

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

Rac1-依賴訊息傳遞路徑在 thrombin 誘導人類肺部上皮細胞 IL-8 表現所扮演的角色

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC94-2320-B-038-047-

執行期間：94 年 08 月 01 日至 95 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

計畫參與人員：鄭惠文

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 95 年 10 月 30 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
期中進度報告
(計畫名稱)

Rac1依賴訊息傳遞路徑在thrombin誘導人類肺部上皮細胞IL-8表現所扮演的角色

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 94-2320-B-038-047

執行期間：94年08月01日至95年07月31日

計畫主持人：陳炳常

共同主持人：

計畫參與人員：鄭惠文

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

中 華 民 國 95年10月10日

一、中文摘要

我們先前的研究發現 thrombin 可經由活化 protease-activated receptor 1 (PAR1) 的訊息傳遞路徑來活化 protein kinase C α (PKC α)、PI3K/Akt 使得 nuclear factor- κ B (NF- κ B) 的活化，最後促使 interleukin-8/CXCL8 (IL-8/CXCL8) 的表現及肺部的發炎反應。本計劃將探討在 A549 肺部上皮細胞中，Rac 在 thrombin 誘導 IL-8/CXCL8 的表現中所扮演的角色。Thrombin 誘導 IL-8/CXCL8 釋放及 IL-8/CXCL8-luciferase 的活性，可被轉染 dominant negative mutant of Rac (Rac N17) 和 PI3K 抑制劑 (LY 294002) 及 dominant negative mutant of Akt (Akt DN) 所抑制。更進一步證實，thrombin 誘導 Akt Ser473 的磷酸化，可被 Rac N17 及 LY 294002 所抑制；同時 thrombin 所誘導 Akt 的激酶活性，也可被 Rac N17、LY 294002 及 Akt DN 所抑制。此外，thrombin 所誘導的 IKK α/β 的磷酸化可被 Rac N17、LY 294002 及 Akt 抑制劑所抑制；同時 Rac N17、LY 294002 及 Akt DN 可抑制 thrombin 誘導的 IKK α/β 的激酶活性。再者 Rac N17、Akt DN 及 LY 294002 皆可以抑制 thrombin 誘導 κ B-luciferase 的活性。綜合以上的實驗結果，可以推測出在 A549 肺部上皮細胞中，thrombin 可經由 Rac/PI3K/Akt 的路徑活化 IKK α/β 進一步再活化 NF- κ B 來調控 IL-8/CXCL8 的表現及釋放。

關鍵詞： thrombin；Rac；PI3K/Akt；I κ B kinase α/β (IKK α/β)；NF- κ B；IL-8/CXCL8；肺部上皮細胞；發炎；訊息傳遞

二、英文摘要

Our previously study has been shown that thrombin activates the protease-activated receptor 1 (PAR1) signaling pathway to activates protein kinase C α (PKC α) PI3K/Akt, which in turn initiates nuclear factor- κ B (NF- κ B) activation, and finally induces IL-8/CXCL8

expression and lung inflammation. This study investigated the signaling pathway involved in Rac in IL-8/CXCL8 expression caused by thrombin in A549 lung epithelial cells. Thrombin caused increase in IL-8/CXCL8 release, which was attenuated by cell transfection with dominant negative mutant of Rac (Rac N17), LY 294002 (a PI3K inhibitor), and dominant negative mutant of Akt (Akt DN). Treatment of A549 cells with thrombin caused increase in Rac and Akt activities. Pretreatment of A549 cells with LY 294002 or transient transfection with Rac N17 inhibited thrombin-induced Akt activity. In addition, Rac N17 and Akt DN inhibited thrombin-induced IKK α/β kinase activity. Moreover, Rac N17, LY 294002, and Akt DN all inhibited thrombin-induced increase in κ B-luciferase activity. These results indicate that thrombin activates the Rac/PI3K/Akt signaling pathway to activate IKK α/β , which in turn initiates NF- κ B activation, and ultimately induces IL-8/CXCL8 expression and release in A549 cells.

