

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
THE THAILAND RESEARCH FUND

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการเรื่อง
กลไกการออกฤทธิ์ของสารกลุ่มไฮดรอกซีอะซิโตฟีโนน
ในการกระตุ้นการหลั่งน้ำดี และลดไขมันในเลือด

“Mechanisms of actions of hydroxyacetophenones in
stimulating bile secretion and lowering plasma lipids”

โดย

คณะผู้ดำเนินการวิจัย

ศ. ดร. ภาวิณี ปิยะจตุรวัฒน์ (Pawinee Piyachaturawat)

ศ. ดร. อภิชาติ สุขสำราญ (Apichart Suksamran)

รศ. อาภรณ์ จันทร์จารุณี (Aporn Chuncharunee)

รศ. ดร. สมัยศึก โสภาสรรค์ (Samaisukh Sophasan)

ธันวาคม พ.ศ. 2549

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการเรื่อง

กลไกการออกฤทธิ์ของสารกลุ่มไฮดรอกซีอะซิโตฟีโนนในการกระตุ้น
การหลั่งน้ำดี และลดไขมันในเลือด

**“Mechanisms of actions of hydroxyacetophenones in stimulating bile
secretion and lowering plasma lipids”**

โดย

คณะผู้ดำเนินการวิจัย

1. ศ. ดร. ภาวิณี ปิยะจตุรวัฒน์

2. รศ. ดร. สมัยศึก โสภาสรรค์

3. ศ. ดร. อภิชาติ สุขสำราญ

4. รศ. ศพ.บ.อาภรณ์ จันท์จารุณี

สังกัด

ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล

ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยรามคำแหง

ภาควิชากายวิภาคศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนการวิจัยโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนทุนวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ
(Acknowledgement)

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (The Thailand Research Fund)
ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยประเภททุนองค์ความรู้ใหม่ที่เป็นพื้นฐานต่อการพัฒนา
ประจำปี 2546-2549 ให้กับโครงการวิจัยนี้
สัญญาเลขที่ BRG 4680009

สารบัญ

	เนื้อเรื่อง	หน้า
	บทคัดย่อไทย	i-5
	บทคัดย่ออังกฤษ	i-8
	บทนำ	1
	วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	4
	เนื้อหางานวิจัย	
ตอนที่ 1.	ศึกษาถึงสารเมตาโบไลต์หลักที่ออกมาจากน้ำดี ชนิดของ เกลือน้ำดี ชนิดและปริมาณของสารเมตาโบไลต์หลักของ	1.1
ตอนที่ 2.	สารฟอรัสซีโดฟีโนนที่ขับออกมา การศึกษาถึงฤทธิ์ และกลไกการออกฤทธิ์กระตุ้นการหลั่ง น้ำดีผ่าน transcytotic vesicular pathway	2.1
ตอนที่ 3.	การศึกษาถึงฤทธิ์ และกลไกการออกฤทธิ์กระตุ้นการหลั่ง น้ำดีแบบไม่ขึ้นกับกรดน้ำดีของสาร MHA	3.1
ตอนที่ 4.	การศึกษาถึงฤทธิ์ และกลไกการออกฤทธิ์กระตุ้นการหลั่ง น้ำดีแบบไม่ขึ้นกับกรดน้ำดีของสาร THA ใน Isolated perfuse rat liver	4.1
ตอนที่ 5.	ศึกษาบทบาทของสารในการออกฤทธิ์ลดไขมัน เน้นที่ กระบวนการขนส่งกรดน้ำดีผ่านเซลล์ลำไส้เล็กไปสู่กระแส เลือด	5.1
ตอนที่ 6.	ศึกษาการประยุกต์ใช้ฤทธิ์การกระตุ้นการหลั่งน้ำดีของสาร THA มาช่วยเร่งการกำจัดสารพิษออกจากร่างกายทางน้ำดี	6.1
	สรุปผลการวิจัยที่ได้รับ (Research Output)	5
	ภาคผนวก:	
	ผลงานวิจัยตีพิมพ์ระดับนานาชาติ และ Manuscript	

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของสารกลุ่มอะซีโตฟีโนนกับฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดี ด้วยสารกลุ่มนี้มีโครงสร้างทางเคมีที่คล้ายกัน แต่ฤทธิ์ในการกระตุ้นการหลั่งน้ำดี และคุณภาพของน้ำดีมีความแตกต่างกันอย่างมาก การวิจัยแบ่งออกเป็น 6 ตอนให้ผลดังนี้

1. ศึกษาบทบาทของสารต่อการกระตุ้นการหลั่งน้ำดี โดยหาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการหลั่งน้ำดีและชนิดของเกลือน้ำดีรวมถึงชนิดและปริมาณของเมตาโบไลต์หลักของสาร hydroxy acetophenones (HAs) ที่ขับออกมา ได้ศึกษาสารกลุ่ม HAs ที่มีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดี 4 ตัวคือ 2,4,6-trihydroxy acetophenone (THA), สาร dihydroxy 2 ตัวคือ 2,4 และ 2,6-dihydroxyacetophenone (2,4-DHA; 2,6-DHA) และ 4-monohydroxyacetophenone (MHA) เนื่องจากชนิดของกรดน้ำดีและสารเมตาโบไลต์ที่หลั่งออกมา มีความสามารถในการดึงน้ำจึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญต่อปริมาณของน้ำดีที่หลั่งออกมา ผลการศึกษาพบว่าหลังจากให้สาร HAs ทำให้อัตราการหลั่งน้ำดีของหนูเพิ่มขึ้นอย่างมาก เมื่อวิเคราะห์ชนิดของกรดน้ำดีด้วย HPLC พบว่าในหนูมีกรดน้ำดีหลักที่ตรวจวัดได้ 4 ชนิด คือ กรดน้ำดี cholic, chenodeoxycholic, deoxycholic และ ursodeoxycholic ปริมาณของกรดน้ำดีที่หลั่งออกมา สันนิษฐานว่า สาร 4-MHA กระตุ้นการหลั่งน้ำดีที่ไม่เกี่ยวข้องกับกรดน้ำดี (Bile acid independent fraction, BAIF) และสาร 2,6-DHA กระตุ้นการหลั่งน้ำดีที่ขึ้นตรงกับกรดน้ำดี (Bile acid dependent fraction, BADF) ในขณะที่สาร 2,4-DHA และ 2,4,6-THA กระตุ้นการหลั่งน้ำดีจากกระบวนการทั้งสองแบบ ถึงแม้ว่าปริมาณของน้ำดีที่ออกมาจะแตกต่างกันอย่างมากในฤทธิ์ของสารแต่ละตัว แต่เมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนของกรดน้ำดีชนิดต่างๆที่เป็นชนิดปฐมภูมิ ทุติยภูมิ และตติยภูมิ ที่ถูกขับออกมาในน้ำดีหลังจากถูกกระตุ้นด้วยสาร HAs ทั้ง 4 ชนิดไม่แตกต่างกัน และไม่ต่างจากกลุ่มควบคุม คาดว่าสารเหล่านี้สามารถออกฤทธิ์กระตุ้นการขับกรดน้ำดีจากแหล่งกักเก็บที่มีอยู่เดิมภายในเซลล์ มิได้ออกฤทธิ์กระตุ้นการสร้างกรดน้ำดีที่ขึ้นมาใหม่ และเมื่อศึกษาชนิดและปริมาณของสารเมตาโบไลต์หลักของ HAs ในน้ำดี พบว่าสารเมตาโบไลต์หลักที่พบเป็น glucuronide conjugates ได้แก่ 2,4,6-THA-4-O-glucuronide, 2,6-DHA-2-O-glucuronide, 2,4-DHA-4-O-glucuronide และ 4-MHA-4-O-glucuronide ได้ พบว่าสารเมตาโบไลต์เหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการให้ฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดีของสารต่อไป

2. ด้วยสารกลุ่ม HAs มีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดี มีการขับสารเมตาโบไลต์ หรือ/และกรดน้ำดีออกมาในน้ำดีด้วย จึงทำการศึกษาเพื่อประเมินกลไกการกระตุ้นการหลั่งน้ำดีของสาร HAs ว่าเกี่ยวข้องกับ transcytotic vesicular pathway หรือไม่ และเนื่องจากกระบวนการแทรกตัวของโปรตีนขนส่งเข้าไปที่เยื่อผิวโดยวิธีเอกโซไซโตซิสเป็นกลไกหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการหลั่งน้ำดี ได้ศึกษาถึงบทบาทของสาร HAs ได้แก่ 2,6-DHA, 4-MHA และ 2,4,6-THA ต่อกระบวนการเอกโซไซโตซิสในเซลล์ตับโดยใช้ horseradish peroxidase (HRP) เป็นเครื่องมือในการติดตาม พบว่าสาร MHA ซึ่งเป็นสารที่กระตุ้นการหลั่งน้ำดีแบบ BAIF มีผลเสริมการขับออกของ HRP ในน้ำดีที่ผ่านช่องระหว่างเซลล์ (paracellular pathway) และขนส่งข้ามผ่านเซลล์ (transcellular pathway) ส่วน THA ซึ่งเป็นสารที่กระตุ้นการหลั่งน้ำดีทั้งแบบ BADF และ BAIF กลับไม่มีผลต่อการขับออกของ HRP ในน้ำดี ในขณะที่ DHA ซึ่งเป็นสารที่กระตุ้นน้ำดีแบบ BADF กลับมีผลยับยั้งการขับออกของ HRP ที่ขนส่งข้ามผ่านเซลล์ นอกจากนี้ยังพบว่า colchicine ซึ่งเป็นสารที่ยับยั้งการทำงานของ microtubule จะเพิ่มการขับออกของ HRP ที่ช่องระหว่างเซลล์ สามารถยับยั้งการขับออกของ HRP ที่ขนส่งข้ามผ่านเซลล์ และยับยั้งฤทธิ์ของ MHA ในการกระตุ้นการหลั่งน้ำดีได้ แสดงว่ากลไกการกระตุ้นการหลั่งน้ำดีของ MHA เกี่ยวข้องกับกระบวนการเอกโซไซโตซิส ส่วนฤทธิ์การกระตุ้นน้ำดีของ DHA และ THA

อาจจะไม่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเอกโซไซโตซิส หรืออาจจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการเอกโซไซโตซิสที่ไม่สามารถ label ได้ด้วย HRP จึงได้ดำเนินการศึกษาบทบาทของสาร HAS ในการทำให้เกิด BADF และ BAIF ต่อไป

3. ศึกษาถึงกลไกการทำงานของสาร MHA ซึ่งเป็นสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ในสมุนไพรมากหลายชนิดที่มีสรรพคุณในการรักษาโรค โดยเฉพาะมีผลดีเด่นในการกระตุ้นการหลั่งน้ำดีจากตับ ในการวิจัยนี้ได้วิเคราะห์สารต่างๆที่ออกมาจากน้ำดีได้แก่ MHA-metabolites, GSH และ inorganic electrolytes ได้พบว่า MHA ออกฤทธิ์กระตุ้น BAIF ในหนูปกติได้อย่างดี แต่สารนี้ไม่สามารถกระตุ้นการขับน้ำดีในหนู TR⁻ ซึ่งเป็นหนูที่มีความบกพร่องของตัวขนส่ง multidrug resistance-associated protein-2, Mrp2/Abcc2 มาแต่กำเนิด ฤทธิ์กระตุ้นการขับน้ำดีของ MHA ไม่ได้เกิดจากการขับทิ้งของ Na⁺, K⁺, Cl⁻ หรือ HCO₃⁻ หรือ GSH อย่างไรก็ตามจากการวิเคราะห์น้ำดีด้วย HPLC พบว่ามีสาร metabolite ถูกขับออกมาในน้ำดีหนึ่งตัว คือสาร 4-hydroxyacetophenone-4-O-β glucuronide ในขณะที่ไม่พบสารแม่ในน้ำดี ปริมาณของสาร metabolite นี้ในน้ำดีมีความสัมพันธ์โดยตรงกับอัตราการหลั่งของน้ำดีที่เพิ่มขึ้นในทางตรงข้ามกับหนูปกติ สาร MHA ไม่สามารถกระตุ้นการหลั่งน้ำดีและขับ MHA metabolite ออกมาในหนู TR- สรุปได้ว่ากลไกที่ทำให้เกิดฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดีของสาร MHA เกิดจากการขับสาร major metabolite ของ MHA เองออกมาในน้ำดี และสารดังกล่าวถูกขนส่งด้วยโปรตีนขนส่ง Mrp2 เข้าไปใน canaliculi ทำให้มีการดึงน้ำตามมาอย่างมาก

4. การศึกษาถึงกลไกการกระตุ้นการหลั่งน้ำดีของสาร THA ในตับที่แยกออกมาจากตัว (isolated perfused rat liver) พบว่า THA มีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดีที่ตับโดยตรง และฤทธิ์การกระตุ้นขึ้นอยู่กับขนาดที่ให้ โดยที่ THA ไม่มีผลต่อการขับออกของกรดน้ำดี, บิลิรูบิน และ GSH จากการศึกษาบทบาทของ THA ภายในเซลล์พบว่า THA มีฤทธิ์ยับยั้งการขนส่งของ Mrp2-substrate และ THA ไม่สามารถกระตุ้นการหลั่งน้ำดีในหนู TR- ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าฤทธิ์ในการกระตุ้นการหลั่งน้ำดีแบบ BAIF ของ THA เกิดจากการขับออกของเมตาบอไลต์ผ่าน Mrp2 เมื่อตรวจสอบผลของ THA ต่อปริมาณของโปรตีนขนส่ง Bsep, Mrp2 และ tight junction protein, Zo-1 ไม่พบการเปลี่ยนแปลง นอกจากนี้ THA ยังมีศักยภาพในการบรรเทาภาวะคั่งของน้ำดีที่เกิดจาก estradiol-17 β-D-glucuronide (E₂-17G) ได้ จากการที่ THA มีฤทธิ์การกระตุ้นการหลั่งน้ำดีที่เกิดจากการขับทิ้งของสารที่มีคุณสมบัติในการดึงน้ำสูง โดยอาศัยการทำงานของโปรตีนขนส่ง Mrp2 ดังนั้น THA นับว่ามีศักยภาพสำคัญในการพัฒนาในการลดความเป็นพิษของสารที่ผ่านวิถีและกระบวนการขับออกในลักษณะเดียวกัน เมื่อพิจารณาผลของ THA ต่อการขับออกของกรดน้ำดีนั้นพบว่าฤทธิ์ของ THA ต่อ BADF ขึ้นอยู่กับปริมาณกรดน้ำดีภายในเซลล์โดยจะเห็นผลเมื่อให้กรดน้ำดีจากภายนอกเสริม คาดว่าการทำงานของ Mrp2 จะเร่งการทำงานของ Bsep ที่ทำหน้าที่ขนส่งกรดน้ำดีได้ด้วย

5. ได้ทำการศึกษาบทบาทและกลไกของสาร THA ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งกรดน้ำดีและลดไขมันในเลือดได้ โดยศึกษาหากลไกการทำงานของ THA ที่ออกฤทธิ์ลดไขมันในเลือดว่าเกี่ยวข้องกับการขัดขวางการขนส่งกรดน้ำดีที่ลำไส้เล็กหรือไม่ ได้ใช้สาร HAS ที่มีฤทธิ์ลดไขมันในเลือด 2 ตัวมาศึกษา ได้แก่ สาร THA และ 2,6-DHA ต่อการดูดซึมกรดน้ำดีในลำไส้เล็กส่วนปลายในหนูแรท พบว่าสาร THA ที่ความเข้มข้น 0.5 mM สามารถยับยั้งการขนส่งกรดน้ำดี taurocholate ผ่านเข้าถุงของ brush border membrane ของลำไส้เล็กส่วนปลายได้ประมาณร้อยละ 50 โดยการยับยั้งเป็นแบบแข่งขันกับกรดน้ำดี (competitive) ขณะที่ DHA มีฤทธิ์ดีกว่าสามารถยับยั้งการขนส่งของกรดน้ำดีได้อย่างสมบูรณ์ โดยความเข้มข้นที่ทำให้การยับยั้งได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) เท่ากับ 1.58 mM และเป็นการยับยั้งแบบไม่แข่งขันกับกรดน้ำดี (non-competitive) มีค่า K_i เท่ากับ 7.65 mM นอกจากนี้สาร THA และ DHA ยังยับยั้งการทำงานของ Na⁺-K⁺-ATPase ใน basolateral membrane ของลำไส้เล็กส่วนปลายได้ด้วย โดย

การยับยั้งเป็นแบบ uncompetitive และเพื่อเป็นการยืนยันฤทธิ์ดังกล่าวได้ป้อนสาร THA และ DHA ในขนาด 400 $\mu\text{mol/kg}$ วันละ 2 ครั้ง ให้แก่หนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีโคเลสเตอรอลสูงด้วยอาหารไขมันสูง ร่วมกับการให้กรดน้ำดีเป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าสาร THA และ DHA สามารถลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือดคิดเป็นร้อยละ 60.4 และ 58.9 ของหนูกลุ่มควบคุมได้ นอกจากนี้ยังพบว่าสาร THA มีผลทำให้การขนส่งกรดน้ำดีในลำไส้เล็กส่วนปลายลดลง ขณะที่ระดับการทำงานของ Na^+/K^+ -ATPase ไม่เปลี่ยนแปลง เนื่องจากการออกฤทธิ์ยังยั้งการหลังกรดน้ำดีเข้าลำไส้ดังกล่าวต้องใช้ความเข้มข้นสูง ซึ่งสามารถไปลดการทำงานของ enzyme อื่นในลำไส้เล็กได้ด้วย จึงสรุปได้ว่าฤทธิ์ของสาร THA และ DHA ในการการยับยั้งการขนส่งกรดน้ำดีผ่าน brush border membrane และลดการทำงานของ Na^+/K^+ -ATPase ที่ basolateral membrane ไม่ใช้กลไกหลัก หากเป็นส่วนหนึ่งของกลไกที่จะทำงานร่วมกับฤทธิ์อื่นๆ เช่นฤทธิ์โดยตรงของสารต่อ Cyp7A1 ในการเร่งการสังเคราะห์และขับกรดน้ำดีออกจากร่างกาย เพื่อลดระดับโคเลสเตอรอลของสาร HAs เป็นต้น

6. นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาบทบาทของสารกลุ่ม HAs ที่มีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดีว่าสามารถเร่งการกำจัดสารพิษออกจากร่างกายได้หรือไม่ ในการวิจัยได้เลือกใช้เมทิลเมอร์คิวรีซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ของปรอทที่ร่างกายขับทิ้งออกทางน้ำดี พบว่าสารปรอทมีความเป็นพิษต่อตับ ทำให้อัตราการหลั่งน้ำดีลดลงทันที ในขณะที่เดียวกันระดับของเอนไซม์ ALT และ AST และ Alkaline phosphatase ในพลาสมาและในน้ำดีเพิ่มขึ้น ปริมาณของ GSH ในตับและในน้ำดีลดลง การให้สาร THA เข้าทางลำไส้เล็กส่วนต้น สามารถกระตุ้นการขับน้ำดีในหนูที่ได้รับสารปรอทมาก่อนให้เพิ่มขึ้นได้ แต่ปรากฏว่าทำให้ปริมาณของสารปรอทและ GSH ซึ่งเคยถูกขับออกทางน้ำดีกลับลดลงอย่างมาก อย่างไรก็ตามปริมาณสารปรอทและ GSH ในตับ และดัชนีที่ใช้แสดงความเป็นพิษต่อตับไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับค่าเหล่านั้นในหนูที่ได้รับสารปรอทอย่างเดียว แสดงว่าสาร THA ไม่ได้เพิ่มความเป็นพิษ จึงน่าจะมีทางอื่นที่ร่างกายกำจัดปรอทออกได้ พบว่าสาร THA สามารถกระตุ้นการขับปัสสาวะพร้อมกับการขับสารปรอทออกทางปัสสาวะเพิ่มมากขึ้น แสดงว่าการให้สาร THA มีผลเปลี่ยนการขับทิ้งสารปรอทจากทางน้ำดีให้ไปใช้ทางอื่น โดยเร่งการขับออกทางปัสสาวะ ความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกการกำจัดสารพิษต่างๆโดยตับ และปฏิสัมพันธ์โดยตรงระหว่างสารกับระบบตัวขนส่งสารต่างๆออกจากตับนับว่ามีความสำคัญอย่างมากในการกำหนดวิธีการในการกำจัดสารพิษ เพื่อลดอาการพิษที่เกิดขึ้น โดยสารอาจจะเกิดการแย่งกันเองที่ตัวขนส่งออกจากตับ (transporter) เช่น กรณีนี้เป็นต้น ซึ่งจำเป็นจะต้องมีการศึกษาให้ชัดเจนก่อนนำไปใช้จริง โดยสาร THA อาจจะช่วยขนส่งสารอื่นได้ที่ไม่ใช่โลหะหนัก

โดยสรุปสาร HAs ซึ่งเป็นสารที่พบได้ในพืชสมุนไพรหลายชนิดรวมถึงว่านชักมดลูก มีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดีที่แรง กลไกการออกฤทธิ์เกิดจากการขับทิ้งของสาร metabolite ของ HAs เองซึ่งมีคุณสมบัติในการดึงน้ำออกทางท่อน้ำดีที่แรง และสารดังกล่าวขนส่งโดยโปรตีน Mrp2 นำผ่านเข้าสู่ canaliculi จากคุณสมบัตินี้จะทำให้ HAs รวมถึงพืชสมุนไพรอื่นๆที่มีสาร HAs มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยาลดการเกิดพิษของสารที่ผ่านวิถี และกระบวนการขับออกในลักษณะคล้ายกันที่ตับ อย่างไรก็ตามการที่จะนำไปประยุกต์ใช้ฤทธิ์ดังกล่าวในการรักษาความผิดปกติที่เกิดจากการกั่งของน้ำดีในตับนั้น จำเป็นต้องรู้สาเหตุที่ทำให้เกิดภาวะของความผิดปกตินั้นๆและกระบวนการขับออกให้ชัดเจนก่อนจึงจะเกิดประโยชน์

คำสำคัญ: ว่านชักมดลูก การหลั่งน้ำดี กรดน้ำดี กลูคูโรไนด์เมตาโบไลต์ อะซีโตนีน โปรตีน Mrp2 ลดไขมัน

Abstract

This study aims to elucidate the choleretic effect and mechanism of hydroxyacetophenones (HAs). The compounds differently increased bile flow rate with varying biliary bile acids output in which the secretion varied from essential bile acid dependence (BADF) to essential bile acid independence (BAIF). The mechanisms by which these compounds exerted different actions remain unclear. Multi-component studies were conducted and reported.

1. We determined bile flow rate, biliary bile acid species and major biliary metabolites of hydroxyacetophenones. The compounds used were 2,4,6-trihydroxyacetophenone (THA); 2,4, and 2,6-dihydroxyacetophenone (2,4-DHA and 2,6-DHA) and 4-monohydroxy acetophenone (4-MHA). By using HPLC analysis, four major bile acids species were detected in normal rat bile. They were cholic, chenodeoxycholic, deoxycholic and ursodeoxycholic acids. Although the secreted bile acid outputs were markedly increased, their percent distribution of individual species was not different among compounds and from the control. It is suggested that HAs stimulated biliary secretion of bile acids from the intracellular storage pool in the hepatocyte, not from newly synthesized bile acids. 4-MHA did not alter the output which confirmed that 4-MHA stimulated BAIF. The chemical structures of the major metabolites from HAs in bile were identified as 2,4,6-THA-4-*O*- β -glucuronide, 2,6-DHA-2-*O*- β -glucuronide, 2,4-DHA-4-*O*- β -glucuronide, and 4-MHA-4-*O*- β -glucuronide. These metabolites were main factors responsible for BAIF which were demonstrated in the subsequent studies.

2. Insertion of transporter proteins into the apical canalicular membrane via vesicular transport is one of several choleretic mechanisms. Based on different choleretic activities of HAs, the present study aims to determine if these compounds stimulated vesicular transport in hepatocytes using horseradish peroxidase (HRP), a marker of the transcytotic vesicle pathway. MHA which stimulates BAIF, showed a dose-dependent increase in both the early (paracellular) and late (transcellular) peak of HRP excretion in bile. THA, which stimulates both BADF and BAIF, did not alter the pattern of HRP excretion into bile. However, DHA, which is more hydrophobic and increases only BADF, decreased the late peak. The stimulating effects of MHA on bile flow and HRP excretion were markedly inhibited by colchicine, suggesting that its choleretic action involves stimulation of exocytosis, as well as increase in paracellular permeability. In contrast, the lack of a stimulatory effect of THA and DHA on biliary HRP excretion suggested that their choleretic action is not associated with vesicular exocytosis. These results demonstrate a variable effect of hydroxyacetophenones on the transcytotic vesicular pathway reflecting different choleretic mechanisms and therapeutic potential.

3. The present study examined the underlying mechanism by which 4-hydroxyacetophenone (4-HA), a bioactive compound found in several medicinal herbs, exerts its potent stimulatory effects on hepatic bile secretion. In normal rats, MHA (4-HA) dramatically increased bile flow rate, whereas it failed to exert a choleric effect in TR⁻ rats that have a congenital defect in the multidrug resistance-associated protein-2, Mrp2/Abcc2. This choleresis was not explained by increased biliary output of Na⁺, K⁺, Cl⁻ or HCO₃⁻, or by increased biliary GSH excretion. Depletion of hepatic GSH with buthionine sulfoximine had no effect on the 4-HA-induced choleresis. HPLC analysis revealed that a single major compound was present in bile, namely 4-hydroxyacetophenone-4-O- β -glucuronide, and that the parent compound was not detected in bile. Biliary excretion of the glucuronide was directly correlated with the increases in bile flow. In contrast to normal rats, this 4-HA metabolite was not present in bile of TR⁻ rats. In conclusions, these results demonstrate that the major biliary metabolite of 4-HA in rats is the 4-O- β -glucuronide, a compound that is secreted into bile at high concentrations, and may thus account in large part for the choleric effects of 4-HA. Transport of this metabolite across the canalicular membrane into bile requires expression of the Mrp2 transport protein.

4. The underlying mechanism by which THA induces bile secretion was conducted. THA inhibited the excretion of typical multidrug resistance proteins 2 (Mrp 2) substrates. These results suggest that its choleric activity is mainly related to the increase in BAIF caused by the excretion of osmotically active solutes via Mrp2. THA had no effect on the subcellular localization and distribution of either Mrp2 or the bile salt export pump (Bsep), nor the integrity of the tight junction. In contrast, the choleric activity of THA was completely absent in the TR⁻ rat, an animal model that lacks Mrp2, directly implicating this canalicular export pump as the mechanisms by which THA is excreted in bile. THA also partially reversed the cholestatic effects of estradiol-17 β -D-glucuronide (E₂-17G) a process also dependent on Mrp2. In conclusion, the choleric activity of THA and its possible metabolites is dependent on Mrp2. THA appears to stimulate BF by its osmotic effects, and may attenuate the cholestatic effects of hepatotoxins undergoing biotransformation and excretion via similar pathways.

5. The effects of the choleric and cholesterol lowering compound, 2,4,6-THA and its analog, 2,6-DHA, on ileal bile acid absorption were investigated in rats. THA inhibited taurocholate (TC) uptake into ileal brush-border membrane vesicles (BBMV), showing a maximum inhibition of 50%, whereas DHA completely inhibited TC uptake into ileal BBMV. THA exhibited competitive inhibition with a K_i of 9.88 mM, while DHA showed non-competitive inhibition with a K_i of 7.65 mM. Both total and ouabain-sensitive basolateral membrane (BLM) Na⁺-K⁺-ATPase activities, which are essential for maintenance of the Na⁺-gradient for bile acid transport, were

inhibited by THA and DHA in a dose-dependent manner. The inhibition of BLM ATPase was uncompetitive with a K_i of 10.1 and 5.0 mM for THA and DHA, respectively. Administration of THA or DHA (400 $\mu\text{mol/kg}$) twice a day, to hypercholesterolemic rats for 3 weeks caused similar and marked reductions in plasma cholesterol to 60% of the cholesterol-fed controls. The data suggest that the inhibitory actions of THA and DHA on two essential components of ileal bile acid recycling to liver could, in part, contribute to the cholesterol lowering effect of the hydroxyacetophenone compounds. These effects on decreasing bile acid recycling, in combination with their potent choleretic effect, accelerating biliary excretion of bile acids, are responsible for the effective cholesterol lowering capacities of these compounds.

6. The effect of THA, a choleretic agent, on biliary excretion of MeHg was investigated in adult male rats. Administration of MeHg into the portal vein immediately decreased bile secretion and toxic to liver. Concurrent with the decreased bile flow rate by the MeHg, activities of plasma alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and alkaline phosphatase (ALP) in both plasma and bile were increased whereas hepatic and biliary glutathione (GSH) contents were decreased. Administration of THA enhanced bile secretion in the MeHg-treated animals but markedly reduced the biliary excretion of the mercury and GSH. However, the liver GSH, Hg content and others toxic signs were not significantly altered. The biliary secretion of GSH and Hg were further decreased after administration of THA in the GSH-depleted rats. However, THA induced an increase in urine flow rate and enhanced Hg excretion in the urine. It is suggested that THA modulated the hepatic excretion of mercury by diverting the excretion to other routes such as via urinary excretion. An understanding on the excretory mechanism of mercury, and the actual interactions to the transport systems are essential for setting detoxification strategies.

In conclusion, HAs, a bioactive compound found in several medicinal herbs including *Curcuma comosa*, exerts potent stimulatory effects on hepatic bile secretion. Their choleretic activities are mainly related to the increase in BAIF caused by the excretion of metabolites which are osmotically active solutes via Mrp2. These HAs as well as plants containing HAs may have therapeutic potential to attenuate the cholestatic effects of hepatotoxins undergoing biotransformation and excretion via similar pathways. However, the formation of toxic compound in the liver, its excretory mechanism and interactions to the transport systems are essential for setting detoxification strategies using HAs.

Keywords: Bile acid, Bile secretion, *Curcuma comosa*, glucuronide metabolite, hydroxyacetophenone, Mrp2, lower cholesterol.

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ตับเป็นอวัยวะหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการมีชีวิตอย่างยั่งยืน (Vital organ) เป็นศูนย์กลางที่ทำหน้าที่ควบคุมระดับไขมัน โดยเฉพาะระดับโคเลสเตอรอลในร่างกาย โดยมีบทบาทสำคัญทั้งต่อการสร้างและการกำจัดโคเลสเตอรอลทั้ง ตับยังมีหน้าที่อื่นที่สำคัญอีกหลายอย่าง ได้แก่ เป็นแหล่งกักเก็บและสร้างพลังงาน สร้างโปรตีน ฮอร์โมน และยังทำหน้าที่เปลี่ยนแปลงรูปของสาร (Biotransform) เพื่อกำจัดออกจากร่างกายไม่ว่าจะเป็นสารที่ร่างกายสร้างขึ้นเอง (endogenous compound) หรือสารที่ได้รับจากภายนอก (exogenous compound) หลังจากที่สารถูกเปลี่ยนแปลงรูปโดยเอนไซม์ที่ตับแล้ว จะถูกขับออกจากร่างกายได้ 2 ทาง คือทางตับซึ่งออกไปกับน้ำดี (bile) และทางไตซึ่งออกไปกับปัสสาวะ (urine) สารแต่ละชนิดจะถูกขับออกทางใดนั้นขึ้นกับหลายปัจจัย เช่น ขนาดของโมเลกุล (molecular weight) และการมีหมู่ประจุลบที่มีขั้วของสาร (strongly polar anionic group) (Millburn et al, 1967) ซึ่งการขับสารออกจากร่างกายโดยไปกับการขับน้ำดีนั้นจะมีประสิทธิผลมากเพียงใด ขึ้นกับขบวนการสร้างและการดูดกลับของกรดน้ำดีที่ลำไส้ (enterohepatic circulation) เนื่องจากกรดน้ำดีเป็นตัวการสำคัญในการสร้างน้ำดี ดังนั้นถ้ามีพยาธิสภาพใดๆเกิดขึ้น ที่รบกวนหรือทำให้การไหลของน้ำดีลดลง (cholestasis) มีการคั่งของน้ำดีเกิดขึ้นในตับ จะมีผลกระทบต่อการทำงานของตับและการทำหน้าที่กำจัดสารออกจากร่างกายที่ผ่านทางน้ำดี การสะสมของสารต่างๆดังกล่าวจะทำให้เกิดพิษของสารเหล่านั้นต่อตับได้

มีพืชสมุนไพรหลายชนิดที่มีฤทธิ์ต่อการทำงานของตับ โดยเฉพาะกลุ่ม *Curcuma* species. ของ family Zingiberaceae ในปี ค.ศ. 1956 และ 1957, Ramaprasad และ Siri ได้รายงานถึงฤทธิ์ของขมิ้นชัน (*Curcuma longa*) ว่ามีฤทธิ์ในการกระตุ้นการหลั่งของน้ำดี และขับ cholesterol ออกทางน้ำดี สารที่ออกฤทธิ์ดังกล่าวคือ Curcumin ต่อมาได้มีรายงานว่า Curcumin สามารถลดระดับ cholesterol ในเลือดได้อีกด้วย (Dixit et al., 1988) คณะของผู้วิจัยได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากขมิ้นชัน (*Curcuma comosa*) สมุนไพรไทย ซึ่งเป็นพืชชนิดหนึ่งในกลุ่ม *Curcuma* พบว่าสารสกัดจากขมิ้นชันมีฤทธิ์ดีเด่นในการกระตุ้นการหลั่งน้ำดีจากตับ น้ำดีที่หลั่งออกมาจะมีปริมาณของ cholesterol สูงกว่าปกติ และในขณะที่มีการขับ cholesterol ออกมาทางน้ำดีจะทำให้ระดับ cholesterol ในเลือดลดลง (Piyachaturawat et al., 1996) เมื่อนำสารสกัดนี้ไปศึกษาถึงฤทธิ์ในการลดระดับไขมันในเลือด พบว่าสารสกัดนั้นสามารถลดระดับ triglyceride และ cholesterol ในเลือดได้ (Piyachaturawat et al., 1997)

จากการสกัดแยกสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์สำคัญออกมาจากว่านชักมดลูก พบว่ามีสารเคมีที่สำคัญอย่างน้อย 3 ตัวที่ออกฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดีได้ดี และในสารสำคัญนั้นมีสารตัวหนึ่งเป็น glucoside ของ phloacetophenone (2,4,6 trihydroxyacetophenone, THA) (Suksamrarn et. al., 1996) การออกฤทธิ์ของสาร glucoside โดยทั่วไปเกิดจากส่วนที่เป็น aglycone หรือส่วนที่ไม่มีน้ำตาลของ glucoside ในกรณีนี้ก็เช่นเดียวกันเมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ของสาร phloracetophenone หรือ THA ซึ่งเป็น aglycone พบว่าออกฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดีได้เป็นอย่างดี เช่นเดียวกับฤทธิ์ glucoside เนื่องจากสาร phloacetophenone หรือ THA เป็นสารขนาดเล็กที่มีจำหน่าย และยังพบในพืชอื่นๆอีกมากมาย จึงได้ดำเนินการศึกษาวิจัยโดยใช้สารดังกล่าว พบว่าสาร THA ออกฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดีและลดไขมันซึ่งเป็นฤทธิ์พบใหม่ที่ น่าสนใจ (Piyachaturawat et.al. 1998) เนื่องจากองค์ประกอบของน้ำดีที่ได้จากการกระตุ้นมีคุณสมบัติ พิเศษที่ดีหลายอย่าง กล่าวคือเป็นน้ำดีที่มีความเข้มข้นของกรดน้ำดีสูง ความเข้มข้นของ cholesterol ต่ำ และน้ำดีมีค่า lithogenic index ต่ำ (แนวโน้มของการตกตะกอนก่อนนิวในถุงน้ำดีต่ำ) ทั้งยังสามารถลด ระดับไขมัน cholesterol ในเลือดได้อีกด้วย จึงได้ดำเนินการศึกษาต่อไปในรายละเอียดถึงฤทธิ์และ กลไกการออกฤทธิ์ของสารนี้ในการลดไขมัน cholesterol โดยใช้สัตว์ทดลองที่มีการเหนี่ยวนำให้มีระดับ cholesterol ในเลือดสูงเกินปกติ เพื่อเลียนแบบภาวะไขมันในเลือดสูงเกินปกติ (hypercholesterolemia) (Piyachaturawat et. al., 2002a) ผลที่ได้จากการศึกษายืนยันว่าสาร THA ออกฤทธิ์ลดระดับของไขมันใน เลือดได้ดี โดยออกฤทธิ์ลดระดับของไขมัน cholesterol ใน VLDL และ LDL และไม่มีผลต่อไขมัน cholesterol ใน HDL นอกจากนี้สารดังกล่าวยังทำให้การทำงานของ enzyme cholesterol 7- α -hydroxylase (C-7 α -OHase) ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักในตับที่เปลี่ยน cholesterol ไปเป็นกรดน้ำดี (bile acid) เพิ่มขึ้น มีผลทำให้ร่างกายขับกรดน้ำดี และ cholesterol ออกมาในลำไส้ของสัตว์ทดลองเพื่อขับทิ้ง เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าสาร THA ยังออกฤทธิ์บรรเทาอาการคันของน้ำดี ลดความเป็นพิษของกรด น้ำดีต่อตับได้อีกด้วย (Piyachaturawat et. al., 2002b)

ตามทีสาร THA หรือ 2,4,6-trihydroxyacetophenone เป็นสารที่มีฤทธิ์ดีเด่นในการกระตุ้นการ หลั่งน้ำดี และลดไขมัน cholesterol ในเลือดได้นั้น คณะผู้วิจัยได้ดำเนินการศึกษาถึงศักยภาพในการ ทำงานของสาร โดยศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะโครงสร้างของสารกับการออกฤทธิ์กระตุ้น การหลั่งน้ำดี โดยใช้ analogs และ derivatives ต่างๆ จากผลการวิจัยได้พบข้อมูลที่เป็นองค์ความรู้ใหม่ที่ น่าสนใจ ที่อาจใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการออกแบบสังเคราะห์ยาให้มีฤทธิ์ในการรักษาตามที่ต้องการได้ หรืออาจใช้ทำนายการออกฤทธิ์ ในบรรดาสาร acetophenones ที่ใช้ศึกษามีสารกลุ่ม hydroxyacetophenone ที่มีฤทธิ์ดีเด่นในการกระตุ้นการหลั่งน้ำดีที่น่าสนใจ 4 ตัว ได้แก่สาร 4-

monohydroxyacetophenone (MHA), 2,4-dihydroxy (2,4-DHA) , 2,6-dihydroxy (2,6-DHA) และ 2,4,6-trihydroxyacetophenone (2,4,6-THA) โดยสาร 2,4,6-trihydroxyacetophenone ซึ่งมีกำเนิดมาจากวานชักมดลูกเป็นสารที่มีฤทธิ์เด่นในการกระตุ้นการหลั่งน้ำดี ที่ขับกรดน้ำดีออกมามากและลดไขมันในเลือดได้ ขณะที่สาร 4-MHA เป็นสารที่มีฤทธิ์แปลกแตกต่างออกไปคือ มีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดีที่มีปริมาณน้ำมากไม่เกี่ยวข้องกับการขับกรดน้ำดีและไขมัน คือ เป็น bile acid independent flow (BAIF) ช่วยเจือจางน้ำดีได้ เหมาะสำหรับการช่วยสลายก้อนนิ่วในถุงน้ำดี นอกจากนี้สาร DHA 2 ตัวคือ 2,4 และ 2,6-DHA มีฤทธิ์ต่างกันโดย 2,4-DHA มีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดีแบบ 4-MHA แต่มีปริมาณของกรดน้ำดีออกมามาก ส่วน 2,6-DHA เป็นสารที่มี hydrophobic สูงกระตุ้นน้ำดีที่ให้การกรดน้ำดีและ cholesterol ออกมามาก อีกทั้งยังลดไขมันได้ โดยสรุป สาร hydroxy analogs ของ acetophenone เท่านั้นที่มีฤทธิ์เด่นในการกระตุ้นการหลั่งน้ำดี มีสาร 2 ตัวเท่านั้นที่สามารถลดไขมัน cholesterol ในเลือดได้ คือสาร 2,6-dihydroxyacetophenone และ 2,4,6-trihydroxyacetophenone (2,6-DHA และ 2,4,6-THA) (Piyachaturawat et. al., 2000)

บทบาทของสารใหม่ที่มีความสามารถในการลดไขมัน Cholesterol ในเลือดได้นี้ เป็นเรื่องที่อยู่ในความสนใจของนักวิจัยทั่วโลก เนื่องจากปัญหาไขมันในเลือดสูงและเส้นเลือดอุดตันยังเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการเสียชีวิตและพิการของประชากรทั่วโลก กลไกการออกฤทธิ์ลดไขมันในเลือดของสารดังกล่าวอาจจะอยู่ที่อวัยวะเป้าหมาย 2 แห่ง คือที่ลำไส้เล็ก และที่ตับ กลไกการทำงานของสารอาจจะเกี่ยวข้องกับการออกฤทธิ์รับกวน หรือ ขัดขวางการดูดซึมกลับของกรดน้ำดีที่ลำไส้เล็กส่วนปลาย (distal ileum) โดยอาจจะมีผลรบกวนต่อการทำงานของ ileal bile acid transporter เป็นต้น ส่งผลต่อการควบคุมการทำงานของเอนไซม์ cholesterol 7- α -hydroxylase ในร่างกาย ความรู้ต่างๆเกี่ยวกับบทบาทของการทำงานของ และการควบคุมของ ileal bile acid transporter และเอนไซม์ C-7- α -OHase จะเป็นเป้าหมายใหม่ที่สำคัญทางเภสัชวิทยาอีกเป้าหมายหนึ่งของการพัฒนายาลดไขมัน cholesterol ที่กำลังได้รับความสนใจในปัจจุบัน

