

신세포암종에서 cDNA Microarray를 이용한 유전자 발현에 관한 연구 -Decorin 발현의 임상병리학적 분석-

이진숙 · 서강석 · 최경운 · 김지연
박도윤

부산대학교 의과대학 병리학교실

접 수 : 2003년 3월 10일
게재승인 : 2003년 7월 23일

책임저자 : 이진숙
우 602-739 부산광역시 서구 아미동1가 10
부산대학교 의과대학 병리학교실
전화: 051-240-7422
Fax: 051-240-7579
E-mail: ljsmd@dreamwiz.com

Analysis of Gene Expression in Renal Cell Carcinomas Using cDNA Microarray -Reduced Expression of Decorin in Renal Cell Carcinomas-

Jin Sook Lee, Kang Suek Suh, Kyung Un Choi, Jee Yeun Kim and Do Youn Park

Department of Pathology, Pusan National University College of Medicine, Busan, Korea

Background : Identification of the genes expressed differentially in renal cell carcinoma (RCC) but not in the non-cancerous kidney is important for understanding the molecular basis of renal cell carcinoma and for defining possible prognostic value and therapeutic intervention. We investigated the changes in gene expression accompanying the development and progression of kidney cancer by cDNA microarrays. **Methods** : To identify molecular alterations in renal cell carcinoma, we measured expression profiles for paired neoplastic and noncancerous kidney samples from an individual by means of a cDNA microarray representing 7,500 genes. Of the differentially expressed genes, we assessed the decorin gene at the protein level using immunohistochemistry. **Results** : The 60 genes were noted to have more than a fivefold change in expression (either increased or decreased) in RCC compared to the non-cancerous kidney. The changed genes are those associated with signal transduction, metabolizing enzymes, the cytoskeleton, cell adhesion, cell cycle control, modulation of transcription, the tumor suppressor gene and tumor antigens. Under immunohistochemistry, the expression of decorin was significantly decreased in the tumor than in the non-cancerous kidney. The expression rate of decorin was not associated with the patient's sex, age, histologic type, Fuhrmann nuclear grade and T stage. **Conclusion** : The author predicted that these gene expression profiling experiments will lead to improvements in the basic understanding of renal tumor pathogenesis and will promote the discovery of novel molecular markers for renal tumor diagnosis and therapy.

Key Words : Renal cell carcinoma-Microarray-Decorin

신세포암종은 성인 신장에서 발생하는 가장 흔한 악성종양으로 전체 악성종양의 약 2%를 차지한다. 신세포암종의 발생과 진행은 여러 가지 유전적 변화가 축적되어 생긴다고 알려져 있다.¹ 최근에 신세포암종 발생과 연관이 있는 유전자로 잘 알려진 것으로는 von Hippel-Lindau 유전자,^{2,3} epidermal growth factor receptor (EGFR) 유전자,^{4,5} transforming growth factor (TGF)- α 유전자,^{6,7} c-myc 유전자^{8,9} 등이 있다. 그러나 현재까지 신세포암종의 기원세포에 대해서 정확히 알려져 있지 않으며, 또한 신세포암종은 임상병리학적으로 서로 다른 특성을 가지는 다양한 이형이 존재하고 그 각각의 발생과 진행에 관여하는 많은 유전자들에 대해서도 아직 잘 알려져 있지 않다.

악성종양에서 유전자 발현의 변화를 알아 내는 것이 진단, 예후, 치료 등에 매우 중요할 것으로 사료되어 이 분야의 연구가 활발히 진행 중이다. 이런 시도 중 최근에 새로 개발된 기술로 cDNA microarray는 암종의 유전자 변화를 한 번에 대량으로 분석할 수 있는 방법으로 암종의 유전정보를 파악하는 데 매우 유용하다.¹⁰ 현재 cDNA microarray를 이용하여 각종 악성종양의 유전자 변화에 대한 연구가 많이 시행되고 있으며, 그 성과로 일부 종양에서 종양의 새로운 분류나 특징들이 밝혀지고 있다.^{11,12} 따라서 저자는 신세포암종의 병태생리와 악성전환을 이해하는 데 도움을 얻기 위해 cDNA microarray로 신세포암종의 유전자 발현 변화를 분석한 후 변화를 보이는 유전자 중

decorin 유전자의 단백발현을 여러 임상병리학적 단계의 신세포암종에서 면역조직화학적 방법으로 연구하기로 하였다.

