

화학요법에 의한 설암조직의 CD34의 변화

길영기

고신대학교 의과대학 해부학교실

Alteration of CD34 Expression in Tongue Cancer Tissue by Chemotherapy

Young-Gi Gil

Department of Anatomy, Kosin University, College of Medicine, Busan, Korea

Abstract

Despite enormous progress in current chemotherapeutic approaches for cancer, there is not advances of prognosis in malignant tumor of head and neck. Especially the prognosis in tongue cancer patients with well developed vessel is poor. Therefore, it is very important to distinguish the patient with infiltrating tumor and to find tumor marker which can play key role in effective strategy for cancer treatment. Because there is little report of CD34 as prognostic marker in tongue cancer, this study was performed to investigate the alteration of CD34 expression in tumor specimens from eleven patients with tongue cancers before and after chemotherapy.

In this study, CD34 was expressed in endothelial cells of mature vessels, especially in micro-vessels, which located in tumor parenchymal tissue. In the specimens after chemotherapy, the expression of CD34 was decreased, suggest that chemotherapy inhibit the angiogenesis.

Taking above, the alteration of CD34 expression in tongue cancer tissue by chemotherapy suggests that CD34 potentially are expected to use in tongue cancer as prognostic factors.

Key words : CD34, Tongue cancer, chemotherapy

서 론

세포표면 단백질인 CD34는 조혈모세포의 분리를 증명하는 표지자와 골수 이식을 위한 처치의 전구체를 분리하기 위한 표지자로 약 30년간 이용되었으며,¹⁾ 또한 CD34는 골수의 조혈세포와 여러 비조혈기관에 존재하는 단량체인 115 kDa의 당단백으로 혈관내피세포의 세포표면에서 관찰되며 혈관내피세포의 면역세포화학적 지표로 알려져 있다.²⁻³⁾ 혈관 내피세포에서는 세포 접착부위에서 주로 발견되어 내피세포의 부착, 이동, 증식 및 혈관형성에 관여 한다.⁴⁻⁵⁾ CD34에 대한 항체는 현재까

지 급성 백혈병의 진단에 유용하게 사용되어 왔는데, 최근에는 각종 장기의 악성 혈관종양의 진단에서 혈관분화의 지표로서도 이용되고 있다.

지금까지 종양에 대한 진단과 치료의 많은 발전에도 불구하고 두경부 영역의 악성종양의 예후는 큰 변화가 없으며 특히 잘 발달된 혈관분포를 가지는 설암에서는 그 치료 및 예후가 불량한 것이 사실이다. 최소한의 침윤양상을 보이는 편평상피세포암일지라도 혀에 존재할 경우 대부분 근치적 절제술로 치료를 하지만 국소적인 재발 혹은 원격전이 등으로 생명에 위협을 초래할 수 있다. 따라서 생물학적으로 침윤 종양을 가진 환자를 구분하고 효과적인 치료전략에 중요한 요소로 작용할 수 있는 종양 표지인자에 대한 연구가 계속적으로 진행되고 있다. 그리고 병리학적 예후인자들은 개개 환자에서

교신저자 : 길 영 기
주소 : 602-702 부산광역시 서구 암남동 34번지
고신대학교 의과대학 해부학교실
TEL : 051-990-6412 FAX : 051-990-3081
E-mail : tomy88@ns.kosinmed.or.kr

의 재발 및 예후를 예측하는데 한계가 있어 분자생물학적 수준의 새로운 예후인자들에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다.

본 연구는 CD34 발현을 통해 화학요법치료에 의한 암 억제에 신생혈관저해와 관련이 있음을 설명하고 설암환자들이 화학요법치료를 받기 전과 받은 후의 표본을 이용하여 조직면역형광염색법으로 CD34의 발현을 조사하였다.

