈관형성인자의 발현의 측정하기 위하여 각각의 샘플에서 4개의 슬라이드에 VEGF의 mRNA에 대한 anti-sense (VEGF-SP6)와 sense (VEFG-T7), 그리고 vWF의 mRNA에 대한 antisense (vWF-SP6)와 sense (vWF-T7)를 제작하여 제자리 부합법에 적용하였다.

2. 제자리부합법 (*In Situ* Hybridization) 기법

1) Template DNA 준비

본 실험에서는 RNA probe를 효과적으로 얻기 위하여 human VEGF cDNA와 vWF cDNA가 들어 있는 pBlueScript plasmid vector를 이용하여 이 두가 고안한 polymerase chain reaction (PCR)로 얻은 DNA를 template DNA로 사용하였다²⁵⁾.

2) PCR에서 얻은 DNA의 사용

Plasmid cDNA의 5' 과 3' flankling RNA promoter (T7, SP6)와 같은 염기서열로 이루어진 primer를 사용하여 denaturation; 94°C, annealing; 60°C, elongation; 72°C, 35 cycles 의 조건에서 PCR을 시행하였다. Primers로는 T7 promoter: GAGG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG, SP6 promoter: GAGG ATT TAG GTG ACA CTA TA (5' 등의 GAGG는 RNA polymerase를 잘 부착시키기 위한 연장 염기서열임)를 사용하였다. PCR을 통하여 얻은 DNA를 1% agarose gel에서 전기영동하여 ethidium bromide의 자외선 형광법으로 확인한 후 (Fig. 1), DNA clean-up kit (Promega, A7107, Madison, WI, U.S.A.)를 사용하여 RNase가 없는 순수한 DNA를 얻어 *In vitro* transcription을 위한 template DNA로 사용하였다.

3) RNA probe의 제작

In vitro transcription reaction mixture를 다음과 같이 준비하였다. 즉 얼음 용기 안에 RNase가 없는 eppendorf tube를 준비하고 RNase free pipet tip을 사용하여 12μl의 DEPC H₂O, 1μl의 template DNA fragment(1μg/μl), 2μl의 10X DIG RNA labeling mixture (10mM ATP, 10mM CTP, 10mM GTP, 6.5mM TTP, 3.5mM

DIG-2-UTP, pH 7.5, 20°C, Roche, 1-277-073, Mannheim, Germany), 2μl의 10X transcription buffer, 1μl의 RNase inhibitor (3U/μl, Fermentas, 6801, Hanover, MD, U.S.A.), 2μl의 RNA polymerase (T7, or SP6, 2U/μl, Fermentas, VT1863, Hanover, MD, U.S.A.)의 반응 혼합액을 만들었다. 37°C 수조에서 2시간 동안 배양시켜 *in vitro* RNA transcription 반응에서 1μg DNA template에서 약 10μg의 DIG labeled RNA probe를 제작하였다. Template DNA는 digoxigenin이 부착되어 있지 않고 RNA probe가 double strand의 template DNA와 반응하지 않으므로 template DNA는 제거하지 않았다. 제작된 DIG labeled RNA probe에 formamide 20μl를 첨가하여 RNA의 분해를 방지하였다.

4) *In situ* Hybridization 및 발색과정

통상적으로 절편의 부착상태의 확보를 위하여 다음과 같이 2일 과정의 *in situ* hybridization을 시행하였다.

(1) 제1일 과정

조직 절편 슬라이드를 xylene에서 10분 동안 3회 탈파라핀화 한후 100%, 95%, 90%, 80%, 70% ethanol에서 각각 5분씩 넣어서 함수시켰다. DEPC-PBS 용액에 5분 동안 넣어 RNase의 활성을 막고, 조직을 함수 및 세척하였다. RNase를 비활성화 시키고 RNA를 포함하는 조직 성분들을 재고정하기 위하여 4% buffered paraformaldehyde 용액으로 약 10분 동안 고정하였다. 조직내 단백질을 분해하기 위해 proteinase K 용액으로 상온에서 20분 동안 배양하고 상온의 0.2 N HCl 용액에서 10분 동안 세척한 후

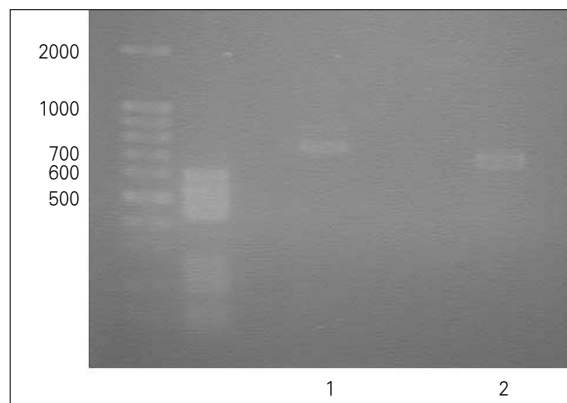


Fig. 1. Electrophoresis of DNA obtained from PCR (polymerase chain reaction) with 1% agarose gel is confirmed by ethidium bromide UV fluorescence method. First and second lane: marker, 1; VEGF cDNA + SP6, T7 promoter primer. 2; vWF cDNA + SP6, T7 promoter primer.

DEPC-PBS 용액에서 5분 동안 중화하였다. 0.1M TEA (triethanolamine, Sigma, T-9534, St. Louis, MO, U.S.A.) 용액에서 10분 동안 적정화한 후 0.1M TEA solution+0.25% acetic acid에서 10분 동안 acetylation 시키고 DEPC-PBS 용액에서 10분 동안 중화하였다. Hybridization solution (HybrisolTMII; Oncore, S4042, Gaithersburg, MD, U.S.A.)을 50℃ 수조에 충분히 녹이고, 조직절편은 깨끗한 종이 타월 위에 놓고 상온에서 건조시켰다. 100 μ l의 hybridization solution에 4 μ l의 DIG labeled RNA probe (2 μ g의 RNA probe)를 섞었다. 조직절편 위에 RNA probe mixture를 놓고 Hybrislip (PGC, 62-6504-04, Frederick, MD, U.S.A.)으로 덮고 55℃ heat plate에서 14-16시간 동안 배양하였다. 조직절편 슬라이드를 습윤통내에서 열판에 놓고 gauze에 물을 묻혀 슬라이드 주위에 충분히 놓은 후 큰 그릇으로 덮어서 밀폐시켜 절편이 건조되지 않도록 하였다.

