

위암 조직에서 Midkine 유전자 발현

연세대학교 의과대학 ¹연세 암센터, ²암 연구소, ³내과, ⁴외과

곽현주² · 김용배² · 민병소² · 맹호영² · 송승훈²
정혜원² · 김태수² · 정희철^{1,2,3} · 라선영^{1,2,3} · 정현철^{1,2,3}
노성훈^{2,4} · 김주형^{1,2,3} · 노재경^{1,2,3} · 민진식^{1,2,4} · 김병수^{1,2}

= Abstract =

Midkine Gene Expression in Gastric Cancer Tissues

Hyun Joo Kwak², Yong Bae Kim², Byung Soh Min²
Ho Young Maeng², Sung Hoon Song, M.D.², Hye Weon Chung, M.D.²
Tae Soo Kim², Hei Cheol Chung, M.D.^{1,2,3}, Sun Young Rha, M.D.^{1,2,3}
Hyun Cheol Chung, M.D.^{1,2,3}, Sung Hoon Noh, M.D.^{2,4}, Joo Hang Kim, M.D.^{1,2,3}
Jae Kyung Roh, M.D.^{1,2,3}, Jin Sik Min, M.D.^{1,2,4} and Byung Soo Kim, M.D.^{1,2}

¹Yonsei Cancer Center, ²Cancer Research Institute, Department of ³Internal Medicine,
⁴General Surgery, Yonsei University College of Medicine

Purpose: We evaluated the clinical significance of the tumor growth factor, midkine (MK), in paired gastric cancer and normal tissues.

Materials and Methods: Twenty paired normal and cancer tissues were tested for MK mRNA expression by Northern blot analysis. Vessel staining was done by immunohistochemical staining using CD-31 monoclonal antibody (Dako).

Results: MK mRNA was mainly expressed in cancer tissues (11 versus 1). Lymph node metastasis, pathological stage and tumor differentiation did not correlate with MK expression. However, MK expression rate increased with increment in tumor size (p=0.05). Microvascular density did not correlate with tumor invasion, lymph node metastasis, and pathological stages. However, there was a tendency of vascular density increment with MK expression in T1-T2 stage.

Conclusion: MK was mainly expressed in larger gastric cancer tissues suggesting its role in cancer growth in vivo. But no definite correlation between MK expression and tumor microvascular density was found.

Key Words: Gastric cancer, Midkine, Microvascular density

서 론

악성 종양이 증식하기 위해서는 암 세포와 주위 정상조직(내피세포, 섬유아세포 등) 사이에 매우 복잡하고도 정교한 전달체계(paracrine pathway)가 필요하다. 이 과정에는 암세포로부터 생성 및 분비되는 polypeptide 종양성장 인자가 암세포와 정상조직 사이 상호반응의 매개체 역할을 함으로써 암의 성장과 전이를 촉진시킨다(1,2).

국소적으로 분비된 polypeptide 성장인자의 중요한 역할 중의 하나가 상처치유 혹은 종양성장에 필수적인 신생혈관생성(neovascularization)의 유도이다(3,4). 여러 연구결과 고형종양은 혈관의 공급을 받지 못하고는 수 mm 이상의 크기로 성장할 수 없음이 밝혀졌으며, 이러한 혈관은 영양 공급의 역할 외에도 전이의 중요한 통로 역할을 하게 된다(2).

생체의 실험에서 내피세포의 증식을 유발하고 생체내에서 혈관생성을 유발시키는 종양성장 인자는 약 10여종이 보고되고 있다. 이중 가장 대표적인 것이 fibroblast growth factor (FGF) family(5)이며, 그 외에 transforming growth factor-alpha/epidermal growth factor(TGF-alpha/EGF)(6), hepatocyte growth factor (HGF)(7), vascular endothelial growth factor(VEGF) (8), pleiotrophin(PTN)(9), midkine(MK)(10) 등이 있다. 그러나 실제 암 조직에서는 어느 인자가 주된 혈관 생성인자로 작용하여 진단 혹은 치료 목표로서 임상적 가치가 있는지는 아직 확인되지 않고 있다.

