

甘菊이 MDCK 세포의 Laminin 합성에 미치는 영향

전 훈* · 나호정 · 전소라 · 차동석 · 은재순 · 임종필 · 신태용 · 오찬호¹ · 양재현 · 김대근 · 임재윤 · 채병숙 · 김성주² · 정연옥³ · 정원환⁴

우석대학교 약학대학, 1: 우석대학교 식품생명공학과, 2: 전북대학교 의과대학,
3: 마산대학교 한약재개발과, 4: 고창국화축제전회

Effect of *Chrysanthemum Morifolium* Extracts on the Synthesis of Laminin of Madin-Darby Canine Kidney Cells

Hoon Jeon*, Ho Jeong Na, Sora Jeon, Dong Seok Cha, Jae Soon Eun, Jong Pil Lim, Tae Yong Shin, Chan Ho Oh¹, Jae Heon Yang, Dae Keun Kim, Jae Yoon Leem, Byeong Suk Chae, Sung Zoo Kim², Yen Ok Jung³, Won Hwan Jeong⁴

College of Pharmacy, 1: Department of Biotechnology Woosuk University,
2: Department of Physiology, Chonbuk National University Medical School,
3: Department of Oriental Herb Science, Masan College, 4: Gochang GukHwa Festival Committee

Basement membranes (BMs) are extracellular matrices associated with epithelia, endothelia, muscle, fat and peripheral nerve. They are involved in cell survival, migration, differentiation. BMs functions also include tissue formation and provide mechanical stability as a selective barriers. Laminins are heterotrimeric glycoproteins found in BMs and have a crucial role in cell adhesion and signalling. Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells are the best established mammalian model for studying epithelial cell biology. The cells form an epithelial monolayer, with tight junctions separating an apical surface from a basolateral membrane facing the filter support and neighboring cells. In this study, using MDCK cells, the synthesis of the BM protein such as laminin with or without methanol extract of *Chrysanthemum morifolium* (CM) stimulation was analyzed by immunoblotting and CM showed significant increased cell density and enhanced synthesis of laminin.

Key words : Basement membranes (BMs), laminin, *Chrysanthemum morifolium* (CM), Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells

서 론

細胞外 matrix는 세포와 세포의 틈을 채워주고, 세포가 조직으로서의 집합체를 형성하는 과정을 돕고 있으며, 세포 자체가 분비한 거대 단백질이나 高分子糖 등으로부터 형성된다. 또한 細胞外 matrix는 뼈와 근육에서 조직의 강도와 유연성을 유지하기 위해 필요하며, 上皮細胞와 內皮細胞層을 받쳐주는 구조, 筋纖維를 에워싸는 筋膜으로서 특히 腎臟에서는 腎系球體의 血液系와 尿管系 사이에서 혈액성분으로부터 단백질을 여과하는 膜으로서

의 기능뿐 아니라 器官形成, 傷處治癒, 神經網形成과 血管新生의 과정에서도 중요한 역할을 하고 있다^{1,2}. 더욱이 癌轉移에도 관여하여 腫瘍세포가 혈류를 타고 轉移, 浸潤함에 있어 血管內皮層을 받쳐주고 있는 基底膜을 관통하지 않으면 안 된다.

基底膜 (basement membrane)은 이와 같은 細胞外 matrix의 일종으로 주요성분으로는 laminin, type IV collagen, heparan sulfate proteoglycan, fibronectin, entactin/nidogen, BM40 (osteonectin, SPARC) 등이 보고되어 있지만, 基底膜의 기본골격은 laminin, type IV collagen 및 entactin이 형성하고 있으며 內皮細胞의 遊走, 增殖, 血管構造의 組織化 등에 관여하고 있다^{2,5}. 內皮細胞의 응집배양에 의한 *in vitro*에서의 capillary-like 세관형성은 laminin과 type IV collagen의 첨가에 의해 촉진되며^{6,7}, 세포의 분화 중에는 많은 단백질의 양적인 변화가 일어나고 세포

* 교신저자 : 전 훈, 전북 완주군 삼례읍 후정리 490 우석대학교 약학대학

· E-mail : jeonh@mail.woosuk.ac.kr, · Tel : 063-290-1577

· 접수 : 2007/04/12 · 채택 : 2007/05/28

의 증식 시에는 laminin, type IV collagen 및 entactin과 같은 단백질들이 합성되어 분비가 촉진되는 것으로 알려져 있다⁸⁾.

