간세포암종에서 Caveolin의 발현: 종양의 신생동맥 형성과 영상소견의 연관성

전북대학교 의과대학 병리학교실, 방사선학교실¹, 외과학교실²,
의과학 연구소 및 헬스케어기술개발사업단

최하나 · 김경열 · 박호성 · 장규윤 · 강명재
이동근 · 김영곤¹ · 조백환² · 차은정 · 문우성

Abstract

Expression of Caveolin in Hepatocellular Carcinoma: Association with Unpaired Artery Formation and Radiologic Findings

Ha Na Choi, M.S., Kyung Ryoul Kim, Ph.D., Ho Sung Park, M.D., Kyu Yun Jang, M.D.,
Myoung Jae Kang, M.D., Dong Geun Lee, M.D., Young Kon Kim, M.D.¹,
Baik Hwan Cho, M.D.², Eun Jung Cha, M.D., Woo Sung Moon, M.D.

Department of Pathology, Radiology¹, Surgery², Chonbuk National University Medical School,
Institute for Medical Sciences and the Center for Healthcare Technology Development, Jeonju, Korea

Background/Aims: Hepatocellular carcinoma (HCC) is becoming one of the common malignant tumors worldwide, and it is characterized by its high vascularity. Caveolin is the major structural protein in caveolae, which are small omega-shaped invaginations within the plasma membrane. Caveolin has been implicated in mitogenic signaling, oncogenesis and angiogenesis. The expression of caveolin-1 and -2 in HCC and its potential relationship with angiogenesis has not been examined. **Methods:** Paraffin sections of 35 HCC specimens were immunostained with caveolin-1, caveolin-2, alpha-smooth muscle actin, and CD34 antibodies. In addition, the expression of caveolin-1 and -2 mRNA in HCC was examined. The relationship between the radiological findings and the number of unpaired arteries and microvessel density (MVD) was also investigated. **Results:** Caveolin-1 and -2 were expressed in the sinusoidal endothelial cells in 20 out of 35, and 18 out of 35 HCC specimens, respectively. Caveolin-1 and -2 were also expressed in the smooth muscle cells of the unpaired arteries in 26 out of 35, and 18 out of 35 HCC specimens, respectively. Increased expression of caveolin-1 and -2 mRNA was detected in 26.7% and 33.3% of the tumor specimens, respectively, compared with the corresponding non-tumorous adjacent liver tissues. There was a significant correlation between expression of caveolin-1, -2 in the smooth muscle cells of unpaired arteries and the number of unpaired arteries. The number of unpaired arteries in HCCs was found to be associated with the degree of contrast enhancement in the arterial phase imaging. However, it did not correlate with the degree of MVD.

◆ Received January 15, 2007; revised April 10, 2007; accepted June 13, 2007

◆ Abbreviations: HVB, hepatitis B virus; HCC, hepatocellular carcinoma; HCV, hepatitis C virus; MVD, microvessel density; PCR, polymerase chain reaction; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction

◆ Corresponding author: Woo Sung Moon, E-mail: mws@chonbuk.ac.kr; Phone: 063) 270-3071; Fax: 063) 270-3135

주소: 전북 전주시 덕진구 금암동 산 2-20 전북대학교 의과대학 병리학교실 (우) 560-180

* 이 논문은 2007년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(지방연구중심대학육성사업/헬스케어기술개발사업단)

Conclusions: These findings suggest that the expression of caveolin-1, -2 is associated with the formation of unpaired arteries in HCC. In addition, there is a correlation between the degree of contrast enhancement of the HCC in the arterial phase image and the number of unpaired arteries. (*Korean J Hepatol* 2007;13:396-408)

Key Words: Carcinoma, hepatocellular; Caveolins; Angiogenesis, pathologic; Diagnostic imaging

서 론

간세포암종은 혈관이 풍부한 악성 종양으로, 진단법과 치료 방법의 발전에도 불구하고 나쁜 예후를 보인다. 간세포암종에서 혈관신생은 종양의 발생 및 진행에 필수적이다. 정상 간이 간문맥과 간동맥 혈관의 공급을 받는 데 비해, 진행 간세포암종은 단지 동맥에 의해서 혈액을 공급받게 되며 굴모양혈관이 모세혈관을 형성하게 된다.¹⁻³ 간세포암종에서는 담관을 동반하지 않는 신생동맥(unpaired artery)과 굴모양혈관의 모세혈관화(sinusoidal capillarization) 정도를 관찰함으로써 혈관신생의 정도를 알 수 있다.¹⁻⁴ 신생동맥은 간경화에서는 거의 관찰되지 않고, 저등급 형성이상결절에서는 발달이 시작되며 그 수가 매우 적다. 신생동맥의 수는 고등급의 형성이상결절에서 점차 증가하여, 간세포암종으로 진행되면 많은 수가 관찰된다. 또한 간세포암종에서 CD34를 이용한 면역염색을 하면 굴모양혈관의 모세혈관화를 관찰할 수 있으며, 굴모양혈관의 모세혈관화는 간세포암종의 진행에 따라 점차 증가하며 신생동맥과 더불어 혈관신생의 정도를 반영한다.¹⁻⁴

Caveolae는 50-100 nm 크기의 구조로 세포 표면의 원형질막에 플라스크 모양으로 함입되어 있으며, 여러 물질의 세포 내 이입과 신호전달 등에 매우 중요한 역할을 한다.⁵ 이는 콜레스테롤, 스핑고리피드 그리고 glycosylphosphatidylinositol 등이 연결된 막 단백질이다. Caveolae의 주요 구성 성분은 caveolin-1, caveolin-2, 그리고 caveolin-3가 있으며 이들은 호모 올리고머 또는 헤테로 올리고머를 이루어 caveolae 구조를 형성한다. Caveolin-1과 -2는 내피세포, I형 폐포세포, 그리고 지방세포

등에서 높은 발현을 보이거나, caveolin-3은 근육에 특이적으로 발현된다.⁵⁻⁹ Caveolin은 혈관 형성에 매우 중요한 인자로 보고되고 있으며,^{10,11} 각종 악성 종양에서 caveolin의 발현은 매우 다양하게 보고되고 있다.¹²⁻¹⁶ 최근 간의 형성이상결절과 간세포암종의 굴모양혈관 내피세포에서 caveolin-1의 발현 증가가 보고되었으나,¹⁷ 간세포암종에서 caveolin-1, -2의 발현과 혈관 형성과의 관계에 대해 연구한 논문은 찾을 수 없었다. 이에 저자들은 간세포암종에서 caveolin-1, -2의 발현과 혈관신생의 지표로 알려진 굴모양혈관의 모세혈관화 및 신생동맥의 관계를 알아보려고 하였다. 또한 영상소견의 고혈관성 간세포암종이 조직 내 굴모양혈관의 모세혈관화의 정도와 신생동맥의 수 중 어느 것을 반영하는지를 조사하였다.

