

자궁경부암에서의 Midkine mRNA 발현에 관한 연구

이화여자대학교 의과대학 산부인과학교실, 의과학연구소
문혜성 · 박한희 · 정혜원

=Abstract=

The Midkine mRNA Expression in Invasive Cervical Cancer

Hye-Sung Moon M.D., Han-Moie Park M.D., Hye-Won Chung M.D.

*Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Ewha Womans University,
and Ewha Medical Center, Seoul, Korea*

Objective: Some growth factors may promote tumor growth by affecting tumor angiogenesis. Midkine(MK) are polypeptides that belong to a new family of heparin-binding growth/differentiation factor and has also been reported to be angiogenic. In various tumor tissues, MK was highly expressed between tumor and normal tissues; however, the pattern of MK expression in normal cervix and cervical cancer has not been established. The aim of this study was to determine the MK mRNA expression in cervical cancer. And we questioned whether its expression is related to cancer stages and prognostic factors.

Methods: The cervical and cervical cancer tissues were taken from patients; healthy women(n=15), and the patients with cervical cancer(n=29). The MK mRNA expression was examined by quantitative competitive PCR after polymerase chain reaction amplification of reverse transcriptase copies of RNA transcripts(RT-PCR).

Results: The cervical cancer expressed higher levels of MK mRNA than normal cervix($p<0.05$). The MK mRNA expression was not correlated with the cervical cancer stage and histopathologic type($p>0.05$).

Conclusion: These results suggested that increased MK mRNA expression is associated with the development of cervical cancer.

Key Words: midkine, cervical cancer, angiogenesis

서론

암세포의 성장 및 전이에는 성장인자, 맥관형성(angio genesis) 인자, 신호전달이 중요한 역할을 수행하며^{1,2)} 이러한 역할을 하는 데는 basic fibroblast growth factor(bFGF)- α ,³⁾ vascular endothelial growth factor(VEGF),⁴⁾ hepatocyte growth factor(HGF)⁵⁾ 등과 그 수용체가 관여한다. 맥관형성은 암 성장에 필수적이며 혈관밀도에 의해 결정되는 맥관형성 능력은

여러 고형성 암에서 임파절 전이와 예후에 관된다.⁶⁾ 맥관형성은 혈관형성을 자극하거나 저해하는 물질의 경쟁적인 작용에 의해 결정되며 많은 맥관형성 인자 중 VEGF는 여러 병기의 방광암에서 다른 발현을 나타내었고 VEGF 과 발현은 암의 재발과 밀접한 관계를 나타내는 것으로 많은 연구가 시도되었다.⁶⁻⁸⁾ 자궁경부암세포에서도 VEGF mRNA가 강하게 발현된다고 하여 VEGF mRNA 발현의 증가가 자궁경부암의 맥관형성과 밀접한 관계가 있다는 것이 보고되었다.⁹⁾ 그러나 VEGF 이외의 다른 인자

들도 암의 재발과 진행에 중요한 역할을 하며 혈관 형성 유형에도 기여한다고 보고함으로써^{7,10)} 맥관형성에 관여하는 다른 인자의 연구의 중요성이 대두되었다.

Midkine(MK)은 retinoic acid에 반응하는 성장 및 분화인자로써 분자량이 13kDa인 단백질이며 1988년 태생암(embryonal cell)에서 처음 발견되었으며 고형성 암에서 매우 증가하는 것으로 알려졌다.¹¹⁾ MK는 주로 혈관내피세포, 태아 성상세포(fetal astrocyte), 신장 근위 세관세포(proximal renal tubular cell)에서 생성되며 주로 신경계 발달과 맥관형성(angiogenesis), 상피성-중간엽성(epithelial-mesenchymal) 상호작용에 중요한 역할을 한다.¹²⁻¹⁴⁾ 따라서, MK는 신경세포, 내피세포, 섬유모세포의 분화와 유사분열에 관여하는 것으로 알려졌다. 정상 조직에서의 MK 발현은 극히 제한되어 있으나 신장, 폐, 갑상선 등에서 MK가 발현되는 것으로 보고되었으며 소장 점막에서는 아주 강하게 발현된다고 하였다.¹³⁾ 이러한 MK의 정상조직에서 제한된 발현으로 병변 조직에서의 MK 과 발현은 매우 의미가 있다고 하겠다. pleiotrophin(PTN)은 MK와 염기서열의 50%가 동일한 heparin에 결합하는 단백질 군이다.¹⁵⁾ MK가 모든 신경모세포종에서 발현되는 데 반해 PTN는 예후가 좋은 신경모세포종에서 발현되는 것으로 보고됨으로써 역할에는 차이가 있다.¹⁶⁾

