한국생물공학회지 제18권 제6호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 18, No. 6, 485-489(2003)

혈관내피세포의 이동에 미치는 Hepatocyte Growth Factor의 영향

오 인 숙 · 소 상 섭 · †김 환 규
전북대학교 자연과학대학 생물과학부
(접수 : 2003. 8. 25. 게재승인 : 2003. 12. 24.)

Effect of Hepatocyte Growth Factor on the Migration of Human Umbilical Vein Endothelial Cells

In Suk Oh, Sang Sup So, and Hwan Gyu Kim†
Division of Biological Sciences, College of Natural Sciences, Chonbuk National University, Chonju, Chonbuk 561-756, Korea
(Received : 2003. 8. 25. Accepted : 2003. 12. 24.)

Hepatocyte growth factor (HGF) is a mesenchymal-derived cytokine. It exerts a motogenic effect on various target cells, which is displayed either by cell scattering, locomotion, and migration during the wound repair process of cultured cells, or invasiveness through the extracellular matrix, *in vitro*. Although it is known that HGF influences the motogenic effect of endothelial cells, the precise effects of HGF during migration are still poorly understood. To elucidate the role of HGF in endothelial cell migration, the effect of HGF on endothelial cell migration and MMPs and plasmin production were studied. We found that HGF induces the migration of cultured endothelial cells through increased MMPs and plasmin secretion

Key Words : HGF, HUVECs, migration, MMPs, plasmin

서 론

혈관신생은 기존의 미세혈관으로부터 새로운 혈관이 만들어지는 것으로서 배란, 배발생 및 상처 치유 등 여러 생리적 또는 병리적 조건에서 고도로 조절되는 과정이다(1). 혈관신생이 일어나기 위해서는, 혈관신생 유도인자, 세포-기질 상호작용을 조절하는 인테그린과 세포의 이동, sprout 형성, 혈관 성장에 필요한 기질을 재구성하는 세린계 단백질 및 matrix metalloproteinases (MMPs) 등 여러 요인이 필요하다(2-6). 세포외기질 (extracellular matrix)의 재구성에 관여하는 대표적인 효소로는 MMPs 및 플라스민을 들 수 있다. MMPs는 Zn^{2+}-결합, Ca^{2+}-의존성 endopeptidase로서 세포외 기질을 분해하는데 중요한 역할을 수행하며, 현재까지 24 종류가 알려져 있다(7-9). 대표적인 MMPs로는 MMP-1 (interstitial collagenase), MMP-2 (72 kDa gelatinase A), MMP-9 (92 kDa gelatinase B)과 MMP-3 (stromelysin) 등이 알려져 있다(10, 11). 이 중에서 MMP-2는 젤라틴과 피브로넥틴 같은 세포외기질을 분해하며, 종양이나 종양 주위의 간질조직에서 높게 나타나나 정상인에서도 상처치유, 임신과 분만, 골재생 같은 생리적 작용에 관여한다고 알려져 있다(12, 13). 한편, MMP-2는 내재성 억제제인 tissue inhibitors of metalloproteinase-2 (TIMP-2)와 1:1의 복합체를 형성하는 방법으로 활성이 조절된다(14, 15). TIMP-2는 proMMP-2의 단백질 분해활성을 억제하거나 matureMMP-2의 효소활성을 억제한다고 알려져 있다(16). 즉, MMP-2와 TIMP-2 사이의 양적 균형이 결합조직의 붕괴를 조절하는데 중요할 것이라 여겨진다(17).

Hepatocyte growth factor (HGF)는 mesenchymal-유래 단백질로서(18-21), 내피세포의 증식 및 이동을 일으키는 강력한 혈관신생 유도인자 및 생존인자로 작용한다고 알려져 있다(22). HGF의 혈관신생 유도 능력은 내피세포에 존재하는 막 투과 tyrosine kinase 수용체 결합에 의한 직접작용에 의해 주로 조절되나, 비내피세포 집단으로부터 다른 내피세포의 mitogen을 유도하는 간접적 방식으로 혈관신생이 유도되기도 한다(23-25).

