

혈관내피세포에서 트롬빈이 TNF- α 에 의해 유도되는 IL-6에 미치는 영향

배종섭 · 박문기*

대구한의대학교 한방산업대학 한방제약공학과

Effect of Thrombin on the TNF- α Induced IL-6 Production in HUVECs

Jong-Sup Bae and Moon-Ki Park*

Department of Herbal Pharmaceutical Engineering, College of Herbal Bio-Industry, Daegu Haany University, 290 Yugok-dong, Gyeongsan-si, Gyeongbuk 712-715, Korea

Abstract Here, we evaluated the effect of thrombin on the interleukin-6 production induced by tumor-necrosis-factor- α in endothelial cells. It is well known that tumor-necrosis-factor- α mediates inflammatory responses by activation of nuclear factor-kappa-B in endothelial cells. Here, we showed that lower concentration of thrombin decreased the production of interleukin-6 induced by tumor-necrosis-factor- α and this inhibitory effect of thrombin on interleukin-6 production was mediated by interacting with protease-activated-receptor-1. In addition, phosphoinositide-3-kinase was also involved the anti-inflammatory responses by lower concentration of thrombin in endothelial cells. These results suggested that lower concentration of thrombin mediated anti-inflammatory responses by interacting with protease-activated-receptor-1 on the cell membrane and phosphoinositide-3-kinase in the cell. These findings will provide the important evidence in the development of new medicine for the treatment of severe sepsis and inflammatory diseases and good clue for understanding unknown mechanisms by which thrombin showed the pro-inflammatory or anti-inflammatory activities in endothelial cells.

Keywords: thrombin, TNF- α , HUVEC, inflammation, PAR-1

서 론

트롬빈은 혈액응고과정에서 가장 중요한 단계 즉, 피브리노젠을 피브린으로 전환시켜 피딩을 만들 뿐만 아니라, 여러 가지 생물학적 조절기능 (염증, 알레르기, 종양의 성장, 전이, 세포자멸사) 등에 관여한다 [1-7]. 트롬빈은 염증반응에서 보여주는 영향은 주로 백혈구세포, 혈소판과 혈관내피세포를 조절하는 능력에 의존한다 [5, 7-9]. 그리고 트롬빈은 G protein-coupled receptors (GPCR) 중의 하나인 protease-activated receptors (PARs)로 알려진 수용체와의 상호작용을 통해 각종 세포작용을 조절한다

[10-11]. 현재까지 4가지 종류의 PAR (PAR-1, -2, -3 그리고 -4)이 밝혀졌는데, PAR 수용체의 N말단에 프로테아제에 의해 잘려지는 부위가 각각 밝혀졌다 [10-12]. PAR-1, PAR-3 그리고 PAR-4는 트롬빈, 카셉신 G 그리고 트립신에 대한 수용체인 반면 [13-16], PAR-2는 트립신, 트립테이즈, 아크로신 그리고 혈액응고인자 중 Xa와 VIIa에 대한 수용체이지만 트롬빈에 대해서는 반응을 하지 않는다 [17-21]. PAR-1이 트롬빈의 수용체인 것이 밝혀진 후 [15, 22], PAR-1 수용체를 통한 트롬빈에 의한 여러 세포작용 예를 들어, 혈관내피세포로 백혈구의 부착, 혈관조절작용, 혈소판응집, 혈관신생작용 그리고 내피세포막에 대한 작용 등이 밝혀졌다 [23-30].

트롬빈이 PAR-1의 N말단부위에 결합하면 PAR-1의 41번 아미노산 잔기 (Arg)과 42번 아미노산 잔기 (Ser) 사이의 펩타이드 결합을 트롬빈이 자름으로써 PAR-1은 활성화가

*Corresponding author

Tel: +82-53-819-1420, Fax: +82-53-819-1272

e-mail: moonki@dhu.ac.kr

된다 [11-12]. 이와 같은 효소학적반응은 PAR-1의 6개의 loop 중 2번째 loop (아미노산 잔기 248번~268번)와 상호 작용하는 tethered ligand로 알려진 새로운 부위를 노출시킨다 [11-12]. PAR-1은 여러 조직과 세포 예를 들어, 단백질, 섬유모세포, 혈소판, 치아속질세포, 평활근세포, 뉴런 그리고 몇몇의 종양세포에서 발견이 되고 있다 [15, 31-36]. 뿐만 아니라, 최근의 연구결과는 생리학적이고 병리학적으로 PAR-1이 혈관조절기능이 있다는 것을 보여주었다 [2-3]. 정상적인 인체의 동맥에서, PAR-1은 혈관내피세포에 한정되어 있지만, 동맥경화증에서는 염증반응이 일어나는 곳에서 PAR-1의 발현이 증가되었다 [37].

