

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

台灣款冬成分Petasins在離體氣管的鬆弛機轉
Relaxant action mechanisms of petasins, isolated from
Petasites formosanus, in isolated Trachea.

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號： NSC 89-2320-B-038-003

執行期間： 88年 8月 1日至 89年 7月 31日

延長至： 90年 1月 31日

個別型計畫： 計畫主持人： 柯文昌

共同主持人：

整合型計畫： 總計畫主持人：

子計畫主持人：

註：整合型計畫總報告與子計畫成果報告請分開
編印各成一冊，彙整一起繳送國科會。

處理方式： 可立即對外提供參考

(請打 V)

一年後可對外提供參考

二年後可對外提供參考

(必要時，本會得展延發表時限

)

執行單位： 台北醫學大學 藥理學科

中華民國 九十年 三月 二十八日

目錄

中文摘要	-----	3
英文摘要	-----	4
壹. 前言	-----	5
貳. 實驗材料與方法	-----	6
參. 結果	-----	10
肆. 討論	-----	12
伍. 參考文獻	-----	14
陸. 圖	-----	17
柒. 表	-----	32

中文摘要

我們分析台灣款冬 (*Petasites formosanus* Kitamura) 所抽提的 petasins 類化合物，包括 petasin、isopetasin、*S*-petasin 與 *S*-isopetasin 對氣管的鬆弛活性，上述 petasins 類化合物對 histamine (10 μ M)、carbachol (0.2 μ M)、KCl (30 mM) 及 leukotriene D₄ (10 nM) 預縮的離體天竺鼠氣管，產生濃度依存性的鬆弛作用，*S*-petasin 雖對四種收縮劑無特殊的選擇性，但 *S*-isopetasin 對 carbachol 和 KCl 預縮的鬆弛作用較具有選擇性，它們的 IC₅₀ 都在 10 μ M 左右，就構造-活性之關係而言，含有硫原子的 petasins 對氣管的鬆弛活性強度 (potency) 比沒有硫原子的 petasins 要強。

含有硫原子的 petasins 中，*S*-isopetasin (50–200 μ M) 在正常 Krebs 中除了使 carbachol 之對數濃度—反應曲線平行向右移動，且不改變其最大收縮，顯示具抗毒蕈素作用 (antimuscarinic effect) 外，非競爭性地抑制 histamine 或 KCl 累加引起之收縮，*S*-petasin (10–200 μ M) 則均非競爭性地抑制 histamine、carbachol 或 KCl 累加引起之收縮；在無鈣環境中，*S*-petasin 預處理對 histamine (100 μ M)、carbachol (10 μ M) 或 KCl (60 mM) 去極化因素加外鈣引起的收縮呈非競爭性地抑制，*S*-isopetasin 則對後者呈非競爭性地抑制，顯示兩者對細胞外鈣離子流入都有抑制作用；在完全無鈣 (含 0.02 mM EGTA) 環境中，*S*-petasin 預處理對 histamine 或 carbachol 累加引起之收縮亦呈非競爭性地抑制，顯示 *S*-petasin 對細胞內鈣離子釋放也有抑制作用。對 carbachol (0.2 μ M) 預縮而 nifedipine (10 μ M) 引起的最大鬆弛情況下，*S*-petasin 或 *S*-isopetasin 也會產生更進一步的鬆弛，表示不管有無抑制 voltage 及/或 receptor operated calcium channels，一定尚有其他鬆弛機轉。然而其鬆弛反應不受 N^o-nitro-L-arginine (20 μ M)、 α -chymotrypsin (1 U/ml)、propranolol (1 μ M)、glibenclamide (10 μ M)、methylene blue (25 μ M) 及 2',5'-dideoxyadenosine (10 μ M) 存在的影響，表示其鬆弛作用與 nitric oxide、vasoactive intestinal polypeptide、 β -adrenoceptor 受體活化、ATP-敏感的鉀通道開啟、adenylate cyclase 或 guanylate cyclase 活化無關。

S-petasin (10–20 μ M) 或 *S*-isopetasin (10–20 μ M) 雖能使 forskolin 及 sodium nitroprusside 的對數濃度—反應曲線呈濃度依存性地向左移動，但不能有意義地增加 forskolin 及 sodium nitroprusside 的 pD₂ 值，由 phosphodiesterase (PDE) 活性的直接測定，得知 *S*-petasin (100–300 μ M) 能有意義地抑制 cAMP-dependent PDE 的活性，但最高只能抑制 33.94 \pm 6.06 % (n=5)，顯示 *S*-petasin 只有輕微的抑制作用，而 *S*-isopetasin (30–300 μ M) 不能有意義地抑制此酵素，*S*-petasin 及 *S*-isopetasin (30–300 μ M) 亦不能有意義地抑制 cGMP-dependent PDE 的活性。

綜合以上結果，台灣款冬 petasins 中含硫原子的 petasins 對氣管鬆弛的作用較強，*S*-petasin 對細胞外鈣流入或細胞內鈣釋放都有抑制作用，對 cAMP-dependent PDE 只有輕微的抑制作用，是一種 non-specific antispasmodic，而 *S*-isopetasin 具有較強的抗毒蕈素作用。

關鍵字： *S*-petasins、*S*-isopetasin、台灣款冬、抗毒蕈素作用、外鈣內流、內鈣釋放、磷酸雙酯酵素抑制。

ABSTRACT

Four petasins, including petasin, isopetasin, *S*-petasin and *S*-isopetasin, were isolated from *Petasites formosanus* Kitamura. They concentration-dependently relaxed histamine (10 μM)-, carbachol (0.2 μM)-, KCl (30 mM)- or leukotriene D₄ (10 nM)-induced precontractions of isolated guinea-pig trachealis. *S*-Isopetasin selectively relaxed carbachol- and KCl-induced precontractions, although *S*-petasin non-selectively relaxed the precontractions induced by these contractile agents. Their IC₅₀s were approximately about 10 μM . It seems that the relaxant effects of sulfur containing petasins, *S*-petasin and *S*-isopetasin, were more potent than those of non-sulfur containing petasins, petasin and isopetasin.

The preincubation of *S*-isopetasin (50~200 μM) competitively inhibited cumulative carbachol-induced contractions, suggesting that *S*-isopetasin had an antimuscarinic effect, in isolated guinea-pig trachealis. However, *S*-isopetasin non-competitively inhibited contractions induced by cumulative histamine or KCl in normal Krebs solution. Whereas, *S*-petasin non-competitively inhibited contractions induced by cumulative histamine, carbachol or KCl in normal Krebs solution. In Ca²⁺-free medium, preincubation of *S*-petasin non-competitively inhibited cumulative Ca²⁺-induced contractions in histamine (100 μM)-, carbachol (10 μM)-, or KCl (60 mM)-depolarized trachealis, and *S*-isopetasin non-competitively inhibited the latter, suggesting that both may inhibit calcium influx from extracellular space. In Ca²⁺-free medium containing 0.02 mM EGTA, the incubations of *S*-petasin also non-competitively inhibited cumulative histamine- or carbachol-induced contractions, suggesting that *S*-petasin may inhibit calcium release from calcium stores. After a maximal inhibition on carbachol (0.2 μM)-induced precontraction by nifedipine (10 μM), *S*-petasin or *S*-isopetasin caused a further relaxation of the trachealis. The results suggest *S*-petasin and *S*-isopetasin may have other relaxant mechanisms regardless of whether inhibiting voltage operated calcium channels in the trachealis. However, their relaxant effects were not affected by the presence of propranolol (1 μM), 2',5'-dideoxyadenosine (10 μM), methylene blue (25 μM), glibenclamide (10 μM), N^o-nitro-L-arginine (20 μM) or α -chymotrypsin (1 U/ml). It suggests their relaxing effect may be unrelated to activation of β -adrenoceptor, adenylate cyclase or guanylate cyclase, the opening of ATP-sensitive potassium channels and the liberation of nitric oxide or vasoactive intestinal polypeptide.

S-petasin and *S*-isopetasin (10~20 μM) produced a parallel leftward shift of the log concentration-response curves of forskolin and sodium nitroprusside, but none significantly affect their pD₂ values. Neither cAMP- nor cGMP-dependent phosphodiesterase (PDE) activity was inhibited by *S*-petasin or *S*-isopetasin, except that *S*-petasin (100~300 μM) had a slightly inhibitory effect on cAMP-dependent PDE activity. The maximal inhibition on the enzyme by *S*-petasin was only 33.94 \pm 6.06 % (n=5). In conclusion, the relaxant effects of sulfur containing petasins, *S*-petasin and *S*-isopetasin isolated from *Petasites formosanus* Kitamura, were more potent than those of non-sulfur containing petasins. *S*-Petasin and *S*-isopetasin inhibited both Ca²⁺-influx from extracellular space and Ca²⁺-release from intracellular stores. In contrast to that *S*-isopetasin had an antimuscarinic effect, *S*-petasin slightly inhibited cAMP-dependent PDE, and may be a non-specific antispasmodic.

Keywords: *S*-petasin, *S*-isopetasin, *Petasites formosanus* Kitamura, antimuscarinic

effect, calcium influx, calcium release, phosphodiesterase inhibition.

壹. 前言

呼吸道平滑肌的收縮和鬆弛在氣喘的發作和改善，扮演著非常重要的角色 (Rodger, 1992)。在氣管上，含有各式各樣的接受體，像是負責氣管平滑肌收縮的 muscarinic、histamine 以及 leukotriene 等受體 (Mak & Barnes, 1990)。當呼吸道發炎所釋放的發炎介質 (如 histamine 和 leukotriene 等) 或是迷走神經受到刺激所釋放的 acetylcholine，這些物質與其受體結合後，會造成平滑肌細胞膜上的 GTP-binding protein 產生變化，進而活化 phospholipase C，使得 phosphatidyl-inositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) 水解產生 inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) 及 1,2-diacylglycerol (DAG)，IP₃ 被釋放到細胞質中，並作用於肌漿網 (sarcoplasmic reticulum) 上的 IP₃ 受體使細胞內鈣離子釋放，產生瞬間收縮 (phasic contraction)，至於 DAG 會使得 protein kinase C 活化，使 Ca²⁺ 通道打開造成細胞外鈣離子流入而引發持續收縮 (tonic contraction) (Rodger, 1992；Exton, 1994；Horowitz et al, 1996)。另一方面，能夠造成氣管平滑肌擴張的物質包含了 β-adrenoceptor agonists、antimuscarinic agents、aminophylline、nitric oxide (NO) 或是 vasoactive intestinal peptide (VIP) 等 (Gross & Skorodin, 1984；Ellis & Farmer, 1989；Murray & Kotlikoff, 1991；Belvisi et al, 1993；Barnes, 1997)。不管是 β-adrenoceptor agonists 作用於 β₂-adrenoceptor 或是 VIP 和其受體結合皆是透過活化 adenylate cyclase 使得細胞內 cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP) 的含量上升；NO 活化 guanylate cyclase 使得細胞內 cyclic guanosine 3',5'-monophosphate (cGMP) 的含量上升；aminophylline 則抑制 phosphodiesterase (PDE) 造成 cAMP 及 cGMP 的含量增加，cAMP 及 cGMP 接著分別活化 protein kinase A 及 protein kinase G，而引發一連串的磷酸化 (Schramm et al., 1992)，導致氣管鬆弛。Antimuscarinic agents 則是阻斷 muscarinic receptor 而拮抗迷走神經釋出 acetylcholine 所產生的收縮作用，因而有氣管鬆弛的效果。

根據神農本草經和本草備要記載，款冬可以用來治療氣喘並且有鎮咳祛痰的效果，為醫治呼吸疾病的中藥之一。台灣款冬 (*Petasites formosanus* Kitamura) 是多年生草本，菊科 (Compositae) 植物，為台灣本土固有種，分佈於全省海拔山區之林蔭、路旁或山間濕地。台灣民間常利用此植物來鎮咳、止痛、消腫、降血壓 (Sasaki, 1924)，因此，我們與國立中國醫藥研究所合作篩選其活性成分，發現台灣款冬中的 petasins 類化合物，包括 *S*-petasin、*S*-isopetasin、petasin 以及 isopetasin，其含量分別為 0.068%、0.024%、0.026% 及 0.005%，皆能夠使氣管平滑肌鬆弛，而我們選取氣管鬆弛活性較強者，來探討其作用機轉。

有關 petasins 的藥理研究報告很少。於動物實驗中，因會抑制血管平滑肌細胞外鈣的流入和內鈣的釋放，petasin 對大白鼠除了具有降低血壓與心跳外，亦使胸主動脈產生鬆弛作用 (Wang et al, 1998)。另外在同屬不同種的植物 *Petasites hybridus* 的石油醚提取物內，發現能夠防止大白鼠中酒精引起的胃黏膜傷害，以及能夠減少 indomethacin 所引發的小腸潰瘍，這可能在提取物內有抑制 leukotriene synthesis 的活性成分 (Brune et al, 1993)，接著，Bickel et al (1994) 確定其活性成分之一為 isopetasin，並證實對 lipoxygenases 有選擇性的抑

制作用，另外，petasin 與 isopetasin 也曾被應用在咳嗽的治療 (Weiss, 1983)，而其他有關 petasins 類化合物對氣管的作用幾無文獻可考 (Medline 1966-1998)。

