

行政院國家科學委員會補助
大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* ***** *
* 計 畫 : 活化大麻鹼受器減緩活性氧族群引發的呼吸道過度敏 *
* 名 稱 : 感 *
* ***** *

執行計畫學生： 柯品如
學生計畫編號： NSC 98-2815-C-040-050-B
研究期間： 98年07月01日至99年02月28日止，計8個月
指導教授： 阮婷

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術學系（所）

中華民國 99年05月12日

行政院國家科學委員會補助
大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

活化大麻鹼受器減緩活性氧族群引發的呼吸道過度敏感
**Activation of Cannabinoid Receptors Attenuates Airway Hypersensitivity
Induced by Reactive Oxygen Species**

執行計畫學生：柯品如

學生計畫編號： NSC 98-2815-C-040-050-B

研究期間： 98年7月1日至99年2月28日

指導教授： 阮婷

處理方式：不公開

執行單位：中山醫學大學生理科

中華民國 99年5月12日

中文摘要

關鍵詞：肺迷走C纖維、呼吸道過度反應、氧自由基、感覺敏感

氣喘病患的典型病徵包括呼吸道過度反應(airway hyperresponsiveness)與肺中活性氧族群(reactive oxygen species, ROS)過量產生。肺迷走C纖維感覺神經(lung vagal C-fiber afferents, C fibers)為呼吸系統含量最多、分佈最廣，對於感受化學物質最敏感的感覺神經。其功能的異常被發現與許多肺部疾病相關。我們認為ROS很有可能會使得C fibers變的過度敏感(airway hypersensitivity)，而導致呼吸道過度反應的產生。另一方面，研究者發現利用大麻鹼接受器(cannabinoid receptors；CB receptors)的作用劑(agonists)活化CB receptors後，大鼠發炎性疼痛與痛覺敏感的反應明顯被抑制。由於C fibers的生理藥理的特性與參與痛覺的傷害性受器(nociceptors)非常類似，因此CB receptors的活化極有可能也可以減弱C fibers的感覺敏感。我們假設肺中ROS的過量產生將會增加C fibers的敏感程度，若是活化CB receptors則可以壓抑此感覺敏感而達到降低呼吸道過度反應的效果。為了證明上述的想法，在本研究計劃中，我們將利用麻醉大白鼠的動物模式，讓動物自發性吸入霧化的過氧化氫(H_2O_2 ；ROS中較安定的一種)，觀察：(一)探討肺中 H_2O_2 的增加是否會增強刺激物引發的呼吸反應？如果會，那我們將進一步探討：(二)此反應的擴大是否與C fibers有關？以及，(三) ROS在此擴大反應中所扮演的角色為何？(四) CB receptors作用劑是否能減緩因 H_2O_2 所擴大的呼吸反應？我們發現， H_2O_2 會增強capsaicin、phenylbiguanide與 α,β -meATP這三種刺激物引起的呼吸反應。此結果顯示，氣喘病患肺中ROS的增加很可能會造成呼吸道的過度敏感，而給予適當劑量CB receptors agonist的處理的確能減緩因 H_2O_2 所擴大的呼吸反應。此計畫的進行不但將能幫助瞭解ROS與C fibers在氣喘等呼吸道過度反應症中的角色，也提供臨床上抗氧化劑或局部活化CB receptors在治療呼吸道過度反應症的可能性。未來我們將進一步探討不同種類的CB receptors分別扮演的角色。

緒論

氣喘為常見的呼吸道過度反應症，其典型症狀是慢性呼吸道發炎、呼出氣體含有較高的活性氧族群(reactive oxygen species, ROS)與呼吸道過度反應(1-3)。許多研究者認為臨床上觀察到氣喘病人不正常的氣管痙攣與收縮、咳嗽、黏膜水腫及呼吸困難等症狀很有可能與肺感覺神經的過度敏感有關 (4, 5)。其中，肺迷走 C 纖維感覺神經(lung vagal C-fiber afferents, C fibers)為呼吸系統中對化學物質最為敏感的感覺神經，所以我們最先懷疑 C fibers 這類感覺神經在病理情況下有感覺敏感的現象。的確，愈來愈多研究結果也顯示 C fibers 功能的異常在呼吸系統疾病的形成與惡化上扮演相當重要的角色。因此，瞭解在病理情況下，C fibers 過度敏感形成的機制與其抑制方法將具有高度的臨床應用價值。大麻酚 (cannabinoids) 具有抑制疼痛的效用。由於 C fibers 的生理藥理的特性與參與痛覺的 nociceptors 非常類似，因此我們想要探討 CB receptors 的活化是否可以壓抑 C fibers 的過度敏感以達到減緩呼吸道過度反應的效用。在本研究計劃中，我們讓大白鼠自發性的吸入霧化的過氧化氫(H₂O₂; ROS 中較安定的一種)，觀察 cannabinoid receptors (CB receptors) agonist 是否能壓抑因吸入 H₂O₂ 所造成的 C fibers 敏感與引發的較強烈的呼吸反射反應。我們發現，H₂O₂ 會增強 C fibers 選擇性刺激物引起的呼吸反應。若事先給予 CB receptors agonist 則能減緩 H₂O₂ 擴大的呼吸反應。此結果顯示，抗氧化劑或 CB receptors agonist 或許可以應用在呼吸道過度反應症的治療上。

文獻探討

C fibers和呼吸道過度反應

肺感覺神經主要的功能為偵測肺中環境的變化，並將此感覺訊息傳遞到中樞，以適時啟動防禦性的呼吸反射反應來保護我們的呼吸系統。C fibers 是呼吸系統三種迷走感覺神經中的一種。這類的肺感覺神經遍佈於整個呼吸系統，且占呼吸系統所有迷走感覺神經的 75%。C fibers 的特性是對於化學物質十分敏感，可以“偵測”許多吸入的刺激物(例如：臭氧、香煙)或是循環中的發炎物質(例如：前列腺素、組織胺)(4, 5)，具有化學警示器(detector)的功能。這類感覺神經受刺激後，會引發一連串經由中樞神經系統的呼吸反射，包括呼氣停止(apnea)、氣道收縮、黏液分泌和咳嗽(4, 5);除此之外，C fibers 的興奮還能同步引發另一種特殊的軸突反射(axon-axon reflex)，將神經衝動傳到旁枝的

