

## 구강암에서 림프관형성 인자의 발현에 관한 면역조직화학적 연구

박영욱 · 권광준 · 이종원

강릉원주대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

### Abstract

#### IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY ON EXPRESSION OF LYMPHANGIOGENIC FACTORS IN ORAL CANCER

Young-Wook Park, Kwang-Jun Kwon, Jong-Won Lee

*Department of Oral & Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Gangneung-Wonju National University*

**Background and purpose:** Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF receptor (VEGFR)-3 are involved in tumor lymphangiogenesis. Oral mucosal squamous cell carcinoma (OMSCC) preferentially metastasizes to cervical lymph nodes, so we investigated the expression and distribution of VEGFR-3 signaling proteins in OMSCC.

**Materials and methods:** Tissue samples of 18 OMSCC, 10 oral mucosal leukoplakia, and 3 normal oral mucosa were evaluated for expression of VEGF-C, VEGF-D, and VEGFR-3 by immunohistochemical staining. The presence of lymphatic vessels was determined using D2-40 staining, by which we also measured lymphatic vessel density (LVD).

**Results:** 72% (13/18) and 56% (10/18) of tissue samples showed VEGF-C and VEGF-D immunopositivity in tumor cells and tumor-associated endothelial cells. VEGFR-3 was also expressed in most of OMSCC, which was up-regulated when compared with normal mucosa or with leukoplakia. Furthermore, LVD was higher in OMSCC than in leukoplakia.

**Conclusion:** Taken together, our results suggest that autocrine activation of lymphatic endothelial cell via VEGFR-3 by VEGF-C and/or VEGF-D could be involved in progression of OMSCC. Therefore, VEGF-C/VEGFR-3 signaling pathway can be a molecular target for anti-metastatic therapy in OMSCC

**Key words:** Oral mucosal squamous cell carcinoma, Lymphangiogenesis, Lymphatic vessel density

### 1. 서 론

다양한 경로를 통한 종양세포의 국소, 원격 전이병소의 형성은 환자의 생명을 위협하는 악성종양의 치명적 표현형이다. 특히 고형종양의 종양세포는 많은 경우에서 림프절로 유입되는 현상이 나타나는 바, 이는 림프관이 종양세포의 전이성 파급에 있어 중요한 경로임을 나타낸다. 과거에는 림프절 전이 (lymphatic metastasis)가 원발성 종양으로부터 떨어져 나온 종양세포가 해부학적으로 근접한, 이미 존재하는 림프계로 단순히 유입 (drainage)됨으로써 전이

병소가 형성되는 것으로 생각하였다.<sup>1)</sup> 그러나 최근에 발표된 실험동물에서의 종양모델을 이용한 연구나<sup>2)</sup> 림프절 전이에 대한 임상병리학적 상관관계에 관한 연구들을<sup>3,4)</sup> 살펴보면, 종물 주변에서의 새로운 림프관의 성장과 형성과정 (lymphangiogenesis)이 림프절 전이를 적극적으로 일으킨다는 것을 알 수 있다.

특히 최근에 발견된 림프관형성 성장인자들과 그 조직학적 표지자들은 혈관과 림프관을 구분함으로써 이같은 가설을 검증하는데 결정적인 역할을 하였다.<sup>5)</sup> 림프관형성 성장인자들은 종양의 림프관 형성능과 림프절 전이능을 촉진하

\*This study was supported by a grant of the Korea Healthcare technology R&D Project, Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (A080293).

는 역할을 한다. 가장 많이 제시되고 연구된 림프관 성장인자와 신호전달체는 분비된 림프관형성 단백질 VEGF (vascular endothelial growth factor)-C와 VEGF-D, 그리고 그들의 수용체인 림프관 내피세포에 존재하는 VEGF receptor (VEGFR)-3 (flt-4)이다.<sup>6)</sup> 이외에 제시된 림프관 형성 신호전달 물질들로는 간세포 성장인자 (hepatocyte growth factor),<sup>7)</sup> 섬유아세포 성장인자 (fibroblast growth factor)의 일부,<sup>8)</sup> angiopoietin,<sup>9)</sup> 혈소판-유래 성장인자 (platelet-derived growth factor),<sup>10)</sup> 그리고 인슐린성 성장인자 (insulin-like growth factor)의 분비된 단백질<sup>11)</sup> 등이 있다.

두경부 편평상피세포암에서도 VEGF-C가 림프관 신형성과 림프절 전이에 영향을 미친다고 보고된<sup>12)</sup> 바 있으며, 2003년 Neuchrist는 RT-PCR과 면역조직화학적 연구를 통하여 VEGF-C와 VEGFR-3가 두경부 편평상피세포암 세포주와 종양조직에서 발현됨을 제시하고 이 인자들이 종양관련 림프관 형성에 연관된다고 하였다.<sup>13)</sup> 대표적인 구강암인 구강점막 편평상피세포암 (oral mucosal squamous cell carcinoma, OMSCC)에서도 VEGF-C가 림프관 형성을 매개하여 림프성 미세관 밀도 (lymphatic microvessel density)를 증가시키고, 종양세포의 림프관성 혹은 혈관성 전이에 영향을 미칠 것이라고 발표된 바 있다.<sup>14)</sup> 또한 2004년 Shintani 등은 구강 편평상피세포암에서 VEGF-D가 발현됨을 제시한 바 있고,<sup>15)</sup> 2007년 Miyahara 등은 110례의 구강 편평상피세포암 조직에 대한 면역조직화학염색을 통하여 VEGF-C의 발현과 종양관련 미세 혈관/림프관 밀도와 의 관계, 그리고 임상병리학적 상관관계를 조사하여 림프성 미세관 밀도가 환자의 생존율에 미치는 영향이 강하

고 따라서 VEGF-C를 새로운 치료 표적물질로 제시하였다.<sup>16)</sup>

위와 같은 배경에서 본 연구진은 한국인의 구강점막 편평상피세포암 조직에서도 림프관형성 성장인자들이 과발현될 것이라는 가설을 설정하고 이를 검증하고자 하였다. 따라서 본 연구의 목적은 구강점막 편평상피세포암 조직에서 VEGF-C, VEGF-D, 그리고 그들의 수용체인 VEGFR-3의 발현정도와 발현분포를 제시하고, 그 발현정도를 구강점막에 발생한 백반증 (leukoplakia) 병소에서와 비교하는데 있다.