貳. 實驗材料與方法

一. 實驗方法

雄性天竺鼠 (Hartley)，體重約 250–450 g，將其敲暈後迅速取出氣管，浸泡在氧氣充份的 Krebs 溶液中，將氣管周圍組織小心地清理乾淨，從 C 形軟骨缺口的對側縱向剪開，將剪開之氣管，以 3–4 個軟骨環切成一段，兩端撐開，一端固定在一支持物上，另一端以絲線固定在 force-displacement transducer (Grass FT03) 上。組織置於內含 indomethacin 2.8 μ M 的 Krebs 溶液之臟浴器 (organ bath) 中，用以消除自發張力，再通以 95% 氧與 5% 二氧化碳的混合氣，溫度維持在 37 $^{\circ}$ C。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，其間每 15 分鐘換一次溶液，直至實驗開始。所有張力的反應以等長的 (isometric) 方式記錄在多功能記錄器 (Gould RS3200 或 TA240S) 上。Krebs 溶液 (Raeburn & Brown, 1991) 的組成 (mM) 是：氯化鉀 4.7、氯化鈉 118.0、氯化鈣 2.5、葡萄糖 10.1、碳酸氫鈉 25.0、硫酸鎂 1.2、磷酸二氫鉀 1.2。部分實驗使用的等張高鉀 (60 mM) 溶液，則將氯化鉀等當量與氯化鈉置換。

(一). 對天竺鼠氣管的鬆弛作用

以 histamine (10 μ M)、carbachol (0.2 μ M)、KCl (30 mM) 或 leukotriene D₄ (10 nM)，令氣管預先產生收縮，簡稱預縮 (precontraction)，達穩定後再以累積用量 (0.1–300 μ M) 方式分別加入 petasin、isopetasin、*S*-petasin 及 *S*-isopetasin 或它們的溶劑，實驗最後加入 1 mM aminophylline 使其達最大鬆弛，令此鬆弛為 100 %，據此求取 petasin、isopetasin、*S*-petasin 及 *S*-isopetasin 之對數濃度–反應曲線 (log concentration–response curve)，並求取各自之 IC₅₀，選擇鬆弛作用較強的 *S*-petasin 和 *S*-isopetasin 來探討它們的作用機轉。

(二). 預防天竺鼠氣管的收縮

累積加入 histamine (0.01–1000 μ M) 或 carbachol (0.001–1000 μ M) 之後洗掉，此步驟重覆幾次，直至平滑肌收縮穩定，再以最後一次之最大收縮作為 100 %，以 *S*-petasin (10–200 μ M)、*S*-isopetasin (10–200 μ M) 或其溶劑作對照，預處理 15 分鐘，再以累積用量方式加入前述之收縮劑，據此求取 histamine 或 carbachol 之對數濃度–反應曲線，並計算 *S*-petasin、*S*-isopetasin 之 pD₂ 或 pA₂ 值。

(三). 抑制鈣離子流入

以 histamine (100 μ M) 或 carbachol (10 μ M) 令氣管產生收縮後，換成無鈣並含 2 mM EGTA 之 Krebs 溶液，平衡 5 分鐘後，再換成無鈣之 Krebs 溶液，此步驟重覆到所加入的 histamine (100 μ M) 或 carbachol (10 μ M) 不再產生收縮為

止，然後在 histamine (100 μM) 或 carbachol (10 μM) 存在下，累積加入 Ca^{2+} (0.01–10 mM)，重覆幾次，直至平滑肌收縮穩定，再以最後一次之最大收縮作為 100%，以 *S*-petasin (50–200 μM) 或其溶劑作對照，預處理 15 分鐘，再以累積用量方式加入 Ca^{2+} (0.01–10 mM) 求其對數濃度–反應曲線，並計算它們的 $-\log \text{IC}_{50}$ 值，檢測 *S*-petasin 抑制外鈣內流之強度。

等張高鉀 (60 mM) 無鈣並含 2 mM EGTA 之 Krebs 溶液，平衡至少 60 分鐘後，再以不含 EGTA 之等張高鉀無鈣溶液沖洗三次之後，累積加入 Ca^{2+} (0.01–10 mM)，此步驟重覆幾次，直至平滑肌收縮穩定，再以最後一次之最大收縮作為 100%，以 *S*-petasin (20–200 μM)、*S*-isopetasin (10–200 μM) 或其溶劑作對照，預處理 15 分鐘，再以累積用量方式加入 Ca^{2+} ，求其對數濃度–反應曲線，並計算它們的 $-\log \text{IC}_{50}$ 值，檢測 *S*-petasin 或 *S*-isopetasin 抑制外鈣內流之強度。

(四). 抑制內鈣釋放

在無鈣並含 0.02 mM EGTA 之 Krebs 溶液中，累積加入 histamine (0.1–3000 μM) 或 carbachol (0.001–3000 μM) 之後，用正常 Krebs solution 洗掉令其完全鬆弛，再改用無鈣並含 0.02 mM EGTA 之 Krebs 溶液，此步驟重覆幾次，直至平滑肌收縮穩定，再以最後一次之最大收縮為 100%，以 *S*-petasin (50–200 μM) 或其溶劑作對照，預處理 15 分鐘，再以累積用量方式加入前述之收縮劑，據此求取 histamine 或 carbachol 之對數濃度–反應曲線，並計算 *S*-petasin 之 pD'_2 值。

(五). 與鈣離子通道阻斷劑之相互作用

以 carbachol (0.2 μM) 預縮達穩定後，加入 nifedipine (10 μM)，待穩定後，再加入 *S*-petasin (100 μM)、*S*-isopetasin (100 μM) 或其溶劑，觀察是否會進一步鬆弛。

(六). 是否活化 β -adrenoceptor 受體

以 histamine (10 μM) 預縮後，加入 β -adrenoceptor blocker, propranolol (1 μM) 或溶劑預處理 15 分鐘，再累積加入 *S*-petasin (0.1–300 μM) 或 *S*-isopetasin (0.1–300 μM)，比較其對數濃度–反應曲線，是否受 propranolol 的影響。

(七). Adenylate 或 guanylate cyclase 抑制劑是否影響其鬆弛作用

Histamine (10 μM) 使氣管收縮穩定後，以 adenylate cyclase 抑制劑 2',5'-dideoxyadenosine (DDA, 10 μM) 或 soluble guanylate cyclase 抑制劑 methylene blue (25 μM) 預處理 15 分後，再累積加入 *S*-petasin (0.1–300 μM) 或 *S*-isopetasin (0.1–300 μM)，觀察 DDA 或 methylene blue 能否影響 *S*-petasin 或 *S*-isopetasin 之鬆弛反應。

(八). 是否與 ATP-敏感的鉀通道開啟有關

以 histamine (10 μM) 預縮達穩定後，加入 ATP-敏感的鉀通道阻斷劑 glibenclamide (10 μM) 或溶劑預處理 15 分鐘後、再累積加入 *S*-petasin (0.1–300 μM) 或 *S*-isopetasin (0.1–300 μM)，觀察是否影響其對數濃度-反應曲線。

(九). Nitric oxide synthase 抑制劑是否影響其鬆弛作用

以 histamine (10 μM) 預縮達穩定後，加入 nitric oxide synthase 抑制劑 N^{ω} -nitro-L-arginine (L-NNA, 20 μM) 或溶劑預處理 15 分鐘後、再累積加入 *S*-petasin (0.1–300 μM) 或 *S*-isopetasin (0.1–300 μM)，觀察是否影響其對數濃度-反應曲線。

(十). Peptidase 是否影響其鬆弛作用

以 histamine (10 μM) 預縮達穩定後，加入 peptidase, α -chymotrypsin (1 U/ml) 或溶劑預處理 15 分鐘後、再累積加入 *S*-petasin (0.1–300 μM) 或 *S*-isopetasin (0.1–300 μM)，觀察是否影響其對數濃度-反應曲線。

(十一). 是否影響 adenylylate 或 guanylate cyclase 活化劑之鬆弛作用

在避光環境下，以 Histamine (10 μM) 使氣管收縮後，預處理 *S*-petasin (10–20 μM) 或 *S*-isopetasin (10–20 μM) 15 分鐘，當達到穩定後再累積加入 adenylylate cyclase 活化劑 forskolin (0.0001–30 μM) 或 guanylate cyclase 活化劑 sodium nitroprusside (0.0001–30 μM)，觀察 *S*-petasin 或 *S*-isopetasin 是否能使 forskolin 和 sodium nitroprusside 的對數濃度-反應曲線向左平行移動。

(十二). 對 phosphodiesterase activity 的抑制作用

本實驗根據 Thompson and Appleman (1971) 及 Cook et al. (1995) 之方法修改而來。將除去軟骨之氣管平滑肌稱重、剪碎置於 20–30 倍體積之 medium (pH 7.4)，內含有 100 mM Tris-HCl、2 mM MgCl_2 及 1 mM dithiothreitol，再以 potter glass/teflon homogenizer (Glas-Col, Terre Haute, IN, U.S.A) 研磨均勻，並於 9500 rpm 下離心 15 分鐘，取均質液 25 μl 與反應試液混合使最終體積成為 100 μl ，其中含有 40 mM Tris-HCl (pH 8.0)、2.5 mM MgCl_2 、3.75 mM β -mercaptoethanol、0.1 U calmodulin、10 μM CaCl_2 、1 μM cAMP 和 0.2 μCi [^3H]cAMP 或 1 μM cGMP 和 0.2 μCi [^3H]cGMP 及 IBMX (30–300 μM)，*S*-petasin (30–300 μM) 或 *S*-isopetasin (30–300 μM) 或其溶劑。組織均質液與試劑混合後，於 37 $^{\circ}\text{C}$ 反應 30 分鐘，之後移至滾水浴中 3 分鐘來終止反應。冷卻後在混合液中加入 20 μl *Ophiophagus hannah* snake venom (1 mg/ml) 於 37 $^{\circ}\text{C}$ 反應 10 分鐘，之後加入 500 μl Dowex 樹脂懸液 (1 \times 8-200, 1:1 於 40 mM Tris-HCl 之緩衝液，pH 8.0) 混合完全，冰浴 30 分鐘，用以移除未反應的 [^3H]cAMP 或 [^3H]cGMP。離心取上清液 150 μl 以 liquid scintillation counter 計算其 radioactivity，據此分析 PDE 活性。此實驗中被自然分解的 [^3H]cAMP 或 [^3H]cGMP 低於 10%，實驗結果應可信賴。

二. 試藥與試劑

Atropine、forskolin、sodium nitroprusside、2',5'-dideoxyadenosine (DDA)、nifedipine、indomethacin、propranolol、(-)-isoprenaline hydrochloride、N^o-nitro-L-arginine、 α -chymotrypsin、histamine、carbachol、aminophylline、ethylene glycol-bis (β -aminoethyl ether) N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA)、glibenclamide、methylene blue、Trizma base、DL-dithiothreitol、 β -mercaptoethanol、cAMP、cGMP、calmodulin、Dowex 樹脂、*Ophiophagus hannah* snake venom等，皆購自 Sigma Chemical Co., MO., U.S.A.. [³H]cAMP 及 [³H]cGMP 購自 Du Pont Co., MS, U.S.A. 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) 購自 Aldrich Chem. Co., WI, U.S.A.，其它試劑皆屬分析級。另外，petasin、isopetasin、*S*-petasin、*S*-isopetasin，由國立中國醫藥研究所林雲蓮研究員提供 (Figure 1)。

Nifedipine 為 voltage operated calcium channel (VOC) 阻斷劑，propranolol 為 β -adrenoceptor 拮抗劑，glibenclamide 為 ATP-敏感的鉀通道阻斷劑，DDA 及 methylene blue 分別為 adenylylase 及 guanylylase 抑制劑，N^o-nitro-L-arginine 為 nitric oxide synthase 抑制劑， α -chymotrypsin 為 peptidase，forskolin 及 sodium nitroprusside 則分別為 adenylylase 及 guanylylase 活化劑，IBMX 及 aminophylline 為 phosphodiesterase 抑制劑。

以上藥物中，glibenclamide 溶於 dimethylsulfoxide (DMSO)，nifedipine、petasin、iso-petasin、*S*-petasin、iso-*S*-petasin 溶於酒精：DMSO (1:1) 中；forskolin、indomethacin 溶於酒精；其餘藥物皆溶於蒸餾水。DMSO 或酒精之最終濃度低於 0.1 %，且對氣管平滑肌收縮不造成影響。

三. 統計分析

Petasins 對收縮藥預縮的鬆弛效果，以百分率表示，其鬆弛反應以 aminophylline 1 mM 的最大鬆弛當 100%，其 IC₅₀ 是抑制收縮藥持續性收縮 50% 所需之濃度，以直線迴歸求得；收縮反應以收縮藥在 *S*-petasin 或 *S*-isopetasin 或溶劑處理前的最大收縮為 100%，求取 *S*-petasin 或 *S*-isopetasin 或其溶劑(對照組)存在下收縮藥的最大收縮反應之百分率，以此根據 Ariens & van Rossum (1957) 以及 van den Brink and Lien (1977) 的方法，再求取 *S*-petasin 或 *S*-isopetasin 預防收縮的 pD₂' 值，此值表示 *S*-petasin 或 *S*-isopetasin 對抗 agonist，使其最大收縮反應減半所需濃度的 -log 值，當此值越大表示 potency 越強。另外，*S*-isopetasin 產生競爭性拮抗的 pA₂ 值是在 *S*-isopetasin 存在下，要達到與原先相同收縮反應而 agonist 的濃度需提高一倍時，所需 *S*-isopetasin 濃度的 -log 值，此值越大表示 competitive antagonism 的能力越強。PDE 的活性以組織均質液在無任何藥物處理下充分作用所得之 radioactivity 為 100%，沒有組織均質液存在的情況(視為 PDE 被完全抑制)所得之 radioactivity 為 0%，*S*-petasin、*S*-isopetasin 或 IBMX 存在下 PDE 之活性則於扣除其溶劑(對照組)對 PDE 活性的影響後，以百分率表示。所有數據均為平均值 \pm 標準誤差 (mean \pm SEM)，用 Student's *t* test 來統計分析，而三種以上不同藥物或數值間的比較則以單因子變異數分析 (one-way analysis of variance, one-way ANOVA) 的方法運算，再以最小顯著差異值 (least significant difference, LSD) 作事後檢定，當 P 值小於 0.05 表示有意義。

