

## 암색전의 맥관 내 맥관 형성에 관한 면역조직화학적 연구

김조현 · 최 찬 · 이재혁 · 이지신  
김재순 · 한창우 · 정상우

전남대학교 의과대학 병리학교실

접 수 : 2007년 3월 14일  
게재승인 : 2007년 7월 23일

책임저자 : 정 상 우  
우 501-746 광주광역시 동구 학1동 5  
전남대학교 의과대학 병리학교실  
전화: 062-220-5688  
Fax: 062-227-3429  
E-mail: swjuhng@chonnam.ac.kr

### An Immunohistochemical Study of Angiogenesis in Tumor Emboli

Jo-Heon Kim, Chan Choi, Jae-Hyuk Lee, Ji-Shin Lee, Sung-Sun Kim,  
Chang-Woo Han and Sang-Woo Juhng

Department of Pathology, Chonnam National University Medical School, Gwangju, Korea

**Background :** Angiogenesis, which is essential for tumor growth, is known to occur in the extravascular stroma. However, vascular structures were noted in intravascular tumor emboli in surgical specimens. This prompted our investigation of the frequency and morphology of angiogenesis in tumor emboli. **Methods :** Hematoxylin-eosin stained specimens were reviewed for tumor emboli, in 21 cases of stomach adenocarcinoma and 22 cases of colon adenocarcinoma. The cases were examined with immunohistochemistry using antibodies against epithelial antigen (cytokeratin), endothelial antigens (CD31, CD34), lymphatic endothelial antigen (D2-40), and proliferation-associated antigen (MIB1). **Results :** Endothelial cells were observed in 16 tumor emboli among four (19.1%) of the 21 cases of stomach adenocarcinoma and in 32 tumor emboli among four (18.2%) of the 22 cases of colon adenocarcinoma. The endothelial cells in the tumor emboli showed papillary ingrowth from the vessel wall, formation of vascular lumens, scattered distribution, or surface coating of the emboli. Some of the endothelial cells in the tumor emboli were D2-40-positive, and some were MIB1-positive. **Conclusions :** These findings demonstrated that angiogenesis occurs in intravascular tumor emboli as well as in the extravascular stroma. Angiogenesis in the tumor emboli may reflect an active process and may facilitate tumor growth.

**Key Words :** Angiogenesis; Tumor emboli; Immunohistochemistry

양성종양과 악성종양의 가장 큰 차이점은 전이 여부다. 악성 종양세포는 혈관이나 림프관을 침입해 원격 전이를 함으로써 이 환율과 사망률을 높인다. 따라서 악성종양의 전이에 대해서 많은 연구가 진행되고 있다.

악성종양세포는 유착분자, 단백질 분해효소, 운동성분자 등을 조절하여 세포외바탕질을 침입하며, 혈관이나 림프관의 내피세포 사이를 뚫고 맥관 안에 들어가는 것으로 알려져 있다.<sup>1</sup> 또, 맥관 안에 들어간 암세포는 숙주의 면역반응에 의해 대부분 제거되지만 일부가 원격 부위의 혈관이나 림프관으로 흘러간 다음 다시 내피세포 사이를 뚫고 세포외바탕질로 빠져나가 맥관 신생을 유도해 성장하는 것으로 알려져 있다.<sup>2-6</sup> 지금까지 종양의 맥관 신생은 세포외바탕질에서 일어나는 것으로 알려져 있는 것이다.<sup>7-10</sup> 저자들은 수술로 적출한 악성종양의 병터를 광학현미경으로 관찰하던 중 악성종양세포의 일부 색전 내에서 맥관이 형성되어 있음을 보았다. 이는 악성종양세포의 색전이 혈관이나 림프관을 뚫고 세포외바탕질로 빠져나가지 않고서도 맥관 신생

을 유도할 수 있다는 것을 의미하며, 악성종양세포의 색전이 좀 더 쉽게 성장하게 해주는 소견이라고 볼 수 있었다.

이러한 소견은 지금까지 보고되지 않은 새로운 내용이며, 이에 대해 체계적으로 연구해볼 필요가 있다고 생각하였다. 이에 저자들은 악성종양세포의 색전 중에서 색전 내 맥관을 형성한 색전이 얼마나 자주 보이는지를 면역조직화학적으로 조사하고, 악성종양의 전이에서 암색전 내의 맥관 형성이 어떠한 의미가 있는지 고찰하기 위해 본 연구를 시행하였다.

