

Joanna Chorostowska-Wynimko¹, Marta Kędzior¹, Radosław Struniawski¹, Paulina Jaguś¹,
Ewa Skrzypczak-Jankun², Jerzy Jankun²

¹Samodzielna Pracownia Diagnostyki Molekularnej i Immunologii, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie
Kierownik: dr hab. n. med. J. Chorostowska-Wynimko

²Urology Research Center, The University of Toledo, Toledo, Ohio, USA

Fenotyp komórek warunkuje antyproliferacyjne działanie PAI-1 — hamujący wpływ na aktywność proliferacyjną komórek raka płuca

Cell phenotype determines PAI-1 antiproliferative effect — suppressed proliferation of the lung cancer but not prostate cancer cells

Praca powstała w ramach projektu badawczego N301 126 31/3839 finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Informatyzacji Rzeczypospolitej Polskiej

Abstract

Introduction: Plasminogen inhibitor activator type 1 (PAI-1) is an important regulator of tumor growth and metastasis formation acting directly via specific urokinase complexing or indirectly due to its affinity to vitronectin. We have shown previously that PAI-1 modifies angiogenic activity of endothelial cells in a dose-dependent manner but also in close relationship to the cell phenotype. Present study aimed on evaluating the PAI-1 effect on the proliferative activity of lung cancer cells (A549), prostate cancer cells (DU145) as well as endothelial cells (HUVEC).

Results: Mutated PAI-1 (1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$) characterized by the prolonged antifibrinolytic activity ($T_{1/2} \sim 7000$ h) inhibited proliferation of lung cancer A549 cells in a dose-dependent ($p < 0.001$) and time-dependent ($p < 0.001$) manner. No significant effect on the DU145 prostate cancer cells has been observed except of the 72 h cultures with highest PAI-1 concentration (100 $\mu\text{g/ml}$) ($p < 0.001$). Proliferative activity of endothelial cells (HUVEC) was affected by 100 $\mu\text{g/ml}$ PAI-1 only, and independent of the culture period (24, 48 and 72 h, $p < 0.001$).

Conclusion: Plasminogen inhibitor activator type 1 modulates cell proliferation via antifibrinolytic mechanism time- and dose-dependently, however final outcome is strongly affected by the cell phenotype.

Key words: PAI-1, lung cancer, prostate cancer, HUVEC

Pneumonol. Alergol. Pol. 2010; 78, 4: 279–283

Streszczenie

Wstęp: Inhibitor aktywatora plazminogenu typu 1 (PAI-1) jest ważnym regulatorem procesu wzrostu guza i tworzenia przerzutów nowotworowych, działając poprzez bezpośrednie hamowanie urokinazy (mechanizm antyfibrynolityczny) oraz niezależnie od kinaz poprzez powinowactwo z witronektyną. Autorzy pracy w poprzednim badaniu wykazali, że PAI-1 modyfikuje aktywność angiogenną komórek śródbłonna w stopniu zależnym od jego stężenia, jak również fenotypu komórek. Celem niniejszej pracy była ocena wpływu PAI-1 na aktywność proliferacyjną linii komórek nowotworowych — raka płuca (A549) i raka gruczołu krokowego (DU145), a także komórek strukturalnych — śródbłonna naczyńowego (HUVEC).

Wyniki: Zmutowana postać PAI-1 (1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$) charakteryzująca się znacząco przedłużoną aktywnością antyfibrynolityczną ($T_{1/2} \sim 7000$ godz.) w stopniu wyraźnie zależnym od dawki ($p < 0,001$) i czasu ($p < 0,001$) zamiennie hamowała aktywność proliferacyjną komórek raka płuca A549. Natomiast istotny wpływ PAI-1 na aktywność proliferacyjną komórek raka gruczołu krokowego DU145 wykazano tylko dla najwyższego użytego stężenia (100 $\mu\text{g/ml}$) i tylko po 72 godzinach

Adres do korespondencji: dr hab. n. med. Joanna Chorostowska-Wynimko, Samodzielna Pracownia Diagnostyki Molekularnej i Immunologii, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie, ul. Płocka 26, 01–138 Warszawa, tel.: 48 22 431 23 86, e-mail: immuno@igichp.edu.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 20.06.2010 r.
Copyright © 2010 Via Medica
ISSN 0867–7077

hodowli ($p < 0,001$). Aktywność proliferacyjna komórek śródbłonka (HUVEC) była hamowana jedynie przez dawkę 100 $\mu\text{g/ml}$ PAI-1 po 24, 48 i 72 godzinach hodowli.