(2) 제2일 과정

조직 절편을 배양기의 습윤통에서 꺼내어 2 \times SSC-50% formamide 용액을 사용하여 50℃ 수조에서 30분 동안 배양한 후 Hybrislip을 제거하였다. TNE (10mM Tris-HCl pH 8.0, 500mM NaCl, 1mM EDTA) 용액을 이용하여 37℃ 수조에서 10분 동안 배양하고, 20 μ g/ml의 RNase A를 TNE 용액에 첨가한 후 37℃ 수조에 30분 동안 배양하였다. 이후 TNE 용액에 넣어 37℃ 수조에 10분 동안 배양하였다. 다시 조직절편을 2 \times SSC-50% formamide 용액으로 50℃ 수조에서 20분 동안 배양하고 0.2 \times SSC 용액으로 50℃ 수조에서 20분 동안 2회 배양하였다.

슬라이드의 세척 과정이 끝난후 다음과 같이 면역검색 (immunodetection) 과정을 진행하였다. 즉 조직절편을 DIG 1 용액에 넣은 후 37℃ 수조에서 10분 동안 배양하였다. DIG 2 용액에 넣은 후 실온에서 2시간 동안 배양한 후 anti-DIG antibody (1:1000 dilution in DIG 1 solution, Roche, 1-093-274, Mannheim, Germany)로 실온에서 2시간 동안 배양하였다. DIG 1 용액을 30분마다 교환하면서 4회 세척하였다. 조직절편을 9 μ g의 NBT (nitroblue tetrazolium salt, Roche, 1-383-213,

Mannheim, Germany)용액과 7 μ g의 BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, Roche, 1-383-221, Mannheim, Germany) 용액을 섞어 염색용액을 만들고 이것으로 30분간 발색하였다. 발색이 충분한가를 현미경으로 직접 관찰하고 DIG 4 용액으로 10분간 세척하여 발색을 중지시킨 후 glycerol gel로 봉입하였다.

3. 자료의 분석

선양낭성암종과 점액표피암종, 다형성선종의 각 슬라이드에서 VEGF와 vWF의 발현 정도를 병리학자에 의해 -, no staining; \pm , staining or not; +, weak staining; ++, moderate staining; +++, strong staining의 5단계로 나누어 비교, 분석하였다.

III. 연구결과

1. 조직학적 소견

다형성선종, 점액표피낭종, 선양낭성암종의 각 슬라이드에 대하여 H&E 염색이 이루어진 조직 사진은 Fig. 2와 같다. 각각의 타액선 종양에 대하여 4장의 조직 슬라이드를 제자리 부합법을 이용하여 혈관형성인자의 발현을 조사하였으며, H&E 염색이 이루어진 조직 슬라이드와 비교 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 전체 실험은 같은 조직절편으로 2회 반복하였다.

2. 선양낭성암종에서 VEGF와 vWF의 발현

VEGF와 vWF RNA probe를 이용한 *in situ* hybridization에서의 발현 강도는 anti-sense primer로 쓰인 SP6 promoter를 이용하여 실험한 슬라이드에서 VEGF와 vWF의 중등도의 발현을 관찰할 수 있었으며 sense primer로 쓰인 T7 promoter를 이용하여 발색한 슬라이드에서는 VEGF와 vWF의 미약한 발현을 볼 수 있었다 (Fig. 3).

Table 1. Degree of positive reaction in VEGF and vWF expression of each salivary tumors

	VEGF		vWF	
	SP6	T7	SP6	T7
Pleomorphic Adenoma	+	-	+	\pm
Mucoepidermoid Carcinoma	+++	+	++	\pm
Adenoid Cystic Carcinoma	++	\pm	++	\pm

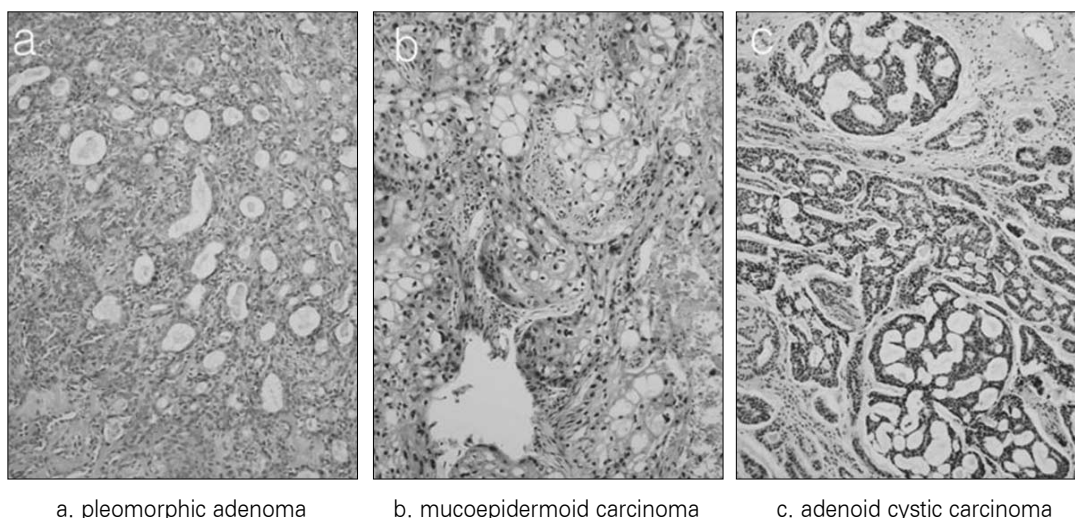


Fig. 2. Histologic features (hematoxyline & Eosin staining, ×200).