### 재료와 방법

#### 연구대상

우리나라에서 발생빈도가 높은 위암종과 대장암종의 원발 병터의 헤마톡실린-에오신 염색 표본을 광학현미경으로 검색하여

악성종양세포의 색전이 있는 표본을 선택하였다.

전남대학교병원에서 2004년 1월부터 4월까지 위암종으로 절제된 위 74예 중 원발 병터에서 암종세포의 색전이 보이는 위암종 21예와, 2003년 1월부터 2004년 2월까지 대장암종으로 절제술을 받은 222예 중 원발 병터에서 암종세포의 색전이 보이는 대장암종 22예를 연구대상으로 하였다.

**면역조직화학염색**

면역조직화학염색으로 세포의 종류를 확인하기 위해 사용한 항체는 다음과 같다.

- 1) CD34, CD31 (Dako, Denmark): 혈관 및 림프관의 내피 세포 표지자<sup>11</sup>
- 2) D2-40 (Dako, Denmark): 림프관의 내피세포 표지자<sup>12</sup>
- 3) Cytokeratin (Zymed, USA): 상피세포 표지자<sup>13</sup>

- 4) MIB1 (Ki-67)(Dako, Denmark): DNA 합성기 세포의 표지자<sup>14</sup>

파라핀에 포매된 조직에서 4 μm의 연속 절편을 만들었고 파라핀을 제거한 다음 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)로 세척하고 각각의 항체를 반응시켰다. 그 후 biotin이 부착된 이차 항체를 반응시킨 다음 avidin-horseradish peroxidase에 작용시켰다. 부착된 horseradish peroxidase는 과산화수소와 diaminobenzidine-4HCl을 이용하여 발색하였으며, 헤마톡실린으로 대조 염색한 후 광학현미경으로 관찰하였다. 음성대조용 표본에는 일차항체 대신 PBS를 작용시켰다.

