

组织因子途径抑制物2对胰腺癌细胞浸润能力的影响

俞建雄, 袁 静, 王春友, 陈立波, 周 峰

俞建雄, 浙江省台州市立医院普外科 浙江省台州市 318000
袁静, 华中科技大学同济医学院附属协和医院眼科 湖北省武汉市 430022
王春友, 陈立波, 周峰, 华中科技大学同济医学院附属协和医院胰腺外科中心 湖北省武汉市 430022
俞建雄, 男, 1974-07-07 生, 江西婺源人, 汉族, 2004 年华东理工大学同济医学院博士, 主治医师, 主要从事胰腺疾病临床与基础研究。
项目负责人: 俞建雄, 318000, 浙江省台州市立医院普外科. yujacky@163.com
收稿日期: 2004-02-03 接受日期: 2004-03-04

Role of tissue factor pathway inhibitor-2 in pancreatic cancer cell invasion

Jian-Xiong Yu, Jing Yuan, Chun-You Wang, Li-Bo Chen, Feng Zhou

Jian-Xiong Yu, Department of General Surgery, Taizhou Municipal Hospital, Taizhou 318000, Zhejiang Province, China
Jing Yuan, Department of Ophthalmology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China
Chun-You Wang, Li-Bo Chen, Feng Zhou, Center for Pancreatic Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China
Correspondence to: Jian-Xiong Yu, Department of General Surgery, Taizhou Municipal Hospital, Taizhou 318000, Zhejiang Province, China. yujacky@163.com
Received: 2004-02-03 Accepted: 2004-03-04

Abstract

AIM: To elucidate the relation between TFPI-2 expression and pancreatic cancer cell invasion.

METHODS: Human TFPI-2 expression vector pBos-Cite-neo/TFPI-2 was transfected into pancreatic cancer cell line Panc-1. After being selected by G418, transfected and nontransfected cells were screened for TFPI-2 mRNA and protein by reverse transcription-polymerase chain reaction and Western blot analysis, respectively. The number of transfected or nontransfected cells passing through membrane of Boyden chamber and the ability of tumorigenesis in nude mice was counted as the basis assessing invasive behaviors of the tumor cells.

RESULTS: Expression of mRNA and protein of TFPI-2 was confirmed in transfected cells. In invasion assay, the number of TFPI-2-expressing cells to traverse a Matrigel-coated membrane was obviously decreased compared with that of non-expressing cells (60.7 ± 7.6 , 109.7 ± 5.5 or 110.7 ± 9.0 , $P < 0.001$); The size grown in nude mice was significantly smaller than its counterpart at 3 weeks ($0.39 \text{ cm} \times 0.36 \text{ cm}$, $0.56 \text{ cm} \times 0.50 \text{ cm}$ or $0.60 \text{ cm} \times 0.52 \text{ cm}$, $P < 0.001$), which were also confirmed no apparent vertical invasion into the muscle layers by pathology.

CONCLUSION: Expression of TFPI-2 may strongly inhibit the invasive ability of pancreatic tumor cells *in vitro* and *in*

vivo, which provides an experimental basis for the treatment of human pancreatic cancer with gene-therapy.

Yu JX, Yuan J, Wang CY, Chen LB, Zhou F. Role of tissue factor pathway inhibitor-2 in pancreatic cancer cell invasion. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(8):1884-1888

摘要

目的: 探讨TFPI-2表达与胰腺癌细胞体外和体内浸润能力之间的关系。

方法: 脂质体介导人类TFPI-2真核表达载体pBos-Cite-neo/TFPI-2转染胰腺癌细胞系Panc-1 G418筛选阳性细胞 RT-PCR Western blot 技术检测转染前后胰腺癌细胞中TFPI-2 mRNA以及相应蛋白质的表达水平; 利用Boyden小室检测转染前后胰腺癌细胞穿膜的细胞数比较转染前后胰腺癌细胞的裸鼠成瘤大小以此作为评价胰腺癌细胞体外和体内浸润能力的指标。

