

# Cyclooxygenase-2 억제제의 N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine 유도 백서 방광암의 유전자 발현에의 영향

## The Effect of Cyclooxygenase-2 Inhibitor on the Gene Expression Profile of N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine-induced Rat Urinary Bladder Cancer

Soo Mee Kwon, Hea Young Oh, Eun Jin Lee, Sun-Il Kim<sup>1</sup>, Sung Joon Hong

From the Department of Urology, and the Urological Science Institute, Brain Korea 21 Project for Medical Science, Yonsei University College of Medicine, <sup>1</sup>Department of Urology, Hanyang University College of Medicine, Seoul, Korea

**Purpose:** Cyclooxygenase (COX)-2 plays an important role in promoting cancer cell proliferation and angiogenesis in human bladder cancer. In this study, we investigated the antitumor or antiangiogenic effects of selective COX-2 inhibitor on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (BBN)-induced rat bladder tumorigenesis.

**Materials and Methods:** Forty male Fischer 344 rats (control) were given only 0.05% BBN, while 40 rats (experimental) were administered 1,500mg/kg celecoxib once daily and this treatment started from 1 week before their BBN treatment. Ten rats from the control groups and the experimental groups were then sacrificed at 4, 12, 16 and 24 weeks after BBN treatment. We observed all the bladders macroscopically as well as microscopically, and we measured the COX-2 expression in the bladder tissues. Utilizing a cDNA microarray, we analyzed the significant differences of gene expression between the 12 week-control group and the 12 week-experimental group.

**Results:** The incidence of tumor was lower in the experimental group than in the control group from week 12 to week 24. The COX-2 expressions were more significantly decreased via the BBN induction ( $p < 0.05$ ) in the experimental groups than in the control groups after 4 weeks. For the 12 week-experimental group, there were 15 genes altered by the administration of selective COX-2 inhibitor, and the selective COX-2 inhibitor especially regulated transgelin, membrane metallo endopeptidase and apolipoprotein E of these 15 genes to prevent the incidence of bladder tumor.

**Conclusions:** Selective COX-2 inhibitor has an inhibitory effect on BBN-induced rat bladder tumorigenesis. In the pre-neoplastic phase, selective COX-2 inhibitor regulates transgelin, membrane metallo endopeptidase and apolipoprotein E to prevent the incidence of bladder tumor. (**Korean J Urol** 2006;47:310-315)

**Key Words:** Butylhydroxybutylnitrosamine, Bladder cancer, Angiogenic factor, cDNA microarray, Rats

대한비뇨기과학회지  
제 47 권 제 3 호 2006

연세대학교 의과대학  
비뇨기과학교실, 남성의학연구소,  
BK21 의과학단, <sup>1</sup>한양대학교  
의과대학 비뇨기과학교실

권수미 · 오혜영 · 이은진  
김선일<sup>1</sup> · 홍성준

접수일자 : 2005년 6월 27일  
채택일자 : 2005년 9월 5일

교신저자: 홍성준  
세브란스병원 비뇨기과  
서울특별시 서대문구 신촌동  
134  
☎ 120-752  
TEL: 02-2228-2315  
FAX: 02-312-2538  
E-mail: sjhong346@yumc.  
yonsei.ac.kr

### 서 론

Cyclooxygenase (COX)-2는 정상적인 인체 세포에서 발현

되지 않고 염증반응이나 암유전자 (oncogene), 사이토카인 (cytokine) 등에 의해 그 발현이 유도되는 효소로서 여러 질병과 관련되어 연구되고 있다.<sup>1,2</sup> 특히 COX-2와 대장암과의 관련성이 보고되면서 암 예방 및 치료 대상으로 COX-2를

주목하게 되었고<sup>3,4</sup> 이후 다른 암에서도 대장암과 같은 COX-2와 암 발생 및 진행과의 관련성이 연구되었다.<sup>1,3</sup> 이때 COX-2는 주로 암의 발생, 촉진 및 전이의 발암과정에서 과발현되고<sup>1</sup> 암세포에 의한 혈관신생과정, 세포고사 등의 기전에 관여한다.<sup>1,2,4</sup> 한편 방광암의 여러 단계 발암과정에서도 COX-2 과발현이 연구되었고,<sup>5,8</sup> 최근에는 COX-2와 방광암의 혈관신생과정과의 관련성이 보고되었다.<sup>9</sup> 따라서 COX-2 억제제는 방광암 발생 억제에도 중요하게 인식되고 있다.

