

혈관내피세포의 발아에 미치는 fibroblast growth factor-2의 효과

김 환 규*

전북대학교 자연과학대학 생물과학부

Received October 29, 2003 / Accepted February 9, 2004

Effect of Fibroblast Growth Factor-2 on the Sprouting in Vascular Endothelial Cells. Hwan Gyu Kim*. *Division of Biological Sciences, Chonbuk National University, Chonju, 561-756, Korea*—The sprouting of vascular endothelial cells is an initial step in angiogenesis. Matrix metalloproteinases can associate with integrin on the surface of endothelial cells, thereby promoting angiogenesis. The purpose of this study was to test if fibroblast growth factor-2 (FGF-2) can regulate the sprouting in porcine pulmonary artery endothelial cells. FGF-2 induced sprouting and secretion of MMP-2 and plasmin. FGF-2 also induced the expression of integrin Mac-1, which is inhibited IS20I. Addition of BB-94, α_2 -antiplasmin and IS20I inhibited FGF-2-induced sprouting activity. Therefore, FGF-2-induced sprouting activity in PPAECs may be accomplished by secretion of proteinases such as MMP-2 and plasmin and integrin expression.

Key words – FGF-2, MMPs, plasmin, integrin

혈관신생(angiogenesis)은 정상조직의 성장과 암세포 등 병적인 조직의 시발 및 전이에 꼭 필요한 과정이며, 그 초기 단계에 여러 종류의 단백질분해효소 및 이들의 억제물질이 관여한다고 알려져 있다. 혈관신생이 일어나기 위해서는 혈관신생 유도인자에 의해 혈관 내피세포의 벽을 구성하는 세포들의 증식, 이동 및 발아(sprouting)가 요구되는데[28,35], 이때 혈관 성장에 필요한 기질을 재구성하는 단백질분해효소가 필요하다[6,33,38]. 혈관신생 과정에 이상이 생기면 류마티스성 관절염, 당뇨병성 망막증, 종양의 성장 및 전이 등이 활발하게 일어난다[11].

내피세포는 세포외기질을 분해할 수 있는 단백질분해효소를 방출하며 세포외기질의 분해에 의해 혈관신생시 내피세포의 이동에 필요한 공간이 확보된다고 알려져 있다[9,34]. 이러한 효소들 중의 일부가 matrix metalloproteinases(MMPs)와 플라스민이다. MMPs는 Zn^{2+} -의존성 endopeptidase로서 세포외기질을 분해하는 능력을 갖고 있으며[24,37], 지금까지 24종류가 알려져 있다[32]. 세포외기질의 재구성 과정에 중요한 역할을 하는 MMPs로는 MMP-1 (type I collagenase), MMP-2 (72 kDa gelatinase A), MMP-9 (92 kDa gelatinase B)과 MMP-3 (stromelysin) 등이 알려져 있다[12,26]. 이 중에서 MMP-2는 젤라틴과 피브로넥틴 같은 세포외기질을 분해하며[2], MMP-2 mRNA는 상처치유, 임신과 분만, 골재생 같은 생리적 작용이 일어나는 부위 및 종양이나 종양 주위의 간질조직에서도 높게 나타난다고 알려져 있다[25]. 또한 MMP-2는 세포외기질 단백질의 특정 결합을 분해시켜 장기간에 걸친 혈관재구성을 유도하기도 한다[8,13].

인테그린은 콜라겐, 엘라스틴, 피브로넥틴과 라미닌-5 같은 주된 세포외기질 단백질에 대한 수용체를 포함하여 최소한 21개의 heterodimeric 복합체로 이루어진 다유전자군으로서, 인테그린과 세포외기질의 접촉이 MMPs의 발현과 기능을 조절할 수 있고[29], 내피세포의 표면에서 인테그린 $\alpha(v)$ beta3와 MMP-2가 상호작용하며[36], 인테그린이 혈관신생 조절자로서 MMP-2의 생성을 유도한다고 알려져 있다[3].

