

## 비소세포 폐암에서 VEGF, HIF-1 $\alpha$ , EGFR의 면역조직화학적 발현과 예후 인자로서의 역할

가톨릭대학교 의과대학 내과학교실  
김명숙, 박성학

## Immunohistochemical Expression and Prognostic Value of VEGF, HIF-1 $\alpha$ , EGFR in Non-Small Cell Lung Cancer

Myung Sook Kim, M.D., Sung Hak Park, M.D.

Department of Internal Medicine, The Catholic University of Korea College of Medicine, Seoul, Korea

**Background:** Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a potent mediator of angiogenesis. VEGF production is regulated by HIF-1 $\alpha$  and EGFR. This study examined the relationship between the clinicopathological factors and VEGF, HIF-1 $\alpha$  and EGFR protein overexpression, and evaluated their prognostic value in patients with a surgically resected non-small cell lung cancer (NSCLC).

**Methods:** Patients who underwent a surgical resection at Kangnam St. Mary's hospital were reviewed retrospectively. The core biopsy samples from 54 patients with NSCLC were assembled on a tissue microarray (TMA), and immunohistochemical staining for the VEGF, HIF-1 $\alpha$  and EGFR proteins was performed. The overexpression of these proteins was evaluated in relation to age, gender, histology and staging by univariate analysis. The clinicopathological prognostic factors were analyzed.

**Results:** Multivariate analysis performed by Cox regression (odds ratio 2.8, 95% CI 1.0~8.2, p=0.046) revealed HIF-1 $\alpha$  overexpression to be an unfavorable factor. There was no correlation between the overexpression of these proteins and the clinicopathological factors. VEGF showed a positive relationship with EGFR, but there was no statistical significance [ $p(\chi^2)=0.06$ ].

**Conclusion:** HIF-1 $\alpha$  overexpression predicts shorter survival in patients with a surgically resected NSCLC. Therefore, HIF-1 $\alpha$  may be a poor prognostic factor in NSCLC.

**Key Words:** Carcinoma, Non-Small-Cell Lung; Immunohistochemistry; Prognosis

### 서론

비소세포 폐암(non-small cell lung cancer, NSCLC)에서 현재까지 가장 잘 알려진 예후인자는 TNM 병기이다. 하지만 동일한 병기의 환자일지라도 각기 다른 예후를 보여 이질성의 생물학적 특성을 반영할 수 있고 치료결과

예후의 예측 및 향상에 기여할 수 있는 다른 예후인자의 필요성이 제기되어, 이를 찾고자 하는 연구가 지속되어 왔다<sup>1</sup>.

발암과정 중 혈관신생은 악성종양의 진행에 중요한 역할을 할 뿐만 아니라 환자의 예후를 좌우할 수 있는 단계의 하나로 알려져 있다<sup>2,3</sup>. Vascular endothelial growth factor (VEGF)가 혈관신생과정의 중요한 조절자 역할을 하며<sup>4</sup>, VEGF 생산을 조절하는 인자들로는 저산소증과 같은 환경적인 요인, epidermal growth factor receptor (EGFR)나 insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) 같은 성장인자 수용체 그리고 여러 종양억제유전자 등이 보고되어 왔다<sup>5,6</sup>.

Address for correspondence: **Sung Hak Park, M.D.**  
Department of Internal Medicine, Seoul St. Mary's Hospital,  
The Catholic University of Korea College of Medicine, 505,  
Banpo-dong, Seocho-gu, Seoul 137-701, Korea  
Phone: 82-2-2258-2891, Fax: 82-2-599-3589  
E-mail: cmcpsh@catholic.ac.kr

Received: Nov. 20, 2009  
Accepted: Dec. 29, 2009

이 중 저산소증은 전사인자 hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)을 통해 VEGF 생산을 증가시키는데<sup>7</sup>, 저산소 분압의 상황에서는 von Hippel-Lindau (vHL)와의 결합이 발생하지 않아 안정화된 HIF-1  $\alpha$ 가 핵 내에서 HIF-1  $\beta$ 와 결합하여 VEGF의 전사를 유도한다<sup>8,9</sup>. EGFR은 PI3K/PDEN/Akt 과정을 경유하여 Sp1이 VEGF 촉진체(promoter)에 결합하는 과정을 조절하거나 혹은 HIF-1  $\alpha$  발현을 유도하고 전사능력을 향상시켜 VEGF 생산을 증가시킬 수 있다<sup>10-12</sup>.