Wniosek: Inhibitor aktywatora plazminogenu typu 1 moduluje aktywność proliferacyjną komórek w mechanizmie hamowania urokinazy w stopniu ściśle zależnym od fenotypu komórek, czasu działania i dawki.

Słowa kluczowe: inhibitor aktywatora plazminogenu typu 1, rak płuca, rak gruczołu krokowego, komórki śródbłonka
Pneumonol. Alergol. Pol. 2010; 78, 4: 279–283

Wstęp

Inhibitor aktywatora plazminogenu typu 1 (PAI-1, *plasminogen activator inhibitor-1*) jest najsilniejszym fizjologicznym inhibitorem kinaz aktywujących plazminogen — urokinazy (uPA, *urokinase plasminogen activator*) oraz tkankowego aktywatora plazminogenu (tPA, *tissue plasminogen activator*). Decyduje on o zachowaniu fizjologicznej równowagi układów krzepnięcia i fibrylizacji w warunkach *in vivo* [1]. Nieprawidłowa ekspresja PAI-1 jest stwierdzana w wielu stanach chorobowych, odgrywa również kluczową rolę w rozwoju nowotworu [2, 3]. Wyniki wieloletnich badań nad udziałem PAI-1 w tych procesach pozwoliły lepiej zrozumieć złożoną naturę jego udziału we wzroście guza nowotworowego i jego interakcji z otaczającymi tkankami [4]. Jak wspomniano, PAI-1 jest najsilniejszym, wysoce swoistym inhibitorem urokinazy, która odgrywa kluczową rolę w procesach migracji i inwazyjności komórek nowotworowych, warunkując wzmożoną aktywność plazminogenu na ich powierzchni i inicjując kaskadową reakcję proteolizy, prowadzącą do rozpadu wiązań między białkami macierzy zewnątrzkomórkowej oraz kontaktów międzykomórkowych [5]. Urokinaza, działając w powiązaniu ze swoistym receptorem zlokalizowanym na powierzchni komórek (uPAR, *urokinase receptor*), zyskuje też wyjątkową chemokinopodobną charakterystykę, wszechstronnie regulując nie tylko migrację, ale również związane z nią procesy zmiany kształtu komórek, adhezji, chemotaksji oraz inwazji macierzy zewnątrzkomórkowej. Inhibitor PAI-1 bezpośrednio wygasza aktywność proteolityczną uPA oraz jej działania chemokino- i adhezyjnopodobne oraz wydatnie skraca czas półtrwania tego białka. Poprzez kompetycyjne oddziaływanie z witronektyną uniemożliwia również interakcję ze swoistym receptorem, hamując w ten sposób zależne od urokinazy procesy adhezji i migracji [1]. Istotny wpływ PAI-1 na te procesy obserwuje się w warunkach fizjologicznej homeostazy, kiedy efektywnie blokuje on kolejne etapy przemian umożliwiających przemieszczanie się komórek w tkankach, uruchamia również mechanizmy pozwalające na ponowne wzbudzenie tych procesów, gwarantujące za-

chowanie między nimi dynamicznej równowagi. Oddziaływanie PAI-1 z uPA podlega w tych warunkach ciągłym zmianom, a jego efekt zależy zarówno od ilościowej przewagi jednego z tych białek, jak i wpływu innych czynników biologicznych.

