

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

Thrombin 誘導肺部上皮細胞 NF- $\kappa$ B 活化及 IL-8 基因表現分子機轉之研究

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2320-B-038-048-

執行期間：91年10月01日至92年07月31日

執行單位：臺北醫學大學呼吸治療學系

計畫主持人：陳炳常

共同主持人：林建煌

計畫參與人員：游宗啟、康如鈞、張珍瑜

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中 華 民 國 92 年 10 月 22 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫  成果報告  中期報告

中進度  
報告

(計畫名稱)

Thrombin 誘導肺部上皮細胞 NF- $\kappa$ B 活化及 IL-8 基因表現分子機

轉之研究

計畫類別： 個別型計畫  整合型計畫

計畫編號：NSC 91-2320-B-038-048

執行期間：91 年 10 月 01 日至 92 年 07 月 31 日

計畫主持人：陳炳常

共同主持人：林建煌

計畫參與人員：游宗啟、康如鈞、張珍瑜

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告  完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年二年後可公開查詢

執行單位:臺北醫學大學呼吸治療學系&臺北醫學大學醫事技術學系

中 華 民 國                      92 年 10 月 22 日

## 中英文摘要及關鍵詞(Keywords)

### 中文摘要及關鍵詞

關鍵詞: thrombin ; protease-activated receptor ; 發炎 ; interleukin-8 ; 核轉錄因子 (NF- $\kappa$ B) ; 蛋白激酶 C ; 肺部上皮細胞 ; 訊息傳遞

Thrombin 為 serine protease 成員之一，它可以促使血小板凝集及誘導肺部發炎反應。本計劃將探討在 A549 肺部上皮細胞中，thrombin 誘導 NF- $\kappa$ B 的活化及 interleukin-8 (IL-8) 表現之機轉。Thrombin 可依照時間依賴增加 IL-8 釋放及 IL-8-luciferase 的活性。Thrombin 誘導 IL-8 的釋放可被 NF- $\kappa$ B 抑制胜肽、Bay117082 (I $\kappa$ B 磷酸化抑制劑)、TPCK (I $\kappa$ B protease 抑制劑) 所抑制。A549 細胞給予 thrombin 可依時間依賴活化 NF- $\kappa$ B-luciferase 的活性。相同地，TRAP1 及 TRAP2 也可以活化 NF- $\kappa$ B-luciferase 的活性，但是 TRAP3 及 TRAP4 卻不行。當細胞給予 thrombin 時，可誘發 I $\kappa$ B kinase  $\alpha/\beta$  (IKK $\alpha/\beta$ ) 活性、I $\kappa$ B $\alpha$  磷酸化、I $\kappa$ B $\alpha$  降解及 p65 的磷酸化。當細胞給予 PPACK (PAR 受體抑制劑)、U73122 (PI-PLC 抑制劑)、BAPTA/AM (細胞內鈣離子螯合劑)、Go 6976 (典型 PKC $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  抑制劑) 及 Bim (PKC 抑制劑) 皆可抑制 thrombin 誘導 IL-8 的釋放。再者，PPACK, U73122, Bim 及 BAPTA/AM 也可抑制 thrombin 誘導 NF- $\kappa$ B 的活化。當細胞給予 thrombin 可導致 PKC $\alpha$  從細胞質轉位至細胞膜而活化。細胞給予特異性 PKC $\alpha$  抑制劑 Ro 32-0432 呈現劑量相關曲線抑制 thrombin 誘導 IL-8 的釋放及 NF- $\kappa$ B 的活化。而 thrombin 增加 I $\kappa$ B $\alpha$  磷酸化及降解也可被 Ro 32-0432 所抑制。經由以上的結果顯示，在 A549 細胞中，thrombin 可能經由活化 PAR1 的訊息傳遞路徑活化 PKC $\alpha$  使 NF- $\kappa$ B 活化，最後促使 IL-8 的表現。