基底膜을 구성하는 주요 구성성분 가운데 하나인 laminin은 이형삼중합체 (heterotrimer)의 糖단백질이며 α, β, γ 세 개의 subunit으로 구성되어 있고 5종의 α subunit, 3종의 β subunit, 그리고 3종의 γ subunit가 조합되어 적어도 15개의 assembly form이 존재한다^{9,10)}. 基底膜에 있어서 laminin은 細胞外 matrix의 附着 및 信號傳達에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다¹⁰⁻¹²⁾.

MDCK (Madin-Darby canine kidney) 세포는 개의 腎臟으로부터 확립된 cell line으로서 腎臟의 말초 세관이나 네프론들로부터 유래하여 內皮細胞와 비슷한 형태학적 특성을 가지고 있다. MDCK 세포는 원래 바이러스와 숙주세포와의 관계를 연구하기 위해 개발되었으나 현재는 內皮細胞의 polarization의 모델로서 사용되고 있다. MDCK 세포의 基底膜 구성성분인 laminin, type IV collagen, fibronectin, proteoglycan 등에 대한 합성 능력은 基底膜 연구에 있어서 MDCK가 활용될 수 있음을 시사한다¹³⁾.

本 實驗에 시료로 쓰인 甘菊 (*Chrysanthemum morifolium*, CM)은 국화과 (菊科; Compositae)에 속한 多年生 草本인 菊花의 꽃으로서 甘苦, 微寒하고 肺 · 肝經에 歸經하여 散風清熱 · 平肝明目 등의 효능이 있어 風熱感冒, 頭痛眩暈, 目赤腫痛, 眼目昏花 등을 치료하는 것으로 알려져 있다¹⁴⁾. 현재까지 이루어진 甘菊에 대한 연구를 살펴보면 抗氧化¹⁵⁾, 心血管收縮低下¹⁶⁾, 抗突然變異¹⁷⁾, 抗炎症作用¹⁸⁻²⁰⁾ 등이 밝혀졌지만 甘菊이 基底膜 단백질 가운데 하나인 laminin의 합성 조절에 대한 연구는 보고된 바 없다. 本 연자는 MDCK 세포를 이용하여 세포의 增殖시 甘菊이 laminin의 합성에 미치는 영향에 대해서 조사하였으며, 유의성 있는 결과를 얻었기에 이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 시약 및 기기

실험에 사용한 시약은 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), penicillin-streptomycin, Dulbecco's phosphate buffered saline, Triton-X100, sodium dodecyl sulfate (SDS), phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF), Dimethylsulfoxide (DMSO), 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide, anti-mouse laminin은 Sigma Co.에서 anti-mouse IgG conjugated HRP, nitrocellulose membrane은 Amersham Biosciences에서 fetal bovine serum (FBS), trypsin은 Gibco Co.에서 구입하였으며, 기타 시약은 cell culture용 및 1급 시약을 사용하였다. 사용기구는 culture flask (Nunc), 24 well plate (Costar), CO₂ incubator (Vision scientific Co.), rotary evaporator (EYELA, Japan), freeze dryer (Ilshin, Korea), microplate reader (Tecan, Austria), electrophoresis system (Bio-Lad), ECL kit (Millipore, USA), XAR-5 X-ray film (Kodak) 등을 사용하였다.

2. CM 추출물 제조

본 실험에 사용된 CM은 지리산에서 채취한 것을 사용하였다. 건조된 CM 250 g은 85% 메탄올 6250 ml로 2시간 동안 초음파 추출하였으며, 여과하여 여액을 rotary evaporator로 감압 농축하였다. 농축액은 freeze dryer를 이용하여 동결 건조하였으며, CM 추출물 6.72 g (수득율 2.68%)을 얻었다.

3. 세포배양

MDCK 세포는 Korean Cell Line Bank (KCLB)에서 구입한 것을 실험에 사용하였다. 세포 배양은 10% FBS와 100 unit/ml의 penicillin/streptomycin을 1% 첨가한 DMEM 배지를 사용하였으며, 37℃의 포화 습도가 유지되는 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

4. DNA 함량측정

24 well plate에서 배양한 세포는 Ono 등의 방법²¹⁾에 의하여 CM의 添加 또는 未添加下에서 배양하였으며, DNA 함량 측정도 Ono 등의 방법²¹⁾에 따라 트립신으로 소화한 후 측정하였다.