W poprzednich doniesieniach autorzy wykazali, że aktywność biologiczna PAI-1 pozostaje w ścisłym związku z jego stężeniem w badanym układzie (tkanka, hodowle komórkowe), ale również z czasem półtrwania, pośrednio odzwierciedlającym aktywność antyfibrynolityczną PAI-1, a więc zdolność do wchodzenia w reakcję z uPA w czasie. I tak zdolność oddziaływania PAI-1 na proces powstawania pączków naczyńowych była wprost zależna od czasu jego półtrwania. Białko zmutowane o znacząco przedłużonej aktywności antyfibrynolitycznej wykazywało zależny od dawki silny efekt hamujący, podczas gdy białko dzikie o krótkim czasie półtrwania stymulowało proces angiogenezy również w sposób zależny od stężenia PAI-1 w układzie doświadczalnym [6–8].

Celem niniejszego projektu była ocena znaczenia opisanych elementów — czasu półtrwania i stężenia — na modulacyjny wpływ zmutowanej postaci PAI-1, charakteryzującej się znacząco przedłużoną aktywnością antyfibrynolityczną ($T_{1/2} = 7000$ godz.), wobec aktywności proliferacyjnej komórek różnych linii nowotworowych — raka płuca, raka gruczołu krokowego oraz komórek śródbłonka naczyńowego [6].

Materiał i metody

Hodowle komórkowe

Linie komórkowe ludzkiego niedrobnokomórkowego raka płuca A549 (CCL-185), raka gruczołu krokowego DU145 (ATCC, Manassas, VA, USA) oraz komórki śródbłonka ludzkiej żyły pępowinowej (HUVEC, *human umbilical vein endothelial cells*) (Cambrex Inc., East Rutherford, NJ, USA) hodowano do momentu osiągnięcia konfluentnego wzrostu w mediach hodowlanych: komórki nowotworowe w podłożu Ham F12 (Sigma) lub RPMI 1640 (Sigma) z dodatkiem 2 mM L-glutaminy (Sigma) i 10% płodowej surowicy bydlęcej (FBS, *fetal bovine serum*) (Sigma) oraz antybiotyków (Antibiotic-Antimycotic, Gibco), komórki HUVEC w podłożu EGM-2MV (Cambrex Inc,

USA), w komorze hodowlanej, w temperaturze 37°C oraz wilgotnej atmosferze z 5% CO₂ (Sony, Japonia).

Komórki płukano PBS (*phosphate-buffered saline*) bez jonów Ca²⁺ i Mg²⁺ i trypsynizowano w roztworze 0,05% trypsyny (Gibco) oraz określano ich gęstość metodą hemocytometryczną, następnie wysiewano na płytki 96-dołkowe w liczbie 4000 komórek/dołek (A549, DU145) lub 5000 komórek/dołek (HUVEC). Po 48 godzinach hodowli po uzyskaniu wzrostu konfluentnego wymieniano podłoże, dodawano PAI-1 w stężeniach: 1, 10, 100 µg/ml, w trzech powtórzeniach. Hodowle prowadzono przez 24, 48 i 72 godziny w standardowych warunkach. Każde doświadczenie powtarzano 3-krotnie.

Aktywność proliferacyjna komórek

Aktywność proliferacyjną komórek nowotworowych oceniano po 24, 48 i 72 godzinach od momentu dodania PAI-1, stosując komercyjny zestaw EZ4Y cytotoxicity assay (Biomedica). Analizę wykonywano zgodnie z zaleceniami producenta. W skrócie, po dodaniu substratu w ilości odpowiadającej 10% objętości mediów hodowlanych i inkubacji w 37°C, 5% CO₂ przez 2 godziny, płytki wytrząsano 5 minut przy 300 rpm i dokonywano pomiaru absorbancji przy długości fali 450 nm (czytnik Infinite M200, Tecan).

Aktywność proliferacyjną komórek śródbłonna oceniano po 24, 48 i 72 godzinach od momentu dodania PAI-1, stosując test z czerwieni obojętną, zestaw In Vitro Toxicology Assay Kit Neutral Red Based (Sigma-Aldrich, Polska). Analizę wykonywano zgodnie z zaleceniami producenta. W skrócie, po dodaniu roztworu czerwieni obojętnej

w ilości odpowiadającej 10% objętości mediów hodowlanych, płytki inkubowano w 37°C, 5% CO₂ przez 2 godziny, pożywkę usuwano, a komórki płukano odczynnikiem utrwalającym, poddawano działaniu 100 ml substancji rozpuszczającej. Pomiaru absorbancji dokonywano przy długości fali 540 nm (czytnik Infinite M200, Tecan).