### 英文摘要及(Keywords)

Keywords: thrombin, protease-activated receptor (PAR), inflammation, interleukin-8, NF- $\kappa$ B, PKC, lung epithelial cell, signal transduction

Thrombin, a serine protease, activates platelet aggregation, and induces lung inflammation. This study investigated the signaling pathway involved in NF- $\kappa$ B activation and IL-8 expression caused by thrombin in A549 lung epithelial cells. Thrombin caused time-dependent increases in the IL-8 release and IL-8-luciferase activity. IL-8 release caused by thrombin was separately attenuated by a NF- $\kappa$ B inhibitor peptide, Bay 117082 (I $\kappa$ B phosphorylation inhibitor), TPCK (I $\kappa$ B protease inhibitors). Treatment of A549 cells with thrombin caused time-dependent activation of NF- $\kappa$ B luciferase. Similarly, TRAP1, and TRAP2 but not TRAP3 or TRAP4 induced NF- $\kappa$ B activation. Stimulation of cells with thrombin caused an increase in the activity of I $\kappa$ B kinase  $\alpha/\beta$  (IKK $\alpha/\beta$ ), I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation, I $\kappa$ B $\alpha$  degradation, and p65 phosphorylation. Treatment of A549 cells with PPACK (a PAR inhibitor), U73122 (a PI-PLC inhibitor), BAPTA/AM (an intracellular calcium chelator), Go 6976 (a classic PKC $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  inhibitor) and Bim (a PKC inhibitor) all inhibited thrombin-induced IL-8 release. Furthermore, PPACK, U73122, Bim, and BAPTA/AM

also inhibited thrombin-induced increase in NF- $\kappa$ B activity. Stimulation of cells with thrombin caused an increase in the activity of PKC $\alpha$  translocation from the cytosol to the membrane. Treatment of A549 cells with a specific PKC $\alpha$  inhibitor inhibited thrombin-induced IL-8 release and NF- $\kappa$ B activation in a dose-dependent manner. The thrombin-mediated increases in the I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation and I $\kappa$ B $\alpha$  degradation were also inhibited by the Ro-32-0432. These results indicate that thrombin may activate the PAR1 signaling pathway to activate PKC $\alpha$ , which in turn initiates NF- $\kappa$ B activation, and ultimately induces IL-8 expression in A549 cells.

## 報告內容[前言及文獻探討、研究目的、研究方法、結果與討論(含結論與建議)] 前言及文獻探討

肺部上皮細胞為一道生理的屏障，其表面積約為 70 平方公分，保護著呼吸道免於異物的侵害(Thurlbeck, 1967)。當有異物吸入時，上皮細胞可經由黏液纖毛的作用，分泌表面清潔劑，將異物清除。一旦此層上皮細胞受到破壞時，會使吸入性的致敏原及細菌直接觸到其下面的平滑肌而造成破壞(Gert and Frans, 1998)。但目前越來越多的證據顯示，肺部上皮細胞除了是一道生理屏障外，它在呼吸道發炎反應扮演著重要調節的角色(Albert *et al.*, 1998)。當致病原活化肺部巨噬細胞時，會釋放出 TNF- $\alpha$ 及 IL-1 $\beta$ ，會進一步作用至肺部上皮細胞，使得上皮細胞釋放出更多的 cytokines, chemokines (例如：IL-8)及發炎物質等，而放大發炎反應(Stadnyk, 1994)。IL-8 為一種嗜中性白血球趨化因子，與許多呼吸系統疾病息息相關，例如：肺部纖維性囊腫、支氣管擴張症和慢性支氣管炎等(Levine, 1995)。當上皮細胞釋放出 IL-8 的時候，會作用至嗜中性白血球，使嗜中性白血球釋放出 elastase，造成肺間質部份失去彈性纖維而導致肺部纖維性囊腫。另外，氣喘病人的氣管上皮細胞中，也有人發現 IL-8 的含量有上升的趨勢，認為可能在氣喘發作時，IL-8 是促使發炎細胞趨化的主要原因(Marini *et al.*, 1992)。經由以上的證據顯示，IL-8 在呼吸道發炎反應扮演著重要的角色。許多細胞在不同的刺激劑作用下，例如：TNF- $\alpha$ ，IL-1 $\beta$ ，lipopolysaccharide，PMA 等，可以活化許多的轉錄因子，而誘導 IL-8 基因表現及分泌(Matsushima and Oppenheim, 1989; Hebert and Baker, 1993; Mukaida *et al.*, 1994; Baggiolini *et al.*, 1995; Roebuck, 1999)。目前已知在 IL-8 基因 5'端由-1 至-133 處的核酸序列中具有三種轉錄因子，例如：NF- $\kappa$ B、AP-1 和 NF-IL-6 是調控 IL-8 基因表現重要的轉錄因子(Xie, 2001)，其中以 NF- $\kappa$ B 最為重要。