**형태 계측**

Analysis 프로그램(SIS, Germany)을 이용하여 내피세포가 들어 있는 암색전과 맥관의 지름을 계측하였으며, 대조 목적으

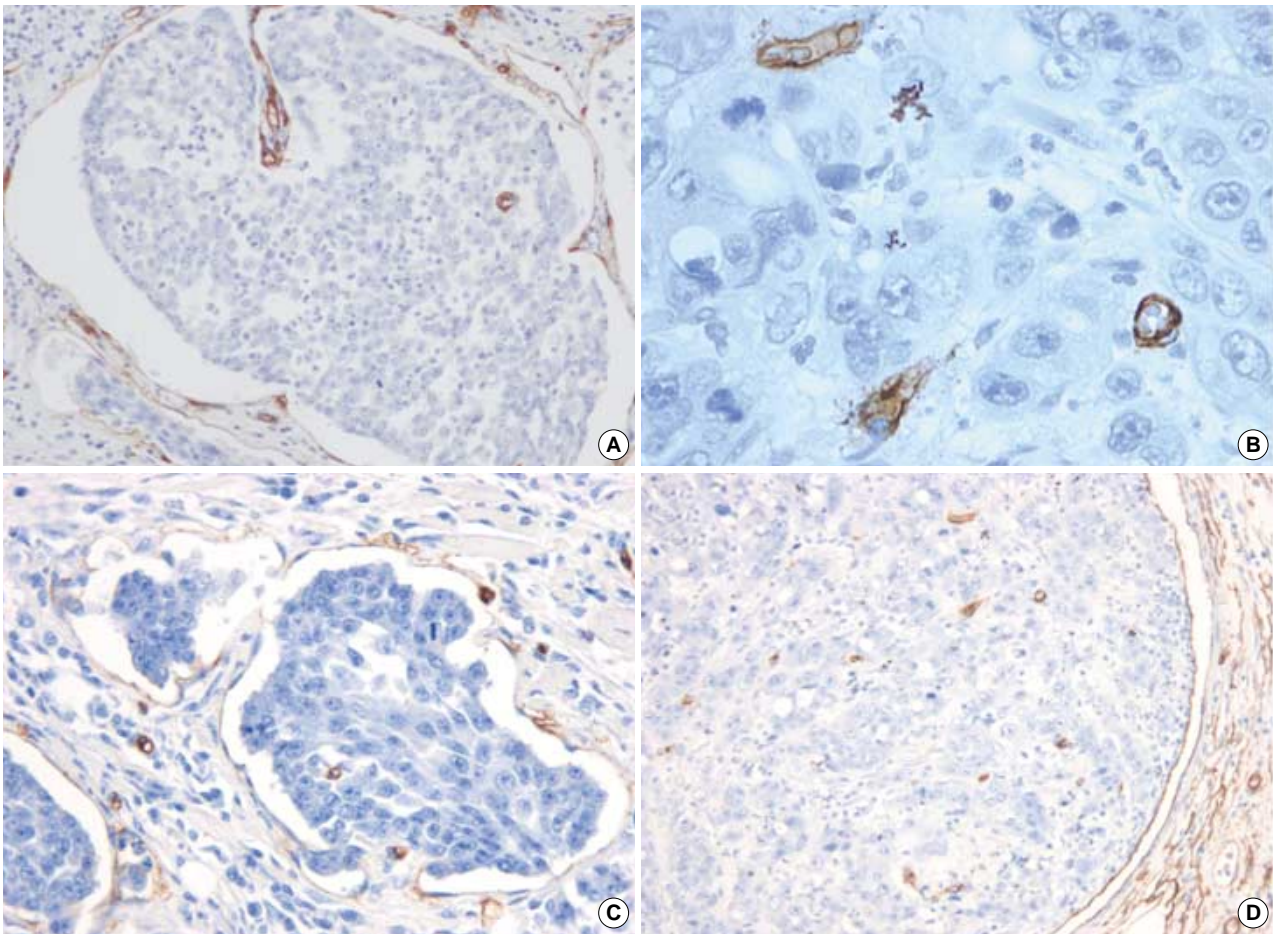


Fig. 1. (A) Papillary pattern. Fibrovascular strands arising from the vessel wall protrude into a tumor embolus. Stomach adenocarcinoma, CD34 immunostaining × 200. (B) Vascular pattern. Endothelial cells form patent vascular lumina within a tumor embolus. Note red blood cells in the vascular lumina. Colon adenocarcinoma, CD34 immunostaining × 400. (C) Scattered pattern. Endothelial cells are scattered individually within a tumor embolus. Colon adenocarcinoma, CD34 immunostaining × 200. (D) Coated pattern. Endothelial cells coat the surface of a tumor embolus. Note also the endothelial cells scattered within a tumor embolus. Colon adenocarcinoma, CD34 immunostaining × 100.

로 내피세포가 들어 있지 않은 암색전과 맥관의 지름을 무작위로 선택한 위암중 6예와 대장암중 12예에서 계측하였다.

## 결 과

맥관 안의 암색전 내에 들어 있는 내피세포를 확인하기 위해 CD31 항체와 CD34 항체를 이용한 면역조직화학 염색 표본을

**Table 1.** Arrangement patterns of the endothelial cells within tumor emboli

Pattern	No. of emboli in stomach cancer	No. of emboli in colon cancer
Papillary	9	18
Vascular	4	10
Scattered	3	1
Coated	0	3
Total	16	32

검색하였다. 그 결과 위암중 21예의 19.1%인 4예의 암색전 내에서 내피세포를 확인할 수 있었는데, 이는 위절제술을 받은 전체 74예의 5.4%에 해당하였다. 내피세포가 들어 있는 암색전은 16군데로서 위암중 4예 모두 두 군데 이상의 암색전 내에 내피세포가 들어 있었다. 대장암중 22예의 18.2%인 4예에서도 암색전 내에 내피세포가 있는 것을 확인할 수 있었고, 이는 대장절제술을 받은 전체 222예의 1.8%에 해당하였다. 내피세포가 들어 있는 암색전은 32군데로서 대장암중 4예 모두 두 군데 이상의 암색전 안에 내피세포가 들어 있었다.