3. 점액표피암종에서 VEGF와 vWF의 발현

VEGF와 vWF RNA probe를 이용한 *in situ* hybridization에서의 발현 강도는 (Table 1)과 같다. 선양낭성암종과 유사하게 SP6 promoter에서 mRNA의 강한 발현을 관찰할 수 있었고, vWF보다 VEGF에서 보다 강한 발현 양상이 관찰되었으며 sense primer로 쓰인 T7 promoter를 이용하여 발색한 슬라이드에서는 VEGF와 vWF의 미약한 발현을 볼 수 있었다 (Fig. 4).

4. 다형성선종에서 VEGF와 vWF의 발현

VEGF와 vWF RNA probe를 이용한 *in situ* hybridization에서의 발현 강도는 (Table 1)과 같다. VEGF와 vWF 모두에서 약한 발현이 관찰되었고, sense primer로 쓰인 T7 promoter를 이용하여 발색한 슬라이드에서도 VEGF와 vWF의 미약한 발현만이 확인되었다 (Fig. 5).

5. 각 타액선 암종간의 VEGF와 vWF mRNA의 발현 정도 비교

타액선 악성종양인 점액표피암종과 선양낭성암종에서 모두 VEGF와 vWF의 발현이 확인되었는데, 특히 점액표피암종에서 VEGF의 강한 발현을 관찰할 수 있었고 타액선 양성종양인 다형성선종에서는 악성종양인 점액표피암종과 선양낭성암종에 비교하여 VEGF와 vWF의 발현이 약하게 관찰되었다.

IV. 총괄 및 고찰

종양의 혈관형성은 종양내부와 외부로 혈관망 (vascular network)을 분화시키는 과정으로 이 과정을 통하여 종양은 영양과 산소를 공급받고 대사 산물을 배출하게 된다. 혈관형성을 촉진하는 물질은 종양 주변의 정상조직에 신호를 전달하여 특정 유전자를 활성화 시키고, 신생 혈관을 분화, 성장시킨다. 종물의 크기는 혈관형성과정 없이는 1-2mm를 초과할 수 없으며, 영양소나 가스 교환이 일어날 수 있는 최대 크기도 이정도이다²⁶⁾. Pang 등은 간세포암종에 있어서 항 VEGF 항체와 VEGF 수용체의 길항체를 이용한 *in vitro* 실험 결과 전신적인 화학요법으로는 효과가 없는 간세포암종에 있어서 분자표적치료가 효과가 있음을 보고하였다²⁷⁾. Schmidt 등은 인간의 유방암에 대하여 화학요법시 종양의 전이와 혈관형성에 관여하는 상피성장인자 (epidermal growth factor, EGF)의 분자표적치료가 항 여성호르몬 (anti-estrogen)을 이용한 화학요법과 병행하여 효과가 있으며, 항신생혈관화는 종양의 치료에 있어서 전향적인 치료개념으로써 중요한 의미를 갖는다고 보고하였다²⁸⁾. 또한 Yao 등은 기존의 항암 치료에 효과가 없는 유암종 (carcinoid)과 섬세포암종 (islet-cell carcinoma)에 있어서 VEGF와 mTOR 길항체를 이용한 분자표적치료로 긍정적인 결과를 얻었으며, VEGF 항체는 암종의 성장을 현저하게 억제하였으며, 간전이율을 줄였다고 보고하였다²⁹⁾.

선양낭성암종 및 점액표피암종은 종양의 성장에 관여하는 다양한 혈관형성 인자의 발현에 관한 연구가 미비한 상태이므로 분자표적치료에 대한 근간으로써 혈관형성인자의 발현 양상에 대한 연구는 향후 타액선 악성 종양의 치료에 있

