ƒ ‹ F | Œfia‹ ˙'e›ß• |–M^D‹ ª¤s›p e ƒ¤"G‡ł§i

MAPKs ⁄ ¸´ ¿ ƒ]⁄lƒbthrombin »⁄ "˝‡¡¥¤ ‰† ›MMMP-12 ⁄ ¸

COX-2 ƒ]" †{⁄§ Tfi§¶ ˙»…–• Q

›p e^ §¡G §O«‹ ›p e

›p e‰ ¸s„¡GNSC93-2320-B-038-045-

ıƒ • ¶¡¡G93 ƒ~08 ⁄°01 ⁄ Ø 94 ƒ~07 ⁄°31 ⁄Ø

ıƒ ‡ ƒ ¡G» O ¥´ ˙⁄j ˙' I § Ťv ł¤t

›p e¥ D ø⁄¡HG‡ fl ←–`

ƒ ØP¥ D ø⁄¡HG" L «•

›p e »P⁄H›ß¡G‹ ‹ 165.

‡ ł § i ^«‹"¡ºG†‡ §i

‡ B † zŁƒG¡¥ » › p e ¥ ł‰¶}‹d,

⁄⁄ ¥` Œ 94 ƒ~10 ⁄°25 ⁄Ø

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）

MAPKs 及轉錄因子在 thrombin 誘導肺部巨噬細胞 MMP-12 及 COX-2 基因表現之訊息傳遞探討

計畫類別：■ 個別型計畫　□ 整合型計畫
計畫編號：NSC 93－2320－B－038－045
執行期間：93 年 08 月 01 日至 94 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：紀正祐

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　　94 年 10 月 18 日

中英文摘要及關鍵詞(Keywords)

中文摘要及關鍵詞

關鍵詞: 肺部巨噬細胞; thrombin；發炎；matrix metalloproteinase-12 (MMP-12)；環氧化酵素-2 (cyclooxygenase-2; COX-2)；誘導性一氧化氮酵素(inducible nitric oxide synthase)；mitogen-activated protein kinases (MAPKs)；NF-κB；訊息傳遞

本計劃我們將探討在肺部 NR8383 巨噬細胞中，ERK 及 NF-κB 在 thrombin 誘導環氧化酵素-2 (cyclooxygenase-2; COX-2)、matrix metalloproteinase-12 (MMP-12)及誘導性一氧化氮酵素(inducible nitric oxide synthase; iNOS)的表現。NR8383 巨噬細胞給予 thrombin 可依時間依賴曲線誘導 COX-2 及 MMP-12 的表現。相同的，thrombin 也可以依濃度及時間依賴曲線誘導 iNOS 的表現。Manumycin A (Ras 抑制劑)、GW 5074 (Raf-1 抑制劑)及 PD 98059 (MEK 抑制劑)皆可抑制 thrombin 誘導 iNOS 的表現。NR8383 巨噬細胞給予 thrombin 可依時間依賴曲線增加 Ras 的活性、Raf-1 磷酸化及 ERK 的磷酸化。NR8383 巨噬細胞給予 PD 98059 可抑制 thrombin 誘導 ERK 的磷酸化。此外，細胞給予 Bay 117082 (IκBα磷酸化抑制劑)及細胞短暫轉染 IκB 突變載體(IκBM)皆可抑制 thrombin 誘導 iNOS 的表現。再者，NR8383 巨噬細胞給予 thrombin 可依時間依賴曲線誘導 IKKα/β磷酸化、IκBα磷酸化、IκBα降解及 κB-luciferase 的活性。經由以上的結果顯示，在 NR8383 巨噬細胞中，thrombin 可能由活化 Ras/Raf-1/ERK 及 IKKα/β/IκBα/NF-κB 的訊息傳遞路徑來誘導 COX-2、MMP-12 及 iNOS 的表現。

英文摘要及(Keywords)

