

계배용모막에서 인슐린-유사 성장인자 II (IGF-II)의 혈관신생 활성조절에 관한 연구

부산대학교 자연과학대학 분자생물학과, ¹의과대학 피부과,
²서울대학교 약학대학 약학과 종합약학연구소

배명호 · 배수경 · 이옥희 · 권유욱 · 김문범¹
오창근¹ · 장호선¹ · 권경술¹ · 김규원²

Regulation of Angiogenic Activity of Insulin-like Growth Factor II (IGF-II) in Chick Chorioallantoic Membrane

Myung-Ho Bae, Soo-Kyung Bae, Ok-Hee Lee,
Yoo-Wook Kwon, Moon-Bum Kim¹, Chang-Keun Oh¹,
Ho-Sun Jang¹, Kyung-Sool Kwon¹ and Kyu-Won Kim²

*Departments of Molecular Biology and ¹Dermatology, Pusan National University,
Busan 609-735, Korea, ²Research Institute of Pharmaceutical Sciences,
College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea*

Insulin-like growth factor II (IGF-II) is highly expressed during hepatocarcinogenesis and psoriasis. It has also angiogenic activity in quantitative chick chorioallantoic membrane (CAM) assay. However, the regulating factor of angiogenic activity of IGF-II is largely unknown. This study was undertaken to examine the control mechanism of angiogenic activity of IGF-II during the development of hepatocellular carcinoma and psoriasis. In this study, we examined angiogenic activity of IGF-II within HepG2 conditioned media by immunoprecipitation and CAM assay. The EGF potentiated the angiogenic activity of IGF-II synergistically while heparin had no effect on the angiogenic activity of IGF-II. This effect of EGF may due to increased-activity of endothelial cell migration. However, EGF had no effect on the proliferating activity of endothelial cells. Finally, we demonstrated that IGF-IIR induced the expression of IGF-II. These results may examine the development mechanism of the hepatocellular carcinoma and psoriasis.

Key Words: Insulin like growth factor-II, Angiogenesis, Endothelial cell, Psoriasis

서 론

혈관신생은 암화과정 뿐만 아니라 초기발생과정, 상처치유 등 정상적인 상태에서도 중요한 역

할을 담당하고 있다. 특히, 악성암의 증식과 전이 및 여러 혈관신생 관련질환은 혈관신생과정과 밀접한 관계가 있으며, 이 혈관신생과정은 많은 혈관신생인자 및 억제인자의 균형에 의해 조절된다.

이러한 인자들로는 vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), transforming growth factor β 1 (TGF β 1) 등 여러 가지 성장인자들이 알려져 있다.¹⁻⁵⁾ 이 중, 최근 혈관신생인자로 보고된 IGF-II는 간암에서 그 발현이 증가하는 단백질로 알려져 있다.⁶⁾

Insulin-like growth factor II (IGF-II)는 proinsulin과 구조적인 상동성을 가지며 여러 세포에서 증식과 분화를 조절하는 인자로 알려져 있다.⁷⁾ IGF-II는 insulin과는 달리 인체 대부분의 조직에서 생산되고 있으며, 상당히 높은 혈중농도를 유지하고 있다. 이러한 IGF-II의 활성은 자가분비/주위분비 또는 내분비의 기전으로 조절되고 있다. 정확한 발생과정에서의 역할은 알 수 없지만 IGF-II가 태생기의 somatomedin이란 사실은 쥐를 이용한 실험을 통해 밝혀진 바 있고,⁸⁾ 여러 세포주 실험을 통해 IGF-II가 DNA합성 및 세포증식을 유도하는 인자임이 알려져 있다.⁹⁻¹⁴⁾ 뿐만 아니라 IGF-II는 발생과정 중에 mesodermal origin 세포의 분화를 유도하고,^{2,3)} 암화과정에서는 혈관신생인자로도 작용함이 알려져 있다.^{15,16)}

이와 같이 암화과정과 발생과정 뿐만 아니라, IGF-II가 작용할 수 있는 혈관신생관련 질환으로는 건선을 들 수 있다. 건선은 피부의 과형성, 다양한 염증세포들의 유입 및 피부세포의 증식 등으로 발생하는 피부병의 일종이다.^{17,18)} 건선의 발생에는 IGF-II를 비롯하여 transforming growth factor- α 와 IL-6, IL-8과 같은 염증을 유발하는 인자들이 관여하는 것이 알려져 있다.¹⁹⁻²¹⁾ 이 중 IGF-II는 인간의 각질세포의 증식을 촉진시키며,²²⁾ 건선 조직주변에 그 발현이 증가되어 있음이 밝혀진 바 있다. 뿐만 아니라, IGF-II가 건선조직에서 염증인자로 잘 알려진 IL-6의 발현증가를 통해 염증반응을 촉진시키는 사실은 본 연구진에 의해 증명되었다.²³⁾ 따라서 IGF-II는 대표적인 혈관신생 관련질환인 건선을 촉진시키는 인자이며, 이러한 IGF-II의 조절단백질은 건선의 발생과정을 이해하는데 중요한 사실이 될 것이다.