Decorin은 small leucine rich proteoglycan으로 다양한 조직에 분포하며 세포의 증식을 조절한다고 알려져 있다.^{13,14} 현재까지 규명된 decorin의 작용기전은 EGFR에 결합하여 활성화되고 mitogen-activated protein (MAP) kinase signal pathway가 활성화되면 cyclin-dependent kinase의 억제제인 p21이 유도되어 성장억제 작용을 한다고 알려져 있다.¹⁵ 암조직에서 decorin의 발현에 관한 이전의 연구에서 decorin은 결직장암,¹⁶ 신경교종,¹⁷ 난소암¹⁸ 등에서 종양세포의 증식을 억제한다고 알려졌다. 또한 decorin이 암종에서 신생혈관 형성을 억제하여 종양의 증식을 억제한다는 연구도 있다.¹⁹ 그러나 아직까지 신장암에서의 decorin 발현에 관한 연구는 보고된 바가 없다. 본 연구는 cDNA microarray에서 신세포암종조직의 decorin 유전자 발현이 감소되어 신세포암종에서 decorin이 종양억제작용을 할 것으로 추정하고 임상병리학적 의의를 찾고자 decorin 발현을 면역조직화학적 방법으로 연구하였다.

재료와 방법

연구재료

신선조직

cDNA microarray 실험을 위해 부산대학교병원에서 신세포암종으로 근치적 신절제술을 시행 받은 환자에서 육안검사상 신세포암종 조직과 종양주위의 정상 신장조직을 신선한 상태에서 채취하여 즉시 -70°C에서 보관하였다. 이 조직은 59세 남자 환자로 T병기는 T1, Fuhrman 핵등급 2의 투명세포형 신세포암종으로 진단되었다.

파라핀 포매조직

면역조직화학염색을 위하여 1998년 1월부터 2002년 9월까지 부산대학교병원에서 외과적으로 절제되어 병리조직학적으로 확진된 신세포암종들 중 파라핀 포매피의 보관 상태가 양호한 43예를 대상으로 하였다. 병리학적인 분석은 두 명의 병리전문의가 H-E 염색표본을 재검토하여 조직학적으로 conventional, chromophobe, papillary, collecting duct type으로 분류하고 TNM 분류법²⁰과 Fuhrman 핵 등급²¹에 따라 신세포암종을 구분하였다.

방법

RNA 분리

-70°C에 보관된 한 쌍의 신세포암종과 정상 신장조직에서 standard TRI reagent RNA isolation protocol (Molecular

Research Center, Inc. Cincinnati, USA)을 이용하여 RNA를 분리하였다. 이 분리된 RNA는 agarose gel 전기영동법으로 28S와 18S band를 확인하였다.

cDNA microarray 방법

7,500개의 유전자를 함유한 human cDNA microarray를 사용하였다(GenomicTree, Inc. Daejeon, Korea). 이 7,500개의 유전자에는 human β -actin, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), α -tubulin 등의 housekeeping gene들이 내부 대조군으로 포함되어 있다.

한 환자에게서 얻은 신세포암종 조직과 정상 신장조직에서 추출한 mRNA를 cDNA로 역전사 시킨 후 각각 Cy3-dUTP와 Cy5-dUTP로 표지하였다. GT 부합화함(hybridization chamber)에 microarray chip slide를 놓고 Cy3-dUTP와 Cy5-dUTP로 표지된 정상과 종양조직의 cDNA를 잘 섞은 후 슬라이드에 놓고 cover slip을 덮는다. 이 부합화함을 65°C에서 하룻밤 동안 배양(incubation)시켰다. 부합화된 microarray의 형광영상을 Axon Scanner GenePix 4000B (Axon Instruments, Inc. CA, USA)를 이용하여 스캔하고 GenePix Pro 3.0 (Axon Instruments, Inc. CA, USA)을 이용하여 분석하였다.²²

면역조직화학적 염색

포르말린에 고정하여 파라핀에 포매된 종양 조직을 5 μ m의 두께로 자른 다음 면역조직화학 염색을 시행하였다. 조직절편을 탈파라핀하고 함수과정을 거친 후 0.01 M citrate buffer (pH 6.0)에 넣고 전자레인지에서 5분간 두 번 가열하여 항원성을 증가시켰다. 내인성 과산화효소를 억제하기 위해서 3% 과산화수소로 처리한 다음 5% 정상염소혈청으로 비특이적인 항원-항체 반응을 억제시켰다. 면역조직화학 염색은 avidin-biotin peroxidase 방법인 Vectastain ABC elite kit (Vector laboratories, Burlingame, CA, USA)를 사용하였고, 발색제는 3-amino-9-ethylcarbazole (Vector laboratories, Burlingame, CA, USA)를 사용하였다. Decorin에 대한 일차 항체(6B6 mouse monoclonal, Seikagaku, Tokyo, Japan)는 1:200으로 희석하여 사용하였다.