대상과 방법

1. 대상

2000년부터 2001년까지 전북대학교병원에서 간세포암종으로 진단된 환자 중 수술 전에 다른 치료를 받지 않은 35명에게서 적출된 간세포암종 조직을 대상으로 하였다. 환자의 연령 분포는 29세에서 76세로 평균 58세였다. 남자는 26명, 여자는 9명이었다. 25명과 4명이 HBV와 HCV 항원에 각각 양성이었다. 간세포암종의 크기는 1.2-9.5 cm의 분포를 보였으며 평균 4.3 ± 0.4 cm였다. 간세포암종의 조직 분화도는 Edmondson 분류에 따랐으며 분화도 I, II, III, IV에 해당하는 간세포암종의 수는 각각 2, 19, 12 및 2개였다. Caveolin-1, -2의 mRNA의 발현 정도를 확인하기 위해 2003년부터 2004년까지 전북대학교병원에서 간세포암종으로 판명받

은 환자의 간조직을 종양과 주변 비종양 조직 부분을 절제하여 한 쌍으로 한 15예를 대상으로 RT-PCR을 시행하였고, 제작된 파라핀 블록 중 보관 상태가 양호한 14예에서 면역조직화학염색을 시행하였다. 조직은 RT-PCR을 위해 -80°C 에 보관하였다. 이 15예 환자의 연령 분포는 40세에서 70세로 평균 연령은 55세였다. 면역조직화학염색에서 caveolin의 발현 유무와 종양의 크기, 조직 등급과 혈관 침윤의 유무 등 임상병리 지표를 비교 분석하였다.

2. 방법

1) 역전사중합효소연쇄반응(RT-PCR)

간세포암종 조직과 주변의 비종양 부분의 조직으로부터 TRI-Reagent (Molecular Research Center, OH)를 이용하여 전체 RNA를 추출하였다. 추출한 전체 RNA ($1\ \mu\text{g}$)를 상보적 DNA (complementary DNA, cDNA)로 합성하기 위해 First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany)를 이용하여 역전사반응을 시행하였다. 추출한 $1\ \mu\text{g}$ RNA, oligo (dT), dNTP, MgCl_2 가 들어있는 혼합물을 65°C 에서 10분간 반응시킨 후 역전사효소가 포함된 혼합물을 첨가하여, 37°C 에서 60분, 95°C 에서 5분, 4°C 에서 5분 동안 반응시켜 cDNA를 얻었다. 중합효소연쇄반응은 (PCR) 역전사로 합성한 cDNA $1-2\ \mu\text{g}$, dNTP, GoTaq polymerase (Promega, USA), PCR 용액, 그리고 각각의 시발체 caveolin-1 (sense 5'-TCT ACAAGCCCAACAACAAGGCC-3', anti-sense-TGCACTGAATCTCAATCAGGAAGC-3'), caveolin-2 (sense 5'-ATGGGG-CTGGAGACGG AGAAGG-3', anti-sense 5'-ATCCAGATGTGC AGACAGCTGAGG-3'), β -actin (sense 5'-ATC TGGCACCACACCTTCTACAATGAGC-3', anti-sense 5'-GTC-AATACTCCTGCTTGCTTGATCCACATC-3')이 포함된 혼합물을 만들어 PCR을 시행하였다. 전변성을 94°C 에서 5분간 반응시킨 후 94°C 에서 30초, 55°C 에서 30초, 72°C 에서 90초의 조건으로 30-35회 반응시키고, 마지막으로

72°C 에서 10분간 반응시켰다. 증폭된 PCR 산물은 ethidium bromide가 첨가된 1.2% agarose gel에서 전기영동한 후 LAS-3000 (Fuji, Tokyo, Japan) 이미지 분석기기를 이용하여 각각의 mRNA 발현을 확인하였다. mRNA 발현 수준은 Multi-gauge software version 3.0 (Fuji, Tokyo, Japan)을 통해 정량적으로 확인하였다.

2) 면역조직화학염색

간세포암종에서 종양 조직과 인접한 비종양 간조직을 포함한 파라핀 블록을 선정하여, $4\ \mu\text{m}$ 두께로 자르고, 유리 슬라이드에 부착시킨 후 크실렌(xylene)과 알코올로 탈파라핀과 함수 과정을 거쳤다. 항원성 회복을 위해 10 mM 구연산(citrate, pH 6.0) 완충액에 담가 10분간 극초단파 처리 후 실온에서 냉각시키고 인산염 완충액(DAKO, Carpinteria, CA)으로 세척하였다. 간세포에 존재하는 내인성 비오틴(biotin)에 의한 비특이 반응을 방지하기 위해 중합체(polymer)를 이용한 Envision system (DAKO, Carpinteria, CA)을 이용하여 면역염색을 시행하였다. 과산화수소수로 내인성 과산화효소를 소비시킨 후, Serum free Protein Block (DAKO, Carpinteria, CA)으로 10분간 처리하였다. 일차 항체인 caveolin-1, -2 (Oncogene Research Products, San Diego, CA), alpha-smooth muscle actin (DAKO, Carpinteria, CA)과 CD34 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)를 실온에서 2시간 반응시켰다. 인산염 완충액으로 수세 후, 중합체와 과산화효소가 부착되어 있는 이차 항체에 실온에서 30분간 반응시켰다. 3-amino-9-ethyl-carbazole (AEC)로 발색 후 Meyer's hematoxylin으로 대조 염색하였다.

