

Proteinase 활성수용체-2로 유발된 백서족척 부종에 미치는 위릉채의 항염효과

임종필* · 이홍규 · 전 훈 · 임보라¹

우석대학교 약학대학, 1: 펜실베이니아 의과대학

Anti-inflammatory Effect of *Potentillae Chinensis* Herba Water Extract on the Proteinase-activated Receptor2-mediated Paw Edema

Jong Pil Lim*, Hong Kyu Lee, Hoon Jeon, Bora Lim¹

College of Pharmacy, Woosuk University, 1: Department of Experimental Therapeutics, School of Medicine, University of Pennsylvania

Potentilla chinensis Ser. (Rosaceae) has long been used for a remedy of diarrhea and inflammation in Korea. In this study, the anti-inflammatory effects of the *Potentillae chinensis* Herba water extract (PCX) was investigated in proteinase-activated receptor-2 (PAR2)-mediated rat paw edema. Paw edema was induced by injection of trypsin or *trans*-cinnamoyl-LIGRLO-NH₂ (*tc*-NH₂) into the hind paw of rats. PCX (10, 50, 100 and 200 mg/kg) was orally administered 1 h before the induction of inflammation. At doses of 50, 100 and 200 mg/kg, PCX showed significant inhibition on both change in paw volume and vascular permeability. PCX (100 mg/kg) significantly inhibited PAR2 agonists-induced myeloperoxidase (MPO) activity in paw tissue. These results indicate that PCX has an anti-inflammatory action in PAR2-mediated paw edema.

Key words : *potentilla chinensis*, anti-inflammatory, trypsin, *tc*-NH₂, paw edema

서 론

최근 어떤 蛋白分解酵素들은 炎症細胞에 나타나는 프로테이나제 活性受容體 (proteinase-activated receptor : PAR)에서 N-말단의 특이적 인식부위를 절단하여 활성화형으로 변화시킨다고 보고되었으며, 현재까지 PAR1, PAR2, PAR3 및 PAR4 등 4가지가 cloning되었다¹⁻⁶. 이 중에서 proteinase 활성수용체인 PAR1, PAR3 및 PAR4가 thrombin에 의하여 활성화될 수 있다는 보고가 있었다⁷. 그리고 PAR2 및 PAR4는 trypsin에 의하여 활성화될 수 있으며 mast cell tryptase 도 PAR2를 활성화시킨다고 하였다^{8,9}. 또한 trypsin, mast cell tryptase 또는 합성 peptide인 SLGRL-NH₂는 PAR2를 활성화시켜서 광범위한 염증을 일으킨다고 하였다¹⁰. PAR2가 염증과정에 중요한 역할을 하는데 氣道 上皮細胞, 纖維芽細胞, 單核細胞, 血管平滑筋 및 內皮細胞 등 대부분의 염증세포들에서 나타나며, 이는 血管 透過성의 증가,

neutrophil의 침투 및 proinflammatory cytokines의 분비에 의한 것이라고 하였다^{11,12}. 또한 neutrophil의 축적은 다양한 염증질환의 특징이며 neutrophil은 myeloperoxidase (MPO)라는 효소를 과립에 가지고 있다¹². 그러므로 이 경우 PAR2 활성화의 억제에는 PAR2에 의한 염증치료를 중요한 의미가 있는 것이다.

萎陵菜 (*Potentilla chinensis* Ser)는 장미과 (Rosaceae)에 속한 다년생 초본인 딱지꽃으로 이 식물의 뿌리는 圓柱形 또는 類圓錐形으로 조금 비틀려 구부러져 分枝되었고 길이 5~17 cm, 지름 0.5~1 cm로 우리나라 각지에 자생하고 있으며, 이의 전초를 봄에 줄기가 아직 나오지 않을 때 채취 晒乾하여 사용한다. 전초에 vitamin C, 단백질, 지방, 무기성분, P₂O₅, CaO 가 함유되어 있고, 뿌리에는 tannin이 많다. 性은 寒 無毒하고 味는 甘하여 肝 및 大腸經에 들어가 清熱解毒, 涼血止痢의 效能으로 治赤痢腹痛, 久痢不止, 痔瘡出血, 癰腫瘡毒한다. 일반적으로 白頭翁, 馬齒莧 등을 配合하여 痢疾腹痛을 治療하고, 槐花, 地榆 등을 配合하여 濕熱로 因한 痔出血을 治療하며, 金銀花, 蒲公英 등을 配合하여 癰腫을 治療하는데 사용하고 있다¹³.