면역조직화학적 염색결과 판독 및 통계학적 분석

Decorin 염색결과의 판정은 각각의 표본에서 종양조직과 정상조직의 간질에서의 염색 정도로 판단하였다. 광학현미경의 저배율 시야에서 염색이 잘 된 곳을 선택하여 400배 시야에서 분석하였다. 염색의 발현 강도를 4단계로 나누어 전혀 발현이 되지 않으면 0점, 가장 강하게 발현되는 신장의 피막에서의 반응 정도를 3점으로 하고 음성보다 약간 발현되면 1점, 중등도로 발현되면 2점으로 하였다. 400배 시야에서 10군데를 각각 측정하여 점수를 합산하였다. 분석은 SPSS 통계프로그램(version 10.0, Chicago, USA)을 이용하여 student t test와 Kruskal-Wallis

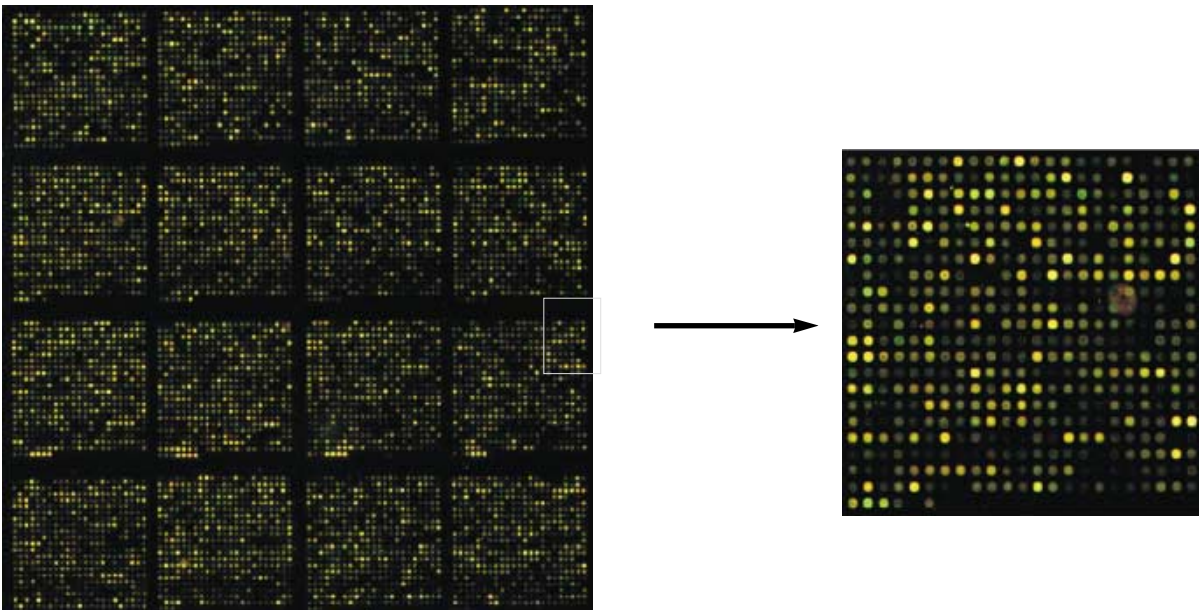


Fig. 1. cDNA microarray. 7,500 genes are spotted onto a glass and the fluorescent image was scanned with Axon scanner GenePix 4000B. The red spots are up regulated genes and green spots are down regulated genes in the renal cell carcinoma than the non-cancerous kidney.

test를 시행하였고 유의수준은 0.05 이하로 하였다.