본 연구에서는 human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)을 이용하여 내피세포의 이동과 여기에 관여할 것이라 여겨지는 MMPs 및 플라스민의 분비에 미치는 HGF의 효과를 관찰하였다. HUVECs 세포에 HGF를 처리

† Corresponding Author : Division of Biological Sciences, Chonbuk National University, Chonbuk, Chonju, 561-756, Korea
Tel : 82-63-270-3352, Fax : 82-63-270-3362
E-mail : hgkim@moak.chonbuk.ac.kr

한 결과 혈관내피세포의 이동과 MMPs 및 플라스민의 증가가 유의할만하게 일어났으며, MMPs 및 플라스민 억제제를 이용한 이동 억제효과로부터 HGF에 의한 HUVECs 세포의 이동이 MMPs 및 플라스민의 분비증가에 의한 결과라는 사실을 밝혔다.

재료 및 방법

시약

재조합 hHGF와 antiplasmin은 R & D System (Minneapolis, MN)로부터 구입하였다. MMPs 및 플라스민 스탠다드는 Cal-Biochem (La Jolla, CA)과 Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany)으로부터 구입하였으며 TIMP1, TIMP2, MMP-1, MMP-2, MMP-3와 MMP-9 enzyme immunoassay kits는 Fuji Chemical Industries (Toyama, Japan)로부터 구입하였다. BB-94는 British Biotechnology (Oxford, UK)로부터 구입하였고 배지 및 혈청은 Life Technology Inc. (Gaitherburg, MD)로부터, 그 외 특별히 적시하지 않은 시약은 Sigma사 (St. Louis, MO)로부터 구입하여 사용하였다.

세포배양

HUVECs 세포는 Kwak 등(26)의 방법에 따라 human umbilical cord를 collagenase로 소화시켜 분리하였으며, 배양된 세포가 내피세포에서 유래됐다는 것은 anti-von Willebrand factor antibody를 이용한 면역형광 염색방법으로 확인하였다. 이렇게 얻어진 혈관내피세포를 20% FBS (v/v) 첨가 Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)에서 37℃, 5% CO_2 조건으로 배양하였다. 본 연구에 사용된 primary 세포의 계대 수는 2~6 사이였다.

혈관내피세포의 Migration Assay

혈관내피세포의 migration assay는 modified 48-well Boyden 챔버 (Neuroprobe, Cabin John, MD)를 이용하여 수행하였다(27). 먼저 bovine serum albumin (BSA)이 들어있는 M199 배지에 지시된 만큼의 HGF를 가한 다음 챔버의 bottom 또는 upper well에 놓고, polycarbonate 필터 (8 μm pores, Poretics, Livermore, CA)를 50 μg/ml의 피브로넥틴과 0.2%의 젤라틴으로 코팅한 다음 upper 챔버와 HGF 용액 사이에 방치하였다. 세포를 트립신 처리한 후 M199 배지로 2회 세척하고 1% BSA에 재현탁하였다. 이후, upper 챔버의 각 well에 $5x10^4$ 세포를 접종한 다음 37℃, 5% CO_2 조건으로 12시간 동안 배양한 후 면봉으로 필터의 위쪽으로부터 이동하지 않은 세포를 제거하였다. 필터를 메탄올로 고정한 다음, 슬라이드 위에서 Diff-Quik 용액 (HEMA-3 stain set; Biochemical Sciences, Swedesbord, NJ)으로 염색한 후, 현미경을 이용하여 (100X) 이동한 세포를 계수하였다.

분비된 MMPs 및 TIMPs에 대한 Enzyme Immunoassay

HUVECs 세포를 24-well plate에 세포밀도가 $5x10^4$ cell/cm^2이 되도록 접종한 다음, 20% FBS (v/v) 첨가 DMEM 배지에서 24시간 배양한 후 confluent한 HUVECs 세포를 무-혈청 및 무-phenol red 배지에서 24시간 동안 배양하였다. 세포를 새로운 배지로 세척한 다음 대조완충용액 혹은 지시된 시약을 지정된 시간만큼 처리하였다. 분비된 MMPs 및 TIMPs의 실제양은 제조회사의 지시에 따라 enzyme immunoassay kits (Fuji Chemical Industries, Toyama, Japan)로 측정하였다.