3) 면역조직화학염색 결과 판독

Caveolin-1, -2 면역조직화학염색의 결과는 신생동맥, 굴모양혈관 내피세포, 종양세포의 세 부분으로 나누어 판독하였다. 신생동맥의 근육세포 및 내피세포, 굴모양혈관 내피세포 및 종양세포에서 면적의 10% 이상의 부위가 염색되고, 염색 강도를

감안하여 약하게 염색된 경우는 1+, 중등도로 염색되는 경우는 2+, 강하게 염색되는 경우는 3+로 판독한 후 2+ 이상인 경우를 caveolin-1, -2 양성으로 간주하였다. 간세포암종 조직에서의 미세혈관의 형성 정도는 영상분석기(Soft Imaging System, GmbH)를 이용하여 정량하였다. 한 종양 내에서도 종양 미세혈관의 분포가 다양하여 광학현미경 40배율에서 가장 혈관 밀도가 높은 종양 부위를 찾은 후, 200배율에서 4곳을 측정하였다. 미세혈관밀도는 검사된 종양의 총 면적에 대해 CD34 항체에 양성을 보인 혈관 내피세포를 백분율로 표시하였다.¹⁸ 현미경 100배율에서 alpha-smooth muscle actin 항체에 강하게 염색된 신생동맥을 무작위로 다섯 구역을 지정하여 종양 내 신생동맥 수를 세었다.

4) 영상소견의 혈관 형성 판정

최소 5년 이상 매일 간 영상을 판독하는 소화기계 방사선 전문의사가 삼중시기 역동기 컴퓨터단층 촬영을 기본으로 하고 MRI와 혈관촬영을 보조로 하여 판정하였다. 역동기 컴퓨터단층촬영의 동맥기에 주변 간실질에 비해 명확히 고밀도 음영을 보이는 경우를 2점, 동음영 또는 저밀도 음영을 보이는 경우 0점, 중간의 강도에 해당되는 경우를 1점으로 분류하였다.

5) 통계

결과 수치는 평균±표준오차(SE)로 표시하였다.

신생동맥과 굴모양혈관 내피세포에서의 caveolin의 발현 정도와 영상소견의 혈관 분포 정도의 관계는 Fisher's exact test를 이용하여 분석하였다. 굴모양혈관 내피세포의 caveolin의 발현 정도와 미세혈관의 형성 정도(CD34의 발현도)의 관계, 신생동맥 caveolin의 발현 정도와 신생동맥 수의 관계는 Student t-test 및 Mann-Whitney test를 이용하였다. *P*값이 0.05 미만인 경우 유의하다고 판단하였다.

결 과

1. 간세포암종에서 caveolin-1, -2 mRNA의 발현

간세포암종과 주변 비종양 간조직에서 RT-PCR을 시행한 결과 caveolin-1, -2의 mRNA 발현은 주변 비종양 간조직에 비해 간세포암종에서 26.7% (4/15), 33.3% (5/15)가 증가되었다(그림 1). 15예의 간세포암종에서 caveolin-1 mRNA 발현은 종양조직 59.20 ± 3.81 , 비종양 조직 53.97 ± 2.45 ($P=0.258$)이었고, caveolin-2 mRNA의 발현은 종양조직 54.68 ± 14.11 , 비종양조직 38.85 ± 10.03 ($P=0.854$)으로 통계에서 의의는 없었다.

2. 면역조직화학염색과 영상소견의 분석 결과

Caveolin-1, -2는 간세포암종 조직 내의 굴모양혈관 내피세포에서 각각 57.1% (20/35)와 51.4% (18/35) 양성 반응을 보였고, 간세포암종 내 신생동맥의 평활근세포와 신생동맥 혈관 내피세포에서

Figure 1. Expression of caveolin-1 and -2 mRNA in IHC. Over-expression of caveolin-1 and -2 mRNA was detected in 26.7% and 33.3% of the tumor specimens (T), respectively, as compared with the corresponding non-tumorous adjacent liver tissues (N).

caveolin-1은 74.3% (26/35), caveolin-2는 51.4% (18/35)가 발현되었다(그림 2A,B,C). 비종양 간조직을 포함한 30예의 간세포암종의 주위 비종양 간조직에서 caveolin-1, -2는 양성인 예(염색 강도 2+ 이상)는 없었지만 각각 66.7% (20/30), 60% (18/30)의 예가 문맥역의 혈관 또는 굴모양혈관 내피세포에서 염색 강도 1+로 약하게 발현되었고, 정상 간세포에서는 발현되지 않았다. 비종양 간조직에서 caveolin-1은 양성인 20예 모두 문맥역의 혈관 내피세포 또는 혈관벽의 평활근세포에서 발현되었고 3예는 굴모양혈관 내피세포에서 발현되었다. 비종양 간조직에서 caveolin-2는 양성인 18예 중 15예에서 문맥역의 혈관 내피세포 또는 혈관벽의 평활근세포에서 발현되었고 5예는 굴모양혈관 내피세포에서 발현되었다. 간세포암종의 종양세포

에서 caveolin-1, -2 항체에 양성을 보인 예는 각각 35예 중 3예(8.6%), 5예(14.3%)였다(그림 2D). 간세포암종 조직에서의 미세혈관밀도는 0.3-7.06%의 분포를 보여 주었으며 평균 $2.48 \pm 1.56\%$ 였다. Alpha-smooth muscle actin에 양성을 보이는 신생동맥의 수는 2개에서 118개 사이였으며 평균 31.63 ± 32.98 개였다. 영상소견에서 혈관 분포의 분석이 가능한 32예의 간세포암종에서 혈관 형성의 정도는 각각 0점이 1예, 1점이 11예, 2점이 20예였다. 비종양 간조직에 비해 간세포암종에서 caveolin-1 mRNA가 증가된 4예 중 3예에서 면역조직화학염색을 시행한 결과 caveolin-1은 간세포암종에서는 신생혈관의 근육세포 또는 굴모양혈관 내피세포에서 중등도로 양성이었다고, 비종양 간조직에서는 주로 혈관의 근육세포에서 약하게 염

Figure 2. Immunohistochemistry for caveolin-1 and caveolin-2 in HCC. (A & B) Immunoreactivity for caveolin-1 on smooth muscle cells of the unpaired artery (A) and sinusoidal endothelial cells (B). (C) Caveolin-2 expression in cancer cells. (D) Caveolin-2 immunoreactivity on smooth muscle cells of the unpaired artery and sinusoidal endothelial cells.

Table 1. Results of Immunohistochemical Stain for Caveolin-1 and -2 in 14 Cases of Hepatocellular Carcinoma and RT-PCR for Caveolin-1 and-2 mRNA.