결 과

cDNA microarray에 의한 신세포암종의 유전자 발현 변화

동일 환자의 신세포암종과 종양 주위 정상 신장조직 한 쌍에서 cDNA microarray를 시행하여 각각의 유전자 발현을 형광 염색의 발현 농도로 측정하였다(Fig. 1). 발현에 차이를 보이는 유전자 중 신세포암종에서 5배 이상 증가되거나 감소되는 유전자에 의미를 두었다. 신세포암종에서 5배 이상 증가한 유전자는 18개였으며 5배 이상 감소한 유전자는 42개였다(Table 1, 2).

발현 변화를 보이는 유전자는 주로 신호전달(signal transduction), 대사(metabolism), 세포골격(cytoskeleton), 세포 접합(cell adhesion), 세포 주기 조절(cell cycle control), 전사 조절(modulation of transcription), 종양억제자/종양항원(tumor suppressor/tumor antigen)에 관계되는 것들이었다.

신세포암종에서 decorin의 발현 분석

신세포암종 조직의 임상병리학적 소견

환자의 나이는 30세에서 73세로 다양하였으며 평균 연령은 52.9세였다. 환자의 성별은 남자가 30예(69.8%), 여자가 13예(30.2%)로 남녀비는 약 2.3:1이었다. 종양의 조직학적 분류는 conventional type이 26예, papillary type이 10예, chromophobe

type이 5예, collecting duct type이 2예였으며, Fuhrmann 핵 등급은 1등급이 7예, 2등급이 13예, 3등급이 16예, 4등급이 7예였다. TNM 분류법에 따른 T 병기는 T1이 19예, T2가 18예, T3a가 4예, T3b가 2예였다.

Decorin의 발현 양상

Decorin은 정상 신장조직에서 피막과 혈관 주변 섬유성 조직에 강하게 발현되었다. 그의 신실질에서는 세뇨관 사이 간질에 발현되었으며 사구체 간질에는 거의 발현되지 않았다. 종양조직에서도 종양세포 사이의 간질에서 발현되었으며 세뇨관 상피세포나 종양세포에서는 발현되지 않았다. 염색의 판정에서 피막, 혈관 주위 그리고 종양과 정상조직 사이의 섬유성 격막에서의 발현을 제외하고 세뇨관 사이 신실질과 종양세포 사이의 간질에서의 발현을 측정하였다. 총 43예에서 정상 신장조직에서보다 종양조직에서 decorin 발현이 현저하게 감소되었으며 이는 통계학적으로 유의하였다($p < 0.05$, Fig. 2, Table 3).

환자의 나이, 성별 및 종양의 조직학적 분류, Fuhrmann 핵 등급, T 병기에 따른 decorin 발현은 Table 4에 요약하였다. 각각의 종양의 임상병리학적 인자에 따른 decorin의 발현에는 유의한 차이가 없었다($p > 0.05$).

고 찰

최근에 종양의 유전자 변이에 대한 연구는 종양의 진단, 치료, 예후의 판정을 위해 중요할 것으로 생각되어 활발히 진행 중이

Table 1. Genes up-regulated greater than 5 fold in renal cell carcinoma

Gene name	Genbank accession No.	Fold change in RCC
Genes for signal transduction		
MAP kinase kinase 7	H85962	100
guanine nucleotide binding protein G	H92232	7
Genes for modulation of transcription		
SNF2/SW12-like protein 2	AA481026	100
Sp4 transcription factor	AA772989	11
SRY-box 21	AI884987	6
Genes for iron channel/transport protein		
lactotransferrin	AA677706	100
glycine receptor, alpha 3	AA283885	10
Gene for immune system		
SEMAPHORIN 3C	AA042990	100
Genes for DNA synthesis/repair		
Replication protein A1 (70 kD)	AA629900	100
Gene for cytoskeleton		
microtubule-associated protein 1B	AA219045	13
Genes for metabolism		
LTB4 omega-hydroxylase, liver	AI364951	7.5
GalNAc transferase 3	W40257	7
hyaluronan synthase 3	AI338972	6.667
NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex, 7	AA022627	5.333
Tumor antigen		
serologically defined colon cancer antigen 43	AI214154	6
Others		
KIAA 1599 protein	AI656119	5
ovarian cancer gene 1	AA670380	5
protein kinase C, alpha binding protein	AK560680	5

RCC: renal cell carcinoma.

