

전립선암에서 혈관내피성장인자 (VEGF)의 발현과 전립선특이항원 (PSA) 및 종양 악성도의 관계에 대한 연구

The Relationship between Prostate-specific Antigen, Invasiveness and Vascular Endothelial Growth Factor in Human Prostatic Cancer

Hyoung Jin Kim, Dong Sun Kim, Duck Ki Yun, Jae Heung Cho, Cheol Whan Kim¹, Jong Bo Choi²

From the Departments of Urology and ¹Pathology, Korea University College of Medicine, Seoul, ²Department of Urology, Ajou University College of Medicine, Suwon, Korea

Purpose: Vascular endothelial growth factor (VEGF) known as an angiogenic factor is a potent inducer of pathologic neovascularization. The purpose of this study is identifying the relationship between serum PSA, invasiveness and VEGF expression in prostatic cancer.

Materials and Methods: Ex-vivo study with immunohistochemical stain analysis for VEGF expression was performed on 18 paraffin embedded specimens of prostatic cancer patients who were treated with radical prostatectomy. VEGF expressions were classified by three groups (1+, 2+, 3+) according to the degree of staining of cancer cell. Biochemical failure and recurrence were determined by Takayama's IMx PSA assay criterion (>0.1ng/ml) following radical prostatectomy.

Results: Immunohistochemical studies demonstrated that each group contained 1, 2, 8 patients in advanced disease (n=11), and 3, 2, 2 patients in localized disease (n=7), respectively. All cases in strong positive (3+) group had Gleason sum higher than 7 and nadir PSA values were lower than 0.1ng/ml except one case. We found no correlation between initial PSA and VEGF expression (p=0.361). Three biochemical recurrent patients were identified as strong positive VEGF expression.

Conclusions: Our study indicates that patients with advanced stage and higher Gleason sum have a trend with more VEGF expression than patients with localized disease. Identifying the angiogenesis factors especially, VEGF involved in prostatic cancer growth and understanding their regulation will lead to the development of anti-angiogenic strategies useful for diagnostic studies and therapeutic interventions. (Korean J Urol 2001; 42:621-626)

Key Words: Prostate cancer, Vascular endothelial growth factor, Angiogenesis Prostate-specific antigen

대한비뇨기과학회지
제 42 권 제 6 호 2001

고려대학교 의과대학
비뇨기과학교실, ¹병리과학교실
²아주대학교 의과대학
비뇨기과학교실

김형진 · 김동선 · 윤덕기
조재흥 · 김철환¹ · 최중보²

접수일자 : 2001년 2월 5일
채택일자 : 2001년 5월 16일

교신저자 : 윤덕기
고대구로병원 비뇨기과
서울시 구로구 구로동 80번지
☎ 152-703
Tel: 02-818-6779
Fax: 02-867-4060
E-mail: duke3@channeli.net

서 론

전립선암에 의한 사망은 대부분 림프절이나 혈행성 파급에 의한 원격 전이에 의한 것으로 골, 간, 폐 등이 가장 흔한 전이장소인 것으로 알려져 있으며, 이러한 전이 병소를 형성하는 데 있어서 신생혈관형성(neovascularization)은 매우 중요한 단계인 것으로 알려져 있다.¹⁻³ 최근의 연구에 따르면 많은 고형암에서 이러한 신생혈관형성의 정도를 정량적으로 측정함으로써 종양의 임상적 예후를 예측할 수 있는

것으로 알려져 있으며 전립선암에 있어서도 혈관밀도, 혈관침윤, 신생혈관형성 등이 전립선암의 성장이나 진행 등과 밀접한 관련성이 있는 것으로 보고되고 있다.^{4,5}

이러한 종양의 신생혈관형성에는 다양한 인자들이 작용하며 이 중 Vascular endothelial growth factor (VEGF)는 종양의 신생혈관형성에 직접적으로 작용하는 인자 중 하나로 전립선암에서도 그 발현이 증가되는 것으로 알려져 있다.^{1,6}

이에 본 연구에서는 전립선암 진단하에 근치적 전립선적출술을 시행받은 환자를 대상으로 술전 PSA 및 종양의 병기, 분화도 등 각종 임상적 예후인자와 VEGF 발현의

관련성에 관하여 조사함으로써 전립선암에 있어서의 VEGF와 PSA 그리고 종양의 악성도의 관계를 규명해 보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상