Case	Caveolin-1 mRNA (T/N)	Tumor			Non tumor		
		SMC	SEC	TC	SMC	SEC	HC
1	increased	-	2+	-	focal 1+	-	-
2	increased	-	1+	-	focal 1+	-	-
3	increased	2+	-	-	1+	-	-
4	not increased	2+	-	-	2+	-	-
5	not increased	1+	-	-	1+	-	-
6	not increased	1+	-	-	1+	-	-
7	not increased	2+	1+	-	1+	-	-
8	not increased	-	-	-	focal 1+	-	-
9	not increased	2+	2+	-	focal 1+	-	-
10	not increased	1+	2+	-	2+	-	-
11	not increased	2+	1+	-	1+	-	-
12	not increased	1+	1+	-	1+	-	-
13	not increased	1+	1+	-	-	-	-
14	not increased	2+	2+	-	1+	-	-

Case	Caveolin-2 mRNA (T/N)	Tumor			Non-tumor		
		SMC	SEC	TC	SMC	SEC	HC
1	increased	2+	2+	-	1+	-	-
2	increased	-	-	3+	1+	focal 1+	-
3	increased	3+	3+	-	1+	-	-
4	increased	2+	2+	2+	1+	-	-
5	not increased	1+	1+	1+	1+	-	-
6	not increased	-	-	-	2+	-	-
7	not increased	2+	1+	2+	2+	1+	-
8	not increased	2+	1+	-	2+	-	-
9	not increased	2+	2+	-	2+	-	-
10	not increased	-	-	-	1+	-	-
11	not increased	2+	2+	1+	2+	-	-
12	not increased	2+	-	-	2+	-	-
13	not increased	2+	1+	-	2+	-	-
14	not increased	2+	2+	2+	2+	1+	-

T/N, tumor/normal; SMC, smooth muscle cells; SEC, sinusoidal endothelial cells; TC, tumor cells; HC, hepatocytes

색되었다(표 1). Caveolin-2 mRNA가 증가된 5예 중 4예에서 면역조직화학염색을 시행한 결과

caveolin-2는 간세포암종에서 신생혈관의 근육세포, 골모양혈관 내피세포, 종양세포에서 각각 3예,

Table 2. Correlation between Caveolin-1, -2 Expression and Numbers of Unpaired Artery in Hepatocellular Carcinoma

Caveolin	Smooth Muscle Cells of Blood Vessel	Number	Numbers of Unpaired Artery (Mean $\pm$ SD)	P Value
Caveolin-1	positive	26	40.0 $\pm$ 33.97	0.009
	negative	9	7.4 $\pm$ 11.44	
Caveolin-2	positive	18	53.6 $\pm$ 32.13	0.001
	negative	17	8.4 $\pm$ 9.76	

SD, standard deviation

Student t-test

Table 3. Correlation between Caveolin-1, -2 Expression and Microvessel Density (MVD) in Hepatocellular Carcinoma

Caveolin	Sinusoid Endothelial Cells	Number	MVD (Mean $\pm$ SD)	P Value
Caveolin 1	positive	20	2.7 $\pm$ 1.63	0.524
	negative	14	2.3 $\pm$ 1.47	
Caveolin -2	positive	18	2.7 $\pm$ 1.79	0.337
	negative	17	2.2 $\pm$ 1.27	

SD, standard deviation; MVD, microvessel density

Student t-test

Table 4. Correlation between Unpaired Artery and Microvessel Density (MVD) and Contrast Intensity in Hepatocellular Carcinoma

Contrast Intensity in Radiology	Number	Numbers of Unpaired Artery (Mean $\pm$ SD)	P Value
0, 1	12	24.58 $\pm$ 28.69	0.025
2	20	40.05 $\pm$ 39.25	

SD, standard deviation Mann-Whitney test

Contrast Intensity in Radiology	Number	MVD (Mean $\pm$ SD)	P Value
0, 1	12	2.60 $\pm$ 1.17	0.413
2	20	2.14 $\pm$ 1.68	

SD, standard deviation; MVD, microvessel density

Student t-test

3예, 2예가 양성이었고, 비종양 간조직에서는 혈관의 근육세포에서 약하게 염색되었다(표 1).

2. Caveolin 발현과 미세혈관밀도, 신생동맥의 수 및 영상소견과의 관계

신생동맥의 평활근세포에서의 caveolin 발현 유무와 신생동맥의 수와의 관계를 분석한 결과 caveolin-1, -2가 발현된 간세포암종에서 신생동맥의

수가 통계에서 유의하게 높았다(표 2). 간세포암종 내의 굴모양혈관 내피세포에서 caveolin-1, -2의 발현이 굴모양혈관의 모세혈관화에 관여하는지 알아보기 위하여 caveolin-1, -2의 발현과 미세혈관밀도와 비교해 본 결과 caveolin-1, -2를 발현한 간세포암종에서 미세혈관밀도가 높았으나 통계에서 유의성은 없었다(표 3). 간세포암종의 종양세포에서 각각 caveolin-1 및 -2를 발현하던 3예와 5예

Table 5. Correlation between Contrast Intensity and the Expression of Caveolin-1, -2 of the Unpaired Artery and Sinusoid Endothelial Cells in Hepatocellular Carcinoma

Number of Cases (n=32)		Contrast Intensity in Radiology		P Value
		0 & 1	2	
Unpaired artery	caveolin-1 (+)	1	10	0.023
	(-)	11	10	
	caveolin-2 (+)	2	14	0.033
	(-)	10	9	
Sinusoid endothelial cells	caveolin-1 (+)	0	2	0.516
	(-)	12	18	
	caveolin-2 (+)	1	7	0.204
	(-)	11	13	

Fisher's exact test

중에서 각각 1예만이 미세혈관밀도가 높았고, 신생동맥의 증가는 없었다. RT-PCR을 시행하였던 14예의 종양 조직에서 미세혈관밀도와 신생동맥의 수를 측정된 결과 caveolin-1 mRNA가 증가된 3예의 미세혈관밀도와 신생동맥의 수는 각각 3.44 ± 4.06 , 24.25 ± 8.06 이었고, caveolin-1 mRNA가 증가하지 않은 10예의 미세혈관밀도와 신생동맥의 수는 각각 5.25 ± 3.21 , 32.55 ± 17.38 이었다. Caveolin-2 mRNA가 증가된 4예의 미세혈관밀도와 신생동맥의 수는 각각 4.24 ± 3.58 , 32.0 ± 12.81 이었고, caveolin-2 mRNA가 증가하지 않은 9예의 미세혈관밀도와 신생동맥의 수는 각각 5.04 ± 3.47 , 29.5 ± 17.45 였다. 영상검사로 진단된 고혈관성 간세포암종이 신생동맥 형성과 관계가 있는지, 또는 미세혈관밀도와 관계가 있는지를 알아보기 위해 영상소견과 신생동맥 수와 미세혈관밀도의 관계를 분석한 결과 영상검사의 고혈관의 소견은 신생동맥 수와 유의한 관계를 보였으나 미세혈관밀도와는 무관하였다(표 4). 신생동맥과 굴모양혈관 내피세포의 caveolin의 발현과 영상소견의 혈관 분포 정도의 관계를 분석한 결과 신생동맥에서 caveolin의 발현은 영상소견의 고혈관 분포와 유의한 연관성이 있으나 굴모양혈관 내피세포에서 caveolin의

