

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

JNK 及 AP-1 在 thrombin 誘導肺部巨噬細胞 COX-2 及 iNOS
表現所扮演的角色

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC94-2314-B-038-064-

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：江玲玲

共同主持人：陳炳常

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)

JNK及AP-1在thrombin誘導肺部巨噬細胞COX-2及iNOS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 94-2314-B-038-064

執行期間：94年08月01日至95年07月31日

計畫主持人：江玲玲

共同主持人：陳炳常

計畫參與人員：

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

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07日

一、中文摘要

在氣喘等呼吸道的疾病中，呼吸道的發炎反應扮演著相當重要的病理角色。當吸入外來的物質時，肺部巨噬細胞為第一道的防線，可借由吞噬的作用將外來的物質清除或直接將病原菌殺死來維持肺部的平衡。此外，肺部的巨噬細胞也會分泌許多的前發炎的物質，其中包括 NO，最後導致呼吸道的發炎反應。而 NO 的產生主要是經由 inducible nitric oxide synthase(iNOS)的表現而來。本計劃我們將探討在肺部 NR8383 巨噬細胞中，AP-1 及 JNK 在 thrombin 誘導 iNOS 表現。NR8383 巨噬細胞給予 thrombin 可依濃度及時間依賴曲線誘導 iNOS 的表現。此外，thrombin 也可依濃度及時間依賴曲線誘導 COX-2 蛋白的表現。NR8383 巨噬細胞給予 SP600125 (為 JNK 抑制劑)可抑制 thrombin 誘導 iNOS 的表現。同樣地，細胞給予 SP600125 也可抑制 thrombin 誘導 COX-2 蛋白的表現。NR8383 巨噬細胞給予 thrombin 可依時間依賴曲線誘導 JNK 的磷酸化。NR8383 巨噬細胞給予 curcumin (為 AP-1 抑制劑)可抑制 thrombin 誘導 iNOS 的表現。此外，NR8383 巨噬細胞給予 thrombin 也可依時間依賴曲線誘導 c-Jun 的磷酸化。NR8383 細胞給予 SP600125 也可抑制 thrombin 誘導 c-Jun 的磷酸化。相反地，PD98059 (為 MEK 抑制劑)則不能抑制 thrombin 誘導 c-Jun 的磷酸化。經由以上的結果顯示，在 NR8383 巨噬細胞中，thrombin 可經由 JNK 及 AP-1 的訊息傳遞路徑來誘導肺部巨噬細胞 iNOS 及 COX-2 蛋白的表現。

關鍵詞：肺部巨噬細胞； thrombin；發炎；誘導性一氧化氮合成酶(iNOS)；環氧化酵素 2 (COX-2) ； JNK； AP-1； c-Jun； 訊息傳遞

二、英文摘要

Airway inflammation plays a major

role in the pathophysiology of many lung disease states, such as asthma and pulmonary fibrosis. As the first line of defense against inhaled substances, alveolar macrophages play a crucial role in maintaining lung homeostasis. This is achieved via phagocytosis of foreign material or directly kills pathogens. Besides, alveolar macrophages are able to secrete a large range of proinflammatory mediators. Among the bioactive substances produced by alveolar macrophages including active form of NO has been found the important mediators of airway fibrosis and inflammation. The NO release is dependent on the COX-2 and iNOS expression. In this project, we would like to investigate the role of JNK and AP-1 on thrombin-induced iNOS expression in alveolar macrophages. Treatment of NR8383 cells with thrombin caused time-dependent increase in iNOS expression. Similar, thrombin also induced increase in COX-2 expression in time-dependent manner. SP600125 (a JNK inhibitor) inhibited thrombin-induced iNOS expression. Similar, SP600125 also inhibits thrombin-induced COX-2 expression. Treatment of NR8383 cells with thrombin caused time-dependent increase in JNK phosphorylation. Treatment of NR8383 cells with curcumin (a AP-1 inhibitor) inhibited thrombin-induced iNOS expression. In addition, cell treatment of thrombin also induces c-Jun phosphorylation. Furthermore, treatment of NR8383 cells with SP 600125 inhibits thrombin-induced c-Jun phosphorylation, but not by PD 98059 (a MEK inhibitor). These results indicate that thrombin activate the JNK and AP-1 signal pathways, which in turn induces iNOS and COX-2 expression in NR 8383 macrophages.