한편, fibroblast growth factor-2(FGF-2)는 평활근 세포의 성장, 상처치유 및 조직재생, hematopoiesis와 내피세포의 분열, 이동 등 혈관신생을 유도하며, 신경계의 분화 및 기능조절에도 중요한 역할을 수행한다고 알려져 있다[4,7,16]. FGF-2는 혈관신생과정 동안 MMP-1, urokinase type plasminogen activator (uPA), plasminogen activator inhibitor (PAI-1), uPA 수용체 및 인테그린 등 여러 분자들의 발현을 조절하는데, 이러한 분자들은 내피세포의 혈관신생 과정에서 나타나는 침윤성 표현형 발현에도 관여한다[23,27,30,31].

본 연구는 FGF-2를 이용하여 혈관내피세포의 발아에 미치는 효과를 확인하고, MMPs와 플라스민의 분비 및 인테그린 발현양상을 조사하였다. 그 결과, FGF-2에 의해 유도된 혈관내피세포의 발아 증가는 MMP-2 및 플라스민의 분비증가와 인테그린 Mac-1의 발현 증가에 의한 것이라고 생각되었다.

재료 및 방법

시약

재조합 hFGF-2와 α_2 -antiplasmin은 R & D System (Minneapolis, MN)로부터 구입하였다. MMPs 및 플라스민 스탠다드는 Cal-Biochem (La Jolla, CA)과 Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany)으로부터 구입하였으며 MMP-1, MMP-

*Corresponding author

Tel : +82-63-270-3352, Fax : +82-63-270-3362

E-mail : hgkim@moak.chonbuk.ac.kr

2, MMP-3와 MMP-9 enzyme immunoassay 키트는 Fuji Chemical Industries (Toyama, Japan)로부터 구입하였다. BB-94는 British Biotechnology (Oxford, UK)로부터 구입하였고, IS20I는 Dupont Pharmaceuticals (Billerica, MA)로부터 구입하였다. 배지 및 혈청은 Life Technology Inc. (Gaithersburg, MD)로부터, 그의 특별히 적시하지 않은 시약은 Sigma사(St. Louis, MO)로부터 구입하여 사용하였다.

세포배양

Porcine pulmonary artery endothelial cells (PPAECs)은 Kim 등[20]의 방법에 따라 porcine pulmonary artery를 collagenase로 소화시켜 분리하였으며, 배양된 세포가 내피세포에서 유래했다는 것은 anti-von Willebrand factor 항체를 이용한 면역형광 염색방법으로 확인하였다. 이렇게 얻어진 혈관내피세포를 20% FBS (v/v) 첨가 Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)에서 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다. 본 연구에 사용된 primary 세포의 세대 수는 2~6 사이였다.

혈관내피세포의 발아 Assay

혈관내피세포의 발아 assay는 Kim 등[20]의 방법을 따라 행하였다. 즉, PPAECs 세포를 microcarrier beads (직경 175 µm; Sigma)상에서 융합상태로 성장시킨 다음 2.0%의 FBS와 지시된 만큼의 FGF-2 및 시약이 포함된 2.5 mg/ml fibrinogen 겔에 방치시켰다. 피브린 겔을 DMEM 배지에서 24시간마다 동량의 FGF-2 및 지시된 시약을 첨가하면서 배양한 다음, 3일째에 도립현미경을 이용하여(100X) 발아된 세포의 수를 세었다.

분비된 MMPs에 대한 Enzyme Immunoassay

PPAECs 세포를 24-well plate에 세포밀도가 5×10^4 cell/cm²이 되도록 접종한 다음, 20% FBS (v/v) 첨가 DMEM 배지에서 24시간 배양한 후 융합된 PPAECs 세포를 무-혈청 및 무-phenol red 배지에서 24시간 동안 배양하였다. 세포를 새로운 배지로 세척한 다음 대조완충용액 혹은 지시된 시약을 지정된 시간만큼 처리하였다. 분비된 MMPs의 실제양은 제조회사의 지시에 따라 enzyme immunoassay 키트(Fuji Chemical Industries, Toyama, Japan)로 측정하였다.

