

上皮細胞部分剝落之天竺鼠氣管對冷卻的反應 —運動後氣喘之實驗模式

周敦穗 黃河* 柯文昌

摘要

運動後引起的氣喘(exercise-induced asthma)是由於熱量散失再吸入冷空氣而使氣管收縮，其機轉至今未明，且無適當之實驗模式。一些研究者以動物或人的氣管來做體外實驗，發現冷卻只能使氣管鬆弛。由於這些研究者都是用正常的氣管來做實驗，而氣喘病人的特徵是上皮細胞受損或發炎。我們將天竺鼠的氣管取出以棉棒拭擦法將其模擬成氣喘的特徵—上皮細胞部分剝落(Epi+/-)，再與完整的(Epi+)及完全脫落的(Epi-)來比較對冷卻的反應。結果顯示急速冷卻(27°C及17°C)Epi+/-的氣管收縮有意義地大於Epi+，而Epi+又有意義地大於Epi-；慢速冷卻則Epi+及Epi-氣管均產生持續性的鬆弛；而Epi+/-則持續性收縮後接著鬆弛。這種收縮的強度與時間會因冷卻的次數增加而遞減，而這種收縮可被抗組織胺劑(diphenhydramine, 10 μ M)所遮斷，甚至產生鬆弛現象，而 lipoxxygenase 的抑制劑 nordihydroguaiaretic acid (NDGA, 30 μ M) 預處理能完全抑制這種收縮及鬆弛反應。此結果暗示冷卻所引起的氣管收縮可能是經由 lipoxxygenase 的產物 hydroxyeicosatetraenoic acid (HETE) 引發 mast cells 釋放出組織胺所造成的連串反應。

氣管的收縮弛放雖然一般都認為是受 cholinergic 及 adrenergic 神經的控制，但最近有很多證據顯示除了受這兩種神經控制外，尚有所謂的 nonadrenergic、noncholinergic (簡稱 NANC) 神經系統⁽¹⁾。譬如氣喘的發作就無法單獨以 cholinergic 及 adrenergic 神經系統去解釋。

氣喘病人在寒冬發作的次數較多，而運動後也常引發氣管收縮現的現象。有些研究者認為這是因為運動後熱量消失再吸入冷空氣才引

起氣管持續收縮的反應^(2,3,4)，但其機轉還不甚了解。另外有一些研究者認為運動引起的氣喘(exercise-induced asthma)是由於媒介物(mediator)的釋放所引起⁽⁵⁾。而 Holtzman 等人⁽⁶⁾發現氣管上皮細胞可能會經由 arachidonic acid 之 lipoxxygenase pathway 而產生一些發炎媒介物。但是到目前為止，尚無恰當的動物模式可供證實。

氣喘病人呼吸道的上皮細胞會表現出形態學上的不正常⁽⁷⁾。在同一個氣喘病人的檢體中

可以看到上皮細胞不同程度的損傷情形。Laitinen 等人認為有一點可能很重要並非所有的氣管上皮細胞會在同一時間表現出同樣程度的傷害⁽⁷⁾。於是我們由拭擦法模擬氣喘病人呼吸道上皮細胞的病理狀況，來比較上皮細胞完整的(Epi+)、部分剝落的(Epi+/-)及完全剝落的(Epi-)天竺鼠氣管對於冷卻的反應。此外，在全部的實驗裏我們都加入 atropine (1 μ M) 及 dl-propranolol (3.5 μ M) 分別遮斷 cholinergic 及 adrenergic 神經系統，以觀察 NANC 的反應。