TNF- α 는 염증반응을 일으키는 사이토카인인데, 주로 활성화된 대식세포에서 생성이 되며, 백혈구, 내피세포 그리고 비만세포에서도 생성이 된다 [38-39]. 특히, TNF- α 는 내피세포에서 NF- κ B (Nuclear Factor Kappa B)의 활성화를 통해 염증반응을 일으킨다는 것은 잘 알려진 사실인데, TNF- α 는 염증반응을 동반하는 여러 가지 병변 예를 들어, 류마티스 관절염, 건선, 크론병 그리고 폐렴에서 높은 수치로 발견이 된다 [38, 40-42]. TNF- α 는 TNF- α 수용체인 TNFR (TNF Receptor)의존적인 신호전달기전을 통해 전사인자인 NF- κ B를 활성화시킨다 [38-39, 43-45].

최근의 몇몇 연구에서 트롬빈이 PAR-1의 활성화를 통해 염증반응을 일으킨다고 보고되었는데, 특히 트롬빈은 HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)세포에서 염증을 유발하는 유전자인 IL (Interleukin), 성장인자인 EGF (EGF-like Growth Factor)와 PDGF (Platelet Derived Growth Factor), 세포부착단백질 (CAM, Cell Adhesion Molecules)중 E-selectin, P-selectin, intracellular adhesion molecule-1 (ICMA-1) 그리고 vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)의 발현을 증가시킨다 [8, 46-49]. 트롬빈은 염증반응을 일으킬 뿐만 아니라, 혈관내피세포에 대한 백혈구의 부착 및 이동을 촉진함으로써 면역반응을 일으킨다 [50]. 그러나 이와 같은 트롬빈의 염증유발반응은 모두 최소 1 nM이상의 트롬빈이 매개하는 반응이다. 최근에 우리는 HUVEC 세포에서 저농도 (25 pM ~ 50 pM)이 항염증반응을 유발시킨다는 것을 보고하였는데, 여기에는 혈관내피세포막의 보호, 혈관내피세포막에 대한 백혈구의 부착 및 이동 저해, 그리고 세포부착단백질의 발현저해 등이 포함된다 [51]. 따라서 이 논문에서는 저농도의 트롬빈이 과연 TNF- α 가 매개하는 IL-6 유전자의 발현에 어떤 영향을 미치는지를 연구하였다. 그 결과, TNF- α 는 HUVEC 세포에서 NF- κ B의 활성화를 통하여 IL-6 유전자의 발현을 매개하였고, 저농도의 트롬빈을 전 처리하면 TNF- α 가 매개하는 IL-6 유전자의 발현이 저해되는 것을 보여주었다. 뿐만 아니라, 이와 같은 저농도 트롬빈이 매개하는 항염증효과반응에는 세포내부에 있는 PI3-Kinase가 관여하는 것도 밝혔다. 그래서 TNF- α 에 의해 유도되는 염증반응에서 저농도의 트롬빈이 보여주는 항염증효과를 통해, 염증으로 유발되는 각종 질환을

치료하는 치료후보물질로서 저농도의 트롬빈의 그 효과가 있을 것으로 기대된다.

재료 및 방법

실험재료

TNF- α 는 R&D System (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하여 사용하였다. 트롬빈과 PI3-kinase의 저해제인 LY-294002는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. NF- κ B 저해제인 CAPE는 Calbiochem (San Diego, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. PAR-1을 기능적으로 저해하는 항체인 Blocking PAR-1 (B-PAR-1)과 대조군으로써 아무 기능이 없는 Non-Blocking PAR-1 (NB-PAR-1) 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

세포배양

혈관으로부터 직접 분리한 내피세포인 HUVECs는 Cambrex Bio Science Inc. (Charles City, IA, USA)에서 구입하여 사용하였고 배양 방법은 이전에 연구한 방법대로 배양하였다 [51-52]. HUVEC는 계대배양을 하였고, passage number는 3번에서 5번사이의 세포를 사용하였다.

IL-6 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

실험조건에 맞게 처리한 후, 세포배양액을 따로 모은 후, -80°C에 보관한다. 세포로부터 분리된 IL-6의 양을 측정하기 위해, ELISA 키트를 DuoSet ELISA Development System (R&D System, Minneapolis, USA)로부터 구입하였고, 실험 방법은 제조사의 guideline에 따라 진행하였다. 간단히 기술하면, IL-6에 특이적인 항체로 코팅된 96-well plate를 0.05% Tween-20이 포함된 PBS로 washing하고 재조합된 IL-6를 희석하여 standard로 사용하였다. 희석액은 10 ng/mL로 시작하여 standard curve를 그렸다. 샘플을 37°C에서 2시간 동안 배양한 후 well을 다시 세척하고 각각에 제조사로부터 제공되는 항체를 넣고 20분간 배양하였다. 다시 well을 세척하고 기질용액 (NeA-Blue Tetramethylbenzidine Substrate, Nalgene에서 구입함)를 넣은 후, ELISA reader를 사용하여 450 nm에서 분석하였다.