그 동안의 萎陵菜에 관한 보고는 많지 않으나, Wang 등¹⁴이

* 교신저자 : 임종필, 전북 완주군 삼례읍 후정리 490, 우석대학교 약학대학

· E-mail : limjp@woosuk.ac.kr, · Tel : 063-290-1571

· 접수 : 2009/11/02 · 수정 : 2009/12/01 · 채택 : 2009/12/12

萎陵菜로부터 3-hydroxy-11-ursen-28, 13-olide, 11, 12-dehydroursoic acid lactone, 3-O-acetyl pomolic acid, betulinic acid, 3-oxo-12-ursen-28-oic acid, ursolic acid, oleanic acid 등의 화합물을 분리했으며, Armstrong 등¹⁵⁾은 萎陵菜가 濕疹에 유효하다고 보고한 바 있다.

본 연구에서는 본초서에 기재된 '治癰腫瘡毒'의 효능을 알아보기 위하여 trypsin이나 *trans*-cinnamoyl-LIGRLO-NH₂ (*tc*-NH₂)에 의하여 생성된 흰쥐의 발 浮腫에 대하여, 萎陵菜 물엑스(PCX)의 투여로 인한 浮腫, 血管透過性, 및 MPO 활성도의 억제 효과를 측정하여, 抗炎症效果를 확인하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 시약 및 동물

Trypsin은 Sigma (St. Louis, MO), *trans*-cinnamoyl-LIGRLO-NH₂(*tc*-NH₂) (M.W. 812.59)는 Santa Cruz Biotech. Inc.(CA. USA)에서 구입하여 사용하였으며 기타 시약은 특급이상을 사용하였다.

동물은 Sprague-Dawley 숫컷 흰쥐를 대한바이오링크 (충북 음성)에서 구입하여 체중 200±20 g인 것을 실험실 환경에서 충분한 사료와 물을 공급하면서 적응시킨 뒤 실험하였으며, 대조군(saline) 및 활성을 확인하기 위한 검액투여군 (PCX로 각기 10, 50, 100 및 200 mg/kg)으로 나누어 각 군마다 6마리씩 실험에 이용하였다.

2. 검액의 조제

본 실험에 사용한 약제는 전주 보화당 약업사에서 구입하여 정선한 것을 사용하였으며, 500 g을 세절하여 물로 3시간씩 3회 가열 추출한 여액을 감압 농축한 후 냉동 건조하여, 萎陵菜 물엑스(PCX) 92.8 g (收得率 18.6%)을 얻어 본 실험에 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

3. 부종 억제율 측정

쥐에게 물은 자유롭게 마시도록 하고 18시간 절식시킨 후 ketamine HCl (30 mg/kg)과 xylazine (6 mg/kg)을 근육주사 하였다. PCX (10, 50, 100 and 200 mg/kg) 및 생리식염수를 경구투여하고 1시간 후 trypsin (500 pmol) 또는 *tc*-NH₂ (500 µg)을 쥐의 뒷다리 발바닥에 주사하였다. Trypsin 및 *tc*-NH₂는 생리식염수에 녹여 100 µl씩으로 만들어 주사하였다. 부종의 크기는 쥐의 발바닥 주사직전과 1시간 후에 plethysmometer (Ugo Basile, Italy)를 이용하여 측정하였으며 전후 차이로 계산하였다. 이때 A는 trypsin 및 *tc*-NH₂ 투여 직전의 수치이며 B는 trypsin 및 *tc*-NH₂ 투여 1시간 후의 수치이다.

