

Suppression of Peritoneal Metastases by Expression of Murine Endostatin cDNA

Seung Ho Choi, M.D.¹, Jae Hoon Lee, M.D.¹, Sung Hee Hong¹, Woo Jin Hyung, M.D.^{1,3}, Sung Hoon Noh, M.D.^{1,3}, Hyun Cheol Chung, M.D.^{2,3}, Jae Kyung Roh, M.D.^{2,3} and Jin Sik Min, M.D.¹

Departments of ¹Surgery, ²Internal Medicine and ³Cancer Metastasis Research Center, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: Peritoneal seeding is one of problems to be solved in gastrointestinal and ovarian cancers. Angiogenesis is the critical step for a dormancy tumor cluster to be an overt metastatic nodule. However, whether an anti-angiogenesis strategy is effective in the control of peritoneal metastases is still obscure. In this study, we evaluated whether endostatin, an endogenous angiogenesis inhibitor, suppresses peritoneal metastases.

Materials and Methods: We transduced a human gastric cancer cell line, AGS and a murine renal cancer cell line, Renca, with the plasmid pEndoSTHB, which encodes a secretable form of murine endostatin. Endostatin expression was tested with western blotting, and the biological activity of the secreted endostatin was confirmed with *in vitro* endothelial cell growth inhibition. In the animal experiments, stable transfectants were injected intraperitoneally.

Results: We demonstrated secretion of endostatin from

two cell lines transduced with the plasmid pEndoSTHB. Conditioned media secreted from pEndoSTHB-transduced mammalian cells were shown to potently inhibit endothelial cell growth *in vitro*. We selected stable transfectants with similar *in vitro* growth rates of their parental cell lines. Significant tumor growth inhibition was observed in the endostatin-expressing Renca cells intraperitoneal injection group at days of 28, compared to the null transfectants intraperitoneal injection control group.

Conclusion: These results support that peritoneal seeding is angiogenesis-dependant and an anti-angiogenesis strategy is a good way to control peritoneal metastases. (Cancer Research and Treatment 2002;34:302-307)

Key Words: Peritoneal metastases, Endostatin, Anti-angiogenesis

서 론

암세포의 성장과 전이에는 혈관신생의 생성이 필수적이며(1) 암조직의 성장에 필요한 혈관 형성의 정도는 암조직과 정상조직 등에서 분비되는 촉진인자와 억제인자와의 균형 속에서 결정된다. 따라서 혈관형성을 촉진하는 인자를 감소시키거나 억제인자를 증가시키는 것은 암조직의 성장을 제어하는 좋은 방법으로 생각할 수 있다. 항암화학요법을 포함한 대부분의 전신적 치료는 암세포를 대상으로 하는 치료로 암세포 특이적인 요소를 발견하여 정상세포에는

영향을 적게 주고 암세포만 선택적으로 제거하고자 하지만 암세포의 저항으로 인하여 효과적이지 못하는 경우가 많다. 반면, 혈관형성의 억제는 암세포의 저항을 유도하지 않을 뿐 아니라 정상조직은 혈관생성이 거의 없기 때문에 부작용 역시 미미할 것으로 예측하고 있다(2~7).

복막전이 기전은 혈행성 전이에 비하여 알려진 바가 적으나 장막까지 침윤된 세포가 복강내로 유리된 후 복막 전이를 일으키거나 림프관을 따라서 복막에 전이가 이루어지는 것으로 생각되고(8) 전이 과정에 있어서도 혈행성 전이와 복막전이는 부분적으로 다른 기전이 사용될 것으로 추정되고 있으며(9,10) 복막으로 전이된 세포의 성장에도 여러 형태가 있다고 보고되고 있다(11,12). 그러나 복막전에서 혈관 신생의 중요성이나 혈관 신생의 억제에 의한 효과 등에 대하여서는 연구된 바가 매우 적다.