암세포에서 생성 후 분비되는 종양 성장인자중 한 가지인 MK는 최근 신장암, 대장암, 위암 및 폐암 세포주에서 관찰되었으며(10), 유방암, Wilm 씨 종양 및 폐암 조직에서도 그 발현이 관찰되었다(11~13). 따라서 본 연구에서는 정상 위조직과 위암조직에서 MK 유전자의 발현을 비교한 다음, 암 조직에서 MK 발현에 따른 임상적 의미를 조사하였다.

대상 및 방법

1) 대상환자

1991년 4월부터 10월사이에 위 선암으로 진단 받고 위절제술이 시행된 후 정상 위조직과 위암 조직이 채취되어 냉동보관 되었던 환자 20예를 대상으로 하였다. 대상 환자의 임상적 특성은 Table 1과 같다.

2) Northern hybridization

(1) RNA 분리: 균질화기로 조직을 분쇄시킨 다음 6M guanidium 용액으로 조직을 용해시켰다. 세포의 불용성 물질을 제거하기 위하여 상온에서 10,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 취한 다음 상층액 1.0 ml당 0.15 g의 cesium chloride(CsCl)를 가하였다. 이 용액을 SW41 시험관이 있는 CsCl cushion위에 조심스럽게 올린 후, 18°C에서 32,000 rpm으로 24 시간 원심분리 하였다. Pellet을 1X SST에 녹인 다음 같은 부피의 chloroform/butanol(4:1)과 혼합하여 원심분리하였다. 유

Table 1. Patient characteristics

Age	range (years)	32 - 70
	median (years)	55
Gender	male:female	15 : 5
Tumor size	range (cm)	3 - 12
	median (cm)	4
Differentiation	well	1
	moderate	6
	poor	11
	signet ring	1
	mucinous	1
Stage	I	6
	II	4
	III	8
	IV	2

기용매층을 1X SST로 다시 추출하여 수용액층을 합한 다음, 수용액층에 sodium acetate(pH 5.2)를 0.3M 되도록 가하고, 2.5배 부피의 에탄올을 첨가하여 -20°C에 밤새 방치하였다. RNA를 10,000g, 4°C에서 15분간 원심분리하여 회수한 다음 -80°C에 보관하면서 사용하였다.

(2) **Hybridization:** Formaldehyde 방법으로 실험을 진행하였다. 약술하면, agarose gel을 조제하여 10mM sodium phosphate buffer(pH 6.7)에서 전기영동 하였다. Probe는 인체 MK cDNA(Dr. Anton Wellstein 제공, Lombardi Cancer Center, Washington D.C.)로 하였다. Filter를 50% formamide가 포함된 hybridization 용액 10 mL에 넣고 42°C에서 15~20시간 반응시켰다. 2X SSC-0.1% SDS 용액으로 실온에서 4~5회 세척하고, 0.1X SSC-0.1% SDS 용액으로 50°C에서 15분간 세척한 다음 공기중에서 건조시키고, autoradiography를 하였다.

3) Immunohistochemical staining method

(1) **염색방법:** 면역조직화학 염색시 사용한 항체는 anti-CD 31 마우스 단클론 항체(Dako, Carpinteria, CA, USA) 였다. 염색과정을 간략하면, 먼저 조직표면에 존재하는 비특이 수용체를 제거하기 위해 blocking 용액(1.5% horse serum) 100 ul를 조직이 고정된 슬라이드에 점적한 후, 37°C 항온

가습기에서 20분간 배양하였다. 배양후 슬라이드를 세척하지 않고 기울여서 blocking 용액을 제거한 다음 1:200으로 희석한 일차항체를 점적하였다. 일차항체를 점적한 슬라이드를 다시 37°C 항온가습기에서 30분간 배양하고 phosphate-buffered-saline(PBS)으로 10분씩 3회 세척하였다. 다음 1:500으로 희석된 2차항체를 점적한 후 37°C에서 30분간 배양하였다. 2차항체 배양이 끝난 다음 PBS로 10분씩 3회 세척하고 avidin-biotin complex 용액을 슬라이드에 점적 후 실온에서 30분간 배양하였다. PBS로 10분씩 3회 세척 후 diaminobenzidine 용액으로 발색시켜 판독하였다.