材料與方法

將雄性天竺鼠 (Hartley strain, 250-350 g) 擊昏後，迅速取出氣管浸泡在預先充足氧氣的 Krebs 溶液中。取氣管的中間部位約 1 cm 的長柱形切成兩個，每個大約包含 4 到 5 個 C 形環狀軟骨，再從 C 形缺口的對側縱向剪開。上皮細胞完全剝落的製備是按 Frossard 及 Muller 等人的報告⁽⁸⁾用沾了 Krebs 溶液的棉花棒輕輕地來回拭擦在整個組織的內側 15 次。上皮細胞部分剝落的製備則只拭擦 5 次。為了確認這一步驟的效果，於是我們在實驗結束後，以組織切片的方法來決定上皮細胞完全或部分剝落。但有些實驗則不拭擦，保持上皮細胞完整以供對照之用。將上述製備的氣管組織分別懸吊在含有 atropine (1 μ M) 及 dl-propranolol (3.5 μ M) 的 krebs 溶液的臟浴器中，通以 95%O₂-5%CO₂，溫度保持在 37°C⁸。Krebs 溶液的組成 (mM) 是：NaCl 120, NaHCO₃ 25, MgSO₄ 0.5, KH₂PO₄ 1.2, KCl 4.72, CaCl₂ 2.5 及 dextrose 11。組織的一端固定在一支持物上，另一端以絲線固定在 force-displacement transducers (Gould UC₂) 上。氣管組織以 1.5 g 的起始張力懸在臟浴器中至少 60 分鐘讓它達到平衡狀態。所有張力的反應以等長的方式記錄在多功能記錄器上 (Gould, RS 3200)。溫度的測量是

將溫度感應器 (YSI) 放在臟浴器中，並同時記錄在多功能記錄器上。我們以兩種不同的冷卻速率進行實驗。急速短暫冷卻是直接將低溫 (27°C & 17°C) 的 krebs 溶液置換臟浴器中的浴液，而臟浴器外圍的溫水 (約 37°C) 還是保持循環。慢速冷卻法是將臟浴器外圍的循環溫水停掉改換另一個約 27°C 的循環水裝置。浴內溫度 37°C 降至 27°C 大約 2.5 分鐘 (-4°C/min) 然後保持在 27°C 約 12.5 分鐘。其反應的阻斷劑如：脂氧化酶 (lipoxygenase) 的抑制劑 nordi-hydroguaiaretic acid (NDGA) 30 μ M 及抗組織胺劑 diphenhydramine (VENA) 10 μ M 分別在 90 分鐘及 10 分鐘前加入臟浴器內。

藥品來源：atropine (Sigma), dl-propranolol (Sigma), NDGA (Sigma), VENA (Tanabe)。NDGA 溶於酒精中配成適當的濃度，最後加入臟浴器溶液中的酒精濃度小於 0.05%。

數據分析：圖中所顯示的結果是以平均值 \pm SEM 表示。數據的分析是以 Student's t-test (two-tailed) 來統計，P < 0.05 以下即認為有意義。

結 果

(一) 急速短暫冷卻法：

如圖 1 所示，無論以 17°C 或 27°C 急速冷卻時 Epi+/- 引起的收縮都有意義地大於 Epi+，而 Epi- 引起的收縮都有意義地小於 Epi+。

(二) 慢速冷卻法：

慢速冷卻法對 Epi+ 氣管及 Epi- 氣管只會引起鬆弛作用 (圖 2)。Epi+ 氣管的鬆弛速度較 Epi- 的氣管快，但是它們的最大鬆弛度卻沒什麼差異。而 Epi+/- 的氣管相反地會產生持續性的收縮 (時間約為 8 分鐘) 接著持續性的鬆弛。但是第二次再冷卻時收縮強度衰減，有的甚至沒有收縮現象而只有鬆弛。第三次冷卻所產生的收縮更是衰減。(圖 3)