感覺神經，造成旁枝感覺神經的末梢釋放出許多感覺神經胜肽(neuropeptides)。這些神經胜肽會作用於附近的肺組織(例如：呼吸道平滑肌、cholinergic 神經節、血管、發炎細胞、黏膜腺體、白血球)，造成多種作用。包括了呼吸道過度敏感、白血球聚集、氣道收縮、血漿外滲和組織水腫等等的發炎反應。一旦 C fibers 變得敏感，將使得呼吸系統接受相同程度刺激時，會引發更持久且更強烈的反射；或是使得原本不會引發呼吸反射的低強度刺激，引發了呼吸反射反應(比如上述的咳嗽、氣道收縮、黏液分泌、白血球聚集、氣道收縮、血漿外滲和組織水腫等反應)，造成呼吸道的過度反應。已知肺發炎時，C fibers 會產生過度敏感(4-7)，因此發炎性介質(比如 ROS)對 C fibers 的敏感化很有可能參與在呼吸道過度反應中。

ROS和呼吸道過度敏感

ROS 為含有氧原子的自由基與其前驅物的統稱(8)。生物體內生性的 ROS 主要包括： $\cdot O_2^-$ 、 H_2O_2 以及 $\cdot OH$ ，它們是細胞進行有氧呼吸的代謝產物，分別是氧分子於反應中接受不同數目的電子還原後形成的。其中， H_2O_2 在游離金屬(主要是鐵離子)的催化下會轉變成最為破壞力最強的 $\cdot OH$ (8)。由於自由基的不穩定性，ROS 極易與其他分子碰撞而產生連鎖反應，造成更多的自由基產生。需藉由體內的抗氧化劑予以清除，維持體內的氧化壓力(oxidative stress)在一平衡的狀態。當 ROS 產生過多時就會打破這樣的平衡機制，造成組織的損傷。ROS 對直接接觸外界環境的呼吸系統而言是不可缺少的防禦機制。肺內有許多產生 ROS 的細胞，例如巨噬細胞(macrophages)以及多核性白血球(polymorphonuclear leukocytes)，都是藉由 ROS 的釋出來殺死侵入物(9-11)。然而，在發炎性肺疾病的病人，其肺部發炎造成過量的白血球聚集，使得肺中的 ROS 大量的增加，遠遠超過抗氧化系統的負荷(9-11)。過量的 ROS 會攻擊鄰近細胞，藉由自由基不斷的自我擴大延續又進而引發肺的發炎反應(9-11)，造成「發炎反應」與「ROS 增加」間不斷的惡性循環。的確，常見的氣喘與 COPD 等發炎性疾病都被檢測出肺中 ROS 有大量增加的現象(2, 3)。同時也有文獻指出，抗氧化劑的給予可以減緩呼吸道過度反應症(6, 7)，顯示 ROS 很有可能造成肺感覺神經的感覺敏感。然而，目前對於 ROS、肺感覺神經(C fibers)和呼吸道過度反應症之間的關係仍缺乏直接有力的證據。

CB Receptors與呼吸道過度敏感

大麻酚(cannabinoids)為大麻(marijuana)中的有效成份，它能造成亢奮的感覺。內生性的大麻酚(endocannabinoids)被發現能引起廣泛的生理變化，已被應用在多種醫療

用途上。其中最被注意的就是具有抑制疼痛的效用 (12)。我們體內組織廣泛的存有 cannabinoid receptor (CB receptors)。目前已被發現的 CB receptor 有 CB1 及 CB2 receptor 兩大類。其中 CB1 receptor 普遍存在中樞神經系統，而 CB2 receptor 主要分佈在周邊的免疫細胞。不論是 CB1 或是 CB2 receptor 都被發現在周邊神經具有止痛的效用 (13-14)。由於 C fibers 的生理藥理的特性與參與痛覺的 nociceptors 非常類似，因此少數呼吸生理藥理學家也開始注意到其在呼吸系統疾病上可能的應用性。有少數研究發現其可以止咳(15)、可以減緩離體的天竺鼠呼吸道平滑肌因電刺激或藥物處理所引發的收縮現象(16)。然而對於其是否具有減緩呼吸道過度敏感的效果仍有待證實。

在本研究計劃中，我們選用 H₂O₂ 這種較為安定的氧自由基作為 ROS 的來源，並利用麻醉大白鼠的動物模式，讓動物自發性的吸入 H₂O₂，研究以下問題：

(一) H₂O₂ 是否會擴大呼吸反應？

已知刺激 C fibers 會引發的呼吸反應之一為呼氣終止(apnea)。因其很方便量測，又是常被使用的指標之一，因此本實驗將以呼氣終止後導致呼氣時間的延長作為呼吸反應大小的依據。

(二) C fibers 在 H₂O₂ 造成的擴大反應中是否扮演重要的角色？

已知 C fibers 為呼吸系統中對化學物質最敏感的感覺神經，因此其最有可能受到 ROS 的影響變的感覺敏感，我們將探討 H₂O₂ 所造成較強烈的呼吸反應是否是由於 C fibers 神經敏感化所導致。

(三) ROS 在 C fibers 感覺敏感反應中的角色為何？

我們將探討在抗氧化劑的前處理是否可以壓抑因 H₂O₂ 所擴大的呼吸反應。

(四) CB receptors 的作用劑是否會減緩因 H₂O₂ 所擴大的呼吸反射反應？

如果 H₂O₂ 的確增強刺激物引起的呼吸反射反應，我們將進一步觀察 CB receptors 的作用劑是否可以減緩 H₂O₂ 所引發的 C fibers 過度敏感。

研究方法

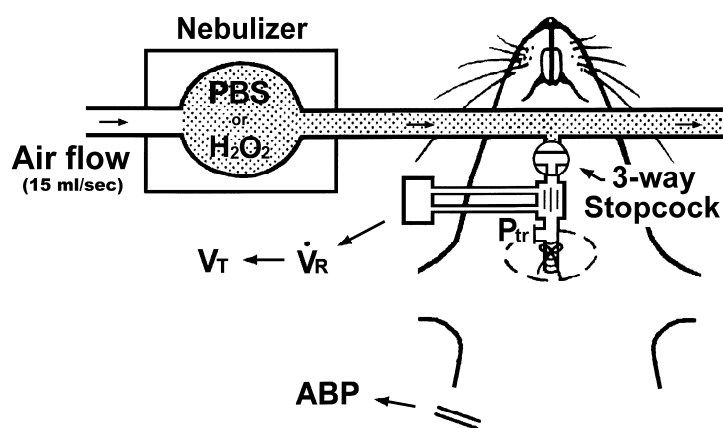
動物的基本處理

SD 雄性大白鼠(380-450g)以麻醉藥(100 mg/kg 的 alpha-chloralose 和 500 mg/kg 的 urethane 溶解於含 2 % 的 borax 生理食鹽水溶液)作腹腔注射麻醉。動物是採仰躺姿勢固定在實驗桌上。我們會在氣管插入氣插管，以量取動物的呼吸氣流訊號；在動物的股動脈插管來量取動脈血壓，以監測動物的生理狀況；在靜脈做插管，以備後續注射