Keywords: alveolar macrophages, thrombin, inflammation, inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2), JNK, AP-1, 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

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)。此外，在肺部受到感染時，肺部巨噬細胞在肺部防禦及免疫反應扮演重要的調節角色(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)及 proinflammatory mediators (例如：COX-2 表現及 PGE₂的釋放；iNOS 表現及 NO 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。本計劃研究的主題將探討 thrombin 誘導前發炎物質 COX-2 及 iNOS 在肺部發炎反應所扮演的角色。

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(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)。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、IL-6 及 IL-8 基因的表現(Asokanathan *et al.*, 2002)。雖然 thrombin 在其它的組織可誘導發炎基因的

表現，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 COX-2 及 iNOS 的表現，其誘導的作用是經由何種作用機制來調控。希望能借著 thrombin 在肺部巨噬細胞的研究清楚得知 thrombin 在肺部疾病及發炎過程所扮演的角色。

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 trypsin、trypase 及凝血因子 VIIa 和 Xa 的活化(Camerer *et al.*, 2000)。當 thrombin 與 PARs 結合的時候，thrombin 會將 PARs 的 N 端抑制性的 peptide 切除，使得 PARs 變成活化態，產生一連串的訊息傳遞，而產生許外的生理反應(Vu *et al.*, 1991)。有趣的是一些合成的 peptide 類似 PARs 的 N 端序列卻具有類似 thrombin 的作用(Vu *et al.*, 1991)。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)。PAR1 與 G_{12/13}蛋白偶合之後，G_{12/13}會與 Rho GEFs (guanine-nucleotide exchange factors)結合，活化 Rho 蛋白，加速血小板變形。PAR1 與 G_i蛋白偶合之後，會抑制 adenylyl cyclase，可促進血小板的反應。PAR1 與 G_q蛋白偶合之後，活化 phospholipase C β ，使得 phosphoinositide 水解產生 IP₃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)。然而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 COX-2 及 iNOS 基因表現？ JNK 和轉錄因子 AP-1 所扮演的角色為何？它們之間利用何種的分

子機制來調控COX-2 和 iNOS 蛋白的表現？希望能夠找出thrombin在肺部巨噬細胞所扮演的角色。

在巨噬細胞中COX-2 為參與發炎反應的重要基因之一。COX-2 是身體內一個重要的酵素，其主要的作用是將花生四烯酸 (arachidonic acid) 代謝成前列腺素 (prostaglandins, PGs)，其中包括PGE₂, PGI₂ 和 TXA₂。目前已知COX具有兩種不同的同功酵素分別是COX-1 及COX-2 (Xie *et al.*, 1991)。COX-1 稱為固定存在型，存在很多的細胞，包括內皮細胞及血小板，它們所產生的前列腺素主要扮演維持細胞恆定的功能(Mitchell *et al.*, 1995)。COX-2 稱為誘導型，當受到一些發炎性物質如 lipopolysaccharide (LPS) 或 cytokines (如: IL-1 β , TNF- α) 的刺激會誘導COX-2 的表現，進一步釋放出PGE₂ 而產生發炎反應(Mitchell *et al.*, 1994, 1995)。

NO為一種自由基的氣體可以媒介許多動物器官之連繫 (Moncada *et al.*, 1991)。目前有三種NOS被分離出來，且已被證實(Knowles and Moncada, 1994)。腦 (type I) 及內皮 (type III) NOS 為持續表現型的酵素，其酵素的活性可受到鈣離子的調控。然而誘導 (type II) NOS (iNOS) 可表現在許多種的細胞中，而產生大量的NO，例如：巨噬細胞產生的NO可以將細菌或癌細胞殺死。在巨噬細胞中，許多的物質，例如：LPS 及 IL-1 β 可經由增加iNOS的轉錄作用，使得iNOS 基因表現增加 (Lorsbach *et al.*, 1993)。iNOS 蛋白可催化 L-Arg 之 terminal guanidine nitrogen atom 而釋放出NO，而扮演著抵禦外來入侵物質的角色。然而在急性過氧肺部受傷的過程中，所誘導iNOS 表現則會釋放出大量的NO 而產生肺部的發炎反應(Hesse *et al.*, 2004)。如此，假如我們能夠深入了解iNOS 基因的表現及其活化的作用機轉將有助於對呼吸系統疾病有更深入的了解。

