



非膽鹼性神經系統對呼吸道/肺之調控--

抗氧化劑對天竺鼠呼吸道之非膽鹼性神經系統的保護角色之調控(2/2)

Antioxidant protection of inhibitory non-cholinergic neurotransmitter in guinea-pig trachea

計畫編號：NSC 89-2320-B-038-017-M41

執行期限：88年8月1日至89年7月31日

主持人：林建煌 執行機構及單位名稱：台北醫學院醫事技術學系

中文摘要

Superoxide anion generator 如 pyrogallol 和 duroquinone 可抑制 SNAP 所引起的平滑肌鬆弛反應，但對於直接電刺激 NANC 神經，所引起的平滑肌鬆弛反應則沒有抑制作用。抗氧化劑 Cu/Zn SOD 和 ascorbate 皆可減少 pyrogallol 和 duroquinone 抑制 SNAP 所引起的平滑肌鬆弛反應。而 pyrogallol 和 duroquinone 的抑制作用可被大量的 Cu/Zn SOD 所對抗。在 diethyldithiocarbamate (Cu/Zn SOD 抑制劑) 存在下，pyrogallol 和 duroquinone 可抑制電刺激所引發氣管的鬆弛反應。另外，buthionine sulphoximine (1 mM, an inhibitor of glutathione production), etharynic acid (30 μ M, a sulphhydryl alkylator), sulphobromophthalein (100 μ M, an inhibitor of glutathione S-transferase), diamide (100 μ M, a glutathione oxidator) 以劑量相關的方式抑制電刺激 NANC 神經所引起的氣管平滑肌鬆弛反應。Carboxy-PTIO (NO scavengers) 也以劑量相關的方式抑制 SNAP 所引起的平滑肌鬆弛反應，但對於電刺激 NANC 神經所引起的平滑肌鬆弛反應則沒有抑制作用。氣管平滑肌組織均質液具有 SOD 的活性，且 Mn SOD 及 Cu/Zn SOD 的活性分別佔 34.2% 及 65.8%。由 Western blotting 的實驗方法可得知，天竺鼠氣管平滑肌組織均質液內存在有 Mn SOD, Cu/Zn SOD, catalase 三種抗氧化酵素。由 Immunocytochemistry 的實驗方法可得知，神經附近可發現有 Mn SOD, Cu/Zn SOD 或 catalase 三種抗氧化酵素的活性。因此神經附近的抗氧化酵素 Mn SOD,

Cu/Zn SOD 或 catalase 可藉由清除氧游離基，來減少 peroxynitrite 對神經細胞之傷害性或延長 NO 之生物活性，因而在發炎的過程中扮演保護抑制性 NANC 神經系統的功能。

關鍵詞：抗氧化劑、非膽鹼性神經系統、一氧化氮

Abstract

There is evidence that nitric oxide (NO) as an prominent i-NANC neurotransmitter in the airway smooth muscle. The superoxide anion generator, pyrogallol and duroquinone reduced tracheal relaxations to SNAP, but had no effect on those to field stimulation. The inhibitory effect of pyrogallol and duroquinone was partially reversed by Cu/Zn SOD and ascorbate. Following inhibition of Cu/Zn SOD activity with diethyldithiocarbamate, pyrogallol and duroquinone also reduced tracheal relaxations to field stimulation and this effect was again by reversed Cu/Zn SOD and ascorbate. Buthionine sulphoximine (1 mM, an inhibitor of glutathione production), etharynic acid (30 μ M, a sulphhydryl alkylator), sulphobromophthalein (100 μ M, an inhibitor of glutathione S-transferase), diamide (100 μ M, a glutathione oxidator) reduced tracheal relaxations to field stimulation. Carboxy-PTIO (NO scavengers) also reduced tracheal relaxations to SNAP, but had no effect on those to field stimulation. Immunostaining demonstrated Mn SOD, Cu/Zn SOD, catalase immunoreactivity in the

nerve terminal. Western blot analysis confirmed the presence of these enzyme in the homogenates of tracheal muscle, and enzyme assays demonstrated exist Mn SOD, and Cu/Zn SOD activities. Therefore antioxidant enzyme found in the nerves may play a role in regulating NO-mediated neuromuscular communication in the guinea-pig trachea.