Keywords: thrombin, Rac, PI3K/Akt, I κ B kinase α/β (IKK α/β), NF- κ B, IL-8/CXCL8, lung epithelial cell, inflammation, signal transduction

三、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、文獻探討及研究目的

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(surfactant)，將異物清除。當有細菌侵入時，上皮細胞也可分泌免疫球蛋白來促進細菌被清除的能力。一旦此層上皮細胞受到破壞時，會使吸入性的致敏原、灰塵、細菌及刺激性的氣體直接觸到其下面的平滑肌及組織而造成破壞

(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，巨噬細胞會釋放出 TNF- α 及 IL-1 β ，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 IL-8/CXCL8 發炎物質，讓更多的發炎細胞進入氣管黏膜層中，而放大發炎反應(Standiford *et al.*, 1990)。

IL-8/CXCL8 為一種嗜中性白血球趨化因子，最早被發現是在活化的單核球細胞會被釋放出來，而刺激嗜中性白血球及 T 細胞的趨化作用(Kunkel *et al.*, 1995)。當嗜中性白血球進入呼吸道後，使嗜中性白血球釋放出 elastase，會產生急性肺部受損、肺間質纖維化及急性呼吸道受損(Piguet *et al.*, 1990)。另外，氣喘病人的氣管上皮細胞中，也有人發現 IL-8/CXCL8 的含量有上升的趨勢，認為可能在氣喘發作時，IL-8/CXCL8 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/CXCL8 在呼吸道發炎反應扮演著重要的角色。

最近也有學者提出，thrombin 在呼吸道的發炎反應扮演著舉足輕重的角色(Asokanathan *et al.*, 2002)。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(Malik and Horgan, 1987)。此時，thrombin 會滲透至血管外面，作用至呼吸系統的細胞，而使得呼吸道平滑肌及纖維細胞快速的增生，而導致氣管有阻塞的現象(Bar-Shavit *et al.*, 1992)。此外，呼吸道上皮細胞中，thrombin 也可以誘導前發炎物質 IL-8/CXCL8 的產生，促使肺部組織受到傷害(Asokanathan *et al.*, 2002)，顯示 thrombin 在呼吸道阻塞疾病扮演著重要的角色。

Thrombin 的作用皆活化它的受體 protease-activated receptors (PARs)而來。目前已知的 PAR 有四種從 PAR1 至 PAR4，PARs 為一種 G 蛋白偶合的受體，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)可被 thrombin 活化。當 thrombin

與 PAR 結合的時候，thrombin 會將 PAR 的 N 端抑制性的 peptide 切除，使得 PAR 變成活化態，此時會活化 G 蛋白而產生一連串的訊息傳遞，影響細胞的功能(Vu *et al.*, 1991)。目前已經知道呼吸道上皮細胞表現 PAR1、PAR2、PAR3 及 PAR4 四種受體，thrombin 及 PAR 的 N 端合成的胜肽 (PAR1, PAR2 及 PAR4 作用劑)經由 PAR 受體而誘導發炎物質 IL-8/CXCL8 的釋放(Asokanathan *et al.*, 2002)，但是 thrombin 經由何種作用機轉來誘導 IL-8/CXCL8 基因表現及釋放目前還不清楚，是值得研究的課題。

一般要增加 IL-8/CXCL8 基因的表現，主要是經由轉錄因子來調控。目前已知在 IL-8/CXCL8 基因的核酸序列中具有多種轉錄因子結合的位置，其中以 NF- κ B 轉錄因子最為重要(Xie, 2001)。NF- κ B 最普遍的轉錄形態主要由 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- κ B 與抑制性蛋白 I κ Bs 結合，遮蔽 NF- κ B 移至細胞核所需的 nuclear localization signal 序列，所以 NF- κ B 一直存在細胞質，此時 NF- κ B 是未活化態。直到細胞受到刺激物作用時，會將 I κ Bs 磷酸化，再接上 ubiquitin 後，proteasome 會將 I κ Bs 分解，此時 NF- κ B 為活化的狀態，便可以進入細胞核中，造成標的基因的轉錄作用。一群蛋白酶複合體被稱為 I κ B kinases (IKKs)已被分離出來，其中最主要包括 IKK α 及 IKK β 可將 I κ B α 在 Ser32 及 Ser36 的位置磷酸化；將 I κ B β 在 Ser19 及 Ser23 的位置磷酸化，使其接上 ubiquitin，接著 I κ Bs 則被分解，而釋放出 NF- κ B，此時 NF- κ B 為活化態，則進入細胞核中，與其標的基因結合，增加其轉錄作用(Karin and Yinon, 2000)。