Wyniki przedstawiono jako procent kontroli (kontrolę stanowiły komórki rosnące w standardowym medium hodowlanym odpowiednim dla danej linii, bez dodatku PAI-1).

Wyniki

Zmutowana postać PAI-1 charakteryzująca się znacznie przedłużoną aktywnością antyfibrynolityczną w istotny sposób hamowała aktywność proliferacyjną komórek A549 raka płuca wraz ze wzrostem jej stężenia w hodowli (tab. 1). Aktywność proliferacyjna komórek A549 hodowanych w obecności 100 µg/ml PAI-1 była znacząco niższa w porównaniu z hodowlą z dodatkiem 1 µg/ml ($p < 0,001$) już po 24 godzinach. Hamujący efekt PAI-1 nasilał się z upływem czasu, był znamienne większy po 48 i 72 godzinach hodowli.

W hodowlach komórek raka gruczołu krokowego DU145 nie obserwowano efektu hamowania zależnego od dawki i czasu. Jedynie komórki poddane działaniu najwyższego stężenia PAI-1 (100 µg/ml) przez 72 godziny wykazywały pewien spadek aktywności proliferacyjnej w stosunku do pozostałych hodowli (1, 10 µg/ml) ($p < 0,001$).

Aktywność proliferacyjna komórek śródbłonna ludzkiej żyły pępowinowej była w istotny spo-

Tabela 1. Wpływ zmutowanej formy PAI-1 o długim czasie półtrwania (PAI-1 VLHL [*very long half-life*]) na aktywność proliferacyjną komórek linii A549 raka płuca oraz linii DU145 gruczołu krokowego

Table 1. The effect of mutated PAI-1 with long half-life time (PAI-1 VLHL) on the proliferation activity of A549 lung cancer cells and DU145 prostate cancer cells

	PAI-1 VLHL [µg/ml]	Proliferacja względem kontroli (%) /Proliferation compared with control (%) × ± SD		
		24 h	48 h	72 h
A549				
	1	105,67 ± 5,53	101,81 ± 3,02 ³	92,26 ± 3,02 ^{3,4}
	10	95,45 ± 1,38 ¹	90,82 ± 3,55 ¹	69,68 ± 4,40 ^{1,3}
	100	86,42 ± 2,43 ^{1,2}	70,62 ± 1,19 ^{1,2,3}	53,68 ± 3,09 ^{1,2,3,4}
DU145				
	1	103,54 ± 5,28	98,00 ± 1,33	102,64 ± 0,72
	10	99,73 ± 1,06	96,66 ± 2,31	102,24 ± 5,57
	100	97,00 ± 5,19	93,43 ± 5,52	91,18 ± 5,10 ^{1,5}

¹p < 0,001 w porównaniu z komórkami hodowanymi w obecności PAI-1 1 µg/ml; ²p < 0,001 w porównaniu z komórkami hodowanymi w obecności PAI-1 10 µg/ml;

³p < 0,001 w porównaniu z hodowlą 24 godz.; ⁴p < 0,001 w porównaniu z hodowlą 48 godz.; ⁵p < 0,01 w porównaniu z komórkami hodowanymi w obecności PAI-1 10 µg/ml; SD (standard deviation) — odchylenie standardowe

Tabela 2. Wpływ zmutowanej formy PAI-1 o długim czasie półtrwania (PAI-1 VLHL [very long half-life]) na aktywność proliferacyjną komórek śródbłonna ludzkiego

Table 2. The effect of mutated PAI-1 with long half-life time (PAI-1 VLHL) on the proliferation activity of human endothelial cells