## II. 연구 재료 및 방법

### 1. 종양조직

강릉원주대학교 치과병원 구강악안면외과에 내원하여 2004년부터 2009년까지 종양절제술이 시행된 중례 중 수술 전에 다른 치료를 받지 않은 환자의 수술조직 18건이 본 연구에 사용되었다. 환자의 임상적 기록은 Table 1과 같으며, 수술이 시행된 환자들에 있어서는 수술 전에 informed consent를 받았다. 신선한 상태의 구강편평상피세포암 종물을 채취한 후 조직을 두께 2 mm 정도로 얇게 자르고 조직 크기의 50배 이상의 고정액을 넣은 용기에 담그고, 이것을 shaker에서 4-6시간 가볍게 흔들어 줌으로써 고정액이 조직 내로 용이하게 침투하게 하였다. 각각의 조직을 별도의 용기를 사용하여 세척한 후 파라핀에 포매하였다. 이 표본으로부터 조직학적 슬라이드를 제작하여 먼저 Hematoxyline & Eosin (H&E) 염색을 통하여 종물의 조직학적

**Table 1.** Patients characteristics

No (Date of operation)	Age/Sex	Location	N Classification	Staging
1 (2004. 4. 12)	82/F	Gingiva mucosa	N0	Stage III
2 (2004. 6. 10)	70/M	Mandible body	N2b	Stage IV
3 (2004. 9. 24)	47/M	Gingiva mucosa	N0	Stage I
4 (2005. 4. 11)	64/M	Gingiva mucosa	N2c	Stage IV
5 (2005. 4. 25)	75/M	Alveolar bone	N2c	Stage IV
6 (2005. 5. 27)	65/M	Buccal mucosa	N0	Stage I
7 (2006. 6. 15)	74/M	Buccal gingiva	N0	Stage II
8 (2006. 12. 19)	53/M	Retromolar	N2	Stage IV
9 (2007. 2. 6)	72/F	Tongue	N2b	Stage IV
10 (2009. 9. 1)	71/M	Alveolar mucosa	N0	Stage II
11 (2008. 1. 22)	75/F	Edentulous alveolar mucosa	N0	Stage II
12 (2008. 2. 26)	68/M	Alveolar ridge	N2c	Stage IV
13 (2008. 3. 28)	36/M	Maxillary sinus	N0	Stage II
14 (2008. 3. 27)	66/M	Alveolar ridge	N0	Stage II
15 (2008. 7. 11)	72/F	Buccal mucosa	N1	Stage III
16 (2009. 6. 15)	72/F	Mouth floor	N2c	Stage IV
17 (2009. 1. 8)	71/M	Tongue	N0	Stage I
18 (2009. 1. 13)	49/F	Mouth floor	N2c	Stage IV

소견을 전반적으로 검색하였으며, 림프관 형성인자의 발현을 검색하기 위하여 각각의 샘플에서 silane coating된 슬라이드를 이용하여 조직 표본을 제작하였다. 또한 대조군으로 정상 구강 점막 조직 3례와 백반증 10례로부터 위와 같은 방법으로 조직학적 슬라이드를 제작하였다.

## 2. 항체 및 시약

면역조직화학염색에는 다음의 일차항체들이 사용되었다: polyclonal rabbit anti-VEGFR-3 (ab27278, abcam, U.S.A), polyclonal goat, anti-VEGF-C (ab18883, abcam, U.S.A), polyclonal rabbit anti-VEGF-D (ab63068, abcam, U.S.A), D2-40 (M3619, Dako, U.S.A), 이차항체로는 goat anti-rabbit HRP (horse-radish peroxidase, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, U.S.A), peroxidase conjugated goat anti-rabbit IgG (Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, U.S.A.), Rabbit polyclonal anti-goat IgG (ab6741, abcam, U.S.A)이 이용되었으며, 발색을 위하여 DAB (3,3-diaminobenzine, Research Genetics, Huntsville, U.S.A)이 사용되었다.

## 3. 림프관 성장인자에 대한 면역조직화학염색

VEGF-C, VEGF-D, VEGFR-3의 면역조직화학염색을 위해서 파라핀 포매 조직을 이용하여 다음과 같이 염색을 시행하였다. 파라핀 포매된 조직을 4-6  $\mu\text{m}$ 로 세절하여 생긴 조직절편을 양성 전하를 띤 슬라이드 위에 올려놓고, 57-60 $^{\circ}\text{C}$ 정도의 열을 30-40분 정도 가하여 왁스성분의 제거를 용이하게 하였다. 자일렌 용액으로 왁스를 제거하고 알코올 용액으로 재수화시킨 후 PBS (phosphate buffered solution)를 이용하여 마르지 않게 하였다. 항원성 회복 (antigen recovery)을 위하여 VEGFR-3 염색의 경우 조직 슬라이드를 10 mM sodium citrate 완충액 (pH 6.0)에 담근 상태에서 전자렌지에서 마이크로웨이브를 이용하여 2분 30초간 강가열 후 7분 30초간 약가열 하였다. VEGF-C의 염색의 경우 PBS를 제거하고 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 15분간 적용한 후  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 제거하기 위하여 PBS로 5분간 3차례 수세하였다. VEGF-D의 경우에는 제조사에서 제시한 대로 별도의 항원성 회복 단계를 시행하지 않았다. 이후 내인성 과산화효소 (endogenous peroxidase)의 활성을 억제하기 위하여 VEGF-C의 염색을 제외한 나머지 염색에서 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  메탄올 용액에서 15분간 두었다. 이 후 조직절편을 다시 PBS로 3분간 3차례 수세 후, 상온에서 비특이 단백질의 결합을 차단하기 위하여 5% 정상 말