5. Cell proliferation assay (MTT assay)

MDCK 세포에서 세포의 증식 및 독성에 대한 CM의 효과를 알아보기 위해 MTT assay를 수행하였다. 24-well culture plate에 CM 추출물의 최종농도가 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ 이 되도록 처리하여 42시간 배양하였다. 42시간이 지난 뒤 배양액을 제거하고 PBS로 두 번 washing한 다음 MTT용액을 가하여 37℃에서 incubation 하였다. 세포의 생존도는 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 비교하였다.

6. Western blotting

포집된 세포는 40 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 120 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1mM NaF, 0.1% nonidet P-40, 1 mM Na₃VO₄, P1 cocktail이 포함된 lysis buffer에 4℃에서 1시간 동안 반응시킨 다음 sample buffer와 혼합하여 100℃에서 3분 동안 가열하여 단백질 변성을 유도하였다. 완성된 cell lysate는 Laemmli²²⁾의 불연속완충액계를 사용, 6% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동 한 다음 분리된 gel의 단백질을 nitrocellulose membrane으로 electroblotting에 의해 transfer하였고, membrane은 5% skim milk에 4℃에서 반응시켜 비특이적 단백질을 blocking 하였다. 일차 항체인 anti-laminin을 skim milk에 1: 500으로 희석하여 2시간 동안 항원 항체 반응을 시킨 다음 5분간 3번 PBS-T로 씻어내고 이차 항체인 anti-mouse IgG conjugated HRP를 1시간 30분 반응시킨 후 ECL kit를 사용하여 X-ray film에 감광시켜 발현된 단백질의 양을 분석하였다.

7. 통계처리

본 실험에서 얻은 실험군 간의 데이터는 student's t-test로 분석하여 P값을 구했으며, 대조군과 비교하여 p<0.05 일 때 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결 과

1. MDCK 세포의 증식시 DNA량의 변화

MDCK 세포에 최종농도가 100 $\mu\text{g/ml}$ 이 되도록 감국을 처리하여 42 h 동안 배양한 후 DNA양을 측정된 결과 CM을 처리한 경우는 대조군보다 DNA양이 유의성 있게 증가한 것을 알 수 있었으며, 42 h 경과하면 CM 첨가여부에 관계없이 confluent 상태에 도달하는 것을 알 수 있었다(Fig. 1).

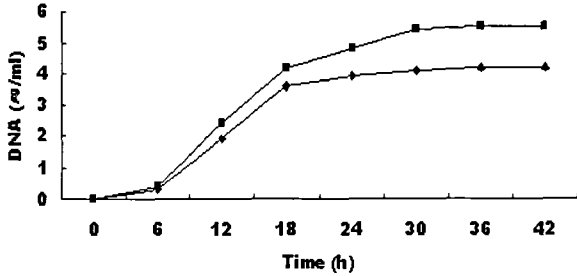


Fig. 1. Effect of CM on growth of MDCK cells. The cells were inoculated on time 0 into 24-well plates at an initial density of 10^3 cells/cm² and grown in DME-FBS with (■) or without (◆) CM (100 $\mu\text{g/ml}$). On the time indicated, the cells were harvested by trypsinization and the amount of DNA per well was assayed. Apparent confluence was reached on 42 h in both cultures.

2. MDCK 세포의 증식에 미치는 CM의 영향

MDCK 세포의 증식에 CM이 미치는 영향은 MTT assay를 통하여 확인하였다. CM을 처리하고 42시간 뒤 세포 생존도를 확인해본 결과 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 유의성 있게 MDCK 세포의 증식이 이루어진 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

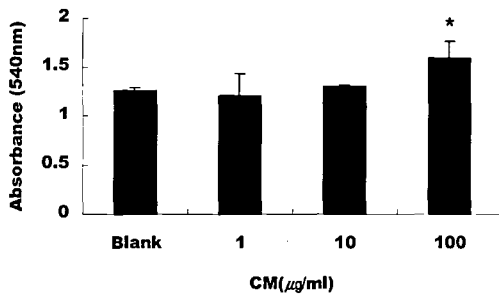


Fig. 2. Effect of CM on viability of MDCK cells. The cells were inoculated into 24-well plates at an initial density of 10^3 cells/cm² and grown in DME-FBS with (1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$) and without (Blank) CM. After 42 h incubation, the cells treated with MTT solution per well were assayed. The addition of CM markedly enhanced cell growth and cell density. * $p < 0.05$; compared with the control group.

