

## 자궁내막암에서 임상병리학적 예후인자와 VEGF, MVD 그리고 MMP-2, -9의 발현간의 상관성

김현, 김원\*, 허방\*\*, 김원규

고신대학교 의과대학 산부인과학 교실, \*경남 정보 대학 의부 행정학 교실, \*\*고신대학교 의과대학 병리학 교실

## The Expression of Vascular Endothelial Growth Factor, Microvessel Density and Matrix Metalloproteinase-2, -9 in Endometrial Cancer

Hyun Kim, M.D., Weon Kim\*, Bang Hur, M.D\*\*, Won gyu Kim, M.D.

*Department of Obstetrics and Gynecology, Kosin University College of Medicine, Busan, Korea*

*\*Department of Medical Administration, Kyung Nam College of Information and Technology, Busan, Korea*

*\*\*Department of Pathology, Kosin University College of Medicine, Busan, Korea*

### Abstract

**Background** : Tumor angiogenesis and degradation of subepithelial basement membrane and extracellular matrix are essential steps for tumor growth, invasion, progression and metastasis. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an important regulator of tumor angiogenetic process and strong VEGF expression is associated with increased microvessel density and poor outcome of endometrial cancer patient. Matrix metalloproteinases(MMPs) are a family of enzymes appear to play a key role in degradations of basement membrane and extracellular matrix, and is responsible for cancer invasion, progression and metastasis and be associated with poor outcome of patient. The aim of this study is to examine the expression of VEGF, MVD and MMPs in endometrial cancer and then to examine the correlation between these factors with prognostic parameters of endometrial cancer.

**Method** : We studied clinicopathologic characteristics of 62 endometrial cancer patients who were diagnosed and operated at Kosin university, Gospel Hospital from January 1995 to December 2003, and investigated the expression of VEGF, microvessel density, MMP-2, and MMP-9 by using immunohistochemistry, then compared these data with the established prognostic parameters of endometrial cancer.

**Results** : There was no statistical correlation between VEGF and clinicopathologic parameters. The MVD also showed no statistical correlation with clinicopathologic parameters but p-value was close to 0.05 in CA-125 level ( $p=0.051$ ). In MMP-2,-9, there was no statistical correlation between VEGF and MVD. There was also no statistical correlation between VEGF, MVD and MMP-2,-9.

**Conclusion** : In this study, the expression of VEGF and MMP-2,-9 and MVD were not correlated with prognostic parameters such as stage, histology, grade, myometrial invasion depth, lymph node metastasis and preop CA-125 level in this study and there was no correlation between VEGF, MVD and MMP-2,-9. It was regarded that there need further study with more cases and based on survival in the future.

**Key words** : Vascular endothelial growth ractor (VEGF), Microvessel density (MVD), Matrix metalloproctcinase -2,-9.

### 서 론

교신저자 : 김 원 규  
주소: 602-703, 부산광역시 서구 압남동 34번지  
고신대학교 의과대학 산부인과학교실  
TEL. 051-990-6227 FAX. 051-244-6939  
E-mail: kwg@ns.kosinmed.or.kr

자궁내막암은 현재 서구 선진국에서는 가장 많이 발  
생하는 부인암으로 2001년 미국에서는 약 39,300명의

신환이 발생하고 6,600명 정도가 사망하였다고 보고되었고, 국내에서는 자궁경부암, 난소암에 이어 3위의 발생빈도를 보이고 있으며 1992년 부인암등록사업을 시작한 이후 3배이상의 증가를 보여 향후 급속히 증가 할 것으로 예상되는 여성생식기암이다.<sup>1,2)</sup> 자궁내막암의 예후를 결정하는 인자들으로써는 환자의 진단시 연령, 병기, 암조직의 분화도, 자궁근 침윤정도, 림프절 전이 유무, 복강 세포진, 병리조직학적 유형, 술전 CA-125, 종양의 크기, 혈관 침윤 유무, 호르몬 수용체, DNA ploidy, 치료방법 등이 있다.<sup>3,4)</sup>

종양이 성장하고 침윤 전이를 일으키기 위해서는 신생혈관의 형성과 상피하 기저막층 그리고 세포외 기질, 조직의 분해과정이 필수적이다. 최근 종양의 혈관신생 그리고 단백질 분해효소 발현의 변화를 연구함으로써 종양 세포의 생물학적 성질 및 예후 추측에 대한 정보를 제공하려고 시도하고 있다.<sup>5-8)</sup>

혈관 형성 과정에는 많은 인자들이 복잡하게 작용하고 있으며 그 중 대표적인 혈관 형성 인자로 혈관 내피 세포 성장인자 (vascular endothelial growth factor, VEGF)가 있다. VEGF는 여러 종류의 종양 세포에서 생성 분비되어 종양 주변 기질의 혈관 투과성 및 혈관 형성에 관여한다고 알려져 있으며 최근 연구들에 의하면 러 종양에서 종양의 미세혈관 밀도와 VEGF 발현정도가 환자의 예후와 관련이 있다고 보고되고 있다.<sup>9-13)</sup>

종양세포가 전이하는 기전은 매우 복잡한 세포생물학 및 생화학적 과정을 거치게 되는데 암세포 침윤에 일차적인 장벽역할을 하는 기저막과 세포외 기질은 collagen, laminin, fibronectin, elastin, proteoglycans, glycosaminoglycan 등으로 구성되어 있어 종양세포가 단백분해효소를 분비하여 이들 기저막과 세포외 기질의 단백질을 분해하는 과정이 종양의 침윤을 결정하는 중요한 요소가 되며 이들의 분해 작용에는 단백질 분해효소의 일종인 matrix metalloproteinases (MMPs)가 중요한 역할을 한다고 보고되고 있다.<sup>7,8)</sup>

본 연구는 자궁내막암에 있어서 VEGF 발현, 미세혈관 밀도 그리고 MMP-2, -9의 발현정도를 살펴보고 이들과 내막암의 예후인자와의 연관성을 살펴보고 이들의 새로운 보조적 예후인자로의 가능성에 대해 조사하기 위해 시행되었다.

연구대상과 방법

1. 연구대상

1995년부터 2003년까지 9년간 고신대학교 복음병원에서 자궁내막암종으로 진단 받고, 자궁적출술을 시행받은 환자 중 병리학적 재검토가 가능하였던 62예를 대상으로 VEGF, CD34, MMP-2, -9에 대한 면역조직학적 검사를 시행하였고, 환자의 의무기록을 통하여, 연령, 조직학적 유형, 세포의 분화도, FIGO 수술적 병기, 자궁근 침윤정도, 림프절 전이유무, 술전 CA-125치를 조사하였다 (Table 1).

Table 1. Clinicopathologic parameters of endometrial cancer

| Clinicopathologic parameters    | Number of patients (%) |
|---------------------------------|------------------------|
| Age (n=62)                      |                        |
| <50                             | 23 (37.1)              |
| ≥50                             | 39 (62.9)              |
| Histology (n=60)                |                        |
| Endometrioid adenocarcinoma     | 55 (91.7)              |
| Non endometrioid adenocarcinoma | 5 (8.3)                |
| Histological grade (n=60)       |                        |
| grade 1                         | 26 (43.3)              |
| grade 2,3                       | 34 (56.7)              |
| Surgical stage (n=56)           |                        |
| stage I, II                     | 48 (85.7)              |
| stage III ↑                     | 8 (14.3)               |
| Myometrial invasion (n=55)      |                        |
| <1/2                            | 27 (49.1)              |
| ≥1/2                            | 28 (50.9)              |
| Lymph node metastasis (n=55)    |                        |
| negative                        | 45 (81.8)              |
| positive                        | 10 (19.2)              |
| CA-125 level (n=55)             |                        |
| < 35 U/ml                       | 35 (63.6)              |
| ≥ 35 U/ml                       | 20 (36.4)              |