최근 cDNA microarray법의 상용화로 대량적인 유전자 발현 연구가 가능하게 됨에 따라 인체 방광암을 대상으로 한 여러 cDNA microarray 결과도 발표되고 있다.<sup>10,11</sup> 이와 더불어 BBN유도 백서 방광암 모델을 대상으로 유전자 발현양상도 발표되었다.<sup>12</sup> 이 연구는 종양의 대사기전 관련 588개의 유전자들로 구성된 cDNA 칩을 사용하였고, 형태학적으로 저등급과 고등급 방광 이행상피암이 우세하고 침윤암이 관찰된 30주 BBN유도 백서 방광암의 점막상피세포를 대상으로 microarray를 시행하였다. 여기서 23개의 의미있게 과발현된 유전자와 7개의 저발현된 유전자가 관찰되었고 이 유전자 중 proliferating cell nuclear antigen (PCNA), glutathione-S-transferase (GST)의 subunits, clusterin, NF-kappa-B (NF  $\kappa$  B) transcription factor와 plakoglobin은 이미 인체 방광암과 관련된 유전자로서 그 역할이 밝혀져 있다. 본 연구의 예비 실험에서도 24주 BBN유도 백서 방광암 분석에서 GST의 subunits, NF  $\kappa$ B의 유전자 변화가 관찰된 바 있다(발표되지 않은 자료임).

본 연구에서는 이러한 발암과정에서의 유전자 발현 변화에 COX-2 선택적 억제제가 어떠한 영향을 미치는지 살펴보고자 하였다. COX-2 선택적 억제제는 기존의 cyclooxygenases 억제제인 비스테로이드성 소염제 (nonsteroidal anti-inflammatory drugs; NSAIDs)의 부작용이 거의 없는 효과적인 암 예방 및 치료제로 대두되고 있다.<sup>4</sup> 특히 본 연구는 방광암의 초기 발암 단계에 초점을 맞추어 COX-2 선택적 억제제의 유전자 발현에의 영향을 연구하고자 하였다. 초기 발암 단계를 연구할 수 있는 BBN유도 백서 방광암 모델은 이미 인체 방광 이행상피암과 형태학적, 생물학적, 분자수준에서 유사한 진행을 보여주는 것으로 알려져 있어 임상연구의 대체 모델로서 가치가 있음이 증명된 바 있다.<sup>12-15</sup>

본 연구팀은 이전 연구에서 BBN 유도 4주부터 24주까지 4단계로 나누어 병리학적 소견, COX-2 발현측면에서 COX-2 선택적 억제제의 효과를 관찰한 결과, COX-2 선택적 억제제가 방광암의 발암과정을 지연시키는 효과를 발표한 바 있다.<sup>16</sup> 이 결과를 근거로 초기 발암 단계 방광병변에서 5,000여 개 cDNA 칩을 대상으로 COX-2 선택적 억제제

에 의해 조절되는 유전자를 밝히고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 실험동물

7주령 (200g)의 수컷 Fischer 344 백서 (n=30, SLC Inc., Shizuoka, Japan)를 구입하여 0.05% BBN (Tokyo Kasei Kogyo, Tokyo, Japan)만을 투여한 군 (대조군, n=10), 0.05% BBN 투여와 함께 1,500mg/kg celecoxib (Pharmacia Searle & Co., San Juan, Puerto Rico)로 억제제를 시도한 군 (실험군, n=10), 정상 방광을 지닌 군 (정상 방광군, n=10)으로 나누었다. BBN은 0.01% tween 80에 용해시켜 음용수에 혼합하여 자유롭게 섭취토록 하였으며 celecoxib는 이전 연구<sup>11</sup>에서 사용된 1,500mg/kg 농도를 1% methylcellulose로 부유시킨 후 straight dosing needle을 사용하여 BBN 투여 1주 전부터 매일 1회 경구투여하였다. 모든 사육 백서는 음용수를 자유롭게 섭취토록 하였다. 상기의 모든 실험과정은 연세대학교 의과대학 실험동물 이용규정에 근거하여 수행되었다.

