

타액선 선양낭성암종에서 혈관형성 신호전달 물질의 발현과 미세혈관농도에 관한 면역조직화학적 연구

박영욱 · 인연수

강릉대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2006;32:530-543)

IMMUNOHISTOCHEMICAL ASSAYS FOR THE EXPRESSION OF ANGIOGENIC SIGNALING MOLECULES AND MICROVESSEL DENSITY IN ADENOID CYSTIC CARCINOMAS OF HUMAN SALIVARY GLANDS

Young-Wook Park, Yeon-Soo In

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Kangnung National University

Adenoid cystic carcinoma (ACC) is one of the most common malignant tumors of salivary glands. It is characterized by a relentless regrowth especially around nerve tissues and a high rate of hematogenous distant metastasis. Clinically most deaths from salivary ACC are caused by delayed lung metastases that are resistant to conventional chemotherapy. So, knowledge of cellular and molecular properties that influence the dissemination of metastatic tumor cells, is important for new treatment strategies of metastatic lesions. We determined expressions of angiogenic signaling molecules microvessel density (MVD) using surgical specimens of human salivary ACC. Protein expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptor (VEGFR)-2, activated VEGFR-2, and human CD31 were assessed in 20 cases of salivary ACC by immunohistochemical staining. Most of the tumors, especially ACC with a tubulocribriform pattern, were positive for antibodies of VEGF, VEGFR-2, and activated VEGFR-2. The overall percentages of the 20 specimens expressing VEGF, VEGFR-2, activated VEGFR-2 were 90, 95, and 95%, respectively. Immunoreactivities of the biomarkers in salivary ACC were higher than those in normal salivary gland. Furthermore, immune-related cells as well as tumor cells expressed VEGF/VEGFR-2. Microvessel density of salivary ACC was higher than that of normal salivary gland ($P<0.05$). Taken together, angiogenic signaling molecules are actively expressed in salivary ACC. And we suggest that these molecules may have critical role in the hematogenous spread of salivary ACC, which has a propensity for delayed lung metastasis. Therefore, these biomarkers can be molecular targets for therapy of metastasis of salivary ACC.

Key words: Salivary adenoid cystic carcinoma, Hematogenous metastasis, Angiogenic signaling molecule, Microvessel density

I. 서 론

선양낭성암종 (adenoid cystic carcinoma, 이하 ACC)은 유방과 같은 선조직에 발생하는 암종으로 타액선에서는 점액성유표피암종 (mucoepidermoid carcinoma)에 이어 두 번째로 빈발하는

악성종양이다¹⁾. 타액선 선양낭성암종은 조직학적으로는 스위스 치즈모양의 암세포 증식상을 보이는 사상체(cribriform)형, 관 구조물을 형성하는 관(tubular)형, 그리고 덩어리 형태로 암세포가 분포하는 충실(solid)형으로 분류된다²⁾. 임상적으로 성장속도가 빠르지 않은 암종이지만 주변조직 침투로 인한 재발 병소와 혈관성 폐전이 병소로 인해 환자의 장기 생존율이 위협받게 된다³⁾. 즉 선양낭성암종은 특징적인 암생물학적 행동양상을 보여 지연성 원격전이 (delayed distant metastasis)가, 특히 폐에 빈발하는 경향이 있어 임상적으로 경과가 길고 예후가 불량한 증례들이 있다⁴⁾. 따라서 기존의 방식으로는 치료가 어려운 혈관성 전이 병소에 대한 새로운 치료책이 요구되고 있다. 이를 위해서는 먼저 선양낭성암종의 혈관성 원격전이 기

박영욱

210-702 강원도 강릉시 강릉대학교 120번지
강릉대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Young-Wook Park

Dept. OMFS, College of Dentistry, Kangnung National University
Gangneung Daehangno 120, Gangneung, Gangwon-do, 210-702, South Korea
Tel: 82-33-640-3183 Fax: 82-33-640-3103
E-mail: ywpark@kangnung.ac.kr

* 본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임. (과제고유번호 : A060174)

전에 관계하는 인자들을 파악하는 것이 선행과제이며, 이같은 물질들이 확인되면 효과적인 분자표적치료(targeted molecular therapy)를 계획할 수 있을 것이다.

모든 생명체가 그러하듯이 종양의 성장과 생존(survival) 그리고 전이 과정도 전적으로 종물에의 적절한 혈액의 공급에 의존한다. 즉 신생혈관의 형성 없이는 종양은 1-2mm³ 이상 성장할 수 없기에 신생혈관형성(neoangiogenesis) 과정은 종양의 악성 표현형 유지에 필수불가결한 과정이다⁵. 신생혈관 형성은 다단계의 연속적이면서도 독립된 과정들에 의한다. 즉 모세혈관 주변의 기저막(basement membrane)이 일부 분해되면서 혈관형성 자극이 존재하는 방향으로 혈관내피세포들이 주변의 간질조직에 침투하게 된다. 혈관내피세포의 이주와 함께 이주하는 구조물의 주변부에 혈관내피세포가 증식하게 된다. 그 후 혈관내피세포들은 삼차원적으로 구조화되면서 새로운 모세혈관의 관구조를 형성하는 것으로 알려져 있다⁶.

이와 같은 신생혈관 형성과정이 시작되는 것은 혈관형성에 대한 양성 조절인자들과 음성 조절인자들간의 평형의 변화에 의한다. 지금까지 연구된 바에 의하면 최소한 20가지 이상의 조절인자들이 혈관형성 과정에 관여하는 것으로 알려져 있다. 이들 조절인자들은 종물내에 존재하는 종양세포, 대식세포, 그리고 면역관련 세포들이 분비하는 것으로 알려져 있다. 혈관내피성장인자 (vascular endothelial growth factor, VEGF), 염기성 섬유아세포 성장인자 (basic fibroblast growth factor, bFGF), 인터루킨-8 (interleukin-8, IL-8), 기질금속단백분해효소 (matrix metalloproteinase, MMP)-9, 그리고 혈소판유래 성장인자 (platelet-derived growth factor) 등이 혈관형성 과정을 유발시키는 대표적인 양성 조절인자들이다⁷⁻¹².

이들 중 가장 강력한 혈관형성 촉진인자이면서 혈관내피세포 분열인자인 VEGF는 혈관 투과성 조절인자 (vascular permeability factor)로도 알려져 있다¹³. VEGF는 저산소증(hypoxia)의 자극을 받아 종양세포에서 분비되어 종양관련 혈관내피세포 (tumor-associated endothelial cell)의 세포막에 존재하는 혈관내피세포 성장인자 수용체 (VEGF receptor, 이하 VEGFR)에 작용하여 동맥, 정맥, 그리고 임파관으로부터 내피세포의 성장을 유도한다¹⁴. 지금까지의 실험적 연구에 의하면 많은 실험실 모델 시스템과 동물 생체 모델에서 VEGF는 혈관형성을 촉진하고, 혈관내피세포가 혈청의 부족으로부터 발생하는 아포포토시스에 저항성을 갖도록 하는 혈관내피세포 생존인자로서의 역할을 하는 것으로 판명되었다^{15,16}.

대부분의 고형종양에서와 마찬가지로 구강 편평상피세포암 중에서도 VEGF가 발현되며 종물 내의 혈관내피세포에서도 VEGF의 특정 수용체인 VEGFR-2/KDR/flk-1이 발현되어 종양의 증식과 전이를 위한 혈관형성을 촉진하는 것으로 알려져 있다⁷. 상피성 피부 종양에서도 VEGF의 발현정도와 악성종양의 표현형 사이에는 의미있는 상관관계가 있는 것으로 보고되었다¹⁷. 그러나 혈관형성 신호를 전달하는 주요 물질인 VEGF/VEGFR-2의 발현에 대한 연구가 타액선암에서는 활발하게 이루어지지 않고 있다. 이에 저자 등은 임파절을 통한 전

이보다는 혈관성 전이가 주로 이루어지는 타액선 선양낭성암 중에서 혈관형성 인자들이 과발현될 것이라는 가설을 세우고 이를 단백질 수준에서 검증하고자 하였다.