발현은 영상소견의 고혈관 분포와 연관성이 없었다(표 5). Caveolin의 발현과 간세포암종의 조직 분화도, 종양의 크기 및 종양세포의 혈관 침습은 통계에서 유의한 연관성이 발견되지 않았다.

고 찰

본 연구에서 저자들은 첫째, caveolin-1, -2는 비종양 간조직에서는 문맥역에 주로 국한되어 혈관벽과 내피세포에 약하게 발현되지만 종양 간조직에서는 굴모양혈관 내피세포와 신생동맥의 근육세포에서 강하게 발현되고, 둘째, 간세포암종의 종양세포에서는 거의 발현되지 않으며, 셋째 caveolin-1, -2의 발현은 신생동맥의 수와 통계에서 밀접한 관계를 보이나 미세혈관밀도와는 무관하였으며, 넷째 영상소견의 고혈관 간세포암종은 신생동맥의 수와 연관이 있음을 밝혔다. 이러한 연구 결과는 간세포암종 내의 caveolin-1, -2의 발현이 신생동맥의 형성에 관여하고 있음을 시사한다.

Caveolae는 처음 모세혈관의 내피세포에서 기술된 후,¹⁹ 어떻게 caveolae가 구성되고 세포에서의 기능이 무엇인가에 대한 연구가 지속되어 왔다. Caveolin은 caveolae를 구성하는 구조 단백질로 서

로 다른 분자 구조와 조직 분포에 의해 caveolin-1, -2 및 -3로 구분된다. 그 중 caveolin-1은 세포의 증식을 억제하는 기능을 가지고 있어 종양억제유전자로 간주되어 왔다.²⁰ 유방, 난소, 대장, 전립샘 및 신장암에서 caveolin-1의 유전자가 위치하고 있는 염색체 7q31.1 위치의 D7S522 유전자가 결손되어 있다는 보고들^{21, 24}과 유방, 폐 및 난소암에서 caveolin-1의 발현이 감소되어 나타난다는 보고들이¹²⁻¹⁴ 이를 뒷받침하고 있다. 그러나 이와는 반대로 전립선, 유방, 대장암 등에서 caveolin-1의 과발현이 보고되었고,^{15,16} 식도의 편평세포암종에서 caveolin-1의 과발현은 림프절 전이 및 종양의 진행도와 밀접한 관련이 있다고 보고되었다.²⁵ 종양의 종류나 진행 정도에 따라 caveolin-1 발현의 정도가 서로 다르게 보고되는 이유는 확실하지 않다. 단지 종양의 발생과 진행 과정에 있어 caveolin-1의 작용이 다른 조절인자에 의해 조절될 수 있고, 다른 조절인자들과의 균형 및 발현 정도에 의해 결정되는 복잡한 과정 때문일 가능성이 있다. 또한 암종의 종류에 따라 종양 발생의 기전과 진행의 과정이 서로 다르기 때문일 수도 있다.¹³ 종양의 발생과 진행에 있어 caveolin-1의 역할과 기전에 대해서는 향후 더욱 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 생각한다.

간세포암종에서 caveolin-1의 발현에 관한 연구는 많지 않다. Lisa 등¹⁷은 19예의 간세포암종에서 caveolin-1에 대한 면역조직화학염색을 시행하여 간세포암종 세포에서는 caveolin-1이 발현되지 않는다고 보고하였다. 그들의 보고에 의하면 caveolin-1의 발현은 간경변에 비해 형성이상결절에서 증가되고 발현 위치는 굴모양혈관 내피세포와 신생동맥이라 하였고, 비종양 간조직에 비교하여 간세포암종의 26%에서 caveolin-1이 증가되어 관찰되었다.¹⁷ 이러한 결과는 caveolin-1, -2 mRNA의 정량 분석을 위하여 실시한 역전사중합효소연쇄반응 결과와 유사하다. 또한 35예의 간세포암종에서 시행한 면역조직화학염색에서 비종양 간조직의 간세포에서는 caveolin-1이 전혀 발현되지 않고, 간세포암종에서 3예만이 종양세포에서 caveolin-1이 발현된 본

연구 결과와 유사하며 이러한 결과는 간암세포는 caveolin-1의 주 생성원이 아님을 시사한다. 그러나 최근 마우스 간세포암종 세포주들을 사용한 연구에서 전이 능력이 높은 세포주에서 caveolin-1의 발현이 높으며 RNAi를 이용하여 caveolin-1의 발현을 억제시켰을 때 림프전이와 감소하고 caveolin-1의 발현이 간세포암종의 전이도와 관련이 있음을 시사하였다.²⁶ 이러한 상이한 결과가 서로 다른 종에서 기원한 간세포암종에 기인한 것인지, 암종 발생의 분자생물학 기전에 기인한 것인지 는 앞으로의 연구에서 밝혀져야 할 것이다.