비소세포 폐암에서 VEGF, HIF-1  $\alpha$ , EGFR의 예후인자로서의 역할이 보고되어 왔지만, 보고자마다 결과가 상이하여 이에 대한 추가적인 연구가 요구되어 왔다.

이에 본 연구는 VEGF와 HIF-1  $\alpha$ 의 생산에 관여하는 것으로 알려진 HIF-1  $\alpha$ , EGFR의 비소세포폐암 조직에서의 발현 양상, 단백발현과 임상 조직학적 인자와의 관련성 그리고 단백발현의 상호 연관성을 조사하고, 예후인자로서 이들의 역할을 알아보려고 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 대상 환자

본 연구는 2004년 1월부터 2006년 12월까지 가톨릭대학교 강남성모병원에서 비소세포 폐암으로 치료목적의 외과적 절제술을 시행 받은 환자들 중 조직의 고정 및 보관상태가 양호한 54예를 선정하여 임상기록을 재검토하였으며 환자들의 나이, 성별, 조직형, 조직 분화도, 조직학적 병기 및 생존기간을 조사하였다. 수술 전 항암 치료나 방사선 치료를 시행 받은 환자, 수술적 치료로 완전 절제가 되지 않은 환자, 종격동 림프절 절제술이 시행되지 않은 환자, 수술 직후 합병증으로 사망한 환자, 수술 전후 다른 악성질환을 진단받은 환자, 수술 직후 추적관찰이 되지 않은 환자들은 제외하였다.

본 연구는 가톨릭중앙의료원 중앙임상연구심의위원회의 승인을 받았고 후향적 연구로 개개의 환자로부터의 동의서는 면제할 수 있다는 승인을 받았다.

### 2. Tissue microarray (TMA) 제작

외과적으로 절제된 비소세포 폐암의 조직 슬라이드에 서 대표적인 종양부위를 직경 5 mm 정도 선택하고, 수술 조직의 파라핀 블록 중 선택된 부분을 Bee-cher arrayer (Unitma, Seoul, Korea)를 이용하여 채취하였다. 채취된 조직은 recipient 블록에 넣어 TMA를 제작하였다.

### 3. 면역조직화학 염색

TMA 조직을 사용하여 통상적인 면역조직화학 염색을 시행하였다. 일차 항체는 EGFR (1 : 50, clone H11; DAKO, Glostrup, Denmark), VEGF (1 : 50; Zymed, San Francisco, CA, USA)를 사용하였다. 각 면역조직화학 염색의 음성대조군은 일차 항체를 처리하지 않았다. HIF-1  $\alpha$ 의 면역조직화학 염색은 Catalysed Signal Amplification System (1 : 25; DAKO, NeoMarkers, USA)을 사용하였고, 제조사의 지침에 따라 시행하였다.

### 4. 염색결과의 판독

VEGF는 세포질이 갈색으로, EGFR은 세포막이 갈색으로 그리고 HIF-1  $\alpha$ 는 핵이 갈색으로 염색되었는지 여부를 관찰하였다. 염색결과는 VEGF, EGFR, HIF-1  $\alpha$  각각 전체 암세포의 30% 이상이 염색될 때를 양성(과발현)으로 판정하였다.

### 5. 수술 후 추적 관찰

환자는 수술 당일부터 추적 관찰하였고, 수술 후 모든 원인에 의한 사망까지의 기간을 전체 생존기간(duration of overall survival, OS)으로 정의하였다. 임상적 추적은 2008년 12월 31일을 기준으로 분석하였다.