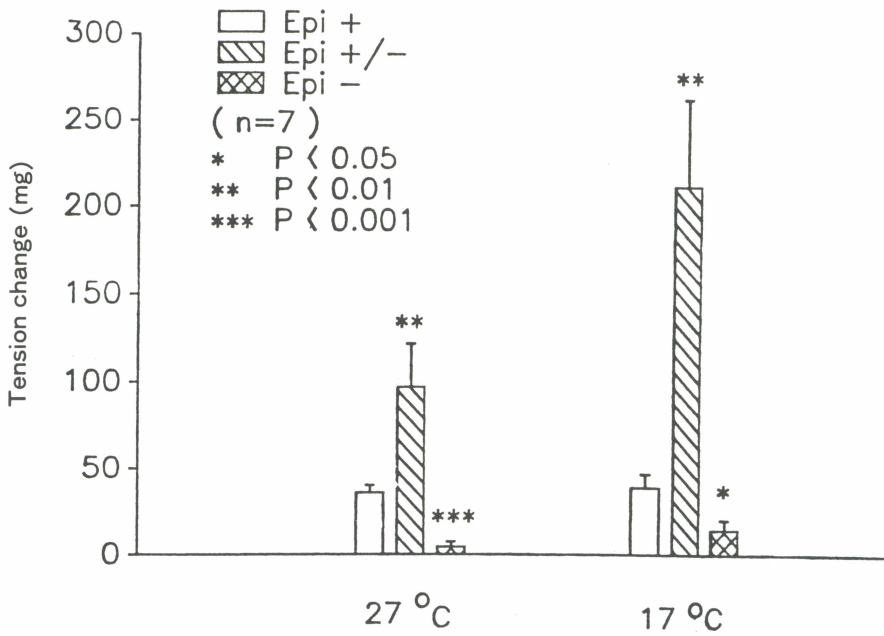


圖1 分別以 27°C 及 17°C 急速短暫冷卻時，上皮細胞部分剝落 (Epi +/-) 的天竺鼠氣管引起的收縮都有意義地大於，而上皮細胞完全剝落 (Epi -) 的氣管引起的收縮都有意義的小於完整 (Epi +) 的氣管。

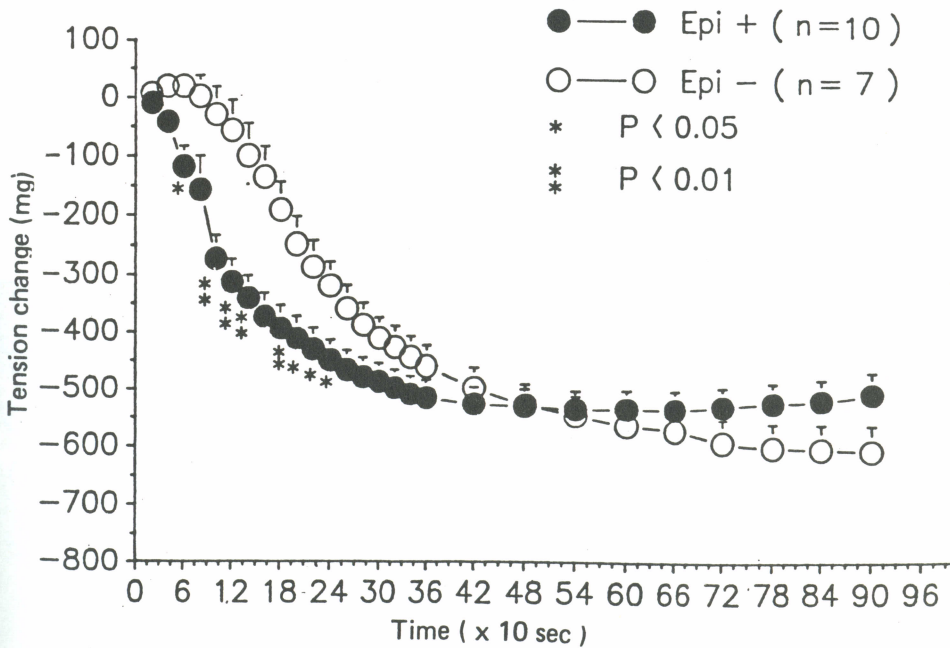


圖2 上皮細胞完整 (Epi +) 及完全剝落 (Epi -) 的天竺鼠氣管對慢速冷卻的張力變化只見鬆弛未見收縮，唯獨 Epi + 的鬆弛有意義地比 Epi - 快一些，但最大鬆弛之張力却無意義地差別。

