RRPC88030498 (5.P)
PC 8803-0498

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

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

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

計畫編號：NSC 88-2314-B-038-134-M41
執行期限：87 年 8 月 1 日至 88 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

一、中文摘要

本研究主要探討過氧化物游離基是否會破壞抑制性 NANC 神經系統的保護性角色；以及在非膽鹼性神經之末梢或神經纖維附近，是否存在有內生性可保護 NO 自由基的抗氧化系統。我們發現在天竺鼠的氣管，過氧化物(superoxide anion) 的產生者如 pyrogallol 和 duroquinone 以劑量相關的方式抑制 S-nitroso-N-acteyl-penicillinamine (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。NO 的清除者如 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；同樣地，對於直接電刺激 NANC 神經，所引起的平滑肌鬆弛反應也沒有抑制作用。抗氧化劑 Cu/Zn SOD 和 ascorbate 皆可減少 pyrogallol, duroquinone 對於 SNAP 的抑制反應；同樣地，Cu/Zn SOD 和 ascorbate 也減少 carboxy-PTIO 對於 SNAP 的抑制反應。而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，可發現 pyrogallol 和 duroquinoneru 皆可部分抑制電刺激所引發的氣管鬆弛反應，而這個作用可被 Cu/Zn SOD 和 ascorbate 所抑制。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 NANC 神經末梢，存在有高濃度的抗氧化物質可以保護 NANC 的神經傳遞物質 NO，使其免於受到 superoxide anion 的攻擊。同時亦可提供控制呼吸道鬆弛反應的一個新方向。

關鍵詞：非膽鹼性神經、抗氧化劑、氣管平滑肌、一氧化氮

Abstract

In this study, we will investigate the hypothesis that NO breakdown may be increased by oxygen free radical, thus leading to the destruction of the protective role of inhibitory NANA nerve. Furthermore, we will also study whether the presence of endogeneous antioxidant system in the vicinity of the neuroeffector junction may protect the endogeneous transmitter from attack by oxygen free radical. The superoxide anion generator, pyrogallol and duroquinone, significantly inhibited the tracheal relaxation to S-nitroso-N-acteyl-penicillinamine (SNAP) but not nitrergic relaxations to NANA nerve stimulation. SOD and ascorbate can reversed the inhibition of pyrogallol and duroquinone on SNAP-induced tracheal relaxation. The NO scavenger, carboxy-PTIO also significantly inhibited the tracheal relaxation to SNAP but not nitrergic relaxations to NANA nerve stimulation. Similarity, SOD and ascorbate can reversed the inhibition of carboxy-PTIO on SNAP-induced tracheal relaxation. Following inhibition of endogeneous Cu/Zn SOD activity with diethyldithiocarbamate (DETC, 3 mM), pyrogallol and duroquinone, also inhibited the tracheal relaxation to NANA nerve stimulation, and this effect was also reversed by SOD and ascorbate. These results suggested that the presence of endogeneous antioxidant system in the vicinity of the

neuroeffector junction may protect the endogeneous transmitter from attack by oxygen free radical. These studies also provided evidence for the modulatory role of exogeneous and endogeneous antioxdant system in inhibitory NANC nerve and may provide new ways of controlling the relaxation of tracheal smooth muscle.

Keywords: non-cholinergic; tracheal smooth muscle; antioxdant; nitric oxide

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稍，一些發炎介質如 bradykinin 或 prostaglandin 可刺激這感覺神經末稍，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]。

雖然 L-arginin/NO 的路徑一般認為包含在 nitrergic 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 nitrergic 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 (diethyidithiocarbamate) 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。

當嚴重發炎反應時，發炎細胞如巨噬細胞 (macrophages) 及嗜中性細胞 (neutrophils) 等會釋放出大量的氧游離基 (O_2^-, OH^- 等)，這些氧游離基會與抑制性 NANC 之神經傳遞物質一氧化氮 (NO) 結合形成 peroxynitrite ($ONOO^-$)，因而降低 NO 所引發之氣管鬆弛反應，或直接傷害神經細胞，使得 NANC 系統所扮演的保護性角色受到破壞。因此內生性的抗氧化系統如 superoxide dismutase (SOD) 或 catalase，或者外加抗氧化劑時，應當可藉由清除氧游離基，而在發炎的過程中扮演保護抑制性 NANC 神經系統的功能。因此本計畫主要是想探討三個主題：(1)瞭解發炎細胞所釋放出之氧游離基，是否會破壞抑制性 NANC 神經系統的保護性角色。(2)抗氧化劑是否可藉由清除氧游離基，因而在發炎的過程中扮演保護抑制性 NANC 神經系統的功能。(3)在非膽鹼性系統之傳出神經纖維末梢或神經纖維附近，是否具有清除 O_2^- 或 OH^- 的內生性抗氧化系統或其它具有保護 NO 自由基的抗氧化系統。