Rac1，為 Rho 蛋白家族的成員之一。Rho 蛋白亦為具有小 GTPase (small GTPase) 活性之 Ras 家族成員的分支。直到目前為止，至少有 11 種哺乳類之 Rho 蛋白被分離出來，分別為 Rac1、Rac2、RhoA、RhoB、RhoC、RhoD、RhoE、RhoG、TC10、TTF 及 CDC42Hs (Khosravi-Far *et al.*, 1997)。Rho 蛋白可經由 nucleotide exchange factors

活化而形成GTP-bound Rho，接著Rho蛋白可經由GTPase-activating proteins的作用將GTP水解，使得Rho形成不活化的狀況(Whitehead et al., 1997)。Rac1 可調節細胞許多的生理反應。第一，Rac1 可誘導 lamellipodium 的形成及細胞膜的皺摺(Nobes & Hall., 1995)。第二，Rac1 也可以調控細胞的增生，可經由增加細胞循環之 regulator cyclin D1 的表現(Olson et al., 1995)。第三，Rac1 可以導致 rodent fibroblast 形成癌化的細胞(Qiu et al., 1995)。此外，Rac1 也可以活化NF- κ B轉錄因子，可以增加基因的轉錄作用及表現(Perona et al., 1997)。由以上的介紹得知，Rac1 在細胞的生理反應扮演著重要的角色，但是在thrombin誘導肺部上皮細胞IL-8/CXCL8 的表現目前還不清楚，是否thrombin可經由Rac/PI3K/Akt的路徑由媒介IL-8/CXCL8 的表現是一個值得探討的課題。

綜合以上的介紹，氣管的發炎反應在呼吸阻塞性疾病中扮演著重要的角色，但是 Rac/PI3K/Akt 是否會貢獻在 thrombin 誘導呼吸道上皮細胞產生發炎物質 IL-8/CXCL8 的釋放並還沒有被研究。這促使我有興趣研究 thrombin 是否會經由 Rac1 活化 PI3K 及 Akt？所活化的 Rac1/PI3K/Akt 經由何種作用機轉來增加 NF- κ B 的活性、誘導 IL-8/CXCL8 表現及釋放。希望能藉此計劃找出 thrombin 在呼吸道疾病所扮演的角色及其作用機轉，進而能夠發展呼吸道阻塞性疾病治療的新方向。

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 μ g/ml streptomycin)中以進行下列的實驗。2. 轉染及報告基因試驗:測定 κ B-luciferase 及 IL-8/CXCL8-luciferase 的活性。3. IL-8/CXCL8 ELISA 測定:測定培養液中 IL-8/CXCL8 的含量。4. 西方點墨法:測定 Rac, Akt-p、Akt、IKK α / β -p 及 IKK α / β 蛋白等的變化。5. 免疫沈澱法及蛋白激酶活

性測定:測定 Akt 及 IKK α / β 的活性。6.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。

研究目的

Thrombin 除了具有加強活化血小板，參與血液的凝固外，它也是一種發炎的物質。在慢性肺部纖維化疾病的初期，支氣管肺部灌流液中 thrombin 的活性有增加的現象。此時，thrombin 會誘導前發炎物質 IL-8/CXCL8 的產生。IL-8/CXCL8 會刺激嗜中性白血球及 T細胞的趨化作用，導致呼吸道發炎的現象，與肺部慢性阻塞性的疾病息息相關，顯示 thrombin 及 IL-8/CXCL8 二者在呼吸道發炎反應中扮演著重要的角色。本計劃主要的目的是探討在肺部上皮細胞中，thrombin 是否會經由 Rac 的作用機轉來活化 PI3K/Akt 最後增加 NF- κ B 的活性及誘導 IL-8/CXCL8 基因表現。希望能夠藉此研究，找出 thrombin 在呼吸系統疾病所扮演的病理角色，進一步提供臨床改善或治療呼吸系統疾病的參考。