Zymography

MMPs 및 플라스민의 기질 분해 활성은 젤라틴 및 피브린 zymography를 행하여 확인하였다[21]. PPAECs 세포를 24-well plate에 세포밀도가 5×10^4 cell/cm²이 되도록 접종한 다음, 20% FBS (v/v) 첨가 DMEM 배지에서 24시간 배양하였다. 이후, 새로운 배지로 세척한 다음 PPAECs 세포를 무-혈청 및 무-phenol red 배지에서 대조완충용액 혹은 FGF-2 및 지시된 시약을 처리한 후 12시간 동안 배양하였다. 젤라

틴 zymography는 MMPs의 기질인 젤라틴을 SDS-PAGE의 running 겔에 첨가한 후 환원조건에서 전기영동한 다음 1% Triton X-100 완충용액에서 재변성시킨 후 배양 완충용액 (0.05M Tris-HCl, pH 7.5, 0.02 M NaCl, 5 mM CaCl₂와 0.02% Brij-35)에서 16시간 반응시켰다(37°C). 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.

Western hybridization

단백질을 10% SDS-polyacrylamide 겔 상에서 분리한 다음, nitrocellulose 막으로 옮긴 후, 막을 2% skim milk 함유 TBS 완충용액에 넣어 막의 비특이성 부위들을 차단하였다. 완충용액을 제거한 다음, 막을 anti-integrin Mac-1 (eBioscience, San Diego, CA)을 이용하여 제조회사의 지시에 따라 immunoblotting을 행하였다.

통계처리

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

결과 및 고찰

발아에 미치는 FGF-2의 효과

혈관내피세포의 발아는 혈관신생의 시작단계이다[22]. 혈관내피세포의 발아에 미치는 FGF-2의 효과를 확인하고자 microcarrier beads에 PPAECs 세포를 2~3일간 배양하여 bead 당 약 25~30 세포가 융합된 상태의 단일층을 형성하도록 한 다음, 이들 beads를 3차원-피브린 겔에 매몰시켜 배양하였다. 24시간마다 FGF-2를 첨가(0.1~10 ng/ml) 하면서 조사한 결과, 10 ng/ml에서 약 3.5배 증가되는 등 농도-의존적으로 발아율이 증가되었다(Fig. 1). 이러한 결과는 angiopoietin-1을 이용한 Kim 등[19]의 결과와 일치하는 것으로, FGF-2가 혈관내피세포에서 발아를 유도하여 혈관신생을 증가시킨다고 생각되었다.

MMPs 및 플라스민의 분비에 미치는 FGF-2의 효과

*In vivo*에서 내피세포가 이동하기 위해서는 인접한 세포의 기질을 분해하여야만 한다. 이 과정에 주된 역할을 하는 효소로 MMPs 및 플라스민이 알려져 있다[7,14]. 따라서 FGF-2에 의해 유도된 발아는 MMPs 및 플라스민의 분비증가에 의한 세포외기질의 재구성에 의한 것이라 생각할 수 있다. 이를 확인하기 위해, PPAECs 세포에 FGF-2를 처리한 다음, PPAECs 세포로부터 분비되는 배양배지를 이용하여 몇 종류의 MMPs에 대한 enzyme immunoassay를 행한 결과(Fig. 2),

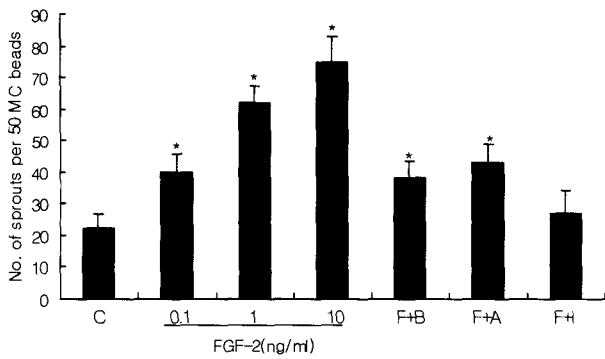


Fig. 1. Effect of fibroblast growth factor-2 (FGF-2) on sprouting activity in porcine pulmonary artery endothelial cells (PPAECs). Cells grown on microcarrier beads were placed in fibrin gels containing control buffer (C), FGF-2 (0.1, 1, 10 ng/ml, respectively), FGF-2 (10 ng/ml) plus BB-94 (20 ng/ml)(F+B), and FGF-2 plus α_2 -antiplasmin (100 mU)(F+A) or FGF-2 plus IS20I (10 μ g/ml)(F+I) and were incubated with daily supplementation with the same amount of indicated reagents. Number of endothelial sprouts with length exceeding the diameter of the microcarrier beads (175 μ m) per 50 microcarrier beads was counted after 3 days. Data are mean \pm SD from three experiments. * P <0.05 vs control.