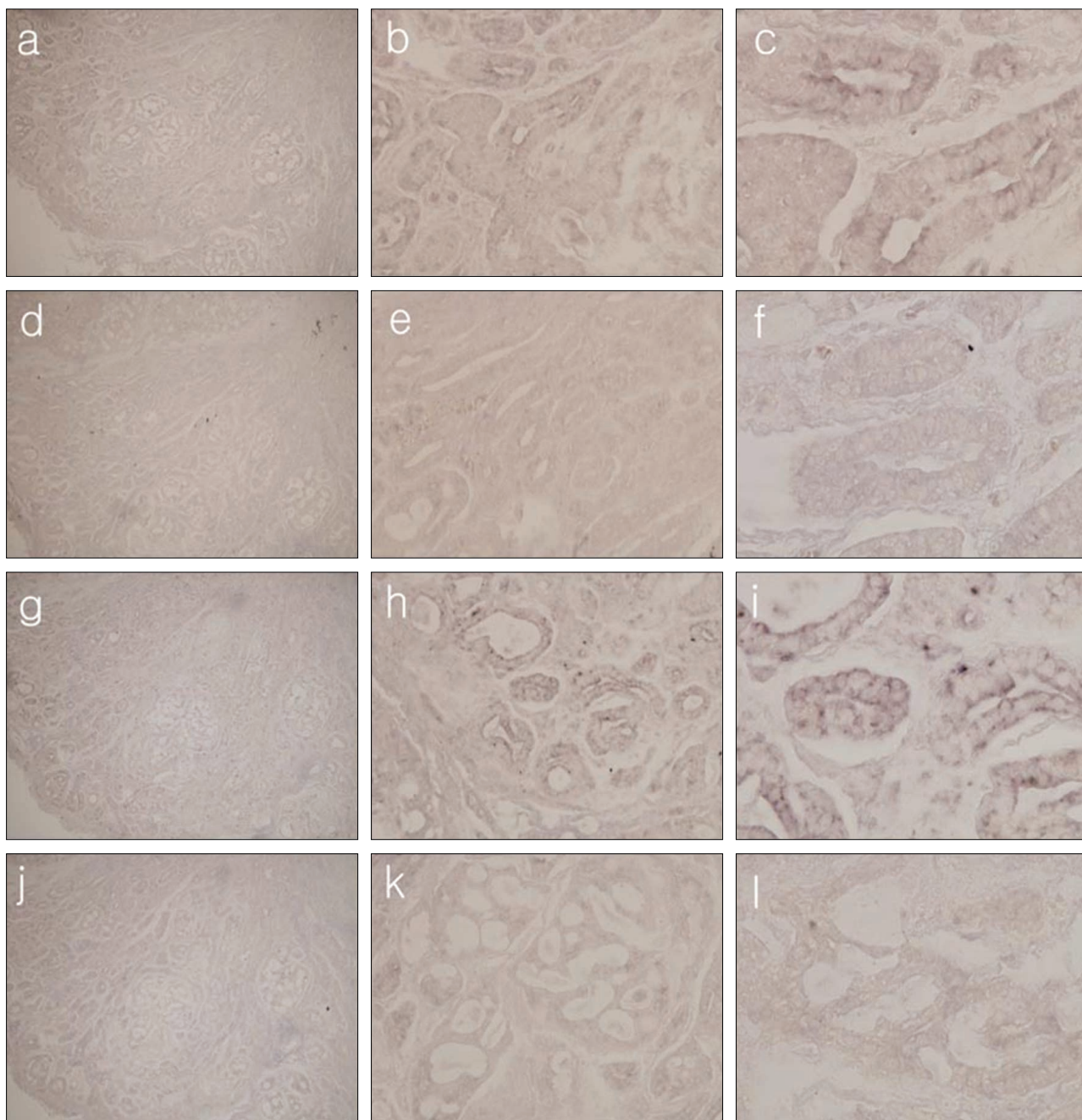


Fig. 3. Histologic features of *in situ* hybridization of adenoid cystic carcinoma.

- a. VEGF probe, SP6 promoter primer, $\times 100$
- b. VEGF probe, SP6 promoter primer, $\times 400$
- c. VEGF probe, SP6 promoter primer, $\times 1000$
- d. VEGF probe, T7 promoter primer, $\times 100$
- e. VEGF probe, T7 promoter primer, $\times 400$
- f. VEGF probe, T7 promoter primer, $\times 1000$
- g. VWF probe, SP6 promoter primer, $\times 100$
- h. VWF probe, SP6 promoter primer, $\times 400$
- i. VWF probe, SP6 promoter primer, $\times 1000$
- j. VWF probe, T7 promoter primer, $\times 100$
- k. VWF probe, T7 promoter primer, $\times 400$
- l. VWF probe, T7 promoter primer, $\times 1000$

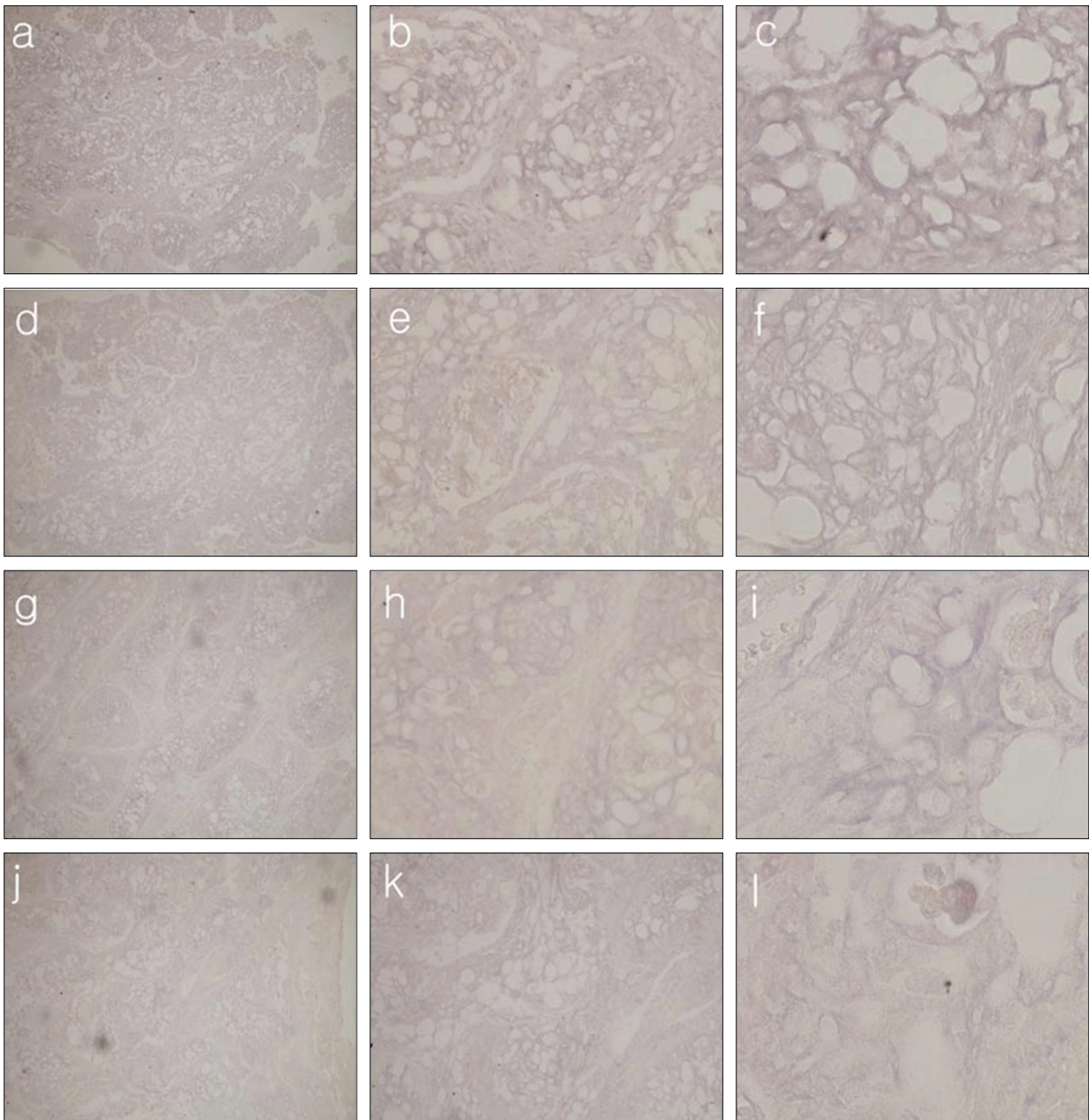


Fig. 4. Histologic features of in situ hybridization of mucoepidermoid carcinoma.