### 6. 통계분석

결과는 SPSS for Window version 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하여 분석하였다. VEGF, HIF-1  $\alpha$ , EGFR의 발현과 임상 조직학적 인자와의 관련성을 알아보기 위해 단변량 분석을 시행하였고, 연령, 성별, 조직형, 분화도, 조직학적 병기 등의 특성에 따른 각각의 단백 발현의 차이를 평가하기 위해 독립표본 t 검정을 시행하였다. 각 단백 발현의 상호연관성은  $\chi^2$  검정 혹은 Fisher 정확 확률 검정을 이용하여 분석하였다. 단백발현에 따른 비소세포폐암 환자들의 생존율의 차이는 Kaplan-Meier Method로 분석 후 Log-rank test로 유의성을 평가하였고, 예후인자로서의 역할을 평가하기 위해 Cox proportional hazard model을 이용하여 다변량 분석을 시행하였다. 모든 결과는  $p < 0.05$ 일 때 통계학적으로 유의한 것으로 정의하였다.

## 결 과

### 1. 대상 환자의 특성

연령의 중앙값은 67세이고 남자가 35예(64.8%), 여자가 19예(35.2%)이었다. 조직형은 선암이 29예(53.7%), 편평상피세포암이 25예(46.3%)이었다. 조직분화의 정도는 well differentiated 12예(22.2%), moderately differentiated 32예(59.3%), poorly differentiated 8예(14.8%), 그리고 구별이 어려운 경우가 2예(3.7%)이었다. 조직학적 병기 분포는 I 병기 29예(53.7%), II 병기 18예(33.3%), III 병기 7예(13.0%)이었다. OS 기간의 중앙값은 29.5개월이었다. 수술 후 보조항암요법을 시행 받은 환자는 23예(42.6%)로 etoposide-cisplatin, paclitaxel-cisplatin, docetaxel-cisplatin 등의 약제를 사용하였다. 수술 후 방사선요법을 시행 받은 환자는 3예(5.6%)였다(Table 1).

Table 1. Clinicopathological factors of the 54 patients with non-small cell lung cancer

Characteristics	No. (%) or median (range)
Age	67 (44~84)
Gender (M/F)	35/19 (64.8/35.2)
Pathology	
Adenocarcinoma	29 (53.7)
Squamous cell carcinoma	25 (46.3)
Differentiation	
Well	12 (22.2)
Moderately	32 (59.3)
Poorly	8 (14.8)
Not available	2 (3.7)
Stage	
I	29 (53.7)
II	18 (33.3)
III	7 (13.0)
T	
1	19 (35.2)
2	31 (57.4)
3	4 (7.4)
N	
0	32 (59.2)
1	15 (27.8)
2	7 (13.0)
Adjuvant chemotherapy	23 (42.6)
Adjuvant radiotherapy	3 (5.6)
OS	29.5 month (10~60)

### 2. VEGF, HIF-1 $\alpha$ , EGFR의 발현 빈도

TMA를 VEGF, HIF-1 $\alpha$ , EGFR로 면역조직화학 염색을 시행한 결과 HIF-1 $\alpha$ 는 핵에, VEGF는 세포질에, EGFR은 세포막에서 각각 양성으로 관찰되었다(Figure 1). VEGF, HIF-1 $\alpha$  그리고 EGFR 각각의 양성 빈도는 45예(83.3%), 28예(51.9%), 38예(70.4%)이었다.

### 3. VEGF, HIF-1 $\alpha$ , EGFR의 발현과 임상 조직학적 인자와의 관계

종양 세포의 VEGF와 EGFR의 과발현과 관련이 있는 것으로 평가되는 통계학적으로 유의한 임상 조직학적 인자는 관찰되지 않았다. 그리고 HIF-1 $\alpha$  과발현과 관련이 있는 인자도 관찰되지 않았다(Table 2).