结果: 转染成功的胰腺癌细胞证实有TFPI-2 mRNA和相应蛋白质的表达; 与未转染的细胞相比转染TFPI-2的细胞体外浸润能力显著下降(穿膜细胞数为 60.7 ± 7.6 109.7 ± 5.5 和 110.7 ± 9.0 $P < 0.001$); 3 wk 后裸鼠成瘤明显缩小($0.39 \text{ cm} \times 0.36 \text{ cm}$ $0.56 \text{ cm} \times 0.50 \text{ cm}$ 和 $0.60 \text{ cm} \times 0.52 \text{ cm}$ $P < 0.001$) 病理切片亦证实没有肌层浸润现象。

结论: TFPI-2表达可显著抑制胰腺癌细胞的体外和体内浸润能力 为进一步开展胰腺癌的基因治疗提供实验依据。

俞建雄, 袁静, 王春友, 陈立波, 周峰. 组织因子途径抑制物2对胰腺癌细胞浸润能力的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(8):1884-1888
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1884.asp>

0 引言

近年研究表明肿瘤细胞分泌的多种丝氨酸蛋白酶以及基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases MMPs)所参与的细胞外基质(extracellular matrix ECM)降解是肿瘤细胞实现浸润转移过程中的关键一步^[1]. 因而 减弱这些酶的活性保护ECM结构完整可能达到抑制肿瘤细胞浸润转移的目的. 组织因子途径抑制物2(tissue factor pathway inhibitor-2 TFPI-2) 又称胎盘蛋白5(placenta protein 5 PP-5)是一种 $M_r 32\ 000$ 的丝氨酸蛋白酶抑制物 体外可抑制纤溶酶胰蛋白酶MMPs在内的多种蛋白酶在纤溶伤口愈合血管生成以及肿瘤细胞浸润转移等一系列病理生理过程中发挥重要作用^[2]. 本

研究将 TFPI-2 基因真核表达载体转染人胰腺癌细胞 Panc-1 观察其对胰腺癌细胞体内外浸润能力的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 人源性胰腺癌细胞系 Panc-1 购自中国医学科学院基础所细胞中心; 裸鼠由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供. 试剂: (1)TFPI-2真核表达载体pBos-Cite-neo/TFPI-2 和抗 TFPI-2 多克隆抗体: 协和血液内科仲任博士惠赠. (2)DMEM 高糖培养基 G418 Trizol 试剂 Lipofectamine 2000 及胎牛血清: 美国 Gibco 公司产品. (3)M-MLV 酶和 Taq 酶: 美国 Promega 公司产品. (4)Matrigel matrix: 美国 B.D 公司产品.

1.2 方法 人胰腺癌细胞 Panc-1 接种于含 100 mL/L 小牛血清的 DMEM 培养液培养瓶内置 37 °C 饱和湿度 50 mL/L CO₂ 的培养箱中培养每 3-5 d 消化转代. 取对数生长期 Panc-1 细胞接种于 6 孔培养板每孔含细胞数 2×10^5 个 培养 24 h 后细胞长至 80-90% 融合 用无血清 DMEM 培养液洗涤细胞 2 次以备转染用.

1.2.1 体外实验 采用脂质体介导的基因转染法. 脂质体为 Lipofectamine2000 真核细胞表达质粒 pBos-Cite-neo/TFPI-2 含有 Neo 标记基因. 转染方法按说明书进行 设为 3 组 细胞转染 pBos-Cite-neo/TFPI-2 表达载体的为实验组命名为 Panc-1-TFPI-2 转染空载体和未转染细胞为对照组分别命名为 Panc-1-V 和 Panc-1-P. 用含 G418 400 mg/L 的 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养基抗性筛选挑选阳性克隆继续在含 G418 200 mg/L 的培养液中维持生长 2 wk 扩大培养. TFPI-2 基因表达情况的检测: (1)逆转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction RT-PCR)检测: 采用 RT-PCR 技术检测三组细胞中 TFPI-2 mRNA 的表达: 人类 TFPI-2 的 PCR 上下游引物分别为 5'-GTTCGATTCTGCTGCTTTTCC-3' 和 5'-ATGGAATTCTTTTGGTGCG-3' [3] 合成产物为 440 bp; β -actin 作为内参照 上下游引物分别为 5'-GAAACTACCTTCAACTCCATC-3' 和 5'-CGAGGCCAGGATGGAGCCGCC-3' 产物为 219 bp. 用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA 紫外分光光度计检测其浓度和纯度后经 M-MLV 行逆转录反应生成的 cDNA 在 Taq 酶作用下 PCR 仪上扩增 35 个循环. 产物经 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析 紫外灯下观察摄像. (2)蛋白印迹 (western blot) 分析: 采用 Western blot 法分析三组细胞 TFPI-2 蛋白的表达 抽提 CM 蛋白方法见参考文献[4]. 样品用 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后恒压转移到 PVDF 膜上 用含 5% 脱脂牛奶的 TBST 缓冲液封闭 4 h 过夜 加入 TBST 1:5 000 稀释抗 TFPI-2 多抗 室温孵育 90 min TBST 洗 5 次 再用 HRP 标记的抗兔二抗孵育 60 min 显色 照相. (3)生长曲线测定: 观察转染 TFPI-2 对胰腺癌细胞生长有无抑制作用取