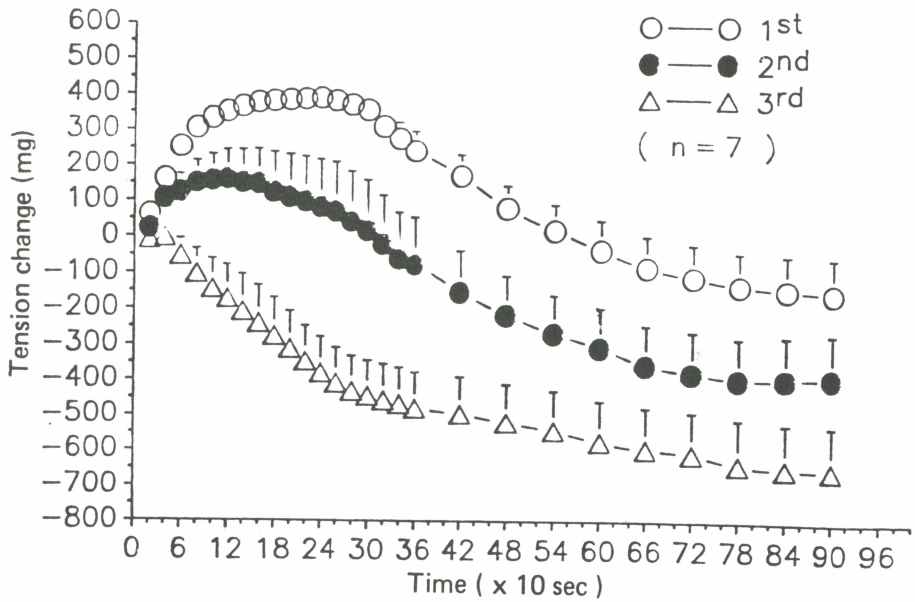


圖3 上皮細胞部分剝落之天竺鼠氣管分別三次慢速冷却之張力變化，(見方法)，顯示第二次有意義地小於第一次，而第三次全部有意義地小於第一次。

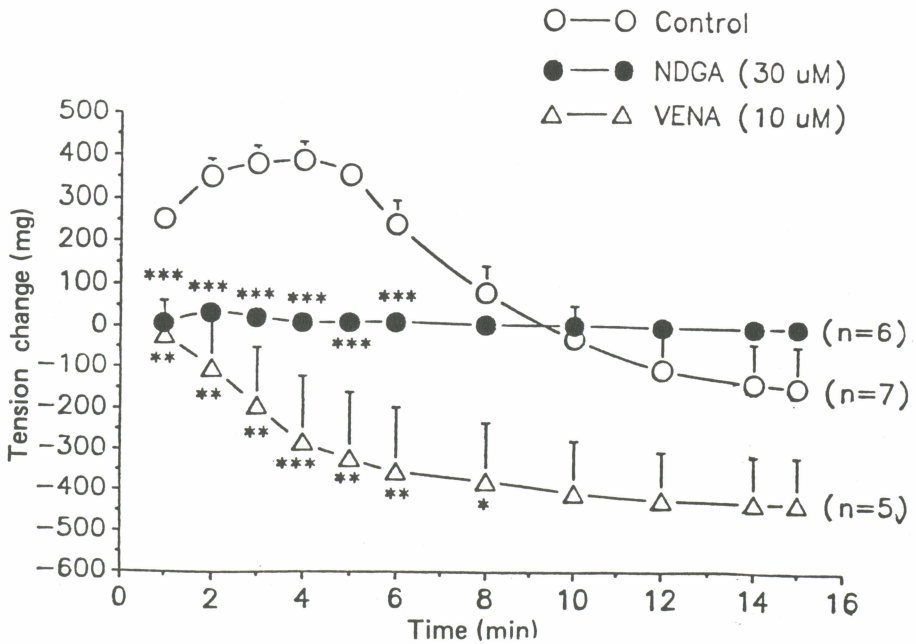


圖4 上皮細胞部份剝落之天竺鼠氣管慢速冷却引起之引縮(control)，有意義地被NDGA預處理90分鐘所抑制，而VENA預處理10分鐘更進一步使這種收縮有意義地轉為鬆弛。* P < 0.05
 ** P < 0.01 *** P < 0.001