### 4. VEGF, HIF-1 $\alpha$ , EGFR 발현의 상호연관관계

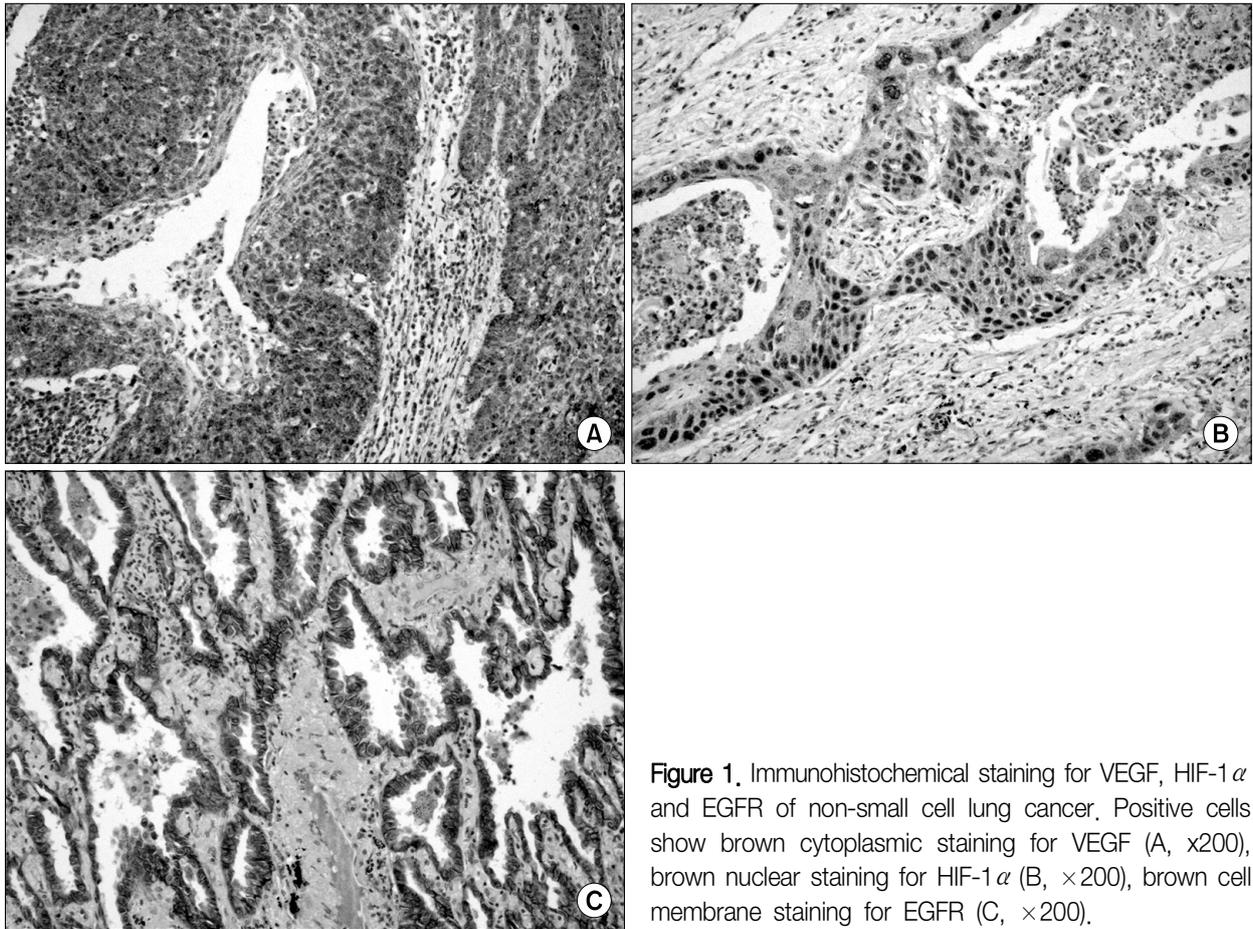
VEGF와 EGFR 발현은 통계학적 유의성은 없으나 발현 연관성의 가능성을 시사해 주었다( $p(\chi^2)=0.06$ ). VEGF와 HIF-1 $\alpha$  발현의 연관성은 관찰되지 않았다( $p(\chi^2)=0.62$ ) (Table 3).