Keywords: alveolar macrophages, thrombin, inflammation, matrix metalloproteinase-12 (MMP-12), cyclooxygenase-2 (COX-2), inducible nitric oxide synthase (iNOS), mitogen-activated protein kinases (MAPKs), nuclear factor-κB, signal transduction

In this project, we would like to investigate the role of ERK and NF-κB on thrombin-induced cyclooxygenase-2 (COX-2), matrix metalloproteinase-12 (MMP-12), and inducible nitric oxide (iNOS) expression in NR8383 alveolar macrophages. Treatment of NR8383 cells with thrombin caused time-dependent increase in COX-2 and MMP-12 expression. Similar, thrombin also induced increase in iNOS expression in concentration- and time-dependent manner. Manumycin A (a Ras inhibitor), GW 5074 (a Raf inhibitor), and PD 98059 (a MEK inhibitor) inhibited thrombin-induced iNOS expression. Treatment of NR8383 cells with thrombin caused time-dependent increase in Ras activity, Raf-1 phosphorylation, and ERK phosphorylation. Treatment of NR8383 cells with PD 98059 inhibited thrombin-induced ERK phosphorylation. In addition, iNOS expression caused by thrombin was separately attenuated by Bay 117082 (a IκBα phosphorylation inhibitor) or transit transfection with IκB mutant plasmid (IκBM). Furthermore, treatment of NR8383 cells with thrombin caused time-dependent increase in IKKα/β phosphotylation, IκBα phosphorylation, IκBα degradation, and κB-luciferase activity. These results indicate that thrombin activate the Ras/Raf-1/ERK and IKKα/β/IκBα/NF-κB signal pathways, which in turn induces COX-2, MMP-12, and iNOS expression in NR 8383 macrophages.

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

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，其功能可將凝血因子 V、VIII 和 XIII 變成活化態，將 fibrinogen 轉換變成 fibrin，活化蛋白 C 和加強血小板的活化，參與血液的凝固。此外，thrombin 也是一種發炎的物質，可作用至平滑肌細胞、巨噬細胞及嗜中性白血球，而引起發炎的反應(Malik & Horgan, 1987; Daves, *et al*., 1993)。而在慢性肺部纖維化疾病的早期，肺部微血管的內皮細胞會被瓦解及血管壁內層也會受到損傷，最後引起微血管的傷害。此時，thrombin 也會滲透至血管外而作用至呼吸系統的細胞，而產生許多的反應，例如：呼吸道平滑肌及肺部纖維細胞的增生(Malik & Horgan, 1987; Bar-Shavit *et al*., 1992)。此外，thrombin 也可以誘導前發炎物質的產生，例如在老鼠腹部巨噬細胞、人類大腸的上皮細胞及人類呼吸道上皮細胞中，thrombin 可以誘導 MMP-12、COX-2、iNOS、IL-6 及 IL-8 基因的表現(Raza *et al*., 2000; Asokananthan *et al*., 2002; Seymour *et al*., 2003)。在我之前的研究主題主要探討 thrombin 在肺部上皮細胞中誘導 IL-8 基因表現的分子作用機轉。然而查詢之前的文獻得知，thrombin 在肺部巨噬細胞所扮演的角色研究卻相當少，這促使我有興趣研究 thrombin 在肺部巨噬細胞所扮演的角色。是否 thrombin 可以誘導肺部巨噬細胞 MMP-12、COX-2 及 iNOS 基因的表現。

目前已知thrombin可經由protease-activated receptors (PARs)而產生許外生理或病理的反應。直到目前為止PARs有四種，分別為PAR1、 PAR2、 PAR3 及PAR4。PARs為一種G蛋白偶合的受體，為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所活化，但PAR2 不行，卻可受到trysin、trypase及凝血因子VIIa和Xa的活化(Nystedt *et al*., 1994)。PAR1 可與$G_{12/13}$、G_q及G_i蛋白偶合，活化下游二級訊息傳遞物質，而產生一連串的反應(Coughlin, 2000)。例如PAR1 與G_q蛋白偶合之後，活化phospholipase Cβ，使得phosphoinositide水解產生IP_3及DAG，使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 (CaMK)、ERK及p38 MAPK等，來調控血小板凝集及增加肺部纖維細胞和內皮細胞轉錄的功能和基因的表現(Rahman *et al*., 1999; Ludeicka-Bradley *et al*., 2000; Ryu *et al*., 2000)。而然在肺部的巨噬細胞中，thrombin所扮演的角色研究卻十分的缺乏，這促使我興趣研究thrombin是否可誘導MMP-12、COX-2 及iNOS基因表現？ERK及轉錄因子NF-κB所扮演的角色為何？

