

병기 IB 자궁경부암에서
혈관내피세포성장인자(VEGF)의
발현이 예후에 미치는 영향

연세대학교 대학원
의 학 과
이 익 재

병기 IB 자궁경부암에서
혈관내피세포성장인자(VEGF)의
발현이 예후에 미치는 영향

지도 박 경 란 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함




2001년 7월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

이 의 재

이익재의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 박 경 관 
심사위원 이 광 남 
심사위원 차 정 우 

연세대학교 대학원

2001년 7월 일

감사의 글

태어나서 지금까지 언제나 저와 함께 하시는 하나님을 찬양하며 감사를 드립니다.

저의 논문이 나오기까지 세심한 가르침과 깊은 관심으로 인도해 주신 박경란 교수님, 이광길 교수님, 차동수 교수님께 진심으로 감사드립니다. 또한, 본 연구의 실험에 많은 도움을 주신 병리과 직원들과 방사선종양학과 직원들에게 깊은 감사를 드립니다.

본 논문이 쓰여지는 동안 늘 든든한 후원자이셨던 부모님과 친지분들의 사랑에 감사드립니다. 그리고 항상 함께 옆에서 지켜보며 격려 해 주었던 아내 현진이에게 사랑과 고마움을 전하고, 저의 힘의 원동력이 되었던 아들 영진이에게도 사랑을 전합니다. 그 사랑을 보살펴 주신 장모님에게도 감사드립니다.

저자 씀

차 례

국문요약	1
I. 서 론	3
II. 재료 및 방법	5
1. 대상환자	5
2. 방법	5
가. 병리조직학적 검색	5
나. 면역조직화학 염색 및 결과 판정	6
다. 추적기간 및 통계학적 분석	7
III. 결 과	9
1. 병리조직학적 소견	9
2. VEGF 발현율과 예후인자들과의 상관관계	9
3. 생존율	9
4. 예후인자에 따른 생존율 분석	16
5. 재발양상	16
IV. 고 찰	22
V. 결 론	27
참고문헌	28
영문요약	33

그림 차례

그림 1. VEGF에 대한 면역조직화학염색 소견	8
그림 2. 생존율 곡선	12
그림 3. 무병생존율 곡선	13
그림 4. 치료방법에 따른 생존율 곡선	14
그림 5. 치료방법에 따른 무병생존율 곡선	15
그림 6. VEGF 발현에 따른 생존율 곡선	17
그림 7. VEGF 발현에 따른 무병생존율 곡선	18

표 차 례

표 1. 임상 및 병리학적 특성	10
표 2. VEGF 발현에 따른 임상 및 병리학적 소견	11
표 3. 예후인자에 대한 단변량분석	19
표 4. 예후인자에 대한 다변량분석	20

병기 IB 자궁경부암에서 혈관내피세포성장인자(VEGF)의 발현이 예후에 미치는 영향

본 연구에서는 자궁경부암에서 VEGF의 발현과 기존의 예후인자들인 종양의 크기, 골반내림프절의 전이, 림프계침윤, 혈관계침윤, 자궁경부 심부침윤과의 상관관계를 분석하고, 생존율을 분석하여 VEGF의 예후 예측인자로서의 임상적 의의에 대해 알아보려고 하였다.

대상환자들은 1986년 1월부터 1998년 10월까지 연세대학교 원주의과대학 원주기독병원에서 자궁경부암으로 진단 받고 근치적 자궁절제술과 양측 골반 림프절 적출술을 받은 FIGO 병기 IB인 환자 118명으로, 88명은 수술 후 화학요법이나 방사선치료가 시행되었다. VEGF 발현은 수술을 시행한 파라핀 조직을 가지고 면역조직화학염색을 시행하였다. 분석은 염색의 강도에 따라 0, +, ++, +++로 판정하였으며 0에서 ++까지를 저발현(low expression), +++를 고발현(high expression)으로 분류하였다. 118명중 고발현을 보이는 환자는 35명(30%)이었으며 VEGF 발현과 예후인자들과의 상관관계에서 자궁경부 심부침윤($p=0.009$)과 골반 내 림프절 전이($p=0.02$)에서 의미 있는 관계가 있었다. 5년 생존율과 무병생존율은 VEGF 발현이 낮을 때 각각 94.6%, 92%였고, 고발현일 때는 90.7%, 81.7%로 의미 있는 차이를 보였다($p=0.01, 0.001$). 재발양상에서 VEGF 발현이 높은 환자에서 골반 내 재발($p=0.003$)과 원격전이($p=0.02$)가 의미 있게 많았다. 다변량분석에서 생존율에 의미 있는 예후인자는 VEGF 발현($p=0.001$)과 골반 내 림프절전이($p=0.01$)였다. 무병생존율에 의미 있는 예후인자는 VEGF 발현($p=0.01$), 혈관계 침윤($P=0.02$) 그리고 종양의 크기($P=0.03$)였다.

결론적으로, 조기 자궁경부암에서 재발의 위험도가 높은 환자들을 찾아내고 기존의 치료법과 VEGF 항체등의 새로운 혈관억제요법을 병행하기에 적합한 대상 환자들을 찾아내는데 있어서 면역조직화학염색을 통한 VEGF 발현의 정도는 임상적으로 유용한 지표로 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

핵심되는 말: 자궁경부암, Vascular endothelial growth factor, 예후인자

병기 IB 자궁경부암에서
혈관내피세포성장인자(VEGF)의
발현이 예후에 미치는 영향

<지도 박 경 란 교수>

연세대학교 대학원 의학과

이 의 제

I. 서 론

자궁경부암은 보건복지부에서 발표한 1999년 한국중양암등록사업 결과에 따르면 우리나라의 여성암에서 3위로 많은 암이지만, 조기 진단될 경우 매우 높은 완치율을 보이고 있으며 병기가 IB (FIGO 병기¹)인 환자에서 수술이나 방사선치료로 72-95%정도의 5년 생존율을 보이고 있다.² 그러나 조기 병기 IB의 자궁경부암에서도 골반 내 재발이 7%, 그리고 원격전이가 13% 정도로 보고되고 있다.³ 자궁경부암의 예후인자로는 종양의 크기, 골반내 림프절 전이, 종양세포의 림프계침윤, 종양세포의 혈관계침윤, 자궁경부 심부침윤, 조직학적 유형, 조직학적 등급, 나이, 빈혈 등이 보고된 바 있다. 근래에 종양의 성장과 전이에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는 혈관형성인자에 대한 연구가 활발히 시행되면서 자궁암의 예후와 관련하여 혈관형성인자의 발현을 연구한 결과들이 보고된 바 있다.

