

nm23-H1 유전자가 주입된 U87MG 세포의 이동능과 침윤능의 감소

백 윤 웅
광주보건대학 물리치료과

Reduction of Migration and Invasion Ability of nm23-H1 Transfected U87MG

Paek, Yun-Woong

Department of Physical Therapy, Kwangju Health College

Abstract

nm23-H1 gene expression has been inversely correlated with tumor metastatic potential in certain tumors including melanomas, breast carcinomas, and hepatocellular carcinomas. However, its role with respect to the invasive behavior of central nervous system tumors has scarcely been addressed. Because cell motility and invasion plays an essential role in metastatic dissemination, we have studied whether motile human glioma cell(U87MG) transfected with nm23-H1 complementary DNA have any alterations in their ability to migrate and invade. There was no significant changes in the shape and size of the cells following nm23-H1 transfection. The role of nm23-H1 in glioma migration and invasion have been evaluated by *in vitro* simple scratch technique and brain slice invasion model. Basal migration ability of nm23-H1 transfectants cell(U87MG-pEGFP-nm23) were lesser than U87MG. Accordingly, U87MG-pEGFP-nm23 didn't migrate away apparently from the tumors implanted site comparing U87MG in brain slice invasion model.

These results suggest that nm23-H1 may play an important role in suppressing the human glioma migration and invasion.

Key words : nm23-H1, tumor metastatic potential, migration, invasion, human glioma

* Corresponding author : Department of Physical Therapy, Kwangju Health College, Sinchang-dong 683-3, Gwangsan-gu, Gwangju, 506-701, Korea

Tel : 82-62-958-7641, Fax : 82-62-958-7786, E-mail : paekyw@kjhc.ac.kr

I. 서론

뇌종양에 대한 많은 연구가 되어 많은 진보가 있었지만 대부분의 연구들이 종양의 성장 억제에 집중이 되어 있고 치료 효과를 거둔 것도 사실이지만 결국 환자가 사망에 이르는 주원인 중 하나는 주변 조직으로 침윤 및 타장기로의 전이가 실제 임상에 있어 환자 치료의 주 실패 원인이 되곤 한다(Oliveira 등, 2005 : Sporn, 1996). 침윤과 전이는 암세포의 중요한 특징 중 하나로서 암으로 인한 사망률을 낮추려면 암의 침윤과 전이를 예측하고 예방하여야 한다(Sloan 등, 2004). 뇌종양의 침윤은 뇌 내에서 주변 뇌 백질부로의 국소 침윤이 가장 중요한 특징이고 환자의 예후와 관련하여 매우 중요하기 때문에 이에 대한 연구가 필요하다(Bernstein, 1996 : Paulus & Tonn, 1995 : Pilkington, 1996). 주변조직으로 침윤을 하는 종양세포들은 세포분열을 하지 않은 매우 silent한 세포들이다. 이러한 이유로 통상적인 치료방법인 수술로써 치료가 되지 않으며 또한 방사선 조사, 항암요법 등의 표적(target)이 되지 않아 적극적인 치료에도 불구하고 사망하게 되어 악성 종양의 성공적인 치료가 되지 않은 이유 중 하나가 종양의 침윤이나 전이에 대한 연구가 미흡했기 때문이다. 침윤과 전이에 관련된 요인들은 cadherin family, laminin receptor, integrin, matrix metalloproteinases(MMP), CD44 등이 있으며(Cotran, Kumar & Collins, 1999 : Ridley 등, 2003) 전이억제 유전자로는 nm23(Steeg 등, 1988)가 있다. nm(nonmetastatic)23 유전자는 1988년에 처음으로 murine K-1735 melanoma 세포주에서 differential hybridization의 기법에 의해 밝혀져 종양전이억제 유전자로 알려졌다(Steeg 등, 1988). nm23-H1 유전자 발현은 유

방암, 간세포암, 난소암, 위암, 흑색종과 같은 많은 인간의 종양에서 전이를 억제하는 기능이 있는 것으로 밝혀졌다(Bevilacqua 등, 1989 : Hennessy 등, 1991 : de la Rosa, Williams & Steeg, 1995). 즉, nm23-H1의 발현과 전이능과 역비례 관계가 있음이 보고되었다. 하지만 neuroblastomas와 췌장암에서 nm23-H1의 발현과 종양의 악성도가 비례하였다(Arkinson & Schmidek, 1991 : Chang 등, 1994 : Hailat 등, 1991). 특히 중추신경계에서 nm23-H1 유전자의 기능은 최근까지 논란이 되고 있고 침윤기전에 관한 연구가 많이 되어지지 않았다.

