

U-373-MG 세포에서 MMPs 및 플라스민의 분비에 미치는 오디 추출물의 효과

이 숙 희 · † 김 환 규

전북대학교 자연과학대학 생물과학부, 생리활성물질연구소
(접수 : 2007. 10. 17., 게재승인 : 2008. 4. 11.)

Effect of Mulberry Extracts on Secretion of MMPs and Plasmin in U-373-MG Cells

Suk Hee Lee and Hwan Gyu Kim†

Division of Biological Sciences, Research Center of Bioactive Materials, Chonbuk National University,
Chonju, Chonbuk 561-756, Korea

(Received : 2007. 10. 17., Accepted : 2008. 4. 11.)

In order to sprout and migrate, cells must secrete proteinases which are degrading the surrounding extracellular matrix. In this study, we examined the effect of mulberry extracts and combination of mulberry extracts and VEGF on human malignant glioma U-373-MG cells. Mulberry extracts induced the secretion of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and suppressed the secretion of MMP-2 and plasmin. Mulberry extracts inhibited the VEGF-induced MMP-2, MMP-9 and plasmin secretion. It is therefore, suggested that mulberry extracts can suppress the VEGF-induced tumor angiogenesis in U-373-MG cells. Also, mulberry extracts induced the secretion of MMP-9 and plasmin through PI 3'-kinase pathway in U-373-MG cells.

Key Words : mulberry, MMP, plasmin, VEGF

서 론

오디 (Mulberry fruit)는 뽕나무과 (Moraceae)에 속하는 뽕나무 (*Morus alba* L.)의 열매로서 주로 안토시아닌 계열의 색소를 가지고 있다. 안토시아닌 색소는 노화 억제, 당뇨 병성 망막장애의 치료(1, 2) 및 항산화 작용(3-5) 등 다양한 생리활성을 갖는 것으로 알려져 있다. 또한 오디에는 항균 및 항염증 물질로 알려진 2-arylbenzofuran 유도체와 암, 염증 및 고혈압 예방 효과를 지닌 레스베라트롤 (resveratrol) 유도체 등 여러 생리활성물질이 함유되어 있음이 밝혀지고 있다(6, 7).

혈관신생은 정상조직의 성장과 암세포 등 병적인 조직의 시발 및 전이에 꼭 필요한 과정이며, 그 초기 단계에 여러 종류의 단백질분해효소 및 이들의 억제물질이 관여한다고 알려져 있다(8). 혈관신생이 일어나기 위해서는 혈관신생

유도인자에 의해 혈관 내피세포의 벽을 구성하는 세포들의 증식, 이동 및 발아가 요구되는데(9), 이 때 혈관 성장에 필요한 기질을 재구성하는 단백질분해효소가 필요하다(10). 이러한 단백질분해효소에는 대표적으로 MMPs와 플라스민이 있다. MMPs는 아연 의존성 endopeptidase로서 세포외기질을 분해하는 능력을 갖고 있으며(11, 12), 지금까지 26종류가 알려져 있다(13). MMP-9 (gelatinase B)은 호중구, 대식세포와 결합조직세포 등을 포함하는 염증세포에 의해 불활성형으로 생성되었다가 92 kDa의 활성형으로 전환되어 Type IV, V 콜라겐과 엘라스틴을 분해한다(14). MMP-2는 젤라틴과 피브로넥틴 같은 세포외기질을 분해하며, 종양이나 종양 주위의 간질조직에서 높게 나타나나 정상인에서도 상처 치유, 임신과 분만, 골재생 같은 생리적 작용에 관여한다고 알려져 있다(15).

Vascular endothelial growth factor (VEGF)는 내피세포에 특이적으로 작용하는 성장인자로서 저산소증, 혈류량의 증가 및 에너지 대사의 변화에 의해 활성화된 후 내피세포의 활성을 유도하여 증식과 분화를 촉진함으로써 혈관의 생성 및 성장을 촉진하는 성장인자이다(16, 17). VEGF는 혈관 투과성을 증가시켜 혈류 순환과정에서 fibrinogen 같은 거대

† Corresponding Author : Division of Biological Sciences, Research Center of Bioactive Materials, Chonbuk National University, Chonju, Chonbuk 561-756, Korea

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

E-mail : hgkim@chonbuk.ac.kr

분자들의 혈관외유출을 유도하며, 종양세포뿐 아니라 혈관 내피세포의 이동과 재구성을 위한 피브린 젤 기질층을 제공하기도 한다(18). 또한 VEGF는 모든 암세포에서 분비되는데(19), 분비된 VEGF는 기존 혈관들로부터 새로운 혈관을 형성하고, 새로 형성된 혈관으로부터 영양분과 산소를 공급받아 암세포 성장을 도모하며, 또한 이 과정 중에 세포 주위의 기질 단백질을 분해하는 효소를 활성화시킨다고 알려져 있다(20).