혈관형성인자로는 acidic fibroblast growth factor, basic fibroblast growth factor, transforming growth factor- α , TGF- β , hepatocyte growth factor, tumor necrosis factor- α , angiogenin, interleukin-8 등이 알려져 있는데 그 중 혈관내피세포성장인자 (vascular endothelial growth factor, VEGF)는 혈관내피세포의 분열을 촉진하고 미세혈관의 투과성을 증가시켜서 혈관생성에 관여하는 것으로 알려져 있고,^{4,5} 여러 종양세포에서 강하게 발현되며 악성도나 예후와 상관이 있다는 보고가 많이 있다.⁶⁻¹⁴

자궁경부암에서 VEGF 발현과 예후인자들과의 상관관계에서 Tjalma등,¹⁵ Kodama등,¹⁶ Fujimoto등,¹⁷ Loncaster등¹⁸은 VEGF 발현은 예후인자들과 유의한 상관관계가 없음을 보고하였고, 생존율 분석에서 Loncaster등¹⁸의 결과에서는 VEGF의 발현이 강할수록 생존율이 감소하였고 원격전이가 의미 있게 증가하였고, 다변량 분석에서도 VEGF 발현이 가장 의미 있는 예후인자라고 하였으나 Tjalma등¹⁵은 VEGF 발현이 생존율에 의미 있는 예후인자라고 아니라고 주장하여 서로 상반된 의견을 보이고 있다. 그러나, 이 연구들은 병기 1기에서 4기까지 일부에서는 자궁경부상피내종양인 환자들도 포함하여 병의 진행 상태가 현저히 다른 환자들을 대상으로 하였다는 점과 치료방법에 있어서도 수술을 시행한 환자들과 조직검사만 시행한 환자들도 포함되어 있어 모든 환자에서 기존의 예후 인자들에 대한 조직병리학적 검사가 이루어지지 않았다는 면에서 VEGF가 예후에 미치는 영향을 정확히 알기 어려운 문제점을 안고 있다.

이에 본 연구에서는 병기 IB로 근치적 자궁적출술과 양측 골반림프절 적출술 후 기존의 예후 인자들로 알려진 종양의 크기, 골반내 림프절의 전이, 림프계침윤, 혈관계침윤, 자궁경부 심부침윤에 대하여 조직병리학적으로 확진된 환자들만을 대상으로 하여 조기 자궁경부암에서 예후 인자로서 VEGF 발현의 임상적 의의를 알아보려고 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 대상환자

1986년 1월부터 1998년 10월까지 연세대학교 원주의과대학 원주기독병원에서 자궁경부암으로 진단 받고 근치적 자궁절제술과 양측 골반림프절 적출술을 받은 FIGO 병기 IB인 환자 118명을 대상으로 하였다. 병기결정을 위해 골반 및 직장 내진과 함께 조직검사를 시행하였으며 흉부 X선 검사, 정맥성 신우조영술, 방광경과 직장경 검사를 하였고 말초혈액검사, 간기능 검사, 소변검사와 같은 일반검사를 시행하였다. 수술 후 방사선 치료가 시행된 환자가 24명(20.3%), 화학요법이 시행된 환자가 47명(39.8%), 그리고 방사선치료와 화학요법 모두 시행된 환자가 16명(13.6%)으로 모두 88명(73.7%)에서 보조요법이 시행되었다(표 1).

대부분의 환자들은 치료 후에 정기적으로 2년까지는 3개월마다, 그리고 그 이후에는 6개월 간격으로 내원 하여 검진을 받도록 권유하여 추적 관찰하였다. 환자의 나이는 24세에서 68세로 중앙연령은 47세였다.

2. 방법

가. 병리조직학적 검색

육안 소견으로 종양의 크기를 측정하였고 파라핀 포매 조직을 5 μ m두께로 박절하고 통상의 표본제작과정을 거쳐 hematoxylin-eosin염색을 시행한 슬라이드를 광학현미경으로 검사하여 조직학적 유형과, 림프절전이 유무와 림프계 침윤, 혈관계 침윤, 자궁경부 심부침윤 여부 등을 조사하였다.

나. 면역조직화학 염색 및 결과판정

파라핀 포매 조직을 5 μ m 두께로 박절하여 절편을 만든 후에 조직을 poly-L-lysine-coated slides에 부착시켜 60 $^{\circ}$ C에서 충분히 건조시켰다. 탈파라핀과 재수화과정을 거친 후 조직 내 내인성 과산화 효소의 작용을 억제하기 위하여 3% hydrogen peroxide/methanol에 10분간 처리하고 Tris buffer에 10분간 수세하였다. 일차항체로서 VEGF 단일 클론항체(Pharmingen, San Diego, CA, USA)를 1:50으로 희석하여 실온에서 하루 밤 동안 반응시킨 후 결합이 안된 항체를 Tris buffer에 10분간 수세하였다. Histostatin plus kit를 이용하여 biotinylated linked antibody(2차항체)와 30분간 반응시키고, Tris buffer에 10분간 수세하였다. 3-amino-9 ethylcarbazole에 6분간 발색한 후 흐르는 물에 세척하고 hematoxylin으로 대조염색을 한 후 발삼으로 봉합하였다.

염색된 자궁경부암 조직은 환자의 임상소견에 대한 정보가 전혀 없는 병리의사에 의해 광학현미경으로 관찰하여 종양세포의 세포질에 염색되면 양성반응으로 판독하였다. 발현 정도를 객관화하기 위해 종양세포에 염색된 염색 강도에 따라서 염색이 되지 않은 경우는 0으로, 다소 연한 정도로 염색된 것을 1+으로, 중간정도로 염색된 것을 2+으로, 진하게 염색된 것을 3+으로 판정하였다. 이 중에서 0에서 2+까지를 저발현(low expression)으로, 3+를 고발현(high expression)으로 분류하였다(그림 1).

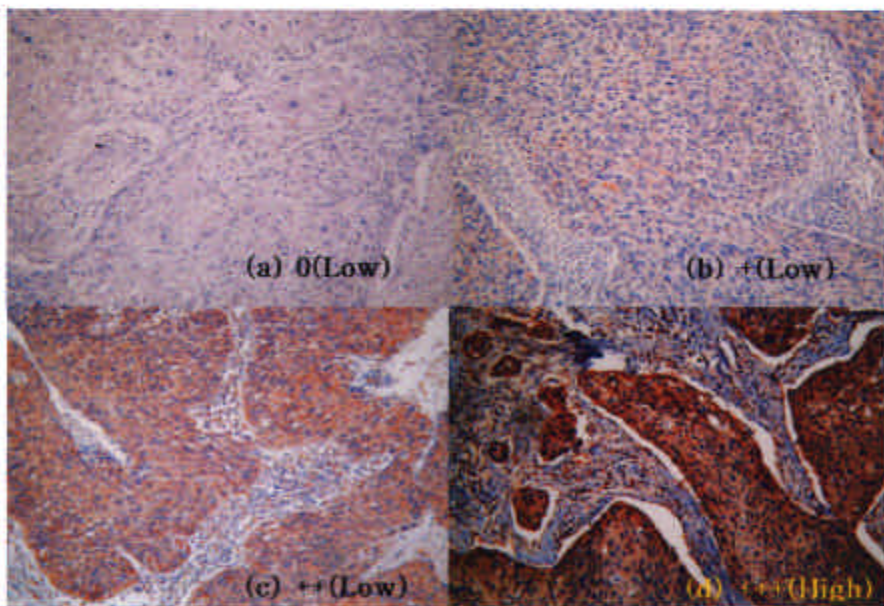
다. 추적기간 및 통계학적 분석

추적관찰기간은 24개월에서 185개월로 중앙값은 110개월이었다. VEGF 및 기존의 예후 인자와의 상관관계에 대해서 SPSS 프로그램 version 7.5를 통해 χ^2 -검정법을 이용하여 산출하였으며, 생존율과 무병생존율은

Kaplan-Meier 법에 의해 산출하였고, 생존기간의 비교는 log rank 법을 이용하여 검정을 실시하였으며 예후인자의 다변량 분석에는 Cox 모델을 이용하였다.