一般而言，要增加iNOS 基因的表現，主要是經由許多轉錄因子來調控。目前已知在iNOS 基因的核酸序列中具有多種轉錄因子結合的位置，其中包括NF- κ B、AP-1 及 NF-IL-6 等轉錄因子 (Lowenstein *et al.*,

1993)。AP-1 便是誘導iNOS 重要的轉錄因子，其組成主要是Fos和Jun所組成。AP-1 主要以homodimer 或是heterodimer 的型式如Jun/Jun、Fos/Jun 及 ATF-2/Jun 等方式存在而結合在AP-1 的作用位置(Karin, 1995)。AP-1 最早發現是PMA 可經由AP-1 轉錄因子來增加metallothionein IIA 基因轉錄的作用，後來陸續發現許多的物質包括生長因子、神經傳遞物質及 cytokines 皆可活化AP-1 來增加基因的表現(Kaminiska *et al.*, 2000)。另外，MAPKs 也可以經由幾種方式來增加AP-1 的活性 (Karin, 1995)。第一，ERK 可經由磷酸化ELK1 轉錄因子而增加Fos 蛋白表現，最後使AP-1 複合體的濃度增加，而增加其轉錄的活性。第二，JNK 或 p38 MAPK 會將Jun 或 ATF2 磷酸化，而增加Jun 蛋白的表現，使得AP-1 的複合體濃度增加，最後增加AP-1 與DNA 結合的親合力及轉錄的作用 (Semal *et al.*, 1991)。第三，新合成出來的Fos 會與Jun 結合成為穩定的複合體，此時ERK 會將Fos 的Ser 374 位置磷酸化 (Deng & Karin, 1994)，而JNK 會將Jun 的Ser 63 及 Ser 73 位置磷酸化，最後增加AP-1 的活性。此外，p38 MAPK 也可經由磷酸化ATF2 的作用來增加AP-1 與DNA 結合的能力 (Karin, 1995)。然而，thrombin 是否可經由JNK 來增加AP-1 與DNA 結合的親合力及轉錄能力來誘導COX-2 及 iNOS 蛋白的表現將是本計劃要探討的課題。

目前已知MAPKs 參與許多基因的表現，其中也包括COX-2 及 iNOS (Lin *et al.*, 2001)。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，而MAPK kinase (MEK1/2、SEK1/MKK4 和 MKK3/MKK6) 又會受到MAPKK kinase 之磷酸化而活化 (Nishida & Gotoh, 1993)。MAPKs 此路徑通常會受到生長因子及G 蛋白偶合受體的刺激而活化 (Blumer & Johnson, 1994)。其中JNK 主要是受到高滲透壓、UV 照射和前發炎細胞激素等刺激而被活化 (Hambleton *et*

al., 1996)。之前的報告已證實LPS可以經由JNK的路徑來增加COX-2基因的表現(Bennett *et al.*, 2001)。此外，在老鼠腹部巨噬細胞中，thrombin可經由JNK的路徑來增加COX-2基因的表現(Kang *et al.*, 2003)。因此，JNK活化的路徑在誘導COX-2及iNOS基因的表現扮演著非常重要的角色。先前的報告已證實thrombin可活化JNK(Marinissen *et al.*, 2003)。因此本計劃將針對JNK是否參與thrombin引發COX-2及iNOS的表現加以探討，其中包括JNK被活化之後是否會經由活化轉錄因子例如：AP-1來誘導COX-2及iNOS基因的表現？此外JNK可經由何種分子的傳遞路徑來誘導這些轉錄因子的活化？

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。因此在本計劃中，我們主要探討thrombin在肺部巨噬細胞中誘導COX-2及iNOS蛋白表現的調控機制及其訊號傳遞路徑。我們將探討JNK的訊息傳遞路徑所活化的AP-1在thrombin誘導COX-2或iNOS蛋白表現所扮演的角色。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. 西方點墨法: 測定COX-2、iNOS、JNK-p、JNK、c-Jun及c-Jun-p等蛋白的變化。
3. 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 iNOS 及 COX-2 的表現