다. 이들 중 최근에 도입된 cDNA microarray 기술은 유전자 분석의 속도를 가속화시킬 수 있을 것으로 기대되어 주된 관심사로 떠올랐다. Microarray는 glass chip에 붙은 유전자 조각들의 작은 배열로 microarray 위의 유전자 조각들과 형광물질로 표기된 시료사이의 부합화(hybridization) 반응을 이용하여 유전자의 활동도 검사와 유전자 변이의 조사에 사용된다. 수천 수만개의 유전자 조각들이 하나의 microarray에 놓여질 수 있기 때문에 전체 유전자 발현을 한 번의 실험에서 얻을 수 있다. 이런 대량 분석이 가능해지면서 현재까지 여러 암종에서 cDNA microarray를 통한 유전자 분석이 시행되어 암종의 새로운 하위 분류가 제시되거나¹¹ 새로운 진단 표지자나 예후인자들이 밝혀지고 있다.²³⁻²⁶ 신세포암종은 여러 유전자 변이의 축적에 의하여 발생하고 진행된다고 하며, 여러 아형이 존재하고 각각의 예후나 진행이 다르다. 따라서 저자는 본 연구에서 신세포암종과 정상 신장조직을 대상으로 7,500개의 유전자를 포함한 cDNA microarray를 시행하여 신세포암종에서 유전자 발현의 변화를 보고, 이들 중 5배 이상의 변화를 보이는 유전자에 의미를 두고 분석해 보았다.

본 연구에 사용된 신세포암종에서는 60개의 유전자가 5배 이

Table 2. Genes down-regulated greater than 5 fold in renal cell carcinoma

Gene name	Genbank accession No.	Fold change in RCC
Genes for signal transduction		
oncogene WNT5A	W49672	0.077
prostaglandin E receptor 1, 42kDa	AA972293	0.1
phosphodiesterase 5A, cGMP-specific	AI313117	0.167
endothelin 1	H11003	0.167
guanine nucleotide binding protein, beta 5	H08753	0.188
a7 nicotinic cholinergic receptor	AI688045	0.2
pleiotrophic regulator 1	AI671334	0.2
Genes for modulation of transcription		
inhibitor of DNA binding 3, dominant negative HLH protein	AA482119	0.091
SRY-box 8	AA425106	0.143
Tumor suppressor/Tumor antigen		
exostoses-like 2	AA490078	0.1
melanoma antigen, family A, 2	AA905896	0.125
cullin 5	AA086475	0.143
deleted in bladder cancer chromosome region candidate 1	H10959	0.143
Genes for cell cycle-related genes		
latent TGF beta binding protein 2	AA424584	0.134
decarin	H64138	0.142
Genes for metabolism		
mercaptopyruvate sulfurtransferase	AA461065	0.048
ubiquitin-conjugating enzyme E2I	AA487197	0.13
thymidylate synthetase	AA663310	0.143
aldehyde reductase	N93428	0.158
phosphatidylinositol glycan, class F	AA098979	0.176
lysophosphatidic acid phosphatase	AA160670	0.2
Apoptosis-related genes		
Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase	N57766	0.067
Genes for cytoskeleton		
keratin 10	AA479882	0.071
alpha actinin 2 associated LIM protein	AI825953	0.077
calponin 1, basic, smooth muscle	AA398400	0.157
Genes for cell adhesion		
tenascin C	R39239	0.122
collagen type XVII, alpha 1	H87536	0.167
thrombospondin 2	H38240	0.177
collagen, type I, alpha 2	AA490172	0.196
Genes for immune system		
complement component 7	AA598478	0.158
Ig G Fc binding protein	T53389	0.167
Others		
vanin 2	AI983895	0.053
homeobox even-skipped homolog protein 1	AI346582	0.1
surfactant, pulmonary-associated protein C	AA487571	0.111
mucin 1, transmembrane	AA488073	0.167
matrix metalloproteinase 7	AA031514	0.17
smooth muscle myosin heavy chain 11	AA126989	0.185
transgelin	AI668906	0.195
vacuolar proton pump, 16 kDa subunit	AA486080	0.2
B7 protein	N90281	0.2
fragile X mental retardation 1	N48355	0.2
empty spiracles homolog 1	AA775410	0.2

RCC: renal cell carcinoma.

