

组织因子途径抑制物 2 对角膜基质细胞表达 MMPs 的影响

袁 静¹, 俞建雄², 周炼红¹

基金项目:国家自然科学基金(No. 81100664); 武汉大学自主科研项目(No. 111091)

作者单位:¹(430060) 中国湖北省武汉市, 武汉大学人民医院眼科;²(430060) 中国湖北省武汉市, 武汉大学人民医院外科

作者简介:袁静, 副主任医师, 副教授, 研究方向: 眼前节疾病。

通讯作者:袁静. xyj711@163.com

收稿日期:2012-12-09 **修回日期:**2013-03-31

Role of tissue factor pathway inhibitor-2 in the expressions of matrix metalloproteinases in keratocytes *in vitro*

Jing Yuan¹, Jian-Xiong Yu², Lian-Hong Zhou¹

Foundation items: National Natural Science Fund of China (No. 81100664); Wuhan University Independent Research Project (No. 111091)

¹Department of Ophthalmology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China; ²Department of Gastrointestinal Surgery, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China

Correspondence to: Jing Yuan. Department of Ophthalmology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China. xyj711@163.com

Received:2012-12-09 **Accepted:**2013-03-31

Abstract

• **AIM:** To elucidate the relation between tissue factor pathway inhibitor - 2 (TFPI - 2) expression and the expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in keratocytes.

• **METHODS:** Primary culture and subculture of rabbit keratocytes were established *in vitro*. Plasmid vector pBos-Cite-neo/TFPI-2 was transfected into keratocytes with Lipofectamine 2000. After being selected by G418, three groups of cells including TFPI-2 gene transfected cells K-TFPI-2, empty vector transfected cells K-V and non-transfected cells K-P were screened for TFPI-2 mRNA and protein by reverse transcription-polymerase chain reaction and Western blot analysis, respectively. The activity of MMPs in the three groups of cells was detected by substrate zymography and compared by ANOVA.

• **RESULTS:** Expression of mRNA and protein of TFPI-2 was more in the cells of K-TFPI-2 than in the other cells of K-P and K-V with a significant difference (mRNA: 0.79 ± 0.02 vs 0.51 ± 0.03 and 0.48 ± 0.02 , $P=0.000$ and $P=0.000$;

Protein: 24.5 ± 0.8 vs 15.5 ± 0.5 and 14.9 ± 0.9 , $P=0.000$ and $P=0.000$). Compared with the two groups of K-P and K-V, the cells of K-TFPI-2 had a significant decreased activity of MMP1 (12.3 ± 0.7 vs 16.7 ± 1.2 and 15.9 ± 0.7 , $P=0.001$ and $P=0.003$) and MMP2 (15.4 ± 1.3 vs 18.2 ± 1.1 and 17.8 ± 1.1 , $P=0.027$ and $P=0.046$).

• **CONCLUSION:** It is suggested that the expression of TFPI-2 may strongly inhibit the activity of MMPs in keratocytes *in vitro*, which provides an experimental basis for curing CNV with gene therapy.

• **KEYWORDS:** keratocytes; tissue factor pathway inhibitor-2; matrix metalloproteinases; extracellular matrix

Citation: Yuan J, Yu JX, Zhou LH. Role of tissue factor pathway inhibitor-2 in the expressions of matrix metalloproteinases in keratocytes *in vitro*. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013;13(4): 656-659

摘要

目的:探讨组织因子途径抑制物(TFPI-2)与体外角膜基质细胞基质金属蛋白酶(MMPs)表达的关系。

方法:体外兔角膜基质细胞原代、传代培养;脂质体介导人类TFPI-2真核表达载体pBos-Cite-neo/TFPI-2转染基质细胞,G418筛选阳性细胞,RT-PCR和Western-blot技术检测转染前后三组角膜基质细胞(转染TFPI-2基因组K-TFPI-2、转染空载体组K-V、未转染组K-P)中TFPI-2 mRNA以及相应蛋白质的表达水平;利用明胶酶谱法分析比较转染前后三组角膜基质细胞表达MMPs的活性差异。