통계처리

각 실험은 최소 3번 이상 검정하였고, 실험 결과는 평균 \pm 표준오차로 표시하였고 non-paired Student's t test로 검정하여 P값이 5% 미만일 때 통계적으로 유의하다고 간주하였다.

결과 및 고찰

혈관내피세포에서 NF- κ B의 활성화가 TNF- α 에 의해 유도되는 IL-6 양에 미치는 영향

TNF- α 가 HUVEC세포에서 분비되는 IL-6의 양에 미치는 영향을 확인하기 위하여 TNF- α 를 HUVEC세포에 처리하였다. 그 결과, TNF- α (2, 5, 10 그리고 20 ng/mL)는 HUVEC 세포에서 분비되는 IL-6의 양을 농도 의존적으로 증가시켰다 (Fig. 1(a)). TNF- α 는 내피세포에서 NF- κ B를 활성화시킨다는 이미 잘 알려진 사실이다 [38, 40-42]. 그래서 NF- κ B가 TNF- α 에 의해 HUVEC에서 분비되는 IL-6에 미치는 영향을 확인하기 위하여, NF- κ B의 저해제로 알려져 있는 CAPE (caffaic acid phenethyl ester, 25 ug/mL)를 처리하고 TNF- α 를 처리하였다. 그 결과, CAPE는 TNF- α 에 의해 유도되는 IL-6의 양을 65% 감소시켰다 (Fig. 1(b)).

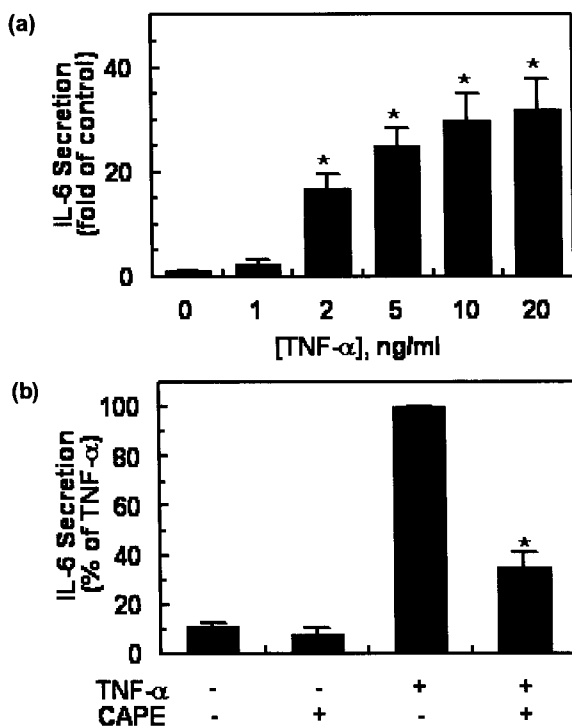


Fig 1. NF- κ B pathway activation is essential for TNF- α induced IL-6 production in HUVECs. (a) Concentration dependent increase of IL-6 secretion by HUVECs induced by TNF- α . HUVECs were incubated with indicated concentration of TNF- α for 8 h. The amounts of IL-6 were determined by ELISA described as "Materials and Methods". Data were normalized to those in the absence of TNF- α (control) and expressed as mean \pm SEM (n = 3). * < 0.05 when compared with control level. (b) Effects of NF- κ B inhibitor (CAPE) on TNF- α induced IL-6 secretion by HUVECs. Cells were incubation with 25 ug/mL of CAPE for 1 h prior to incubation with TNF- α . Data were normalized to the levels of TNF- α at 10 ng/mL and expressed as mean \pm SEM (n = 3). * < 0.05 when compared with TNF- α alone.

CAPE를 단독으로 처리하였을 때 IL-6의 분비량은 아무 변화가 없었다. 이것은 TNF- α 가 NF- κ B의 활성화를 통해 HUVEC세포에서 유도되는 IL-6를 조절한다는 것을 의미한다.