연구대상과 방법

연구대상

설암을 가진 환자들에서 파라핀 절편을 획득하였다. 모든 환자들은 1998년 11월부터 2008년 9월까지 부산대학교 구강악안면외과에서 조직검사를 통하여 설암으로 진단받고 최소한 1회 이상의 항암제 치료를 실시한 후 근치적 절제술을 시행 받은 11명의 환자를 대상으로 하였다. 환자들은 조직검사시기에 인지할 만한 원격전이 는 없었으며 어떠한 환자도 이전에 방사선 치료 등의 치료를 받은 과거력은 없었다. 항암제 치료는 cisplatin과 5-fluorouracil을 이용하여 근치적 절제술 전에 신부가 화학요법으로 실시하였다. Cisplatin은 70 mg/m² 용량으로 하루에 주입하였고 5-fluorouracil은 1000 mg/m² 용량으로 4일 연속으로 주입하였으며 2회 이상 실시할 경우 이러한 일정은 매 3주 다시 실시되었다. 추적기간 중 2명의 환자들에게서 국소적 재발 및 폐 원격전이가 나타나 사망하였다.

연구방법

술 전 조직검사 표본을 통한 악성도의 평가

구강편평상피세포암에 대한 Anneroth등의 분석방법을 응용하여 환자에 대한 임상적 정보가 없는 2명의 병리학자를 통하여 술 전 조직검사 표본에서 다음의 세 가지 항목을 조사하였다. 각화도(Keratinization), 핵 다형성(Nuclear pleomorphism), 고배율상의 유사분열 수(Number of mitoses)를 조사하였으며 이들 3개 항목에 대하여 400배의 고배율로 관찰하여 3등급으로 나누어 1등급은 악성도가 가장 낮은 것으로, 3등급은 가장 악성

도가 높은 것으로 표현하였다. 세포의 각화도, 그리고 핵다형성은 핵의 수, 크기, 형태의 변화, 핵-세포질 비율, 다염색성핵 및 다핵의 존재로 평가하였고 유사분열 수는 기저세포층 상방에서 유사분열 수를 평가하였다.

조직면역형광염색

탈파라핀한 조직절편을 증류수에 수화시킨 후, 1%의 normal horse serum에 1시간 동안 반응시켜 비특이적인 반응을 억제했다. 1차 항체로 1:200으로 희석한 mouse monoclonal anti-human CD34 (Santa Cruz, CA, USA)를 37°C에서 1시간 동안 적용시켰다. PBS로 10분씩 3회 세척한 후 2차 항체인 FITC-conjugated anti-mouse IgG (Vector Lab.)을 1:200으로 희석하여 실온에서 1시간 동안 적용하였다. 조직절편을 PBS로 10분씩 3회 세척한 후, PBS:glycerol (1:1) 혼합액을 떨어뜨리고 봉입했다.

조직면역형광염색 후 환자에 대한 임상적 정보를 전혀 인지하지 못하는 2명의 병리학자를 통하여 종양세포에서의 CD34의 발현은 염색강도(staining intensity)를 통하여 평가하였다. 0에서 3까지 4등급으로 나누어 0은 인지할 만한 염색강도가 없는 경우, 1은 저발현군, 2는 중발현군, 3은 고발현군으로 표기하였다. 또한 저배율에서 면역양성을 보이는 조직의 3개의 영역을 선택하여 200배 배율에서 형광현미경카메라 (AxioCam MRc5, Carl Zeiss, Germany)로 관찰하고, 사진 촬영한 후 영상 분석장치 (AxioVision 4.3, Carl Zeiss, Germany)로 면역양성을 띠는 혈관수를 계산하고 조직의 면적과 밀도를 계산하고 평균치를 구하였다.

통계학적 분석

술 전 조직검사표본과 신부가화학요법 후 근치적 절제술을 실시한 표본에서 미세혈관밀도 수준의 변화는 윌콕슨 부호순위 검정(wilcoxon's signed rank test)을 통하여 분석하였으며 유의수준은 $p < 0.05$ 로 하였다.