- a. VEGF probe, SP6 promoter primer, $\times 100$
- b. VEGF probe, SP6 promoter primer, $\times 400$
- c. VEGF probe, SP6 promoter primer, $\times 1000$
- d. VEGF probe, T7 promoter primer, $\times 100$
- e. VEGF probe, T7 promoter primer, $\times 400$
- f. VEGF probe, T7 promoter primer, $\times 1000$
- g. VWF probe, SP6 promoter primer, $\times 100$
- h. VWF probe, SP6 promoter primer, $\times 400$
- i. VWF probe, SP6 promoter primer, $\times 1000$
- j. VWF probe, T7 promoter primer, $\times 100$
- k. VWF probe, T7 promoter primer, $\times 400$
- l. VWF probe, T7 promoter primer, $\times 1000$

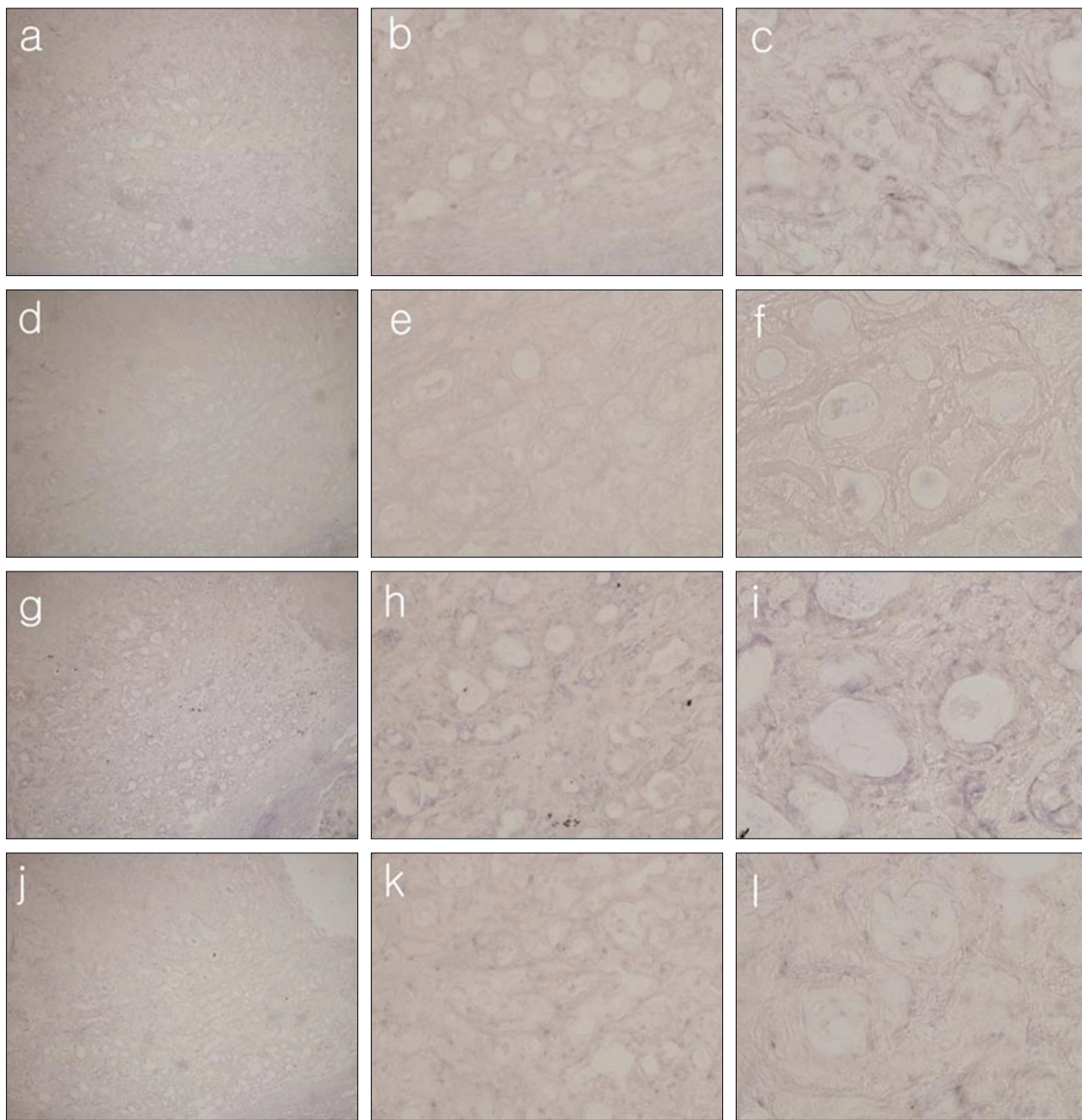


Fig. 5. Histologic features of in situ hybridization of pleomorphic adenoma.