한편, 간암은 한국인의 사망률에 있어서 높은 비율을 차지하고 있지만 아직까지 적절한 치료방법이 없으며, 유전자 수준에서 국내외적으로 많은 연구가 이루어져 있지 않은 암종이다. 특히, 간암

은 조직주위로 과도한 혈관신생을 보이고 있으며, 이러한 간암의 혈관신생과정을 유도하는 혈관신생인자로서 IGF-II가 작용할 뿐만 아니라 정상간에 비해 간암조직에서 그 발현이 현저히 증가한다는 보고가 있다.⁶⁾ 따라서 간암발생과정에서 증가하는 IGF-II의 발현은 간암의 악성화 및 전이에 있어서 필수적인 조건으로 생각된다. 이와 같이 암화과정에서 혈관신생과정은 존재하며, 매우 중요한 단계임을 알 수 있다. 따라서 암화과정에서 IGF-II는 혈관신생과정의 중요한 인자로 사용될 가능성이 있으며 이러한 IGF-II의 생물학적 활성 조절기작은 암화과정을 이해하는 데 도움을 줄 것이다.

본 연구에서는 HepG2 인간 간암세포주로부터 추출한 conditioned media의 혈관신생활성을 CAM assay로 살펴보고, 이 활성이 IGF-II에 의한 것임을 immunoprecipitation assay 및 CAM assay를 통해 증명하였다. 또한 heparin과 EGF와 같은 보조인자들이 IGF-II의 혈관신생활성에 미치는 영향을 CAM assay를 통해 알아보고, 혈관신생과정의 특징적인 현상인 혈관내피세포의 증식 및 이동에 관여하는지를 Thymidine incorporation assay, Wounding migration assay 등을 통해 살펴보았다. 뿐만 아니라 IGF-II가 유도하는 혈관신생활성의 정확한 기작을 알기 위해 IGF-II의 조절인자들(IGFR, IGFBP-3)의 발현을 Northern blot analysis를 통해 살펴보았다.

재료 및 방법

1) HepG2 세포의 배양

American Type Culture Collection에서 구입한 HepG2 cell (HB-8065)을 Gibco BRL에서 구입한 fetal bovine serum (FBS)을 첨가한 Minimal Essential Medium (MEM)에 배양하였다. 분말상태의 배지를 2차 증류수 1 L로 녹인 후 sodium bicarbonate 2.2 g을 첨가하여 HCl로 pH 7.2를 맞추었다. 0.22 μ m Millipore filter로 이를 여과한 다음, 사용직전에 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin (P-S)를 첨가하였다.

2) HepG2 세포의 conditioned medium 준비

HepG2 세포를 70~80% confluent 한 상태로 배양한 다음 10% FBS가 첨가된 배지로 세 번 세척하였고, 세척한 세포에 serum-free 배지를 첨가하고 24시간 동안 배양하였다. 세포의 배양이 끝나면 배지를 수거한 다음 5,000 rpm, 4°C에서 10분간 원심분리하여 바닥의 세포를 제거한다. 세포가 제거된 배지를 13,000 rpm, 4°C에서 5분간 원심분리하여 세포의 불순물을 제거한다. 이렇게 준비된 conditioned media를 Millipore에서 구입한 한외여과장치(Ultrafree-15)에 부은 뒤, 원심분리기에 넣어 2,000 g에서 회전시키면 농축이 완료된다. 농축된 conditioned media로 CAM assay를 수행하였다.

3) Immunoprecipitation (IP)

HepG2 conditioned media에 단클론 anti-rat IGF-II antibody (Upstate Biotechnology Inc., New York, USA)와 12시간 반응시킨 후 protein A-agarose (Sigma chemical Co., St Louis, USA)로 immunoprecipitate를 얻었다. 이렇게 얻은 immunoprecipitate와 상등액으로 CAM assay를 수행하였다.