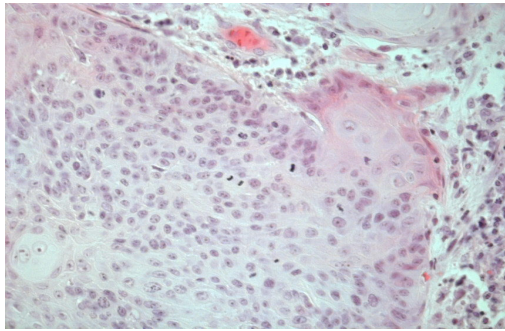
결 과

술 전 조직검사표본에서 악성도 검사

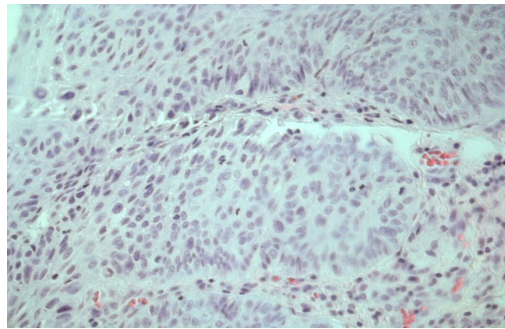
각화도, 핵 다형성, 그리고 유사분열 수를 통한 설암

Table 1. Malignancy Grading System of Tongue Squamous Cell Carcinoma

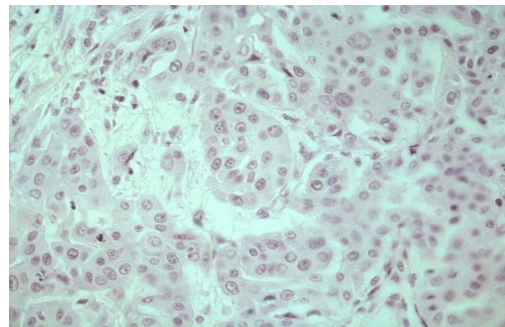
	Grade		
	G1	G2	G3
Keratinization	7	4	0
Nuclear pleomorphism	1	3	7
Number of mitosis	1	4	6



(A)



(B)



(C)

Fig. 1. Micrographs showing histological differences at each tumor grade(G) of tongue squamous cell carcinoma. (A) G1 shows orderly stratification, obvious intercellular bridges, and keratinization. (B) G2 have intermediate features between former types. (C) G3 are composed of sheets of undifferentiated cells without obvious keratinization and show a high mitotic rate. x 400.

에서는 규칙적인 층을 형성 하고, 명확한 세포사이다리와 각화되는 양상을 보였으며, 3 등급의 암 조직에서는 각화현상이나 세포사이다리를 보이는 층판 구조를 보이지 않았으나, 상당히 많은 세포들이 거대세포를 형성 하면서 핵 다형성과 세포분열 모습을 나타내었다. 2 등급의 암 조직에서는 1 등급과 3 등급 사이의 중간 형태를 나타내었다(Table 1). 400배 배율의 현미경 사진이 등급에 따른 암 조직의 형태를 보여 주고 있다(Fig. 1).

술 전 조직검사와 근치적 절제술 후 표본의 미세혈관 밀도 변화

술 전 조직검사표본과 신부가화학요법 후 근치적 절제술을 실시한 표본에서 미세혈관밀도의 발현 변화를 CD34 항체를 이용하여 평가하였다(Table 2). 술 전 생검조직과 비교하여 미세혈관밀도의 발현은 Cisplatin과 5-FU를 이용한 신부가화학요법 후 근치적 절제술을 실시한 표본에서 감소하는 경향을 나타내었다. 생검조직에서 CD34 고발현하는 세 경우는 근치적 절제술 후에 두 경우에서 CD34 저발현을 보였으며, CD34 중발현하는 세 경우에는 근치적 절제술 후 두 경우가 CD34 저발현을 나타내었다(Fig. 2).

Table 2. The mean area [μm^2] of CD34 expressed in biopsy and radical excision specimen.

Tissue number	Biopsy	Radical excision
1	68.23	42.45
2	53.98	28.22
3	34.54	25.64
4	29.78	32.24
5	49.09	37.59
6	56.83	30.25
7	65.19	62.73
8	42.55	40.74
9	47.37	34.15
10	33.71	18.88
11	77.39	42.49
Total	558.66	395.38
Average	50.78	35.94

