

자궁경부암에서 종양의 맥관 형성이 암전이에 미치는 영향

계명대학교 의과대학 산부인과학교실* · 의학유전연구소**
신해영* · 차순도* · 이태성*·**

=Abstract=

The Impact of Tumor Angiogenesis on Pelvic Node Metastasis in Cervical Cancer

Hae Young Shin, M.D.,* Soon Do Cha, M.D.,* Tae Sung Lee, M.D.*^{**}

Department of Obstetrics and Gynecology, * Institute for Medical Genetics,^{**}

College of Medicine, Keimyung University

To investigate the correlation between tumor angiogenetic activity and lymph node metastasis in cervical carcinoma, immunohistochemical staining with antifactor VIII related antigen (F-VIII RAg) antibody was used.

Seventy-one specimens resected from the patients with squamous cell carcinoma of the uterine cervix were analyzed by staining with a monoclonal antibody against Factor VIII-related antigen. Correlations among the microvessel count(the mean number of microvessels in three areas of highest vascular density at 200 times magnification), various clinicopathologic factors, and disease free survival rates were studied.

The microvessel count (MVC) (range 6.3~29.7, mean=14.6±4.8) were higher in the advanced stages. MVC had no correlation with the other clinicopathologic factors, i.e. lymph node status, invasion depth, lymphovascular space invasion, cell type, and histologic grade.

There was statistically significant correlations between the disease free survival rates and lymph node status. However, there was no significant correlations in disease free survival rates with microvessel count.

These results showed that microvessel count, may not be related to lymph node status and prognosis of the disease.

Key Words: Microvessel count; Lymph node status; Cervical cancer

I. 서 론

자궁경부암은 한국 여성의 암 중에 가장 높은 빈도를 차지하며 자궁경부암의 발생에 관여하는 여러 위험인자들에 대해서는 많이 알려져 있다. 자궁경부

암의 진단에 이용되는 질확대경검사(colposcopy)는 자궁경부의 혈관 상태에 따라서 자궁경부의 전암병소와 침윤암을 감별진단하고 있어 자궁경부암에서의 신생혈관의 정도가 암의 진행에 중요한 역할을 한다는 것을 미루어 짐작할 수 있다. 신생혈관의 형성은 종양의 성장을 돋고, 작은 종양이 처음 생겨 성장을

계속하기 위해서는 새로운 모세혈관 형성을 유도하게 되며 진행시 종양세포가 혈관 내로 유입되어 전이가 일어나게 된다(Gimbrone et al., 1971). Goldman (1907)이 종양의 성장과 전이는 맥관 형성(angiogenesis)에 의존한다고 처음으로 언급한 이후, Folkman (1971)이 악성 종양에서 종양혈관 형성인자(tumor angiogenesis factor, TAF)를 분리하였고 이는 혈관 내피 세포의 분열을 유도하여 빠르게 신생혈관 형성을 일으킨다고 하였다. Chodak 등(1980)은 종양의 맥관 형성 능력이 방광의 전암성 병변 및 악성 병변의 초기 징후가 될 수 있으며 맥관 형성의 정도로 방광암이 발생할 수 있는 고위험군을 예견할 수 있다고 하였다. 여러 보고에서 전립선암, 폐암 및 직장암 등에서 신생혈관 형성은 암의 급속한 성장뿐만 아니라 전이에 있어서 매우 중요한 요소로 알려져 있다(Weidner et al., 1993; Macchiarini et al., 1992; Saclarides et al., 1994).

Factor VIII 관련 항원은 항혈우병인자(antihemophilic factor)의 세 가지 기능적 구성체의 하나로 혈관의 내피세포에서 합성되며 거핵구, 혈소판, 비만세포에서도 발견된다. Factor VIII 관련 항원은 내피세포의 증식을 아는데 거의 특이적 표지자로 사용되며(Juan et al., 1989), Factor VIII 관련 항원을 이용한 종양의 맥관 형성과 각 예후인자의 비교 연구가 많이 진행되어 왔다. Weidner 등(1991, 1993)은 유방암과 전립선암에서 전이가 있는 경우, 없는 경우에 비하여 미세혈관의 수가 훨씬 증가되어 있으며 이런 경우 좀더 적극적인 치료를 요하는 것으로 보고하였으며, Maedae 등(1995)은 위암에서 미세혈관의 증가는 재발과 밀접한 관계가 있으며 예후인자로서 중요한 역할을 있다고 보고하였다.