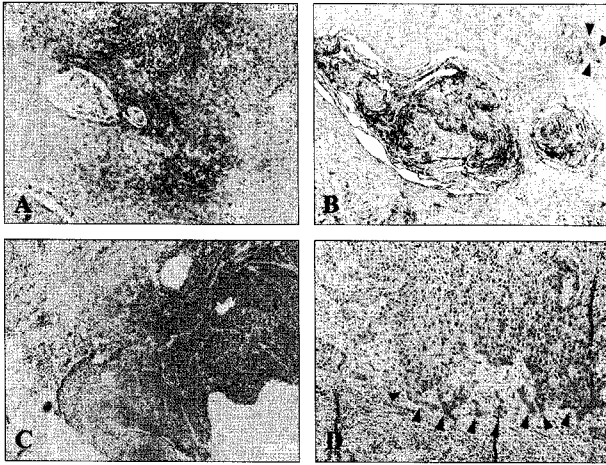
혈청과 1% 정상 양혈청을 PBS에 섞은 단백질 차단액에 20분간 반응시켰다. 단백질 차단액 제거 후 단백질 차단액에 일차항체를 적용하여 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 밤새 결합시켰다. 일차항체는 제조사에서 제시한 희석율에 따라 VEGF-C (1:50), VEGF-D (1:50), VEGFR-3 (1:100)의 비율로 희석하여 사용하였다. 음성대조 표본은 PBS만을 적용하였다. PBS로 3분간 3차례 수세하고 단백질 차단액을 10분간 적용한 후, 단백질 차단액을 제거하고 단백질 차단액에 1:500으로 희석시킨 이차항체인 goat anti-rabbit HRP를 상온에서 30분 동안 반응시켰다. 슬라이드를 PBS로 3분간 3차례 수세 후, 발색반응을 위하여 DAB을 적용하였다. 이때 발색반응을 현미경으로 확인해가며 적정시간 적용하되 5분을 넘지 않도록 하였다. 증류수로 3분간 3회 수세 후, 헤마톡실린 (Gill's hematoxylin, Sigma, U.S.A.)으로 대조염색을 50초간 시행하였다. 흐르는 증류수로 대조염색을 중지시키고 세포핵을 푸른색으로 강조하기 위하여 PBS를 30-60초간 적용하였다. 증류수로 모든 염기성분이 제거되도록 철저히 수세한 후 마운트를 2-3방울 적용하여 고정하였다.

## 4. 림프관 밀도 (Lymphatic Vessel Density, LVD)

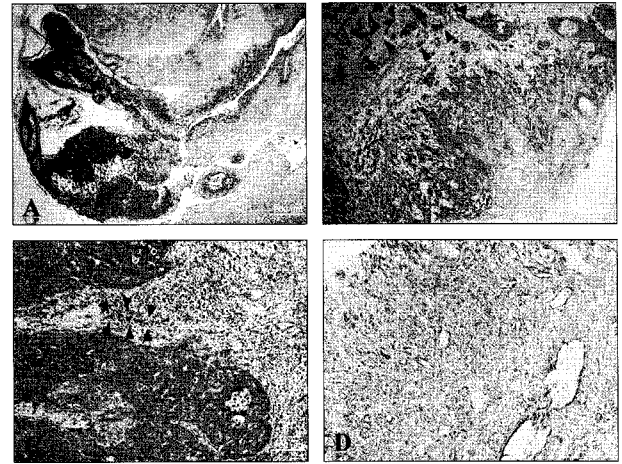
림프관 밀도를 측정하기 위하여 D2-40 항체를 적용하여 면역조직화학염색을 시행하였다. 즉 전술한 바와 같이 파라핀 포매된 조직 슬라이드를 치리한 후 별도의 항원성 회복 단계를 시행하지 않고, 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  메탄올 용액과 단백질 차단액을 반응시켰다. 단백질 차단액 제거 후 단백질 차단액에 일차항체를 1:50의 비율로 적용하여 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 밤새 결합시켰다. 이 후 통상적인 과정을 진행하였고, 발색반응을 위하여 DAB을 적용하였고 대조염색을 시행하였다. 실험군과 대조군의 대표적인 슬라이드 5장을 선택하여  $\times 200$  배율 현미경야에서 슬라이드 당 4부위씩 종양조직의 부위 (1부위는 0.039  $\text{mm}^2$ )를 선택하였다. 선택된 부위에서 D2-40 항체에 의하여 염색된 내피세포로 이루어진 림프관의 숫자를 계수하여 그 평균치를 비교, 분석하였다.