II. 연구재료 및 연구방법

1. 수술 표본

악안면부의 대타액선과 소타액선에 원발성 선양낭성암을 가진 20명 환자에 대한 수술시 절제된 조직으로부터 표본을 제작하였다. 대상이 된 모든 환자는 수술 전에 항암 약물치료를 시행받은 적이 없었다. 광범위 절제된 조직의 일부를 떼어 통상적인 방법에 의해 포르말린으로 고정하고, 파라핀으로 포매하였다. 이 표본으로부터 조직학적 슬라이드를 제작하여 먼저 헤마톡실린과 에오신 염색을 통하여 종물의 조직학적 소견을 전반적으로 검색한 후 제작된 파라핀 블록을 4-6 μ m로 세절하여 면역조직화학염색에 이용하였다.

2. 면역조직화학염색

1) VEGF 염색

조직절편은 양성 전하를 띤 슬라이드 위에 올려놓고, 57-60 °C 정도의 열을 30-40분 정도 가하여 왁스성분의 제거를 용이하게 하였다. 자일렌 용액으로 왁스를 제거하고 계열 알코올 용액으로 재수화시킨 후 PBS (phosphate buffered solution)를 이용하여 마르지 않게 하였다. 항원성 회복(antigen recovery)을 위하여 PBS를 제거하고 펩신 (Biomedica, Foster City, CA, USA)을 37 °C에서 20분간 적용하였다. 펩신을 제거하기 위하여 PBS로 3분간 3차례 수세 후, 내인성 과산화효소 (endogenous peroxidase)의 활성을 억제하기 위하여 3% H₂O₂ 메탄올 용액에서 12분간 두었다. 조직절편을 다시 PBS로 3분간 3차례 수세 후, 상온에서 비특이 단백질의 결합을 차단하기 위하여 5% 정상 말혈청과 1% 정상 양혈청을 PBS에 섞은 단백질 차단액에 20분간 반응시켰다. 단백질 차단액 제거 후 단백질 차단액에 1:500으로 희석시킨 일차항체인 rabbit anti-human VEGF (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 4°C에서 밤새 결합시켰다. PBS로 3분간 3차례 수세하고 단백질 차단액을 10분간 적용한 후, 단백질 차단액을 제거하고 단백질 차단액에 1:500으로 희석시킨 이차항체인 goat anti-rabbit HRP (horseradish peroxidase, Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, PA, USA)를 상온에서 1시간동안 반응시켰다. 슬라이드를 PBS로 3분간 3차례 수세 후 브리지 용액 (50ml PBS에 brij용액 1방울을 떨균 후 pH를 7.6으로 맞추)으로 린스하고, 발색반응을 위하여 DAB (3,3-diaminobenzidine, Research Genetics, Huntsville, AL, USA)을 적용하였다. 이때 발색반응을 현미경으로 확인해가며 적정시간 적용하되 10분을 넘지 않도록 한다. 증류수로 3분간 3회 수세 후 브리지 용액 (50ml 증류수에 brij용액 1방울을 떨균)으로 린스하고, 헤마톡실린 (Gill's hematoxylin, Sigma, St. Louis, MO, USA)으로 대조염색을

10-20초간 시행하였다. 흐르는 증류수로 대조염색을 중지시키고 세포핵을 푸른 색으로 강조하기 위하여 PBS를 30-60초간 적용하였다. 증류수로 모든 염기 성분이 제거되도록 철저히 수세한 후 마운트를 2-3방울 적용하고 50-60°C의 열판에서 5-10분 정도 중합시켜 고정하였다. 음성대조 표본은 일차항체를 사용하지 않고 이차항체만 이용하여 같은 방법으로 면역조직화학 염색을 시행하였다.

2) VEGFR-2 염색

포르말린으로 고정하여 파라핀 포매한 조직절편을 전술한 방법으로 파라핀을 제거하고, 계열알코올로 재수화시켰다. 항원부위 노출을 통해 항원성을 노출시키기 위하여 10mM citrate 완충용액 (pH 6.0)에 담긴 상태에서 전자렌지에서 마이크로웨이브를 이용하여 10분간 가열하되 먼저 2분 30초간 강하게 가열한 후 7분 30초간 약하게 가열하였다. PBS로 수세 후, 내인성 과산화효소의 활성을 억제하기 위하여 3% H₂O₂ 메탄올 용액에 12분간 두었다. PBS로 수세 후 상온에서 단백질 차단 후 단백질 차단액에 1:200으로 희석시킨 일차항체인 rabbit polyclonal anti-VEGFR-2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 4°C에서 밤새 결합시켰다. PBS로 3분간 3차례 수세하고 단백질 차단액을 10분간 적용한 후, 단백질 차단액을 제거하고 단백질 차단액에 1:500으로 희석시킨 이차항체인 goat anti-rabbit HRP를 상온에서 1시간동안 반응시켰다. 슬라이드를 PBS로 3분간 3차례 수세 후 전술한 바와 같이 DAB을 이용하여 양성반응을 가지화하였다. 헤마톡실린으로 대조염색을 시행한 후 Universal mount를 이용하여 고정하였다. 음성대조 표본은 이차항체만을 적용하였으며, 양성대조 표본으로는 피부편평상피세포암 표본을 이용하였다.

3) Phosphorylated VEGFR-2 염색

포르말린으로 고정하여 파라핀 포매한 조직절편을 이용하였으며, 항원-항체반응의 항원성을 증가시키기 위하여 10mM citrate 완충용액 (pH 6.0)에 담긴 상태에서 전자렌지에서 위에서와 같이 10분간 가열하였다. PBS로 수세 후, 내인성 과산화효소의 활성을 억제하기 위하여 3% H₂O₂ 메탄올 용액에 12분간 두었다. PBS로 수세 후, 상온에서 단백질 차단을 위하여 5% 정상 말혈청과 1% 정상 양혈청을 PBS에 섞은 단백질 차단액에 20분간 반응시켰다. 단백질 차단액 제거 후 단백질 차단액에 1:50으로 희석시킨 일차항체인 rabbit polyclonal anti-phospho-VEGFR-2 (pVEGFR-2, Oncogene, Boston, MA, USA)를 4°C에서 밤새 결합시켰다. PBS 수세 후 위에서와 같이 면역효소법 (immunoenzyme technique)을 적용하여 이차염색을 시행하고 DAB을 이용하여 발색하였다. 음성대조 표본은 이차항체만을 적용하였으며, 양성대조 표본으로는 활성화된 혈관내피세포 성장인자 수용체가 잘 발현된다고 알려진 피부종양 표본을 이용하였다.

4) Human-CD31 염색

파라핀 포매 조직의 처리에 있어 먼저 조직절편이 슬라이드

에 견고하게 달라붙도록 하기 위하여 37°C 열판에서 최소한 1시간정도 가열하였다. 57-60°C 정도의 열을 10-20분 추가로 가한 후 파라핀을 제거하고 수화하였다. 제조사에서 제작된 target retrieval solution (Dako, USA)을 증류수에 1:10으로 희석하여 cold steamer에서 건조되지 않도록 40분간 두어 항원성을 증가시켰다. 증류수로 3분 2회 수세 후 3% H₂O₂ 메탄올 용액으로 내인성 과산화효소의 반응을 저지하였다. PBS 수세 후 정상혈청으로 비특이 단백질의 결합을 차단한 후 일차항체인 h-CD31 (Dako, USA)을 정상혈청에 1:20으로 희석하여 4°C에서 밤새 반응시켰다. PBS 수세 후 다시 정상혈청으로 10분간 비특이 단백질 차단하였다. 이차항체인 biotinylated IgG1 (PharMingen, San Diego, CA, USA)를 상온에서 30분간 반응시킨 후 streptavidine을 30분간 반응시키는 LSAB (labelled streptavidin biotin)법으로 면역조직화학염색을 시행하였다. PBS 수세 후 전술한 바와 같이 정색반응 및 대조염색을 시행하였다.