### 2. cDNA microarray를 이용한 유전자 발현 분석

1) Total RNA 추출 및 fluorescent labeled cDNA 제조: 이전 연구에서<sup>16</sup> 초기 방광암 발암단계를 보여주고 COX-2 선택적 억제제에 의한 발암과정 지연효과가 최초로 나타나는 12주 대조군과 12주 실험군의 방광에서 total RNA를 추출하였다. 이때 각 군 10마리의 방광 중 동일한 조직학적 양상을 보인 방광을 선택하여 Trizol reagent (Invitrogen life technologies, Carlsbad, USA)로 total RNA를 추출하였다. 추출된 total RNA는 동일한 양으로 혼합되어 12주 대조군과 12주 실험군 각각 50  $\mu$ g total RNA로 만들어졌다. 이후 이들은 각각 붉은색 형광염료인 cyanine 5 (Cy5, NEN Life Science Products, Boston, USA)로 표지되었다. 한편 reference total RNA는 3마리의 Fischer 344 백서의 10개 조직 (뇌, 방광, 췌장, 신장, 비장, 피부, 대장, 소장, 심장, 폐)으로부터 각각 추출된 total RNA를 동량으로 혼합하여 50  $\mu$ g total RNA를 만들었고 이후 연두색 형광염료인 cyanine 3 (Cy3, NEN Life Science Products, Boston, USA)으로 표지되었다. 이와 같이 준비된 total RNA는 역전사과정을 거쳐 cDNA로 제조되었으며 이 과정에서 Cy3-dUTP (reference)와 Cy5-dUTP (12주 대조군 또는 12주 실험군)가 혼입되었다.<sup>17-19</sup> 이렇게 제조된 각각의 cyanine으로 표지된 cDNA 생성물은 정제되어 microarray hybridization을 위하여 hybridization blockers와 함께 혼합된 후 최종 농도로 농축되었다.<sup>17-19</sup>

2) Microarray hybridization 및 자료분석: 염기서열이 알려진 유전자와 expressed sequence tags (EST)를 포함한 5,000

Table 1. Primer sequences and the PCR conditions

Genes		Primer sequences	bp	PCR condition
Transgelin	Sense	5'-GTGGATTGTAATGCAGTGTG-3'	605	35 cycles 94°C, 5min 55°C, 1min 72°C, 1min
	Antisense	5'-GTGATACCTCAAAGCTGTCC-3'		
Apo-E	Sense	5'-CCAGGGCAAAGCGACCAACC-3'	613	35 cycles 94°C, 5min 60°C, 1min 72°C, 1min
	Antisense	5'-GGTTGCCCACTTCTCCAGC-3'		
Mme	Sense	5'-TTCTGTGCTCGTCTTGCTCC-3'	221	35 cycles 94°C, 5min 58°C, 1min 72°C, 1min
	Antisense	5'-CTGTATCGGGAAGTGGTCTC-3'		
$\beta$ -actin	Sense	5'-TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3'	350	35 cycles 94°C, 5min 55°C, 1min 72°C, 1min
	Antisense	5'-TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCC-3'		

PCR: polymerase chain reaction, bp: base pair, Apo-E: apolipoprotein E, Mme: membrane metallo endopeptidase