따라서 본 연구에서는 종양전이억제 유전자인 nm23-H1을 pEGFP-C1 vector에 삽입하여 악성 신경교종 세포주 U87MG에 transfection시켜 transfection된 U87MG-pEGFP-nm23와 transfection시키지 않은 모세포 U87MG의 이동능과 침윤능을 상호 비교하여 종양전이억제 유전자인 nm23-H1 유전자가 신경교종세포에서 암의 침윤과 전이에 어떠한 영향을 미치는가 조사하여 신경교종에서 nm23-H1의 기능을 밝히고 최근에 질병치료기법으로 활발히 진행되고 있는 유전자 치료법의 기초를 마련하고자 하였다.

II. 연구방법

1. U87MG 세포주와 배양조건

기본 이동능이 뛰어난 인간 악성 신경교종 세포주 U87MG(obtained from the American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA)의 배양은 α -minimal essential media(α -MEM) (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) 배지에 10% fetal calf serum(FCS)을 첨가하여 37°C의 온도, 5% CO₂와 100% 습도가 유지되는 CO₂ 배양기에서 배양하였다.

2. nm23-H1 유전자를 U87MG세포에 transfection

인간 nm23-H1 cDNA를 합성하기 위하여 nm23-H1 primer를 제작하였다(Bioneer, Korea). nm23-H1 primer의 염기서열은 sense primer: 5'-CGGAATTCATGGCCAACTGT-GAGCGT-3'이며 *EcoRI* 제한효소 위치를 가지고 있고, antisense primer: 5'-CGGGAT-CCCGTCATTCATAGATCCAGT-3'이며 *BamHI* 제한효소 위치를 가지고 있다. 인간의 정상 뇌조직에서 추출한 total RNA를 주형으로 하여 nm23-H1 primer를 사용하여 reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)를 하였다.

PCR 산물은 *EcoRI*과 *BamHI* 제한효소를 처리하여 정제하여 nm23-H1 cDNA를 얻었다. nm23-H1 cDNA를 pEGFP-C1 vector(Clon-tech, California, USA) multiple cloning site(MCS)의 *EcoRI-BamHI* 제한효소 위치 사이에 cloning하여 automatic DNA sequencer ABI Prism 377(PE applied BIO-systems, USA)로 염기서열을 확인하였다. pEGFP-C1 vector는 neomycin 저항성을 가지고 있어 transfectants를 선별하기 쉽고 또한 형광빛을 내는 표식자 단백질을 생산하기 때문에 암세포 이동을 추적하기 쉬워서 암의 침윤 연구에 아주 유용하게 쓰인다.

U87MG 세포에 nm23-H1 유전자가 삽입된 pEGFP-C1 vector와 nm23-H1 유전자가 삽입되지 않은 pEGFP-C1 vector를 각각 Fu-GENE™ 6(Roche molecular biochemicals, Mannheim, Germany)를 사용하여 제조사의 방법대로 transfection 시켰다.

3. Transfectants의 선별 및 확인

Transfection된 세포를 선별하기 위하여 0.6mg/ml neomycin(G418)이 함유된 α -MEM 배지에서 세포를 배양하여 neomycin 저항성 clone 12개를 각각 분리하였고 또한 형광 현미경하에서 형광빛의 유무에 의하여 nm23-H1 유전자 주입을 확인하였다. 그중 6개의 clone을 선별하여 western blot analysis를 통하여 nm23-H1 단백질 발현의 패턴을 조사하였다.