3. 혈관형성 신호전달 물질들에 대한 양성반응의 판독 및 통계분석

VEGF, VEGFR-2, pVEGFR-2 염색에 대한 양성반응의 강도는 -, no staining; +, weak staining; ++, strong staining의 3단계로 나누어 비교, 분석하였다. 해당 단백질의 정상조직에 대한 종양조직에서의 발현 정도, 즉 면역조직화학적 염색의 강도를 비교하기 위하여 양성반응을 보인 표본 중에서 대조염색을 시행하지 않은 슬라이드를 5개씩 제작하였다. ×200 현미경야에서 5개 슬라이드로부터 정상조직과 종양조직을 10부위 (1부위는 0.039mm²)씩 선택하였다. 선택된 화상을 CCD 카메라 (Hamamatsu Corp., Bridgewater, NJ, USA)를 이용하여 컴퓨터에 입력하였다. Optimas 영상분석 소프트웨어에서 DAB에 의한 양성반응의 강도를 OD (optical density)값으로 수치화한 후, 비모수 검정 (Wilcoxon's rank sum test)으로 비교하였다. OD값 측정시에는 실험내용을 모르는 계측자에 의해 대표적인 염색이 시행되었다고 생각되는 부위를 무작위적으로 설정 후, 목표지점에서의 수치를 측정하고 해당 슬라이드에서의 배경 염색 (background staining)된 수치를 빼서 데이터로 이용하였다. 통계분석시 0.05 이하의 P값을 유의성 있는 차이로 인정하였다.

4. 미세혈관농도의 측정

혈관내피세포 표지자인 CD31에 의해 염색된 표본에서 종양 관련 혈관내피세포의 농도를 구하였다. 먼저 40배의 저배율 하에서 종물의 주변부에서 종양관련 신생혈관이 집중적으로 분포된 부위를 확인한 후, 그 부위에서 100배의 배율로 렌즈를 바꾸었다. 종양 부위와 타액선 조직 부위를 각각 10부위씩 무작위적으로 택하여 0.159mm² 영역에서 CD31 항체에 의해 주변부가 완전히 염색된 혈관의 수를 결정한 후¹⁸⁾, 위에서와 같이 비모수 검정으로 비교하였다.

III. 연구결과

1. 조직학적 소견

본 연구의 대상이 된 환자의 연령은 29-80세, 평균 53세였으며 남자환자는 9명이었고, 여자환자는 11명이었다. 20례 선양낭성암종의 원발 부위는 이하선 5례, 설하선 2례, 그리고 소타액선에서 발생한 13례였다. 소타액선에서 발생한 악성종양의 주 병소부위는 구개부 7례, 상악 2례, 구강내 2례, 혀 1례, 그리고 구인두부 1례였다. 조직학적으로는 충실형이 6례였고 관사상체(tubulocribriform) 형이 14례로 관사상체형이 많았다. 충실형 6례 중 3례는 구개부 소타액선에서 발생한 종양이었고, 2례는 이하선 종양, 그리고 나머지 1례는 설하선 종양이었다 (Table 1).

2. 타액선 선양낭성암종에서 VEGF의 발현

검색된 20례의 선양낭성암종 중 18례(90%)에서 VEGF가 발현되었다. 관사상체형에서 100%(14례 중 14례)가 발현된 반면 충실형에서는 66%(6례 중 4례)에서 VEGF가 발현되었다 (Table 2, 4). 내부 대조군인 종물 주변의 정상 타액선 조직의 도관세포(ductal cell)와 선포세포(acinar cell)에서는 VEGF가 발현되지 않았다 (Fig. 1-B). 또 다른 대조군인 점막 상피세포에서는 과립층

(granular layer)의 몇몇 세포에서 VEGF가 발현되었다 (Fig. 1-T). 종물내의 종양관련 혈관내피세포 (Fig. 1-N)와 간질에 존재하는 면역관련 세포들 (Fig. 1-C,K,R)도 역시 VEGF 단백을 발현하였다. 특히 관사상체형 종양 중 일부에서 종양세포의 세포질에 VEGF 발현이 현저하여 (Fig. 1-C,L,Q) 정상 타액선 조직에 비교하여 종양조직에서 VEGF 발현이 유의성 있게 증가되어 있었다 (Table 3).

3. 타액선 선양낭성암종에서 VEGF 수용체의 발현과 활성화 상태

전체적으로 검색된 20례의 선양낭성암종 중 19례 (95%)에서 VEGFR이 발현되었다. 관사상체형에서는 100% (14례 중 14례), 충실형에서 83% (6례 중 5례)에서 VEGFR이 발현되었다 (Table 2,4). 내부 대조군인 종물 주변의 정상 타액선 조직 중 일부 표본의 도관세포에서 양성반응이 관찰되었으나 선포세포에서는 VEGFR이 발현되지 않았다 (Fig. 2-C). 종물내의 종양관련 혈관내피세포도 역시 VEGFR을 발현하였다 (Fig. 2-L). 특히 관사상체형 종양에서 종양세포막에 VEGFR 발현이 현저하여 (Fig. 2-E,G,I,M,Q) 종양 조직에서의 VEGFR 발현은 정상 타액선 조직에 비교하여 유의성 있게 증가되어 있었다 (Table 3).

활성화된 수용체의 형태인 pVEGFR의 경우 정상 타액선 조직의 도관세포와 선포세포 모두에서 발현되지 않았으며 (Fig.

Table 1. Clinical specimens of adenoid cystic carcinoma.

	Age/Sex	Location	Histological Pattern
Specimen 1	48/F	Oropharynx	Tubulocribriform
Specimen 2	70/F	Sublingual	Solid
Specimen 3	77/F	Parotid	Tubulocribriform
Specimen 4	58/M	Parotid	Tubulocribriform
Specimen 5	49/M	Palate	Solid
Specimen 6	71/F	Palate	Tubulocribriform
Specimen 7	45/F	Parotid	Solid
Specimen 8	46/F	Palate	Solid
Specimen 9	46/F	Palate	Solid
Specimen 10	48/F	Parotid	Solid
Specimen 11	29/M	Intraoral	Tubulocribriform
Specimen 12	62/F	Maxilla	Tubulocribriform
Specimen 13	67/M	Intraoral	Tubulocribriform
Specimen 14	80/F	Nasopharynx	Tubulocribriform
Specimen 15	31/M	Parotid	Tubulocribriform
Specimen 16	52/F	Maxilla	Tubulocribriform
Specimen 17	31/M	Tongue	Tubulocribriform
Specimen 18	63/M	Palate	Tubulocribriform
Specimen 19	36/M	Palate	Tubulocribriform
Specimen 20	60/M	Sublingual	Tubulocribriform

Table 2. Expression of angiogenic-signaling proteins.

	VEGF	VEGFR-2	pVEGFR-2
Specimen 1	+	++	++
Specimen 2	+	+	++
Specimen 3	+	-/+	++
Specimen 4	+	++	++
Specimen 5	-	+	++
Specimen 6	+	+	+
Specimen 7	-	-	-
Specimen 8	+	-/+	+
Specimen 9	+	+	+
Specimen 10	+	+	+
Specimen 11	++	++	++
Specimen 12	+	+	+
Specimen 13	+	+	++
Specimen 14	+	+	+
Specimen 15	+	++	++
Specimen 16	+	+	+
Specimen 17	+	+	+
Specimen 18	+	+	++
Specimen 19	+	+	+
Specimen 20	+	+	+

-, no staining; +, weak staining; ++, strong staining

Table 3. OD values of angiogenic-signaling proteins and microvessel density.