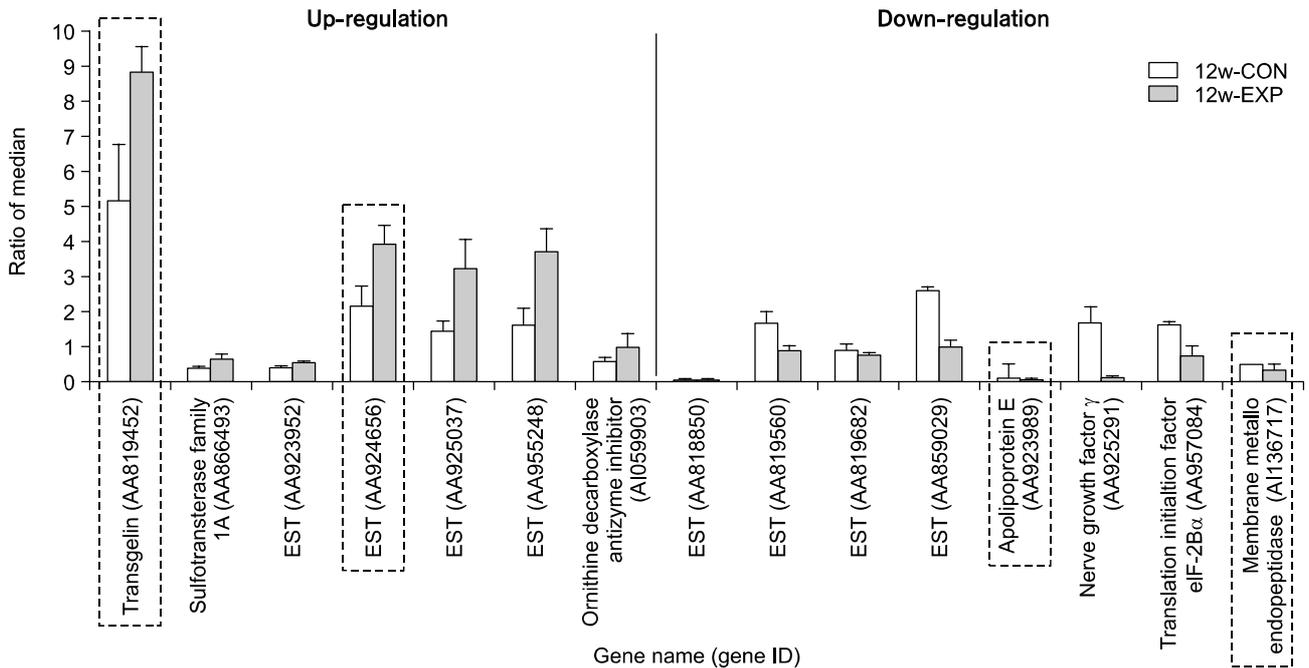
여 개의 백서 cDNA clones들이 접착된 rat cDNA chips (RSVC v1.0, GenomicTree Inc, 대전, 한국)을 구입하여 이전 연구<sup>17-19</sup>와 같이 pre-hybridization과 hybridization을 실시하였다. 그리고 hybridization의 발현변화의 타당성 검증을 위하여 Cy5와 Cy3를 바꾸어 표지한 다음 hybridization 실험을 실시하였고 시행된 모든 microarray hybridization을 3회 반복하였다. Microarray의 형광이미지는 GenePix 4000B scanner (Axon Instruments, Foster, USA)로 얻었고, 얻어진 자료들은 먼저 fold change를 보인 유전자들과 microarray hybridization의 배경잡음과 구별되는 평균 강도를 가진 유전자들만을 포함하도록 걸러졌다. 그 후 12주 대조군과 12주 실험군 간의 유전자 발현 차이는 significance of microarray (SAM)으로 분석되었다.

**3) Reverse transcriptase-polymerase chain reaction:** 12주 대조군과 12주 실험군의 방광조직에서 cDNA microarray 결과로 얻어진 유전자 발현 변화를 reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)로 검증하기 위해 앞서 12주 대조군과 12주 실험군의 각각의 방광조직에서 추출된 total RNA 1  $\mu$ g을 15unit/ $\mu$ g avian myeloblastosis virus (AMV) reverse transcriptase와 0.025  $\mu$ g/ $\mu$ l random primer (Reverse transcription system, A3500, Promega Co, Madison, USA)를 사용하여 단일가닥의 cDNA로 제조하였다.<sup>20</sup> 이때 역전사 반응액으로 10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50mM KCl, 0.1% Triton X-100, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM deoxyribonucleoside triphosphates

(dNTPs) 혼합액을 사용하였다. 역전사는 Thermal cycler (Perkin Elmer geneAMP PCR system 9600, Applied biosystems, Foster, USA)으로 42°C 60분, 99°C 5분, 4°C 5분 조건에서 이루어졌다. 이 후 Taq PCR master mix kit (Qiagen, Cat. No. 201443, Valencia, USA)로 얻어진 역전사 생성물 2  $\mu$ l를 넣어 제조사의 지시에 따라 PCR을 수행하였다. 이 때 50  $\mu$ l PCR 반응액은 Taq PCR master mix 25  $\mu$ l, 증류수 21  $\mu$ l와 각각의 0.4  $\mu$ M sense와 antisense primer를 포함하였다. PCR에 이용한 transgelin (NM\_031549), apolipoprotein E (NM\_138828), membrane metallo endopeptidase (NM\_012608)와  $\beta$ -actin의 primer 염기서열 및 반응조건은 Table 1과 같다. 음성 대조군으로 cDNA 대신 diethyl pyrocarbonate (DEPC)로 처리한 증류수를 동량 사용하였다. 증폭된 PCR 생성물은 2% agarose gel에서 전기영동을 하였고 이것을 ethidium bromide (EtBr)로 염색하였다. 상대적 발현정도는 TINA 2.10e program (Raytest sotopenmessgeraete GmbH, 1993, Pforzheim, Germany)으로 측정하였다.