3. MDCK 세포에서 CM에 의한 laminin의 합성

MDCK 세포에서 CM이 기저막 구성 단백질 가운데 하나인 laminin의 합성에 미치는 영향을 western blotting으로 분석하였다. CM을 처리하지 않은 control군에 비하여 CM을 처리함에 따라 농도 의존적으로 laminin의 합성이 증가하는 것이

관찰되었다(Fig. 3).

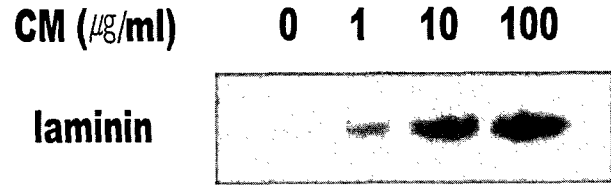


Fig. 3. Effect of CM on laminin synthesis in MDCK cells. MDCK cells were treated CM at the final concentration of 0, 1, 10 and 100 $\mu\text{g/ml}$. Cell lysates were applied to SDS-electrophoresis and western blotted by anti-laminin antiserum.

고 찰

本實驗에 사용된 甘菊은 국화의 꽃으로서 微寒한 性과 甘苦한 味를 가지고 있으며 肺, 肝經으로 歸經하여 風熱感冒, 頭痛眩暈, 目赤腫痛, 眼目昏花를 主治하여 處方에 常用되는 藥物이다. 국화에는 黃菊, 白菊, 野菊의 세 가지 종류가 있는데 공통적으로 疏散風熱, 平肝解毒의 효능을 가지는 반면 黃菊은 疏散風熱을 주로하고, 白菊은 平肝瀉陽에 쓰이며 野菊은 清熱解毒의 특징을 가지는 등 작용에 있어 약간의 차이점이 있다¹⁴⁾. 本實驗에서는 지리산에서 採取한 野菊花를 사용하여 實驗하였으며 現在까지 보고된 甘菊의 抗菌作用²³⁾, 및 抗炎作用¹⁸⁾ 등은 아마도 清熱解毒의 효능이 우수한 野菊에 대한 연구로 생각된다. 그러나 아직 基底膜 단백질과 관련된 甘菊에 대한 연구는 보고된 바 없었기에 本實驗에서는 甘菊이 MDCK 세포의 增殖 및 基底膜을 구성하는 주요 단백질 가운데 하나인 laminin의 합성에 어떠한 영향을 미치는지 조사하였다.

基底膜 (basement membrane)은 細胞外 matrix의 일종으로 上皮 (epithelium)와 內皮 (endothelium)층의 아래쪽에 膜狀構造體를 형성하며 組織의 형성에 관여한다. 幹充織 (mesenchyme)을 基底膜이 뒤덮고, 그 위에 단층의 上皮나 內皮細胞가 퍼져있는 구조를 하고 있다. 조직의 특징은 上皮나 內皮細胞의 성질에 의해 결정되고 基底膜은 빈약한 단층구조를 보강함은 물론 integrin 등의 수용체를 이용 세포골격에도 작용한다. 또한 세포의 極性決定을 포함하여, 다양한 세포의 接着, 伸展, 遊走, 分化 등에 관여하고 癌轉移에도 밀접하게 관여하여 腫瘍細胞가 血管 內皮細胞를 싸고 있는 基底膜을 관통하지 않으면 轉移를 할 수 없다. 基底膜의 구성성분은 laminin, type IV collagen, BM40, entactin, fibronectin, proteoglycan 및 tenascin 등의 糖단백질로 형성되어 있다. 基底膜은 이러한 단백질의 다양한 결합양식에 의한 網狀構造를 형성하고 있으며 type IV collagen이 총 基底膜 단백질의 60% 정도를 차지하고 나머지 부분은 대부분 laminin으로 이루어져 있다.