- a. VEGF probe, SP6 promoter primer, $\times 100$
- b. VEGF probe, SP6 promoter primer, $\times 400$
- c. VEGF probe, SP6 promoter primer, $\times 1000$
- d. VEGF probe, T7 promoter primer, $\times 100$
- e. VEGF probe, T7 promoter primer, $\times 400$
- f. VEGF probe, T7 promoter primer, $\times 1000$
- g. VWF probe, SP6 promoter primer, $\times 100$
- h. VWF probe, SP6 promoter primer, $\times 400$
- i. VWF probe, SP6 promoter primer, $\times 1000$
- j. VWF probe, T7 promoter primer, $\times 100$
- k. VWF probe, T7 promoter primer, $\times 400$
- l. VWF probe, T7 promoter primer, $\times 1000$

어서 의미가 있을 것으로 사료된다. 본 연구를 통하여 주변 조직 침투와 혈관성 전이를 종양 진행의 주 기전으로 하는 타액선 선양낭성암종에서 미세혈관농도 (microvascular density, MVD)를 증가시키고 암종의 원격 전이를 증가시키는¹⁸⁾ VEGF가 과발현되는 것을 관찰할 수 있었다. 즉 수많은 표현형의 악성종양 중 암세포의 성장속도가 비교적 느려 실험적으로 모델화하기 어려운 타액선 악성종양에서 수술 표본을 이용하여 혈관화와 관련된 혈관형성 인자들의 발현정도를 유전자 수준에서 검색하여 VEGF와 vWF의 의미 있는 발현을 제시하였다.

저자는 기존의 연구를 통하여 본 연구진의 연구대상인 타액선 암종에서 연구목표 물질인 혈관형성인자들 중 대표적인 VEGF와 그 신호전달계에 관여하는 유전자, 그리고 그 외의 대표적인 혈관형성 인자들의 발현정도를 단백질 수준에서 검색하여 제시한 바 있다. 즉 마우스에 이종이식된 인간 암 세포주에서 유도된 종물과 세포주에서 VEGF/VEGFR-2, IL-8과 MMP-9의 단백질 발현 수준이 높게 조절되어 있는 현상을 웨스턴 블롯팅과 면역세포화학, 그리고 면역조직화학염색을 통하여 제시하였다³⁰⁾. 또한 인간 타액선 선양낭성암종 조직에서 VEGF 신호전달계 단백질이 정상 타액선 조직에 비교하여 과발현되며 종양관련 미세혈관이 매우 발달되어 있음을 MVD를 측정하여 보고하였다³¹⁾. 외에도 타액선 악성종양 조직에서 타액선 양성종양 조직에서보다 VEGF와 그 수용체, 그리고 MMP-9이 과발현됨을 면역조직화학염색으로 검증하였을³²⁾ 뿐만 아니라 마우스에 확립된 타액선 동위종양에서 피하종양에서보다 혈관형성인자인 VEGF, bFGF 그리고 MMP-9이 과발현됨을 제시한 바 있다³³⁾.

제자리부합법 (*in situ* hybridization)은 대사활동에 필요한 단백질을 이루는 핵산분자를 가시화하는 분자조직세포화학적 방법으로서, 세포에서 특정 염기서열의 유전자 발현상태를 검토했고 다양한 세포현상의 조절기구를 해명하는데 있어서 필수적이다. 특히, 조직 내에서 세포증식, 분화, 아포토시스와 같은 개개의 세포가 보여주는 현상을 해석하는데 있어서 세포집단에 대한 평균적인 해석만이 가능한 northern blot법이나 RT-PCR법으로는 불충분하며 조직화학적 방법론인 제자리부합법에 대한 세포 개개 수준에서의 검토가 필요하다. 호르몬 분자와 같은 분비성 단백질의 경우에는 합성 후에 저장, 분비, 수용 등에 의해 변화가 생기므로 면역조직화학적으로 검출된 단백질의 존재 자체가 반드시 그 세포의 그 시점에서의 합성을 의미하지는 않는다. 그 시점에서의 생성을 확인하기 위하여 mRNA 발현의 검토가 필요하다²⁴⁾. 따라서 본 연구를 통하여 기존의 연구에서 중요하게 제시되었던 혈관형성인자인 VEGF외에도 새롭게 vWF 유전자의 발현이 타액선 암종에서 검증됨으로써 이들 물질들을 항암치료를 위한 표적물질로 확실하게 제

시할 수 있게 되었다.

선양낭성암종은 암세포의 증식상에 대한 조직학적 소견이 스위스 치즈 모양을 닮은 사상체형, 관형 구조를 보이는 관형, 덩어리를 형성하는 충실형으로 나눌 수 있다³⁴⁾. 이들 중 충실형의 선양낭성암종이 다른 형태보다 높은 원격 전이와 낮은 생존율을 보인다³⁵⁾. 본 연구에서 VEGF와 vWF의 발현이 검증된 선양낭성암종의 임상적 특징 중 하나는, 전이가 주로 혈관성으로 야기되면 다른 기관에 비해 특히 폐전이 빈번하다는 것이다. 선양낭성암종에서 임파절 전이는 드물며, 혈관성 전이라기 보다는 임파절로의 종양의 직접적인 침투의 결과인 경우가 많다⁵⁾. Ribatti 등은 제자리부합법을 이용한 실험 연구에서 VEGF가 내피세포를 자극하여 VEGFR-2를 합성하고 혈관형성을 기시하도록 유도하고, 신생혈관을 성숙시키고 안정화시키는데 중요한 역할을 한다고 보고하였다³⁶⁾. Fukuzawa 등은 신경모세포종(neuroblastoma) 세포에 있어서 VEGF의 발현을 제자리 부합법과 면역조직화학기법을 이용하여 연구하였다. 그 결과 VEGF의 mRNA가 내피세포 뿐만 아니라 신경모세포종 세포에서도 관찰되었는데, 이는 종양의 성장과 침습에 중요한 역할을 하는 VEGF가 내피세포에 의한 주변분비 뿐 아니라 신경모세포종 세포에 의한 자가분비에도 영향을 받는다는 것을 의미한다³⁷⁾.

Blot 등은 암종과 연관된 혈전성 미세혈관병증에서 vWF의 발현에 대해 연구하였다. vWF의 거대 다형체는 전이성 종양에 있어서 혈소판 응집에 중요한 역할을 한다고 보고하였으며,³⁸⁾ Morganti 등은 선암종 (adenocarcinoma)에 있어서 암종과 내피세포 사이에 vWF가 연계하여 섬유소 용해를 억제하고, 혈소판의 부착을 증가시킨다고 보고하였다³⁹⁾. Morganti 등은 내피세포와 종양세포의 공동배양 실험에서 vWF를 추가한 실험군에서 대조군에 비하여 33%의 세포군 증가량을 보였으며 vWF에 대한 항체 투여 후 대조군과 유사한 종양세포-내피세포 결합정도를 보였다고 보고하였다⁴⁰⁾.