2. 연구방법

1) 면역조직화학적 염색 및 판정

10% 중성 완충 포르말린 용액에 고정된 후 제작한 파라핀 괴를 3μm 두께로 절박하여 Probe-on 슬라이드 (Fisher Scientific, Pritsburgh, PA, USA)를 이용하였다. 면역반응의 검출을 위해 Histostain-plus kit (Zymed, CA, USA)를 사용하여 avidin-biotin peroxidase complex 법을 시행하였다. 10% 포르말린에 고정된 자궁내막암 파라핀

포매 조직을 4 $\mu$ m 두께로 박절하여 Proben-on plus 슬라이드 (Fisher Scientific, Pennsylvania, USA)에 부착시켰다. 파라핀 제거를 위해 조직을 xylene에서 3회 반복 처리하고 100%, 90% 알코올 순서로 각각 2회씩 처리 후 증류수에 합수시켰다. 항원성 회복을 위해 10mM 구연산 완충액 (citrate buffer, pH 6.0)에 슬라이드를 넣고 전자오븐에서 15분동안 끓인 다음 실온에서 식힌 후 내인성 과산화효소 활성을 억제시키기 위해 3% 과산화수소를 사용하여 10분 동안 처리하였다. Tris buffer로 세척하고 비특이적인 항체의 결합을 방지하기 위하여 정상 차단 혈청으로 전 처리한 후, 마우스 단클론 일차항체를 반응시켰다.

VEGF 염색을 위한 슬라이드는 구연산 완충액 (citrate buffer)(DAKO, Glostrup, Denmark)을 넣은 용기에 담아 incubator에 넣고 7분 동안 고온 가압하여 항원성을 증가시켰고, VEGF 항체 (Santa Cruz, CA, USA)를 1:50으로 희석하여 실온에서 3시간 작용시킨 후 완충액 (10X Automation buffer) (Research Genetics, Huntsville, AL, USA)으로 세척하였다. VEGF 발현의 양성 판독은 종양 조직의 5%이상의 세포에서 세포질에 갈색으로 반응을 보이는 것을 양성으로 판정하였다 (Fig. 1).

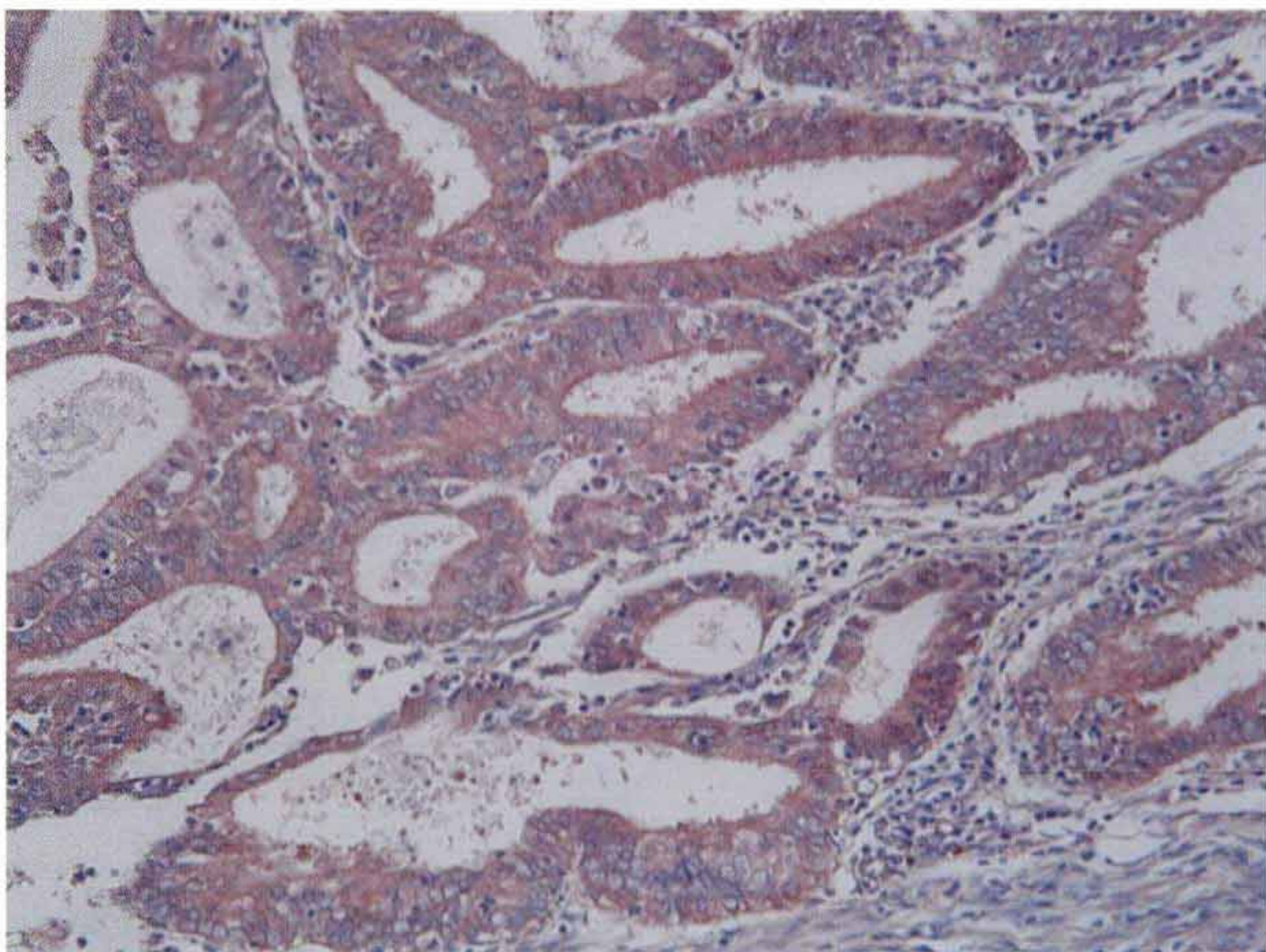


Fig. 1. Diffuse immunostaining pattern to VEGF monoclonal antibody is noted in tumor tissue(×200, VEGF)

CD 34 염색을 위한 슬라이드는 pepsin (Research Genetics, Huntsville, AL, USA)에 45°C에서 3분 동안 처리하여 항원성을 증가시켰고 CD34항체 (DAKO, Glostrup, Denmark)를 1:100으로 희석하여 45°C에서 20분간 작용시켰다. 이차항체는 biotin이 부착된 Universal

secondary antibody (Zymed, CA, USA)를 이용하여 10분간 작용시킨 후 완충액으로 세척하고, streptavidin-horseradish peroxidase (Zymed, CA, USA)에 10분간 작용시켰다. 발색은 완충액으로 수세한 후 aminoethylcarbazole (AEC) (Zymed, CA, USA)를 이용하였으며, 헤마톡실린으로 대조염색 후 양성반응을 관찰하였다. 미세혈관 밀도는 저배율 현미경 시야 (40배)에서 미세혈관 밀도가 가장 높은 5가지 부위를 선택하여 200배에서 신생 혈관의 수를 세고 그 평균을 구하였다. 신생 혈관은 내강의 유무와 상관없이 CD34에 양성으로 보이는 내피세포가 하나 혹은 그 이상 모여있는 것은 미세혈관으로 간주하였으며, 혈관의 내경이 적혈구의 8배 이상이 되거나 근층이 관찰되는 혈관은 측정에서 배제하였다 (Fig. 2).