악성 종양에서 caveolin-2의 발현에 대한 연구는 매우 미약하다. 이는 초기의 연구들에서 caveolin-1이 많은 종양세포에서 발현이 감소한 것과는 달리 caveolin-2의 변화가 관찰되지 않아 많은 연구가 진행되지 못한 것으로 생각된다. 그러나 최근 연구에서 caveolin-2가 폐의 샘암종에서 과발현되고 이는 예후와 밀접한 관계가 있으며²⁷, 식도암과 방광암에서 정상 조직에 비해 과발현되고 방광암에서는 종양의 분화도와 연관성이 관찰되었다.^{28,29} 이와는 반대로 유방암에서는 caveolin-2의 발현이 정상 유방조직에 비하여 감소하고, 근상피세포에서 강하게 발현됨을 보고하였다.³⁰ 본 연구에서는 35예의 간세포암종 중 5예에서 종양세포에서 강하게 발현되었으나 양성 예가 너무 적어 환자의 임상 소견과 비교 연구하기에는 무리가 있었다. Caveolin-2의 발현을 간세포암종에서 조사한 논문은 아직까지 찾을 수 없었고, 면역조직화학염색을 통하여 폐의 혈관 내피세포, 혈관 근육세포에서의 caveolin-2의 발현³¹이 관찰되어, 본 연구에서 관찰되는 간세포암종 내에 caveolin-2의 유사한 조직 분포를 보였다. 본 연구에서 관찰된 caveolin-1과 유사한 caveolin-2의 조직 내 분포는 caveolin-1과 caveolin-2가 호모 올리고머 또는 헤테로 올리고머를 이루어 caveolae 구조를 형성한다는 것을 감안한다면 가능한 결과로 추정된다.

비종양 간조직에 비해 간세포암종에서 caveolin-1 mRNA가 증가된 3예에서 caveolin-1에 대한 면역조직화학염색 결과 간세포암종에서 염색의 강도는

비종양 간조직에 비해 큰 차이가 없었으며(표 1), caveolin-2 mRNA가 증가된 4예에서 caveolin-2에 대한 면역조직화학염색 결과 간세포암종에서 신생혈관의 근육세포, 굴모양혈관 내피세포, 종양세포에서 각각 3예, 3예, 2예가 양성이었으며, 염색의 강도도 비종양 간조직에 비해서 강했다.

종양의 형성과 성장에서 caveolin-1의 역할과 더불어 주목받고 있는 것은 caveolin-1의 혈관 형성 기능이다.^{10,11} Caveolin-1을 과발현시킨 경우 모세혈관(capillary tube) 형성이 3배 정도 증가하였으며³² 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 핵내 주입시켰을 때 모세혈관의 형성이 급격히 감소하였다.^{32,33} 이러한 연구 보고들은 caveolin이 혈관 형성에 있어 중요한 역할을 하리라는 것을 시사한다. 간세포암종에서 신생혈관 형성의 척도로 사용된 신생동맥의 수와 굴모양혈관의 모세혈관화의 정도와 caveolin의 발현과의 관계를 관찰한 본 연구에서 caveolin-1, -2의 발현이 신생동맥의 수와 통계적으로 유의한 상관관계를 보였으나, 굴모양혈관의 모세혈관화에는 영향을 주지 못하였다. 종양 내 caveolin-1의 발현과 종양 내 미세혈관 형성과의 연관관계를 조사한 연구로는 신장암에서 caveolin-1의 발현이 종양 내의 미세혈관 밀도 및 종양의 전이와 상관관계가 있다는 보고가 있으나,³⁴ 이와는 반대로 뇌의 신경교종 내의 혈관 내피세포에서는 caveolin-1의 발현이 감소한다는 상반된 보고³⁵를 찾을 수 있었다. 본 연구에서 간세포암종과 비종양 간조직을 비교했을 때 비종양 간조직의 혈관 내피세포에서 발현되는 caveolin은 간세포암종의 혈관 내피세포에서 발현되는 것보다 약하였고 범위도 주로 문맥역에 국한되어 있었으며 근육세포에서의 발현도 간세포암종 내의 발현 강도에 비해 약하였다. 이러한 caveolin의 분포와 발현의 강도가 간세포암종과 비종양 간의 caveolin의 발현의 양을 결정짓는 주요한 요소로 생각된다. 본 연구 결과는 caveolin이 신생혈관 형성을 유도한 것인지 신생혈관 형성이 간세포암종에서 증가했으므로 혈관의 내피세포와 근육세포가 증가되어 이 세포에서 발현하는 caveolin 발현이 증가한 것인지에 대한 직

접적인 증거를 제시하지 못하였으며, 이에 대한 규명을 위해서는 앞으로 간세포암종에서 신생동맥의 형성 시 caveolin의 근육세포에 대한 작용과 기능에 대한 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다. 본 연구 결과로는 간세포암종 내의 혈관 내피세포와 혈관 근육세포의 caveolin의 발현 숫자뿐만 아니라 비종양 조직에 비하여 그 발현 강도도 증가된 것을 감안하면, 본 연구에서 관찰된 간세포암종 내의 신생동맥의 근육세포에서 caveolin의 강한 발현은 간세포암종의 진행 중 새로운 동맥을 형성하는데 caveolin이 혈관 근육세포에서 중요한 역할을 할 것을 시사한다. 이러한 가정은 caveolin-1이 혈관의 압력 등에 반응하여 혈관의 근육세포의 증식에 관여하거나,³⁷ 혈관 근육세포의 미세관의 중합 반응을 조절하고,³⁸ 분화된 혈관 근육세포의 수축을 조절하며,⁶ 백서의 동맥 근육세포의 표현형(수축에서 합성 근육세포로)의 변화에 따라 caveolin의 발현이 변화한다는³⁶ 연구결과에 의해 뒷받침된다. 간세포암종의 종양세포에서 caveolin-1 및 -2를 발현하던 3예와 5예 중 각각 1예씩만 미세혈관 밀도가 평균보다 높았고, 신생동맥의 증가는 없었다. 이 경우들에서 혈관 근육세포와 굴모양혈관의 내피세포에서는 caveolin -1 및 -2가 발현되지 않았다. 반면 미세혈관밀도가 높았던 예들은 종양세포보다는 혈관 근육세포 또는 굴모양혈관의 내피세포에서 caveolin-1 및 -2의 발현을 보였고 이런 결과는 종양세포보다는 혈관 근육세포 또는 굴모양혈관의 내피세포에서의 caveolin-1 및 -2 발현이 혈관신생 작용에 중요함을 시사한다. RT-PCR을 시행하였던 14예의 종양 조직에서 미세혈관밀도와 신생동맥의 수를 측정된 결과 caveolin-1, -2 mRNA가 증가된 예들의 미세혈관밀도와 신생동맥의 수는 mRNA가 증가하지 않은 예들과 비교해서 차이가 없었다. 이처럼 caveolin-1, -2의 mRNA의 발현과 면역조직화학염색에서 caveolin-1, -2의 단백질 발현이 완전 일치를 보이지 않는 것은 면역조직화학염색에 사용된 조직과 RT-PCR을 위해 채취된 조직과의 불일치에 기인한 것으로 생각된다. 조직에서 간세포암종의 혈관신생은 담관을 동반