4) Chorioallantoic membrane (CAM) assay

수정란을 구입하여 45시간 동안 18°C에 놓아둔 다음 90% 습도가 유지되는 37°C 배양기에 넣어 이를 0일배로 하여 배양한다. 3일배가 되면 계란의 끝 부분에 구멍을 내어 주사기로 알부민을 3 ml 뽑아낸다. 4일배가 되면 계란의 공기주머니가 있는 쪽을 요오드 탱크로 소독한 후 메스를 이용하여 지름 3 cm 크기의 원형 창문을 만든다. 공기주머니 아래에 있는 막은 핀셋으로 제거한 후 유리테이프를 구멍을 막는다. 혈관형성촉진제의 검색을 위하여 이것을 계속 배양기에서 키워 9일배가 되면 thermanox coverslip에 혈관형성을 촉진할 것이라 여겨지는 농축된 HepG2 conditioned media를 도포한 후 이를 40분 동안 말린다. 다 마른 것을 확인하고 9일배의 유리테이프를 떼어낸 후, 이 coverslip을 발생 중의 embryo CAM 표면에 놓고 다시 유리테이프를 창문을 막는다. 이를 배양기에서 3일 동안 배양시킨 후 10% fat emulsion (Intralipid, 녹십자)을 CAM막 안쪽에 주입하여 해부현미경(magnification×8)으로 혈관형성이 유도되었는지 관찰하고 CAM의 사진을 찍는다.

5) 혈관내피세포의 증식조사(3H-Thymidine incorporation assay)

HUVEC을 gelatin으로 코팅된 24 well multiplate에 1×10^4 cells/well의 밀도로 분주하고 1 ml의 배지를 첨가하여 37°C에서 배양한다. 세포가 안정화 되면 IGF-II를 처리한다. 증식을 조사하고자 하고자 하는 시간보다 4시간 전에 1μCi/ml의 농도로 ³H-thymidine을 첨가한다. 4시간 동안 37°C 배양기에서 배양한 후 배지를 버리고 100%의 methanol을 첨가하여 4°C에서 30분 동안 고정시킨다. 그 후 PBS로 세포를 2번 씻고 10%의 TCA로 한 번 씻은 후 10%의 TCA를 300μl를 첨가하여 12시간 동안 처리한다. 12시간이 지난 후 TCA를 버리고 0.2 M의 NaOH와 0.1%의 SDS가 포함된 solubilization buffer를 150μl를 첨가하여 37°C에서 30분간 처리하여 세포를 lysis시킨다. 세포를 lysis시킨 후 scintillation solution을 첨가한 후 Liquid Scintillation Counter (Packard)를 사용하여 방사능동위원소의 활성을 측정한다.

6) Wounding migration assay

HUVEC을 60 mm culture dish에 바닥이 보이지 않는 정도가 될 때까지 배양한 후 면도날로 세포에 상처를 내어 reference line을 긋고 일부를 긁어낸다. Serum free medium으로 3번 씻어내고 10% FBS가 포함된 M199 배지를 3 ml를 첨가한다. 그리고 동시에 1mM thymidin과 IGF-II를 첨가하여 24시간 동안 37°C, 포화 습도로 유지되는 5% CO₂ 배양기에서 배양한다. 배지를 버리고 PBS로 씻어내고 methanol로 1분간 고정시키고 Giemsa로 5분간 염색한 후 물로 씻어낸다. Inverted microscopy를 이용하여 40배로 관찰하여 reference line을 넘어 이동한 세포 수를 센다.

7) Northern blot analysis

HUVEC 세포로부터 전체 RNA를 분리하고 Northern hybridization 분석을 수행한다. 전체 RNA를 분리하기 위하여 4°C phosphate-buffered saline (PBS)으로 3번 씻은 후, Acid-Guanidine-Phenol-Chloroform방법으로 전체 RNA를 분리한다. 분리한 전체 RNA를 1% formaldehyde-agarose gel 상에서

electrophoresis한 다음 nylon membrane에 transfer하여 random primer labeling 방법으로 [³²P]α-dCTP를 이용해 labelling한 cDNA probe로 유전자 발현에 대한 Northern analysis를 한다. 유전자 발현에 대한 control로는 GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 유전자 혹은 β-actin 유전자의 발현을 사용한다.