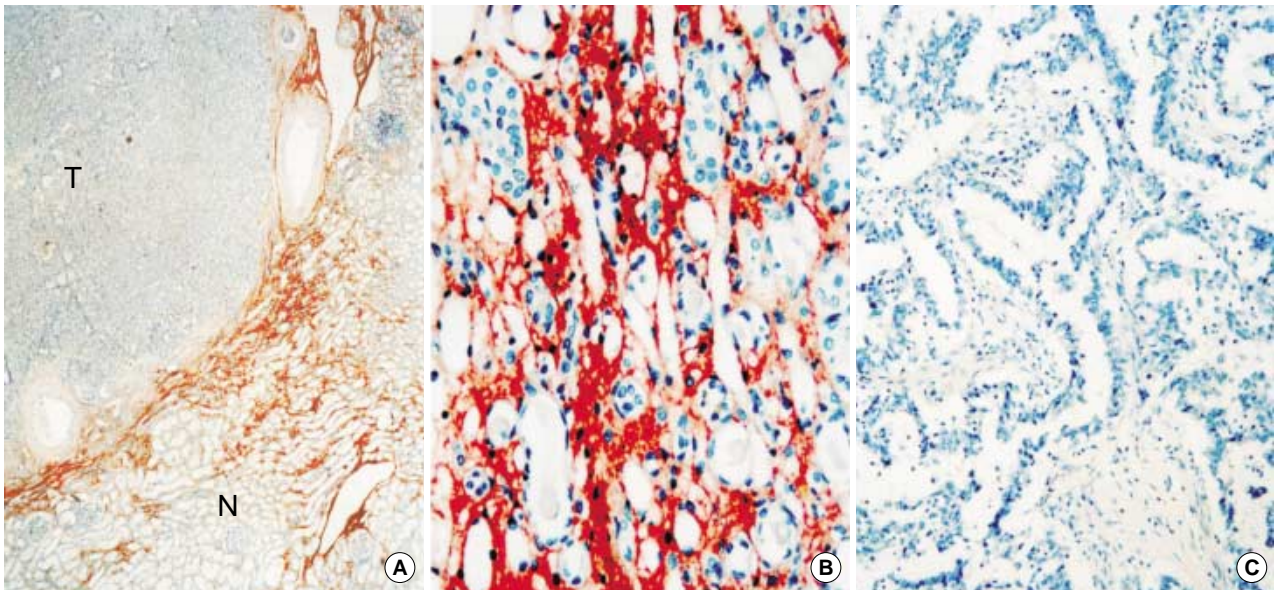


Fig. 2. Immunohistochemical staining of decorin. (A) It shows representative expression of decorin in normal (N) and tumor (T) tissue. (B) Decorin is strongly expressed in normal interstitium. (C) Decorin is reduced expression in tumor stroma.

Table 3. Differential expression of decorin in renal cell carcinoma and non cancerous kidney

	Tumor	Normal	p-value
Decorin expression score (mean±SD)	6.02±3.73	22.21±6.10	0.0012

상의 발현 차이를 보였으며, 이들 중 18개는 5배 이상 증가되었고 42개는 감소되었다(Table 1, 2). 이들 변화를 보이는 유전자들은 주로 신호전달(signal transduction), 대사(metabolism), 세포골격(cytoskeleton), 세포 접합(cell adhesion), 세포 주기 조절(cell cycle control), 전사 조절(modulation of transcription), 종양억제자/종양항원(tumor suppressor/tumor antigen)에 관계되는 것들이었다. 그리고 mRNA를 이용하여 microarray로 유전자 발현을 본 정보가 실제 종양에서 단백질 수준의 발현 정도를 대표할 수 있는지, 그리고 전체 신세포암종에서 유용한 정보인지를 알기 위하여 많은 수의 암종조직에서 면역조직화학 염색을 시행해 보았다.

저자는 microarray 결과 중 신세포암종에서 5배 이상의 감소를 보인 유전자산물 중 decorin을 선택하여 43예의 다양한 신세포암종에서 면역조직화학 염색을 시행했다. Decorin을 선택한 이유는 포르말린 고정조직에서 유용한 일차 항체가 존재하며 다른 여러 암종에서 종양억제작용을 한다는 연구가 발표되어 있었고,¹⁶⁻¹⁸ 만성신장질환과 당뇨병 신증에서 증가한다는 보고는 있지만^{27,28} 신세포암종에서의 발현은 연구된 바가 없기 때문이다. Decorin은 small leucine rich proteoglycan으로 EGFR에 결합하여 이를 활성화시켜 MAP kinase signal pathway가 활성화되면 cyclin-dependent kinase의 억제제인 p21이 유도되어 성