$$\text{Inhibition (\%)} = (A-B)/A \times 100$$

4. 혈관투과성 억제율 측정

Trypsin 및 *tc*-NH₂주사에 의한 혈관투과성은 Katayama 등

¹⁶⁾의 방법에 따라 측정하였다. PCX (10, 50, 100 and 200 mg/kg) 및 생리식염수를 경구투여하고 trypsin이나 *tc*-NH₂를 상기와 같이 100 µl씩 쥐 발바닥에 주사한 직후 2.5 mg/kg의 Evans blue를 생리식염수에 녹여 정맥주사 1시간 후 쥐를 죽인 다음 발바닥을 제거하여 무게를 측정하고 잘게 썰어 마개 있는 시험관에 넣어 1 N KOH용액 1 ml를 붓고 37°C에서 하루 밤을 침출시킨 후 0.6 N H₃PO₄와 acetone (5:13) 혼액 9 ml를 가하고 수초동안 시험관을 세게 흔들어 3,000 rpm에서 15분 동안 원심분리하여 上澄液을 spectrophotometer로 620 nm에서 흡광도를 측정하여 Evans blue표준곡선에 의하여 농도를 구하여 µg/g으로 표시하였다. 血管透過性 抑制率은 다음 식으로 계산하였다. 이때 A는 trypsin 및 *tc*-NH₂ 투여 직전의 수치이며 B는 trypsin 및 *tc*-NH₂ 투여 1시간 후의 수치이다.

$$\text{Inhibition (\%)} = (A-B)/A \times 100$$

5. MPO 활성도 억제율 측정

생리식염수나 PCX를 경구투여한 1시간 후 trypsin이나 *tc*-NH₂를 쥐 발바닥에 상기와 같이 주사하고, 6시간 후 쥐 발바닥 무게를 측정한 뒤 MPO 활성도는 Bradley 등¹⁷⁾의 방법에 따라 시행하였다. 조직을 잘게 썰어서 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB) (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 포함하는 KH₂PO₄/K₂HPO₄ buffer (pH 6.0)중에 0°C에서 45초 동안 전동 homogenizer로 혼화한 후 4°C에서 3,000 rpm으로 20분간 원심분리한다. Myeloperoxidase 활성도를 측정하기 위하여 96-well microtiter plate에 상정액 50 µl, 50 µl의 phosphate buffer 함유 0.5% HTAB (pH 6.0), 50 µl의 o-dianisidine (Sigma) (0.68 mg/ml in distilled water)을 첨가하고 반응을 촉진하기 위하여 새로 조제한 0.003% hydrogen peroxide를 가하였다. 그리고 450 nm에서 흡광도차를 이용하여 계산하였다. MPO 활성도 억제율은 다음 식으로 계산하였다. 이때 A는 trypsin 및 *tc*-NH₂ 투여 직전의 수치이며 B는 trypsin 및 *tc*-NH₂ 투여 1시간 후의 수치이다.

$$\text{Inhibition(\%)} = (A-B)/ A \times 100$$

5. 통계처리

실험 성적의 통계처리는 student's t-test로 하였으며 유의수준은 0.01이하로 하였다

결 과

1. 부종 억제율

PAR2 작용약물인 trypsin이나 *tc*-NH₂로 유발된 쥐의 뒷발바닥 부종은 PAR2 작용약물을 주사한 경우 생리식염수 단독 처리시보다 유의성 있게 증가하였다(Table 1). Trypsin으로 유발된 부종에서 PCX 50 mg/kg 투여 시 36.7%, 100 mg/kg에서 67.3%, 200 mg/kg에서 61.2%의 유의성 있는 억제율을 보였다. *tc*-NH₂

로 유발된 부종에서는 PCX 50 mg/kg 투여군에서 33.3%, 100 mg/kg에서 57.1%, 200 mg/kg에서 54.8%의 억제율을 나타냈다. Trypsin이나 *tc*-NH₂으로 유발된 부종에서 PCX 100 mg/kg과 200 mg/kg 투여군에서 거의 비슷한 억제율을 나타냈으나 10 mg/kg에서는 유의성이 보이지 않았다.

Table 1. Effects of PCX on trypsin or *tc*-NH₂-induced paw edema in rats.

Agonist	Treatment	Dose (mg/kg p.o.)	Change of paw	% inhibition
Trypsin (500 pmol)	Saline	-	0.49±0.02	-
		10	0.46±0.09	8.7
		50	0.31±0.02*	36.7*
	PCX	100	0.16±0.05*	67.3*
		200	0.19±0.11*	61.2*
		200	0.19±0.02*	54.8*
<i>tc</i> -NH ₂ (500 µg)	Saline	-	0.42±0.10	-
		10	0.39±0.12	7.1
		50	0.28±0.08	33.3*
	PCX	100	0.18±0.01*	57.1*
		200	0.19±0.02*	54.8*

Data show the mean±SE from 6 rats. The PCX was orally administered 1 hr before the subplantar injection of trypsin (500 pmol) or *tc*-NH₂ (500 µg). *p<0.01 compared to the saline group.