(2) **판독 기준:** 혈관의 분포는 heterogenous 하였으므로 혈관 염색이 가장 밀집되게 관찰되는 부위를 저배율로서 정한 다음, 200배의 배율로서 3 field를 세어 평균을 구하였다. Weidner등(14)의 기준에 의해 갈색으로 염색되는 미세혈관과 내피세포 집락 혹은 1개의 내피세포는 모두 1개의 혈관으로 간주하고 혈관수를 세었다(Fig. 1). 미세혈관의 직경이 적혈구 크기의 6배 이하인 경우만 미세혈관으로 간주하였다. 혈관수는 각 슬라이드별로 3회 센 다음 그 평균으로 정하였다.

4) 조직학적 병기 설정

수술로 제거한 환자의 조직은 H&E 염색에 의

Fig. 1. Immunohistochemical staining of microvessels by CD-31 antibody (x 200). A: low microvessel density B; high microvessel density

해 침윤도와 임파절 전이 여부를 결정한 다음 AJCC 기준(15)에 의해 병리학적 병기를 정하였다.

5) 통계적 처리

각 군간의 비교는 non-parametric 방법인 Mann-Whitney 법 및 Student t-test로 하였다. 생존율은 Kaplan-Meier법으로 조사하였으며 log rank test로 유의도 검정하였다.

결 과

1) 정상 위조직과 위암조직에서 MK 발현 비교

동일한 환자에서 채취한 정상 위조직과 위암조직에서 MK mRNA 발현 비교시 정상 조직에서는 1예(5%), 위암 조직에서는 11예(55%)에서 MK mRNA 발현이 관찰되었다(Fig. 2).

2) MK 유전자 발현에 따른 임상 양상 비교

암의 침윤도가 증가할수록 MK의 발현은 증가하는 경향이었던 반면(33% versus 64%; p=0.22), 임파절 전이 유무와 병리학적 병기 및 암의 분화도와 MK 발현도와 무관하였다. 그러나 암의 크기가 증가할수록 MK의 발현도는 증가하였다(p=0.05)(Table 2).

3) 임상 양상별 microvascular density 비교

암의 침윤도, 임파절 전이 유무, 병리학적 병기 및 종양 크기의 변화에 따른 microvascular density의 차이는 없었다. 그러나 종양의 분화도가 좋을 경우 microvascular density가 증가하였다(77±16 versus 59±13; p=0.02).

4) MK 발현에 따른 vascular density 비교

T1-T2 병기와 분화도가 좋은 경우에 MK의 발현에 따라 microvascular density가 증가하는 경향을 관찰하였다(Table 3).

5) MK 발현에 따른 생존율 비교

전체 환자 20예의 추적관찰기간 중앙치는 17개월(범위: 1~67개월)이었다. 20예중 6예의 환자가 사망하여 환자의 2년 생존율은 MK를 발현하지

Table 2. Comparison of clinical parameters based on MK expression

	MK mRNA		p-value
	expression	non-expression	
T-stage			
T1-2	2	4	
T3	9	5	0.22
N-stage			
no metastasis	5	4	
metastasis	6	5	0.66
Stage			
I-II	5	5	
III-IV	6	4	0.50
Tumor size			
< 5 cm	4	7	
≥ 5 cm	7	2	0.05
Tumor differentiation			
well-moderate	4	4	
poor-signet ring	7	5	0.45

Fig. 2. Northern blot analysis of MK mRNA expression in normal and gastric cancer tissues. Upper: Northern hybridization, Lower: Ethidium bromide staining of loaded total RNA of each sample. N: normal gastric tissue, C: gastric cancer tissue

Table 3. Comparison of microvascular density based on MK expression

	MK mRNA		p-value
	expression	non-expression	
T-stage			
T1-T2	90 ± 26*	69 ± 19	0.43
T3	62 ± 14	60 ± 8	0.72
N-stage			
without metastasis	73 ± 23	66 ± 18	0.63
with metastasis	63 ± 15	62 ± 11	0.97
Stage			
I-II	73 ± 23	68 ± 15	0.72
III-IV	63 ± 15	59 ± 9	0.61
Tumor size			
< 5cm	67 ± 18	63 ± 16	0.77
≥ 5 cm	68 ± 20	66 ± 4	0.81
Tumor differentiation			
well-moderate	85 ± 20	69 ± 7	0.20
poor-signet ring	57 ± 9	60 ± 18	0.70