刺激物與麻醉藥的補充給予。整個實驗中，動物體溫維持在 37 °C。

H₂O₂ 的給予

H₂O₂ 於每次給予前以 PBS 稀釋成所需濃度。利用超音波霧化器 (nebulizer) 將 H₂O₂ 溶液震盪成 0.5 ~ 5 μm 的霧氣分子。藉由空氣氣流 (500 ml/min) 的推送，霧化的 H₂O₂ 充斥在一管路中 (內徑 8 mm)。動物原本吸入的是空氣，當要給予 H₂O₂ 時，便轉動此裝置的三向閥，使大白鼠由管路的側枝自發性的吸入霧化的 H₂O₂ 90 秒。之後將三向閥轉回，讓動物回復呼吸空氣。此管路的另一側出口端接有抽氣機，不斷地將多餘的霧氣抽排至室外(如以下圖)。



呼氣終止反應的測量

大白鼠採自發性的呼吸。呼吸氣流由呼吸阻力計和壓力差轉換器共同測量。利用電腦軟體會將此呼吸氣流訊號對時間積分以得到潮氣容積。同時也分析出每次呼吸所花的呼氣時間。呼氣延長反應是以藥物打入動物後產生呼氣時間(apneic duration)的延長大小，除以藥物打入前動物的基礎呼氣時間(baseline expiratory time)的大小，取兩者相除的比值(%)表示。

實驗的分組

264 隻動物總共分為 11 大組，每大組 24 隻動物。每大組將平均分成三小組，分別處理三種不同的刺激物，觀察 H₂O₂ 對不同的刺激物是否都有擴大反應的效果。

問題一：H₂O₂ 是否會擴大呼吸反射反應？

本實驗選用三種常用的 C fibers 刺激物：capsaicin、 α, β -meATP 和 phenylbiguanide，

利用從頸靜脈瞬間注射到肺循環的方式給予。在第一組動物比較同一隻動物吸入不同劑量 H₂O₂ (0 %, 0.025 % and 0.05 %; 90 秒) 後 1 min，由頸靜脈注射刺激物所引發呼氣時間延長的程度，觀察是否具有劑量-反應間的關係(Group 1)? 第二組動物比較同一隻動物吸入 H₂O₂ (0.05 %; 90 秒)後不同時間(1, 5, 10 或 40 min)，由頸靜脈注射辣椒素引發的呼氣延長反應的大小(Group 2)。我們初步發現，隨著 H₂O₂ 的劑量愈高，刺激物所引起的呼氣延長反應就愈強，而且此增強反應在休息 40 min 後就消失。因此在本實驗中，每次給予 H₂O₂ 的時間將間隔 40 min。在此劑量與反應的初步結果發現，每一隻動物吸入 0.05 % H₂O₂ 90 sec 後，都顯著的增強刺激物引發的呼吸反射；而部分動物吸入 0.025% H₂O₂ 90 sec 後並未明顯擴大刺激物引發的反應，因此我們將以處理 0.05 % H₂O₂ 90 sec 進行後續的實驗。

問題二：C fibers 在 H₂O₂ 造成的擴大反應中是否扮演重要的角色?

第三到第五組動物分別觀察不同的神經處理：perivagal capsaicin treatment (將頸部二側迷走神經以高濃度辣椒素包圍可選擇性阻斷 C fibers 的傳導; Group 3)、vagotomy (切除頸部二側迷走神經，所有的肺感覺神經傳導都完全阻斷; Group 4) 或是 sham nerve treatment (假神經處理組; Group 5) 處理前後 0.05 % H₂O₂ 引發的呼吸增強反應是否仍舊存在?

問題三：ROS 在 C fibers 感覺敏感反應中的角色為何?

第六到第九組動物比較 catalase (H₂O₂ 分解酶; Group 6)、heat-inactivated catalase (Group 7)、OH 清除劑(Group 8)或是 OH 清除劑的溶劑(Group 9)處理前後 0.05 % H₂O₂ 引發的呼吸增強反應是否有改變?

問題四：CB receptors 的活化是否會減緩因 H₂O₂ 所擴大的呼吸反射反應?

第十與十一組動物比較：non-selective CB receptor agonist (Group 10)、non-selective CB receptors agonist 的溶劑(Group 11)處理前後 0.05 % H₂O₂ 引發的呼吸增強反應是否有改變?