对数生长期三组 Panc-1 细胞接种于 100 mm 培养板 每组设 3 个复孔 每孔接种 1×10^4 细胞. 每隔 1 d 定时行细胞计数取平均值连续 2 wk. (4) Boyden 小室体外浸润实验: 采用 Boyden 小室检测三组细胞体外穿透人工重组 ECM 的能力具体方法见文献[4]. 每组细胞设三个复孔 每孔细胞数目大约为 5×10^5 个 体积大约为 25 μ L 37 °C 培养 6 h 甲醇固定并 Giemsa 染色. 每个孔随机计算 5 个视野($\times 100$)穿膜的细胞数求平均数. 穿膜的肿瘤细胞数目多少作为评价肿瘤细胞浸润能力强弱的指标.

1.2.2 体内实验 取 4 wk 龄的裸鼠(BALB/c -/-)15 只分为 3 组 每组皮下注射实验组(Panc-1-TFPI-2 细胞) 对照组(Panc-1-P 细胞)与控制组(Panc-1-V 细胞)各 0.2 mL (细胞密度为 5×10^{10} cells/L) 21 d 后测量肿瘤大小 并估算其重量(宽²/2). 处死后取接种部位及肝 肺组织行病理切片检查.

统计学处理 采用 SPSS11.0 统计软件包进行 ANOVA 检验 检验水准 $\alpha = 0.05$.

2 结果

2.1 体外实验 采用脂质体介导转染法经 G418 克隆筛选后获得稳定转染细胞. 其基因表达情况检测: (1) TFPI-2 基因在胰腺癌细胞中的表达: Panc-1-TFPI-2 细胞经 RT-PCR 检测可见明显的 TFPI-2 mRNA 表达 而 Panc-1-P 细胞和 Panc-1-V 细胞仅有极低量 TFPI-2 mRNA 表达(图 1). (2) TFPI-2 蛋白在胰腺癌细胞中的表达与 RT-PCR 结果相似 Panc-1-TFPI-2 细胞 ECM 抽提物中有 M_r 27 000 31 000 32 000 三种 TFPI-2 蛋白表达 而 Panc-1-P 细胞和 Panc-1-V 细胞 ECM 抽提物中没有任何一种 TFPI-2 蛋白的表达(图 2). (3) 胰腺癌细胞的生长曲线: 3 组生长曲线经 ANOVA 方差分析表明 TFPI-2 表达对胰腺癌细胞生长无抑制作用(图 3). (4) 胰腺癌细胞体外浸润实验: 把 Matrigel 铺在人工膜表面模拟体内 ECM 环境使肿瘤细胞不能自由穿过人工膜必须借助分泌的蛋白酶破坏 Matrigel 后细胞才可以穿过以检测肿瘤细胞的浸润能力. 本实验中 Panc-1-TFPI-2 Panc-1-P 和 Panc-1-V 三组细胞穿过人工膜的细胞数分别为 60.7 7.6 109.7 5.5 和 110.7 9.0 (图 4 5A B) $F = 41.2$ $P < 0.001$ 统计学有极显著差异说明 TFPI-2 表达可以明显抑制胰腺癌细胞的体外浸润.