一般認為肺部巨噬細胞為肺部及血管分界的保護者，當做第一道防線來防禦外來的入侵者。它主要利用吞噬的作用將外來的細菌、病毒或過敏原清除(Sibille and Reynolds, 1990)。當肺部受到大量的細菌或病毒感染的時候，這些致病原會活化肺部巨噬細胞，且會誘導巨噬細胞增加前發炎基因的表現及發炎物質的釋放，例如：cytokines (如：IL-1，IL-6及TNF-α)、chemokines (如：IL-8)、MMPs (如：MMP-12)、iNOS、COX-2 及PGE_2的釋放(Haslett, 1999)。而這些前發炎物質會直接將免疫細胞吸引到發炎部位，最後產生更大的發炎反應。目前已知MAPKs參與許多基因的表現，其中也包括MMP-12、COX-2 及iNOS (Lin *et al*., 2001; Wu *et al*., 2003)。有關MAPK家族的分類乃依其phospho-Thr及-Tyr中間之胺基酸而分成p44/42 MAPK (ERK1/2)、c-jun N-terminal kinase (JNK)和p38 MAPK，都屬於 Ser/Thr kinases，其Thr和Tyr受到上游MAPK kinase的磷酸化後才會被活化(Nishida & Gotoh, 1993)。

先前的報告指出在巨噬細胞中，LPS可經由活化Raf-1 而增加ERK1/2 的活性進而調控COX-2 的生成(Reimann *et al.*, 1994; Hwang *et al.*, 1997)。此外，也有研究顯示thrombin可經由PKC 及ERK1/2 的路徑活化老鼠腹部巨噬細胞MMP-12 的表現及釋放(Raza *et al.*, 2000)。因此，ERK活化的路徑在誘導COX-2、MMP-12 及iNOS基因的表現扮演著非常重要的角色。本計劃將針對ERK是否參與thrombin引發MMP-12 COX-2 及iNOS的表現加以探討。

NF-κB最早被發現可結合到Ig-κ light chain 基因上的轉錄因子，而且只對 B 細胞有專一性。後來的研究發現，NF-κB 普遍存在於細胞內，可參與許多基因的轉錄作用，在免疫及發炎反應扮演著很重角色。NF-κB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; Baldwin, 1996)。在未受到刺激的細胞中，NF-κB與抑制性蛋白IκBs結合，遮蔽NF-κB移至細胞核所需的nuclear localization signal (NLS)序列，所以NF-κB一直存在細胞質，此時NF-κB是未活化態。直到細胞受到刺激物作用時，會將IκBs磷酸化，再接上ubiquitin後，26S proteasome會將IκBs分解，此時NF-κB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(Ghosh & Baltimore, 1990)。一群蛋白酶複合體被稱為IκB kinases (IKKs)已被分離出來，其中最主要包括IKKα及IKKβ可將IκBα在Ser32及Ser36的位置磷酸化；將IκBβ在Ser19及Ser23的位置磷酸化，使其接上ubiquitin，而被分解(Karin and Yinon, 2000)。最近的報告也證實thrombin會經由活化 NF-κB轉錄因子，進而導致COX-2的生成(Kaur *et al.*, 2003)。因此我們想探討NF-κB在thrombin引發COX-2、iNOS或MMP-12表現的路徑當中扮演何種角色？