結果

Thrombin 經由活化 Rac 誘導 IL-8/CXCL8 的釋放

首先為了測定 Rac 是否參與在 thrombin 誘導肺部上皮細胞 IL-8/CXCL8 的釋放中，將 A549 細胞分別轉染 0.5 μ g 及 1 μ g 的 dominant negative mutant of Rac (Rac N17) 24 小時後，以 thrombin (10 U/ml) 刺激 24 小時，收集細胞培養液觀察 IL-8/CXCL8 的釋放。可見 Rac N17 0.5 μ g 及 1 μ g 皆可有效抑制由 thrombin 所誘發 IL-8/CXCL8 的釋放，分別抑制了 58 \pm 16%，75 \pm 16% (Figure 1A)。接著為了更進一步證實 Rac 是否參與在 thrombin 誘導 IL-8/CXCL8 的表現中，將 A549 細胞分別轉染 0.5 μ g 或 1 μ g 的 Rac N17 及 0.2 μ g 的 IL-8 wt-Luc 質體 24 小時，再給予 thrombin (10 U/ml) 刺激 24 小時後，結果發

現 thrombin 所誘導 IL-8/CXCL8-luciferase 的活性，可分別被 Rac N17 0.5 μg 及 1 μg 抑制了 $62 \pm 21\%$ ， $92 \pm 6\%$ (Figure 1B)。接下來為更進一步證明 thrombin 是否可直接活化 Rac，將 A549 細胞給予 thrombin (10 U/ml) 刺激 0-30 分鐘後，發現 thrombin 能有效增加 GTP-Rac 的表現量即 Rac 被活化，且在 3 分鐘活化量具有明顯的上升，並持續至 20 分鐘 (Figure 1C)。綜合以上結果推論 Rac 確實參與在 thrombin 誘導肺部上皮細胞 IL-8/CXCL8 的表現及釋放中。

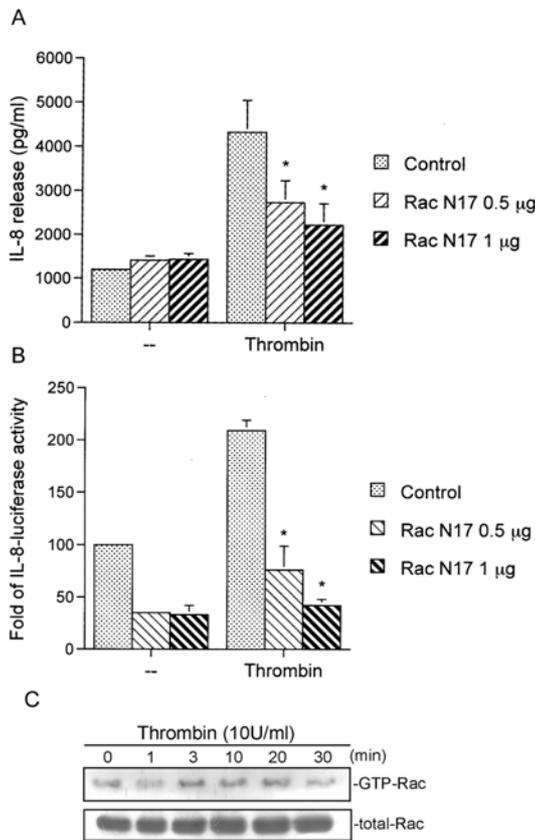


Figure 1

Thrombin 經由 Rac 及 PI3K 路徑磷酸化 Akt

之前的研究發現 thrombin 能夠有效誘導增加 Akt Ser473 磷酸化及活化之現象，來媒介 IL-8/CXCL8 的表現及釋放。故將更進一步探討 thrombin 磷酸化 Akt 的作用是否可經由 Rac 及 PI3K 的路徑而來。A549 細胞分別轉染 0.5 μg 及 1 μg 之 Rac N17 後 24 小時，再以 thrombin (10 U/ml) 刺激 20 分鐘後，發現 Rac N17 呈濃度相