PAI-1 VLHL [$\mu\text{g/ml}$]	Proliferacja względem kontroli (%) /Proliferation compared with control (%) $\times \pm \text{SD}$			
	HUVEC	24 h	48 h	72 h
n = 9	1	96,95 \pm 3,93	99,16 \pm 3,38	93,25 \pm 7,65
	10	89,06 \pm 1,67	92,39 \pm 7,15	91,25 \pm 7,95
	100	79,52 \pm 8,00 ^{1,4}	79,69 \pm 3,45 ^{1,3}	74,64 \pm 12,05 ^{2,4}

¹p < 0,001 w porównaniu z komórkami hodowanymi w obecności PAI-1 1 $\mu\text{g/ml}$; ²p < 0,01 w porównaniu z komórkami hodowanymi w obecności PAI-1 1 $\mu\text{g/ml}$; ³p < 0,001 w porównaniu z komórkami hodowanymi w obecności PAI-1 10 $\mu\text{g/ml}$; ⁴p < 0,01 w porównaniu z komórkami hodowanymi w obecności PAI-1 10 $\mu\text{g/ml}$; SD (standard deviation) — odchylenie standardowe

sób hamowana przez PAI-1 w stężeniu 100 $\mu\text{g/ml}$ już po 24 godzinach, efekt ten obserwowano również w kolejnych dobach hodowli po 48 i 72 godzinach (tab. 2). Hamujący efekt PAI-1 nie wykazywał dynamiki w czasie.

Dyskusja

Mikrośrodowisko tkankowe, w którym namnażają się komórki nowotworowe, charakteryzuje bardzo duża dynamika, wynikająca z rozchwiania ogólnoustrojowej oraz lokalnej homeostazy czynnościowej w organizmie chorego, jak również z indywidualnych cech tych komórek — fenotypu nowotworu. W sposób szczególnie zjawisko to dotyczy PAI-1, który jest elementem wyjątkowo skomplikowanego układu zależności, bardzo skróto określonego jako oddziaływanie PAI-1 poprzez uPA lub też poprzez witronektynę [1]. W rzeczywistości interakcje białek w ramach tego systemu biologicznego są znacznie bardziej złożone, a aktualna wiedza tylko w niewielkim stopniu pozwala zrozumieć stopień komplikacji wzajemnych oddziaływań na poziomie białek i genów. Odzwierciedlają to istotne sprzeczności w publikowanych wynikach badań nad wpływem PAI-1 na aktywność angiogenną komórek nowotworowych. Silny stymulujący wpływ urokinazy i jej receptora na ogół uważa się za pewnik, natomiast rola PAI-1 w tych procesach jest nadal dyskusyjna, a wyniki badań doświadczalnych różnicowane [9–13]. Wydaje się, że źródłem tych rozbieżności jest wysoki stopień skomplikowania wzajemnych powiązań między PAI-1 a pozostałymi elementami układu plazminogen–plazmina, ale również bardzo różnicowane oddziaływania innych cytokin i mediatorów uwalnianych przez komórki, stosownie do ich charakterystyki fenotypowej [14]. Warto też pamiętać o licznych ograniczeniach

technicznych stosowanych modeli doświadczalnych *in vitro* i *in vivo* oraz o problemach wynikających z bardzo krótkiego czasu półtrwania dzikiej formy PAI-1 ($T_{1/2} = 60$ min) i z niezadowalającej stabilności uzyskanych dotąd zmodyfikowanych form PAI-1 (max $T_{1/2} = 145$ godz.) [15]. Bardzo długi czas półtrwania stworzonej przez autorów zmutowanej postaci PAI-1 ($T_{1/2} \sim 7000$ godzin) pozwala uniknąć części spośród wymienionych wcześniej problemów technicznych i nie pozostawia wątpliwości odnośnie do aktywności białka PAI-1 w hodowli, jak również mechanizmu, w którym oddziałuje na komórki.