본 연구에서는 U-373-MG 세포를 이용하여 혈관신생의 초기과정에 관여하는 단백질분해효소의 분비에 미치는 오디 추출물의 효과에 대해 확인하고자 하였다. 연구결과, U-373-MG 세포에 오디 추출물을 50~600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리한 결과, MMP-2의 분비는 거의 완벽하게 억제되었으며, MMP-9의 분비량은 약 1.6~6.6배 증가하였다. 또한 U-373-MG 세포에 오디 추출물 50~600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리한 결과, 플라스민의 분비량은 약 70%가 감소되었다. 또한 오디 추출물이 VEGF에 의해 유도된 MMP-2, MMP-9 과 플라스민의 분비를 억제하였다.

재료 및 방법

시약

MMPs 및 플라스민 스탠다드는 Cal-Biochem (La Jolla, CA, USA)과 Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany)로부터 구입하였다. MMP-2 및 MMP-9 enzyme immunoassay 키트는 Fuji Chemical Industries (Toyama, Japan)로부터 구입하였으며, 플라스민 enzyme immunoassay 키트는 Progen (Heidelberg, Germany)으로부터 구입하였다. 배지 및 혈청은 Life Technology Inc. (Gaithersburg, MD, USA)로부터, 그외 특별히 적시하지 않은 시약은 Sigma (St. Louis, MO, USA) 사로부터 구입하여 사용하였다.

세포배양

U-373-MG 세포주는 한국세포주 은행에서 구입하여, 10% FBS (v/v) 첨가 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에서, 5%의 CO_2 , 37°C 조건으로 배양하였다.

오디 추출물의 준비

오디 추출물의 준비는 Saeki의 방법을 이용하였다(21). 즉, 오디를 50% 에탄올에 침적 (15 g/L)시켜 하룻밤 동안 방치한 다음 30분간 원심분리 (5,000 g)하여 침전물을 얻어 냉동건조 시켰다. 건조된 추출물을 증류수로 용해시켜 본 실험에 사용했다.

배양배지에서 MMPs와 플라스민의 Enzyme Immunoassay

U-373-MG 세포를 24 well plates에 세포밀도가 5×10^4 cells/ cm^2 이 되도록 접종한 다음, 10% FBS (v/v) 첨가 DMEM 배지에서 24시간 동안 배양한 후 약 80% 정도 융합상태로 자란 U-373-MG 세포를 무-혈청 및 무-phenol red 배지에서 12시간 동안 배양하였다. 세포를 새로운 배지로 세척한 다음 대조완충용액 또는 지시된 시약을 지정된 시간만큼 처리

하였다. 분비된 MMPs와 플라스민의 실제양은 제조사의 지시에 따라 enzyme immunoassay 키트로 측정하였다.

Zymography

MMPs 및 플라스민의 기질 분해 활성은 젤라틴 및 피브린 zymography를 행하여 확인하였다(22). U-373-MG 세포를 24 well plates에 세포밀도가 5×10^4 cells/ cm^2 이 되도록 접종한 다음, 10% FBS (v/v) 첨가 DMEM 배지에서 24시간 배양하였다. 이후, 새로운 배지로 세척한 다음 U-373-MG 세포를 무-혈청 및 무-phenol red 배지에서 대조완충용액 또는 지시된 시약을 넣어준 후 12시간 동안 배양하였다. 젤라틴 zymography는 MMPs의 기질인 젤라틴을 SDS-PAGE의 running 젤에 1%가 되도록 첨가한 후 환원조건에서 전기 영동한 다음, 2.5% triton X-100 대조완충용액에서 재변성시킨 후 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°C). 이후 0.5%의 Coomassie brilliant blue R250으로 3시간 염색시킨 다음, 10% acetic acid, 30% 메탄올에서 투명한 밴드가 나타날 때까지 탈색시켰다. 플라스민 활성은 기질로서 피브린을 첨가하여 피브린 zymography를 행하였다.