Zymography

MMPs 및 플라스민의 기질 분해 활성은 젤라틴 및 피브린 zymography를 행하여 확인하였다(17, 28). HUVECs 세포를 24-well plate에 세포밀도가 $5x10^4$ cell/cm^2이 되도록 접종한 다음, 20% FBS (v/v) 첨가 DMEM 배지에서 24시간 배양하였다. 이후, 새로운 배지로 세척한 다음 confluent한 HUVECs 세포를 무-혈청 및 무-phenol red 배지에서 대조완충용액 혹은 HGF를 처리한 후 12시간 동안 배양하였다. 젤라틴 zymography는 MMPs의 기질인 젤라틴을 SDS-PAGE의 running gel에 첨가한 후 reducing 조건에서 전기영동한 다음 1% Triton X-100 완충용액에서 재변성시킨 다음 배양 완충용액 (0.05 M Tris-HCl, pH 7.5, 0.02 M NaCl, 5 mM $CaCl_2$, 0.02% Brij-35)에서 16시간 반응시켰다 (37℃). 이후 0.5% Coomassie brilliant blue R250으로 3시간 염색시킨 다음, 10% acetic acid, 30% 메탄올에서 투명한 밴드가 나타날 때까지 탈색시켰다. 플라스민 활성은 기질로서 피브린을 첨가하여 피브린 zymography를 행하여 확인하였다.

통계처리

자료는 평균 ± SD로 나타냈으며, 유의성은 Student-Newman-Keuls test에 의한 one-way ANOVA를 이용하여 검사하였다. 통계적 유의성은 $P < 0.05$를 기준으로 하였다.

결과 및 고찰

HUVECs 세포의 이동에 미치는 HGF의 효과

혈관신생의 초기과정에서 혈관신생 유도인자의 자극에 의한 내피세포의 증식 및 이동이 중요한 역할을 수행한다고 알려져 있다. 혈관내피세포의 이동에 미치는 HGF의 효과를 확인하고자 microcarrier beads (diameter 175 μm; Sigma)에 HUVECs 세포를 2~3일간 배양하여 bead 당 약 25~30 세포가 confluent하게 단일층을 형성하도록 하였다. 이렇게 HUVECs 세포로 덮힌 microcarrier beads를 젤라틴 처리된 plastic dishes에 대조완충용액을 첨가하여 배양한 결과, 약 78~83 세포가 이동되었으며, 10 ng/ml의 HGF 처리에 의해 HUVECs 세포의 이동이 약 3.3배 촉진되었으며, 농도 의존적으로 세포의 이동이 증가하였다(Fig. 1). 이러한 결과는 HGF가 HUVECs 세포에서 강력한 이동 유도인자라는 사실을 나타내주고 있으며, 다른 유형의 내피세포에서 관찰된 결과와 일치하였다(29-31).

HUVECs 세포로부터 MMPs 및 TIMPs 분비

*In vivo*에서 내피세포가 이동하기 위해서는 인접한 세포외 기질을 분해하여야만 한다(32). 이 과정에 주된 역할을 하는 효소로 세린계 단백질분해효소 및 MMPs가 알려져 있으며

(4-6), MMPs는 활성화되기 전까지는 내재적 억제인자인 α2-macroglobulin 또는 TIMPs에 의해 그 활성이 조절된다고 알려져 있다(9, 33). HGF에 의해 HUVECs 세포로부터 분비되는 배양배지를 이용하여 enzyme immunoassay를 행한 결과, HGF의 첨가 (10 ng/ml)에 의해 MMP-2 및 MMP-3의 분비양이 약 3.3배 및 6.1배씩 증가되었다(Fig. 2A). 특히, MMP-3의 경우, 대조군도 18 ng/10^6 cells로 많은 양이 분비되었고 HGF 첨가에 의해 두드러진 분비증가 효과를 나타냈다. 이는 세포외기질 및 기저막 단백질의 분해에 젤라틴 분해효소 (MMP-2와 MMP-9) 뿐만 아니라 MMP-3 (stromelysin -1)도 중요한 역할을 할 것임을 시사하고 있다. 한편, HGF 첨가 (10 ng/ml)에 의한 TIMPs 분비효과를 관찰한 결과, TIMP-1은 대조군에 비해 약 1.8배 분비가 증가되었으나, TIMP-2는 대조군에 비해 약 3.1배 분비가 억제되었다(Fig. 2B). 이것은 MMP-2와 TIMP-2가 1:1의 복합체를 형성하는 방법으로 효소의 활성이 조절된다는 이전의 연구(14-15)를 뒷받침하는 결과라 할 수 있다. 즉, MMP-2와 TIMP-2 사이의 양적 균형이 결합조직의 붕괴를 조절하는데 중요할 것이라 여겨진다.