基底膜을 구성하는 糖단백질인 laminin은 α, β, γ 의 서로 다른 subunit의 조합에 의해 형성되며 각각 disulfide binding에 의한 十字架구조를 이루고 있다. Laminin은 MDCK, CPAE (Calf pulmonary artery endothelial)를 포함한 각종 培養細胞에서 分泌되며 type IV collagen 및 proteoglycan에 강한 친화력을 보이

고 세포接着, 세포間 信號傳達, 正常細胞 및 癌細胞 增殖, 細胞分化 誘導, 癌細胞 轉移 등 여러 세포기능에 參與한다. 또한 laminin은 fibronectin과 더불어 collagen, proteoglycan, 섬유소 등과 결합할 수 있는 부착분자로서 上皮細胞에 있는 laminin receptor와 binding하여 上皮細胞膜과 강하게 결합되어 있다.

癌의 轉移는 다양한 유전자가 參與하는 복합적인 과정으로서 크게 신생혈관의 형성, 細胞外 matrix의 浸潤, 細胞外 matrix에 腫瘍細胞의 부착, 효소에 의한 細胞外 matrix의 분해, 腫瘍細胞의 이동 등의 과정을 거친다. 基底膜은 이러한 암의 전이 과정 가운데 細胞外 matrix에 腫瘍細胞의 부착 및 細胞外 matrix의 분해 과정과 깊은 관련이 있다. 癌細胞 轉移에 있어서 Liotta^{24,25)} 등은 癌細胞가 laminin receptor를 통해 基底膜의 laminin과 결합하여 type IV collagen으로 이루어진 基底膜의 網狀構造를 type IV collagenase와 같은 교원질 분해효소를 분비해 消化하여 轉移가 이루어진다고 하였다. 이 때 laminin은 세포 표면의 laminin receptor와 type IV collagen을 연결하는 架橋 역할을 하게 된다. 특히 陽性腫瘍과 浸潤력이 있는 惡性腫瘍은 laminin과 type IV collagen의 부분적 결손으로 인한 基底膜 손실 여부로 구분이 가능하다. 이러한 浸潤性 腫瘍의 基底膜 소실 기전은 비정상적인 laminin의 형성으로 分泌나 排泄作用의 장애, 基底膜 교체과정과 腫瘍細胞의 laminin 생성 속도의 불일치, 腫瘍細胞의 laminin 생성 및 합성능력의 장애 등이 알려져 있다²⁶⁾.

甘菊을 처리하고 48시간동안 배양한 후 세포의 生存度를 알아본 결과 甘菊은 유익성 있게 MDCK 세포를 增殖시켰다. 또한 MDCK 세포에서 基底膜을 구성하는 단백질 가운데 하나인 laminin의 합성 역시 농도 依存的으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이런 점에서 비추어볼 때 甘菊의 laminin 합성에 대한 촉진 효과는 基底膜을 보다 強化시켜 준다는 측면에서 癌의 轉移를 억제하는데 도움을 줄 수 있을 것으로 생각된다.

결 론

MDCK 세포의 DNA量 및 세포 生存度를 측정된 결과 CM은 MDCK 세포의 增殖를 촉진하였으며, MDCK 세포의 增殖시 基底膜의 주요 구성성분인 laminin의 합성이 CM에 의해 농도 의존적으로 증가되어 癌의 轉移 및 浸潤을 억제하는데 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 고창국화축제전회 및 2007년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (지방연구중심대학육성사업/헬스케어기술개발사업단)