저농도 트롬빈이 HUVEC에서 TNF- α 가 매개하는 IL-6에 미치는 영향

우리는 최근에 저농도 트롬빈이 HUVECs와 HPAECs (Human Pulmonary Aortic Endothelial Cells)에서 항염증 효과가 있다는 것을 밝혔다 [51]. 여기에는 내피세포막의 투과성을 보호하고, 백혈구가 혈관내피세포에 부착하고 이동하는 것을 저해하는 것을 포함한다 [51]. 이것은 백혈구가 혈관내피세포에 부착하고 이동하는데 있어 중요한 세포부착 단백질 (CAM, cell adhesion molecule) 예를 들어, VCAM (Vascular Cell Adhesion Molecule), ICAM (Intercellular Cell Adhesion Molecule) 그리고 E-Selectin의 발현을 저농도의 트롬빈이 저해하는 기전으로 그 항염증효과를 보여준다 [50-52]. TNF- α 역시 NF- κ B의 활성화를 통해 염증효과를 매개한다는 것은 이미 잘 알려진 사실이다 [38, 40-42]. 그래서 우리는 저농도의 트롬빈이 HUVEC세포에서 TNF- α 에 의해 유도되는 IL-6에 어떤 영향이 있는지를 확인하였다. 그 결과, 25 pM 그리고 50 pM의 트롬빈은 TNF- α 에 의해 유도되는 IL-6를 저해하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2). 이것은 이전에 보고된 결과와 일치하는데, HUVEC세포에서 25 pM~50 pM 범위의 트롬빈이 보여주는 항염증효과와 일치한다 [51]. 따라서 HUVEC세포에서 25 pM~50 pM 범위의 트롬빈은 이전에 보고된 그 항염증효과와 더불어 염증을 매개하는 유전자인 IL-6의 발현을 저해함으로써 저농도의 트롬빈이 가지는 항염증효과는 재확인 되었다고 볼 수 있다.

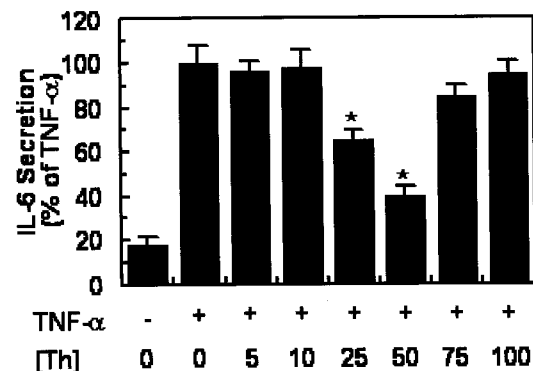


Fig 2. Effects of thrombin on TNF- α induced IL-6 upregulation. Concentration dependent effect of thrombin on TNF- α induced IL-6 secretion. HUVECs were preincubated with concentration of thrombin for 3 h followed by incubation with 10 ng/mL TNF- α for 8 h. The amounts of IL-6 were determined by ELISA described as "Materials and Methods". Data were normalized to the levels of TNF- α at 10 ng/mL and expressed as mean \pm SEM (n = 3). * < 0.05 when compared with TNF- α alone.

PAR-1이 저농도 트롬빈에 의한 IL-6 발현 억제에 미치는 영향

그동안 PAR-1 (Protease Activated Receptor-1)은 트롬빈이 HUVEC세포에서 미치는 영향에 있어서 트롬빈의 수용체로써 작용한다고 알려져 있다 [11-12]. 특히, 저농도 트롬빈이 보여주는 항염증효과에 있어서도 트롬빈은 항상 PAR-1을 통해서 그 효과를 보여주었다 [51]. 즉, PAR-1의 기능을 없애는 항체를 먼저 처리하였을 때, 저농도 트롬빈은 더 이상 항염증효과를 보여주지 못하였다 [51]. 따라서 우리는 저농도 트롬빈에 의한 IL-6 발현 억제에 있어서 PAR-1이 어떤 영향을 미치는지 확인하기 위하여 HUVEC 세포에 TNF- α 를 처리하기 전에 PAR-1의 활성을 저해하는 항체 처리하였다. 그 결과, PAR-1의 기능을 효과적으로 저해하는 항체 (B) PAR-1을 전 처리하였을 경우, 50 pM 트롬빈이 매개하는 IL-6 발현 억제는 보여주지 못하였다 (Fig. 3). 하지만, PAR-1의 기능을 효과적으로 저해하지 못하는 항체 (NB) PAR-1은 아무런 효과가 없었다. 이것은 저농도 트롬빈이 가지는 IL-6 발현 억제는 특이적으로 PAR-1을 통해 매개한다는 것을 의미한다. 따라서 이 결과는 이전에 보고된 저농도 트롬빈이 매개하는 항염증효과 즉, 내피세포막의 보호작용, 백혈구가 내피세포막에 부착하고 이동하는 것을 저해하는 작용 그리고 세포부착단백질의 발현을 억제하는 작용뿐만 아니라, TNF- α 에 의해 유도되는 IL-6의 발현을 억제하는 작용에도 PAR-1이 관여되어 있다는 것을 시사한다.