통계처리

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

결과 및 고찰

MMP-2 및 MMP-9 분비에 미치는 오디 추출물의 효과

MMPs는 기저층의 기질을 분해하는 효소로, 혈관신생의 초기 단계에 작용한다고 알려져 있다(23). In vivo에서 혈관이 생성되기 위해서는 인접한 세포의 기질을 분해하여야 한다. 또한 MMPs의 과다발현 및 활성 증가는 전이성 암으로의 진행과 밀접한 관계가 있다는 연구 결과에 따라 MMPs를 표적으로 하는 약물의 개발에 연구가 집중되고 있다. 본 연구에서는 오디 추출물 처리에 의해 U-373-MG 세포에서 MMP-2와 MMP-9의 분비에 미치는 효과를 확인하기 위해, U-373-MG 세포에 오디 추출물을 처리한 다음, U-373-MG 세포로부터 배양배지를 이용하여 MMP-2와 MMP-9에 대한 enzyme immunoassay를 행하였다(Fig. 1A). 그 결과, MMP-2는 오디 추출물에 의해 분비가 거의 완벽하게 억제되었다. 오디 추출물 농도 50~600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 MMP-9는 농도-의존적으로 분비가 증가되었으며, 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 최대로 약 5.9배 증가되었다. 또한 오디 추출물 처리에 의해 U-373-MG 세포에서 분비된 MMP-2와 MMP-9의 활성을 확인하기 위해 젤라틴 zymography를 실행한 결과(Fig. 1B), enzyme immunoassay(Fig. 1A)와 유사하게 MMP-2의 분비는 억제되었으며, MMP-9의 분비는 농도-의존적으로 증가됨을 확인할 수 있었다. 한편 MMP-2의 경우, 대조군에서는 활성형의 분비가 불활성형에 비해 더 많았으나, 오디 추출물에 의해 활성형 MMP-2의 분비는 완전히 억제되었다.

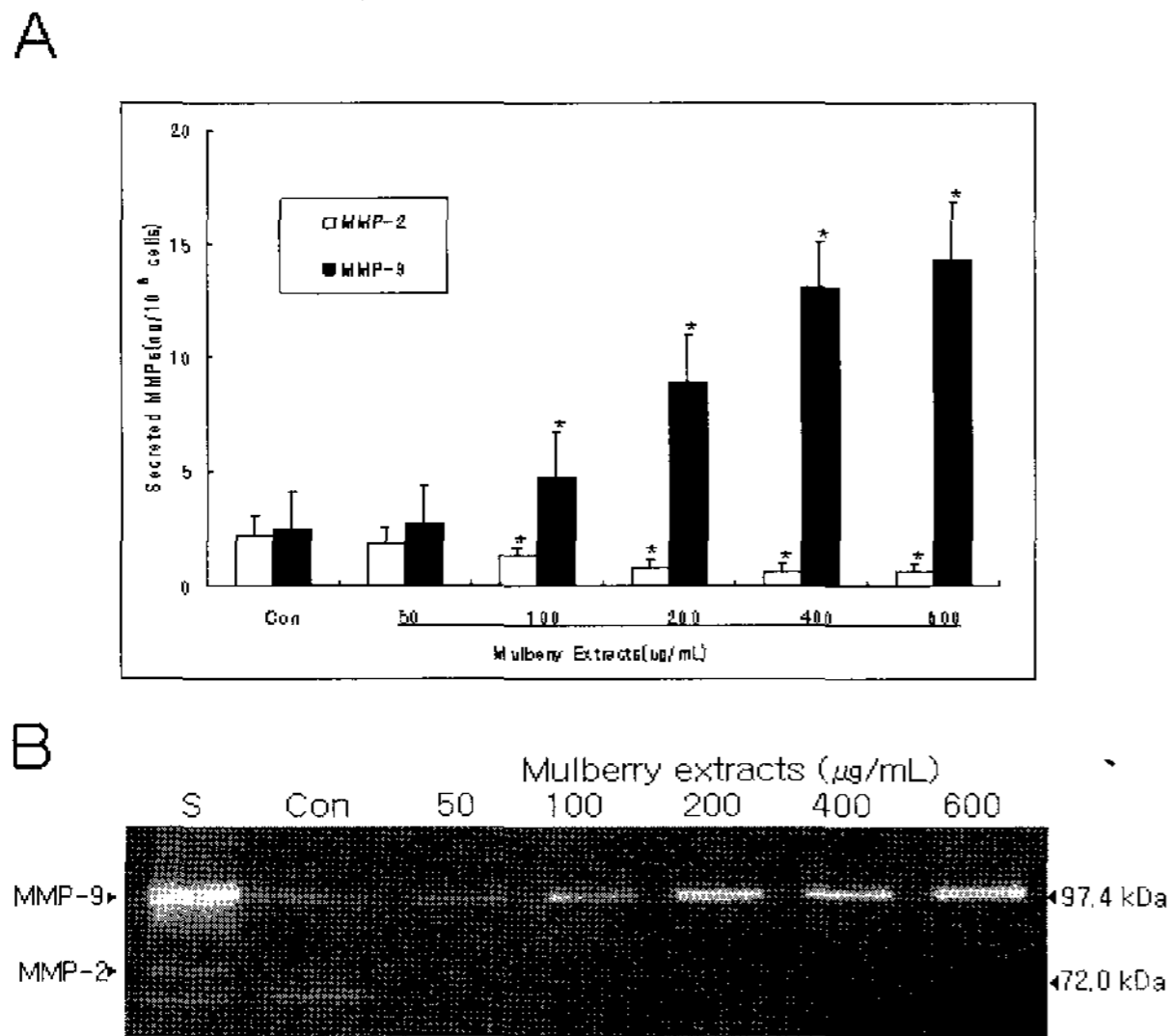


Figure 1. Effect of mulberry extracts on the secretion of MMP-2 and MMP-9 in U-373-MG cells. Cells were incubated in serum- and phenol red-free DMEM for 20 h. Then, cells were incubated for 12 h after addition of a control buffer (Con) and various amounts of mulberry extracts (50 to 600 μg/mL), and media were quantitatively assayed by enzyme immunoassay (A). Bars represent the mean ± 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. (B) Gelatin zymography assay. Lane S contains standards of MMPs. MMPs was separated on 10% polyacrylamide gel. Results of three independent experiments were similar.