	Tumor (N=10, OD: mean ± SD)	Salivary gland (N=10, OD: mean ± SD)
VEGF	0.43 ± 0.11 [†]	0
VEGFR-2	0.72 ± 0.19 [†]	0.18 ± 0.05
pVEGFR-2	1.34 ± 0.27 [†]	0
Microvessel Density	13 ± 5 [†]	5 ± 2

[†] : P<0.05 compared with control (Wilcoxon's rank sum test)

OD : optical density

SD : standard deviation

Table 4. Summary of expressions of the biomarkers in each cell-type.

	VEGF	VEGFR-2	pVEGFR-2
Tumor cell (Solid, N=6)	4	5	5
Tumor cell (Tubulocribriform, N=14)	14	14	14
Acinar cells	-	-	-
Ductal cells	-	-/+	-
Tumor associated endothelial cells	+	+	+
Immune-related cells	+	+	+

(- : negative expression, + : positive expression)

3-C), 점막세포에서도 그 활성이 거의 없는 것으로 관찰되었다 (Fig. 3-D). 반면에 오직 종양조직의 종양세포와 혈관내피세포, 그리고 기질세포들에서 pEGFR이 강하게 발현되는 양상을 보여 (Fig. 3-E,H,N,R,T) 정상조직에서와는 달리 종양조직에서 혈관내피성장인자 수용체가 활성화되는 소견을 보여주었다 ($P<0.05$, Table 3).

4. 타액선 선양낭성암종의 미세혈관농도

정상 타액선 조직의 미세혈관농도는 5 ± 2 (평균 \pm 표준편차)로 계산된 반면 선양낭성암 종물내에서의 미세혈관농도는 13 ± 5 (평균 \pm 표준편차)로 유의하게 종양조직에서 미세혈관농도가 높게 나타났다 ($P<0.05$).

IV. 총괄 및 고찰

본 연구를 통하여 저자 등은 혈관성 전이를 종양 진행의 주 기전으로 하는 타액선 선양낭성암중에서 종양관련 신생혈관의 형성에 관련된 단백질이 정상 타액선 조직과 비교하여 과 발현됨을 제시하였다. 즉 수많은 표현형의 악성종양 중 암세포의 성장속도가 비교적 느려 실험적으로 모델화하기 어려운 타액선 악성종양에서 수술표본을 이용하여 종양 혈관형성의 핵심 인자인 VEGF의 종양세포 분비 여부와 그 수용체인 VEGFR-2의 발현정도와 활성화 상태를 전반적으로 검색하였다. 데이터는 선양낭성암중을 조직학적 특성과 임상적 예후에 의거하여 충실형과 관사상체형으로 분류하여 분석, 제시하였다.

악성종양의 진행과정에서 전이는 가장 점진적으로 개체의 생명을 위협해가는 단계이다. 암의 조기진단, 수술기법과 환자관리법의 발전, 그리고 전신적, 국소적 보조치료 요법의 개발에도 불구하고 타액선암을 비롯한 두경부 악성종양의 완치는 크게 개선되지 못하고 있다. 이는 대부분의 환자사망이 기존의 치료법에 저항성을 보이는 전이병소로부터 기인되기 때문이다. 타액선 선양낭성암중도 예외가 아니어서 때때로 공격적으로 혈관성 전이병소를 폐에 발생시키는 빈도가 높고, 이로 인하여 장기 생존율이 불량하다⁹. 최근의 암치료 목표의 경향은 환자의 주 사망원인인 전이 병소의 차단 내지 치료에 있다¹⁰. 본 연구에서도 특징적으로 혈관성 전이가 문제가 되는 표현형인 타액선 선양낭성암중의 전이 병소를 차단하고자 그 관련인자들을 밝히고자 하였다.

분자표적치료란 종양의 악성 표현형 유지에 중요한 물질들을 표적으로 하여 분자 수준에서 차단하거나 억제함으로써 치료효과를 거두고자 하는 방식의 새로운 암치료 개념이다. 지난 수십년간의 분자생물학적, 유전학적 개념의 확립으로 분자 수준에서의 치료가 현실화되고 있다. 타액선 암종과 같은 상피성 악성종양에서 지금까지 실험실적으로 혹은 동물실험이나 초기 임상 평가에서 긍정적으로 알려진 기법 중 하나가 타이로신 인산화효소의 억제제를 통한 종물의 증식이나 전이를 조절하는 것이다²⁰. 본 연구에서의 가설에 따라 타액선 선양낭성

암중에서 혈관형성에 관련되는 수용체 타이로신 인산화효소인 VEGFR-2가 과발현된다면 이 인자에 대한 수용체 타이로신 인산화효소 억제제를 적용하여 타액선 선양낭성암중의 전이를 조절할 수 있을 것이다.

VEGF는 VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF189, VEGF206의 5가지의 아형이 존재하는 당단백으로, 혈관내피세포에 직접 작용하는 heparin-결합성 성장인자로서 측분비 기전 (paracrine action)을 통하여 생리적, 병리적 환경에서 혈관형성을 유도한다²¹. 종양세포를 포함한 많은 세포들이 VEGF를 합성, 분비한다. 저자 등의 면역조직화학적 염색 결과 VEGF는 정상 타액선 조직에서는 발현되지 않았으나 대부분의 표본에서 종물 내의 종양세포, 종양관련 혈관내피세포, 그리고 간질 내의 면역관련 세포의 세포질에서 모두 발현되었다. 따라서 선양낭성암세포는 VEGF를 합성, 분비한다고 결론지을 수 있으며, 혈관내피세포에서의 양성반응은 VEGF가 리간드로서 수용체에 결합한 것이거나 혈관내피세포에서 자가분비한 것으로 생각하였다.

타액선 선양낭성암중은 조직학적으로 다양한 양상을 보여 일반적으로 사상체형, 관형, 그리고 충실형으로 분류된다. 일반적으로 관형이나 사상체형이 우세한 증례들이 충실형이 우세한 증례들에 비교하여 임상적 예후가 양호한 것으로 알려져 있다²². 본 연구에서 암생물학적으로 유사성을 보이는 관사상체형과 충실형으로 구분하여 혈관형성 관련인자들의 발현을 고찰해 본 결과 예상과는 달리 충실형보다는 관사상체형에서 VEGF 신호전달 물질들이 강하게 발현되는 양상을 보여 선양낭성암중의 불량한 예후에는 혈관형성인자들 외에 다른 요인들이 관여함을 암시하였다.

본 연구에서 정상 타액선 조직의 도관 구조물 일부에서 VEGFR 항체 양성반응이 있었는데 이는 도관세포에서 발현되었을 수도 있고, 도관 구조물 내의 미세혈관의 내피세포에서 발현되었을 수도 있다고 고찰하였다. 또는 VEGFR 항체의 불안정성에 기인한 반응일 수도 있으나 어느 세포에서 발현되었든지 pVEGFR에 대한 염색 결과 그 활성은 없는 것으로 판명되었다. 또한 VEGFR 항체에 대한 면역반응이 민감성이 약하여 양성인지 음성인지 판단하기 어려운 표본들도 있었는데 (vague expression; +/-), 이 표본들 중 대부분이 pVEGFR 항체에 강하게 반응하여 VEGFR 염색에 양성반응이 있는 것으로 해석하였다. 또한 선양낭성암중 종물 내의 면역관련 세포 등의 기질세포에서 VEGF/VEGFR이 발현되는 양상을 보인 점은 특기할 만하다. 즉 이들 세포들이 종양의 혈관형성을 통한 진행에 어떤 역할을 할 것이라는 추론이 가능하며 이는 추후 연구를 통하여 밝혀야 할 것이다.