NF- $\kappa$ B 通常由 p50 與 p65 的次單位組合而成(Ghosh *et al.*, 1995)，在未受到刺激的細胞中，NF- $\kappa$ B 因為與抑制性蛋白 I $\kappa$ Bs 結合，一直存在細胞質，直到受到一些前發炎物質(例如：TNF- $\alpha$ 或 IL-1 $\beta$ )刺激時，將 I $\kappa$ Bs 磷酸化，再接上 ubiquitin 後，proteasome 會將 I $\kappa$ Bs 分解，此時 NF- $\kappa$ B 為活化的狀態，便可以進入細胞核中，而造成標的基因的轉錄作用活化。一群蛋白酶複合體被稱為 I $\kappa$ B kinases (IKKs)已被分離出來，其中最主要包括 IKK $\alpha/\beta$ 可將 I $\kappa$ B $\alpha/\beta$ 磷酸化，使其接上

ubiquitin，而被分解(Karin and Yinon, 2000)。有許多激酶被證明可以磷酸化 IKK，但其中以 NIK 最為重要(Malinin *et al.*, 1997)。除了促進 I $\kappa$ Bs 分解之外，目前也有一些證據顯示，增加 NF- $\kappa$ B 的活性不需要 I $\kappa$ Bs 的分解，例如在 p65 次單位磷酸化後，便可增加 NF- $\kappa$ B 的活性(Schmitz *et al.*, 2001)。

Thrombin 為一個多功能 serine protease 的物質，在血液凝固的過程中扮演著重要的角色，參與血液的凝固。除此之外，thrombin 也是一種發炎的物質，當血管受到傷害時，thrombin 除了扮演著組織修復的角色，同時也會引起發炎反應(Daves, *et al.*, 1993)。現在越來越多科學家認為，在慢性肺部纖維化疾病的初期，肺部微血管會有受到傷害的現象，原因是因為微血管的內皮細胞瓦解及血管壁內層受到損傷而引起的(Malik & Horgan, 1987; Schmidt *et al.*, 1996; Uhiba *et al.*, 1996)。Thrombin 除了參與血液凝固之外，也會滲透至血管外面而作用至呼吸系統的細胞，增加 PDGF 的生成，使得呼吸道平滑肌及纖維細胞快速的增生(Ohba *et al.*, 1994)。最近也有許多論文指出，thrombin 可以誘導前發炎物質的產生，例如在人類肺部纖維細胞及上皮細胞中，thrombin 可以誘導 IL-6 及 IL-8 的產生，促使肺部組織受到受害(Sower *et al.*, 1996)，但是其詳細的作用機轉還不清楚。一般而言，thrombin 在血小板、血管平滑肌及血管內皮細胞所扮演的角色研究的比較多，但是在肺部上皮細胞的研究卻是相當少，這促使我有興趣研究 thrombin 在肺部上皮細胞所扮演的角色，是否可以誘導 IL-8 基因表現，其誘導的作用是經由何作機制來調控。Thrombin 的作用都是經由 protease-activated receptors (PARs) 而來。目前已知的 PAR 有四種從 PAR1 至 PAR4，PARs 為一種 G 蛋白耦合的受體，穿透細胞膜七次的受體。PAR1 (Vu *et al.*, 1991)，PAR3 (Ishihara *et al.*, 1997) 和 PAR4 (Xu *et al.*, 1998)被 thrombin 活化，但 PAR2 不行，卻可受到 trypsin、trypase 及凝血因子 VIIa 和 Xa 的活化(Nystedt *et al.*, 1994; Molino *et al.*, 1997; Camerer *et al.*, 2000)。PAR 可與 G<sub>12/13</sub>、G<sub>q</sub> 及 G<sub>i</sub> 蛋白耦合，活化下游二級訊息傳遞物質，而產生一連串的反應(Coughlin, 2000)。PAR 與 G<sub>12/13</sub> 蛋白耦合之後，G<sub>12/13</sub> 會與 RhoGEFs (guanine-nucleotide exchange factors)結合，活化 Rho 蛋白，加速血小板變形。PAR 與 G<sub>i</sub> 蛋白耦合之後，會抑制 adenylyl cyclase，可促進血小板的反應。PAR 與 G<sub>q</sub> 蛋白耦合之後，活化 phospholipase C $\beta$ ，使得 phosphoinositide 水解產生 IP<sub>3</sub> 及 DAG，細胞內鈣離子濃度增加及活化 PKC，可進一步活化鈣離子依賴激酶及 mitogen-activated protein kinases (MAPKs)等，來調控細胞轉錄的功能，但是在肺部上皮細胞中，thrombin 所扮演的角色為何，是否可以誘導 IL-8 基因表現，其誘導的作用是經由何作機制來調控是否清楚，是一個值得討論的課題。