하지 않는 신생동맥과 굴모양혈관의 모세혈관화 정도를 관찰함으로써 혈관형성의 정도를 판정한다.²⁻⁴ 영상소견의 고혈관성 간세포암종은 컴퓨터 단층촬영의 동맥기에 주변 간실질에 비해 명확히 고밀도 음영을 보이는 종양을 말한다. 그러나 고혈관성 간세포암종이 영상소견에서 고혈관성으로 보이는 이유가 신생동맥의 수를 반영하는 것인지 아니면 굴모양의 모세혈관화 때문인지는 잘 알려져 있지 않다. 이에 고혈관성 간세포암종과 신생동맥 수 및 미세혈관밀도와의 관계를 분석한 결과 영상 검사에서 고혈관성 간세포암종의 소견은 신생동맥 수와 유의한 관계를 보였으나 미세혈관밀도와는 무관하였다. 이런 결과는 최근 컴퓨터단층촬영을 통한 연구에서 동맥기에서 조영증강의 정도는 굴모양혈관의 모세혈관화와는 관련이 없고 간세포암종의 신생동맥의 수와 연관성이 있다는 Kim 등³⁹의 결과와도 일치하는 결과이다.

결론으로 본 연구는 간세포암종에서 종양의 신생동맥의 형성은 caveolin-1, -2의 발현에 의해 조절될 수 있음을 보여 준다. 또한 caveolin-1, -2의 발현은 종양 내의 혈관 내피세포, 혈관 근육세포에서 발현되며 특히 일부의 간세포암종 세포에서도 유리될 수 있음을 시사한다.

요 약

목적: 세포 원형질막에는 플라스크 모양의 caveolae가 존재하여 세포의 신호전달과정 등에 중요한 역할을 담당하고 있는데, 악성 종양에서 caveolae의 구성 성분인 caveolin-1 및 -2의 역할에 대한 연구가 증가하고 있다. 본 연구에서는 간세포암종 조직에서 caveolin-1, -2의 발현과 간세포암종 내의 신생동맥(unpaired artery)과 미세혈관밀도(microvessel density)의 관계를 연구하였다. **대상과 방법:** 35명의 간세포암종 환자의 파라핀 포매 조직에 caveolin-1, -2, alpha smooth muscle actin 및 CD34 항체를 이용하여 면역조직화학염색을 시행하였다. 또한 간세포암종 조직의 caveolin-1, -2 mRNA 발현 양은 RT-PCR을 이용하여 확인

하였다. 영상소견의 고혈관성 간세포암종과 조직의 신생동맥 수와 미세혈관밀도의 관계를 분석하였다. **결과:** 간세포암종 조직에서 caveolin-1, -2의 발현은 주로 굴모양혈관 내피세포와 신생동맥의 평활근세포와 혈관 내피세포에서 강하게 발현되었다. 간세포암종 조직에서 caveolin-1, -2는 굴모양혈관 내피세포에서 각각 57.1% (20/35), 51.4% (18/35) 양성 반응을 보였고, 간세포암종 내의 신생동맥에의 평활근세포에서 caveolin-1은 74.3% (26/35), caveolin-2는 51.4% (18/35)가 발현되었다. 반면에 간세포암종 종양세포에 발현된 것은 caveolin-1, -2는 각각 8.6%와 14.3%였다. Caveolin-1, -2 mRNA의 발현은 주변 비종양 간 조직에 비해 간세포암종에서 26.7% (4/15), 33.3% (5/15) 증가되었다. Caveolin-1, -2의 발현은 신생동맥의 증가와 통계에서 의미 있게 관련이 있었으나, 미세혈관 밀도는 관련이 없었다. 영상소견의 고혈관성 간세포암종은 신생동맥의 수와 연관되었으며 미세혈관밀도와는 무관하였다. **결론:** 본 연구 결과는 간세포암종에서의 caveolin-1, -2의 발현은 간세포암종의 신생동맥 형성에 관여할 가능성을 제시한다.

색인단어: 간세포암종, 카베올린, 혈관신생, 영상소견

참고문헌

1. Himeno H, Enzan H, Saibara T, Onishi S, Yamamoto Y. Hitherto unrecognized arterioles within hepatocellular carcinoma. J Pathol 1994;174:217-222.
2. Matsui O, Kadota M, Kameyama T, Yoshikawa J, Takashima T, Nakanuma Y, et al. Benign and malignant nodules in cirrhotic livers: distinction based on blood supply. Radiology 1991;178:493-497.
3. Nakamura S, Muro H, Suzuki S, Sakaguchi T, Konno H, Baba S, Syed AS. Immunohistochemical studies on endothelial cell phenotype in hepatocellular carcinoma. Hepatology 1997;26:407-415.
4. Park YN, Yang CP, Fernandez GJ, Cubukcu O, Thung SN, Theise ND. Neoangiogenesis and sinusoidal "capillarization" in dysplastic nodules of the liver. Am J Surg Pathol 1998;22:656-662.
5. Liu P, Rudick M, Anderson RG. Multiple functions of