## 5. 자료분석 및 통계

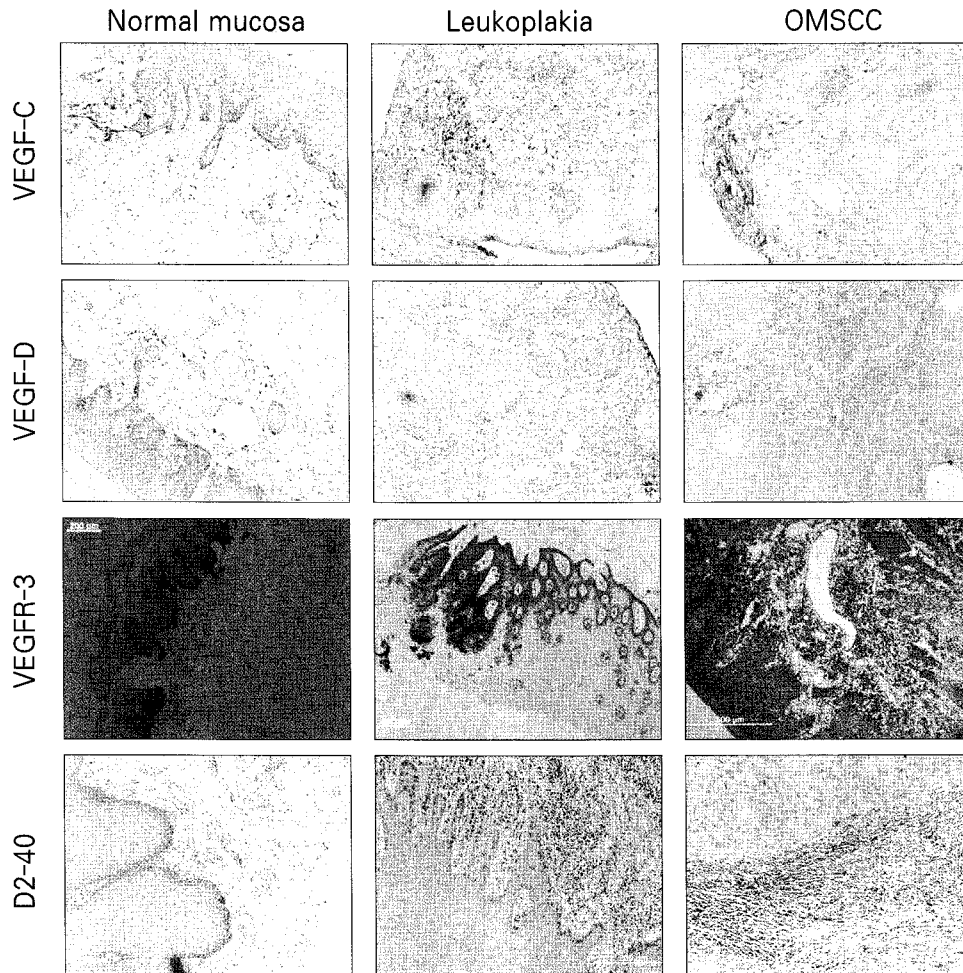
각 인자의 면역조직화학 염색에 대한 양성반응을 확인하고 그 분포 부위를 확인하기 위해서 대조염색을 시행한 슬라이드를 제작하였다. 대표적인 슬라이드 5장을 선택하여  $\times 200$  배율 현미경야에서 슬라이드 당 4부위씩 종양조직의 부위 (1부위는 0.039  $\text{mm}^2$ )를 선택하였다. 선택된 화상을 CCD 카메라 (Olympus DP70 digital microscope camera; Olympus Corporation, Tokyo, Japan)를 이용하여 컴퓨터에 입력하고 관찰하였다. DAB에 의해 양성반응이 나타난 부위를 SigmaScan Pro 영상분석 소프트웨어



**Fig. 1.** Immunostaining for VEGF-C and VEGF-D in oral mucosal squamous cell carcinoma lesions. VEGF-C immunopositivity in the cytoplasm of tumor cells (A,  $\times 200$ ) and tumor-associated endothelial cells (arrow head) at the periphery of the tumor cells (B,  $\times 200$ ). VEGF-D expression was found in the cytoplasm of tumor cells (C,  $\times 100$ ). The immunoreactivity of VEGF-D was up-regulated at the infiltrating tumor portion (arrow head ; D,  $\times 200$ ).



**Fig. 2.** Immunostaining for VEGFR-3 in oral mucosal squamous cell carcinoma lesions. VEGFR-3 expression was found on the cell surface membrane of neoplastic cells (A,  $\times 100$ ). Infiltrative tumor islands showed stronger expression of VEGFR-3 (arrow head ; B,  $\times 100$ ). Some stromal cells (arrow head ; C,  $\times 200$ ) and lots of tumor associated endothelial cells (D,  $\times 200$ ) demonstrated VEGFR-3 immunopositivity.



**Fig. 3.** Expression of lymphangiogenic factors and LVD (lymphatic vessel density) in the tissues of normal mucosa, leukoplakia, and oral mucosal SCC.

(SigmaScan Pro 5.0, SPSS Science, U.S.A)를 통해 표시하고, 그 분포 부위를 확인하였다.

또한 VEGF-C와 VEGFR-3에 대한 면역조직화학 염색에 대한 양성반응의 강도, 즉 발현 정도에 대한 실험군과 대조군간의 정량적 비교분석을 위하여 대조염색을 시행하지 않은 슬라이드를 제작하였다.  $\times 200$  배율 현미경야에서 슬라이드 당 4부위씩 종양조직의 4부위 (1부위는  $0.039 \text{ mm}^2$ )를 선택하였다. 양성반응 확인 시와 같이 선택된 화상을 CCD 카메라를 이용하여 컴퓨터에 입력하였다. 발현 정도의 비교를 위하여 SigmaScan Pro 영상분석 소프트웨어에서 DAB에 의한 양성반응의 강도를 OD (optical density)값으로 수치화한 후 평가하였다. OD값 측정 시에는 계측자에 의해 대표적인 염색이 시행되었다고 생각되는 부위를 무작위적으로 설정 후, 목표지점에서의 수치를 측정하고 해당 슬라이드에서의 배경 염색 (background staining)된 수치를 빼서 데이터로 이용하였다. 실험군과 대조군간의 양성반응의 강도 비교는 Student t-test를 이용하여 통계처리 하였다. 통계분석 시 0.05이하의 P값을 유의성 있는 차이로 인정하였다.

### III. 연구 결과

#### 1. 구강암에서 VEGF-C/VEGF-D의 발현 및 분포

구강점막 편평상피세포암 조직에서 림프관 형성관련 성장인자인 VEGF-C/VEGF-D의 발현도와 그 분포를 면역조직화학염색을 통하여 결정하였다. 그 결과 VEGF-C는 18례의 구강암 표본 중 13례에서 육안적으로 약하거나 중등도의 발현이 관찰되었다. 종양세포의 세포질 뿐만 아니라 종양세포 주변 간질 부위에 존재하는 내피세포들에서도 그 발현이 관찰되었다 (Fig. 1-A, B). VEGF-D의 경우 18례의 구강암 표본 중 10례에서 육안적으로 약한 정도의 발현이 관찰되었으며, 발현 부위는 정상조직으로 침투해 들어가는 종양세포의 세포질과 종양세포 주변의 내피세포에서 주로 발현되었다 (Fig. 1-C, D).