2.2 体内实验 模拟体内环境评估肿瘤细胞成瘤能力大小. 结果表明 TFPI-2 表达可显著降低胰腺癌细胞的成瘤能力 实验组裸小鼠成瘤实体明显小于对照组和控制组(相对大小: 0.39 cm 0.36 cm 0.56 cm 0.50 cm 和 0.60 cm 0.52 cm $F = 36.8$ (长值)或 $F = 94.4$ (宽值) $P < 0.001$; 成瘤相对质量: 0.027 0.004 g 0.081 0.014 g 和 0.093 0.020 g $F = 30.8$ $P < 0.001$) 病理切片

发现虽然在第21 d时3组中肝肺并未发现转移灶但Panc-1-P组和Panc-1-V组细胞接种的裸小鼠大腿内侧新生物组织被证实是肿瘤组织且浸润到肌层使肌层组织结构被破坏肌纤维排列紊乱而Panc-1-TFPI-2组细胞接种的裸小鼠背部新生物组织虽也证实是肿瘤但其周边整齐没有肌层浸润现象(表1及图6-7)。

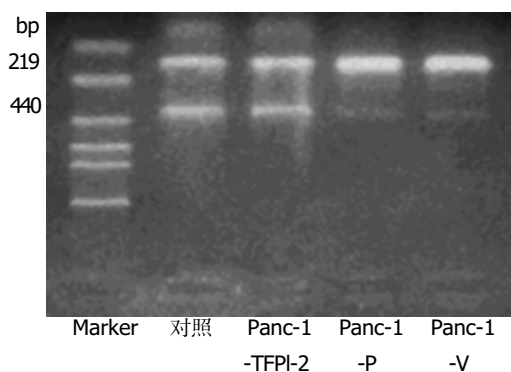


图1 胰腺癌细胞的RT-PCR分析。

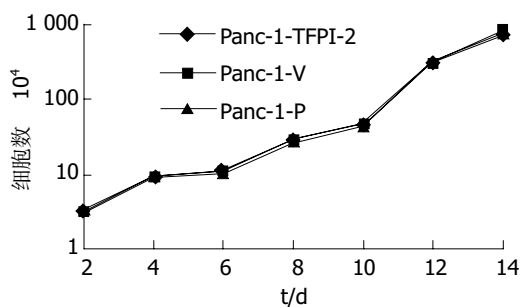


图3 胰腺癌细胞生长曲线测定。

表1 胰腺癌细胞接种裸鼠生成肿瘤的相对质量及远处转移(mean±SD, n=5)

细胞类型	相对大小(cm)		相对质量(g)		肺肝转移
Panc-1-P	0.56	0.50	0.093	0.020	0/10
Panc-1-V	0.60	0.52	0.081	0.014	0/10
Panc-1-TFPI-2	0.39	0.36 ^b	0.027	0.004 ^b	0/10

^bP<0.01.