플라스민 분비에 미치는 오디 추출물의 효과

세린계 단백질분해효소 중에서 urokinase-type plasminogen activator (uPA)는 플라스미노겐을 플라스민으로 전환시킨다. 플라스민은 세포가 이동할 때, 세포외기질에 존재하는 피브린을 분해하는 단백질분해효소이다(24, 25). 본 연구에서는, U-373-MG 세포에 오디 추출물을 처리하여 플라스민의 분비에 미치는 효과를 확인하였다. Enzyme immunoassay 결과, 플라스민의 분비는 100~600 μg/mL 농도에서 약 36%~58% 감소되었다(Fig. 2A). 피브린 zymography를 통해 플라스민의 활성을 조사한 결과, enzyme immunoassay의 결과와 일치하게 플라스민의 분비 감소를 확인할 수 있었다(Fig. 2B). 이전의 연구 결과, 플라스민과 MT1-MMP와의 상호작용에 의해 proMMP-2의 활성화가 조절된다고 알려져 있다(10). 또한, 암세포에서 인테그린과 uPAR 사이의 상호작용이 uPAR-uPA-MMP-2 연쇄반응에 관련되어 있다는 사실이 밝혀졌다(26). 따라서 본 연구에서 관찰된 오디 추출물에 의한 플라스민의 분비감소는 MMP-2의 분비 억제 및 불활성화와 관련되어 있다고 사료된다. 이를 확인하기 위해 인테그린 α₍₆₎β₍₁₎의 기능 억제에 의해 플라스민과 MMP-2의 분비 억제가 일어나는지를 추후 조사할 계획이다.

단백질분해효소의 분비에 미치는 오디 추출물과 VEGF의 효과

MMP-9은 세포외기질로부터 VEGF를 분비하는 기작에 의해 중앙 혈관신생에 관여한다고 알려져 있다(27). VEGF 수용체에 특이적인 항체를 이용한 연구 결과 VEGF의 분포는 MMP-9의 분포와 관련이 있다는 것이 밝혀졌다(28).

또한 플라스민의 억제는 MMP-9의 활성과는 독립적으로 일어난다는 것이 밝혀졌다(29). 따라서, 오디 추출물과 VEGF와의 관련 여부를 확인하기 위해 오디 추출물과 VEGF에 의한 MMP-2 및 MMP-9의 분비양상을 확인한 결과, VEGF 처리 (10 ng/mL)에 의해 MMP-2와 MMP-9의 분비는 약 6.7배, 12.6배 증가한 반면, VEGF와 오디 추출물 (100 μg/mL)을 병용 처리한 경우, MMP-2와 MMP-9 분비가 VEGF를 단독 처리한 경우에 비해 85.5% 및 89.8% 감소하였다(Fig. 3A). 따라서 오디 추출물이 VEGF에 의한 MMP-2와 MMP-9 분비를 억제한다는 것을 알 수 있었다. 한편, 오디 추출물 (100 μg/mL)를 처리했을 때 플라스민 분비는 거의 완벽하게 억제되었다(Fig. 3B). VEGF를 처리한 경우는 플라스민의 분비가 약 3.6배 증가하였고, VEGF (10 ng/mL)와 오디 추출물 (100 μg/mL)을 병용처리한 경우, 플라스민의 분비가 VEGF만을 처리한 경우보다 약 91.6% 감소되었다. 따라서, 오디 추출물이 VEGF에 의해 유도된 플라스민의 분비를 억제한다는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 오디 추출물이 VEGF의 과발현에 따른 암의 성장을 억제 조절하는데 이용될 수 있을 가능성을 보여주고 있다.