nm23-H1 단백질 분석을 위한 단백질 추출과 western blot analysis 방법은 다음과 같다. 배양된 세포를 50 mmol/L Tris-Cl(pH7.5), 150mmol/L NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate(SDS)가 들어있는 용액으로 용해시켜 단백질을 추출하였다. 4°C, 10,000g에서 15분 동안 원심 분리하여 pellet을 제거하였다. 조직 균질액의 단백질 농도는 BCA(Bicinchonic acid) kit(Pierce)을 이용하고 bovine serum albumin을 standard로 하여 spectrophotometer를 이용하여 흡광도를 측정하였다. nm23-H1 단백질 blotting을 위하여 15 μ g의 단백질 시료를 각각 15% polyacrylamide resolving gel과 5% polyacrylamide stacking gel로 이루어진 비연속성계를 이용하여 전기영동 하였다. 그런 다음 gel속의 단백질을 전기영동하여 nitroplus membrane(Amersham, England)에 옮겼다. 이 membrane을 Tris-buffered saline(TBS)에 씻고 TBS에 용해시킨 5% 무지방 건조 우유(Nonfat Dry Milk, NFM) 용액에서 blocking 하고, 2% NFM/TBS로 polyclonal rabbit anti-nm 23-H1(Santa Cruz biotechnology, USA)을 1대 1,000의 비율로 희석한 용액에서 하룻밤동안 4°C에서 incubation했다. 그런 후 membrane을 2% NFM/TBS에서 1시간 동안 horseradish peroxidase-labeled goat anti-rabbit IgG(1:4,000) (Amersham, Eng-land) 2

차 항체와 함께 incubation 했다. 결합된 항체를 hyperfilm(Amersham, England)에 나타나는 chemiluminescence로 측정하였다.

4. Transfection된 U87MG 세포의 특성조사

1) 세포형태와 Doubling time

모세포 U87MG와 nm23-H1 유전자가 삽입되지 않은 pEGFP-C1 vector를 U87MG 세포에 transfection 시킨 U87MG-pEGFP 세포, 그리고 nm23-H1 유전자가 삽입된 pEGFP-C1 vector를 U87MG 세포에 transfection 시킨 U87MG-pEGFP-nm23 세포를 각각 5×10^5 세포로 60mm 배양용기에 배양하였다.

배양된 세포를 형광현미경하에서 모세포 U87MG와 transfection된 U87MG-pEGFP 세포, U87MG-pEGFP-nm23 세포간 서로 세포 형태를 비교하였다.

Doubling time은 세포를 48시간 동안 serum starvation 후 24시간 마다 세포를 회수하여 세포수를 측정하였다. Doubling time(DT)은 7일 동안 성장곡선에서 $DT = (t - t_0) \log 2 / (\log N - \log N_0)$ 의 공식에 의하여 계산하였다.

2) 세포 이동능 조사

기본 이동능 조사를 Simple Scratch Technique(Pilkington 등, 1997)을 사용하여 측정하였다. 배양세포를 10cm culture dish에 세포가 짝 차게 배양했다. 세포배양액에 5mM hydroxyurea(Sigma, USA)을 첨가하여 세포분열에 의한 세포들의 이동효과를 배제시켰다. 24시간 후 면도칼로 culture dish에 wound를 만들고 세포들의 이동을 측정하기 위하여 한 방향으로 scraping 했다. PBS로 두 번 세척 후 hydroxyurea가 포함된 배지에 48시간 배양하

여 100% 메탄올로 고정한 뒤 0.1% toluidine blue(Sigma, USA)로 염색하여 현미경하에서 wound를 넘어간 세포 수와 wound 선으로부터 이동한 세포까지의 거리를 측정했다. 이상의 실험은 3번 반복하여 그 평균값을 측정하였다.