MK 유전자는 5개의 exon으로 구성되며 염색체 11p 11.2에 위치한다. MK는 배아 뇌신경세포의 축색돌기(neurite)의 성장을 증진시키고 혈관내피세포의 plasminogen activator 활동을 증가시키며 NIH 3T3 세포의 악성화 변환에 관여하여 신경친화성(neurotrophic), 맥관형성, 유사분열 효과를 나타낸다.¹⁷⁻²⁰⁾

고형성 암에서 맥관형성에서의 MK 역할은 유방암 세포주인 MCF-7에 MK를 주입(transfection)시켜서 암 성장이 가속화되었고 nude mice에 이 세포를 주입하여 암의 혈관형성이 증가된 것으로 증명되었다.²¹⁾ 또한 MK가 여러 고형성 암에서의 암화 과정에 관여한다고 보고되었는데 MK는 정상조직에 비해 윌름종양(Wilm's tumor),^{13,22)} 간암,²²⁾ 유방암,²³⁾ 폐암,²⁴⁾ 위암,²⁵⁾ 방광암⁷⁾ 등에서 높게 발현된다고 하였다. 신경모세포종(neuroblastoma)¹⁶⁾에서 MK 과 발현은 환자의 예후와 밀접한 관계가 있다고 하였다. 그

러나, 아직 자궁경부암에서의 MK 발현에 대해서 보고된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 정상 자궁경부 조직과 자궁경부암에서의 MK mRNA 발현량의 차이를 연구함으로써 자궁경부암에서 맥관형성에 관여하는 인자가 중요한 역할을 하는지 알아보고자 한다. 또한 이러한 MK mRNA가 자궁경부암 진단에 이용될 수 있는지와 자궁경부암 진행에 관여하는지 알아보고자 한다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

1998년 3월부터 2000년 3월까지 이화의료원 부속 목동병원 산부인과를 내원하여 조직 생검으로 자궁경부암으로 진단 받은 환자 29명을 대상으로 하였으며 조직은 조직 생검 및 원추생검술에 의해 채취하였다. 대조군은 자궁내막증이나 자궁 근종으로 자궁 적출술을 시행 받은 환자 15명으로 자궁경부암 세포진 검사가 정상인 경우로 하였으며 조직은 수술시 채취하였다.

2. 자궁경부 및 RNA 추출

자궁경부 및 경부암 생검 조직에서 다음과 같이 total RNA를 분리하였다. 조직의 혈액제거를 위하여 Phosphate buffered saline(이하 PBS)으로 세척한 후 조직 100mg당 1ml의 RNA-STAT-60 (Tel-Test "B" Inc., Friendswood, TX)를 넣은 후 균질화 하였다. RNA-STAT-60 1ml당 500 μ l의 chloroform을 넣고 원심분리 후 상층액을 isopropanol 500 μ l에 넣어 침전시킨 후 침전물을 75% ethanol로 한번 세척한 후 공기 중에서 말려 diethylpycycarbonate(DEPC)로 처리한 물에 녹였다. RNA의 순도 및 양은 분광광도 분석기로 측정하였다.