綜合以上的介紹，肺部的發炎反應在呼吸系統疾病例如氣喘及慢性阻塞性疾病中扮演著重要的角色。在本計劃中，我們主要探討 thrombin 在肺部巨噬細胞中誘導 MMP-12、CXO-2 及 iNOS 基因表現的調控機制及其訊號傳遞路徑。我們將探討 ERK1/2 及 NF-κB 轉錄因子在 thrombin 誘導 iNOS、COX-2 或 MMP-12 基因表現所扮演的角色。希望能藉此計劃能更進一步找出 thrombin 在呼吸道疾病所扮演的角色及其作用機轉，進而發展出呼吸道阻塞性疾病治療的新方向。

研究方法

1. 細胞培養:將人類肺部巨噬細胞株NR8383 培養在 Ham's/F12K 含有 10%胎牛血清及抗生素(100 units/ml penicillin 及 100 μg/ml streptomycin)中以進行下列的實驗。2. 轉染及報告基因試驗:測定κB-luciferase 的活性。3. MMP-12 RT-PCR 測定:測定細胞中 MMP-12 mRNA 表現量。4. 西方點墨法:測定 COX-2、iNOS、ERK-p、IKKα/β-p、IKKα/β、IκBα-p、及 IκBα 等蛋白的變化。5.統計方法:所有實驗數據皆以平均值±標準差(mean ± 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 誘導 COX-2 及 MMP-12 表現

首先我們將 NR8383 巨噬細胞給予 thrombin 處理不同時間，收集其蛋白質及 RNA 來分析 COX-2 及 MMP-12 的表現。將 NR8383 巨噬細胞給予 thrombin (10 U/ml)刺激，發現 COX-2 蛋白表現在 4 小時就有增加，且在 12-24 小時達到最大，48 小時之後慢慢的下降(Fig.

1)。而 MMP-12 之 RNA 的表現同樣也有增加的現象，MMP-12 之 RNA 表現也在 4 小時就有增加，且持續至 24 小時之久(Fig. 2)。

Thrombin 誘導 iNOS 蛋白表現

接下來我們也要觀察另外一個發炎蛋白 iNOS 表現的情形。NR8383 巨噬細胞給予 thrombin 處理不同時間，發現 thrombin (10 U/ml)依時間依賴曲線增加 iNOS 蛋白表現。Thrombin 誘導 iNOS 蛋白表現在 6 小時就有增加的情形，且在 12 小時具有明顯的增加作用，在 24 小時達到最大的表現(Fig. 3)。同樣地，在 thrombin 不同濃度處理發現 thrombin (1 U/ml)也可誘導 iNOS 蛋白的表現，且在 10 U/ml thrombin 可達到最大值(Fig. 4)。接下來的實驗我們將以 thrombin 誘導 iNOS 蛋白的表現當做研究的模式，觀察 MAPK 及轉錄因子 NF-κB 媒介 thrombin 誘導 iNOS 蛋白表現的情形。

Manumycin A、GW 5074 及 PD 98059 抑制 thrombin 引發 iNOS 蛋白的表現

由前面的實驗證實了 thrombin 可以刺激 iNOS 蛋白的表現。接下來我們將來觀察 Ras/Raf-1/ERK 是否貢獻在 thrombin 所誘導 iNOS 蛋白的表現當中。將細胞以 manumycin A (Ras 抑制劑; 0.3-3 μM)、GW 5074 (Raf-1 抑制劑; 01-1 μM)及 PD 98059 (MEK 抑制劑; 3-30 μM)前處理 30 分鐘，再以 thrombin (10 U/ml)刺激 24 小時後，以西方點墨法的方法來分析 iNOS 蛋白表現的情形。發現 Manumycin A、GW 5074 及 PD 98059 的確可依濃度依賴曲線抑制 thrombin 誘導 iNOS 蛋白的表現。Manumycin A 在 3 μM 明顯抑制 thrombin 誘導 iNOS 的表現(Fig. 5)。GW 5074 在 0.3 μM 明顯抑制 thrombin 誘導 iNOS 的表現(Fig. 7)。PD 98059 在 10 μM 明顯抑制 thrombin 誘導 iNOS 的表現(Fig. 9)。