본 연구에서와 같이 면역조직화학적 염색을 통하여 목표 인자의 단백질 발현의 정도를 평가하여 해당 유전자의 역할을 규명하는 연구에서는 무엇보다도 단백질 발현의 정도를 정확하게 평가하여 객관화하는 것이 중요하다. 지금까지 보고된 몇몇 문헌들의 결과가 일관성이 없는 것은 표본의 선정, 표본의 보관상태, 염색 기법의 표준화 등 여러 가지 문제점을 생각할 수

있겠으나 무엇보다도 조직 항원을 감지하는 능력의 차이에 기인한다고 볼 수 있다. 본 연구에서는 비교적 조직의 상태가 양호하지 못한 파라핀 포매 조직에서 효과적으로 항원성을 회복시키기 위하여 예비실험을 통한 다양한 시도를 거쳐 항원성을 극대화할 수 있는 방법을 찾아 적용하였다. 또한 VEGF, VEGFR, pVEGFR에 대한 면역조직화학염색 기법은 비교적 민감도가 떨어지는 면역효소법, 즉 조직에 존재하는 항원과 1차 항체의 결합상태를 확인하는데 효소의 분해작용을 이용하는 방법을 적용하였으나 데이터 해석에 충분한 변별력을 얻을 수 있었다.

악성종양의 종물에 대한 조직학적 표본에서 미세혈관을 계측하는 것은 신생혈관 형성반응을 정량적으로 평가하는, 지금까지 알려진 가장 좋은 방법이며, 계측된 미세혈관농도는 구강암을 포함한 대부분의 고형종양에서 잘 알려진 예후인자이다^{23,24}. 조직학적 표본에서의 미세혈관은 본 연구에서와 같이 내피세포에 대한 면역염색을 통하여 확인할 수 있다. 사용된 CD31 항체는 일반적으로 파라핀 포매 조직에서 적용 가능하지만 고정액에 acetic acid가 포함되었을 경우 항원성이 상실되는 단점이 있어²⁵, 이를 극복하기 위해 일반적으로 마이크로웨이브를 이용하여 항원성을 회복시키는데 본 연구에서는 제조사에서 제작된 target retrieval solution으로 항원성을 증가시켜 실험을 진행하였다. 또한 CD31 항체는, vWF (von Willebrand factor), CD34 항체, 그리고 thrombomodulin과 함께 모든 내피세포를 확인할 수 있는 표지자이다. 즉 림프관이나 증식성이 없는 기존의 정상 혈관들, 그리고 염증세포까지 CD31 항체에 반응할 수 있으므로 종양관련 신생혈관의 확인에 어려움이 있을 수 있다.

보다 정확한 예후 정보를 얻기 위해서는 활성화된 내피세포를 확인하는 것이 중요하다. 활성화된 내피세포 표지자에는 CD105 항체, LM609, integrin $\alpha v \beta 3$ 항체, 그리고 VEGF 수용체에 대한 항체가 있다^{26,27}. 본 연구에서 선양낭성암종의 혈관형성능에 대한 결과 판독시 종양관련 혈관내피세포와 염증세포와의 감별은 세포의 조직내 위치를 참고로 하였으며, 정상혈관과의 감별은 형태학적으로 가능하였다. 즉 종양관련 신생혈관은 정상 혈관과는 달리 그 모양이 불규칙하고, 혈관내피층이 불완전하게 형성된 양상을 보여주었다. 조직학적 표본에서 혈관의 존재는 표본의 두께에 영향을 받아 얇은 표본에서는 혈관의 분절만이 보이게 되며, 두꺼운 표본에서는 혈관망까지 나타난다. 본 연구에서는 미세혈관농도의 측정시 CD31에 의해 완전히 염색된 세포들에 의해 둘러싸인 내강을 가지고 있는 구조물만을 계산하였다. 다만 림프관과의 감별은 혼동될 수 있는데, 일반 내피세포 표지자인 CD31과 함께 혈관내피세포 증식인자인 VEGFR-2/pVEGFR-2를 함께 분석함으로써 해당 종물의 혈관형성능 활성화 정도가 비교적 객관적 결과로 도출되었다고 여겨진다. 또한 본 연구에서 종물 주변부에 신생혈관들이 집중되어 있어 혈관성 전이가 시작되는 부위로 가설된²⁸ 소위 "hot spot"이 관찰되기도 하였다.

2001년 Li는 55례의 선양낭성암 환자의 수술표본에서 VEGF

발현과 미세혈관농도를 평가하였다. 그 결과 VEGF 발현이 높은 증례들에서 평균 미세혈관농도가 유의하게 증가되었음을 보고하였다. 또한 VEGF 과발현이 종양의 위치, 임상적 병기와 의미있는 상관관계가 있었으나, 종양의 재발이나 전이, 그리고 환자 생존율과는 무관하며, 미세혈관농도는 전술한 어느 지표와도 상관관계가 없다고 하였다²⁸. 또한 2003년 Yu는 31례의 타액선 선양낭성암종에서 VEGF와 CD34의 발현을 반영한 미세혈관농도를 평가하였다. 연구결과 조직학적 아형, 병기, 미세혈관농도, 그리고 VEGF 발현이 환자 생존율과 유의성이 있다고 보고하였다. 특히 미세혈관농도는 VEGF 발현과 원격 전이율과도 상관관계가 있는 것으로 평가되어 가장 신뢰할 수 있는 예후인자라고 하였다²⁹. 따라서 타액선 선양낭성암종에서 VEGF와 미세혈관농도가 예후인자로서 가치가 있는지는 더 평가를 해 보아야 할 것이다.

V. 요 약

인간 타액선 선양낭성암종 조직 20례에서 VEGF 신호전달 단백질에 대한 면역조직화학적 염색을 시행하여 종물 주변의 정상 타액선 조직과 비교, 분석하여 다음과 같은 결과를 도출하였다.

- 1) VEGF는 타액선 선양낭성암종 조직의 90%에서 발현되었으며, 정상 타액선 조직과 비교하여 암종 조직에서 발현이 증가되었다 ($P < 0.05$).
- 2) VEGF 수용체는 일부 타액선 도관세포와 95% 종물의 모든 세포성분에서 발현되었으며, 정상 타액선 조직과 비교하여 암종 조직에서 그 발현이 유의하게 증가되었다 ($P < 0.05$).
- 3) pVEGFR은 정상 타액선 조직에서는 발현되지 않았으며, 암종 조직의 종양세포에서 그 발현이 현저히 증가되었다 ($P < 0.05$).
- 4) 검색된 인자들은 충실형 암종 조직 보다는 관사상체형 암종 조직에서 강하게 발현되었다.
- 5) 미세혈관농도 역시 정상 타액선 조직과 비교하여 암종 조직에서 유의하게 증가되었다 ($P < 0.05$).
- 6) 종물 내의 종양관련 혈관내피세포에서도 위의 혈관형성 인자들이 모두 발현되었다.
- 7) 종양 기질 내의 면역관련 세포들에서도 역시 혈관형성 인자들이 발현되어 이들 세포들이 타액선 선양낭성암종의 혈관성 전이에 중요한 역할을 할 것이라는 추론을 가능하게 하였다.

위의 연구결과들을 종합하면 혈관형성 신호전달계에 관여하는 인자인 VEGF와 VEGFR이 정상 타액선 조직에 비교하여 타액선 선양낭성암종에서 과발현되고 활성화되었다. 따라서 이들 인자들이 타액선 선양낭성암종의 혈관성 전이 과정에서 중요한 역할을 할 것임을 제시하였다. 따라서 이들 물질의 발현을 억제하거나 그 작용기전을 차단함으로써 타액선 선양낭성암종의 혈관성 전이병소의 발생을 억제하거나 전이병소의

증식을 완화시킬 수 있는 새로운 치료법을 개발할 수 있을 것으로 사료되는 바이다.