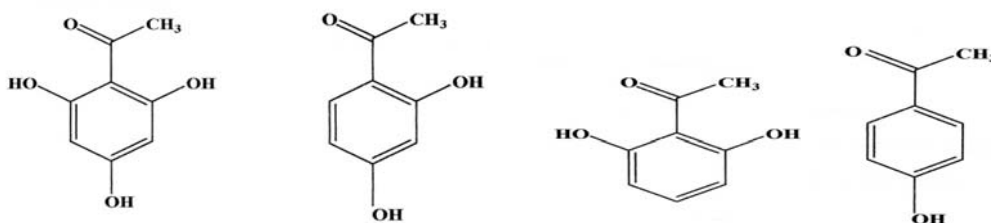
จากการศึกษาวิจัยฤทธิ์ของสมุนไพร ทำให้ได้พบฤทธิ์ที่น่าสนใจในการกระตุ้นการหลั่งน้ำดี และลดไขมันของวานชักมดลูก และฤทธิ์ของสาร THA รวมถึง analogs ล้วนเป็นข้อมูลใหม่ การได้ศึกษากลไกของ analogs รวมถึงการออกฤทธิ์ต่อ bile acids transporter เป็นความก้าวหน้าทางวิชาการเป็นองค์ความรู้ที่จะนำไปใช้เป็นแนวทางในการพัฒนายาใหม่ๆ ให้มีประสิทธิภาพในการรักษาความผิดปกติเกี่ยวกับน้ำดี และไขมันได้ตามที่ต้องการ ความรู้ดังกล่าวจะมีความสำคัญต่อวิชาการทางการแพทย์และเภสัชกรรมต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

ในการศึกษานี้เพื่อค้นหากลไกการทำงานของสารกลุ่ม Hydroxyacetophenones ได้แก่ analogs ของ phloracetophenone (2,4,6-trihydroxyacetophenone; THA) ในระดับเซลล์และระดับโมเลกุล ต่อการกระตุ้นการหลั่งน้ำดีและการขับกรดน้ำดี และลดไขมันในเลือด โดยในการศึกษาจะใช้สาร hydroxyl acetophenones ที่มีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดี 4 ตัวคือ 2,4,6-trihydroxyacetophenone (THA), สาร dihydroxy 2 ตัวคือ 2,4 และ 2,6-dihydroxyacetophenone (2,4-DHA; 2,6-DHA) และ 4-monohydroxyacetophenone (4MHA) โดยมีรายละเอียดดังนี้

1. ศึกษาบทบาทของสาร hydroxyacetophenones (HAs) ต่างๆในกลุ่มทั้ง 4 ตัวต่อการกระตุ้นการหลั่งน้ำดีและขับกรดน้ำดีชนิดต่างๆที่ถูกขับออกมา เปรียบเทียบปริมาณของกรดและชนิดของน้ำดีที่เป็น primary, secondary และ tertiary bile acids และศึกษาถึงสารเมตาโบไลต์หลักของสาร hydroxyacetophenones (major metabolite) ที่ออกมากับน้ำดี และวิถีทางหลักในการกำจัดสารดังกล่าวเป็นตัวย่อย ซึ่งมีความสำคัญต่อการขับ และขนส่งกรดน้ำดีเข้าสู่ตับ ไปออกฤทธิ์ควบคุมการสร้างและการหลั่งน้ำดีต่อไป
2. ศึกษากลไกของสารกลุ่ม HAs ในการกระตุ้นการหลั่งน้ำดี โดยเฉพาะสาร 2 ตัวหลัก MHA และ THA ที่มีฤทธิ์แรงในการกระตุ้นการหลั่งน้ำดีที่เป็น BAIF และ BAIF ร่วมกับ BADF ตามลำดับ และวิถีทางหลักในการกำจัดสารดังกล่าว ซึ่งจะมีบทบาทสำคัญต่อการสร้างและการหลั่งน้ำดีต่อไป
3. ศึกษาบทบาทของสาร THA ต่อกระบวนการขนส่งกรดน้ำดีผ่านเซลล์ลำไส้เล็กไปสู่กระแสเลือด เข้าสู่ตับไปออกฤทธิ์ควบคุมการสร้างและการหลั่งน้ำดีต่อไป
4. ศึกษาการประยุกต์ใช้สาร THA ที่กระตุ้นการหลั่งน้ำดี ในการช่วยกำจัดสารพิษปรอทออกจากตับและจากร่างกาย

โดยการวิจัยแบ่งออกเป็น 6 การทดลองย่อยดังนี้



โครงสร้างของสาร hydroxyacetophenones ที่มีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดี 4 ตัว คือ 2,4,6-trihydroxyacetophenone (THA), สาร dihydroxy 2 ตัวคือ 2,4 และ 2,6-dihydroxyacetophenone (2,4-DHA; 2,6-DHA) และ 4-monohydroxyacetophenone (MHA, 4-HA)

เอกสารอ้างอิงบทนำ

1. Bouchard, G., Yousef, I.M., Tuchweber, B. (1993). Influence of oral treatment with ursodeoxycholic and tauro-ursodeoxycholic acids on estrogen-induced cholestasis in rats: effects on bile formation and liver plasma membranes. *Liver* 13: 193-202.
2. Dixit, V.P., Jain, P., Joshi, S.C. (1988). Hypolipidemic effect of *Curcuma longa* L. and *Nardostachys jatamansi* DC. in triton-induced hyperlipidemic rats. *Ind. J. Physiol. Pharmacol*, 32: 299-304.
3. Jurgens, T.M., Frazier, E.G., Schaeffer, J.M., Jones, T.E., Zink, D.L., Borris, R.P., Nanakorn, W., Beck, H.T., Balick, M. J. (1994). Novel nematocidal agents from *Curcuma comosa* J. *Nat. Prod.* 57: 230-235.
4. Millburn, P., Smith, R.L., Williams, R.T. (1967). Biliary excretion of foreign compounds; biphenyl, stilboestrol and phenolphthalein in rat: molecular weight, polarity and metabolism as factors in biliary excretion. *Biochem. J.* 105: 1275-1281.
5. Ozaki, Y., Soedigdo, S. (1988). Cholagogic effect of Zingiber plants obtained from Indonesia. *Shoyakugaku Zasshi*, 42, 333-336.
6. Piyachaturawat, P., Gansar, R., Suksamrarn, A. (1996). Choloretic effect of *Curcuma comosa* rhizome extracts in rats. *Int. J. Pharmacog.* 34: 174-178.
7. Piyachaturawat, P., Teeratagolpibal, N., Toskulkao, C., Suksamrarn, A. (1997). Hypolipidemic effect of *Curcuma comosa* in mice. *Artery* 22 (4): 233-241.
8. Piyachaturawat, P., Suwanumpai, P., Komarat, P., Chuncharunee, A., Suksamrarn, A. (1998). Effect of phloracetophenone on bile flow and biliary lipids in rats. *Hepatology Research* 12: 198-206.
9. Piyachaturawat, P., Chai-ngam, N., Chuncharunee, A., Komaratat, P., Suksamrarn, A. (2000). Choloretic activity of phloracetophenone in rats: Structure-function studies using acetophenone analogues. *European J. Pharmacol.* 387: 221-227.
10. Piyachaturawat, P., Srivoraphan, P. Chuncharunee, A., Komarat, P., Suksamrarn A. (2002a). Cholesterol lowering effect of a choloretic phloracetophenone in hypercholesterolemic hamsters. *European J. Pharmacol.* 439: 141-147.
11. Piyachaturawat, P., Tubtim, C., Chuncharunee, A., Komarat, P., Suksamrarn A. (2002b). Evaluation of the acute and subacute toxicity of a choloretic phloracetophenone in experimental animals. *Toxicol. Letter.* 129 (1-2): 123-132.
12. Ramprasad, C., Sirsi, M. (1956). Studies on Indian medicinal plants: *Curcuma longa* Linn: Effect of curcumin the essential oils of *C. longa* on bile secretion. *J. Sci. Ind. Res.* 15C: 262-265.
13. Ramprasad, C., Sirsi, M. (1957). *Curcuma longa* and bile secretion; quantitative changes in the bile constituents induced by sodium curcumin. *J. Sci. Ind. Res.*, 16C: 108-110.
14. Suksamrarn, A., Eiamong, S., Piyachaturawat, P., Byrne, L.T. (1997). Phloracetophenone glucoside with choloretic activity from *Curcuma comosa*. *Phytochemistry* 45: 103-105.

ตอนที่ 1.

ศึกษาชนิด และปริมาณของกรดน้ำดี และของสารเมตาโบไลต์หลักของสาร HAs ที่ออกมา กับน้ำดี

บทคัดย่อ

ศึกษาบทบาทของสารกลุ่ม hydroxyacetophenones (HAs) ต่อการกระตุ้นการหลั่งน้ำดี โดยวัดอัตราการหลั่งน้ำดีและชนิดของเกลือน้ำดีที่เป็นส่วนประกอบ ชนิดและปริมาณของสารเมตาโบไลต์หลักของสารฟอรัสซีโดฟีโนนที่ขับออกมา ได้ทำการศึกษาสารกลุ่ม HAs ที่มีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดี 4 ตัวคือ 2,4,6-trihydroxyacetophenone (THA), สาร dihydroxy 2 ตัวคือ 2,4 และ 2,6-dihydroxyacetophenone (2,4-DHA; 2,6-DHA) และ 4-monohydroxy acetophenone (4MHA) เนื่องจากชนิดของกรดน้ำดีและสารเมตาโบไลต์ที่หลั่งออกมาในน้ำดีเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญต่อปริมาณของน้ำดีที่ส่งออกมา จากการศึกษพบว่า หลังจากให้สารฟอรัสซีโดฟีโนนและอะนาโลกในขนาด 100 mg/kg BW ทำให้อัตราการหลั่งน้ำดีของหนู Rat เพศผู้ เพิ่มขึ้นอย่างมาก โดยเพิ่มจากระดับ 63.7 ± 2.2 $\mu\text{L/kg BW/min}$ ในกลุ่มควบคุม เป็น 131.1 ± 15.0 , 119.5 ± 5.9 , 99.4 ± 9.2 และ 164.8 ± 12.5 $\mu\text{L/kg BW/min}$ ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ชนิดของกรดน้ำดีพบว่าในหนู rat มีกรดน้ำดีหลักที่ตรวจวัดได้ในการศึกษานี้ 4 ชนิด คือกรดน้ำดี cholic, chenodeoxycholic, deoxycholic และ ursodeoxycholic คิดเป็นร้อยละ 69.7 ± 1.0 , 9.0 ± 0.6 , 3.1 ± 0.2 และ 18.2 ± 0.6 ของกรดน้ำดีทั้งหมด ตามลำดับ ปริมาณกรดน้ำดีทั้งหมดที่ขับออกมาในน้ำดี หลังจากได้รับสาร 2,4-DHA, 2,6-DHA และ 2,4,6-THA เพิ่มขึ้นเป็น 164.4 ± 8.6 , 177.7 ± 7.1 และ 199.5 ± 26.2 % ของกลุ่มควบคุมตามลำดับ โดยที่สาร 4-MHA ไม่มีผลต่อการขับกรดน้ำดี ผลการศึกษสนับสนุนว่า สาร 4-MHA กระตุ้นการหลั่งน้ำดีที่ไม่ขึ้นกับกรดน้ำดี (BAIF) และสาร 2,6-DHA กระตุ้นน้ำดีที่ขึ้นกับกรดน้ำดี (BADF) ในขณะที่สาร 2,4-DHA และ 2,4,6-THA กระตุ้นให้มีการหลั่งน้ำดีเพิ่มขึ้นจากกระบวนการทั้งสองแบบ การกระจายขององค์ประกอบของกรดน้ำดีชนิดต่างๆที่ขับออกมาในน้ำดีหลังจากได้รับสารไฮดรอกซีอะซิโดฟีโนนทั้ง 4 ชนิดไม่แตกต่างกันและไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม คาดว่าสารเหล่านี้อาจออกฤทธิ์กระตุ้นการขับกรดน้ำดีจากแหล่งกักเก็บที่มีอยู่เดิมในเซลล์ ไม่ได้เกิดจากการออกฤทธิ์กระตุ้นการขับน้ำดีที่สร้างขึ้นใหม่ จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารเมตาโบไลต์ในน้ำดี พบว่าสารเมตาโบไลต์หลักที่พบคือ 2,4,6-THA-4-O-glucuronide, 2,6-DHA-2-O-glucuronide, 2,4-DHA-4-O-glucuronide และ 4-MHA-4-O-glucuronide

บทนำ

ตามที่สารกลุ่ม hydroxyacetophenones (HAs) ที่มีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดี 4 ตัว คือ 2,4,6-trihydroxyacetophenone (THA), สาร dihydroxy 2 ตัวคือ 2,4 และ 2,6-dihydroxyacetophenone (2,4-DHA; 2,6-DHA) และ 4-monohydroxy acetophenone (4MHA) ให้ผลกระตุ้นการหลั่งน้ำดีที่แตกต่างกันเนื่องจากชนิดของกรดน้ำดีที่หลั่งออกมาเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญต่อปริมาณของน้ำดีที่ส่งออกมา การหาชนิดและปริมาณของกรดน้ำดีหลังจากถูกกระตุ้นได้แก่ กรดน้ำดีที่เป็นชนิดปฐมภูมิ ทุติยภูมิ

และคดียกยุมิ เป็นต้น จึงอาจนำไปสู่การอธิบายกลไกการออกฤทธิ์ของสาร รวมถึงการศึกษาวิเคราะห์หาโครงสร้างของเมตาโบไลต์หลักของสาร HAs ที่ถูกขับออกมาคับน้ำดี (major metabolite) ว่ามีโครงสร้างอย่างไร มีบทบาทสำคัญต่อการควบคุมการสร้างและการหลั่งน้ำดีที่ดัดอย่างไร

วัตถุประสงค์การวิจัย

1.1 ได้ศึกษาบทบาทของสาร HAs ต่างๆในกลุ่มทั้ง 4 ตัวต่อการกระตุ้นการหลั่งน้ำดีและชนิดต่างๆของกรดน้ำดีที่ขับออกมา เปรียบเทียบปริมาณของกรดน้ำดีที่เป็น primary, secondary และ tertiary bile acids

1.2 ศึกษาวิเคราะห์หาโครงสร้างของสารเมตาโบไลต์หลัก (major metabolite) ของสาร HAs ที่ออกมาคับน้ำดี ซึ่งอาจจะมีบทบาทสำคัญต่อการขนส่งกรดน้ำดีผ่านลำไส้ และเข้าสู่ตับไปออกฤทธิ์ควบคุมการสร้างและการหลั่งน้ำดีต่อไป

วิธีวิจัย

1.1 การศึกษาบทบาทของสาร hydroxyacetophenone ต่อชนิดของกรดน้ำดี และเมตาโบไลต์ของสารในน้ำดี

1. การเตรียมสัตว์ทดลองเพื่อเก็บน้ำดี

การศึกษาถึงฤทธิ์ของสารต่อการกระตุ้นการหลั่งน้ำดีได้ทำการศึกษาในหนู rat เนื่องจากหนู rat ไม่มีถุงน้ำดี น้ำดีที่ได้จะหลั่งออกมาโดยตรงจากตับ ทำให้ง่ายต่อการศึกษาถึงปัจจัยต่างๆที่มีอิทธิพลต่อการหลั่ง และการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของน้ำดี ใช้หนู rat พันธุ์ Wistar เพศผู้ น้ำหนักประมาณ 200-250 กรัม เป็นสัตว์ทดลองเลี้ยงด้วยอาหารหนูมาตรฐาน อาหารหนู 1 กิโล สลับด้วยยาสลบ Nembutal (35-50 mg/kg., i.p.) สอดท่อเข้าหลอดลม (tracheostomy) เพื่อช่วยในการหายใจ cannulate bile duct ด้วย polyethylene tube (PE) No. 10 เพื่อเก็บน้ำดี สอดท่อ PE No. 50 เข้า femoral vein เพื่อใช้ในการ infuse สารละลาย ทำการ infuse ด้วย normal saline เพื่อทดแทนการสูญเสียของสัตว์ระหว่างการทดลอง อุณหภูมิของสัตว์ทดลองถูกควบคุมให้อยู่ที่ 37°C ด้วย rectal probe ต่อเข้ากับ temperature regulator และโดยใช้ไฟส่องให้ความร้อนเหนือตัวสัตว์ ทำการเก็บน้ำดีที่ไหลออกมาจากท่อน้ำดีเป็นเวลา 30 นาที น้ำดีช่วง 30 นาทีแรกจะทิ้งไปและเก็บต่ออีก 30 นาที เพื่อใช้เป็นตัวควบคุม (control) หลังจากนั้นทำการฉีดสารละลายที่ต้องการจะทดสอบทีละตัว ทั้ง 4 ตัว ในขนาดที่ให้ฤทธิ์การกระตุ้นได้สูงสุด (ขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม) เข้าสู่โพรงลำไส้เล็กส่วนต้นบริเวณ duodenum ทำการเก็บน้ำดีช่วงละ 30 นาที ต่ออีกเป็นเวลา 4 ครั้ง น้ำดีที่ได้จะนำไปชั่งน้ำหนักหาน้ำหนักของน้ำดีที่ได้ในแต่ละช่วง คำนวณหาฤทธิ์การกระตุ้นอัตราการหลั่งน้ำดี (Bile flow rate) นำน้ำดีไปหาปริมาณกรดน้ำดีชนิดต่างๆที่เป็นส่วนประกอบในน้ำดีนั้นๆ โดยใช้วิธี High performance liquid chromatography (HPLC)

2. การวิเคราะห์หาปริมาณกรดน้ำดีโดยใช้ HPLC

ทำการสกัดกรดน้ำดีออกจากน้ำดีโดยใช้วิธีของ Nakayama *et al*, 1980 โดยนำน้ำดีที่ได้ไปตกตะกอนโปรตีนด้วยแอลกอฮอล์ (ethanol) 20 ปริมาตร แช่ในอ่างน้ำร้อนจนเริ่มเห็นการตกตะกอน และนำออกมาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน หลังจากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง ทำการลดปริมาตรลงจนเหลือเท่ากับปริมาตรเริ่มต้นด้วยการเป่าด้วยก๊าซไนโตรเจนจนแห้ง ทำการละลายตะกอนกลับ กรองด้วยตัวกรองขนาด 0.45 ไมครอน นำน้ำดีที่ได้มาแยกชนิดต่างๆของกรดน้ำดีที่มีอยู่ด้วยวิธี HPLC

ระบบ HPLC ที่ใช้แยกกรดน้ำดีจากน้ำดี ใช้วิธีของ Nakayama *et al*, 1980 คือ Reverse phase system อุปกรณ์ประกอบด้วยตัว controller, pump, detector, manual injectors เป็นของบริษัท Water Associates ประเทศสหรัฐอเมริกา ส่วนคอลัมน์ที่ใช้คือ μ -Bondapak C₁₈ (125 Å, 10 μ m, 3.9x300 mm) สารละลายตัวพาที่ใช้คือ สารละลายผสมระหว่าง acetonitrile-methanol-0.03 M phosphate buffer, และอัตราการไหลของสารตัวพา คือ 0.5 มิลลิลิตร/นาที และวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 200 nm.

การแยกชนิดของกรดน้ำดี จะทำการศึกษาเทียบกับกรดน้ำดีมาตรฐานจากบริษัท Sigma Chemical Co. รวม 7 ชนิดดังนี้ tauroursodeoxycholic acid (TUDC), glycooursodeoxycholic acid (GUDC), taurocholic acid (TC), glycocholic acid (GC), taurochenodeoxycholic acid (TCDC), glycochenodeoxycholic acid (GCDC) and taurodeoxycholic acid (TDC) การเตรียม standard curve ทำการเตรียมที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.25 μ g/ μ l จนถึง 1 μ g/ μ l นิดสารละลายเกลื่อน้ำดีมาตรฐานในขนาด 20 μ l นำข้อมูลพื้นที่ใต้กราฟของสารแต่ละตัวที่ความเข้มข้นต่างๆมา plot เป็น standard curve เพื่อใช้คำนวณหาปริมาณกรดน้ำดีในสารตัวอย่างที่ทดสอบต่อไป

การหาปริมาณของกรดน้ำดีแต่ละชนิดจากตัวอย่างน้ำดี ทำการนึ่งน้ำดีที่สกัดแล้วตามวิธีข้างต้นปริมาตร 10-20 μ l. เข้าเครื่อง HPLC นำพื้นที่ใต้กราฟของแต่ละโครมาโตแกรมไปคำนวณหาปริมาณของกรดน้ำดีแต่ละชนิดจากสมการที่ได้จาก standard curve จะทำให้ได้ปริมาณของกรดน้ำดีที่เป็นส่วนประกอบในน้ำดีตัวอย่างนั้นๆ ผลรวมของเกลื่อน้ำดีแต่ละชนิดจะถือว่าเป็น ปริมาณของเกลื่อน้ำดีทั้งหมดที่ประกอบในน้ำดีตัวอย่างนั้น

3. การศึกษาเพื่อวิเคราะห์หาโครงสร้างของสาร major metabolite ของ hydroxyacetophenones ในน้ำดี

ระบบของ HPLC ที่จะใช้ในการทดลองนี้ใช้ preparative HPLC (large scale HPLC) ทั้งนี้เพื่อฉีดสารจำนวนมากๆ คอลัมน์ที่ใช้คือ Novapak C₁₈ ขนาด 39 x 100 mm ของบริษัท Water Associates ประเทศสหรัฐอเมริกา สารละลายที่ใช้เป็นสารตัวพา คือ methanol: 5% acetic acid in water ในอัตราส่วน 5: 95 อัตราการไหลของตัวพา คือ 10 ml/min. ปริมาตรสารตัวอย่างที่ฉีดแต่ละครั้ง คือ 1 ml วัดการดูดกลืนแสงที่ 280 nm เก็บสารละลายตัวพาที่มีสาร metabolite ที่ผ่านจากคอลัมน์ไว้ นำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องทำให้แห้งโดยใช้ความเย็น (freeze dryer) เพื่อการสกัดเอาสาร metabolites ไปหาสูตรโครงสร้างต่อไปโดยใช้วิธี NMR และ Mass Spectrophotometry

เนื่องจาก metabolites ของสาร HAs อาจจะเป็นตัวการสำคัญในการก่อให้เกิดฤทธิ์ต่างๆ จึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษา ขั้นตอนของการเก็บน้ำดีและการให้สารทดสอบจะทำเช่นเดียวกันกับข้างต้น น้ำดีที่ได้จะถูกนำมารวมนกัน (pooled bile) เพื่อให้ได้น้ำดีในปริมาณที่มากพอ ปกติจะใช้น้ำดีจากหนูประมาณ 5-10 ตัว สกัดเพื่อตกตะกอนโปรตีน แล้วนำน้ำดีที่ได้ไปแยกเก็บสาร metabolites ด้วย preparative HPLC สารละลายที่ใช้เป็นสารตัวพา คือ methanol: 5% acetic acid in water ในอัตราส่วน 5: 95 อัตราการไหลของตัวพา คือ 0.5 ml/min. ปริมาตรสารตัวอย่างที่ฉีดแต่ละครั้ง คือ 10 μ l. วัดการดูดกลืนแสงที่ 280 nm คอลัมน์ที่ใช้คือ μ -Bondapak C_{18} และคำนวณหาปริมาณของสาร major metabolite จากสมการที่ได้จาก standard curve โดยใช้สาร metabolite ที่ได้จากการทดลองข้างต้นเป็นสารมาตรฐาน

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล (Results and Discussion)

จากการกระตุ้นการหลั่งน้ำดีของสารกลุ่ม hydroxy acetophenones ในขนาด 100 mg/kg BW ซึ่งเป็นขนาดที่ให้ฤทธิ์สูงสุด โดยเปรียบเทียบอัตราการหลั่งน้ำดีที่ 30 นาทีหลังจากให้สาร สาร hydroxyacetophenones ทั้ง 4 ตัว ได้แก่ 4-MHA, 2,4-DHA, 2,6-DHA และ 2,4,6-THA สามารถเพิ่มอัตราการหลั่งน้ำดี ได้มากกว่าเท่าตัว คือเพิ่มขึ้นเป็น 231.1 ± 15.0 , 219.5 ± 5.9 , 199.4 ± 9.2 และ 264.8 ± 12.5 % ตามลำดับเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมก่อนได้รับสารกระตุ้นโดยให้เป็น 100% (ตารางที่ 1.1)

ดังรูปที่ 1.1 แสดงถึงโครมาโตแกรมและ retention time ของกรดน้ำดีมาตรฐานแต่ละชนิด หลังจากฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยกรดน้ำดีเริ่มปรากฏออกมาตั้งแต่นาทีที่ 10 เป็นต้นไปตามลำดับดังนี้ (a) tauroursodeoxycholic acid (TUDC), (b) glyoursodeoxycholic acid (GUDC), (c) taurocholic acid (TC), (d) glycocholic acid (GC), (e) taurochenodeoxycholic acid (TCDC), (f) glycochenodeoxycholic acid (GCDC) and (g) taurodeoxycholic acid (TDC) รูปที่ 2 แสดงถึงชนิดของกรดน้ำดีหลังจากฉีดตัวอย่างน้ำดีที่ได้จากสัตว์ทดลองก่อนให้สารกระตุ้น ปริมาณของกรดน้ำดีแต่ละชนิดสามารถคำนวณได้จากพื้นที่ใต้กราฟของแต่ละโครมาโตแกรม เมื่อรวมพื้นที่ใต้กราฟทั้งหมด จะได้ปริมาณของกรดน้ำดีทั้งหมดที่ถูกขับออกมา (total bile acid output) รูปที่ 3 แสดงถึงปริมาณของกรดน้ำดีที่ถูกขับออกมา (total bile acid output) หลังจากถูกกระตุ้นด้วยสารกลุ่ม hydroxyacetophenones พบว่าปริมาณของกรดน้ำดีที่ค่าควบคุมก่อนให้สารกระตุ้นมีค่าประมาณ 540.0 ± 20.0 nmol/kg BW/min การให้สาร 2,4-DHA, 2,6-DHA, and 2,4,6-THA สารทั้ง 3 ตัวกระตุ้นการขับกรดน้ำดีออกมาเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน ส่วนสาร 4-MHA ไม่มีผลเพิ่มปริมาณของกรดน้ำดี (รูปที่ 3)

จากการวิเคราะห์แยกชนิดของกรดน้ำดีที่ถูกขับออกมาหลังจากถูกกระตุ้น ดังตารางที่ 2-6 วิเคราะห์

ชนิดของกรดน้ำดีที่ถูกขับออก (Bile acid species) ในภาวะปกติ น้ำดีที่ได้จากหนูมีกรดน้ำดีอยู่ 4 ชนิด ดังนี้คือ cholic acid, chenodeoxycholic acid, deoxycholic acid, and ursodeoxycholic acid

1. **Cholic acid** เป็นกรดน้ำดีปฐมภูมิ (primary bile acids) เป็นกรดน้ำดีหลักที่พบในน้ำดีของหนู สาร 2,4,6-THA กระตุ้นกรดน้ำดีชนิดนี้ได้มากที่สุดคือประมาณ 203.7 ± 28.2 % ตามด้วยสาร 2,6-DHA (174.3 ± 7.2 %) และ 2,4-DHA (159.1 ± 6.9 %) ตามลำดับ โดยเทียบกับกลุ่มควบคุม (100%) ส่วน 4-MHA (108.9 ± 7.9 %) ไม่มีผลต่อการขับกรดน้ำดี (ตารางที่ 2)
2. **Chenodeoxycholic acid** เป็น primary dihydroxy bile acid ที่เด่นในคน แต่ในหนูจะมีเพียง 5-10 % . สาร chenodeoxycholic acid มีฤทธิ์แรงในการกระตุ้นการหลั่งกรดน้ำดี (choleretic activity สูง) ผลการวิจัยพบว่า 2,4,6-THA, 2,6-DHA และ 2,4-DHA กระตุ้นกรดน้ำดีชนิดนี้ได้ 201.0 ± 44.5 % , 176.4 ± 14.6 % และ 166.3 ± 36.1 % ตามลำดับ ขณะที่ 4-MHA (108.9 ± 7.9 %) ไม่มีผลต่อการขับกรดน้ำดี (ตารางที่ 3)
3. **Deoxycholic acid** เป็น secondary bile acid ที่มีฤทธิ์แรงในการกระตุ้นการหลั่งกรดน้ำดี (choleretic activity สูง) แต่ในหนูมีกรดชนิดนี้อยู่เพียง 3-5 % การให้สาร 2,4,6-THA, 2,6-DHA และ 2,4-DHA กระตุ้นได้ 32.8 ± 7.2 , 17.7 ± 0.6 และ 22.9 ± 4.1 nmol/kg BW/min ตามลำดับ เทียบกับ 16.5 ± 1.5 nmol/kg BW/min ในกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 4)
4. **Ursodeoxycholic acid** มีฤทธิ์แรงที่สุดในการกระตุ้นการหลั่งกรดน้ำดี (choleretic activity) ในกลุ่มควบคุมมีกรดน้ำดีชนิดนี้ ประมาณ 96.3 ± 2.4 nmol/kg BW/min หรือ 18.2 ± 0.7 % ของปริมาณกรดน้ำดีทั้งหมด สาร 2,4,6-THA, 2,6-DHA และ 2,4-DHA กระตุ้นการขับกรดน้ำดีชนิดนี้ได้ประมาณ 197.0 ± 24.2 % , 193.7 ± 7.2 และ 193.7 ± 8.8 % ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

จากการเปรียบเทียบสัดส่วนของกรดน้ำดีชนิดต่างๆหลังที่ออกมาในน้ำดี หลังจากถูกกระตุ้นด้วยสารในกลุ่ม hydroxyacetophenone แต่ละตัว พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน เช่น ปริมาณของ primary bile acid เป็น cholic acid มีค่า ประมาณ 68.9 ± 3.1 % (ในกลุ่มควบคุม) , 66.8 ± 2.5 % (กลุ่ม solvent), 70.0 ± 1.7 % (กลุ่ม 4-MHA), 67.7 ± 2.1 % (กลุ่ม 2,4-DHA), 69.2 ± 2.7 % (กลุ่ม 2,6-DHA) และ 68.4 ± 2.4 % (กลุ่ม 2,4,6-THA) ตามลำดับ มีปริมาณของ primary bile acid ที่เป็น chenodeoxycholic acid อยู่ระหว่าง 8.1 ± 1.9 ถึง 11.4 ± 0.9 % . มี secondary bile acid คือ deoxycholic acid อยู่ระหว่าง 2.04 ± 0.2 ถึง 4.4 ± 0.6 % . Ursodeoxycholic acid, tertiary bile acid อยู่ระหว่าง 17.6 ± 2.0 % ถึง 20.9 ± 0.8 % (ตารางที่ 6).

ถึงแม้ว่าปริมาณของกรดน้ำดีชนิดต่างๆจะแตกต่างกัน แต่เนื่องจากสัดส่วนของการกระจายของกรดน้ำดีชนิดต่างๆที่ถูกขับออกมาในน้ำดีหลังจากถูกกระตุ้นสาร 2,4,6-THA, 2,6-DHA และ 2,4-DHA เป็นเวลา 30 นาทีนั้น ไม่มีความแตกต่างกัน อาจสรุปได้ว่าสารเหล่านั้นออกฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งกรดน้ำดีที่มีอยู่แล้วจากแหล่งกักเก็บภายในเซลล์ ไม่ได้เกิดจากการกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์กรดน้ำดีขึ้นมาใหม่แล้วขับออก

Table 1: Bile flow rates (BFR) in response to 2,4,6-trihydroxyacetophenone (2,4,6-THA) and its hydroxy analogs administration.

BFRs were obtained at 30 min after a single intraduodenal injection of the compound at the dose of 100 mg/kg BW.

Compounds	No. of animals	Bile flow rate (μ l/kg BW/min)		
		Before treatment	After treatment	% of Control
control	6	62.2 $\pm$ 4.1	63.1 $\pm$ 4.6	101.2 $\pm$ 2.1
solvent	6	63.7 $\pm$ 2.2	69.4 $\pm$ 1.9	109.3 $\pm$ 2.9
4-MHA	5	56.3 $\pm$ 1.0	130.1 $\pm$ 8.9*	231.1 $\pm$ 15.0 [#]
2,4-DHA	6	62.6 $\pm$ 3.3	137.5 $\pm$ 8.6*	219.5 $\pm$ 6.5
2,6-DHA	5	62.1 $\pm$ 3.0	122.7 $\pm$ 2.7*	199.4 $\pm$ 10.3
2,4,6-THA	5	58.8 $\pm$ 1.9	156.2 $\pm$ 10.7*	264.8 $\pm$ 14.00
				164.8 $\pm$ 12.5 [#]

Each value is mean $\pm$ S.E.M. * $p < 0.001$, compared with control period before treatment, [#] $p < 0.001$, compared with solvent control (4-MHA, 2,4-DHA and 2,6-DHA are 4-monohydroxy, 2,4-dihydroxy and 2,6-dihydroxy acetophenones, respectively).

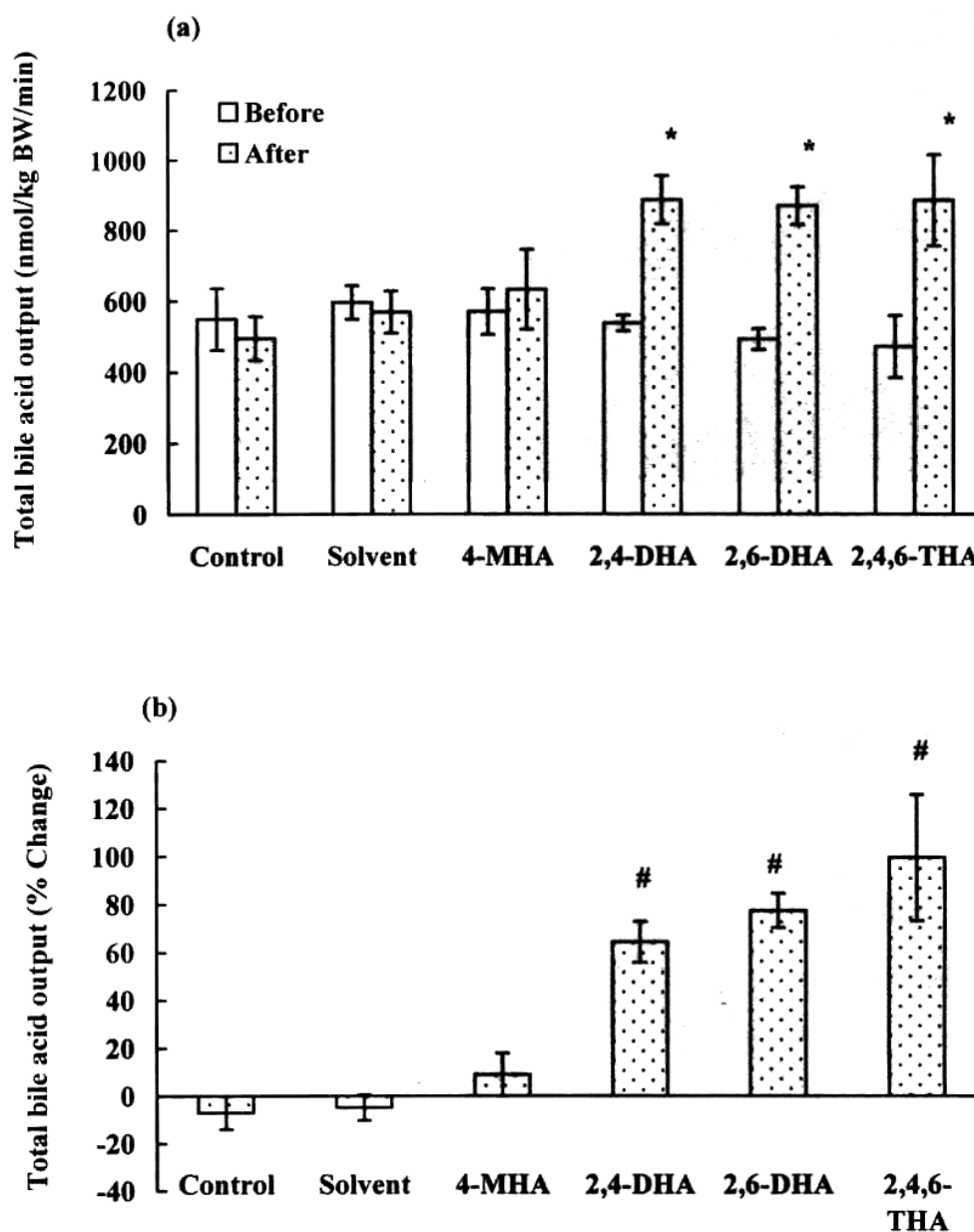


Figure 5: Effect of hydroxyacetophenones on total bile acid output (nmol/kg BW/min) collected at 30 min after intraduodenal of the compounds (100 mg/kg BW). Each bar is mean $\pm$ S.E.M. obtained from 5-6 animals. (a) amount before and after treatments, (b) Percent change after treatments. * $p < 0.05$, compared with the control period before treatment, # $p < 0.05$, compared with the solvent control at corresponding time.

2. การศึกษาเพื่อวิเคราะห์หาโครงสร้างของสาร major metabolite ของ hydroxyacetophenones ในน้ำดี (Determination of major biliary metabolites of hydroxyacetophenones)

ผลที่จะได้จากการวิจัยนี้จะทำให้ทราบว่า มี metabolite ของสารออกมากี่ชนิด มีมากน้อยอย่างไร และอาจจะทำให้ทราบถึงการออกฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดีของสาร hydroxyacetophenone ว่าเกิดจากฤทธิ์ของสารเอง หรือ เกิดจาก metabolite ของสาร นอกจากนี้ metabolite ที่ได้จะนำไปศึกษาฤทธิ์เทียบกับสารหลัก (parent compound) ในฤทธิ์อื่นๆ ต่อไป

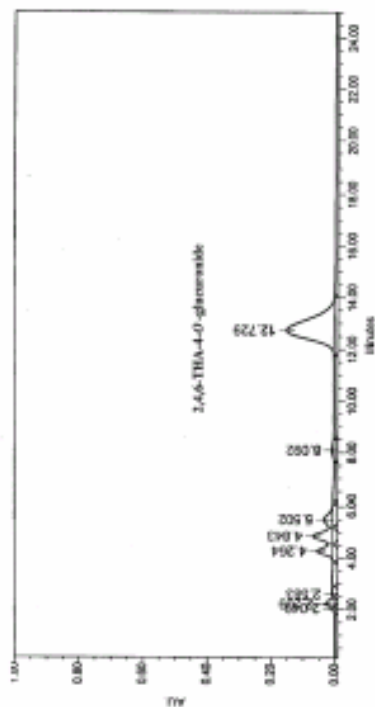


Figure 23: Chromatogram of 2,4,6-THA-4-O-glucuronide in bile sample obtained from a reverse phase HPLC. Peak appeared at retention time value of 12.729.

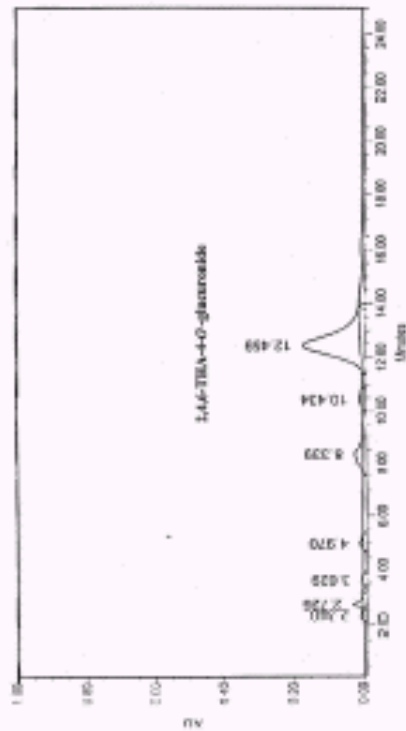


Figure 25: Chromatogram of 2,4,6-THA-4-O-glucuronide in urine sample obtained from a reverse phase HPLC. Peak appeared at retention time value of 12.459.

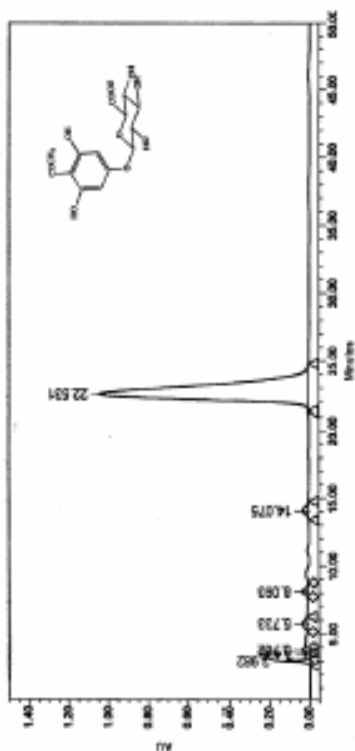


Figure 31: Chromatogram showing major metabolite of 2,4,6-THA obtained from HPLC. Peak appeared at retention time value of 22.531 min is 2,4,6-ethyldiacetophenone-4-O-glucuronide.

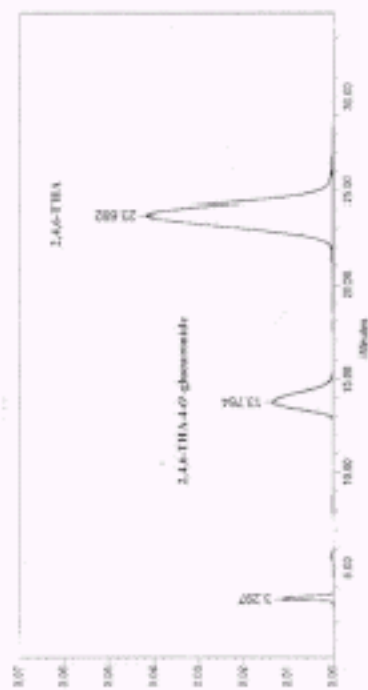


Figure 21: Chromatogram of standard 2,4,6-THA-4-O-glucuronide and 2,4,6-THA obtained from HPLC. Peak appeared at retention time value of 13.851 and 23.629 min, respectively.