### 研究目的

雖然 thrombin 可活化其 PAR 受體及其下游的作用機轉調控血小板的功能研究相當多，相對地，thrombin 在肺部上皮細胞活化 NF- $\kappa$ B 轉錄因子及其增加 IL-8 基因表現的研究卻十分的缺乏。目前已知 thrombin 在內皮細胞、肺部纖維細胞及膠瘤細胞可經由活化 PKC、p38 MAPK 及 ERK 的作用機轉活化 NF- $\kappa$ B 及增加 ICAM-1 及 iNOS 基因的表現。但是在肺部的上皮細胞中，thrombin 所扮演的角

色研究卻十分的缺乏，這促使我興趣研究 thrombin 是經由何種 PAR 的亞型來活化 NF- $\kappa$ B 轉錄因子及誘導 IL-8 基因表現？是經由何種分子機制來調控例如何種 PKC 亞型而來？希望能夠順利找出 thrombin 在呼吸系統中疾病中所扮演的角色。

### 研究方法

1. 細胞培養: 將人類肺部上皮細胞株 A549 培養在 DMEM 含有 10% 胎牛血清及抗生素(100 units/ml penicillin 及 100  $\mu$ g/ml streptomycin)中。2. 轉染及報告基因試驗: 測定 NF- $\kappa$ B-luciferase 及 IL-8-luciferase 的活性。3. IL-8 ELISA 測定: 測定培養液中 IL-8 的含量。4. 西方點墨法: 測定 IKK $\alpha$ / $\beta$ -p、IKK $\alpha$ / $\beta$ 、I $\kappa$ B $\alpha$ -p、I $\kappa$ B $\alpha$ 、p65-p 及 p65 蛋白的變化。5. 免疫沈澱法及蛋白激酶活性測定: 測定 IKK $\alpha$ / $\beta$ 的活性。6. 蛋白激酶 C (PKC)轉移的測定: 測定 PKC $\alpha$ 。7. 統計方法: 所有實驗數據皆以平均值 $\pm$ 標準差(mean  $\pm$  S.E.M)表示，並以 Analysis of Variance (ANOVA)配合 Dunnet's test 分析比較各組間是否有顯著差異。p < 0.05 視為有統計上的意義。