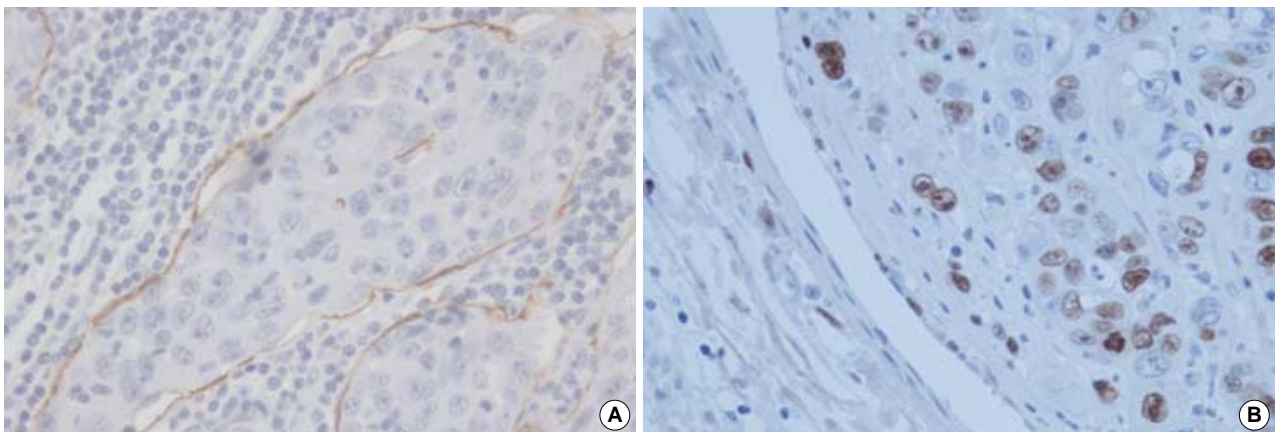
암색전 내의 내피세포는 1) 주위의 맥관벽과 연결된 젖꼭지 모양이거나(유두형[papillary pattern]; Fig. 1A), 2) 내강을 갖는 맥관 모양이거나(맥관형[vascular pattern]; Fig. 1B), 3) 하나하나 흩어져 있는 모양이었으며(산재형[scattered pattern]; Fig. 1C), 4) 내피세포가 암색전 표면을 전부 또는 일부 둘러싸며 앞의 모양이 섞여 있기도 하였다(피복형[coated pattern]; Fig. 1D). 유두형이 가장 많았고 피복형이 가장 적었다. 각각의 빈도를 Table 1에 표기하였다.

**Table 2.** Greatest diameters of tumor emboli

		<40 $\mu\text{m}$	40-200 $\mu\text{m}$	200-500 $\mu\text{m}$	500-1,000 $\mu\text{m}$	>1,000 $\mu\text{m}$	Total
With endothelial cells	Stomach	0	6	4	3	3	16 (4 cases)
	Colon	1	20	8	2	1	32 (4 cases)
Without endothelial cells	Stomach	4	24	6	1	0	35 (6 cases)
	Colon	7	39	11	3	0	60 (12 cases)

**Table 3.** Greatest diameters of vessel lumina containing tumor emboli

		<40 $\mu\text{m}$	40-200 $\mu\text{m}$	200-500 $\mu\text{m}$	500-1,000 $\mu\text{m}$	>1,000 $\mu\text{m}$	Total
With endothelial cells	Stomach	0	5	4	4	3	16 (4 cases)
	Colon	1	19	8	3	1	2 (4 cases)
Without endothelial cells	Stomach	1	25	8	1	0	35 (6 cases)
	Colon	2	38	14	5	1	60 (12 cases)



**Fig. 2.** (A) The endothelial cells coating partly the surface of a tumor embolus and scattered within the embolus are D2-40-positive. Colon adenocarcinoma, D2-40 immunostaining  $\times 400$ . (B) Some of the endothelial cells that coat the surface of a tumor embolus are positive for MIB1. Colon adenocarcinoma, MIB1 immunostaining  $\times 400$ .

CD31 항체와 CD34 항체에 양성 반응을 보인 위암종 16군데 중 5군데와 대장암종 32군데 중 11군데의 암색전 내 내피세포를 표적으로 림프관 내피세포의 표지자로 알려진 D2-40 항체를 이용해 면역조직화학염색을 한 표본을 검색하였다. 그 결과, D2-40에 양성 반응을 보인 암색전 내 내피세포(Fig. 2A)는 위암종의 경우 두 군데였고 대장암종의 경우 다섯 군데였다.

암색전 내의 내피세포 일부는 MIB1 염색에서 양성 반응을 보였다(Fig. 2B).