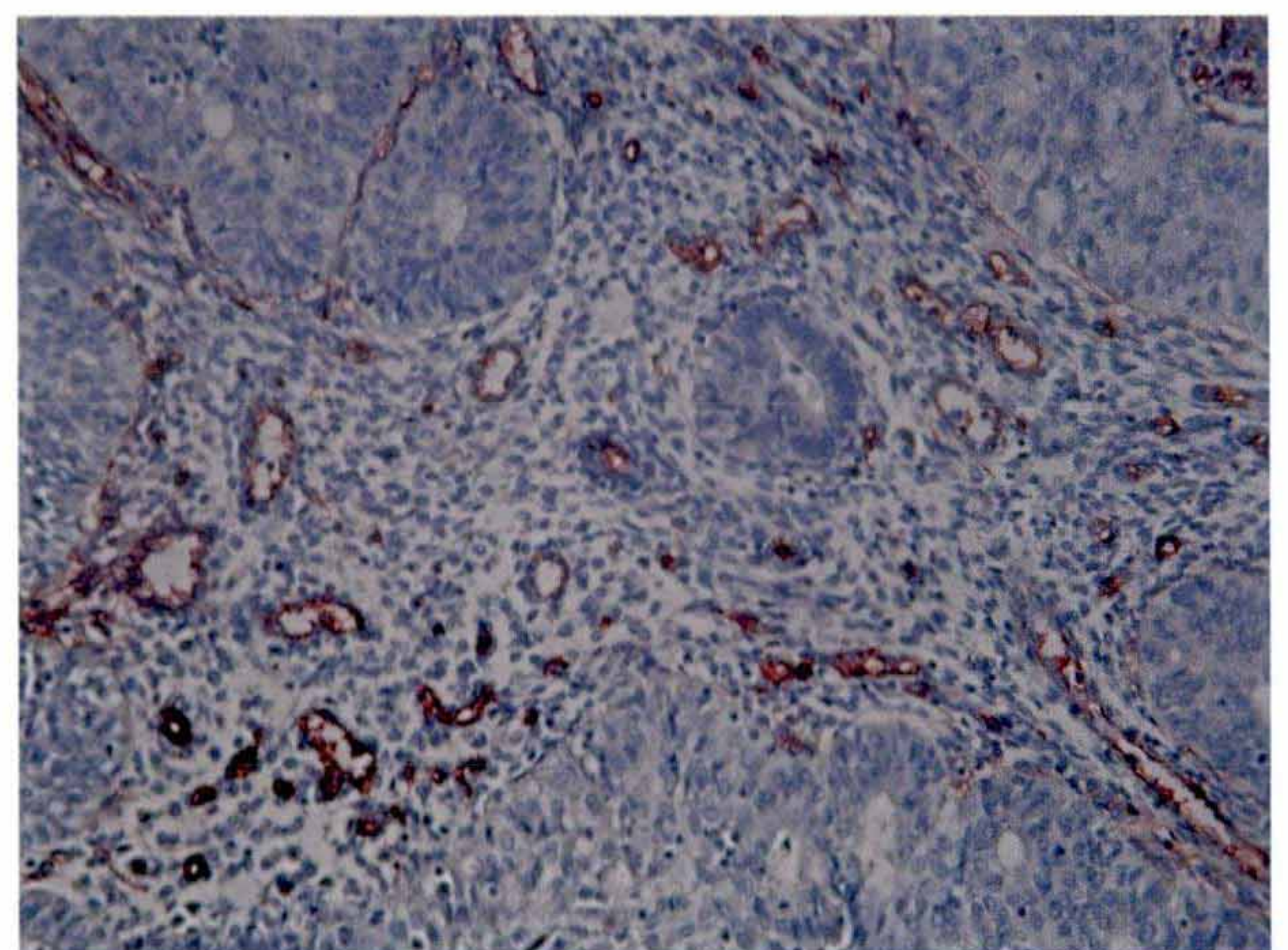


Fig. 2. CD34 reactive circular or curvilinear pattern of microvessels or clusters of endothelial cells are noted in tumor stroma(×200, CD34)

MMP-2, -9의 면역조직화학적 염색은 파라핀 블록을 4 $\mu$ m 두께의 절편 aminopropyltri-ethoxysilane (APEAS, Sigma, USA)이 도포된 유리 슬라이드에 부착시키고 60°C에서 1시간 파라핀을 녹인 후 100% xylene에서 10분간 2회 탈파라핀 과정과 90%, 85%, 80%, 70%, 60%, 50% 알코올로 10분간 합수 과정을 거친 후 증류수로 세척하였다. 항원성 회복을 위하여 1% zinc sulfate (Sigma, USA)가 포함된 10mM citrate 완충액 (pH 6.0)에 슬라이드를 넣고 microwave 오븐을 이용하여 5분간 3회 가열하였다. 항체에 대한 비특이적 반응을 억제하기 위하여 0.5% normal horse serum (Vector, USA)을 함유한 Tris buffer

에 30분간 실온에서 반응시켰다. 메탄올과 30% 과산화수소수가 9:1 비율로 섞인 용액에 10분간 처리하여 내인성 peroxidase을 차단한 후 Tris buffered saline (TBS) (10mM Tris, 150mM NaCl, pH 7.2)으로 3회 수세하였다. 이후의 과정은 DAKO 회사의 LSAB (Labelled streptavidine biotin) kit를 이용하여 시행하였다. 15분간 normal goat serum을 처리한 후 MMP-2 (Oncogene Research, MA, USA)에 대한 일차항체를 1:50으로, MMP-9 (Oncogene Research, MA, USA)에 대한 일차항체를 1:100으로 희석하여 실온에서 60분간 반응시켰다. TBS로 10분간 3차례 수세한 후 2차 항체인 horse biotinylated anti-rabbit IgG (1:50 in TBS, signa)을 실온에서 30분간 반응시켰다. TBS로 다시 3차례 수세한 후 peroxidase-conjugated streptavidin (1:500 in TBS, DAKO) 과 실온에서 30분간 반응시킨 후 TBS로 수세하고 AEC (aminoethylcarbazole)로 10-20분간 실온에서 발색시켰다. 다시 TBS로 세 차례 수세한 후 Mayer's hematoxylin으로 대조 염색하고 Crystal mount를 사용하여 봉입한 후 검경하였다. 사람의 태반조직을 양성 대조 표본으로 사용하였으며, 음성 대조 표본을 일차항체 대신 TBS를 사용하여 위와 동일한 방법으로 염색하였다. MMP-2와 MMP-9의 발현에 대한 판독은 종양세포의 세포질이나 종양세포 주변의 기질 세포질에서 발현되며 그 발현 범위가 검색 범위의 5% 이상일 경우를 양성으로 판독하였다 (Fig. 3, Fig. 4).