Thrombin 誘導 Ras 的活性、Raf-1 及 ERK 的磷酸化

經由以上的實驗發現 Ras/Raf-1/ERK 的確貢獻在 thrombin 誘導 iNOS 的表現當中。接著我們將進一步探討 Ras、Raf-1 及 ERK 是否會因 thrombin 的刺激而活化。我們將利用 Ras 活性分析套組，即 Ras-binding domain for Raf-1 (Raf-1 RBD)與 Ras 結合的特性，利用免疫沈澱法方式來分析 Ras 的活化，或利用特異性磷酸化 Raf-1 及 ERK 的抗體來偵測 Raf-1 及 ERK 被磷酸化的情形。將 NR8383 細胞給予 thrombin 刺激不同的時間(0-60 分鐘)，發現 Ras 的活性在 5 分鐘時就有增加，且在 30 分鐘達到最大，60 分鐘之後慢慢的下降(Fig. 6)。而 Raf-1 之磷酸化也同樣有增加的現象，並且在 30 分鐘達最大(Fig. 8)。而在 ERK 的磷酸化也可發現在 10 分鐘就有明顯的磷酸化，且持續至 30 分鐘(Fig. 10)。由此可見，thrombin 的確可以活化 Ras/Raf-1/ERK 的訊息傳遞路徑來促使 iNOS 蛋白的表現。

PD 98059 抑制 thrombin 引發 ERK 的磷酸化

由前面的實驗證實了 thrombin 刺激 iNOS 蛋白的表現受到 Ras/Raf-1/ERK 的調控。接下來我們將來觀察 thrombin 所活化的 ERK 是否可被 MEK 抑制劑 PD 98059 所抑制。將細胞以 PD 98059 (10 及 30 μM)前處理 30 分鐘，再以 thrombin (10 U/ml)刺激 20 分鐘後，發現 PD 98059 的確可抑制 thrombin 誘導 ERK 磷酸化的現象(Fig. 11)。

Bay 117082 及 Dominant negative mutant of IκB (IκBM)皆可抑制 thrombin 誘導 iNOS 蛋白的表現

之前的研究顯示 NF-κB 在前發炎物質的表現扮演者重要的角色。接著我們將探討 thrombin 刺激 iNOS 的表現是否經由 NF-κB 的訊息傳遞路徑而來。細胞以 Bay 117082 (IκBα 磷酸化抑制劑，1-10 μM)前處理 30 分鐘，再以 thrombin (10 U/ml)刺激 24 小時，發現 Bay 117082 可依濃度反應曲線抑制 thrombin 誘導 iNOS 蛋白的表現(Fig. 12)。相同地，NR8383 短暫轉染 IκBM 也可抑制 thrombin 誘導 iNOS 的表現(Fig. 13)。顯示 thrombin 可經由 NF-κB 的活化來誘導 iNOS 蛋白的表現。

Thrombin 引發 IKKα/β磷酸化、IκBα磷酸化、IκBα降解及 NF-κB 活化

由前面實驗證實了 thrombin 刺激 iNOS 蛋白的表現受到轉錄因子 NF-κB 的調控。接下來我們將來觀察 thrombin 是否可活化 NF-κB 上游之蛋白激酶 IKKα/β的活化、NF-κB 的抑制性蛋白 IκBα，受到 thrombin 的刺激而磷酸化以及降解的情形及 NF-κB 活化的情形。首先我們觀察 IKKα/β是否受到將 thrombin 刺激而磷酸化。發現 thrombin (10 U/ml)刺激 20 分鐘 IKKα/β的磷酸化就有增加的作用，且持續至 60 分鐘(Fig. 14)。接著我們將觀察 IκBα是否會受到 thrombin 刺激而磷酸化及降解。NR8383 細胞給予 thrombin 不同時間刺激，觀察到細胞質 IκBα磷酸化的程度在 5 分鐘就有增加的情形，且持續至 60 分鐘(Fig. 15)；IκBα在 10 到 60 分鐘時有被降解的情形(Fig. 16)，顯示 thrombin 可將 IκBα磷酸化之後，IκBα隨之快速的降解，而釋放出具有活性的 NF-κB。最後我們將探討 thrombin 是否可以增加 κB-luciferase 的活性。將 NR8383 細胞中轉殖κB-luciferase 來觀察 NF-κB 被活化的情形。細胞給予 thrombin (1-10 U/ml)刺激 24 小時之後，κB-luciferase 的活性隨著 thrombin 濃度的增加而增加，以 thrombin (10 U/ml)達到最大。