3. 역전사 중합효소 연쇄 반응(RT-PCR)을 위한 올리고 뉴클레오타이드 시발체(Oligonucleotide Primer)의 설계

MK의 염기서열을 National Institute of Health 산하의 National Center for Biotechnology Information의 Gene Bank Database에서 얻은 후 OLIGO 5.0 Primer Analysis Software (National Bioscience, Plymouth,

MN)을 이용하여 올리고 뉴클레오타이드 시발체 (Oligonucleotide Primer)를 고안하였다. 올리고 뉴클레오타이드 시발체의 염기서열 및 mRNA에서의 위치는 Table 1과 같다.

4. 역 전사 (Reverse Transcription)

역 전사 중합효소 연쇄 반응에는 Gen Amp RNA PCR kit (Perkin-Elmer, Foster City, CA)을 사용하였다. 5mmol/L MgCl₂, 1X PCR buffer II, dNTP 1mmol/L, 2.5μl/L Oligo deoxythymidine, 20IU ribonuclease inhibitor, 50IU Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase(이상 Perkin Elmer)을 포함한 역전사용 혼합물 19μl에 1μl당 1μg이 되게 희석한 RNA 1μl를 넣은 후 역 전사하였다. 역 전사는 Perkin-Elmer사의 DNA Thermal Cycler 9600을 이용하여 42℃에서 15분, 99℃에서 5분 반응시켜서 4℃로 냉각시킨 후 사용 전까지 -20℃에 보관하였다. 음성대조는 RNA 1μl 대신 DEPC로 처리한 물 1μl를 넣고 역 전사하였다.

5. MK competitive와 target cDNA 의 합성

자궁경부와 경부암 조직에서 추출한 RNA로부터 역 전사 후 정상 3-, 5- 시발체를 넣고 중합효소 연쇄반응을 통하여 316 bp의 MK target DNA를 얻은 후 agarose gel에 전기영동 시키고 Promega사의 DNA purification kit으로 cDNA를 추출하였다. Competitive cDNA를 만들기 위하여 정상 3-, 5- 시발체 접합부위 사이의 염기 서열 중에서 3-floating primer를 고안한 후 정상 5- 시발체와 함께 반응시켜서 target cDNA를 얻는 방법과 같은 방법으로 cDNA를 추출하였다. 이렇게 만들어진 competitive cDNA는 MK의 경우 134 bp가 잘려져 나가서 182 bp의 크기가 되었다.

6. Standard Curve 작성과 Competitive PCR

MK의 standard curve는 일정한 양의 competitive

cDNA(50 atmol)와 점차 감소시킨 양의 target cDNA를 동시에 증폭하여 만든다.(Fig. 1) standard curve는 1.9mM MgCl₂, 10X PCR buffer II, 0.2mM dNTP, 2.5U Taq-polymerase 0.2 mol/L의 시발체를 혼합한 용액 40μl와 competitive와 target cDNA를 혼합한 용액 60μl를 넣었고, 역 전사된 sample에 1.9mM MgCl₂, 10X PCR buffer II, 2.5U Taq-polymerase 0.2 mol/L의 시발체를 혼합한 용액 80μl를 넣은 후 Perkin Elmer사의 DNA Thermal Cycler 9600으로 95℃ 5분간 모든 단백질을 denaturation 시켜서 94℃ 1분, 55℃ 1분, 72℃ 1분으로 30주기 반응시키고 72℃ 7분 elongation 시킨 후 4℃로 냉각시켰다. Ethidium Bromide(ETB)로 염색한 1% agarose gel에 standard curve 및 sample PCR 산물 25μl씩을 100 bp의 DNA ladder와 함께 전기 영동 시킨 후 Bio-Rad사의 Gel-Doc 1000 system의 UV 농도계로 gel blot을 분석하였다. standard curve에 사용한 각각의 target cDNA의 양과 target cDNA/ competitive cDNA의 gel blot 농도의 비를 log로 전환하여 Fig. 1와 같은 standard curve를 얻었다. 이 standard curve는 반복해서 얻어졌으며 $y=b+mx$ 로 표현 될 수 있어서 이로부터 농도를 알 수 없는 sample의 cDNA양을 계산해 내었다. 각 환자에서 얻어진 두개이상의 RT sample을 QC PCR 하였는데 두개의 오차는 ±5% 미만이었다.