1993년 9월부터 1997년 7월 사이에 경직장전립선생검에 의해 전립선암으로 진단받은 후 핵자기공명영상 및 골주사 검사에서 전립선에 국한된 암으로 진단 받고 근치적 전립선적출술을 시행받은 환자 중에서 2년 이상 추적 관찰이 가능하였던 18례의 환자를 대상으로 하였다. 환자의 연령은 59-73세까지, 평균 63.8세였으며 평균 추적관찰 기간은 3년 8개월이었다. 18례의 환자 중 최종적으로 병리학적 병기상 T₂N₀M₀ 이하로 전립선에 국한된 질환으로 판정된 경우는 7례였으며, 전립선 주위로의 국소 전이나 림프절 전이가 있어 국소 침윤성 전립선암으로 진단된 경우는 11례였다.

조직은 근치적 전립선적출술에 의해 얻은 파라핀 포매된 전립선조직을 사용하였으며 대조군으로는 동기간 동안 양성 전립선비대증으로 경요도전립선절제술을 시행받은 5명 환자의 조직을 사용하였다.

2. 면역조직화학 염색

면역조직화학염색은 immunoperoxidase를 이용한 간접 염색방법을 사용하였다.^{6,7} 4 μ m 두께의 파라핀으로 포매된 종양조직편을 xyrol I, II, III를 이용해 파라핀을 제거한 후 알코올 (99.9%, 95%, 80%, 70%)로 순차적으로 수화하였다. 다음으로 pH 6.0인 citrate buffer 1,000ml에 처리한 후 10분간 121°C에서 고압멸균하였다. 이후 내인성 과산화효소활성을 억제하기 위해서 메틸알코올을 함유한 과산화수소 (0.01% H₂O₂)에 20분간 담가 처리하였으며 슬라이드 위에서 blocking reagent와 5분간 반응시켰다. 실온에서 3시간 동안 1차항체 (VEGF-monoclonal antibody: rabbit, DAKO, USA)를 반응시키고 Tris buffer (pH 7.6)로 세척한 후 가토의 면역글로부린에 대한 바이오틴 부착 2차항체와 10분간 반응시켰다. 이어서 절편을 세척한 후 streptavidin에 10분간 반응시킨 다음 0.05% diaminobenzidine (DAB)/Tris-HCl/hydrogen peroxide 용액으로 2-3분 동안 발색을 시킨 후 Mayer's hematoxylin으로 5분간 대조염색을 하였다. 마지막으로 슬라이드를 증류수로 세척 후 농도를 달리하면서 알코올 (70%, 80%, 95%, 99.9%)로 각각 1분씩 탈수한 후 xyrol I, II, III로 각각 3분간 clearing 하고 crystal mounting solution으로 봉입 (mounting)하였다.

3. 면역조직화학염색 발현의 분석

한 명의 비뇨병리학자가 저배율 및 고배율 시야에서 조직을 관찰함으로써 Gleason score에 따라 분화도를 다시 확인하였으며 VEGF의 발현 양상은 동일한 비뇨병리학자가 면역조직화학적으로 염색된 조직 절편을 200배 확대 시야에서 검사함으로써 분석하였다. 아직까지 VEGF 발현의 분류는 정확한 기준이 확립되어 있지 않으나 문 등⁸의 보고를 참조하여 200배 확대 시야상 대조군인 5례의 양성 전립선비대증 환자의 염색과 동일한 양상의 면역조직화학염색을 보이는 경우 (염색인 안되는 경우)를 음성으로, 면역조직화학적으로 염색된 세포가 차지하는 비율이 25% 미만인 경우를 약양성 (1+)으로, 25-75%인 경우를 양성 (2+)으로, 75% 이상이 염색되는 경우를 강양성 (3+)으로 분류하였다.

4. 임상적 예후 분석

모든 환자에서 최종적인 병리학적 병기 및 분화도와 VEGF의 발현과의 관련성에 대하여 조사하였으며 술전 PSA치 및 술후 nadir PSA치, 추적관찰 기간에 biochemical recurrence (nadir PSA가 biochemical failure의 기준인 0.1 ng/ml 이하로 감소했다가 추적 관찰한 PSA가 다시 0.1 ng/ml 이상으로 증가한 경우)⁹와 VEGF의 발현과의 관련성에 대하여 조사하였다. 근치적 전립선적출술 시행 후 추가적인 내분비요법을 시행한 경우에 있어서도 역시 치료 후 PSA의 변화 및 biochemical recurrence와 VEGF의 발현과의 관련성에 대하여 조사하였다.