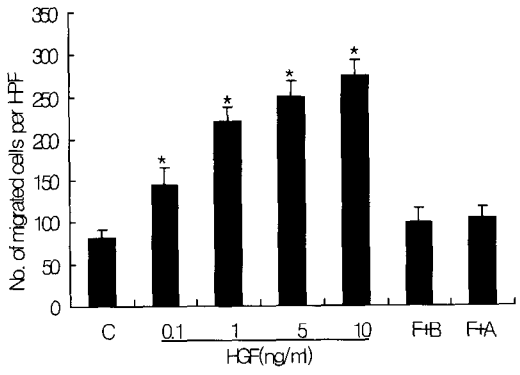

Figure 1. Effects of HGF, BB-94 and α_2-antiplasmin on migratory activity in HUVECs. A modified Boyden chamber was used to examine directional migratory activity. Cells grown on microcarrier beads were treated various amounts of HGF, HGF (10 ng/ml) plus BB-94 (20 ng/ml) (F+B), and HGF plus α_2-antiplasmin (100 mU) (F+A). HPF indicates high-power field (X100). Data are means±SD from three independent experiments. Statistical significance was tested using one-way ANOVA followed by the Students *t* test. $^*P < 0.05$ versus control buffer.

Zymographic analysis

MMP-2 및 MMP-9의 활성을 정확히 확인하기 위해서는 젤라틴 zymography가 요구된다. 젤라틴 zymography를 이용하여 HGF에 의한 MMP-2 및 MMP-9의 분비양을 조사한 결과, MMP-2는 약 1.8배, MMP-9은 약 2.4배 증가하여 enzyme immunoassay 결과와 유사한 분비양상을 보여주었다(Fig. 3). 이들 결과로부터 HGF가 혈관내피세포의 이동에 필수적인 MMP-2 및 MMP-9의 효과적인 유도인자임을 확인할 수 있었다. 또한 HGF의 자극에 반응하여 *in vitro*의 피브린 젤 상에서 내피세포가 이동하기 위해서는 피브린 분해효소의 분비가 필수적이다. 현재까지 피브린 분해효소 활성을 조절하는 내피세포의 능력은 주로 플라스민에 의한다고 알려져 있다(34). 본 연구에서 플라스민의 분비를 피브린 zymography를 행하여 확인한 결과, Fig. 4에서 보는 바와 같이 대조군과 비교하여 HGF 처리 (10 ng/ml)에 의해 플라스민의 분비양이 약 3.8배 증가되었다. 이러한 결과는 HGF 처리가 plasminogen activator (uPA) 같은 물질을 활성화시켜 plasminogen으로부터 플라스민을 생성시킨다는 연구 결과와 연관성이 있다(28). 이러한 개념은 HGF 처리 후 시간경과에 따른 uPA에 대한 Northern 혼성화 연구를 통해 추후 확인할 계획이다.