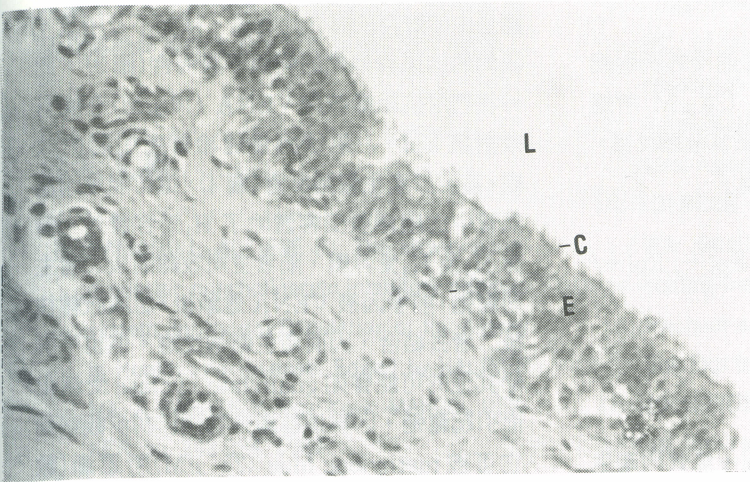


圖5 上皮細胞完整的天竺鼠氣管組織切片。(X 300)
L=lumen E=epithelium C=cilia

圖6 上皮細胞部分剝落的天竺鼠氣管組織切片。(X 300)
L=lumen E=epithelium

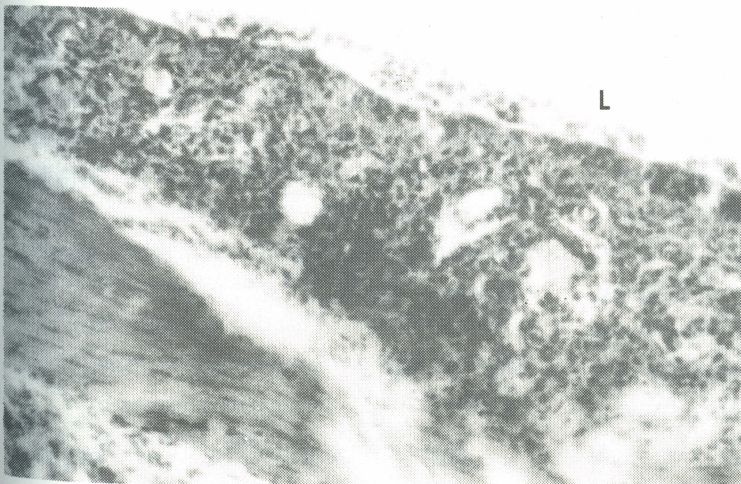
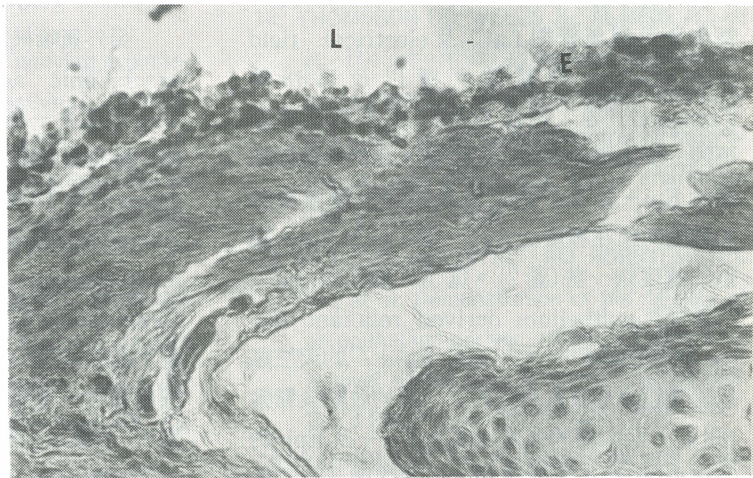


圖7 上皮細胞完全剝落的天竺鼠氣管組織切片。(X 300)
L=lumen

(三)阻斷劑的作用：

圖 4 顯示 Epi+/- 氣管因慢速冷卻所引起的收縮及鬆弛反應均被 NDGA (30 μ M) 所遮斷。而 VENA (10 μ M) 只能遮斷其收縮反應，但對其鬆弛反應却無意義的改變。