결 과

1) IGF-II의 혈관신생 촉진효과 검색

인간간암세포주인 HepG2 cell의 conditioned media 내에 다량 존재하는 IGF-II의 혈관신생활성을 확인하기 위해 Immunoprecipitation에 의해 HepG2 conditioned media에 존재하는 IGF-II를 제거한 뒤, IGF-II가 제거된 conditioned media의 혈관신생활성을 살펴보았다(Fig. 1). HepG2 conditioned media의 혈관신생활성은 60% 정도 유도되는 것이 관찰되었고, 정상적인 conditioned media에 비해 IGF-II가 제거된 conditioned media는 절반 이상 현저히 줄어든 혈관신생활성을 나타내었다(Fig. 1). 따라서 HepG2 conditioned media 내의 IGF-II가 간암진행과정에 있어 강력한 혈관신생유도인자로 작용함을 확인할 수 있었다.

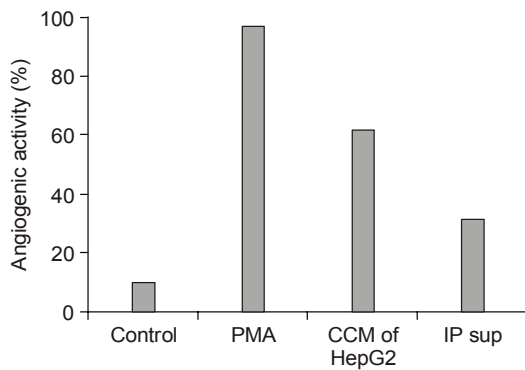


Fig. 1. Decreased angiogenic activity of HepG2 conditioned media by immunoprecipitation. PMA was used as positive control (CCM: concentrated conditioned media, Sup: supernatant).

2) IGF-II의 혈관신생활성에 미치는 heparin의 역할조사

여러 가지 다른 혈관신생인자의 활성 조절단백질로 알려진 heparin의 역할을 알아보기 위해, CAM assay를 수행하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 heparin은 IGF-II의 혈관신생활성에 큰 영향을 주지 않았다. 따라서 IGF-II의 혈관신생활성은 heparin과는 무관함을 알 수 있다.

3) IGF-II의 혈관신생활성에 미치는 EGF의 역할조사

IGFBP3의 활성을 저해하는 것으로 알려진 EGF

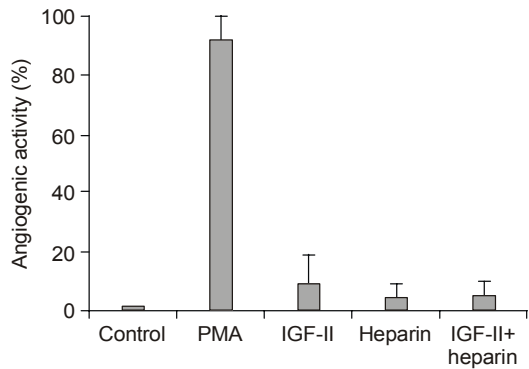


Fig. 2. Effect of heparin on the IGF-II action. Heparin had no effect on IGF-II action in angiogenesis.

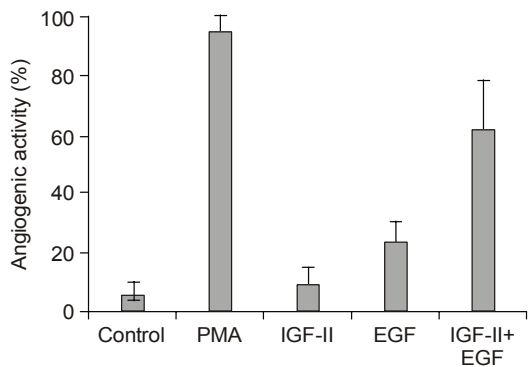


Fig. 3. Enhanced angiogenic activity of IGF-II by the cotreatment with EGF. In case of cotreatment with IGF-II and EGF, considerable angiogenic activity was shown on the CAM, while IGF-II or EGF alone did not induce angiogenesis.

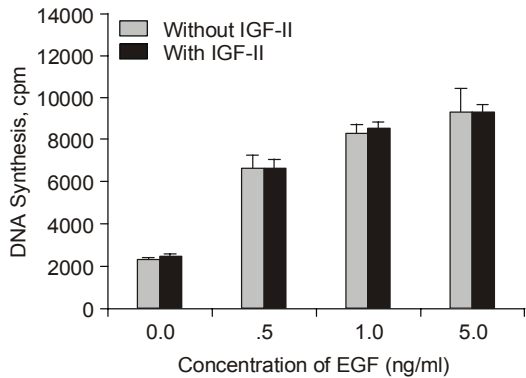


Fig. 4. Effects of IGF-II and EGF on the proliferation of HepG2 cells. Following the dispersion and stabilizing incubation of 1×10^5 cells per well, $1 \mu\text{Ci}$ methyl tritiated thymidine and each samples was treated simultaneously. After 4 hours of incubation, incorporated thymidines were measured by liquid scintillation counter.