Keywords: nitric oxide; non-cholinergic; antioxidant

二、緣由與目的

呼吸道之神經系統主要包括三個部分：一是膽鹼性神經系統 (cholinergic nerve)，此神經系統是引起氣管收縮的主要途徑¹。二是腎上腺神經系統 (adrenergic nerve)，雖然此神經系統並不直接分佈至人類的呼吸道平滑肌，但平滑肌上存有豐富之 β 接受體，因此血液中的 epinephrine 在呼吸道張力的調節上扮演重要的角色²。三是非腎上腺非膽鹼性神經系統 (non-adrenergic non-cholinergic nerve, NANC)，此神經又分為傳入神經及傳出神經，當呼吸道上皮細胞剝落，而曝露出感覺神經末梢，一些發炎介質如 bradykinin 或 prostaglandin 可刺激這感覺神經末梢，導致逆向刺激感覺神經的分支，因而引起軸突反射釋放出 tachykinin 如 substance P, neurokinin A 和 calcitonin-gene related peptide (CGRP)³。這些物質會引起氣管的收縮，微血管血漿的滲出及黏液的分泌，此部分稱為興奮性之非腎上腺非膽鹼性神經系統 (excitatory NANC)。而 Tachykinin 的分解主要是經由位於呼吸道上皮之 neutral endopeptidase (NEP)，因此當上皮細胞剝落，而導致 NEP 的活性下降，會使得感覺神經所釋放出的 tachykinin 無法被分解，而擴大 tachykinin 的氣管收縮、血漿滲出及黏液分泌作用¹。另一部分稱為抑制性之非腎上腺非膽鹼性神經系統 (inhibitory NANC)，此神經是人類呼吸道唯一的神經性氣管鬆弛途徑⁴。其主要之神經傳遞物質是一氧化氮 (nitric oxide, NO) 及

vasoactive intestinal peptide (VIP)⁵。有報告指出，當發炎時肥大細胞所釋放出之 tryptase 會將 VIP 分解⁶，而其它發炎細胞所釋放出之氧游離基會與一氧化氮結合，導致氣管的鬆弛途徑受到破壞，因此當發炎時副交感神經的氣管收縮作用，將會被進一步的擴大⁵。但有關呼吸道非腎上腺非膽鹼性神經所釋出之 NO 與發炎細胞所釋出之氧游離基的交互作用，仍有許多地方尚未完全瞭解，這也是此計畫想要探究的地方。

雖然 L-arginin/NO 的路徑一般認為包含在 nitrenergic NANC 的神經傳遞物質中⁷，但其真正的性質則仍有一些爭論，主要的原因是，在胃腸道平滑肌的實驗中發現 superoxide anion generator 如 pyrogallol, duroquinone 和 xanthine/xanthine oxidase 對於電刺激 NANC 神經所引起的平滑肌鬆弛反應並沒有抑制作用，但對於直接外給 NO 溶液所引起的反應則有顯著的抑制作用^{8,9,10}。同樣地，在胃腸道及海綿體平滑肌所作的實驗也發現，給予 NO scavengers 如 hydroxocobalamin, carboxy-PTIO 及 hydroquinone 也有類似的實驗結果^{11,12,13}。因此真正的 nitrenergic NANC 的神經傳遞物質可能不是 free NO，而是一個 superoxide-resistant 但包含 NO 的分子如 nitrosothiol 的物質。另一個可能是在 NANC 的神經末梢，存在有高濃度的抗氧化系統可以保護 NANC 的神經傳遞物質，使其免於受到 superoxide anion 的攻擊，然而直接外給 NO 時，在 NO 到達它的作用位置前仍會受到 superoxide anion 的攻擊。另外，在小鼠之海綿體的實驗發現，當預先給予 Cu/Zn superoxide dismutase 的抑制劑 (diethyldithiocarbamate) 時，hydroquinone 對於電刺激 NANC 神經所引起的鬆弛反應，有較明顯抑制作用¹⁴；但再重新加入 Cu/Zn SOD 時僅能部分回復 hydroquinone 的抑制作用¹⁵。此結果說明在 NANC 的神經末梢可能除了存在 Cu/Zn SOD 的抗氧化系統外，可能存在有其他的抗氧化系統。但在氣管的平滑肌，則尚未有這方面的報告，而且抑制性之