종양의 성장이 혈관형성과 관련이 있으며 이에 대한 분자 표적치료는 여러 연구에서 보고되고 있다^{41,42)}. 타액선 종양 중 발병빈도가 높고 혈관성 전이가 빈발하는 선양낭성암종에 있어서 혈관형성인자인 VEGF와 vWF의 발현양상에 대한 연구는 암종의 혈관성 전이와 생존율을 예측하는데 도움이 될 것이라고 생각되며, 향후 이들 물질이나 이들 물질이 관여하는 신호전달계를 표적으로 한 치료연구가 이루어져야 할 것이다.

V. 결 론

본 연구를 통하여 대표적인 인간 타액선 악성종양에서 혈관성 전이에 관여하는 인자로 생각되는 VEGF와 von Willebrand Factor (vWF)의 mRNA 수준을 *in situ*

hybridization 실험 기법을 이용하여 검색하였다. 인간 타액선 점액표피암종(MEC)과 선양낭성암종(ACC), 그리고 다형성선종에 대한 수술 조직을 이용하여 검색한 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. VEGF mRNA의 발현정도는 MEC에서 가장 강하게 발현되었으며 다형성선종에서는 MEC이나 ACC에서 보다 약한 반응을 나타냈다.
2. vWF mRNA의 발현정도는 악성 타액선 종양에서 비슷한 정도로 중등도의 발현양상이 관찰되었으며, 다형성선종에서는 MEC이나 ACC에서보다 약한 반응이 관찰되었다.
3. ACC에서는 VEGF와 vWF의 mRNA 발현양상이 종괴를 이루는 조직에서보다는 각 조직으로 침습해 들어가는 종양세포에서 더욱 강한 반응을 나타내었다.
4. MEC에서는 종괴에 전반적으로 강한 VEGF와 vWF의 mRNA 발현이 나타났다. 이에 반하여 다형성선종에서는 도관을 형성하는 종양세포에서 발현양상이 관찰되었으며 대상이 된 2가지 암종에 비해 약하게 발현되었다.

요약하면 타액선 암종의 종양세포에서 혈관성 전이에 관여한다고 생각되는 VEGF와 vWF의 발현이 공통적으로 관찰되며, 악성도가 심할수록 강한 VEGF와 vWF mRNA의 과발현을 보인다고 결론지었다. 즉 이들 혈관형성인자가 임상적으로 선양낭성암종의 혈관성 원격 전이 성향에 깊은 연관성이 있다는 것을 추론해 볼 수 있으며, 따라서 향후 분자 표적치료 (targeted molecular therapy)에 대한 표적분자 물질로 제시하는 바이다.

참고문헌

1. Katherine T, John D, Fotis I et al : Management of adenoid cystic carcinoma of minor salivary glands. J Oral Maxillofac Surg 64 : 1114, 2006.
2. Fan X, Yincheng Z, Feng L et al : Expression of IgSF in salivary adenoid cystic carcinoma and its relationship with invasion and metastasis. J Oral Patho Med 34 : 295, 2005.
3. Alfro JT, Andre DN, Priscila PCA et al : Management of salivary gland adenoid cystic carcinoma: institutional experience of a case series. Sao Paulo Med J 124(1) : 26, 2006.
4. Son CW, Kim KW, Kim CH : Study on Expression of glycosaminoglycan in adenoid cystic carcinoma. J Kor Oral Maxillofac Surg 30 : 271, 2004.
5. Park YW : Cellular and molecular characterization of adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. J Kor Assoc Of Maxillofac Plast And Reconstr Surg 27(2) : 110, 2005.
6. Raguse JD, Gath HJ, Bier J et al : Docetaxel (taxotere) in recurrent high grade mucoepidermoid carcinoma of the major salivary glands. Oral Oncology EXTRA 40 : 5, 2004.
7. Bell BR, Dierks EJ, Homer L et al : Management and outcome of patients with malignant salivary gland tumors. J Oral Maxillofac Surg 63 : 917, 2005.
8. Yih WY, Kratochvil EJ, Stewart CB : Intraoral minor salivary gland neoplasms: review of 213 cases. J Oral Maxillofac Surg 63 : 805, 2005.
9. Bhattacharyya N : Survival and prognosis for cancer of the submandibular gland. J Oral Maxillofac Surg 62 : 427, 2004.
10. Perez DEC, Pires FR, Lopes MA et al : Adenoid cystic carcinoma and mucoepidermoid carcinoma of the maxillary sinus: report of a 44-year experience of 25 cases from a single institution. J Oral Maxillofac Surg 64 : 1592, 2006.
11. Baj A, Bertolini F, Ferrari S et al : Central mucoepidermoid carcinoma of the jaw in a teenager: a case report. J Oral Maxillofac Surg 60 : 207, 2002.
12. Sidoni A, Derrico P, Simoncelli C et al : Central mucoepidermoid carcinoma of the mandible: report of a case treated 13 years after first radiographic demonstration. J Oral Maxillofac Surg 54 : 1242, 1996.
13. Ishibashi H, Shiratuchi T, Nakagawa K et al : Hypoxia-induced angiogenesis of cultured human salivary gland carcinoma cells enhances vascular endothelial growth factor production and basic fibroblast growth factor release. Oral Oncol 37 : 77, 2001.
14. Weal S, Hiroko IY, Takashi S : Angiogenesis in mucous retention cyst: a human *in vivo*-like model of endothelial cell differentiation in mucous substrate. J Oral Pathol Med 34 : 30, 2005.
15. Lim JJ, Kang SM, Lee MR et al : Expression of vascular endothelial growth factor in salivary gland carcinomas and its relation to p53, Ki-67 and prognosis. J Oral Pathol Med 32 : 552, 2003.
16. Peter AB, Tijjani U, Alan WW et al : Expression of type 2 nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor in oral dysplasia. J Oral Maxillofac Surg 60 : 1455, 2002.
17. Shang ZJ, Li JR, Li ZB : Upregulation of serum and tissue vascular endothelial growth factor correlates with angiogenesis and prognosis of oral squamous cell carcinoma. J Oral Maxillofac Surg 65 : 17, 2007.
18. Wong YK, Liu CJ, Kwan PC et al : Microvascular density and vascular endothelial growth factor immunoreactivity as predictors of regional lymph node metastasis from betel-associated oral squamous cell carcinoma. J Oral Maxillofac Surg 61 : 1257, 2003.
19. Schmutz M, Rand ML, Freedman J : Platelets and von willebrand factor. Transfusion and Apheresis Science 28 : 269, 2003.
20. Shavit JA, Motto DG : Coagulation and metastasis - an unexpected role for von Villebrand factor. J Thromb Hemost 4 : 517, 2006.
21. Paczusi R, Bialkowska A, Kotschy M et al : Von willebrand factor in plasma of patients with advanced stages of larynx cancer. Thrombosis Research 95 : 197, 1999.
22. Zaverro MR : Structure of von willebrand factor and its function in platelet adhesion and thrombus formation. Best Practice & Research Clinical Hematology 14(2) : 257, 2001.
23. Teo NB, Shoker BS, Jarvis C et al : Angiogenesis and invasive recurrence in ductal carcinoma *in situ* of the breast. European Journal of Cancer 39 : 38, 2003.
24. Kikaku G : Immunohistochemistry. Gakusai Kikaku Co, 2002, p.297.
25. Lee SK, Kim YS, Song IS et al : Improved technique of digoxigenin labeled RNA *in situ* hybridization. The Korean Journal of Pathology 35 : 98, 2001.
26. Bhat TA, Singh RP : Tumor angiogenesis - a potential tar-