研究結果

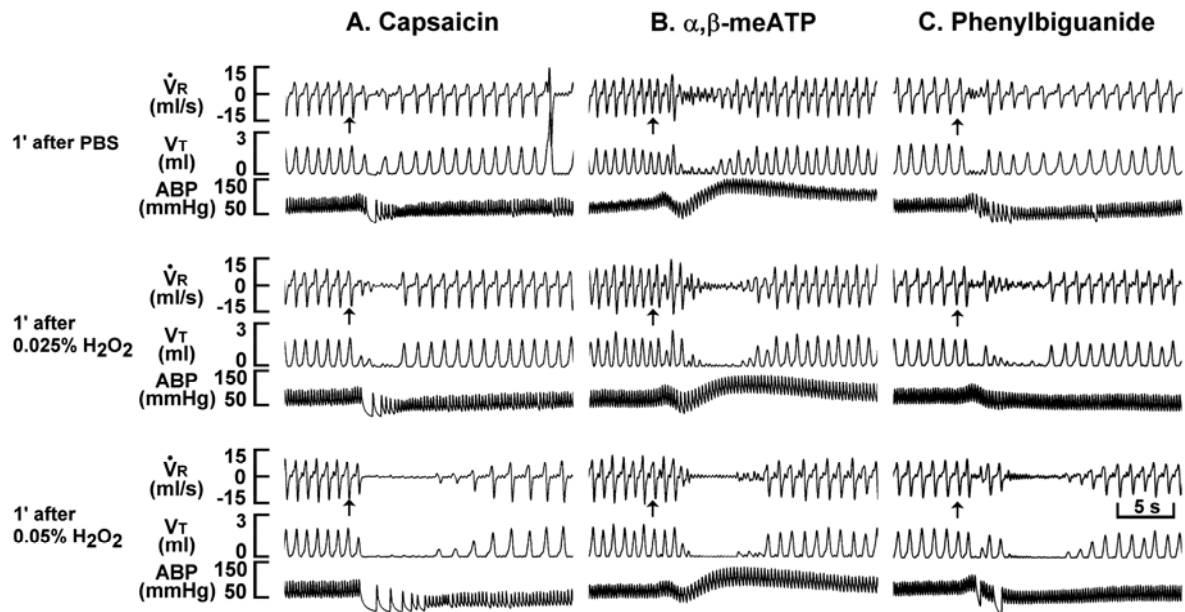


Figure 1. Apneic responses to intravenous injections of capsaicin (A), α,β -meATP (B), or phenylbiguanide (C) after inhalation of PBS, 0.025% H₂O₂ and 0.05% H₂O₂ in three anesthetized rats. Capsaicin (0.75 μ g/kg), α,β -meATP, (10 μ g/kg) and phenylbiguanide (5 μ g/kg) are a TRPV1 receptor agonist, P2X receptor agonist and serotonin 5-HT₃ receptor agonist, respectively. They are also chemical stimulants for LVCFAs. The onset of stimulant challenge is indicated by arrows. Between the inhalation of PBS and H₂O₂ or two H₂O₂ inhalations, 40 min were allowed to elapse. \dot{V}_R , respiratory flow; V_T , tidal volume; ABP, arterial blood pressure. Note that H₂O₂ dose-dependently augmented the apneic response to each stimulant.

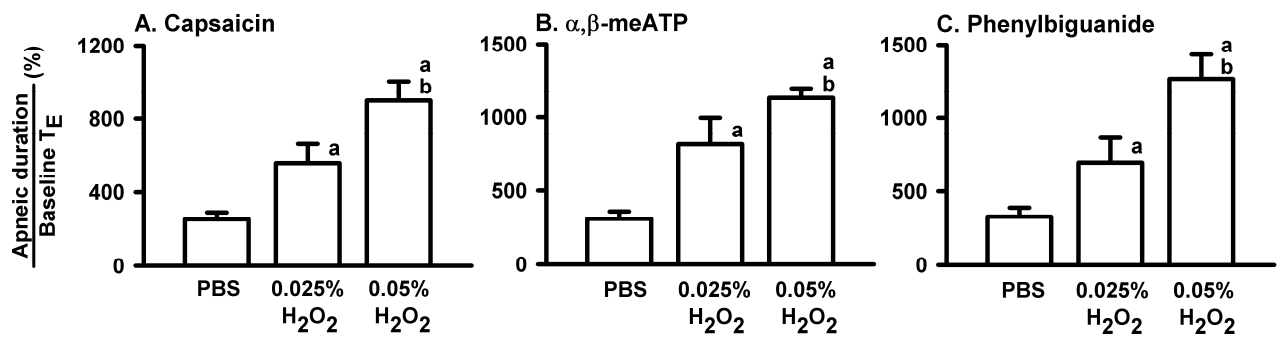


Figure 2. Augmentation of apneic responses to capsaicin (A), α,β -meATP (B), or phenylbiguanide (C) after inhalation of PBS, 0.025% and 0.05% H₂O₂ in three study groups. T_E, expiratory time; a, significantly different from response after PBS; b, significantly different from response after 0.025% H₂O₂. Data in each group are mean \pm SE from 8 rats. See legend of figure 1 for further explanation.

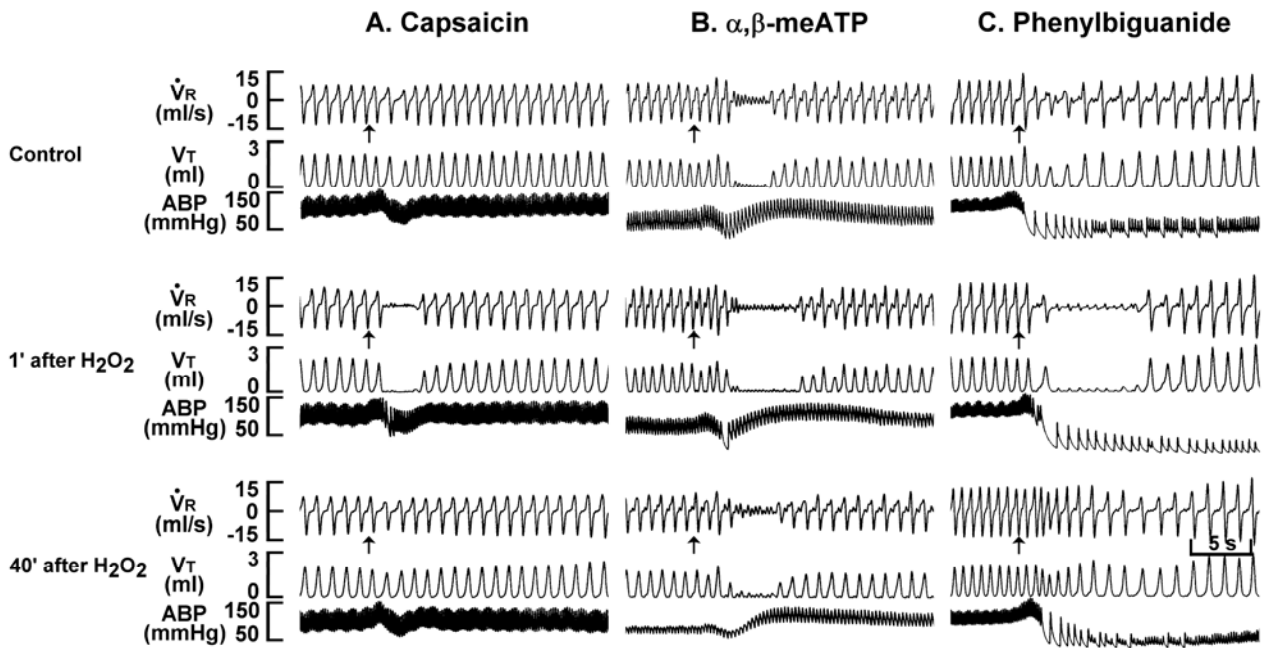


Figure 3. Apneic responses to intravenous injections of capsaicin (A), α,β -meATP (B), or phenylbiguanide (C) before and after one inhalation of 0.05 % H₂O₂ in three anesthetized rats. The onset of stimulant challenge is indicated by arrows. H₂O₂ inhalation was performed 40 min after obtaining the control response. \dot{V}_R , respiratory flow; V_T , tidal volume; ABP, arterial blood pressure. Note that the augmentation of the apneic response to stimulants by H₂O₂ occurred at 1 min after inhalation and vanished at 40 min after inhalation. See legend of figure 1 for further explanation.