가장 강력한 혈관형성 억제제 중 하나인 엔도스타틴은 제18 콜라겐 C-terminal 조각으로서 분자량이 약 20 kD인 단백질이다(2). 이는 내피세포의 이동과 성장을 억제함으로

Correspondence: Seung Ho Choi, Department of Surgery, Yonsei University Severance Hospital, Yonsei University College of Medicine, Youngdong P.O. Box 1217, Seoul 135-720, Korea. (Tel) 02-3497-3375, (Fax) 02-3462-5994, (E-mail) choish@yumc.yonsei.ac.kr

Received March 29, 2002, Accepted July 25, 2002

This study was supported by a faculty research grant of Yonsei University College of Medicine for 1998. (No. 1998-06)

씨 암조직의 세포사멸을 유도하며 반복투여는 암세포의 완전한 소실을 이르게 한다고 보고되고 있다(19). 이에 저자들은 엔도스타틴을 분비하는 암세포가 복막전이 모델에서 성장하는 양상을 관찰하여 엔도스타틴이 복막전이에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

1) 세포주

인체 위암세포주인 AGS는 ATCC로부터 구입하였으며 마우스 신장암세포주인 Renca는 Hiroshi Eto 교수(Kobe University, Japan)로부터 분양받았고 우폐동맥 내피세포(cow pulmonary artery endothelial cells: CPAE)는 한국 세포주 은행으로부터 분양받았다. AGS 및 Renca 세포주는 DMEM 배지에 10% 우태아혈청(GibcoBRL, Gaithersburg, MD)을 첨가하여 계대 배양하였으며 CPAE세포는 DMEM 배지에 15% 비활성화 우태아혈청과 2 mM L-glutamine (Gibco BRL)을 첨가한 배양액으로 배양하였다.

2) Transfectants

pSecTag2/HygroB 벡터(Invitrogen, Carlsbad, CA)에 마우스 엔도스타틴의 cDNA가 삽입된 pEndoSTHB 벡터를 Kenneth K Tanabe 교수(Harvard Medical School)로부터 공여받았다(13). AGS와 Renca 세포주에서 LipofectAMINE PLUS Reagent (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD)를 이용하여 pEndoSTHB를 삽입한 transfectant를 제조하였다. 본 실험에서 사용한 plasmid는 hygromycin에 저항을 보이는 유전자가 함유되어 있어서 transfectant는 hygromycin 800 ug/ml을 첨가하여 배양하였으며 약 4주 후 hygromycin에 저항을 보이는 세포주를 선택하여 마우스 엔도스타틴이 발현되는지를 western blotting으로 확인하였다. 비교군은 pSecTag2/HygroB를 삽입한 후 제조한 안정된 transfectant로 하였다.

3) Western blotting

pSecTag2/HygroB에는 myc과 His의 cDNA가 들어 있어서 제조한 마우스 엔도스타틴은 C-terminal에 myc항원이 함께 발현되도록 제조되었다. 마우스 엔도스타틴을 검출하기 위하여 엔도스타틴에 붙어있는 myc항원을 western blotting을 통하여 확인하였다.

1×10^7 개의 안정된 transfectant를 10 cm plate에 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 배지를 DMEM으로 바꾸고 48시간 동안 추가로 배양한 뒤 배양배지를 수거하여 Micricon 10 microconcentrator (Amicon, Beverly, MA)를 사용하여 10배로 농축하였다. 농축된 배양배지 20 ul를 18% polyacrylamide

gel에서 전기영동을 한 다음 nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell, Keene, NH)에 옮기고 4°C에서 하루 밤 동안 5% 무지방 우유에 배양하였다. 0.1% tween 20을 함유한 1% 무지방 우유로 씻어 낸 다음 항c-myc 항체 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)를 1 : 1,000으로 희석하여 상온에서 1시간 동안 배양하였다. 0.1% tween 20이 함유된 1% 무지방 우유로 세척한 후 horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse immunoglobulin (Amersham, Arlington Heights, IL)을 1 : 4,000으로 희석하여 상온에서 1시간 동안 배양하고 ECL (Amersham, Arlington Heights)을 이용하여 X-ray film으로 확인하였다.