결 과

대조군으로 사용한 전립선비대증 조직 5례에서는 면역조직화학염색 결과 모두 음성의 결과를 보였으며 전립선암의 경우 약양성 (1+)으로부터 강양성 (3+)까지 다양한 결과를 보였으나 모든 경우 면역조직화학염색에 양성 반응을 보였다 (Fig. 1).

전립선에 국한된 질환으로 판정된 경우의 VEGF의 발현은 약양성에서부터 강양성까지 비교적 고른 분포를 보였으나 (1+: 3례, 2+: 2례, 3+: 2례), 국소 침윤성 전립선암의 경우는 대부분 강양성의 염색 결과를 보였다 (1+: 1례, 2+: 2례, 3+: 8례). 최종 병리조직을 기준으로 한 조직분화도의 경우 VEGF 염색 결과 강양성의 결과를 보였던 10례의 경우는 모두 7 이상의 Gleason sum을 보였으나 약양성이나 양성의 염색결과를 보였던 8례에서는 5에서 9까지의 다양한 Gleason sum의 결과를 보였다 (Table 1).

술전에 측정된 PSA와 VEGF 발현과는 상관관계가 유의

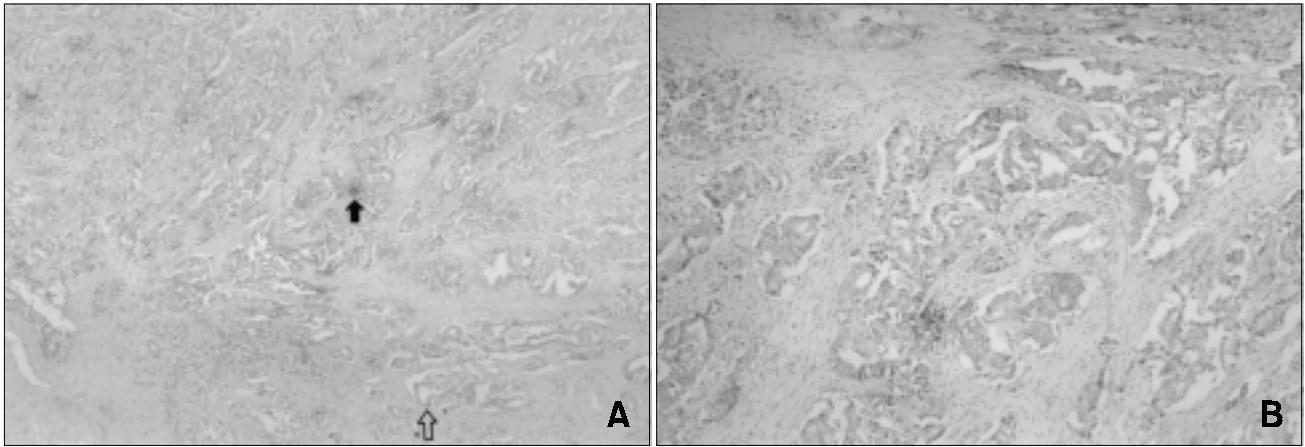


Fig. 1. (A) Stained tumor cells look bright red color (black arrow), while, normal epithelial cells are not stained (open arrow) (x40). (B) Cytoplasm of cancer cells are stained by bright red color (x200).

Table 1. Patient characteristics and VEGF expression

Pts.	Age (years)	Initial PSA (ng/ml)	Nadir PSA (ng/ml)	Biochemical recurrence* (ng/ml)	Stage (TNM)	Grade [†]	Adjuvant therapy [‡]	VEGF expression
1	61	5.66	0.04	no	T2bN0M0	5	no	2+
2	60	4.49	0.01	no	T2bN0M0	7	no	2+
3	65	49.3	0.1	no	T2N0M0	6	no	1+
4	59	6.8	0.1	no	T2bN0M0	9	no	1+
5	60	4.83	0.01	no	T2N0M0	7	no	3+
6	66	4.26	0.02	no	T2N0M0	9	no	3+
7	60	9.68	0.01	no	T2N0M0	6	F	1+
8	65	9.98	0.1	no	T2aN1M0	7	F	2+
9	64	15.3	0.1	no	T3N0M0	8	no	3+
10	72	23.3	0.02	1.44	T3N0M0	9	L	3+
11	67	35.7	0.2	no	T3N0M0	9	no	3+
12	62	69.1	0.01	0.36	T4N0M0	9	G+F	3+
13	73	13.0	0.1	no	T4aN0M0	7	no	3+
14	71	13.5	0.1	0.43	T4aN0M0	7	F	3+
15	62	13.1	0.1	no	T4aN0M0	8	L+F	3+
16	60	24	0.02	no	T4aN2M0	7	F+G	3+
17	62	15.38	0.01	no	T3cN2M0	9	F	2+
18	61	2.54	0.01	no	T3cN2M0	7	F+G	1+