3) 인간 뇌조직에서 침윤능 측정

U87MG와 U87MG-pEGFP, U87MG-pEGFP-nm23 세포들의 침윤능을 알아보기 위하여 Brain Slice Invasion Model(Jung 등, 1999, 2001; Tanaka 등, 1994)을 이용하였다. 즉, 전남대학병원 신경외과에서 간질 및 뇌혈관 기형 수술시 얻은 정상 뇌조직을 수술실에서 가져와 HBSS(Hank's Balanced Salt Solution)으로 세척 후, 무균적으로 뇌의 백질을 brain slice apparatus(Harvard Instruments, Boston, MA)를 사용하여 1mm 두께로 잘라 brain slice를 만들고 $8 \times 8 \text{ mm}^2$ 로 조각을 만들어 뇌 절편의 중앙에 구멍을 만든다. 이렇게 준비된 뇌 절편을 3차원적인 구조가 유지되게 24mm Transwell culture dish($0.4 \mu\text{m}$ pore size, Corning Costar Corporation, Cambridge, MA)의 upper chamber 위에 놓는다. 뇌 절편은 upper chamber에 있는 막의 구멍을 통하여 lower chamber로부터 배양액이 공급되게 하여 3차원적인 구조가 유지되게 배양하였다. U87MG와 U87MG-pEGFP-nm23 세포의 침윤능을 측정하기 위하여 5×10^5 개의 세포를 뇌 절편 중앙의 구멍에 넣어 10일 동안 배양하였다. 배양된 뇌 절편은 4% paraformaldehyde에 담귀 4°C에서 하룻밤을 둔 다음 PBS로 조심스럽게 씻었다. 뇌 절편 표본을 만들어 laser confocal microscopy 위에서 이식된 중앙세포가 정상 뇌 조직으로 어떤 패턴으로 침윤되었는가 조사하였다.

5. 자료처리

U87MG와 U87MG-pEGFP 세포, 그리고 U87MG-pEGFP-nm23 세포의 이동능 조사에서 이동거리와 세포 수는 ANOVA를 이용하여 비교하였으며, SPSS 10.0 for Window를 사용하여 통계 처리하였다.

III. 연구결과

1. nm23-H1 유전자의 transfection 확인

Transfectants는 항생제 neomycin 저항성을 가지고 있기 때문에 G418이 함유된 α -MEM에 배양시 생존하여 일차적으로 transfectants를 선별할 수 있었으며 또한 transfectants는 형광 빛을 발하는 표식자 단백질을 생산하기 때문에 pEGFP-C1 vector가 U87MG 세포에 transfection된 것을 형광현미경 하에서 확인할 수 있었다. nm23-H1 유전자를 지닌 pEGFP-C1 vector가 U87MG세포에 주입될지라도 nm23-H1 유전자의 발현 유무가 최종적

으로 중요하기 때문에 western blot analysis를 통하여 확인하였다. 그림 1에서와 같이 모세포 U87MG와 U87MG-pEGFP, 그리고 U87MG-pEGFP-nm23 세포에서의 nm23-H1 단백질 발현 양상을 비교할 때, U87MG와 U87MG-pEGFP는 17 KDa에 nm23-H1 단백질 밴드가 나타났고, U87MG-pEGFP-nm23은 17 KDa 위치에 희미하게 밴드가 나타났으며 nm23-H1 단백질과 형광빛을 내는 표식자 단백질과 융합된 위치인 45 KDa 위치에 밴드를 확인할 수 있어서 transfection을 확인할 수 있었다.

2. nm23-H1 transfectants 세포의 특성조사

1) 세포형태와 Doubling time

U87MG와 U87MG-pEGFP, 그리고 nm23-H1 transfectants인 U87MG-pEGFP-nm23 세포간의 형태학적인 변화를 비교해 보았는데 세포의 크기나 모양에 큰 변화가 없었다(Fig. 2).

Doubling time 조사에 의해 세포증식률을 비교한 결과 U87MG는 19시간, U87MG-pEGFP는 23.6시간, 그리고 U87MG-pEGFP-nm23 세포는 24.7시간으로 각 그룹사이의 차이가 없었다.

이리하여 모세포와 transfectants 세포간에 세포형태와 증식률에 있어서는 큰 차이가 없음을 알 수 있었다.

2) 세포 이동능 조사

U87MG 세포는 기본 이동능이 좋은 세포인데 nm23-H1 유전자가 transfection된 U87MG-pEGFP-nm23 세포는 모세포에 비교하여 wound로부터 이동한 세포 수와 세포의 이동거리에 있어서 감소하였다(Fig. 3, Table 1).