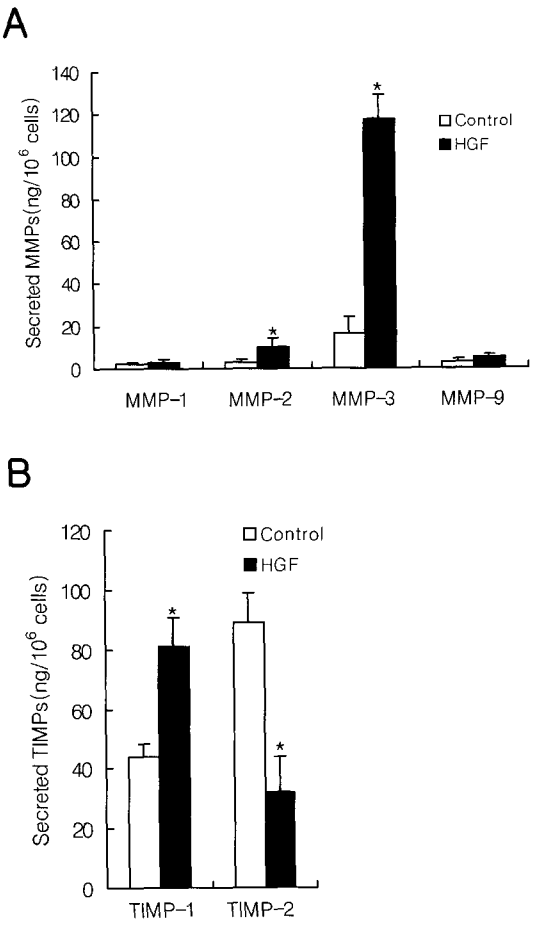

Figure 2. Effects of HGF on the secretion of MMPs (A) and TIMPs (B) in HUVECs. Cells were incubated in serum and phenol red-free DMEM for 12 h. Then, control buffer or HGF (10 ng/ml) was added to 0.5 ml culture medium, incubated for 12 h, and media were quantitatively assayed by enzyme immunoassay. Bars represent the means±SD from three independent experiments. Statistical significance was tested using one-way ANOVA followed by the Students *t* test. $^*P < 0.05$ versus control buffer.

혈관내피세포의 이동에 미치는 MMPs 및 플라스민의 효과

혈관내피세포의 이동은 혈관신생의 초기단계에 일어난다(1). 즉, 세포외기질 및 기저막 단백질을 뚫고 혈관내피세포가 이동하기 위해서는 이들을 분해할 수 있는 효소의 분비가 반드시 요구된다. 따라서 HGF에 의한 내피세포 이동효과

(Fig. 1)에 근거해 볼 때, HGF에 의해 유도된 내피세포의 이동에 MMPs 및 플라스민이 직접 관여할 것이라 추측할 수 있다. 이러한 가설을 확인하기 위해 내피세포에 MMPs 및 플라스민의 억제제를 전처리 한 다음 내피세포의 이동을 관찰하였다. 그 결과, 광범위 MMPs-억제제인 BB-94 (20 ng/ml)를 처리한 경우와 플라스민 억제제인 α_2-antiplasmin (100 mU)을 처리한 경우 모두 HGF에 의해 유도된 혈관내피세포의 이동을 거의 완벽하게 억제하였다(Fig. 1). 이런 결과로부터, HGF에 의한 내피세포의 이동촉진 효과는, 부분적으로 MMPs 및 플라스민의 분비증가를 통하여 이루어진다고 볼 수 있다.

이상의 결과를 요약하면, HGF는 HUVECs 세포에서 MMP-2, MMP-3, MMP-9 및 플라스민의 분비증가를 일으켰으며, HGF에 의해 분비가 증가된 단백질분해효소에 의해 세포외기질 및 기저막 단백질로의 혈관내피세포의 이동이 촉진되고, 결과적으로 혈관신생을 유도할 것이라 사료된다.