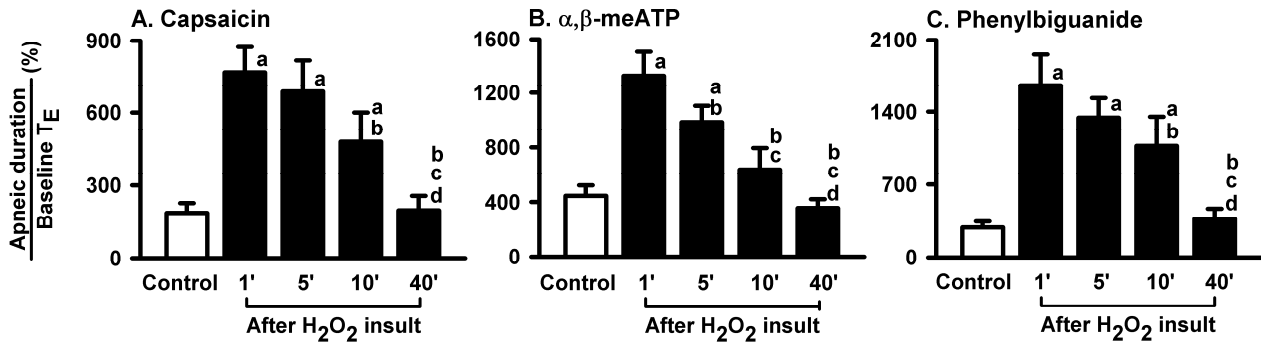


Figure 4. Time course of the augmentation of apneic responses to capsaicin (A), α,β -meATP (B), or phenylbiguanide (C) after one inhalation 0.05% H_2O_2 in three study groups. T_E , expiratory time; a, significantly different from the control response; b, significantly different from the response at 1 min after inhalation. c, significantly different from the response at 5 min after inhalation. d, significantly different from the response at 10 min after inhalation. Data in each group are mean \pm SE from 8 rats. See legend of figure 1 for further explanation.

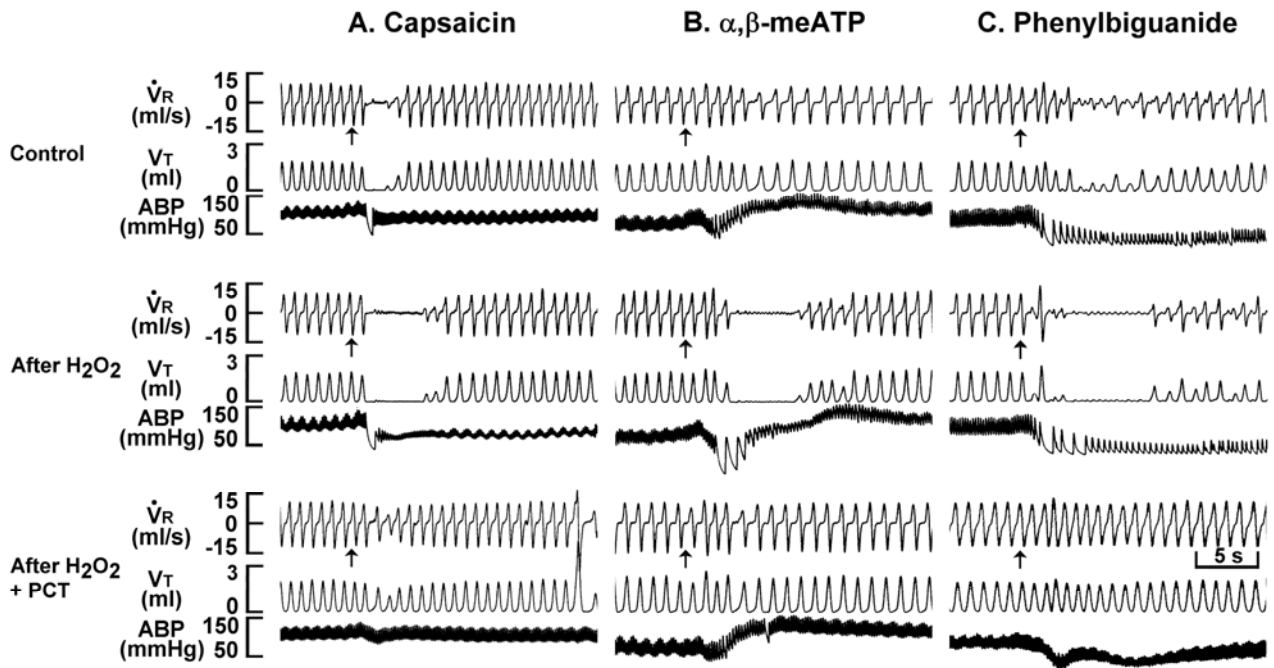


Figure 5. Apneic responses to intravenous injections of capsaicin (A), α,β -meATP (B), or phenylbiguanide (C) before and after two inhalations of 0.05 % H_2O_2 in three anesthetized rats. The first H_2O_2 inhalation was performed 40 min after obtaining the control response. The second H_2O_2 inhalation was performed 40 min after the first and after perivagal capsaicin treatment (H_2O_2 +PCT). Intravenous injections of these stimulants were performed 1 min after each H_2O_2 inhalation. The onset of stimulant challenge is indicated by arrows. \dot{V}_R , respiratory flow; V_T , tidal volume; ABP, arterial blood pressure. Note that the apneic responses to stimulants following the second H_2O_2 inhalation were abolished by PCT, suggesting that they were mediated through LVCFAs. See legend of figure 1 for further explanation.