그림 1. VEGF에 대한 면역조직화학염색 소견. VEGF 발현 강도에 따라 전
체 염색이 되지 않을 때 0로(a), 약한 양성반응일 때 +(b), 중간정도의 양성
반응일 때 ++(c), 그리고 강한 양성반응일 때 +++로(d) 하였으며, +++이상일
때 고발현으로 분류하였다(ABC*, ×200)

* ABC, avidinbiotin complex method



III. 결 과

1. 병리조직학적 소견

조직학적 유형은 편평상피암종이 103명(87.3%)으로 가장 많았고 선암종이 10명(8.5%), 그리고 편평상피선암종이 5명(4.2%)이었다. 기존의 예후 인자들로 알려진 종양의 크기, 골반내 림프절의 전이, 림프계 침윤, 혈관계 침윤, 자궁경부 심부침윤에 대하여 보았을 때 종양의 크기가 3cm이상인 환자가 36명(30.5%)이었고 림프절의 전이가 있었던 환자가 25명(21.2%), 림프계 침윤이 31명(26.3%), 혈관계 침윤이 4명(3.4%), 그리고 자궁경부 심부침윤이 37명(31.4%)이었다(표 1).

2. VEGF 발현과 예후 인자들과의 상관관계

자궁경부암 118예 중에서 111예(90.7%)가 양성이며 11예(9.3%)가 음성이었다. VEGF 발현강도에 따른 분류에 의하면 0가 11명(9.3%), 1+가 25명(21.2%), 2+가 47명(39.8%), 그리고 3+의 고발현을 보인 환자는 35예(29.7%)이었다(표 1).

기존의 예후 인자들로 알려진 종양의 크기, 골반내 림프절의 전이, 림프계 침윤, 혈관계 침윤, 자궁경부 심부침윤과 VEGF 발현의 상관관계를 보았을 때 자궁내막침윤이 있을 때와 골반 내 림프절의 전이가 있을 때, VEGF 고발현을 보인 환자가 통계학적으로 유의하게 많았다($p=0.009, 0.02$)(표 2).

3. 생존율

5년 생존율은 94.6%이었고, 무병생존율은 92%이었다(그림 2, 3). 치료방법에 따른 생존율과 무병생존율은 치료방법간에 통계학적으로 의미 있는 차이가 없었다(그림 4,5).

표 1. 임상 및 병리조직학적 특성

변 수	환자 수 (%)
조직학적 유형	
편평상피암종	103(87.3)
편평상피선암종	5(4.2)
선암종	10(8.5)
치료방법	
수술단독	31(26.3)
수술후 방사선요법	24(20.3)
수술후 화학요법	16(13.6)
수술후 방사선 및 화학요법	47(39.8)
종양크기(cm)	
<3cm	82(69.5)
≥3cm	36(30.5)
림프절전이	
없음	93(78.8)
있음	25(21.2)
림프계침윤	
없음	87(73.7)
있음	31(26.3)
혈관계침윤	
없음	114(96.6)
있음	4(3.4)
자궁내막침윤	
없음	81(68.6)
있음	37(31.4)
VEGF 발현강도	
0	11(9.3)
+	25(21.2)
++	47(39.8)
+++	35(29.7)

표 2. VEGF 발현에 따른 임상 및 병리학적 소견

	VEGF 발현강도(%)		p 값*
	저발현	고발현	
자궁경부심부침윤			p=0.009
없음	63(77.8)	18(22.2)	
있음	20(54.1)	17(45.9)	
림프절전이			p=0.02
없음	70(75.3)	23(24.7)	
있음	13(52.0)	12(48.0)	
조직학적유형			p=0.09
편평상피암종	70(68.0)	33(32.0)	
선암종	10(100)		
편평상피선암종	3(60.0)	2(40.0)	
림프계침윤			p=0.08
없음	65(74.7)	22(25.3)	
있음	18(58.1)	13(41.9)	
종양크기(cm)			p=0.77
<3cm	57(69.5)	25(30.5)	
≥3cm	26(72.2)	10(27.8)	
혈관계침윤			p=0.84
없음	80(70.2)	34(29.8)	
있음	3(75.0)	1(25.0)	

* log rank test

그림 2. 생존율 곡선. 전체 118명의 환자들에서의 생존율을 Kaplan-meier 법에 의해 구하였을 때 5년 생존율은 95.7%였다.

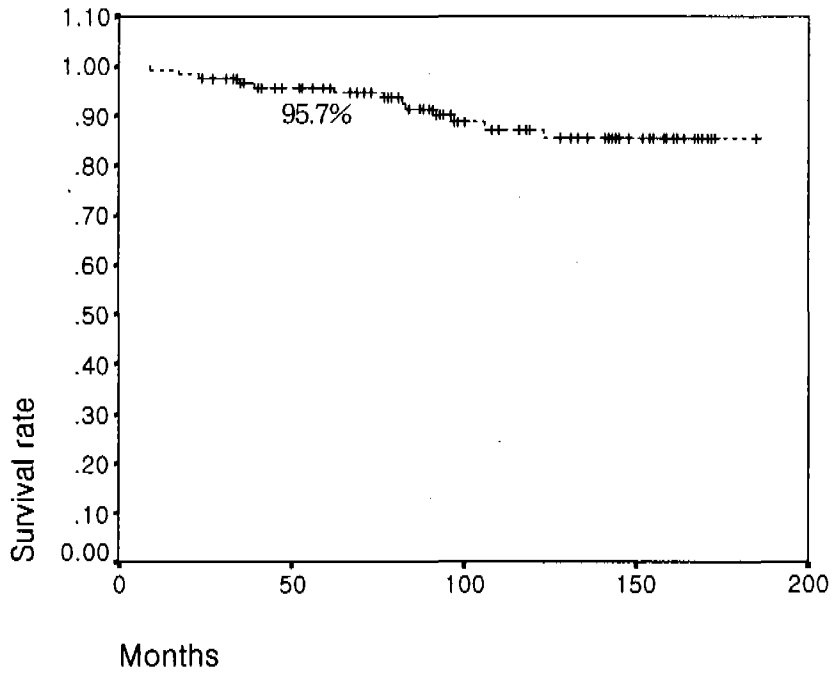


그림 3. 무병생존율 곡선. 전체 118명의 환자들에서의 무병생존율을 Kaplan-meier 법에 의해 구하였을 때 5년 생존율은 93.1%였다.