### 結果

#### **Thrombin 刺激 A549 細胞 IL-8 的釋放表現**

首先我們以不同濃度的 thrombin (0.3-10U/ml) 刺激 A549 細胞 24 小時後，觀察 IL-8 的釋放的情形。發現 IL-8 的釋放會隨著 thrombin 劑量增高而增加，並且在 10 U/ml 濃度的刺激之下，IL-8 的釋放達到最大量(n=3) (Fig. 1)。而給予 TNF- $\alpha$  (10 ng/ml)同樣地也可使 IL-8 大量的釋放(Fig. 1)。相同地，將細胞轉殖 IL-8-luciferase 來觀察 IL-8 的活性，發現以 thrombin、TRAP1 (活化 PAR1 的胜肽)、TRAP2(活化 PAR2 的胜肽)及 TRAP4(活化 PAR4 的胜肽)皆可增加 IL-8-luciferase 的活性。相反地，TRAP3 則不行(Fig. 2)。由上面結果得知，在 A549 細胞中，活化 PAR1、PAR2 及 PAR4 受體可誘導 IL-8 的釋放，但 thrombin 增加 IL-8 的釋放是經由何種 PAR 受體而來，則需要更深入的研究與探討。

#### **Thrombin 活化轉錄因子 NF- $\kappa$ B 來誘導 IL-8 的釋放**

在哺乳動物的 IL-8 基因中，具有許多的轉錄因子可調控 IL-8 基因的表現，其中包括 NF- $\kappa$ B。接著我們將探討是否 thrombin 誘導 IL-8 的釋放經由 NF- $\kappa$ B 而來。將細胞以 NF- $\kappa$ B 抑制性胜肽(10  $\mu$ g/ml)、Bay 117082 (I $\kappa$ B 磷酸化抑制劑，10  $\mu$ M)和 I $\kappa$ B protease 抑制劑 L-1-tosylamido-2-phenyleneethyl chloromethyl ketone (TPCK, 3  $\mu$ M)前處理 30 分鐘，再以 thrombin (10 U/ml)刺激 24 小時，發現這些抑制劑皆可抑制 thrombin 誘導 IL-8 的釋放(Fig. 3)，由此可見，thrombin 的確可經由 NF- $\kappa$ B 來促使 IL-8 的釋放。

#### **Thrombin 引發 NF- $\kappa$ B 活化、I $\kappa$ B $\alpha$ 磷酸化及 I $\kappa$ B $\alpha$ 降解**

由前面實驗證實了 thrombin 刺激 IL-8 的釋放受到轉錄因子 NF- $\kappa$ B 的調控。接下來我們將來觀察 thrombin 是否可活化 NF- $\kappa$ B 及 NF- $\kappa$ B 的抑制性蛋白 I $\kappa$ B $\alpha$ ，受到 thrombin 的刺激而磷酸化以及降解的情形。在 A549 細胞中轉殖 NF- $\kappa$ B-luciferase 來觀察 NF- $\kappa$ B 被活化的情形，細胞給予 thrombin 刺激 24 小時之後，NF- $\kappa$ B 的活性隨著 thrombin 濃度的增加而增加，以 thrombin (10 U/ml)達

到最大。相同地，TNF- $\alpha$  (10 ng/ml)的剌激也可誘導 NF- $\kappa$ B 的活化(Fig. 4)。而 A549 細胞給予 TRAP1 及 TRAP2 同樣可以增加 NF- $\kappa$ B-luciferase 的活性(Fig. 5)。我們將 IL-8-luciferase 基因中的 $\kappa$ B-binding site 去除之後，thrombin 並不會誘導 IL-8-luciferase 的活性(Fig. 6)，顯示 NF- $\kappa$ B 在 thrombin 誘導 IL-8 基因的表現佔有舉足輕重的角色。接著我們將觀察 I $\kappa$ B $\alpha$ 是否會受到 thrombin 剌激而磷酸化及降解。A549 細胞給予 thrombin 不同時間(0-120 min)剌激，觀察到細胞質 I $\kappa$ B $\alpha$  磷酸化的程度在 30 分鐘時達到最大(Fig. 7)；I $\kappa$ B $\alpha$ 在 10 到 30 分鐘時有被降解的情形(Fig. 8)，顯示 thrombin 可將 I $\kappa$ B $\alpha$ 磷酸化之後，I $\kappa$ B $\alpha$ 隨之快速的降解，而釋放出具有活性的 NF- $\kappa$ B。