结果:K-TFPI-2组角膜基质细胞TFPI-2 mRNA和蛋白质的表达较K-P和K-V组显著上调(mRNA: 0.79 ± 0.02 vs 0.51 ± 0.03 和 0.48 ± 0.02 , $P=0.000$ 和 $P=0.000$;蛋白质: 24.5 ± 0.8 vs 15.5 ± 0.5 和 14.9 ± 0.9 , $P=0.000$ 和 $P=0.000$);与K-P和K-V组相比,K-TFPI-2组细胞表达MMP-1,2的活性下降(MMP-1: 12.3 ± 0.7 vs 16.7 ± 1.2 和 15.9 ± 0.7 , $P=0.001$ 和 $P=0.003$; MMP-2: 15.4 ± 1.3 vs 18.2 ± 1.1 和 17.8 ± 1.1 , $P=0.027$ 和 $P=0.046$)。

结论:TFPI-2表达可明显抑制角膜基质细胞表达MMPs的活性,为进一步开展角膜新生血管性疾病的基因治疗提供实验依据。

关键词:角膜基质细胞;组织因子途径抑制物2;基质金属蛋白酶;细胞外基质

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2013.04.03

引用:袁静,俞建雄,周炼红.组织因子途径抑制物2对角膜基质细胞表达MMPs的影响.国际眼科杂志2013;13(4):656-659

0 引言

近年研究表明:基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)所参与的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)降解是角膜新生血管(corneal neovascularization, CNV)形成过程中的关键一步^[1-3]。因而,减弱这些 MMPs 的活性,保护 ECM 结构完整可抑制角膜新生血管的生长。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),是一种分子量为 32000 的丝氨酸蛋白酶抑制物,能有效抑制 MMPs 的活性。与只有胶原酶抑制作用的金属蛋白酶抑制物(TIMP)相比,TFPI-2 的蛋白酶抑制谱更广,能力更强。本研究通过 TFPI-2 基因真核表达载体转染实验兔的角膜基质细胞,观察后者表达 MMPs 的活性差异,为基因治疗 CNV 奠定实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料 选取 2 月龄健康新西兰大白兔 6 只,雌雄不限[购自武汉大学人民医院动物实验中心,合格号 SYXK(鄂)2004-0027]。DMEM 培养液、FBS、胰蛋白酶、Trizol 试剂、Lipofectamine2000(Gibco); XbaI 和 KpnI 酶(华美公司); M-MLV(生命公司);Taq 酶(Promega);抗波形蛋白抗体(中山公司);兔抗 TFPI-2 多抗和辣根过氧化物酶标记的二抗(武汉三鹰公司);质粒 pBos-Cite-neo/TFPI-2 质粒(由青岛大学医学院附属医院血液科仲任博士惠赠);图像分析仪(德国 Leica Q550iw)。

1.2 方法

1.2.1 兔角膜基质细胞原代和传代培养及鉴定 参照 Dropcova 等^[4]的方法,选取 2 月龄健康新西兰大白兔 6 只,雌雄不限,处死后立即摘除眼球,用 1/5000 氢氧化汞和生理盐水冲洗眼球,无菌条件下沿角膜缘取下角膜,在解剖显微镜下刮去上皮及内皮层,剪切角膜基质至 1mm³ 大小,接种到培养瓶中,置 37℃ 和 50mL/L CO₂ 培养箱干燥 2~3h 后加入适量 100mL/L FBS 的 DMEM 培养液培养,原代接种 1d 后,观察组织块贴壁情况、培养色泽等;每 3~4d 更换 1 次培养液,相差显微镜下观察细胞生长状况及形态特征,待基质细胞生长汇合至 80% 时,消化细胞,按 1:2 分种,取 3~4 代细胞用于实验。以抗波形蛋白抗体经免疫细胞化学方法鉴定,结合细胞生长特性及形态特征,确定培养的细胞为成纤维细胞。