2. 혈관투과성 억제율

500 pmol trypsin이나 500 µg *tc*-NH₂주사 1시간 후 뚜렷이 Evans blue의 투과성이 높아졌다. 그러나 PCX 투여군 (50, 100 and 200 mg/kg)은 유의성 있게 발바닥 조직의 Evans blue 투과성을 억제하였다(Table 2). PCX 100 mg/kg에서 혈관투과율은 trypsin의 경우 64.0%, *tc*-NH₂의 경우 52.9%의 억제율을 보였다. 100 mg/kg과 200 mg/kg에서 trypsin 및 *tc*-NH₂의 경우 혈관투과 억제율은 비슷했다.

Table 2. Effects of PCX on trypsin or *tc*-NH₂-induced vascular permeability in the paw of rats.

Agonist	Treatment	Dose (mg/kg p.o.)	Amount of drug (µg/g paw)	% inhibition
Trypsin (500 pmol)	Saline	-	92.48±3.84	-
		10	75.69±0.09	18.2
		50	59.18±3.14*	36.0*
	PCX	100	33.31±1.33*	64.0*
		200	34.95±2.44*	62.2*
		200	34.41±2.95*	51.7*
<i>tc</i> -NH ₂ (500 µg)	Saline	-	71.32±3.16	-
		10	63.17±1.24	11.4
		50	45.34±1.31	36.4*
	PCX	100	33.58±3.24*	52.9*
		200	34.41±2.95*	51.7*

Data show the mean±SE from 6 rats. The PCX was orally administered 1 hr before the subplantar injection of trypsin (500 pmol) or *tc*-NH₂ (500 µg). *p<0.01 compared to the saline group.

Table 3. Effects of PCX on trypsin or *tc*-NH₂-induced MPO activity in the paw of rats.

Agonist	Treatment	Dose (mg/kg p.o.)	% inhibition
Trypsin (500 pmol)	Saline	-	-
	PCX	100	60.6*
<i>tc</i> -NH ₂ (500 µg)	Saline	-	-
	PCX	100	59.6*

Data show the mean±SE from 6 rats. The PCX was orally administered 1 hr before the subplantar injection of trypsin (500 pmol) or *tc*-NH₂ (500 µg). *p<0.01 compared to the saline group.

3. Myeloperoxidase 활성화도 억제율

PCX투여군 (100 mg/kg)은 유의성 있는 MPO활성도 억제효과를 나타냈는데, trypsin의 경우에는 MPO activity가 2.59±0.61일 때 그 억제율은 60.6%, *tc*-NH₂의 경우에는 MPO activity가 2.39±0.41일 때 59.6%의 억제효과를 보였다(Fig. 1, Table 3).

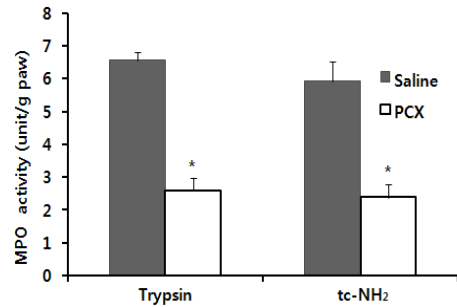


Fig. 1. Effects of PCX on PAR-2 agonist-induced MPO activity in the paw of rats. The PCX was orally administered 1 hr before the subplantar injection of trypsin (500 pmol) or *tc*-NH₂ (500 µg). Saline was used as control. Data show the mean±SE from 6 rats. *p<0.01 compared to the saline group.

고찰

본 연구에서 trypsin이나 *tc*-NH₂로 유발된 쥐발바닥 浮腫, 血管透過性, myeloperoxidase 활성화도에서 PCX 50, 100 및 200 mg/kg 투여시 유의성 있는 감소율을 보였다. PCX 1,000 mg/kg 이상의 고용량에서는 trypsin 이나 *tc*-NH₂로 유발된 부종에서는 100 mg/kg의 경우보다 오히려 더 낮은 효과를 보여 (data 게재하지 않음) 고농도의 PCX는 큰 도움이 되지 않는 것으로 보인다.

Trypsin 이나 *tc*-NH₂와 같은 PAR2 誘發劑의 주사는 쥐 발바닥에서 血管透過性이 증가하여 부종으로 나타난다고 한다^{18,19}.