### 5. VEGF, HIF-1 $\alpha$ , EGFR의 발현에 따른 생존 분석

전체 54명의 환자들의 중앙 OS 기간은 29.5개월이었다. 전체 54명의 환자 중 종양 조직의 HIF-1 $\alpha$  발현 양성인 경우(n=28)와 발현 음성의 경우(n=26)에서 중앙 OS 기간은 각각 28개월과 39.5개월로 나타났다. Kaplan-Meier Method로 분석 후 Log-rank test로 유의성을 평가한 결과 통계학적으로 유의한 차이를 보였다( $p=0.03$ ) (Figure 2). VEGF, HIF-1 $\alpha$ , EGFR, 성별, 조직형, 조직학적 병기 그리고 항암치료 유무 등의 변수들을 이용하여 Cox 회귀모형을 통한 다변량 분석을 시행한 결과 HIF-1 $\alpha$ 가 전체 생존 기간과 유의한 연관성을 보였다(odds ratio 2.8, 95% CI 1.0~8.2,  $p=0.046$ ) (Table 4). VEGF 발현 양성인 경우(n=45)와 발현 음성의 경우(n=9)의 중앙 OS 기간은 각각 29개월과 39개월이었고, EGFR 발현 양성인 경우(n=38)와 발현 음성의 경우(n=16)의 중앙 OS 기간은 각각 28.5개월과 33개월로 모두 통계학적으로 유의한 차이는 없었다.

## 고 찰

본 연구를 통해 비소세포 폐암환자에서 단백발현의 예후인자로서의 역할을 분석한 결과, HIF-1 $\alpha$  과발현 환자들



**Figure 1.** Immunohistochemical staining for VEGF, HIF-1 $\alpha$  and EGFR of non-small cell lung cancer. Positive cells show brown cytoplasmic staining for VEGF (A,  $\times 200$ ), brown nuclear staining for HIF-1 $\alpha$  (B,  $\times 200$ ), brown cell membrane staining for EGFR (C,  $\times 200$ ).

이 낮은 전체 생존율을 보이고, Cox 회귀모형 분석에서도 HIF-1 $\alpha$  과발현 환자들의 사망 위험이 저발현 환자들에 비해 높은 것으로 관찰되어, 수술적 치료를 받은 비소세포 폐암환자에서 HIF-1 $\alpha$ 가 나쁜 예후인자로서의 역할을 할 수 있음을 보였다. HIF-1 $\alpha$  과발현이 종양 내 저산소화나 유전자 돌연변이로 인해 나타나고, 치료에 대한 저항 및 나쁜 예후와 관련이 되며, 전체 생존율과도 유의한 연관성이 있다고 보고된 이전의 결과들과 부합되는 소견이다<sup>13-15</sup>. 그리고 HIF-1 $\alpha$  과발현이 수술 후 불량한 예후와 관련 가능성이 있다고 보고한 결과와도 부합되는 소견이다<sup>16</sup>. 하지만 비소세포 폐암으로 진단받은 후 수술적 치료를 시행한 59명의 환자를 대상으로 종양세포에서의 HIF-1 $\alpha$  과발현의 양상과 예후와의 관련성에 대한 Cho 등<sup>16</sup>의 보고에 의하면, HIF-1 $\alpha$ 의 과발현이 TNM 병기, 조직학적 T 병기, 조직학적 N 병기와 연관성이 있다고 하였으나, 본 연구에서는 관련성이 있는 임상 조직학적인 인자를 관찰하지는 못하였다.