내피세포가 들어 있는 암색전의 지름은 위암종의 경우 최소 142  $\mu\text{m}$ 부터 최대 1,491  $\mu\text{m}$  사이였고, 대장암종의 경우 최소 29  $\mu\text{m}$ 부터 최대 1,528  $\mu\text{m}$  사이였다(Table 2). 맥관의 지름은 위암종의 경우 최소 159  $\mu\text{m}$ 부터 최대 1,550  $\mu\text{m}$  사이였고, 대장암종의 경우 최소 35  $\mu\text{m}$ 부터 최대 1,621  $\mu\text{m}$  사이였다(Table 3). 내피세포가 들어 있지 않은 암색전의 지름은 위암종의 경우 최소 30  $\mu\text{m}$ 부터 최대 600  $\mu\text{m}$  사이였고, 대장암종의 경우 최소 20  $\mu\text{m}$ 부터 최대 800  $\mu\text{m}$  사이였다(Table 2). 맥관의 지름은 위암종의 경우 최소 35  $\mu\text{m}$ 부터 최대 720  $\mu\text{m}$  사이였고, 대장암종의 경우 최소 30  $\mu\text{m}$ 부터 최대 1,100  $\mu\text{m}$  사이였다(Table 3).

Table 4. Grading of stomach and colon adenocarcinomas\*

		W	M	P	Sum
Total	Stomach	11	20	39	70
	Colon	77	129	15	221
Without emboli	Stomach	9	10	30	49
	Colon	74	115	10	199
With emboli	Stomach	2	10	9	21
	Colon	3	14	5	22
With emboli containing endothelial cells	Stomach		1	3	4
	Colon		1	3	4

W, Well differentiated; M, Moderately differentiated; P, Poorly differentiated.

\*, Three cases of mucinous adenocarcinomas and 1 case of sarcomatoid carcinoma are not included in stomach.

\*, One case of adenosquamous cell carcinoma is not included in colon.

Table 5. Staging of stomach adenocarcinomas

Stomach cancer	Stage 0	Stage IA	Stage IB	Stage II	Stage IIIA	Stage IIIB	Stage IV	Sum
Total		31	8	7	11	6	11	74
Without emboli		29	5	4	7	3	5	53
With emboli		2	3	3	4	3	6	21
With emboli containing endothelial cells					1	1	2	4

Table 6. Staging of colon adenocarcinomas

Colon cancer	Stage 0	Stage I	Stage IIA	Stage IIB	Stage IIIA	Stage IIIB	Stage IIIC	Stage IV	Sum
Total	1	21	81	3	6	42	34	34	222
Without emboli	1	21	80	3	6	37	26	26	200
With emboli			1			5	8	8	22
With emboli containing endothelial cells						1	2	1	4

내피세포가 들어 있는 암색전과 맥관의 지름이 내피세포가 없는 암색전과 맥관의 지름보다 좀 더 큰 경향을 보였다.

위암종에서 암색전이 있는 21예 중에서 중등도 분화도를 보이는 예가 10예, 저분화도를 보이는 예가 9예로서 전체의 91.5%를 차지했다. 암색전이 없는 49예 중에서는 중등도 분화도를 보이는 예와 저분화도를 보이는 예가 각각 10예, 30예로서 전체의 81.6%를 차지했다. 대장암종에서 암색전이 있는 22예 중 중등도 분화도를 보이는 예는 14예, 저분화도를 보이는 예는 5예로서 전체의 86.3%를 차지했다. 암색전이 없는 199예 중에서는 중등도 분화도를 보이는 예와 저분화도를 보이는 예가 각각 115예, 10예로서 전체의 62.8%를 차지했다(Table 4). 위암종에서 암색전이 있는 21예 중 병기가 stage II 이상인 예는 16예로서 전체의 76.2%였고, 암색전이 없는 53예 중에서는 19예로서 전체의 35.8%였다. 대장암종에서 암색전이 있는 예는 모두 병기가 stage IIA 이상으로, 암색전이 없는 예보다 병기가 더 높았다(Table 5, 6). 따라서 암색전이 있는 위암종과 대장암종은 암색전이 없는 위암종과 대장암종보다 분화도가 좋지 않았고 병기도 더 높았다.

위암종과 대장암종에서 내피세포가 들어 있는 암색전이 있는 8예 모두 중등도 분화도나 저분화도를 보여, 내피세포가 들어 있지 않은 암색전이 있는 21예, 22예보다 분화도가 좀 더 나쁜 경향을 보였다(Table 4). 위암종에서 내피세포가 들어 있는 암색전이 있는 4예 모두 병기가 stage IIIA 이상이었으며, 대장암종에서 내피세포가 들어 있는 암색전이 있는 4예 모두 병기가 stage IIIB 이상으로, 내피세포가 들어 있지 않은 암색전이 있는 21예, 22예에 비해서 좀 더 높은 경향을 보였다(Table 5, 6).