4) 내피세포의 증식 분석

1×10^7 개의 안정된 transfectant를 10 cm plate에 분주하여 24시간 동안 배양하고 다시 배지를 DMEM으로 바꾸고 72시간 동안 배양한 뒤 배양배지를 수거하여 centriplus 10 concentrator (Amicon)으로 10배 농축하였다. 한편, collagen이 덮인 96well plate에 5,000개의 CPAE 세포를 분주한 다음 4시간 동안 배양하여 세포가 배양판에 붙도록 하였다. 이어서 세포를 세척하고 농축된 transfectant의 배양액을 각 well에 100μl씩 넣고 1시간 동안 37°C, 5% CO₂ 상태에서 배양한 다음 100μl의 두 배로 농축된 CPAE 배양 배지를 첨가하여 각각 예정된 기간 동안 배양하였다. 세포의 양은 MTT assay로 측정하였으며(14) 모든 실험은 3회 반복하였다.

5) Stable transfectant의 *in vitro* 성장을 측정

2×10^3 개의 세포를 96well plate에 분주한 다음 37°C, 5% CO₂ 상태에서 지정된 시간 동안 배양하여 세포의 양을 MTT assay로 측정하였고(14) 모든 실험은 3회 반복하였다.

6) 동물 실험

약 6주 된 BALB/c-nu/nu 마우스(Charles River Japan Inc., Kanagawa, Japan)와 BALB/c 마우스(Charles River Japan Inc)를 무균상태에서 7일 정도 실험환경에 적응시킨 뒤 본 실험에 사용하였다. 배양 중인 AGS 및 Renca transfectant를 EDTA/trypsin을 이용하여 단일세포부양액으로 만든 다음 PBS로 세척하고 HBSS에 부유시켰다. 각각의 transfectant 숫자를 확인 후 실험에 따라 계획된 수만큼 AGS transfectant는 BALB/c-nu/nu 마우스, Renca transfectant는 BALB/c 마우스의 복강 내로 주입하고 4주 후에 복막전이 유무 및 정도를 관찰하였다. P0는 복강 내 육안적으로 세포증식을 관찰할 수 없는 경우, P1은 육안적으로 세포증식을 관찰할 수 있으면서 그 수를 셀 수 있는 경우, P2는 세포증식의 수를 셀 수 없을 정도로 많은 증식을 보이는 경우로 하였다.

결 과

1) 재조합 엔도스타틴(recombinant endostatin)을 분비하는 암 세포주

pEndoSTHB 벡터는 CMV promoter에 의하여 유핵세포에서 발현되도록 제작된 벡터로서 amino terminal에 murine immunoglobulin k chain signal peptide가 있어서 세포 내에서 재조합 단백질이 합성된 뒤 세포 외로 분비되도록 고안되었고 carboxyl terminal에 his tag과 myc tag이 있어서 transfectant의 배양배지를 수거하여 myc 항원을 검출함으로써 세포 외로 분비되는 엔도스타틴을 확인할 수 있도록 하였다(Fig. 1A). 안정된 transfectant에서 엔도스타틴의 발현을 확인하기 위하여 western blotting을 시행하였다(Fig. 1B). 본 연구에서 사용된 재조합 엔도스타틴은 마우스 엔도스타틴에 his tag과 myc tag이 함께 발현되기 때문에 분자량이 약 29 KDa로 추정되었고 비교군은 엔도스타틴의 cDNA가 삽입되지 않은 pSecTag2/HygroB를 가지고 만든 안정된 transfectant로 하였다. 비교군에서는 아무런 단백질 band가 검출되지 않은 반면, 실험군에서 약 29 KDa의 단백질 band가 발견되었다. 일부에서는 약 60 kD 근처에서 단백질 band가 검출되었는데, 이는 두 개의 엔도스타틴이 dimer를 형성하