จากการศึกษาพบว่า หลังจากให้สารฟอร์อะซีโตฟีโนนและอะนาลอกในขนาด 100 mg/kg BW ทำให้ อัตราการหลั่งน้ำดีของหนู Rat เพศผู้ เพิ่มขึ้นอย่างมาก โดยเพิ่มจากระดับ $63.7 \pm 2.2 \mu\text{l/kg BW/min}$ ใน กลุ่มควบคุม เป็น 131.1 ± 15.0 , 119.5 ± 5.9 , 99.4 ± 9.2 และ $164.8 \pm 12.5 \mu\text{l/kg BW/min}$ ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ชนิดของกรดน้ำดีพบว่าในหนู rat มีกรดน้ำดีหลักที่ตรวจวัดได้ในการศึกษานี้ 4 ชนิด คือกรด cholic, chenodeoxycholic, deoxycholic และ ursodeoxycholic คิดเป็นร้อยละ 69.7 ± 1.0 , 9.0 ± 0.6 , 3.1 ± 0.2 และ 18.2 ± 0.6 ของกรดน้ำดีทั้งหมด ตามลำดับ ปริมาณกรดน้ำดีทั้งหมดที่ขับออกมาในน้ำดี หลังจากได้รับสาร 2,4-DHA, 2,6-DHA และ 2,4,6-THA เพิ่มขึ้นเป็น 164.4 ± 8.6 , 177.7 ± 7.1 และ $199.5 \pm 26.2 \%$ ของกลุ่มควบคุมตามลำดับ โดยที่สาร 4-MHA ไม่มีผลต่อการขับกรดน้ำดี ผลการศึกษาสนับสนุนว่า สาร 4-MHA กระตุ้นการหลั่งน้ำดีที่ไม่ขึ้นกับการคั่งน้ำดี (BAIF) และสาร 2,6-DHA กระตุ้นน้ำดีที่ขึ้นกับการคั่งน้ำดี (BADF) ในขณะที่สาร 2,4-DHA และ 2,4,6-THA กระตุ้นให้มีการหลั่งน้ำดีเพิ่มขึ้นจากกระบวนการทั้งสองแบบ การกระจายขององค์ประกอบของกรดน้ำดีชนิดต่างๆที่ขับออกมาในน้ำดีหลังจากได้รับสารไฮดรอกซีอะซีโตฟีโนนทั้ง 4 ชนิดไม่

Table 9: Phenacetophenone glucuronide excreted in bile and urine within first 30-min period and 2 h after a single intraduodenal injection of the phenacetophenone (2,4,6-THA) at the dose of 100 mg/kg BW*.

Rat No.	2,4,6-THA-4-O-glucuronide (% of administered dose)			
	First 30-min period		Within 2 h	
	Bile	Urine	Bile	Urine
1	6.9	2.4	13.5	12.1
2	6.5	1.5	14.6	9.6
3	8.1	1.3	21.3	16.5
4	2.8	1.3	4.8	8.0
5	5.9	3.1	11.3	11.3
mean $\pm$ S.E.M.	6.0 ± 1.0	1.9 ± 0.4	12.9 ± 2.9	11.5 ± 1.6

*Values were obtained from 5 rats.

แตกต่างกันและไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม คาดว่าสารเหล่านี้อาจออกฤทธิ์กระตุ้นการขับกรดน้ำดีจาก
แหล่งกักเก็บที่มีอยู่เดิมในเซลล์ ไม่ได้เกิดจากการออกฤทธิ์กระตุ้นการขับน้ำดีที่สร้างขึ้นใหม่ จาก
การศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารเมตาโบไลต์ในน้ำดี พบว่าสารเมตาโบไลต์หลักที่พบคือ 2,4,6-
THA-4-*O*-glucuronide, 2,6-DHA-2-*O*-glucuronide, 2,4-DHA-4-*O*-glucuronide และ 4-MHA-4-*O*-
glucuronide

REFERENCES

1. Boyer JL. New concepts of mechanisms of hepatocyte bile formation. *Physiol Rev*, 1980; 60: 303-26.
2. Hofmann AF. Overview of bile secretion-Handbook of physiology secretion 6: The gastrointestinal system, vol III. United State of America 1989: 449-566.
3. Heubi JE. Liver and biliary system. In: *Physiology (Essential of basic science)*. Edited by Sperlakis N, Banks RO. United state of America 1993; 631-43.
4. Danzinger RG, Hofmann AF, Schoenfield LJ, Thistle JL. Dissolution of cholesterol gallstones by chenodeoxycholic acid. *New England J Med* 1972; 286 (1): 1-8.
5. Kowdley KV. Ursodeoxycholic acid therapy in hepatobiliary disease. *Am J Med* 2000; 108: 481-6.
6. Bern RM, Levy MN. Gastrointestinal secretion. In: *Physiology*. 3rd ed. Edited by Farrell R. Missouri: Mosby-Year Book Inc., 1993: 678-87.
7. Repa JJ, Mangelsdorf. The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000; 16:459-81.
8. Miner PB, Caito JM. Bile flow in response to pharmacological agent. *Biochem Pharmacol* 1979; 28: 1063-6.
9. Gurantz D, Hofmann AF. Influence of bile acid structure on bile flow and biliary lipid secretion in the hamster. *Am J Physiol* 1984; 247: G736-48.
10. Stiehl A, Redsch R, Rudolph G, Walker S. Effect of ursodeoxycholic acid on biliary bile acid and bile lipid composition in gallstone patients. *Hepatology* 1984; 4(1): 107-11.
11. Tavoloni N. Bile acid structure and bile formation in the guinea pig. *Biochem Biophys Acta* 1986; 879: 186-201.
12. Loria P, Carulli N, Medici G, Tripodi A, Iori P, Rovesti S, Bergomi M, Rosi A, Romani M. Determinants of bile secretion: Effect of bile acid structure on bile flow and biliary cation secretion. *Gastroenterology* 1989; 96: 1142-50.
13. Wheeler HO. Water and electrolyte in bile. In: *Handbook of physiology: Alimentary canal*. Edited by Code CF, Heidel W. Washington, DC. *Am Physiol Soc* 1968; 6(5): 2409-32.

14. Meier PJ, Knickelbein RS, Moseley RH, Dobbins JW, Boyer JL. Evidence for carrier-mediated chloride/bicarbonate exchange in canalicular rat liver plasma membrane vesicle. *J Clin Invest* 1985; 75: 1256-63.
15. Anwer MS, Atkinson JM, Zimniak P. Amiloride and taurine inhibit cholera-induced HCO_3^- -rich choleresis in perfused rat livers. *Am J Physiol* 1990; 259(22): G453-61.
16. Strazzabosco M, Sakisaka S, Hayakawa T, Boyer JL. Effect of UDCA on intracellular and biliary pH in isolated rat hepatocyte couplets and perfused livers. *Am J Physiol* 1999; 260(23): G58-69.
17. Alvaro D, Mennone A, Boyer JL. Effect of ursodeoxycholic acid on intracellular pH regulation in isolated bile duct epithelial cells. *Am J Physiol* 1993; 265(28): G783-91.
18. Piyachaturawat P, Suwanampai P, Komaratat P, Chuncharunee A, Suksamrarn A. Effect of phloracetophenone on bile flow and biliary lipids in rats. *Hepatology Research* 1998; 12: 198-206.
19. Piyachaturawat P, Chi-Ngam N, Chuncharunee A, Komaratat P, Suksamrarn A. Choleric activity of phloracetophenone in rats: structure-function studies using acetophenone analogs. *Eur J Pharmacol* 2000; 387: 221-7.
20. Erlinger S. Bile secretion. *Br Med Bull* 1992; 48(4): 860-70.
21. Siow Y, Schurr A, Vitale CG. Diabetes-induced bile acid composition changes in rat bile determined by high performance liquid chromatography. *Life Sci* 1991; 49: 1301-8.
22. Rodriguez VJ, Torres MA, Lunazzi G, Tiribelli C. Effect of ethinylestradiol and epomediol on bile flow and biliary lipid composition in rat. *Biochem Pharmacol* 1992; 43(6): 1289-93.
23. Weidenbach H, Scheibner J, Stange EF, Adler G, Beckh K. Reduction of bile secretion by prostaglandins in the rat in vivo. *Life Sci* 1996; 58(18): 1531-8.
24. Rabergh CMI, Ziegler K, Isomaa B, Lipsky MM, Eriksson JE. Uptake of taurocholic acid and cholic acid in isolated hepatocytes from rainbow trout. *Am J Physiol* 1994; 267 (30): G380-6.
25. Stange FE, Scheibner J, Ditschuneit H. Role of primary and secondary bile acids as feedback inhibitors of bile acid synthesis in the rat in vivo. *J Clin Invest* 1989; 84: 173-80.
26. Ballatori N, Truong AT. Glutathione as a primary osmotic driving force in hepatic bile formation. *Am J Physiol* 1992; 263: G617-G624.

ตอนที่ 2.

การศึกษากลไกกระตุ้นการหลั่งน้ำดีในระดับเซลล์ของสารฟลอราเซโดฟีโนนและอนาลอกในหนู
(ตีพิมพ์ใน Eur. J. Pharm. 547:152-159, 2006)

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากลไกกระตุ้นการหลั่งน้ำดีของสารไฮดรอกซีอะเซโตฟีโนน จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าอนาลอกของสารไฮดรอกซีอะเซโตฟีโนน (HAs) ได้แก่ 2,6-dihydroxyaceto-phenone (DHA), 4-hydroxyacetophenone (MHA) และ 2,4,6-trihydroxyacetophenone (THA) มีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดีที่แตกต่างกันและเนื่องจากกระบวนการเอกโซไซโตซิสซึ่งเป็นกระบวนการที่ตัวโปรตีนขนส่งไปแสดงออกที่เยื่อผิวเซลล์ เป็นกลไกอย่างหนึ่งที่จะกระตุ้นการหลั่งน้ำดี ดังนั้นการศึกษาจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาบทบาทของสารเหล่านี้ต่อกระบวนการเอกโซไซโตซิสในเซลล์ตับโดยใช้ horseradish peroxidase (HRP) เป็นตัว marker ผลการทดลองพบว่า MHA ซึ่งเป็นสารที่กระตุ้นการหลั่งน้ำดีที่ไม่ขึ้นกับกรดน้ำดี (BAIF) มีผลกระตุ้นการขับออกของ HRP ผ่านทางช่องว่างระหว่างเซลล์ (paracellular pathway) และผ่านข้ามเซลล์ (transcellular pathway) THA ซึ่งเป็นสารที่กระตุ้นการหลั่งน้ำดีที่ขึ้น (BADF) และไม่ขึ้นกับกรดน้ำดี (BAIF) ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการขับออกของ HRP ในขณะที่ DHA ซึ่งเป็นสารที่กระตุ้น BADF มีผลยับยั้งการขับออกของ HRP นอกจากนี้ยังพบว่า colchicine สามารถยับยั้งฤทธิ์ของ MHA ในการกระตุ้นการหลั่งน้ำดี โดยเฉพาะฤทธิ์ในการกระตุ้น peak ที่สองซึ่งแสดงว่ากลไกกระตุ้นการหลั่งน้ำดีของ MHA เกี่ยวข้องกับกระบวนการเอกไซโตซิสและการเพิ่มการขับออกผ่านทางช่องระหว่างเซลล์ ส่วนฤทธิ์การกระตุ้นการหลั่งน้ำดีของ DHA และ THA ไม่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเอกไซโตซิส

บทนำ

การหลั่งน้ำดีมีบทบาทสำคัญต่อการขับทิ้งของสารต่างๆทั้งที่เกิดขึ้นเองภายในร่างกาย และได้รับจากภายนอก และยังสำคัญต่อการย่อย การดูดซึมอาหารของลำไส้เล็ก โดยเฉพาะอาหารประเภทไขมัน การสร้างน้ำดีจากตับ (hepatic bile) ส่วนหนึ่งขึ้นตรงกับปริมาณกรดน้ำดีที่ถูกขับเข้าสู่ทางเดินท่อน้ำดี (Bile acid dependent fraction, BADF) และอีกส่วนหนึ่งที่ไม่ขึ้นกับกรดน้ำดี (Bile acid independent fraction, BAIF) แต่ขึ้นการขับสารพวก glutathione, สารอินทรีและอินทรีอื่นๆ ด้วย

การเกิด endocytotic retrieval และ exocytotic insertion ของ vesicles เข้าและออกจาก apical canalicular membrane มีบทบาทสำคัญต่อการหลั่งน้ำดี เคลื่อนน้ำดี Taurocholate ซึ่งมีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดี ก็มีทำงานผ่านทาง transcytotic vesicular pathway เช่นเดียวกัน กระบวนการ transcytotic, vesicular pathway ที่ขึ้นอาศัยการทำงานของ microtubules ซึ่งสามารถติดตามได้โดยการ label ด้วย horseradish peroxidase(HRP) กระบวนการดังกล่าวสามารถยับยั้งด้วย colchicine ซึ่งไปยับยั้ง microtubule polymerization ความไม่สมดุลของกระบวนการ retrieval และการ insertion ของ vesicle ไปยังผิวเซลล์ จะก่อให้เกิดพยาธิสภาพได้ เช่น ภาวะกั่งของน้ำดี (cholestasis) ที่เกิดจาก estradiol-17 β -D-glucoronide พบว่าจำนวนของตัวขนส่งมีการลดลงอย่างรวดเร็ว เกิด endocytotic internalization ของ multispecific resistance-associated protein-2 (Mrp-2) และของ bile salt export pump (Bsep) ดังนั้นสารใดก็ตามที่สามารถลดการเกิด endocytotic retrieval หรือไปเพิ่ม insertion ของจำนวนของตัวขนส่งให้ไปแสดงออกที่ผิวเซลล์ที่ canalicular ได้จะมีศักยภาพในการบรรเทาพยาธิสภาพ เช่น การกั่งของน้ำดีในตับได้

Hydroxyacetophenones (HAs) เป็นกลุ่มสารที่ประกอบด้วย analogues หลายตัว ซึ่งสามารถพบได้ในพืชสมุนไพรหลายชนิด เช่น *Artemisia capillaries*, *Artemisia scoporia*, barley tea และว่านชักมดลูก (*Curcuma comosa*) จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างทางเคมีของ HAs analogue และฤทธิ์การกระตุ้นการหลั่งน้ำดี (choleretic activities) พบว่า สารเหล่านี้มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายกัน แต่มีฤทธิ์การกระตุ้นการหลั่งของน้ำดีที่ต่างกัน ในบรรดา choleretic HAs มีเฉพาะสาร MHA เท่านั้นที่สามารถกระตุ้นให้น้ำดีให้หลังแบบ BAIF ขณะที่ DHA เหนียวทำให้เกิดเฉพาะ BADF ส่วน THA มีฤทธิ์ขับน้ำดีสูงสุด และสามารถกระตุ้นให้เกิดการหลั่งน้ำดีทั้งแบบ BADF และ BAIF ด้วยการเดินทางของตัวขนส่งที่ไปแสดงออกที่ผิวเซลล์ที่ canaliculi ใช้ vesicular transport นับว่าเป็นกลไกที่สำคัญต่อกระบวนการขับน้ำดี การศึกษาครั้งนี้เพื่อประเมินประสิทธิภาพของ choleretic HAs 3 ชนิดว่าเกี่ยวข้องกับการใช้ vesicle หรือไม่ โดยใช้ horseradish peroxidase ซึ่งเป็นตัวชี้วัดของ transcytotic vesicular pathway ผลการศึกษาแสดงฤทธิ์ที่แตกต่างกันของ HAs ต่อการขับ horseradish peroxidase และสนับสนุนความสัมพันธ์ของ vesicular exocytosis ซึ่งเป็นกลไกสำหรับการสร้างกรดน้ำดีที่ไม่ขึ้นกับการไหลโดย MHA

วิธีการวิจัย

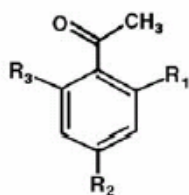
1. การเตรียมสัตว์ทดลอง

หนูแรท พันธุ์istar ขนาด 250-280 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ สาธยา ได้รับการคอาหารหนึ่งกินก่อนนำมาทดลอง การทดลองเริ่มต้นด้วยการสลบหนูด้วย sodium pentobarbital ปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวเป็นกิโลกรัม ต่อมาเปิดช่องคอเพื่อกระตุ้นการหายใจ หลังจากนั้นสอดท่อเข้าไปในท่อน้ำดี และเส้นเลือด femoral เพื่อเก็บน้ำดีและให้น้ำเกลือด้วยอัตรา 1.2 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง การศึกษาฤทธิ์ของ hydroxyacetophenone ต่อการหลั่ง horseradish peroxidase (HRP) ในน้ำดี

เก็บตัวอย่างน้ำดีทุกช่วงเวลา 15 นาที การทดลองเริ่มจากการฉีด HAs (รูปที่ 3.1) เข้าสู่โพรงลำไส้ส่วนต้นโดยมีการฉีดนำไปก่อนด้วยขนาด 125 หรือ 250 ไมโครโมลต่อน้ำหนักตัวเป็นกิโลกรัม หลังจากนั้นทำการ infusion สารเข้าสู่โพรงลำไส้ด้วยขนาด 8 หรือ 16 ไมโครโมลต่อน้ำหนักตัวเป็นกิโลกรัม รอประมาณ 45 นาทีเพื่อให้อัตราการหลั่งของน้ำดีคงที่แล้วทำการฉีด HRP เข้าไป หลังจากนั้นทำการเก็บน้ำดีทุกช่วงเวลา 2 นาทีเป็นเวลาทั้งสิ้น 10 นาที ทุกช่วงเวลา 5 นาทีเป็นเวลาทั้งสิ้น 30 นาที และทุกช่วงเวลา 10 นาทีเป็นเวลาทั้งสิ้น 40 นาทีตามลำดับ ทั้งนี้ใช้ taurocholate เป็นตัวควบคุม บวก คำนวณอัตราการหลั่งของน้ำดีและปริมาณของ HRP ที่ถูกขับออกมา

การศึกษาผลของ Colchicine ต่อฤทธิ์การกระตุ้นการหลั่งน้ำดีของ MHA

เพื่อประเมินบทบาทของ colchicin ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการทำงานของ microtubule ที่มีต่อการขับ HRP การทดลองเริ่มจากการฉีด colchicine ขนาด 2 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัวเป็นกิโลกรัมเข้าสู่ femoral vein ก่อนเริ่มการผ่าตัดเพื่อเก็บน้ำดีเป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง ทั้งนี้ HRP จะถูกฉีดหลังจากที่การไหลของน้ำดีถึงคงที่ หลังจากนั้นตามด้วยการฉีด MHA ค่าการขับออกของ HRP ในน้ำดีที่ได้ก็นำมาเทียบกับค่าที่ได้จากกลุ่มที่ได้รับ colchicin เพียงอย่างเดียว



Compound	R ₁	R ₂	R ₃
(1). 4-OH-acetophenone	H	OH	H
(2). 2,6-(OH) ₂ -acetophenone	OH	H	OH
(3). 2,4,6-(OH) ₃ -acetophenone	OH	OH	OH

รูปที่ 2.1

แสดงถึงโครงสร้างทาง

เคมีของHydroxy

acetophenone analogues

การวิเคราะห์การขับออกของ HRP ในน้ำดี

ความเข้มข้นของ HRP ในน้ำดีวิเคราะห์ได้จากอัตราการออกซิเดชันของสาร 4-aminoantipyrine ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร นำปริมาณการขับออกของ HRP ที่วัดได้มาคำนวณและแสดงผลเป็นนาโนกรัมต่อนาทีต่อน้ำหนักของตับเป็นกรัมหลังจากทำการสร้าง standard curve แล้ว ปริมาณ HRP ทั้งหมดที่ถูกขับออกมามีค่าคำนวณได้จากพื้นที่ใต้กราฟ

การวิเคราะห์ทางสถิติ

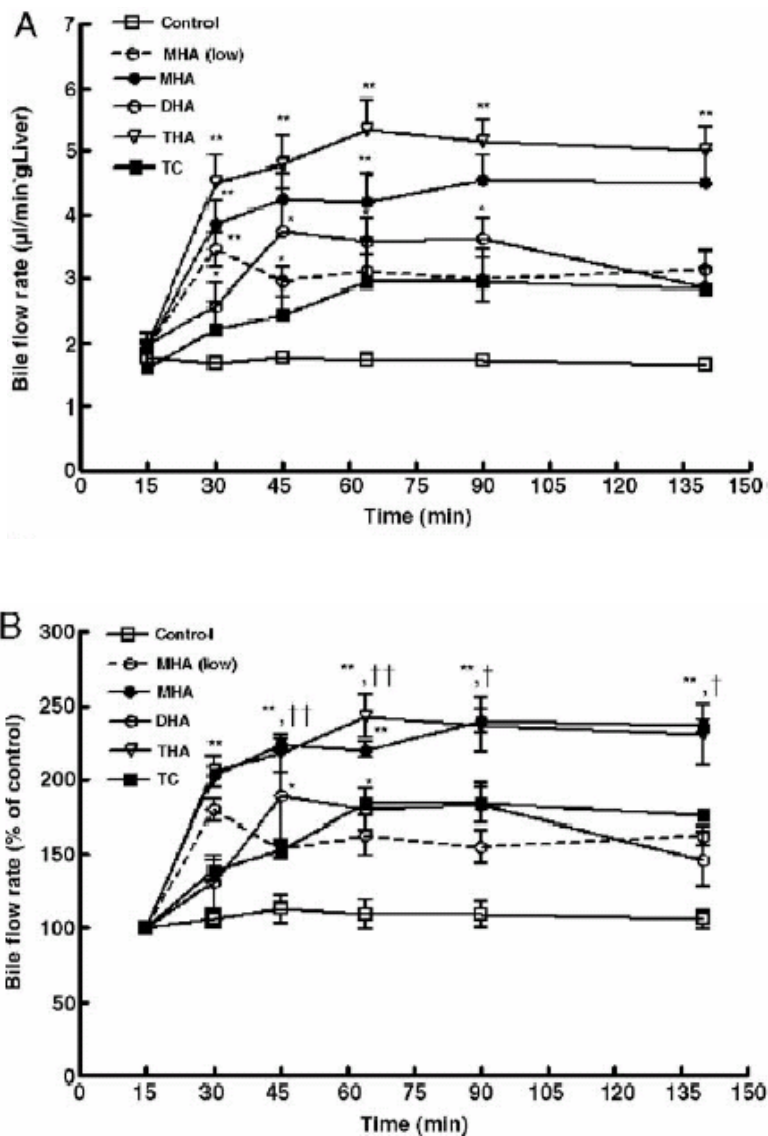
ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E.M การเปรียบเทียบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่าง กลุ่มโดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และตามด้วย post her Student-Newman-Keul's test ซึ่งความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญพิจารณาที่ค่า $p < 0.05$

ผลการทดลอง

1. บทบาทของสาร hydroxyacetophenone ต่ออัตราการหลั่งน้ำดี และการหลั่ง HRP ออกทางน้ำดี

การตรวจสอบฤทธิ์ของ hydroxyacetophenone ที่มีต่อการขับ HRP นั้น จำเป็นต้องรอให้ฤทธิ์การกระตุ้นการหลั่งน้ำดีคงที่ก่อน ซึ่งใช้เวลาประมาณ 30 นาที แล้วจึงจะทำการให้ HRP การ infuse MHA และ THA ขนาด 16 $\mu\text{mol/min/kg}$ ผลที่ได้พบว่าสามารถเพิ่มอัตราการหลั่งของน้ำดีได้ถึง 224.0 ± 4.5 และ $218.0 \pm 13\%$ ตามลำดับ ส่วน DHA และ Taurocholate จะให้ผลที่ต่ำกว่าคือ กระตุ้นอัตราการหลั่งน้ำดีได้ $188.8 \pm 3.3\%$ และ $184 \pm 3\%$ ตามลำดับ ส่วน MHA ขนาดต่ำกระตุ้นการหลั่งน้ำดีได้ $153.0 \pm 6.5\%$ (รูปที่ 2.2A, B) เมื่ออัตราการหลั่งน้ำดีคงที่ ทำการฉีด HRP ในหนูปกติ HRP จะถูกขับออกมาทางน้ำดีเป็น 2 peak โดย peak แรกออกมากที่ 4-8 นาที และ peak ที่ 2 ออกมากที่ 20-30 นาที ใน peak แรกจะบ่งบอกถึงการขับออกทาง paracellular ขณะที่ peak ที่ 2 เป็นการขับผ่านเข้าสู่เซลล์ตับก่อนแล้วค่อยขับออกมากที่ canaliculi

การให้ MHA จะเพิ่มการขับทิ้งของ HRP ในน้ำดีทั้งใน peak แรก และ peak ที่ 2 ฤทธิ์ของ MHA ในการขับ HRP จะขึ้นกับขนาดที่ให้อยู่ที่รูปที่ 2.3 ที่น่าประหลาดใจคือ THA ซึ่งมีผลกระตุ้นทั้ง BADF และ BAIF ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการขับ HRP ทั้ง 2 peak ยิ่งไปกว่านั้น DHA จะมีผลลดการขับ HRP ออกในน้ำดี ด้วย มี MHA เป็นสารตัวเดียวที่มีผลต่อ vesicular exocytosis จึงจะได้ทำการศึกษาบทบาทของการทำงานของ MHA ต่อไป



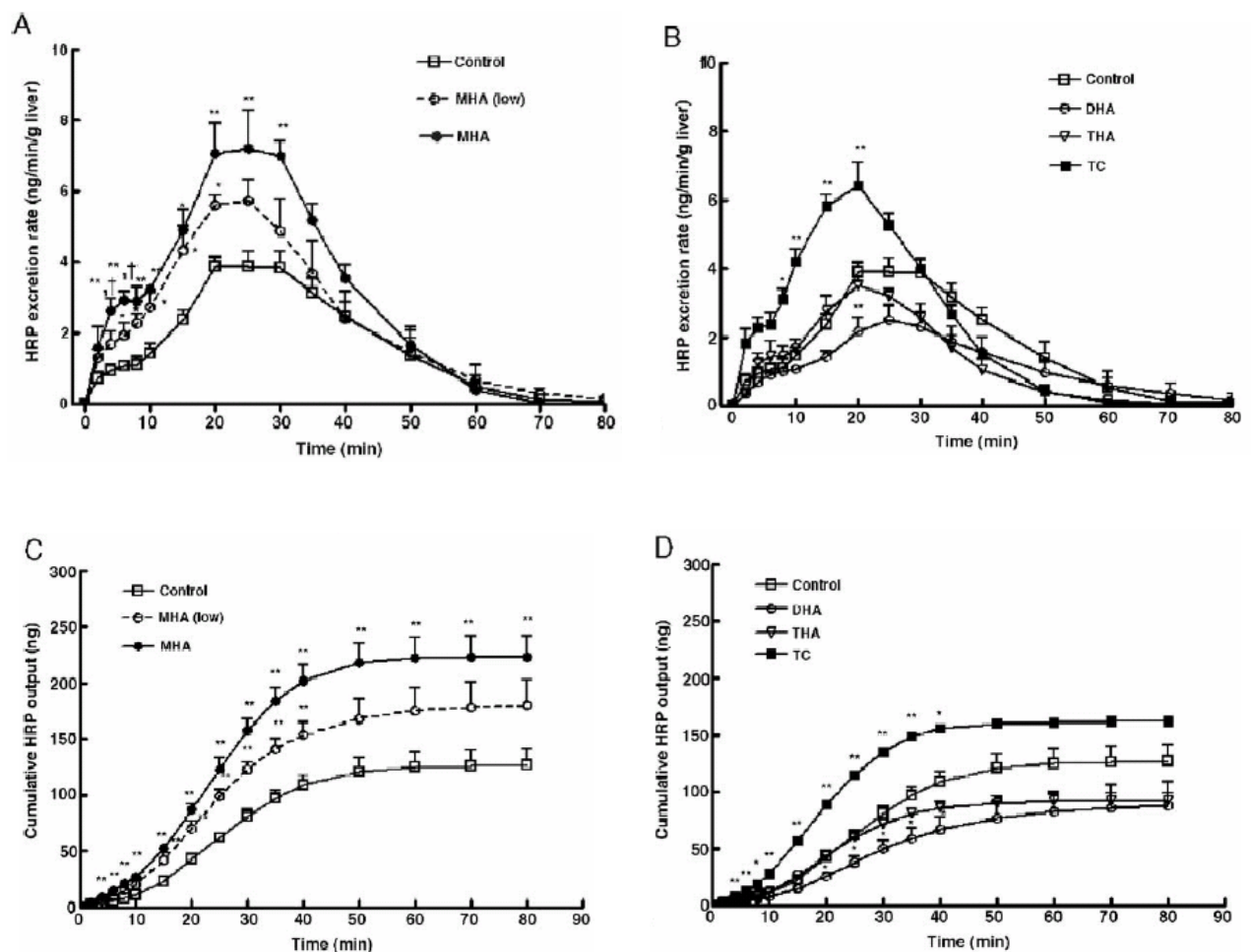
รูปที่ 2.2 แสดงผลของ hydroxyacetophenones (MHA, DHA, THA) และ taurocholate ที่มีต่ออัตราการไหลของน้ำดี (A) และอัตราการไหลของน้ำดีคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของกลุ่มควบคุม (B)
 $*p < 0.05$ และ $**p < 0.01$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุม
 $† p < 0.05$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจาก MHA ที่ความเข้มข้นต่ำ

ผลของ Colchicine ต่อฤทธิ์ของ MHA ในการกระตุ้นการหลั่งน้ำดี

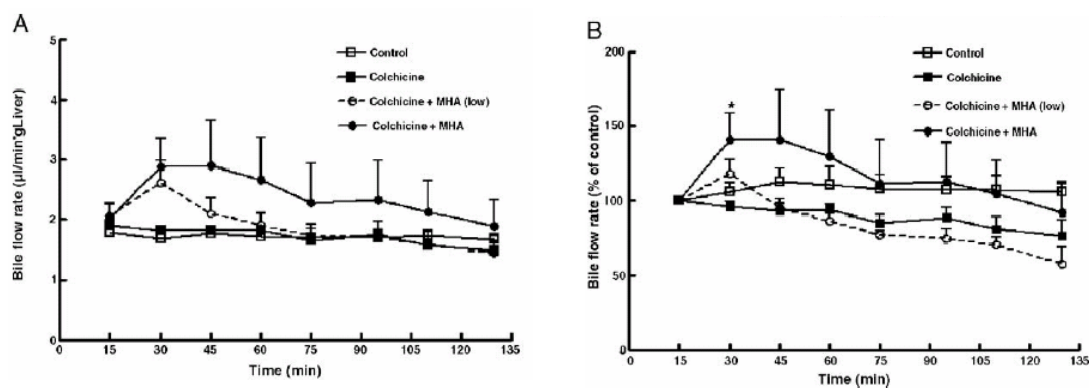
เพื่อศึกษาถึงกลไกของ MHA ในการทำให้เกิด vesicular exocytosis ว่าเป็น microtubule dependent หรือไม่ จึงได้ให้ colchicine แก่สัตว์ทดลอง พบว่าการใช้ colchicine ขนาด 2 mg/kg เป็นเวลา 2.5 ชม. ไม่มีผลต่อการหลั่งน้ำดีทั้งระดับ basal แต่ระดับการหลั่งจะค่อยๆลดลงตามเวลา การใช้ MHA

ในสัตว์ที่ได้รับ colchicine นี้จะให้น้ำดีลดลงอย่างมาก MHA ขนาดสูงจะประคองการเพิ่มการหลั่งน้ำดีได้นานกว่า low dose (รูปที่ 2.4)

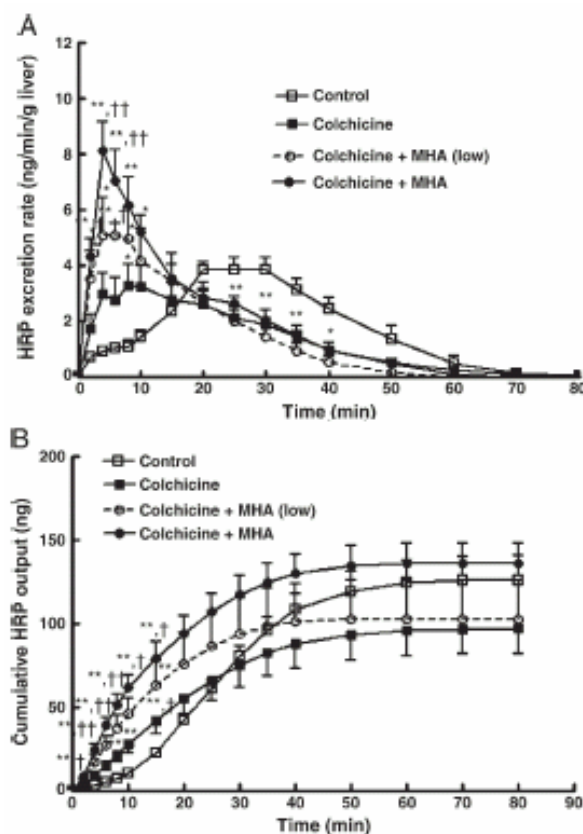
เมื่อให้ HRP ไปในสัตว์ทดลองดังกล่าวพบว่า colchicines เพิ่มการขับออกของ HRP ใน peak แรก แต่ไปยับยั้งการขับ HRP ใน peak ที่ 2 ซึ่งเป็น transcytotic vesicular pathway ที่อาศัย microtubule ในการนำ vesicle ไปขับทิ้ง (รูปที่ 2.5)



รูปที่ 2.3 แสดงถึงผลของ hydroxyacetophenones และ taurocholate ต่อ การขับออกของ horseradish peroxidase (HRP) ในน้ำดี (A) ผลของการ infusion ด้วย DHA, THA และ taurocholate ต่อการขับออกของ HRP (B) ผลของ MHA ที่มีต่อการขับทั้งสะสมของ HRP ในน้ำดี (C) และผลของ DHA, THA และ taurocholate ที่มีต่อการขับทั้งสะสมของ HRP ในน้ำดี (D) * $p < 0.05$ และ ** $p < 0.01$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุม † $p < 0.05$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจาก MHA ที่ความเข้มข้นต่ำ



รูปที่ 2.4 แสดงผลของ colchicine pretreatment ที่มีต่อการหลั่งของน้ำดีจากการกระตุ้นด้วย MHA (A) แสดงถึงอัตราการหลั่งที่แท้จริง (B) แสดงถึงอัตราการหลั่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ นีด colchicine ปริมาณ 2 mg/kg ก่อนทำการทดสอบ 2.5 ชั่วโมงค่าที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E.M จากสัตว์ทดลอง 4-5 ตัว * $p<0.05$ และ ** $p<0.01$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุม



รูปที่ 2.5 แสดงผลของ colchicine pretreatment ที่มีต่อการขับ horadish peroxidase (HRP)ในน้ำดี(A) และมีต่อการขับทั้งสะสมของ HRP(B) ได้ นีด colchicine ปริมาณ 2 mg/kg ก่อนทำการทดสอบ 2.5 ชั่วโมงในหนูกลุ่มควบคุม ค่าที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E.M จากสัตว์ทดลอง 4-5 ตัว * $p<0.05$ และ ** $p<0.01$ แสดงความแตกต่างอย่าง มีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุม † $p<0.05$ และ †† $p<0.01$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจาก colchicine

บทวิจารณ์

การวิจัยนี้เพื่อศึกษาฤทธิ์ของการกระตุ้นการหลั่งน้ำดีของ HAs analogues ที่มีต่อ vesicular transport โดยใช้ horseradish peroxidase ในน้ำดีเป็น marker จากการทดสอบพบว่าในบรรดา analogues ทั้งสาม มีเพียง MHA เท่านั้น ที่กระตุ้นการหลั่งน้ำดีแบบ BAIF และมีความสัมพันธ์ในเชิงบวกระหว่างฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดี (choleretic activities) และการจับของ horseradish peroxidase ในน้ำดี การให้ colchicine pretreatment จะไปลดการเกิด biliary exocytosis ของ horseradish peroxidase และ choleretic activities ของ MHA ในการทำหน้าที่ vesicular transport และการหลั่งน้ำดีขึ้น integrity ของ microtubules สาร MHA, DHA และ THA มีโครงสร้างที่คล้ายกันแต่ให้ฤทธิ์ต่างกัน เป็นที่รู้กันดีว่า THA กระตุ้นการหลั่งน้ำดีแบบ BADF แต่ไม่มีฤทธิ์กระตุ้นการจับของ HRP ส่วน DHA ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น hydrophobic มากกว่าให้ผลยับยั้งการจับของ HRP โดยภาพรวมผลการวิจัยนี้พบว่า vesicular exocytosis pathway สามารถอธิบายกลไกของ MHA กระตุ้นการหลั่งน้ำดีแบบไม่ขึ้นกับกรดน้ำดีได้ ขณะที่ฤทธิ์การกระตุ้นการหลั่งน้ำดีของ DHA และ THA อาจจะเกี่ยวข้องกับกลไกอื่นภายในเซลล์ซึ่งไม่ถูก label ด้วย horseradish peroxidase

ในการศึกษาในกลุ่ม control พบว่า การจับ HRP ออกทางน้ำดีมี 2 peak โดย peak แรกที่ 4-8 นาที และ peak 2 ที่ 20-30 นาที หลังจากฉีดพบว่า peak แรกของ HRP ในน้ำดีเกิดจากการเคลื่อนที่ผ่าน paracellular pathway ระหว่าง hepatocytes ขณะที่ late peak เป็น transcellular exocytosis ของ HRP ในการศึกษา MHA เพิ่มการจับของ horseradish peroxidase ทั้งช่วงแรกและช่วงหลัง การเพิ่มขึ้นในช่วงแรกเกิดจากการเพิ่ม permeability ของ tight junction ซึ่งกลไกในการเพิ่ม permeability ของ tight junction ยังไม่ทราบแน่ชัด ด้วยการทำงานของ tight junction ถูกควบคุมโดย osmotic และ hydrostatic pressure ในระหว่างที่เกิด osmotic cholerisis การสะสมของ osmotic active compound ในน้ำดีทำให้เกิด osmotic gradient ทำให้น้ำดีไหลผ่าน tight junction และ metabolites เป็นตัวหนึ่งที่ทำให้เกิด osmotically active biliary ของ MHA คือ 4-hydroxyacetophenone-4-O- β -glucuronide และ choleretic activity ของ MHA ที่พบก็มีความสัมพันธ์กับปริมาณของ metabolites ที่ขับออกมา อย่างไรก็ตาม MHA เองอาจจะมีปฏิกิริยาโดยตรงกับ tight junction proteins หรือ micro filaments ซึ่งทำหน้าที่รักษา integrity และ function ของ barrier กันระหว่างเลือดและน้ำดี

MHA ซึ่งออกฤทธิ์จับ HRP ใน peak หลังนั้น ฤทธิ์จะเพิ่มขึ้นเป็นไปตามขนาดของสารที่ให้และฤทธิ์ดังกล่าวถูกยับยั้งโดย colchicines ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ว่าเกี่ยวข้องกับ transcytotic microtubule-dependent

vesicle transport และกระบวนการ exocytosis อย่างไรก็ตาม colchicines ไม่มีผลลดฤทธิ์ของ MHA ที่ขนาดสูง ซึ่งยังไม่มีคำอธิบายที่ทราบชัด แต่อย่างไรก็ตามตัวขนส่งอาจจะยังคงอยู่ที่ canalicular membrane หลังจากทำให้สาร colchicine และทำให้ MHA ขับออกมาในน้ำดี เมื่อถูก infuse ที่อัตราที่สูงกว่าตัวขนส่ง Mrp2, the multispecific resistance-associated protein-2, มีบทบาทสำคัญในการขับน้ำดี และ endogenous และ exogenous compounds ซึ่งประกอบด้วย glucuronide, glutathione และ sulfate conjugates และในทำนองเดียวกับการขับของ osmotically active metabolites ของ MHA ชัดเจนในการศึกษา Mrp2 ใน deficient rats ซึ่งฤทธิ์ของ colchicines และของ MHA ที่ทำให้เกิดพยาธิสภาพ MHA อาจจะกระตุ้นการแตกตัวของ vesicles ซึ่งบรรจุ Bsep และ Mrp2 MHA เป็นสารหลักที่พบในยา Yin Zhi Huang ที่ทางการแพทย์จีนใช้ในการขับ bilirubin ในเด็กแรกเกิด และใช้รักษาอาการ neonatal jaundice อย่างไรก็ตามบทบาทของ MHA ในการช่วยรักษาโดยออกฤทธิ์เป็นแบบเดียวกันกับที่พบในการวิจัยนี้ยังต้องศึกษาต่อไป

ในทางตรงข้ามกับ MHA สาร THA และ DHA ซึ่งกระตุ้นการหลั่งน้ำดีแบบ BADF ไม่มีผลกระตุ้นการขับ HRP ออกในน้ำดี ในการทำงานของสารทั้งสองนี้ไม่เกี่ยวข้องกับ transcytotic vesicle pathway สาร colchicines ไม่มีผลต่ออัตราการหลั่งของ basal bile acid ด้วย ฤทธิ์ที่แตกต่างกันของ HAs ทั้ง 3 ชนิด ที่มีต่อการขับ HRP เข้าในน้ำดี ยังไม่มีคำอธิบายที่ชัดเจน อย่างไรก็ตามเป็นที่ทราบกันดีว่าการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยของโครงสร้างทางเคมีอาจนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงอย่างมากในคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ ความแตกต่างในฤทธิ์ของ HAs ที่แตกต่างกัน มีรายงานว่ามีความสัมพันธ์กับจำนวนและตำแหน่งของ hydroxyl groups บน acetophenone nucleus โดย strong polar hydroxyl group ที่ตำแหน่งที่ 4 บน benzene nucleus มีความสำคัญต่อการหลั่งของน้ำดี ในขณะที่ hydroxyl groups ที่ตำแหน่งที่ 2 และ 6 มีความสำคัญต่อการเหนี่ยวนำการขับของ solid materials เข้าในน้ำดี ซึ่งอาจประกอบด้วยกรดน้ำดี และ cholesterol เป็นต้น นอกจากนี้สาร DHA และ THA มีฤทธิ์ในการยับยั้งการ uptake กรดน้ำดีใน ileal brush border membrane vesicles ที่แตกต่างกันซึ่งฤทธิ์ที่แตกต่างกันของ HAs analogues ทั้ง 3 ตัวต่อการขับ HRP ทั้งในน้ำดีที่พบได้ในการศึกษานี้อาจจะมีความสัมพันธ์กับคุณสมบัติทาง physiochemical ความแตกต่างซึ่งเป็นผลจากการจับกับ protein/transporter หรือ binding site ในการทำปฏิกิริยาแตกต่างกัน

กล่าวโดยสรุป HAs analogues ทั้ง 3 ชนิด ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีคล้ายกัน แต่มีฤทธิ์ต่อ vesicular transport ของ HRP ต่างกันมากและมีเพียง MHA เท่านั้นที่สามารถเพิ่มการขับทั้ง paracellular

และ transcellular vesicular transport pathways ซึ่งถูก label ด้วย HRP การที่ THA และ DHA ไม่มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการขับ HRP เข้าในน้ำดีนั้น สรุปได้ว่าฤทธิ์การกระตุ้นการหลั่งน้ำดีของสารทั้งสองไม่เกี่ยวข้องกับ vesicular exocytosis pathway และสาร MHA จะมีประโยชน์สำหรับการรักษา cholestatic liver injury ที่กระบวนการ transcytotic vesicular pathway ที่ถูก impair

References:

1. Ballatori, N., Truong, A.T., 1989. Relation between biliary glutathione excretion and bile acid-independent bile flow. *Am. J. Physiol.* 256, G22–G30.
2. Barnwell, S.G., Lowe, P.J., Coleman, R., 1984. The effects of colchicine on secretion into bile of bile salts, phospholipids, cholesterol and plasma membrane enzymes: bile salts are secreted unaccompanied by phospholipids and cholesterol. *Biochem. J.* 220, 723–731.
3. Barr, V.A., Hubbard, A.L., 1993. Newly synthesized hepatocyte plasma membrane proteins are transported in transcytotic vesicles in the bile ductligated rat. *Gastroenterology* 105, 554–571.
4. Benedetti, A., Strazzabosco, M., Ng, O.C., Boyer, J.L., 1994. Regulation of activity and apical targeting of $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger in rat hepatocyte. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 792–796.
5. Beuers, U., Nathanson, M.H., Isales, C.M., Boyer, J.L., 1993. Tauroursodeoxycholic acid stimulates hepaocellular exocytosis and mobilizes extracellular Ca^{++} mechanisms defective in cholestasis. *J. Clin. Invest.* 92, 2984–2993.
6. Beuers, U., Throckmorton, D.C., Anderson, M.S., Isales, C.M., Thasler, W., Kullak-Ublick, G., Sauter, G., Koebe, H.G., Paumgartner, G., Boyer, J.L., 1996. Tauroursodeoxycholic acid stimulates protein kinase C in isolated rat hepatocyte. *Gastroenterology* 110, 1553–1563.
7. Beuers, U., Bilzer, M., Chittattu, A., Kullak-Ublick, G.A., Keppler, D., Paumgartner, G., Dombrowski, F., 2001. Tauroursodeoxycholic acid inserts the apical conjugate export pump, Mrp2, into canalicular membranes and stimulates organic anion secretion by protein kinase C-dependent mechanisms in cholestatic rat liver. *Hepatology* 33, 1206–1216.
8. Beuers, U., Denk, G.U., Soroka, C.J., Wimmer, R., Rust, C., Paumgartner, G., 2003. Tauro lithocholic acid exerts cholestasis effects via phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism in perfused rat livers and rat hepatocyte couplets. *J. Biol. Chem.* 278, 17810–17818.