參. 結果

一. 對天竺鼠氣管預縮的鬆弛作用

在離體天竺鼠氣管中，對 histamine (10 μ M)、carbachol (0.2 μ M)、KCl (30 mM) 及 leukotriene D₄ (10 nM) 之預縮，分別產生 1.27 ± 0.13 (n=25)、 1.29 ± 0.15 (n=28)、 1.14 ± 0.11 (n=26) 及 1.34 ± 0.12 (n=21) g 的張力，也分別是這四種收縮藥最大收縮的 $56.44 \pm 5.78\%$ 、 $70.11 \pm 8.15\%$ 、 $64.41 \pm 6.21\%$ 及 $67.29 \pm 10.48\%$ ，彼此間無意義差。這四種 petasins 對四者都能產生濃度依存性的鬆弛作用 (Figure 2)，因此可求得 petasins 對 histamine、carbachol、KCl 及 leukotriene D₄ 之 IC₅₀ (Table 1)。根據這些 IC₅₀ 的比較，發現所有 *S*-petasin 之 IC₅₀ 有意義小於 petasin；*S*-isopetasin 對 carbachol 或 KCl 預縮的之 IC₅₀ 有意義地小於 isopetasin，至於對 histamine 及 leukotriene D₄ 預縮之 IC₅₀ 則大於 300 μ M，petasin 對 histamine 或 KCl 預縮之 IC₅₀ 有意義小於 isopetasin，然而 petasin 對 carbachol 預縮的之 IC₅₀ 則無意義地與 isopetasin 之 IC₅₀ 有所差別，此外，*S*-petasin 對 carbachol 或 KCl 預縮的之 IC₅₀ 亦無意義地與 *S*-isopetasin 之 IC₅₀ 有所差別 (Table 1)。

二. 預防天竺鼠氣管的收縮

當累積加入 histamine (0.01–1000 μ M) 或 carbachol (0.001–1000 μ M) 能產生劑量依存性之收縮。與對照組比較，除了 *S*-isopetasin (50–200 μ M) 使 carbachol 之對數濃度–反應曲線平行向右移動，且不改變其最大收縮，顯示其抑制作用為競爭性 (Figures 3D)，*S*-isopetasin (100–200 μ M) 預處理不能使 histamine 之對數濃度–反應曲線呈濃度依存性地抑制，但會抑制最大收縮，顯示其抑制作用為非競爭性 (Figure 3C)，此外，*S*-petasin (20–200 μ M) 預處理能使 histamine 或 carbachol 之對數濃度–反應曲線向右移動，且能有意義地抑制其最大收縮，顯示其抑制作用為非競爭性 (Figure 3A,B)，比較 *S*-petasin 或 *S*-isopetasin 對這二種收縮劑的 pD₂' 值或 pA₂ 值，發現 *S*-petasin 對 histamine 的 pD₂' 值有意義地大於 *S*-isopetasin 對 histamine 的 pD₂' 值，但對 carbachol 的 pD₂' 值有意義地小於後者對 carbachol 的 pA₂ 值 (Table 2)，後者之 Schild 直線方程式是 $y = 6.56 + 1.30x$ ($r = 0.9626$)，其斜率為 1.299 ± 0.232 (n=6)，與 unity 比無意義差，參照藥 atropine 對 carbachol 的 pA₂ 值有意義地大於 *S*-isopetasin 對 carbachol 的 pA₂ 值 (Table 2)。

三. 抑制鈣離子流入

在無鈣並以 histamine (100 μ M) 或 carbachol (10 μ M) 去極化之天竺鼠氣管，外加鈣離子引起的收縮，*S*-petasin (50–200 μ M) 與對照組比較亦有明顯之非競爭性抑制作用 (Figure 4)，對二者的 $-\log IC_{50}$ 值分別為 3.76 ± 0.32 (n=6)，及 4.05 ± 0.07 (n=5) (Table 2)。

在等張高鉀 (60 mM) 無鈣之去極化天竺鼠氣管，因外加鈣離子引起的收縮，nifedipine (1 μ M) 幾乎可以完全抑制，*S*-petasin (20–200 μ M) 或 *S*-isopetasin

(10–200 μM) 與對照組比較亦有明顯之非競爭性抑制作用 (Figure 4), 二者的 $-\log\text{IC}_{50}$ 值分別為 4.50 ± 0.31 ($n=6$)、 4.82 ± 0.15 ($n=6$) (Table 2)。

四. 抑制內鈣釋放

在無鈣並含 0.02 mM EGTA 之 Krebs 溶液中, *S*-petasin (50–200 μM) 對於 histamine 或 carbachol 引起內鈣釋放而收縮之對數濃度–反應曲線向右移動, 且能有意義地抑制其最大收縮, 顯示其抑制作用為非競爭性 (Figure 5)。

五. 與鈣離子通道阻斷劑之相互作用

以 carbachol (0.2 μM) 預縮, nifedipine (10 μM) 會造成大約 $24 \pm 10\%$ ($n=6$) 之鬆弛作用, 而 *S*-petasin (100 μM) 或 *S*-isopetasin (100 μM) 加入後分別產生 $80 \pm 9\%$ ($n=6$) 或 $72 \pm 8\%$ ($n=6$) 的更大鬆弛作用, 最後 aminophylline (1 mM) 能使其完全鬆弛 (Figure 6)。

六. 是否活化 β -adrenoceptor

Propranolol (1 μM) 能使 isoprenaline 之對數濃度–反應曲線平行向右移動(數據保留), 但 propranolol (1 μM) 存在並不影響 *S*-petasin 或 *S*-isopetasin 對 histamine (10 μM) 預縮之對數濃度–反應曲線 (Figure 7)。

七. Adenylate 或 guanylate cyclase 抑制劑是否影響其鬆弛作用

DDA (10 μM) 或 methylene blue (25 μM) 並不影響 *S*-petasin 或 *S*-isopetasin 對 histamine (10 μM) 預縮之對數濃度–反應曲線 (Figures 8, 9)。

八. 是否與ATP - 敏感的鉀離子通道開啟有關

Glibenclamide (10 μM) 能使 cromakalim 之對數濃度–反應曲線平行向右移動(數據保留), 但 glibenclamide (10 μM) 並不影響 *S*-petasin 或 *S*-isopetasin 對 histamine (10 μM) 預縮之對數濃度–反應曲線 (Figure 10)。

九. Nitric oxide synthase 抑制劑是否影響其鬆弛作用

N^{ω} -nitro-L-arginine (20 μM) 並不影響 *S*-petasin 或 *S*-isopetasin 對 histamine (10 μM) 預縮之對數濃度–反應曲線 (Figure 11)。

十. Proteolytic enzyme 是否影響其鬆弛作用

α -Chymotrypsin (1 U/ml) 並不影響 *S*-petasin 或 *S*-isopetasin 對 histamine (10 μM) 預縮之對數濃度–反應曲線 (Figure 12)。

十一. 是否影響 adenylate 或 guanylate cyclase 活化劑之鬆弛作用

S-petasin (10–20 μ M) 或 *S*-isopetasin (10–20 μ M) 雖能使 forskolin 及 sodium nitroprusside 的對數濃度—反應曲線呈濃度依存性地向左移動，但不能有意義地增加 forskolin 及 sodium nitroprusside 的 pD_2 值 (Figures 13, 14; Table 3)。

十二. 對 phosphodiesterase 的抑制作用

S-petasin (100–300 μ M) 雖然能有意義地抑制 cAMP-PDE，但當濃度為 100 μ M 與 300 μ M 時，其抑制率分別是 $33.9 \pm 6.1\%$ ($n=5$) 和 $33.2 \pm 4.4\%$ ($n=6$)，僅呈現輕微的抑制作用，而 *S*-isopetasin (30–300 μ M) 對 cAMP-PDE 活性則無抑制作用。至於對 cGMP-PDE 活性，兩者都無抑制作用 (Figure 15)。

肆. 討論

我們分析由台灣款冬 (*Petasites formosanus* Kitamura) 所抽提的 petasins 類化合物，包括 petasin、isopetasin、*S*-petasin 與 *S*-isopetasin 對 histamine (10 μ M)、carbachol (0.2 μ M)、KCl (30 mM) 及 leukotriene D_4 (10 nM) 預縮的離體天竺鼠氣管產生鬆弛作用，所得之對數濃度—反應曲線及 IC_{50} (Figure 2, Table 1)，顯示 *S*-isopetasin 對 carbachol 和 KCl 預縮的鬆弛作用較具選擇性，且作用甚強，其 IC_{50} 在 10 μ M 左右，其餘對此四種收縮劑的鬆弛活性沒有特殊的選擇性，但以 *S*-petasin 作用最強，其 IC_{50} 也均在 10 μ M 左右 (Table 1)，就構造—活性關係而言，含有硫原子的 petasins 對氣管的鬆弛活性比沒有硫原子的 petasins 要強，不安定的 petasin 同分異構化 (isomerization) 成安定的 isopetasin，雖然曾被報告有可能會增加 *Petasites hybridus* 提取物對 leukotriene 生合成的抑制作用 (Bickle et al., 1994)，但本結果對同分異構化的影響不明，*S*-isopetasin 對 histamine 及 leukotriene D_4 所引起的預縮沒有作用，而 *S*-petasin 對它們的預縮卻有很強的鬆弛作用，原因依照不明。

上述 petasins 化合物中，我們選擇鬆弛作用最強的 *S*-petasin 和 *S*-isopetasin 來進一步探討其鬆弛作用的可能機轉。由於鈣離子對平滑肌收縮的調控扮演著非常重要的角色，而致效藥 (agonist) 如 histamine 或 carbachol 引起的收縮作用一般有兩相 (biphasic)，即瞬間收縮 (phasic contraction) 和持續收縮 (tonic contraction) (Bolton, 1979)，前者由細胞內鈣離子釋放所造成，不同的收縮藥利用不同的鈣貯藏 (Foster et al., 1983; Goodman et al., 1987; Chidekel & Anireddy, 1991)；後者由細胞外鈣離子經 voltage dependent calcium channels (VOC) 及/或 receptor operated calcium channels (ROC) 內流所造成 (Creese & Denborough, 1981; van Breemen et al., 1982; Putney, 1986; Bauer et al., 1991; Matyas et al., 1995)。除了 *S*-isopetasin 對 carbachol 累加收縮呈現競爭性的對抗 (Figure 3D) 外，*S*-petasin 對預防 histamine、carbachol 或 KCl 累加收縮，呈現非競爭性的抑制 (Figures 3A,B,C)，*S*-isopetasin 對抗 carbachol 累加收縮的 pA_2 值有意義地大於對其他收縮劑的 pD_2' 值，也大於 *S*-petasin 對 carbachol 的 pD_2' 值 (Table 2)，表示 *S*-isopetasin 所具的抗毒蕈素作用 (antimuscarinic effect) 可能是造成氣管鬆弛的主要原因，在無鈣 0.02 mM EGTA 的存在下，*S*-petasin 對 carbachol 及 histamine 引起的收縮呈現非競爭性的抑制 (Figure 5)，顯示對內鈣釋放也有抑制作用，在等張高鉀 (60 mM) 無鈣溶液中，外加鈣引起的收縮一般相信是外鈣經由 VOC

流入而引起 (Godfraind et al., 1986 ; Putney, 1990) , 與 KCl 單獨引起的持續收縮機轉相同。 *S*-petasin 或 *S*-isopetasin 呈現濃度依存性但非競爭性地抑制外加 Ca^{2+} 所引起的收縮 (Figure 4) , 並且能對 nifedipine 10 μ M (Tsien, 1990) 造成的抑制作用 , 產生進一步的鬆弛 (Figure 6) , 顯示 *S*-petasin 或 *S*-isopetasin 不管是否抑制 VOC , 一定還有其它鬆弛機轉。

S-petasin 或 *S*-isopetasin 的鬆弛作用不被 β -adrenoceptor 之拮抗劑 propranolol 1 μ M 所影響 (Figure 7) , 顯示其作用並非活化 β -adrenoceptor 所導致。 *S*-petasin 或 *S*-isopetasin 的鬆弛作用也不被 adenylate cyclase 抑制劑 2',5'-dideoxyadenosine (Johnson et al., 1989 ; Sabouni et al., 1991) 或 guanylate cyclase 抑制劑 methylene blue (Gruetter et al., 1981) 所影響 (Figures 8-9) , 顯示他們的作用機轉可能與 adenylate cyclase (Katsuki & Murad, 1977) 或 guanylate cyclase (Diembycz & Raeburn, 1991) 的活化無關。 *S*-petasin 或 *S*-isopetasin 的鬆弛作用也無法被 ATP- 敏感的鉀通道抑制劑 glibenclamide 10 μ M (Murray et al., 1989) 所影響 (Figure 10) , 顯示 *S*-petasin 或 *S*-isopetasin 造成鬆弛作用的機轉可能與 ATP- 敏感的鉀通道無關 (Allen et al., 1986 ; Cook, 1988 ; Raeburn & Brown, 1991 ; Lin et al., 1993) 。許多研究報告指出 , 呼吸道上皮細胞能夠釋放 epithelium-derived relaxing factor (EpDRF) , 來調節呼吸道平滑肌的反應 , 而目前確知至少有 NO 和 VIP (Barnes et al., 1985 ; Hay et al., 1986 ; Holroyde, 1986 ; Goldie et al., 1990 ; Morrison et al., 1990) , 由我們的實驗結果顯示 , 不管是 NO synthase 抑制劑 N^{ω} -nitro-L-arginine (20 μ M) 或是會分解 VIP 的 peptidase α -chymotrypsin (1 U/ml) , 皆不影響 *S*-petasin 或 *S*-isopetasin 的鬆弛反應 (Figures 11, 12) , 顯示其鬆弛作用似乎與 NO 或 VIP 的釋放無關。