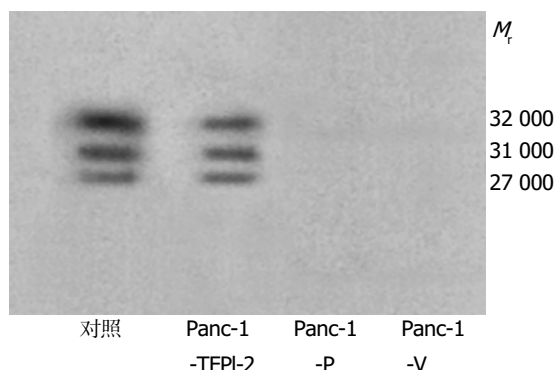


图2 胰腺癌细胞ECM的Western blot分析。

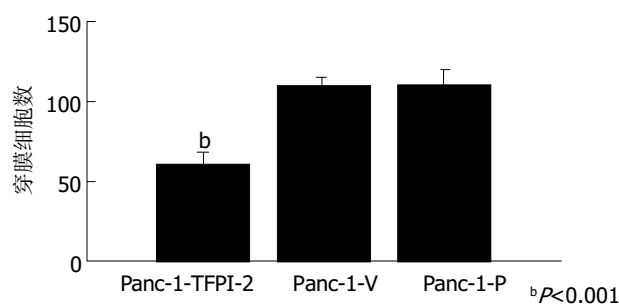


图4 TFPI-2对胰腺癌细胞体外浸润能力的影响。

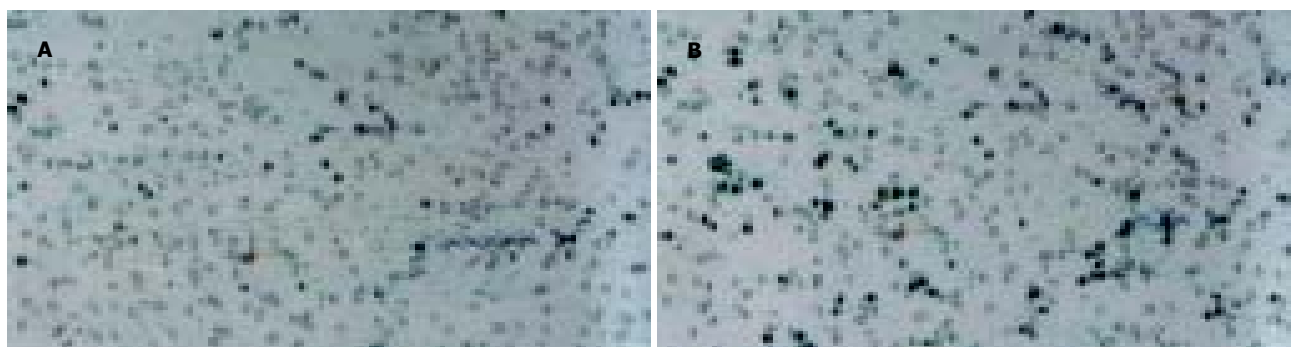


图5 胰腺癌细胞体外浸润能力 100. A: Panc-1-TFPI-2; B: Panc-1-P和Panc-1-V.

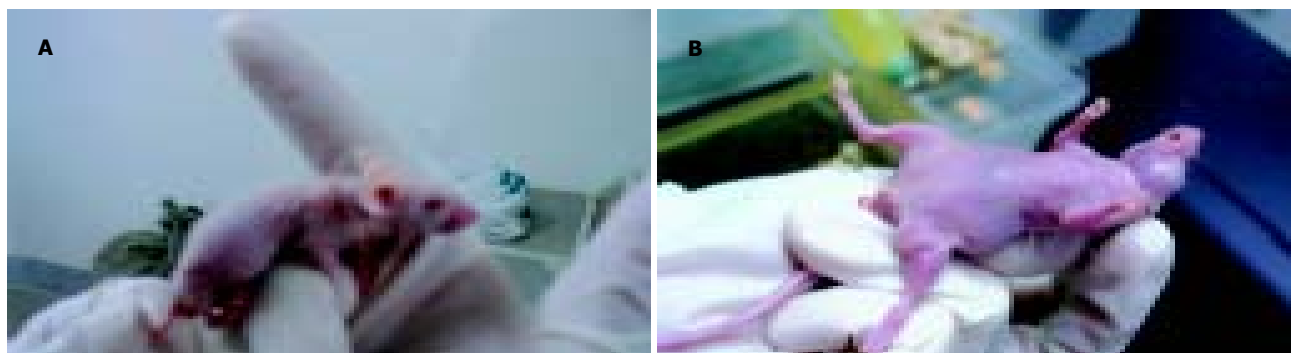


图6 胰腺癌细胞成瘤大小. A: Panc-1-TFPI-2; B: Panc-1-V/P.