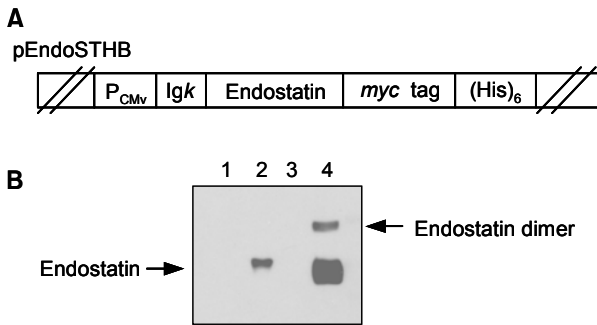


Fig. 1. A. Plasmid structure of pEndoSTHB: Murine endostatin cDNA (*Endo*) was placed downstream of the CMV promoter, murine immunoglobulinkchain signal peptide, and upstream of c-myc epitope, and polyhistidine (His) tag in pSecTag2/HygroB. B. Detection of endostatin by western blot analysis. pEndoSTHB was transfected into AGS and Renca cell lines. Conditioned media from transfectants were concentrated and twenty microgram of protein was loaded in each lane of SDS-PAGE gel. Proteins were detected with an anti-c-myc mAb. The size of the mouse endostatin-c-myc-His fusion protein was estimated to be 29 kD. Lane 1, AGS-null transfectants. Lane 2, Endostatin-secreting AGS transfectant. Lane 3, Renca-null transfectants. Lane 4, Endostatin-secreting Renca transfectant.

는 것으로 추정되었다.

2) Stable transfectant에서 분비되는 마우스 엔도스타틴의 생물학적 활성도(*in vitro*)

엔도스타틴의 생물학적 활성도를 CPAE 세포의 성장 억제 정도로 측정하였다(Fig. 2). DMEM배지만으로 배양한 결과는 세포가 거의 자라지 않은 반면 비교군으로 사용한 AGS-null transfectant 및 Renca-null transfectant 세포군의 배양배지는 DMEM 배지로 배양한 결과에 비하여 CPAE의 성장을 촉진시켰다. 반면 엔도스타틴을 분비하는 AGS transfectant 및 Renca transfectant 세포군의 배양배지는 DMEM 배지로 배양한 결과보다 CPAE의 성장을 억제하였다. 이는 AGS 및 Renca 세포주가 혈관 신생을 촉진시키는 물질을 분비하는 것으로 추정되며(15) 마우스 엔도스타틴은 AGS 및 Renca 세포주가 분비하는 혈관 신생 촉진물질에도 불구하고 혈관내피세포의 성장을 억제하는 것으로 생각되었다.

3) Stable transfectants의 *in vitro* 성장률의 비교

각각의 세포주를 96 well plate에 분주한 다음, 지정된 시간에 따라 세포의 양을 MTT assay로 측정하였다(Fig. 3). 본

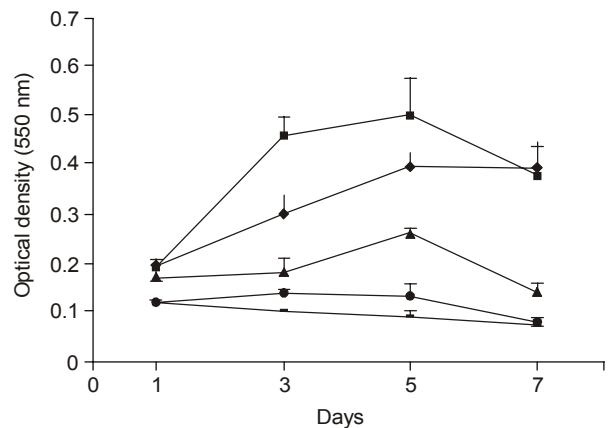


Fig. 2. The biologic activity of endostatin on CPAP cell proliferation. The endothelial cell proliferation assay was performed as described in text. At the indicated days, cell numbers were quantified using a colorimetric MTT assay, as measured by absorbance (OD 550 nm). The growth of endothelial cells (CPAE) were stimulated by conditioned media from AGS-null transfectants (■) and Renca-null transfectants (◆), compared with DMEM (-) added instead of conditioned media. The endothelial cell proliferation were inhibited by conditioned media from endostatin-secreting AGS (●) and endostatin secreting Renca (▲) cell transfectants. Data were provided as the mean±SD of three individual experiments.