참고문헌

1. Spiro RH: Salivary neoplasms, overview of a 35 year experience with 2,807 patients. *Head Neck Surg* 1986;8:177-184.
2. Batsakis JG, Luna MA, el-Naggar: Histopathologic grading of salivary gland neoplasms. III. Adenoid cystic carcinomas. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1990;99:1007-1009.
3. Fordice J, Kershaw C, El-Naggar, Goepfert H: Adenoid cystic carcinoma of the head and neck: predictors of morbidity and mortality. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1999;125:149-152.
4. Spiro RH: Distant metastasis in adenoid cystic carcinoma of salivary origin. *Am J Surg* 1997;174:495-498.
5. Neuchrist C, Quint C, Pammer A, Burian M: Vascular endothelial growth factor(VEGF) and microvessel density in squamous cell carcinomas of the larynx: an immunohistochemical study. *Acta Otolaryngol* 1999;119:732-738.
6. de Jong JS, van Diest PJ, Michalides RJ, van der Valk P, Meijer CJ, Baak JD: Expression of growth factors, growth-inhibiting factors, and their receptors in invasive breast cancer. II: Correlations with proliferation and angiogenesis. *J Pathol* 1998;184:53-57.
7. Michi Y, Morita I, Amaqasa T, Murota S: Human oral squamous cell carcinoma cell lines promote angiogenesis via expression of vascular endothelial growth factor and upregulation of KDR/flk-1 expression in endothelial cells. *Oral Oncol* 2000;36:81-88.
8. Esser S, Wolburg K, Wolburg H, Breier G, Kurzcharia T, Risau W: Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro. *J Cell Biol* 1998;140:947-959.
9. Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elner VM et al: Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* 1992;258:1798-1801.
10. Sauter ER, Nesbit M, Watson JC, Klein-Szanto A, Litwin S, Herlyn M: Vascular endothelial growth factor is a marker of tumor invasion and metastasis in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin Cancer Res* 1999;5:775-782.
11. Luca M, Huang S, Gershenwald JE, Singh RK, Reich R, Bar-Eli M: Expression of interleukin-8 by human melanoma cells up-regulates MMP-2 activity and increases tumor growth and metastasis. *Am J Pathol* 1997;151:1105-1113.
12. Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K et al: Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2000;2:737-744.
13. Gille J, Swerlick RA, Caughman SW: Transforming growth factor-alpha-induced transcriptional activation of the vascular permeability factor (VPF/VEGF) gene requires AP-2-dependent DNA binding and transactivation. *Embo J* 1997;16:750-759.
14. Ishibashi H, Shiratuchi T, Nakagawa K, Onimaru M, Sugiura T, Sueishi K et al: Hypoxia-induced angiogenesis of cultured human salivary gland carcinoma cells enhances vascular endothelial growth factor production and basic fibroblast growth factor release. *Oral Oncol* 2001;37:77-83.
15. Gerber HP, Dixit V, Ferrara N: Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1998;273:13313-13316.
16. Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, Pode D, Keshet E: Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J Clin Invest* 1999;103: 159-165.
17. Bowden J, Brennan PA, Umar T, Cronin A: Expression of vascular endothelial growth factor in basal cell carcinoma and cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Cutaneous Pathol* 2002;29:585-589.
18. Yoneda J, Kuniyasu H, Crispens MA, Price JE, Bucana CD, Fidler IJ: Expression of angiogenesis-related genes and progression of human ovarian carcinomas in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:447-454.
19. Yigitbasi OG, Younes MN, Doan D, Jasser SA, Schiff BA, Bucana CD et al: Tumor cell and endothelial cell therapy of oral cancer by dual tyrosine kinase receptor blockade. *Cancer Res* 2004;64:7977-7984.
20. Craven RJ, Lightfoot H, Cance WG: A decade of tyrosine kinases: from gene discovery to therapeutics. *Surg Oncol* 2003;12:39-49.
21. Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW: Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev* 1992;13:18-32.
22. Gates GA: Malignant neoplasm of the minor salivary glands. *N Engl J Med* 1982;306:718-722.
23. Hasan J, Byers R, Jayson GC: Intra-tumoural microvessel density in human solid tumours. *Br J Cancer* 2002;86(10):1566-1577.
24. Hasan J, Shnyder SD, Bibby M, Double JA, Bicknell R, Jayson GC: Quantitative angiogenesis assays in vivo-a review. *Angiogenesis* 2004;7:1-16.
25. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Toi M, Martin L, McCulloch P et al: Quantification of angiogenesis in solid human tumours: An international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer* 1996;32A(14):2474-2484.
26. Brekken RA, Huang X, King SW, Thorpe PE: Vascular endothelial growth factor as a marker of tumor endothelium. *Cancer Res* 1998;58(9):1952-1959.
27. Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S: CD105 is important for angiogenesis: Evidence and potential applications. *FASEB J* 2003;17(9):984-992.
28. Li Z, Tang P, Xu Z: Clinico-pathological significance of microvessel density and vascular endothelial growth factor expression in adenoid cystic carcinoma of salivary glands. *Zhonghua Kou Qinaq Yi Xue Za Zhi* 2001;36(3):212-214.
29. Yu F, Jiang XZ, Chen WT, Zhao YF, Zhou XJ: Microvessel density and expression of vascular endothelial growth factor in adenoid cystic carcinoma of salivary gland. *Shanghai Kou Qinaq Yi Xue* 2003;12:443-446.

사진부도 설명

Fig. 1. VEGF expression in clinical specimens of salivary adenoid cystic carcinoma ($\times 100$ magnification)

- A : Negative control without application of the primary antibody
- B : Acinar and ductal component of normal salivary gland, which served as control, didn't express VEGF.
- C : VEGF expression of specimen 1 (tubular-type ACC)
- D : VEGF expression of specimen 2 (solid-type ACC)
- E : VEGF expression of specimen 3
- F : VEGF expression of specimen 4 (cribriform-type ACC)
- G : VEGF expression of specimen 6
- H : Specimen 7 didn't express VEGF.
- I : VEGF expression of specimen 8
- J : VEGF expression of specimen 9
- K : VEGF expression of specimen 10, we can detect the positive VEGF expression of immune-related cells in stroma of the tumor.
- L : VEGF expression of specimen 11
- M : VEGF expression of specimen 12
- N : VEGF expression of specimen 13, tumor-associated endothelial cells showed VEGF immunoreactivity.
- O : VEGF expression of specimen 14
- P : VEGF expression of specimen 15
- Q : VEGF expression of specimen 16
- R : VEGF expression of specimen 17
- S : VEGF expression of specimen 18
- T : Keratinized mucosa served as internal control.

Fig. 2. VEGFR-2 expression in clinical specimens of salivary adenoid cystic carcinoma ($\times 100$ magnification)

- A : Negative control without application of the primary antibody
- B : Positive control, which clearly demonstrated the membranous staining of this biomarker.
- C : Acinar and ductal component of normal salivary gland, which also served as control. Some ductal cells seemed to express VEGFR-2.
- D : Keratinized mucosa served as internal control.
- E : VEGFR-2 expression of specimen 1, judged as "strong staining".
- F : VEGFR-2 expression of specimen 3 (cribriform-type ACC)
- G : VEGFR-2 expression of specimen 4
- H : VEGFR-2 expression of specimen 5
- I : VEGFR-2 expression of specimen 6, judged as "weak staining".
- J : Specimen 7 didn't express VEGFR-2.
- K : VEGF expression of specimen 8, which judge as "vague expression (-/+)".
- L : VEGFR-2 expression of specimen 10, we can also detect the positivity of the tumor-associated endothelial cells.
- M : VEGFR-2 expression of specimen 11
- N : VEGFR-2 expression of specimen 12
- O : VEGFR-2 expression of specimen 13, we can detect the positive VEGFR-2 expression of immune-related cells in stroma of the tumor.
- P : VEGFR-2 expression of specimen 14
- Q : VEGFR-2 expression of specimen 15
- R : VEGFR-2 expression of specimen 16
- S : VEGFR-2 expression of specimen 17
- T : VEGFR-2 expression of specimen 18

Fig. 3. Phosphorylated VEGFR-2 (pVEGFR-2) expression in clinical specimens of salivary adenoid cystic carcinoma ($\times 100$ magnification)