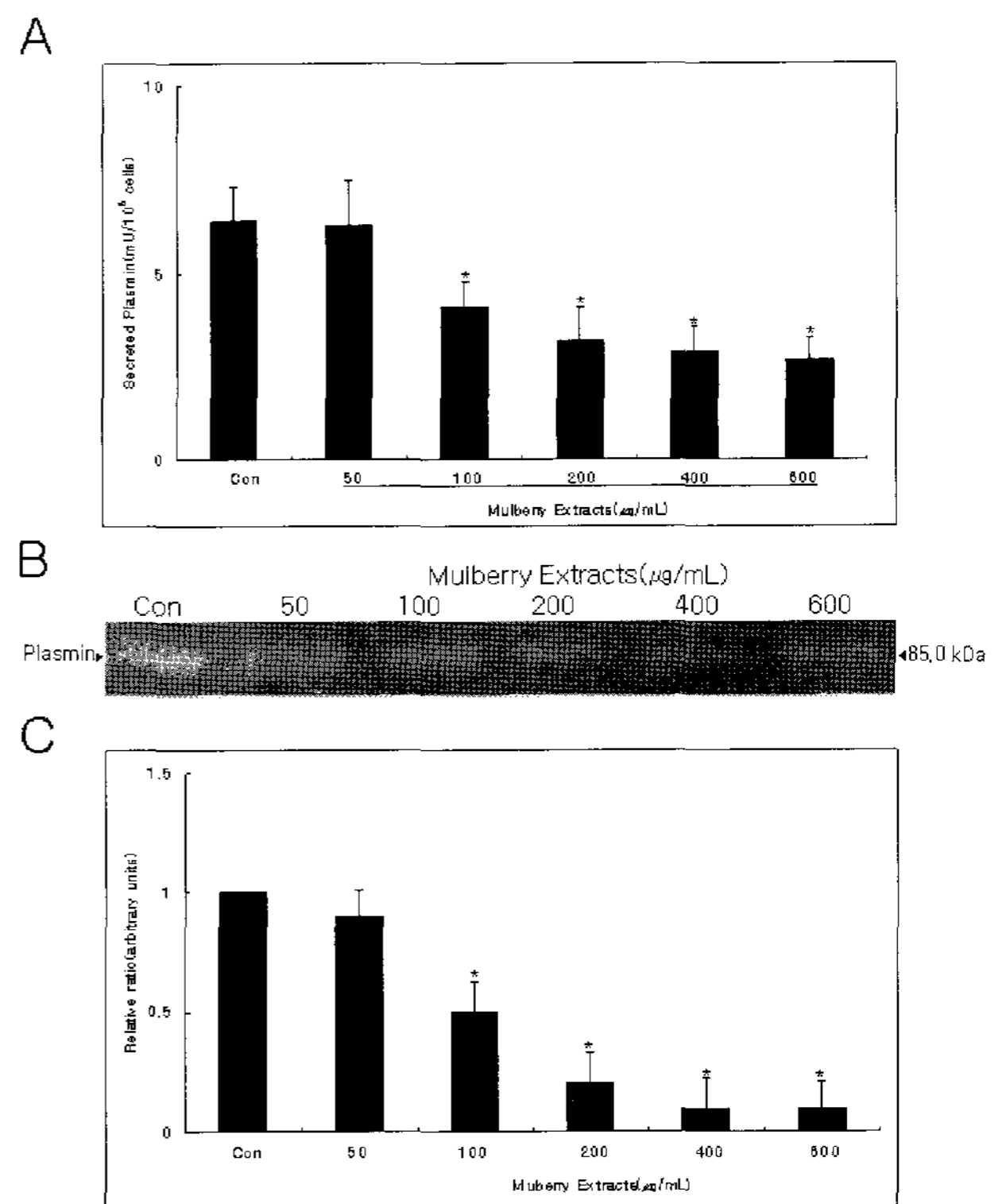


Figure 2. Effect of mulberry extracts on the secretion of plasmin in U-373-MG cells. Cells were incubated in serum- and phenol red-free DMEM for 20 h. Then, cells were incubated for 12 h after addition of a control buffer (Con) and various amounts of mulberry extracts (50 to 600 μg/mL), and media were quantitatively assayed by enzyme immunoassay (A). (B) Fibrin zymography assay. Plasmin was separated on 10% polyacrylamide gel. (C) Densitometric analyses of the blots are presented as the relative ratio of induction of the plasmin by addition of mulberry extracts. The plasmin secretion by addition of control buffer for 12 h is arbitrarily presented as 1. Data are mean ± 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.