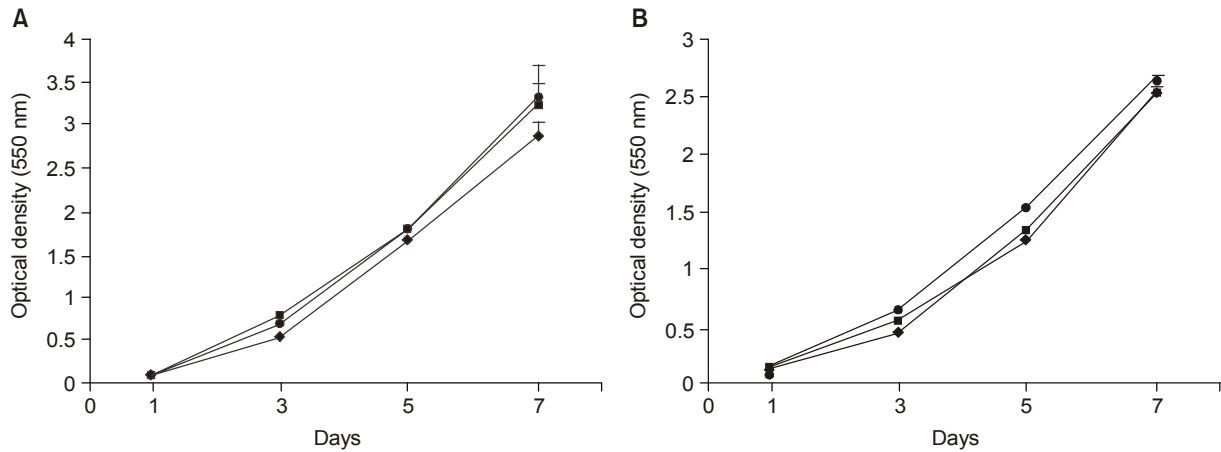


Fig. 3. *In vitro* growth of stable transfectants. A. AGS parental cells (■), AGS-null transfectants (◆), and endostatin-secreting AGS transfectants (●) were plated in 96-well plates and allowed to grow for determined time periods. The number of viable cells was determined using MTT assay. B. *in vitro* growth of Renca parental cells (■), Renca-null transfectants (◆), and endostatin-secreting Renca transfectants (●) were measured in a similar method. Data were provided as the mean±SD of three individual experiments.

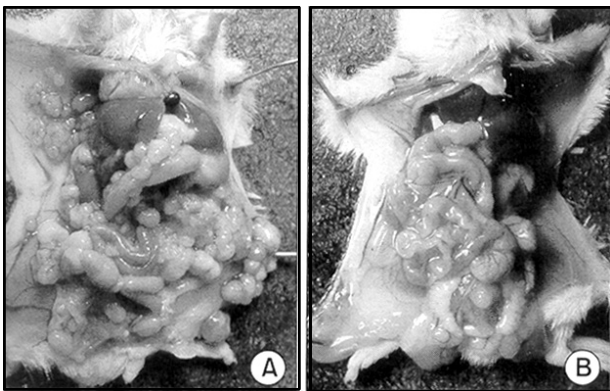


Fig. 4. Renca-null transfectants and endostatin-secreting Renca transfectants were injected into the peritoneal cavity of BALB/c mice. Mice were sacrificed 4 weeks later. One of Renca-null transfectants injected group (A) showed massive peritoneal metastases. In contrast, one of endostatin secreting Renca transfectants injected group (B) demonstrated no peritoneal metastases.

실험에 사용된 모든 stable transfectant는 transfection하기 전의 모세포에 비하여 *in vitro* 성장 속도가 유사하였다. 이는 transfection 과정 동안 모세포에 비하여 성장에 차이를 보이는 변종이 발생하지 않았으며 엔도스타틴은 AGS나 Renca 세포주의 성장에 영향을 미치지 않는다고 추정되었다.