## 결 과

BBN 유도 백서 방광암 발암과정 초기 발암단계에서의 COX-2 선택적 억제제 효과를 cDNA microarray에 의해 측정하였다. 이때 초기 발암단계는 조직학적으로 전암병변이 우세하며 최초로 분열기 세포가 관찰되는 12주 대조군과



**Fig. 1.** Altered genes by administering selective COX-2 inhibitor. Fifteen genes are differentially expressed by administering selective COX-2 inhibitor. The ratio of the median, mean and log of Cy5/Cy3. EST and transgelin are up-regulated by the selective COX-2 inhibitor on the results of triplicate experiments, and mme and Apo-E are down-regulated. COX-2: cyclooxygenase-2, mme: membrane metallo endopeptidase, Apo-E: apolipoprotein-E.

12주 실험군의 방광으로 정의하였다.<sup>16</sup> Fig. 1은 microarray hybridization 후 얻은 유전자의 이미지 강도를 ratio of median 값으로 표시한 그래프로, 12주 대조군과 12주 실험군을 SAM 분석한 결과 의미있는 변화를 보인 15개 유전자들에 대한 ratio of median 값을 나타냈다.

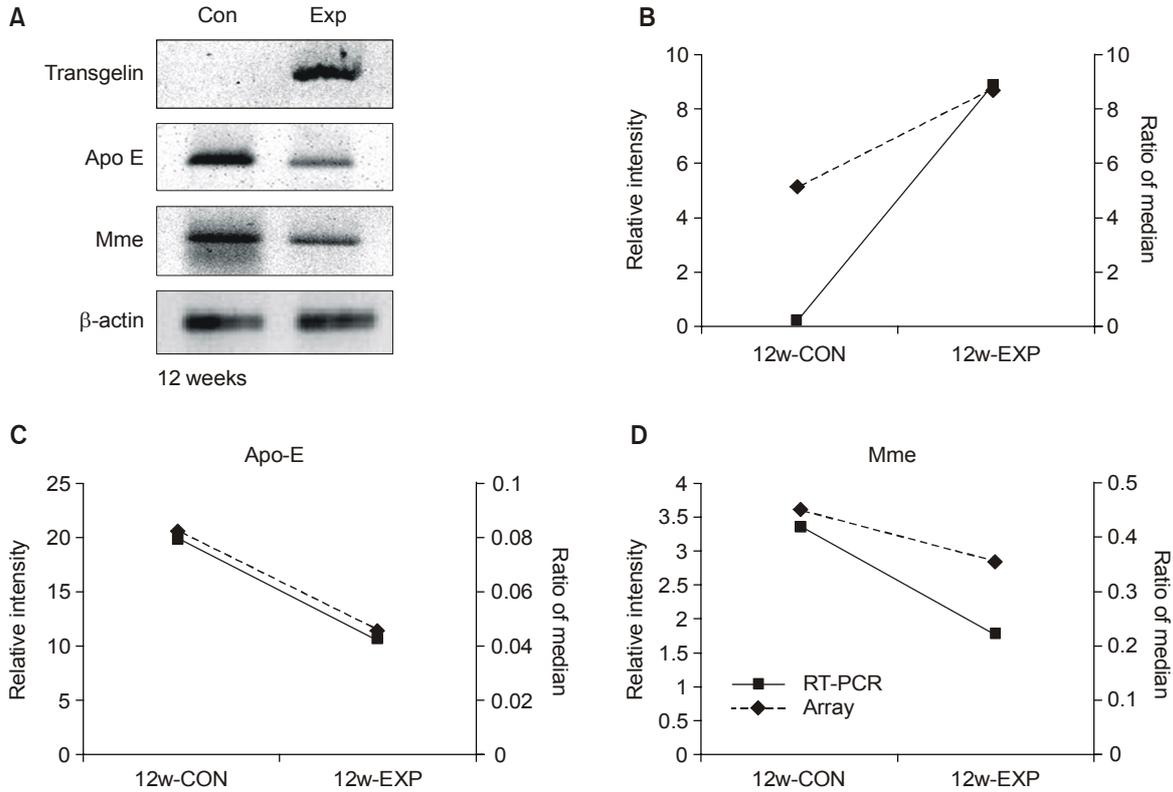
특히 EST, transgelin, Apo-E, mme 유전자는 3회 반복된 실험에서 fold change가 2.0 이상 0.5 이하의 범위에 ratio of median 값을 가지며 상향 또는 하향조절된 유전자들이다 (Fig. 1). 이 실험에 대한 타당성을 그 역할이 알려져 있지 않은 EST를 제외하고 RT-PCR로 검증한 결과 (Fig. 2), transgelin, Apo-E, mme 유전자는 microarray와 동일한 발현 양상을 보였다.