요 약

HGF는 내피세포의 증식 및 이동을 일으키는 강력한 혈관신생 유도인자 및 생존인자로서 작용한다고 알려져 있다. 본 연구에서는 HUVECs 세포를 이용하여 내피세포의 이동 및 단백질분해효소의 분비에 미치는 HGF의 효과를 확인하였다. 그 결과, HGF 처리 (10 ng/ml)에 의해 HUVECs 세포의 이동이 약 3.3배 촉진되어, HGF가 HUVECs 세포에서 강력한 이동 유도인자라는 사실을 확인하였다. 내피세포의 이동에 관여할 것이라 여겨지는 MMPs, TIMPs 및 플라스민의 분비에 미치는 HGF의 효과를 관찰한 결과, HGF에 의해 MMP-2 및 MMP-3의 분비양이 각각 3.3배와 6.1배씩 증가되었다. HGF에 의한 TIMPs 분비효과를 관찰한 결과, TIMP-1은 대조군에 비해 약 1.8배 분비가 증가되었으나, TIMP-2는 대조군에 비해 약 3.1배 분비가 억제되었다. 또한, 광범위 MMPs-억제제인 BB-94 (20 ng/ml) 및 플라스민 억제제인 α_2-antiplasmin (100 mU)을 처리했을 때, HGF에 의해 유도된 혈관내피세포의 이동이 거의 완벽하게 억제되었다. 결론적으로, HGF는 HUVECs 세포에서 MMP-2, MMP-3, MMP-9, TIMP-1 및 플라스민의 분비 증가를 일으켰으며, HGF에 의해 분비가 증가된 단백질분해효소에 의해 세포외기질 및 기저막 단백질로의 혈관내피세포의 이동이 촉진되고, 결과적으로 혈관신생을 유도할 것이라 사료된다.

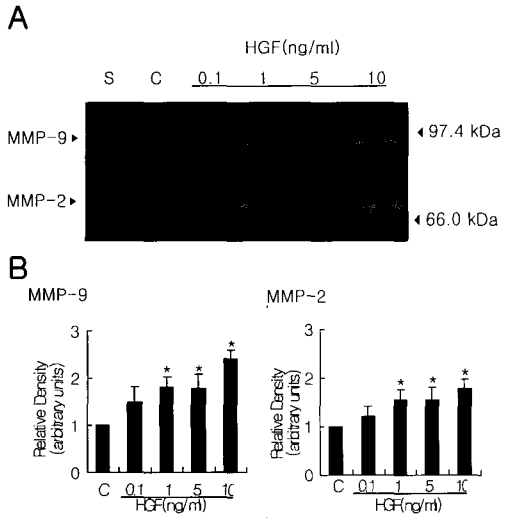

Figure 3. Gelatin zymography of MMPs in culture medium of HUVECs treated with HGF. (A) Cells were incubated in serum and phenol red-free DMEM for 12 h. Then, the cells were incubated for 12 h after addition of control buffer (C) or HGF (0.1, 1, 5, 10 ng/ml, respectively). Equal amounts of proteins (10 μg/lane) from supernatants was loaded into each lane. Lane S contains standards of MMPs. (B) Densitometric analyses of the zymographs are presented as the relative ratio of induction of the MMPs by addition of HGF. The MMPs secretion by addition of control buffer for 12 h is arbitrarily presented as 1. Data are means±SD from three independent experiments. Statistical significance was tested using one-way ANOVA followed by the Students *t* test. $^*P < 0.05$ versus control buffer.

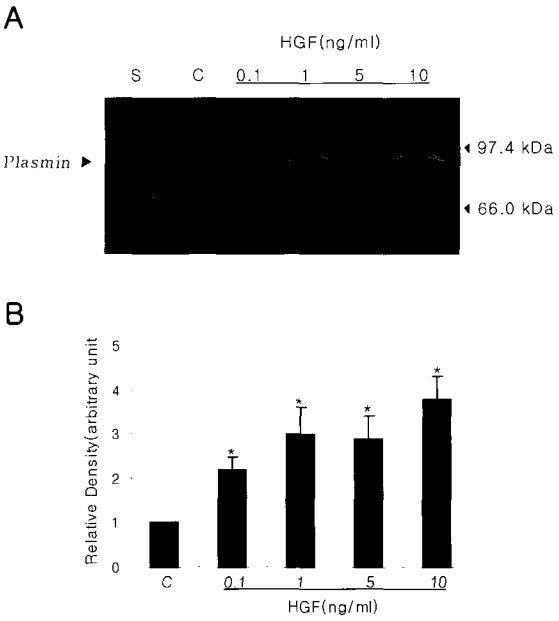

Figure 4. Fibrin zymography of plasmin in culture medium of HUVECs treated with HGF. (A) Cells were incubated in serum and phenol red-free DMEM for 12 h. Then, the cells were incubated for 12 h after addition of control buffer (C) or HGF (0.1, 1, 5, 10 ng/ml, respectively). Equal amounts of proteins (10 μg/lane) from supernatant was loaded into each lane. Lane S contains standards of plasmin. (B) Densitometric analyses of the zymographs are presented as the relative ratio of induction of the plasmin by addition of HGF. The plasmin secretion by addition of control buffer for 12 h is arbitrarily presented as 1. Data are means±SD from three independent experiments. Statistical significance was tested using one-way ANOVA followed by the Students *t* test. $^*P < 0.05$ versus control buffer.