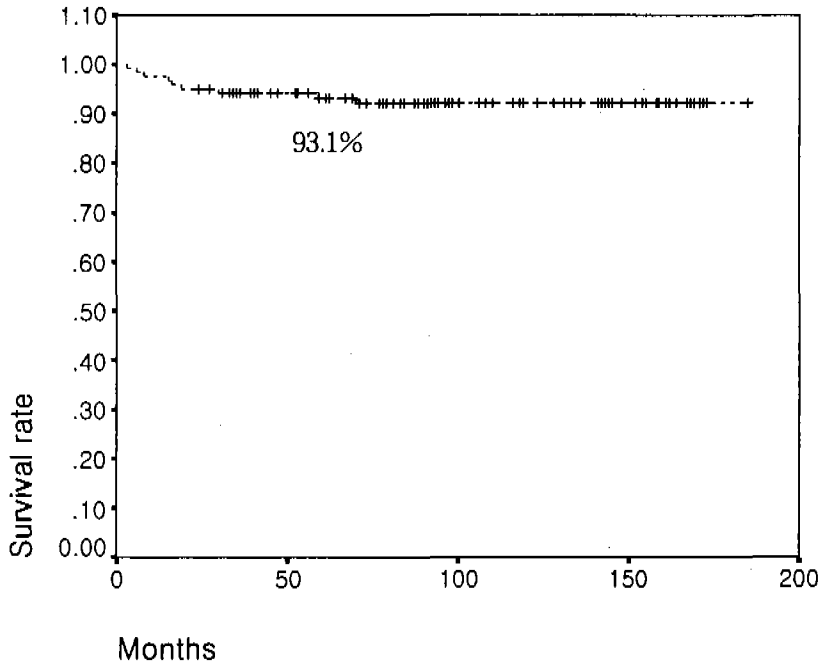


그림 4. 치료방법에 따른 생존율. 수술만 시행한 환자에서는 5년 생존율은 92.6%, 수술후 방사선치료만 시행된 환자에서는 100%, 수술후 약물치료만 시행된 환자에서는 95.6%, 수술후 방사선치료와 약물치료 모두가 시행된 환자는 94.1%였고, 치료방법에 따른 생존율의 차이는 통계학적 의미가 없었다 ($p=0.48$). OP, operation; RT, radiotherapy; CTx, chemotherapy

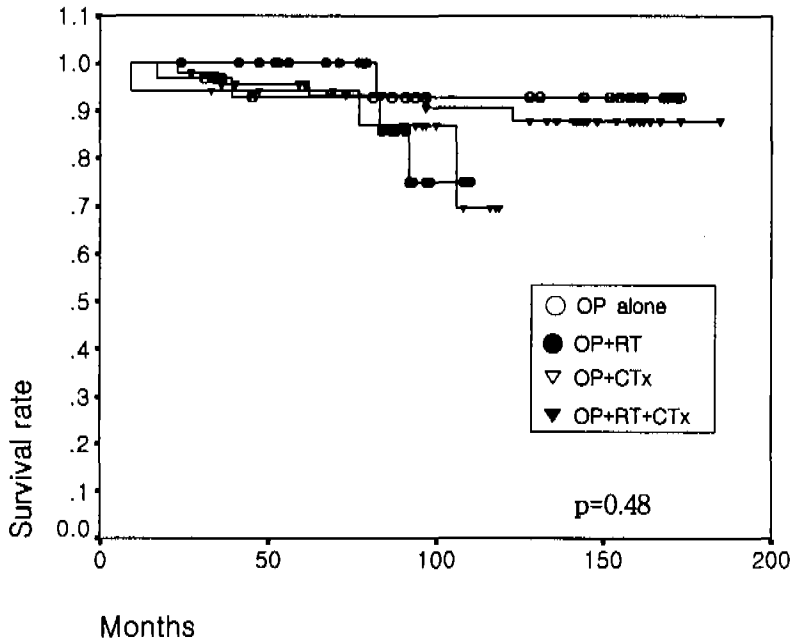
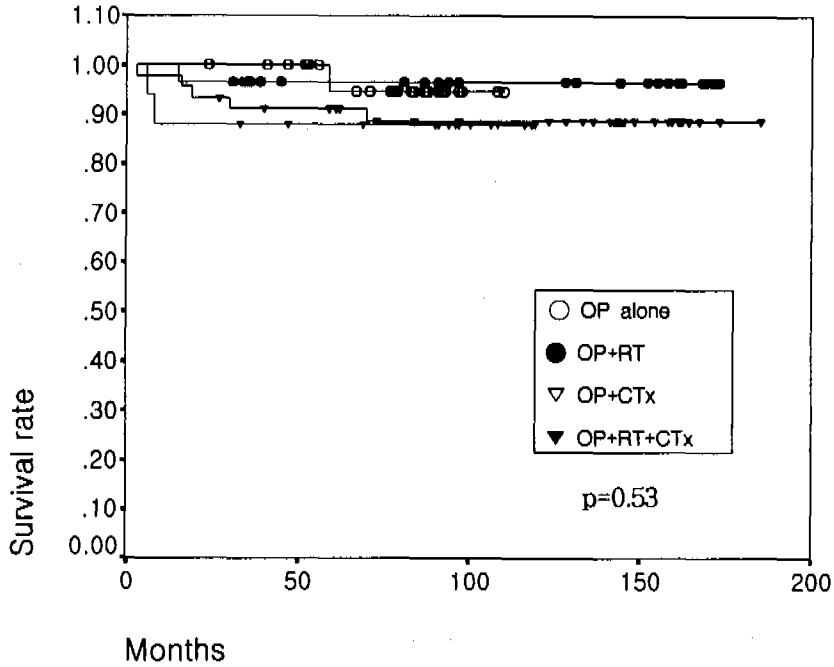


그림 5. 치료방법에 따른 무병생존율. 수술만 시행한 환자에서는 5년생존율은 96.7%, 수술후 방사선치료만 시행된 환자에서는 94.2%, 수술후 약물치료만 시행된 환자에서는 91.2%, 수술후 방사선치료와 약물치료 모두가 시행된 환자는 88.2%였고, 치료방법에 따른 생존율의 차이는 통계학적 의미가 없었다($p=0.53$). OP, operation; RT, radiotherapy; CTx, chemotherapy



4. 예후인자 분석

기존의 예후 인자들로 알려진 종양의 크기, 골반내 림프절의 전이, 림프계 침윤, 혈관계침윤, 자궁경부 심부침윤 여부와 VEGF 발현 정도에 대한 단변량분석에서 VEGF 발현 정도가 생존율과 무병생존율에 통계학적으로 유의한 차이를 보였고($p=0.01, 0.001$)(표 3, 그림 6,7), 종양의 크기는 생존율과 무병생존율에($p=0.04, 0.01$), 림프절 전이 유무는 생존율($p=0.04$)에 통계학적으로 의미 있는 차이를 나타냈으며, 그외 혈관계 침윤, 자궁경부 심부침윤, 그리고 림프계 침윤 유무에 따른 생존율의 차이는 없었다(표 3).

다변량분석의 결과에서 생존율에 의미 있는 예후인자는 VEGF 발현($p=0.001$)과 골반 내 림프절전이($p=0.01$)였다. 무병생존율에 의미 있는 예후인자로는 VEGF 발현($p=0.01$), 혈관계 침윤($P=0.02$) 그리고 종양의 크기($P=0.03$)로(표 4), VEGF 발현 정도가 예후에 가장 영향을 주는 인자임을 알 수 있었다.