1.2.2 质粒制备与纯化 真核细胞表达质粒 pBos-Cite-neo/TFPI-2 质粒经碱变性法抽提和 Liel 纯化法纯化,紫外分光光度仪测 DNA 纯度及浓度,经 XbaI 和 KpnI 酶切 37℃ 2h,1% 琼脂糖电泳,拍照。

1.2.3 脂质体介导的基因转染及阳性细胞筛选 脂质体为 Lipofectamine2000,转染方法按说明书进行,设为三组细胞,转染 pBos-Cite-neo/TFPI-2 表达载体为实验组,命名为 K-TFPI-2,转染空载体和未转染细胞为对照组,分别命名为 K-V 和 K-P。用含 G418 400mg/L 的 100mL/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 200mg/L 的培养液中维持生长 2wk,扩大培养。

1.2.4 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测 Trizol 试剂一步法提取细胞总 RNA,2μg 总 RNA 用 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,并同时扩增 β-actin 作为内参照。人类 TFPI-2 的 PCR 上、下游引物分别为 5'-GTCGATTCTGCTGCTTTTCC-3' 和 5'-ATGGAATTTCTTTGCTGCG-3'^[5],合成产物

为 440bp;β-actin 上、下游引物分别为 5'-GAAACTACC TTCAACTCCATC-3' 和 5'-CGAGGCCAGGATGGAGCCG CC-3',产物为 219bp。产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析,紫外灯下观察、摄像。

1.2.5 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^[6]。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,封闭后加入兔抗 TFPI-2 多抗(1:5000)4℃ 过夜,辣根过氧化物酶标记的二抗(1:1000)检测杂交蛋白,显色,照相。

1.2.6 明胶酶谱分析转染前后细胞 MMPs 的活性 收集无血清培养 24h 的三组亚融合状态细胞上清液,3000r/min 离心 5min。按细胞数换算成细胞上清液体积数,取等量细胞数的上清液加等体积 2×上样缓冲液,不变性经 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶(含 1.0mg/mL 明胶)电泳分离,凝胶于 2.5% Triton X-100 中漂洗 3h,Tris-HCl 缓冲液 37℃ 孵育 18h,考马斯亮蓝染色 4h,脱色 2h。

1.2.7 图像分析 用德国 Leica Q550iw 图像分析仪对 RT-PCR 和 Western-blot 及酶谱结果进行图像分析,计算条带的积分吸光度(IA),IA=平均吸光度×面积。

统计学分析:使用的软件为 SPSS 13.0 数据统计分析系统,所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,行 one-way ANOVA 检验,两两比较采用 LSD-t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 质粒酶切鉴定 经 XbaI 和 KpnI 酶切后所得质粒电泳结果见图 1,与分子量标准比较,可见 400~500bp 之间有一条清晰的条带,证实提取的 DNA 是携带 TFPI-2 片段的表达质粒。

2.2 基质细胞培养及基因转染 组织块接种 2~3d 后可见少许细胞爬出,呈梭形排列整齐;4~5d 后,细胞以组织块为中心呈星芒状向周围生长,其间夹有少量多角形细胞,1wk 后融合传代;2wk 后,生长细胞可呈片状、网状连接,经过 2~3 次传代后,夹杂的少量上皮细胞因对胰蛋白酶耐受性差异、再次贴壁难易程度而逐渐消失,传第 3 代后,即可得到纯的基质细胞(图 2)。培养的兔角膜基质细胞经波形蛋白免疫细胞化学染色阳性,结合细胞形态、病理 HE 染色证实细胞为成纤维细胞。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,稳定转染后的细胞形态及生长速度未见明显改变。