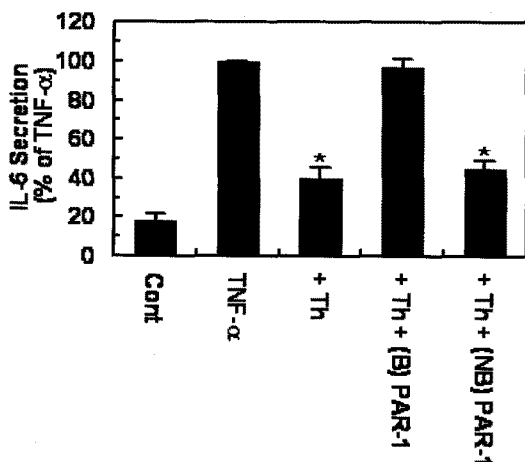


Fig 3. Effects of PAR-1 on low concentration thrombin mediated inhibition of IL-6 production induced by TNF- α in HUVECs. Cleavage blocking (B) and non-blocking (NB) monoclonal anti-PAR-1 antibodies (at 25 μ g/mL) were preincubated on HUVECs for 30 minutes followed by incubation of thrombin at 50 pM for 3 h. Then, HUVECs were incubated with TNF- α for 8 h. The amounts of IL-6 were determined by ELISA described as "Materials and Methods". Data were normalized to the levels of TNF- α at 10 ng/mL and expressed as mean \pm SEM (n = 3). * < 0.05 when compared with TNF- α alone.

PI3-Kinase가 저농도 트롬빈에 의한 IL-6 발현 억제에 미치는 영향

우리는 PI3-Kinase (Phosphoinositide 3-kinase)은 HUVEC 세포에서 저농도 트롬빈이 가지는 항염증효과에 관련되어 있다고 최근에 보고하였다 [51]. 따라서 우리는 저농도 트롬빈에 의한 IL-6 발현 억제에 있어서 PI3-Kinase가 어떤 영향을 미치는지 확인하기 위하여 HUVEC세포에 TNF- α 를 처리하기 전에 PI3-Kinase의 저해제 (LY-294002)를 처리하였다. 그 결과, PI3-Kinase의 기능을 효과적으로 저해하는 LY-294002를 전 처리하였을 경우, 50 pM 트롬빈이 매개하는 IL-6 발현 억제는 보여주지 못하였다 (Fig. 4). 이것은 저농도 트롬빈이 가지는 IL-6 발현 억제는 특이적으로 PI3-Kinase를 통해 매개한다는 것을 의미한다.

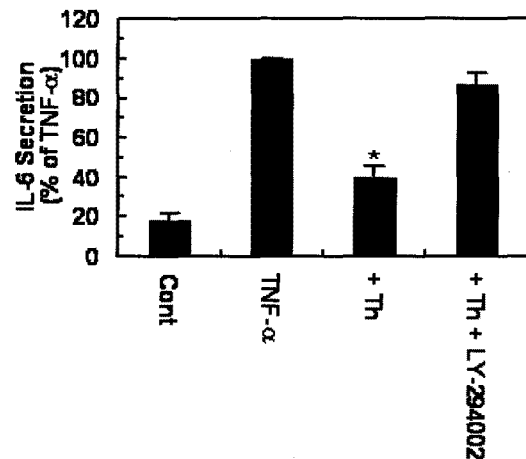


Fig 4. Effects of PI3-Kinase inhibitor on low concentration thrombin mediated inhibition of IL-6 production induced by TNF- α in HUVEC. PI3-Kinase inhibitor (LY-294002, used at 10 μ M) was preincubated on HUVECs for 1 h followed by incubation of thrombin at 50 pM for 3 h. Then, HUVECs were incubated with TNF- α for 8 h. The amounts of IL-6 were determined by ELISA described as "Materials and Methods". Data were normalized to the levels of TNF- α at 10 ng/mL and expressed as mean \pm SEM (n = 3). * < 0.05 when compared with TNF- α alone.

따라서 본 연구는 저농도 (25~50 pM) 트롬빈은 그것의 수용체인 PAR-1을 통해서 세포내부의 PI3-kinase를 활성화 시켜 TNF- α 에 의한 IL-6의 발현을 억제한다는 것을 보여준다. 그래서 TNF- α 에 의해 유도되는 염증반응에서 저농도의 트롬빈이 보여주는 항염증효과를 통해, 염증으로 유발되는 각종 질환을 치료하는 치료후보물질로서 저농도의 트롬빈의 그 효과가 있을 것으로 기대된다.