9. Boyer, J.L., Soroka, C.J., 1995. Vesicle targeting to the apical domain regulates bile secretory function in isolated rat hepatocytes couplets. *Gastroenterology* 109, 1600–1611.
10. Bruck, R., Haddad, P., Graf, J., Boyer, J.L., 1992. Regulatory volume decrease stimulates bile flow, bile acid excretion, and exocytosis in isolated perfused rat liver. *Am. J. Physiol.* 262, G806–G812.
11. Chen, Z.L., Guan, W.H., 1985. Approach to the effect and indication of Yin Zhi Huang to treat neonatal jaundice. *J. Clin. Pediatr.* 3, 302–303.
12. Crawford, J.M., 1996. Role of vesicle-mediated transport pathways in hepatocellular bile secretion. *Semin. Liver Dis.* 16, 169–189.
13. Crawford, J.M., Berken, C.A., Gollan, J.L., 1988. Role of the hepatocyte microtubular system in the excretion of bile salts and biliary lipid: implications for intracellular vesicular transport. *J. Lipid Res.* 29, 144–156.
14. Crawford, J.M., Strahs, D.C., Crawford, A.R., Barnes, S., 1994. Role of bile salt hydrophobicity in hepatic microtubule-dependent bile salt secretion. *J. Lipid Res.* 35, 1738–1748.
15. Crocenzi, F.A., Mottino, A.D., Cao, J., Voggi, L.M., Sanchez Pozzi, E.J., Vore, M., et al., 2003. Estradiol-17 β -D-glucuronide induces endocytotic internalization of Bsep in rats. *Am. J. Physiol.: Gastrointest. Liver Physiol.* 285, G449–G459.
16. El-Seaidy, A.Z., Mills, C.O., Elias, E., Crawford, J.M., 1997. Lack of evidence for vesicle trafficking of fluorescent bile salts in rat hepatocyte couplets. *Am. J. Physiol.* 272, G298–G309.
17. Etoh, H., Murakami, K., Yogoh, T., Ishikawa, H., Fukuyama, Y., Tanaka, H., 2004. Anti-oxidative compounds in barley tea. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 2616–2618.
18. Fox, T.F., 2001. Neonatal jaundice-traditional Chinese medicine approach. *J. Perinatol.* 21 (Suppl 1), S98–S100 (discussion S104–S107). Gatmaitan, Z.C., Nies, A.T., Arias, I.M., 1997. Regulation and translocation of ATP-dependent membrane proteins in rat liver. *Am. J. Physiol.* 272, G1041–G1049.
19. Gerk, P.M, Vore, M., 2002. Regulation of expression of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) and its role in drug disposition. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302, 407–415.
20. Gregory, D.H., Vlahcevic, Z.R., Prugh, M.F., Swell, L., 1998. Mechanism of secretion of biliary lipids: role of microtubule system in hepatocellular transport of biliary lipids in the rats. *Gastroenterology* 74, 93–100.

21. Haussinger, D., Saha, N., Hallbrucker, C., Lang, F., Gerok, W., 1993. Involvement of microtubules in the swelling-induced stimulation of transcellular taurocholate transport in perfused rat liver. *Biochem. J.* 291, 335–360.
22. Hayakawa, T., Bruck, R., Ng, O.C., Boyer, J.L., 1990a. DBcAMP stimulates vesicle transport and HRP excretion in the isolated perfused rat liver. *Am. J. Physiol.* 259, G727–G735.
23. Hayakawa, T., Ng, O.C., Boyer, J.L., 1990b. Taurocholate stimulates transcytosis vesicular pathways labeled by horseradish peroxidase in the isolated perfused rat liver. *Gastroenterology* 99, 216–228.
24. Huang, W., Zhang, J., Moore, D.D., 2004. A traditional herbal medicine enhances bilirubin clearance by activating the nuclear receptor CAR. *J. Clin. Invest.* 113, 137–143.
25. Kanchanapoo, J., Rao, M.C., Sophasan, S., Suksamrarn, A., Piyachaturawat, P., 2006. Inhibitory effects of choleric hydroxyacetophenones on ileal bile acid transport in rats. *Life Sci.* 78, 1630–1636.
26. Kubitz, R., Huth, C., Schmitt, M., Horbach, A., Kullak-Ublick, G., Haussinger, D., 2001. Protein kinase C-dependent distribution of the multidrug resistance protein 2 from the canalicular to the basolateral membrane in human HepG2 cell. *Hepatology* 34, 340–350.
27. Kubitz, R., Sutfels, G., Kuhlkamp, T., Kolling, R., Haussinger, D., 2004. Trafficking of the bile salt export pump from the Golgi to the canalicular membrane is regulated by the p38 MAP kinase. *Gastroenterology* 126, 541–555.
28. Kubitz, R., Helmer, A., Haussinger, D., 2005. Biliary transport system: shortterm regulation. *Methods Enzymol.* 400, 252–257.
29. Larkin, J.M., Palade, G.E., 1991. Transcytotic vesicular carrier for polymeric IgA receptors accumulate in rat hepatocyte after bile duct ligation. *J. Cell Sci.* 98, 205–216.
30. Larocca, M.C., Pellegrino, J.M., Garay, E.A.R., Marinelli, R.A., 1999. Taurocholate-induced inhibition of hepatic lysosomal degradation of horseradish peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 1428, 341–347.
31. Lowe, P.J., Kan, K.S., Barnwell, S.G., Sharma, R.K., Coleman, R., 1985. Transcytosis and paracellular movements of horseradish peroxidase across liver parenchyma tissue from blood to bile. Effects of alpha-naphthylisothiocyanate and colchicine. *Biochem. J.* 229, 529–537.

32. Mahagita, C., Tanphichai, K., Suksamrarn, A., Piyachaturawat, P., 4-Hydroxyacetophenone-induced choleresis in rats in mediated by the Mrp2-dependent biliary secretion of its glucuronide conjugate. *Pharm. Res.* 23(11):2603-2610.
33. Misra, S., Varticovski, L., Aris, I.M., 2003. Mechanisms by which cAMP increases bile acid secretion in rat liver and canalicular membrane vesicles. *Am. J. Physiol.* 285, G316–G324.
34. Mottino, A.D., Cao, J., Veggi, L.M., Crocenzi, F.A., Roma, M.G., Vore, M., 2002. Altered localization and activity of canalicular Mrp2 in estradiol-17 β -D-glucuronide-induced cholestasis. *Hepatology* 35, 1409–1419.
35. Nathanson, H.M., Boyer, J.L., 1991. Mechanisms and regulation of bile secretion. *Hepatology* 14, 551–566.
36. Negoro, M., Wakabayashi, I., 2004. Determination of the liver cytosolic proteins that bind to p-hydroxyacetophenone. *Biomed. Chromatogr.* 18, 335–340.
37. Okuno, I., Uchida, K., Nakamura, M., Sakurawi, K., 1988. Studies on choleric constituents in *Artemisia capillaris* THUNB. *Chem. Pharm. Bull.* 36, 769–775.
38. Piyachaturawat, P., Suwanumpai, P., Komaratat, P., Chuncharunee, A., Suksamrarn, A., 1998. Effect of phloracetophenone on bile flow and biliary lipids in rats. *Hepatol. Res.* 12, 198–206.
39. Piyachaturawat, P., Chaingam, N., Chuncharunee, A., Komaratat, P., Suksamrarn, A., 2000. Choleric activity of phloracetophenone in rats: structurefunction studies using acetophenone analogues. *Eur. J. Pharmacol.* 387, 221–227.
40. Piyachaturawat, P., Tanphichai, K., Suksamrarn, A., 2001. Stimulatory activity of hydroxy phloracetophenone analogues on bile secretion in rats. *FASEB J.* 15, A820.
41. Powell, D.W., 1981. Barrier function of epithelia. *Am. J. Physiol.* 241, G275–G288.
42. Roelofsen, H., Soroka, C.J., Keppler, D., Boyer, J.L., 1998. Cyclic AMP stimulates sorting of the canalicular organic anion transporter (Mrp2/cMoat) to the apical domain in hepatocyte couplets. *J. Cell Sci.* 111, 1137–1145.
43. Roma, M.G., Marinelli, R.A., Crocenzi, F.A., Rodriguez Garay, E.A., 1995. Effect of cholephilic dyes on hepatic tight junctional permeability in the rat. *Biochem. Pharmacol.* 50, 1079–1086.
44. Seino, S., Shibasaki, T., 2005. PKA-dependent and PKA-independent pathways for cAMP-regulated exocytosis. *Physiol. Rev.* 85, 1303–1342.

45. Soroka, C.J., Pate, M.K., Boyer, J.L., 1999. Canalicular export pump traffic with polymeric immunoglobulin A receptor on the same microtubule-associated vesicle in rat liver. *J. Biol. Chem.* 274, 26416–26424.
 46. Suksamrarn, A., Eiamong, S., Piyachaturawat, P., Byrne, L.T., 1997. Phloracetophenone glucoside with choleric activity from *Curcuma comosa*. *Phytochemistry* 45, 103–105.
 47. Tachizawa, H., Sano, N., Takikawa, H., 2004. Effects of colchicine on the maximum biliary excretion of cholephilic compounds in rats. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 19, 1016–1022.
 48. Toyota, N., Miyai, K., Hardison, W.G.M., 1984. Effect of biliary pressure versus high bile acid flux on the permeability of heterocellular tight junction. *Lab. Invest.* 50, 536–542.
 49. Trauner, M., Boyer, J.L., 2003. Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol. Rev.* 83, 633–671.
 50. Worthington, V., 1972. *Worthington Enzyme Manual. Peroxidase (horseradish)*, vol. 71. Worthington Biochemical Corporation Freehold, NJ, USA, pp. 1050–1060.
 51. Yang, S.H., Lu, C.F., 1984. Effects of decoction of *Artemisia*, *Rheum*, *Gardenia*, *Coptidis* and *Rhizoma* on neonatal jaundice in Chinese newborn infants. *J. Chin. Child Med.* 25, 144–148.
 52. Yin, J., Wennberg, R.P., Xia, Y.C., Liu, J.W., Zhou, H.Z., 1991. Effect of a traditional Chinese medicine, Yin Zhi Huang, on bilirubin clearance and conjugation. *Dev. Pharmacol. Ther.* 16, 59–64.
 53. Zhang, Q.W., Zhang, Y.Z., 1989. Determination of choleric constituents in *Artemisia scoparia* Waldst. Et Kit. By TLC densitometry. *Yao Xue Bao* 24, 43–47.
-

ตอนที่ 3

การศึกษาฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดีแบบ BAIF ของสาร 4-Mono hydroxyacetophenone (MHA หรือ 4-HA) พบว่าเกิดจากสาร metabolite เป็น glucuronide conjugate ที่ขับทิ้งโดยโปรตีนขนส่ง Mrp-2

(ตีพิมพ์ในวารสาร Pharmaceutical Research Vol. 23 (11): 2603-2610, 2006)

บทคัดย่อ

สาร 4-Monohydroxyacetophenone (MHA or 4-HA) เป็นสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพรหลายชนิดที่มีสรรพคุณในการรักษาโรค โดยเฉพาะมีฤทธิ์เด่นในการกระตุ้นการหลั่งน้ำดีจากตับ ในการวิจัยนี้เพื่อศึกษาหากลไกการออกฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดีได้วิเคราะห์สารต่างๆ ที่ออกมาจากตับน้ำดี เช่น การขับออกของ MHA metabolites, GSH และ inorganic electrolytes พบว่า MHA ออกฤทธิ์กระตุ้น BAIF ได้อย่างชัดเจนในหนูขาวที่ปกติ ขณะที่สารนี้ไม่มีผลต่อการขับน้ำดีในหนู TR- ซึ่งเป็นหนูที่มีความบกพร่องมาแต่กำเนิดของตัวขนส่ง multidrug resistance-associated protein-2, Mrp2/Abcc2 ฤทธิ์กระตุ้นการขับน้ำดีของ MHA ไม่ได้เกิดจากการขับทิ้งของ Na^+ , K^+ , Cl^- หรือ HCO_3^- หรือ GSH ในน้ำดี อย่างไรก็ตามจากการวิเคราะห์น้ำดีด้วย HPLC พบว่ามีสาร major metabolite ถูกขับออกมาหนึ่งตัวในน้ำดี คือสาร 4-hydroxyacetophenone-4-O- β -glucuronide ในขณะที่ไม่พบสารแม่ (parent compound) ในน้ำดี ปริมาณของสาร metabolite นี้ในน้ำดีมีความสัมพันธ์โดยตรงกับอัตราการไหลของน้ำดีที่เพิ่มขึ้น ในทางตรงข้ามกับหนูปกติ สาร MHA ไม่สามารถกระตุ้นการหลั่งน้ำดี และไม่มีสาร MHA metabolite ขับออกมาในหนู TR- สรุปได้ว่ากลไกที่ทำให้เกิดฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดีของสาร MHA เกิดจากการขับสาร major metabolite ของ MHA ออกมาในน้ำดี และสารดังกล่าวถูกขนส่งด้วยโปรตีนขนส่ง Mrp2 เข้าไปใน canaliculi ทำให้มีการคั่งน้ำตามมา

บทนำ

การสร้างน้ำดีของตับมีบทบาทสำคัญในการกำจัดทั้งสารประกอบที่เกิดขึ้นภายในร่างกายและที่ได้รับจากภายนอก เช่น สารพวก xenobiotics และสารพิษต่างๆ ความบกพร่องของการสร้างและการหลั่งน้ำดีนี้ก่อให้เกิดการคั่งค้างของสารเหล่านั้นในตับและก่อให้เกิดอันตรายตามมา นอกจากสารที่คั่งจะมีผลโดยตรงทำให้เซลล์ได้รับอันตรายแล้ว สารยังอาจจับกับ nuclear receptor และ transcription factor ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในการแสดงออกของยีนส์เป้าหมายต่างๆตามมา นำไปสู่พยาธิสภาพอื่นๆ ดังนั้นสารใด

ก็สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการขับน้ำดีและกระตุ้นการกำจัดพิษที่เป็นพิษ น่าจะมีศักยภาพในการรักษาโรคเกี่ยวกับตับ

น้ำดีสร้างและหลังจากเซลล์ตับเข้าสู่ท่อน้ำดี ปริมาณของน้ำดีในท่อน้ำดีเกิดจาก osmotic water flow ซึ่งปริมาณของน้ำในน้ำดีเป็นผลจากการขนส่งสารแบบแอคทีฟ น้ำดีที่เกิดขึ้นมีกำเนิดมาจากสองส่วน คือส่วนแรกเกิดจากการขับกรดน้ำดีออกมา (bile acid) ส่วนที่สองไม่จับกับการขับกรดน้ำดี แต่เกิดจากตัวละลายอื่นที่ไม่ใช่กรดน้ำดี เช่น reduced glutathione (GSH) สารละลายอินทรีย์และอนินทรีย์ ส่วนที่จับกับกรดน้ำดี (BAIF) ในหนูคิดเป็น 40-50 เปอร์เซ็นต์ของน้ำดีในท่อน้ำดี และส่วนที่เหลือเป็นส่วนที่ไม่จับกับกรดน้ำดี (BAIF) การขับออกของ GSH และ HCO_3^- ถือว่าเป็นแรงหลักของการสร้างน้ำดีแบบ BAIF ซึ่ง BAIF นี้ อาจเกิดจากการกำจัดโมเลกุลของสารอินทรีย์แปลกปลอม หรือผลผลิตของโมเลกุลเหล่านี้ โดยมีสารพวก Inorganic electrolytes (Na^+ , Cl^- และ K^+) ทำหน้าที่เป็น counter-ions ซึ่งถูกหลั่งจากเซลล์ตับหรือ/และผ่าน tight junction ออกมาตาม electrochemical gradients

การศึกษานี้พบว่า สาร hydroxyacetophenones (HAs) เป็นสารตัวหนึ่งที่มีผลกระตุ้นการหลั่งของน้ำดีได้ดี และจากการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะโครงสร้างของสาร HAs กับฤทธิ์การกระตุ้นการหลั่งน้ำดี (choleretic activities) ของสารนี้ พบว่า สารในกลุ่ม HAs ที่มีเพียง 4-hydroxyacetophenone (4-MHA) ที่กระตุ้นการขับน้ำดีที่มี low lithogenic index สารดังกล่าวนี้ยังพบว่าเป็น active ingredient ในพืชหลายชนิดที่นำมาใช้ในการรักษาโรคในหลายประเทศแถบเอเชีย พืชเหล่านี้เช่น *Aster batangensis*, barley tea และ *Artemisia capillare* A. capillare ได้นำมาใช้เป็นส่วนประกอบของยาจีนเพื่อเพิ่มการรับ bilirubin ในเด็กแรกเกิด อย่างไรก็ตามกลไกการออกฤทธิ์ของสาร 4-MHA ในการขับน้ำดียังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ในการวิจัยครั้งนี้จะได้ทำการศึกษากลไกดังกล่าว

วัตถุประสงค์

ศึกษาถึงกลไกการทำงานของสาร 4-Mono hydroxyacetophenone (MHA หรือ 4-HA) ซึ่งกระตุ้นการหลั่งน้ำดีแบบ BAIF โดยวิเคราะห์องค์ประกอบต่างๆของน้ำดี รวมถึง GSH และ inorganic electrolytes และ metabolite ของ MHA และยังทำการศึกษาให้สมบูรณ์โดยศึกษาในหนู TR- ซึ่งเป็นหนูที่มีความบกพร่องมาแต่กำเนิดของตัวขนส่ง multidrug resistance-associated protein-2, Mrp2/Abcc2 จนสามารถบ่งชี้ได้ว่าฤทธิ์การกระตุ้นการหลั่งน้ำดีของสาร MHA เกิดจากการขับ glucuronide conjugate ของสารเองด้วยตัวขนส่ง Mrp-2 ซึ่งเป็น osmotically active compound ที่ทำให้น้ำตามออกมา

วิธีวิจัย

1. การทดลองในสัตว์และการเก็บตัวอย่างของน้ำดี

หนูวิสตาร์เพศผู้น้ำหนักตัว 220-290 กรัม (อายุ 7-8 อาทิตย์) จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ ศาเลา เลียงด้วยวิธีมาตรฐาน ส่วนหนู TR- เลียงไว้ที่ University of Rochester School of Medicine Animal Facility และสัตว์เหล่านี้ได้ทำการทดลอง ที่ University of Rochester ในการทดลองทำการงดอาหารสัตว์ 1 คืน นำมาสลบด้วย sodium pentobarbital (50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม, ip) และเตรียมสำหรับการเก็บน้ำดี ตัวอย่าง การเจาะคอเพื่อช่วยในการหายใจ สอดท่อ polyethylene (PE) เข้าไปใน common bile duct และ femoral vein เพื่อเก็บน้ำดีที่หลังออกมา และเพื่อการ infusion ด้วย 0.9% saline ที่อัตรา 1.2 มิลลิลิตร/ชั่วโมง โดยใช้ infusion pump รักษาอุณหภูมิร่างกายของสัตว์ให้คงที่ที่อุณหภูมิ 37 ± 0.5 องศาเซลเซียสด้วยโคมไฟที่ให้ความร้อนต่อเข้ากับเครื่องควบคุมอุณหภูมิ ขั้นตอนการทดลองได้รับความเห็นชอบจาก Institutional Animal Care and Use Committees

เก็บน้ำดีตัวอย่างที่ทุกช่วงเวลา 15 นาที หลังจากเก็บ control sample ได้แล้ว ฉีด MHA ที่ละลายในตัวทำละลายผสม (dimethyl sulfoxide: ethanol: water, 25:15:60) ฉีดเข้าช่องท้องที่ความเข้มข้นต่างๆ หนูกลุ่ม control ได้รับปริมาณของตัวทำละลายในขนาดที่เท่ากัน (0.5 มิลลิลิตร) ใช้กรดน้ำดี Ursodeoxycholic acid (UDCA) ซึ่งฉีดเข้าช่องท้องเพียงครั้งเดียวเป็นกลุ่ม positive control UDCA ขนาด 6 มิลลิโมล/กิโลกรัมของน้ำหนักตัว, i.p. ส่วน Buthionine sulfoximine (BSO) ที่นำมาใช้ deplete GSH ในเซลล์จะให้ก่อนที่จะได้รับ MHA 4 ชั่วโมง เพื่อประเมินผลของการขาด GSH ต่อการขับของน้ำดี คำนวณอัตราการขับออกของน้ำดีและความเข้มข้นขององค์ประกอบต่างๆในน้ำดี

2. การวิเคราะห์ส่วนประกอบของน้ำดี

วัดความเข้มข้นของน้ำดีถูกดัดใช้ 3α -hydroxysteroid dehydrogenase ความเข้มข้นของ Biliary electrolytes เช่น Na^+ , K^+ , Cl^- และ HCO_3^- วัดโดยใช้ ion selective electrodes (DADE Dimension RxL, Dade Behring Holdings, USA) เก็บน้ำดีตัวอย่างภายใต้ mineral oil เพื่อป้องกัน volatilization ของคาร์บอนไดออกไซด์ ค่า electrolyte operating range ของ Na^+ มีค่าเท่ากับ 50-200 มิลลิโมล/ลิตร ของ K^+ เท่ากับ 1-10 มิลลิโมล/ลิตรของ (1- เท่ากับ 50-200 มิลลิโมล/ลิตร และของ Total CO_2 เท่ากับ 5-45 มิลลิโมล/ลิตร

วัดBiliary และ hepatic content ของ total glutathione โดยใช้ enzymatic methods ของ Tietze และ Griffith ในน้ำดีเติม 500 μl ของ 6% sulfosalicylic acid เพื่อตกตะกอนโปรตีนและเพื่อป้องกัน autoxidation ตัวอย่างที่ได้นำไปปั่นที่ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนโปรตีน ส่วน supernatant เก็บไว้ที่ -70 °C จนกระทั่งนำมาวัดค่าด้วย spectrophotometry ส่วนดับเก็บใน tared tube ซึ่งมี ice-chilled 5% perchloric acid และมี 1 มิลลิโมลาร์ EDTA บดดับให้เป็นเนื้อเดียวกันและนำไปปั่นที่ 7,500 xg ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที ที่ supernatant ส่วนของตัวอย่างนำไปวัด hepatic glutathione content

3. การแยกและวิเคราะห์โครงสร้างของสารที่เป็นส่วนประกอบของน้ำดี

เก็บตัวอย่างน้ำดีที่ช่วงเวลา 15 นาที นำตัวอย่างน้ำดีที่ถูกกระตุ้นด้วย MHA มาเจือจางด้วย absolute ethanol 20 เท่า นำไปต้มให้เดือดเป็นเวลา 30 นาที กรองผ่านกระดาษ Whatman No. 1 ของเหลวที่ผ่านการกรองทำให้แห้งโดยใช้ speed vacuum นำสารที่ได้มาละลายด้วย 5% ของกรดอะซิติกใน methanol (mobile phase) สำหรับการวิเคราะห์ด้วย HPLC เป็น waters 600 system controller และ pump ใช้ water 996 diode array detector และ waters manual injector (Waters Associates, Milford, MA, USA) Separation และ quantization การแยกใช้ μ -Bondapak 10 ไมโครลิตร 3.9 x 300 มิลลิเมตร column (Waters Associates) mobile phase of 5% acetic acid ใน methanol ที่อัตราการไหล 1 มิลลิเมตร/นาที และที่ความยาวคลื่น 264 นาโนเมตร HPLC peak ซึ่งพบเป็น single major metabolite เก็บที่ retention time 8-10 นาที และส่วนที่เป็นตัวทำละลายถูกกำจัดทิ้งโดย co-evaporation with n-butanol under reduced pressure ค่า nuclear magnetic resonance (NMR) spectra ถูกบันทึกด้วย Bruker AVANCE 400 FT-NMR spectrometer C Faellanden, Switzerland). Residual nondeuterated dimethyl sulfoxide- d_6 signal at 2.49 ppm ใช้เป็น reference สำหรับ ^1H -NMR spectra High-resolution fast atom bombardment mass spectra ถูกวัดด้วย Finnigan MAT 90 instrument (Bremen, Germany) ปริมาณของ 4-hydroxyacetophenone-4-O- β -glucuronide ในน้ำดีถูกวัดค่า spectrophotometrically ที่ความยาวคลื่น 264 นาโนเมตร เตรียม standards จาก สาร 4-hydroxyacetophenone-4-O- β -glucuronide ที่แยกโดย HPLC จากน้ำดีตัวอย่างของหนูที่ได้รับ MHA

4. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลทั้งหมดแสดงค่าเป็น mean $\pm$ SEM ค่าที่ได้รับหลังการทดสอบจะเปรียบเทียบกับค่า controls ก่อนการทดสอบโดยใช้ ANOVA และ Student-Newman-Keul's test ส่วนความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหลของน้ำดีและอัตราการขับออกของกรดนํ้าดีจะวิเคราะห์โดยใช้ Linear regression analysis คำนัยสำคัญทางสถิติถูกพิจารณาที่ค่า $p < 0.05$

ผลการทดลอง

1. ผลการตอบสนองต่อความเข้มข้นของ 4-HA ที่มีต่อการหลั่งของน้ำดี (Dose Response Effect of 4-HA on Bile Secretion)

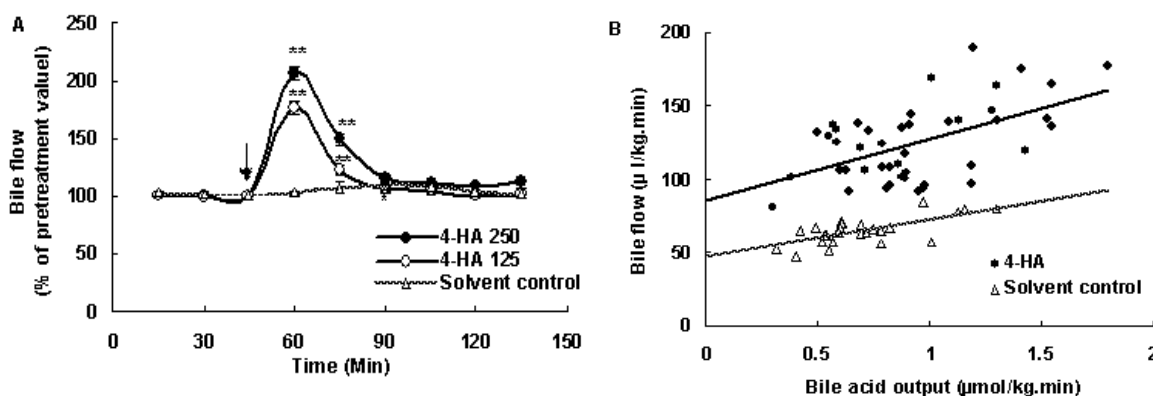
ในหนูตัวเมียปกติ สาร MHA เพิ่มการหลั่งของน้ำดีได้อย่างรวดเร็วให้ผลสูงสุดในช่วงเวลา 15 นาทีแรกของการเก็บตัวอย่างหลังจากที่ได้รับ MHA ที่ความเข้มข้นของ MHA ที่ 125 และ 250 ไมโครโมล/กิโลกรัม การหลั่งน้ำดีเพิ่มขึ้นเป็น 176 $\pm$ 6 และ 206 $\pm$ 5% ของ control ตามลำดับ อย่างไรก็ตามอัตราการไหล

ของน้ำดีได้กลับสู่ระดับ baseline อย่างรวดเร็ว (รูปที่ 3.1) ในเวลาเดียวกับที่การไหลเวียนของน้ำดีได้เพิ่มขึ้น ความเข้มข้นของกรคน้ำดีได้ลดลง ตามที่อธิบายไว้ในรูปที่ 3.1 ค่า slope ของเส้นบ่งบอกถึงความสัมพันธ์ระหว่างการไหลเวียนของน้ำดีและกรคน้ำดีที่ผลิตออกมาในหนูที่ได้รับ MHA ค่า slope ที่ได้นี้คล้ายกับของกลุ่ม control ข้อสังเกตนี้แสดงให้เห็นว่า การไหลเวียนของน้ำดีที่เพิ่มขึ้นเนื่องมาจากการเพิ่มขึ้นของ BAIF

2. อิทธิพลของ 4-HA หรือ MHA ต่อการหลั่งของ electrolyte และการขับออกของ FSH ในน้ำดี (Effect of 4-HA on Biliary Electrolyte and GSH excretion)

ได้วิเคราะห์ความเข้มข้นและปริมาณของ Na^+ , K^+ , Cl^- และ HCO_3^- และ GSH ในน้ำดีเพื่อตรวจสอบว่าสาร osmotically active solute (5) ตัวไหนที่มีผลกระตุ้นการหลั่งน้ำดีแบบ BAIF พบว่าสาร 4-HA หรือ MHA ลดความเข้มข้นของ Na^+ , Cl^- , HCO_3^- และเพิ่มความเข้มข้นของ K^+ ในน้ำดีดังตารางที่ 3.1

ปริมาณของ inorganic electrolytes เหล่านี้เพิ่มขึ้นเมื่อการไหลเวียนของน้ำดีเพิ่มขึ้น สาร UDCA ซึ่งใช้เป็นตัวแทนควบคุมบอกระดับการกระตุ้นน้ำดีมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มความเข้มข้นของ HCO_3^- และการลดความเข้มข้นของ Cl^- เพื่อใช้ในการนำมาเปรียบเทียบหลังจาก UDCA treatment Choleresis สัมพันธ์กับการเพิ่มความเข้มข้นของ HCO_3^- และการลดความเข้มข้นของ Cl^- ในน้ำดี (ตารางที่ 3.1) Linear regression analyses ของอัตราการไหลของน้ำดีและ electrolyte outputs ได้ถูกแสดงไว้ในรูปที่ 3.2 อัตราการไหลของน้ำดีมีความสัมพันธ์กับ electrolyte output ทั้งในสัตว์ทดลองที่เป็นกลุ่ม control และในกลุ่มที่ถูกทดสอบด้วย 4-HA หรือ MHA ถึงอย่างไรก็ตาม electrolyte output ทั้งหมดมีการเปลี่ยนแปลงไปในทิศทางเดียวกัน แสดงว่า electrolyte output ไม่ใช่ปัจจัยที่สำคัญที่ทำให้ น้ำไหลเข้าสู่ลำน้ำดีหลังจากที่ทดลองด้วย 4-HA หรือ MHA



รูปที่ 3.1 แสดงฤทธิ์ของ 4-HA หรือ MHA ในการกระตุ้นการหลั่งน้ำดีในหนูขาวที่ปกติ (a) Choloretic activity ของสาร MHA ที่ 125 (วงกลมเปิด) และที่ 250 (วงกลมปิด) ไมโคร โมล/น้ำหนักตัวเป็นกิโลกรัม หรือของกลุ่ม control (สามเหลี่ยมเปิด) (b) ความสัมพันธ์ระหว่างการไหลของน้ำดี ขับกรคน้ำดีที่ผลิตออกมา น้ำดีตัวอย่างถูกเก็บที่เวลา 15 นาที หลังจาก MHA ถูกฉีดเข้าช่องท้อง (วงกลมปิด); $y = 41.95x + 85.29$, $r^2 = 0.2972$, $P < 0.005$ หรือกลุ่ม control (สามเหลี่ยมเปิด); $y = 25.37x + 47.01$, $r^2 = 0.4785$, $P < 0.005$ และ $*P < 0.05$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่ม control

ตารางที่ 3.1 แสดงผลของ 4-HA หรือ MHA ที่มีต่อความเข้มข้นของ Inorganic electrolytes ในน้ำดี (Na^+ , K^+ , Cl^- และ HCO_3^-) เก็บน้ำดีตัวอย่างที่เวลา 15 นาทีหลังจากฉีด 4-HA เข้าไปในช่องท้อง (125 หรือ 250 ไมโครโมล/kg น้ำหนักตัว) และหลังจากการฉีด UDCA เข้าสู่ portal vein (50 หรือ 100 ไมโครโมล/น้ำหนักตัวกิโลกรัม) ค่าที่แสดงคือค่า means $\pm$ SEM จากสัตว์ทดลอง 10-11 ตัว

* $P < 0.05$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจาก individual control ก่อนทดสอบด้วยสาร

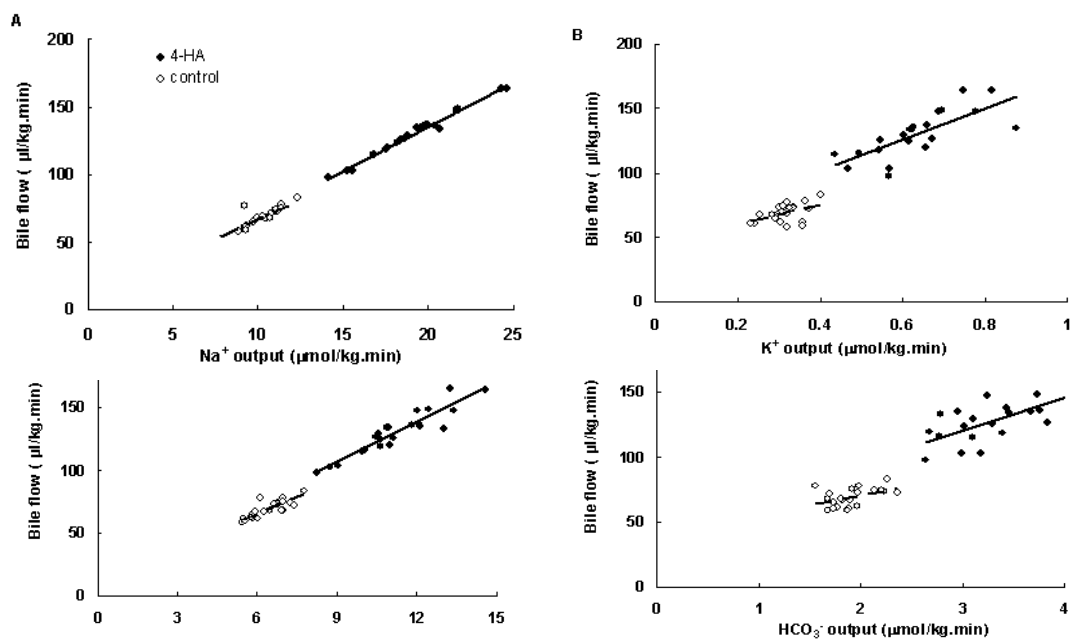
** $P < 0.005$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจาก individual control ก่อนทดสอบด้วยสาร

Effect of 4-HA on Biliary Concentrations of Inorganic Electrolytes (Na^+ , K^+ , Cl^- and HCO_3^-)					
	BFR ($\mu\text{l}/\text{min}.\text{kg}$)	Na^+ (mM)	K^+ (mM)	Cl^- (mM)	HCO_3^- (mM)
Solvent control					
Before	65.8 $\pm$ 2.5	150.5 $\pm$ 0.3	5.78 $\pm$ 0.3	95 $\pm$ 2.5	22.4 $\pm$ 3
After	67.6 $\pm$ 3.3	152.5 $\pm$ 0.3	5.46 $\pm$ 0.2	94 $\pm$ 2.8	24.4 $\pm$ 3
4-HA 125 $\mu\text{mol}/\text{kg}$					
Before	69.4 $\pm$ 2.5	150.8 $\pm$ 0.6	4.71 $\pm$ 0.2	93.6 $\pm$ 1	28.2 $\pm$ 0
After	118.0 $\pm$ 3.9**	147.2 $\pm$ 0.6**	4.82 $\pm$ 0.2	86.9 $\pm$ 0.8**	26.4 $\pm$ 0
4-HA 250 $\mu\text{mol}/\text{kg}$					
Before	68.5 $\pm$ 1.3	152.1 $\pm$ 0.9	4.52 $\pm$ 0.2	95.4 $\pm$ 1.4	28.2 $\pm$ 1
After	140.5 $\pm$ 3.9**	148.2 $\pm$ 0.8**	4.93 $\pm$ 0.2**	86.3 $\pm$ 1.5**	26.3 $\pm$ 1
UDCA 50 $\mu\text{mol}/\text{kg}$					
Before	70.1 $\pm$ 6.3	150.7 $\pm$ 0.3	5.85 $\pm$ 0.6	89.7 $\pm$ 1.3	26.5 $\pm$ 1
After	85.4 $\pm$ 6.3**	155.7 $\pm$ 0.9*	6.42 $\pm$ 0.6*	84.7 $\pm$ 1.3*	28.9 $\pm$ 1
UDCA 100 $\mu\text{mol}/\text{kg}$					
Before	67.1 $\pm$ 5.1	151.0 $\pm$ 0.5	5.15 $\pm$ 0.5	90.7 $\pm$ 0.8	27.2 $\pm$ 0
After	88.3 $\pm$ 2.1*	153.3 $\pm$ 1.33*	5.37 $\pm$ 0.4*	84.7 $\pm$ 1.8*	30.9 $\pm$ 0

Bile samples were collected for 15 min after intraduodenal injection of 4-HA (125 or 250 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ body weight) and after UDCA injection into the portal vein (50 or 100 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ body weight). Values are means $\pm$ SEM from 10–11 animals.

* $p < 0.05$ significantly different from individual control before administration.