5. 재발양상

재발을 골반 내 재발과 골반 외 원격전이로 나누어 분석한 결과 전체 118명중 골반 내 재발은 7명(18.3%), 원격전이는 5명(14.3%)이었다. 예후인자들과 골반 내 재발, 원격전이와의 상관관계를 살펴보았을 때, VEGF 발현이 고발현일 때 골반내 재발이 많았고($p=0.003$), 원격전이는 VEGF 발현이 고발현일때와 골반 내 림프절 전이가 있는 환자들에서 통계학적으로 의미 있게 증가하였다($p=0.02, 0.03$). 골반내 재발환자 7명중 6명, 그리고 원격전이 환자 5명 모두에서 VEGF 고발현을 보여 두 가지 형태의 재발이 모두 VEGF 발현이 높을수록 의미 있게 높았다($p=0.003$).

그림 6. VEGF 발현에 따른 생존율 곡선. VEGF 발현에 따른 생존율을 Kaplan-meier 방법으로 비교해 보았을 때, 5년 생존율이 고발현일 때 93.4%였고 저발현일 때는 97.7%로 p값 0.01로 의미 있는 차이를 보였다.

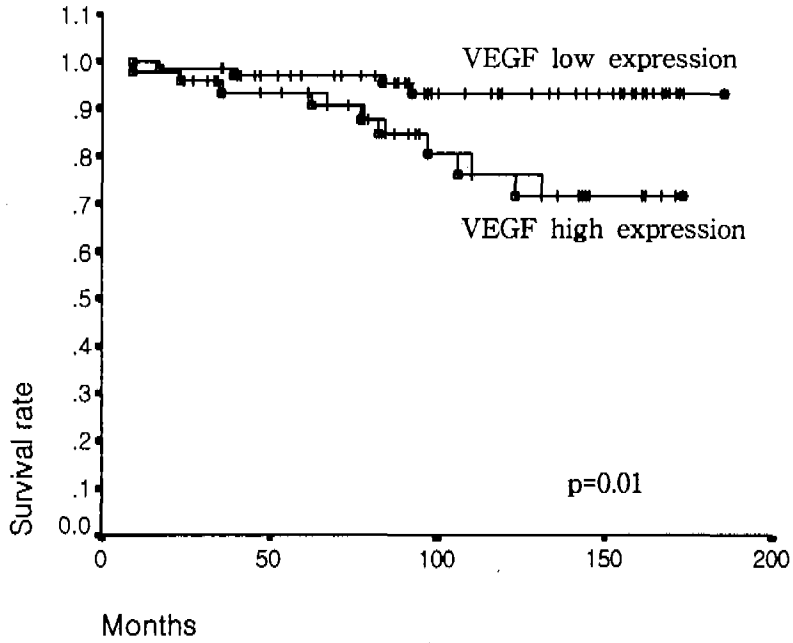


그림 7. VEGF 발현에 따른 무병생존율 곡선. VEGF 발현에 따른 무병생존율을 Kaplan-meier 방법으로 비교해 보았을 때, 5년 생존율이 고발현일 때 84.5%이었고 저발현일 때는 98.6%로 p값 0.001로 의미 있는 차이를 보였다.

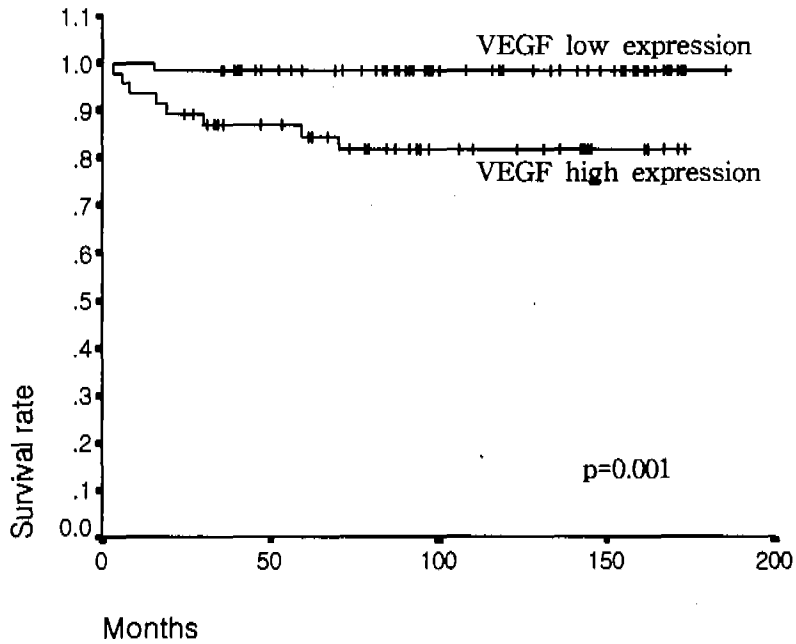


표 3. VEGF 발현강도와 임상병리조직학적 소견에 따른 생존율의 비교

	5년 생존율(%)	p 값*	5년 무병 생존율(%)	p 값*
VEGF intensity				
0,1,2	97.1	p=0.01	98.6	p<0.01
3+	93.4		84.5	
종양크기				
<3cm	98.7	p=0.04	96.1	p=0.01
≥3cm	85.6		82.8	
림프절전이				
없음	85.6	p=0.04	91.9	p=0.37
있음	63.9		88.0	
림프계침윤				
없음	94.1	p=0.99	93.1	p=0.78
있음	100.0		92.7	
혈관계침윤				
없음	93.8	p=0.22	95.5	p=0.43
있음	75.0		100.0	
자궁내막침윤				
없음	95.0	p=0.49	92.6	p=0.56
있음	97.3		93.9	

* log rank test

표 4. 예후인자에 대한 다변량분석

	생존율 (p 값*)	무병생존율 (p 값*)
VEGF 발현강도	0.008	0.01
림프절전이	0.01	0.37
혈관계침윤	0.12	0.02
종양크기	0.09	0.03
림프계침윤	0.36	0.45
혈관계침윤	0.12	0.02
자궁경부심부침윤	0.16	0.72

* cox regression

표 5. 예후인자에 따른 재발양상

	골반내 재발(Pelvic failure) p 값*	원격전이(Distant failure) p 값*
VEGF 발현강도	0.003	0.02
림프절 전이	0.622	0.03
림프계 침윤	0.46	0.75
혈관계 침윤	0.61	0.67
자궁경부침윤	0.65	0.12
종양 크기	0.91	0.64

* χ^2 검정법

IV. 고 찰

최근 신생혈관형성은 종양의 성장과 전이에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 신생혈관형성인자 중 VEGF는 혈관의 투과성을 증가시키고 종양의 성장을 위한 혈관내피세포의 분열을 촉진하여 혈관 내에서 순환하고 있던 종양세포가 쉽게 혈관 기저막을 통과할 수 있게 하고^{4,5} 플라즈미노겐 활성화계를 활성화시켜서 주변부위의 세포의 간질을 분해하여 전이가 용이하게 하는 역할을 한다¹⁹. VEGF family는 VEGF, VEGF-B, VEGF-C와 태반성장인자(placental growth factor)로 분류되며 각각 고유한 기능을 수행하여 혈관형성에 관여하는 것으로 알려져 있다.²⁰