그러나 자궁경부암에서는 아직 종양의 신생혈관 형성과 예후 및 임상 양상과 관계에 대한 연구가 많지 않은 실정이어서 저자 등은 자궁경부암에서 종양의 맥관 형성의 정도가 전이에 미치는 영향을 알기 위하여 본 연구를 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 연구 대상

1980년 3월 1일부터 1993년 12월 31일까지 계명대학교 동산의료원 산부인과에서 자궁경부암으로 진

단받고 근치적 자궁절제술 및 골반림프절 절제술을 시행한 후 추적 관찰중인 환자의 기록부를 재검토하고 임상적 병기를 FIGO stage에 따라 분류하여 I b 및 IIa를 선택하여 병리학적 소견을 재검색하였다. 이 중 파라핀 블록이 충분한 71예를 임의로 선정하여 종양이 가장 많이 포함된 원발병소의 파라핀 블록을 선택하여 Factor VIII 관련 항원을 사용하여 면역 조직화학적 염색을 시행하였다. 추적 조사는 1983년 9월부터 1997년 9월까지 실시하여 그 결과를 분석하였다.

2. 병리조직학적 검색

연구 대상 71예의 표본을 광학현미경으로 재검색하여 종양세포의 유형, 분화도, 침윤의 깊이, 림프관-모세혈관 내강의 침습 유무 및 림프절 전이 유무를 분석하였다. 세포의 유형은 캐라틴진주(keratin pearl)의 형성 유무에 따라 비각화성 대세포형과 각화성 대세포형으로 분류하였고, 분화도는 분화의 정도에 따라 고등도, 중등도, 저등도(well, moderately, poorly, differentiated)로 분류하였다.

3. 면역조직화학적 검사

종양의 신생미세혈관의 정도를 보기 위하여 혈관 내피세포의 표지자로 Factor VIII 관련 항원에 대한 항체(DAKO-vWF, F8/86 A/S Denmark)를 사용하였다. 10% 중성 포르말린에 고정되고 파라핀으로 포매된 조직을 4 μm 두께로 박절한 후, Xylene으로 탈파라핀화하고 계열 애탠올(100%, 90%, 75%; 각각 5분간 3회)로 재함수하였다. 그리고 3% 과산화수소수로 내인성 peroxidase를 차단하고, PBS(phosphate-buffered saline) 완충액으로 수세하여 구연산 완충액(citrate buffer, PH 6.0)에 넣고 전자오븐에서 10분간 전처리한 후 실온에서 냉각시키고 PBS 완충액으로 수세하여, 1:50으로 회색한 factor VIII 관련 항원에 대한 항체에 37 °C에서 1시간 반응시켰다. 그리고 LSAB kit (DAKO, Santa Barbara, CA, USA)으로 발색하여 Meyer's hematoxylin으로 30초간 대조염색한 후 Canada balsam으로 봉입하였다.

미세혈관이 가장 많이 관찰되는 부위를 선택하여 200배 광학 현미경 시야(10× 접안렌즈, 20× 대물렌즈, Zeiss)에서 3 시야를 사진 촬영한 후 미세혈관의 수를 세어 시야당 미세혈관수의 평균치(mean microvessel count)를 계산하였다(Fig. 1). 이때, 대략 8개 이

상의 적혈구가 포함된 혈관과 두꺼운 균육층의 혈관은 제외하였으며 가지친 미세혈관도 끊김이 없으면 하나의 혈관으로 간주하였고 날개로 염색되는 내피 세포도 위양성으로 염색되는 염증세포와 형태학적으로 구별하여 계산하였다.

Fig. 1. Microvessels in area of large cell non-keratinizing squamous cell carcinoma. Immunohistochemical stained with anti-Factor VII related antigen($\times 200$).

4. 통계학적 분석

통계학적 처리는 Student's t-test를 이용하였고 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 를 기준으로 하였다. 무병생존율은 Kaplan-Meier 방법으로 분석하였다.