W niniejszej pracy analizowano wpływ PAI-1 na aktywność proliferacyjną komórek nowotworowych — linii A549 raka płuca oraz DU145 raka gruczołu krokowego — uzyskując ich znacząco różną odpowiedź na obecność tego białka w mikrośrodowisku hodowlanym. W dostępnym piśmiennictwie brakuje badań na temat wpływu PAI-1 na aktywność proliferacyjną linii A549, a także innych linii raka płuca. Pośrednie dane pochodzą z prac, w których analizowano wpływ TGF- β (transforming growth factor beta) na proliferację komórek raka płuca, wykazując, że antyproliferacyjne działanie tej cytokiny odbywa się poprzez wzbudzenie uwalniania PAI-1 i zanika w razie zahamowania jego syntezy [14]. Bardzo interesujący wydaje się wykazany przez autorów znamieny związek między stężeniem PAI-1 i czasem jego oddziaływania na stopień zahamowania proliferacji komórek A549. Zależność ta przekonująco potwierdza, że kluczowym mechanizmem regulującym aktywność proliferacyjną komórek A549 jest interakcja między PAI-1 i uPA, a więc mechanizm antyproliferacyjny. Wiadomo skądinąd, że komórki A549 należą do typowych „producentów” uPA, natomiast uwalnianie uPA jest silnie stymulowane przez hipoksję [16]. Fakt ten może stanowić interesujące pole do dalszych badań, należy bo-

wiem założyć, że antyproliferacyjne działanie PAI-1 jest znacząco modyfikowane w obecności nadmiaru uPA w mikrośrodowisku (uPA-PAI-1 tworzą kompleks w stosunku 1:1) [1].

W przeciwieństwie do linii raka płuca, komórki raka gruczołu krokowego DU145 charakteryzowała znacząca oporność wobec zmutowanej postaci PAI-1 o długim czasie działania. Poza najwyższą dawką PAI-1 po 72 godzinach hodowli nie wykazano istotnego wpływu na aktywność proliferacyjną tych komórek. Wprawdzie Soff i wsp. [10] opisali hamujące działanie PAI-1 na wzrost pierwotnego guza i tworzenie przerzutów u myszy po wszczepieniu komórek raka gruczołu krokowego, jednak kolejni badacze potwierdzili, że efekt ten jest związany z silnym działaniem proapoptotycznym PAI-1 wobec komórek śródbłonna naczyniowego i efektem antyangiogennym [17, 18]. Także zaobserwowane przez autorów niniejszej pracy antyproliferacyjne działanie PAI-1 wobec komórek śródbłonna naczyniowego pozostaje w zgodzie z cytowanymi doniesieniami o antyangiogennym działaniu tego białka wynikającym głównie z jego działania antyfibrynolitycznego. Wyniki tej pracy są również zbieżne z obserwacjami innych autorów hamującego wpływu PAI-1 na procesy gojenia śródbłonna naczyń po interwencji chirurgicznej czy też zaburzeń proliferacji komórek śródbłonna w warunkach *in vitro* [19, 20]. Niniejsza analiza dobitnie potwierdza wysoki poziom trudności badań nad biologiczną rolą PAI-1, podkreślając wielość elementów istotnie wpływających na biologiczny efekt działania tego białka. Wykazano, że PAI-1 moduluje aktywność proliferacyjną komórek w mechanizmie hamowania urokinazy w stopniu ściśle zależnym od czasu działania i dawki, ale również fenotypu komórek. Ten ostatni związek wskazuje też na konieczność zachowania daleko idącej ostrożności w interpretowaniu wyników badań nad komórkami o zróżnicowanym pochodzeniu.