4) 마우스에서 엔도스타틴을 분비하는 세포주의 복막 증식양상

엔도스타틴이 암세포주의 복막전이에 미치는 영향을 알

Table 1. The results of peritoneal metastases after peritoneal injection of Renca transfectants

	P0*	P1 [†]	P2 [‡]
Renca-null transfectants	2	5	
Endostatin-secreting Renca transfectants	2	4	1

p<0.05. *no peritoneal metastases, [†] small number of peritoneal metastases, [‡] numerous peritoneal metastases

아보기 위하여 BALB/c-nu/nu 누드 마우스 복강 내에 엔도스타틴을 분비하는 AGS세포주와 분비하지 않은 AGS세포주, 각각 5×10^6 개 및 5×10^7 개를 주입하여 4주 후 복막전이 정도를 관찰하였다. 그러나 엔도스타틴을 분비하지 않은 null transfectant군에서 복막전이를 거의 일으키지 않아서 양군을 비교할 수 없었다. 이어서 BALB/c 마우스 복강 내에 Renca transfectant를 각각 5×10^6 개를 주입하여 4주 후 복막전이 정도를 관찰하였다(Fig. 4). 엔도스타틴을 분비하지 않은 Renca세포주를 주입한 비교 군에서는 2마리에서 국소적 복막전이를, 5마리에서 광범위한 복막전이를 보여 주었던 반면, 엔도스타틴을 분비하는 Renca세포주를 주입한 실험 군에서는 2마리에서 복막전이를 전혀 관찰할 수 없었으며 4마리에서 국소적 복막전이를, 1마리에서 광범위한 복막전이를 보여 주었다(Table 1). 두 군은 wilcoxon signed rank test 상에서 통계학적으로 유의 있는 차이를 보여주었다(p<0.05).

고찰

복막전이(腹膜癌)는 진행성 위암에서 근치적 절제 후 치료실패의 가장 흔한 원인이며(16) 복강 내 위치한 대장암에서도 복막 재발에 의한 사망이 가장 빈발하다고 보고되고 있다(17). 또한 상피세포에서 기원한 난소암에 있어서도 일차수술 시 절반 이상에서 복막전이가 발견되고 있으나 적절한 치료방법의 부재가 난소암의 치료성적을 불량하게 하고 있다(18).

암조직은 암세포, 그리고 암세포의 영향을 받은 정상세포 및 세포외 기질 등으로 구성되어 있으며 암조직 내 혈관은 정상조직의 혈관내피세포로부터 분화되어 암조직에 영양을 공급하고 노폐물을 제거할 뿐만 아니라 암조직의 생존인자 공급원으로서 기능을 하고 있다. 즉 암세포는 조직 내 혈관생성에 의존적이며 암세포가 지속적인 성장을 하기 위하여서는 혈관신생이 절대적으로 필요하다. 따라서 이미 형성된 암조직 내 혈관신생을 억제하면 암조직은 세포사멸 과정을 통하여 세포동면(dormancy)에 빠지게 된다. 뿐만 아니라 암조직 내 혈관은 숙주조직으로부터 기원하기 때문에 유전자 이상이 없는 세포로서 항암치료에서 흔히 발생하는 저항성이 발생하지 않는다고 보고되고 있다(19). 그러나 이러한 실험결과는 일차병소나 간 혹은 폐전이와 같이 혈행성 전이에서 확인된 것들이어서 전이 기전이 상이한 복막 전이에 혈관형성 억제가 어떤 영향을 미칠지는 확실하지 않았다. 최근 Yoshikawa 등(20)이 혈관신생 억제제인 TNP-470가 복막전이를 억제한다고 보고하였으며 Hampl 등(21)은 혈관신생 억제를 유도하는 유전자 삽입으로 복막전이에 의한 복수를 치료할 수 있었다고 하였다. 이러한 것들은 저자들의 연구결과와 일치하는 것으로서 복막전이도 혈관신생에 의존적이며 혈관신생의 억제를 통하여 복막전이를 치료할 수 있음을 시사하는 것이라 할 수 있다.