F: flutamide (Eulexin[®]), L: leuproline acetate (Leupline[®]), G: gosereline acetat (Zoladex[®])

*Biochemical recurrence: Increased follow-up PSA (>0.1ng/ml) more than nadir PSA (<0.1ng/ml), [†] Grade: referenced to Gleason sum,

[‡] Adjuvant therapy: Adjuvant endocrine therapy after radical prostatectomy

하지 않는 것으로 나타났다. 또한 18명의 환자 중 근치적 전립선적출술 후 nadir PSA치가 0.1ng/ml 이하로 감소하지 않아 biochemical failure로 판정된 경우는 1례였으나 나머지 17례의 경우는 0.1ng/ml 이하로 감소하였으며 VEGF의 발현

에 따른 술후 nadir PSA와의 상관관계도 유의하지 않았다 (Table 2). 술후 추가적인 내분비요법을 시행 받은 경우는 10례로, 이 중 추적관찰 기간에 3례에서 biochemical recurrence가 있었으며 세 경우 모두 VEGF는 강양성의 발현을

Table 2. Characteristics of VEGF expression in localized and locally advanced prostatic cancer and initial PSA

VEGF expression	Localized disease (%)	Locally advanced disease (%)	Initial PSA (ng/ml) (Mean±SD)	Nadir PSA (ng/ml) (Mean±SD)	Biochemical recurrence (%)
1+	3 (17)	1 (5)	17.08±21.67	0.055±0.052	0
2+	2 (11)	2 (11)	8.87±4.93	0.040±0.042	0
3+	2 (11)	8 (45)	21.60±19.14	0.068±0.062	3 (17)
Total	7 (39)	11 (61)	17.77±17.56	0.057±0.058	3 (17)

1+: less than 25% of stained cell, 2+: 25-75% of stained cell, 3+: more than 75% of stained cell

보였다.

고 찰

1971년 Folkman¹⁰이 종양의 성장이 혈관 신생 (angiogenesis)에 의존한다고 제안한 이후 유방암, 폐암, 두경부암, 흑색종, 중추신경계암 등에 이르기까지 다양한 종양에서 미세혈관 밀도의 증가와 종양의 악성도, 병리학적 병기, 환자의 예후와 연관성이 있다고 보고되고 있다.^{11,12} 최근의 연구에 따르면 전립선암에 있어서도 전립선비대증에 비해 상대적으로 혈관밀도가 많이 증가한다는 사실이 보고된 바 있다.¹³

체내에서 신생혈관형성은 혈관형성의 촉진인자와 억제인자의 상호균형에 의해 조절되며 인체내에서의 대표적인 혈관형성의 촉진인자로는 성장인자 (peptide growth factor) 인 VEGF, 섬유아세포 성장인자들 (fibroblast growth factor; basic FGF, acidic FGF 등), transforming growth factor alpha (TGF α), transforming growth factor beta-1 (TGF β 1), keratinocyte growth factor (KGF), epidermal growth factor (EGF), platelet derived endothelial cell growth factor (PDEC GF), tumor necrosis factor alpha (TNF α), interleukin-1 β , interleukin-6 등을 들 수 있으며, 혈관형성의 억제인자로는 thrombospondin과 angiostatin, endostatin, interferon, interleukin-4, interleukin-12 등이 거론되고 있다.⁸ 종양의 성장과 전이에는 이러한 혈관형성의 촉진인자와 억제인자간의 균형이 깨짐으로써 상대적으로 혈관형성인자의 작용이 강화되는 점이 중요한 기전 중 하나인 것으로 알려져 있으며¹⁴⁻¹⁶ taxol과 같은 항암제나 온열요법, 방사선치료 등의 상당수의 항암치료법이 이러한 신생혈관형성의 차단에 그 효과를 기초하고 있는 것으로 알려져 있다.¹⁶

VEGF는 암세포에서 생산되어 인접한 종양주위 간질세포에 격리되며 간질과 세포외기질내 격리는 basic FGF와 같은 heparin과 결합하는 성장인자와의 작용에 의한 것으로 보고된 바 있다.⁷ 현재 전립선의 간질내 함유된 VEGF의 생