#### 2. 구강암에서 VEGFR-3의 발현 및 분포

구강점막 편평상피세포암 조직에서 림프관 형성관련 수용체인 VEGFR-3의 발현 정도를 면역조직화학염색을 통하여 결정하였다. 그 결과 VEGFR-3는 18례의 구강암 표본 중 16례에서 육안적으로 중등도에서 강한 정도의 발현이 관찰되었다. 내피세포 뿐만 아니라 많은 종양세포의 세포표면에서 발현되었으며 (Fig. 2-A), 특히 주변조직으로 침투해 들어가는 종양세포군에서는 강하게 발현되는 양상이 관찰되었다 (Fig. 2-B). 종양세포 외에도 섬유아세포를 포함한 많

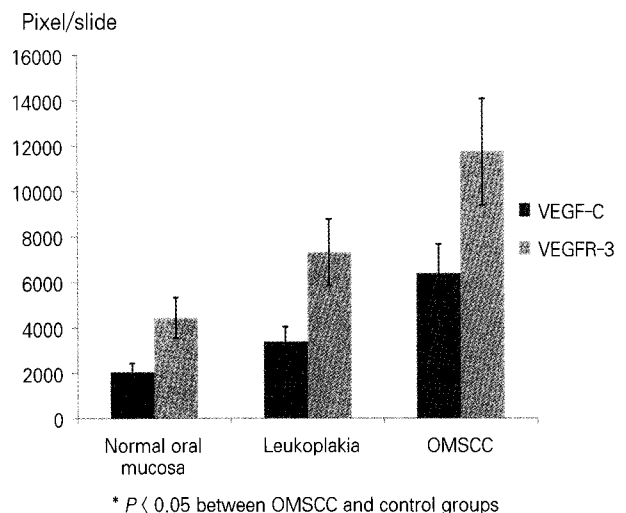
은 간질세포 (Fig. 2-C)와 대부분의 종양관련 혈관/림프관 내피세포 (Fig. 2-D)에서도 강한 발현을 나타내었다.

#### 3. 구강암에서 VEGF-C/VEGFR-3의 과발현

구강점막 편평상피세포암 조직에서 림프관 형성 주 성장인자인 VEGF-C와 VEGFR-3의 과발현 여부를 정상 구강점막과 백반증 병소와의 비교를 통하여 결정하였다. 그 결과 대조군 조직인 정상 구강점막과 백반증에서 VEGF-C와 VEGFR-3는 정상적인 상피층의 기저부에 존재하는 세포층과 과각화 병소의 일부 상피세포, 그리고 주변의 정상적인 내피세포에서 약하게 발현되는 양상이 관찰되었다. 발현 정도에 대한 정량분석 결과 VEGF-C와 VEGFR-3의 전체적인 발현 정도는 백반증이나 정상 구강점막에서보다 구강암 종물 조직에서 유의성 있게 과발현 되었다 ( $P < 0.05$ , Fig. 3, 4).

#### 4. LVD

실험군과 대조군의 미세림프관밀도를 결정하기 위하여 D2-40 항체로 염색된 림프관을 계수하여 평균과 표준편차를 구하였다. 그 결과 구강점막 편평상피세포암 조직에서 LVD는  $21.4 \pm 6.5$ 로 측정되어 백반증 조직에서의  $9.6 \pm 5.4$ 보다 유의하게 높았다 (Fig. 3).



**Fig. 4.** Quantitative analysis of VEGF-C and VEGFR-3 immunostaining. Absorbance determined as described in "Materials and Methods". Degree of VEGF-C and VEGFR-3 immunopositivity was significantly higher in oral mucosal SCC than in normal mucosa or in leukoplakia ( $P < 0.05$ ).

#### IV. 총괄 및 고찰

구강점막 편평상피세포암종 (OMSCC)은 대표적인 구강암으로 두경부 편평상피세포암에서와 같이 임상적으로 림프관을 통하여 전이되는 경향이 강하여, 초진시 림프절 전이병소의 존재는 대표적으로 불량한 예후 인자로 평가되고 있다.<sup>17)</sup> 따라서 림프관형성 성장인자들이 구강점막 편평상피세포암에서 어느정도 어떤 방식으로 발현되어 그 종양생물학적 영향을 미치는가는 규명해야 할 과제이다. 본 연구진은 선행연구를 통하여 OMSCC으로부터 확립된 세포주 5종을 이용하여 VEGFR-3와 그 리간드인 VEGF-C와 VEGF-D의 발현여부를 RT-PCR, 웨스턴 블롯팅, 그리고 ELISA로 검색하였다. 그 결과 구강점막 편평상피세포암 종양세포에서도 VEGF-C mRNA가 발현되고, 림프관형성 관련 세포표면 수용체인 VEGFR-3가 존재함을 제시하였다. 또한 7종류의 구강암 수술조직에 대한 웨스턴 블롯팅 결과 모든 구강점막 편평상피세포암 종물에서 VEGF-C와 VEGFR-3 단백질이 발현됨을 보고하였다.<sup>18)</sup>