엔도스타틴은 자연계에 존재하는 가장 강력한 혈관신생 억제제의 하나로 알려져 있다. 그 동안 대부분 연구에서 사용한 엔도스타틴은 대장균에서 합성한 재조합 단백질로서 잘 녹지 않고 생물학적 활성도가 떨어진다는 의견이 있었다. 본 실험에서는 유핵세포에서 직접 엔도스타틴을 합성하게 함으로써 자연계에 존재하는 엔도스타틴과 유사한 물질이 만들어지도록 하였으나 엔도스타틴의 검출을 용이하게 하기 위하여 myc와 histidine이 엔도스타틴의 끝부분에 함께 발현되게 하였기 때문에 생물학적 활성도에 영향을 주었을 수 있다. 저자들은 CPAE를 통하여 본 실험에서 사용한 엔도스타틴의 혈관 증식 억제능은 확인하였으나 타 실험에서 사용된 엔도스타틴과는 비교하지 않았기 때문에 상대적인 활성도는 알 수 없었다. 저자들이 사용한 벡타는

IgG kappa chain의 signal sequence가 엔도스타틴의 염기서열 앞에 삽입되어 세포 내에서 합성된 단백질이 세포 외로 분비되도록 고안되었다(3). 유전자 조작을 한 세포의 배양액을 모아서 western blotting으로 확인한 결과, 대부분의 엔도스타틴은 29 kD의 무게를 가지고 있어서 엔도스타틴, myc, 그리고 histidine으로 이루어진 합성단백질을 알 수 있었으나 일부는 약 60 kD으로 엔도스타틴이 dimer를 형성하고 있음을 추측케 하였다. 그러나 이들 각각이 어떤 생물학적 활성도를 보이는지는 알 수 없었다.

앞서 기술한 바와 같이 동물실험에서 엔도스타틴에 의하여 여러 가지 암조직의 완전 소실이 관찰됨으로써 엔도스타틴은 암치료제로서 사용 가능성이 있음을 보여주었으나 대장균에서 생산된 재조합 엔도스타틴은 불용해성 단백질이었기 때문에 현탁액 형태로 사용하였고 현탁액을 만드는 과정에서 대부분의 단백질이 소실되어 대량생산에 어려움이 있어왔다. 유핵세포에서 생산된 엔도스타틴은 용해성이 높고 *in vitro* 실험에서 대장균에서 생산된 것보다 효과적으로 혈관신생 억제 작용이 있는 것으로 확인되었으나 용해성 단백질은 생체 내에 투입하자마자 대부분 신장을 통하여 배설되기 때문에 암조직에 엔도스타틴이 충분히 침착되기 위하여서는 다량을 지속적으로 투여하여야 하는 단점이 있었다(22). 본 실험에서 시사하듯이 종양에서 직접, 혹은 종양의 주위조직에서 엔도스타틴을 발현하게 함으로써 암조직 내 혈관 신생 억제를 효과적으로 유도할 수 있다고 생각되었다.

결론

유핵세포에서 만들어진 마우스 엔도스타틴은 내피세포의 성장을 억제하였으며 복막 내 암 성장을 억제하였다. 이들의 결과로 미루어 복막전이도 혈관신생에 의존적이며 아울러 혈관 신생억제는 복막전이의 예방이나 치료로서 사용이 가능한 방법임을 시사하였다.

REFERENCES

1. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995;1(1):27-31.
2. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 1994;21:79(2):315-328.
3. Thorpe PE, Burrows FJ. Antibody-directed targeting of the vasculature of solid tumors. *Breast Cancer Res Treat* 1995;36(2):237-251.
4. Fan TP, Jagger R, Bicknell R. Controlling the vasculature: angiogenesis, anti-angiogenesis and vascular targeting of gene