자궁경부암에서 VEGF와 관련된 임상적 연구로 암의 진행 상태에 따른 VEGF 발현 정도에 대한 연구 결과들이 보고되어 있으나 상반된 결과를 보여주고 있다. Kodama¹⁶은 자궁경부암 병기 I에서 IVB로 진단 받은 환자 66명을 대상으로 병기와 VEGF mRNA의 관계에 대해 보았을 때 VEGF mRNA/ β -actin ratio(V/A)는 병기 IA에서 가장 높았고 병기가 높을수록 V/A ratio가 의미 있게 감소하다가 병기 IVB에서 다시 V/A ratio가 증가하였다. 한편, Fujimoto¹⁷은 자궁경부암 환자에서 VEGF에 대한 immunoassay와 mRNA에 대한 Southern blot을 이용해 정량적 분석을 시행하였는데, 병기에 따른 VEGF 발현정도와 VEGF mRNA를 비교한 결과 병기가 높을수록 VEGF mRNA의 수치가 높은 결과를 보여 Kodama¹⁶과는 상반된 결과를 보고하였다. 병기에 따른 VEGF 발현의 차이가 없는 결과들도 있었는데, Loncaster¹⁸은 병기 I에서 III까지의 환자들에서 VEGF발현에 대한 면역조직화학염색을 시행하여 발현 정도에 따라 분류하였고 이중 3+로 고발현을 보이는 환자는 31명(31%)이었으며 병기에 따른 차이는 없음을 보고하였고, Tjalma²¹은 130명의 병기 IA에서 IVB까지의 자궁경부암환자와 22명의 자궁상피내암환자들을 대상으로 VEGF에 대해 면역조직화학염색을 시행하여 고발현을 보이는 환자군과 나머지로 분류하였는데, 고발현인 환자

들은 30명(20%)이었고 역시 병기에 따른 차이는 없었다.

VEGF발현과 예후인자들과의 상관관계를 분석한 연구들에서는 Loncaster 등¹⁸이 자궁경부암 100명의 환자들을 대상으로 면역조직화학염색을 시행했을 때 조직학적 분화도, 나이, 방사선 감수성에 따라서 VEGF 발현의 차이는 없었고, Tjalma 등²¹은 VEGF 발현이 나이, 조직학적 분화도, 림프혈관계 침윤 여부, 림프절 전이와 관련이 없다고 하였고, Kodama 등¹⁶도 VEGF mRNA에 따른 종양의 크기나 자궁옆조직 침윤, 림프절 전이, 림프혈관계 침윤, 자궁내막침윤의 차이가 없었다고 주장하였다. 생존율 분석에서 Loncaster 등¹⁸의 결과에서는 VEGF의 발현이 강할수록 생존율이 감소하였고 원격전이가 의미 있게 증가하였고, 다변량 분석에서도 VEGF의 발현이 가장 의미 있는 예후인자라고 하였으나 Tjalma 등²¹은 VEGF의 발현이 생존율에 의미 있는 예후인자가 아니라고 주장하여 서로 상반된 결과를 보이고 있다.

위의 연구들의 대상 환자들은 자궁경부상피내암부터 4기까지 암의 진행 상태가 현저히 다른 환자들이 포함되었고 치료에 있어서도 2기말 이상의 병기부터는 수술이 시행되지 않았으며 조직 생검만 시행되어 골반 내 림프절 전이, 림프계 침윤, 혈관계 침윤이나 자궁내막 심부침윤등에 관하여 조직병리학적분석이 시행되지 않았기 때문에 VEGF와 예후인자와의 상관관계나 VEGF가 예후에 미치는 영향을 정확히 찾아내는데 어려움이 있다는 문제점을 안고 있다.

병기 IB와 IIA기에 국한하여 근치적자궁절제술과 양측골반림프절 절제술을 시행한 환자들에서 종양의 크기, 자궁경부 심부침윤, 림프혈관계 침윤, 자궁옆조직외 침윤이, 골반 내 림프절 전이 유무를 분석한 Cheng 등^{22,23}의 연구에 의하면 VEGF에 대한 immunoassay로 정량적 분석을 시도한 결과 VEGF 단백질 양이 종양의 크기가 클수록, 자궁경부 심부침윤, 림프혈관계 침윤, 자궁옆조직외 침윤이나 골반 내 림프절 전이가 있을 때 의미 있게 증가하였으며 생존율에 의미 있는 예후인자로는 VEGF 단백질 양과 림프혈관계 침윤이었고 무병생존율에는 VEGF 단백질 양만이 의미 있는 예후인자였다.

본 연구에서도 VEGF 발현이 예후에 미치는 영향을 정확히 분석하고자 병기 IB 환자만을 대상으로 근치적 자궁적출술과 양측 끝반림프절 적출술 후 기존의 예후인자들로 알려진 종양의 크기, 끝반내 림프절의 전이, 림프계 침윤, 혈관계 침윤, 자궁경부 심부침윤에 대하여 조직병리학적으로 확진된 환자들만을 대상으로 VEGF 발현정도를 관찰한 결과 전체 118명 중 저발현을 보인 환자가 83명(70.3%), 그리고 고발현을 보이는 환자는 35명(29.7%)이었다. VEGF의 발현이 고발현인 환자들에서 자궁경부 심부침윤과 끝반 내 림프절의 전이가 의미 있게 증가되는 결과를 보였다. 예후인자를 분석해 보았을 때 VEGF가 고발현일 때 생존율과 무병생존율 모두에서 통계학적으로 유의하게 저조한 결과를 보였고 단변량과 다변량분석에서 여러 예후 인자들 중 VEGF의 발현이 가장 강력한 독립적인 예후인자로서 작용하였다. VEGF 발현과 재발양상을 보았을 때 Loncaster¹⁸은 VEGF 발현이 강할 때 원격 전이가 증가하였으나 국소재발에서는 의미 있는 차이가 없음을 보였고, Cheng²³의 연구에서는 재발양상에 대한 분석은 없었으나 재발이 있는 환자들에서 VEGF 양이 의미 있게 증가하였다. 본 연구에서는 끝반 내 재발이 있었던 7명 중 6명이, 그리고 원격전이가 있었던 5명 모두 즉 재발환자 12명 중 11명이 VEGF 고발현군에 속하는 환자로 VEGF 발현이 높은 경우 끝반 내 재발과 원격전이가 통계학적으로 유의하게 증가하였다($p=0.003, 0.02$).

VEGF 발현이 높을수록 예후가 저조한 이유로는 본 연구와 Cheng^{22,23}의 연구결과에서 조기 병기의 자궁경부암에서 종양의 자궁경부 심부침윤과 림프절 전이 이전에 VEGF가 관련되어 있을 가능성을 시사해 주고 있으며, 여러 암에서 저산소증 상태에서 VEGF가 증가됨이 알려져 있고,²⁴⁻²⁶ 자궁경부 세포주에서 저산소증 상태에서 VEGF mRNA가 증가된다는 보고와²⁷ 자궁경부암에서 저산소증이 있을 때 국소재발과 림프절 전이가 많으며 치료성적도 낮은 연구결과들을 토대로 하여,²⁸⁻³⁰ 저산소증에서 VEGF 발현이 증가되고 VEGF 발현이 증가하면 자궁경부 심부침윤과 림프절 전이가 증가되어 저조한 치료성적을 보이는 것으로 예측할 수 있다. VEGF 항체와 방사선치료를

병행하여 저산소증 상태에서도 정상 산소 상태에서와 동등한 종양성장지연 (tumor growth delay)을 보인 Lee등³⁴의 결과를 참고로 보았을 때, 조기 자궁경부암에서 VEGF 발현이 높은 환자에서는 기존의 수술이나 방사선 치료와 VEGF 항체등의 혈관생성억제요법을 병행하여 치료 성적을 향상시킬수 있을 것으로 보인다.