討論(含結論與建議)

綜合以上的實驗證明顯示，在 NR8383 肺部巨噬細胞中，thrombin 經由活化 Ras/Raf/ERK 的訊息傳遞路徑及 IKKα/β/IκBα/NF-κB 的活化，進一步誘導前發炎物質例如 COX-2、MMP-12 及 iNOS 的表現。經由本計畫及之前在肺部上皮細胞的研究也發現 thrombin 可經由 PKCα及 PI3K/Akt 的訊息傳遞路徑，將 IKKα/β磷酸化來增加 NF-κB 的活化，而誘導 IL-8 的表現及釋放來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

Asokananthan, 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 E_2 release from human respiratory epithelial cells. *J. Immunol.* **168,** 3577-3585.

Bar-Shavit, R., Benezra, R.M., Sabbah, V., Bode, W. and Vlodasky, I. (1992) Thrombin as a multifunctional protein: induction of cell adhesion and proliferation. *Am. J. Respir. Cell. Biol.* **6,** 123-130.

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.

Ghosh, G., Vanduyne, G., Ghosh, S. and Sigler, P.B. (1995) Structure of NF-κB p50 homodimer bound to a κB site. *Nature* **373,** 303-310.

Ghosh, S. and Baltimore. D. (1990) Activation in vitro of NF-κB by phosphorylation of its inhibitor IκB. *Nature* **344**, 678-682.

Haslett, C. (1999) Granulocyte apoptosis and its role in the resolution and control of lung inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **160,** S5-S11.

Hwang, D., Jang, B.C., Yu, G. and Boudreau, M. (1997) Expression of mitogen-inducible cyclooxygenase induced by lipopolysaccharide: mediation through both mitogen-activated protein kinase and NF-κB signaling pathways in macrophages. *Biochem. Pharmacol.* **54**, 87-96.

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-κB activity. *Ann. Rev. Immunol.* **18,** 621-663.

Kaur, J., Woodman, R.C. and Kubes, P. (2002) P38 MAPK: critical molecule in thrombin-induced NF-κB-dependent leukocyte recruitment. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **284,** H1095-103.

Lin, C.H., Kuan, I.H., Lee, H.M., Lee, W.S., Sheu, J.R., Ho, Y.S., Wang, C.H. and Kuo, H.P. (2001) Induction of cyclooxygenase-2 protein by lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* in human pulmonary epithelial cells: Involvement of a nuclear factor-κB-dependent pathway. *Br. J. Pharmacol.* **134**, 543-552.

Ludeicka-Bradley , A., Tourkina, E., Suzuki, S., Tyson, E., Bonner, M., Fenton II, J.W., Hoffman, S. and Silver, R.M. (2000) Thrombin upregulates interleukin-8 in lung fibroblasts via cleavage of proteolytically activated receptor-I and protein kinase C-γ activation. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **22,** 235-243.

Malik, A.B. and Horgan, M.J. (1987) Mechanisms of thrombin induced lung vascular injury and edema. *Am. Rev. Respir. Dis.* **136,** 467-470.

Nishida, E. and Gotoh, Y. (1993) The MAP kinase cascades is essential for diverse signal transduction pathways. *TIBS,* **18**, 128-131.

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.

Rahman, a., Anwar, K.N., True, A.L. and Malik, A.B. (1999) Thrombin-induced p65 homodimer binding to downstream NF-κB site of the promoter mediates endothelial ICAM-1 expression and neutrophil adhesion. *J. Immunol.* **162,** 5466-5476.