III. 성 적

1. 임상 소견

연령 분포는 28세에서 66세까지 평균 43.4세였고 40~50대가 45%를 차지하였다. 연령에 따른 맥관 형성의 정도는 통계학적인 유의성은 없으나 연령이 높아질수록 미세혈관의 수가 증가하는 경향을 보였다.

병기는 FIGO 임상기별 분류에 따라 분류시 Ib 43예, IIa 28예로 Ib가 많았다. 병기와 미세혈관 수

의 상관관계를 비교하면 병기 I b에 비하여 IIa에서 통계학적으로 유의하게 미세혈관의 수가 증가되어 있었다($p=0.031$).

무병생존기간은 6개월에서 156개월로 광범위하였으며 평균 무병생존기간이 85.6개월이었다. 미세혈관 수와 무병생존기간과의 상관관계를 평균 미세혈관 수를 기준으로하여 두 군으로 나누어 비교하면 평균 치보다 낮은 군이 38명으로 이 중 5명(13.1%)이 재발 또는 사망하였고 평균치보다 높은 군이 29명으로 이 중 8명(27.5%)이 재발 또는 사망하였다. 그러나 양군을 비교하여 보면 무병생존율은 통계적으로 유의한 차이는 없었다($p=0.10$)(Fig. 2).

림프절 전이는 71예 중 26예(36.6%)에서 관찰되었고 림프절 전이가 없었던 예가 45예(63.4%)였다. 림프절 전이가 있었던 26예 중 10예(38.4%)가 재발 또는 사망하였으나, 림프절 전이가 없었던 45예 중에서는 2예(4.4%)만이 재발 또는 사망하여 두 군간에 유의한 차이를 보였다($p=0.00001$)(Fig. 3).

2. 병리학적 검색

세포의 유형은 비각화성 대세포형이 44예, 각화성 대세포형이 27예였다. 연구 대상 71예의 림프절 전이 여부, 침윤의 깊이, 세포의 유형, 분화도, 림프관-모세혈관 내강의 침습 유무를 검토하는데 미세혈관수는 이러한 병리학적인 인자들과 유의한 상관관계가 없었다(Table 1).

IV. 고 칠

자궁경부암은 한국 여성의 악성 종양 중 발생빈도가 가장 높을 뿐만 아니라 조기진단과 치료가 가능한 대표적 질환이다. 1993년 보사부 암등록 조사

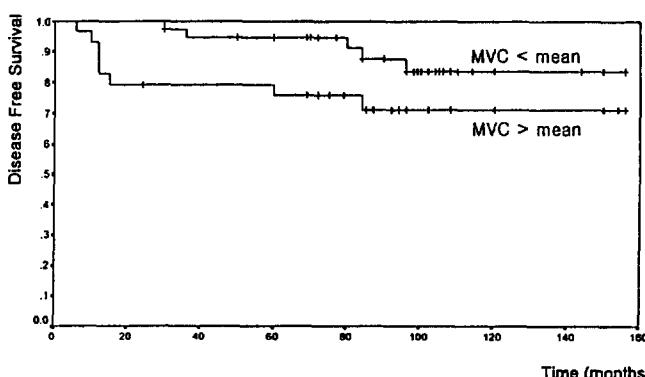


Fig. 2. Disease free survival of 71 patients with regard to microvessel counts.
MVC: Microvessel count

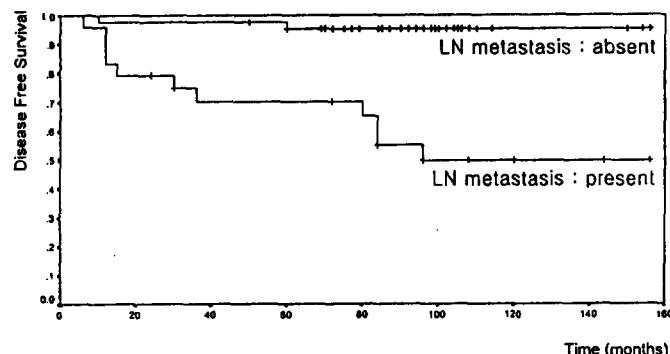


Fig. 3. Disease free survival of 71 patients with cervical cancer regard to the presence of lymph node metastasis.
LN: Lymph node

Table 1. Correlation between the microvessel count and clinicopathologic variables.