### **Thrombin 增加 IKK $\alpha$ / $\beta$ 磷酸化、激酶的活性及 p65 的磷酸化**

有學者指出 IKK $\alpha$ / $\beta$ 被活化時，會在 IKK $\alpha$ 的 Ser176、180 與 IKK $\beta$  Ser177、181 的位置磷酸化，而產生激酶活性，進一步使下游的 I $\kappa$ B $\alpha$ 磷酸化及降解而釋放出 NF- $\kappa$ B。接著我們將進一步探討 IKK $\alpha$ / $\beta$ 是否會因 thrombin 的剌激而活化，我們將利用特异性磷酸化 IKK $\alpha$ / $\beta$ 抗體及 IKK 激酶活性分析的方法來偵測 IKK 活化的情形。將 A549 細胞給予 thrombin 剌激不同的時間(0-60 分鐘)，發現 IKK $\alpha$ / $\beta$  磷酸化的程度在 3 分鐘時就有增加，而在 30 分鐘時已達到最大(Fig. 9)，而 IKK 激酶活性也同樣有增加的現象，並在 30 分鐘達最大(Fig. 10)。由此可知 thrombin 會使 IKK $\alpha$ / $\beta$ 激酶的活性增加。另外有文獻指出，NF- $\kappa$ B 的次單元 p65 受到磷酸化時，也會增加 NF- $\kappa$ B 的活性。A549 細胞給予 thrombin (10 U/ml)剌激不同的時間(0-30 分鐘)，發現 p65 磷酸化在 20-30 分鐘時具有明顯的增加情形(Fig. 11)。

### **Thrombin 經由 PKC 及鈣離子調控 NF- $\kappa$ B 的活性及 IL-8 的釋放**

Thrombin 經由 PAR1 受體的作用後，可以活化 PI-PLC 產生 IP<sub>3</sub> 及 DAG，活化下游的蛋白激酶來誘導 IL-8 的釋放，接下來我們將探討 thrombin 可以活化何種蛋白激酶來剌激 IL-8 的釋放。將細胞給予不同濃度的 PPACK (100 nM, thrombin 受體抑制劑)、U73122 (10  $\mu$ M, PI-PLC 抑制劑)和 BAPTA/AM (30  $\mu$ M, 細胞內鈣離子結合劑)、Go6976 (1  $\mu$ M, 典型 PKC $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ 抑制劑)及 Bim (10  $\mu$ M, PKC 抑制劑)前處理 30 分鐘後，再加入 thrombin (10 U/ml)剌激 24 小時後，發現 IL-8 的釋放皆被這些抑制劑所抑制(Fig. 12)。相同地，我們給予 PPACK (100 nM)、U73122 (10  $\mu$ M)、Bim (10  $\mu$ M)、及 BAPTA/AM (30  $\mu$ M)也可抑制 thrombin 誘導 NF- $\kappa$ B 的活性(Fig. 13)。綜合以上的結果推測，thrombin 可能經由典型 PKC 的路徑來調控 IL-8 的釋放。

### **PKC $\alpha$ 媒介 thrombin 誘導 NF- $\kappa$ B 的活性及 IL-8 的釋放**

之前研究發現在 A549 細胞中具有典型 PKC $\alpha$ ，但不具有 PKC $\beta$ 及 PKC $\gamma$ 。接著我們將測試是否 thrombin 可以直接活化 PKC $\alpha$ ，我們將分離細胞膜及細胞質來觀察 PKC $\alpha$ 活化的情形。A549 細胞給予 thrombin(10 U/ml)剌激不同的時間(0-30 分鐘)，發現 PKC $\alpha$ 會經由細胞質轉移至細胞膜上，且 PKC $\alpha$  的活性隨著 thrombin 剌激的時間增加而增加，從 5 分鐘開始持續至 30 分鐘之久 (Fig. 14)。接著我們將細胞以 Ro-32-0432 (1-10  $\mu$ M, 選擇性 PKC $\alpha$ 抑制劑)，發現 thrombin 誘導 IL-8