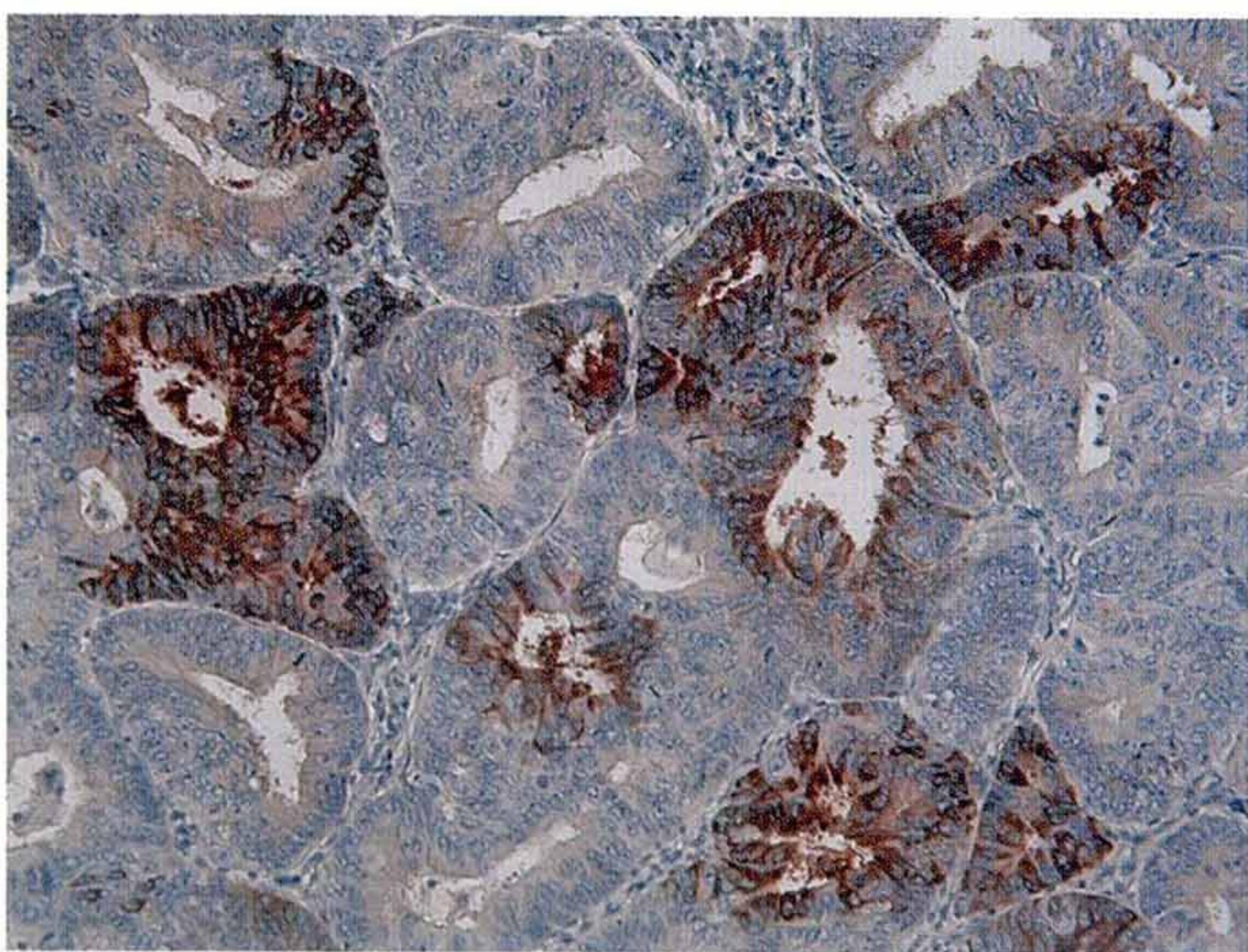


Fig. 3. Some isolated tumor glands show focal and strong positive immunostaining to MMP-2 monoclonal antibody in tumor cell cytoplasm( $\times 200$ , MMP-2)

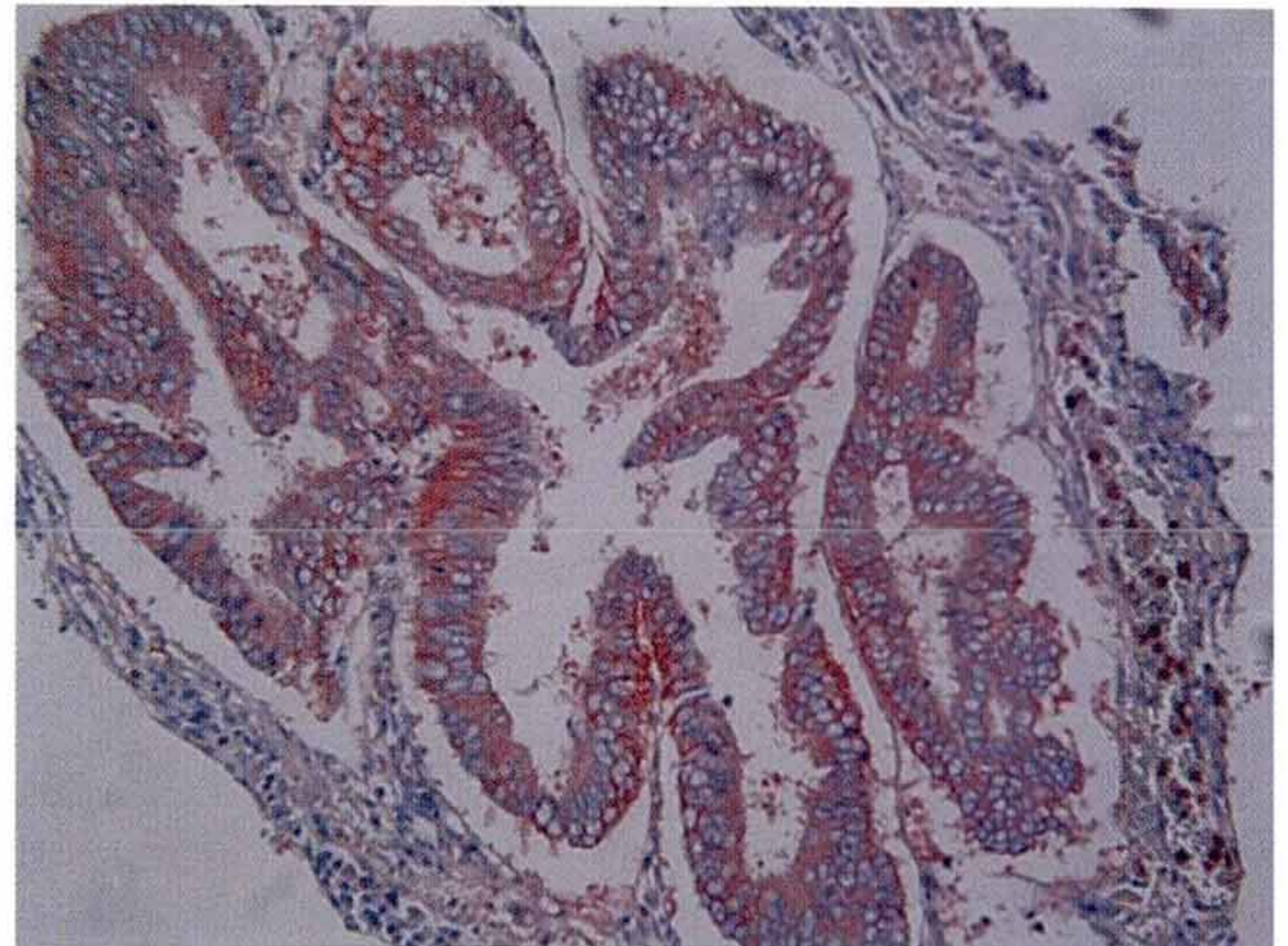


Fig. 4. Endometrial tumor glands show diffuse and moderately reactive immunostaining to MMP-9 monoclonal antibody in tumor cell cytoplasm and stromal cell components ( $\times 200$ , MMP-9)

## 2) 통계분석

통계학적 분석은  $\chi^2$ -test, 독립표본 T검정, 일원배치 분산분석법을 통하여 조사하였고 P값이 0.05 미만인 경우를 통계학적으로 유의있는 것으로 판정하였다.

## 결 과

### 1. 자궁내막암환자의 임상병리학적 특성

본 연구대상 환자 62명중 50세 미만은 23명 (37.1%), 50세 이상은 39명 (62.9%)였고, 평균 연령은 54세였다. 조직학적 유형은 endometrioid adenocarcinoma가 55례 (91.7%), non endometrioid adenocarcinoma가 5례 (8.3%)였다. 분화도는 grade 1이 26례 (43.3%), grade 2이상인 34례 (56.7%)였다. 임상적 병기는 I기, II기가 48례 (85.7%), III기, IV기가 8례 (14.3%)였다. 자궁근층의 침범이 1/2미만은 27례 (49.1%), 1/2이상인 28례 (50.9%)였다. 림프절 전이 유무는 45례 (81.8%)에서 보이지 않았으며, 10례 (19.2%)에서 전이를 보였다. 술전 CA-125 level은 35U/ml 미만인 35례 (63.6%), 35U/ml 이상이 20례 (36.4%)였다 (Table 1).