악성종양의 성장을 위한 영양분이나 산소공급은 초기에는 단순 확산(simple diffusion)을 통해 공급이 가능하나 종양의 직경이 1~2 mm 이상인 경우는 혈관신생(angiogenesis)을 통해 종양의 성장과 전이가 일어나며, 따라서 혈관신생은 종양환자의 예후와 연관된다고 한다. 이 과정의 중요한 조절자인 VEGF 또한 나쁜 예후를 예측할 수 있는 인자로서 보고되어 왔다<sup>4,17,18</sup>. 예후인자로서 EGFR의 역할에 대해서는 예후와 무관하다는 의견과<sup>19,20</sup> 근거는 미약하나 일부에서는 나쁜 예후인자로서 과발현의 경우 짧은 생존기간을 보인다는 보고가 있어 왔지만<sup>1,21,22</sup> 본 연구에서는 VEGF와 EGFR 모두 의미있는 예후인자로서의 역할을 볼 수 없었다. 그리고 임상 조직학적 인자와의 유의한 연관성도 관찰하지는 못하였다.

단백발현 상호간의 관련성 측면에서 본 연구는 VEGF와 EGFR 발현이 통계학적 유의성은 없으나 상호연관성의 경향을 시사해 주었다. VEGF와 HIF-1 $\alpha$  발현의 상호연관성은 관찰되지 않아, 연관성의 가능성을 시사한 다른 보고

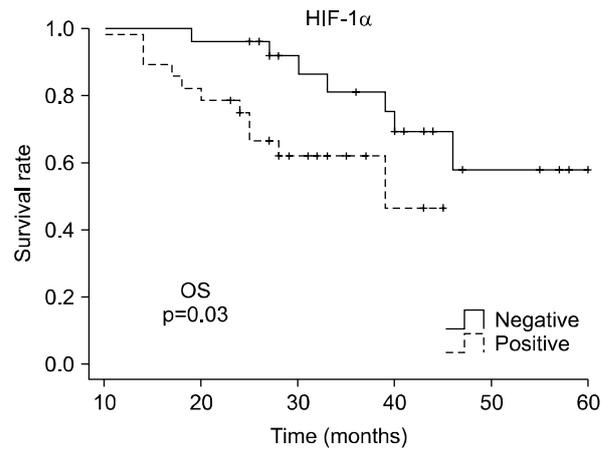
**Table 2.** Correlation between HIF-1 $\alpha$  expression and clinicopathologic characteristics in 54 cases of non-small cell lung cancer

	Negative (n=26)	Positive (n=28)	p-value
Age	67 (44~82)	67 (52~84)	0,89
Gender			0,11
M	12 (46,2%)	7 (25,0%)	
F	14 (53,8%)	21 (75,0%)	
Pathology			0,58
Adenocarcinoma	15 (57,7%)	14 (50,0%)	
Squamous cell carcinoma	11 (42,3%)	14 (50,0%)	
Differentiation			0,34
Well	6 (23,1%)	6 (21,4%)	
Moderately	16 (61,5%)	16 (57,2%)	
Poorly	2 (7,7%)	6 (21,4%)	
Not available	2 (7,7%)		
Stage			0,87
I	14 (53,8%)	15 (53,6%)	
II	9 (34,7%)	9 (32,1%)	
III	3 (11,5%)	4 (14,3%)	
T			0,30
1	11 (42,3%)	8 (28,6%)	
2+3	15 (57,7%)	20 (71,4%)	
N			0,82
0	15 (57,7%)	17 (60,7%)	
1+2	11 (42,3%)	11 (39,3%)	

**Table 3.** Association between VEGF expression and EGFR or HIF-1 $\alpha$  expression in 54 cases of non-small cell lung cancer

Parameters	No. of cases	VEGF		p-value
		Positive (n=45)	Negative (n=9)	
EGFR				0,062
Positive	38	34	4	
Negative	16	11	5	
HIF-1 $\alpha$				0,626
Positive	28	24	4	
Negative	26	21	5	

와는 부합되지 않는 결과를 보였다<sup>16</sup>. HIF-1 $\alpha$ , EGFR, VEGF의 혈관신생과정에서의 관련성을 근거로, 종양조직 내의 단백질발현에서도 유의한 상호연관성이 있을 것이라고 가정하였지만 통계학적 유의성을 보이지 못했다. EGFR이



**Figure 2.** Kaplan-Meier overall survival curves in patients with non-small cell lung cancer according to HIF-1 $\alpha$  expression.