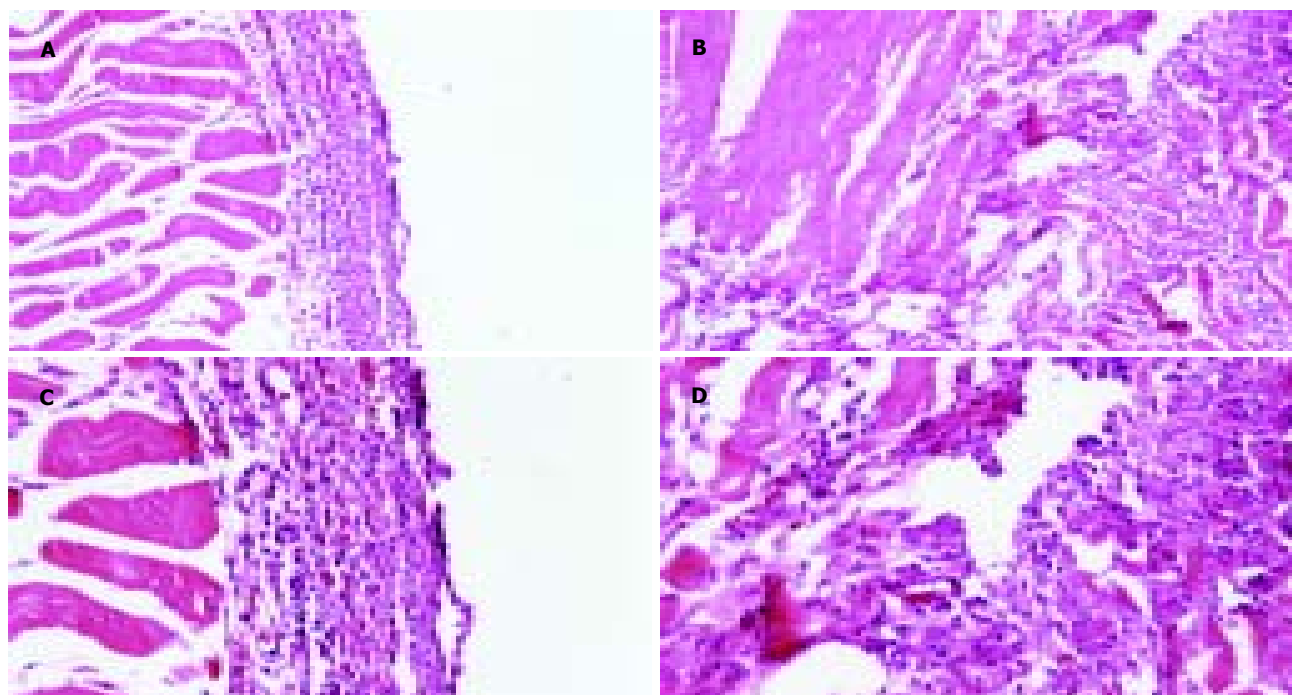


图7 胰腺癌细胞成瘤病理切片 HE. A: Panc-1-TFPI-2 100; B: Panc-1-V/P 100; C: Panc-1-TFPI-2 200; D: Panc-1-V/P 200.

3 讨论

浸润和转移是胰腺癌最重要的生物学特性与其他肿瘤相比胰腺癌发生转移早且较严重是导致患者丧失手术机会5a生存率极差的关键原因所在. 针对肿瘤的发生和发展与肿瘤细胞及其周围内环境密切相关因此应从肿瘤细胞本身和肿瘤生长的内环境两方面入手进行肿瘤的研究和诊治. 随着DNA重组技术的发展和肿瘤是基因异常持续发展结果的认可基因治疗技术这正逐渐成为治疗肿瘤的重要手段之一. 基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase MMPs)在胰腺癌浸润和转移中发挥至关重要的作用^[5] 体外试验证明将组织金属蛋白酶抑制物(tissue inhibitor of metalloproteinase TIMP)转染人胰腺癌细胞Panc-1后在不改变MMP2的含量同时可显著性降低胰腺癌细胞裸鼠接种的成功率抑制接种瘤的生长血管生成和转移增加Panc-1的细胞凋亡率^[6]; 并显著延长裸鼠负瘤的生存期^[7].

定位于7q22的TFPI-2基因其产物是广谱的丝氨酸蛋白酶抑制物在人类肝脏肾脏心脏骨骼肌等正常组织中都有着高度表达^[8] 主要以 $M_r 32\ 000$ 的形式分布在ECM中. 体外能强烈抑制纤溶酶胰蛋白酶MMP-1和MMP-3在内的多种蛋白酶与只有胶原酶抑制作用的TIMP相比TFPI-2的蛋白酶抑制谱更广抑制能力更强因而在维持ECM的结构完整抑制肿瘤细胞侵袭转移方面有着至关重要的作用. 然而一些肿瘤细胞常有TFPI-2基因缺失或染色体7q的改变^[9] 不能合成足够的TFPI-2来保护ECM免遭破坏从而造成肿瘤细胞侵袭转移能力提高加速病情发展. 我们既往的实验结果亦证实在进展期胰腺癌中存在有TFPI-2的严重表达不足^[10]. Shinode *et al*^[11]报道