요약

본 논문에서는 혈관내피세포에서 저농도의 트롬빈이

TNF- α 가 NF- κ B의 활성화를 통해 생성되는 IL-6의 생성량에 미치는 영향을 관찰하였다. TNF- α 는 혈관내피세포에서 NF- κ B의 활성화를 통해 염증을 유발시킨다는 것은 잘 알려진 사실이다. 이 논문에서는 TNF- α 가 매개하는 염증작용에서 저농도의 트롬빈은 TNF- α 가 생성시키는 IL-6의 생성량을 감소시켰고, 여기에는 트롬빈의 수용체인 PAR-1이 작용한다는 것을 확인하였다. 뿐만 아니라, 세포내의 PI3-Kinase 역시 저농도 트롬빈이 관여한다는 것을 확인하였다. 이것은 저농도의 트롬빈이 수용체인 PAR-1을 활성화시키고, 활성화된 PAR-1은 PI3-Kinase의 활성화를 통해 항염증작용을 보여준다는 것을 의미한다. 이 결과는 향후 중증 패혈증 및 각종 염증질환을 치료할 수 있는 신약개발에 있어 중요한 단서를 제공하고 혈관내피세포에서 아직 명확하게 밝혀지지 않은 트롬빈의 염증작용 및 항염증작용의 기전을 밝히는데 좋은 정보를 제공할 것이다.

감 사

이 논문은 2009년도 대구한의대학교 기린연구비 지원에 의한 것임.

접수 : 2009년 10월 17일, 게재승인 : 2009년 11월 3일

REFERENCES

1. Cirino, G., C. Napoli, M. Bucci, and C. Cicala (2000) Inflammation-coagulation network: Are serine protease receptors the knot?. *Trends Pharmacol. Sci.* 21: 170-2.
2. Coughlin, S. R. (2000) Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* 407: 258-64.
3. Coughlin, S. R. (2001) Protease-activated receptors in vascular biology. *Thromb. Haemost* 86: 298-307.
4. Grand, R. J., A. S. Turnell, and P. W. Grabham (1996) Cellular consequences of thrombin-receptor activation. *Biochem. J.* 313: 353-368.
5. Klepfish, A., M. A. Greco, and S. Karpatkin (1993) Thrombin stimulates melanoma tumor-cell binding to endothelial cells and subendothelial matrix. *Int. J. Cancer.* 53: 978-982.
6. Macfarlane, S. R., M. J. Seatter, T. Kanke, G. D. Hunter, and R. Plevin (2001) Proteinase-activated receptors. *Pharmacol. Rev.* 53: 245-282.
7. Nierodzik, M. L., F. Kajumo, and S. Karpatkin (1992) Effect of thrombin treatment of tumor cells on adhesion of tumor cells to platelets in vitro and tumor metastasis in vivo. *Cancer Res.* 52: 3267-72.
8. Kaplanski, G., V. Marin, M. Fabrigoule, V. Boulay, A. M. Benoliel, P. Bongrand, S. Kaplanski, and C. Farnarier (1998) Thrombin-activated human endothelial cells support monocyte adhesion in vitro following expression of intercellular adhesion molecule-1 (Icam-1; Cd54) and vascular cell adhesion molecule-1 (Vcam-1; Cd106). *Blood* 92: 1259-67.
9. Nierodzik, M. L., A. Plotkin, F. Kajumo, and S. Karpatkin (1991) Thrombin stimulates tumor-platelet adhesion in vitro and metastasis in vivo. *J. Clin. Invest.* 87: 229-236.
10. Coughlin, S. R. (2005) Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J. Thromb Haemost* 3: 1800-1814.
11. Ossovskaya, V. S., and N. W. Bunnett (2004) Protease-activated receptors: Contribution to physiology and disease. *Physiol. Rev.* 84: 579-621.
12. Steinhoff, M., J. Buddenkotte, V. Shpacovitch, A. Rattenholl, C. Moormann, N. Vergnolle, T. A. Luger, and M. D. Hollenberg (2005) Proteinase-activated receptors: Transducers of proteinase-mediated signaling in inflammation and immune response. *Endocr. Rev.* 26: 1-43.
13. Ishihara, H., A. J. Connolly, D. Zeng, M. L. Kahn, Y. W. Zheng, C. Timmons, T. Tram, and S. R. Coughlin (1997), Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. *Nature* 386: 502-6.
14. Kahn, M. L., Y. W. Zheng, W. Huang, V. Bigornia, D. Zeng, S. Moff, R. V. Farese, Jr., C. Tam, and S. R. Coughlin (1998) A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature* 394: 690-4.
15. Vu, T. K., D. T. Hung, V. I. Wheaton, and S. R. Coughlin (1991) Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* 64: 1057-68.
16. Xu, W. F., H. Andersen, T. E. Whitmore, S. R. Presnell, D. P. Yee, A. Ching, T. Gilbert, E. W. Davie, and D. C. Foster (1998) Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 95: 6642-6.
17. Camerer, E., W. Huang, and S. R. Coughlin (2000) Tissue factor- and factor x-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor viia. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 97: 5255-5260.
18. Molino, M., E. S. Barnathan, R. Numerof, J. Clark, M. Dreyer, A. Cumashi, J. A. Hoxie, N. Schechter, M. Woolkalis, and L. F. Brass (1997) Interactions of mast cell tryptase with thrombin receptors and par-2. *J. Biol. Chem.* 272: 4043-4049.
19. Nystedt, S., K. Emilsson, A. K. Larsson, B. Strombeck, and J. Sundelin (1995) Molecular cloning and functional expression of the gene encoding the human proteinase-activated receptor 2. *Eur. J. Biochem.* 232: 84-89.
20. Smith, R., A. Jenkins, A. Loubakos, P. Thompson, V. Ramakrishnan, J. Tomlinson, U. Deshpande, D. A.