의 역할을 알아보기 위하여 IGF-II와 EGF를 계배 용모막에 동시 처리하여 각각 처리한 군과의 차이를 알아보았다. Fig. 3에서 보는 바와 같이, EGF가 IGF-II의 혈관신생활성을 상승적으로 촉진함을 관찰할 수 있었고, 이것은 EGF 단독이 나타내는 혈관신생작용의 2.5배 가량이 되는 것을 관찰할 수 있었다. 따라서, EGF는 IGF-II의 활성을 저해하는 IGFBP3의 발현을 억제하여 IGF-II가 일으키는 혈관신생활성에 영향을 끼친다는 사실을 알 수 있다.

4) EGF가 촉진하는 IGF-II의 혈관신생작용의 검증

상승적으로 IGF-II의 혈관신생활성을 촉진하는 EGF의 역할에 초점을 맞추어, 혈관내피세포를 이용한 angiogenesis assay를 수행하였다. 먼저 thy-

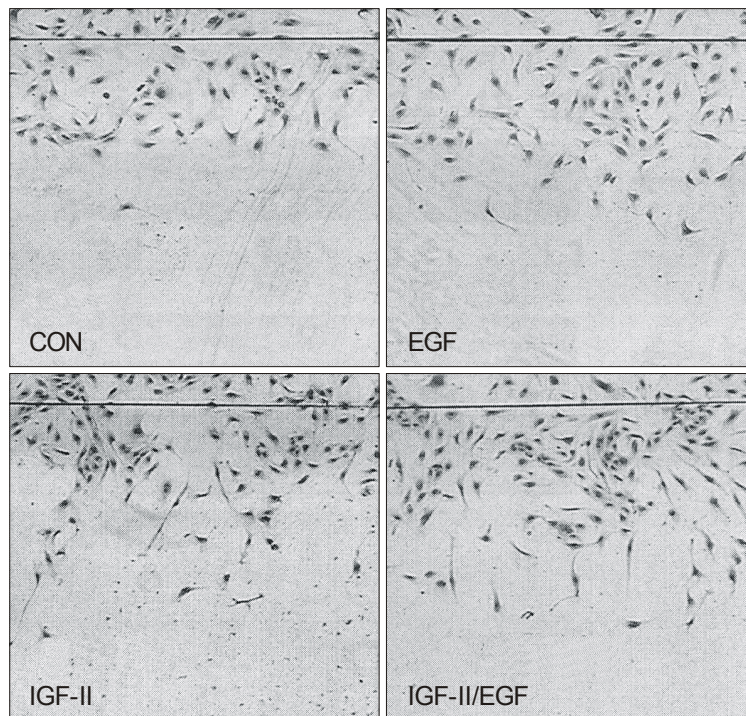


Fig. 5. Effect of IGF-II and/or EGF on migration of HUVECs. Each of EGF (5 ng/ml) and IGF-II (100 ng/ml) stimulated the migration of HUVECs. When EGF and IGF-II were added in combination (IGF-II/EGF), the migration stimulatory effect was greater than the additive effects of each growth factor added alone. Phase-contrast photomicrographs show HUVECs that migrated from edge of the wound.

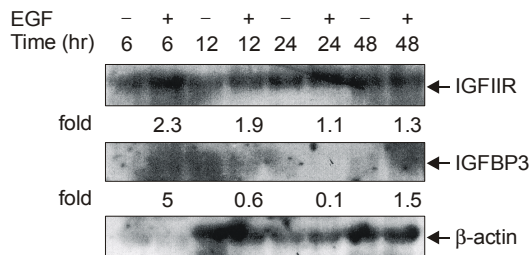


Fig. 6. Induction of IGFIIR expression by EGF. Confluent HUVECs culture was maintained for 12 hr in M199 containing with 1% FBS and then treated with or without EGF (20 ng/ml) for indicated times. Northern blot analysis was performed with 20µg of total RNA/lane using human IGFIIR and IGFBP3 cDNA probe. Hybridization with the human β-actin control probe is shown below.