TFPI-2可作为血管平滑肌细胞增生的刺激因子在心肌粥样变中发挥重要作用. 而在本实验中在给予胰腺癌细胞充分的空间和营养时TFPI-2并没有对胰腺癌细胞生长起促进或抑制作用考虑TFPI-2的丝裂原作用可能与细胞类型有关; 也提示我们TFPI-2不是通过抑制肿瘤细胞生长来抑制肿瘤的浸润和转移. 根据肿瘤细胞对细胞外基质的侵袭破坏过程而设计的Boyden小室是良好的体外浸润模型将肿瘤细胞置于上室下室中加入趋化因子在上室和下室之间分别以matrigel和PVPF膜代替基质及基底膜模拟肿瘤细胞降解局部细胞外基质穿过基底膜的浸润过程^[12]. 我们利用成功转染的Panc-1-TFPI-2细胞进行人胰腺癌细胞体外浸润能力的测定发现TFPI-2蛋白的表达可以显著抑制其体外浸润能力与国外研究人员针对其他肿瘤细胞所做的研究结果相一致^[4, 13-14]. 但与Neaud *et al*^[13]结果相迥异: 他们发现成肌纤维细胞(myofibroblast)分泌的TFPI-2可加强肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor HGF)(亦由成肌纤维细胞合成)诱导的肝癌细胞侵袭并且TFPI-2 cDNA转染的HCC也可以发生自发侵袭现象从而提出TFPI-2可能是通过与TF/F复合物结合来诱导HCC侵袭转移的这一点与TFPI-1(即我们通常所指的TFPI)促进膀胱癌细胞浸润转移作用相类似(膀胱癌细胞自身也表达TF/F复合物)^[15]. 进一步的裸小鼠种植成瘤能力实验证实TFPI-2是通过维持ECM的完整性来抑制胰腺癌细胞的浸润的. 在实验组中肿瘤细胞与周边肌层分界清晰而不似对照组和控制组; 虽在3 wk时3组均并未发现远处转移考虑与接种时间过短有关. 然而如何解释实验组中肿瘤的实体标本小于后两组呢我们推测: 在肿瘤的生长过程中存

在着无血管期和有血管期两个阶段.在无血管期时肿瘤处于增生和凋亡的平衡状态直径不超过 1-2 mm;在血管期肿瘤通过自分泌或旁分泌途径产生血管内皮生长因子(VEGF) 成纤维细胞生长因子(bFGF)血小板衍生生长因子(PDGF)等促血管生长因子促进肿瘤微血管内皮细胞增生和迁移尤其是 VEGF 是血管内皮细胞特有的有丝分裂原^[16].因此在实验组中胰腺癌细胞并不象后 2 组那样可以从宿主中获得充分的营养而避免凋亡发生.

胰腺癌高表达组织因子(tissue factor TF) 并与胰腺癌的分化程度和预后呈强线性负相关已作为胰腺癌预后的一重要参考因素^[17].TF可以通过多种重组细胞骨架^[18];通过上调肿瘤细胞u-PAR表达^[19];通过调节肿瘤细胞的血管生成抗血管生成平衡等途径来增强胰腺癌的侵袭转移能力^[20].虽然TFPI-2对TF/FVII复合物抑制作用较弱但其可通过维持ECM完整性来免受肿瘤细胞入侵其中势必与TF/FVII复合物发生错综复杂的联系进一步的研究对于在TFPI-2 TF/FVII复合物和肿瘤转移之间构成一个网络更好地阐述肿瘤肿瘤的浸润转移发生机制为今后基因治疗奠定理论和实验基础实属必要.