7. 통계분석

통계분석은 SPSS 9.0을 이용하여 t-test와 Univariate Analysis of Variance를 하였고, p값이 <0.05에서 통계적으로 유의하다고 보았다.

결 과

1. 정상자궁경부와 자궁경부암에서의 MK의 발현 RT-PCR을 한 결과 정상 자궁경부와 자궁경부암

Table 1. The Sequences of MK Oligonucleotide Primer

mRNA		5'end to 3'-end	Size(bp)	Position on mRNA
MK	Upstream	GCG GCG TGG GTT TCC GCG	316	179-197
	Downstream	TCT GAC ACC AGG GGC TCC		478-495
	Competitor	TGT GAC ACC AGG GGC TCC GGT GCC TTG GCG GAC	182	478-495, 329-343

모두에서 316 bp 크기의 MK가 발현되었다.(Fig. 2)

2. MK mRNA의 정량 분석

QC PCR 을 한 결과 모든 정상 자궁 경부와 자궁 경부암 표본에서 target과 competitive 두개의 band가 보였다.(Fig. 3) standard curve를 이용하여 mRNA를

정량한 결과 자궁경부암에서의 MK mRNA 발현은 정상 자궁경부에 비해 통계적으로 유의하게 높았다.($p<0.05$, Fig. 4)

3. 자궁경부암에서의 MK mRNA 분석

자궁경부암에서 mRNA 발현은 각 병기별, 조직 병리학적 유형별, 분화도에 따라 통계적으로 유의한 차이는 없었다.($p>0.05$, Table 2)

고 찰

Fig 1. A representative illustration of MK standard curve. (A) It shows a agarose gel stained with ethium bromide. Declining amounts of target cDNA were coamplified with 1 at mol of competitive cDNA.

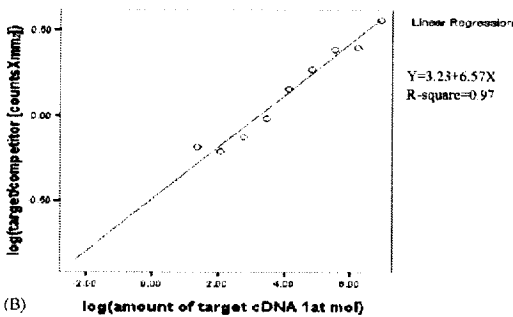


Fig 1. (B) It shows the standard curve from A gel. The log ratio of target to competitive product density is plotted against the log amount of target initially added to the PCR.

MK 발현은 여러 암에서 보고되고 있으며, 악성 조직에서 그 발현이 증가한다고 하였다.특히 MK가 신경모세포종과 방광암 환자에서 예후가 나쁜 경우 과발현된다고 하였다.^{7,16)} MK발현은 양성 난소종양

Fig 3. QC PCR of MK in normal cervix and cervical cancer

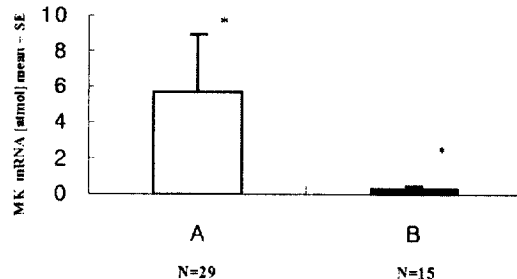


Fig 2. MK mRNA expression in cervical cancer and normal cervix amplified by RT-PCR. Lane 1: size marker, lane 2-3: cervical cancer, lane 4-5: normal cervix

Fig 4. QC PCR analysis of MK RNA extracted from cervical cancer(A) and normal cervix(B). Samples were coamplified for 30 cycles in the presence of a defined amount of internal standard cDNA for 316 bp MK(1 at mol).

Table 2. The Clinicopathologic Finding of Cervical Cancer Patients.