首先我們將NR8383巨噬細胞給予thrombin處理0-48小時，收集其蛋白質分析iNOS的表現。將NR8383巨噬細胞給

予thrombin (10 U/ml)刺激，發現iNOS蛋白表現在8小時就有增加，且在48小時達到最大(Fig. 1)。

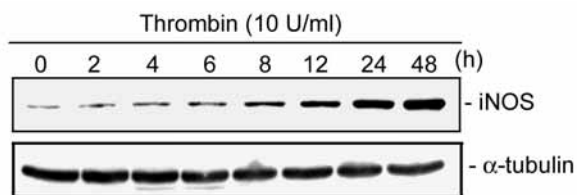


Figure 1

Thrombin 誘導 COX-2 蛋白表現

接下來我們也要觀察另外一個發炎蛋白COX-2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COX-2蛋白表現。Thrombin誘導iNOS蛋白表現在4小時就有增加的情形，且在12小時具有明顯的增加作用，且持續到48小時之久(Fig. 2)。經由以上面結果的確在肺部巨噬細胞中，thrombin可以誘導發炎物質iNOS及COX-2蛋白的表現。

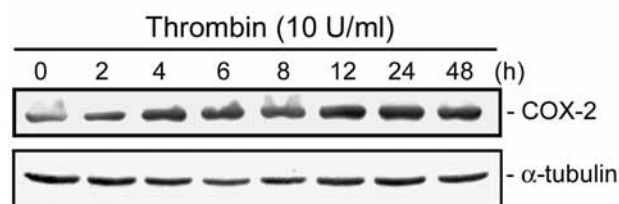


Figure 2

SP600125 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。接下來我們將觀察JNK是否貢獻在thrombin所誘導iNOS蛋白的表現當中。將細胞以SP600125 (JNK抑制劑; 3及10 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SP600125的確可依濃度依賴曲線抑制thrombin誘導iNOS蛋白的表現。SP600125在10 µM明顯抑制thrombin誘導iNOS的表現(Fig. 3)。

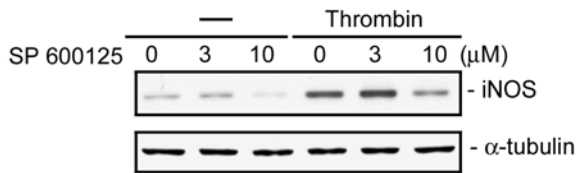


Figure 3

SP600125 抑制 thrombin 引發 COX-2 蛋白的表現

經由前面的實驗證實 SP600125 可抑制 thrombin 刺激 iNOS 蛋白的表現。同樣地我們將來觀察 JNK 是否貢獻在 thrombin 所誘導 COX-2 蛋白的表現中。將細胞以 SP600125 (JNK 抑制劑; 3 及 10 μ M) 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 COX-2 蛋白表現的情形。發現 SP600125 的確可依濃度依賴曲線抑制 thrombin 誘導 iNOS 蛋白的表現。SP600125 在 3 μ M 就有明顯抑制作用，而 SP600125 在 10 μ M 完全抑制 thrombin 誘導 COX-2 蛋白的表現(Fig. 4)。

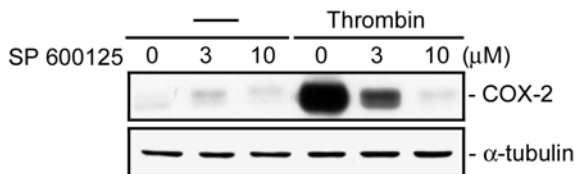


Figure 4

Thrombin 誘導 JNK 的磷酸化

經由以上的實驗發現 JNK 的確貢獻在 thrombin 誘導 iNOS 及 COX-2 蛋白的表現當中。接著我們將進一步探討 JNK 是否會因 thrombin 的刺激而活化。我們將利用利用特異性磷酸化 JNK 的抗體來偵測 JNK 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 JNK 的活性在 10 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. 5)。由此可見，thrombin 的確可以活化 JNK 的訊息傳遞路徑來促使 iNOS 及 COX-2 蛋白的表現。