*mean standard deviation

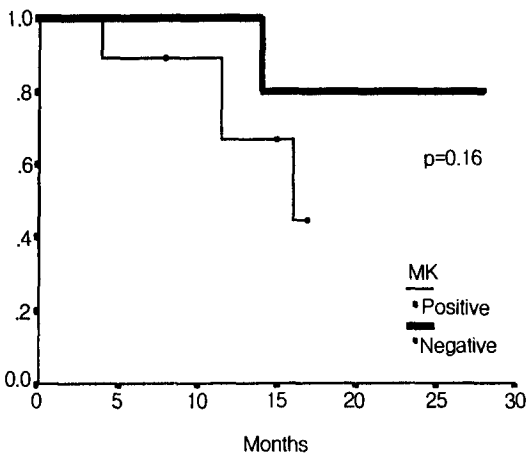


Fig. 3. Comparison of 2-year overall survivals based on MK expression.

않는 군과 발현하는 군에서 각각 80%, 44%(p=0.16)였다(Fig. 3).

고 안

MK 유전자는 신경아세포 혹은 섬유아세포의 증식을 유도하며 특히 내피세포에서 plasminogen activator의 생성을 유도하여 신생혈관 생성을 증가시킨다(16~18). 이와같은 특성은 MK 유전자가 종양의 증식에 중요한 역할을 담당할 것으로 생각된다. 실제로 유방암, 폐암, 방광암 등에서 정상 조직에 비해 MK 유전자 발현이 증가되어 있으며, 이 유전자 발현은 환자의 예후와 관련이 있음으로 보고되었다(11~13,19). 저자들도 in vitro 실험 결과 MK 유전자를 발현하는 위암 세포주는 내피세포 증식 유도능이 있음을 확인할 수 있었다(20).

종양 성장인자와 신생혈관생성과의 관계는 Folkman등(21)에 의해 tumor angiogenesis factor

(TAF)가 발견된 이후 연구가 활발히 진행되었다. 신생혈관 생성은 내피세포의 증식, 이동, 분화, tube 형성 등에 필요한 여러가지 유전자가 적절하게 작용하여 이루어지는 매우 복잡한 과정으로, 이러한 암세포와 내피세포 사이의 상관관계를 형성하는 paracrine factor가 계속 발견되었으며 가장 대표적인 예가 acidic fibroblast growth factor(aFGF), basic fibroblast growth factor(bFGF), TGF family, VEGF, PTN/MK family등이다(5~10). 종양에서 신생혈관 생성은 종양의 성장 및 전이의 중요한 통로로서 작용하므로 혈관생성 정도가 암 진행의 지표로 이용될 수 있음이 여러 종양에서 확인되었다(22~26). 뿐만아니라 신생혈관 생성의 억제가 새로운 암 치료법으로 제시되어 임상 실험이 진행중이다(27,28). 신생혈관의 생성을 억제하기 위해서는 paracrine growth factor 자체의 생성 및 분비를 억제시키는 개념과 내피세포의 반응을 억제시키는 두 가지 개념으로 연구가 진행 중이다. 종양성장 인자들은 각기 서로 다른 종양에서 관찰되거나 혹은 같은 종양에서 몇가지 성장인자가 동시에 발현되기도 하므로(29), 가장 critical role을 나타내는 종양 성장인자의 paracrine activity를 억제시켜야 신생혈관 생성이 억제되고, 그 결과 항 종양효과를 기대할 수가 있다. 그러나 위암에서는 신생혈관의 생성이 예후인자로 작용할 수 있음은 보고되었으나(22), 아직까지 paracrine activity를 나타내는 대표적 종양성장 인자가 확인되지 않고 있다. 최근 위암세포주를 포함하는 여러가지 세포주에서 내피세포 증식능이 있는 MK 유전자가 관찰된 바(10~13), 본 연구에서는 위암에서 MK발현에 따른 임상적 의의와 microvascular density를 조사함으로써 MK가 신생혈관 생성 억제치료의 target으로서 이용될 수 있는지 그 가능성을 조사하였다.