에서의 종양세포 특성을 고배율로 관찰하여 술 전 조직 검사 표본에서 악성도를 평가하였다. 1 등급의 암 조직

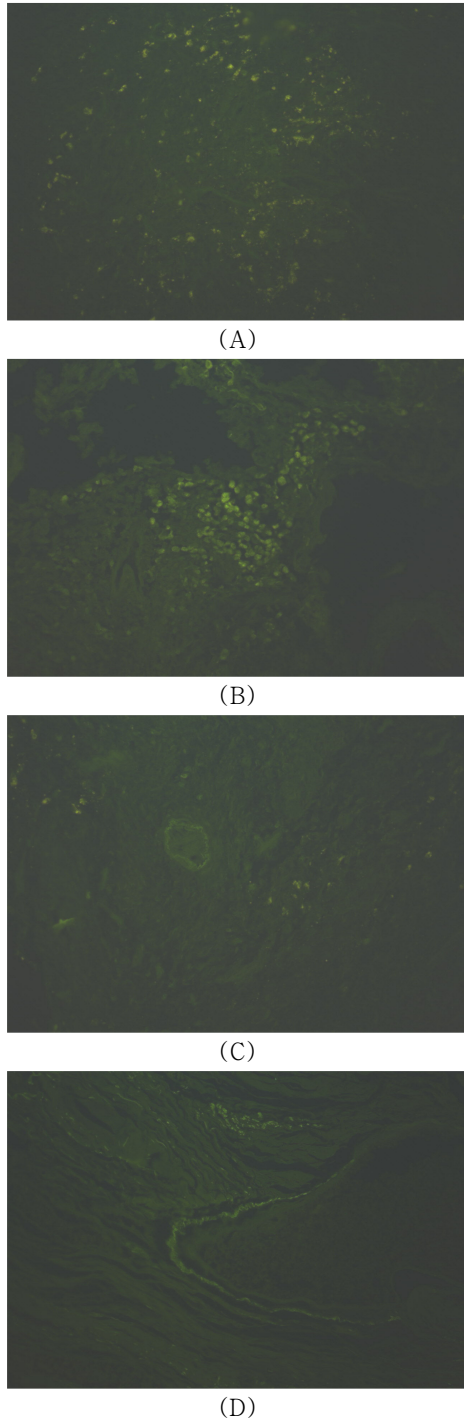


Fig. 2. Representative photomicrographs of staining for CD34 in biopsy (A and B) and radical excision specimen (C and D). x 200.

고 찰

정상조직과 유사하게 종양은 종양세포로 이루어진

실질조직과 염증세포, 혈관내피세포 및 섬유모세포 등의 비종양 지지조직으로 이루어진 간질조직으로 구성되어 있으며 산소와 영양소를 제공하는 새로운 혈관의 공급이 없을 경우 저산소 상태를 야기하게 된다. 혈관신생은 기존에 존재하는 혈관망에서 이루어지는 것으로 정상적인 생리학적 과정과는 달리 종양에서는 조절되지 않는 비정상적인 혈관의 형성을 야기한다. 많은 연구에 의하면 비정상적인 혈관신생과 증식이 악성종양에서 전이와 깊은 관련이 있으며, Homer 등⁶⁾은 두경부종양에서 이러한 미세혈관의 증가가 종양의 재발이나 림프절 전이 등과 밀접한 관련이 있다고 보고하였다.

CD34는 골수의 조혈세포 표면에서 발견되어 줄기세포 표식자로 생각되어 왔으며,⁷⁾ 후에 정상 혈관 내피세포에서도 발현되는 것으로 알려졌다. 또한 림프관 내피세포에서는 발현이 되지 않으며 림프관종에서도 음성으로 발현되어⁸⁾ 혈관에서 유래한 양성 및 악성 종양의 기원을 밝히는데 매우 유용한 지표로 알려져 있다.⁹⁾ CD34 염색 시 같은 조직의 주변부 정상 혈관 내피세포보다 종양성 증식을 보인 혈관 내피세포에서 강하게 염색되었다는 보고¹⁰⁾와 혈관의 크기가 작을수록 강하게 염색되는 경향이 있다는 보고¹¹⁾ 등으로 미루어 CD34가 혈관형성과 관련이 있을 것으로 추측된다. 혈관형성과정은 내피세포의 이동으로 시작하여 싹이 형성되고 내피세포의 증식이 일어난 후 싹이 융합되며, 그 후 기저막의 형성과 혈관주위세포가 발생하고 새로운 혈관으로 성숙된다.¹²⁾ Traweck 등⁹⁾은 각종 혈관 기원 종양에서 CD34에 대한 염색을 시행한 결과 일반적으로 종양성 혈관 내피세포가 같은 조직의 주변부 정상 내피세포보다 강하게 염색된다고 보고하였으나, 혈관종의 경우는 그 염색도가 다양하며 일반적으로 강하지 않았는데 이는 느린 증식과 관련이 있을 것이라고 하였다. 본 실험의 결과에서는 CD34의 발현이 화학요법치료 전의 환자에서는 암실질 조직 내의 성숙혈관의 내피세포에서 CD34의 발현을 보였으며, 특히 작은 혈관에서 강하게 발현 되었으며, 화학요법치료 후에는 작은 혈관들의 생성이 현저하게 줄어 든 것으로 보아, 화학요법 치료에 의한 암 억제가 신생혈관저해와 관련이 있어 보인다.