Variables	Number	Microvessel Count(mf^2) Mean \pm SD	Significance
Total	71	14.6 \pm 4.8	
Stage			p < 0.05
I b	43	13.7 \pm 4.3	
II a	28	16.1 \pm 5.1	
Histologic type			NS
Keratinizing	27	14.3 \pm 3.9	
Non-keratinizing	44	14.9 \pm 5.3	
Histologic grade			NS
Well differentiated	4	13.2 \pm 1.6	
Moderately differentiated	61	15.0 \pm 5.0	
Poorly differentiated	6	11.5 \pm 1.7	
Lymphovascular invasion			NS
None	28	14.5 \pm 5.1	
Mild	23	15.8 \pm 5.2	
Moderate	10	13.6 \pm 3.6	
Depth of invasion			NS
< 1 cm	41	14.8 \pm 4.8	
> 1 cm	30	14.4 \pm 4.8	
LN metastasis			NS
Absent	45	14.7 \pm 4.9	
Present	26	14.6 \pm 4.7	

NS: Not significant; LN: Lymph node; SD: Standard deviation

자료에 의하면 자궁경부암은 1년에 약 5천명 정도의 새로운 환자들이 발생하며 여성암의 약 22%를 차지한다고 한다(부인종양학, 1996). 1950년대 이후 자궁경부암의 빈도와 이로 인한 사망률은 점차적으로 감소하고 있는데 이는 세포진 및 질 확대경검사에 의하여 침윤암 이전의 상피내종양의 단계 및 침윤암 초기 상태에서 조기 진단에 기인한 것이다. 자궁경부암 발생의 평균 연령은 52.2세이고 35~39세와 60~64세에 두 번의 상승되는 분포를 보인다(Boring et al., 1994). 본 연구에서 대상 환자의 평균 연령이

43.4세로 낮은 것은 대상 환자가 주로 1기 및 2기로 수술을 실시한 경우이기 때문으로 추정된다. 초기 암에서 림프절 전이가 없는 경우는 5년 생존율이 85~90%에 이르나 림프절 전이가 있는 경우 전이된 림프절의 수, 위치 및 크기 등에 따라 5년 생존율이 20~74%로 감소한다. 전자궁적출술과 림프절 절제를 시행한 후의 생존율은 림프절 상태, 병灶의 크기, 경부주변의 자궁방 조직 침윤, 침윤의 깊이 및 림프관-모세혈관 내강의 침습 등이 영향을 미친다(부인종양학, 1996).

종양의 전이 단계를 살펴보면, 먼저 종양세포의 증식, 맥관 형성, 그리고 침습의 세 단계 즉, 부착(adhesion), 단백분해(proteolysis), 이동(migration)의 단계를 거친다. 종양세포의 전이가 일어나기 위해서는 기저막(basement membrane)과 주위 간절조직의 분해 이외에도 신생혈관 형성이 필요하다. 이것은 종양성장에 필요한 영양을 공급하고 종양세포가 순환계 내로 침윤하는 통로의 역할을 한다. 순환계 내로 들어간 종양세포는 전이 대상의 장기에 도달하여 전이 시작 때와 같은 단계를 거쳐 침투해 들어간다. 이때 풍부한 맥관 형성이 종양세포의 생존에 필수적이다 (Alessandro et al., 1997). 이와 같이 종양의 맥관 형성은 원발성 종양의 초기 단계와 종양의 전이과정의 말기단계, 또는 전이된 장기에서의 초기 단계에서 일어나는 생물학적 과정으로 이해될 수 있으며, 그리하여 thalidomide와 같은 종양의 맥관 형성을 억제하는 약제를 특여함으로써 종양의 성장과 전이를 억제하여 치료에 응용하려는 연구들도 진행되어 왔다 (D'Amato., 1994).