먼저 정상조직과 위암조직에서 MK의 발현 정도를 비교함으로써 종양증식 과정에서 MK 유전자의 autocrine activity 여부를 조사하였다. 그 결과 정상조직에서는 1예에서만 MK가 발현한 반면, 암조직의 55%에서 그 발현이 관찰되었다. 이

러한 결과는 폐암과 유방암에의 결과(11,13)와 동일하여, MK 유전자 발현과 종양형성과의 상관성을 제시할 수 있었다. 다음 단계로 종양의 진행에 따른 MK의 역할을 조사하기 위해 기존의 임상적 parameter와 MK 발현과의 상관성을 조사하였다. 그 결과 종양의 침윤도, 임파절 전이도, 병리학적 병기 및 종양의 분화도와 MK 발현과는 상관성을 관찰하지 못한 반면, 실험에 이용한 예수가 작기는 하지만 종양의 크기가 증가할수록 MK 발현도가 증가하였다. 이 결과는 다변량 분석시에도 marginal significance($p=0.06$, data not shown)를 나타내어, MK가 autocrine pathway로 암세포의 증식을 유발하며, paracrine pathway로 신생혈관의 생성을 증가시킨 결과로 설명이 가능하였다. 본 연구자들이 위암세포주를 이용한 연구에서도 MK를 발현하는 세포주에서 종양 형성능과 내피세포 증식 유도능이 증가되어 있음을 확인한 점이 이를 뒷받침한다 하겠다(20). MK이외의 다른 종양성장인자의 발현여부와 MK발현과의 상관성을 조사하기 위해 저자들은 위암에서 다른 종양성장인자의 발현을 조사중이다(manuscript in preparation).

이같은 MK 단백질의 paracrine activity는 위암에서 다른 종양 성장인자들과의 관계가 밝혀지지 않았을 뿐 아니라, 실제 MK가 위암조직에서 신생혈관 생성의 주 인자인지도 확인되지 않았다. 따라서 본 연구에서는 이를 간접적이거나 암 조직내에서 확인하기 위해 종양의 microvessel density를 측정하여 다음 MK 발현과의 상관성을 조사하였다. 먼저 본 연구에 이용된 조직에서 microvessel density의 의미를 조사하기 위해 임상 양상별 density를 비교하였다. 임파절 전이 여부, 병리학적 병기 및 종양의 크기에 따른 microvessel density의 차이를 관찰하지 못한 반면, 암의 분화도가 좋은 경우에 미분화암에 비해 microvessel density가 높아, 위암에서는 분화도와는 차이가 없다는 보고(22)와 상이하였다. 그러나 본 연구의 조직에서 관찰된 microvessel density와 이들 보고에서의 microvessel density가 차이가 심하여 직접적 비교는 어려웠다. 이 점에 대해 유방암에서는

미 분화암일수록 microvessel density가 높다는 보고(30), 혹은 임파절 전이 유무에 따라 분화도와 microvessel density사이에는 서로 상이하다는 보고(31)가 있어 아직 그 기전을 정확하게 설명할 수가 없어 추후 보다 많은 예에서 연구가 필요하다고 생각된다.