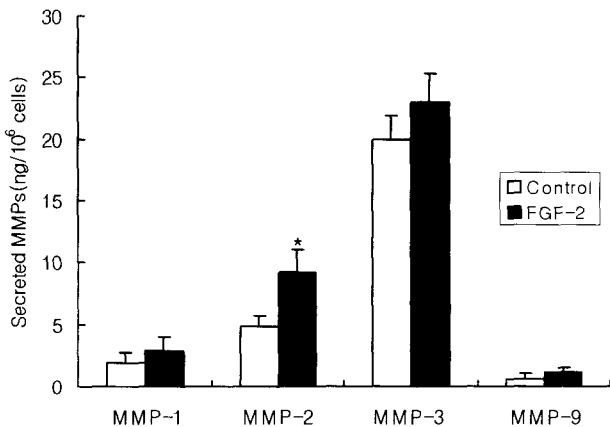


Fig. 2. Effects of FGF-2 on the secretion of MMPs in PPAECs. Cells were incubated in serum and phenol red-free DMEM for 12 h. Then, control buffer or FGF-2 (10 ng/ml) was added to 0.5 ml culture medium, incubated for 12 h, and media were quantitatively assayed by enzyme immunoassay. Bars represent the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

MMP-2의 분비만 약 1.9배 증가되었다. MMP-1 및 MMP-3는 FGF-2에 의해 유의할만한 증가가 나타나지 않았으며, 특히 하게 MMP-3는 혈관신생인자의 처리 없이도 많은 양이 분비되었다. MMP-9은 0.6~1.2 ng/10⁶ cells 정도로 분비량이 적었다. 이러한 결과는 정상 조직의 지속적인 성장과정 및 혈

관신생시에 MMP-2가 중요한 역할을 할 것[17,34]이란 결과와 일치한다.

Zymography에 의한 MMPs 및 플라스민의 FGF-2-유도 분비 증가효과

MMPs의 활성을 정확히 확인하기 위해서는 젤라틴 zymography가 요구된다. 젤라틴 zymography를 이용하여 FGF-2에 의한 MMPs의 분비량을 조사한 결과, 대조군에 비해 pMMP-2(약 68 kDa)는 약 1.9배 증가하였으며, MMP-9은 검출이 불가능하여 enzyme immunoassay 결과와 유사한 양상을 보여주었다(Fig. 3). 또한 pMMP-2 보다 약간 큰 젤라틴 분해 밴드(약 74 kDa)도 관찰되었다. 광범위 MMPs 억제제인 BB-94(20 ng/ml)를 전처리한 경우, MMP-2의 분비가 거의 완벽하게 억제되었으며, pMMP-2의 활성화에 관여한다고 알려진 플라스민의 억제제(α_2 -antiplasmin, 100 mU)는 MMP-