조직학적 유형에 따른 VEGF 발현에 관해서는 Tokumo등³¹이 편평상피암 종보다는 선암종에서 VEGF 발현이 의미 있게 증가되고, platelet-derived endothelial cell growth factor는 편평상피암종에서 선암종보다 의미 있게 증가됨을 보고하면서, 자궁경부암에서는 조직학적 유형에 따라 혈관생성의 경로가 다를 것이라는 의견을 제시하였다. Fujimoto등¹⁷도 VEGF발현에 대한 면역조직화학 검사와 VEGF에 대한 immunoassay와 mRNA에 대한 정량적 분석을 시행하였는데 선암종에서 편평상피암종보다 강하게 염색된다고 보고하였다. 그러나, Tjalma등^{15,32}은 조직학적 유형중 선암종에서 VEGF발현이 의미 있게 낮았다고 보고하고 있다. Cheng등^{22,23}과 Loncastor등¹⁸의 연구에서는 조직학적 유형에 따른 차이점을 발견할 수 없었는데, 본 연구에서는 선암종에서 모두 VEGF 발현강도가 ++이하로 염색되었으나 조직학적 유형에 따른 통계학적인 차이는 없었는데, 다른 연구들에 비해 선암종이 10명으로 연구대상수가 적어 정확한 비교는 어려울 것으로 생각되며 앞으로 조직학적 유형에 따른 VEGF 발현에 대한 연구는 더 많은 환자들을 대상으로 연구가 시행되어야 확실한 결론을 얻을 수 있을 것으로 보인다.

본 연구는 면역조직화학염색법으로 VEGF 발현을 관찰하였는데 정량적인 검사가 아니기 때문에 VEGF에 대한 정량적인 검사가 시행된다면 예후인자의 분석에 더욱 정확한 결과를 얻을 수 있을 것으로 생각되며, 본 연구를 포함하여 대부분의 VEGF mRNA와 VEGF 발현에 관한 연구에서는 종양의 극히 일부분에서 조직을 떼어 관찰하게 되어 종양의 전체적인 신생혈관생성 상태를 관찰 할 수 없는 단점이 있는데, Hawighorst등³³은 자궁경부암 환자에서 기능적 자기공명영상장치(MRI)를 이용하여 특정한 조직에서의 MRI의

신호증가 정도를 측정함으로써 미세혈관밀도와 VEGF 발현과의 연관성에 대해 연구하여 기능적 MRI에서의 측정값이 예후에 영향을 미친다고 보고하였다. MRI의 측정값은 전반적인 자궁암 조직에서의 혈관밀도에 대해서 알 수 있다는 장점과 관계 있는 것으로 생각되며 따라서 기능적 MRI에 의한 측정이 포괄적인 면에서 종양 전체의 혈관생성에 대한 정보를 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

결론적으로, 조기 자궁경부암에서 재발의 위험도가 높은 환자들을 찾아내고 기존의 치료들과 VEGF 항체등의 새로운 혈관억제요법을 병행하기에 적합한 대상 환자들을 찾아내는데 있어서 면역조직화학염색을 통한 VEGF 발현의 정도는 임상적으로 유용한 지표로 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

V. 결 론

본 연구에서는 근치적 자궁적출술이 시행되고 조직병리학적 검색이 확진된 병기 IB의 자궁경부암 환자 118예를 대상으로 하여 자궁경부암에서 VEGF의 발현과 예후인자들인 종양의 크기, 골반내 림프절의 전이, 림프계침윤, 혈관계침윤, 자궁경부 심부침윤과의 상관관계를 분석하고, 생존율을 분석하여 VEGF발현이 예후 예측인자로서 어떠한 가치가 있는가 알아보고자 VEGF에 대한 면역조직화학염색을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. VEGF 발현이 높은 환자에서 자궁경부 심부침윤 ($p=0.009$)과 골반 내 림프절 전이 ($p=0.02$)가 의미 있게 증가하였다.
2. 생존율에 의미 있는 예후인자로 VEGF 발현 ($p=0.001$)과 골반 내 림프절전이 ($p=0.01$)였다.
3. 무병생존율에 의미 있는 예후인자들로 VEGF 발현 ($p=0.01$), 혈관계 침윤 ($P=0.02$), 종양의 크기 ($P=0.03$)였다.
4. VEGF가 높게 발현된 환자에서 골반 내 재발 ($p=0.003$)과 원격전이 ($p=0.02$)된 환자가 많았다.

자궁경부암 IB로 근치적 자궁적출술을 시행한 환자에서 VEGF의 발현을 보았을 때 VEGF 발현이 자궁경부 심부침윤과 골반 내 림프절 전이와 유의한 상관관계가 있었으며 환자의 생존율과 무병생존율에 가장 의미 있는 예후인자였고 VEGF 발현이 높은 환자에서 골반 내 재발과 원격전이가 의미 있게 많았다. 결론적으로, 조기 자궁경부암에서 재발의 위험도가 높은 환자들을 찾아내고 기존의 치료들과 VEGF 항체등의 새로운 혈관억제요법을 병행하기에 적합한 대상 환자들을 찾아내는데 있어서 면역조직화학염색을 통한 VEGF 발현의 정도는 임상적으로 유용한 지표로 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Shepherd JH. Cervical and vulva cancer: changes in FIGO definitions of staging. *Br J Obstet Gynaecol* 1996;103:405-6
2. Perez CA, Brady LW. Principles and practice of radiation oncology. 3rd ed. Lippincott-Raven Publishers; 1998
3. Cox JD. Moss' radiation oncology. 7th ed. Mosby-year book; 1994
4. Ferrara N. The role of vascular endothelial growth factor in pathological angiogenesis. *Breast Cancer Res Treat* 1995;36:127-37
5. Dellas A, Moch H, Schultheiss E. Angiogenesis in cervical neoplasia: microvessel quantitation in precancerous lesions and invasive carcinomas with clinicopathological correlations. *Gynecol Oncol* 1997;67:27-33
6. Abu-Jawdeh GM, Faix JD, Niloff J, Tognazzi K, Manseau E, Dvorak HF, et al. Strong expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in ovarian borderline and malignant neoplasm. *Lab Invest* 1996;6:1105-15
7. Boocock CA, Charnock-Jones DS, Sharkey AM, McLaren J, Barker PJ, Wright KA, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors Flt and KDR in ovarian carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:506-16
8. Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Manseau EJ, Dvorak HF, et al. Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in kidney and bladder carcinoma. *Am J Pathol* 1993;143:1255-62
9. Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Guidi AJ, Dvorak HF, et al. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in breast cancer. *Hum Pathol*