** $p < 0.005$ significantly different from individual control before administration.

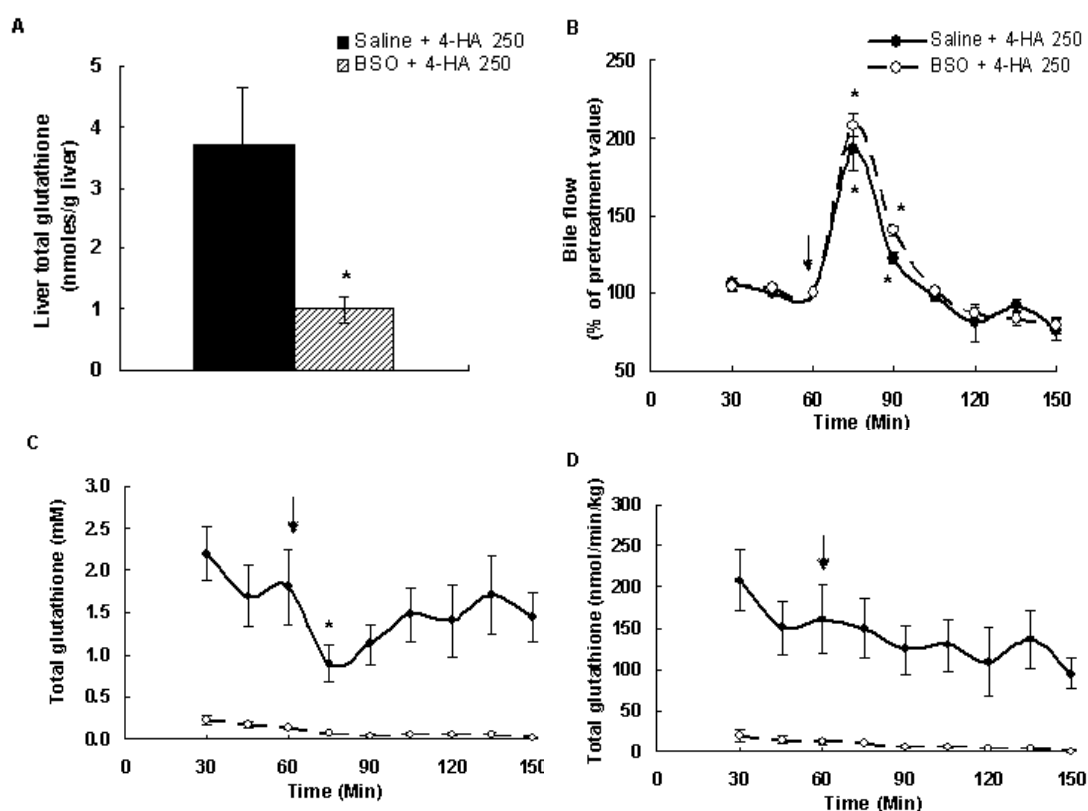


รูปที่ 3.2 แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างการไหลของน้ำดีกับ electrolyte output น้ำดีตัวอย่างถูกเก็บเป็นเวลา 15 นาทีหลังจากการฉีด 4-HA หรือ MHA เข้าช่องท้อง (วงกลมปิด) หรือของกลุ่ม control (วงกลมเปิด) น้ำดีตัวอย่างนี้ได้นำมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างการไหลของน้ำดีกับ Na^+ ที่ผลิตออกมา (a); $y = 5.78x + 9.06$, $r^2 = 0.6973$, $P < 0.005$ (control), $y = 6.56x + 4.08$, $r^2 = 0.9871$, $P < 0.005$ (4-HA), K^+ (b); $y = 76.25x + 44.89$, $r^2 = 0.2219$, $P = 0.0269$ (control), $y = 122.3x + 52.65$, $r^2 = 0.5578$, $P < 0.0001$ (4-HA), Cl^- (c); $y = 8.32x + 15.18$, $r^2 = 0.6798$, $P < 0.0001$ (control), $y = 10.5x + 11.81$, $r^2 = 0.8707$, $P < 0.005$ (4-HA), HCO_3^- (d); $y = 14.08x + 42.17$, $r^2 = 0.2128$, $p = 0.0307$ (control), $y = 25.02x + 45.48$, $r^2 = 0.5954$, $P < 0.0001$ (4-HA)

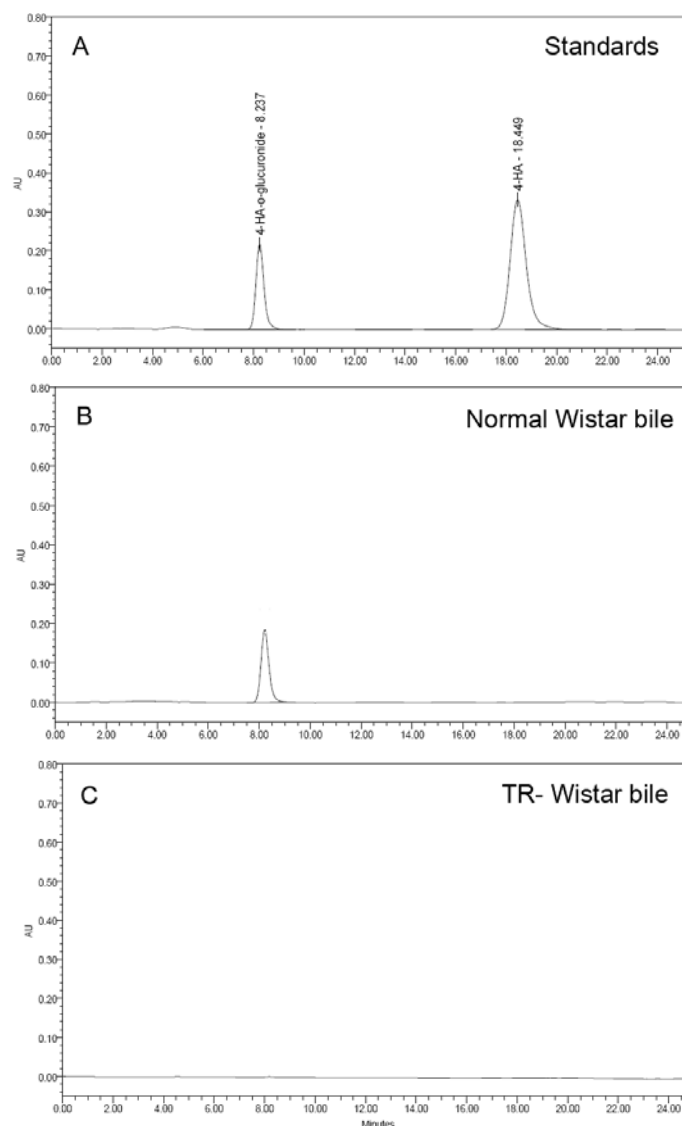
เนื่องจากสาร GSH เป็น osmotically active solute ที่สำคัญตัวหนึ่งที่มีผลต่อ BAIF (2, 3) ดังนั้นจึงทำการศึกษาเพื่อทดสอบว่า GSH เกี่ยวข้องกับการไหลของน้ำดีที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย 4-HA หรือ MHA (4-HA-Induced choleresis หรือไม่) วัดระดับของ GSH ในน้ำดีทั้งในสัตว์ทดลองกลุ่ม control และกลุ่มที่ได้รับสาร BSO เพื่อกำจัดระดับของ GSH จากตับ ถึงแม้ว่า BSO ทำให้ GSH จากตับหมดสิ้นไป แต่ BSO ก็ไม่ได้มีอิทธิพลต่อการไหลของน้ำดีที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย 4-HA (4-HA-induced choleresis) (รูปที่ 3.3) นอกจากนี้พบว่า total GSH output ในน้ำดีไม่ได้มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ หลังจากทดสอบด้วย 4-HA หรือ MHA แสดงว่า GSH ไม่เกี่ยวข้องในการไหลของน้ำดีที่ถูกเหนี่ยวนำโดย 4-HA หรือ MHA

การขับออกของ 4-HA หรือ MHA และ metabolites (Biliary Excretion of 4-HA and Its Metabolites)

จากการใช้ HPLC ตรวจวิเคราะห์ปริมาณการขับของ 4-HA หรือของ metabolite ในน้ำดีเพื่อที่จะศึกษาฤทธิ์การกระตุ้นการหลั่งน้ำดีว่าเป็นผลมาจากการขับทิ้งของสารเหล่านี้หรือไม่



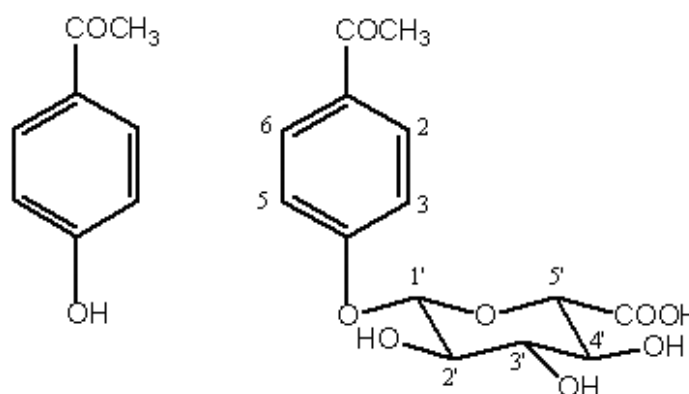
รูปที่ 3.3 แสดงผลของการขับน้ำดีที่เกิดจาก 4-HA หรือ MHA ไม่ได้ขึ้นกับ GSH 6 มิลลิโมล/น้ำหนักตัวเป็นกิโลกรัม, i.p. ของ saline (วงกลมปิด) หรือของ BSO (วงกลมเปิด) ถูกฉีดในสัตว์ทดลอง 4 ชั่วโมงก่อนที่จะได้รับ 4-HA ตับจะถูกเก็บในแต่ละครั้งของการทดลอง และนำมาวิเคราะห์หา total glutathione (a) นอกจากนี้ยังหาการไหลของน้ำดี (b) ความเข้มข้น (c) และ output ทั้งหมดของ glutathione (d) *P<0.05 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับ individual control (b)



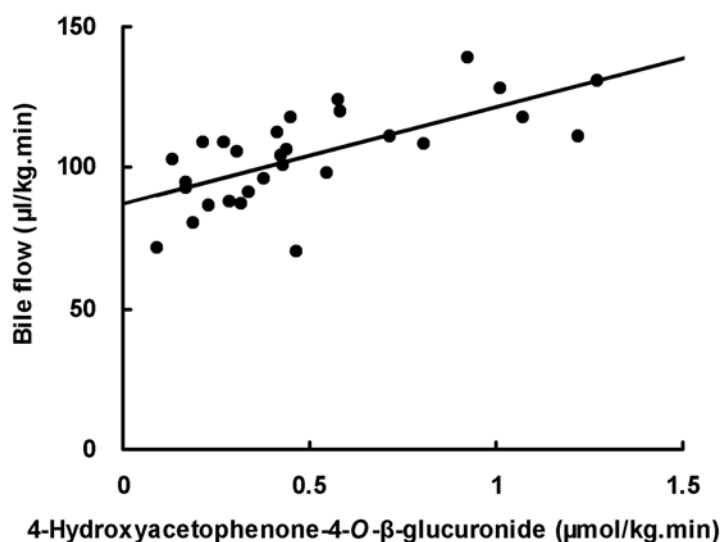
รูปที่ 3.4 แสดงการวิเคราะห์ HPLC ของ 4-HA หรือ MHA metabolite ในน้ำดี (a) Retention times ของสารละลายมาตรฐานที่มี 4-hydroxyacetophenone-4-O- β -glucuronide และ 4-HA (b) ในน้ำดีของหนูขาววิสตราที่ได้รับ 4-HA สามารถถูกตรวจพบ major metabolite ซึ่งก็คือ 4-hydroxyacetophenone-4-O- β -glucuronide (c) ทั้ง 4-HA และ metabolites ใดๆก็ตามไม่สามารถถูกตรวจพบในน้ำดีของหนูกลุ่ม TR⁻ ที่ได้รับ 4-HA

ได้พบว่าในน้ำที่ได้จากหนูปกติที่ได้รับ 4-HA หรือ MHA มี single major new peak ออกมาที่ retention time 8-10 นาทีของ (รูปที่ 3.4) ไม่พบส่วนที่เป็น parent compound ในน้ำดี parent compound จะสามารถออกมาได้ที่ retention time 17-19 นาที (รูปที่ 3.4) โครงสร้างของ parent compound ถูกวิเคราะห์โดยใช้ NMR และ mass spectral analysis ซึ่งพบว่าเป็น a pseudomolecular ion $[M-H]^-$ ที่ m/z 311.0768 in the negative ion high-resolution fast atom bombardment (HR-FAB) mass spectrum ที่มี molecular formula เป็น $C_{14}H_{16}O_8$ ข้อมูลของ 1H -NMR spectral ตรงกันกับของ 4-hydroxyacetophenone moiety ตามที่พบว่า

three-proton singlet of the acetyl group at δ 2.51, the proton doublet ($J = 8.7$ Hz) of H-3 and H-5 at δ 7.10 และ the two-proton doublet ($J = 8.7$ Hz) of H-2 and H-6 at δ 7.92 Glucuronide moiety ที่พบแสดงเป็น a doublet signal at δ 5.18 ซึ่งตรงกับ anomeric proton H-1' และ broad triplet signals of H-2', H-3' และ H-4' at δ 3.30, 3.26 และ 3.35 ที่ 8.5-8.7 Hz ของค่า apparent coupling constants ค่า relatively large coupling constant (7.0 Hz) ของ H-1' แสดงถึง β -orientation ของ sugar acid residue ดังนั้นจากข้อมูลเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่า ส่วนประกอบของน้ำดีนี้คือ 4-hydroxyacetophenone-4-O- β -glucuronide (รูปที่ 3.5, ด้านขวา)

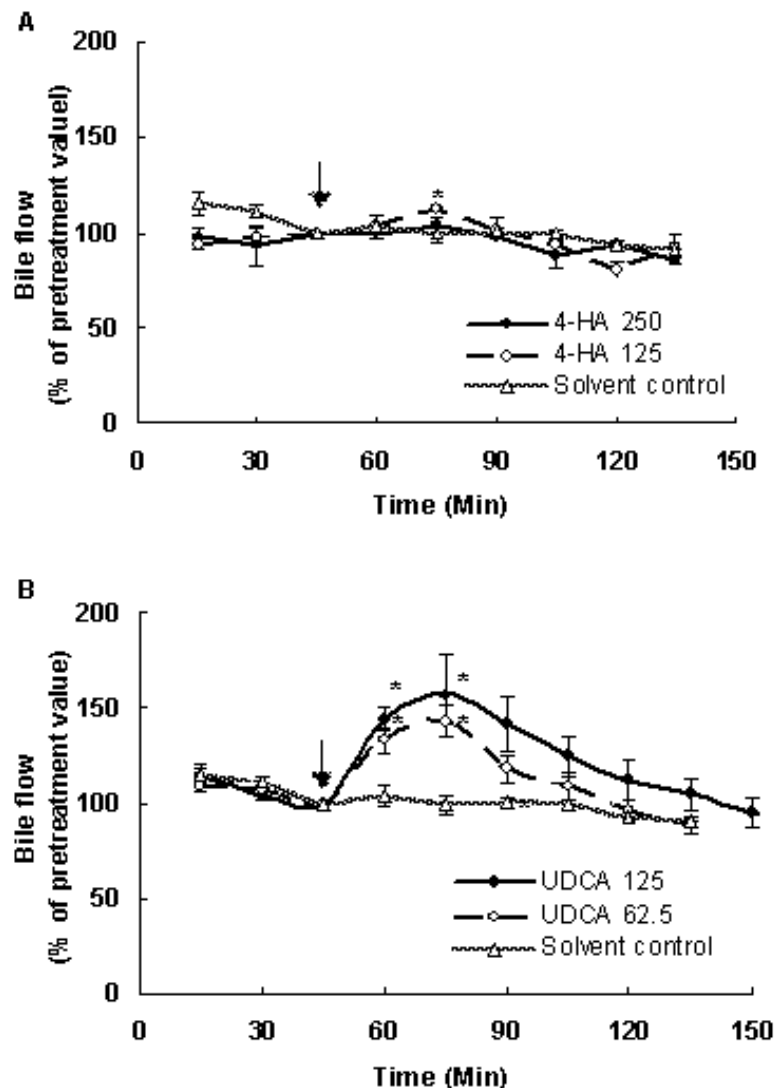


รูปที่ 3.5 แสดงโครงสร้างของ 4-hydroxyacetophenone (4-HA หรือ MHA) (ซี่ 18) และ 4-hydroxyacetophenone-4-O- β -glucuronide (ขวา)



รูปที่ 3.6 แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างการไหลของน้ำดีกับอัตราการขับออกของ 4-hydroxyacetophenone-4-O- β -glucuronide หลังจากที่ได้รับ 4-HA หรือ MHA น้ำดีตัวอย่างถูกเก็บและนำมาวิเคราะห์หา 4-hydroxyacetophenone-4-O- β -glucuronide ที่ผลิตออกมาโดยใช้ HPLC ดังที่ได้อธิบายไว้ในส่วนอุปกรณ์และวิธีการทดลอง, $y = 34.48x + 86.89$, $r^2 = 0.4583$, $P < 0.005$.

ปริมาณของ 4-HA metabolite ในน้ำดีมีค่าสูงถึง 13 mM (รูปที่ 3.6) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับปริมาณของสาร 4-HA หรือ MHA ที่ได้รับ และยังพบว่าอัตราการหลั่งของน้ำดีมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับปริมาณของสาร metabolite ที่ถูกขับออกมา (รูปที่ 3.6) ปริมาณของน้ำดีที่ถูกขับออกมาต่อไมโครโมล ของ 4-hydroxyacetophenone-4-O- β -glucuronide มีค่าเท่ากับ 34 ไมโครลิตร (รูปที่ 3.6) ซึ่งเทียบได้กับปริมาณของน้ำดีที่ถูกขับออกมาโดยกรดน้ำดี (รูปที่ 3.1) ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า 4-HA หรือ MHA มีกลไกการขับน้ำดีที่ขึ้นอยู่กับ การขับสาร metabolite นี้เข้าสู่ น้ำดี



รูปที่ 3.7 แสดงการขาดผลของ 4-HA หรือ MHA ที่มีต่อการขับน้ำดีในหนูขาววิสตรา TR⁻ (a) สัตว์ทดลองที่ได้รับ 4-HA ที่ความเข้มข้น 125 (วงกลมเปิด) หรือ 250 (วงกลมปิด) ไมโครโมล/น้ำหนักตัวเป็นกิโลกรัมหรือได้รับ solvent control (สามเหลี่ยมเปิด) (b) สัตว์ทดลองที่ได้รับ UDCA ที่ความเข้มข้น 62.5 (วงกลมเปิด) หรือ 125 (วงกลมปิด) ไมโครโมล/น้ำหนักตัวเป็นกิโลกรัมหรือได้รับ solvent control (สามเหลี่ยมเปิด)
*P<0.05 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากค่าที่ได้ก่อนการทดสอบ

ความล้มเหลวของ 4-HA หรือ MHA ในการขับน้ำดีในหนูที่มีความบกพร่องของโปรตีน Mrp2 (4-HA fails to induce a choleresis in Mrp2-deficient rats)

ในทางตรงกันข้ามหนูปกติ สาร 4-HA หรือ MHA ไม่สามารถกระตุ้นการขับน้ำดีในหนู TR^- ซึ่งหนูชนิดนี้ไม่มี canalicular Mrp2 transport protein (รูปที่ 3.7) นอกจากนี้ยังไม่พบว่า 4-hydroxyacetophenone-4-O- β -glucuronide ในน้ำดีของ TR^- (รูปที่ 3.4) เมื่อทดสอบการขับของน้ำดีในหนู TR^- ที่ถูกกระตุ้นด้วย UDCA พบว่าการขับของน้ำดีที่ดีขึ้นซึ่งเป็นไปตามที่ได้คาดการณ์ไว้ (รูปที่ 3.7) จากผลที่ได้ชี้ให้เห็นได้ชัดเจนว่าการขนส่งสารโดยโปรตีน Mrp2 มีความจำเป็นต่อการขับของน้ำดี และสารที่ถูกขนส่งคือ 4-hydroxyacetophenone-4-O- β -glucuronide ซึ่งเป็น substrate ของ Mrp2

อภิปรายผล

สาร 4-HA หรือ MHA เป็นสารที่มีอยู่ตามธรรมชาติพบได้ในพืชหลายๆชนิด สารนี้มีผลต่อการหลั่งน้ำดีจากตับและอาจเป็นสารที่มีบทบาทสำคัญในการนำมาใช้รักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับความบกพร่องของการหลั่งน้ำดี การวิจัยครั้งนี้พบว่ากลไกพื้นฐานที่มีผลต่อการหลั่งน้ำดีคือการที่ major biliary metabolite ของ 4-HA หรือ MHA ซึ่งก็คือ 4-O- β -glucuronide ถูกหลั่งเข้าสู่น้ำดีที่ความเข้มข้นที่สูง การขับ glucuronide ออกจากเซลล์ตับต้องอาศัยโปรตีนขนส่งที่เรียกว่า Mrp2 การสะสมสาร metabolite ในปริมาณมากในน้ำดีมีผลต่อการหลั่งของน้ำดี

น้ำดีที่อยู่ในท่อน้ำดีเกิดขึ้นจากแรงดัน osmosis การที่น้ำและ electrolytes เข้าสู่ท่อน้ำดีเป็นผลสืบเนื่องมาจากการขนส่งสารละลาย (solutes) ต่างๆที่เข้าสู่ท่อน้ำดี แบบแอคทีฟ สารดังกล่าวมี osmotic driving force สูง ซึ่งกรดน้ำดีเป็นตัวหลักที่มีผลต่อการหลั่งของน้ำดี (i.e. BADF) อย่างไรก็ตามสารละลายที่ไม่ใช่กรดน้ำดี เช่น reduced glutathione (GSH) และสารละลายอินทรีย์อื่นๆ อย่างเช่น ยา และสารเคมีแปลกปลอมหลายๆชนิด ก็มีผลต่อการหลั่งของน้ำดีด้วยเช่นกัน การขับทิ้งของ GSH และ HCO_3^- ทำให้เกิดการหลั่งน้ำดีที่ไม่ขึ้นกับกรดน้ำดี (BAIF) หลังจากการกระตุ้นด้วย 4-HA หรือ MHA พบว่าความเข้มข้นของ Na^+ , K^+ , Cl^- และ HCO_3^- เปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น และมีค่าใกล้เคียงกับค่าในเลือด นอกจากนี้การขับออกของ GSH ก็ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

UDCA เป็นสารที่กระตุ้น BAIF โดยทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนระหว่าง HCO_3^- กับ Cl^- ที่ canalicular และ ductular membrane ทำให้ความเข้มข้นของ HCO_3^- ในน้ำดีเพิ่มขึ้น ทำให้ความเข้มข้นของ Cl^- ในน้ำดีลดลงจากค่าปกติ ซึ่งผลที่ได้นี้แตกต่างจากผลของ 4-HA หรือ MHA ซึ่งทำให้ความเข้มข้นของ HCO_3^- ในน้ำดีลดลง ถึงแม้ว่าการขับน้ำดีที่เป็นผลมาจาก 4-HA หรือ MHA จะสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของปริมาณ inorganic electrolytes แต่การเพิ่มดังกล่าวไม่ได้เป็นปัจจัยหลักที่ทำให้เกิดการขับของน้ำดี GSH ซึ่งเป็น osmotically active solute ที่เกี่ยวข้องกับ BAIF ก็ไม่ได้มีผลต่อการขับน้ำดีเช่นกัน แม้ว่าจะทำให้ระดับของ GSH ในตับลดลงเหลือเพียงแค่ 30% ของค่าปกติ การหลั่งของน้ำดี จากได้รับ 4-HA หรือ MHA ยังเพิ่มสูงได้

นอกจากนี้ยังพบว่า output ของกรดน้ำดีเพิ่มขึ้นน้อยมากในระหว่างที่มีการขับน้ำดีที่เกิดจาก 4-HA หรือ MHA ข้อมูลนี้ตรงกับผลที่ได้รับก่อนหน้านี้ที่ว่า 4-HA หรือ MHA มีผลโดยมากต่อ BAIF ได้พบว่าสาร 4-hydroxyacetophenone-4-O- β -glucuronide หลังเข้าสู่น้ำดีที่ความเข้มข้น 13 มิลลิโมลา และการขับออกของสาร metabolites นี้มีผลโดยตรงต่อการหลั่งของน้ำดีที่เพิ่มขึ้น ด้วย สาร 4-HA หรือ MHA ละลายในน้ำได้น้อย ดังนั้นสารจะถูกเปลี่ยนแปลงในตับก่อนที่จะถูกลำเลียงผ่านผนังเซลล์และถูกขับออกจากเซลล์ ปริมาณของน้ำดีที่ถูกขับออกมาต่อหนึ่งไมโครโมลของ 4-hydroxyacetophenone-4-O- β -glucuronide มีค่าเท่ากับ 34 μ l (รูปที่ 3.6) ซึ่งคล้ายกันกับในกรณีของกรดน้ำดี (รูปที่ 3.1) ทั้งนี้สามารถใช้อธิบายฤทธิ์การขับของน้ำดีได้ ในทางตรงข้ามไม่พบสาร parent compound ในน้ำดี

ได้ทำการศึกษาต่อไปเพื่อยืนยันว่า Mrp2 เกี่ยวข้องกับการหลั่งของ 4-hydroxyacetophenone-4-O- β -glucuronide โดยใช้หนู TR⁻ ที่ขาดโปรตีน Mrp 2 ซึ่งเป็นโปรตีนขนส่งที่มีความสำคัญต่อการหลั่งของ glucuronide conjugates เข้าสู่ น้ำดี การศึกษานี้พบว่า หนู TR⁻ ไม่สามารถที่จะขับน้ำดีและไม่มีสาร 4-hydroxyacetophenone-4-O- β -glucuronide ในน้ำดีของหนูกลุ่มนี้ ผลที่ได้เหล่านี้สนับสนุนสมมุติฐานที่ว่า การขับออกของ 4-hydroxyacetophenone-4-O- β -glucuronide โดยโปรตีน Mrp2 ทำให้เกิดแรงขับเคลื่อนทาง osmotic ซึ่งทำให้เพิ่มการหลั่งของน้ำดีหลังจากที่ได้รับสาร 4-HA หรือ MHA เนื่องจากว่าสาร 4-HA หรือ MHA มีอยู่ในพืช และมี polyphenol จำนวนมากในพืชที่สามารถถูกเปลี่ยนมาเป็น 4-HA หรือ MHA ดังนั้นผลของ 4-HA หรือ MHA ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ จะมีประโยชน์ในการนำมาอธิบายผลทางการรักษาของสารที่อยู่ในพืชนี้

สรุปได้ว่า สาร 4-HA หรือ MHA เป็นสารที่พบได้ในพืชสมุนไพรหลายชนิดรวมถึงว่านชักมดลูก มีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดีที่แรง กลไกการออกฤทธิ์เกิดจากการขับทิ้งของสาร metabolite เองซึ่งมีคุณสมบัติในการดึงน้ำออกทางท่อน้ำดีสูง และอาศัยโปรตีนขนส่ง Mrp2 นำผ่านเข้าสู่ canaliculi ความเข้าใจในกลไกของสาร bioactive compounds เช่น 4-HA หรือ MHA ที่อยู่ในพืชซึ่งกระตุ้นการขับออกของน้ำดีนี้มีประโยชน์ในการรักษาความบกพร่องในการทำงานของตับและสามารถนำมาพัฒนาเป็นตัวยาใหม่ๆ

REFERENCES

1. M. Trauner, M. Wagner, P. Fickert, and G. Zallner. Molecular regulation of hepatobiliary transport systems: Clinical implications for understanding and treating cholestasis. J. Clin. Gastroenterol. 39:S111-S124 (2005).
2. N. Ballatori and A. T. Truong. Relation between biliary glutathione excretion and bile acid-independent bile flow. Am. J. Physiol. 256:G22-G30 (1989).
3. N. Ballatori and A. T. Truong. Glutathione as a primary osmotic driving force in hepatic bile formation. Am. J. Physiol. 263:G617-G624 (1992).
4. M. H. Nathanson and J. L. Boyer. Mechanism and regulation of bile secretion. Hepatology 14:551-556 (1991).

5. P. Calhoun, K. B. Brown, R. Strunk, D. A. Krusch, M. Scheld, and J. B. Hanks. Experimental studies of biliary excretion of piperacillin. *Ann. Surg.* 205:420-427 (1987).
6. J. Chenderovitch, A. Raizman, and R. Infante. Mechanism of ethacrynic acid-induced choleresis in rat. *Am. J. Physiol.* 229:1180-1187 (1975).
7. J. Gonzalez, C. Fernandez, E. Marino, A. Morales, and R. Jimenez. Biliary excretion and choleric effect of cefmetazole in rats. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33:1970-1974 (1989).
8. K. Ito, T. Koresawa, K. Nakano, and T. Horie. Mrp2 is involved in benzylpenicillin-induced choleresis. *Am. J. Gastroint. Liv. Physiol.* 287:42-49 (2004).
9. P. Piyachaturawat, N. Chai-ngam, A. Chuncharunee, P. Komaratat, and A. Suksamrarn. Choleric activity of phloracetophenone in rats: Structure-function studies using acetophenone analogues. *Eur. J. Pharmacol.* 387:221-227 (2000).
10. Y. Shao, Y. L. Li, and B. N. Zhou. Phenolic and triterpenoid glycosides from *Aster batangensis*. *Phytochemistry* 41:1593-1598 (1996).
11. E. Hideo, K. Murakami, T. Yogoh, H. Ishikawa, Y. Fukuyama, and H. Tanaka. Anti-oxidative compounds in Barley tea. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68:2616-2618 (2004).
12. I. Okuno, K. Uchida, M. Nakamura, and K. Sakurawi. Studies on choleric constituents in *Artemisia capillaris* THUNB. *Chem. Pharm. Bull.* 36:769-775 (1988).
13. L. A. Turnberg and A. Anthony-Mote. The quantitative determination of bile salt using thin layer chromatography and 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase. *Clin. Chim. Acta* 24:253-259 (1969).
14. F. Tietze. Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* 27:502-522 (1969).
15. O. W. Griffith. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* 106:207-212 (1980).
16. D. Alvaro, A. Mennone, and J. L. Boyer. Effect of ursodeoxycholic acid on intracellular pH regulation in isolated rat bile duct epithelial cells. *Am. J. Physiol.: Gastrointest. Liver Physiol.* 266:G783-G791 (1993).
17. N. Ballatori, C. L. Hammond, J. B. Cunningham, S. M. Krance, and R. Marchan. Molecular mechanisms of reduced glutathione transport: Role of the MRP/CFTR/ABCC and OATP/SLC21A families of membrane proteins. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 204:238-255 (2005).
18. N. Vrchotova, J. Triska, O. Urban, and L. Peknic. Variability of catechin and 4-hydroxy acetophenone distribution in Norway spruce needles in relation to their position, age, and growing conditions. *Environ. Pollut.* 131:55-59 (2004).
19. M. Shimizu and I. B. Weinstein. Modulation of signal transduction by tea catechins and related phytochemicals. *Mutat. Res.* 591(1-2):147-160 (2005).

ตอนที่ 4

การศึกษาสาร Phloracetophenone ออกฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดีโดยผ่านตัวขนส่ง Mrp 2

(Submitted to Am. J. Physiology: Gastrointestinal-Liver, 2006)

บทคัดย่อ

Phloracetophenone (2,4,6-trihydroxy acetophenone, THA) เป็นสารที่มีคุณสมบัติเด่นในการขับน้ำดี อย่างไรก็ตามกลไกการขับน้ำดีดังกล่าวยังไม่เป็นที่ทราบชัด การวิจัยนี้ได้ศึกษาฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดีของสาร THA โดยศึกษาฤทธิ์โดยตรงของสารในตับที่แยกออกมาจากตัว (ใน isolated perfused rat liver, IPRL) พบว่า การให้ THA โดยทำ step-wise infusions 1-4 ไมโครโมลต่อนาที มีผลกระตุ้นการหลั่งน้ำดีทันที และปริมาณน้ำดีจะเพิ่มตามขนาดของ THA ที่ให้ จนถึงระดับหนึ่งอัตราการหลั่งจะคงที่ อัตราการหลั่งของน้ำดีที่เพิ่มขึ้นใน model IPRL กระตุ้นให้เกิดการหลั่งของน้ำดีที่ไม่ได้ขึ้นตรงต่อกรดน้ำดี (bile add-independent bile flow, BAIF) จึงมุ่งหากลไกการออกฤทธิ์โดยสารอื่น การออกฤทธิ์ของสาร THA ในการกระตุ้นการหลั่งน้ำดีดังกล่าวอาจเกิดจากการที่สารถูกปรับเปลี่ยนเป็น metabolite เช่นถูก conjugate ด้วย glucuronide หรือ glutathione และถูกขับทิ้งด้วยโปรตีนขนส่ง Mrp2 จึงได้ทำการตรวจสอบฤทธิ์ของ THA ที่มีต่อการขับออกของ substrates หลักของโปรตีนขนส่ง Mrp2 (multidrug resistance proteins-2) ที่ทำหน้าที่ขับสารทิ้งที่ bile canaliculi ได้แก่ sulfabromophthalein (BSP) และ disulfobromophthalein (DBSP) ที่ตับ พบว่า THA มีฤทธิ์ยับยั้งการขับออกของ substrates ทั้งสองตัวในน้ำดีอย่างชัดเจน โดยทั่วไปสาร BSP ก่อนถูกขับทิ้งจะถูกเปลี่ยนเป็น metabolite ที่ conjugate กับ glutathione ขณะที่สาร DBSP เป็นสารที่มีการ conjugate แล้วจะถูกขับออกมาโดยปราศจากการ conjugation เป็น glutathione อีก พบว่า THA อาจจะแย่งจับตำแหน่งที่เป็น common canalicular transport site ของ Mrp2 ไม่ได้แย่งการ conjugate จากการตรวจสอบฤทธิ์ของ THA ต่อปริมาณของตัวขนส่งต่างๆที่เกี่ยวข้อง สาร THA ไม่มีผลต่อ subcellular localization และ distribution ของ Mrp2 หรือของ bile salt export pump (BSEP) และไม่มีผลต่อ integrity ของ tight junction นอกจากนี้ยังพบว่าสาร THA ไม่สามารถกระตุ้นการหลั่งน้ำดีในหนู TR- ซึ่งไม่มีโปรตีน Mrp2 ข้อมูลนี้ชี้ให้โปรตีนขนส่ง Mrp2 ซึ่งรับผิดชอบการขับทิ้ง THA metabolite เข้าสู่น้ำดีเป็นตัวการสำคัญที่ทำให้เกิดฤทธิ์ของสาร THA ซึ่งออกฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดีโดยเกิดจาก metabolite ในตับซึ่งจะถูกขับ

ออกด้วยโปรตีนขนส่ง Mrp2 นอกจากนี้พบว่า THA สามารถบรรเทาการคั่งของน้ำดีในสัตว์ทดลองที่มี การคั่งของน้ำดีด้วย estradiol-17 β -D-glucuronide

การวิจัยนี้สรุปได้ว่าฤทธิ์การกระตุ้นการหลั่งน้ำดีของ THA เกิดจากการขับทิ้งของ THA-metabolites ขึ้นตรงต่อการทำงานของโปรตีนขนส่ง Mrp2 โดย THA ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงปริมาณตัวขนส่งแต่อาจเร่งการทำงานของตัวขนส่ง THA ยังช่วยลดการคั่งของน้ำดีที่เกิดจากสารพิษที่ตับที่มีวิถีของการ metabolism ในตับและขับออกที่คล้ายกัน

บทนำ

การผลิตน้ำดีประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ขึ้นตรงกับการขับออกของกรดน้ำดี (bile acid-dependent flow, BADF) และหรือขึ้นกับการขับสารอื่นทิ้งในน้ำดี เช่น ขึ้นกับการขับออกของ glutathione (GSH) และของตัวละลาย organic และ inorganic อื่นๆ (2, 20, 36) ซึ่งการผลิตแบบหลังนี้เป็นการผลิตน้ำดีที่ไม่ขึ้นตรงต่อกรดน้ำดี (bile acid-independent flow, BAIF) แต่จะขึ้นกับการขับทิ้งของ osmotically active compound เช่น metabolic by-products และ xenobiotics ซึ่งเป็นแรงขับเคลื่อนให้เกิดการเคลื่อนที่ของเหลวผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ตับและผ่าน tight junction แบบ passive transport (4) การหลั่งน้ำดีเป็นกระบวนการสำคัญในการกำจัดสารที่เกิดขึ้นภายในและที่มาจากภายนอกร่างกายทิ้ง ซึ่งสารเหล่านี้ถูกเปลี่ยนแปลง (biotransformation) โดย Phase I และ Phase II enzymes ในตับ ก่อนที่จะถูกขับเข้าสู่ น้ำดี ตัวอย่างเช่น

Phloracetophenone หรือ 2,4,6-trihydroxyacetophenone (THA) เป็นส่วน aglycone ของ phloracetophenone glucoside ซึ่งเป็นสารประกอบที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติที่มาจากส่วนหัวของ วาน ชักมดลูก *Curcuma comosa* (Family Zingiberaceae)(24) THA สามารถกระตุ้นการไหลของน้ำดี และ เพิ่มการขับออกของกรดน้ำดีในหนู ส่งผลให้ระดับ cholesterol ในเลือดลดลง ข้อมูลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า THA มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยารักษาภาวะที่น้ำดีคั่ง (cholestasis) และ ป้องกันโรคนิ่วในถุงน้ำดี (gallstones) อย่างไรก็ตามกลไกที่ THA เพิ่มการไหลเวียนของน้ำดี ยังไม่เป็นที่ทราบชัด การวิจัยนี้จะใช้ isolated perfused rat liver (IPRL) ในการศึกษาผลของ THA ที่มีต่อการไหลของน้ำดีซึ่งเป็นการทำงานโดยตรงของสารนี้ต่อดับซึ่งสามารถตัดตัวแปรที่เป็นผลของการไหลเวียนของเลือดหรือตัวแปรที่ไม่ใช่เนื้อเยื่อของตับ ผลที่ได้จากการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า ฤทธิ์กระตุ้น ของ THA ที่มีต่อการขับน้ำดีเกี่ยวข้องกับ Mrp2 และ THA อาจมีประโยชน์ทางการแพทย์ ในการรักษา ภาวะที่น้ำดีคั่งที่เป็นผลมาจาก E2-17G

วัตถุประสงค์

การศึกษากลไกการกระตุ้นการหลั่งน้ำดีของสาร THA ในตับที่แยกออกมาจากตัว (isolated perfused rat liver) และศึกษาบทบาทของ THA ภายในเซลล์ที่มีผลต่อการจับของ specific substrate ของ Mrp2 และยังทำการศึกษาในหนู TR- ซึ่งเป็นหนูที่มีความบกพร่องมาแต่กำเนิดของตัวขนส่ง multidrug resistance-associated protein-2, Mrp2/Abcc2 และบ่งชี้ได้ว่าฤทธิ์การกระตุ้นการหลั่งน้ำดีของสาร THA ส่วนที่เป็น BAIF เกิดจากการจับ glucuronide conjugate ของสารเองด้วยตัวขนส่ง Mrp-2 ซึ่งเป็น osmotically active compound ที่ทำให้น้ำตามออกมา

วิธีการวิจัย

1. **การศึกษา isolated perfused rat liver** การทดลองนี้ใช้หนู Sprague-Dawley เพศผู้ น้ำหนักตัว 190 ถึง 200 กรัม ซึ่งได้รับจาก Charles River Laboratories (Wilmington MA, USA) การทดลองทุกขั้นตอนอยู่ภายใต้เงื่อนไขของ National Institutes of Health และได้รับความเห็นชอบจาก Yale Animal Care and Use Committee การทดลองทำในห้องปฏิบัติการของ Cellular และ Molecular Physiology Core of the Yale Liver Center ทั้งนี้เริ่มด้วยการแยกตับหนูออกมาและทำการ perfusion ดังที่ได้อธิบายไว้ก่อนหน้านี้แล้ว(6) ขั้นแรกทำให้หนูสลบด้วย sodium pentobarbital (50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวเป็นกิโลกรัม)แล้วใช้ท่อ PE-10 tubing (Becton Dickinson Primary Care Diagnostics, Sparks, MD, USA) สอดเข้าไปในท่อน้ำดี และท่อ 14-gauge Teflon intravenous catheter (McKesson General Medical, Cheshire, CT, USA) สอดเข้าไปในหลอดเลือดดำใหญ่ หลังจากนั้น perfusion ด้วย Krebs-Ringer's bicarbonate (KRB) buffer (pH 7.4) ซึ่งมีออกซิเจน 95% มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% มี glucose 1% และมีอุณหภูมิคงที่ที่ $37^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ การ perfusion ทำที่อัตราการไหลของ buffer เท่ากับ 30 มิลลิลิตรต่อนาที ต่อมาสอดท่อเข้าไปใน inferior vena cava และย้ายตับไปไว้ใน temperature-controlled chamber และทำการ perfusion ด้วย oxygenated KRB buffer ที่อัตราการไหล 40 มิลลิลิตรต่อนาที (4.4 – 5.7 มิลลิลิตร/นาที่/น้ำหนักของตับเป็นกรัม) ระดับของก๊าซออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ใน KRB buffer ถูกควบคุมอย่างต่อเนื่องที่ระดับออกซิเจนเป็น 95% และคาร์บอนไดออกไซด์เป็น 5% ที่อุณหภูมิ $37^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ด้วย thermister probe (Yellow Springs Instrument Co., Yellow Springs, OH, USA) ซึ่งถูกสอดเข้าไประหว่าง lobes ของตับ ในท้ายการทดลองทำการฉีด trypan blue เข้าไปในตับเพื่อดู uniformity ของการ perfusion จากการกระจายตัวของสีที่ใช้ย้อม

ทุกการทดลองของ isolated perfused rat liver ใช้ระบบ single-pass system ของ oxygenated (95% O₂ – 5% CO₂) KRB (pH 7.4) ที่เวลา 15 นาทีหลังจากเริ่ม perfusion สาร THA จะถูกฉีดเข้าไป หลังจากนั้นทำการตรวจสอบการไหลของน้ำดี การขับออกของกรคน้ำดี และ glutathione อิสระทั้งหมดอยู่ในน้ำดี THA ที่ละลายไว้ในสารละลายผสม (DMSO: absolute ethanol: KRB ที่อัตราส่วน 25:15:60) ถูก infuse เข้าสู่ perfusate โดยวิธีการ a step-wise fashion ด้วยอัตรา 1 หรือ 2 หรือ 4 ไมโครโมลต่อนาที (25, 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ) ในทุกช่วงเวลา 20 นาที ตัวอย่างน้ำดีถูกเก็บทุกช่วงเวลา 5 นาทีตลอดทั้งการทดลอง น้ำดีถูกเก็บไว้ใน pre-weighed tubes ในกรณีที่จะตรวจวัด GSH จะต้องเติม 6% sulfosalicylic acid ในตัวอย่างน้ำดีที่จะนำมาตรวจวัด ตัวอย่างน้ำดีถูกนำมาวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของกรคน้ำดีและ glutathione ทั้งหมดที่อยู่ในน้ำดี ในกรณีที่จะศึกษาผลของ THA ที่มีต่อการขับ BSP หรือ DBSP นั้น THA ถูกเติมลงใน perfusion media ด้วยอัตราคงที่ที่ 40 ไมโครโมลต่อนาที (1 ไมโครโมลาร์) เป็นเวลา 45 นาที ซึ่งการใส่ THA ใน perfusion media จะทำหลังจากที่ทดสอบฤทธิ์ของ BSP หรือ DBSP (0.04 ไมโครโมลต่อนาที (1 ไมโครโมล)) จนกระทั่งอัตราการไหลของน้ำดีคงที่และมีการขับออกของ BSP หรือ DBSP คงที่ ตัวอย่างน้ำดีที่ได้ถูกนำมาวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของ BSP หรือ DBSP และปริมาณที่ถูกขับออกของ BSP หรือ DBSP

การตรวจสอบศักยภาพของ THA ในการรักษาหรือบรรเทาอาการคั่งของน้ำดี (cholestasis) ที่เกิดจากการได้รับสาร E₂-17G การทดลองเริ่มจากการให้กรคน้ำดี taurocholate (TC) ที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลต่อนาที (12.5 ไมโครโมลาร์) หลังจากที่มีการขับออกของ TC ถึง Steady state ต่อมาเติม THA ลงใน perfusion medium หลังจากเก็บ control period ซึ่งใช้เวลา 15 นาที และให้ด้วย อัตรา 40 ไมโครโมลต่อนาที (1 มิลลิโมลาร์) พร้อมกับ single bolus injection ของ E₂-17G (1 ไมโครโมลต่อน้ำหนักตัว 100 กรัม) หลังจากนั้นทำการวัดค่าอัตราการไหลของน้ำดีและค่าความเข้มข้นของกรคน้ำดีและ glutathione อิสระทั้งหมดที่อยู่ในน้ำดี