4 参考文献

- Hofmann UB, Eggert AA, Blass K, Brocker EB, Becker JC. Expression of matrix metalloproteinases in the microenvironment of spontaneous and experimental melanoma metastases reflects the requirements for tumor formation. *Cancer Res* 2003; 63:8221-8225
- Rao CN, Reddy P, Reeder DJ, Liu Y, Stack SM, Kisiel W, Woodley DT. Prokaryotic expression, purification, and reconstitution of biological activities (Antiprotease, antitumor, and heparin-binding) for tissue factor pathway inhibitor-2. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;276:1286-1294
- Neaud V, Hisaka T, Monvoisin A, Bedin C, Balabaud C, Foster DC, Desmouliere A, Kisiel W, Rosenbaum J. Paradoxical pro-invasive effect of the serine proteinase inhibitor tissue factor pathway inhibitor-2 on human hepatocellular carcinoma cells. *J Biol Chem* 2000;275:35565-35569
- Jin M, Udagawa K, Miyagi E, Nakazawa T, Hirahara F, Yasumitsu H, Miyazaki K, Nagashima Y, Aoki I, Miyagi Y. Expression of serine proteinase inhibitor PP5/TFPI-2/MSPI decreases the invasive potential of human choriocarcinoma cells in vitro and in vivo. *Gynecol Oncol* 2001;83:325-333
- Matsuyama Y, Takao S, Aikou T. Comparison of matrix metalloproteinase expression between primary tumors with or without liver metastasis in pancreatic and colorectal carcinomas. *J Surg Oncol* 2002;80:105-110
- Bloomston M, Shafii A, Zervos EE, Rosemurgy AS. TIMP-1 overexpression in pancreatic cancer attenuates tumor growth, decreases implantation and metastasis, and inhibits angiogenesis. *J Surg Res* 2002;102:39-44
- Rigg AS, Lemoine NR. Adenoviral delivery of TIMP1 or TIMP2 can modify the invasive behavior of pancreatic cancer and can have a significant antitumor effect in vivo. *Cancer Gene Ther* 2001;8:869-878
- Miyagi Y, Koshikawa N, Yasumitsu H, Miyagi E, Hirahara F, Aoki I, Misugi K, Umeda M, Miyazaki K. cDNA cloning and mRNA expression of a serine proteinase inhibitor secreted by cancer cells: identification as placental protein 5 and tissue factor pathway inhibitor-2. *J Biochem (Tokyo)* 1994;116:939-942
- Stumpf E, Aalto Y, Hoog A, Kjellman M, Otonkoski T, Knuutila S, Andersson LC. Chromosomal alterations in human pancreatic endocrine tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 2000;29:83-87
- 俞建雄, 王春友, 陈立波, 周峰, 许逸卿. 组织因子途径抑制物 2 在胰腺癌中表达的实验研究. *中国现代医学杂志* 2004;14:72-75
- Shinoda E, Yui Y, Hattori R, Tanaka M, Inoue R, Aoyama T, Takimoto Y, Mitsui Y, Miyahara K, Shizuta Y, Sasayama S. Tissue factor pathway inhibitor-2 is a novel mitogen for vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1999;274:5379-5384
- Tullberg K, Haidvogel H, Obrist R, Burger MM, Obrecht JP. Selection of highly malignant tumour cells using reconstituted basement membrane matrix. *Invasion Metastasis* 1989;9:15-26
- Konduri SD, Tasiou A, Chandrasekar N, Nicolson GL, Rao JS. Role of tissue factor pathway inhibitor-2 (TFPI-2) in amelanotic melanoma (C-32) invasion. *Clin Exp Metastasis* 2000;18:303-308
- Konduri SD, Tasiou A, Chandrasekar N, Rao JS. Overexpression of tissue factor pathway inhibitor-2 (TFPI-2), decreases the invasiveness of prostate cancer cells in vitro. *Int J Oncol* 2001; 18:127-131
- Fischer EG, Riewald M, Huang HY, Miyagi Y, Kubota Y, Mueller BM, Ruf W. Tumor cell adhesion and migration supported by interaction of a receptor-protease complex with its inhibitor. *J Clin Invest* 1999;104:1213-1221
- Price DJ, Miralem T, Jiang S, Steinberg R, Avraham H. Role of vascular endothelial growth factor in the stimulation of cellular invasion and signaling of breast cancer cells. *Cell Growth Differ* 2001;12:129-135
- Kakkar AK, Lemoine NR, Scully MF, Tebbutt S, Williamson RC. Tissue factor expression correlates with histological grade in human pancreatic cancer. *Br J Surg* 1995;82:1101-1104
- Ruf W, Fischer EG, Huang HY, Miyagi Y, Ott I, Riewald M, Mueller BM. Diverse functions of protease receptor tissue factor in inflammation and metastasis. *Immunol Res* 2000;21: 289-292
- Taniguchi T, Kakkar AK, Tuddenham EG, Williamson RC, Lemoine NR. Enhanced expression of urokinase receptor induced through the tissue factor-factor VIIa pathway in human pancreatic cancer. *Cancer Res* 1998;58:4461-4467
- Poon RT, Lau CP, Ho JW, Yu WC, Fan ST, Wong J. Tissue factor expression correlates with tumor angiogenesis and invasiveness in human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003;9:5339-5345