1995;26:86-91

10. Chin K-F, Greenman J, Gardiner E, Kumar H, Topping K, Monson J. Pre-operative serum vascular endothelial growth factor can select patients for adjuvant treatment after curative resection in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2000;83:1425-31
11. Fine B.A, Valente P.T, Feinstein G.I, Dey T. VEGF, flt-1, and KDR/flk-1 as prognostic indicators in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 2000;76:33-9
12. Seo Y, Baba H, Fukuda T, Takashima M, Sugimachi K. High expression of vascular endothelial growth factor is associated with liver metastasis and a poor prognosis for patients with ductal pancreatic adenocarcinoma. *Cancer* 2000;88:2239-45
13. Takahama M, Tsustumi M, Tsujiuchi T, Nezu K. Enhanced expression of Tie2, its ligand angiopoietin-1, vascular endothelial growth factor, and CD31 in human non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res* 1999;5:2506-10
14. Yoshiji H, Gomez DE, Shibuya M, Thorgeirsson UP. Expression of vascular endothelial growth factor, its receptor and other angiogenic factors in human breast cancer. *Cancer Res* 1996;56:2013-6
15. Tjalma W, Van Marck E, Weyler J. Quantification and prognostic relevance of angiogenic parameters in invasive cervical cancer. *Br J Cancer* 1998;78:170-4
16. Kodama J, Seki N, Tokumo K. Vascular endothelial growth factor is implicated in early invasion in cervical cancer. *Eur J Cancer* 1999;35:485-9
17. Fujimoto J, Sakaguchi H, Ichigo S, Tamaya T. Expression of vascular endothelial growth factor(VEGF) and its mRNA in uterine

- cervical cancers. Br J Cancer 1999;80:827-33
18. Loncaster JA, Cooper RA, Logue JP, Davidson SE, Hunter RD, West CML. Vacular endothelial growth factor(VEGF) expression is a prognostic factor for radiotherapy outcome in advanced carcinoma of the cervix. Br J Cancer 2000;83:620-5
 19. Pepper MS. Ferrara N and Orchi L. Vacular endothelial growth factor(VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun 1991;181:902-6
 20. Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins pathologic basis of disease. 6th ed. Philadelphia(Pennsylvania): W.B. Saunders Company; 1999
 21. Tjalma W, Weyler J, Weyn B, Marck EV, Daele AV, Dam PV, et al. The association between vascular endothelial growth factor, microvessel density and clinicopathological features in invasive cervical cancer. Obstet Gynecol 2000;92:251-7
 22. Cheng W, Chen C, Lee C, Chen T, Hsieh F, Hsieh C. Vascular endothelial growth factor in cervical carcinoma. Obstet Gynecol 1999;93:761-5
 23. Cheng W, Chen C, Lee C, Wei L, Hsieh F, Hsieh C. Vascular endothelial growth factor and prognosis of cervical carcinoma Obstet Gynecol 2000;96:721-6
 23. Koos RD, Olson CE. Hypoxia stimulates expression of the gene for vascular endothelial growth factor (VEGF), a putative angiogenic factor, by granulosa cells of the ovarian follicle, a site of angiogenesis. J Cell Biol 1991;115:421A
 24. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis.

Nature 1992;359:843-5

25. Ladoux A, Frelin C. Hypoxia is a strong inducer of vascular endothelial growth factor mRNA expression in the heart *Biochem Biophys Res Commun.* 1993;195:1005-10
26. Chiarotto JA and Hill RP. A quantitative analysis of the reduction in oxygen levels required to induce up-regulation of vascular endothelial growth factor(VEGF) mRNA in cervical lines. *Br J Cancer* 1999;80:1518-24
27. Fyles AW, Milosevic M, Wong R, Kavanagh M-C, Pintilie M, Chapman W, et al. Oxygenation predicts radiation response and survival in patients with cervix cancer. *Radiother Oncol* 1998;48:149-56
28. Hockel M, Knoop C, Schlenger K, Vorndran B, Baussman E, Mitze M, et al. Intratumoral pO₂ predicts survival in advanced cancer of the uterine cervix. *Radiother Oncol* 1993;26:45-50
29. Hockel M, Schlenger K, Aral B, Mitze M, Schaffer U, Vaupel P. Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer* 1996;56:4509-15
30. Tokumo K, Kodama J, Seki N. Different angiogenic pathways in human cervical cancer. *Gynecol Oncol* 1998;68:38-44
31. Tjalma W, Sonnemans H, Weyler J. Angiogenesis in cervical intraepithelial neoplasia and the risk of recurrence. *Am J Obstet Gynecol* 1999;181:554-9
32. Hawighorst H, Weikel W, Knapstein PG. Angiogenic activity of cervical carcinoma: Assessment by functional magnetic resonance imaging-based parameters and a histomorphological approach in correlation with disease outcome. *Clin Cancer Res* 1998;4:2305-12
33. Lee CK, Heijn M, Tomaso E, Greffon-Etienne G, Ancukiewicz M,

Koike C et al. Anti-vascular endothelial growth factor treatment augment tumor radiation response under normoxic or hypoxic conditions. *Cancer Res* 2000;60:5565-70

Abstract

The expression of vascular endothelial growth factor(VEGF)
is a highly significant prognostic factor in stage IB
carcinoma of the cervix

Ik Jae Lee

Department of Medicine

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Kyung Ran Park)

Purpose: The aim of this study was to clarify the role of VEGF expression as an independent prognostic factor and to identify the patients at high risk for poor prognosis in stage IB cervical cancer.

Methods: A total of 118 patients with stage IB cervical cancer who had radical hysterectomy and pelvic lymph node dissection were included in the study. All known high risk factors of the patients were pathologically confirmed from the surgical specimen. Of the 118 patients, 88 patients were treated with postoperative radiotherapy and/or chemotherapy. VEGF expression was examined using immunohistochemistry in formalin-fixed, paraffin-embedded specimens of post-hysterectomy surgical materials. A

semiquantitative analysis was made using a scoring system of 0, +, ++, and +++ for increasing intensity of stain. We classified the patients with scores from 0 to ++ as low staining intensity and the patients with a score of +++ as high staining intensity.

Results: Of the 118 patients, 35 patients (30%) showed high staining intensity (3) of VEGF. Strong correlations were found between the high staining intensity of VEGF and both deep stromal invasion ($p=0.009$) and the positive pelvic node ($p=0.02$). The 5-year overall and disease-free survival rates for all 118 patients were 94.6% and 92%. The 5-year overall ($p=0.01$) and disease-free survival ($p=0.001$) rates were 97.1% and 98.6% for low intensity (0, +, and ++) of VEGF and 90.7% and 81.7% for high intensity of VEGF, respectively. Pelvic and distant failures for low versus high intensity of VEGF were 1.2% versus 17.1%, ($p=0.003$) and 0% versus 14.3% ($p=0.002$), respectively. In a Cox multivariate analysis of survival, the high staining intensity of VEGF ($p=0.008$) and the positive pelvic node ($p=0.01$) were significant prognostic factors for overall survival. The high staining intensity of VEGF ($p=0.01$), vascular invasion ($p=0.02$), and bulky mass ($p=0.03$) demonstrated as significant prognostic indicators for disease free survival.

Conclusion: These results showed that the intensity of VEGF expression was a highly significant predictor for pelvic and distant failure and the most significant prognostic factor of overall and disease free survival for the patients with stage IB cervix cancer treated with radical surgery. We strongly suggest that the immunohistochemistry for VEGF expression be performed in a

routine clinical setting in order to identify patients at high risk for poor prognosis in early stage cervical cancer.

Key words : Uterine cervical cancer, Vascular endothelial growth factor, prognostic factor