### 2. 자궁내막암에서 VEGF, MMP-2, MMP-9의 발현

자궁내막암에서 VEGF의 양성 발현율은 58명 중 48명이 발현되어 84.5% 이었고, MMP-2의 양성 발현율은 56명 중 43명이 발현되어 76.4% 이었으며, MMP-9의 양성

발현율은 55명 중 42명이 발현되어 76.4% 이었다 (Table 2, Fig. 1, Fig. 3, Fig. 4).

Table 2. Expression of VEGF, MMP-2, MMP-9 in endometrial cancer

|              | Number of positive cases (%) |
|--------------|------------------------------|
| VEGF (n=58)  | 49/58 (84.5%)                |
| MMP-2 (n=56) | 43/56 (76.8%)                |
| MMP-9 (n=55) | 42/55 (76.4%)                |

### 3. 자궁내막암에서 미세혈관밀도의 평균

자궁내막암에서 미세혈관 밀도의 평균값은  $19.4 \pm 8.6$  이었다 (Table 3, Fig. 2).

Table 3. Mean Microvessel Density in endometrial cancer

|               | MVD (n=58)     |
|---------------|----------------|
| Mean $\pm$ SD | $19.4 \pm 8.6$ |

Table 4. Correlation between VEGF expression and clinicopathologic parameters of endometrial cancer

| Clinicopathologic parameters    | No. of cases | VEGF (+) | VEGF (-) | P-value |
|---------------------------------|--------------|----------|----------|---------|
| Age (n=58)                      |              |          |          | 0.689   |
| <50                             | 22           | 19       | 3        |         |
| $\geq 50$                       | 36           | 30       | 6        |         |
| Histology (n=57)                |              |          |          | 0.946   |
| Endometrioid adenocarcinoma     | 52           | 45       | 7        |         |
| Non endometrioid adenocarcinoma | 5            | 4        | 1        |         |
| Histological grade (n=57)       |              |          |          | 0.291   |
| grade 1                         | 24           | 22       | 2        |         |
| grade 2,3                       | 33           | 27       | 6        |         |
| Surgical stage (n=54)           |              |          |          | 0.237   |
| stage I, II                     | 46           | 39       | 7        |         |
| stage III $\uparrow$            | 8            | 8        | 0        |         |
| Myometrial invasion (n=53)      |              |          |          | 0.961   |
| <1/2                            | 27           | 24       | 3        |         |
| $\geq 1/2$                      | 26           | 23       | 3        |         |
| Lymph node metastasis (n=52)    |              |          |          | 0.233   |
| negative                        | 43           | 37       | 6        |         |
| positive                        | 9            | 8        | 1        |         |
| CA-125 level (n=52)             |              |          |          | 0.951   |
| < 35 U/ml                       | 33           | 28       | 5        |         |
| $\geq 35$ U/ml                  | 19           | 16       | 3        |         |

### 4. 자궁내막암에서 VEGF발현과 임상병리학적 특성과의 상관관계

VEGF의 발현 유무와 예후를 결정하는 임상병리학적 인 특성들 즉, 환자의 연령, 조직학적 유형, 분화도, 임상 병기, 자궁근 침윤정도, 림프절 전이, 술전 CA-125 level 과는 통계학적인 유의성이 없었다 ( $p>0.05$ ) (Table 4).

### 5. 자궁내막암에서 미세혈관밀도와 임상병리학적 특성과의 상관관계

자궁내막암에서 미세혈관밀도 (MVD)와 임상병리학적 특성들 사이에는 역시 통계학적인 유의성은 없었으나 ( $p>0.05$ ), 술전 CA-125 level과는 통계학적으로 유의성이 있는 수치와 거의 근접하였다 ( $p=0.051$ ) (Table 5).

Table 5. Correlation between Microvessel density and clinicopathologic parameters of endometrial cancer

| Clinicopathologic parameters    | No. of cases | MVD            | P-value |
|---------------------------------|--------------|----------------|---------|
| Age (n=58)                      |              |                | 0.130   |
| <50                             | 23           | $21.5 \pm 7.8$ |         |
| $\geq 50$                       | 35           | $18.1 \pm 8.9$ |         |
| Histology (n=57)                |              |                | 0.982   |
| Endometrioid adenocarcinoma     | 53           | $19.5 \pm 8.7$ |         |
| Non endometrioid adenocarcinoma | 4            | $19.4 \pm 8.2$ |         |
| Histological grade (n=57)       |              |                | 0.280   |
| grade 1                         | 23           | $21.0 \pm 9.0$ |         |
| grade 2,3                       | 34           | $18.4 \pm 8.4$ |         |
| Surgical stage (n=54)           |              |                | 0.247   |
| stage I, II                     | 46           | $19.5 \pm 7.8$ |         |
| stage III $\uparrow$            | 8            | $25.7 \pm 9.9$ |         |
| Myometrial invasion (n=54)      |              |                | 0.184   |
| <1/2                            | 26           | $18.4 \pm 7.5$ |         |
| $\geq 1/2$                      | 28           | $21.5 \pm 9.1$ |         |
| Lymph node metastasis (n=53)    |              |                | 0.840   |
| negative                        | 44           | $19.6 \pm 8.5$ |         |
| positive                        | 9            | $20.2 \pm 8.6$ |         |
| CA-125 level (n=52)             |              |                | 0.051   |
| < 35 U/ml                       | 32           | $17.5 \pm 7.3$ |         |
| $\geq 35$ U/ml                  | 20           | $22.3 \pm 9.6$ |         |

## 6. 자궁내막암에서 MMP-2발현과 임상병리학적 특성과의 상관관계

MMP-2의 발현유무와 임상병리학적 특성들 즉, 환자의 연령, 조직학적 유형, 분화도, 임상병기, 자궁근 침윤정도, 림프절 전이, 술전 CA-125 level과는 통계학적인 유의성이 없었다 ( $p>0.05$ ) (Table 6).

Table 6. Correlation between immunoreactivity of MMP-2 and clinicopathologic parameters of endometrial cancer

| Clinicopathologic parameters    | No. of cases | MMP-2 (+) | MMP-2 (-) | P-value |
|---------------------------------|--------------|-----------|-----------|---------|
| Age (n=56)                      |              |           |           | 0.389   |
| <50                             | 23           | 19        | 4         |         |
| ≥50                             | 33           | 24        | 9         |         |
| Histology (n=55)                |              |           |           | 0.790   |
| Endometrioid adenocarcinoma     | 50           | 39        | 11        |         |
| Non endometrioid adenocarcinoma | 4            | 3         | 1         |         |
| Histological grade (n=55)       |              |           |           | 0.098   |
| grade 1                         | 20           | 18        | 2         |         |
| grade 2,3                       | 34           | 24        | 10        |         |
| Surgical stage (n=51)           |              |           |           | 0.135   |
| stage I, II                     | 44           | 33        | 11        |         |
| stage III ↑                     | 7            | 7         | 0         |         |
| Myometrial invasion (n=52)      |              |           |           | 0.343   |
| <1/2                            | 25           | 21        | 4         |         |
| ≥1/2                            | 26           | 19        | 7         |         |
| Lymph node metastasis (n=51)    |              |           |           | 0.101   |
| negative                        | 42           | 31        | 11        |         |
| positive                        | 8            | 8         | 0         |         |
| CA-125 level (n=50)             |              |           |           | 0.492   |
| < 35 U/ml                       | 30           | 22        | 8         |         |
| ≥ 35 U/ml                       | 19           | 16        | 3         |         |

## 7. 자궁내막암에서 MMP-9의 발현과 임상병리학적 특성과의 상관관계

MMP-9의 발현 유무와 임상병리학적 특성들 즉, 환자의 연령, 조직학적 유형, 분화도, 임상병기, 자궁근 침윤정도, 림프절 전이, 술전 CA-125 level과는 통계학적인 유의성이 없었다 ( $p>0.05$ ) (Table 7).