2. การศึกษา Bile fistula rat ในหนู TR⁻

TR⁻ rat นำมาจาก University of Rochester School of Medicine Faculty (Rochester, NY, USA) ก่อนทำการทดลองให้หนูงดอาหารหนึ่งคืน การทดลองเริ่มต้นด้วยการสลบหนูด้วย sodium pentobarbital (50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวเป็นกิโลกรัม) หลังจากนั้นเปิดช่องคอหนูออกเพื่อเป็นการกระตุ้นการหายใจแล้วสอดท่อ Polyethylene เข้าไปในท่อน้ำดีเพื่อเก็บน้ำดีที่หลั่งออกมาทุกช่วงเวลา 15

นาที่ น้ำดีที่ได้ถูกเก็บไว้ใน pre-weighed tubes ต่อมาสอดท่อ Polyethylene เข้าไปใน femoral vein เพื่อทำการ infusion ด้วย normal saline ที่อัตรา 1.2 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ดังอธิบายไว้ก่อนหน้านี้ (23) ทั้งนี้ อุณหภูมิของร่างกายของหนูถูกรักษาให้คงที่ที่ $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ โดยใช้คอมไฟท์ให้ความร้อน

หลังจากทำการเก็บ control samples เสร็จแล้วทำการฉีด THA เข้าในส่วนต้นของ duodenum ด้วยความเข้มข้น 125 หรือ 250 ไมโครโมลต่อน้ำหนักตัวเป็นกิโลกรัม (0.5 มิลลิลิตร) ต่อมาตัวอย่างน้ำดีถูกเก็บอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 90 นาที หลังจากนั้นนำหลอดทดลองมาชั่งน้ำหนักอีกครั้งหนึ่งและค่าที่ได้ นำมาคำนวณหาอัตราการไหลของน้ำดี

3. Immunohistochemistry และ confocal analysis

เพื่อศึกษาบทบาทของ THA ต่อปริมาณของ bile salt export pump (Bsep) multidrug resistance-associated protein 2 (Mrp2) และ tight junction-associated protein ซึ่งคือ Zonula occludens (ZO-1) การศึกษานี้จะแยกการทดลองของ Bsep ของ Mrp2 และของ ZO-1 ออกจากกัน การทดลองเริ่มต้นด้วยการฉีด THA เข้าสู่ IPRL เป็นเวลา 25 นาที จากนั้นตัดตับเป็น a small cubic pieces แล้วทำการแช่แข็งโดยทันทีด้วย Freon/Liquid nitrogen และเก็บไว้ที่ -80°C จนกระทั่งจะนำมาใช้ ในการเตรียมเนื้อเยื่อนั้น ตัด small cubic pieces ของเนื้อเยื่อตัดให้เป็น 4-6 μm -thick sections และวางไว้บน slides ดับที่ถูกล้าง ถูก fix ใน cold acetone (-20°C) เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้น rehydrate โดยการแช่ใน blocking buffer (PBS, 1% BSA, 0.05% Triton X-100) เป็นเวลา 20 นาที การย้อม Bsep และ Mrp2 ทำได้โดยการแช่เนื้อเยื่อเป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องใน Bsep antibody (1:200) และ Mrp2 antibody (1:100) ที่ถูกเจือจางใน blocking buffer หลังจากล้างด้วย PBS-0.05% Triton X-100 เนื้อเยื่อถูกแช่เป็นเวลา 60 นาทีใน secondary antibody ที่เจือจางใน blocking buffer ทั้งนี้ Alexan594-conjugated goat anti-rabbit (1:500) ใช้เป็น secondary antibody สำหรับย้อม Bsep และ Alexa 488-conjugated goat anti-mouse (1:500) ใช้เป็น secondary antibody สำหรับย้อม Mrp2 ส่วนการย้อม ZO-1 นั้นดับที่ถูกล้าง ถูกแช่ใน primary antibody ของ ZO-1 (1:400) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากการล้าง ดับถูกนำไปแช่ใน secondary antibody (1:500) เป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นทำการตรวจเช็ค Fluorescent localization โดยใช้เครื่อง Zesis LSM 510 confocal microscope (Carl Zeiss Inc, NY, USA)

4. Analytical methods

การวิเคราะห์กรดน้ำดีทั้งหมดใช้ Sigma diagnostic bile acid reagent kit (Trinity Biotech, Co Wicklow, Ireland) ซึ่งใช้หลักการ 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase enzymatic method (17) ทั้งนี้ Glutathione ทั้งหมดในน้ำดีตรวจวิเคราะห์ได้จากน้ำดีตัวอย่างซึ่งถูกเก็บไว้ใน pre-weighed tube ที่บรรจุข้างในด้วย 6% sulfosalicylic acid เพื่อการ minimize oxidation ของ GSH หลังจากนั้นทำการตรวจวิเคราะห์ค่าดัชนีการหักเหของแสง โดยทำตามขั้นตอน enzymatic recycling ของ Tietze (33) ซึ่งขั้นตอนนี้ถูกปรับเปลี่ยนโดย Griffith (8) ความเข้มข้นของ BSP และ DBSP ในน้ำที่ถูกตรวจวัดจากค่าดัชนีการหักเหแสงที่ความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร หลังจากเจือจาง BSP และ DBSP ด้วย 0.1 N NaOH

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการทดลองถูกแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E.M. ในการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม control กับกลุ่มที่ได้รับ THA ใช้วิธี Student's pair *t*-test ส่วนการเปรียบเทียบความแตกต่างบางประการที่มากกว่า 2 กลุ่มขึ้นไป ใช้วิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และ Student-Newman-Keul's test ทั้งนี้ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญถูกพิจารณาที่ $P < 0.05$

ผลการวิจัย

1. ผลของ THA ที่มีต่ออัตราการไหลของน้ำดี (BFR)

การทำ step-wise infusion ด้วย THA (1, 2 และ 4 ไมโครโมลต่อนาที) เข้าสู่ isolated perfused rat liver ทำให้อัตราการหลั่งน้ำดี (BFR) เพิ่มขึ้นตามปริมาณของ THA ที่เพิ่มสูงขึ้น และ BFR นี้เพิ่มขึ้นถึง steady state ที่เวลา 10-15 นาที หลังจากเริ่มการ infusion (รูปที่ 1) ทั้งนี้ที่ความเข้มข้นของ THA 1 ไมโครโมลต่อนาทีมีผลทำให้การไหลของน้ำดีเพิ่มขึ้นอย่างทันทีและ BFR คงที่ที่ 1.8 ± 0.1 ไมโครโมลต่อนาที ($n = 4$) เมื่อเทียบกับภาวะปกติที่ BFR เท่ากับ 1.0 ± 0.1 ไมโครโมลต่อนาทีต่อน้ำหนักของตับเป็นกรัม ที่ความเข้มข้นของ THA 2 ไมโครโมลต่อนาทีมีผลทำให้ BFR เพิ่มขึ้นถึงระดับสูงสุดที่ 2 ± 0.2 ไมโครโมลต่อนาทีต่อน้ำหนักตัวเป็นกรัม ขณะที่ THA ที่ความเข้มข้น 4 ไมโครโมลต่อนาทีไม่สามารถทำให้ BFR เพิ่มขึ้นได้อย่างต่อเนื่องส่วนค่า BFR ในสัตว์กลุ่มควบคุมนั้น ค่อยๆลดลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น ดังนั้น THA กระตุ้นให้การไหลของน้ำดีซึ่งแปรตามความเข้มข้นของ THA ที่เพิ่มขึ้นจนถึงระดับอิ่มตัวซึ่งไม่สามารถทำให้การไหลของน้ำดีเพิ่มขึ้นได้

2. ผลของ THA ที่มีต่อการหลั่งของกรคน้ำดีและ glutathione ในน้ำดี (GSH + GSSG)

ในการศึกษาบทบาทของ THA ที่มีต่อการหลั่งของน้ำดี กรคน้ำดี และ glutathione ใน isolated perfused liver พบว่าในกลุ่มควบคุม ความเข้มข้นของกรคน้ำดีมีค่าลดลงอย่างรวดเร็วและมีค่าต่ำสุดที่ 0.9 ± 0.2 มิลลิโมลาร์หลังจากทำการ infusion เป็นเวลา 30 ถึง 35 นาที (รูปที่ 2 A) สำหรับความเข้มข้นของกรคน้ำดีในกลุ่มที่ได้รับ THA พบว่ามีค่าลดลงตามเวลาซึ่งให้ผลที่คล้ายกับผลที่ได้จากกลุ่มควบคุม ความเข้มข้นของกรคน้ำดีลดลงอย่างมีนัยสำคัญจนถึง 0.4 ± 0.04 มิลลิโมลาร์ ($P < 0.05$) หลังจากที่ได้รับ THA 15 นาที (รูปที่ 2A) อย่างไรก็ตาม กรคน้ำดีทั้งหมดที่ออกมาในน้ำดี ไม่ได้แตกต่างไปจากกลุ่มควบคุม (รูปที่ 2B) สำหรับความเข้มข้นและ glutathione ทั้งหมดที่ถูกขับออกในน้ำดี (GSH + GSSG) ในกลุ่มที่ได้รับ THA นั้นพบว่ามีค่าลดลงในขณะที่ระดับ glutathione ในกลุ่มควบคุมอยู่ในระดับคงที่ตลอดการทดลอง (รูปที่ 2C และ 2D) ทั้งนี้ที่ความเข้มข้นของ THA 1 ไมโครโมลต่ออนาที มีผลให้ความเข้มข้นของ glutathione ทั้งหมดที่อยู่ในน้ำดีมีค่าลดลงคิดเป็น $67.3 \pm 5.1\%$ ของค่าที่ได้จากกลุ่มควบคุม ซึ่งเป็นค่าที่วัดก่อนที่ได้รับ THA เป็นเวลา 10 นาที เมื่อความเข้มข้นของ THA เพิ่มขึ้น ค่าความเข้มข้นของ glutathione ก็ลดลงอย่างต่อเนื่องตลอดการทดลอง (รูปที่ 2C) สำหรับอัตราการขับออกของ GSH ในน้ำดีนั้น มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญหลังจากที่ได้รับ THA ที่ความเข้มข้น 4 ไมโครโมลต่ออนาที ซึ่งค่าที่ได้คิดเป็น $45.0 \pm 8.9\%$ เทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 2D) อย่างไรก็ตามพบว่าในช่วง 5 นาทีแรกหลังจากได้รับ THA อัตราการขับออกของ glutathione มีค่าเพิ่มขึ้นคิดเป็น $130.2 \pm 4.8\%$ ของกลุ่มควบคุม ในขณะที่ค่าความเข้มข้นของ GSH ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งผลที่ได้จากการทดลองนี้เหมือนเป็น “washout” phenomenon

3. บทบาทของ THA ต่อการขับออกของสาร BSP

Multidrug resistance-associated protein 2 (Mrp2) มีบทบาทสำคัญต่อการขนส่งเพื่อ การขับออกของ metabolite ที่เป็น glucuronide sulfate, glutathione S-conjugation และการขับออกของ GSH (7) โปรตีน Mrp2 อาจเป็นตัวการสำคัญที่รับผิดชอบการขนส่งของ THA เพราะว่า THA สามารถขัดขวางการขับออกของ GSH ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงศึกษาผลของ THA ที่มีต่อการขับออกของ BSP และ DBSP ซึ่งสาร 2 ชนิดนี้เป็น substrates ที่ดีของโปรตีนขนส่ง Mrp2 ซึ่งอยู่ที่ผิวของ canalicular membrane ทั้งนี้เมื่อ infusion BSP ด้วยอัตรา 0.04 ไมโครโมลต่ออนาทีพบว่า BFR ไม่เปลี่ยนแปลงและ

คงที่อยู่ระดับ 1 ไมโครลิตรต่อนาทีที่ต่อน้ำหนักตัวดังแสดงในรูปที่ 3 ในทางตรงกันข้ามการ infusion ด้วย THA ที่อัตรา 40 ไมโครโมลต่อนาที มีผลให้ BFR เพิ่มขึ้นอย่างทันทีถึง 2 เท่า ภายใน 5 นาทีแรกของการ infusion หลังจากนั้นจึงค่อยๆลดลงอย่างต่อเนื่องเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น(รูปที่ 3A) ในระหว่างที่ BFR เพิ่มขึ้นค่าความเข้มข้นและอัตราการขับออกของ BSP ในน้ำดีลดลง (รูปที่ 3B และ 3C) ซึ่งความเข้มข้นของ BSP ในน้ำดีลดลงอย่างมีนัยสำคัญจาก 4.8 ± 0.2 มิลลิโมลาร์เป็น 2.6 ± 0.6 มิลลิโมลาร์หลังจาก infusion ด้วย THA 10 นาที ผลที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่า THA อาจแย่งกับ BSP ในการที่จะถูกขับออกมาสู่น้ำดี การเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยของ BSP ที่ถูกขับออกมาในช่วง 10 นาทีแรก และการลดลงของ BSP ที่ถูกขับออกมาในน้ำดี หลังจากหยุดการให้สาร THA เป็นเวลา 10 นาที เกิดจากกั๊งค้างของ BSP ใน bile canaliculi และ biliary tree ที่เป็นผลจากการเพิ่มขึ้นและการลดลงของการไหลของน้ำดี ซึ่งเรียกปรากฏการณ์นี้ว่า washout phenomenon (รูปที่ 3C)

4. ผลของ THA ที่มีต่อการขับออกของ DBSP ในน้ำดี

เนื่องจาก BSP ถูก conjugated กับ glutathione ซึ่งเป็น 2 non-metabolizable analogue ของ BSP ที่พร้อมจะถูกขับออกมาสู่น้ำดีและไม่จำเป็นต้องผ่านการ conjugation เหมือนกับ BSP (5, 9, 14) ดังนั้นการวิจัยนี้จึงทดสอบผลของ THA ที่มีต่อการขับออกของ DBSP ผลการทดสอบพบว่า การ fusion ด้วย DBSP ไม่ทำให้ BFR เปลี่ยนแปลง ส่วนการ infusion ด้วย THA ซึ่งทำไปพร้อมกันกับการ infusion ด้วย DBSP พบว่า BFR เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจาก 0.9 ± 0.1 เป็น 1.4 ± 0.2 ไมโครลิตรต่อนาทีที่ต่อน้ำหนักของตัวเป็นกรัม อย่างไรก็ตาม การเพิ่มขึ้นของการหลั่งน้ำดี (BFR) ไม่มีความแตกต่างทางสถิติจากกลุ่มควบคุมและมีค่าลดลงตามเวลาของการทดลอง นอกจากนี้ยังพบว่า THA ทำให้ความเข้มข้นและปริมาณการขับออกของ DBSP ในน้ำดีลดลงอย่างทันที (รูปที่ 4B และ 4C) ทั้งนี้เป็นที่น่าสังเกตว่าฤทธิ์การยับยั้งของ THA ที่มีต่อการขับ DBSP ในน้ำดีเกิดขึ้นเร็วกว่าและมีผลชัดเจนกว่าการขับออกของ BSP ในน้ำดี ดังนั้นผลการศึกษานี้จึงชี้ให้เห็นว่า THA มีฤทธิ์ยับยั้งการขับทิ้งในน้ำดี (bile excretory phase) มากกว่ายับยั้งการ form metabolite ที่เป็น intracellular step of phase II conjugation ของ BSP

5. ผลของ THA ที่มีต่อ immunofluorescent localization ของ Mrp2, Bsep และ ZO-1 ในตับ

เนื่องจากการได้รับ THA ทำให้อัตราการหลั่งของน้ำดีจากตับเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วถึงแม้จะเพิ่มเพียงชั่วคราวเท่านั้น ดังนั้นฤทธิ์การกระตุ้นระยะสั้นของ THA อาจเกิดจากการกระตุ้นการเคลื่อนที่ของ

vesicles ที่บรรจุ canalicular transport proteins ได้ผิว ทั้งนี้สมมติฐานดังกล่าวได้ถูกพิสูจน์โดยการตรวจสอบ localization ของโปรตีน Bsep และโปรตีน Mrp2 โดยใช้ fluorescent confocal microscopy ซึ่งผลการศึกษาในรูปที่ 5 แสดงให้เห็นว่าโปรตีน Bsep และ Mrp2 ในกลุ่มที่ได้รับ THA มีตำแหน่งอยู่ที่ canalicular membrane เช่นเดียวกับในกลุ่มที่ควบคุม การแสดงออกที่ผิวเซลล์และตำแหน่งที่อยู่ของโปรตีนทั้งสองชนิดนี้ไม่เปลี่ยนแปลงจากกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ยังพบว่าตำแหน่งที่อยู่ของ tight junction protein (ZO-1) ไม่มีการเปลี่ยนแปลงหลังจากที่ได้รับ THA ทั้งที่ความเข้มข้นต่ำและสูง (1 และ 8 ไมโครโมลต่อนาที) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับ THA (รูปที่ 6)

6. ผลของ THA ต่ออัตราการไหลของน้ำดีในหนู TR^{-}

เนื่องจากเมื่อ THA เข้าสู่ตับจะถูกเปลี่ยนเป็น metabolite ที่อาจจะเป็นตัวให้ osmotic force ทำให้เกิดน้ำดี และ metabolite ดังกล่าวถูกขับออกจากโปรตีนขนส่ง Mrp2 การวิจัยนี้จึงทำการศึกษาผลของ THA ที่มีต่อการหลั่งน้ำดีในหนู TR^{-} ซึ่งไม่มีโปรตีนขนส่ง Mrp2 (13) เพื่อดูว่า THA สามารถถูกขนส่งผ่านโปรตีนขนส่ง Mrp2 และโปรตีนขนส่งนี้มีความสำคัญต่อ choleretic activity ของ THA หรือไม่ ผลการทดสอบแสดงไว้ในรูปที่ 7 ซึ่งพบว่า THA ที่ปริมาณ 125 และ 250 ไมโครโมลต่อน้ำหนักตัวเป็นกิโลกรัมไม่สามารถกระตุ้นการหลั่งน้ำดี และค่า choleretic activity ของ THA ไม่เปลี่ยนแปลงจากค่าปกติ ในขณะที่ในหนูปกติที่ได้รับ THA ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลต่อน้ำหนักตัวเป็นกิโลกรัม มีค่า BFR เพิ่มขึ้นเป็น $197.3 \pm 13.4\%$ ของกลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับ THA ผลที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่า Mrp2 มีความจำเป็นต่อฤทธิ์การกระตุ้นน้ำดีของ THA

7. ผลของ THA ที่มีต่อภาวะน้ำดีคั่งที่เกิดจากได้รับ estradiol-17 β -D-glucuronide (E_2 -17G)

การที่จะศึกษาศักยภาพของ THA ว่าสามารถบรรเทาการคั่งของน้ำดี ซึ่งเกิดจาก E_2 -17G ได้หรือไม่ เริ่มต้นจากการให้เกลือน้ำดี Taurocholate (TC) ที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลต่อนาทีผ่านเข้าสู่ IPRL ตลอดทั้งการทดลองเพื่อเป็นการเพิ่ม endogenous bile acid ผลที่ได้พบว่า TC สามารถเพิ่ม BFR ได้อย่างมีนัยสำคัญโดยเพิ่มถึง 190% ของ BFR เริ่มต้น ($P < 0.05$) ดังแสดงไว้ในรูปที่ 8 เมื่อทำการฉีด E_2 -17G เข้าตับพบว่าค่า BFR ลดลงอย่างรวดเร็วเหลือ $52.6 \pm 15.5\%$ ของค่า BFR เริ่มต้น ซึ่งค่าที่ต่ำสุดของ BFR วัดได้หลังจากได้รับ E_2 -17G 10 นาที หลังจากนั้นค่า BFR กลับสู่ระดับเดิมที่ถูกกระตุ้นโดย TC อย่างไรก็ตามการทำ infusion ด้วย THA สามารถบรรเทาภาวะน้ำดีคั่งที่เกิดจาก E_2 -17G ซึ่งสารนี้ทำให้

ความเข้มข้นและปริมาณการขับออกของกรดน้ำดีลดลงอย่างรวดเร็ว (รูปที่ 9A และ 9B) จนกระทั่งถึงระดับต่ำสุดที่เวลา 10-15 นาที THA ซึ่งมีผลกระตุ้นการหลั่งน้ำดีจะทำให้ความเข้มข้น ของกรดน้ำดีลดลงแต่ปริมาณน้ำดีที่ออกมาทั้งหมดไม่แตกต่างเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ E_2-17G อย่างเดียว ($P<0.05$) (รูปที่ 9A) นอกจากนี้พบว่า THA ทำให้ความเข้มข้นของ glutathione อิสระในน้ำดีลดลงอย่างมากจาก $103.0\pm6.3\%$ เป็น $27.5\pm7\%$ ของค่าที่วัดได้ก่อนได้รับ E_2-17G ความเข้มข้นที่ลดลงนี้ส่งผลทำให้การขับออกของ glutathione ทั้งหมดในน้ำดีลดลง ซึ่งลดลงถึง $9.4\pm3.1\%$ ของค่าที่วัดได้ก่อนได้รับ E_2-17G ซึ่งค่าที่ได้นี้แตกต่างจากค่าที่วัดได้ก่อนได้รับทั้ง THA และ E_2-17G ซึ่งคิดเป็น $39.3\pm5.8\%$ ของค่าที่วัดได้ก่อนได้รับ E_2-17G ($P<0.05$) (รูปที่ 9D) ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า THA อาจเกิด form metabolite ที่ conjugate กับ GSH ทำให้ค่า GSH อิสระในน้ำดีลดลงอย่างมาก

ผลวิจารณ์

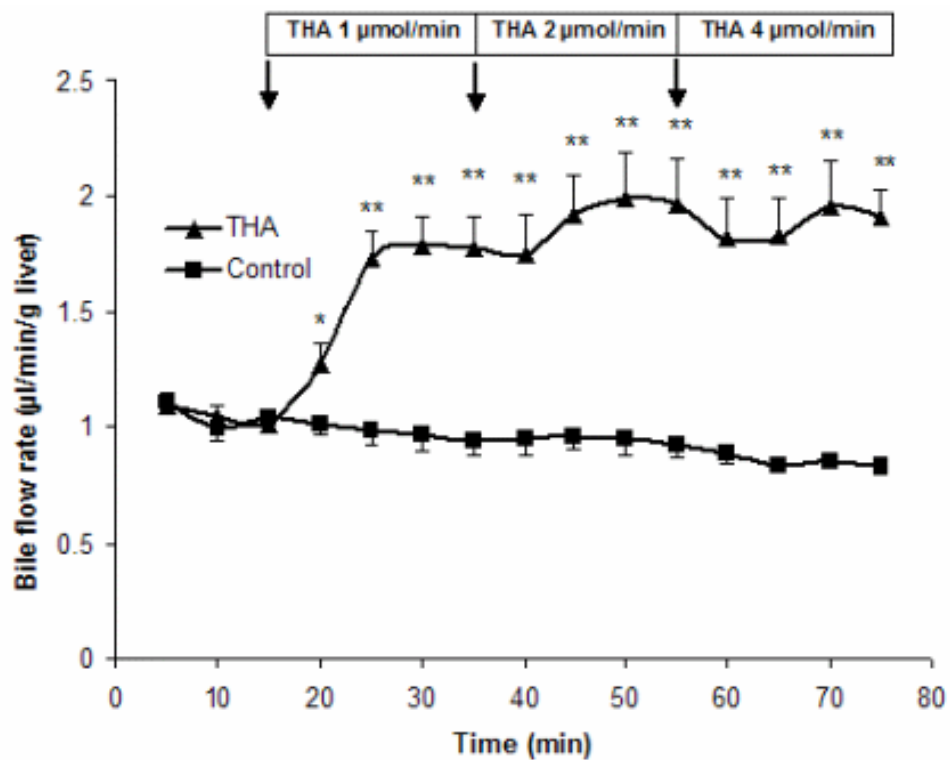
งานวิจัยนี้แสดงถึงบทบาทของ THA ในระดับเซลล์ต่อการกระตุ้นการหลั่งน้ำดีและสามารถติดตามกลไกที่ THA ทำงานที่มีผลต่อการขับน้ำดี ประการแรกพบว่า THA มีผลโดยตรงต่อการกระตุ้นการหลั่งน้ำดีและออกฤทธิ์อย่างรวดเร็วซึ่งฤทธิ์ดังกล่าวมีขีดจำกัดจะมีค่าคงที่เมื่อเพิ่ม THA ให้สูงขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นผลจาก a carrier mediated transport maximum (รูปที่ 1) ประการที่สอง ในแบบจำลองนี้ THA ไม่มีผลต่อการขับกรดน้ำดี ดังนั้นแสดงว่า THA มีผลต่อ BAIF (bile salt independent fraction) ประการที่สามพบว่า THA ยับยั้งการขับ BSP และ DBSP ซึ่งสารทั้งสองเป็น substrates ของ multidrug resistance-associated protein 2 (Mrp2) ผลทั้งหมดที่กล่าวข้างต้นนี้ ชี้ให้เห็นว่าผลการขับน้ำดีที่เกิดจาก THA เป็นผลมาจากการขับออกของ osmotically active solutes ผ่าน Mrp2 ประการสุดท้ายพบว่า THA ไม่สามารถออกฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดีในหนู TR ซึ่งไม่โปรตีน Mrp2 ผลที่ได้นี้ชี้ให้เห็นว่า bile canalicular system หรือ Mrp2 จำเป็นต่อการไหลของน้ำดีแบบที่ไม่ขึ้นตรงต่อกรดน้ำดี นอกจากนี้ยังพบว่า THA ไม่มีผลต่อ subcellular localization ของโปรตีนขนส่งหรือไม่มีผลต่อการไปแสดงออกของโปรตีนขนส่งจากภายในเซลล์ไปสู่ผิวเซลล์ด้านบน ผลที่ได้นี้ชี้ให้เห็นว่า THA ไม่มีบทบาทใน post-transcriptional modification ของ Mrp2

การวิจัยก่อนหน้านี้ใน bile fistula rat พบว่า THA มีผลทำให้เพิ่มทั้ง BAIF และ BADF (23, 26) อย่างไรก็ตามกลไกที่ THA เพิ่ม BAIF และ BADF ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่า THA มีผลโดยตรงต่อบริเวณที่มีผลทางอื่นผ่านทาง signaling molecules ที่มาจาก intestine การวิจัยครั้งนี้ชี้ให้เห็นอย่างชัดเจนว่า

THA มีผลโดยตรงต่อดับ นอกจากนี้ยังพบว่า THA สามารถเพิ่ม BFR โดยปราศจากการกระตุ้นการหลั่งของกรดน้ำดีหรือ glutathione เข้าสู่น้ำดี การที่ THA ไม่มีผลต่อการขับออกของน้ำดีที่ศึกษาได้จากการวิจัยครั้งนี้แตกต่างจากผลที่ได้จากการวิจัยก่อนหน้านี้ที่ทำใน bile fistula rat ซึ่งพบว่า THA เพิ่มการขับกรดน้ำดีและลด cholesterol ในเลือด (23, 26) ความแตกต่างนี้อาจเนื่องมาจากการขาดกรดน้ำดีของ isolated perfused rat liver เมื่อเวลาเพิ่มขึ้น และเนื่องจาก washout phenomenon ของกรดน้ำดีใน intact animal

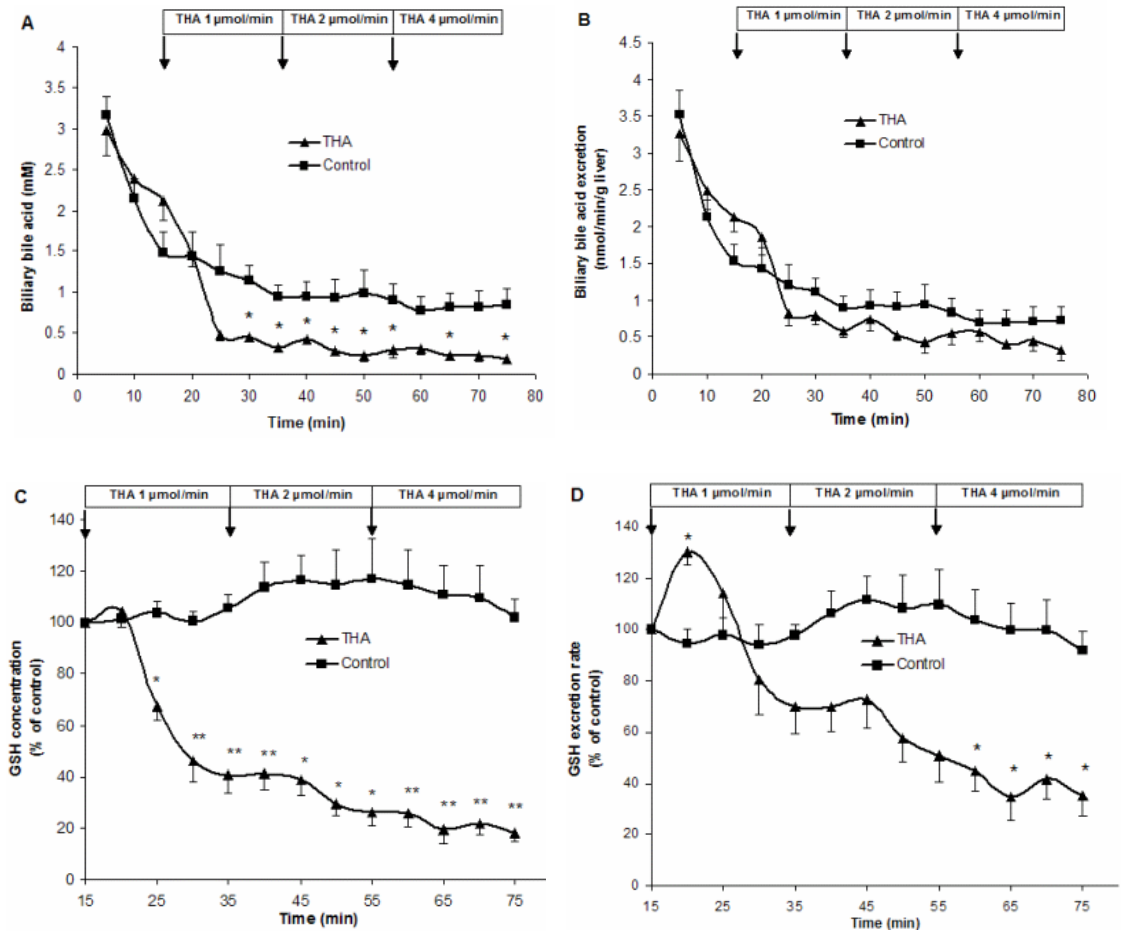
เนื่องจาก THA ไม่ได้กระตุ้นการขับกรดน้ำดี และ glutathione ดังนั้นกลไกที่ THA เพิ่ม BFR เกิดจากการขับออกของ astrocytically active solutes ของ biotransformed THA ซึ่งก็คือ two glucuronide metabolites ของ THA (Khamdang et al, unpublished observation) ผลที่ได้นี้เหมือนกับผลจากการวิจัยก่อนหน้านี้ซึ่ง glucuronide conjugation ของ phloracetophenone เป็น major biliary metabolite (11, 16) Mrp2 มีบทบาทสำคัญต่อการขับสารประกอบภายนอก และภายในที่ประกอบด้วย glucuronide, glutathione และ sulfates conjugates เข้าสู่น้ำดี (7) และมีบทบาทสำคัญต่อการขับ metabolite ของ THA

ข้อสรุปที่ได้จากการวิจัยนี้พบว่า THA การกระตุ้นการไหลของน้ำดีได้จากการขับออกของ osmotically active solute เข้าสู่น้ำดีโดยผ่านทางโปรตีนขนส่ง Mrp2 บทบาทในการขับน้ำดีของ THA ไม่ได้เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลง distribution และ localization canalicular transporters ของ Mrp2 ของ Bsep หรือของ tight junction protein ZO-1 ทั้งนี้บทบาทในการขับน้ำดีของ THA เกี่ยวกับการที่ THA แย่งกับ substrates ของ Mrp2 เพื่อที่จะถูกขับออกมาในน้ำดี THA อาจมีศักยภาพในการนำไปพัฒนาให้เป็น anti-cholestatic therapeutic agent



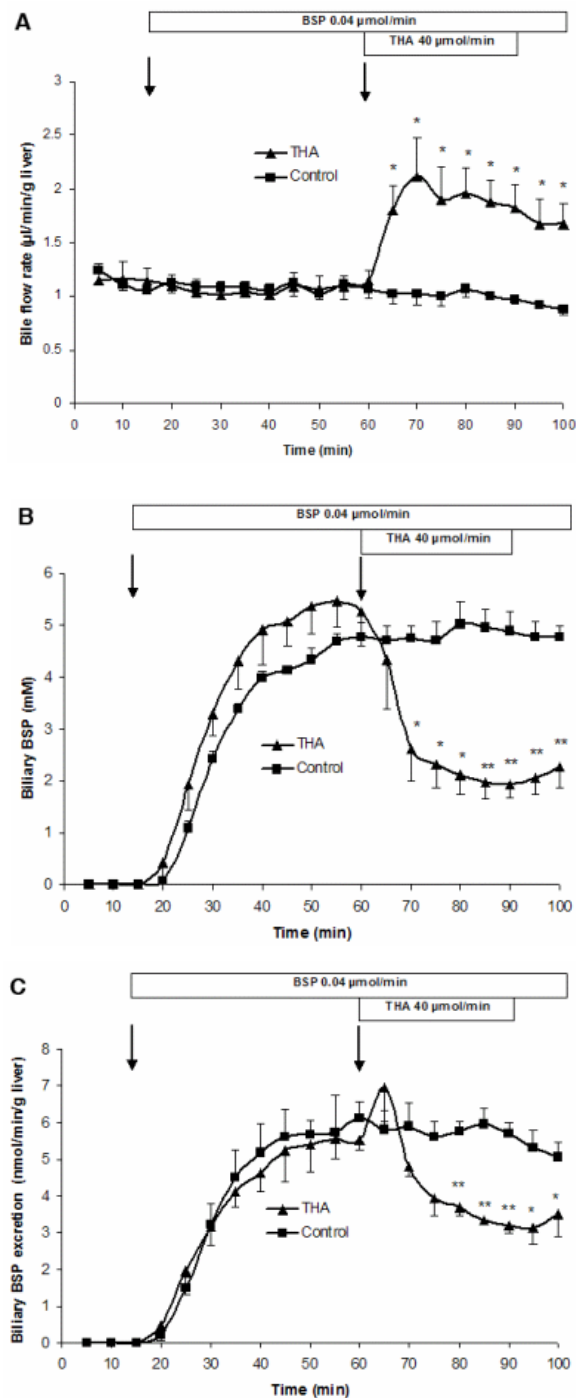
รูปที่ 4.1 แสดงผลของ THA ต่ออัตราการไหลของน้ำดีใน isolated perfused rat liver การทดสอบ

เริ่มต้นจากการทำ step-wise infusion ด้วย THA ที่ความเข้มข้น 1 2 และ 4 ไมโครโมลต่อนาที ทั้งนี้แต่ละความเข้มข้นใช้เวลา 20 นาที ผลการทดสอบแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E.M ที่มาจากสัตว์ทดลองสี่ตัว * $p < 0.05$ และ ** $p < 0.01$ แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ จากกลุ่มควบคุม

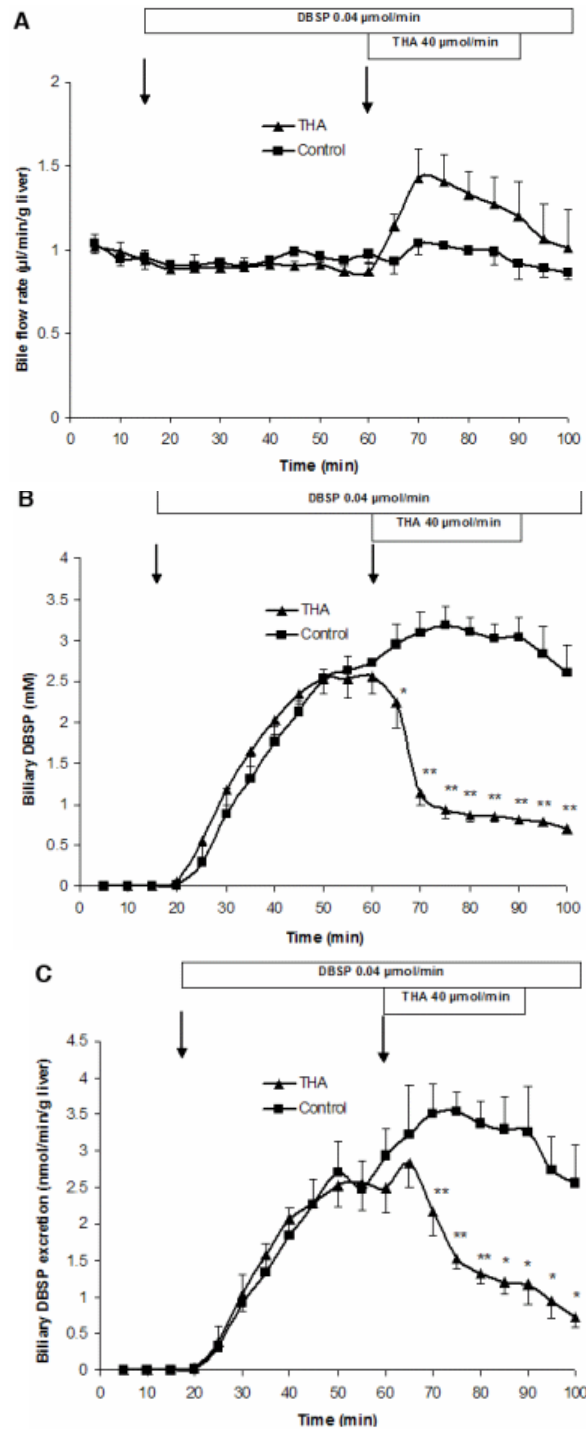


รูปที่ 4.2 แสดงผลของ THA ที่มีต่อความเข้มข้นของกรดน้ำดี (A) อัตราการขับกรดน้ำดี(B) ความเข้มข้น(C)

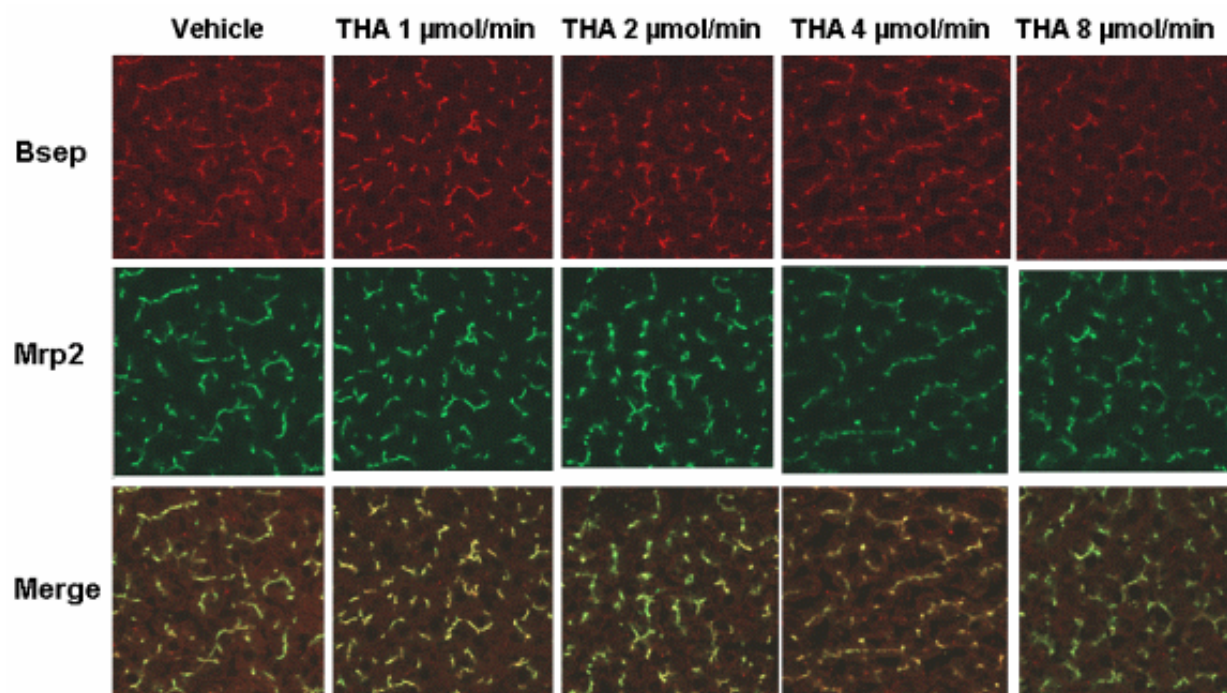
และอัตราการขบออกของ glutathione อิสระทั้งหมดในน้ำดี (GSH+GSSH) (D) ใน isolated perfused rat liver ทั้งนี้การทดสอบเริ่มจากการทำ step-wise fusion ด้วย THA ที่ความเข้มข้น 1 2 และ 4 ไมโครโมลต่อนาที โดยใช้เวลา 20 นาทีสำหรับแต่ละความเข้มข้น ผลการทดสอบแสดงเป็น ค่าเฉลี่ย±SEM ที่มาจากสัตว์ทดลองสี่ตัว * $p < 0.05$ และ ** $p < 0.01$ แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ จากกลุ่มควบคุม