물학적 역할은 잘 알려져 있지 않으나 VEGF가 소의 내피세포에서 serine proteases의 발현이나 인간의 제대내피세포에서 interstitial collagenase의 발현을 유발한다는 사실은 세포외기질의 분해에 영향을 미치거나 새로운 혈관형성에 기여한다는 것을 가리킨다.¹⁰ VEGF는 전립선암세포에서 그 발현이 보고된 바 있으며 basic FGF와 acidic FGF, TGF α , TGF β 1, KGF, EGF 등과 더불어 전립선암에 있어서의 신생혈관형성을 촉진하는 대표적인 물질인 것으로 알려져 있다.¹⁶ 또한 최근의 연구에 따르면 VEGF는 백서의 복부전립선모델과 인체의 전립선비대증 조직을 대상으로 한 연구에서도 발현됨이 보고된 바 있으며,⁶ Brown 등¹⁷에 의하면 전립선조직에서 양성으로 염색되는 부분은 관찰되지 않았지만 정액내에 VEGF가 다량으로 존재하는 것으로 보아 선상피세포내에 VEGF의 존재는 그들의 분비기능과 관련이 있음을 추측하게 한다. 또한 전립선비대증환자에서 얻은 조직에서 간질세포가 뚜렷하게 염색이 되는 것은 혈관이 매우 풍부한 간질세포의 존재와 임상적 혹은 병리학적으로 증식성 질환이라는 증거를 의미한다고 하였다.⁷ 저자들의 연구에서는 경요도전립선절제술에 의해 얻은 5례의 전립선비대증 조직을 대상으로 VEGF에 대한 면역조직화학염색을 시행한 결과 모든 경우에 있어서 염색이 되지 않는 음성의 결과를 보여 Brown 등¹⁷의 연구와 동일한 결과를 보였다.

이러한 종양의 신생혈관형성의 정도를 파악하는 방법에는 크게 3가지가 있으며 면역조직화학염색 후 미세혈관밀도를 측정하는 방법과 혈관내피세포의 항원에 대한 면역조직화학염색을 시행한 후 증식하는 혈관내피세포의 수를 분석하는 혈관내피세포증식지수법 (endothelial cell proliferation index), 그리고 Doppler를 이용한 증가된 전립선조직내의 혈류를 직접 측정하는 방법 등이 그것이다. 본 연구에서는 이들 방법 중 VEGF 면역조직화학염색에 따른 미세혈관밀도분석법을 이용하였으며 면역조직화학염색의 결과를 염색의 정도에 따라 정량적으로 측정하여 음성, 약양성, 양성, 강양성 등으로 세분하여 분석하였다. 이러한 분류법은 기존의 음성과 양성

의 단점을 보완하기 위한 것으로 기존의 분류법이 양성으로 염색된 종양군간에는 예후차를 증명할 수 없었던 반면 본 연구에서는 양성으로 염색되는 경우를 3단계로 세분함으로써 양성 염색군간에서의 예후차에 대하여 좀더 상세히 분석하였다.

Brower 등¹⁸은 전립선암에서의 혈관신생은 병리학적 병기에 독립적인 예후인자로 작용한다고 보고하였는데, VEGF를 이용한 전립선암에 있어서의 혈관신생에 대한 본 연구의 결과 근치적 전립선적출술을 시행 받은 환자 중 전립선내에 종양이 국한된 환자의 경우 다양한 VEGF 염색 결과를 보였던 반면, 림프절이나 국소 전이가 있었던 경우에는 대부분의 환자가 강양성의 VEGF 면역염색 결과를 보임으로써 동일한 결과를 보였다.

최근 Duque 등¹⁹의 연구에서 혈장내 VEGF의 농도와 Gleason sum과의 관련성에 대한 분석결과 통계적으로 유의한 차이가 없었지만 Gleason sum이 8-10인 경우 혈장내 VEGF 농도가 높은 경향이 있는 것으로 보고하였다. 저자들의 연구에서도 강양성의 염색 결과를 보였던 모든 환자가 Gleason sum 7 이상의 세포 분화도를 보이는 결과를 얻음으로써 VEGF의 발현이 종양의 분화도나 병기와 밀접한 관련성이 있다는 것을 알 수 있었다. 또한 Duque 등¹⁹은 혈청 PSA가 20ng/ml 이상인 경우 혈청 PSA가 20ng/ml 이하인 경우보다 혈장내 VEGF 농도가 유의하게 높다고 증명하였다. 본 연구에서는 술전 PSA 값과 VEGF 발현과는 상관관계가 없는 것으로 나타났으나 추적 기간 중 biochemical recurrence가 있었던 모든 환자에서 강양성의 VEGF 염색결과를 보임으로써 VEGF가 술후 예후를 예측하는 데 있어서 중요한 인자로 작용한다는 것을 알 수 있었다.