- A : Negative control without application of the primary antibody
- B : Positive control, which clearly demonstrated the membranous staining of pVEGFR-2.
- C : Acinar and ductal component of normal salivary gland, which served as control, didn't express pVEGFR-2.
- D : Keratinized mucosa served as internal control.
- E : In this figure, we can find tumor-associated endothelial cells express pVEGFR-2.
- F : pVEGFR-2 expression of specimen 3
- G : pVEGFR-2 expression of specimen 4
- H : pVEGFR-2 expression of specimen 5, judged as "strong staining". Stromal cells also express this biomarker.
- I : pVEGFR-2 expression of specimen 6, judged as "weak staining".
- J : Specimen 7 didn't express pVEGFR-2.
- K : pVEGFR-2 expression of specimen 8
- L : pVEGFR-2 expression of specimen 9
- M : pVEGFR-2 expression of specimen 10
- N : pVEGFR-2 expression of specimen 11
- O : pVEGFR-2 expression of specimen 12
- P : pVEGFR-2 expression of specimen 13
- Q : pVEGFR-2 expression of specimen 14
- R : pVEGFR-2 expression of specimen 15
- S : pVEGFR-2 expression of specimen 16
- T : pVEGFR-2 expression of specimen 18

Fig. 4. hCD31 expression in clinical specimens of salivary adenoid cystic carcinoma ($\times 100$ magnification)

- A : Positive control from a specimen of prostate cancer.
- B : hCD31 expression of normal salivary tissue, we can see a few normal small vessels.
- C : Tumor-associated blood vessels located in the stromal portion of cribriform-type ACC.
- D : Small tumor-associated blood vessels are in the stromal portion of tubular-type ACC.
- E : In this picture, lots of new vessels are in the periphery of tumor, which represent so called "hot spot".
- F-G : Tumor-associated blood vessels are morphologically unstable and different from normal blood vessels.