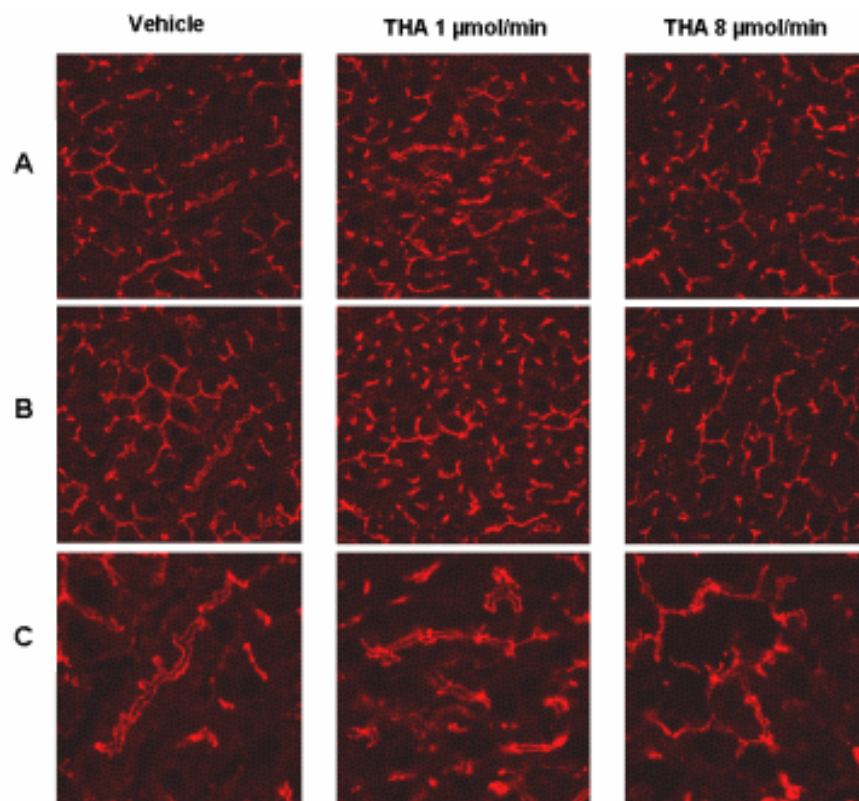
รูปที่ 4.3 แสดงผลของ THA ที่มีต่ออัตราการไหลของน้ำดี(A) ความเข้มข้นของ biliary sulfobromophthalein (BSP) ใน น้ำดี(B) และอัตราการขับออกของ BSP(C) ใน isolated perfused rat liver ทั้งนี้ได้รับ BSP ที่ความเข้มข้น 0.04 ไมโครโมลต่อนาทีตลอดทั้งการทดลองและในขณะเดียวกันที่เวลา 60 นาทีนั้นจากการเริ่มการทดลอง ได้รับ THA ที่ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลต่อนาที ผลการทดสอบแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ SEM ที่มาจากสัตว์ทดลองสัตว์ * $p < 0.05$ และ ** $p < 0.01$ แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุม



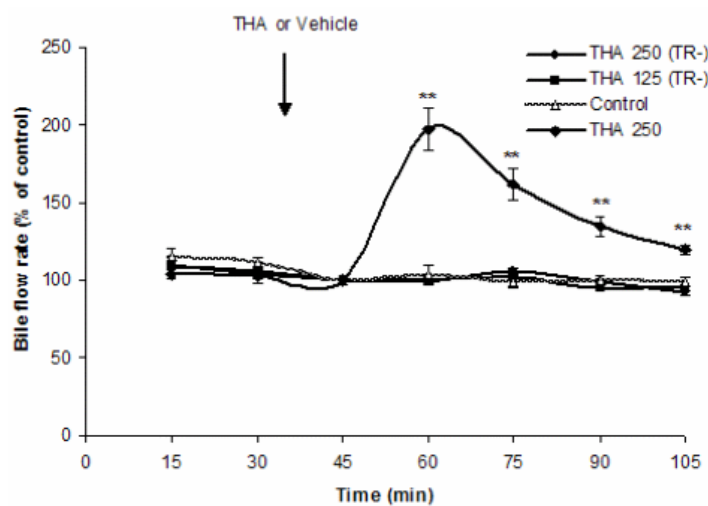
รูปที่ 4.4. แสดงผลของ THA ที่มีต่ออัตราการไหลของน้ำดี(A) ความเข้มข้นของ biliary dibromosulfobromophthalein (DBSP)(B) และอัตราการขับออกของ DBSP(C) ใน isolated perfused rat liver ทั้งนี้ได้รับ DBSP ที่ความเข้มข้น 0.04 ไมโครโมลต่อนาทีตลอดทั้งการทดลอง และในขณะเดียวกันที่เวลา 60 นาทีนับจากเริ่มการทดลอง ตับได้รับ THA ที่ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลต่อนาที ผลการทดสอบแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ SEMที่มาจากสัตว์ทดลองสัตว์ * $p < 0.05$ และ** $p < 0.01$ แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุม



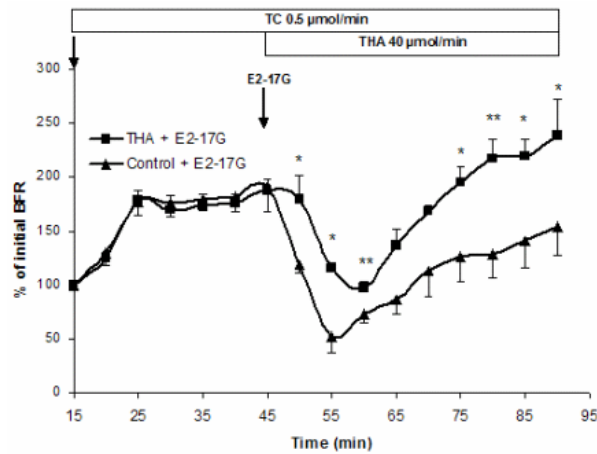
รูปที่ 4.5 แสดงผลของTHA immunofluorescent localization Bile salt export (Bsep)และmultispecific resistance-associated protein 2 (Mrp2)ในตับที่ได้รับ VehicleหรือTHAที่ความเข้มข้น1 2 และ8ไมโครโมลต่อ นาทีเป็นเวลา25นาที สีแดงแสดงถึง Fluorescent signal ของBsep สีเขียวแสดงถึง Fluorescent signal ของMrp2



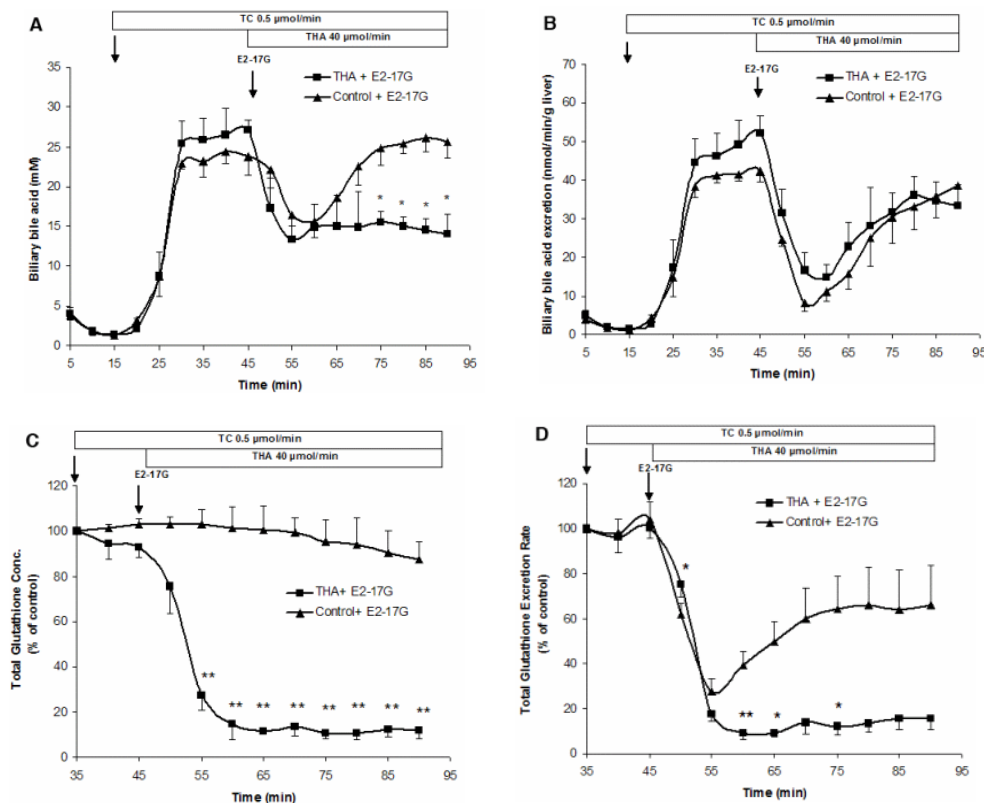
รูปที่ 4.6. แสดงผลของTHA ที่มีต่อ immunofluorescent localization ของ Zonula Occluden1 protein (ZO-1) ในตับที่ได้รับ Vehicle หรือ THA (1 และ 8 ไมโครโมลต่อนาที) ภาพA และB ถ่ายด้วยกำลังขยายที่เท่ากันแต่ภาพ C ถ่ายด้วยกำลังขยายที่มากกว่า



รูปที่ 4. 7 แสดงผลของTHAที่มีต่ออัตราการไหลของน้ำดีในหนูที่ไม่มี Mrp2 (TR- rat)และหนูที่ปกติที่ได้รับTHA ฉีดเข้าช่องท้องด้วยความเข้มข้น 125และ250 ไมโครโมลต่อน้ำหนักตัวเป็นกิโลกรัมเป็นเวลา 45 นาที ผลการทดสอบแสดงเป็นค่าเฉลี่ย±SEMที่มาจากสัตว์ทดลองสี่ตัว *p<0.05และ**p<0.01 แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุม



รูปที่ 4.8 แสดงผลของTHAที่มีต่อภาวะน้ำดีคั่งที่เกิดมาจากE₂-17G ทั้งนี้ได้รับTaurocholateที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลต่อนาทีตลอดการทดสอบ เพื่อชดเชยกรดน้ำดีภายในร่างกาย ดับได้รับ E₂-17G ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลต่อน้ำหนักตัวเป็นกรัมก่อนที่จะได้รับTHAด้วยอัตรา 40 ไมโครโมลต่อนาทีตั้งแต่วันที่ 45 ถึงนาทีที่ 90 ผลการทดสอบแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ SEM ที่มาจากสัตว์ทดลองสี่ตัว * $p < 0.05$ และ ** $p < 0.01$ แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่ม ควบคุม



รูปที่ 4.9 แสดงผลของTHAที่มีต่อความเข้มข้นของกรดน้ำดี(A) อัตราการขับกรดน้ำดี(B) ความเข้มข้น(C) และอัตราการขับ glutathione อิสระทั้งหมด (GSH+GSSH) (D) ในภาวะน้ำดีคั่งที่เกิดจากE₂-17G ทั้งนี้ได้รับ Taurocholate ที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลต่อนาทีตลอดการทดสอบ เพื่อชดเชย กรดน้ำดีภายในร่างกาย ดับได้รับ E₂-17G ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลต่อน้ำหนักตัวเป็นกรัม ก่อนที่จะได้รับTHAด้วยอัตรา 40 ไมโครโมลต่อนาทีตั้งแต่วันที่ 45 ถึงนาทีที่ 90 ผลการทดสอบ แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ SEM ที่มาจากสัตว์ทดลองสี่ตัว * $p < 0.05$ และ ** $p < 0.01$ แสดงถึงความแตกต่าง อย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่ม ควบคุม

Reference:

1. **Accatino L, Pizarro M, Solis N, Koenig C.** Effects of diosgenin, a plant-derived steroid, on bile secretion and hepatocellular cholestasis induced by estrogens in the rat. *Hepatology* 28: 129-140, 1998.
2. **Ballatori N and Truong AT.** Relation between biliary glutathione excretion and bile acid-independent bile flow. *Am J Physiol* 256: G22-30, 1989.
3. **Berenson MM, Marin JJG, Gunther C.** Effect of bile acid hydroxylation on biliary protoporphyrin excretion in rat liver. *Am J Physiol* 255: G382-G388, 1988.
4. **Boyer JL.** Milestones in liver disease: a commentary. *J Hepatol* 36: 4-7, 2002.
5. **Combes B and Stakelum GS.** Conjugation of sulfobromophthalein sodium with glutathione linkage by the rat. *J Clin Invest* 39: 1214-1222, 1960.
6. **Corasanti JG, Smith ND, Gordon ER, Boyer JL.** Protein kinase C agonists inhibit bile secretion independently of effects on the microcirculation in the isolated perfused rat liver. *Hepatology* 10: 8-13, 1989.
7. **Gerk PM and Vore M.** Regulation of expression of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) and its role in drug disposition. *J Pharmacol Exp Ther* 302: 407-415, 2002.
8. **Griffith OW.** Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem* 106: 207-212, 1980.
9. **Grodsky GM, Carbone JV, Fanska R.** Biosynthesis of bromophthalein mercaptide with glutathione. *Proc Soc Exp Biol Med* 106: 526-530, 1961.
10. **Gumucio JJ, Accatino L, Macho AM, Contreras A.** Effect of Phenobarbital on the ethynyl estradiol-induced cholestasis in the rat. *Gastroenterology* 65: 651-657, 1973.
11. **Haley TJ and Bassin M.** Metabolism and urinary excretion of several flavonoid compounds. *Proc Soc Exp Biol Med* 81: 298-300, 1952.
12. **Huang L, Smit JW, Meijer DKF, Vore M.** Mrp2 is essential for estradiol-17 β (β -D-glucuronide)-induced cholestasis in rats. *Hepatology* 32: 66-72, 2000.
13. **Jansen PLM, Groothuis GMM, Peters WHM, Meijer DKF.** Selective hepatobiliary transport defect for organic anions and neutral steroids in mutants rats with hereditary-conjugated hyperbilirubinemia. *Hepatology* 7: 71-76, 1987.

14. **Javitt NB.** Phenol 3,6-dibromophthalein disulfonate, a new compound for the study of liver disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 117: 254-257, 1964.
15. **Kubitz R, Helmer A, Haussinger D.** Biliary transport system: short-term regulation. *Methods Enzymol* 400: 252-257, 2005.
16. **Mahagita C, Tanphichai K, Suksamrarn A, Ballatori N, and Piyachaturawat P.** 4-Hydroxyacetophenone-induced choleresis in rats is mediated by the Mrp2-dependent biliary secretion of its glucuronide conjugate. *Pharmaceutical Res.* 23:2602-2610, 2006
17. **Mashige F, Osuga T, Tanaka N, Yamanaka M.** Continuous-flow determination of bile acids in serum and its clinical application. *Clin Chem* 24: 1150, 1978.
18. **Meyers M, Slikker W, Pascoe G, Vore M.** Characterization of cholestasis induced by estradiol-17 β -D-glucuronide in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 214: 87-93, 1980.
19. **Meyers M, Slikker W, Vore M.** Steroid D-ring glucuronide: characterization of a new class of cholestatic agents in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 218: 63-73, 1981.
20. **Nathanson HM and Boyer JL.** Mechanisms and regulation of bile secretion. *Hepatology* 14: 551-566, 1991.
21. **Ookhtens M and Kaplowitz N.** The use of isolated perfused liver in studies of biological transport processes. *Methods Enzymol* 192: 485-495, 1990.
22. **Palmer KR, Gurantz D, Hofmann AF, Clayton LM, Hagey LR, Cecchetti S.** Hypercholeresis induced by norchenodeoxycholate in biliary fistula rodent. *Am J Physiol* 253: G219-G228, 1987.
23. **Piyachaturawat P, Chaingam N, Chuncharunee A, Komaratat P, Suksamrarn A.** Choloretic activity of phloracetophenone in rats: structure-function studies using acetophenone analogues. *Eur J Pharmacol* 387: 221-227, 2000.
24. **Piyachaturawat P, Gansar R, Suksamrarn A.** Choloretic effect of *Curcuma comosa* rhizome extracts in rats. *Int J Pharmacogn* 34: 174-187, 1996.
25. **Piyachaturawat P, Suwanampai P, Komaratat P, Chuncharunee A, Suksamrarn A.** Effect of phloracetophenone on bile flow and biliary lipids in rats. *Hepatol Res* 12: 198-206, 1998.
26. **Piyachaturawat P, Srivoraphan P, Chuncharunee A, Komaratat P, Suksamrarn, A.** Cholesterol lowering effects of a choloretic phloracetophenone in hypercholesterolemic hamsters. *Eur J Pharmacol.* 439: 141-7, 2002.

27. **Piyachaturawat P, Tubtim C, Chuncharunee A, Komaratat P, Suksamrarn A.** Evaluation of the acute and subacute toxicity of a choleric phloracetophenone in experimental animals. *Toxicol Let* 129: 123-132, 2002.
28. **Powell DW.** Barrier function of epithelia. *Am J Physiol* 241: G275-G288, 1981.
29. **Pozzi EJS, Crocenzi FA, Pellegrino JM, Catania VA, Luquita MG, Roma MG, Garay EAR, Mottino AD.** Ursodeoxycholate reduces ethinylestradiol glucuronidation in the rat: Role in prevention of estrogen-induced cholestasis. *J Pharmacol Exp Ther* 306: 279-286, 2003.
30. **Roma MG, Marinelli RA, Crocenzi FA, Rodriguez GEA.** Effect of cholephilic dyes on hepatic tight junctional permeability in the rat. *Biochem Pharmacol* 50, 1079-1086, 1995.
31. **Shoda J, Muira T, Utsunomiya H, Oda K, Yamamoto M, Kano M, Ikegami T, Tanaka N, Akita H, Ito K, Suzuki H, Sugiyama Y.** Genipin enhances Mrp2 (Abcc2) –mediated bile formation and organic transport in rat liver. *Hepatology* 39: 167-178, 2004.
32. **Takeda S, Endo T, Aburada M.** Pharmacological studies on iridoid compounds. III. The choleric mechanism of iridoid compounds. *J Pharm Dyn* 4: 612-623, 1981.
33. **Tietze F.** Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Application to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* 27: 502-522, 1969.
34. **Toyota N, Miyai K, Hardison WGM.** Effect of biliary pressure versus high bile acid flux on the permeability of heterocellular tight junction. *Lab Invest* 50: 536-542, 1984.
35. **Tradtrantip L, Boyer JL, Suksamrarn A, Piyachaturawat P.** Differential effects of hydroxyacetophenone analogues on the transcytotic vesicular pathway in rat liver. *Eur J Pharmacol* 547: 152-159, 2006.
36. **Trauner M and Boyer JL.** Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev* 83: 33-671, 2003.
-

ตอนที่ 5.

การศึกษากลไกการทำงานของ THA ในการลดไขมันในเลือดว่าเกี่ยวข้องกับการขัดขวาง การขนส่งกรดน้ำดีที่ลำไส้เล็กหรือไม่ (ตีพิมพ์ใน Life Science 78:1630-1636, 2006)

บทคัดย่อ

ได้ทำการศึกษาบทบาทและกลไกของสาร THA ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งกรดน้ำดี และลดไขมันในเลือดได้ โดยศึกษาหากลไกการทำงานของ THA ที่ออกฤทธิ์ลดไขมันในเลือดว่าเกี่ยวข้องกับการขัดขวางการขนส่งกรดน้ำดีที่ลำไส้เล็กหรือไม่ ได้ใช้สาร HAs ที่มีฤทธิ์ลดไขมันในเลือด 2 ตัวมาศึกษา ได้แก่ สาร THA และ 2,6-DHA ต่อการดูดซึมกรดน้ำดีในลำไส้เล็กส่วนปลายในหนูแรท พบว่าสาร THA ที่ความเข้มข้น 0.5 mM สามารถยับยั้งการขนส่งกรดน้ำดี taurocholate ผ่านเข้าสู่ถุงของ brush border membrane ของลำไส้เล็กส่วนปลายได้ประมาณร้อยละ 50 โดยการยับยั้งเป็นแบบแข่งขันกับกรดน้ำดี (competitive) ขณะที่ DHA มีฤทธิ์ดีกว่าสามารถยับยั้งการขนส่งของกรดน้ำดีได้อย่างสมบูรณ์ โดยความเข้มข้นที่ทำให้การยับยั้งได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) เท่ากับ 1.58 mM และเป็นการยับยั้งแบบไม่แข่งขันกับกรดน้ำดี (non-competitive) มีค่า K_i เท่ากับ 7.65 mM นอกจากนี้สาร THA และ DHA ยังยับยั้งการทำงานของ $Na^+-K^+-ATPase$ ใน basolateral membrane ของลำไส้เล็กส่วนปลายได้ด้วย โดยการยับยั้งเป็นแบบ uncompetitive และเพื่อเป็นการยืนยันฤทธิ์ดังกล่าวได้ป้อนสาร THA และ DHA ในขนาด 400 $\mu\text{mol/kg}$ วันละ 2 ครั้ง ให้แก่หนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีโคเลสเตอรอลสูงด้วยอาหารไขมันสูง ร่วมกับการให้กรดน้ำดีเป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าสาร THA และ DHA สามารถลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือดคิดเป็นร้อยละ 60.4 และ 58.9 ของหนูกลุ่มควบคุมได้ นอกจากนี้ยังพบว่าสาร THA มีผลทำให้การขนส่งกรดน้ำดีในลำไส้เล็กส่วนปลายลดลง ขณะที่ระดับการทำงานของ $Na^+-K^+-ATPase$ ไม่เปลี่ยนแปลง เนื่องจากการออกฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งกรดน้ำดีเข้าสู่ลำไส้ดังกล่าวต้องใช้ความเข้มข้นสูง ซึ่งสามารถไปลดการทำงานของ enzyme อื่นในลำไส้เล็กได้ด้วย จึงสรุปได้ว่าฤทธิ์ของสาร THA และ DHA ในการการยับยั้งการขนส่งกรดน้ำดีผ่าน brush border membrane และลดการทำงานของ $Na^+-K^+-ATPase$ ที่ basolateral membrane ไม่ใช่กลไกหลัก หากเป็นส่วนหนึ่งของกลไกที่จะทำงานร่วมกับฤทธิ์อื่นๆ เช่นฤทธิ์โดยตรงของสารต่อ Cyp7A1 ในการเร่งการสังเคราะห์และขับกรดน้ำดีออกจากร่างกาย เพื่อลดระดับโคเลสเตอรอลของสาร HAs เป็นต้น

บทนำ

สาร hydroxyacetophenones ที่มีผลลดไขมันในเลือด และเพิ่ม activity ของ enzyme Cyp 7A1 ได้แก่ สาร 2,4,6-THA และ 2,6-DHA ซึ่งฤทธิ์ในการลดไขมัน cholesterol ในเลือดดังกล่าวทำให้มีการ

ขับทั้งกรดน้ำดีทางอุจจาระเพิ่มขึ้น ฤทธิ์ดังกล่าวอาจเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการทำงานของขนส่งกรดน้ำดีผ่านเซลล์ลำไส้เล็กทั้งที่ด้านในของโพรงลำไส้ (lumen) ที่ผ่าน apical brush border membrane ซึ่งเป็นการทำงานของ ileal bile acid transporter และที่ด้านฐานเซลล์ลำไส้ (basolateral membrane) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการทำงานของ enzyme $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ โดยกลไกทั้ง 2 เป็นขั้นตอนสำคัญต่อการดูดซึมกรดน้ำดีผ่านเซลล์ลำไส้เข้าสู่ตับ เพื่อควบคุมการระดับไขมันในเลือดโดยสร้างเป็นกรดน้ำดีจากไขมัน cholesterol และขับทั้งทางอุจจาระ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย:

เพื่อศึกษาว่าสาร HAS 2 ตัวที่มีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดีและลดระดับไขมันในเลือด คือ THA และสาร 2,6-DHA โดยศึกษาบทบาทต่อกระบวนการขนส่งกรดน้ำดีผ่านเซลล์ลำไส้เล็กไปสู่กระแสเลือด

วิธีวิจัย

1. การเตรียม Brush Border Membrane Vesicle (BBMV) ของลำไส้เล็กส่วนปลาย (distal ileum)

หนูแรทเพศผู้พันธุ์ Sprague Drawley น้ำหนัก 200-250 กรัม ทำการอดอาหาร 1 คืน ทำการสลบ ผ่าตัด นำลำไส้เล็กส่วนปลายออกมา (ยาวประมาณ 15 ซม จาก ileocecal valve) ผ่าเปิดลำไส้ตลอดความยาวและขูดเอาเซลล์ชั้น mucosa นำเซลล์ดังกล่าวไป homogenate และ centrifuse แยก brush border membrane vesicle (BBMV) โดยวิธี Magnesium precipitation (Schmitz 1973 and Ulrich 1990) ทำการตรวจสอบหาความบริสุทธิ์ของ BBMV ที่ได้โดยการวัดหา activities ของ enzyme sucrase, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ ซึ่งเป็น marker enzymes ของ brush border membrane และ basolateral membrane ตามลำดับ จากนั้นทำการทดสอบฤทธิ์ของสารอะซีโตนต่อการขนส่งของกรดน้ำดีที่ลำไส้เล็กส่วนปลาย โดยการ incubate BBMV กับกรดน้ำดีทอโรโคลิก ที่ติดสารรังสี (^3H -taurocholic acid) เพื่อติดตามการขนส่งกรดน้ำดีผ่าน membrane ของลำไส้เล็กส่วนปลาย ในภาวะที่มีและไม่มีสารอะซีโตน

2. การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการขนส่งกรดน้ำดีผ่านทาง BBMV (Determination of optimum time course for uptake of bile acids)

การศึกษการขนส่งกรดน้ำดีเข้าเซลล์ ทำการ incubate BBMV กับกรดน้ำดีทอโรโคลิกติดรังสี (^3H -taurocholic acid) ที่ 25°C ใน water bath เมื่อครบเวลาการ incubate ตามที่กำหนด หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลาย (stop solution) ที่เย็นหรือใช้ mercury chloride ซึ่งใช้เป็นตัวยับยั้งการขนส่งสารทั่วไป จากนั้นทำการกรอง BBMV ดังกล่าวด้วยกระดาษกรอง GFB ขนาดรูพรุน 1 ไมครอน ล้างด้วย stop solution 3 ครั้ง นำกระดาษกรองที่มี vesicle ค้างอยู่ไปใส่ scintillation cocktail แล้วนำไปวัดปริมาณสารรังสี (กรดน้ำดี) ที่ถูกขนส่งเข้าไปใน vesicle ด้วยเครื่อง liquid-scintillation

spectrophotometer แสดงผลการทดลองในรูปของปริมาณกรดน้ำดีที่ถูกขนส่งเข้า vesicle ต่อมิลลิกรัมของ vesicle protein ต่อ 1 หน่วยเวลา (pmol/mg protein/min)

เมื่อเริ่มการวิจัยมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมในการขนส่งสาร โดยทำการ incubate BBMV กับกรดน้ำดีทอโรโคลิก ที่ติดสารรังสี (^3H -taurocholic acid) ในระยะเวลาต่าง ๆ กัน ที่ 5, 10, 15, 30, 60 และ 120 วินาที แล้วหาระยะเวลาที่มีการขนส่งกรดน้ำดีได้สูงสุด ซึ่งจะนำมาใช้ในการทดลองต่อไป

3. การศึกษาผลของสารอะซีโตฟีโนนต่อการขนส่งกรดน้ำดีผ่านทาง BBMV ของลำไส้เล็กส่วนปลาย

การทดลองนี้เพื่อศึกษาบทบาทของสาร HAs ในการออกฤทธิ์ยับยั้งการขนส่งของกรดน้ำดีที่ลำไส้เล็กส่วนปลายโดยการศึกษาทั้งใน *in vivo* และ *in vitro* system

การทดลอง *in vitro* system ใช้หนูปกติเตรียม BBMV ทำการ incubate BBMV กับกรดน้ำดีทอโรโคลิกที่ติดสารรังสี (^3H -taurocholic acid) ในภาวะที่มีและไม่มีสารอะซีโตฟีโนน นำผลการทดลองที่ได้ไปหาความเข้มข้นของสารอะซีโตฟีโนนสามารถยับยั้งการขนส่งกรดน้ำดีได้ 50% (IC_{50}) และนำความเข้มข้นนี้ไปใช้ในการหา kinetic ต่อไป

การทดลอง *in vivo* system ทำโดยป้อนสารที่จะทดสอบต่อสัตว์ทดลองเป็นระยะเวลาประมาณ 3 สัปดาห์ นำลำไส้เล็กส่วนปลายที่ได้จากสัตว์ทดลองที่ได้รับสารกลุ่ม THA หรือ 2,6-DHA มาเตรียมเป็น brush border membrane vesicle (BBMV) จากนั้นจะทำการตรวจสอบการขนส่งกรดน้ำดีผ่านทาง BBMV โดยการ incubate BBMV กับกรดน้ำดีที่ติดสารรังสี 250 ไมโครโมลาร์ ทำการเปรียบเทียบปริมาณการขนส่งกรดน้ำดีผ่านทาง BBMV ของลำไส้เล็กส่วนปลายในหนูที่ได้รับและไม่ได้รับ สารอะซีโตฟีโนน

4. การศึกษาจลศาสตร์การยับยั้งของสาร HAs ต่อการขนส่งกรดน้ำดีผ่านลำไส้เล็กส่วนปลาย

การทดลองนี้เพื่อศึกษารูปแบบการยับยั้งของสาร HAs ต่อการขนส่งกรดน้ำดีที่ลำไส้เล็กส่วนปลาย และหาค่าคงที่ของการยับยั้ง (K_i) การทดลองทำโดยการ incubate BBMV กับกรดน้ำดีทอโรโคลิกที่ติดสารรังสี (^3H -taurocholic acid) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในภาวะที่มีและไม่มีสารอะซีโตฟีโนน ผลการทดลองที่ได้จะนำไปหารูปแบบการยับยั้งของสารอะซีโตฟีโนนว่าเป็นแบบแข่งขัน หรือแบบไม่แข่งขัน รวมทั้งนำไปคำนวณหาค่าคงที่ของการยับยั้ง (K_i)

ผลที่จะได้จากการวิจัยนี้จะทำให้ทราบว่าสาร HAs มีบทบาทต่อการขนส่งกรดน้ำดีผ่านเข้าเซลล์ลำไส้ได้อย่างไร ได้เปรียบเทียบฤทธิ์ระหว่างสารหลัก (parent compound) และ metabolite ต่อการขนส่งกรดน้ำดีผ่าน apical brush border membrane เป็นการทำงานของ ileal bile acid transporter

5. การศึกษาฤทธิ์ของสาร HAS ต่อการทำงานของเอนไซม์ $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ ในลำไส้เล็กส่วนปลาย

การทดลองนี้เพื่อศึกษาถึงฤทธิ์ของสารอะซีโดฟีโนนต่อการทำงานของเอนไซม์ $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ ซึ่งอยู่ทางด้าน basolateral membrane ในลำไส้เล็กส่วนปลายซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อการควบคุมระดับ Na ภายในเซลล์ มีผลต่อการขับเคลื่อนการทำงานของตัวขนส่งกรดน้ำดีในลำไส้เล็กที่ BBMV เนื่องจากเป็นการขนส่งกรดน้ำดีเป็นแบบ Na-dependent และ secondary active transport การศึกษาจะดำเนินการทั้งใน *in vitro* และ *in vivo* systems เช่นเดียวกัน

การศึกษาใน *in vivo* system

นำหนู Rat เพศผู้ น้ำหนักประมาณ 200-250 กรัม จะได้รับสารอะซีโดฟีโนน (THA หรือ DHA) ทางปาก (i.g.) ต่อวัน เป็นเวลาติดต่อกันระยะหนึ่ง เมื่อครบกำหนดหนูจะได้รับการอดอาหาร 1 คืน ทำการผ่าตัดลำไส้เล็กส่วนปลายออกมายาวประมาณ 15 ซม. จาก ileocecal valve ขูดเซลล์ชั้น mucosa ออกมา นำมาเตรียม basolateral membrane โดยวิธีของ Mircheff and Wright, 1976. และทำการศึกษาเปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์ $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ ในหนูที่ได้รับและไม่ได้รับสารอะซีโดฟีโนนต่อไป ทำการเปรียบเทียบค่าคงที่ของปฏิกิริยา (K_m) และค่าปฏิกิริยาสูงสุด (V_{max}) ในแต่ละกลุ่ม จากนั้นจะทำการเปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์ $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ (ouabain-sensitive) ในแต่ละกลุ่มโดยการทำปฏิกิริยาในขณะที่มี ouabain และไม่มี ouabain เนื่องจากลำไส้มี $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ ส่วนของ $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ ที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งเกลือน้ำดีเป็น ouabain sensitive

ศึกษาหา K_i ในปฏิกิริยาของ ATPase ในภาวะที่มี ATP ความเข้มข้นต่างๆ กัน ตั้งแต่ 50- 1000 ไมโครโมลาร์ ทั้งในขณะที่มีและไม่มีสารอะซีโดฟีโนน นำผลการทดลองที่ได้ไป plot หารูปแบบการยับยั้งของสารอะซีโดฟีโนนว่าเป็นแบบแข่งขัน หรือแบบไม่แข่งขันอย่างไร รวมทั้งนำไปคำนวณหาค่าคงที่ของการยับยั้ง (K_i)

นอกจากนี้ถ้าสารมีผลยับยั้งจะได้ทำการศึกษาต่อไปถึงฤทธิ์ของ metabolite ว่ามีผลหรือไม่อย่างไรเมื่อเทียบกับสารหลัก (parent compound)

ผลการวิจัย (Results)

1. จากการศึกษาระยะเวลาเหมาะสมในการขนส่งกรดน้ำดี โดยใช้สารรังสี [^3H]taurocholate ผ่านถุง (vesicle) ของ brush border membrane, BBMV พบว่าการขนส่งขึ้นกับเวลาการ uptake จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ถึงจุดสูงสุดหรือ peak ในเวลา 15 วินาทีที่ 25°C แล้วลดลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งเหตุการณ์ดังกล่าวเป็นลักษณะทั่วไปของการ uptake ที่เป็น Na^+ -dependent มีการขับเคลื่อนด้วย Na^+ gradient เมื่อถึงจุดสูงสุดจะมีการ dissipate ของ Na^+ gradient การขนส่งจะลดลง และเวลาการศึกษาการ uptake ที่เป็นเวลา 15 วินาทีแล้วแปรเปลี่ยนความเข้มข้นของกรดน้ำดี [^3H]-taurocholate พบว่า กระบวนการขนส่งแสดงลักษณะของ saturation มีค่า V_{max} ที่ 1898 ± 150 pmol/mg prot. และ $K_m = 85.4 \pm 15.7$ μM

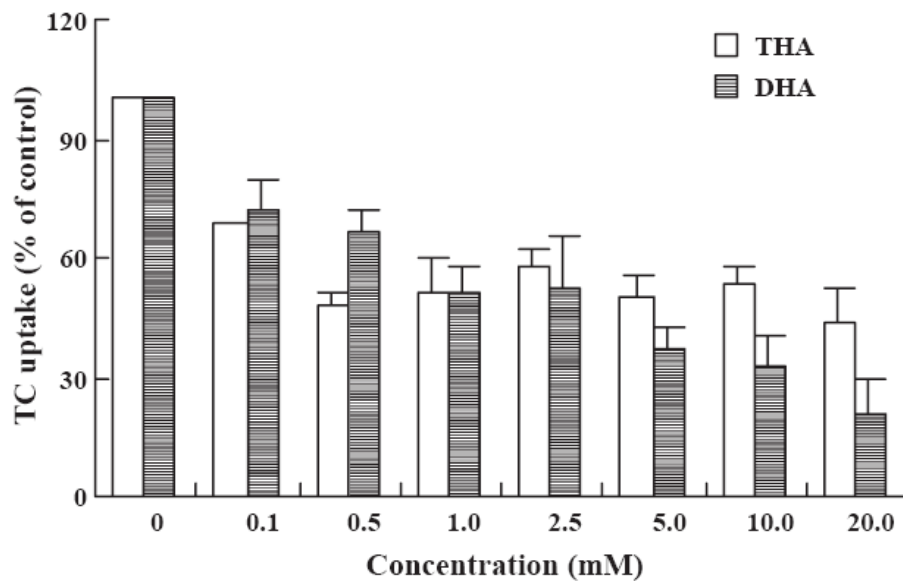


Fig. 5.1. Effects of 2,4,6-trihydroxyacetophenone (THA) and 2,6-dihydroxyacetophenone (DHA) on the uptake of TC into BBMVs of rat ileum ($n = 3-6$). Uptake of 20 μ M [3 H]-taurocholate into BBMVs was measured at 15 s in the presence of various concentrations of THA or DHA ranging from 0.1 to 20 mM.

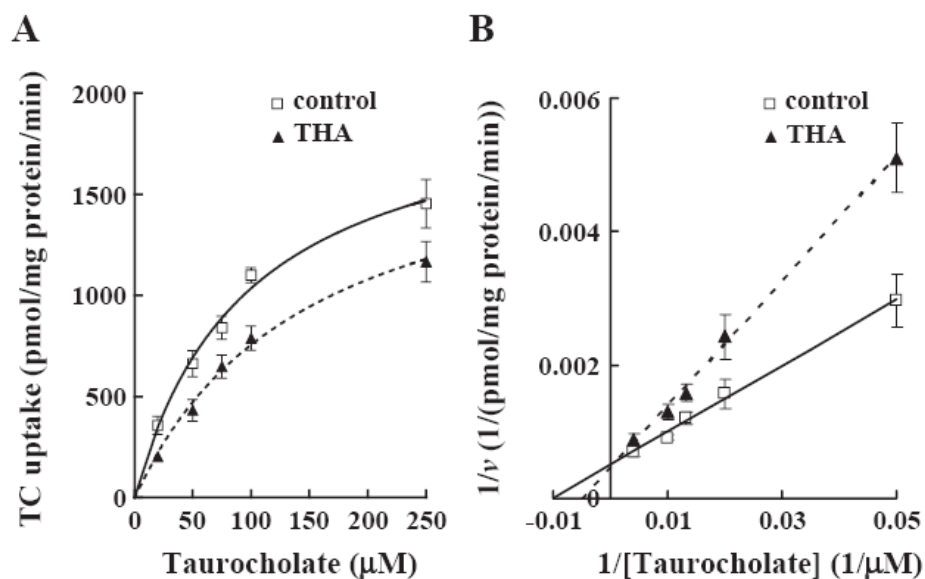


Fig. 5.2. Kinetics of TC uptake into rat ileal BBMVs: (A) kinetics of THA inhibition of TC uptake into rat ileal BBMVs; (B) Lineweaver–Burke reciprocal plot of THA inhibition. Uptake of [3 H]-taurocholate (20 to 250 μ M) was measured over 15 s in the presence or absence of 10 mM THA. The mode of inhibition and K_i for THA were estimated by graphical analysis of Lineweaver–Burke reciprocal plot of $1/v$ as a function of $1/[S]$ in the presence or absence of THA. Solution of the reciprocal velocity equation for competitive inhibition: $1/v = (K_m/V_{max})(1 + [I]/K_i)(1/[S] + 1/V_{max})$.

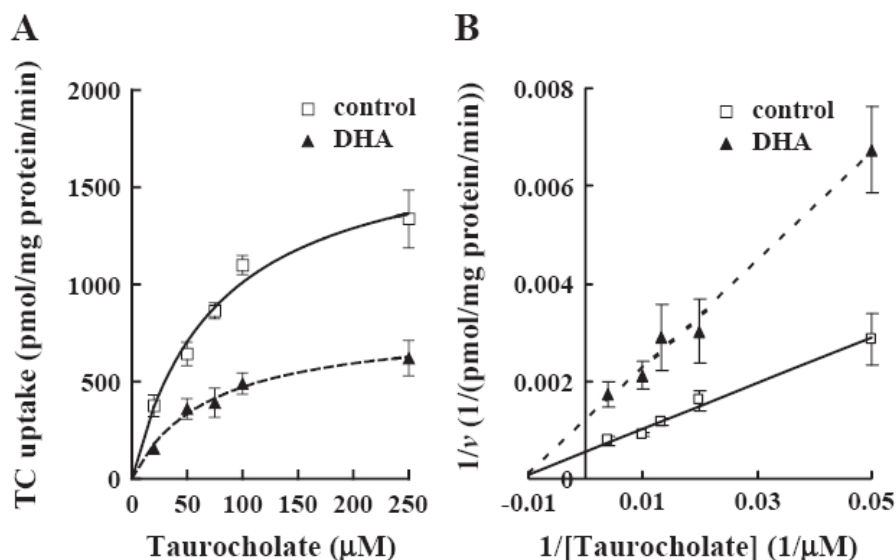


Fig. 5.3. Kinetics of TC uptake into rat ileal BBMV: (A) kinetics of DHA inhibition of TC uptake into rat ileal BBMV; (B) Lineweaver–Burke reciprocal plot of DHA inhibition. Uptake of [3H]-taurocholate (20 to 250 μM) was measured over 15 s in the presence or absence of 10 mM DHA. The mode of inhibition and K_i for DHA were estimated by graphical analysis of Lineweaver–Burke reciprocal plot of $1/v$ as a function of $1/[S]$ in the presence or absence of DHA. Solution of the reciprocal velocity equation for noncompetitive inhibition: $1/v = (K_m/V_{max}) (1 + [I]/K_i) (1/[S]) + (1 + [I]/K_i)(1/V_{max})$.