Raza, S.L., Nehring, L.C., Shapiro, S.D. and Cornelius, L.A. (2000) Proteinase-activated receptor-1 regulation of macrophage elastase (MMP-12) secretion by serine proteinases. *J. Biol. Chem.* **275,** 41243-41250.

Reimann, T., Buscher, D., Hipskind, R.A., Krautwald, S., Lohmann-Matthes, M.L. and Baccarini,

M. (1994) Lipopolysaccharide induces activation of the Raf-1/MAP kinase pathway. *J. Immunol.* **153**, 5740-5749.

Ryu, J., Pyo, H. and Joe, E. (2000) Thrombin induced NO release from cultured rat microglia via protein kinase C, mitogen-activated protein kinase, and NF-κB. *J. Biol. Chem.* **275,** 29955-29959.

Seymour, M.L., Zaidi, N.F., Hollenberg, M.D. and MacNaughton, W.K. (2003) PAR1-dependent and independent increases in COX-2 and PGE2 in human colonic myofibroblast stimulated by thrombin. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **284,** C1185-C1192.

Sibille, Y. and Reynoids, H.Y. (1990) Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. *Am. Rev. Respir. Dis.* **141,** 471-501.

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.

Wu, L., Tanimoto, A., Murata, Y., Sasaguri, T., Fan, J., Sasaguri, Y. and Watanabe, T. (2003) Matrix metalloprotease-12 gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Genes to Cells.* **8,** 225-234.