### 고찰

초기 방광암 발암 단계인 12주 실험군에서 COX-2 선택적 억제제는 15개의 유전자에 영향을 주었고 그중 암 억제 방향으로 조절되는 transgelin, membrane metallo endopeptidase (mme), apolipoprotein E (Apo-E)를 확인하였다. 방광암 발암과정의 억제에 이들 유전자와 COX-2 발현이 어떠한 상호작용으로 관여하는지는 밝혀진 바 없다.

그러나 본 연구에서 COX-2 선택적 억제제의 유전자 수

준에서의 억제 효과는 육안적 및 현미경적으로 변화가 미세하여 관찰이 어려운 초기 발암 단계의 방광 (12주 대조군과 12주 실험군)을 대상으로 하여 얻은 결과로서 의의가 있다. COX-2 선택적 억제제에 의해 상향 조절된 유전자 7개와 하향 조절된 유전자 8개가 모두 발암과정에 영향을 미치고 있으나 특히 transgelin, mme, Apo-E가 이전 연구에서도 여러 암과 관련하여 연구된 바 있다. cDNA microarray결과와 더불어 RT-PCR로 12주 대조군과 실험군 방광에 발현을 검증한 바 COX-2 선택적 억제제에 의해 방광암의 발암과정 억제 방향으로 조절됨이 확인되었다 (Fig. 1, 2). 이때 COX-2 선택적 억제제는 종양관련 유전자 중 transgelin 발현을 증가시켰고 mme와 Apo-E는 그 발현을 감소시켰다. 이것은 BBN 유도 백서 방광암 모델에서 COX-2 선택적 억제제가 초기 발암 단계에 유전자 발현의 변화를 유도하며 이들 15개 유전자들을 암을 억제시키는 방향으로 조절시키는 것으로 추정되었다. 그러나 일부 transgelin, mme, Apo-E만이 암 억제와 관련된 연구 결과가 나타나 있고 다른 유전자들의 암 억제와 관련한 역할은 거의 알려져 있지 않다. 이미 알려진 transgelin,<sup>21</sup> mme,<sup>22,23</sup> Apo-E<sup>24</sup>의 주된 역할은 암 유전자로의 기능이며, actin-gelling 단백질인 transgelin은 BBN 유도 방광암의 초기 발암과정에서 COX-2 선택적 억제제에 의해 그 발현이 증가되었고 이는 인체 유방암과 대장암 세



**Fig. 2.** The transgelin, Apo-E and mme expressions by cDNA microarray and RT-PCR. In week 12, the transgelin, Apo-E and mme expressions of the bladder tissues on cDNA microarray are similar to results obtained on RT-PCR. (A) Electrophoresis on 2% agarose gel after RT-PCR. (B, C, D) Comparison between the cDNA microarray and RT-PCR for the transgelin, Apo-E and mme expression. The relative intensity is the ratio of each gene's intensity to the  $\beta$ -actin intensity. RT-PCR: reverse transcriptase-polymerase chain reaction, Apo-E: apolipoprotein E, Mme: membrane metallo endopeptidase.