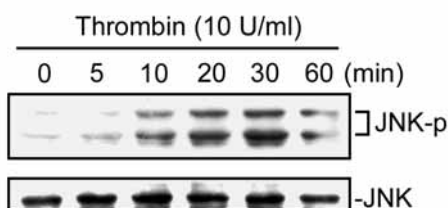


Figure 5

Curcumin 抑制 thrombin 誘導 iNOS 蛋白的表現

之前的研究顯示 AP-1 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 AP-1 的訊息傳遞路徑而來。細胞以 curcumin (AP-1 抑制劑, 0.1-1 μ M) 前處理 30 分鐘，再以 thrombin (10 U/ml) 刺激 24 小時，發現 curcumin 可依濃度反應曲線抑制 thrombin 誘導 iNOS 蛋白的表現(Fig. 6)。顯示 thrombin 可經由 AP-1 的活化來誘導 iNOS 蛋白的表現。

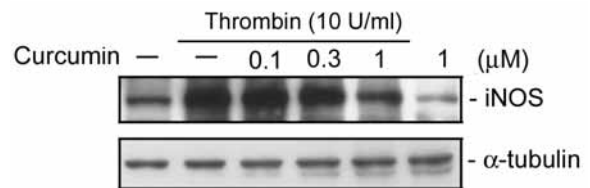


Figure 6

Thrombin 引發 c-Jun 磷酸化

由前面實驗證實了 thrombin 刺激 iNOS 蛋白的表現受到轉錄因子 AP-1 的調控。接下來我們將觀察 thrombin 是否可活化 AP-1 之次單元 c-Jun 的磷酸化。我們將利用利用特異性磷酸化 c-Jun 的抗體來偵測 c-Jun 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 c-Jun 的磷酸化在 20 分鐘時就有增加，且在 60 分鐘達到最大(Fig. 5)。由此可見，thrombin 的確可以活化 c-Jun 使轉錄因子 AP-1 的活化來促使 iNOS2 蛋白的表現。

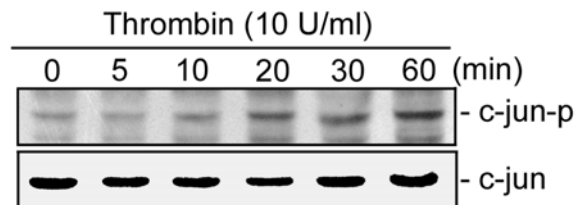


Figure 7

SP600125 抑制 thrombin 引發 c-Jun 的磷酸化

由前面的實驗證實了 thrombin 刺激 iNOS 蛋白的表現受到 JNK 的調控。接下來我們將觀察 thrombin 所活化的 c-jun

是否可被 JNK 抑制劑 SP600125 所抑制。將細胞以 SP600125 (10 μ M) 前處理 30 分鐘，再以 thrombin (10 U/ml) 刺激 60 分鐘後，發現 SP600125 的確可抑制 thrombin 誘導 c-Jun 磷酸化的現象(Fig. 8)。相反地，給予 MEK 抑制劑 PD98059 (30 μ M) 並不會抑制 thrombin 誘導 c-Jun 磷酸化的現象(Fig. 8)。顯示 thrombin 活化 c-Jun 是經由 JNK 的訊息傳遞路徑而來。

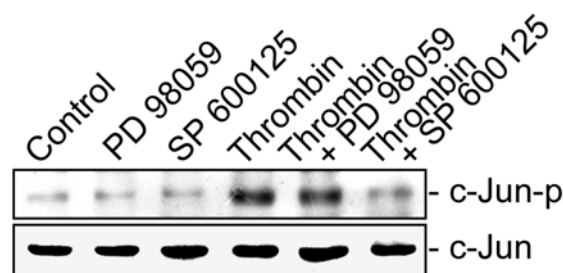


Figure 8

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 JNK 的訊息傳遞路徑及 AP-1 的活化，進一步誘導前發炎物質例如 iNOS 及 COX-2 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 PKC α 及 Rac/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。

五、參考文獻

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.