(四)組織切片：

圖 5、圖 6 及圖 7 分別表示 Epi+，Epi+/- 及 Epi- 的氣管。

討 論

慢速冷卻天竺鼠及人的 Epi+ 氣管均產生鬆弛反應^(5,9)。而急速冷卻則先有短暫的收縮後緊接著是持續的鬆弛⁽¹⁰⁾。1986 年 Holroyde⁽¹¹⁾ 報告天竺鼠氣管對 LaCl₃ 及 electrical field stimulation 的鬆弛反應以及 1988 年 Tompson⁽¹²⁾ 等人報告 NANC 的鬆弛反應都不因上皮細胞存在與否的影響。我們的結果亦顯示 Epi+ 與 Epi- 的天竺鼠氣管對慢速冷卻的鬆弛反應在程度上大約一樣，只是 Epi+ 鬆弛的速度快一些(圖 2)。這也許是因為 Epi+ 的氣管有 epithelium derived relaxant factor 存在的關係^(13,14,15)。至於 Epi+/- 的天竺鼠氣管慢速冷卻後先有大約 8 分鐘的收縮後鬆弛(圖 4)，而收縮的強度也遠比 Epi+ 及 Epi- 的氣管大(圖 1)，不過這種收縮的強度及時間會隨冷卻的次數增加而遞減(圖 3)。這可能是因上皮細胞部份剝落後神經及肥大細胞(mast cell)暴露出來，一些媒介物質如組織胺等釋放的結果，這與臨床上的觀察吻合。Bienenstock 等人⁽¹⁶⁾ 證實肥大細胞存在於上皮細胞之內及下方而有維持及穩定鄰近組織的功能。但當上皮細胞上的 ciliated cell 受損則神經與肥大細胞就暴露出來，這是氣喘病人常有的現象⁽⁷⁾。這些氣喘病人在運動後血中的組織胺含量會稍微上昇^(17,18)。在臨床上使用噴霧式或肌肉內注射抗組織胺劑均能有效的預防運動後引起的氣喘^(19,20)。然而大多數的氣喘病人在第二次運動時會出現不反應期的現象⁽²¹⁾。他們的解

釋是由於貯存的媒介物耗盡，補充不及所致。我們的結果與他們的假說不謀而合(圖 3)。此外我們用抗組織胺劑 VENA (10 μ M) 亦能有效對抗 Epi+/- 氣管因慢速冷卻所引起的收縮，甚至於產生鬆弛反應(圖 4)。這可能是因為氣管中的組織胺受容體除了 H₁ 受容體外，尚有 H₂ 及 H₃ 受容體，前者主司收縮而後二者主司鬆弛，前者因被 VENA 遮斷後，組織胺轉往後二者去結合，因而產生鬆弛反應。但也不排除其他的可能譬如 guanylate cyclase 受活化而引起鬆弛，因為這種鬆弛我們已初步觀察到它可被 methylene blue (25 μ M) 所遮斷(數據暫且保留)，而 methylene blue 是眾所周知的 soluble guanylate cyclase 的抑制劑⁽²²⁾。

另外氣喘被認為可能是氣管上皮細胞經由 arachidonic acid 之 lipoxygenase 的 pathway 而產生一些發炎媒介物所造成⁽⁶⁾。因為損傷的細胞會游離 arachidonic acid 經由 lipoxygenase 的作用生成 15-HETE (hydroxyeicosatetraenoic acid)⁽²³⁾，15-HETE 會使 mastocytoma cells 釋放出慢反應物質 LTC₄ (leukotriene C₄)⁽²⁴⁾。假如這發現可以引用到肥大細胞的話，15-HETE 的產生可能使肥大細胞釋放一些媒介物而導致呼吸道的收縮反應¹⁶。根據以上的報告，我們以 lipoxygenase 的抑制劑 NDGA (30 μ M) 預處理 Epi+/- 的氣管，慢速冷卻的結果顯示收縮的現象被抑制了，而且鬆弛現象也不見了(圖 4)。