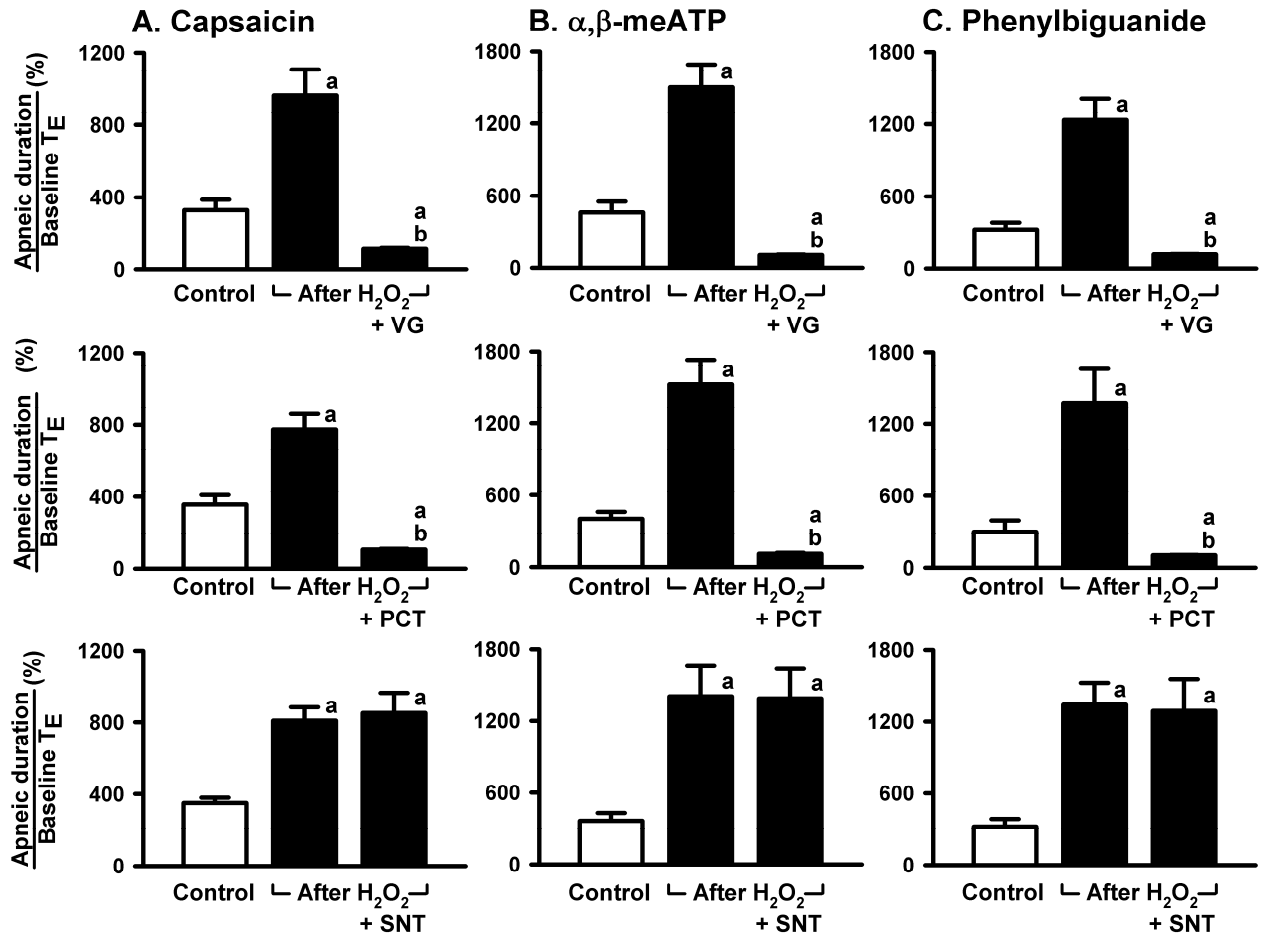


Figure 6. Effects of various vagus nerve treatments on the H₂O₂-induced augmentation of apneic responses to capsaicin (A), α,β-meATP (B), or phenylbiguanide (C) in three study groups. VG, bilateral vagotomy; PCT, perivagal capsaicin treatment; SNT, sham nerve treatment; T_E, expiratory time; a, significantly different from the control response; b, significantly different from the response before nerve treatment. Data in each group are mean ± SE from 8 rats. See legend of figure 5 for further explanation.