釋放的情形只會隨著 Ro-32-0432 濃度的增加而減少(Fig. 15)。綜合以上的結果發現 thrombin 可經由活化 PKC $\alpha$ 來進一步誘導 IL-8 的釋放。

#### **Thrombin 經由活化 PKC $\alpha$ 來調控 I $\kappa$ B $\alpha$ 磷酸化、I $\kappa$ B $\alpha$ 降解及 NF- $\kappa$ B 活化**

我們將進一步探討 thrombin 活化 NF- $\kappa$ B 是否經由活化 PKC $\alpha$ 而來。A549 細胞給予 Ro-32-0432 (1-10  $\mu$ M)前處理 30 分鐘，再加入 thrombin (10 U/ml)刺激 24 小時後，發現 thrombin 誘導 NF- $\kappa$ B-luciferase 的活性會隨著 Ro32-0432 的濃度增加而減少(Fig. 16)。此外，Ro32-0432 也會抑制 thrombin 誘導 I $\kappa$ B $\alpha$ 磷酸化(Fig. 17)及 I $\kappa$ B $\alpha$ 降解的作用(Fig. 18)。

#### **討論(含結論與建議)**

綜合以上的實驗證明顯示，在 A549 肺部上皮細胞中，thrombin 可能經由 PAR1 的接受體，進而活化 PKC $\alpha$ 的訊息傳遞路徑，將 I $\kappa$ B $\alpha$ 磷酸化及降解，促使 NF- $\kappa$ B 的活化，進一步誘導 IL-8 基因的表現，進而產生大量的 IL-8 的釋放。一旦 IL-8 釋放之後將會產生更大的發炎反應。如此，希望能夠透過本計劃的研究，能夠更清楚了解 thrombin 在肺部濃度增加時所產生的發炎反應的作用機轉，對往後發展治療肺部的疾病貢獻一自之力。

#### **參考文獻**

- Albert, J., Polito, M.D. and David, P.B. (1998) Epithelial cells as regulators of airway inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **102**, 714-718.
- Baggiolini, M., Loetscher, P. and Moser, B. (1995) Interleukin-8 and the chemokine family. *Int. J. Immunopharmacol.* **17**, 103-108.
- Camerer, E., Huang, W. and Coughlin, S.R. (2000) Tissue factor- and Factor X-dependent activation of PAR2 by factor VIIa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 5255-5260.
- Coughlin, S.R. (2000) Thrombin signaling and protease-activated receptors. *Nature* **407**, 258-264.
- Daves, K.E., Gray, A.J. and Laurent, G.J. (1993) Thrombin stimulates fibroblasts chemotaxis and replication. *Eur. J. Cell. Physiol.* **128**, 96-104.
- Gert, F. and Frans, P.N. (1998) Airway epithelium: more than just a barrier! *Trends Pharmacol. Sci.* **19**, 334-341.
- Ghosh, G., Vanduyne, G., Ghosh, S. and Sigler, P.B. (1995) Structure of NF- $\kappa$ B p50 homodimer bound to a  $\kappa$ B site. *Nature* **373**, 303-310.
- Hebert, C.A. and Baker, J.B. (1993) Interleukin-8: a review. *Cancer Invest.* **11**, 743-750.
- Ishihara, H., Connolly A.J., Zeng, D., Kahn, M.L., Zheng, Y.W., Timmons, C., Tram, T. and Coughlin, S.R. (1997) Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. *Nature* **386**, 502-506.