본 연구에서는 선행연구에서 도출된 결과인, 종양세포와 종양조직 총단백에서 검출된 VEGFR-3와 그 리간드가 실제 종양조직 표본에서 어떤 발현 분포를 갖는지를 면역조직화학염색을 통하여 밝히고자 하였다. 그 결과 검색된 표본의 수는 18개로 충분치 않았으나 전반적인 추세는 파악하여 의미있는 결론을 도출하였다. 즉 림프관 형성 성장인자인 VEGF-C와 VEGF-D 단백질이 종양세포 주변의 종양관련 내피세포 뿐만 아니라 많은 표본의 종양세포에서 육안적으로 약하거나 중등도로 발현됨이 관찰되었다. 특히 이들 성장인자들이 종양세포 중에서도 주변 조직으로 침투해 들어가는 종양세포군의 세포질에서 강하게 발현되어 이들 인자들이 구강암 종양세포의 파급에 중요한 역할을 함을 암시하였다. 또한 종양 미세환경 (tumor microenvironments) 이 배제된 세포주를 적용한 선행실험에서 VEGF-D가 발현되지 않았고, 본 실험에서도 검색된 표본 중 VEGF-C의 발현빈도가 72%이나 VEGF-D의 발현빈도는 56%로 비교적 낮음을 고려해볼 때, OMSCC에서의 주 림프관 형성인자는 VEGF-C임을 추정할 수 있었다. 조직학적으로 동일한 편평상피세포암인 자궁경부암 조직에 대한 Van Trappen 등의 연구에 의하면 암화과정 중 결체조직으로의 침투성이 증가하는 단계에서 VEGF-D가 종양관련 혈관/림프관 내피세포 뿐만 아니라 50%의 표본에서 상피내 종양세포에서도 강하게 발현되었다는 보고와<sup>19)</sup> 유사한 결과이다.

본 실험에서 VEGF-C 단백질의 경우 전반적으로 VEGF-D 단백질보다 구강암에서의 발현빈도가 증가된 양상이었다. VEGF-C 단백질은 종양세포 주변의 혈관/림프관 내피세포 뿐만 아니라 종양세포의 세포질에서도 발현됨을 관찰할 수 있었다. 일반적으로 VEGF-C는 VEGFR-3와 VEGFR-2

를 통해서 종양생물학적 신호를 전달하여 림프관과 혈관의 성장을 일으키는 인자로서 최근의 연구에 의하여 주기능은 림프관 내피세포에 우세하게 발현되는 VEGFR-3의 리간드로 작용하여 림프관 성장을 조절하는 것으로 밝혀졌다.<sup>20)</sup> Shintani 등은 98개의 구강 편평상피세포암 조직에 대한 면역조직화학염색을 시행하여 66개 샘플에서 VEGF-C가, 54개 샘플에서 VEGF-D가 발현되었고, VEGF-C와 VEGF-D 단백질은 림프절 전이-음성 종양보다는 림프절 전이-양성 종양에서 강하게 발현되는 경향이 있다고 보고하였다.<sup>15)</sup> 본 연구에서는 축적된 데이터 부족으로 VEGF 양성인 표본이 임상적으로 림프절 전이병소와 연관된 병기가 진행되었는지는 검증하지 못하였다.

VEGFR-3는 림프관 내피세포에 발현되는 주 림프관형성 매개인자(mediator)이다.<sup>21)</sup> Neuchrist 등은 VEGF-C와 그 수용체인 VEGFR-3가 정상조직에 비교하여 두경부 편평상피세포암 조직에서 상향조절 (upregulation)되어 있음을 보고하였다.<sup>13)</sup> 본 실험에서도 VEGFR-3의 발현정도를 정상 구강점막과 구강점막에 발생한 백반증 병소에서와 정량적으로 비교하여 보았을 때 유의하게 OMSCC에서 과발현됨이 관찰되어 VEGFR-3가 OMSCC의 성장과 전이에 중요한 역할을 함을 알 수 있었다. 또한 종양관련 내피세포와 종양세포 외에도 많은 간질세포에서도 VEGFR-3의 발현이 관찰되었는데 종양세포에서 VEGF-C/D의 분비가 균질하지 않고 약하기 때문에 종양세포와 간질세포간의 paracrine growth loop의 가능성을 추정하게 하였다. Schoppmann 등도 자궁경부암 조직에서의 연구를 통해 간질에 존재하는 종양관련 마크로파지가 VEGF-C를 발현하고, 결과적으로 림프관 형성과 종양세포의 파급에 관여함을 제시한 바 있다.<sup>22)</sup>

성숙한 림프관 내피세포는 세포표면 표지자인 LYVE-1과 podoplanin을 발현하며, D2-40 항체는 림프관 형성에 중요한 뮤신형 막단백 (mucin-type transmembrane glycoprotein)인 podoplanin의 고정저항성 (fixation-resistant) 에피토프를 감지함으로써 포르말린 고정을 거쳐 파라핀에 포매된 조직에서도 림프관을 식별할 수 있다.<sup>23)</sup> 본 연구에서도 D2-40 항체를 적용하여 혈관과 구분되는 podoplanin-양성 림프관을 계수함으로써 림프관밀도 (LVD)를 규정하였다. LVD는 기존의 방법<sup>24)</sup> 등을 참고로 하여 본 실험에서 관찰되는 특성, 즉 종물내에서 림프관의 분포가 종양세포군 주위에 집중되는 양상을 고려하여 연구 방법에서 기술한 바와 같이 결정하였다. 따라서 본 결과에서 제시된 LVD는 종양세포 주변의 림프관 (peritumoral lymphatics)에 비중을 두었는데 Valencak 등은 종물 주변의 신생 림프관이 국소 림프절 전이와 환자 생존을 저하와 상관관계가 있다고 보고한 바 있다.<sup>25)</sup> Ohno 등은 구강암 조직에 대한 면역조직화학염색을 통한 연구에서 종양관련

혈관 신형성은 종물내에서 전체적으로 증가되어 진행되지만, 림프관 형성의 경우 침투해 들어가는 심부 종물 부위에서는 그 분포가 감소되어 있는데 이는 이 부위에서 VEGF-C의 발현이 감소되어 있기 때문이고, 정상 조직과 비교해 보았을 때 종물의 심부보다는 표층에서 림프관 신형성이 증가되어 있다고 보고한 바 있다.<sup>26)</sup> 본 연구에서 의미가 있는 종양세포 주변의 림프관 내피세포들이 기존의 림프관들이 압축된 것인지 증식성이 있는지는 추후 연구를 통하여 규명해야 할 것이다.