midine incorporation assay에 의해 혈관내피세포의 증식에 미치는 영향을 살펴본 결과, 5 ng/ml까지 EGF농도를 증가시켜 보았음에도 불구하고 IGF-II의 혈관내피세포 증식효과에 별다른 영향을 주지 못함을 확인하였다(Fig. 4). 그러나, wounding migration assay를 통한 혈관내피세포의 이동에는 IGF-II의 단독효과보다 EGF를 함께 처리했을 때 약 3배 가량의 혈관내피세포가 이동이 촉진됨을 관찰하였다(Fig. 5). 따라서 EGF가 일으키는 IGF-II에 대한 상승적인 혈관신생 촉진활성은 혈관내피세포의 증식이 아니라, 이동을 촉진함으로써 일어난다는 것을 알 수 있다. 뿐만 아니라, EGF가 IGF-II의 조절인자인 IGFIIR과 IGFBP3의 발현에 미치는 영향을 Northern blot analysis로 살펴보았다(Fig. 6). 20 ng/ml의 EGF를 6시간 처리하였을 때 2.3배, 12시간 처리시 약 2배 가량의 IGFIIR 발현증가가 관찰되었다. 반면 IGFBP3의 발현에는 다소 저해 효과가 있음을 알 수 있었다. 따라서, EGF는 IGF-II의 활성을 저해하는 IGFBP3의 발현을 억제하고, IGFIIR의 발현을 촉진함으로써 IGF-II가 일으키는 혈관신생활성에 영향을 끼친다는 사실을 알 수 있다.

고 찰

국내 호발암인 간암은 대표적인 hypervascular

tumor이다.^{24,25)} 암조직에서 혈관생성은 암의 증식과 전이에 직접적으로 관련되어 있다고 알려져 있다.²⁵⁾ 그러나 간암에 대해서는 이러한 연구가 국외에서도 매우 미약한 상황이므로 혈관생성억제에 의한 간암의 증식과 전이 억제방법의 개발은 국내에서 앞으로 필히 수행되어야 할 과제이다. 또한 만성피부염인 건선은 피부세포의 증식과 염증반응을 촉진시키는 질환이다.^{17,18)} 이러한 건선은 난치병으로서 그 발생기작에 관여하는 인자를 연구하는 것은 질병의 발생과정을 이해하는데 도움을 줄 것이다.

IGF-II는 간암으로의 이행과정과 건선의 발생과정에서 그 발현이 급격히 증가되는 것으로 알려져 있다.^{23,26)} 이러한 IGF-II의 활성을 직접적으로 조절할 수 있는 인자로는 IGF binding proteins (IGFBPs)와 IGF receptors (IGFR) 등을 들 수 있다. 특히 IGFBP-3는 혈청 내에 존재하는 IGFBP 중 가장 많은 양을 차지하고 있고, 강한 affinity로 IGF-II에 결합할 수 있으며, IGF-II의 활성을 저해하는 작용을 가지고 있다. 이러한 IGFBP-3에 의한 IGF-II 활성저해는 IGF receptor에 IGF-II가 결합하는 것을 IGFBP-3가 방해함으로써 일어난다.^{27,28)} 그러므로 이들 IGFBP-3와 IGFR의 발현은 IGF-II의 활성과 직접적으로 연결되어 있으며 이들의 발현을 조절하는 인자 역시 IGF-II의 활성과 연관되어 있다고 말할 수 있다. 따라서 IGFBP-3를 전사활성을 억제하는 EGF²⁹⁾는 IGF-II의 혈관신생활성과 직접적으로 연계되어 있을 가능성이 높다.

또한 VEGF, bFGF와 같이 강력한 혈관신생인자로 알려진 단백질은 heparin결합단백질로 알려져 있으며, 특히 IGF-I의 경우는 heparin에 의해 조절 받는다는 사실이 알려져 있다.^{30,31)} 즉, VEGF, bFGF의 혈관신생활성은 각각 단독으로 작용할 때보다 heparin과의 결합상태에서 더욱 증가한다 하겠다. 따라서 heparin은 이들 성장인자들과 결합함으로써 성장인자들의 혈관신생활성을 직접적으로 조절할 수 있는 보조인자로서의 역할을 수행할 것으로 사료된다.

본 연구에서는 위의 사실을 바탕으로 하여 HepG2 인간 간암세포주의 conditioned media 내에 다량 존재하는 IGF-II의 혈관신생촉진활성을 확인하기 위해 IGF-II antibody를 이용한 immunopre-

cipitation 방법에 의해 HepG2 conditioned media 내에 존재하는 IGF-II를 제거한 뒤, IGF-II가 제거된 conditioned media의 혈관신생활성이 기존의 conditioned media보다 혈관신생활성이 저해됨을 CAM assay를 통해 관찰하였다(Fig. 1). 또한 IGFBP-3의 전사활성을 저해하는 EGF가 IGF-II의 혈관신생활성을 상승적으로 촉진함을 CAM assay를 통해 조사하였다(Fig. 2, 3). 이와 같이 EGF가 촉진하는 IGF-II의 혈관신생작용은 혈관내피세포의 이동을 촉진함으로써(Fig. 5) 일어나며, 이러한 현상은 IGFBP3와 IGFR의 발현변화에 기인한 것임(Fig. 6)을 알 수 있었다.