綜合我們實驗的結果來推論，冷卻所引起的氣管收縮現象可能是經由 lipoxygenase 的產物 HETE 引發肥大細胞釋放出組織胺所造成的連串反應。以上我們所提的假說，有待進一步的證實。不過我們所示範的 Epi+/- 氣管的動物模式，也許能提供大家做為研究氣喘致病機轉的一個工具。

誌 謝

感謝本學科陳增福教授對實驗的建議、台

大藥理研究所所長蕭水銀教授贈予 NDGA 藥品及藥檢局黃坤生先生幫忙組織切片的照像工作。

參考文獻

1. DIAMOND L, ALTIERE RJ: The airway nonadrenergic noncholinergic inhibitory nervous system. In: *Neural Regulation of the Airway in Health and Disease*. Edited by KALINER MA, & BARNES P, New York, MARCEL DEKKER, pp. 343-394, 1987.
2. MCFADDEN ER, INGRAM RH: Exercise-induced airway obstruction. *Am Rev Physiol* 45; 453-463, 1984.
3. ANDERSON SD: Is there a unifying hypothesis for exercise-induced asthma? *J Allergy Clin Immunol* 73; 660-665, 1984.
4. BAR-YISHAY E, GODFREY S: Mechanism of exercise-induced asthma. *Lung* 162; 195-204, 1984.
5. CHAUDHARY BA, KOLBECK RC, SPEIR WA JR: Thermal changes in tracheal smooth muscle tone: Is increased reactivity mediator-dependent? *Am Rev Resp Dis* 123; 80, 1981.
6. HOLTZMAN MJ, AIZAWA H, NADEL JA, et al: Selective generation of leukotriene B₄ by tracheal epithelial cells from dogs. *Biochem Biophys Res Commun* 114; 1071-1076, 1983.
7. LAITINEN LA, HEINO M, LAITINEN A, et al: Damage of the airway epithelium and bronchial reactivity in patients with asthma. *Am Rev Resp Dis* 131; 599-606, 1985.
8. FROSSARD N, MULLER F: Epithelial modulation of tracheal smooth muscle responses to antigenic stimulation. *J Appl Physiol* 61; 1449-1456, 1986.
9. JONGEJAN RC, JONGSTE JC, RAATGEEP RC, et al: Effects of cooling on invitro responses of human peripheral airways to inflammatory mediators and neurotransmitters. *Agents and Actions* 26; 73-74, 1989.
10. KOLBECK RC, CHAUDHARY BA, SPEIR JR WA: Studies of mediator involvement in cooling-induced alterations of guinea pig tracheal smooth muscle contractility. *Proc Soc Exp Biol Med* 187; 82-88, 1988.
11. HOLROYDE MC: The influence of epithelium on the responsiveness of guinea-pig isolated trachea. *Br J Pharmacol* 87; 501-507, 1986.
12. THOMPSON DC, WELLS JL, ALTIERE RJ, et al: The effect of epithelium removal on non-adrenergic, non-cholinergic inhibitory responses in the isolated central airways of the cat and guinea pig. *Eur J Pharmacol* 145; 231-237, 1988.
13. HAY DWP, MUCCITELLI RM, HORSTEMEYER DL, et al: Demonstration of the release of an epithelium-derived inhibitory factor from a novel preparation of guinea pig trachea. *Eur J Pharmacol* 136; 247-250, 1987.
14. VANHOUTTE PM: Epithelium-derived relaxing factor(s) and bronchial reactivity. *Am Rev Resp Dis* 138; S 24-S 30, 1988.
15. FERNANDES LB, PATERSON JW, GOLDIE RG: Co-axial bioassay of a smooth muscle relaxant factor released from guinea-pig tracheal epithelium. *Br J Pharmacol* 96; 117-124, 1989.
16. BIENENSTOCK J, PERDUE M, BLENNERHASSETT M, et al: Inflammatory cells and the epithelium. *Am Rev Resp Dis* 138; S 31-S 34, 1988.
17. ANDERSON SD, BYE PTP, SCHOEFFEL RE, et al: Arterial plasma histamine levels at