감 사

본 연구는 전북대학교 2002년도 후반기 신임교수연구비에 의해 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Risau, W. (1997), Mechanisms of angiogenesis, *Nature* **386**, 671-674.
2. Millauer, B., S. Wizigmann-Voos, H. Schnurch, R. Martinez, N. P. Moller, W. Risau, and A. Ullrich (1993), High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis, *Cell* **72**, 835-846.
3. Brooks, P. C., R. A. Clark, and D. A. Cheresh (1994), Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis, *Science* **264**, 569-571.
4. Bergers, G., R. Brekken, G. McMahon, T. H. Vu, T. Itoh, K. Tamaki, K. Tanzawa, P. Thorpe, S. Itohara, Z. Werbm, and D. Hanahanm (2000), Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis, *Nat. Cell Biol.* **2**, 737-744.
5. Zhou, Z., S. S. Apte, R. Soininen, R. Cao, G. Y. Baaklini, R. W. Rauser, J. Wang, Y. Cao, and K. Tryggvason (2000), Impaired endochondral ossification and angiogenesis in mice deficient in membrane-type matrix metalloproteinase I, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 4052-4057.
6. Pepper, M. S. (2001), Extracellular proteolysis and angiogenesis, *Thromb. Haemost.* **86**, 346-355.
7. Coussens, L. M. and Z. Werb (1996), Matrix metalloproteinases and the development of cancer, *Chem. Biol.* **3**, 895-904.
8. Nelson, A. R., B. Fingleton, M. L. Rothenberg, and L. M. Matrisian (2000), Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications, *J. Clin. Oncol.* **18**, 1135-1149.
9. Overall, C. M. and C. Lopez-Otin (2002), Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era, *Nat. Rev. Cancer* **2**, 657-672.
10. Frederick, J. and J. F. Jr. Woessner (1998), The matrix metalloproteinase family, In *Matrix metalloproteinases,* W. C. Parks and R. P. Mecham, Eds., pp.1-14, Academic Press, London.
11. Matrisian, L. M. (1992), The matrix-degrading metalloproteinases, *BioAssays* **14**, 455-463.
12. Anita, E. Y., A. N. Murphy, and W. G. Stetler-Stevenson (1998), 72 kDa gelatinase(gelatinase A): structure, activation, regulation, and substrate specificity, In *Matrix metalloproteinases,* W. C. Parks and R. P. Mecham, Eds., pp.85-113, Academic Press, London.
13. Liotta, L. A., P. S. Steeg, and W. G. Stetler-Stevenson (1991), Cancer metastasis and angiogenesis: An imbalance of positive and negative regulation, *Cell* **64**, 327-336.
14. Stetler-Stevenson, W. G., S. Azanvoorian, and A. Liotta (1993), Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis, *Annu. Rev. Cell Biol.* **9**, 541-573.
15. Nagase, H. (1997), Activation mechanisms of matrix metalloproteinases, *J. Biol. Chem.* **378**, 151-160.
16. Ward, R. V., S. J. Atkinson, P. M. Slocombe, A. J. Docherty, J. J. Reynolds, and G. Murphy (1991), Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 inhibits the activation of 72 kDa progelatinase by fibroblast membranes, *Biochem. Biophys. Acta.* **1079**, 242-246.
17. Kim, H. G. and G. Y. Koh (2000), Lipopolysaccharide activates matrix metalloproteinase-2 in endothelial cells through an NF-kB-dependent pathway, *Biochem. Biophys. Res. Commu.* **269**, 401-405.
18. Morimoto, A., K. Okamura, R. Hamanaka, Y. Sato, N. Shima, K. Higashio, and M. Kuwano (1991), Hepatocyte growth factor modulates migration and proliferation of human microvascular endothelial cells in culture, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **179**, 1042-1049.