- Karin, M and Yinon, B.-N. (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity. *Ann. Rev. Immunol.* **18**, 621-663.
- Levine, J.S. (1995) Bronchial epithelial cell-cytokine interactions in airway inflammation. *J. Invest. Med.* **43**, 241-249.
- Malik, A.B. and Horgan, M.J. (1997) Mechanisms of thrombin induced lung vascular injury and edema. *Am. Rev. Respir. Dis.* **136**, 467-470.
- Malinin, N.L., Boldin, M.P., Kovalenko, A.V. and Wallach, D. (1997) MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature* **385**, 540-544.
- Marini, M., Vittori, E., Holleborg, J. and Mattoli, S. (1992) Expression of the potent inflammatory cytokines, granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor and interleukin-6 and interleukin-8 in bronchial epithelial cells of patients with asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **89**, 1001-1009.
- Matsushima, K. and Oppenheim, J.J. (1989) Interleukin 8 and MCAF: novel inflammatory cytokines inducible by IL 1 and YNF. *Cytokine* **1**, 2-13.
- Molino, M. Barnathan, E.S., Numerof, R., Clark, J., Dreyer, M., Cumashi, A., Hoxie, J.A., Schechter, N., Woolkalis, M. and Brass, L.F. (1997) Interactions of mast cell tryptase with thrombin receptors and PAR-2. *J. Biol. Chem.* **272**, 4043-4049.
- Mukaida, N., Okamoto, S., Ishikawa, Y. and Matsushima, K. (1994) Molecular mechanism of interleukin-8 gene expression. *J. Leukocyte Biol.* **56**, 554-558.
- Nystedt, S., Emilsson, K., Wahlestedt, C. and Sundelin, J. (1994) Molecular cloning of a potential novel protease activated receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 9208-9212.
- Ohba, T., McDonald, J.K., Silver, R.M., Strange, C., LeRoy, E.C. and Ludwicka, A. (1994) Scleroderma BAL fluid contains thrombin, a mediator of human lung fibroblast proliferation via induction of the PDGF  $\alpha$ -receptor. *Am. J. Respir. Cell. Biol.* **10**, 405-412.
- Roebuck, K.A. (1999) Regulation of interleukin-8 gene expression. *J. Interferon Cytokine Res.* **19**, 429-438.
- Schmidt, B., Davis, P., Pointe, H.L., Monokman, S., Coates, G. and DeSa, D. (1996) Thrombin inhibitors reduce intrapulmonary accumulation of fibrinogen and Procoagulant activity of bronchoalveolar lavage fluid during acute lung injury induced by pulmonary overdistention in newborn piglet. *Pediatr. Res.* **39**, 798-804.
- Schmitz, M.L., Bacher, S. and Kracht, M. (2001) I $\kappa$ B-independent control of NF- $\kappa$ B activity by modulatory phosphorylations. *Trend Biochem. Sci.* **26**, 186-190.

- Sower, L.E., Klimpel, G.R., Hanna, W. and Froelich, C.J. (1996) Granzyme A induces IL-6 and IL-8 production in fibroblast and epithelial cell lines. *Cell. Immunol.* **171**, 159-163.
- Stadnyk, A.W. (1994) Cytokine production by epithelial cells. *FASEB J.* **8**, 1041-1047.
- Thurlbeck, W.M. (1967) Internal surface area and other measurements in emphysema. *Thorax* **22**, 483-496.
- Uhiba, M., Okajima, K., Murakami, K., Okabe, H. and Takatsaki, K. (1996) Attenuation of endotoxin-induced pulmonary vascular injury induced by antithrombin III. *Am. J. Physiol.* **270**, L921-930.
- Vu, T.K., Hung, D.T., Wheaton, V.I. and Coughlin, S.R. (1991) Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* **64**, 1057-1068.
- Xie, K. (2001) Interleukin-8 and human cancer biology. *Cytokine and Growth Factor Rev.* **12**, 375-391.
- Xu, W.F., Andersen, H., Whitmore, T.E., Presnell, S.R., Yee, D.P., Ching, A., Gilbert, T., Davie, E.W. and Foster, D.C. (1998) Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 6642-6646.

附圖