Piśmiennictwo

1. Chorostowska-Wynimko J., Skrzypczak-Jankun E., Jankun J. Plasminogen activator inhibitor type-1: its structure, biological activity and role in tumorigenesis. *Int. J. Mol. Med.* 2004; 13: 759-766.
2. Yamamoto K., Saito H. A pathological role of increased expression of plasminogen activator inhibitor-1 in human or animal disorders. *Int. J. Hematol.* 1998; 68: 371-385.
3. Gveric D., Herrera B., Petzold A., Lawrence D.A., Cuzner M.L. Impaired fibrinolysis in multiple sclerosis: a role for tissue plasminogen activator inhibitors. *Brain* 2003; 126: 1590-1598.
4. Rakic J.M., Maillard C., Jost M. i wsp. Role of plasminogen activator-plasmin system in tumor angiogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* 2003; 60: 463-473.
5. Andreasen P.A., Egelund R., Peterson H.H. The plasminogen activation system in tumor growth, invasion and metastasis. *Cell. Mol. Life Sci.* 2000; 57: 25-40.
6. Chorostowska-Wynimko J., Swiercz R., Skrzypczak-Jankun E. i wsp. A novel form of the plasminogen activator inhibitor created by cysteine mutations extends its half-life: relevance to cancer and angiogenesis. *Mol. Cancer Ther.* 2003; 2: 19-28.
7. Chorostowska-Wynimko J., Skrzypczak-Jankun E., Jankun J. The plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) controls the process of the *in vitro* sprout formation. *J. Physiol. Pharmacol.* 2004; 55 (supl. 3): 49-56.
8. Chorostowska-Wynimko J., Swiercz R., Skrzypczak-Jankun E., Selman S.H., Jankun J. Plasminogen activator inhibitor type-1 mutants regulate angiogenesis of human umbilical and lung vascular endothelial cells. *Oncol. Rep.* 2004; 12: 1155-1162.
9. Hildenbrand R., Dilger I., Horlin A., Stutte H.J. Urokinase plasminogen activator induces angiogenesis and tumor vessel invasion in breast cancer. *Pathol. Res. Pract.* 1995; 191: 403-409.
10. Soff G.A., Sanderowitz J., Gately S. i wsp. Expression of plasminogen activator inhibitor type 1 by human prostate carcinoma cells inhibits primary tumor growth, tumor-associated angiogenesis, and metastasis to lung and liver in an athymic mouse model. *J. Clin. Invest.* 1995; 96: 2593-2600.
11. Bajou K., Noel A., Gerard R.D. i wsp. Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization. *Nat. Med.* 1998; 4: 923-928.
12. Eitzman D.T., Krauss J.C., Shen T., Cui J., Ginsburg D. Lack of plasminogen activator inhibitor-1 effect in a transgenic mouse model of metastatic melanoma. *Blood* 1996; 87: 4718-4722.
13. Almholt K., Nielsen B.S., Frandsen T.L. i wsp. Metastasis of transgenic breast cancer in plasminogen activator inhibitor-1 gene-deficient mice. *Oncogene* 2003; 22: 4389-4397.
14. Albo D., Arnoletti J.P., Castiglioni A. i wsp. Thrombospondin (TSP) and transforming growth factor beta 1 (TGF-beta) promote human A549 lung carcinoma cell plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) production and stimulate tumor cell attachment *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994; 203: 857-865.
15. Ginsburg D., Zeheb R., Yang A.Y. i wsp. cDNA cloning of human plasminogen activator-inhibitor from endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 1986; 78: 1673-1680.
16. Sato M., Tanaka T., Maemura K. i wsp. The PAI-1 gene as a target of endothelial PAS domain protein-1 in adenocarcinoma A549 cells. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 2004; 31: 209-215.
17. Festuccia C., Dolo V., Guerra F. i wsp. Plasminogen activator system modulates invasive capacity and proliferation in prostatic tumor cells. *Clin. Exp. Metastasis* 1998; 16: 513-528.
18. Chen S., Dale H., Reczek P., Wong M. Plasminogen activator inhibitor type-1 inhibits prostate tumor growth through endothelial apoptosis. *Mol. Cancer Ther.* 2008; 7: 1227-1236.
19. Suzuki J., Ogawa M., Muto S. i wsp. The effects of pharmacological PAI-1 inhibition on thrombus formation and neointima formation after arterial injury. *Expert Opin. Ther. Targets* 2008; 12: 783-794.
20. Balsara R.D., Castellino F.J., Ploplis V.A. A novel function of plasminogen activator inhibitor-1 in modulation of the AKT pathway in wild-type and plasminogen activator inhibitor-1-deficient endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 2006; 281: 22527-22536.