2.3 RT-PCR 检测 TFPI-2 基因表达 经 RT-PCR 检测三组角膜基质细胞 TFPI-2 mRNA 表达情况(图 3),并采用 TFPI-2 与 β-actin 的 IA 比值表示角膜基质细胞 TFPI-2 基因表达水平(表 1)。经 LSD-t 检验发现:K-TFPI-2 组与 K-P 组、K-TFPI-2 与 K-V 组之间存在显著性差异($P = 0.000$ 和 $P = 0.000$),而 K-P 组与 K-V 组之间差异不显著($P = 0.177$)。

2.4 Western-blot 分析 TFPI-2 蛋白质表达 角膜基质细胞 CM 抽提物主要为 32000 分子量 TFPI-2 蛋白表达(图 4),K-P 和 K-V 与 K-TFPI-2 组细胞 IA_{TFPI-2} 见表 1。经 LSD-t 检验发现:K-TFPI-2 组与 K-P 组、K-TFPI-2 与 K-V 组之间存在显著性差异($P = 0.000$ 和 $P = 0.000$),而 K-P 组与 K-V 组之间差异不显著($P = 0.369$)。提示 K-TFPI-2 组 TFPI-2 蛋白表达水平明显增强。

表1 各组角膜基质细胞 TFPI-2 的表达及 MMPs 的活性 $\bar{x} \pm s$

分组	IA _{TFPI-2} /IA _{β-actin}	IA _{TFPI-2}	IA _{MMP-1}	IA _{MMP-2}
K-P 组	0.51±0.03	15.5±0.5	16.7±1.2	18.2±1.1
K-V 组	0.48±0.02	14.9±0.9	15.9±0.7	17.8±1.1
K-TFPI-2 组	0.79±0.02 ^a	24.5±0.8 ^a	12.3±0.7 ^a	15.4±1.3 ^a
<i>P</i> (K-TFPI-2 vs K-P)	0.000	0.000	0.001	0.027
<i>P</i> (K-TFPI-2 vs K-V)	0.000	0.000	0.003	0.046
<i>P</i> (K-V vs K-P)	0.177	0.369	0.317	0.691

^a*P*<0.05 vs K-P 组和 K-V 组。

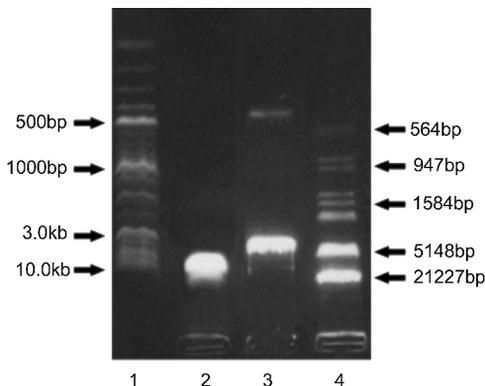


图1 真核表达质粒 pEF-BOS-CITE-TFPI-2 经 KpnI 和 XbaI 酶切鉴定电泳图谱 1:2-Log Marker;2:未经 KpnI 和 XbaI 双酶切的 pEF-BOS-CITE-TFPI-2 质粒;3:经 KpnI 和 XbaI 双酶切后得到的,得到 5.05kb 和 440bp(目的基因)两个片段;4:λDNA/EcoR I + Hind III Markers (SABC,21227, 5148,3530,1584,947, 831,564bp)。