三、結果與討論

1. Pyrogallol 對 SNAP 和直接電刺激所引起的氣管平滑肌鬆弛反應的影響

在天竺鼠氣管平滑肌中預先給予 pyrogallol (10 和 30 μM) 前處理 30 分鐘，發現 pyrogallol 以劑量相關的方式抑制 S-nitroso-acteyl-penicillinamine (SNAP, 1 μM) 所引起的氣管鬆弛反應 (分別抑制 36.3% 和 82.5%)。而抗氧化劑 Cu/Zn SOD (500 U/ml) 和 ascorbate (300 μM) 皆可部份拮抗 (52.6% 和 68.9%) pyrogallol (30 μM) 對於 SNAP (1 μM) 的抑制作用。但 pyrogallol (10 和 30 μM) 對於直接電刺激氣管之 NANC 神經所引起的平滑肌鬆弛反應，則沒有任何的抑制作用。而當天竺鼠氣管平滑肌預先給予 Cu/Zn SOD 的抑制劑 diethyldithiocarbamate (DETC, 3 mM) 前處理 45 分鐘，可發現 pyrogallol (10 和 30 μM) 可部分抑制 (10.4% 和 35.7%) 直接電刺激所引發氣管的鬆弛反應。

2. Duroquinone 對 SNAP 和直接電刺激所引起的氣管平滑肌鬆弛反應的影響

預先給予 duroquinone (30 和 100 μM) 前處理氣管平滑肌 30 分鐘，發現 duroquinone 也以劑量相關的方式抑制 SNAP, 1 μM) 所引起的氣管鬆弛反應 (分別抑制 26.3% 和 65.6%)。而抗氧化劑 Cu/Zn SOD (500 U/ml) 和 ascorbate (300 μM) 皆可部份拮抗 (38.9% 和 45.8%) duroquinone (100 μM) 對於 SNAP (1 μM) 的抑制作用。但 duroquinone (10 和 30 μM) 對於直接電刺激氣管之 NANC 神經所引起的平滑肌鬆弛反應，則沒有任何的抑制作用。而當天竺鼠氣管平滑肌預先給予 Cu/Zn SOD 的抑制劑 diethyldithiocarbamate (DETC, 3 mM) 前處理 45 分鐘，可發現 duroquinone (30 和 100 μM) 可部分抑制 (26.4% 和 59.6%) 直接電刺激所引發氣管的鬆弛反應。

3. NO 清除劑 carboxy-PTIO 對 SNAP 和直接電刺激所引起的氣管平滑肌鬆弛反應的影響

在天竺鼠氣管平滑肌中預先給予 carboxy-PTIO (10-100 μM) 前處理 30 分鐘，發現 carboxy-PTIO 以劑量相關的方式抑制 SNAP (1 μM) 所引起的氣管鬆弛反應 (分別抑制 17.7%, 46.4% 和 88.5%)。而抗氧化劑 Cu/Zn SOD (500 U/ml) 和 ascorbate (300 μM) 皆可部份拮抗 (38.4% 和 47.8%) carboxy-PTIO (100 μM) 對於 SNAP (1 μM) 的抑制作用。但 carboxy-PTIO (10-100 μM) 對於直接電刺激氣管之 NANC 神經所引起的平滑肌鬆弛反應，則沒有任何的抑制作用。而當天竺鼠氣管平滑肌預先給予 Cu/Zn SOD 的抑制劑 diethyldithiocarbamate (DETC, 3 mM) 前處理 45 分鐘，可發現 carboxy-PTIO 也無法抑制直接電刺激所引發之氣管鬆弛反應。

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，這可能有幾個原因：(1)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，另外可能包括其他的物質如 VIP 或其他對 superoxide anion 不敏感 (insensitive) 的物質如 nitrosothiol, 這部份的實驗我們正持續進行中；(2) 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 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。所以下一個年度的計畫我們將以進一步的藥理學方法以及分析 SOD 的酵素活性、Western blot 和 immunocytochemistry 等方式來證實我們的假說。

四、計畫成果自評

(一) 此計畫已詳細探討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。

(二) 本研究部分的結果正擬投稿於 **Br. J. Pharmacol.** 題目為 Effect of Cu/Zn superoxide dismutase and ascorbate inhibition on nitrergic relaxations in guinea-pig trachea .

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) Endogeneous 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) Nitrergic 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 nitrergic 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 nitrergic 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 nitrergic 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.