不論是 *S*-petasin 或 *S*-isopetasin (10 - 20 μ M) , 雖能使 forskolin 或 sodium nitroprusside 的對數濃度-反應曲線向左平行移動 , 亦不使 forskolin 或 sodium nitroprusside 的 pD_2 值產生有意義的增加 (Figures 13, 14; Table 3) , 因此推測 *S*-petasin 或 *S*-isopetasin 的鬆弛機轉 , 和抑制 cAMP- 或 cGMP-dependent PDE 而造成 cAMP 或 cGMP 的增加無關 (Schultz et al., 1977 ; Seamon et al., 1983 ; Lorenz & Wells, 1983 ; Suzuki et al., 1986 ; Diembycz & Raeburn, 1991 ; Torphy & undem, 1991 ; Zhou & Torphy, 1991) , 雖然 *S*-petasin (100 及 300 μ M) 對 cAMP-dependent PDE 的活性有意義地抑制 , 但是其抑制作用卻無法達到 40 % , *S*-isopetasin (30 - 300 μ M) 無法抑制此酵素。二者也都無法抑制 cGMP-dependent PDE 的活性 (Figure 15) , 很明顯地表示二者引起氣管平滑肌鬆弛的作用並非來自抑制 cAMP- 或 cGMP-dependent PDE 的活性 , 僅 *S*-petasin 對 cAMP-dependent PDE 活性輕微地抑制作用。

綜合以上結果 , 可以得知 , 從結構-活性的關係來看 , 含有硫原子的 petasins (*S*-petasin 與 *S*-isopetasin) 對氣管的鬆弛作用 比沒有硫原子的 petasins (petasin 和 isopetasin) 要強。 *S*-petasin 使氣管鬆弛的可能機轉 , 主要抑制內鈣釋放及外鈣內流及輕微的 cAMP-PDE 抑制作用 , 是一種 non-specific antispasmodic , 另一方面 , *S*-isopetasin 造成氣管鬆弛的可能機轉主要是來自抗毒蕈素作用 (antimuscarinic effect)。

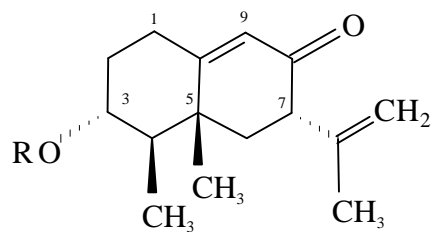
致謝: 作者感謝國科會專題研究計劃 NSC89-2320-B038-003 的經費支持。

伍. 參考文獻

- ALLEN, S.L., BOYLE, J.P., CORTLJO, J., FORSTER, R.W., MORGAN, G.P. & SMALL, R.C. (1986). Electrical and mechanical effects of BRL 34915 in guinea pig isolated trachealis. *Br. J. Pharmacol.*, **89**, 395-405.
- ARIENS, E.J. & VAN ROSSUM, J.M. (1957). pD_x, pA_x and pD'_x value in the analysis of pharmacodynamics. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, **110**, 275-299.
- BARNES, P.J., CUSS, F.M. & PALMER, J.B. (1985). The effect of airway epithelium on smooth muscle contractility in bovine trachea. *Br. J. Pharmacol.*, **86**, 685-691.
- BARNES, P.J. (1997). Current therapies for asthma. *Chest*, **111**, 17s-26s.
- BAUER, V., HOLZER, P. & ITO, Y. (1991) Role of extra- and intracellular calcium in the contractile action of agonists in the guinea-pig ileum. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **343**, 58-64.
- BELVISI, M.G., MIURA, M., STRETTON, D. & BARNES, P.J. (1993). Endogenous vasoactive intestinal peptide and nitric oxide modulate cholinergic neurotransmission in guinea-pig trachea. *Eur. J. Pharmacol.*, **231**, 97-102.
- BICKEL, D., RÖDER, T., BESTMANN, H.J. & BRUNE, K. (1994). Identification and characterization of inhibitors of peptido-leukotriene-synthesis from *Petasites hybridus*. *Planta. Med.*, **60**, 318-322.
- BOLTON, T.R. (1979). Mechanism of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol. Rev.*, **59**, 606-718.
- BRUNE, K., BICKEL, D. & PESKAR, B.A. (1993). Gastro-protective effects by extracts of *Petasites hybridus*: the role of inhibition of peptido-leukotriene synthesis. *Planta. Med.*, **59**, 494-496.
- CHIDEKEL, E.W. & ANIREDDY, D.R. (1991). Effect of caffeine on tone and intracellular Ca⁺² release in guinea-pig and human trachealis. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, **311**, 166-176.
- COOK, N.S. (1988). The pharmacology of potassium channels and therapeutic potential. *Trends Pharmacol. Sci.*, **9**, 21-28.
- COOK, S.J., ARCHER, K., MARTIN, A., BUCHHEIT, K.H., FOZARD, J.R., MULLER, T., MILLER, A.J., ELLIOTT, K.R.F., FOSTER, R.W. & SMALL, R.C. (1995). Further analysis of mechanisms underlying the tracheal relaxant action of SCA40. *Br. J. Pharmacol.*, **114**, 143-151.
- CREESE, B.R. & DENBOROUGH, M.A. (1981). Sources of calcium for contraction of guinea-pig isolated tracheal smooth muscle. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **8**, 175-182.
- DIEMBYCZ, M.A. & RAEBURN, D. (1991). Putative substrates for cyclic nucleotide-dependent protein kinases and the control of airway smooth muscle tone. *J. Auton. Pharmacol.*, **11**, 365-398.
- ELLIS, J.L. & FARMER, S.G. (1989). The effects of VIP antagonists, and peptide histidine isoleucine antisera on non-adrenergic, non-cholinergic relaxations of tracheal smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.*, **96**, 513-520.
- EXTON, J.H. (1994). Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1212**, 26-42.
- FOSTER, R.W., SMALL, R.C. & WESTON, A.H. (1983). The spasmogenic action of potassium chloride in guinea-pig trachealis. *Br. J. Pharmacol.*, **80**, 553-559.
- GODFRAND, T., MILLER, R. & WIBO, M. (1986). Calcium antagonism and calcium entry blockade. *Pharmacol. Rev.*, **38**, 321-416.

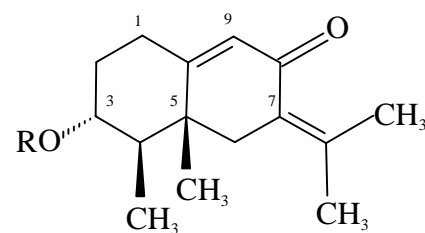
- GOLDIE, R.G., FERNANDES, L.B., FARMER, S.G. & HAY, D.W. (1990). Airway epithelium-derived inhibitory factor. *Trends Pharmacol. Sci.*, **11**, 67-70.
- GOODMAN, F.R., WEISS, G.B., KARAKI, H. & NAKAGAWA, H. (1987). Differential calcium movements induced by agonists in guinea-pig tracheal muscle. *Eur. J. Pharmacol.*, **133**, 111-117.
- GROSS, N.J. & SKORODIN, M.S. (1984). Anticholinergic, antimuscarinic bronchodilators. *Am. Rev. Respir. Dis.* **129**, 856-890.
- GRUETTER, C.A., KODOWITZ, P.J. & IGNARRO, L. (1981). Methylene blue inhibits coronary arterial relaxation and guanylate cyclase activation by nitroglycerine, sodium nitrate and amyl nitrite. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **59**, 150-156.
- HAY, W.P., FARMER, S.G., RAEBURN, D., ROBINSON, V.A. & FLEMING, W.W. (1986). Airway epithelium modulates the reactivity of guinea-pig respiratory smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.*, **129**, 11-18.
- HOLROYDE, M.C. (1986). The influence of epithelium on the responsiveness of guinea pig isolated trachea. *Br. J. Pharmacol.*, **87**, 501-507.
- HOROWITZ, A., MENICE, C.B., LAPORTE, R. & Morgan, K.G. (1996). Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol. Rev.*, **76**, 967-1003.
- JOHNSON, R.A., YEUNG, S. - M.H. STUBNER, D., BUSHFIELD, M. & SHOSHANI, I. (1989). Cation and structural requirements for P site- mediated inhibition of adenylate cyclase. *Mol. Pharmacol.*, **35**, 681-688.
- KATSUKI, S. & MURAD, F. (1977). Regulation of adenosine cyclic 3',5'-monophosphate and guanosine cyclic 3',5'-monophosphate levels and contractility in bovine tracheal smooth muscle. *Mol. Pharmacol.*, **13**, 330-341.
- LIN, C.H., KO, F.N., WU, C.Y., LU, S.T. & TENG, C.M. (1993). The relaxant action on guinea pig trachealis of atherosperminine isolated from *Fissistigma glaucescens*. *Eur. J. Pharmacol.*, **237**, 109-116.
- LORENZ, K.L. & WELLS, J.N. (1983). Potentiation of the effects of sodium nitroprusside and of isoproterenol by selective phosphodiesterase inhibitors. *Mol. Pharmacol.*, **23**, 424-430.
- MAK, J.C.W. & BARNES, P.J. (1990). Autoradiographic visualization of muscarinic receptor subtypes in human and guinea pig lung. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **141**, 1559-1568.
- MATYAS, S., PUCOVSKY, V. and BAUER, V.(1995). Involvement of different Ca²⁺ source in changes of responsiveness of guinea-pig trachea to repeated administration of histamine and acetylcholine. *Gen. Physiol. Biophys.*, **14**, 51-60.
- MORRISON, K.J., GAO, Y. & VANHOUTTE, P.M. (1990). Epithelial modulation of airway smooth muscle. *Am. J. Physiol.*, **258**, L254-L262.
- MURRAY, M.A., BOYLE, J.P. & SMALL, R.C. (1989). Cromakalim- induced relaxation of guinea pig isolated trachealis: Antagonism by glibenclamide and by phentolamine. *Br. J. Pharmacol.*, **98**, 856-874.
- MURRAY, R.K. & KOTLIKOFF, M.I. (1991). Receptor-activated calcium influx in human airway smooth muscle cells, *J. Physiol.* , **435**, 123-144.
- PUTNEY, J.W. JR. (1986). A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium*, **7**, 1-12.
- PUTNEY, J.W. JR. (1990). Capacitative calcium entry revisited. *Cell. Calcium*, **11**, 611-624.
- RAEBURN, D. & BROWN, T.J. (1991). RP 49356 and cromakalim relax airway smooth muscle in vitro by opening a sulphonylurea-sensitive K⁺ channel: a comparison with nifedipine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **256**, 480-485.

- RODGER, I.W. (1992). Airway smooth muscle. *Br. Med. Bull.*, **48**, 97-107.
- SASAKI, S.I. (1924). *Taiwan minkan yakyo shoukubustu shi (a manual of the medicinal plants of flormosa)* Kobun Kan, Taipei. Taiwan, Appendix p9.
- SABOUNI, M.H., CUSHING, D.J., MAKUJINA, S.R. & MUSTAFA, S.J. (1991). Inhibition of adenylate cyclase attenuates adenosine receptor-mediated relaxation in coronary artery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **254**, 508-512.
- SCHRAMM, C.M. & GRUNSTEIN, M.M. (1992). Assessment of signal transduction mechanisms regulating airway smooth muscle contractility. *Am. J. Physiol.*, **262**, L119-L139.
- SCHULTZ, K., SCHULTZ, K. & SCHULTZ, G. (1977). Sodium nitroprusside and other smooth muscle-relaxants increase cyclic GMP levels in rat ductus deferens. *Nature*, **265**, 750-751.
- SEAMON, K.B., DALY, J.W., METZGER, H., DE SOUZA, N.J. & REDEN, J. (1983). Structure-activity relationships for activation of adenylate cyclase by the diterpene forskolin and its derivatives. *J. Med. Chem.*, **26**, 436-439.
- SUZUKI, K., TAKAGI, K., SATAKE, T., SUGIYAMA, S. & OZAWA, T. (1986). The relationship between tissue levels of cyclic GMP and tracheal smooth muscle relaxation in the guinea pig. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **13**, 39-46.
- THOMPSON, W.J. & APPLEMAN, M.M. (1971). Multiple cyclic nucleotide phosphodiesterase activities from rat brain. *Biochemistry*, **10**, 311-316.
- TORPHY, T.Y. & UNDEM, B.J. (1991). Phosphodiesterase inhibitor: new opportunities for the treatment of asthma. *Thorax*, **46**, 512-523.
- TORPHY, T.H., ZHENG, C., PETERSON, S.M., FISCUS, R.R., RIARD, G.A. & MAYER, S.E. (1985). Inhibitory effect of methacholine on drug-induced relaxation, cyclic AMP accumulation, and cyclic AMP-dependent protein kinase activation in canine tracheal smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **233**, 409-417.
- TSIEN, R.W. & TSIEN, Y.Y. (1990). Calcium channels, stores, and oscillations. *Annu. Rev. Cell Biol.*, **6**, 715-760.
- VAN BREEMEN, C., AARONSON, P., LOUTZENHISER, R. & MEISHERI, K. (1982). Calcium fluxes in isolated rabbit aorta and guinea pig tenia coli. *FASEB J.*, **41**, 2891-2897.
- VAN DEN BRINK, F.G. & LIEN, E.J. (1977). pD₂-, pA₂- and pD₂'-value of a series of compounds in a histamine and a cholinergic system. *Eur. J. Pharmacol.*, **44**, 251-270.
- WANG, G.J., LIN, Y.L., HSU, S.Y. & CHEN, C.F. (1998). Effects of petasin, an antihypertensive sesquiterpene from *Petasites formosanus*, on intracellular calcium concentration in rat thoracic aorta. *Abstr. 13th Joint Ann. Conf. Biom. Sci., Taipei*, p44.
- WEISS, R.F. (1983). Praktische anwendung von hustenmitteln. *Arzte naturheil verfahren*, **24**, 36-40.
- ZHOU, H.L. & TORPHY, T.J. (1991). Relationship between cyclic guanosine monophosphate accumulation and relaxation of canine trachealis induced by nitrovasodilator. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **258**, 972-978.