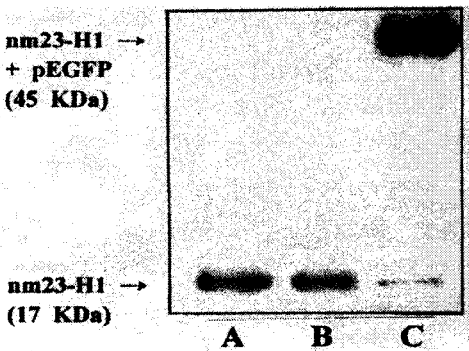


Fig. 1. Western blot analysis in parental and transfectants cells.
 A : U87MG, B : U87MG-pEGFP,
 C : U87MG-pEGFP-nm23.

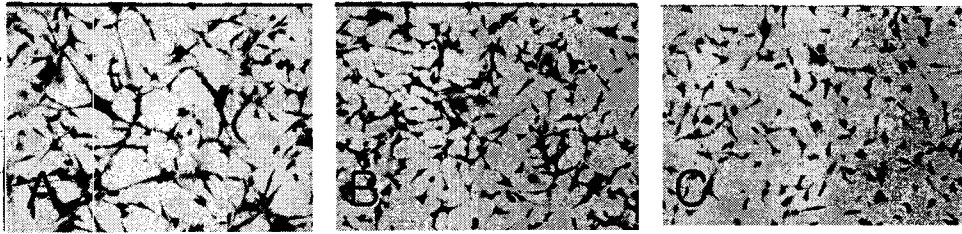


Fig. 2. Photomicrographs show cell morphology.
A : U87MG, B: U87MG-pEGFP, C : U87MG-pEGFP-nm23.

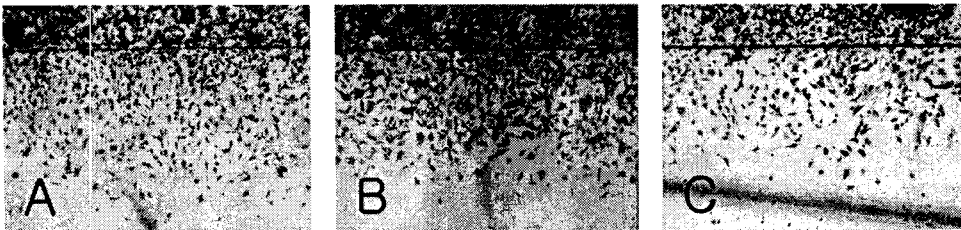


Fig. 3. Photomicrographs show migration status.
A : U87MG, B: U87MG-pEGFP, C : U87MG-pEGFP-nm23.

Table 1. Comparison of the mean data of the maximal distance and cells migrated from the wound between parental and transfectants cells

Cell Line	Migration(μ m)	No. of Cell
U87MG	1315.3 \pm 72.4	363.3 \pm 28.9
U87MG-pEGFP	1404.0 \pm 78.5	409.0 \pm 32.7
U87MG-pEGFP-nm23	1089.1 \pm 62.0*	225.3 \pm 25.7*

Values are means \pm SD.

* $P < 0.01$.

* $P < 0.05$.

3) 세포 침윤능 측정

Brain Slice Invasion 모델을 통하여 모세포와 nm23-H1 transfectants인 U87MG-pEGFP-nm23 세포와의 침윤능을 laser confocal microscopy 하에서 조사해 본 결과 모세포는 뇌절편 중앙구멍의 접종위치에서 정상 뇌조직의 주변부로 산발적으로 흩어져 침윤하

였으나 U87MG-pEGFP-nm23 세포는 접종부위에서 모세포에 비교하여 상대적으로 이동이 되지 않고 접종 부위에 뭉쳐서 머무르고 있는 것으로 나타났다(Fig. 4).

이러한 결과는 nm23-H1 유전자가 인간의 악성 신경교종의 전이와 침윤에 억제적으로 작용함을 보여준다.