따라서 이러한 염증반응 모델은 抗炎症反應을 평가하는데 적당하다고 생각된다. PAR2는 neutrophil과 eosinophil에서 뿐만 아니라 mast cell에서도 나타난다고 한다²⁰⁻²². Kawabata 등¹⁸)은 조직침투 (Evans blue extravasation)에서 신속 (15 min)한 mast cell 의존도의 증가는 PAR2 은 조직침투 peptide인 SLIGRL-NH₂의 投與에 기인한 것이라고 하였다. 반대로 Vergnolle 등¹⁹)은 *tc*-NH₂에 의한 염증반응은 주로 mast cell degranulation에 독립적이라고 말하였다. 이러한 반응들은 PAR2가 endothelial cell 뿐만 아니라 neutrophil 과 eosinophil과 같은 mast cell 이외의 조직 함유물에서 나타나는데 이는 쥐의 발에서 trypsin이나 *tc*-NH₂에 대한 하나의 중요한 표적이 되며 이것이 조직의 투과성과 부종 증가의 원인이 된다고 하였다²²). 또한 *tc*-NH₂로 유발된 발바닥 부종은 prostaglandin나 nitric oxide와는 관계가 없다고 하였다²³⁻²⁵).

대부분의 清熱解毒藥이 性이 寒하며 이들이 抗菌과 抗炎症作用을 함께 가지고 있는 경우가 많으므로, 萎陵菜의 抗炎症作用도 豫見된 것이지만 proteinase 活性受容體-2로 誘發된 炎症反應 모델을 이용하여 萎陵菜의 抗炎症效果를 藥理學적으로 확인할 수 있었으며, 그 효과도 비교적 좋았으므로 기존 한의서에서 金銀

花, 蒲公英 등을 배합하여 癰腫을 치료하는데 사용했음이 의의가 있다고 할 수 있다.

결 론

Proteinase 活性受容體-2로 誘發된 흰쥐 뒷발바닥 浮腫모델에서, trypsin이나 tc-NH₂로 誘發된 발바닥 浮腫, 血管透過性, myeloperoxidase 活性도가, 萎陵菜 물엑스를 50, 100 및 200 mg/kg 경구투여한 경우 유의성있는 억제율을 보였으며, 100 mg/kg 경구투여한 경우가 가장 抗炎症效果가 뚜렷함을 나타냈다.

감사의 글

이 논문은 2009년 교육과학기술부의 지원 (지역거점연구단 육성사업/헬스케어기술개발사업단)과 2009학년도 우석대학교 교내 학술연구비 지원에 의하여 연구되었음.

참고문헌

1. Macfarlane, S.R., Seatter, M.J., Kanke, T., Hunter, G.D., Plevin, R. Preteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev* 53: 245-249, 2001.
2. Vu, T.K., Hung, D.T., Wheaton, V.I., Coughlin, S.R. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* 64: 1057-1062, 1991.
3. Nystedt, S., Emilsson, K., Wahlestedt, C., Sundelin, J. Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 9208-9213, 1994.
4. Bohn, S.K., Kong, W., Bromme, D., Smeekens, S.P., Anderson, D.C., Connolly, A., Kahn, M., Nelken, N.A., Coughlin, S.R., Payan, D.G., Bunnett, N.W. Molecular cloning expression and potential functions of the human proteinase-activated receptor-2. *Biochem J* 314: 1009-1013, 1996.
5. Hollenberg, M.D., Saifeddine, M., Al-Ani, B. Proteinase-activated receptor-activating peptides. *Mol Pharmacol* 49: 229-232, 1996.
6. Ishihara, H., Connolly, A.J., Zeng, D., Kahn, M.L., Zheng, Y.W., Timmons, C., Tram, T., Coughlin, S.R. Protease-activated receptor-3 is a second thrombin receptor in humans. *Nature* 386: 502-506, 1997.
7. Kahn, M.L., Zheng, Y.W., Huang, W., Bigornia, V., Zeng, D., Moff, S., Farese, R.V.Jr., Tam, C., Coughlin, S.R. A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature* 394(6694):690-694, 1998.
8. Coughlin, S.R. How the protease thrombin talks to cells.

Proc Natl Acad Sci USA 96(20):11023-11027, 1999.