Petasin : $R = \text{COC}(\text{CH}_3)\overset{Z}{=}\text{CH}(\text{CH}_3)$

S-petasin : $R = \text{COCH}\overset{Z}{=}\text{CH}(\text{SCH}_3)$



Isopetasin : $R = \text{COC}(\text{CH}_3)\overset{Z}{=}\text{CH}(\text{CH}_3)$

S-isopetasin : $R = \text{COCH}\overset{Z}{=}\text{CH}(\text{SCH}_3)$

Fig. 1 Structures of petasins, isolated from *Petasites formosanus* Kitamura

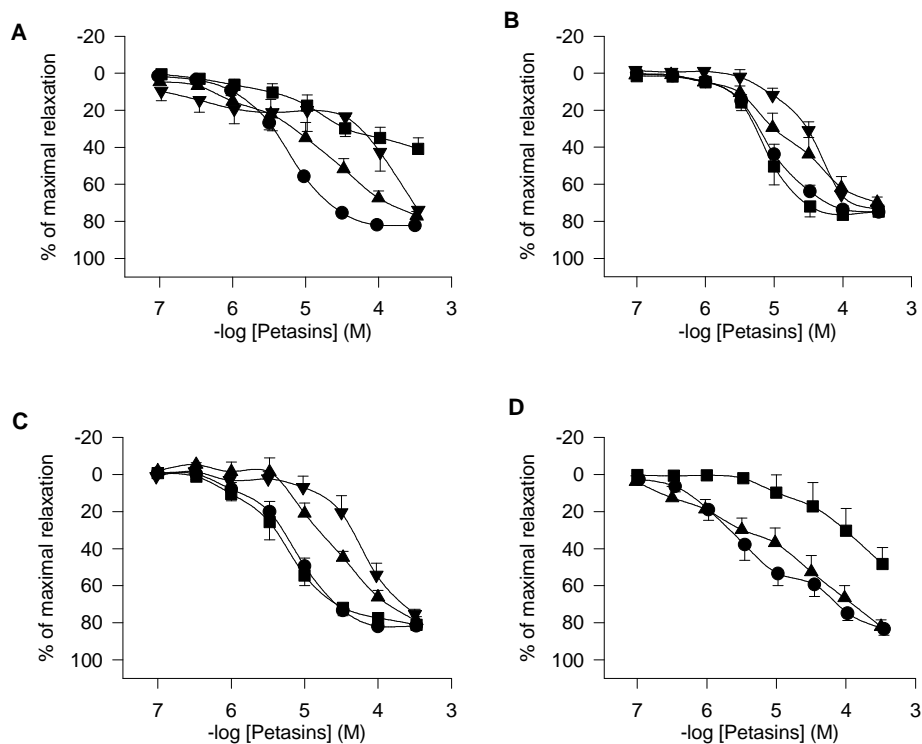


Fig. 2 The log concentration-response curves of *S*-petasin (○), *S*-isopetasin (△), petasin (□) and isopetasin (◇) in guinea pig trachealis precontracted with 10 μM histamine (A), 0.2 μM carbachol (B), 30 mM KCl (C) and 10 nM leukotriene D₄ (D). Each point represents the mean ± SEM. of 4-8 experiments. The relaxation level of 1 mM aminophylline, added at the end of experiment, was set as 100% of maximum relaxation.

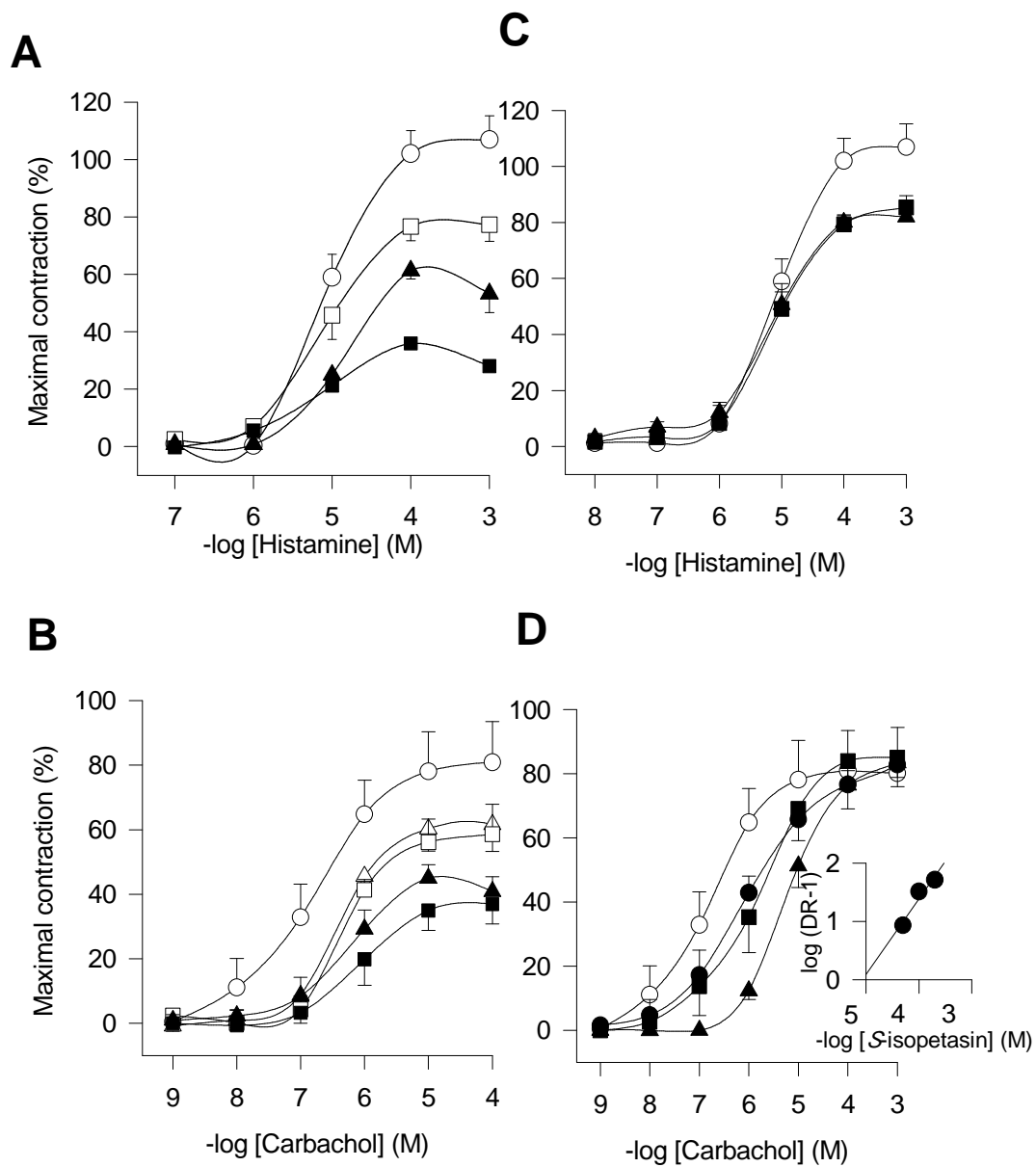


Fig. 3 The inhibitory effects of *S*-petasin (A, B) and *S*-isopetasin (C, D) (□, vehicle; ○, 10 μM; △, 20 μM; ■, 50 μM; ●, 100 μM; ▲, 200 μM) on cumulative histamine (A, C)-, and carbachol (B, D)-induced contractions in guinea-pig trachealis in normal Krebs solution. Each point represents the mean±SEM of 4-11 experiments. The relationship between -log concentration of *S*-isopetasin and log (DR-1), where DR is the dose ratio, is shown in the inset.

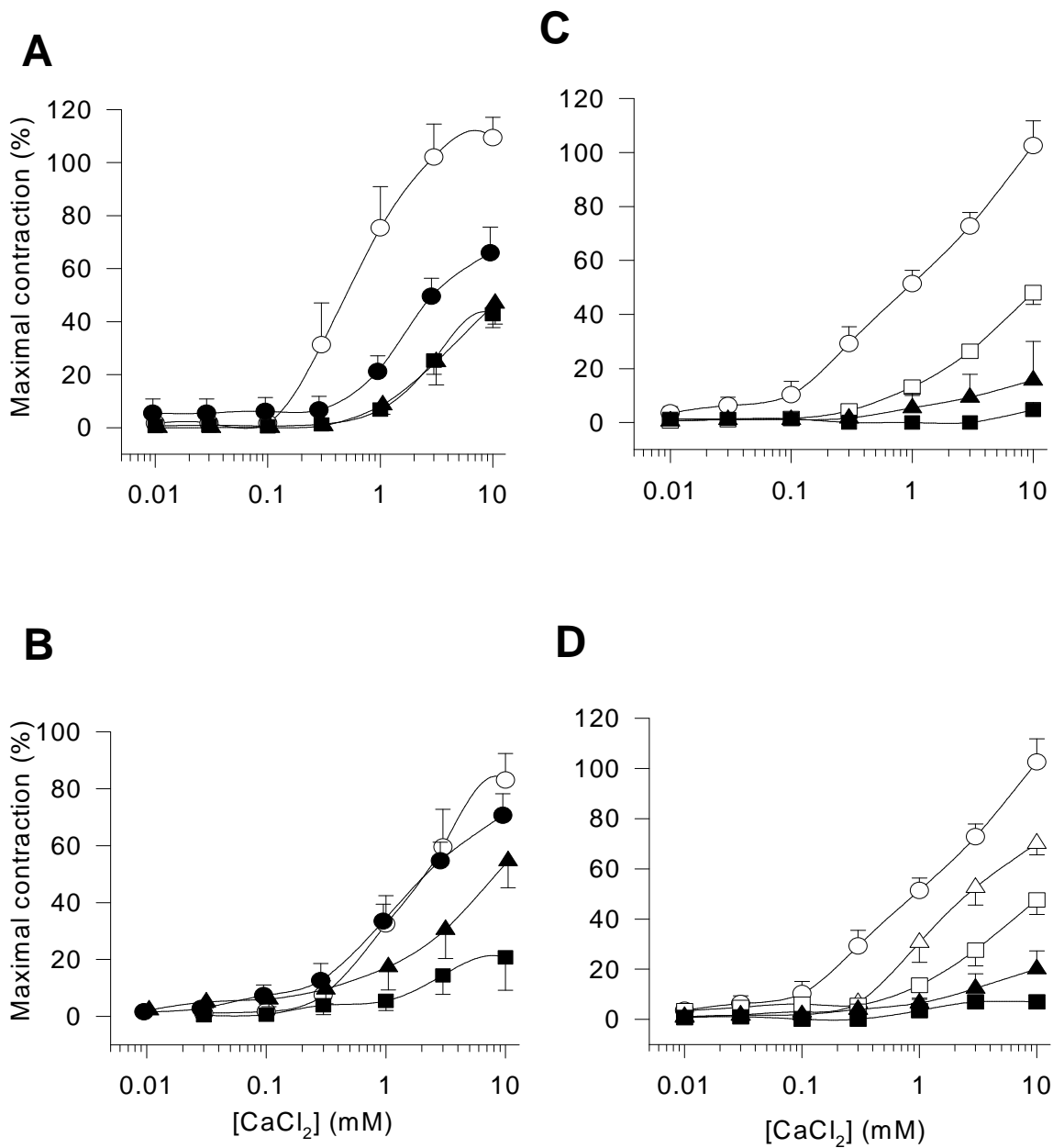


Fig. 4 The inhibitory effects of *S*-petasin (A, B, C) and *S*-isopetasin (D) (○, vehicle; ●, 10 μM; ◻, 20 μM; ▲, 50 μM; ◻, 100 μM; ◻, 200 μM) on cumulative calcium-induced contractions in guinea pig trachealis depolarized by (A) histamine 100 μM, (B) carbachol 10 μM, and (C, D) KCl 60 mM in Ca²⁺-free medium without EGTA. Each point represents the mean±SEM of 4-15 experiments.