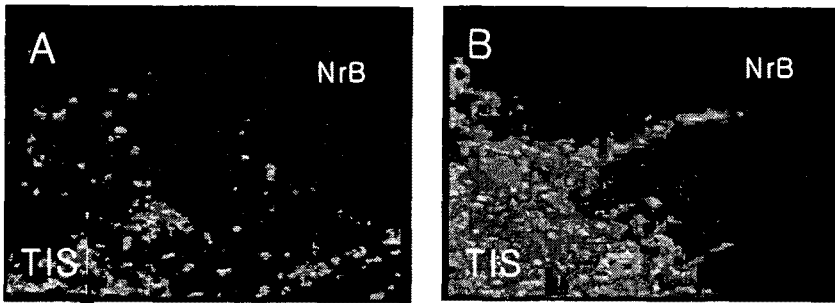


Fig. 4. Invasion assay by brain slice invasion model.

A : U87MG, B : U87MG-pEGFP-nm23,

TIS : Tumors Implanted Site, NrB: Normal Brain.

IV. 논의

뇌종양은 신경계 밖으로 전이를 거의 일으키지 않고, 주로 뇌 백질부 즉 뇌량, corticospinal tract, 혈관 등을 따라 수지상으로 주변 조직으로 침윤 하는 것이 특징으로 알려져 있어(Bernstein, 1996 : Giese & Westphal, 1996 : Pilkington, 1996) 종양수술 후 장기간의 추적 시 흔히 재발하게 되어 치료의 실패 원인이 되고 있다.

뇌종양 수술 후 잔여 종양이 있는 경우는 재발의 원인이 일차적으로 종양의 높은 증식률에 있지만 종양을 완전 적출했을 때 재발의 주원인 중 하나는 주변 조직으로 종양세포의 침윤이기 때문에 종양의 침윤기전에 관한 연구가 많이 되어져야 하지만 침윤에 관한 실험 모델이 실제와 유사하지 않아 아직까지 연구 결과가 부족하다. 그래서 본 연구에서는 nm23-H1 유전자를 악성 신경교종세포에 transfection 시켜 모세포인 U87MG와 transfectants인 U87MG-pEGFP-nm23을 서로 비교하여 nm23-H1 유전자가 기본 이동능과 침윤능에 어떠한 영향을 미치는지 조사하였다.

기본 이동능은 Simple Scratch Technique을 사용하여 측정한 결과 U87MG 비하여

U87MG-pEGFP-nm23가 이동능이 감소하였다. 이러한 결과들은 Kantor 등(1993)이 nm23-H1 cDNA를 인간의 종양세포주에 주입하여 형질 전환된 세포에서 세포의 motility가 대조군에 비하여 감소된 결과와 Leone 등(1991)이 전이능이 높은 K-1735 melanoma 세포주에 nm23-H1 cDNA를 주입하여 형질전환된 세포에서 전이능력이 감소된 결과와 유사하다. 이것은 nm23-H1의 발현이 종양세포의 이동능을 억제시킨다는 것을 시사한다.

침윤능은 Brain Slice Invasion Model을 사용하여 측정하였는데 이 방법은 기존의 Matrigel assay(Amar 등, 1994 : Pilkington 등, 1997 : Tonn 등, 1997)보다 실제 뇌조직을 사용함으로써 종양세포의 주변조직으로의 침윤에 큰 역할을 하는 세포외액 성분 등이 실제 in vivo 상황에서와 훨씬 더 유사하다. 또한 본 실험에 사용된 pEGFP vector는 형광빛을 내는 표식자 단백질을 생산하므로 transfectants들은 뇌조직에서 이동하는 종양세포를 정상 뇌세포와 구별을 용이 하게하여 종양침윤 연구에서 종양을 이동 추적 시 vital dye(DiO, DiI) staining을 사용하던 기존의 방법(Pilkington 등, 1997 : Tonn 등, 1997)보다 아주 유용하게 사용되리라 기대된다. 이와 같

은 방법들에 의해 환자가 갖는 뇌종양 유형에 따라 고유 침윤능을 알 수 있다면 향후 예후를 아는데 많은 도움이 될 것이라고 생각되며 침윤능과 재발을, 조직학적 악성도를 비교 검토하여 더 나아가 정확한 재발기전을 밝힐 수 있을 것으로 기대될 뿐 아니라 치료학적 측면에서 뇌종양 환자의 종양 고유의 침윤능에 따른 수술 후 보조요법을 사용할 수 있는 지표가 될 수 있을 것으로 생각한다.