사진부도 ①

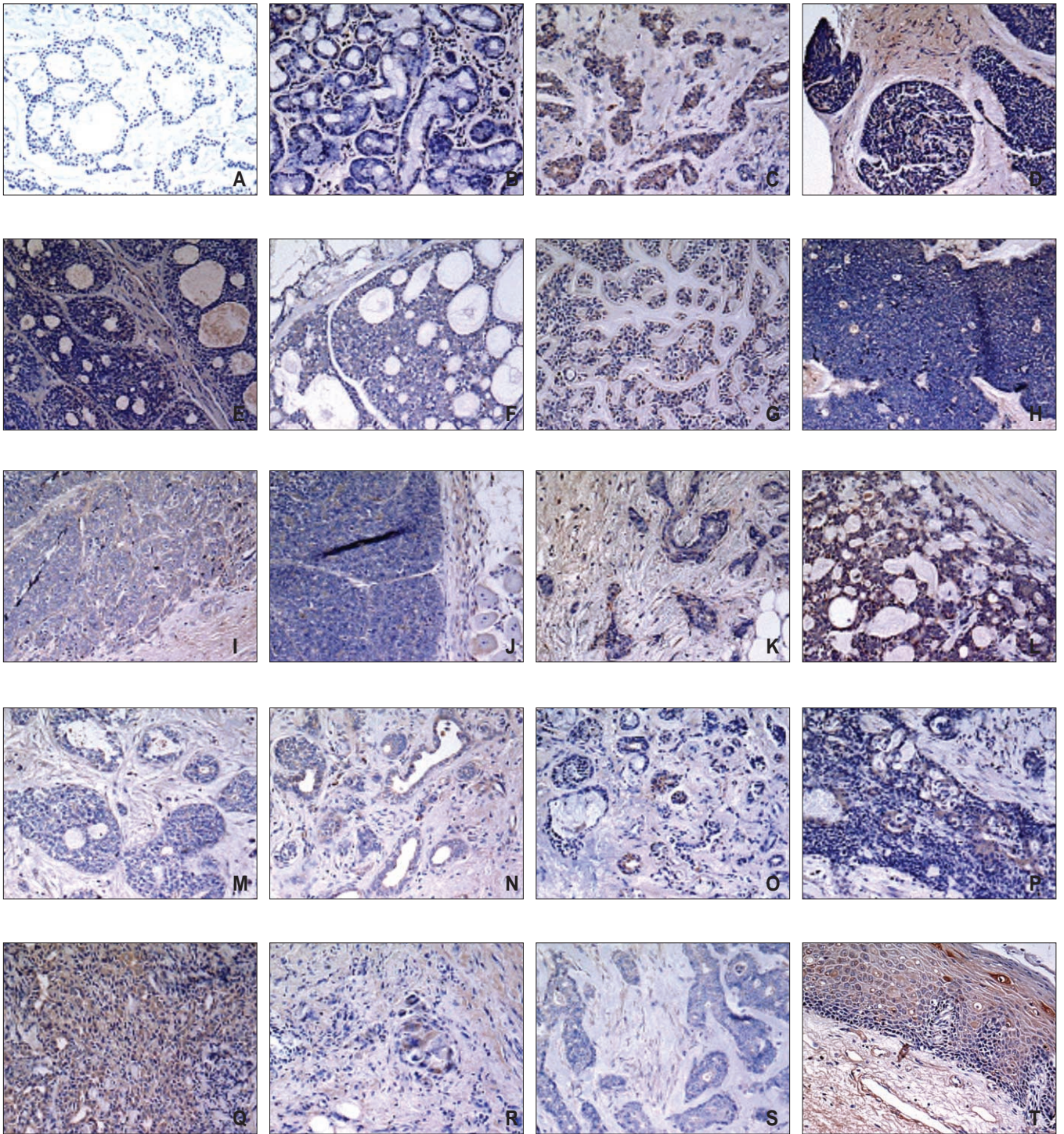


Fig. 1

사진부도 ②

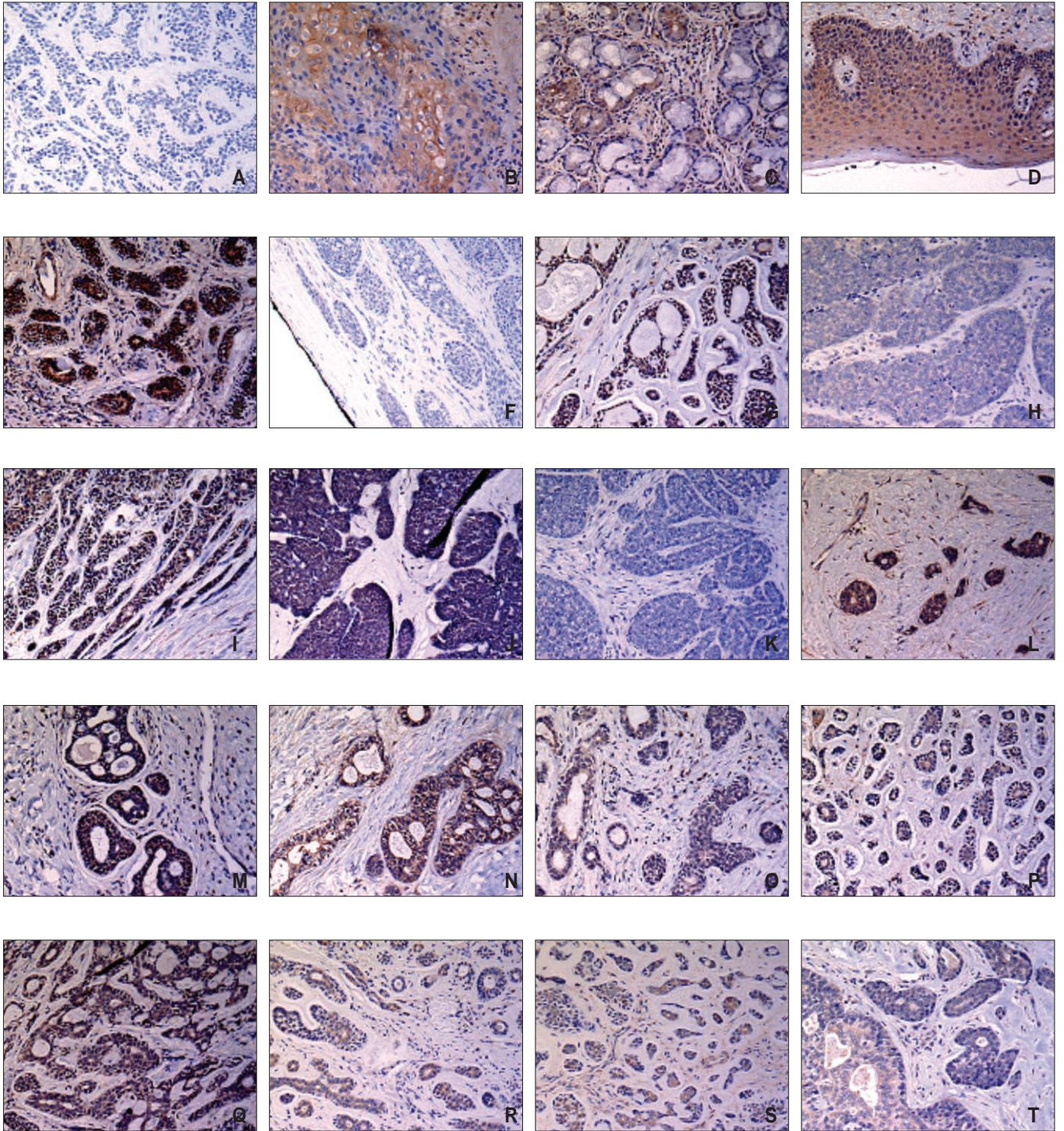


Fig. 2

사진부도 ③

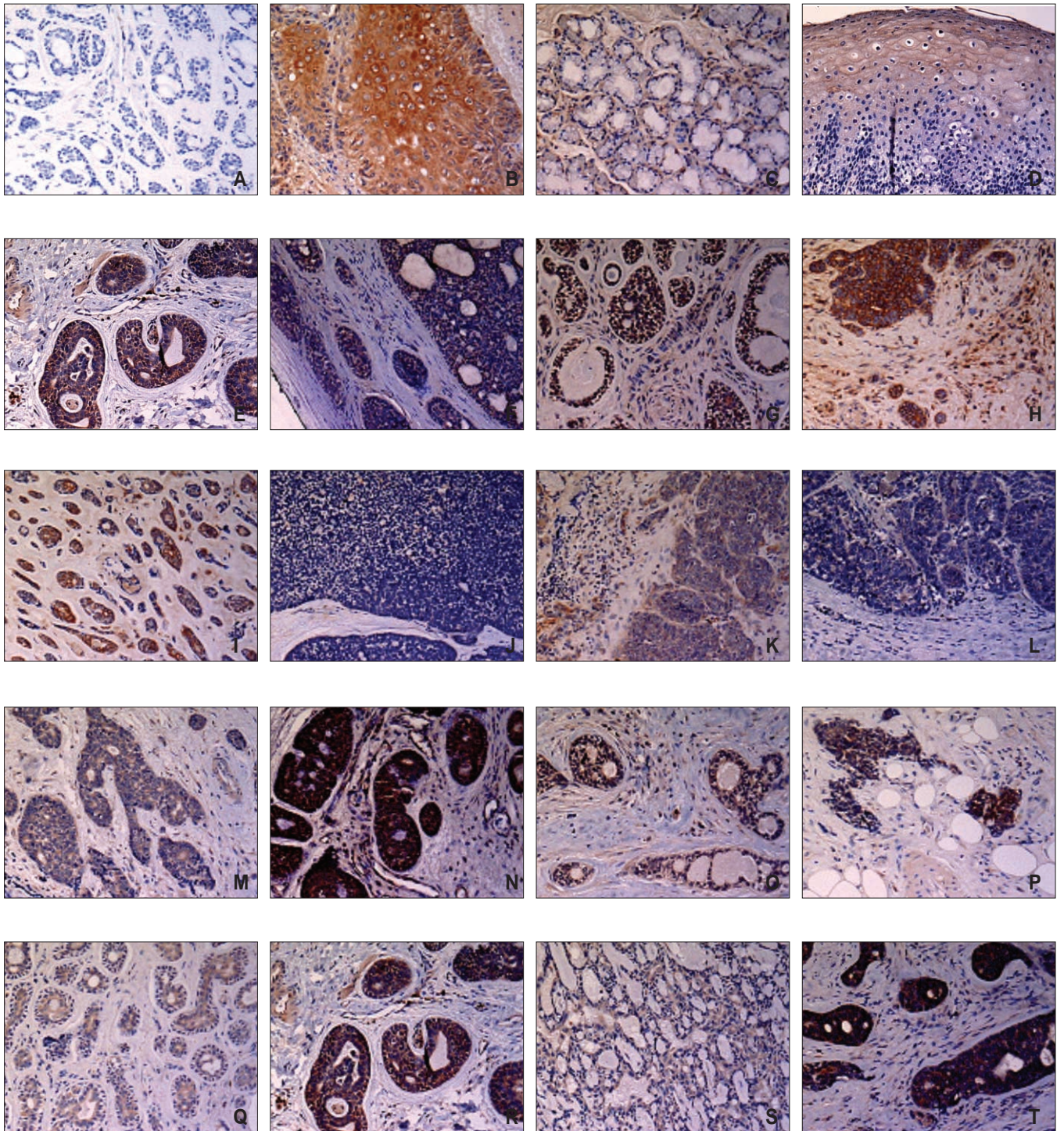


Fig. 3

사진부도 ④

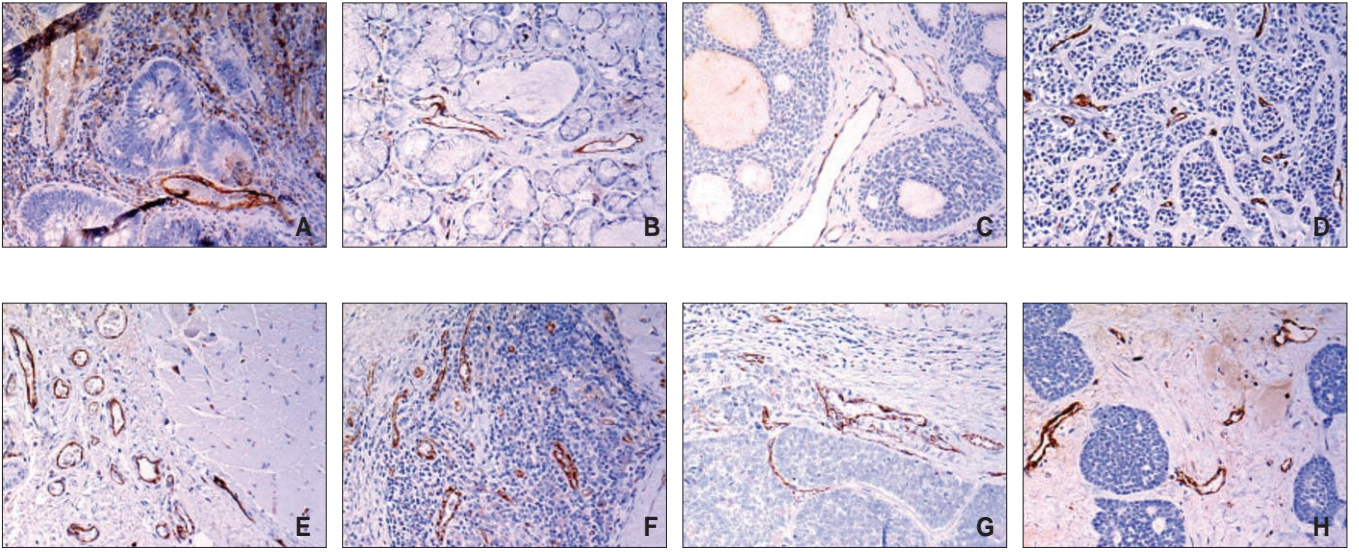


Fig. 4