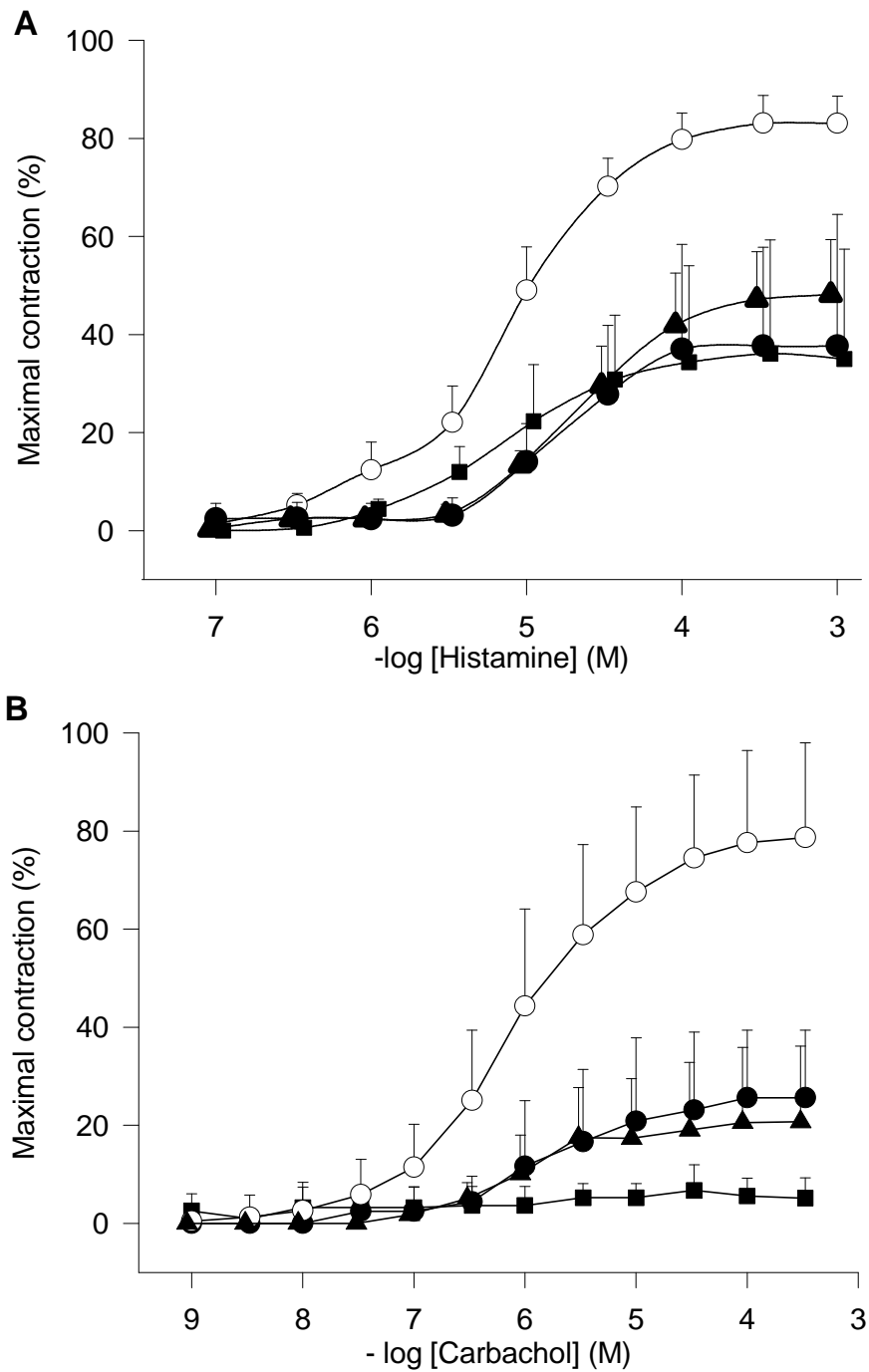


Fig. 5 The inhibitory effects of *S*-petasin (○, vehicle; ●, 50 μM; ▲, 100 μM; ■, 200 μM) on cumulative (A) histamine- and (B) carbachol-induced contractions in guinea pig trachealis in Ca²⁺-free medium with 0.02 mM EGTA. Each point represents the mean±SEM of 4-6 experiments.

Fig. 6 The tracing graph of relaxant effects of *S*-petasin and *S*-isopetasin on carbachol (CCh, 0.2 μ M)-induced precontraction in guinea-pig trachealis in normal Krebs solution. *S*-Petasin (100 μ M) or *S*-isopetasin (100 μ M), compared to their vehicle, further relaxed nifedipine (Nif, 10 μ M)-remaining tension. At the end of the experiment, aminophylline (AP, 1 mM) was added to completely relax the trachealis.

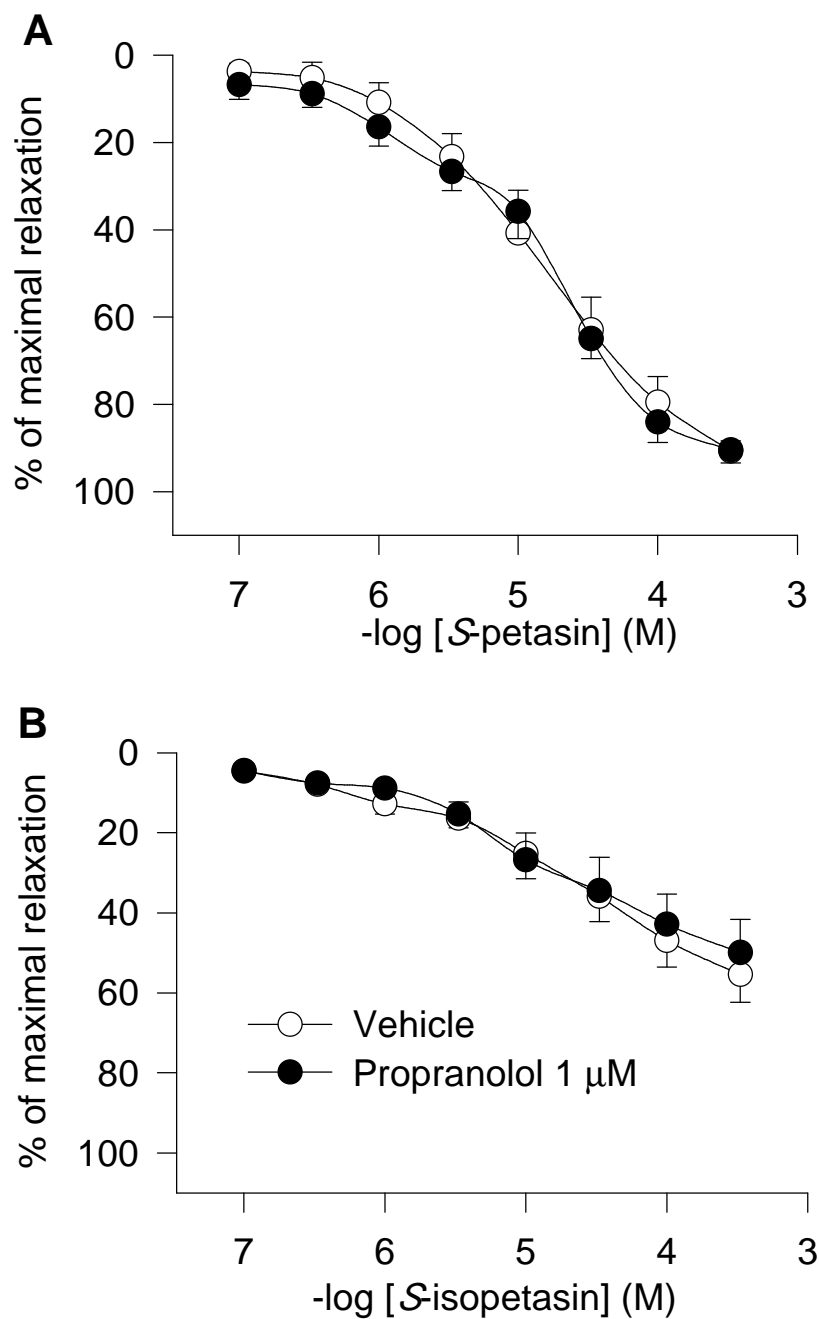


Fig. 7 The antagonistic effects of propranolol (1 μM) on the relaxant response of cumulative *S*-petasin (A) and *S*-isopetasin (B) to precontraction induced by histamine (10 μM) in guinea-pig trachealis. Each point represents mean ± SEM of 6 experiments. The relaxation of 1 mM aminophylline, added at the end of experiment, was set as 100 % of maximal relaxation.

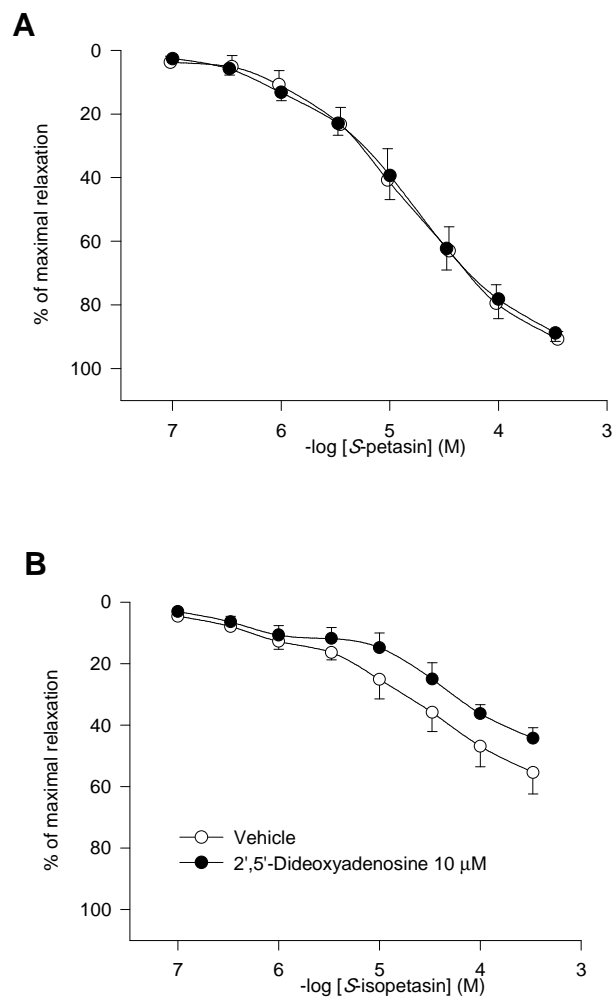


Fig. 8 The antagonistic effects of 2',5'-dideoxyadenosine (10 μM) on the relaxant response of cumulative *S*-petasin (A) and *S*-isopetasin (B) to precontraction induced by histamine (10 μM) in guinea-pig trachealis. Each point represents mean±SEM of 6 experiments. The relaxation of 1 mM aminophylline, added at the end of experiment, was set as 100 % of maximal relaxation.

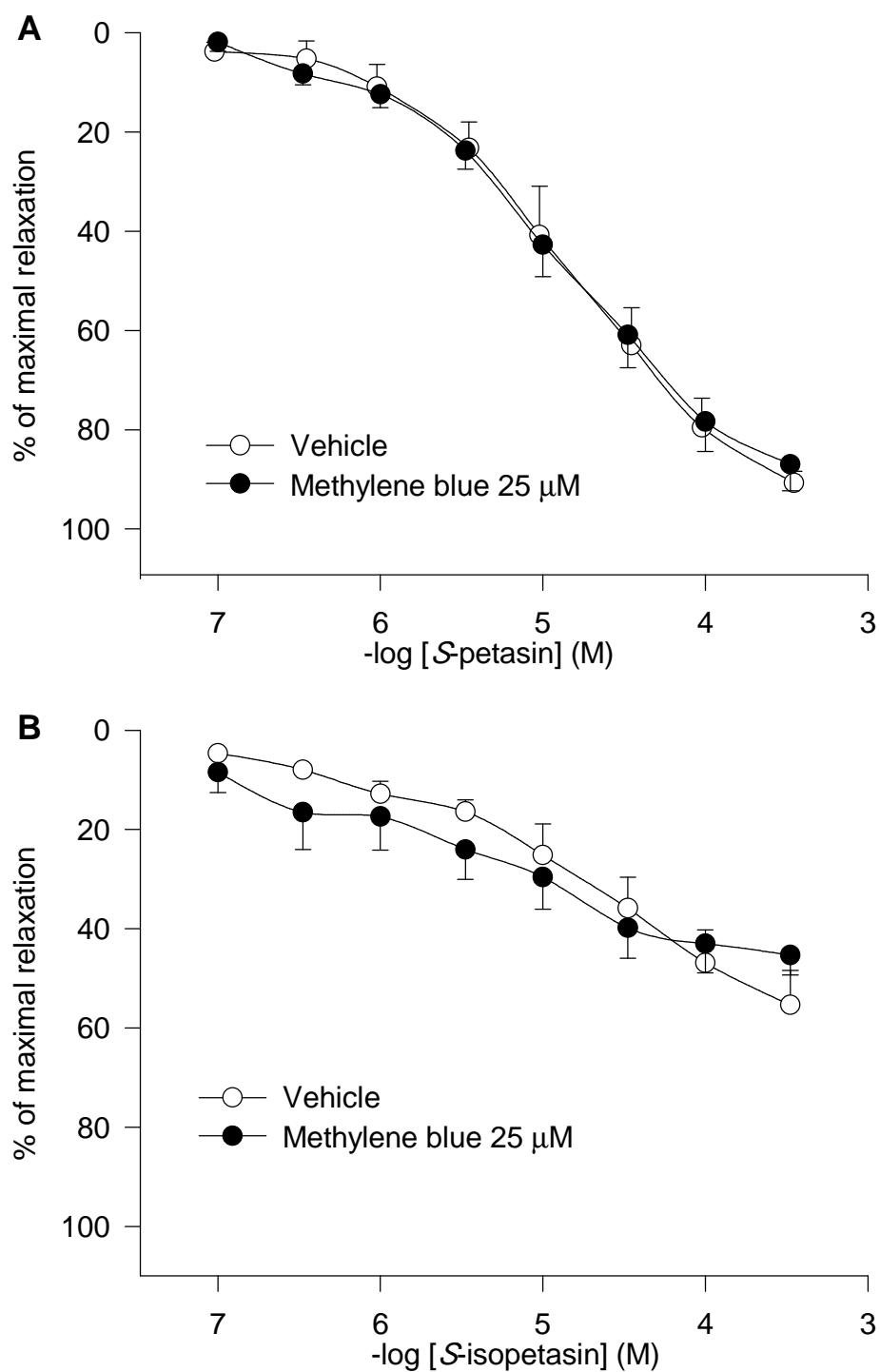


Fig. 9 The antagonistic effects of methylene blue (25 μ M) on the relaxant response of cumulative *S*-petasin (A) and *S*-isopetasin (B) to precontraction induced by histamine (10 μ M) in guinea-pig trachealis. Each point represents mean \pm SEM of 6 experiments. The relaxation of 1 mM aminophylline, added at the end of experiment, was set as 100 % of maximal relaxation.