## 8. 자궁내막암에서 VEGF와 MVD와의 상관관계

VEGF와 미세혈관밀도 (MVD)를 동시에 염색관찰 가능하였던 55례 중 VEGF 양성인 49례의 미세혈관밀도

(MVD) 평균은  $19.9\pm9.1$ 이었고, VEGF 음성인 6례의 미세혈관밀도 (MVD) 평균은  $16.7\pm5.6$ 로 나타나 VEGF 양성인 군이 미세혈관밀도가 높게 나타났으나, 이 두 군간에 통계학적 유의성은 없었다 ( $p>0.05$ ) (Table 8).

Table 7. Correlation between immunoreactivity of MMP-9 and clinicopathologic parameters of endometrial cancer

| Clinicopathologic parameters    | No. of cases | MMP-9 (+) | MMP-9 (-) | P-value |
|---------------------------------|--------------|-----------|-----------|---------|
| Age (n=55)                      |              |           |           | 0.154   |
| <50                             | 22           | 19        | 3         |         |
| ≥50                             | 33           | 23        | 10        |         |
| Histology (n=53)                |              |           |           | 0.982   |
| Endometrioid adenocarcinoma     | 49           | 37        | 12        |         |
| Non endometrioid adenocarcinoma | 4            | 3         | 1         |         |
| Histological grade (n=53)       |              |           |           | 0.797   |
| grade 1                         | 22           | 17        | 5         |         |
| grade 2,3                       | 31           | 23        | 8         |         |
| Surgical stage (n=51)           |              |           |           | 0.598   |
| stage I, II                     | 45           | 33        | 12        |         |
| stage III ↑                     | 6            | 5         | 1         |         |
| Myometrial invasion (n=51)      |              |           |           | 0.811   |
| <1/2                            | 25           | 19        | 6         |         |
| ≥1/2                            | 26           | 19        | 7         |         |
| Lymph node metastasis (n=50)    |              |           |           | 0.944   |
| negative                        | 42           | 31        | 11        |         |
| positive                        | 8            | 6         | 2         |         |
| CA-125 level (n=48)             |              |           |           | 0.740   |
| < 35 U/ml                       | 30           | 21        | 9         |         |
| ≥ 35 U/ml                       | 18           | 14        | 4         |         |

Table 8. The correlation between VEGF and MVD in endometrial cancer

|     | VEGF (n=55)  |              | P-value |
|-----|--------------|--------------|---------|
|     | (+) (n=49)   | (-) (n=6)    |         |
| MVD | $19.9\pm9.1$ | $16.7\pm5.6$ | 0.399   |

## 9. 자궁내막암에서 미세혈관밀도(MVD)와 MMP-2,-9의 상관관계

미세혈관밀도 (MVD) 와 MMP-2를 동시에 염색관찰 가능하였던 56례 중 MMP-2 양성인 43례에서 미세혈관밀도 (MVD)의 평균은  $20.8\pm8.3$ 이었고, 음성인 군에서 미세혈관밀도 (MVD)의 평균은  $16.8\pm8.6$ 이었으며, 미세

혈관밀도 (MVD)와 MMP-9를 동시에 염색관찰 가능하였던 55례 중 MMP-9 양성인 42례에서 미세혈관밀도 (MVD)의 평균은  $20.3 \pm 7.5$ 이었고, 음성인 군에서 미세혈관밀도 (MVD)의 평균은  $18.2 \pm 10.5$ 로 나타나 MMP-2, -9 양성인 군에 미세혈관밀도가 높게 나타났으나 통계학적인 유의성은 없었다 ( $p > 0.05$ ) (Table 9).

Table 9. The correlation between MVD and MMP-2, -9 in endometrial cancer

|         | MMP-2 (n=56)   |                | MMP-9 (n=55)   |                 |
|---------|----------------|----------------|----------------|-----------------|
|         | (+) (n=43)     | (-) (n=13)     | (+) (n=42)     | (-) (n=13)      |
| MVD     | $20.8 \pm 8.3$ | $16.8 \pm 8.6$ | $20.3 \pm 7.5$ | $18.2 \pm 10.5$ |
| P-value | 0.138          |                | 0.450          |                 |

#### 10. 자궁내막암에서 혈관 내피세포 성장인자 (VEGF)와 MMP-2, -9의 상관관계

VEGF와 MMP-2를 동시에 염색관찰 가능하였던 54례에서 VEGF 발현이 양성인 47례 중 MMP-2 양성과 음성인 군은 각각 36례와, 11례이고, VEGF 발현이 음성인 7례 중 MMP-2 양성과 음성인 군은 각각 6례와 1례로 나타났으며 이 두 군간에 통계학적 유의성은 없었다. VEGF와 MMP-9를 동시에 염색관찰 가능하였던 52례에서 VEGF 발현이 양성인 45례 중 MMP-9 양성과 음성인 군은 각각 34례와, 11례이고, VEGF 발현이 음성인 7례 중 MMP-9 양성과 음성인 군은 각각 6례와 1례로 나타났으며 이 두 군 간에 통계학적 유의성은 없었다 ( $p > 0.05$ ) (Table 10).

Table 10. The correlation between VEGF and MMP-2, -9 in endometrial cancer

|          | MMP-2 (n=54) |            | MMP-9 (n=52) |            |
|----------|--------------|------------|--------------|------------|
|          | (+) (n=42)   | (-) (n=12) | (+) (n=40)   | (-) (n=12) |
| VEGF (+) | 36(85.7)     | 11(91.7)   | 34(85.0)     | 11(91.7)   |
| VEGF (-) | 6(14.3)      | 1(8.3)     | 6(15.0)      | 1(8.3)     |
| P-value  | 0.588        |            | 0.533        |            |

#### 고 찰

자궁내막암은 폐경기 이후의 여성에서 주로 발생하며 현재 서구 선진국에서는 가장 많이 발생하는 부인암으

로 그 빈도가 자궁경부암의 2배 정도로 미국에서 2001년에 39,300명의 신환이 발생하여 6600명이 사망했다고 보고되었고 우리나라에서는 자궁경부암, 난소암 다음으로 3위의 발생빈도를 보이고 있으나 1991년 부인암 등록사업을 시작한 이후 3배이상 발생이 증가하여 현재에는 발생빈도가 낮으나 앞으로 상당기간 발생이 급속히 증가할 것으로 예측되고 있다.<sup>1,2)</sup> 우리나라에서 증가요인으로는 한국여성에서 점차 서구화 되고 있는 식생활 형태, 호르몬 폭로, 임신, 초경, 폐경 연령의 변화와 관련이 있으리라 추정되고 있다. 이러한 자궁내막암 환자의 진단시 70~80%의 환자는 병변이 자궁에 국한된 초기에 발견되나 자궁내막암의 전체 사망률은 오히려 자궁경부암에 의한 사망률보다 높아 그 임상적 의의가 높다고 하겠으며 자궁내막암의 예후인자로는 병리조직학적 분류 및 분화도, 자궁근층의 침범정도, FIGO 수술적 병기, 림프절 전이 유무, 술전 CA-125치, 복강세포진 검사 결과, 자궁부속기 전이 유무등이 중요한 인자로 알려져 있고 이외 종양의 크기, 에스트로젠 및 프로제스테론 수용체 유무, DNA ploidy, 암유전자 혹은 종양억제유전자의 발현등이 알려져 있으며 이들 예후인자 사이에는 서로 밀접한 상관관계가 있다고 알려져 있다.<sup>3,4)</sup>