**Table 4.** Multivariate analysis of overall survival in 54 cases of non-small cell lung cancer

Factors	Odds ratio	95% CI	p-value
VEGF (high vs low)	0,898	0,267~3,022	0,861
HIF-1 $\alpha$ (high vs low)	2,896	1,019~8,235	0,046
EGFR (high vs low)	0,515	0,178~1,489	0,220
Gender (male vs female)	1,342	0,409~4,408	0,628
Histology (adeno vs squ)	1,243	0,434~3,557	0,685
Stage (II-III vs I)	1,226	0,366~4,104	0,741
CHT (done vs not done)	2,574	0,786~8,431	0,118

Multivariate analysis was conducted using Cox-proportional hazard model; results are showed as p-value.

CI: confidence interval; Adeno: adenocarcinoma; Squ: squamous cell carcinoma.

PI3K/Akt 과정을 통해 VEGF 생산에 관여하므로<sup>10,12</sup> EGFR 과 VEGF 단백질 발현 사이에 연관성이 존재할 수도 있지만, Akt 유전자 변형이나 PI3K 과발현이 있는 종양의 경우는 EGFR과 무관한 VEGF 발현의 변화가 초래될 수 있을 것이다<sup>12</sup>. 정상의 산소화 영역과 저산소화 영역이 비균질하게 산재되어 있을 종양내부의 환경적 특성을 고려한다면 저산소 환경으로 인한 HIF-1 $\alpha$ 의 영향도 VEGF 발현에 영향을 줄 것이며, 어느 기전이 우세하게 작용할 것이냐는 종양세포 종류, 유전자 변형여부 그리고 주변환경 등에 의해 좌우될 수 있을 것이다<sup>12</sup>. 이러한 이유로 단백질 발현

의 연관성은 다양하게 나타날 수 있으므로 다른 결과를 보이는 경우는 해석에 주의를 기울여야 하겠다.

본 연구는 전통적인 방법이 아닌 TMA 제작 후 이를 이용하여 면역조직화학 염색을 시행하였다. TMA는 하나의 슬라이드에 여러 환자의 조직을 함께 넣어 분석함으로써 연구의 효율을 높일 수 있을 뿐만 아니라, 전통적인 방법의 면역조직화학법과 비교 시 유사한 신뢰도를 제공해 줄 수 있는 검사로 알려져 있다<sup>23,24</sup>. 면역염색과정을 규격화하여 염색과정에서 발생하는 오차를 줄일 수 있는 장점이 있으나 제작과정이나 염색과정 중 조직 소실의 위험이 있고, 기존의 중앙조직 블록의 상태를 충분히 반영할 수 있는 조직부분이 선택될 수 있도록 주의를 기울여야 한다는 제한점이 있다.

본 연구는 부족한 환자 증례수를 대상으로 하였다는 제한점을 가지고 있으며 향후 좀 더 많은 증례를 대상으로 연구가 이루어진다면 보다 나은 결과를 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

결론적으로 비소세포 폐암에서 VEGF와 EGFR의 예후 인자로서의 역할은 관찰되지 않았지만, HIF-1 $\alpha$  과발현이 환자의 생존기간과 유의한 관련성이 있음을 보여, HIF-1 $\alpha$ 가 수술 후 불량한 예후를 예측할 수 있는 인자로서 역할을 할 수 있음을 제안하는 바이다.