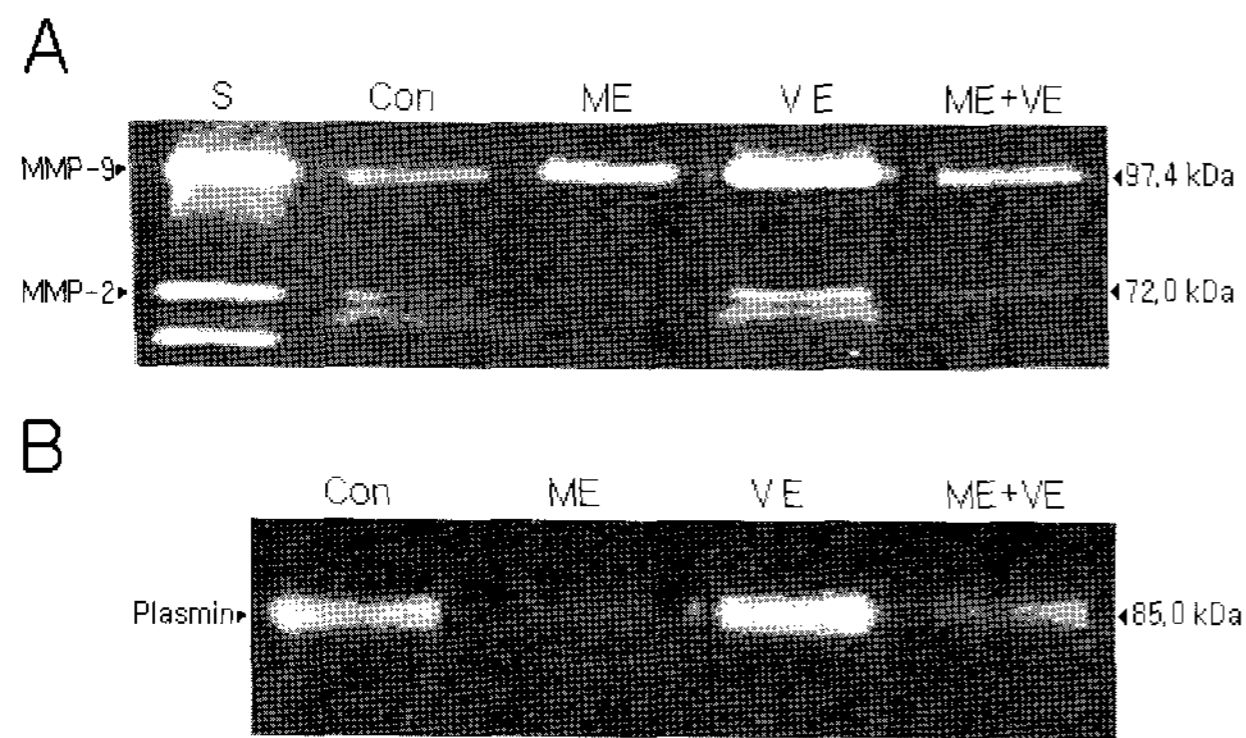


Figure 3. Effect of the combination of mulberry extracts and VEGF on the secretion of MMPs and plasmin in U-373-MG cells. Cells were incubated in serum- and phenol red-free DMEM for 20 h. Then, cells were incubated for 20 h after addition of a control buffer, mulberry extracts (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and VEGF (10 ng/mL). Equal amounts of supernatants were loaded into each lane. (A) Gelatin zymography. MMPs was separated on 12% polyacrylamide gel. Con; control, ME; mulberry extracts (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), VE; VEGF (10 ng/mL), ME+VE; mulberry extracts (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) plus VEGF (10 ng/mL). (B) Fibrin zymography. Results were similar in three independent experiments.