참고문헌

1. Madri, J.A., Williams, S.K. Capillary endothelial cell cultures; phenotypic modulation by matrix components. J.

Cell Biol. 97: 153-165, 1983.
 2. Form, D.M., Pratt, B.M., Madri, J.A. Endothelial cell proliferation during angiogenesis. Lab. Invest. 55: 521-530, 1986.
 3. Madri, J.A., Stenn, K. Aortic endothelial cell migration. Am. J. Pathol. 106: 180-186, 1982.
 4. Repesh, L.A., Fitzgerald, T.J., Furcht, L.T. Fibronectin involvement in granulation tissue and wound healing in rabbits. J. Histochem. Cytochem. 30: 351-358, 1982.
 5. Herbst, T.J., McCarthy, J.R., Tsilibary, E.C., Furcht, L.T. Differential effects of laminin, intact type IV collagen on endothelial cell adhesion and migration. J. Cell Biol. 106: 1365-1373, 1988.
 6. McGuire, P.G., Orkin, R.W. Isolation of rat aortic endothelial cells by primary explant techniques and their phenotypic modulation by defined substrata. Lab. Invest. 57: 94-105, 1987.
 7. Montesano, R., Orci, L., Vassalli, P. In vitro rapid organization of endothelial cells into capillary-like networks is performed by collagen matrices. J. Cell Biol. 97: 1648-1652, 1983.
 8. Aratani, Y., Kitagawa, Y. Enhanced synthesis and secretion of type IV collagen and entactin during adipose conversion of 3T3-L1 cells and production of unorthodox laminin complex. J. Biol. Chem. 263: 16163-16169 1988.
 9. Colognato, H., Yurchenco, P.D. Form and function: the laminin family of heterodimers. Dev. Dyn. 218: 213-234, 2000.
 10. Miner, J.H., Yurchenco, P.D. Laminin functions in tissue morphogenesis. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 20: 255-284, 2004.
 11. Aumailley, M., Smyth, N. The role of laminins in basement membrane function. J. Anat. 193: 1-21, 1998.
 12. Ekblom, M., Falk, M., Salmivirta, K., Durbeek, M., Ekblom, P. Laminin isoforms and epithelial development. Ann. N.Y. Acad. Sci. 857: 194-211, 1998.
 13. Erickson, A.C., Couchman, J.R. Basement membrane and interstitial proteoglycans produced by MDCK cells correspond to those expressed in the kidney cortex. Matrix Biol. 19: 769-778, 2001.
 14. 全國韓醫科大學 本草學教授. 本草學. 永林社, 서울, pp 184-185, 266-267, 2003.
 15. Kim, H.J., Lee, Y.S. Identification of new dicaffeoylquinic acids from Chrysanthemum morifolium and their antioxidant activities. Planta. Med. 71: 871-876, 2005.
 16. Jiang, H., Xia, Q., Xu, W., Zheng, M. Chrysanthemum morifolium attenuated the reduction of contraction of isolated rat heart and cardiomyocytes induced by ischemia/reperfusion. Pharmazie. 59: 565-567, 2004.
 17. Miyazawa, M., Hisama, M. Antimutagenic activity of flavonoids from Chrysanthemum morifolium. Biosci.

- Biotechnol. Biochem. 67: 2091-2099, 2003.
18. Cheng, W., Li, J., You, T., Hu, C. Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of the extracts from the inflorescence of *Chrysanthemum indicum* Linne. *J. Ethnopharmacol.* 101: 334-337, 2005.
 19. Akihisa, T., Yasukawa, K., Oinuma, H., Kasahara, Y., Yamanouchi, S., Takido, M., Kumaki, K., Tamura, T. Triterpene alcohols from the flowers of compositae and their anti-inflammatory effects. *Phytochemistry.* 43: 1255-1260, 1996.
 20. Na, H.J., Cha, D.S., Jeon, S.R., Bu, Y.M., Jeong, W.H., Jeon, H. *Chrysanthemum morifolium* inhibits inflammatory responses in IFN- γ and LPS-induced mouse peritoneal macrophages. *OPEM.* 6: 161-166, 2006.
 21. Ono, M., Aratani, Y., Kitagawa, I., Kitagawa, Y. Ascorbic acid phosphate stimulates type IV collagen synthesis and accelerates adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Exp. Cell Res.* 187: 309-314, 1990.
 22. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685, 1970.
 23. Shunying, Z., Yang, Y., Huaidong, Y., Yue, Y., Guolin, Z. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Chrysanthemum indicum*. *J. Ethnopharmacol.* 96: 151-158, 2005.
 24. Liotta, LA. Tumor invasion and metastases: role of the basement membrane. *Am. J. Pathol.* 117: 339-348, 1984.
 25. Liotta, LA., Rao, CN., Barsky, SH. Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab. Invest.* 49: 636-649, 1983.
 26. Liotta, L.A., Kohn, E.C. Invasion and metasis. In Holland JF, et al (eds): *Cancer Medicine*, 4th ed. Invasion and metastasis. Baltimore, U.S.A., Williams & Wilkins. p 165, 1997.