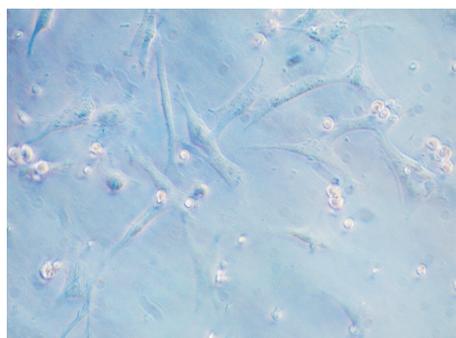


图2 兔基质细胞传代培养(培养的角膜基质细胞呈典型的梭形,×100)。

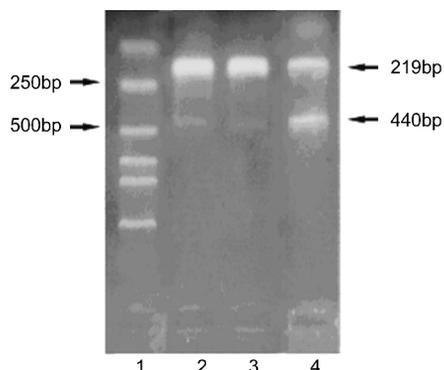


图3 角膜基质细胞 TFPI-2 mRNA 表达 1:DNA marker;2:K-P 组;3:K-V 组;4:K-TFPI-2 组。

2.5 明胶酶谱法分析基质细胞 MMPs 的活性 基质细胞无血清培养上清液在含有明胶底物的聚丙烯酰胺凝胶上电泳,上清液中的蛋白酶局部分解明胶,经考马斯亮蓝染色、

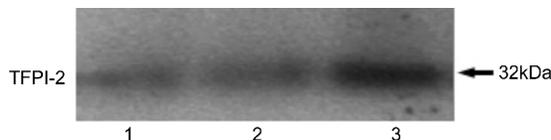


图4 角膜基质细胞 TFPI-2 蛋白质表达 1:K-P 组;2:K-V 组;3:K-TFPI-2 组。

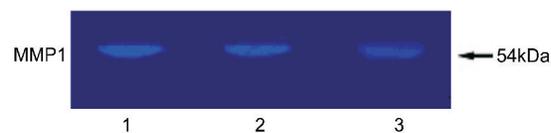


图5 明胶酶谱法检测角膜基质细胞 MMP1 的活性 1:K-P 组;2:K-V 组;3:K-TFPI-2 组。

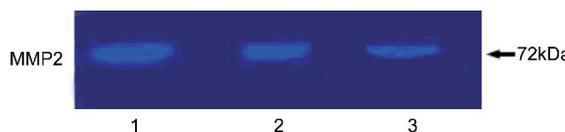


图6 明胶酶谱法检测角膜基质细胞 MMP2 的活性 1:K-P 组;2:K-V 组;3:K-TFPI-2 组。

脱色形成一条负染带,以此负染带的 IA 表示基质细胞分泌金属蛋白酶能力强弱。K-P 和 K-V 与 K-TFPI-2 组细胞酶谱见图 5,6,其 IA_{MMP-1} 和 IA_{MMP-2} 见表 1。经 LSD-*t* 检验发现;K-TFPI-2 与 K-P,K-TFPI-2 与 K-V 组之间 MMP-1 及 MMP-2 活性存在显著性差异(*P*=0.001 和 *P*=0.003,*P*=0.027 和 *P*=0.046),而 K-P 组与 K-V 组之间 MMP-1 及 MMP-2 活性差异不显著(*P*=0.317,*P*=0.691)。

3 讨论

无血管是角膜最重要的生物学特性,在某些病理条件如外伤、感染、自身免疫性疾病等引起的新生血管性角膜病变使角膜失去透明而致盲,严重影响了患者的生存质量。由于 CNV 的发生和发展与基质细胞及其周围基质内环境密切相关,因此从角膜基质细胞和 CNV 生长的内环境入手,则有可能为我们开发和研制抗 CNV 新药提供有效靶点。

随着 DNA 重组技术的发展,基因治疗技术作为一种药物转移系统有可能成为治疗 CNV 的重要手段之一。理论上,通过体细胞基因治疗,改变与 ECM 降解相关的蛋白酶的活性表达,可以抑制 CNV 的生长。而且,利用基因治疗的方法可在局部释放相应蛋白,无需异载体,方法经济有效,避免了外源性蛋白半衰期短、体内降解速度快、反复给药、价格昂贵等缺点,且生物活性可能更高。以往的研究已证实,病理情况下角膜基质细胞产生的 MMPs 是降解 ECM 的主要酶系。本实验体外实验亦发现:传代基质细胞其 MMP-1,2 活性高表达。作为角膜炎症的主要靶细胞——基质细胞在传代培养中类似于体内激活状态下