		Cases(n=29)
Age		56.7 ± 10.7
Stage	I	8
	II	12
	III	3
	IV	6
Pathology	Squamous, Large Cell, Keratinizing	10
	Large Cell, Nonkeratinizing	17
	Small Cell, Nonkeratinizing	1
	Adenocarcinoma	1
Treatment	Radical Hysterectomy	8
	Radiation	21

에 비해 난소암에서 증가되며 난소암의 기질세포에서 과 발현되는데 반해 정상 난소의 기질세포에서는 약하게 발현된다고 하였다. 따라서 난소암의 암화 과정에 MK의 과발현이 관계된다고 보고되었다.²⁶⁾ 그러나 아직까지 난소암 이외의 부인과 암, 특히 자궁경부암에서 MK 발현은 연구된 바 없다.

MK는 *in vitro*상에서 유사분열 되고 맥관형성 능력이 있으며 변형능력이 있는 oncogenic 성질을 갖는 성장인자의 하나이다. 따라서 antisense MK RNA는 교아종(glioblastoma) 세포주의 성장을 억제하며²⁷⁾ MK 항체처리에 의해 윌름씨 종양의 배양이 부분적으로 억제되었다.²²⁾ 유사분열 효과는 직접적으로 혹은 간접적으로 관계되는지는 명확치 않으나 정상 조직과 암 조직에서의 다양한 MK 발현에 대한 연구로 MK가 *in vivo*상에서도 정상, 비정상 세포의 성장에 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다.

MK는 정상 소장에서 강하게 발현되고 갑상선에서 중등도로 발현되며 폐, 위, 결장, 신장, 에서 약하게 발현되고 정상 식도, 간에서 발현되지 않는다.¹³⁾ 그러나 이 성장인자는 이상과 같은 조직에서 발생한 암에서는 상당히 높게 발현되며 전립선암에서도 정상 전립선에 비해 강하게 발현된다.²⁸⁾ 본 연구에서는 정상 자궁경부와 자궁경부암에서 MK mRNA를 연구함으로써 자궁경부에서의 MK mRNA 발현을 최초로 보고하였다. 또한 본 연구결과로 자궁경부암에서 MK mRNA 발현이 정상 자궁경부에서보다 통계적으로 유의하게 높게 발현되는 것으로 나타났다. 따라서 신경세포, 내피세포, 섬유모세포의

분화와 유사분열에 관여하는 것으로 알려졌던 MK는 자궁경부암처럼 편평상피세포 암화과정의 맥관형성에 중요하게 관여한다고 사료된다.

정상 전립선 조직에서 MK의 동일치 않은, 낮은 발현은 MK가 정상 성장 및 재생과정에 관여할 뿐 아니라 유형 변형에 관계하며²⁸⁾ 또한 전립선암의 악성화 경향과도 밀접한 관계가 있다. 일반적으로 일차 암보다 전이 암에서 더 강하게 MK가 발현되는 것은 분화되지 않은 암세포에 MK 발현이 증가되기 때문이다.¹⁵⁾ 절단된(truncation) MK는 직장암 20%에서, 유방암 24%에서 발견되며 이는 exon 3이 부족하여 MK 기능을 유지하는 COOH기 대신 NH₂-terminal기를 갖고 있기 때문인 것으로 보고하였다.²⁹⁾ 또한 신경모세포종과 방광암에서도 임상적 병기와 MK 발현이 상관관계가 있는 것으로 연구되었다.^{7,16)} 그러나 본 연구 결과에서는 MK mRNA 발현은 자궁경부암의 다른 예후인자, 병기나 조직병리학적 유형과는 통계적으로 유의한 상관관계는 없었다. 따라서 암의 종류마다 MK 발현의 정도는 차이가 있으며 자궁경부암에서는 예후인자로 이용가능하지는 않다고 사료된다.

전립선암에서도 MK는 강하게 발현되며 전립선 전암단계에서도 MK가 발현됨을 보고함으로써 전립선암의 암화 과정 초기단계에 이 유전자의 증가가 중요한 역할을 한다고 하였다.²⁸⁾ 쥐에서 diethylnitrosamine 유도하에 간암을 유발시킨 경우 전암단계에서부터 암의 말기까지 MK가 발현되었고 직장의 선종과 이형성증에서부터 직장암까지 MK

mRNA가 발현되어 직장암의 암화과정에 관여함을 보고하였다.³⁰⁾ 본 연구에서 자궁경부암 전암단계인 자궁경부 상피내종양을 연구하지는 않았으나 추후 계속 연구한다면 MK 발현이 자궁경부암의 암화과정에도 관여함을 알 수 있을 것으로 사료된다.