Table 4. Relationship of decorin expression to clinicopathologic features in 43 cases of renal cell carcinoma

	Case No.	Decorin expression score				p value
		1-5	6-10	11-15	16-20	
Age(years)						
≤50	14	5	8	1	0	0.132
>50	29	19	7	2	1	
Sex						
male	30	18	10	1	1	0.727
female	13	7	5	1	0	
Tumor type						
conventional	26	14	9	2	1	0.414
papillary	10	5	4	1	0	
chromophobe	5	4	1	0	0	
collecting duct	2	2	0	0	0	
Fuhrmann grade						
Grade 1	7	4	3	0	0	0.382
Grade 2	13	6	5	1		
Grade 3	16	12	3	1	0	
Grade 4	7	3	4	0	0	
T stage						
T1	19	12	7	0	0	0.520
T2	18	9	6	2	1	
T3a	4	3	1	0	0	
T3b	2	1	0	1	0	

장억제 작용을 일으킨다고 알려져 있다.¹⁵

본 연구에서 decorin은 신장의 피막과 혈관주변, 종양과 정상 조직 사이의 섬유성 격막에서 강하게 발현되었다. 신세포암종 43예 모두에서 종양과 정상신장조직에서의 decorin 발현은 차이가 있었고 종양에서 현저히 감소하였으며 이는 통계학적으로 유의한 차이가 있었다(Table 3). 이는 microarray 결과와 일치하

는 것이며, 이러한 사실로 미루어 보아 decorin이 신세포암종에서도 종양억제 작용이 있을 것으로 생각되었다. 그러나 신세포암종을 환자의 나이, 성별, 조직학적 분류, Fuhrman 핵 등급, T 병기로 나누어 각각에서 종양내 decorin의 발현을 비교한 결과는 모든 변수에서 통계학적 의의는 없는 것으로 나왔다(Table 4). 그러나 decorin이 종양세포가 아닌 세포외기질에 존재하는 것으로 보아 종양의 침윤능이나 혈관형성, 전이 등에 영향을 줄 수 있을 것으로도 생각되며, 따라서 앞으로 신세포암종의 혈관 침윤여부나 림프절이나 타 장기 전이 등의 변수와의 관계를 조사해 보는 것이 중요할 것으로 생각된다.

이상의 실험으로 cDNA microarray를 이용한 유전자 발현변이 분석과 그와 병행한 면역조직화학적 실험이 종양의 기본적인 병리기전을 이해하고 나아가 새로운 진단, 치료인자를 밝혀내는데 중요한 연구가 될 수 있을 것이라고 사료되었다. 그러나 본 연구에서 microarray 결과에서 나타난 유전자 변화 중 이전의 다른 암종에서 알려진 바와는 다른 변화를 보이는 경우도 많았다. 이는 이번 microarray 연구가 육안적으로 절제된 종양조직을 사용하여 아주 다양한 세포로 구성되어 있을 것이므로 변화된 유전자들이 특정 종양세포만을 대표한다고 볼 수는 없으며, 개개인의 유전자 차이와 또한 microarray에 사용되는 mRNA 시료채취과정이나 실험과정 중의 위음성이나 위양성의 가능성도 배제하지는 못한다는 점을 고려해야 할 것이다. 따라서 발현된 유전자의 세포기원을 밝히는 연구와 여러 번의 실험을 통하여 유전자 정보를 축적한다면 이런 실험방법들이 종양의 연구에 좋은 지표가 될 것으로 생각된다.