的活体细胞,其 MMPs 的活性高表达证实 MMPs 所参与的 ECM 降解是 CNV 形成中的关键环节之一。那么,将 TFPI-2 转染基质细胞后,有可能通过降低 MMPs 的活性以维持 ECM 的完整性,进而抑制 CNV 的生长。本实验基于此设想将 TFPI-2 基因转染基质细胞,希望获得其持续稳定表达,不仅为 CNV 的转基因治疗提供条件,同时对研究内源性 TFPI-2 作用的分子机制、分泌途径等也有重要意义。

TFPI-2 是新近发现的一种分子量为 32kDa 的丝氨酸蛋白酶抑制物,定位于 7q22,属于 Kunitz 结构超家族的成员,由三个串联的 Kunitz 型结构域,以及一个富含碱性氨基酸的羧基末端组成^[7]。其中,第一个和第三个 Kunitz 结构域中共含有 7 个精氨酸残基,它们在 TFPI-2 与 ECM 的结合过程中起着重要的作用。TFPI-2 可由内皮细胞、角质细胞、成纤维细胞等合成、分泌,其基因分布广泛,在人类正常肝脏、肾脏、心脏、骨骼肌等组织细胞中均有表达^[8],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^[9-11]。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,能力更强,因而在维持 ECM 的结构完整、抑制新生血管生成等方面有着至关重要的作用。然而,体内某些细胞可能存在 TFPI-2 基因缺失或染色体 7q 的改变^[12],不能合成足够的 TFPI-2 来保护 ECM 免遭破坏,从而为新生血管生长提供了条件。我们在实验中亦发现对照组角膜基质细胞仅分泌极低量 TFPI-2,提示基质细胞不分泌或仅分泌极少量的 TFPI-2,在病理过程中不足以对抗 MMPs 降解 ECM 的作用,新生血管趋向于生长。研究中设立空载体组,其 TFPI-2 基因和蛋白的表达与正常对照组无显著差异,排除质粒转染时其它外源性基因对 TFPI-2 表达的影响,而质粒组细胞 TFPI-2 基因和蛋白表达明显增强,提示质粒转染后可使基质细胞开启或上调 TFPI-2 表达。经培养细胞生物学观察,未见细胞形态及生长速度明显改变,亦提示其对细胞生长特性并无明显作用,这与 Shinoda 等^[13]报道的 TFPI-2 可作为血管平滑肌细胞增生的刺激因子的作用有所不同,分析它的丝裂原作用可能与细胞类型有关,同时也提示转染细胞 TFPI-2 的表达量增加来自转染成功的细胞合成量的增加,而不是通过促进细胞增生而使整个细胞的合成总量增加。

根据明胶酶及胶原酶是降解 IV 型胶原的特异性水解酶,而设计的明胶酶谱实验可以很好地检测 MMP-1 和 MMP-2 的活性,其活性与新生血管形成中基底膜的降解密切相关。本研究中我们利用成功转染的细胞进行 MMPs 活性测定,发现 TFPI-2 蛋白明显抑制以明胶为底物的明胶分解,提示 MMP-1,2 的活性下降,并以 MMP-1 的活性下降更显著,与 Herman 等^[14]对动脉粥样硬化中 TFPI-2 抑制 MMPs 的活性表达结果相一致。但与 Du 等^[15]结果相迥异,这可能与细胞类型和实验方法设计不同有关。进一步分析 TFPI-2 如何影响 MMPs 的活性表达,认为可能存在两种形式:一是直接抑制基质金属蛋白酶等在内的多种酶^[16];二是通过其 N 端肝素样分子与 ECM 结合^[10],保护后者不被基质金属蛋白酶等水解酶所破坏。但在角膜组织中,是否两种机制共存,抑或以一种机制为主,尚需进一步实验证实。