關性抑制 thrombin 誘導 Akt Ser473 磷酸化之現象。0.5 μg 之 Rac N17 可抑制 thrombin 誘導增加 Akt Ser473 磷酸化約 $58 \pm 29\%$ ，而 1 μg 之 Rac N17 幾乎可完全抑制 thrombin 誘導 Akt Ser473 的磷酸化之現象 (Figure 2A)。相同地，用 PI3K 抑制劑 LY 294002 (10 μM) 前處理 30 分鐘，再加入 thrombin (10 U/ml) 刺激 20 分鐘後，發現 LY 294002 也可抑制由 thrombin 誘發 Akt Ser473 磷酸化的現象，約抑制 $87 \pm 15\%$ (Figure 2B)。經由以上的推論發現 thrombin 確實可經由 Rac 及 PI3K 的路徑來增加 Akt Ser473 之磷酸化。

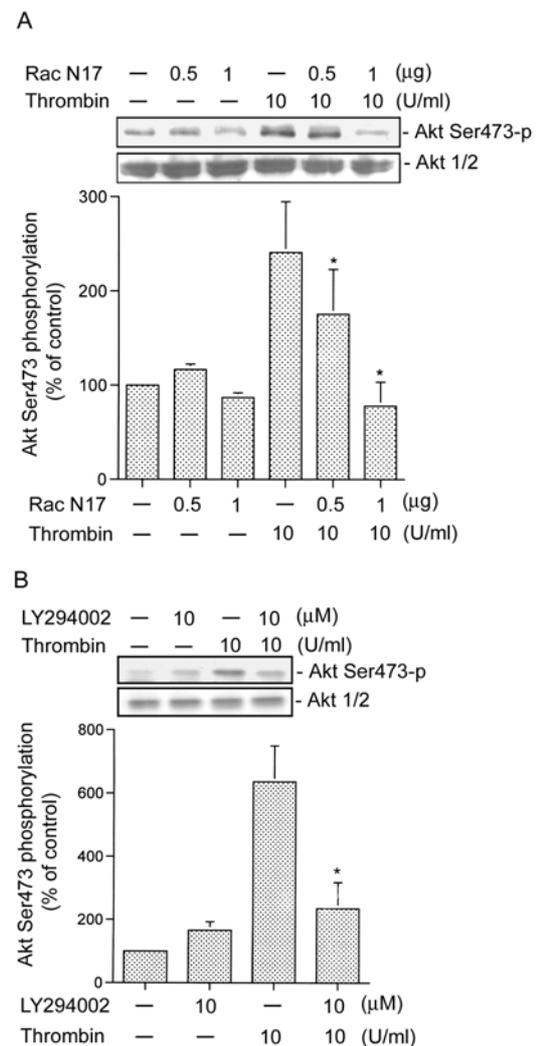


Figure 2

Thrombin 經由 Rac 及 PI3K 路徑活化 Akt 激酶活性

進一步確定 thrombin 除了經由 Rac 及 PI3K 路徑增加 Akt 之 Ser473 磷酸化外，

是否也會增加 Akt 蛋白激酶的活性。A549 細胞分別轉染 1 μg 的 Rac N17 及 0.5 μg 的 Akt DN 後 24 小時，再以 thrombin (10 U/ml) 刺激 20 分鐘後，利用蛋白激酶活性方法測定，發現 Rac N17 及 Akt DN 皆有效抑制 thrombin 誘導 Akt 蛋白激酶活性 (Figure 3A 及 3C)。同樣地，用 PI3K 抑制劑 LY 294002 (10 μM) 前處理 30 分鐘，再加入 thrombin (10 U/ml) 刺激 20 分鐘後，也可見到 LY 294002 具有抑制 thrombin 所誘導 Akt 蛋白激酶活性的現象 (Figure 3B)，且與 Akt 被磷酸化的情形互相輔合。經由以上推論得知 thrombin 確實可以經由 Rac 及 PI3K 的路徑來增加 Akt 的磷酸化及蛋白激酶的活性。