Bennett, B.L., Sasaki, D.T., Murray, B.W., O'Leary, E.C., Sakata, S.T., Xu, W.,

Leisten, J.C., Motiwala, A., Pierce, S., Satoh, Y., Bhagwat, S.S., Manning, A.M. and Anderson, D.W. (2001) SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 13681-13686.

Blumer, K.J. and Johnson, G.L. (1994) Diversity in function and regulation of MAPK kinase pathways *TIBS*, 19, 236-240.

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.

Deng, T. and Karin, M. (1994) c-Fos transcriptional activity stimulated by H-Ras-activated protein kinase distinct from JNK and ERK. *Nature* 371, 171-175.

Hambleton, J., Weinstein, S. L., Lem, L. and DeFranco, A. L. (1996) Activation of c-Jun N-terminal kinase in bacterial lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 2774-2778.

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.

Hesse, A.K., Dorger, M., Kupatt, C. and Krombach, F. (2004) Proinflammatory role of inducible nitric oxide synthase in acute hyperoxic lung injury. *Respir Res.* 5, 11.

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.

Kaminiska, B., Pyrzynska, B., Ciechomska, I. and Wisniewska, M. (2000) Modulation of the composition of AP-1 complex and its impact on

- transcriptional activity. *Acta Neurobiol. Exp.* 60, 395-402.
- Kang, K.W., Choi, S.Y., Cho, M.K., Lee, C.H. and Kim, S.G. (2003) Thrombin induces nitric-oxide synthase via Galpha12/13-coupled protein kinase C-dependent I- κ B α phosphorylation and JNK-mediated I- κ B α degradation. *J Biol Chem.* 278, 17368-17378.
- Karin, M. (1995) The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* 270, 16483-16486.
- Knowles, R.G. and Moncada, S. (1994) Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J.* 298, 249-258.
- 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- κ B-dependent pathway. *Br. J. Pharmacol.* 134, 543-552.
- Lorsbach, R.B., Murphy, W.J., Lowenstein, C.J., Snyder, S.H. and Russell, S.W. (1993) Expression of the nitric oxide synthase gene in mouse macrophages activated for tumor cell killing. Molecular basis for the synergy between interferon-gamma and lipopolysaccharide. *J Biol Chem.* 268, 1908-1913.
- Lowenstein, C.J., Alley, E.W., Raval, P., Snowman, A.M., Snyder, S.H., Russell, S.W. and Murphy, W.J. (1993) Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90, 9730-9734.
- 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.
- Marinissen, M.J., Servitja, J.M., Offermanns, S., Simon, M.I. and Gutkind, J.S. (2003) Thrombin protease-activated receptor-1 signals through Gq- and G13-initiated MAPK cascades regulating c-Jun expression to induce cell transformation. *J. Biol. Chem.* 278, 46814-46825.
- Mitchell, J.A., Belvisi, M.G., Akaresereenont, P. Robbins, R.A., Kwon, O.J., Croxtall, J., Barnes, P.J. and Vane, J.R. (1994) Induction of cyclo-oxygenase-2 by cytokines in human pulmonary epithelial cells: regulation by dexamethasone. *Br. J. Pharmacol.* 113, 1008-1014.
- Mitchell, J.A., Larkin, S. and Williams, T.J. (1995) Cyclooxygenase-2: regulation and relevance in inflammation. *Biochem. Pharmacol.* 50, 1535-1542.
- Moncada, S., Palmer, R.M. and Higgs, E.A. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 43, 109-142.
- Nishida, E. and Gotoh, Y. (1993) The MAP kinase cascades is essential for diverse signal transduction pathways. *TIBS*, 18, 128-131.
- Rahman, a., Anwar, K.N., True, A.L. and Malik, A.B. (1999) Thrombin-induced p65 homodimer binding to downstream NF- κ B site of the promoter mediates endothelial ICAM-1 expression and neutrophil adhesion. *J. Immunol.* 162, 5466-5476.
- Semal, T., Binetruy, B., Mercola, D., Birrer, M. and Karin, M. (1991) Oncogenic and transcriptional cooperation with Ha-Ras required phosphorylation of c-Jun on serine 63 and 73. *Nature* 354, 494-496.
- Sibille, Y. and Reynolds, 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.

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.