고형성 암에서 증가된 혈관 밀도형성에 관여하는 맥관형성 인자가 암의 종류마다 정확히 알려져 있지는 않으나 VEGF, PDGF, bFGF, aFGF 등이 역할을 한다고 알려져 있다.^{10,31,32)} 맥관형성은 방광암의 성격에 중요한 영향을 미치므로 혈관밀도는 침윤성 방광암의 예후를 결정하는 예측인자로 이용될 수 있다고 하였다.⁶⁾ 침윤성 방광암에서 VEGF와 PDGF가 다르게 발현된다고 보고되었는데 침윤성 방광암에서 PDGF는 두 가지 맥관형성 기전을 가지고 있으며 MK는 이 두 가지 기전을 작동시키는 역할을 한다고 하였다.^{10,33)} 그러므로 고형성 암에서 두 가지 이상의 맥관형성 인자를 생성 분비함이 한 가지 인자에 의해 형성되는 암보다 더 악성인 경향을 띤다고 하였다. 본 연구자는 이미 자궁경부암에서 정상 자궁경부에 비해 VEGF가 많이 발현됨을 보고하였고³⁴⁾ VEGF가 높게 발현된 환자에서 MK mRNA 발현을 연구하지는 않았으나 본 연구 결과 자궁경부암 조직에서도 MK mRNA 발현이 높은 것으로 보아 자궁경부암에서 맥관형성에 여러 종류의 맥관형성 인자가 관여하는 것으로 나타났다. 따라서 자궁경부암의 맥관형성을 감소시키기 위해서는 여러가지 맥관형성 인자를 모두 억제하여야 효과가 있을 것으로 사료된다.

또한 최근에 MK와 염기 서열이 50%가 동일한 pleiotropin(PTN)이 발견되었다. PTN은 MK와 염기 서열이 비슷하지만 17-18kDa 자궁과 뇌조직에서 생기는 다른 heparin 결합 단백질로써 MK와 기능이 동일하지는 않다¹⁵⁾고 한다. 또한 MK와는 달리 정상 유방조직에서도 발현되며 유방암 조직에서는 MK와 동시에 발현된다.²³⁾ 정상 폐 조직에서는 PTN만 발현되며 폐암 조직에서는 MK만 발현된다. 모든 신경모 세포종 세포주에서는 MK가 발현되나 PTN은 예후가 좋은 신경모세포종에서만 관찰되므로 heparin 결합 성장/분화인자의 발현도 차이가 있음이 보고되었다.¹⁴⁾ 이 두 관련 유전자는 양성파와 악성조직에 다르게 발현되기 때문에 이런 유전자의 발현차이를 연구하는 것은 암세포의 침윤 및 전이를 파악

하는데 중요하다고 하겠다. 신경모 세포종의 암화과정에서는 MK가 PTN보다 더 관련이 되는 것으로 보고되었으며 따라서 자궁경부암에서도 염기서열이 비슷한 PTN의 발현을 연구하는 것이 자궁경부암에서의 MK 역할이 규명하는데 도움이 되리라 사료된다.

본 연구결과에 의하면 정상 자궁 경부에서는 MK mRNA 발현이 적은 반면 자궁경부암에서는 MK mRNA 발현이 증가하며 이 두 조직에서 MK mRNA 발현의 QC PCR을 시행하여 자궁경부암 진단에 이용할 수 있어 임상적으로 유용하다. 그러나 MK mRNA 발현을 측정하는 것은 자궁경부암의 진행 및 재발 예측에는 유용하지 않으며 이는 계속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결 론