본 연구에서 종양 전이억제유전자 nm23-H1이 신경교종세포의 이동능을 억제하여 주변 조직으로의 침윤을 감소시킨 것으로 나타나 향후 침윤성 뇌종양의 치료에 보다 적극적인 antisense strategy을 세워 실제 뇌종양환자의 유전자 치료법에 응용할 수 있는 발판을 마련할 수 있을 것이라 생각하며 종양억제유전자인 nm23-H1을 이용한 유전자 치료법의 가능성을 제시하게 되었다.

V. 결론

nm23-H1은 여러 종양에서 전이를 억제하는 유전자로 알려져 있다. 하지만 뇌종양에서는

연구의 수도 적고 또한 nm23-H1의 기능에 대하여 논란이 되고 있다. 그래서 본 연구에서는 nm23-H1 유전자가 뛰어난 이동능을 지닌 악성신경교종 U87MG에 주입 되었을 때 신경교종 세포주의 이동능과 침윤능에 어떠한 영향을 미치는지 알아보았다. nm23-H1 유전자를 pEGFP-C1 vector를 사용하여 악성신경교종 U87MG 세포에 transfection시켜 nm23-H1이 주입된 transfectants를 neomycin으로 선별하고 형광현미경과 western blot analysis로 확인하였다. 모세포 U87MG와 transfectants인 U87MG-pEGFP-nm23 세포간의 형태적인 차이와 증식률에는 어떠한 변화가 없었다. nm23-H1 유전자가 신경교종의 이동능과 침윤능에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 Simple Scratch Technique과 Brain Slice Invasion Model을 사용하여 비교해 보았다. 이동능이 뛰어난 U87MG에 비교하여 U87MG-pEGFP-nm23 세포가 이동능과 침윤능에 있어서 감소하였다.

이러한 결과는 nm23-H1 유전자가 신경교종에서 암의 침윤과 전이에 억제적으로 작용함을 시사한다.

참고문헌

- Amar, A. P., DeArmond, S. J., Spencer, D., Coopersmith, P. F., Ramos, D. M., & Rosenblum M. L.(1994). Development of an in vitro extracellular matrix assay for studies of brain tumour cell invasion. J. Neuro-Oncology, 20(1), 1-15
- Arkinson, L., & Schmidek, H.(1991). Steroid Hormones and Meningiomas, In: Meningiomas and their surgical management. Philadelphia : WB Saunders.
- Bernstein, J. J.(1996). Local invasion and intraparenchymal metastasis of astrocytomas. Neuropathol. Appl. Neurobiol, 22(5), 421-424
- Bevilacqua, G., Sobel, M. E., Liotta, L. A., & Steeg, P. S.(1989). Association of low nm23 RNA levels in human primary infiltrating ductal breast carcinomas with lymph node involvement and other