- get in cancer chemoprevention. Food Chem Toxicol : 1, 2007.
27. Pang R, Poon RPT : Angiogenesis and antiangiogenic therapy in hepatocellular carcinoma. Cancer Letters 242 : 151, 2006.
 28. Schmidt M, Lichtner RB : EGF receptor targeting in therapy-resistant human tumors. Drug Resistance Updates 5 : 11, 2002.
 29. Yao JC : Molecular targeted therapy for carcinoid and islet-cell carcinoma. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism 21 : 163, 2007.
 30. Park YW : Cellular and molecular characterization of adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. J Kor Acad Maxillofac Plast Reconst Surg 27(2) : 110, 2005.
 31. Park YW, In YS : Immunohistochemical assays for the expression of angiogenic signaling molecules and microvessel density in adenoid cystic carcinomas of human salivary glands. J Kor Assoc Oral Maxillofac Surg 32(6) : 530, 2006.
 32. In YS, Kim SM, Park YW : Comparative immunohistochemical assays for the expression of angiogenic factors in tumors of human salivary glands. J Kor Acad Maxillofac Plast Reconst Surg 29(1) : 10, 2007.
 33. Jang JH, Kwon KJ, Park YW : Expressions of vascular metastasis related factors in murine orthotopic tumor models of salivary glands. J Kor Acad Maxillofac Plast Reconst Surg 29(6) : 499, 2007.
 34. Beltran D, Faquin WC, Gallagher G et al : Selective immunohistochemical comparison of polymorphous low-grade adenocarcinoma and adenoid cystic carcinoma. J Oral Maxillofac Surg 64 : 415, 2006.
 35. Hartenbach EM, Olson TA, Moganraj GD et al : Vascular endothelial growth factor(VEGF) expression and survival in human epithelial ovarian carcinomas. Cancer Letters 121 : 169, 1997.
 36. Ribatti D, Cruz A, Nico B et al : *in situ* hybridization and immunogold localization of vascular endothelial growth factor receptor-2 on the pericytes of the chick chorioallantoic membrane. Elsevier Science Ltd 17(5) : 262, 2002.
 37. Fukuzawa M, Sugiura H, Koshinaga T et al : Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor Flk-1 in human neuroblastoma using *in situ* hybridization. Journal of Pediatric Surgery 37(12) : 1747, 2002.
 38. Blot E, Decaudin D, Veyradier A et al : Cancer-related thrombotic microangiopathy secondary to von willebrand factor-cleaving protease deficiency. Thrombosis Research 106 : 127, 2002.
 39. Morganti M, Mittermayer C, Hanze U et al : Expression of tissue-type plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor and von willebrand factor in the supernatant of endothelial cell cultures in response to the seeding of adenocarcinoma cell line HRT-18. Biomed & Pharmacother 50 : 373, 1996.
 40. Morganti M, Carpi A, Amo-Takya B et al : Von Willebrand's factor mediates the adherence of human tumoral cells to human endothelial cells and ticlopidine interferes with this effect. Biomed & Pharmacother 54 : 431, 2000.
 41. Davies DE, Chamberlin SG : Targeting the epidermal growth factor receptor for therapy of carcinomas. Biochemical Pharmacology 51 : 1101, 1996.
 42. Gao ZN, Wei YQ, Yang PS et al : Combined effects of soluble vascular endothelial growth factor receptor FLT-1 gene therapy and cisplatin chemotherapy in human tongue carcinoma xenografts. Oral Oncology 43 : 477, 2007.

저자 연락처

우편번호 210-702
 강원도 강릉시 강릉대학교로 120번지
 강릉대학교 치과대학 구강악안면외과학교실
박영욱

원고 접수일 2007년 12월 4일
 게재 확정일 2008년 1월 14일

Reprint Requests

Young-Wook Park

Dept. of OMF, College of Dentistry, Kangnung National Univ.
 Gangneung Daehangno 120, Gangneung, Gangwon-do, 210-702, South Korea
 Tel: 82-33-640-3183 Fax: 82-33-640-3103
 E-mail: ywpark@kangnung.ac.kr

Paper received 4 December 2007
 Paper accepted 14 January 2008