참고문헌

- Presti JC Jr, Rao PH, Chen Q, *et al.* Histopathological, cytogenetic, and molecular characterization of renal cortical tumors. *Cancer Res* 1991; 51: 1544-52.
- Seizinger BR, Rouleau GA, Ozelius LJ, *et al.* Von Hippel-Lindau disease maps to the region of chromosome 3 associated with renal cell carcinoma. *Nature* 1999; 332: 268-9.
- Gnarra JR, Tory K, Weng Y, *et al.* Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat Genet* 1994; 7: 85-90.
- Ishikawa J, Maeda S, Umezumi K, Sugiyama T, Kamidono S. Amplification and overexpression of the epidermal growth factor receptor gene in human renal-cell carcinoma. *Int J Cancer* 1990; 45: 1018-21.
- Moch H, Sauter G, Gasser TC, *et al.* EGF-r gene copy number changes in renal cell carcinoma detected by fluorescence in situ hybridization. *J Pathol* 1998; 184: 424-9.
- Lager DJ, Slagel DD, Palechek PL. The expression of epidermal growth factor receptor and transforming growth factor alpha in renal cell carcinoma. *Mod Pathol* 1994; 7: 544-8.
- Uhlman DL, Nguyen P, Manivel JC, *et al.* Epidermal growth factor receptor and transforming growth factor alpha expression in papillary and nonpapillary renal cell carcinoma: correlation with metastatic behavior and prognosis. *Clin Cancer Res* 1995; 1: 913-20.
- Drabkin HA, Bradley C, Hart I, Bleskan J, Li FP, Patterson D. Translocation of c-myc in the hereditary renal cell carcinoma associated with a t(3;8)(p14.2;q24.13) chromosomal translocation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 6980-4.
- Yao M, Shuin T, Misaki H, Kubota Y. Enhanced expression of c-myc and epidermal growth factor receptor (C-erbB-1) genes in primary human renal cancer. *Cancer Res* 1988; 48: 6753-7.
- DeRisi J, Penland L, Brown PO, *et al.* Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat Genet* 1996; 14: 457-69.
- Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, *et al.* Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999; 286: 531-7.
- Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, *et al.* Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000; 403: 503-11.
- Fisher LW, Termine JD, Young MF. Deduced protein sequence of bone small proteoglycan I (biglycan) shows homology with proteoglycan II (decorin) and several nonconnective tissue proteins in a variety of species. *J Biol Chem* 1989; 264: 4571-6.
- Ruoslahti E, Yamaguchi Y. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell* 1991; 64: 867-9.
- Moscattello DK, Santra M, Mann DM, McQuillan DJ, Wong AJ, Iozzo RV. Decorin suppresses tumor cell growth by activating the epidermal growth factor receptor. *J Clin Invest* 1998; 101: 406-12.
- Santra M, Skorski T, Calabretta B, Lattime EC, Iozzo RV. De novo decorin gene expression suppresses the malignant phenotype in human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 7016-20.
- Stander M, Naumann U, Dumitrescu L, *et al.* Decorin gene transfer-mediated suppression of TGF-beta synthesis abrogates experimental malignant glioma growth in vivo. *Gene Ther* 1998; 5: 1187-94.
- Nash MA, Loercher AE, Freedman RS. In vitro growth inhibition of ovarian cancer cells by decorin: synergism of action between decorin and carboplatin. *Cancer Res* 1999; 59: 6192-6.
- Grant DS, Yenisey C, Rose RW, Tootell M, Santra M, Iozzo RV. Decorin suppresses tumor cell-mediated angiogenesis. *Oncogene* 2002; 21: 4765-77.
- Sobin LH, Wittekind C. eds. International Union Against Cancer. TNM Classification of Malignant Tumors. 4th ed. New York: Wiley, 1997; 296-302.
- Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1982;

- 6: 655-63.
22. Yang SH, Kim JS, Oh TJ, *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.
23. Sugita M, Geraci M, Gao B, *et al.* Combined use of oligonucleotide and tissue microarrays identifies cancer/testis antigens as biomarkers in lung carcinoma. *Cancer Res* 2002; 62: 3971-9.
24. Xiao SY, Wang HL, Hart J, Fleming D, Beard MR. cDNA arrays and immunohistochemistry identification of CD10/CALLA expression in hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol* 2001; 159: 1415-21.
25. Otsuka M, Kato M, Yoshikawa T, *et al.* Differential expression of the L-plastin gene in human colorectal cancer progression and metastasis. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 289: 876-81.
26. Feng G, Xu X, Youssef EM, Lotan R. Diminished expression of S100A2, a putative tumor suppressor, at early stage of human lung carcinogenesis. *Cancer Res* 2001; 61: 7999-8004.
27. Vleming LJ, Baelde JJ, Westendorp RG, *et al.* Progression of chronic renal disease in humans is associated with the deposition of basement membrane components and decorin in the interstitial extracellular matrix. *Clin Nephrol* 1995; 44: 211-9.
28. Schaefer L, Raslik I, Grone HJ, *et al.* Small proteoglycans in human diabetic nephropathy: discrepancy glomerular expression and protein accumulation of decorin, biglycan, lumican, and fibromodulin. *FASEB J* 2001; 15: 559-61.