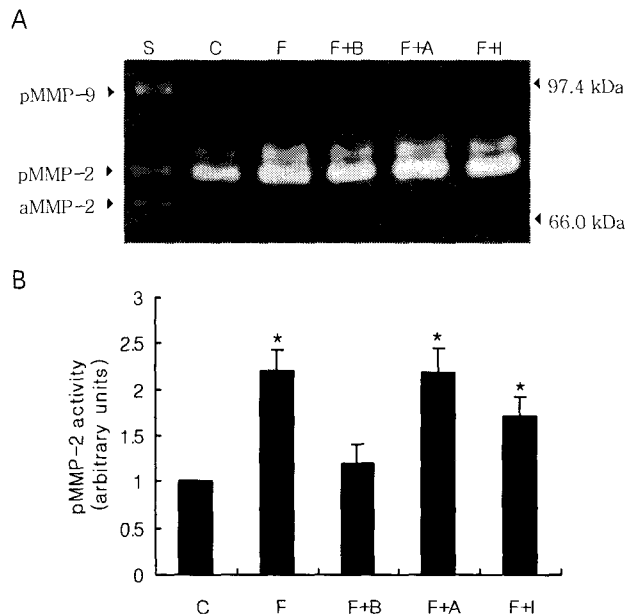


Fig. 3. Gelatin zymography of MMPs in culture medium of PPAECs. (A); Cells were incubated in serum and phenol red-free DMEM for 12 h. Then, the cells were incubated for 12 h after addition of control buffer (C), FGF-2 (10 ng/ml), FGF-2 (10 ng/ml) plus BB-94 (20 ng/ml)(F+B), FGF-2 plus α_2 -antiplasmin (100 mU)(F+A) and FGF-2 plus IS20I(10 μ g/ml)(F+I). Equal amounts of proteins(10 μ g/lane) from supernatant 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 MMP-2 by addition of indicated reagents to PPAECs. The MMP-2 secretion by addition of control buffer for 12 h is arbitrarily presented as 1. Data are means \pm SD from three independent experiments. Statistical significance was tested using one-way ANOVA followed by the Students *t* test. * P <0.05 vs control buffer.

2의 분비에 거의 영향을 미치지 못하였다. 인테그린 억제제인 IS20I는 MMP-2의 분비를 부분적으로 억제하였다. 이러한 결과는, FGF-2에 의한 내피세포의 발아 촉진 효과가, 부분적으로는 MMP-2의 분비증가를 통하여 이루어진다고 볼 수 있으며 Hofmann 등[18]의 결과와 일치하였다. 그러나 본 연구에서 검출된 MMP-2는 불활성형이므로 세포외기질의 재구성 및 이를 통한 발아에는 MMP-2의 활성화가 반드시 요구되므로, 추후 MMP-2의 활성화에 관여하는 또 다른 인자의 탐색을 통해 보다 정확한 발아기작을 이해하고자 한다.

한편, *in vitro* 피브린 겔에서 FGF-2에 반응하여 발아되기 위해서는 내피세포가 피브린 분해효소를 분비하여야 한다. 피브린 분해활성을 조절할 수 있는 내피세포의 능력은 주로 플라스민에 의한다고 알려져 있다[15]. 예상한대로 FGF-2에 의해 플라스민의 분비가 약 2.6배 증가하였으며, MMPs 억제제 및 인테그린 억제제에 의해 유의할만한 감소가 나타났다 (Fig. 4). 또한 플라스민 억제제인 α_2 -antiplasmin에 의해서

플라스민의 분비가 완전히 억제되었다. 이러한 결과는 플라스민의 분비기작에 MMPs 및 인테그린-의존적 경로가 존재할 가능성을 제시하고 있다.

인테그린 Mac-1의 발현이 sprouting에 미치는 효과

생리적인 상태와 병리적인 상태 모두에서 세포내 침윤은 세포외기질의 분해, 세포간 부착 및 탈착 그리고 세포외기질 구성성분에 대한 세포의 부착 및 탈착 등이 요구된다. 이러한 모든 과정은 단백질분해효소 및 부착분자의 상호조절된 발현에 좌우되며, 기능적으로 활성을 띤 MMP-2의 세포 표면에서의 축적은 인테그린에 의해 조절된다고 알려져 있다[10]. 또한 melanoma 세포의 침윤에는 인테그린 $\alpha_v\beta_3$ 의 협동적 발현이 필요하다는 사실이 밝혀지기도 했다[18]. 따라서 본 연구에서도 FGF-2에 의한 발아 증가, MMP-2 및 플라스민의 증가가 인테그린과 관계가 있는지를 확인한 결과(Fig. 5), FGF-2에 의해 인테그린 Mac-1의 발현이 농도-의존적으로 증가되었다. 또한 인테그린 억제제인 IS20I를 전처리한 결과, 인테그린 Mac-1의 발현이 완전히 억제되었다. IS20I는 많은 종양세포 및 내피세포에서 혈관신생을 억제하며 동시에 유사분열 억제 및 항이동 효과를 나타냈고, 고농도의 IS20I는 내피세포 및 종양세포의 apoptosis를 유도한다고 알려져 있다[5]. 본 연구에서도 유사한 결과를 얻었는데, FGF-2에 의한 발아 유도효과는 IS20I 처리에 의해 거의 완벽하게 억제되었으며 (Fig. 1), MMP-2 (Fig. 3) 및 플라스민(Fig. 4)의 분비도 유의할만하게 감소되었다. 이상의 결과를 요약하면, FGF-2에 의해 유도된 혈관내피세포의 발아 증가는 MMP-2 및 플라스민의 분비증가와 인테그린 Mac-1의 발현증가에 의한 것이라 생각된다.