1998년 3월부터 2000년 3월까지 이화여자대학교 목동 병원 산부인과를 내원한 정상 자궁경부를 가진 환자 15명과 자궁경부암 환자 29명을 대상으로 하여 정상 자궁경부와 자궁경부암 조직에서 MK mRNA 발현을 RT-PCR과 QC PCR로 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

정상 자궁경부와 자궁경부암 모두에서 316 bp 크기의 MK mRNA가 발현되었으며 mRNA를 정량한 결과 자궁경부암에서의 MK mRNA 발현은 정상 자궁경부에 비해 통계적으로 유의하게 높았다. 그러나 자궁경부암에서 병기별, 조직병리학적 유형별, 등급별 유의한 차이는 없었다.

본 연구 결과로 MK mRNA 발현을 측정하는 것은 자궁경부암 진단에 유용하며 임상적으로 진단의 지표로 이용될 수 있다고 사료되는 바이다.

- 참고문헌 -

1. Aaronson SA. Growth factors and cancer. Science 1991;254:1146-53.
2. Heldin CH, Westermark B. Growth factors as transforming proteins. Eur J Biochem 1989;184:487-96.
3. Di BA, Camiti C, Vigano P, Vignali M. Basic fibro-

- blast growth factor and ovarian cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995;53:375-9.
4. Boockck CA, Charnock-Jones DS, Sharkey AM, McLaren J, Barker PJ, Wright DA, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors flt and KDR in ovarian carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:506-16.
5. Renzo MFD, Olivero M, Katsaros D, Crepaldi T, Gaglia P, Zola P, et al. Overexpression of the MET/HGF receptor in ovarian cancer. *Int J Cancer* 1994;58:658-62.
6. Dickinson A, Fox S, Persad R, Hollyer J, Sibley G, Harris A. Quantitation of angiogenesis is an independent predictor of prognosis in invasive bladder cancer. *Br J Urol* 1994;74:762-6.
7. O'Brien T, Cranston D, Fuggle S, Bicknell R, Harris AL. The angiogenic factor midkine is expressed in bladder cancer, and over-expression correlates with a poor outcome in patients with invasive cancers. *Cancer Res* 1996;56:2515-8.
8. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992;267:10931-4.
9. Guidi AJ, Abu-Jawdeh G, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Dvorak HF, Brown LF. Vascular Permeability Factor(Vascular Endothelial Growth Factor) Expression and Angiogenesis in Cervical Neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:1237-45.
10. O'Brien T, Cranston D, Fuggle S, Bicknell R, Harris A. Different angiogenic pathways characterize superficial and invasive bladder cancer. *Cancer Res* 1995;55:510-513.
11. Kadomatsu K, Tomomura M, Muramatsu T. cDNA cloning and sequencing of a new gene intensely expressed in early differentiation stages of embryonal carcinoma cells and in mid-gestation period of mouse embryogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;151:1312-8.
12. Kadomatsu K, Hagihara M, Akhter S, Fan Q-W, Muramatsu H, Muramatsu T. Midkine induces the transformation of NIH3T3 cells. *Br J Cancer* 1997;75:354-9.
13. Tsutsui J, Kadomatsu K, Matsubara S, Nakagawara A, Hamanoue M, Takao S, et al. A new family of heparin-binding growth/differentiation factors: Increased midkine expression Wilms' tumor and other human carcinomas. *Cancer Res* 1993;53:1281-5.
14. Li YS, Milner PG, Chauhan AK, Watson MA, Hoffman RM, Kodner CM, Milbrandt J, Deuel T. Cloning and expression of a developmentally regulated protein that induces mitogenic and neurite outgrowth activity. *Science* 1990;250:1690-4.
15. Czubyko F, Schulte AM, Missner SC, Hsieh SS, Colley KJ, Anton VD. Molecular and pharmacologic targeting of angiogenesis factors-the example of pleiotrophin. *Breast Cancer Res and Treat* 1995;36:157-68.
16. Nakagawara A, Milbrandt J, Muramatsu T, Deuel TF, Zhao H, Cnaan A, et al. Differential expression of pleiotrophin and midkine in advanced neuroblastomas. *Cancer Res* 1995;55:1792-7.
17. Muramatsu H, Muramatsu T. Purification of recombinant midkine and examination of its biological activities: Functional comparison of new heparin binding factors. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;177:652-8.
18. Muramatsu H, Shirahama H, Yonezawa S, Maruta H, Muramatsu T. Midkine a retinoic acid-inducible growth differentiation factor: Immunochemical evidence for the function and distribution. *Dev Biol* 1993;159:392-402.
19. Kadomatsu K, Hagihara M, Akhter S, Fan Q-W, Muramatsu H, Muramatsu T. Midkine induces the transformation of NIH3T3 cells. *Br J Cancer* 1997;75:354-9.
20. Choudhuri R, Zhang H-T, Donnini S, Ziche M, Bicknell R. An angiogenic role for the neurokines, midkine and pleiotrophin in tumorigenesis. *Cancer Res* 1997;57:1814-9.
21. Chauhan AK, Li YS, Deuel TF. Pleiotrophin transforms NIH 3T3 cells and induces tumors in nude mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:679-82.
22. Tsutsui K, Kadomatsu K, Matsubara S, Nakagawara A, Hamanoue M, Takao S, Shimazu H, 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;53:1281-5.
23. Garver R Jr, Radford DM, Donis-Keller H, Wick MR, Milner PG. Midkine and pleiotrophin expression in normal and malignant breast tissue. *Cancer* 1994;74:1584-90.
24. Garver R Jr, Chan CS, Milner PG. Reciprocal expression of pleiotrophin and midkine in normal versus malignant lung tissues. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993;9:463-6.
25. Ariodome K, Tsutsui J, Takao S, Kadomatsu K, Ozawa M, Aikou T, et al. Increased midkine gene expression in human gastrointestinal cancer. *Jpn J Cancer Res* 1995;86:655-61.
26. Nakanishi T, Kadomatsu K, Okamoto T, Tomoda Y, Muramatsu T. Expression of Midkine and Pleiotrophin in Ovarian tumors. *Obstet Gynecol* 1997;90(2):285-90.
27. Mishima K, Asai A, Kadomatsu K, Ino Y, Nomura K, Narita Y, Muramatsu T, Kirino T. Increased expression of midkine during the progression of human astrocytoma. *Neurosci Lett* 1997;233:29-32.