总之,本研究利用脂质体介导 TFPI-2 真核表达载体

稳定转染至体外培养的角膜基质细胞中,转染成功的细胞显著表达 TFPI-2,并初步证实其 MMP-1,2 的活性下降,为进一步研究 CNV 的基因治疗提供了实验基础。今后,将在体内转染 TFPI-2 后对 ECM 的保护作用及对角膜基质细胞的安全性作进一步研究。

致谢:本研究得到国际自然科学基金(No. 81100664)和武汉大学自主科研项目(No. 111091)资助。另外,本研究得到青岛大学医学院附属医院血液科仲任博士的帮助,特此感谢。

参考文献

- 1 Ebrahim Q, Chaurasia SS, Vasanji A, et al. Cross-talk between vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinases in the induction of neovascularization *in vivo*. *Am J Pathol* 2010;176(1):496-503
- 2 Chang JH, Han KY, Azar DT. Wound healing fibroblasts modulate corneal angiogenic privilege: interplay of basic fibroblast growth factor and matrix metalloproteinases in corneal angiogenesis. *Jpn J Ophthalmol* 2010;54(3):199-205
- 3 康剑书,何为民.明胶酶 MMP-2 和 MMP-9 及其组织抑制剂与眼科疾病. *国际眼科杂志* 2009;9(11):2154-2157
- 4 Drocova S, Denyer SP, Lloyd AW, et al. A standard strain of human ocular keratocytes. *Ophthalmic Res* 1999;31(1):33-41
- 5 Neaud V, Hisaka T, Monvoisin A, et al. Paradoxical pro-invasive effect of the serine proteinase inhibitor tissue factor pathway inhibitor-2 on human hepatocellular carcinoma cells. *J Biol Chem* 2000;275(45):35565-35569
- 6 Jin M, Udagawa K, Miyagi E, et al. 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(2):325-333
- 7 Broze GJ Jr, Girard TJ. Tissue factor pathway inhibitor: structure-function. *Front Biosci* 2012;17:262-280
- 8 Chand HS, Foster DC, Kisiel W. Structure, function and biology of tissue factor pathway inhibitor-2. *Thromb Haemost* 2005;94(6):1122-1130
- 9 Sierko E, Wojtukiewicz MZ, Kisiel W. The role of tissue factor pathway inhibitor-2 in cancer biology. *Semin Thromb Hemost* 2007;33(7):653-659
- 10 Ivanciu L, Gerard RD, Tang H, et al. Adenovirus-mediated expression of tissue factor pathway inhibitor-2 inhibits endothelial cell migration and angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27(2):310-316
- 11 Bajaj MS, Ogueli GI, Kumar Y, et al. Engineering kunitz domain 1 (KD1) of human tissue factor pathway inhibitor-2 to selectively inhibit fibrinolysis: properties of KD1-L17R variant. *J Biol Chem* 2011;286(6):4329-4340
- 12 Monk D, Wagschal A, Arnaud P, et al. Comparative analysis of human chromosome 7q21 and mouse proximal chromosome 6 reveals a placental-specific imprinted gene, TFPI2/Tfpi2, which requires EHMT2 and EED for allelic-silencing. *Genome Res* 2008;18(8):1270-1281
- 13 Shinoda E, Yui Y, Hattori R, et al. Tissue factor pathway inhibitor-2 is a novel mitogen for vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1999;274(9):5379-5384
- 14 Herman MP, Sukhova GK, Kisiel W, et al. Tissue factor pathway inhibitor-2 is a novel inhibitor of matrix metalloproteinases with implications for atherosclerosis. *J Clin Invest* 2001;107(9):1117-1126
- 15 Du X, Chand HS, Kisiel W. Human tissue factor pathway inhibitor-2 does not bind or inhibit activated matrix metalloproteinase-1. *Biochim Biophys Acta* 2003;1621(3):242-245
- 16 Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* 2002;115(19):3719-3727