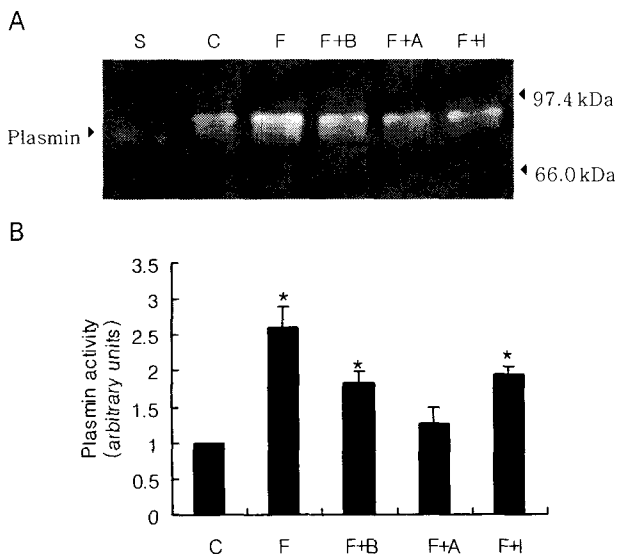


Fig. 4. Fibrin zymography of plasmin in culture medium of PPAECs. (A); Cells were incubated in serum and phenol red-free DMEM for 12 h. Then, the cells were incubated for 12 h after addition of control buffer (C), FGF-2 (10 ng/ml), FGF-2 (10 ng/ml) plus BB-94 (20 ng/ml)(F+B), FGF-2 plus α_2 -antiplasmin (100 mU) (F+A) and FGF-2 plus IS20I (10 μ g/ml)(F+I). Equal amounts of proteins (10 μ g/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 FGF-2 to PPAECs. The plasmin secretion by addition of control buffer for 12 h is arbitrarily presented as 1. Data are means \pm 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.

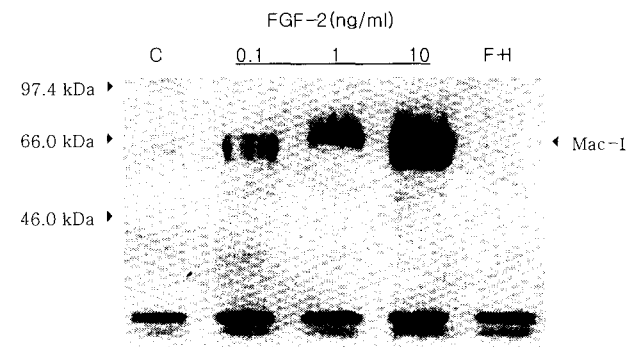


Fig. 5. IS20I inhibits FGF-2-induced integrin Mac-1 expression. PPAECs were grown in 100-mm dishes to 90% confluence, incubated with control buffer (C), FGF-2 (0.1, 1, 10 ng/ml, respectively) and FGF-2 (10 ng/ml) plus IS20I (10 μ g/ml)(F+I) for 12 h. 15 μ g of protein (total cell lysate) was used for western blot. The protein was separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose, and probed with anti-integrin Mac-1. A representative blot from three experiments is shown.