28. Konishi N, Hiasa Y, Hayashi I, Matsuda H, Tsuzuki T, tao M, Kitahori Y, Shiraishi T, Yatani R, Shimazaki J. p53 mutations occur in clinical, but not latent, human prostate carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 1995;86:57-63.
29. Kaname T, Kadomatsu K, Aridome K, Yamashita S, Sakamoto K, Ogawa M, et al. The expression of truncated MK in human tumor. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 219:256-60.
30. Ye C, Qi M, Fan QW, Ito K, Akiyama S, Kasal Y, Matsuyama M, Muramatsu T, Kadomatsu K. Expression of midkine in the early stage of carcinogenesis in human colorectal cancer. *British J Cancer* 1993;79: 179-84.
31. Chopin DK, Caruelle JP, Colombel M, Palcy S, Ravery V, Caruelle D, Abbou CC, Barritault D. Increased immunodetection of acidic fibroblast growth factor in bladder cancer, detectable in urine. *J Urol* 1993;150: 1126-30.
32. Nguyen M, Watanabe H, Budson A, Richie J, Folkman J. Elevated levels of the angiogenic peptide basic fibroblast growth factor in urine of bladder cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:241-2.
33. Spruck CR, Ohneseit PF, Gonzalez ZM, Esrig D, Miyao N, Tsai YC, Lerner SP, Schmutte C, Yang AS, Cote R. Two molecular pathways to transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res* 1994;54:784-8.
34. 서재걸, 문혜성, 김상술, 민병조, 성순화. 자궁경부 신생물에서 VEGF(Vascular Endothelial Growth Factor), VEGF-receptor(KDR), TGF- β 1(Transforming Growth Factor- β 1)의 발현. 대한 산부회지 2000(in submission).