- Johnson, R. Jones, E. J. Mackie, and R. N. Pike (2000) Evidence for the activation of par-2 by the sperm protease, Acrosin: Expression of the receptor on oocytes. *FEBS Lett.* 484: 285-290.
21. Steinhoff, M., C. U. Corvera, M. S. Thoma, W. Kong, B. E. McAlpine, G. H. Caughey, J. C. Ansel, and N. W. Bunnett (1999) Proteinase-activated receptor-2 in human skin: Tissue distribution and activation of keratinocytes by mast cell tryptase. *Exp. Dermatol.* 8: 282-294.
 22. Rasmussen, U. B., V. Vouret-Craviari, S. Jallat, Y. Schlesinger, G. Pages, A. Pavirani, J. P. Lecocq, J. Pouyssegur, and E. Van Obberghen-Schilling (1991) Cdna cloning and expression of a hamster alpha-thrombin receptor coupled to Ca²⁺ mobilization. *FEBS Lett.* 288: 123-128.
 23. Chin, A. C., N. Vergnolle, W. K. MacNaughton, J. L. Wallace, M. D. Hollenberg, and A. G. Buret (2003) Proteinase-activated receptor 1 activation induces epithelial apoptosis and increases intestinal permeability. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 100: 11104-11109.
 24. Cunningham, M. A., E. Rondeau, X. Chen, S. R. Coughlin, S. R. Holdsworth, and P. G. Tipping (2000) Protease-activated receptor 1 mediates thrombin-dependent, cell-mediated renal inflammation in crescentic glomerulonephritis. *J. Exp. Med.* 191: 455-462.
 25. Ludwicka-Bradley, A., E. Tourkina, S. Suzuki, E. Tyson, M. Bonner, J. W. Fenton, 2nd, S. Hoffman, and R. M. Silver (2000) Thrombin upregulates interleukin-8 in lung fibroblasts via cleavage of proteolytically activated receptor-i and protein kinase c-gamma activation. *Am. J. Respi. Cell Mol. Biol.* 22: 235-243.
 26. Naldini, A. and D. H. Carney (1996) Thrombin modulation of natural killer activity in human peripheral lymphocytes. *Cell Immunol.* 172: 35-42.
 27. Sambrano, G. R., E. J. Weiss, Y. W. Zheng, W. Huang, and S. R. Coughlin (2001) Role of thrombin signalling in platelets in haemostasis and thrombosis. *Nature* 413: 74-78.
 28. Sugama, Y., C. Tiruppathi, K. offakidevi, T. T. Andersen, J. W. Fenton, 2nd, and A. B. Malik (1992) Thrombin-induced expression of endothelial p-selectin and intercellular adhesion molecule-1: A mechanism for stabilizing neutrophil adhesion. *J. Cell Biol.* 119: 935-944.
 29. Suk, K. and S. Cha (1999) Thrombin-induced interleukin-8 production and its regulation by interferon-gamma and prostaglandin E2 in human monocytic U937 Cells. *Immunol. Lett.* 67: 223-237.
 30. Vergnolle, N., M. D. Hollenberg, and J. L. Wallace (1999) Pro- and anti-inflammatory actions of thrombin: A distinct role for proteinase-activated receptor-1 (Par1). *Br. J. Pharmacol.* 126: 1262-1268.
 31. Arena, C. S., S. M. Quirk, Y. Q. Zhang, and K. P. Henrikson (1996) Rat uterine stromal cells: Thrombin receptor and growth stimulation by thrombin. *Endocrinology* 137: 3744-3749.
 32. Chang, M. C., C. P. Lin, T. F. Huang, W. H. Lan, Y. L. Lin, C. C. Hsieh, and J. H. Jeng (1998) Thrombin-induced DNA synthesis of cultured human dental pulp cells is dependent on its proteolytic activity and modulated by prostaglandin E2. *J. Endod.* 24: 709-713.
 33. Colotta, F., F. L. Sciacca, M. Sironi, W. Luini, M. J. Rabet, and A. Mantovani (1994) Expression of monocyte chemotactic protein-1 by monocytes and endothelial cells exposed to thrombin. *Am. J. Pathol.* 144: 975-985.
 34. Grandaliano, G., A. J. Valente, and H. E. Abboud (1994) A novel biologic activity of thrombin: Stimulation of monocyte chemotactic protein production. *J. Exp. Med.* 179: 1737-1741.
 35. Howells, G. L., M. Macey, M. A. Curtis, and S. R. Stone (1993) Peripheral blood lymphocytes express the platelet-type thrombin receptor. *Br. J. Haematol.* 84: 156-1560.
 36. Weinstein, J. R., S. J. Gold, D. D. Cunningham, and C. M. Gall (1995) Cellular localization of thrombin receptor mrna in rat brain: Expression by mesencephalic dopaminergic neurons and codistribution with prothrombin mrna. *J. Neurosci.* 15: 2906-2919.
 37. Nelken, N. A., S. J. Soifer, J. O'Keefe, T. K. Vu, I. F. Charo, and S. R. Coughlin (1992) Thrombin receptor expression in normal and atherosclerotic human arteries. *J. ClinInvest* 90: 1614-1621.
 38. Bradley, J. R. (2008) Tnf-Mediated Inflammatory Disease, *J. Pathol.* 214: 149-160.
 39. Rahman, M. M., and G. McFadden (2006) Modulation of tumor necrosis factor by microbial pathogens. *PLoS Pathog.* 2: e4.
 40. Kim, H., J. S. Hwang, C. H. Woo, E. Y. Kim, T. H. Kim, K. J. Cho, J. H. Kim, J. M. Seo, and S. S. Lee (2008) Tnf-alpha-induced up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 is regulated by a rac-ros-dependent cascade in human airway epithelial cells. *Exp. Mol. Med.* 40: 167-175.
 41. Muppidi, J. R., J. Tschopp, and R. M. Siegel (2004) Life and death decisions: Secondary complexes and lipid rafts in tnf receptor family signal transduction. *Immunity* 21: 461-465.
 42. Palladino, M. A., F. R. Bahjat, E. A. Theodorakis, and L. L. Moldawer (2003) Anti-tnf-alpha therapies: The next generation. *Nat. Re. vDrug. Discov.* 2: 736-746.
 43. Karin, M. and F. R. Greten (2005) Nf-kappab: Linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat. Rev. Immunol.* 5: 749-759.