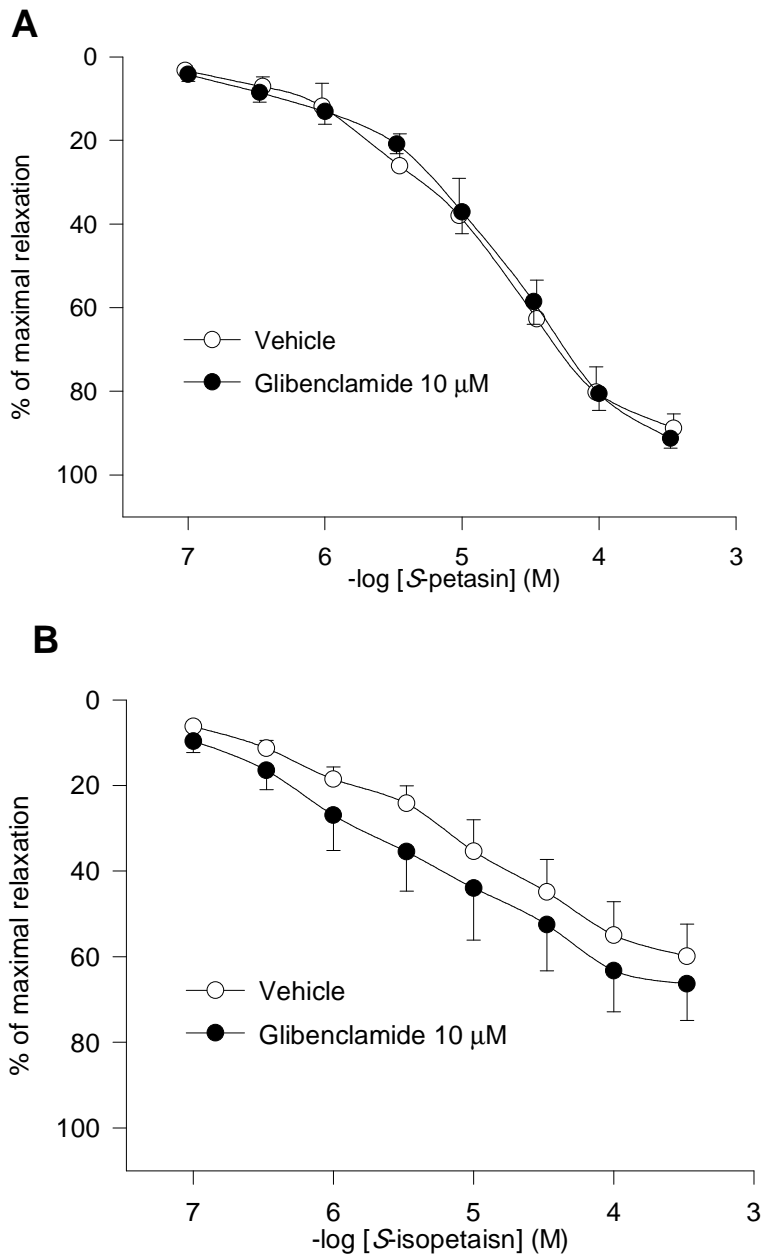


Fig. 10 The antagonistic effects of glibenclamide (10 μ M) on the relaxant response of cumulative *S*-petasin (A) and *S*-isopetasin (B) to precontraction induced by histamine (10 μ M) in guinea-pig trachealis. Each point represents mean \pm SEM of 6 experiments. The relaxation of 1 mM aminophylline, added at the end of experiment, was set as 100 % of maximal relaxation.

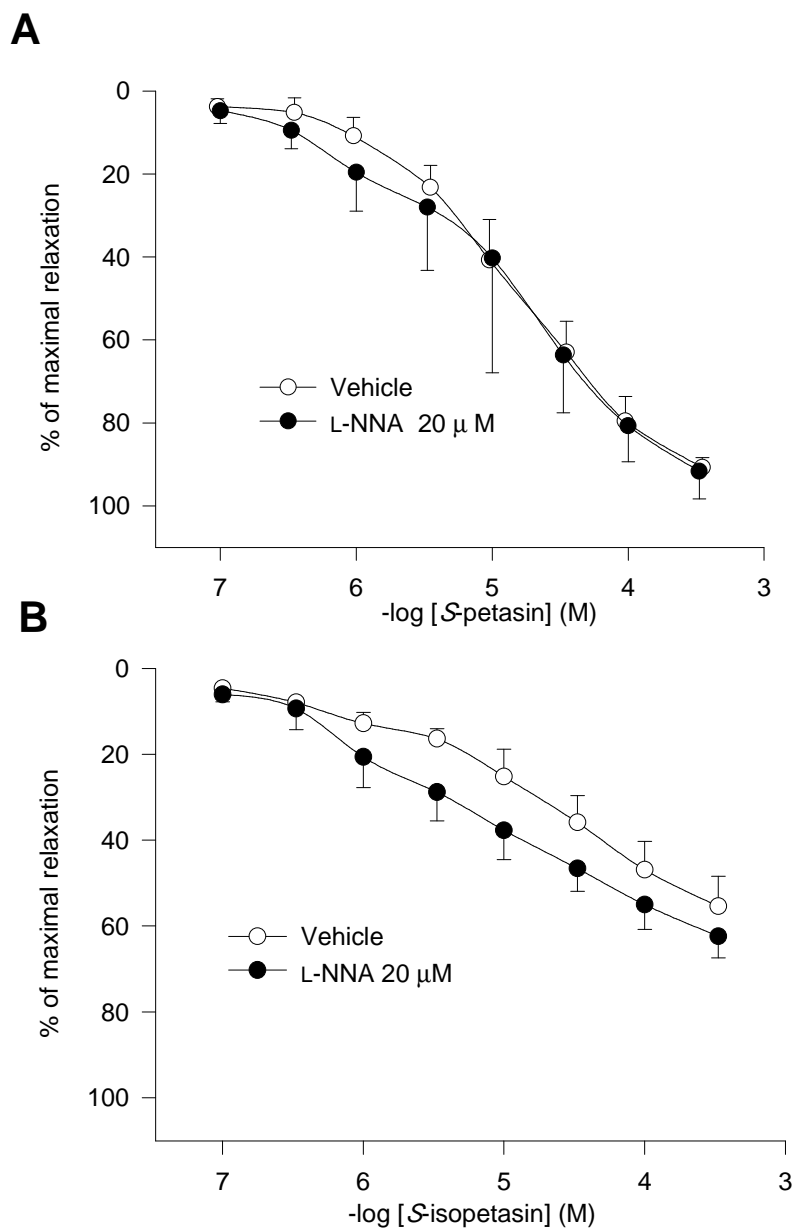


Fig. 11 The antagonistic effects of N^o-nitro-L-arginine (20 μM) on the relaxant response of cumulative *S*-petasin (A) and *S*-isopetasin (B) to precontraction induced by histamine (10 μM) in guinea-pig trachealis. Each point represents mean±SEM of 6 experiments. The relaxation of 1 mM aminophylline, added at the end of experiment, was set as 100 % of maximal relaxation.

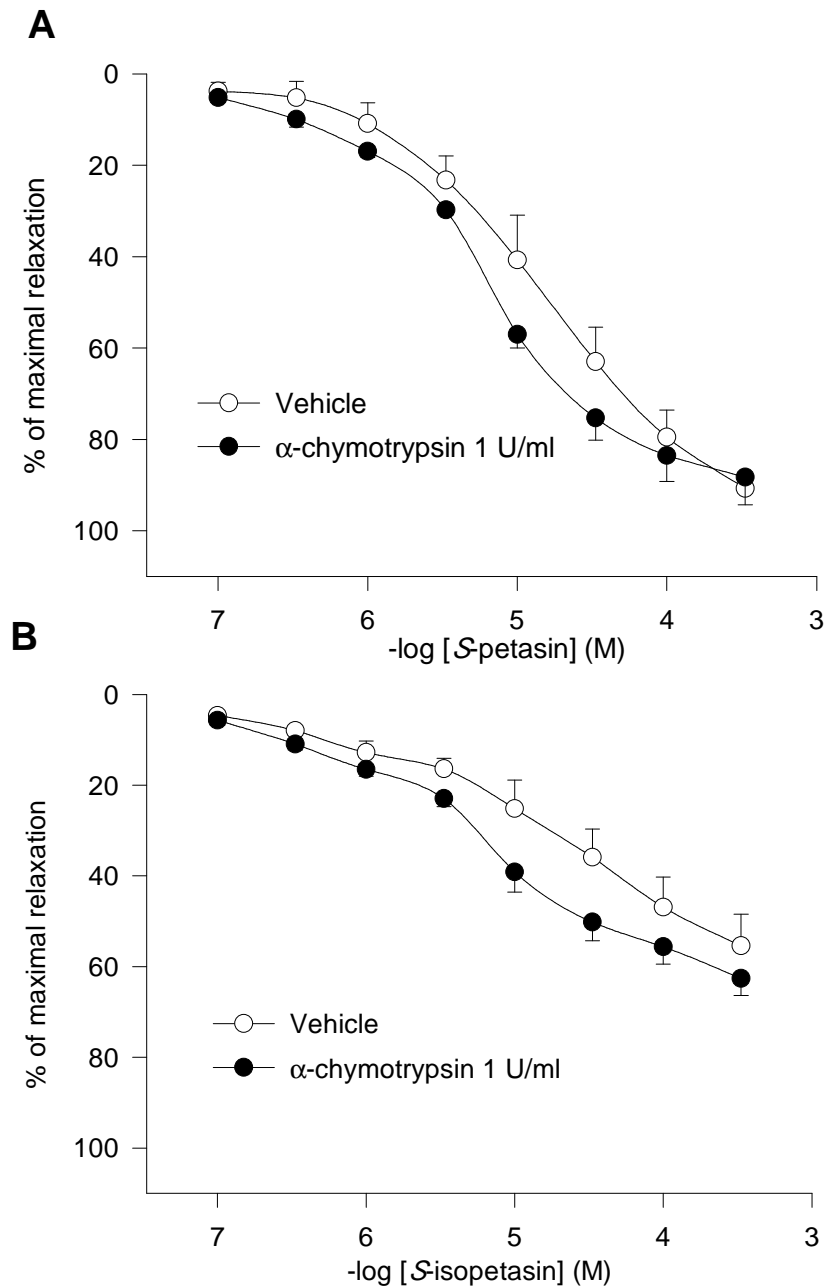


Fig. 12 The antagonistic effects of α -chymotrypsin(1 U/ml) on the relaxant response of cumulative *S*-petasin (A) and *S*-isopetasin (B) to precontraction induced by histamine (10 μ M) in guinea-pig trachealis. Each point represents mean \pm SEM of 6 experiments. The relaxation of 1 mM aminophylline, added at the end of experiment, was set as 100 % of maximal relaxation.