포주와 환자 종양조직에서 암의 진행에 따라 발현이 억제되는 결과와 상응한다. 또한 인체 자궁내막암, 비소세포폐암의 프로테오믹스 연구 결과도 종양조직에서 transgelin 발현이 억제됨을 발표한 바 있다.<sup>25,26</sup> Mme와 Apo-E는 암의 진행에 따라 발현이 증가하는 유전자로 본 연구에서는 COX-2 선택적 억제제에 의해 그 발현이 감소되었다. Mme는 CD10 이라고 명명되기도 하며 현재 급성림프구성백혈병의 일반적인 항원으로 밝혀져 있고 이는 B cell 분화 초기의 표지자이다.<sup>27</sup> 1994년에는 이미 초기 방광암의 예후인자로서 연구되었으나,<sup>22</sup> 현재 구체적인 작용기전이 밝혀져 있지 않다. Apo-E는 콜레스테롤 역운반에 관련하는 단백질로서 macrophage에서 발현된다.<sup>28</sup> 특히 최근에는 방광암의 증식 조절에 역할을 하는 TERE1 유전자/단백질과 Apo-E가 상호 작용하는 것이 발표되었다.<sup>29</sup> 여기서 Apo-E는 정상 방광과 다양한 이행상피 방광암에서 모두 발현되었고 정상방광과 비교되었을 때 근육 침윤 이행상피 방광암에서는 유의적으로 발현이 감소하였다. 이와 같이 방광암에서의 transgelin, mme, Apo-E의 역할이 밝혀져 있지 않으므로 추후 transgelin, mme,

Apo-E가 COX-2 발현과 암 억제에 어떠한 역할을 하는지 구체적으로 연구되어야 할 것이다.

요약하면 BBN 유도 백서 방광암 발암과정에서 COX-2 선택적 억제제는 초기 발암 단계가 우세한 12주 실험군에서 방광암 발암을 억제시키는 방향으로 transgelin, mme, Apo-E 유전자를 조절시켜 초기 방광암의 예후인자로서의 가능성을 기대한다. 하지만 이들 유전자들과 COX-2 발현 및 COX-2 선택적 억제제의 억제기전과의 관련성은 알 수 없어서, 향후 COX-2 선택적 억제제에 의한 방광암 발암과정 억제 측면에서 이들 유전자들의 역할이 규명되어야 할 것이다.

### 결론

COX-2 선택적 억제제는 BBN 유도 백서 방광암 발암과정의 초기 발암단계가 우세한 12주에 15개의 유전자 발현에 영향을 주었다. 특히 transgelin, Apo-E, mme와 같은 암 관련 유전자 발현에 영향을 주는 것으로 보인다. 향후 이들

유전자에 대한 다양한 실험적 조건에서 인체 방광암을 대상으로 한 역할 규명에 관한 연구가 이루어져야 할 것이다.