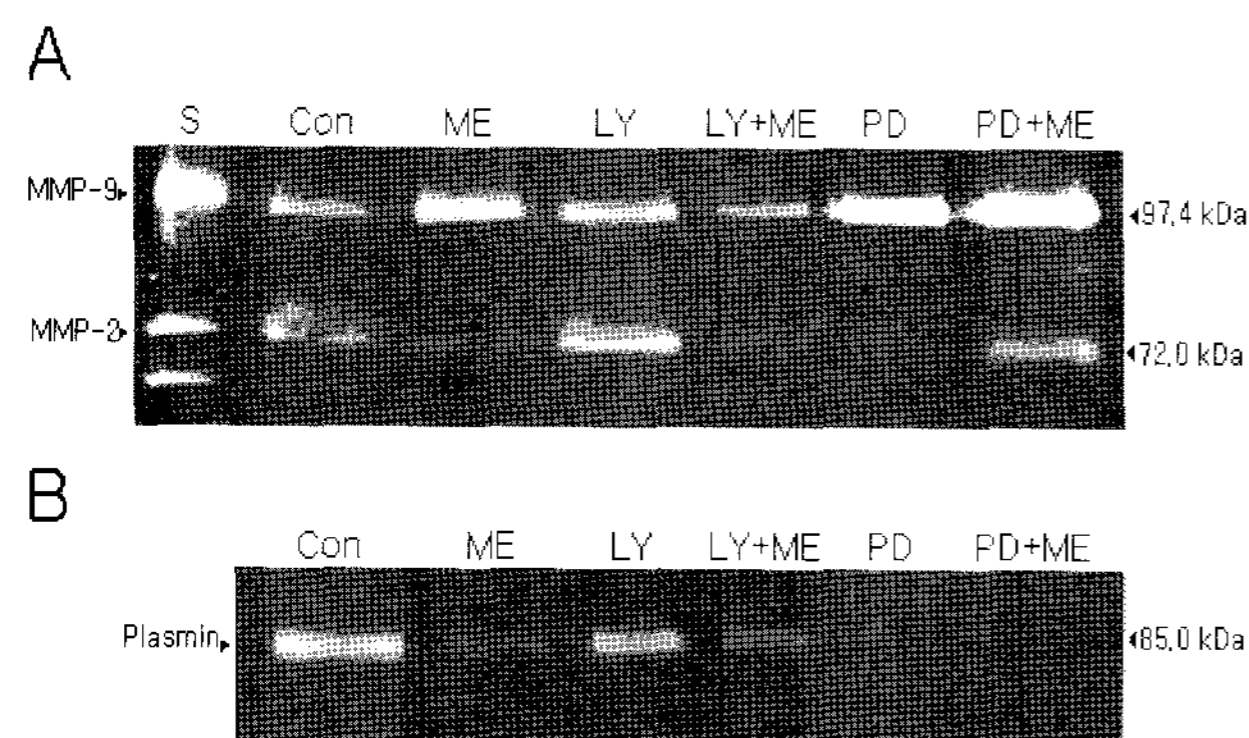


Figure 4. Effect of PI 3'-kinase and NF- κ B inhibitors on mulberry extracts-induced proteinases secretion. Cells were incubated in serum- and phenol red-free DMEM for 20 h. One hour prior to stimulation with mulberry extracts (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), cells were treated with LY294002 (100 nM), and PDTC (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Then, cells were incubated for 20 h after addition of a control buffer and mulberry extracts (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Equal amounts of supernatant were loaded into each lane. (A) Gelatin zymography. Lane S contains standards of MMP-2 and MMP-9. (B) Fibrin zymography. Con; control, ME; mulberry extracts (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), LY; LY294002 (100 nM), LY+ME; LY294002 (100 nM) plus mulberry extracts (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), PD; PDTC (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) PD+ME; PDTC (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) plus mulberry extracts (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Results were similar in three independent experiments.

오디 추출물에 의한 단백질분해효소의 분비경로

오디 추출물에 의한 단백질분해효소의 분비경로를 확인하기 위해 U-373-MG 세포에 phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3'-kinase) 억제제인 LY294002 (100 nM)와, NF- κ B 억제제인 pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 1시간 전처리하여, 오디 추출물 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)에 의한 MMP-2와 MMP-9의 분비 정도를 젤라틴 zymography를 통해 확인하였다(Fig. 4A). 그 결과, PI 3'-kinase 억제제인 LY294002 (100 nM) 처리에 의해 오디 추출물 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)에 의한 MMP-9 분비 증가가 유의할만하게 억제되었다. 따라서 U-373-MG

세포에서 오디 추출물 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)에 의한 MMP-9의 분비 증가는 PI 3'-kinase 경로에 의존적이라는 것을 알 수 있었다. 오디 추출물 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)에 의한 플라스민의 분비 정도를 피브린 zymography를 통해서 확인한 결과, PI 3'-kinase 억제제인 LY294002 (100 nM) 처리에 의해 오디 추출물 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)에 의한 플라스민 분비증가가 유의할만하게 억제되었다(Fig. 4B). 따라서 U-373-MG 세포에서 오디 추출물 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)에 의한 플라스민의 분비 증가 역시 PI 3'-kinase 경로에 의존적이라는 것을 알 수 있었다.

요 약

본 연구에서는 U-373-MG 세포를 이용하여 오디 추출물과 VEGF에 의한 MMPs 및 플라스민의 분비에 미치는 영향을 확인하고자 하였다. U-373-MG 세포에 오디 추출물을 100~600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리한 결과, MMP-2의 분비는 거의 완벽하게 억제되었고 MMP-9의 분비는 약 1.6~5.9배 증가하였다. 이에 비해 플라스민의 분비는 오디 추출물 농도 500~600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 36%~58% 감소하였다. 오디 추출물과 VEGF를 병용처리한 경우, MMP-2의 분비는 VEGF만을 처리한 것과 비교하여 약 85.5% 감소하였고, MMP-9의 분비는 약 89.8% 감소하였다. 또한, U-373-MG 세포에서 오디 추출물 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)에 의한 MMP-2와 MMP-9의 분비 증가와 플라스민 분비증가는 PI 3'-kinase 경로에 의존적이었다. 본 연구 결과를 통해 오디 추출물이 VEGF의 과발현에 따른 암의 성장을 억제 조절하는데 이용될 수 있는 가능성을 확인하였다.