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

Fig. 1

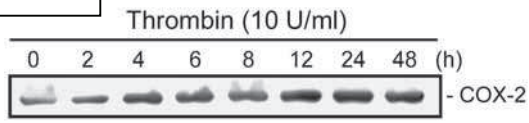

Fig. 2

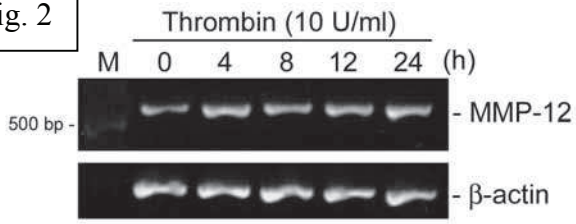

Fig. 3

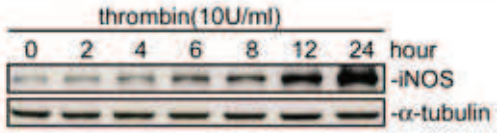

Fig. 4

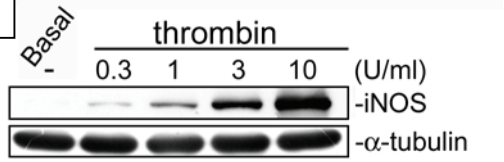

Fig. 5

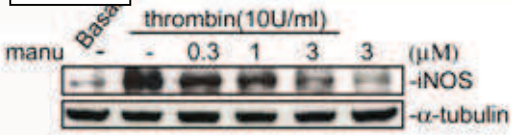

Fig. 6

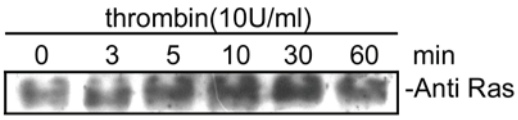

Fig. 7

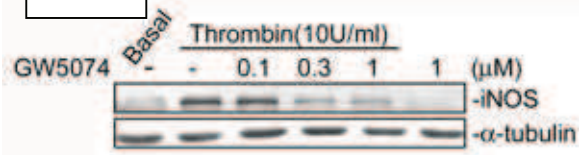

Fig. 8

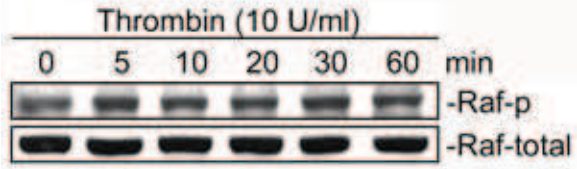

Fig. 9

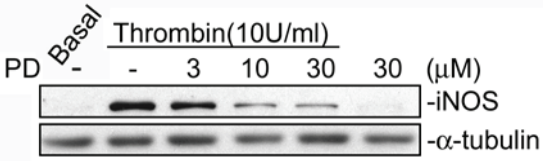

Fig. 10

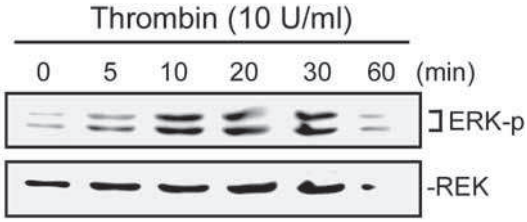

Fig. 11

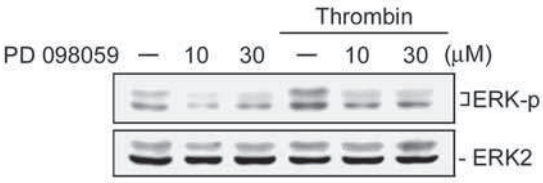

Fig. 12

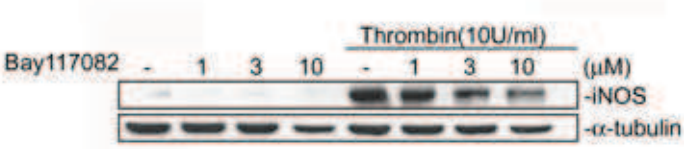

Fig. 13

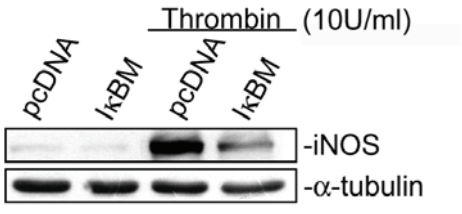

Fig. 14

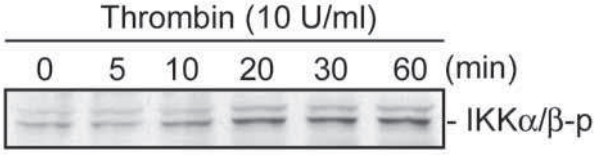

Fig. 15

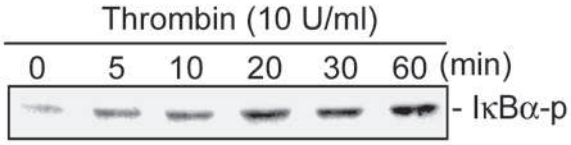

Fig. 16

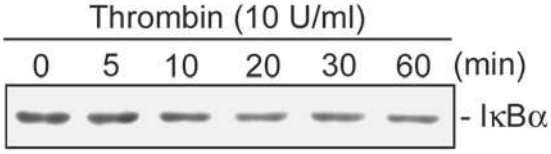
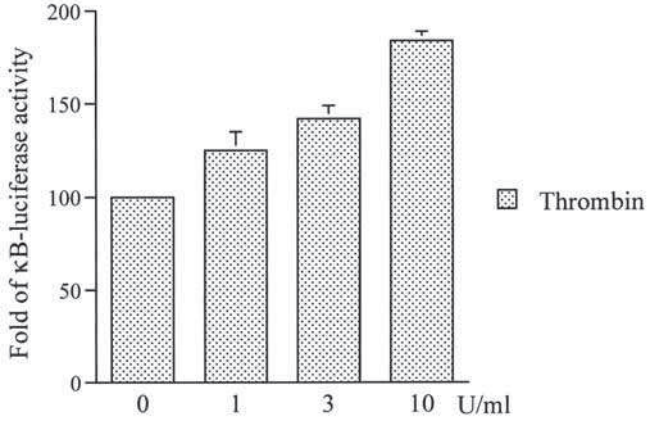
Fig. 17