이와 같은 사실은 간암이행과정과 건선의 발생 과정에서 급격한 증가를 보이면서, 혈관신생활성 인자로서 작용하는 IGF-II의 새로운 조절 단백질로서 EGF가 작용할 수 있음을 직접적으로 밝힌 사실이라 하겠다. 즉, 간암발생과정에서 급격히 발현이 증가되는 IGF-II는 간암의 형성과정중 간암세포로부터 분비되어 간암의 성장을 유도하는 혈관신생활성을 가지고, EGF는 이러한 IGF-II의 혈관신생작용에 상승효과를 가지게 하는 단백질로서 악성종양으로의 유도를 촉진하여 암전이를 일으키고, IL-6와 같은 염증반응에 관여하는 인자들의 발현촉진을 통해 건선을 일으킴을 추측할 수 있다.

결 론

IGF-II가 암조직에서 발현되는 혈관신생 촉진인자이며, 이 IGF-II의 혈관신생작용을 EGF 단백질이 상승적으로 촉진함을 확인하였다. 또한 이러한 상승효과는 EGF가 혈관내피세포의 이동을 촉진하는 데에서 비롯됨을 증명하였다. 뿐만 아니라, EGF의 혈관내피세포 이동촉진은 IGFBP3와 IGFR의 발현변화에 기인한 것임을 알 수 있었다. 이상의 결과에 의해 암화과정 및 건선발생과정 중에서 IGF-II가 EGF에 의해 혈관신생이 촉진되는 방향으로 조절되고 있음을 시사하고 있다. 향후 암조직과 건선조직에서의 IGF-II 작용에 관한 연구와 발현 기작에 관한 연구가 진행된다면 악성암과 건선에서의 IGF-II의 역할을 이해할 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 2001년도 부산대학교병원 의학연구소 연구비의 지원으로 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

참고 문헌

- 1) Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992; 359: 843-845.
- 2) Plate KH, Breier G, Weich HA, Risau W. Vascular endothelial growth factor is a potential factor in human gliomas *in vivo*. *Nature* 1992; 359: 845-848.
- 3) Nabel EG, Yang Z, Plautz G, Forough R, Zhan X, Haudenschild DD, Maciag T, Nabel GJ. Recombinant fibroblast growth factor-1 promotes intimal hyperplasia and angiogenesis in arteries *in vivo*. *Nature* 1993; 362: 844-846.
- 4) Yang EY, Moses HL. Transforming growth factor β 1-induced changes in cell migration, proliferation, and angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane. *J Cell Biol* 1990; 111: 731-741.
- 5) Pepper MS, Montesano R, Orci L, Vassalli JD. Transforming growth factor beta-1 modulates basic fibroblast growth factor-induced proteolytic and angiogenic properties of endothelial cells *in vitro*. *J Cell Biol* 1990; 111: 743-754.
- 6) Park BC, Huh MH, Seo JH. Differential expression of transforming growth factor alpha and insulin-like growth factor II in chronic active hepatitis B, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 1995; 22: 286-294.
- 7) Cohick WS, Clemmons DR. The insulin-like growth factors. *Annu Rev Physiol* 1993; 55: 131-153.
- 8) Moses AC, Nissley SP, Short PA, Rechler MM, White RM, Knight AB, Higa OZ. Elevated levels of insulin-like growth factor, multiplication stimulatory activity in fetal rat serum. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 3649-3653.
- 9) Hill DJ, Milner RDG. Somatomedins and fetal growth. In the fetus and independent life, *Ciba foundation symposium* 1981; 86: 124-151. London: Pitman.
- 10) Milner RDG, Hill DJ. Fetal growth: The role of insulin and related peptides. *Clin Endocrinol* 1984; 21: 415-433.