9. Corvera, C.U., Dery, O., McConalogue, K., Bohm, S.K., Khitin, L.M., Caughey, G.H., Payan, D.G., Bunnett, N.W. Mast cell tryptase regulates rat colonic myocytes through proteinase-activated receptor 2. *J Clin Invest* 100(6):1383-1393, 1997.
10. Kong, W., Mcconalogue, K., Khitin, L.M., Hollenberg, M.D., Payan, D.G., Bohm, S.K., Bunnett, N.W. Luminal trypsin may regulate enterocytes through proteinase-activated receptor-2. *Proc. Natl Acad Sci USA* 94: 8884-8889, 1997.
11. Molino, M., Barnathan, E.S., Numerof, R., Clark, J., Dreyer, M., Cumashi, A., Hoxie, J.A., Schechter, N., Woolkalis, M., Brass, L.F. Interactions of mast cell tryptase with thrombin receptors and PAR-2. *J Biol Chem* 272: 4043-4039, 1997.
12. Steinhoff, M., Vergnolle, N., Toung, S.H., Tognetto, M., Amadesi, S., Ennes, H.S., Trevisani M., Hollenberg, M.D., Wallace, J.L., Caughey, G.H., Mitchell, S.E., Williams, L.M., Geppetti, P., Mayer, E.A., Bunnett, N.W. Agonists of protease-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism. *Nat Med* 6: 151-158, 2000.
13. Kim, C.M., Shin, M.K., Ahn, D.K., Lee, K.S. *Great Chinese Medicine Dictionary*, Jungdam Co. p 4294, 1998.
14. Wang, Q.H., Li, Z.Y., Shen, Y., Lin, H.W., Shu, W.Z. Studies on triterpenoids from *Potentilla chinensis*, *J B Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 31(17):1434-1436, 2006.
15. Armstrong, N.C., Ernst, E. The treatment of eczema with Chinese herbs: a systematic review of randomized clinical trials. *Br J Clin Pharmacol* 48(2):262-264, 1999.
16. Katayama, S., Shionoya, H., Ohtake, S. A new method for extraction of extravasated dye in the skin and the influence of fasting stress on passive cutaneous anaphylaxis in guinea pigs and rats. *Microbiol Immunol* 22(2):89-101, 1978.
17. Bradley, P.P., Priebat, D.A., Christensen, R.D., Rothstein, G. Measurement of cutaneous inflammation: Estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 78(3):206-209, 1982.
18. Kawabata, A., Kureda, R., Imnami, T., Kataka, K., Taneda, M. Increased vascular permeability by a specific agonist of protease-activated receptor-2 in rat hindpaw. *Br J Pharmacol* 125: 419-422, 1998.
19. Vergnolle, N., Hollenberg, M.D., Sharkey, K.A., Wallace, J.L. Characterization of the inflammatory response to proteinase-activated receptor-2 (PAR-2) -activating peptides in the rat paw. *Br J Pharmacol* 127: 1083-1090, 1999.
20. Nystedt, S., Ramakrishnan, B., Sundelin, J. The proteinase-activated receptor 2 is induced by inflammatory mediators in human endothelial cells. *J Bil Chem* 271:

- 14910-14915, 1996.
21. Howells, G.L., Macey, M., Chinni, C., Hou, L., Fox, M.T., Harriott, P., Stone, S. Proteinase-activated receptor-2: expression by human neutrophils. *J. Cell Sci* 110: 881-887, 1997.
 22. Miike, S., McWilliam, A.S., Kita, H. Trypsin induces activation and inflammatory mediator release from human eosinophils through protease-activated receptor-2. *J Immunol* 167(11):6615-6622, 2001.
 23. Vergnolle, N., Macnaughton, W.K., Al-Ani, B., Saifeddine, M., Wallace, J.L., Hollenberg, M.D. Proteinase-activated receptor-2-activating peptides: identification of a receptor that regulates intestinal transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7766-7771, 1998.
 24. Lohman, R.J., Jones, N.C., O'Brien, T.J., Cocks, T.M. A regulatory role for protease-activated receptor-2 in motivational learning in rats. *Neurobiol Learn Mem* 92(3):301-309, 2009.
 25. Morla, L., Crambert, G., Mordasini, D., Favre, G., Doucet, A., Imbert-Teboul, M. Proteinase-activated receptor 2 stimulates Na,K-ATPase and sodium reabsorption in native kidney epithelium. *J Biol Chem* 283(42):28020-28024, 2008.