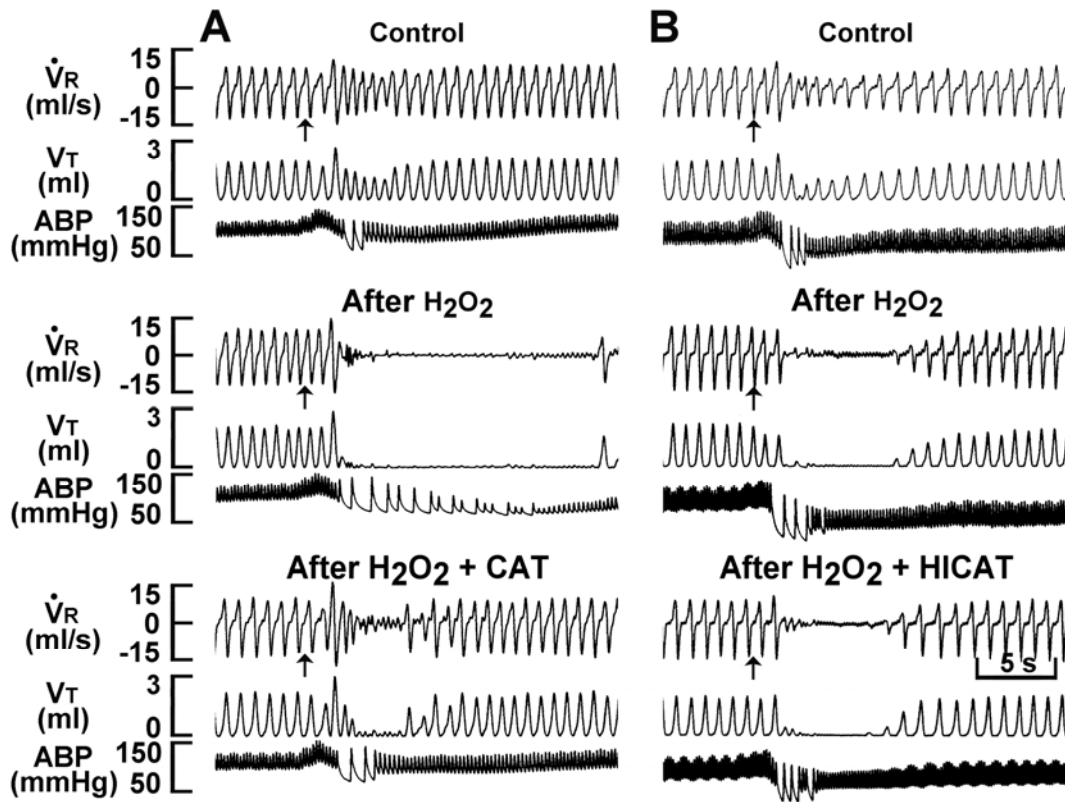


Figure 7. Apneic responses to intravenous injections of phenylbiguanide before and after two inhalations of 0.05 % H_2O_2 in two anesthetized rats. Phenylbiguanide ($5 \mu\text{g}/\text{kg}$) is a serotonin 5-HT_3 receptor agonist. The first H_2O_2 inhalation was performed 40 min after obtaining the control response. The second H_2O_2 inhalation was performed 40 min after the first and after pretreatment with catalase ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{CAT}$; A) or heat-inactivated catalase ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{HICAT}$; B). CAT (13500 IU/ml) is an enzyme catalyzing H_2O_2 , whereas HICAT is the heat-inactivated enzyme. Intravenous injections of phenylbiguanide were performed 1 min after each H_2O_2 inhalation. The onset of stimulant challenge is indicated by arrows. \dot{V}_R , respiratory flow; V_T , tidal volume; ABP, arterial blood pressure. Note that pretreatment with CAT prevented the H_2O_2 -induced augmentation of the apneic response to phenylbiguanide, whereas pretreatment with HICAT failed to do so.

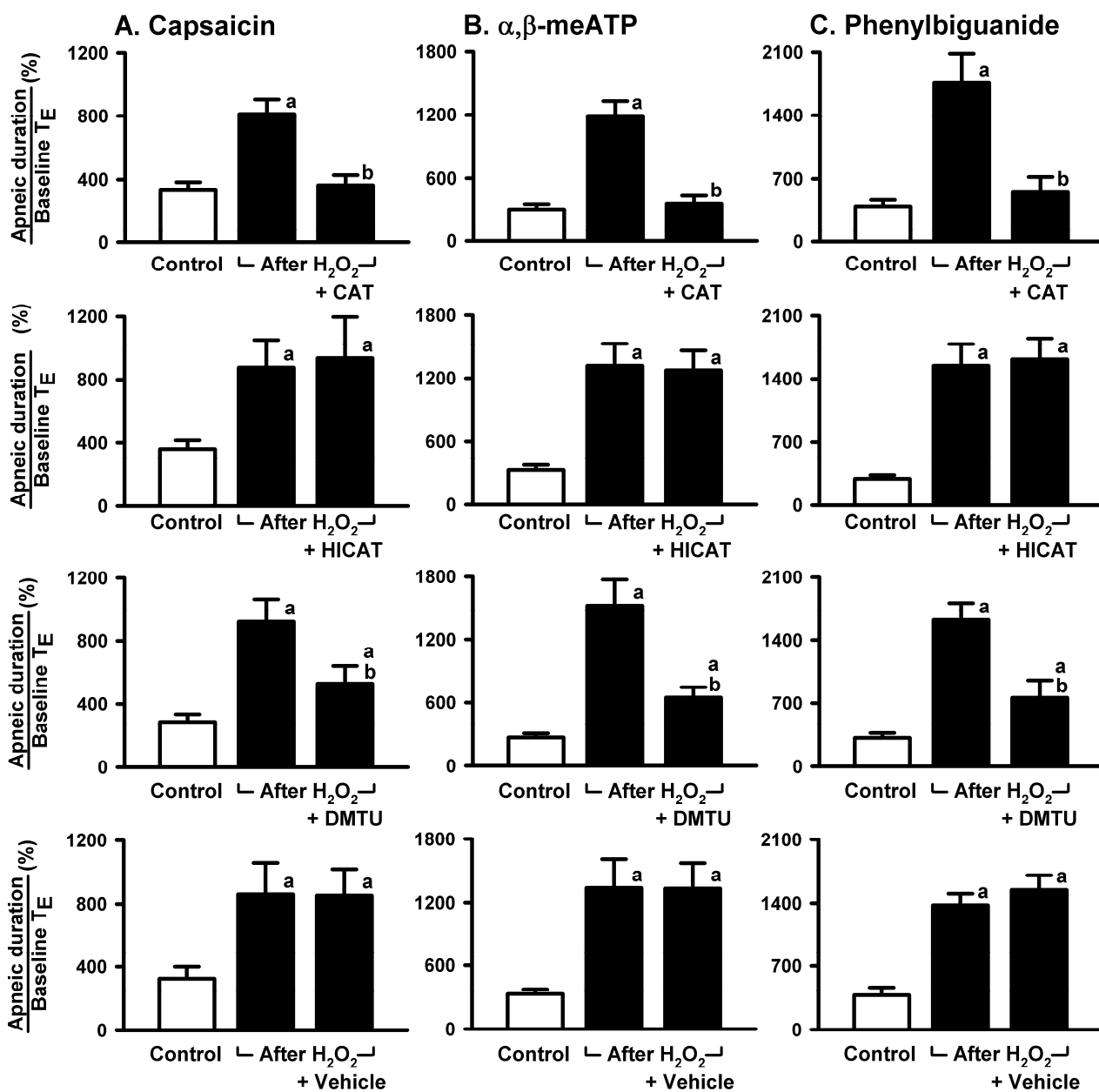


Figure 8. Effects of pretreatment with various pharmacological interventions on the H₂O₂-induced augmentation of apneic responses to capsaicin (A), α,β-meATP (B), or phenylbiguanide (C) in four study groups. CAT, catalase; HICAT, heat-inactivated catalase; DMTU, dimethylthiourea; vehicle, vehicle of DMTU. CAT (13500 IU/ml) is an enzyme catalyzing H₂O₂, whereas HICAT is the heat-inactivated enzyme. DMTU (1 g/kg) is a •OH scavenger. TE_E, expiratory time; a, significantly different from the control response; b, significantly different from the response before pharmacological intervention. Data in each group are mean ± SE from 8 rats. See legend of figure 7 for further explanation.