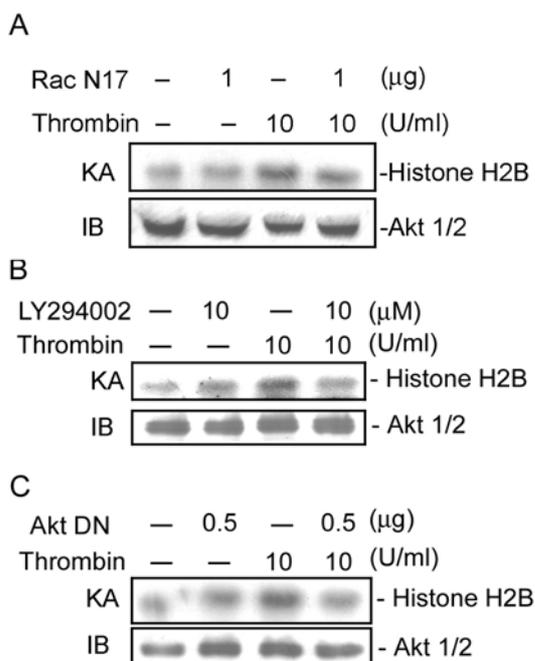


Figure 3

Thrombin 經由 Rac 及 PI3K/Akt 增加 IKK α/β Ser180/Ser181 磷酸化的作用

依據以上結果得知 thrombin 可經由 Rac/PI3K/Akt 的路徑增加 A549 肺部上皮細胞 IL-8 的釋放。而要增加 IL-8 基因的表現，其中 NF- κB 為一個重要的轉錄因子。在我們尚未發表的結果中，將 IL-8/CXCL8 promoter 之 κB 剔除的載體中，發現可抑制 thrombin 所誘導之 IL-8/CXCL8 表現，顯示 NF- κB 對 thrombin 所誘導之 IL-8 表現扮演著重要的角色。且在之前研究指出

Akt 可經由不同路徑來增加 NF- κB 的活性，其中即包括將 NF- κB 上游之 IKK α/β 磷酸化。接下來我們將探討 Rac/PI3K/Akt 是否可經由誘導增加 IKK α/β 活性的作用來促使 NF- κB 的活化。將 A549 細胞分別轉染 0.5 μg 及 1 μg 的 Rac N17 後 24 小時，再以 thrombin (10 U/ml) 刺激 30 分鐘後，發現 Rac N17 呈濃度相關性抑制 thrombin 誘導 IKK α/β Ser180/Ser181 磷酸化之作用，分別抑制了 $68 \pm 12\%$ 及 $95 \pm 9\%$ (Figure 4A)。相同地，PI3K 抑制劑 LY 294002 (10 μM) 及 Akt 抑制劑 (10 μM) 前處理 30 分鐘，再加入 thrombin (10 U/ml) 刺激 30 分鐘後，同樣地 LY 294002 及 Akt 抑制劑皆可抑制由 thrombin 誘發 IKK α/β Ser180/Ser181 磷酸化的現象 (Figure 4B)。經由以上推論得知 thrombin 確實可經由 Rac 及 PI3K/Akt 的路徑來增加 IKK α/β 之磷酸化。