- caveolin-1. *J Biol Chem* 2002;277:41295-41298.
6. Je HD, Gallant C, Leavis PC, Morgan KG. Caveolin-1 regulates contractility in differentiated vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286:H91-H98.
7. Frank PG, Woodman SE, Park DS, Lisanti MP. Caveolin, caveolae, and endothelial cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1161-1168.
8. Minshall RD, Sessa WC, Stan RV, Anderson RG, Malik AB. Caveolin regulation of endothelial function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;285:L1179-L1183.
9. Peterson TE, Guicciardi ME, Gulati R, Kleppe LS, Mueske CS, Mookadam M, et al. Caveolin-1 can regulate vascular smooth muscle cell fate by switching platelet-derived growth factor signaling from a proliferative to an apoptotic pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1521-1527.
10. Liu J, Razani B, Tang S, Terman BI, Ware JA, Lisanti MP. Angiogenesis activators and inhibitors differentially regulate caveolin-1 expression and caveolae formation in vascular endothelial cells. Angiogenesis inhibitors block vascular endothelial growth factor-induced down-regulation of caveolin-1. *J Biol Chem* 1999;274:15781-15785.
11. Liu J, Wang XB, Park DS, Lisanti MP. Caveolin-1 expression enhances endothelial capillary tubule formation. *J Biol Chem* 2002;277:10661-10668.
12. Hayashi K, Matsuda S, Machida K, Yamamoto T, Fukuda Y, Nimura Y, et al. Invasion activating caveolin-1 mutation in human scirrhous breast cancers. *Cancer Res* 2001;61:2361-2364.
13. Kato T, Miyamoto M, Kato K, Cho Y, Itoh T, Morikawa T, et al. Difference of caveolin-1 expression pattern in human lung neoplastic tissue. Atypical adenomatous hyperplasia, adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Cancer Lett* 2004;214:121-128.
14. Wiechen K, Diatchenko L, Agoulnik A, Scharff KM, Schober H, Arlt K, et al. Caveolin-1 is down-regulated in human ovarian carcinoma and acts as a candidate tumor suppressor gene. *Am J Pathol* 2001;159:1635-1643.
15. Yang G, Truong LD, Timme TL, Ren C, Wheeler TM, Park SH, et al. Elevated expression of caveolin is associated with prostate and breast cancer. *Clin Cancer Res* 1998;4:1873-1880.
16. Fine SW, Lisanti MP, Galbiati F, Li M. Elevated expression of caveolin-1 in adenocarcinoma of the colon. *Am J Clin Pathol* 2001;115:719-724.
17. Yerian LM, Anders RA, Tretiakova M, Hart J. Caveolin and thrombospondin expression during hepatocellular carcinogenesis. *Am J Surg Pathol* 2004;28:357-364.
18. Moon WS, Rhyu KH, Kang MJ, Lee DG, Yu HC, Yeum JH, et al. Overexpression of VEGF and angiopoietin 2: a key to high vascularity of hepatocellular carcinoma? *Mod Pathol* 2003;16:552-557.
19. Palade GE. Fine structure of blood capillaries. *J Appl Physiol* 1953;24:1424.
20. Razani B, Schlegel A, Liu J, Lisanti MP. Caveolin-1, a putative tumour suppressor gene. *Biochem Soc Trans* 2001;29:494-499.
21. Zenklusen JC, Bieche I, Lidereau R, Conti CJ. (C-A)n microsatellite repeat D7S522 is the most commonly deleted region in human primary breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:12155-12158.
22. Zenklusen JC, Thompson JC, Klein-Szanto AJ, Conti CJ. Frequent loss of heterozygosity in human primary squamous cell and colon carcinomas at 7q31.1: evidence for a broad range tumor suppressor gene. *Cancer Res* 1995;55:1347-1350.
23. Kerr J, Leary JA, Hurst T, Shih YC, Antalis TM, Friedlander M, et al. Allelic loss on chromosome 7q in ovarian adenocarcinomas: two critical regions and a rearrangement of the PLANH1 locus. *Oncogene* 1996;13:1815-1818.
24. Jenkins RB, Qian J, Lee HK, Huang H, Hirasawa K, Bostwick DG, et al. A molecular cytogenetic analysis of 7q31 in prostate cancer. *Cancer Res* 1998;58:759-766.
25. Kato K, Hida Y, Miyamoto M, Hashida H, Shinohara T, Itoh T, et al. Overexpression of caveolin-1 in esophageal squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis and pathologic stage. *Cancer* 2002;94:929-933.
26. Zhou H, Jia L, Wang S, Wang H, Chu H, Hu Y, et al. Divergent expression and roles for caveolin-1 in mouse hepatocarcinoma cell lines with varying invasive ability. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;345:486-494.
27. Wikman H, Seppänen JK, Sarhadi VK, Kettunen E, Salmenkivi K, Kuosma E, et al. Caveolins as tumour markers in lung cancer detected by combined use of cDNA and tissue microarrays. *J Pathol* 2004;203:584-593.
28. Fong A, Garcia E, Gwynn L, Lisanti MP, Fazzari MJ, Li M. Expression of caveolin-1 and caveolin-2 in urothelial carcinoma of the urinary bladder correlates with tumor grade and squamous differentiation. *Am J Clin Pathol* 2003;120:93-100.
29. Hu YC, Lam KY, Law S, Wong J, Srivastava G. Profiling of differentially expressed cancer-related genes in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) using human cancer cDNA arrays: overexpression of oncogene MET correlates with tumor differentiation in ESCC. *Clin Cancer Res* 2001;7:3519-3525.
30. Sagara Y, Mimori K, Yoshinaga K, Tanaka F, Nishida K, Ohno S, et al. Clinical significance of Caveolin-1, Caveolin-2 and HER2/neu mRNA expression in human breast cancer. *Br J Cancer* 2004;91:959-965.
31. Achcar RO, Demura Y, Rai PR, Taraseviciene-Stewart L, Kasper M, Voelkel NF, Cool CD. Loss of caveolin and heme oxygenase expression in severe pulmonary hypertension. *Chest* 2006;129:696-705.
32. Griffoni C, Spisni E, Santi S, Riccio M, Guarnieri T, Tomasi V. Knockdown of caveolin-1 by antisense oligonucleotides impairs angiogenesis in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;276:756-761.
33. Joo HJ, Oh DK, Kim YS, Lee KB, Kim SJ. Increased expression of caveolin 1 and microvessel density correlates with metastasis and poor prognosis in clear cell

- renal cell carcinoma. *BJU Int* 2004;93:291-296.
34. Regina A, Jodoin J, Khoeir P, Rolland Y, Berthelet F, Moudjian R, et al. Down-regulation of caveolin-1 in glioma vasculature: modulation by radiotherapy. *J Neurosci Res* 2004;75:291-299.
35. Thyberg J, Roy J, Tran PK, Blomgren K, Dumitrescu A, Hedin U. Expression of caveolae on the surface of rat arterial smooth muscle cells is dependent on the phenotypic state of the cells. *Lab Invest* 1997;77:93-101.
36. Sedding DG, Braun-Dullaeus RC. Caveolin-1: dual role for proliferation of vascular smooth muscle cells. *Trends Cardiovasc Med* 2006;16:50-55.
37. Kawabe J, Okumura S, Nathanson MA, Hasebe N, Ishikawa Y. Caveolin regulates microtubule polymerization in the vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;342:164-169.
38. Kim CK, Lim JH, Park CK, Choi D, Lim JIK, Lee WJ. Neoangiogenesis and sinusoidal capillarization in hepatocellular carcinoma: correlation between dynamic CT and density of tumor microvessels. *Radiology* 2005;237:529-534.