감 사

이 논문은 학술진흥재단 중점연구소 지원 연구비 (KRF-2006-J0310)에 의해 연구되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Scharter, A. and M. Ober (1981), Anthocyanosides in the treatment of retinopathies, *Klin. Monatsbl. Augenheikd.* **178**, 386-389.
- Kim, T. W., Y. B. Kwon, J. H. Lee, I. S. Yang, J. K. Youm, H. S. Lee and J. Y. Moon (1996), A study on the antidiabetic effect of mulberry fruits, *Kor. J. Seric. Sci.* **38**, 100-107.
- Tamura, H. and A. Yamagami (1994), Antioxidative activity of monoacylated anthocyanins isolated from muscat bailey a grape, *J. Agric. Food Chem.* **42**, 1612-1615.
- Yoshiki, Y., K. Okubo, and K. Igarashi (1995), Chemiluminescence of anthocyanins in the presence of acetaldehyde and tert-butyl hydroperoxide, *J. Biolumin. Chemilumin.* **10**, 335-338.
- Park, J. C., J. S. Choi, and J. W. Choi (1995), Effect of the Fractions from the leaves, fruits, stems and roots of *Cudrania tricuspidata* and flavonoids on lipid peroxidation, *Kor. J. Pharmacol.* **26**, 377-384.
- Kim, M. H., K. C. Ko, S. H. Lim, and Y. S. Yu (1980), Study on the usability of Mulberry fruit (1) Fruit characteristics of Mulberry, *Coll. of Agric. Bull. SNU.* **5**, 221-223.
- Havsteen, B. (1983), Flavonoids, a class of natural products of high

- pharmacological potency, *Biochem. Pharmacol.* **32**, 1141-1145.
8. Risau, W. (1997), Mechanisms of angiogenesis, *Nature* **386**, 671-674.
 9. 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.
 10. Pepper, M. S. (2001), Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **21**, 1104-1117.
 11. 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.
 12. Woessner, J. F. Jr. (1994), The family of matrix metalloproteinase, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **732**, 11-21.
 13. Sounni, N. E. and A. Noel (2005), Membrane type-matrix metalloproteinases and tumor progression, *Biochimie* **87**, 329-342.
 14. Brown, P. D. (1997), Matrix metalloproteinase inhibitors, *Angiogenesis* **1**, 142-154.
 15. Anita, E. Y., A. N. Murphy, and W. G. Stetler-Stevenson (1998), 72kDa 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. UK.
 16. Dor, Y., R. Porat, and E. Keshet (2001), Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbances in oxygen homeostasis, *Am. J. Physiol.* **280**, 1367-1374.
 17. Neufeld, G., T. Cohen, S. Gengrinovitch, and Z. Poltorak (1999), Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor, *FASEB J.* **13**, 9-22.
 18. Ferrara, N. and W. J. Henzel (1989), Pituitary specific for vascular endothelial cell, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **161**, 852-858.
 19. Zhang, H. T., P. Graft, P. A. Scott, M. Ziche, H. A. Weich, A. L. Harris, and R. Bicknell (1995), Enhancement of tumor growth and vascular density by transfection of vascular endothelial cell growth factor into MCF-7 human breast carcinoma cells, *J. Natl. Cancer. Inst.* **87**, 213-219.
 20. Plate, K. H. and W. Risau (1995), Angiogenesis in malignant gliomas, *Glia* **15**, 339-347.
 21. Saeki, Y. (1994), Effect of seaweed extracts on Streptococcus sobrinus adsorption to saliva-coated hydroxyapatite, *Bull. Tokyo Dent. Coll.* **35**, 9-15.
 22. Kim, H. G. and G. Y. Koh (2000), Lipopolysacchride activates matrix metalloproteinase-2 in endothelial cells through an NF- κ B-dependent pathway, *Biophys. Res. Commun.* **269**, 401-405.
 23. Thiennu, H. and Z. Werb (2000), Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology, *Genes Dev.* **14**, 2123-2133.
 24. Pepper, M. S. (2001), Extracellular proteolysis and angiogenesis, *Thromb. Haemost.* **86**, 346-355.
 25. Goldfarb, R. H., L. A. Liotta, and V. P. Terranova (1981), Cleavage of laminin by thrombin and plasmin: Alpha thrombin selectively cleaves the beta chain of laminin, *Thromb. Res.* **21**, 663-673.
 26. He, Y., X. D. Liu, Z. Y. Chen, J. Zhu, Y. Xiong, K. Li, J. H. Dong, and X. Li (2007), Interaction between cancer cells and stromal fibroblasts is required for activation of the uPAR-uPA-MMP-2 cascade in pancreatic cancer metastasis, *Clin. Cancer Res.* **13**, 3115-3124.
 27. 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.
 28. Brekken, R. A., X. Huang, S. W. King, and P. E. Thorpe (1998), Vascular endothelial growth factor as a marker of tumor endothelium, *Cancer Res.* **58**, 1952-1959.
 29. Dewyer, N. A., V. Sood, E. M. Lynch, C. E. Luke, G. R. Jr. Upchurch, T. W. Wakefield, S. Kunkel, and P. K. Henke (2007), Plasmin inhibition increases MMP-9 activity and decreases vein wall stiffness during venous thrombosis resolution, *J. Surg. Res.* **142**, 357-363.