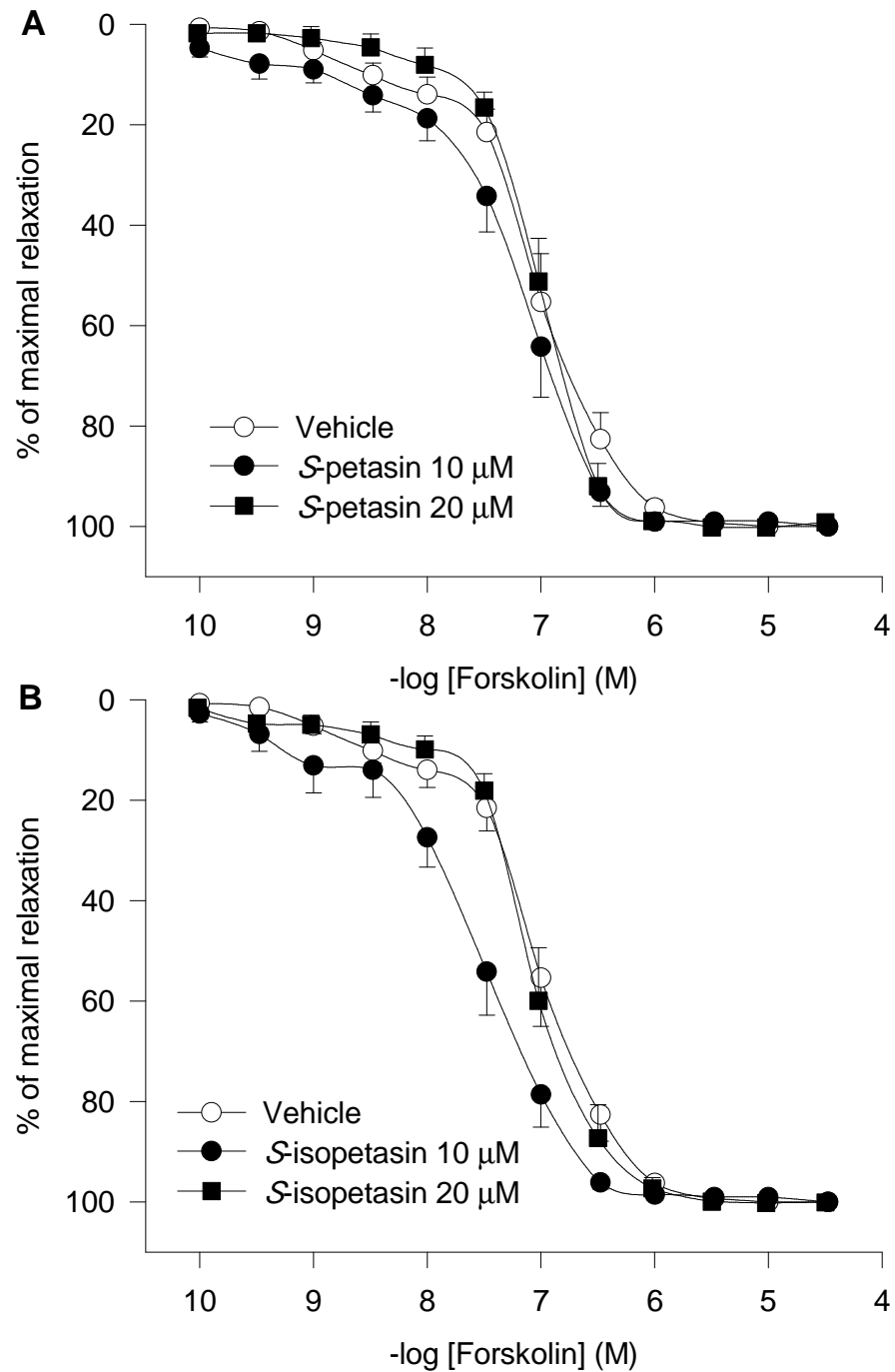


Fig. 13 The effects of *S*-petasin (A) and *S*-isopetasin (B) on the log concentration-response curves of forskolin to precontraction induced by histamine (10 μM) in guinea-pig trachealis. Each point represents mean±SEM of 7-9 experiments. The relaxation of 1 mM aminophylline, added at the end of experiment, was set as 100 % of maximal relaxation.

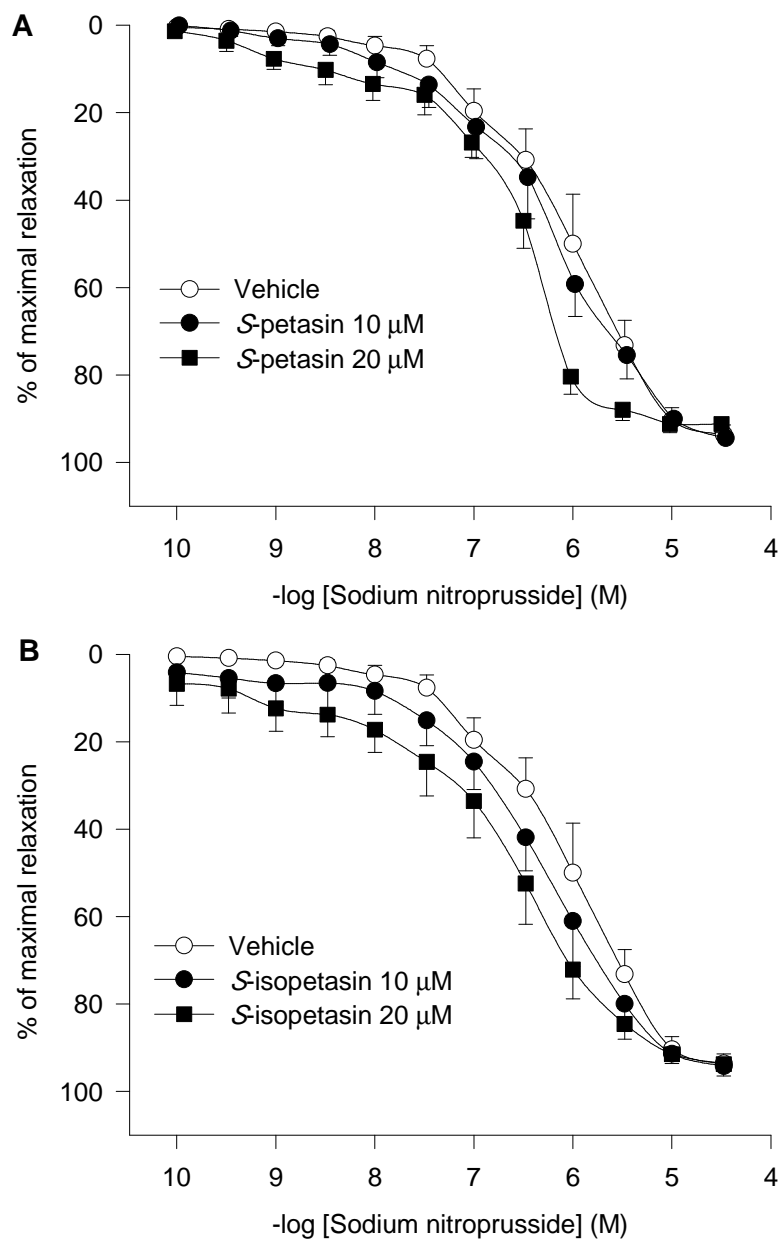


Fig. 14 The effects of *S*-petasin (A) and *S*-isopetasin (B) on the log concentration-response curves of sodium nitroprusside to precontraction induced by histamine (10 μ M) in guinea-pig trachealis. Each point represents mean \pm SEM of 5-6 experiments. The relaxation of 1 mM aminophylline, added at the end of experiment, was set as 100 % of maximal relaxation.

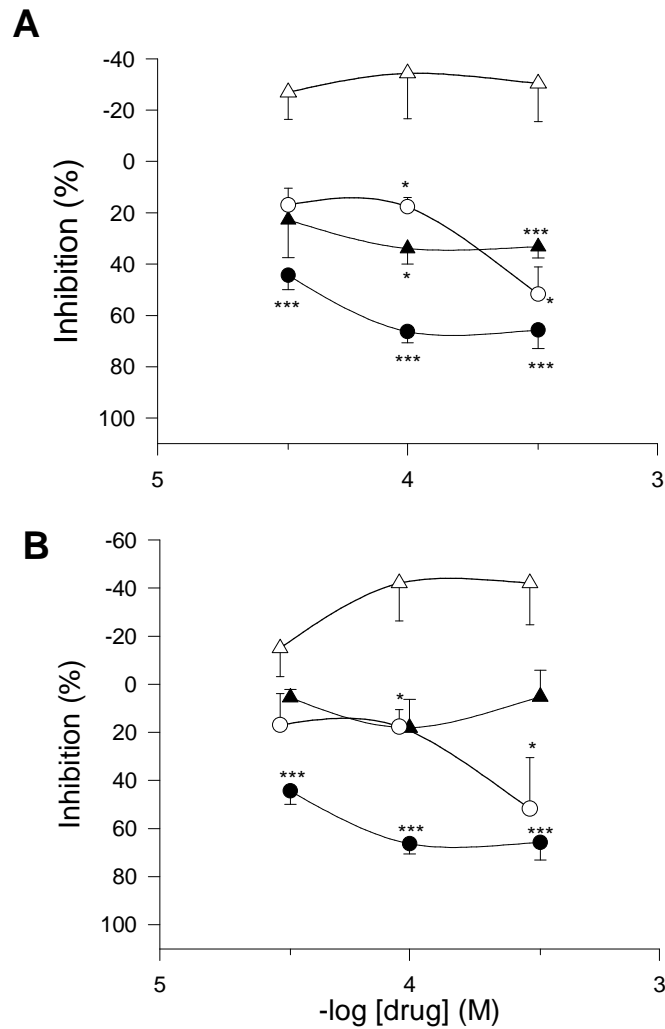


Fig. 15 The log concentration-inhibitory effects of *S*-petasin (A), *S*-isopetasin (B) (,) and IBMX (,) on cAMP (,)- and cGMP (,)-dependent phosphodiesterase activities. The inhibitory effects do not include those of their vehicle. Each point represents the mean \pm SEM of 4-7 experiments. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ when analyzing the difference between drugs and their vehicles by Student's unpaired t -test.

Table 1 The IC₅₀ (μM) of petasins for the inhibitory effect on the precontraction induced by histamine, carbachol, KCl or leukotriene D₄ (LTD₄) in isolated guinea-pig trachealis.

Petasins	Histamine (10 μM)	Carbachol (0.2 μM)	KCl (30 mM)	LTD ₄ (10 nM)
Petasin	40.83 ± 13.95 (6)	65.13 ± 25.24 (8)	47.69 ± 12.30 (8)	45.85 ± 10.23 (8)
Isopetasin	134.77 ± 30.29(4) ^{##}	66.72 ± 7.30 (4)	100.27 ± 17.58 (4) [#]	ND
<i>S</i> -petasin	5.72 ± 0.60 (7) [*]	9.41 ± 1.33 (8) [*]	7.80 ± 1.16 (7) ^{**}	9.35 ± 3.42 (8) ^{**}
<i>S</i> -isopetasin	>300 (8)	11.73 ± 2.89 (8) ^{***}	7.19 ± 1.85 (7) ^{**}	>300 (5)
Positive control Aminophylline	95.29 ± 20.80 (7)	117.40 ± 31.74 (6)	133.35 ± 32.14 (7)	ND

Values are presented as means ± S.E.M. (n), where n is the number of experiments.

* P<0.05, ** P<0.01, and *** P<0.001 when compared their IC₅₀s of petasins by one-way ANOVA and then compared with their corresponding non-sulfur containing petasins, by LSD analysis.

[#]P<0.05, and ^{##}P<0.01 when compared their IC₅₀s of petasins by one-way ANOVA and then compared with their structural isomers, by LSD analysis.

ND: not determined.

Table 2 pD₂' , pA₂ and -log IC₅₀ values of *S*-petasin and *S*-isopetasin in non-depolarized and depolarized guinea-pig trachealis

	Non-depolarized preparation				Depolarized preparation		
	Normal Ca ²⁺ (2.5 mM)		Ca ²⁺ -free (0.02mM EGTA)		K ⁺ (60 mM) Ca ²⁺	His (100 μM) Ca ²⁺	CCh (10 μM) Ca ²⁺
	His	CCh	His	CCh			
<u><i>S</i>-petasin</u>							
pD ₂ '	4.10±0.08 (18)	3.95±0.11 (20) ^{###}	4.20±0.17 (12) [#]	4.74±0.16 (14)			
-logIC ₅₀					4.50±0.31 (6)	3.76±0.32 (6)	4.05±0.07 (5) [#]
<u><i>S</i>-isopetasin</u>							
pA ₂		5.36±0.09 (25) ^{***}					
pD ₂ '	3.15±0.11 (14) ^{***}		ND	ND			
-logIC ₅₀					4.82±0.15 (6)	ND	ND
<u>Atropine</u>							
pA ₂		8.92±0.08 (7) ^{\$\$\$}					
<u>Aminophylline</u>							
pD ₂ '	3.76±0.10 (12) ^{**}	3.57±0.12 (17) [*]					

Values are presented as means±SEM (*n*); *n* is the number of experiments.

* *P*<0.05, ** *P*<0.01, *** *P*<0.001 when compared with the corresponding pD₂' value of *S*-petasin.

P<0.05, ### *P*<0.001 when compared with the pD₂' value of *S*-petasin against CCh in Ca²⁺-free Krebs solution with 0.02 mM EGTA.

\$\$\$ *P*<0.001 when compared with the corresponding pA₂ value of *S*-isopetasin.

ND: not determined

His: histamine

CCh: carbachol

Table 3 Effects of *S*-petasin and *S*-isopetasin on the relaxant action of forskolin or nitroprusside in isolated guinea-pig trachealis precontracted by histamine (10 μ M)

	pD ₂ value	
	Forskolin	Nitroprusside
<i>S</i> -petasin		
Vehicle	7.08 ± 0.08 (14)	6.13 ± 0.20 (6)
10 μ M	7.26 ± 0.11 (7)	6.34 ± 0.21 (6)
20 μ M	7.32 ± 0.13 (15)	6.59 ± 0.16 (5)
<i>S</i> -isopetasin		
Vehicle	7.08 ± 0.08 (14)	6.13 ± 0.20 (6)
10 μ M	7.36 ± 0.13 (15)	6.41 ± 0.18 (6)
20 μ M	7.13 ± 0.13 (9)	6.70 ± 0.21 (6)

Values are expressed as mean ± SEM (n), and n is the number of experiments.