Takebayashi 등(1996)은 대장암 환자 중 림프절 전이가 있었던 환자군에서 없었던 환자군에서보다 미세혈관수 및 재발률이 훨씬 높았다고 하였으며 Macchiarini 등(1992)은 폐의 소세포암에서 미세혈관 수가 증가할수록 전이 역시 증가하는 것으로 보고하였다. Wiggins 등(1995)은 림프절 전이 음성 및 림프관-모세혈관 내강의 침습이 음성인 저위험군의 자궁경부암 환자에서 미세혈관의 수로 초기 재발을 예견할 수 있다고 하였으며 맥관 형성의 정도가 자궁경부의 편평세포암의 중요한 독립적인 예후인자가 될 수 있다고 하였고, 자궁경부암에서 신생 혈관의 수가 림프절 전이상태, 자궁주위 조직의 침범과 종양침습의 깊이나 종양의 육안적 소견들과는 무관하나 혈관내 종양의 침범(vascular involvement)과는 유의한 관계가 있다고 하였다. Cox의 비례위험 모형을 이용하여 종양내의 미세혈관의 수가 병기, 분화도, 그리고 세포유형에 비하여 무병생존기간의 예측에 더 나은 예측인자라는 것을 보여주었다. 본 연구에서 저자는 연구 대상 71예의 자궁경부암의 연령, 병기, 림프절 전이 여부, 침윤의 깊이, 세포의 유형, 분화도와 림프관-모세혈관 내강의 침습 유무를 검토하였고 무병생존기간과의 연관성을 비교하였다. 환자의 연령에 따른 맥관 형성의 정도는 통계학적인 유의성은 없으나 연령이 높아질수록 미세혈관의 수가 증가하는 경향

을 보여 연령에 따른 변화는 없는 것으로 보였다. 미세혈관의 수는 림프절 전이 여부, 침윤의 깊이, 세포의 유형, 분화도와 림프관-모세혈관 내강의 침습 유무와는 무관하여 Wiggins 등(1993)의 림프관-모세혈관 내강의 침습시 미세혈관이 증가한다는 보고와는 상이한 결과를 보였다.

본 연구에서 병기와 미세혈관의 수의 상관관계를 비교하면 병기 I b에 비하여 IIa에서 통계학적으로 유의하게 미세혈관의 수가 증가되어 있어 이로 암의 진행에 따라 맥관 형성이 많아진다는 것을 알 수 있다. 림프절 전이와 예후와의 상관관계는 림프절 전이가 있었던 경우는 38.4%가 재발 또는 사망하였으나, 림프절 전이가 없는 경우에는 4.4%만이 재발 또는 사망하여 두 군간에 유의한 차이를 보였다 ($p=0.00001$). 따라서 본 연구의 결과로 림프절 전이는 중요한 예후인자임을 확인할 수 있었으나 미세혈관의 수는 림프절 전이에 영향을 미치지는 않았다. 무병생존율은 미세혈관수가 평균치 이하인 군에서 평균치 이상인 군보다 높은 경향을 보였으나 통계적으로 유의한 차이가 없었다.

유방암에서 Noel 등(1993)은 맥관 형성이 림프절 전이와 연관성이 있어 예후인자로서의 가치가 있음을 보고하였고, Silvano 등(1992)도 유방암에서 같은 결과를 발표하였다. 반면에 Wiggins 등(1995)은 자궁경부암에서 신생 혈관의 수가 림프절 전이 상태와는 무관하다고 하였다. 본 연구에서 Factor VII 관련 항원을 이용하여 혈관내피세포를 염색하여 맥관 형성을 관찰한 결과 림프절 전이가 있는 군과 없는 군에서 차이를 보이지 않아 자궁경부암은 유방암이나 폐의 소세포암과는 달리 지금까지 보고된 바와 같이 맥관 형성 정도가 림프절 전이에 영향을 미치지 않는 것으로 보인다.

본 연구는 다른 보고에 비하여 많은 환자를 대상으로 하였으나 맥관 형성의 정도를 단지 육안적으로 판정함으로 인하여 관찰자의 오류도 있을 수 있으므로 향후 좀더 객관적인 판정을 위하여 컴퓨터를 이용한 화상분석 등의 새로운 방법에 의한 시도가 요망된다 하겠으며 또 맥관 형성에는 맥관 형성 인자와 같은 여러 생물학적인 인자가 관계됨으로 인하여 이들에 대한 연구가 많이 이루어지고 있어 향후 이러한 생물학적인 인자와의 연관된 연구가 요망된다 하겠다.