## 고찰

맥관 형성은 종양의 성장에 필수적인데, 지금까지는 원발 병터이든 전이 병터이든 간에 종양의 맥관 형성이 맥관 밖의 세포 외바탕질에서 일어나는 것으로 알려져 있다.<sup>7-10</sup> 그러나 본 연구

는 암색전 내에도 내피세포가 들어 있음을 보여주어 종양의 맥관 형성이 맥관 안에서도 이루어질 수 있음을 시사하였다.

맥관 안의 암색전 내 내피세포는 하나하나 흩어져 있는 산재형으로 관찰되기도 하였으나, 그보다는 주위의 맥관벽과 연결된 유두형이나 내강이 있는 맥관형이 훨씬 많았다. 이는 암색전 안의 내피세포가, 암세포가 맥관을 침입할 때 피동적으로 수반되어 들어온 내피세포가 아니라, 암색전의 능동적인 맥관 신생으로 형성된 내피세포라는 것을 의미한다고 볼 수 있다. 암색전 내의 내피세포가 증식기 세포의 표지자인 MIB-1에 양성 반응을 보인 것도 암색전의 능동적 맥관 신생을 반영하는 소견이라고 생각된다.

원발종양 부위에서 암색전을 보이는 예 중 암색전 내에서 내피세포를 확인할 수 있었던 경우는 위암 19.1%, 대장암 18.2%의 빈도로서 높지는 않았다. 암색전 중에는 맥관 안에서 제거되거나 맥관 밖으로 빠져나가 세포외바탕질에서 맥관 신생을 유도해 성장하는 암색전의 빈도가 더 높을 것이라고 추정할 수 있었다. 그러나 빈도가 높지 않다고 하더라도, 맥관 내의 암색전 내에서부터 일어나는 맥관 신생은 암세포의 성장 가능성을 높여줄 것으로 생각되었다.

종양의 맥관 형성이 맥관 안에서도 이루어질 수 있음을 제시한 본 연구결과는 아직 보고된 바 없는 새로운 소견이다. 그러나 혈관 내 혈전이 기질화에 의해 재소통(recanalization) 혈전으로 바뀌는 것이나 내피세포가 반응성 유두상 증식을 하는 것을 생각해 보면 암색전의 맥관 신생도 인체에서 일어나는 일반적 현상의 하나로서 예외적 현상이 아니라고 생각한다.

암색전은 숙주의 면역반응에 의해 성장이 저해되거나 제거될 수 있다. 따라서 암색전 표면의 일부 또는 전부가 내피세포로 덮여 있는 피복형은 숙주의 면역반응을 피할 수 있을 것이므로 내피세포에 의한 피복이 암색전의 생존에 긍정적으로 작용할 것으로 생각되며, 이에 대해서도 체계적으로 연구해 볼 필요가 있다. Lapis 등<sup>15</sup>도 악성흑색종 세포주를 이용한 전이 실험에서 내피세포로 피복된 암색전을 보고한 바 있다.

암색전 내의 내피세포 형태 중 주위의 맥관벽과 연결된 유두형과 암색전의 표면을 덮는 피복형은 맥관 신생이 주위 맥관벽에서 유래했을 것으로 생각할 수 있다. 그러나 맥관형이나 산재형은 암색전 내의 내피세포가 어떻게 유래했는지 본 연구결과만으로는 추정하기 어려웠다. 암종세포가 맥관 안으로 침입하기 이전 단계에서 이미 내피세포가 암종세포들 사이에 존재했을 가능성도 있으며 순환혈액 내의 줄기세포에서 유래했을 가능성도 있다. 연속절편을 만들어 삼차원 영상을 구축해 주위 맥관벽과의 관계를 조사하고 내피세포 줄기세포의 표지자를 이용해 조사해 볼 필요가 있다.