- therapy. *Trends Pharmacol Sci* 1995;16(2):57-66.
5. Baillie CT, Winslet MC, Bradley NJ. Tumour vasculature--a potential therapeutic target. *Br J Cancer* 1995;72(2):257-267.
 6. Bicknell R. Vascular targeting and the inhibition of angiogenesis. *Ann Oncol* 1994;5(Suppl 4):45-50.
 7. Burrows FJ, Thorpe PE. Vascular targeting--a new approach to the therapy of solid tumors. *Pharmacol Ther* 1994;64(1):155-174.
 8. Yamagata K, Kumagai K. Experimental study of lymphogenous peritoneal cancer dissemination: migration of fluorescent-labelled tumor cells in a rat model of mesenteric lymph vessel obstruction. *J Exp Clin Cancer Res* 2000;19(2):211-217.
 9. Nishimori H, Yasoshima T, Denno R, Shishido T, Hata F, Okada Y, Ura H, Yamaguchi K, Isomura H, Sato N, Hirata K. A novel experimental mouse model of peritoneal dissemination of human gastric cancer cells: different mechanisms in peritoneal dissemination and hematogenous metastasis. *Jpn J Cancer Res* 2000;91(7):715-722.
 10. Nishimori H, Yasoshima T, Denno R, Shishido T, Hata F, Honma T, Ura H, Yamaguchi K, Yagihashi A, Tanaka H, Kawaguchi S, Kamiguchi K, Isomura H, Sato N, Hirata K. A new peritoneal dissemination model established from the human pancreatic cancer cell line. *Pancreas* 2001;22(4):348-356.
 11. Jayne DG, O'Leary R, Gill A, Hick A, Guillou PJ. A three-dimensional in-vitro model for the study of peritoneal tumour metastasis. *Clin Exp Metastasis* 1999;17(6):515-523.
 12. Yamamura S, Onda M, Uchida E. Two types of peritoneal dissemination of pancreatic cancer cells in a hamster model. *Nippon Ika Daigaku Zasshi* 1999;66(4):253-261.
 13. Yoon SS, Eto H, Lin C, Nakamura H, Pawlik TM, Son SU, Tanabe KK. Mouse endostatin inhibits the formation of lung and liver metastases. *Cancer Research* 1999;59:6251-6256.
 14. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 1986;89:271-277.
 15. Rha SY, Noh SH, Kwak HJ, Wellstein A, Kim JH, Roh JK, Min JS, Kim BS, Chung HC. Comparison of biological phenotypes according to midkine expression in gastric cancer cells and their autocrine activities could be modulated by pentosan polysulfate. *Cancer Lett* 1997;118:37-46.
 16. Yang HK, Choi SJ, Chung KW, Kim YH, Lee HK, Lee KU, Choe KJ, Kim JP. A clinicopathological analysis of recurrent gastric cancer. *Cancer Res Treat* 2001;33:207-215.
 17. Sugraker PH, Schellinx ME, Chang D, Koslowe P, von Meyerfeldt M. Peritoneal carcinomatosis from adenocarcinoma of the colon. *World J Surg* 1996;20(5):585-591.
 18. Rabinerson D, Kaplan B, Levavi H, Neri A. The biology of ovarian cancer of epithelial origin. *Isr J Med Sci* 1996;32(11):1128-1133.
 19. Boehm T, Folkman J, Browder T, O'Reilly MS. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* 1997;390(6658):404-407.
 20. Yoshikawa T, Yanoma S, Tsuburaya A, Kobayashi O, Sairenji M, Motohashi H, Noguchi Y. Angiogenesis inhibitor, TNP-470, suppresses growth of peritoneal disseminating foci. *Hepatology* 2000;47(31):298-302.
 21. Hampl M, Tanaka T, Albert PS, Lee J, Ferrari N, Fine HA. Therapeutic effects of viral vector-mediated antiangiogenic gene transfer in malignant ascites. *Hum Gene Ther* 2001;12(14):1713-1729.
 22. Yokoyama Y, Green JE, Sukhatme VP, Ramakrishnan S. Effect of endostatin on spontaneous tumorigenesis of mammary adenocarcinoma in a transgenic mouse model. *Cancer Res* 2000;60(16):4362-4365.
-