결 론

전립선암에 대한 VEGF 면역조직화학염색 결과 술전 PSA값과 VEGF발현과는 유의한 상관관계를 가지고 있지 않았으나 종양의 병기나 분화도 등의 임상적 예후인자와 밀접한 관련성을 가지고 있었다. 특히 종양의 재발과 VEGF의 발현과 밀접한 관련성을 보임으로써 근치적 전립선적출술 후 종양의 재발 등 임상적 예후를 예측하는 데 VEGF의 발현이 중요한 의미를 가진다는 것을 알 수 있었다. 전립선암의 성장과 조절에 관계된 혈관형성인자에 대한 연구는 전립선암의 진단과 치료에 많은 도움이 될 것으로 생각되며, 향후 장기간에 걸쳐 더 많은 조사군을 대상으로 하여 혈관형성인자 중 하나인 VEGF의 독립적인 예후인자로서의 임상적 중요성에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

REFERENCES

1. Stina H, Pernilla W, Anders B, Jan-Eric D. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in the rat ventral prostate and dunning R3327 PAP adenocarcinoma. *Prostate* 1998; 36:71-9.
2. Potgens AJG, Westphal HR, de Waal RMW, Ruiter DJ. The role of the vascular permeability factor and basic fibroblast growth factor in tumor angiogenesis. *Biol Chen Hoppe Seylor* 1995; 376:57-70.
3. Folkman J. The role of angiogenesis in tumor growth. *Semin Cancer Biol* 1992; 3:65-71.
4. Brawer MK, Deering RE, Brown M, Preston SD, Bigler SA. Predictors of pathologic stage in prostatic carcinoma. *Cancer* 1994; 73:678-87.
5. McNeal JE, Yemoto CEM. Significance of demonstrable vascular space invasion for the progression of prostatic adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 1996; 20:1351-60.
6. Ferrer FA, Miller LJ, Andrawis RI, Kurtzman SH, Albertsen PC, Laudone VP, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human prostate cancer: in situ and in vitro expression of VEGF by human prostate cancer cells. *J Urol* 1997; 157:2329-33.
7. Jackson MW, Bentel JM, Tilley WD. Vascular endothelial growth factor expression in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *J Urol* 1997; 157:2323-8.
8. 문삼영, 문우철. 내분비요법이 전립선암의 VEGF 발현과 혈관 생성에 미치는 영향. *대한비뇨회지* 1999; 40:29-40.
9. Ferrigni RG, Schild SE. The evaluation and treatment of biochemical failure following radical prostatectomy. *AUA Update Series* 1999; 18:242-8.
10. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Natur Med* 1995; 1:27-34.
11. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285:1182-6.
12. Weinder N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. *Am J Pathol* 1995; 147:9-19.
13. Andrawis R, Nashid NS, Lindquist RR, Fitzgerald J, Albertsen PC, Walzak M. Benign prostatic hyperplasia. *J Urol* 1996; 153:355A.
14. Busolino F, Albini A, Camussi G, Presta M, Viglietto G, Ziche M, et al. Role of soluble mediators in angiogenesis. *Eur J Cancer* 1996; 32A:2401-12.
15. Brown LF, Metmar M, Claffey K, Nagy JA, Feng D, Dvorak AM, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine. *EXS* 1997; 79:233-69.
16. Campbell SC. Advances in angiogenesis research: relevance to urologic oncology. *J Urol* 1997; 158:1663-74.
17. Brown LF, Yeo KT, Berse B, Morgentaler A, Dvorak HF, Rosen S. Vascular permeability factor (vascular endothelial

growth factor) is strongly expressed in the normal male genital tract and is present in substantial quantities in semen. J Urol 1995; 154:576-9.

18. Brawer MK, Deering RE, Marianne B, Preston D, Bigler SA. Predictors of pathologic stage in prostate carcinoma: the role

of neovascularity. Cancer 1994; 73: 678-87.

19. Duque JLF, Loughlin KR, Adam RM, Kantoff PW, Zurakoski D, Freeman MR. Plasma levels of vascular endothelial growth factor are increased in patients with metastatic prostate cancer. J Urol 1999; 54: 523-7.
-