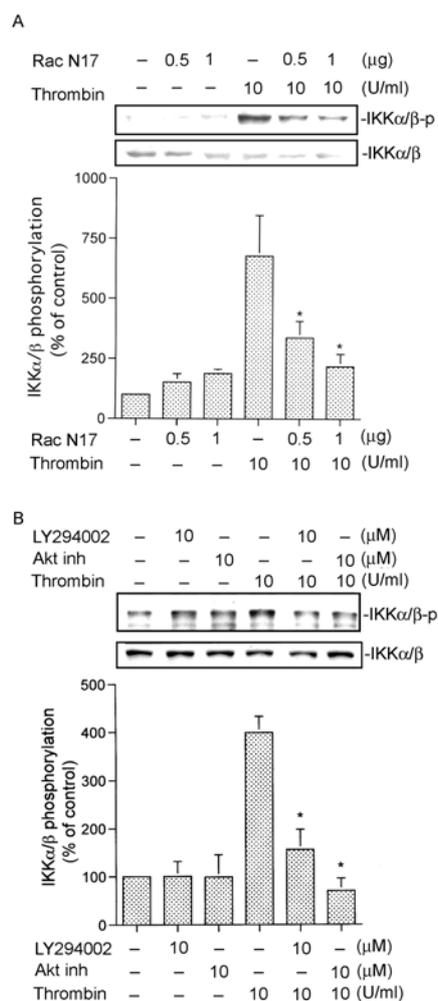


Figure 4

Thrombin 經由 Rac 及 PI3K/Akt 路徑活化 IKK α / β 激酶活性

接下來進一步證明 thrombin 除了經由 Rac 及 PI3K/Akt 路徑增加 IKK α / β Ser180/Ser181 磷酸化外，是否也會增加 IKK α / β 蛋白質激酶的活性。A549 細胞分別轉染 1 μ g 之 Rac N17 及 0.5 μ g 之 Akt DN 後 24 小時，再以 thrombin (10 U/ml) 刺激 30 分鐘後，發現 Rac N17 及 Akt DN 皆有效抑制 thrombin 誘導 IKK α / β 蛋白質激酶活性之表現 (Figure 5A 及 5C)。相同地，利用 PI3K 抑制劑 LY 294002 (10 μ M) 前處理 30 分鐘，再加入 thrombin (10 U/ml) 刺激 30 分鐘後，發現 LY 294002 也可抑制 thrombin 誘導 IKK α / β 蛋白質激酶的活性 (Figure 5B)，此現象與 IKK α / β 被磷酸化的情形互相輔合。經由以上推論 thrombin 確實可經由 Rac 及 PI3K/Akt 的路徑來增加 IKK α / β 的磷酸化及蛋白質激酶的活性。

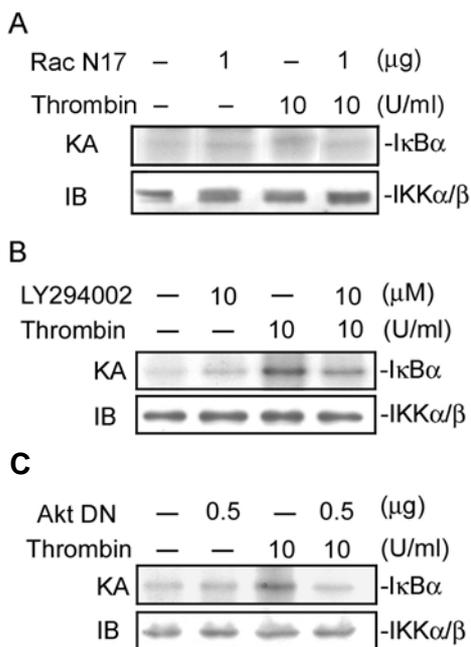


Figure 5

Thrombin 經由活化 Rac/PI3K/Akt 路徑誘發 NF- κ B 的活化和調控 IL-8/CXCL8 的表現

綜合以上的結果已經證實 thrombin 誘導 IL-8/CXCL8 表現及釋放的路徑中，Rac/PI3K/Akt 的確可經由活化 IKK α / β 蛋

白激酶而來，因此接下來將利用轉染的方法，更進一步證明 thrombin 可經由 Rac/PI3K/Akt 來增加 NF- κ B 的活性。A549 細胞分別轉染 0.5 μ g 及 1 μ g 的 Rac N17 或 0.5 μ g Akt DN 24 小時，或以 LY 294002 (10 μ M) 前處理 30 分鐘，再加入 thrombin (10 U/ml) 刺激 24 小時之後，可發現 Rac N17、LY 294002 及 Akt DN 皆可抑制 thrombin 誘導 κ B-luciferase 的活性，其中 Rac N17 更呈現濃度相關性抑制作用。而 LY 294002 及 Akt DN 分別抑制 thrombin 誘導 κ B-luciferase 的活性為 $67 \pm 9\%$ 及 $74 \pm 12\%$ (Figure 6)。經由以上結果得知 Rac/PI3K/Akt 也可調控 NF- κ B 轉錄因子的活性來參與 thrombin 誘導 IL-8/CXCL8 的表現。