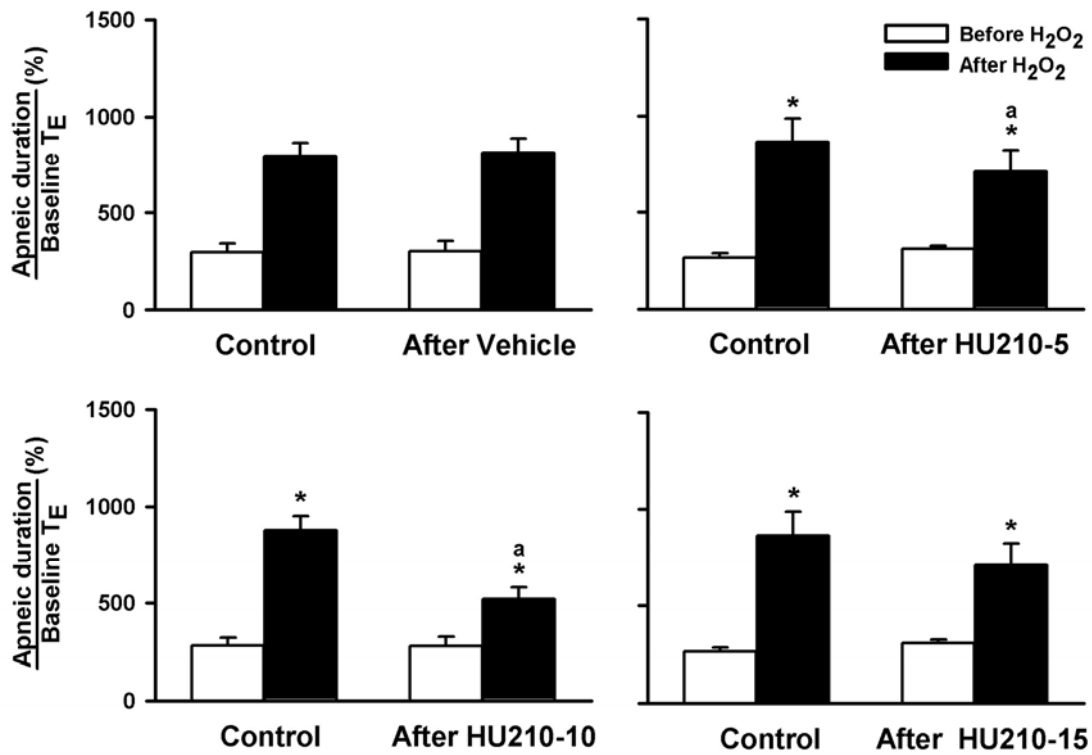


Figure 9. Effects of pretreatment with HU 210 on the H₂O₂-induced augmentation of apneic responses to to capsaicin in four study groups. HU 210 is a highly potent cannabinoid receptor agonist; TE, expiratory time; *, significantly different from the control response; a, significantly different from the response before intervention. Data in each group are mean \pm SE from 8 rats.

結論與建議

1. 大白鼠肺中過多的ROS，尤其是 H_2O_2 和 $\cdot OH$ ，會經由增強C fibers的敏感度，造成C fibers興奮後所引發的呼吸反射反應強度增大。
2. 適當劑量CB receptors agonist的處理能減緩因 H_2O_2 所擴大的呼吸反應。未來我們將進一步探討不同種類的CB receptors分別扮演的角色。
3. 根據我們的實驗結果，在臨床對於呼吸過度反應症患者的治療或許可以考慮給予抗氧化劑或是CB receptors的作用劑，以達到降低呼吸道反應強度的目的。

參考文獻

1. Grootendorst DC, Rabe KF. Mechanisms of bronchial hyperreactivity in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Proceedings of the American Thoracic Society* 1: 77-87, 2004.
2. Emelyanov A, Fedoseev G, Abulimity A, Rudinski K, Fedoulov A, Karabanov A, Barnes PJ. Elevated concentrations of exhaled hydrogen peroxide in asthmatic patients. *Chest* 120: 1136-1139, 2001.
3. Ferreira IM, Hazari MS, Gutierrez C, Zamel N, Chapman KR. Exhaled nitric oxide and hydrogen peroxide in patients with chronic obstructive pulmonary disease: effects of inhaled beclomethasone. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 164: 1012-1015, 2001.
4. Lee LY, Pisarri TE. Afferent properties and reflex functions of bronchopulmonary C-fibers. *Respiration Physiology* 125: 47-65, 2001.
5. Lee, LY, Lin YS, Gu Q, Chung E, Ho CY. Functional morphology and physiological properties of bronchopulmonary C-fiber afferents. *The Anatomical Record* 270:17-24, 2003.
6. Tsai TL, Chang SY, Ho CY, Kou YR. Neural and hydroxyl radical mechanisms underlying laryngeal airway hyperreactivity induced by laryngeal acid-pepsin insult in anesthetized rats. *Journal of Apply Physiology* 101: 328-338, 2006.
7. Belvisi MG. Airway sensory innervation as a target for novel therapies: an outdated concept? *Current Opinion in Pharmacology* 3: 239-243, 2003.
8. Pryor WA. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. *Annual Review of Physiology* 48: 657-667, 1986.
9. MacNee W. Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. *European Journal of Pharmacology* 429: 195-207, 2001.
10. Rahman I, Biswas SK, Kode A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *European Journal of Pharmacology* 533: 222-239, 2006.
11. Ward PA, Warren JS, Johnson KJ. Oxygen radicals, inflammation, and tissue injury. *Free Radical Biology & Medicine* 5: 403-408, 1988.
12. Adams IB, Martin BR. Cannabis: pharmacology and toxicology in animals and humans. *Addiction* 91: 1585-1614, 1996.
13. Gutierrez T, Farthing JN, Zvonok AM, Makriyannis A, Hohmann AG. Activation of

- peripheral cannabinoid CB1 and CB2 receptors suppresses the maintenance of inflammatory nociception: a comparative analysis. British Journal of Pharmacology 150: 153-163, 2007.
14. Elmes SJ, Winyard LA, Medhurst SJ, Clayton NM, Wilson AW, Kendall DA, Chapman V. Activation of CB1 and CB2 receptors attenuates the induction and maintenance of inflammatory pain in the rat. Pain 118: 327-335, 2005.
 15. Patel HJ, Birrell MA, Crispino N, Hele DJ, Venkatesan P, Barnes PJ, Yacoub MH, Belvisi MG. Inhibition of guinea-pig and human sensory nerve activity and the cough reflex in guinea-pigs by cannabinoid (CB2) receptor activation. British Journal of Pharmacology 140: 261-268, 2003.
 16. Yoshihara S, Morimoto H, Yamada Y, Abe T, Arisaka O. Cannabinoid receptor agonists inhibit sensory nerve activation in guinea pig airways. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 170: 941-946. 2004.