- rest, during and after exercise in patients with asthma: Effects of terbutaline aerosol. *Thorax* 36; 259-267, 1981.
18. SHAW R, DURHAM S, TORZILLO P, et al: Neutrophil chemotactic activity following the inhalation of ultrasonically nebulized water. *Aust N Z J Med* 13; 541-549, 1983.
 19. HARTLEY JPR, NOGRADY SG: Effect of an inhaled antihistamine on exercise induced asthma. *Thorax* 35; 675-679, 1980.
 20. ZIELINSKI J, CHODOSOWSKA E: Exercise-induced bronchoconstriction in patients with bronchial asthma: Its prevention with an antihistaminic agents. *Respiration* 34; 32-35, 1977.
 21. GODFREY S, SILVERMAN M, ANDERSON SD: Problems of interpreting exercise induced asthma. *J Allergy Clin Immunol* 52; 199-209, 1973.
 22. GRUETTER CA, KADOWITZ PJ, IGNARRO LJ: Methylene blue inhibits coronary arterial relaxation and guanylate cyclase activation by nitroglycerin, sodium nitrite and amyl nitrite. *Can J Physiol Pharmacol* 59; 150-156, 1981.
 23. SIGAL E, GRUNBERGER D, HOLTZMAN MJ: Arachidonate 15-lipoxygenase activity in human eosinophils and airway epithelial cells. *Clin Res* 35; 172 A, 1987.
 24. GOETZL EJ, PHILLIPS MJ, GOLD WM: Stimulus specificity of the generation of leukotrienes by dog mastocytoma cells. *J Exp Med* 158; 731-737, 1983.

Demonstration of Partial Epithelium Removal on Guinea-Pig Airway to Cooling as an Experimental Model of Exercise-Induced Asthma.

D_{UEN}-S_{UEY} C_{HOU}, *H_{ER} H_{UANG}, and W_{UN}-C_{HANG} K_O

ABSTRACT

The mechanism of exercise-induced bronchoconstriction is poorly understood. It has been suggested that respiratory heat loss and sequent cooling of the airway constitute the initial reaction sequence causes bronchoconstriction in asthmatics. The general concept of mediators release, as related to exercise-induced asthma, is supported by several observations. Findings of HOLTZMAN et al suggested that even epithelial cell may be a source of inflammatory mediators derived from the lipoxigenase pathway of arachidonic acid.

Morphological abnormalities of epithelial cells lining the respiratory tract has been described in patients with asthma. it may be of importance that not all cells of the airway epithelium are at the same time in the same stage of destruction. However, several investigators observed that cooling induced only bronchodilation in epithelium intact animals or human trachea in vitro. In other words, there is no appropriate animal model of investigating the exercise-induced asthma. This study considered the influence of epithelium in cooling induced tension changes in guinea-pig tracheal smooth muscle. We applied mechanical method to denude (Epi-) and partially denude (Epi +/-) epithelium to mimic the pathological damage of asthmatics on guinea-pig trachea. In order to compare the denuded effects, some experiment were carried out in keeping epithelium intact (Epi+).

It was found that: (1) Rapid cooling (27°C and 17°C) induced a transient contraction followed by relaxation on Epi+ trachea. (2) Slow cooling (27°C) induce only relaxation on Epi+ and Epi- trachea. The magnitude of the relaxation was non-significantly different, but the relaxation speed of Epi+ was faster. (3) Slow cooling (27°C) induced a sustained contraction followed by relaxation on Epi +/- trachea, but it showed a decay characteristic during repeated cooling. (4) Diphenhydramine (VENA) (10 μM) pretreatment could reverse the contraction induced by cooling on Epi +/- trachea. (5) Cooling induced contraction and relaxation on Epi +/- trachea were inhibited by nordihydroguarairactic acid (NDGA) (30 μM) pretreatment.

The results of our study suggest that the partially denuded epithelium may produce lipoxigenase metabolites, such as hydroxyeicosatetraenoic acid, and stimulate histamine release from mast cells, and play a role in the cooling induced contraction of airway smooth muscle. The Epi +/- trachea, we demonstrated, may provide a useful model to investigate the mechanism of exercise-induced asthma.

Key words: Exercise-induced asthma, Guinea-pig, Epithelium, Cooling, Trachea, Mast cells.