44. Lin, H. Y., S. H. Juan, S. C. Shen, F. L. Hsu, and Y. C. Chen (2003) Inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by flavonoids in Raw264.7 macrophages involves heme oxygenase-1. *Biochem. Pharmacol.* 66: 1821-1832.
45. Zhang, G. (2004) Tumor necrosis factor family ligand-receptor binding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14: 154-160.
46. Drake, W. T., N. N. Lopes, J. W. Fenton, 2nd, A. C. Issekutz, A. Ueno, K. Murakami, K. Yamanouchi, M. Watanabe, and T. Kondo (1992) Thrombin enhancement of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha induced polymorphonuclear leukocyte migration. *Lab. Invest.* 67: 617-627.
47. Garcia, J. G., C. Patterson, C. Bahler, J. Aschner, C. M. Hart, and D. English (1993) Thrombin receptor activating peptides induce Ca²⁺ mobilization, barrier dysfunction, prostaglandin synthesis, and platelet-derived growth factor mRNA expression in cultured endothelium. *J. Cell Physiol.* 156: 541-549.
48. Kayanoki, Y., S. Higashiyama, K. Suzuki, M. Asahi, S. Kawata, Y. Matsuzawa, and N. Taniguchi (1999) The requirement of both intracellular reactive oxygen species and intracellular calcium elevation for the induction of heparin-binding egf-like growth factor in vascular endothelial cells and smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 259: 50-55.
49. Ueno, A., K. Murakami, K. Yamanouchi, M. Watanabe, and T. Kondo (1996) Thrombin stimulates production of interleukin-8 in human umbilical vein endothelial cells. *Immunology* 88: 76-81.
50. Bae, J. S., L. Yang, C. Manithody, and A. R. Rezaie (2007) Engineering a disulfide bond to stabilize the calcium-binding loop of activated protein C eliminates its anticoagulant but not its protective signaling properties. *J. Biol. Chem.* 282: 9251-9259.
51. Bae, J. S., Y. U. Kim, M. K. Park, and A. R. Rezaie (2009) Concentration dependent dual effect of thrombin in endothelial cells via par-1 and pi3 kinase. *J. Cell Physiol.* 219: 744-751.
52. Bae, J. S., L. Yang, C. Manithody, and A. R. Rezaie (2007) The ligand occupancy of endothelial protein C receptor switches the protease-activated receptor 1-dependent signaling specificity of thrombin from a permeability-enhancing to a barrier-protective response in endothelial cells. *Blood* 110: 3909-3916.