요 약

본 연구에서는 FGF-2를 이용하여 혈관내피세포의 발아와 단백질분해효소의 분비 및 인테그린과의 관계를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

PPAECs 세포의 발아에 미치는 FGF-2의 효과를 조사한 결과, 10 ng/ml에서 약 3.5배 증가되는 등 농도-의존적으로 발아가 증가되었다. MMPs에 대한 enzyme immunoassay 결과, MMP-2에서만 약 1.9배의 분비증가가 유도되었다. MMP-1 및 MMP-3는 FGF-2에 의해 유의할만한 분비 증가가 나타나지 않았으며, 특이하게 MMP-3는 FGF-2의 처리 없이도 많은 양이 분비되었고, MMP-9은 0.6~1.2 ng/10⁶ cells 정도로 분비량이 적었다. FGF-2에 의한 플라스민의 분비증가 여부를 확인한 결과, 10 ng/ml에서 약 2.6배 증가하였으며, MMPs 억제제 및 인테그린 억제제에 의해 유의할만한 감소가 나타났고 플라스민 억제제인 α_2 -antiplasmin에 의해서는 플라스민의 분비가 완전히 억제되었다. 또한, FGF-2 처리에 의해 농도-의존적으로 인테그린 Mac-1의 발현이 증가되었으며, 인테그린 억제제인 IS20I를 전처리한 결과, 인테그린 Mac-1의 발현이 완전히 억제되었다. FGF-2에 의한 발아 유도효과는 IS20I 처리에 의해 거의 완벽하게 억제되었으며, MMP-2 및 플라스민의 분비도 유의할만하게 감소시켰다. 이상의 결과를 요약하면, FGF-2에 의해 유도된 혈관내피세포의 발아 증가는 MMP-2 및 플라스민의 분비증가와 인테그린 Mac-1의 발현 증가에 의한 것이라 생각된다.

참 고 문 헌

- Agren, M. S. 1994. Gelatinase activity during wound healing. *Br. J. Dermatol.* **131**, 634-640.
- Anita, E. Y., A. N. Murphy and W. G. Stetler-Stevenson. 1998. 72 kDa gelatinase (gelatinase A): structure, activation, regulation, and substrate specificity, pp. 85-113, *In Parks, W. C. and R. P. Mecham (eds.), Matrix Metalloproteinase*, Academic Press., London.
- Bafetti, L. M., T. N. Young, Y. Itoh and M. S. Stack. 1998. Intact vitronectin induces matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinases-2 expression and enhanced cellular invasion by melanoma cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 143-149.
- Basilico, C. and D. Moscatelli. 1992. The FGF family of growth factors and oncogenes. *Adv. Cancer Res.* **59**, 115-165.
- Bello, L., V. Lucini, C. Giussani, G. Carrabba, M. Pluderi, F. Scaglione, G. Tomei, R. Villani, P. M. Black, A. Bikfalvi and R. S. Carroll. 2002. IS20I, a specific α v β 3 integrin inhibitor, reduces glioma growth *in vivo*. *Neurosurgery* **52**, 177-185.
- Bergers, G., R. Brekken, G. McMahon, T.H. Vu, T. Itoh, K. Tamaki, K. Tanzawa, P. Thorpe, S. Itohara, Z. Werb and D. Hanahan. 2000. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat. Cell Biol.* **2**, 737-744.
- Bikfalvi, A. and Z. C. Han. 1994. Angiogenic factors are hematopoietic growth factors and vice versa. *Leukemia* **8**, 523-529.
- Birkedal-Hansen, H. 1995. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 728-735.
- Birkedal-Hansen, H., W. G. I. Moore and M. K. Bodeen. 1993. Matrix metalloproteinase. *Crit. Rev. Oral Med.* **4**, 197-250.
- Brooks, P. C., S. Stromblad, L. C. Sanders, T. L. von Schalscha, R. T. Aimes, W. G. Stetler-Stevenson, J. P. Quigley and D. A. Cheresh. 1996. Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin α v β 3. *Cell* **85**, 683-693.
- Folkman, J. and Y. Shing. 1992. Angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **267**, 10931-10934.
- Frederick, J. and J. F. Jr. Woessner. 1998. The matrix metalloproteinase family, pp. 1-14, *In Parks, W. C. and R. P. Mecham (eds.), Matrix Metalloproteinase*, Academic Press., London.
- Giannelli, G., J. Falk-Marzillier, O. Schiraldi, W. G. Stetler-Stevenson and V. Quaranta. 1997. Induction of cell migration by matrix metalloproteinase-2 cleavage of laminin-5. *Science* **277**, 225-228.
- Grant, D. S. and H. K. Kleinman. 1997. Regulation of capillary formation by laminin and other components of the extracellular matrix. *EXS* **79**, 317-333.
- Hajjar, K. A. 1995. Changing concepts in fibrinolysis. *Curr. Opin. Hematol.* **2**, 345-350.
- Hanneken, A., P. A. Maher and A. Baird. 1995. High affinity immunoreactive FGF receptors in the extracellular matrix of vascular endothelial cells implications for the modulation of FGF-2. *J. Cell Biol.* **128**, 1221-1228.
- Herrera-Velitz, P. and N. E. Reiner. 1996. Bacterial lipopolysaccharide induces the association and coordinate activation of p53/56lyn and phosphatidylinositol 3-kinase in human monocytes. *J. Immunol.* **156**, 1157-1165.
- Hofmann, U. B., J. R. Westphal, E. T. Waas, J. C. Becker, D. J. Ruiter and G. N. van Muijen. 2000. Coexpression of integrin α (v) β 3 and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) coincides with MMP-2 activation: correlation with melanoma progression. *J. Invest. Dermatol.* **115**, 625-632.
- 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.
- Kim, I., S. O. Moon, K. N. Koh, H. Kim, C. S. Uhm, H. J. Kwak, N. G. Kim and G. Y. Koh. 1999. Molecular cloning, expression, and characterization of angiopoietin-related protein induces endothelial cell sprouting. *J. Biol. Chem.* **274**, 26523-26528.
- Kim, H. G. and G. Y. Koh. 2000. Lipopolysaccharide activates matrix metalloproteinase-2 in endothelial cells