- 11) Underwood LE, D'Ercole AJ. Insulin and somatomedins/insulin-like growth factors in fetal and neonatal development. In: ed, by Daughaday WH Clinics in Endocrinology and Metabolism vol. 13, Tissue Growth Factors. pp 68-89, East Essex, England: Saunders WB Co, Ltd, 1984.
- 12) Froesch ER, Schmid C, Schwander J, Zapf J. Actions of insulin-like growth factors. *A Rev Physiol* 1985; 47: 443-467.
- 13) Zapf J, Froesch ER. Insulin-like growth factors/ somatomedins: Structure, secretion, biological actions and physiological role. *Hormone Res* 1986; 24: 121-130.
- 14) Baxter RC. The somatomedins: Insulin-like growth factors. *Adv Clin Chem* 1986; 25: 49-115.
- 15) Kim KW, Bae SK, Lee OK, Bae MH, Lee MJ, Park BC. Insulin-like growth factor II induced by hypoxia may contribute to angiogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1998; 58: 348-351.
- 16) Bae MH, Lee MJ, Bae SK, Lee OK, Lee YM, Park BC, Kim KW. Insulin-like growth factor II (IGF-II) secreted from HepG2 human hepatocellular carcinoma cells shows angiogenic activity. *Cancer Lett* 1998; 128: 41-46.
- 17) Christophers E, Parzefall R, Braun-Falco O. Initial events in psoriasis: quantitative assessment. *Br J Dermatol* 1973; 89: 327-334.
- 18) Braverman IM, Keh-Yen A. Three-dimensional reconstruction of endothelial cell gaps in psoriatic vessels and their morphologic identity with gaps produced by the intradermal injection of histamine. *J Invest Dermatol* 1986; 86: 577-581.
- 19) Xu S, Cwyfan-Hughes SC, van der Stappen JW, Sansom J, Burton JL, Donnelly M, Holly JM. Altered insulin-like growth factor-II (IGF-II) level and IGF-binding protein-3 (IGFBP-3) protease activity in interstitial fluid taken from the skin lesion of psoriasis. *J Invest Dermatol* 1996; 106:109-112.
- 20) Elder JT, Fisher GJ, Lindquist PB, Bennett GL, Pittelkow MR, Coffey RJ Jr, Ellingsworth L, Derynck R, Voorhees JJ. Overexpression of transforming growth factor alpha in psoriatic epidermis. *Science* 1989; 243: 811-814.
- 21) Gillitzer R, Berger R, Mielke V, Muller C, Wolff K, Stingl G. Upper keratinocytes of psoriatic skin lesions express high levels of NAP-1/IL-8 mRNA in situ. *J Invest Dermatol* 1991; 97: 73-79.
- 22) Neely EK, Morhenn VB, Hintz RL, Wilson DM, Rosenfeld RG. Insulin-like growth factors are mitogenic for human keratinocytes and a squamous cell carcinoma. *J Invest Dermatol* 1991; 96: 104-110.
- 23) Kwon YW, Jang ER, Lee YM, Kim YS, Kwon KS, Jang HS, Oh CK, Kim KW. Insulin-like growth factor II induces interleukin-6 expression via NFkappaB activation in psoriasis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 278: 312-317.
- 24) Liotta LA, Steeg PA, Stetler-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 1991; 64: 327-336.
- 25) Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987; 235: 442-447.
- 26) Yang DY, Rogler CE. Analysis of Insulin-like Growth Factor II (IGF-II) expression in neoplastic nodules and hepatocellular carcinomas of the woodchuck utilizing in situ hybridization and immunohistochemistry. *Carcinogenesis* 1991; 12: 1893-1901.
- 27) Mohan S, Bautista CM, Wergedat J, Baylink DJ. Isolation of an inhibitory Insulin-like Growth Factor (IGF) binding protein from bone cell-conditioned medium: a potentia; local regulator of IGF action. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1989; 86: 8338-8342.
- 28) Rose M, Francis GL, Szabo L, Wallace JC, Ballard, FJ. Insulin-like Growth Factor (IGF)-binding proteins inhibit the biological activities of IGF-1 and IGF-2 but des-(1-3)-IGF-1. *Biochem J* 1989; 258: 267-272.
- 29) Hembree JR, Agarwal C, Eckert RL. Epidermal growth factor suppresses insulin-like growth factor binding protein 3 levels in human papillomavirus type 16-immortalized cervical epithelial cells and thereby potentiates the effects of insulin-like growth factor 1. *Cancer Res* 1994; 54:3160-3166.
- 30) Folkman J, Shing Y. Control of angiogenesis by heparin and other sulfated polysaccharides. *Adv Exp Med Biol* 1992; 313: 355-364.
- 31) Clemmons DR, Underwood LE, Chatelain PG, Van Wyk JJ. Liberation of immunoreactive somatomedin-C from its binding proteins by proteolytic enzymes and heparin. *J Clin Endocrinol Metab* 1983; 56: 384-389.