이상의 연구결과로 미루어 볼 때, CD34 항체의 발현이 화학요법치료 전과 후에 현저하게 차이나는 것으로

보아 설암의 예후인자로 유용하게 사용될 수 있는 잠재성이 있으므로 더 많은 증례와 연구를 통해 CD34의 분포와 종양전이 유무, 예후 등을 관련지어 보는 것이 필요하다.

결 론

본 연구에서 CD34의 발현이 화학요법치료 전의 환자에게서는 종양실질조직 내의 성숙혈관의 내피세포에서 CD34의 발현을 보였으며, 특히 작은 혈관에서 강하게 발현되었으며, 화학요법치료 후에는 작은 혈관들의 생성이 현저하게 줄어 든 것으로 보아, 화학요법치료에 의한 암 억제제가 신생혈관저해와 관련이 있어 보인다.

이상의 연구결과로 미루어 볼 때, CD34 항체의 발현이 화학요법치료 전과 후에 현저하게 차이 나는 것으로 보아 설암의 잠재적인 예후인자로 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

- 1) Nielsen JS, McNagny KM : Novel functions of the CD34 family. J Cell Sci 15:3683-3692, 2008
- 2) Ramani P, Bradley NJ, Fletcher CD : QBEND/10, a new monoclonal antibody to endothelium: assessment of its diagnostic utility in paraffin sections. Histopathology 17: 237-242, 1990
- 3) Watt SM, Karhi K, Gatter K, Furley AJ, Katz FE, Healy LE, Altass LJ, Bradley NJ, Sutherland DR, Levinsky R : Distribution and epitope analysis of the cell membrane glycoprotein (HPCA-1) associated with human hemopoietic progenitor cells. Leukemia 1: 417-426, 1987
- 4) 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
- 5) Fina L, Molgaard HV, Robertson D, Bradley NJ, Monaghan P, Delia D, Sutherland DR, Baker MA, Greaves MF : Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. Blood 15:2417-2426, 1990
- 6) Homer JJ, Greenman J, Stafford ND : Angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. Clin Otolaryngol 25:169-180, 2000
- 7) Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH,

- Loken MR, Civin CI : Antigenic analysis of hematopoiesis. IV. The My-11 hematopoietic cell surface antigen is expressed by myelomonocytic and lymphoid, but not erythroid, progenitor cells. Exp Hematol 14:935-945, 1986
- 8) Sankey EA, More L, Dhillon AP : QBEnd/10. a new immunostain for the routine diagnosis of Kaposi's sarcoma. J Pathol 161:267-271, 1990
- 9) Kaufmann M, Heider KH, Sinn HP, von Minckwitz G, Ponta H, Herrlich P : CD44 variant exon epitopes in primary breast cancer and length of survival. Lancet 11:615-619, 1995
- 10) Maenpaa H, Ristamaki R, Virtamo J, Franssila K, Albanes D, Joensuu H : Serum CD44 levels preceding the diagnosis of non-Hodgkin's lymphoma. Leuk Lymphoma 37:585-592, 2000
- 11) Nickloff BJ. The human progenitor cell antigen (CD34) is localized on endothelial cells, dermal dendritic cells, and perifollicular cells in formalin-fixed normal skin, and on proliferating endothelial cells and stromal spindle-shaped cells in Kaposi's sarcoma. Arch Dermato 127:523-529, 1991
- 12) Schlingemann RO, Rietveld FJ, de Waal RM, Bradley NJ, Skene AI, Davies AJ, Greaves MF, Denekamp J, d Ruiter DJ : Leukocyte antigen CD34 is expressed by a subset of cultured endothelial cells and on endothelial abluminal microprocesses in the tumor stroma. Lab Invest 62:690-696, 1990