V. 결 론

본 연구는 근치적 자궁절제술 및 골반림프절 절제술을 시행한 71예의 I b 및 IIa기의 자궁경부의 평상피암조직을 대상으로 Factor VII 관련 항원의 면역조직화학적 염색을 실시하여 종양의 신생미세혈관의 형성 정도가 암전이에 미치는 영향을 알기 위하여 술후 림프절 전이와의 관계 및 다른 여러 예후인자 즉 연령, 병기, 침윤의 깊이, 세포의 유형, 분화도, 림프관-모세혈관 내강의 침습 유무, 무병생존기간과의 연관성을 비교하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 미세혈관 수는 림프절 전이 유무와는 상관관계가 없었다.

2. 평균 미세혈관 수는 재발 또는 사망이 있었던 군에서 없었던 경우보다 높은 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다.

3. 종양의 미세혈관 수는 연령, 림프절 전이 유무, 침윤의 깊이, 세포의 유형, 분화도, 림프관-모세혈관 내강의 침습 유무와는 무관하였고 단지 임상적 병기와 통계학적으로 유의한 상관관계를 보였다($p < 0.05$).

이와 같은 결과로 신생혈관의 수와 증가는 림프절 전이에 영향이 없다는 것을 알 수 있었다.

-References-

- 자궁경부암의 임상 양상. 대한부인종양·콜포스코피학회. 부인종양학. 서울. 칼빈서적 1996; 1-2.
- 침윤성 자궁경부암의 예후 및 예후인자. 대한부인종양·콜포스코피학회. 부인종양학. 서울. 칼빈서적 1996; 71-72.
- Alessandro R, Bicher A, Kohn E. Tumor invasion and metastases. Principles and Practice of Gynecologic Oncology. Second edition 1997; 88-101.
- Boring CC, Squires TS, Tong T. Cancer statistic. CA-cancer J Clin 1994; 44: 7-26.
- Chodak GW, Haudenschild C, Gittes RF et al. Angiogenic activity as a marker of neoplastic and preneoplastic lesions of the human bladder. Ann Surg 1980; 12: 762-71.
- D'Amato RJ, Lourhanan MS, Flynn E et al. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 4082-8.
- Folkman J. Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. N Engl J Med 1971; 285: 1182-6.
- Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. Science 1987; 235: 442-7.
- Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? J Natl Cancer Inst 1990; 82: 4-6.
- Folkman J, Merler E, Abernathy C et al. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. J Exp Med 1971; 133: 275-88.
- Gimbrone NA, Leapman SB, Cotran RS et al. Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. N Eng J Med 1971; 136: 261-76.
- Goldman E. The growth of malignant disease in man and the lower animals with special reference to the vascular system. Cited from Horak ER. Lancet 1992; 1120-24.
- Hollingsworth HC, Kohn EC, Steinberg SM et al. Tumor angiogenesis in advanced stage ovarian carcinoma. Am J Pathol 1995; 147: 33-34.
- Juan R. Ackerman's surgical pathology. 7th. ed. ST Louis: The C.V. Mosby 1989; 389-94.
- Macchiarini P, Fontanini G, Hardin MJ. Relation of neovascularisation to metastasis of non-small-cell lung cancer. Lancet 1992; 340: 145-46.
- Maeda K, Chung YS, Takatsuka S et al. Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence in gastric carcinoma. J Clin Oncol 1995; 13: 477-481.
- Mahadevan V, Hart IR. Metastasis and angiogenesis. Acta Oncol 1990; 29: 97-103.
- Noel W, Peter RC, Jonathan F et al. Tumor angiogenesis correlated with metastasis in invasive prostate carcinoma. Am J Pathol 1993; 143: 401-409.
- Saclardes TJ, Speziale NJ, Drab E et al. Tumor angiogenesis and rectal carcinoma. Dis Colon Rectum 1994; 37: 921-926.
- Silvano B, Arthur KCL, Ronald AD et al. Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma. Human Pathol 1992; 23: 755-761.
- Takebayashi Y, Akiyama S, Yamada K et al. Angiogenesis as an unfavorable prognostic factor in human colorectal carcinoma. Cancer 1996; 78: 226-231.
- Weidner N, Carroll PR, Flax J et al. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. Am J Pathol 1993; 143: 401-409.
- Weidner N, Semple JP, Welch WR et al. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. N Engl J Med 1991; 324: 1-8.
- Wiggins DL, Granai CO, Steinhoff MM et al. Tumor angiogenesis as a prognostic factor in cervical carcinoma. Gynecol Oncol 1995; 56: 353-356.