본 연구에서는 맥관의 내피세포와 맥관 안 암색전 내의 내피세포가 혈관의 내피세포인지 또는 림프관의 내피세포인지 조사하기 위해 CD31 또는 CD34 항체와 함께 최근 개발된 D2-40 항체를 이용하였다. 혈관과 림프관의 내피세포는 CD31 항체나

CD34 항체를 이용한 면역조직화학 반응에서 양성반응을 보이고, 림프관 내피세포는 D2-40 항체에 양성반응을 보이는 것으로 알려져 있다. 본 연구결과, CD31 또는 CD34 항체에 양성반응을 보이는 내피세포 중에는 D2-40 항체에 양성반응을 보여 림프관 내피세포라고 볼 수 있는 것도 있었으나, 절반 이상은 D2-40 항체에 음성반응을 보여 혈관 내피세포로 볼 수 있는 것도 상당수 있었다. 그러나 악성종양의 신생맥관은 생리학적 신생맥관과 다르므로,<sup>5</sup> 어느 쪽이라고 단정 짓기는 어렵고 다른 림프관 내피세포의 표지자를 이용해 더 조사할 필요가 있었다.

암색전이 들어있는 맥관의 지름은 모두 세동맥 또는 세정맥 이상의 크기였다. 맥관 형성을 보이는 암색전의 지름은 작게는 30  $\mu\text{m}$ 에서 크게는 1,500  $\mu\text{m}$ 였으며, 맥관 형성을 보이지 않는 암색전의 지름(20-800  $\mu\text{m}$ )보다는 컸으나, 대부분 1,000  $\mu\text{m}$  이하였다. 맥관 형성을 보이는 암색전의 지름이 맥관 밖의 바탕질에서 맥관 신생이 일어나는 것으로 알려진 종양의 크기 1-2 mm보다 대부분 작은 것도 암색전 내에서 맥관이 능동적으로 형성된다는 것을 의미한다고 볼 수 있었다. 암색전 내에서 맥관이 형성되는 경우에는 그렇지 않은 경우보다 맥관과 색전의 크기가 좀 더 컸다.

암색전이 있는 위암종과 대장암종은 암색전이 없는 위암종과 대장암종에 비해 분화도가 좋지 않고 병기가 더 높았다. 또 암색전 내에서 맥관이 형성된 종양이 그렇지 않은 것보다 종양의 분화도가 좀 더 나쁘고 병기는 좀 더 높은 경향을 보였다. 통계적으로 의의가 있는 결론에 도달하기 위해서는 더 많은 증례를 대상으로 한 추가 조사가 필요하리라고 본다.

## 참고문헌

1. Tuszyński GP. Adhesive proteins and hematogenous spread of cancer. *Acta Haematol* 1997; 97: 29-39.
2. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003; 9: 653-8.
3. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the "seed and soil" hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 453-8.
4. Radisky D, Muschler J, Bissell MJ. Order and disorder: the role of extracellular matrix in epithelial cancer. *Cancer Invest* 2002; 20: 139-53.
5. Ruoslahti E. Specialization of tumour vasculature. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 83-90.
6. Weiss L. Cell and tissue movements, invasion and angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 2000; 19: 257-79.
7. Achen MG, McColl BK, Stacker SA. Focus on lymphangiogenesis in tumor metastasis. *Cancer Cell* 2005; 7: 121-7.
8. Li CY, Shan S, Cao Y, Dewhirst MW. Role of incipient angiogenesis in cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2000; 19: 7-11.

9. Kalluri R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 422-33.
10. Swartz MA, Skobe M. Lymphatic function, lymphangiogenesis, and cancer metastasis. *Microsc Res Tech* 2001; 55: 121-7.
11. Parums DV, Cordell JL, Micklem K, Heryet AR, Gatter KC, Mason DY. JC70: a new monoclonal antibody that detects vascular endothelium associated antigen on routinely processed tissue sections. *J Clin Pathol* 1990; 43: 752-7.
12. Khan HJ, Marks A. A new monoclonal antibody, D2-40, for detection of lymphatic invasion in primary tumors. *Lab Invest* 2002, 82: 1255-7.
13. Chu PG, Weiss LM. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology* 2002; 40: 403-39.
14. Kruse AJ, Baak JP, Helliesen T, Kjellevoid KH, Bol MG, Janssen EA. Evaluation of MIB-1-positive cell clusters as a diagnostic marker for cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2002; 26: 1501-7.
15. Lapis K, Paku S, Liotta LA. Endothelialization of embolized tumor cells during metastasis formation. *Clin Exp Metastasis* 1988; 6: 73-89.