NANC 是人類呼吸道唯一的神經性氣管鬆弛途徑，若能詳細研究抗氧化系統在抑制性 NANC 之神經末梢所扮演的角色，將可提供控制呼吸道鬆弛反應的一個新方向。

在真核細胞內已經證實存在有三種 SOD：Mn SOD 主要存在於粒線體內；Cu/Zn SOD 主要存在於細胞質內；而 extracellular SOD 主要存在於細胞外，此抗氧化酵素 SOD 可將身體內之 O_2^- 清除，轉變成 H_2O_2 ¹⁶。身體內則存在另一種重要的抗氧化酵素 catalase，其可將 H_2O_2 轉變為 H_2O 和 O_2 ，因此 SOD 和 catalase 可藉由清除 O_2^- ，因而抑制 NO 轉變為 ONOO⁻ (peroxynitrite)。當呼吸道平滑肌有不正常的收縮反應時，通常伴隨有呼吸道的發炎反應，且在這個情況下通常有過量的 O_2^- 產生，而 O_2^- 的產生可能來自於發炎反應或身體內所遭受之氧化壓力 (oxidative stress)。而 O_2^- 與 NO 可結合形成 peroxynitrite (ONOO⁻)，使 NO 被清除而降低 NO 的生物活性。Peroxynitrite 是一個具有高度活性的分子，其會引發脂質之過氧化，因而對細胞產生傷害性¹⁷。因此假如非膽鹼性神經之神經末梢或神經附近，存有內生性的抗氧化系統如 superoxide dismutase (SOD) 或 catalase，它們可藉由清除氧游離基，來減少 peroxynitrite 對神經細胞之傷害性或延長 NO 之生物活性，因而在發炎的過程中扮演保護抑制性 NANC 神經系統的功能。如此的保護機轉，可能在發炎反應時用以維持呼吸道平滑肌正常的功能。

三、結果與討論

1. 氣管平滑肌組織均質液具有 SOD 的活性，且 Mn SOD 及 Cu/Zn SOD 的活性分別佔 34.2% 及 65.8%。
2. 由 Western blotting 的實驗方法可得知，天竺鼠氣管平滑肌組織均質液內存在有 Mn SOD, Cu/Zn SOD, catalase 三種抗氧化酵素。
3. 由 Immunocytochemistry 的實驗方法可得知，神經附近可發現有 Mn SOD,

Cu/Zn SOD 或 catalase 三種抗氧化酵素的的存在。

4. superoxide anion generator 如 pyrogallol 和 duroquinone 以劑量相關的方式抑制 SNAP (NO donor) 所引起的氣管平滑肌鬆弛反應，但對於直接電刺激 NANC 神經，所引起的平滑肌鬆弛反應則沒有抑制作用。抗氧化劑 Cu/Zn SOD 和 ascorbate 皆可減少 pyrogallol, duroquinone 抑制 SNAP 所引起的平滑肌鬆弛反應。當天竺鼠氣管環標本預先給予 Cu/Zn SOD 的抑制劑 diethyldithiocarbamate (DETC, 3 mM) 前處理 45 分鐘後，pyrogallol 和 duroquinone 可部分抑制電刺激所引發氣管的鬆弛反應 (Fig. 7)。
5. Buthionine sulphoximine (1 mM, an inhibitor of glutathione production), etharynic acid (30 μ M, a sulphhydryl alkylator), sulphobromophthalein (100 μ M, an inhibitor of glutathione S-transferase), diamide (100 μ M, a glutathione oxidator) 以劑量相關的方式抑制電刺激 NANC 神經所引起的氣管平滑肌鬆弛反應。
6. NO scavengers 如 carboxy-PTIO 也以劑量相關的方式抑制 SNAP 所引起的平滑肌鬆弛反應 (Fig. 3)，同樣地，對於直接電刺激 NANC 神經，所引起的平滑肌鬆弛反應則沒有抑制作用，同樣地，Cu/Zn SOD 和 ascorbate 也減少 carboxy-PTIO 抑制 SNAP 所引起的平滑肌鬆弛反應 (Fig. 6)。

由以上之結果得知 pyrogallol 和 duroquinone 並不抑制電刺激 NANC 神經所引起的平滑肌鬆弛反應，但是當 Cu/Zn SOD 被 DETC 抑制後，pyrogallol 和 duroquinone 即可部分抑制電刺激所引發的氣管鬆弛反應，這結果暗示在氣管的平滑肌存有內生性之 SOD。但是我們也發現當 Cu/Zn SOD 被 DETC 抑制後，pyrogallol 和 duroquinone 並無法完全抑制電刺激所引發的氣管鬆弛反應，這可能是由於 NANC 神經受刺激所引發的氣管鬆弛反應其神經傳遞物質可能不僅僅是 NO，另外可

能包括其他對 superoxide anion 不敏感 (insensitive) 的物質如 nitrosothiol, 的確我們發現 buthionine sulphoximine (an inhibitor of glutathione production), etharynic acid (a sulphhydryl alkylator), sulphobromophthalein (an inhibitor of glutathione S-transferase), diamide (a glutathione oxidator) 以劑量相關的方式抑制電刺激 NANC 神經所引起的氣管平滑肌鬆弛反應。另外 NANC 神經的神經傳遞物質可能不僅受內生性之 Cu/Zn SOD 所保護, 其它的抗氧化酵素如 MnSOD, catalase 可能也扮演重要的角色, 因為 Mn SOD 並不會受到 DETC 的抑制, 且有報告指出在大白鼠之結腸平滑肌有部分的 MnSOD 是與 NO synthase 位在相同的位置。因此 Mn SOD 有可能也是存在氣管平滑肌存之內生性 SOD。由 Immunocytochemistry 及 Western blotting 的實驗可發現, 神經附近有 Mn SOD, Cu/Zn SOD 或 catalase 三種抗氧化酵素的的存在。因此神經附近的抗氧化酵素 Mn SOD, Cu/Zn SOD 或 catalase 可藉由清除氧游離基, 來減少 peroxynitrite 對神經細胞之傷害性或延長 NO 之生物活性, 因而在發炎的過程中扮演保護抑制性 NANC 神經系統的功能。