최종적으로 MK 발현에 따른 microvessel density 차이 여부를 각 임상 양상별로 조사한 바, 진행 초기인 T1-T2와 분화도가 좋은 경우에서 MK 유전자 발현시 microvessel density가 증가하는 경향이였다. 이러한 결과는 아직 예수가 작기는 하지만 MK는 위암의 비교적 초기병변의 신생혈관 생성에 관여하며 그 정도가 미세혈관 수의 증가에 critical role을 하지는 않은 것으로 생각된다. 그러나 본 연구에서 시행한 혈관염색은 증식하고 있는 내피세포를 염색한 것이 아니기 때문에 MK 유전자가 실제 위암의 내피세포 증식과 어느정도 상관성이 있는지는 보다 조사가 요구된다 하겠다. 이는 Fox 등(32)이 유방암 조직에서 내피세포의 증식 정도와 microvessel density와는 상관성이 없다는 보고에서 microvessel density는 지속적인 조직재생과 관련하여 해석해야 한다고 제시한 바와 같이 MK가 조직내 신생혈관 생성 과정의 어느 단계에 보다 효과적으로 작용하는 지에 대한 연구가 필요하겠다. 이러한 관점은 bFGF가 위조직내 미세혈관의 reinnervation에 작용한다는 보고(33)에서 보다 새로운 면에서 해석할 수가 있다. 즉 MK는 중추 신경계에서 신경세포의 증식과 neurite outgrowth에 작용함은 이미 확인되었으므로(10), MK가 종양 혈관의 형태적 조절뿐 아니라 자율신경의 innervation을 유도하여 미세순환을 조절하는 기능적 조절의 가능성이 제시된다 하겠다. 따라서 종양성장 인자와 신생혈관 생성의 paracrine pathway의 임상적 의의를 조사함에는 현재까지 시행되었던 형태학적 상관성외에 추후 기능적 상관성에 대한 연구로 그 개념의 확장이 필요하다 하겠다.

MK 발현 유무 및 기타 임상 양상에 따른 생존율 비교를 단변수 분석시 환자수가 작아 예상한

대로 유의한 인자는 관찰되지 않았다. 그러나 MK 발현에 따른 2년 생존율은 유의성은 없으나 MK를 발현하지않는 군에서 높은 경향이 나타나 방광암에서의 보고와 같이 예후인자로서 가능성을 관찰하였다.

결 론

위의 정상 및 암조직에서 MK 유전자는 위암 조직에서 주로 발현하며, 종양의 크기가 증가할수록 발현도가 증가하여 종양의 증식과 상관성이 관찰되었으나 직접적인 microvessel density와의 상관성은 관찰하지 못하였다.

참 고 문 헌

- Dickson R, Lippman ME. Estrogenic regulation and polypeptide growth factor secretion in human breast carcinoma. *Endocr Rev* 1987; 8: 29-43
- Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: An imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 1991; 64: 327-336
- Folkman J. How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? *Cancer Res* 1986; 46: 467-473
- Folkman J, Klausbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987; 235: 442-447
- Baird A, Klagsburn M. The fibroblast growth factor family. *Cancer Cells* 1991; 3: 239-243
- Schreiber AB, Winkler ME, Derynck R. Transforming growth factor-alpha: a more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor. *Science* 1986; 232: 1250-1252
- Weidner KM, Hartmann G, Sachs M, Birchmeier W. Properties and functions of scatter factor/hepatocyte growth factor and its receptor c-Met. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993; 8: 229-237
- Kim KJ, Li B, Winer J. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth in vivo. *Nature* 1993; 362: 841-844
- Fang WJ, Hartmann N, Chow D, Riegel AT, Wellstein A. Pleiotrophin stimulates fibroblasts, endothelial and epithelial cells, and is expressed in human cancer. *J Biol Chem* 1992; 267: 25889-25897
- Tsutsui J, Kadomatsu K, Matsubara S, Nakagawara A,