암의 진행에 있어서 종양이 성장하고 침윤, 전이를 일으키기 위해서는 신생혈관의 형성과 상피하 기저막층, 세포외 기질, 간질 조직의 분해과정이 필수적이다. 먼저 혈관 신생은 종양의 성장에 있어서 필수적이며 종양내에 혈관형성이 있어야  $2-3\text{mm}^3$  이상의 크기로 성장이 가능하며 동시에 종양의 신생 혈관의 내피세포는 여러 분해효소를 분비하기 때문에 종양세포가 쉽게 순환계로 들어가 전이의 기회가 높아질 수 있으며 여러 암종에서 신생혈관의 형성정도가 림프절 전이와 연관이 있는 것으로 보고되고 있다.<sup>5,6)</sup>

종양의 혈관형성을 자극하는 인자로 알려진 것은 acidic fibroblast growth factor (aFGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), VEGF, epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), platelet-derived growth factor(PDGF) 등이 있고, 억제 인자로는 thrombospondin-1 (TSP-1), angiostatin 등이 알려져 있으며 이중 대표적인 혈관 형성 인자로 알려진 VEGF는 34-45 kDa 크기의

당단백으로 종양환자에서 복수가 차는 것을 촉진하는 인자로 처음 보고된 이후 여러 정상 조직 그리고 종양 조직에서의 발현이 보고 되었다.<sup>14-17)</sup> VEGF의 작용 기전은 종양 세포에서 분비되는 VEGF에 의해 혈관 투과성이 증가되고 혈장 단백질이 빠져나와 섬유소가 풍부한 기질이 형성되며 기질내로 혈관 내피세포가 이동하게 하거나, 종양 주변의 대식 세포나 세포외 기질에 저장되어 있는 VEGF가 방출되어 혈관 내피세포 표면에 있는 VEGF 수용체인 flt-1과 KDR과 결합하고 이것이 유사 분열 신호로 작용하여 혈관 내피세포를 증식시키는 것으로 알려져 있다.<sup>18,19)</sup> VEGF의 발현은 유방암, 결장암, 자궁경부암 등에서 혈관신생 및 악성도와 관련이 있다고 보고되고 있으며 자궁내막암을 대상으로 한 Guidi 등 연구에 의하면 자궁내막암의 10예 모두에서 VEGF의 발현이 있었고, 정상 자궁내막 상피에 비하여 발현의 정도가 강하다고 하였다.<sup>9,20-22)</sup> 본 연구에서는 자궁내막암 58례 중 49례에서 VEGF의 발현 양성을 보여 발현율은 84.5%였으며 VEGF 양성발현과 자궁내막암의 예후를 좌우하는 임상병리학적 특성인 연령, 조직학적 유형, 세포의 분화도, FIGO 수술적 병기, 자궁근 침윤정도, 림프절 전이유무, 술전 CA-125치와의 상관관계는 유의성이 없는 것으로 나타났다.

종양이 성장하면서 새로이 형성되는 혈관은 종양 내 미세혈관 밀도로 측정될 수 있는데 본 연구에서 혈관 내피세포 표지자로 사용한 CD34 항원은 분자량 115 kDa의 당단백으로 처음에는 골수의 초기 골수양 세포 및 림프양 조상 세포에서 표현되는 것으로 알려졌으나, 그 후 혈관 형성 중의 내피세포에서 특히 민감하게 표현되는 것으로 밝혀져 내피세포의 지표로 이용되고 있다.<sup>23)</sup> 최근 여러 암종에서 미세혈관 밀도와 종양의 전이와 예후와의 상관성에 대한 많은 연구들이 있으며, 그 결과는 다양하게 보고되고 있다.<sup>24-26)</sup> 본 연구에서 자궁내막암 58례에서 CD34 항원을 이용한 면역조직화학적 염색에서 측정된 미세혈관 밀도는 평균  $19.4 \pm 8.6$ 이었으며 측정된 미세혈관 밀도와 자궁내막암의 예후를 좌우하는 임상병리학적 특성들과의 상관관계는 통계학적으로 유의성이 없는 것으로 나타났으나, 술전 CA-125치와는 통계학적으로 유의성이 있는 수치와 거의 근접하였다 ( $P=0.051$ ).

Matrix metalloproteinases(MMPs)는 암의 침윤과정에 필수적인 기저막과 세포외 기질의 분해과정에 작용하는 여러 단백질 분해효소 중 가장 많이 연구되는 효소로 이러한 단백질의 분해뿐만 아니라 암의 성장에 필수적인 맥관형성에도 직접 관여한다고 알려져 있다.<sup>7,8)</sup> 최근에는 종양의 예후인자로 중요한 가능성을 가진 단백분해효소들의 종양 침윤 및 전이와의 관계에 대한 연구와 논의가 활발하다. 종양세포가 침윤, 전이하는 기전은 매우 복잡한 생화학적, 세포생물학적 과정을 거치게 되는데 이 중 종양세포가 단백분해효소를 분비하여 조직의 형태를 유지하고 암세포의 침윤에 대한 일차적인 장벽의 역할을 담당하는 기저막과 세포외 기질을 분해하는 과정이 가장 중요한 단계이다. 이들 단백분해에 관여하는 효소는 MMPs, cathepsin D 그리고 neutrophil elastase나 plasmin과 같은 serine계 단백분해효소 등으로 크게 분류된다.<sup>30-32)</sup> Matrixin이라고도 알려진 MMPs는 활성도가  $Zn^{2+}$ 에 의존하는 내인성 단백분해효소로서 제 4형 교원질, laminin, fibronectin 등으로 주로 구성되는 기저막, 세포외 기질을 분해하고 정상 간질조직의 대사에도 관여한다.<sup>27)</sup> MMPs의 경우 지금까지 23종류 (MMP 1-23)가 발견되었으며 그 중 19개 (MMP 1-13 및 MMP 18-23)는 분비성 단백질인데 비해 나머지 4개 (MMP 14-17; MT-MMP 1-4)는 세포막 부착형인 막성 MMP (Membrane type MMP; MT-MMP)이다.<sup>8,28)</sup> 최근에 발견된 막형(membrane type) MMP(MT-MMP)는 세포막에 존재하며 주로 MMP-2의 비활성형을 활성화시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있다.<sup>28)</sup>

MMP-2(gelatinase A)는 분자량 72 kDa로 교원질 및 elastin, fibronectin 등을 분해하는데, 기저막의 주요 성분인 제 4형 교원질 분해에 가장 중요한 역할을 하며, 그외 세포외 기질의 분해와 맥관형성(angiogenesis)에 관여하여 암의 진행에 관여한다고 하였다.<sup>29)</sup> MMP-9 (gelatinase B)은 분자량 92 kDa로 역시 MMP-2와 비슷한 기능을 가지는 것으로 알려져 있다.<sup>29,33,34)</sup> MMP-2는 암세포를 성장, 증식시키는 인자에 의해 기질세포에서 합성되며 MT1-MMP에 의해 암세포 원형질막에서 활성화되거나 세포표면 수용체/활성화 물질에 의해 활성화된다.<sup>29)</sup> 본 연구에서는 자궁내막암에서 MMP-2, -9의 발현율은 MMP-2는 76.8%(43/56), MMP-9은 76.4%(42/55)였으며,

MMP-2,-9의 양성발현과 자궁내막암의 예후를 좌우하는 임상병리학적 특성들과의 상관관계는 통계학적으로 유의성이 없는 것으로 나타났다.