四、計畫成果自評

此子計畫的完成將可詳細瞭解氧游離基在非腎上腺非膽鹼性之傳出神經所扮演的角色, 及外加的抗氧化劑和內生性的抗氧化系統對非腎上腺非膽鹼性之傳出神經的調控。這些研究將可解釋當抑制性之非腎上腺非膽鹼性神經系統遭破壞時, 可能會導致或加重呼吸道痙攣的症狀。同時亦可提供控制呼吸道鬆弛反應的一個新方向。

五、參考文獻

1. Barnes, P.J. (1992) Modulation of neurotransmission in airways. *Physiol. Rev.* 72, 699-729.
2. Barnes, P.J. (1986) Endogenous catecholamines and asthma. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 77, 791-795.
3. Barnes, P.J. (1990) Reactive oxygen

- species and airway inflammation. *Free Rad. Biol. Med.* 9, 235-242.
4. Ellis, J.L. and Farmer, S.G. (1989) The effects of vasoactive intestinal peptide (VIP) antagonists, and VIP and peptide histidine isoleucine antisera on nonadrenergic, noncholinergic relaxations of tracheal smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 96, 513-520.
5. Li, C.G. and Rand M.J. (1991) Evidence that part of the NANC relaxant response of guinea-pig trachea to electrical field stimulation is mediated by nitric oxide, *Br. J. Pharmacol.* 102, 91-94.
6. Caughey, G.H., Leidig, F., Yirio, N.F. and Nadel, J.A. (1988) Substance P and vasoactive intestinal peptide degradation by mast cell tryptase and chymase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 244, 133-137.
7. Rand, M.J. (1992) Nitrgic transmission: nitric oxide as a mediator of non-adrenergic, non-cholinergic neuro-effector transmission. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 19, 147-169.
8. Lilley, E. and Gibson, A. (1995) Inhibition of relaxations to nitrgic stimulation of the mouse anococcygeus by duroquinone. 116, 3231-3236.
9. Gillespie, J.S. and Sheng, H. (1990) The effects of Pyrogallol and hydroquinone on the response to NANC nerve stimulation in the rat anococcygeus and bovine retractor penis muscles. *Br. J. Pharmacol.* 99, 194-196.
10. Gibson, A., Brave, S.R. and Tucker, J. F. (1994) Differential effect of xanthine:xanthine oxidase on NANC and NO-induced relaxations of the mouse anococcygeus. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* (Suppl.1) 475.
11. Rajanayagam, M.A.S., Li, C.G. and Rand, M.J. (1993) Differential effects of hydroxocobalamin on NO-mediated relaxations in rat aorta and anococcygeus muscle. *Br. J. Pharmacol.* 108, 3-5.
12. Paisley, K. and Martin, W. (1996) Blockade of nitrgic transmission by hydroquinone, hydroxocobalamin and carboxy-PTIO in bovine retractor penis:

- role of superoxide anion. *Br. J. Pharmacol.* 117, 1633-1638.
13. Rand, M.J. and Li, C.G. (1995) Discrimination by the NO-trapping agent, carboxy-PTIO, between NO and nitreergic transmitter but not between NO and EDRF. *Br. J. Pharmacol.* 116, 1906-1910.
14. Martin, W., McAllister, K.H.M. and Paisley, K. (1994) NANC neurotransmission in the bovine retractor penis is blocked by superoxide anion following inhibition of superoxide dismutase with diethyldithiocarbamate. *Neuropharmacology.* 33, 1293-1301.
15. Lilley, E. and Gibson, A. (1996) Protection of NO from hydroquinone by some physiological antioxidants *Br. J. Pharmacol.* 117, 215P.
16. Bannister, J. V. and Bannister W.H. (1987) Aspects of the structure, function and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 22: 141-180.
17. Chang, L.Y., Slot, J.W., Geuze, H.J. and Crapo, J.D. (1988) Molecular immunochemistry of the CuZn superoxide dismutase in rat hepatocytes. *J. Cell Biol.* 107, 2169-2179.