- histopathological indicators of high metastatic potential. *Cancer Res*, **49**(18), 5185-5190
- Chang, C. L., Zhu, X. X., Thoraval, D. H., Ungar, D., Rawwas, J., Hora, N., Strahler, J. R., Hanash, S. M., & Radany, E.(1994). nm23-H1 mutation in neuroblastoma. *Nature*, **370**(6488), 335-336
- Cotran, R., Kumar, V., & Collins, T.(1999). *Pathologic basis of disease* 6th Ed, Chapter 8, Neoplasia, Philadelphia : WB Saunders.
- de la Rosa, A., Williams, R. L., & Steeg, P. S.(1995). nm23/nucleoside diphosphate kinase: toward a structural and biochemical understanding of its biological functions. *Bioessays*, **17**(1), 53-62
- Giese, A., & Westphal, M.(1996). Glioma invasion in the central nervous system. *Neurosurgery*, **39**, 235-252
- Hailat, N., Keim, D. R., Melhem, R. F., Zhu, X. X., Eckerskorn, C., Brodeur, G. M., Reynolds, C. P., Seeger, R. C., Lottspeich, F., & Strahler, J. R.(1991). High levels of p19/nm23 protein in neuroblastoma are associated with advanced stage disease and N-myc gene amplification. *J. Clin. Invest*, **88**(1), 341-345
- Hennessy, C., Henry, J. A., May, F. E. B., Westley, B. R., Angus, B., & Lennard, T. W.(1991). Expression of the antimetastatic gene nm23 in human breast cancer: an association with good prognosis. *J. Natl. Cancer Inst*, **83**(4), 281-285
- Jung, S., Ackerley, C., Ivanchuk, S., Mondal, S., Becker, L. E., & Rutka, J. T.(2001). Tracking the invasiveness of human astrocytoma cells by using green fluorescent protein in an organotypical brain slice model. *J. Neurosurg*, **94**(1), 80-89
- Jung, S., Hinek, A., Tsugu, A., Hubbard, S. L., Ackerley, C., Becker, L. E., & Rutka, J. T.(1999). Astrocytoma cell interaction with elastin substrates: implications for astrocytoma invasive potential. *Glia*, **25**(2), 179-189
- Kantor, J. D., McCormick, B., Steeg, P. S., & Zetter, B. R.(1993). Inhibition of cell motility after nm23 transfection of human murine tumor cells. *Cancer Res*, **53**(9), 1971-1973
- Leone, A., Flatow, U., King, C. R., Sandeen, M. A., Margulies, I. M., Liotta, L. A., & Steeg, P. S.(1991). Reduced tumor incidence, metastatic potential and cytokine responsiveness of nm23-transfected melanoma cells. *Cell*, **65**(1), 25-35
- Oliveira, R., Christove, C., Guillamo, J. S., Debouard, S., Palfi, S., Venance, L., Tardy, M., & Peschanski, M.(2005). Contribution of gap junctional communication between tumor cells and astroglia to the invasion of the brain parenchyma by human glioblastomas. *BMC Cell Biol*, **6**(1), 7
- Paulus, W., & Tonn, J. C.(1995). Interactions of glioma cells and extracellular matrix. *J. Neuro-Oncology*, **24**(1), 87-91
- Pilkington, C.(1996). The role of the extracellular matrix in neoplastic glial invasion of the nervous system. *Braz. J. Med. Biol. Res*, **29**(9), 1159-1172
- Pilkington, G. J., Bjerkvig, R., De Ridder, L., & Kaaijk, P.(1997). In vitro and in vivo models for the study of brain tumor invasion. *Anticancer Res*, **17**(6B), 4107-4109
- Ridley, A. J., Schwartz, M. A., Burridge, K., Firtel, R. A., Ginsberg, M. H., Borisy, G., Parsons, J. T., & Horwitz, A. R.(2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*, **5:302**(5651), 1704-1709
- Sloan, K. E., Eustace, B. K., Stewart, J. K., Zehetmeier, C., Torella, C., Simeone, M., Roy, J. E., Unger, C., Louis, D. N., Itag, L. L., & Jay, D. G.(2004). CD155/PVR plays a key role in cell motility during tumor cell invasion and migration. *BMC Cancer*, **7:4**(1), 73

- Sporn, N. B.(1996). The war on cancer. Lancet, 18:347(9012), 1377-1381
- Steeg, P. S., Bevilacqua, G., Kopper, L., Thorgeirsson, U. P., Talmadge, J. E., Liotta, L. A., & Sobel, M. E.(1988). Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. J. Natl. Cancer Inst., 80(3), 200-204
- Tanaka, M., Tomita, A., Yoshida, S., Yano, M., & Shimizu, H.(1994). Observation of the highly organized development of granule cells in rat cerebellar organotypic cultures. Brain Res, 641(2), 319-327
- Tonn, J. C., Ott, M. M., Bouterfa, H., Kerkau, S., Kapp, M., Muller-Hermelink, H. K., & Roosen, K.(1997). Inverse correlation of cell proliferation and expression of progesterone receptors in tumor spheroids and monolayer cultures of human meningiomas. Neurosurgery, 41(5), 1152-1159