18례의 OMSCC 수술조직에서 시행된 면역조직화학적 연구를 통하여 본 연구진의 선행연구에서 결론지어진 VEGF-C/VEGFR-3 발현의 조직학적 분포가 파악되었다. 즉 VEGF-D의 경우 일부 증례의 종양세포에서도 직접적으로 발현되고 또한 종양세포 주변의 간질 내피세포에 발현되는 것을 관찰할 수 있었으며, VEGF-C/VEGFR-3의 경우 내피세포 뿐만 아니라 종양세포에서도 강하게 발현되는 것이 확인되었다. 최근의 연구에 의하면 내피세포에 독립적으로 발현된다는 VEGF 수용체들이 빈번하게 고행 암종의 종양세포를 포함한 비내피세포에서도 발현되고, 부분적으로는 병리적인 환경에서 발견되고 있음이 제시되고 있다.<sup>27,28)</sup> 즉 대장암 종양세포와 췌장암 세포주 및 원발성 암종에서 VEGFR-1 발현이 보고된<sup>29,30)</sup> 바 있고, VEGFR-2 또한 췌장암, 유방암, 두경부 편평상피세포암종 등의 인간 암종과 세포주에서 발현됨이 보고되었다.<sup>27,31)</sup> 또한 VEGFR-3와 VEGF-C, VEGF-D의 활성이 유방암과 흑색종 종양세포에서 상향조절되어, 그 영향으로 림프절 전이가 촉진되는 것으로 보고되었다.<sup>32,33)</sup> 또한 췌장암의 종양세포에서 VEGFR-3와 VEGF-C의 동반 발현은 림프관에의 침습과 림프절로의 전이 증가와 연관된다고 보고되었다.<sup>34)</sup> 이러한 종양세포에서의 VEGF 수용체의 직접적인 발현과 활성화는 종양세포의 이주와 침습과 밀접한 관계가 있다고 보고되었다.<sup>27)</sup> 게다가, 종양세포에서 VEGFR-2 매개 신호전달은 자가분비적 자극기전 (autocrine activation loop)을 형성한다는 증거가 제시되어 종양세포 자신이 VEGF 발현을 유지함으로써 종양생물학적 기능을 유지한다는 것으로 이해할 수 있다.<sup>35)</sup>

위의 문헌보고와 본 연구결과들을 종합해 볼때 OMSCC 종양세포로부터 분비된 VEGF-C가 종양세포 주변에 새로운 림프관 형성을 유도함으로써 림프관 밀도를 증가시키고, 증가된 림프계 공간을 통하여 침투성이 강한 종양세포군이 유입되어 국소 림프절 전이병소를 형성할 수 있음을 추정케 한다. Su 등은 문헌고찰을 통해 본 연구에서 관찰된 바와 같은 현상인 종물에서의 VEGF-C/VEGFR-3 신호전달계가 림프관 내피세포에 발현됨으로써 림프관 형성을 증가시킴으로써 전이과정을 촉진하고, 몇몇 고행종양의 종양세포에 발현됨으로써 종양세포의 운동성과 주변조직으로의 침

투성을 증가시킴으로써 종양세포 전이를 촉진함을 제시한 바 있다.<sup>36)</sup>

결론적으로 많은 증례의 OMSCC 종양세포는 자체적으로 VEGFR-3를 발현하고 VEGF-C를 분비함으로써 종양의 진행과정을 조절한다고 추정된다. 따라서 VEGF가 VEGFR에 부착하는 것을 방해하거나 VEGFR의 기능을 억제하는 것은 단지 순수하게 내피세포에 작용하여 혈관형성 혹은 림프관형성 억제 역할만 하는 게 아니라 종양세포에 중요한 직접적인 효과를 줄 수 있다고 볼 수 있다. 하지만, 종양세포 자체에서 활성화된 VEGFR의 신호와 기능에 대한 생물학적 효과에 대한 연구가 아직 부족한 상태이다. 따라서 종양세포와 내피세포에 있는 VEGFR-3와 VEGF-C/D의 생물학적 기능에 대한 이해를 위한 추가적인 연구가 이루어져야 할 것이다.

## References

1. Pepper MS : Lymphangiogenesis and tumor metastasis: myth or reality? Clin Cancer Res 7 : 462, 2001.
2. Saharinen P, Tammela T, Karkkainen MJ *et al* : Lymphatic vasculature: development, molecular regulation and role in tumor metastasis and inflammation. Trends Immunol 25 : 387, 2004.
3. Achen MG, Stacker SA : Tumor lymphangiogenesis and metastatic spread - New players begin to emerge. Int J Cancer 119 : 1755, 2006.
4. Zeng Y, Opekin K, Baldwin ME *et al* : Expression of cascar endothelial growth factor receptor-3 by lymphatic endothelial cells is associated with lymph node metastasis in prostate cancer. Clinical Cancer Reserch 10 : 5137, 2004.
5. Stacker SA, Achen MG, Jussila L *et al* : Lymphangiogenesis and cancer metastasis Nat Rev Cancer 2 : 573, 2002.
6. Brychtova S, Bezdekova M, Brychta T *et al* : The role of vascular endothelial growth factors and their receptors in malignant melanomas. Neoplasma 55(4) : 273, 2008.
7. Tanaka K, Miki C, Wakuda R *et al* : Circulating level of hepatocyte growth factor as a useful tumor marker in patient with early-stage gastric carcinoma. Scand L Gastroenterol 39 : 754, 2004.
8. Chang LK, Garcia-Cardena G, Farnebo F *et al* : Dose-dependent response of FGF-2 for lymphangiogenesis. Proc Natl Acad Sci USA 101 : 11658, 2004.
9. Stiligoi C, de Luca A, Cascone I *et al* : Angiopoietin-2 expression in breast cancer correlates with lymph node invasion and short survival. Int J Cancer 103 : 466, 2003.
10. Cao R, Bjorndahl MA, Religa P *et al* : PDGF-BB induces intratumoral lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. Cancer Cell 6 : 333, 2004.
11. Bjorndahl M, Cao R, Nissen LJ *et al* : Insulin-like growth factors 1 and 2 induce lymphangiogenesis in vivo. Proc Natl Acad Sci USA 102 : 15593, 2005.
12. O-charoenrat P, Rhys-Evans P, Eccles SA : Expression of vascular endothelial growth factor family members in head and neck squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis. Cancer 92 : 556, 2001.
13. Neuchrist C, Erovic BM, Handisurya A *et al* : Vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial



- growth factor receptor 3 expression in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Head Neck*. 2003 Jun;25(6): 464-474.
14. Sedivy R, Mannagetta JB, Battistutti W *et al* : Expression of vascular endothelial growth factor-C correlates with the lymphatic microvessel density and the nodal status un oral squamous cell cancer. *J Oral Pathol Med*. 2003 Oct 15;146(2) 455-460.
  15. Shintani S, Li C, Ishikawa T *et al* : Expression of vascular endothelial growth factor A, B, C, and D in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 40 : 13, 2004.
  16. Miyahara M, Tanuma JI, Sugihara K *et al* : Tumor lymphangiogenesis correlates with lymph node metastasis and clinicopathologic parameters in oral squamous cell carcinoma. *Cancer*. 2007 Sep 15;110(6): 1287-1294.
  17. Grandi C, Alloisio M, Moglia D *et al* : Prognostic significance of lymphatic spread in head and neck carcinomas: Therapeutic implications. *Head Neck Surg* 8 : 67, 1985.
  18. Park YW, Kim SG, Kim SH *et al* : Gene expression for lymphangiogenic factors in oral mucosal squamous cell carcinoma. *J Kor Acad Maxillofac Plast Reconst Surg* 31(6) : 453, 2009.
  19. Van Trappen PO, Steele D, Lowe DG *et al* : Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF-D, and their receptor VEGFR-3, during different stages of cervical carcinogenesis. *J Pathol* 201 : 544, 2003.
  20. Witte D, Thomas A, Ali N *et al* : Expression of the vascular endothelial growth factor receptor-3(VEGFR-3) and its ligand VEGF-C in human colorectal adenocarcinoma. *Anticancer Res* 22(3) : 1463, 2002.
  21. He Y, Rajantie I, Pajusola K. *et al* : Vascular endothelial cell growth factor receptor 3-mediated activation of lymphatic endothelium is crucial for tumor cell entry and spread via lymphatic vessels. *Cancer Res* 65 : 4739, 2005.
  22. Schoppmann SF, Birner P, Stockl J *et al* : Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. *Amer J of Pathol* 161(3) : 947, 2002.
  23. Gombos Z, Xu X, Chu CS *et al* : Peritumoral lymphatic vessel density and vascular endothelial growth factor C expression in early stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Clin Cancer Res* 11 : 8364, 2005.
  24. Weidner N, Semple J, Welch W *et al* : Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast cancer. *N Engl J Med* 324 : 1, 1991.
  25. Valencak J, Heere-Ress E, Kopp T *et al* : Selective immunohistochemical staining shows significant prognostic influence of lymphatic and blood vessels in patients with malignant melanoma. *Eur J Cancer* 40 : 358, 2004.
  26. Ohno F, Nacknishi H, Abe A *et al* : Regional difference in intratumoral lymphangiogenesis of oral squamous cell carcinoma evaluated by immunohistochemistry using D2-40 and podoplanin antibody: an analysis in comparison with angiogenesis. *J Oral Pathol Med* 36 : 281, 2007.
  27. Neuchrist C, Erovic BM, Handisurya A *et al* : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 (VEGFR2) Expression in Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck. *Laryngoscope* 111 : 1834, 2001.
  28. Masood R, Cai J, Zheng T *et al* : Vascular endothelial growth factor(VEGF) is an autocrine growth factor for VEGF receptor-positive human tumors. *Blood* 98 : 1904, 2001.
  29. Wey JS, Stoeltzing O, Ellis LM : Vascular endothelial growth factor receptors: expression and function in solid tumors. *Clin Adv Hematol Onco* 2(1) : 37, 2004.
  30. Yang AD, Camp ER, Fan F *et al* : Vascular endothelial growth factor receptor-1 activation mediates epithelial to mesenchymal transtion in human pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res* 66 : 46, 2006.
  31. Moser C, Lang SA, Stoeltzing O : The direct effects of anti-vascular endothelial growth factor therapy on tumor cells. *Clin Colorectal Cancer* 6(8) : 564, 2007.
  32. Valtola R, Salven P, Heikkilä P *et al* : VEGFR-3 and its ligand VEGF-C are associated with angiogenesis in breast cancer. *Am J Pathol* 154(5) : 1381, 1999.
  33. Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME *et al* : VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat Med* 7 : 186, 2001.
  34. Tang RF, Itakura J, Aikawa T *et al* : Overexpression of lymphangiogenic growth factor VEGF-C in human pancreatic cancer. *Pancreas* 22(3) : 285, 2001.
  35. Gee MF, Tsuchida R, Eichler-Jonsson C *et al* : Vascular endothelial growth factor acts in an autocrine manner in rhabdomyosarcoma cell lines and can be inhibited with all-trans-retinoic acid. *Oncogene* 24(54) : 8025, 2005.
  36. Su JL, Yen CJ, Chen PS *et al* : The role of the VEGF-C/VEGFR-3 axis in cancer progression. *Br J Cancer* 96 : 541, 2007.

**저자 연락처**

우편번호 210-702  
 강원도 강릉시 강릉대학로 120번지  
 강릉원주대학교 치과대학 구강악안면외과학교실  
**박영욱**

원고 접수일 2009년 12월 28일  
 게재 확정일 2010년 01월 20일

**Reprint Requests**

**Young-Wook Park**  
 Dept. OMFs, College of Dentistry, Gangneung-Wonju National University  
 Gangneung Daehangno 120, Gangneung, Gangwon-do, 210-702,  
 South Korea  
 Tel: 82-33-640-3102 Fax: 82-33-640-3103  
 E-mail: ywpark@gwnu.ac.kr

Paper received 28 December 2009  
 Paper accepted 20 January 2010