- through an NF- κ B-dependent pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **269**, 401-405.
22. Klagsburn, M. and P. D'Amore. 1991. Regulators of angiogenesis. *Ann. Rev. Physiol.* **53**, 217-239.
 23. 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.
 24. Lamoreaux, W. J., M. E. C. Fitzgerald, A. Reiner, K. A. Hasty and S. T. Chares. 1998. Vascular endothelial growth factor increase release of gelatinase A and decrease of tissue inhibitor of metalloproteinases by microvascular endothelial cells *in vitro*. *Microvas. Res.* **55**, 29-42.
 25. 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.
 26. Matrisian, L. M. 1992. The matrix-degrading metalloproteinases. *BioAssays* **14**, 455-463.
 27. Mignatti, P. and D. B. Rifkin. 1993. Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol. Rev.* **73**, 161-195.
 28. Millauer, B., S. Witzmann-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.
 29. Mitra, A., J. Chakrabarti and A. Chatterjee. 2003. Binding of alpha5 monoclonal antibody to cell surface alpha5beta1 integrin modulates MMP-2 and MMP-7 activity in B16F10 melanoma cells. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* **22**, 167-178.
 30. Montesano, R. 1992. Regulation of angiogenesis *in vitro*. *Eur. J. Clin. Invest.* **22**, 504-515.
 31. Morrison, R. S., S. Giordano, F. Yamaguchi, S. Hendrickson, M. S. Berger and K. Palczewski. 1993. Basic fibroblast growth factor expression is required for clonogenic growth of human glioma cells. *J. Neurosci. Res.* **34**, 502-509.
 32. 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.
 33. Pepper, M. S. 2001. Extracellular proteolysis and angiogenesis. *Thromb. Haemost.* **86**, 346-355.
 34. Pepper, M. S., R. Montesano, S. J. Mandriota, L. Orci and J. D. Vassalli. 1996. Angiogenesis: a paradigm for balanced extracellular proteolysis during cell migration and morphogenesis. *Enzyme Protein* **49**, 138-162.
 35. Risau, W. 1997. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* **386**, 671-674.
 36. Silletti, S., T. Kessler, J. Goldberg, D. L. Boger and D. A. Cheresh. 2001. Disruption of matrix metalloproteinase 2 binding to integrin alpha vbeta 3 by an organic molecule inhibits angiogenesis and tumor growth *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 119-124.
 37. Woessner, J. F. Jr. 1994. The family of matrix metalloproteinase. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **732**, 11-21.
 38. 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.