- Hamanoue M, Takao S, Shimata N, Ohi Y, Muramatsu T. A new family of heparin-binding growth/differentiation factors: increased midkine expression in Wilms tumor and other human carcinomas. *Cancer Res* 1993; 53: 1281-1285
11. Garver RI, Chan CS, Milner PG. Reciprocal expression of pleiotrophin and midkine in normal versus malignant lung tissues. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993; 9: 463-466
 12. Nakagawara A, Milbrandt J, Muramatsu T, Deuel TF, Zhao H, Cnaan A, Brodeur GM. Differential expression of pleiotrophin and midkine in advanced neuroblastomas. *Cancer Res* 1995; 55: 1792-1797
 13. Garver RI, Radford DM, Donis-ZKeller H, Wick MR, Milner PG. Midkine and pleiotrophin expression in normal and malignant breast tissue. *Cancer* 1994; 74: 1584-1590
 14. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis - correlation in invasive breast carcinoma. *New Engl J Med* 1991; 324: 1-8
 15. Beahrs OH, Myers MH. The manual for staging of cancer. J.B. Lippincott, Philadelphia, 4th ed., 62, 1992
 16. Kojima S, Muramatsu H, Amanuma H, Muramatsu T. Midkine enhances fibrinolytic activity of bovine endothelial cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 9590-9596
 17. Kojima S, Inui T, Kimura T, Sakakibara S, Muramatsu H, Amanuma H, Maruta H, Muramatsu T. Synthetic peptide derived from midkine enhance plasminogen activator in bovine aortic endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 206: 468-473
 18. Kojima S, Inui T, Muramatsu H, Kimura T, Sakakibara S, Muramatsu T. Midkine is heat and acid stable polypeptide capable of enhancing plasminogen activator activity and neurite outgrowth extension. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 216: 574-581
 19. O'Brien T, Cranston D, Fuggle S, Bicknell R, Harris AL. The angiogenic factor midkine is expressed in bladder cancer, and overexpression correlates with a poor outcome in patients with invasive cancers. *Cancer Res* 1996; 56: 2515-2518
 20. 라선영, 공수정, 조재용, 유내춘, 정현철, 노성훈, 김주향, 노재경, 민진식, 김병수. Evaluation of biological phenotypes by Mid-kine gene in gastric cancer cell lines. 제 22회 대한암학회초록집 1996; 22: 19 (abstr)
 21. Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med* 1971; 133: 275-288
 22. Maeda K, Chung YS, Takatsuka S, Ogawa Y, Sawada T, Yamashita Y, Onoda N, Kato Y, Nitta A, Arimoto Y, Kondo Y, Sowa M. Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence in gastric carcinoma. *J Clin Oncol* 1995; 13: 477-481
 23. Vermuulen PB, Verhoeven D, Hubens G, Van Marck E, Goovaerts G, Huyghe M, De Bruijn EA, Van Oosterom AT, Dirix LY. Microvessel density, endothelial cell proliferation and tumor cell proliferation in human colorectal adenocarcinomas. *Ann Oncol* 1995; 6: 59-64
 24. Engel CJ, Bennett ST, Chambers AF, Doig GS, Kerkvliet N, O'Malley FP. Tumor angiogenesis predicts recurrence in invasive colorectal cancer when controlled for Duke staging. *Am J Surg Pathol* 1996; 20: 1260-1265
 25. Bosari S, Lee AKC, DeLellis RA, Wiley BD, Heatley GJ, Silverman ML. Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma. *Hum Pathol* 1992; 23: 755-761
 26. Toi M, Kashitani J, Tominaga T. Tumor angiogenesis is an independent prognostic indicator in primary breast carcinoma. *Int J Cancer* 1993; 55: 371-374
 27. Brem H, Folkman J. Analysis of experimental antiangiogenic therapy. *J Ped Surg* 1993; 28: 445-451
 28. Scott PAE, Harris AL. Current approaches to targeting cancer using antiangiogenesis therapies. *Cancer Treat Rev* 1994; 20: 393-412
 29. Fox SB, Gatter KC, Harris AL. Tumor angiogenesis. *J Pathol* 1996; 179: 232-237
 30. Bevilacqua P, Barbareschi M, Verderio P, Boracchi P, Caffo O, Palma PD, Meli S, Weidner N, Gasparini G. Prognostic value of intratumoral microvessel density, a measure of tumor angiogenesis, in node-negative breast carcinoma-results of a multiparametric study. *Breast Cancer Res Treat* 1995; 36: 205-217
 31. Horak E, Leek R, Klenk N, LeJeune S, Smith K, Stuart N, Greenall M, Stepniewska K, Harris AL. Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet* 1992; 340: 1120-1124
 32. Fox SB, Gatter KC, Bicknell R, Going JJ, Stanton P, Cooke TG, Harris AL. Relationship of endothelial cell proliferation to tumor vascularity in human breast cancer. *Cancer Res* 1996; 55: 4161-4163
 33. Nakamura M, Oda M, Inoue J, Ito T, Akiba Y, Kitajima M, Tsujiya M, Ishi H. Effect of basic fibroblast growth factor on reinnervation of gastric microvessels: possible relevance to ulcer recurrence. *Digestive Dis Sci* 1995; 40: 1451-1458