그리고 본 연구에서 VEGF, MVD 사이의 상관관계는 VEGF 양성인 군의 미세혈관밀도(MVD)의 평균은  $19.9 \pm 9.1$ , VEGF 음성인 군의 미세혈관밀도(MVD) 평균은  $16.7 \pm 5.6$ 로 나타나 VEGF 양성인 군이 높게 나타났으나 이 두군 간에 통계학적 유의성은 없었다. 미세혈관밀도(MVD)와 MMP-2,-9사이의 상관관계는 MMP-2 양성인 군에서 미세혈관밀도(MVD)의 평균은  $20.8 \pm 8.3$ , 음성인 군에서 미세혈관밀도(MVD)의 평균은  $16.8 \pm 8.6$ 이었으며, MMP-9 양성인 군에서 미세혈관밀도(MVD)의 평균은  $20.3 \pm 7.5$ , 음성인 군에서 미세혈관밀도(MVD)의 평균은  $18.2 \pm 10.5$ 로 나타나 MMP-2,-9양성인 군에서 미세혈관 밀도가 높게 나타났으나 역시 통계학적인 유의성은 없었다.

혈관 내피세포 성장인자(VEGF)와 MMP-2,-9사이의 상관관계도 역시 통계학적으로 유의성이 없는 것으로 나타났다.

## 결 론

62예의 자궁내막암 중 조직을 대상으로 VEGF, MVD, MMP-2,-9에 대한 면역조직화학염색을 실시하여 이들의 발현과 자궁내막암의 예후인자 즉, 연령, 조직학적 유형, 세포의 분화도, FIGO 수술적 병기, 자궁근 침윤정도, 림프절 전이유무, 술전 CA-125치와의 상관관계를 분석하고 또 이들 간의 연관성에 대하여 분석을 시행한 결과 모두 통계학적으로 연관성이 없다는 결과가 나와, 본 연구 결과에 의하면 이들은 자궁내막암 환자의 예후인자로서의 유용성은 없는 것으로 나타났으나 향후 좀 더 많은 증례를 통한 생존율 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. Jemal A, Thomas A, Murray T : Cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin 52:23-47, 2002.
2. 한국 중앙암등록본부, 보건복지부. 한국 중앙암등록사업 연례보고서 (2002.1-2002.12) 보건복지부, 2004.
3. 정인형, 이성경, 김승보 : 자궁내막암 56예의 임상병리학적 특성 및 예후에 관한 고찰, 대한산부회지 45:687-695, 2002.

4. Lutz Mh, Underwood PB Jr, Kreutner A Jr, Miller MC : Endometrial carcinoma: a new method of classification of therapeutic and prognostic significance. Gynecol Oncol 6:83-94, 1978.
5. Folkman J, Shing Y : Angiogenesis. J Biol Chem 267:10931-10934, 1992.
6. Weidner N : Intratumor microvessel density as prognostic factor in cancer. Am J Pathol 147:9-19, 1995.
7. Curran S, Murray GI : Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. Eur J Cancer 36:1621-1630, 2000.
8. Nagase H, Woessner JF Jr : Matrix Metalloproteinases. J Biol Chem 274:21491-21494, 1999.
9. Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Manseau EJ, Senger DR, Dvorak HF : Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptor in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract. Cancer Res 53:4727-4735, 1993.
10. Yamamoto S, Konishi I, Mandai M, Kuroda H, Komatsu T, Nanbu K : Expression of VEGF in epithelial ovarian neoplasm: Correlation with clinicopathology and patient survival, and analysis of serum VEGF levels. Br J Cancer 76:1221-1227, 1997.
11. Guidi AJ, Abu-Jawdeh G, Tognazzi K, Dvorak HF, Brown LF : Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in endometrial carcinoma. Cancer 78:454-460, 1996.
12. Salvesen HB, Akslen LA : Significance of tumor-associated macrophages, vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 expression for tumor angiogenesis and prognosis in endometrial carcinoma. Int J Cancer 84:538-543, 1999.
13. Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG : Cancer metastasis and angiogenesis: An imbalance of positive and negative regulation. Cell 64:327-336, 1991.
14. Folkman J : Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. Nat Med 1:27-31, 1995.
15. Terai Y, Ueda M, Kumagai K, Ueki K, Ueki M : Tumor angiogenesis and thymidine phosphorylase expression in ovarian carcinomas including serous surface papillary adenocarcinoma of the peritoneum. Int J Gynecol Pathol 19:354-360, 2000.
16. Senger DR, Van de Water L, Brown LF, Nagy JA, Yeo KT, Yeo TK, Berse B, Jackman RW, Dvorak AM, Dvorak HF : Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. Cancer Metastasis Rev 12:33-24, 1993.
17. Berse B, Brown LF, Van de Water L, Dvorak HF, Senger DR : Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. Mol Biol Cell 3:211-220, 1992.
18. Esch F, Baird A, Ling N, Hill F, Deneroy L : Primary structure of bovine basic fibroblast growth factor (FGF) and comparison with the amino-terminal sequence of bovine brain acidic FGF. Proc Natl Acad Sci USA 82:6507-6511, 1985.

19. De Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT : The fms-like tyrosine kinase, a receptor for VEGF. *Science* 255:989-991, 1992.
20. Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Guidi AJ, Dvorak HF, Senger DR, Connolly JL, Schnitt SJ : Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinoma of gastrointestinal tract. *Cancer Res* 53:4727-4735, 1993.
21. Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Manseau EJ, Dvorak HF, Senger DR : Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in kidney and bladder carcinomas. *Am J Pathol* 43:1255-1262, 1993.
22. Guidi AJ, Abu-Jawdeh G, Berse B : Vascular permeability factor expression and angiogenesis in cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 87:1237-1245, 1995.
23. Traweek ST, Kandalaft PL, Mehta P, Battifora H : The human hematopoietic progenitor cell antigen (CD34) in vascular neoplasia. *Am J Clin Pathol* 96:25-31, 1991.
24. Shen GH, Ghazizadeh M, Kawanami O, Shimizu H, Jin E, Araki T, Sugisaki Y : Prognostic significance of vascular endothelial growth factor expression in human ovarian carcinoma. *Br J Cancer* 83:196-203, 2000.
25. Gasparini G, Bonoldi E, Viale G, Verderio P, Boracchi P, Panizzoni GA, Radaelli U, Di Bacco A, Guglielmi RB, Bevilacqua P : Prognostic and predictive value of tumor angiogenesis in ovarian carcinomas. *Int J Cancer* 69:205-211, 1996.
26. Hollingsworth HC, Kohn EC, Steinberg SM, Rothenberg ML, Merino MJ : Tumor angiogenesis in advanced stage ovarian carcinoma. *Am J Pathol* 147:33-41, 1995.
27. Lokeshwar BL, Selzer MG, Block NL, Gunja-Smith Z : Secretion of matrix metalloproteinases and their inhibitors (tissue inhibitor of metalloproteinases) by human prostate in explant cultures: Reduced tissue inhibitor of metalloproteinase secretion by malignant tissues. *Cancer Res* 63:4493-4498, 1993.
28. Sato H, Seiki M : Membrane-Type Matrix Metalloproteinases (MT-MMPs) in Tumor Metastasis. *J Biochem* 119:209-215, 1996.
29. Seiki M : Membrane-Type Matrix Metalloproteinases. *APMIS* 107:137-143, 1999.
30. Boag AH, Young ID : Immunohistochemical analysis of type IV collagenase expression in prostatic hyperplasia and adenocarcinoma. *Mod Pathol* 6:65-68, 1993.
31. Tryggvason K, Hoyhtya M, Pyke C : Type IV collagenases in invasive tumors. *Breast Cancer Res Treat* 24:209-218, 1993.
32. Sato H, Kida Y, Mai M, Endo Y, Sasaki T, Tanaka J, Seiki M : Expression of genes encoding type IV collagen-degrading metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in various human tumor cells. *Oncogene* 7:77-83, 1992.
33. Ueno H, Nakamura H, Inoue M, Imai K, Noguchi M, Sato H, Seiki M, Okada Y : Expression and tissue localization of membrane-types 1, 2 and 3 matrix metalloproteinases in human invasive breast carcinomas. *Cancer Res* 57:2055-2060, 1997.
34. Matrisian LM : Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet* 6:121-125, 1990.