## REFERENCES

- Pruthi RS, Derksen E, Gaston K. Cyclooxygenase-2 as a potential target in the prevention and treatment of genitourinary tumors: a review. *J Urol* 2003;169:2352-9
- Li G, Yang T, Yan J. Cyclooxygenase-2 increased the angiogenic and metastatic potential of tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;299:886-90
- Prescott SM, Fitzpatrick FA. Cyclooxygenase-2 and carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2000;1470:M69-78
- Ricchi P, Zarrilli R, Di Palma A, Acquaviva AM. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in colorectal cancer: from prevention to therapy. *Br J Cancer* 2003;88:803-7
- Shirahama T. Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in transitional cell carcinoma and its preneoplastic lesions in the human urinary bladder. *Clin Cancer Res* 2000;6:2424-30
- Ristimaki A, Nieminen O, Saukkonen K, Hotakainen K, Nordling S, Haglund C. Expression of cyclooxygenase-2 in human transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Am J Pathol* 2001;158:849-53
- Kim SI, Kwon SM, Kim YS, Hong SJ. Association of cyclooxygenase-2 expression with prognosis of stage T1 grade 3 bladder cancer. *Urology* 2002;60:816-21
- Shirahama T, Sakakura C. Overexpression of cyclooxygenase-2 in squamous cell carcinoma of the urinary bladder. *Clin Cancer Res* 2001;7:558-61
- Friedrich MG, Toma MI, Petri S, Huland H. Cyclooxygenase-2 promotes angiogenesis in pTa/T1 urothelial bladder carcinoma but does not predict recurrence. *BJU Int* 2003;92:389-92
- Hurst CD, Fiegler H, Carr P, Williams S, Carter NP, Knowles MA. High-resolution analysis of genomic copy number alterations in bladder cancer by microarray-based comparative genomic hybridization. *Oncogene* 2004;23:2250-63
- Sanchez-Carbayo M, Cordon-Cardo C. Applications of array technology: identification of molecular targets in bladder cancer. *Br J Cancer* 2003;89:2172-7
- Ariel I, Ayesh S, Gofrit O, Ayesh B, Abdul-Ghani R, Pizov G, et al. Gene expression in the bladder carcinoma rat model. *Mol Carcinog* 2004;41:69-76
- Grubbs CJ, Lubet RA, Koki AT, Leahy KM, Masferrer JL, Steele VE, et al. Celecoxib inhibits N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine-induced urinary bladder cancers in male B6D2F1 and female Fischer-344 rats. *Cancer Res* 2000;60:5599-602
- Takei S, Iseda T, Yokoyama M. Inhibitory effect of clotrimazole on angiogenesis associated with bladder epithelium proliferation in rats. *Int J Urol* 2003;10:78-85
- Osawa S, Terashima Y, Kimura G, Akimoto M. Antitumor effects of the angiogenesis inhibitor AGM-1470 on rat urinary bladder tumours induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine. *BJU Int* 1999;83:123-8
- Kwon SM, Oh HY, Kim SI, Hong SJ. Cyclooxygenase-2 inhibitor delayed the tumorigenesis of N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced rat urinary bladder cancer model. *Korean J Urol* 2004;45:578-84
- Kim JH, Shim JS, Lee SK, Kim KW, Rha SY, Chung HC, et al. Microarray-based analysis of anti-angiogenic activity of demethoxycurcumin on human umbilical vein endothelial cells: crucial involvement of the down-regulation of matrix metalloproteinase. *Jpn J Cancer Res* 2002;93:1378-85
- Yang SH, Kim JS, Oh TJ, Kim MS, Lee SW, Woo SK, et al. Genome-scale analysis of resveratrol-induced gene expression profile in human ovarian cancer cells using a cDNA microarray. *Int J Oncol* 2003;22:741-50
- Seo MY, Rha SY, Yang SH, Kim SC, Lee GY, Park CH, et al. The pattern of gene copy number changes in bilateral breast cancer surveyed by cDNA microarray-based comparative genomic hybridization. *Int J Mol Med* 2004;13:17-24
- Shintani N, Tomimoto S, Hashimoto H, Kawaguchi C, Baba A. Functional roles of the neuropeptide PACAP in brain and pancreas. *Life Sci* 2003;74:337-43
- Shields JM, Rogers-Graham K, Der CJ. Loss of transgelin in breast and colon tumors and in RIE-1 cells by Ras deregulation of gene expression through Raf-independent pathways. *J Biol Chem* 2002;277:9790-9
- Freedland SJ, Seligson DB, Liu AY, Pantuck AJ, Paik SH, Horvath S, et al. Loss of CD10 (neutral endopeptidase) is a frequent and early event in human prostate cancer. *Prostate* 2003;55:71-80
- Koiso K, Akaza H, Ohtani M, Miyanaga N, Aoyagi K. A new tumor marker for bladder cancer. *Int J Urol* 1994;1:33-6
- Venzoni MC, Giunta S, Muraro GB, Storari L, Crescini C, Mazzucchelli R, et al. Apolipoprotein E expression in localized prostate cancers. *Int J Oncol* 2003;22:779-86
- Li LS, Kim H, Rhee H, Kim SH, Shin DH, Chung KY, et al. Proteomic analysis distinguishes basaloid carcinoma as a distinct subtype of nonsmall cell lung carcinoma. *Proteomics* 2004;4:3394-400
- DeSouza L, Diehl G, Rodrigues MJ, Guo J, Romaschin AD, Colgan TJ, et al. Search for cancer markers from endometrial tissues using differentially labeled tags iTRAQ and cIAT with multidimensional liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *J Proteome Res* 2005;4:377-86
- Perna AG, Smith MJ, Krishnan B, Reed JA. CD10 is expressed in cutaneous clear cell lesions of different histogenesis. *J Cutan Pathol* 2005;32:348-51
- Galetto R, Albajar M, Polanco JI, Zakin MM, Rodriguez-Rey JC. Identification of a peroxisome-proliferator-activated-receptor response element in the apolipoprotein E gene control region. *Biochem J* 2001;357:521-7
- McGarvey TW, Nguyen TB, Malkowicz SB. An interaction between apolipoprotein E and TERE1 with a possible association with bladder tumor formation. *J Cell Biochem* 2005;95:419-28