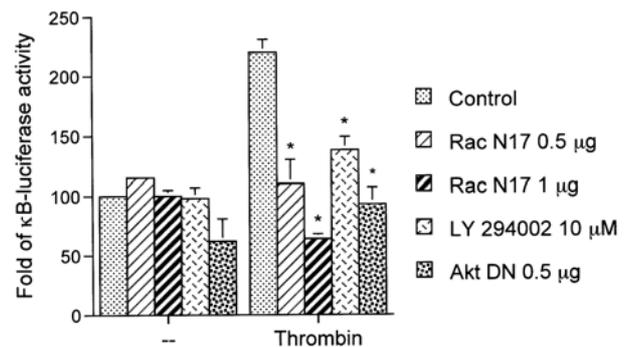


Figure 6

討論(含結論與建議)

綜合先前的結果及以上的實驗證明顯示，在 A549 肺部上皮細胞中，thrombin 除了經由活化 PKC α 及 PI3K/Akt 的訊息傳遞路徑，將 I κ B α 磷酸化及降解，促使 NF- κ B 的活化，進一步誘導 IL-8/CXCL8 基因的表現，進而產生大量的 IL-8/CXCL8 的釋放。另外，thrombin 可能經由活化上游之 Rac 再進一步透過 PI3K/Akt 的訊息傳遞路徑，將 IKK α / β 磷酸化來增加 NF- κ B 的活化，而誘導 IL-8/CXCL8 的表現及釋放。一旦 IL-8/CXCL8 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。

五、参考文献

- Albert, J., Polito, M.D. and David, P.B. (1998) Epithelial cells as regulators of airway inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 102, 714-718.
- Asokanathan, N., Graham, P.T., Fink, J., Knight, D.A., Bakker, A.J., McWilliam, A.S., Thompson, P.J. and Stewart, G.A. (2002) Activation of protease-activated receptor (PAR)-1, PAR-2, and PAR-4 stimulates IL-6, IL-8 and prostaglandin E₂ release from human respiratory epithelial cells. *J. Immunol.* 168, 3577-3585.
- Bar-Shavit, R., Benezra, R.M., Sabbah, V., Bode, W. and Vloday, I. (1992) Thrombin as a multifunctional protein: induction of cell adhesion and proliferation. *Am. J. Respir. Cell. Biol.* 6, 123-130.
- 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- κ B p50 homodimer bound to a κ B site. *Nature* 373, 303-310.
- 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- κ B activity. *Ann. Rev. Immunol.* 18, 621-663.
- Kunkel, S.L., Strieter, R.M., Lindley, I.J.D. and Westwick, J. (1995) Chemokines: new ligands, receptors and activities. *Immunol. Today* 16, 559-561.
- Malik, A.B. and Horgan, M.J. (1997) Mechanisms of thrombin induced lung vascular injury and edema. *Am. Rev. Respir. Dis.* 136, 467-470.
- Marini, M., Vittori, E., Hollemborg, 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.
- Nobes, C.D., and Hall, A. (1995) Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81, 53-62.
- Olson, M.F., Ashworth, A. and Hall, A. (1995) An essential role for Rho, Rac and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G₁. *Science* 269, 1270-1272.
- Perona, R., Montaner, S., Saniger, L., Sánchez-Pérez, I., Bravo, R. and Lacal, J.C. (1997) Activation of the nuclear factor-KB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins. *Genes Dev.* 11, 463-475.
- Piguet, P.F., Collart, M.A., Grau, G.E., Sappino, A.-P. and Vassalli, P. (1990) Requirement of tumour necrosis factor for development of silica-induced pulmonary fibrosis. *Nature* 344, 245-247.
- Qiu, R.-G., Chen, J., Kirn, D., McCormick, F. and Symons, M. (1995) An essential role for Rac in Ras transformation. *Nature* 374, 457-459.
- Standiford, T.J., Kunkel, S.L., Basha, M.A., Chensue, S.W., Lynch, J.P., Toews, G.B., Westwick, J. and Strieter, R.M. (1990) Interleukin-8 gene expression by a pulmonary epithelial cell line. A model for cytokine networks in the lung. *J. Clin. Invest.* 86, 1945-1953.
- Thurlbeck, W.M. (1967) Internal surface area and other measurements in emphysema. *Thorax* 22, 483-496.
- 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.
- Whitehead, I.P., Campbell, S., Rossman, K.L. and Der, C.J. (1997) Dbl family proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1332, F1-F23.
- 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.