19. Bussolino, F., M. F. Di Renzo, M. Ziche, E. Bocchietto, M. Olivero, L. Naldini, G. Gaudino, L. Tamagnone, A. Coffer, and P. M. Comoglio (1992), Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth, *J. Cell Biol.* **119**, 629-641.
20. Grant, D. S., H. K. Kleinman, I. D. Goldberg, M. Bhargava, B. J. Nickoloff, J. L. Kinsella, P. Polverini, and E. M. Rosen (1993), Scatter factor induces blood vessel formation *in vivo, Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 1937-1941.
21. Rosen, E. M., K. Lamszus, J. Laterra, P. J. Polverini, J. S. Rubin, and I. D. Goldberg (1997), HGF/SF in angiogenesis, *Ciba Found Symp.* **212**, 15-226.
22. Hayashi, S., R. Morishita, J. Higaki, M. Aoki, A. Moriguchi, I. Kida, S. Yoshiki, K. Matsumoto, T. Nakamura, Y. Kaneda, and T. Ogihara (1996), Autocrine-paracrine effects of overexpression of hepatocyte growth factor gene on growth of endothelial cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **220**, 539-545.
23. Rosen, E. M. and I. D. Goldberg (1997), Regulation of angiogenesis by scatter factor, *EXS* **79**, 193-208.
24. Silvagno, F., A. Follenzi, M. Arese, M. Prat, E. Giraudo, G. Gaudino, G. Camussi, P. M. Comoglio, and F. Bussolino (1995), *In vivo* activation of met tyrosine kinase by heterodimeric hepatocyte growth factor molecule promotes angiogenesis, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **15**, 1857-1865.
25. Belle, V. E., B. Witzenbichler, D. Chen, M. Silver, L. Chang, R. Schwall, and J. M. Isner (1998), Potentiated angiogenic effect of scatter factor/hepatocyte growth factor via induction of vascular endothelial growth factor: the case for paracrine amplification of angiogenesis, *Circulation* **97**, 381-390.
26. Kwak, H. J., J. N. So, S. J. Lee, I. Kim, and G. Y. Koh (1999), Angiopoietin-1 is an apoptosis survival factor for endothelial cells, *FEBS Lett.* **448**, 249-253.
27. Kim, I., H. G. Kim, S. O. Moon, S. W. Chae, J. N. So, K. N. Koh, B. C. Ahn, and G. Y. Koh (2000), Angiopoietin-1 induces endothelial cell sprouting through the activation of focal adhesion kinase and plasmin secretion, *Circ. Res.* **86**, 952-959.
28. Klein, S., F. G. Giancotti, M. Presta, S. A. Albelda, C. A. Buck, and D. B. Rifkin (1993), Basic fibroblast growth factor modulates integrin expression in microvascular endothelial cells, *Mol. Biol. Cell* **4**, 973-982.
29. Lala, P. K. and C. Chakraborty (2003), Factors regulating trophoblast migration and invasiveness: possible derangements contributing to pre-eclampsia and fetal injury, *Placenta* **24**, 575-587.
30. Mine. S., T. Fujisaki, C. Kawahara, T. Tabata, T. Iida, M. Yasuda, T. Yoneda, and Y. Tanaka (2003), Hepatocyte growth factor enhances adhesion of breast cancer cells to endothelial cells *in vitro* through up-regulation of CD44, *Exp. Cell Res.* **288**, 189-197.
31. Ding. S., T. Merkulova-Rainon, Z. C. Han, and G. Tobelem (2003), HGF receptor up-regulation contributes to the angiogenic phenotype of human endothelial cells and promotes angiogenesis *in vitro, Blood* **101**, 4816-4822.
32. Stetler-Stevenson, W. G. (1999), Matrix metalloproteinases in angiogenesis : a moving target for therapeutic intervention, *J. Clin. Invest.* **103**, 1237-1241.
33. Nagase, H. and J. F. Jr. Woessner (1999), Matrix metalloproteinases, *J. Biol. Chem.* **274**, 21491-21494.
34. Hajjar, K. A. (1995), Changing concepts in fibrinolysis, *Curr. Opin. Hematol.* **2**, 345-350.