## 참 고 문 헌

- Zhu CQ, Shih W, Ling CH, Tsao MS. Immunohistochemical markers of prognosis in non-small cell lung cancer: a review and proposal for a multiphase approach to marker evaluation. *J Clin Pathol* 2006;59:790-800.
- Onn A, Herbst RS. Angiogenesis and lung cancer: implications for prognosis and treatment. *Lancet Oncol* 2007;8:460-1.
- Bremnes RM, Camps C, Sirera R. Angiogenesis in non-small cell lung cancer: the prognostic impact of neoangiogenesis and the cytokines VEGF and bFGF in tumours and blood. *Lung Cancer* 2006;51:143-58.
- Han H, Silverman JF, Santucci TS, Macherey RS, d'Amato TA, Tung MY, et al. Vascular endothelial growth factor expression in stage I non-small cell lung cancer correlates with neoangiogenesis and a poor prognosis. *Ann Surg Oncol* 2001;8:72-9.
- Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999;13:9-22.
- Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* 2005;23:1011-27.
- Levy AP, Levy NS, Wegner S, Goldberg MA. Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J Biol Chem* 1995;270:13333-40.
- Ke Q, Costa M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol* 2006;70:1469-80.
- Rini BI, Small EJ. Biology and clinical development of vascular endothelial growth factor-targeted therapy in renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2005;23:1028-43.
- Zhong H, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Hanrahan C, Georgescu MM, et al. Modulation of hypoxia-inducible factor 1 alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res* 2000;60:1541-5.
- Maity A, Pore N, Lee J, Solomon D, O'Rourke DM. Epidermal growth factor receptor transcriptionally up-regulates vascular endothelial growth factor expression in human glioblastoma cells via a pathway involving phosphatidylinositol 3'-kinase and distinct from that induced by hypoxia. *Cancer Res* 2000;60:5879-86.
- Pore N, Jiang Z, Gupta A, Cerniglia G, Kao GD, Maity A. EGFR tyrosine kinase inhibitors decrease VEGF expression by both hypoxia-inducible factor (HIF)-1-independent and HIF-1-dependent mechanisms. *Cancer Res* 2006;66:3197-204.
- Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Sivridis E, Turley H, Talks K, Pezzella F, et al. Relation of hypoxia inducible factor 1 alpha and 2 alpha in operable non-small cell lung cancer to angiogenic/molecular profile of tumours and survival. *Br J Cancer* 2001;85:881-90.
- Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res* 1999;59:5830-5.
- Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003;3:721-32.
- Cho SR, Byun JH, Kim JI, Lee BG, Chun BK. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha in non-small cell lung cancer: relationship to prognosis and tumor biomarkers. *Korean J Thorac Cardiovasc Surg* 2006;39:828-37.
- Fontanini G, Lucchi M, Vignati S, Mussi A, Ciardiello F, De Laurentis M, et al. Angiogenesis as a prognostic indicator of survival in non-small cell lung carcinoma:

- a prospective study. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:881-6.
18. Yilmaz A, Ernam D, Unsal E, Demirag F, Atikcan S, Tastede I. Vascular endothelial growth factor immunostaining correlates with postoperative relapse and survival in non-small cell lung cancer. *Arch Med Res* 2007;38:764-8.
  19. Nakamura H, Kawasaki N, Taguchi M, Kabasawa K. Survival impact of epidermal growth factor receptor overexpression in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Thorax* 2006;61:140-5.
  20. Ahn JH, Kim SW, Hong SM, Suh C, Kim WK, Lee IC, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) expression in operable non-small cell lung carcinoma. *J Korean Med Sci* 2004;19:529-35.
  21. Selvaggi G, Novello S, Torri V, Leonardo E, De Giuli P, Borasio P, et al. Epidermal growth factor receptor overexpression correlates with a poor prognosis in completely resected non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2004;15:28-32.
  22. Meert AP, Martin B, Delmotte P, Berghmans T, Lafitte JJ, Mascaux C, et al. The role of EGF-R expression on patient survival in lung cancer: a systematic review with meta-analysis. *Eur Respir J* 2002;20:975-81.
  23. Battifora H. The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing. *Lab Invest* 1986;55:244-8.
  24. Schmidt LH, Biesterfeld S, Kummel A, Faldum A, Sebastian M, Taube C, et al. Tissue microarrays are reliable tools for the clinicopathological characterization of lung cancer tissue. *Anticancer Res* 2009;29:201-9.
-