2. บทบาทของ THA, DHA และ PHA-metabolite ต่อการขนส่งกรดน้ำดี ได้ทำการ incubate BBMV กับ THA และ DHA ที่ความเข้มข้นต่างๆเป็นเวลา 15 วินาทีพบว่า THA มีฤทธิ์ยับยั้งการ uptake ของ กรดน้ำดี TC ได้สูงสุดแค่ 50% ที่ความเข้มข้นขนาด 0.5 mM (รูปที่ 5.1 และ 5.2) ในทางตรงข้าม DHA มีฤทธิ์ในการยับยั้งได้แรงกว่าฤทธิ์ที่พบจากรูปของสาร พบว่าความเข้มข้นที่ยับยั้งได้ 50% หรือ IC_{50} ของ DHA มีค่า = 1.58 mM ฤทธิ์ยับยั้งสูงสุดอยู่ที่ 80% โดย DHA ที่ 20 mM (รูปที่ 5.2)

ด้วย THA เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะกระตุ้นเปลี่ยนไปเป็น 2,4,6-THA-O-glucuronide ออกมาจกน้ำดี ได้ตรวจสอบฤทธิ์ของ metabolite ดังกล่าวต่อการขนส่งกรดน้ำดี TC เข้าสู่ BBMV พบว่าสาร metabolite ดังกล่าวไม่มีผลยับยั้งการขนส่งของกรดน้ำดีที่ลำไส้เล็ก การศึกษารูปแบบของการออกฤทธิ์ยับยั้ง พบว่า THA ยับยั้งการขนส่งกรดน้ำดีผ่าน BBMV แบบแข่งขันกับกรดน้ำดี (competitive inhibition) ดังรูป 5.2 ส่วนสาร DHA ออกฤทธิ์แบบไม่แข่งขัน (non-competitive inhibition) ดังรูป 5.3

3. การศึกษารูปแบบของ THA และ DHA ต่อการทำงานของ enzyme $Na^+-K^+-ATPase$ พบว่า สาร THA ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ $Na^+-K^+-ATPase$ ได้สูงสุดแค่ 50% มีค่า $IC_{50} = 19.1$ mM ขณะที่ DHA ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ $Na^+-K^+-ATPase$ ได้สมบูรณ์ มีค่า $IC_{50} = 6.3$ mM (รูปที่ 5.4)

เนื่องจาก $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ ที่เกี่ยวข้องสามารถขนส่งกรดน้ำดีเป็น enzyme ที่ไวต่อ Quabain จึงได้ทำการประเมินผลของสารต่อ activity ของ enzyme ที่ไวต่อ Quabain พบว่าสารทั้งสองฤทธิ์กีดการทำงานของ Quabain sensitive ATPase ได้อย่างชัดเจน (รูปที่ 5.5)

บทบาทของสาร THA และ DHA ต่อการลดระดับไขมัน cholesterol ในหนูแร่งที่เหนียวทำให้มีระดับไขมันในเลือดสูง เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาบทบาทของสารดังกล่าวในหนูแร่ง และเพื่อเป็นการยืนยันฤทธิ์ของสารในหลอดทดลองจึงได้ทำการศึกษาในสัตว์ทดลอง พบว่าการป้อน THA และ DHA ขนาด 400 $\mu\text{mole/Kg}$ แก่หนูแร่งที่เหนียวทำให้มีระดับไขมันในเลือดสูงเป็นเวลานาน 3 สัปดาห์ ระดับไขมัน cholesterol ในเลือดลดลงจาก $258.7 \pm 23.7 \text{ mg\%}$ ในกลุ่มควบคุมลงมาเป็น $156.2 \pm 2.6 \text{ mg\%}$ โดย TH A และลงมาเป็น $252.4 \pm 16.4 \text{ mg\%}$ โดย DHA โดยสารทั้งสองออกฤทธิ์ต่อระดับ VLDL + LDL เป็นหลักในการขณะที่ระดับของ HDL ไม่เปลี่ยนแปลง(รูปที่ 5.6)

ได้ทำการศึกษาฤทธิ์การป้อนสารต่อการขนส่งกรดน้ำดีที่ลำไส้ พบว่าขนาดของสารที่ป้อนดังกล่าวเป็นเวลา 3 สัปดาห์ THA มีฤทธิ์ลดการขนส่งกรดน้ำดีผ่านลำไส้ ขณะที่ DHA ไม่มีผลดังกล่าว อย่างไรก็ตามสารทั้งสองมีฤทธิ์ลด activity ของ enzyme $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Quabain sensitive ATPase อย่างชัดเจน

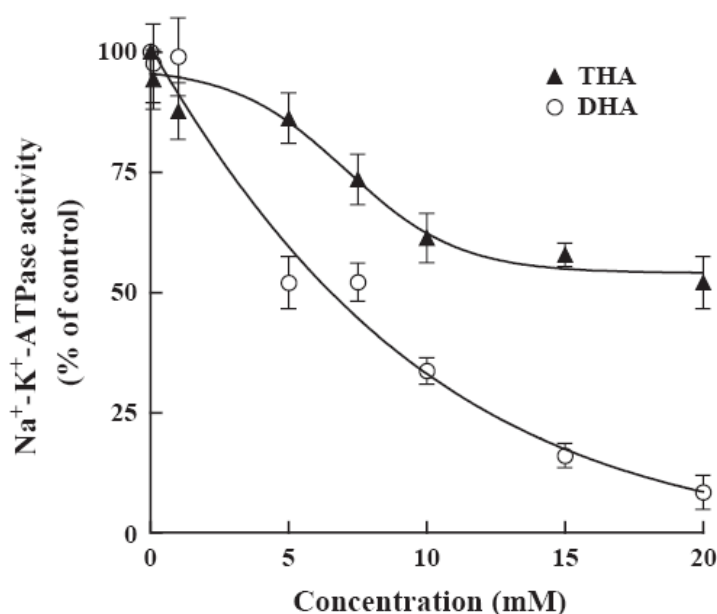


Fig. 5.4. Dose-dependent inhibition of THA and DHA on the total ATPase activity of rat ileal basolateral membrane ($n=5-8$). Total ATPase activity in 30 min was measured in the presence or absence of various concentrations (0.1 to 20 mM) of THA and DHA.

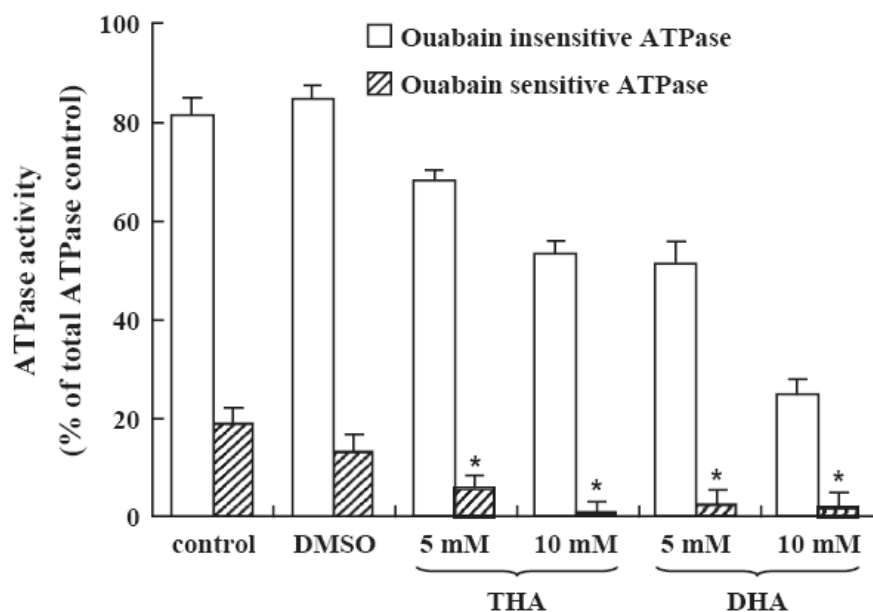


Fig. 5.5. Effects of THA and DHA on ouabain-sensitive ATPase. The Na⁺-K⁺-ATPase was measured in the presence or absence of 1.5 mM ouabain. Ouabain-sensitive ATPase (hatched bar) was calculated as the difference between total ATPase and ouabain insensitive ATPase. The values were expressed as percent of total ATPase of control. n = 5. *p < 0.05 significant difference from its corresponding vehicle control.

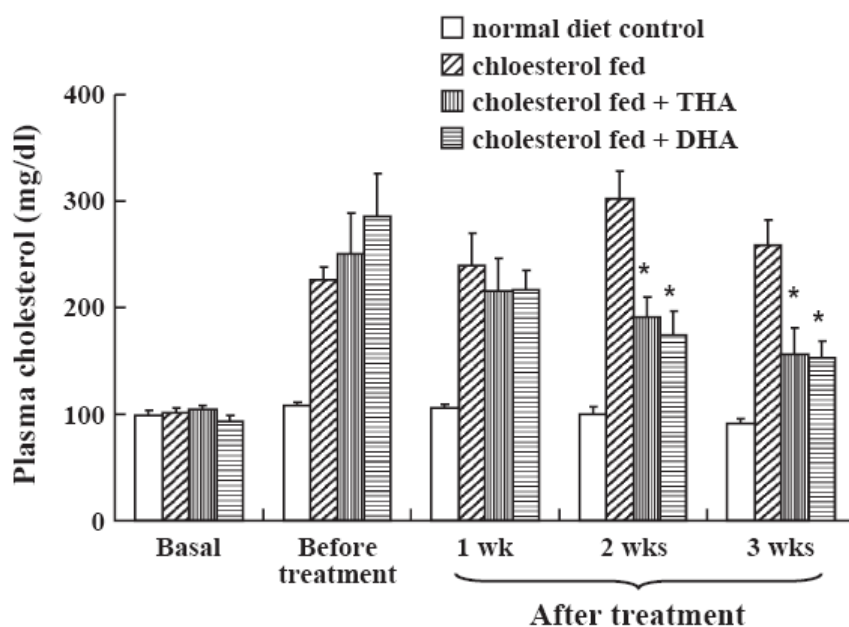


Fig. 5.6. Effects of THA and DHA treatment on the plasma cholesterol in hypercholesterolemic rats. The compounds were intragastrically administered at a dose of 400 Amol/kg BW twice a day,

and plasma cholesterol was followed for 3 weeks during THA and DHA treatment. * $p < 0.05$ significant difference from its corresponding cholesterol fed control ($n = 5-7$).

อภิปรายผล (Discussion)

ตามทฤษฎีไฮดรอกซีอะเซโตฟีโนน(HAs) คือ THA และ DHA มีผลกระตุ้นการหลั่งน้ำดี โดยสารทั้งสองสามารถเพิ่มการขับกรดน้ำดีออกมาทางน้ำดีสู่ลำไส้เล็ก ทำให้มีปริมาณกรดน้ำดีที่สะสมในลำไส้เพิ่มขึ้น ลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือดลงและมีการทำงานของเอนไซม์ Cyp7A ในตับเพิ่มขึ้น นั้น ด้วยการออกฤทธิ์เพิ่มการทำงานของเอนไซม์ Cyp7A นั้นยังไม่ชัดเจน อาจจะเป็นฤทธิ์ทางตรงและ/หรือฤทธิ์ทางอ้อมของสาร ด้วยกรดน้ำดีในลำไส้สามารถถูกดูดซึมนำกลับมาใช้ใหม่ที่ตับได้อีก โดยผ่านกระบวนการที่เรียกว่า enterohepatic circulation กรดน้ำดีนี้จะส่งผลไปยังยังกระบวนการสังเคราะห์กรดน้ำดีในตับ โดย Cyp7A เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในที่ถูกยับยั้ง ดังนั้นหนทางหนึ่งที่น่าจะเป็นไปได้คือกลไกการออกฤทธิ์ลดโคเลสเตอรอลของสารเป็นฤทธิ์ทางอ้อมเกิดจากไปรบกวนการวนกลับของกรดน้ำดีเพื่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Cyp7A ซึ่งผลการศึกษานี้ได้พบว่าสาร HAs ทั้ง 2 ตัว สามารถยับยั้งการขนส่งของกรดน้ำดีจากลำไส้กลับไปที่ตับได้ การขัดขวางกระบวนการหมุนวนนำกรดน้ำดีจากลำไส้กลับไปที่ตับนี้เป็นกลไกหนึ่งที่เสริมฤทธิ์การลดไขมัน โคเลสเตอรอลของสาร THA และ DHA โดยทำงานร่วมกับกลไกอื่นของสารซึ่งมี multisites of actions

ในลำไส้เล็กการดูดซึมกรดน้ำดีผ่านเซลล์ (enterocyte) จากเซลล์ลำไส้ผ่านเซลล์บุโพรงลำไส้เป็นกระบวนการที่มีหลายขั้นตอน เริ่มจากกรดน้ำดีจะถูกขนส่งผ่านเยื่อหุ้มเซลล์โพรงลำไส้ด้านบนที่เป็นส่วน brush border โดยอาศัยโปรตีน ASBT (Apical sodium dependent bile acid transporter) จากนั้นกรดน้ำดีจะจับกับโปรตีนภายในเซลล์และเคลื่อนย้ายไปยังเยื่อหุ้มเซลล์ด้านฐาน basolateral เพื่อทำการขนส่งผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ด้านนี้เข้าสู่กระแสเลือด และเข้าสู่เส้นเลือดดำใหญ่ที่ไปเลี้ยงตับอีกทอดหนึ่ง การยับยั้งการขนส่งกรดน้ำดีที่ลำไส้ไม่ให้กลับไปที่ตับจะส่งผลให้มีการแสดงออกของ gene Cyp7A1 และสังเคราะห์ enzyme มากขึ้น เป็นการช่วยเร่งการกำจัดโคเลสเตอรอลให้เปลี่ยนเป็นกรดน้ำดี เพื่อขับทิ้งและจะทำให้ระดับโคเลสเตอรอลในเลือดลดลงได้ กระบวนการยับยั้งการขนส่งกรดน้ำดีที่ลำไส้นี้ได้รับความสนใจอย่างมาก เป็นเป้าหมายใหม่ของการพัฒนายาลดโคเลสเตอรอล ดังนั้นกลไกการลดโคเลสเตอรอลของสาร THA และ DHA อาจจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการนี้ด้วย ป้องกันไม่ให้กรดน้ำดีหมุนวนกลับไปใช้ใหม่ที่ตับ โดยทั่วไปการดูดซึมกรดน้ำดีผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ด้าน brush border โดยโปรตีน ASBT นั้นจะเกิดขึ้นที่เฉพาะลำไส้เล็กส่วนปลาย ในคนพบว่า ร้อยละ 75 ของกรดน้ำดีที่หมุนวนกลับไปใช้ที่ตับนั้นถูกขนส่งผ่านโปรตีน ASBT (Huff et al., 2002) การศึกษาโดยวิเคราะห์ปริมาณการขนส่งกรดน้ำดีเข้าสู่ของเยื่อหุ้มเซลล์ด้าน brush border นั้นเป็นวิธีที่ใช้กันมากในการศึกษาการดูดซึมของกรดน้ำดีที่ลำไส้เล็กส่วนปลาย (Beesley and Faust, 1979; Murer and Kinne, 1980) ซึ่งได้นำมาใช้ในงานวิจัยนี้ ได้พบว่า THA มีฤทธิ์ยับยั้งการขนส่งกรดน้ำดีเข้าสู่ของเยื่อหุ้มเซลล์ด้าน brush border

ของเซลล์ลำไส้เล็กส่วนปลายได้แต่ไม่สมบูรณ์ และการยับยั้งเป็นแบบแข่งขันกับกรดน้ำดี (competitive) ขณะที่ DHA ยับยั้งได้สมบูรณ์และการยับยั้งเป็นแบบไม่แข่งขันกับกรดน้ำดี (non-competitive) เนื่องจากการดูดซึมกรดน้ำดีเป็นกระบวนการแอคทีฟแบบทุติยภูมิ (secondary active transport) โดยที่โปรตีน ASBT จะขนส่งกรดน้ำดีพร้อมกับกลีโคไซด์ (Weinman, 1997) และการทำงานของ ASBT จะขึ้นกับการทำงานของเอนไซม์ Na^+/K^+ -ATPase บนเยื่อหุ้มเซลล์ด้าน basolateral การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Na^+/K^+ -ATPase สามารถลดการขนส่งกรดน้ำดีเข้าสู่เซลล์ลำไส้เล็กส่วนปลายของหนูทุกตัวได้ (Wilson and Treanor, 1981) เป็นที่ทราบกันดีว่า เอนไซม์ Na^+/K^+ -ATPase ในลำไส้เล็กของหนูทุกตัวมีปริมาณของเอนไซม์ Na^+/K^+ -ATPase ที่ไวต่อการยับยั้งด้วยสาร ouabain ในงานวิจัยนี้ พบว่าเยื่อหุ้มเซลล์ด้าน basolateral ของลำไส้เล็กส่วนปลายที่เตรียมได้มีปริมาณเอนไซม์ ATPase ซึ่งไวต่อ ouabain ประมาณร้อยละ 19 ของปริมาณเอนไซม์ ATPase ทั้งหมด ซึ่งมีปริมาณที่ใกล้เคียงกับการศึกษาอื่น (Charney and Donowitz, 1978; Harms and Wright, 1980) สาร THA และ DHA ทั้งสองตัวสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ATPase ทางด้าน basolateral โดยการยับยั้งเอนไซม์ ATPase เป็นแบบ uncompetitive กับ ATP โดยสารทั้ง 2 สามารถเปลี่ยนแปลงทั้งค่าคงที่การทำงานของเอนไซม์ (K_m) และค่าความสามารถในการทำงานสูงสุดของเอนไซม์ (V_{max}) นอกจากนี้ทั้ง THA และ DHA สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Na^+/K^+ -ATPase ในส่วนที่ไวต่อการยับยั้งด้วย ouabain ได้อย่างสมบูรณ์ ดังนั้นการทำงานของสาร THA และ DHA ในลำไส้เล็กส่วนปลายนอกจากจะเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการขนส่งกรดน้ำดีผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ด้าน brush border แล้วยังเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Na^+/K^+ -ATPase ทางด้าน basolateral ซึ่งเป็นตัวกำหนดการขับเคลื่อนในการดูดซึมกรดน้ำดีผ่านเซลล์อีกด้วย ประสิทธิภาพในการลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือดของสาร THA และ DHA ได้รับการยืนยันอีกครั้งในการนี้ โดยได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารในหนูทุกตัวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะโคเลสเตอรอลในเลือดสูง สารทั้งสองตัวสามารถลดระดับโคเลสเตอรอลอย่างเห็นได้ชัด โดยสามารถลดระดับโคเลสเตอรอลสู่ระดับประมาณร้อยละ 60 ของหนูโคเลสเตอรอลสูงในกลุ่มควบคุม ซึ่งมีประสิทธิภาพที่ใกล้เคียงกับยาลดโคเลสเตอรอลที่มีขายในท้องตลาด

กลไกในการยับยั้งการดูดซึมกรดน้ำดีในลำไส้เล็กส่วนปลายที่แตกต่างกันระหว่างสาร THA และ DHA นั้นยังไม่สามารถอธิบายได้แน่ชัด ในจำนวนสารกลุ่มไฮดรอกซีอะเซโตฟีโนนทั้งหมดที่เคยศึกษา มีเฉพาะสาร THA ซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซีที่ตำแหน่ง 2, 4 และ 6 และสาร DHA ซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซีที่ตำแหน่ง 2 และ 6 เท่านั้นที่สามารถลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือดได้ ซึ่งสารทั้ง 2 ตัวนี้ก็สามารถยับยั้งการดูดซึมกรดน้ำดีได้ด้วยดังที่พบในการศึกษาครั้งนี้ มีรายงานมากมายถึงความเป็นไปได้ว่าความแตกต่างของหมู่ไฮดรอกซีเพียง 1 หมู่ สามารถทำให้การออกฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ของสารแตกต่างกันได้ การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า สารทั้ง 2 ตัวนี้มีความแตกต่างกันในการออกฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดีจากตับ โดยพบว่าจำนวนและตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซี บนโครงสร้างเบนซีนของอะเซ

โคฟีโนนนั้นเป็นปัจจัยสำคัญ ในการกำหนดการทำงานของสารไฮดรอกซีอะเซโตฟีโนทั้ง 2 ตัว หมู่ไฮดรอกซีที่ตำแหน่งที่ 4 ของวงเบนซีน ซึ่งให้ความเป็นขั้วแก่มอเลกุลของสารไฮดรอกซีอะเซโตฟีโนมากที่สุด มีความสำคัญในการเพิ่มปริมาณการหลั่งน้ำดี ในขณะที่หมู่ไฮดรอกซีที่ตำแหน่งที่ 2 และ 6 จะมีบทบาทสำคัญในการเพิ่มการขับสารอินทรีย์ เช่น กรดน้ำดี และโคเลสเตอรอล ออกสู่น้ำดี อย่างไรก็ตามควรจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงรายละเอียดปลีกย่อยเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างทางเคมีและการทำงานของสารกลุ่มไฮดรอกซีอะเซโตฟีโนในระดับของโปรตีนขนส่งบนเยื่อหุ้มเซลล์ต่อไป

แม้ว่าสาร THA และ DHA สามารถยับยั้งสองขั้นตอนสำคัญของการดูดซึมกรดน้ำดีที่ลำไส้เล็กส่วนปลายได้ก็ตาม แต่การออกฤทธิ์ของสารในการยับยั้งดังกล่าวไม่รุนแรง โดยขนาดของสารที่ออกฤทธิ์อยู่ใน millimole range อย่างไรก็ตามได้มีการศึกษาฤทธิ์ของ THA ต่อการทำงานของ enzyme Cyp7A โดยใช้ Cell HepG-2 ในหลอดทดลอง พบว่าสารดังกล่าวมีฤทธิ์โดยตรงต่อเซลล์ตับ สามารถเพิ่มปริมาณของ mRNA และ protein Cyp7A ได้ ด้วยสารยังสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อื่นในลำไส้เล็กได้อีกด้วย ดังนั้นกลไกในการยับยั้งการดูดซึมกรดน้ำดีที่ลำไส้เล็กนี้ไม่ได้เป็นเพียงกลไกหลัก เป็นกลไกเสริมฤทธิ์ของสารต่อ Cyp7A ในการออกฤทธิ์ลดโคเลสเตอรอล นอกจากนี้ enzyme ที่ในตับยังเป็นไปได้ที่สารอาจจะทำงานผ่านโปรตีนเป้าหมายตัวอื่นภายในเซลล์ ในปัจจุบันตัวรับสัญญาณในนิวเคลียสของเซลล์ (Nuclear receptor) ที่ควบคุมการทำงานของเอนไซม์ Cyp7A นั้นได้รับความสนใจอย่างมากในการใช้เป็นแนวทางที่จะพัฒนาให้เป็นเป้าหมายของยาลดโคเลสเตอรอลสมัยใหม่ ตัวรับสัญญาณที่เกี่ยวข้องและที่สำคัญนั้นได้แก่ farnesoid X nuclear receptor หรือ FXR และ liver X nuclear receptor หรือ LXR ในการควบคุมระดับโคเลสเตอรอลในเลือดนั้น การถอดรหัสสารพันธุกรรมของเอนไซม์ Cyp7A จะถูกยับยั้งที่กระบวนการที่ควบคุมโดย FXR จะถูกกระตุ้นด้วย LXR FXR เป็นตัวรับสัญญาณโดยตรงจากกรดน้ำดีซึ่งเป็น ligand ของ FXR ขณะที่การถอดรหัสพันธุกรรมของ Cyp7A ความเป็นไปได้ที่สาร THA และ DHA ทั้ง 2 ตัวจะกระตุ้นการทำงานของ Cyp7A โดยตรงที่ตับ โดยการยับยั้งการทำงานของ FXR หรือกระตุ้นการทำงานของ LXR อยู่ในช่วงการศึกษาวิจัยต่อไป

โดยสรุป สารไฮดรอกซีอะเซโตฟีโนทั้ง THA และ DHA สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการดูดซึมกลับของกรดน้ำดีที่ลำไส้เล็ก โดยออกฤทธิ์ทำงานบนเยื่อหุ้มเซลล์ทั้งด้าน brush border ในโพรงลำไส้และด้าน basolateral ของเซลล์ลำไส้เล็กส่วนปลาย ความสามารถของสารในการยับยั้งในกระบวนการดูดซึมกรดน้ำดีทั้ง 2 กระบวนการที่สำคัญนี้ ร่วมกับความสามารถของสารในการออกฤทธิ์โดยตรงที่ระดับยีนของ Cyp7A และฤทธิ์ในการเร่งการขับออกของกรดน้ำดีออกจากตับจะเป็นฤทธิ์ที่สำคัญของสารทั้งสองในกลไกการลดโคเลสเตอรอลในเลือด การพิจารณาปรับแต่งโครงสร้างหลักทางเคมีของสารทั้ง 2 ตัวเพื่อให้มีประสิทธิภาพในการกำจัดโคเลสเตอรอลโดยการเปลี่ยนเป็นกรดน้ำดีได้มากขึ้นจะ

เป็นแนวทางที่สำคัญแนวทางหนึ่งในการออกแบบยาใหม่เพื่อใช้ในการควบคุมระดับโคเลสเตอรอลในผู้ป่วยต่อไปในอนาคต

References:

1. Apiwattanakul, N., Sekine, T., Chairoungdua, A., Kanai, Y., Nakajima, N., Sophasan, S., Endou, H., 1999. Transport properties of nonsteroidal anti-inflammatory drugs by organic anion transporter 1 expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Molecular Pharmacology* 55 (5), 847–854.
2. Beesley, R.C., Faust, R.G., 1979. Sodium ion-coupled uptake of taurocholate by intestinal brush-border membrane vesicles. *Biochemical Journal* 178 (2), 299–303.
3. Bellentani, S., Hardison, W.G., Marchegiano, P., Zanasi, G., Manenti, F., 1987. Bile acid inhibition of taurocholate uptake by rat hepatocytes: role of OH groups. *American Journal of Physiology* 252 (3 Pt 1), G339–G344.
4. Charney, A.N., Donowitz, M., 1978. Functional significance of intestinal Na^+/K^+ -ATPase: in vivo ouabain inhibition. *American Journal of Physiology* 234 (6), E629–E636.
5. Chiang, J.Y., Kimmel, R., Weinberger, C., Stroup, D., 2000. Farnesoid X receptor responds to bile acids and represses cholesterol 7 α -hydroxylase gene (CYP7A1) transcription. *Journal of Biological Chemistry* 275 (15), 10918–10924.
6. Craddock, A.L., Love, M.W., Daniel, R.W., Kirby, L.C., Walters, H.C., Wong, M.H., Dawson, P.A., 1998. Expression and transport properties of the human ileal and renal sodium-dependent bile acid transporter. *American Journal of Physiology* 274 (1 Pt 1), G157–G169.
7. Fiske, C.H., Subbarow, Y., 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *Journal of Biological Chemistry* 66, 375–400.
8. Gordon, S.J., Kinsey, M.D., Magen, J.S., Joseph, R.E., Kowlessar, O.D., 1979. Structure of bile acids associated with secretion in the rat cecum. *Gastroenterology* 77 (1), 38–44.
9. Griffin, S.D., Buxton, K.D., Donaldson, I.A., 1993. The α -D-glucosyl C-2 hydroxyl is required for binding to the H(+)-sucrose transporter in phloem. *Biochimica et Biophysica Acta* 1152 (1), 61–68.
10. Harms, V., Wright, E.M., 1980. Some characteristics of Na/K-ATPase from rat intestinal basal lateral membranes. *Journal of Membrane Biology* 53 (2), 119–128.
11. Huff, M.W., Telford, D.E., Edwards, J.Y., Burnett, J.R., Barrett, P.H., Rapp, S.R., Napawan, N., Keller, B.T., 2002. Inhibition of the apical sodium dependent bile acid transporter reduces LDL cholesterol and apoB by enhanced plasma clearance of LDL apoB. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 22 (11), 1884–1891.

12. Klip, A., Grinstein, S., Biber, J., Semenza, G., 1980. Interaction of the sugar carrier of intestinal brush-border membranes with HgCl₂. *Biochimica et Biophysica Acta* 598 (1), 100–114.
13. Kuroki, S., Naito, T., Chijiwa, K., Tanaka, M., 1999. Effects of cholestyramine on hepatic cholesterol 7 α -hydroxylase and serum 7 α -hydroxycholesterol in the hamster. *Lipids* 34 (8), 817–823.
14. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193 (1), 265–275.
15. Lu, T.T., Makishima, M., Repa, J.J., Schoonjans, K., Kerr, T.A., Auwerx, J., Mangelsdorf, D.J., 2000. Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Molecular Cell* 6 (3), 507– 515.
16. Miller, D.S., 1981. HgCl₂ inhibition of nutrient transport in teleost fish small intestine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 216 (1), 70–76.
17. Mircheff, A.K., Wright, E.M., 1976. Analytical isolation of plasma membranes of intestinal epithelial cells: identification of Na, K–ATPase rich membranes and the distribution of enzyme activities. *Journal of Membrane Biology* 28 (4), 309– 333.
18. Murer, H., Kinne, R., 1980. The use of isolated membrane vesicles to study epithelial transport processes. *Journal of Membrane Biology* 55 (2), 81–95.
19. Piyachaturawat, P., Chai-ngam, N., Chuncharunee, A., Komaratat, P., Suksamrarn, A., 2000. Choleretic activity of phloracetophenone in rats: structure– function studies using acetophenone analogues. *European Journal of Pharmacology* 387 (2), 221– 227.
20. Piyachaturawat, P., Srivoraphan, P., Chuncharunee, A., Komaratat, P., Suksamrarn, A., 2002. Cholesterol lowering effects of a choleretic phloracetophenone in hypercholesterolemic hamsters. *European Journal Pharmacology* 439 (1–3), 141– 147.
21. Root, C., Smith, C.D., Sundseth, S.S., Pink, H.M., Wilson, J.G., Lewis, M.C., 2002. Ileal bile acid transporter inhibition, CYP7A1 induction, and antilipemic action of 264W94. *Journal of Lipid Research* 43 (8), 1320–1330.
22. Russell, D.W., Setchell, K.D., 1992. Bile acid biosynthesis. *Biochemistry* 31(20), 4737– 4749.
23. Saeki, T., Matoba, K., Furukawa, H., Kirifuji, K., Kanamoto, R., Iwami, K., 1999. Characterization, cDNA cloning, and functional expression of mouse ileal sodium-dependent bile acid transporter. *Journal of Biochemistry (Tokyo)* 125 (4), 846–851.
24. Schmitz, J., Preiser, H., Maestracci, D., Ghosh, B.K., Cerda, J.J., Crane, R.K., 1973. Purification of the human intestinal brush border membrane. *Biochimica et Biophysica Acta* 323 (1), 98– 112.
25. Shneider, B.L., 2001. Intestinal bile acid transport: biology, physiology, and pathophysiology. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 32 (4), 407–417.

26. Shneider, B.L., Dawson, P.A., Christie, D.M., Hardikar, W., Wong, M.H., Suchy, F.J., 1995. Cloning and molecular characterization of the ontogeny of a rat ileal sodium-dependent bile acid transporter. *Journal of Clinical Investigation* 95 (2), 745– 754.
27. Spady, D.K., Cuthbert, J.A., Willard, M.N., Meidell, R.S., 1998. Overexpression of cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A) in mice lacking the low density lipoprotein (LDL) receptor gene. LDL transport and plasma LDL concentrations are reduced. *Journal of Biological Chemistry* 273 (1), 126– 132.
28. Terlouw, S.A., Graeff, C., Smeets, P.H., Fricker, G., Russel, F.G., Masereeuw, R., Miller, D.S., 2002. Short- and long-term influences of heavy metals on anionic drug efflux from renal proximal tubule. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 301 (2), 578– 585.
29. Tochtrop, G.P., DeKoster, G.T., Covey, D.F., Cistola, D.P., 2004. A single hydroxyl group governs ligand site selectivity in human ileal bile acid binding protein. *Journal of the American Chemical Society* 126 (35), 11024– 11029.
30. Ulrich, H., 1990. Sodium chloride transport pathways in intestinal membrane vesicle. *Methods in Enzymology* 192, 389– 408.
31. Weinman, S.A., 1997. Electrogenicity of Na⁽⁺⁾-coupled bile acid transporters. *Yale Journal of Biology and Medicine* 70 (4), 331–340.
32. Wilson, F.A., 1981. Intestinal transport of bile acids. *American Journal of Physiology* 241 (2), G83–G92.
33. Wilson, F.A., Treanor, L.L., 1981. Studies of relationship among bile-acid uptake, Na⁺, K⁺ – ATPase, and Na⁺ gradient in isolated cells from rat ileum. *Gastroenterology* 81 (1), 54–60.
34. Wolf, G., 1999. The role of oxysterols in cholesterol homeostasis. *Nutrition Reviews* 57 (6), 196– 198.
35. Wong, M.H., Oelkers, P., Craddock, A.L., Dawson, P.A., 1994. Expression cloning and characterization of the hamster ileal sodium-dependent bile acid transporter. *Journal of Biological Chemistry* 269 (2), 1340– 1347.

ตอนที่ 6

การศึกษาฤทธิ์การกระตุ้นการหลั่งน้ำดีของ THA ว่าสามารถนำมาประยุกต์ใช้ช่วยเร่งการกำจัดสารพิษออกจากร่างกายได้หรือไม่

บทคัดย่อ

ได้ทำการศึกษาบทบาทของสาร THA ที่มีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดีว่าสามารถเร่งการกำจัดสารพิษออกจากร่างกายได้หรือไม่ ในการวิจัยได้เลือกใช้เมทิลเมอร์คิวรีซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ของปรอทที่ร่างกายขับทิ้งออกทางน้ำดี ผลการทดลองพบว่าสารปรอทมีความเป็นพิษต่อดับ ทำให้อัตราการหลั่งน้ำดีลดลงทันที ในขณะที่การหลั่งน้ำดีลดลง ระดับของเอนไซม์ ALT และ AST และ Alkaline phosphatase ในพลาสมาและในน้ำดีเพิ่มขึ้น ปริมาณของ GSH ในตับ และที่หลั่งออกมาในน้ำดีลดลง การให้สาร THA เข้าทางลำไส้เล็กส่วนต้น สามารถกระตุ้นการขับน้ำดีในหนูที่ได้รับสารปรอทมาก่อนให้เพิ่มขึ้นได้ แต่ปรากฏว่าทำให้ปริมาณของสารปรอทและ GSH ซึ่งเคยถูกขับออกทางน้ำดีกลับลดลงอย่างมาก อย่างไรก็ตามปริมาณสารปรอทและ GSH ในตับ และดัชนีที่ใช้แสดงความเป็นพิษต่อดับไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับค่าเหล่านั้นในหนูที่ได้รับสารปรอทอย่างเดียว แสดงว่าสาร THA ไม่ได้เพิ่มความเป็นพิษ จึงน่าจะมีทางอื่นที่ร่างกายกำจัดปรอทออกได้ พบว่าสาร THA สามารถกระตุ้นการขับปัสสาวะพร้อมกับการขับสารปรอทออกทางปัสสาวะเพิ่มมากขึ้น แสดงว่าการให้สาร THA มีผลเปลี่ยนการขับทิ้งสารปรอทจากทางน้ำดีให้ไปใช้ทางอื่น โดยเร่งการขับออกทางปัสสาวะ ความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกการกำจัดสารพิษต่างๆโดยตับ และปฏิสัมพันธ์โดยตรงระหว่างสารกับระบบตัวขนส่งสารต่างๆออกจากตับนับว่ามีความสำคัญอย่างมากในการกำหนดวิธีการในการกำจัดสารพิษ เพื่อลดอาการพิษที่เกิดขึ้น โดยสารอาจจะเกิดการแย่งกันเองที่ตัวขนส่งออกจากตับ (transporter) เช่น กรณีนี้เป็นต้น ซึ่งจำเป็นจะต้องมีการศึกษาให้ชัดเจนก่อนนำไปใช้จริง โดยสาร THA อาจจะช่วยขนส่งสารอื่นได้ที่ไม่ใช่โลหะหนัก

บทนำ

การศึกษาถึงการประยุกต์ใช้ฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดีของสาร มาช่วยเร่งการกำจัดสารพิษออกจากร่างกาย ออกทางน้ำดี ในการวิจัยได้เลือกใช้เมทิลเมอร์คิวรีซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ของปรอทที่ร่างกายขับทิ้งออกทางน้ำดี ด้วยปรอทเป็นโลหะหนักที่มีการนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางทั้งทางด้านการแพทย์ วิทยาศาสตร์ การเกษตร การทหาร และอุตสาหกรรมต่าง ๆ การปนเปื้อนปรอทเป็นปัญหาของสิ่งแวดล้อมในหลายประเทศ ปรอทกระจายตัวอยู่ได้ทั่วไป สามารถเข้าสู่ร่างกายมนุษย์ได้ทุกทางและเป็นสาเหตุของโรคต่างๆ โดยเฉพาะต่อพัฒนาการของเซลล์ประสาทและทำงานของระบบประสาท เมื่อปรอทเข้าสู่ร่างกาย จะผ่านเข้าไปในกระแสเลือดและกระจายไปตามเนื้อเยื่อต่างๆ ได้แก่ ไต ตับ ม้าม สมอง ตามลำดับ ร่างกายขับปรอทออกทางปัสสาวะและอุจจาระโดยผ่านทางน้ำดี จากการที่สารกลุ่มอะซีโดฟีโน

มีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งของน้ำดีได้เป็นอย่างดี จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจที่จะศึกษาบทบาทของสารกลุ่มอะซีโตฟีโนนต่อการขับทิ้งปรอทออกในน้ำดี

วัตถุประสงค์เพื่อศึกษา

1. ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของเมทิลเมอคิวรีและความรุนแรงของการเกิดพิษที่ตับ
2. บทบาทของสารกลุ่มอะซีโตฟีโนนต่อการกำจัดสารเมทิลเมอคิวรีในน้ำดี
3. กลไกการออกฤทธิ์ของสารกลุ่มอะซีโตฟีโนนที่มีผลเปลี่ยนแปลงการขับเมทิลเมอคิวรีในน้ำดี

วิธีการวิจัย

1. การเตรียมสัตว์ทดลองเพื่อเก็บน้ำดี

ใช้หนู rat พันธุ์ Wistar เพศผู้ น้ำหนักประมาณ 200-250 กรัม เป็นสัตว์ทดลองเลี้ยงด้วยอาหารหนูมาตรฐาน (F.E. Zuellig, Bangkok) อุดอาหารหนู 1 ถิ่น สลับด้วย Nembutal (35-50 mg/kg., i.p.) ทำ tracheostomy เพื่อช่วยในการหายใจ cannulate bile duct ด้วย polyethylene tube (PE) No. 10 เพื่อเก็บน้ำดี สอดท่อ PE No. 50 เข้า femoral vein เพื่อใช้ในการ infuse สารละลาย ทำการ infuse ด้วย normal saline เพื่อทดแทนการสูญเสียของสัตว์ระหว่างการทดลอง ควบคุมอุณหภูมิของสัตว์ทดลองให้อยู่ที่ 37°C ด้วย rectal probe ต่อเข้ากับ temperature regulator และโดยใช้ไฟส่องให้ความร้อนเหนือตัวสัตว์ ทำการเก็บน้ำดีที่ไหลออกมาจากท่อน้ำดีเป็นเวลา 30 นาที น้ำดีช่วง 30 นาทีแรกจะทิ้งไปและเก็บต่ออีก 30 นาที เพื่อใช้เป็นตัวควบคุม(control) หลังจากนั้นทำการฉีดสารละลายที่ต้องการจะทดสอบ

2 การศึกษาความสัมพันธ์ของสารปรอท (MeHg) ต่อการเกิดพิษที่ตับ

การเก็บตัวอย่างน้ำดีที่ไหลออกมาจากท่อน้ำดีจะทำเป็นช่วง ๆ ช่วงละ 30 นาที หลังจากเก็บน้ำดีช่วงที่ 2 แล้วฉีดสารปรอทเข้าทางเส้นเลือดดำที่เข้าสู่ตับ (Portal vein) ด้วยความเข้มข้น 20-80 $\mu\text{mol/kg BW}$ และเก็บน้ำดีต่ออีก 4 ช่วง ในขณะเดียวกันเก็บตัวอย่างเลือดประมาณ 0.2 มิลลิลิตร หลังจากนั้น ฉีดสารจำพวกกลุ่มอะซีโตฟีโนน (acetophenone) ด้วยความเข้มข้นที่เหมาะสมขนาด 20-80 $\mu\text{mol/kg BW}$ โดยฉีดเข้าสู่โพรงลำไส้เล็กส่วนต้น (duodenum) และเก็บน้ำดีต่ออีก 4 ช่วง ช่วงสุดท้ายของการทดลองทำการเก็บเลือดจาก Abdominal aorta แล้วจึงเก็บตัวอย่างตับ ดังแผนผัง

การวิเคราะห์ทางชีวเคมี

นำตัวอย่างน้ำดี เลือด และตัวอย่างตับที่เก็บได้มาวิเคราะห์ดังต่อไปนี้

1. คำนวณหาอัตราการหลั่งของน้ำดี (Bile flow rate)
2. วิเคราะห์ความเข้มข้นและปริมาณของสารปรอท สารกลูตาไทโอน (GSH) ในน้ำดี และในตับ
3. วิเคราะห์หาความเข้มข้นและปริมาณของ AST และ ALT ในพลาสมา
4. วิเคราะห์ความเข้มข้นและปริมาณของเอนไซม์ Alkaline phosphatase ในน้ำดีและในพลาสมา

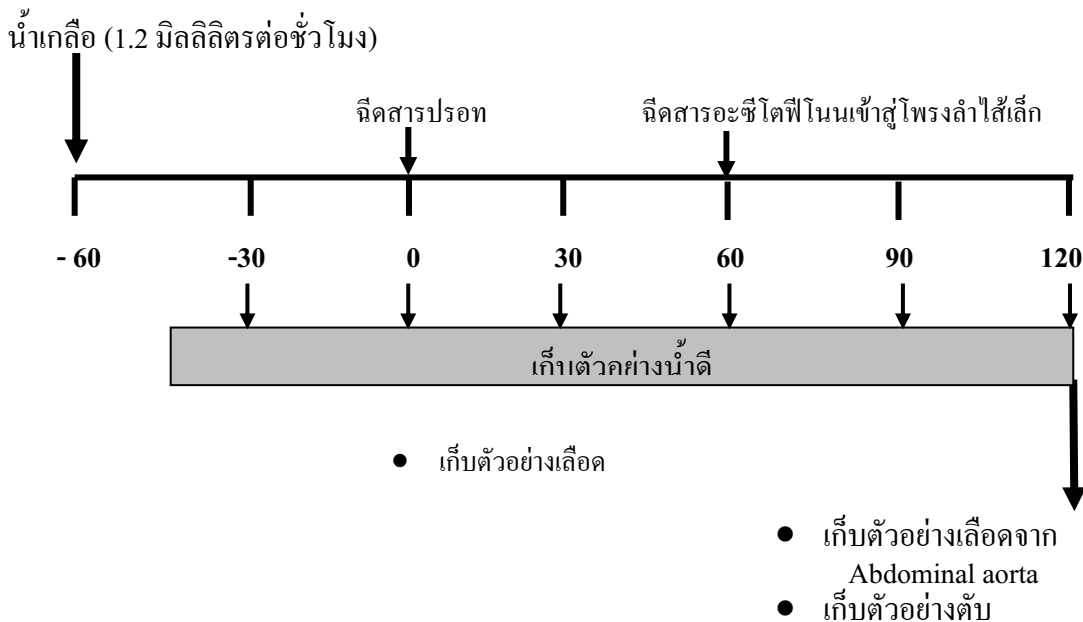
5. วิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ glutathione S-transferase ในตับ

3 การศึกษาบทบาทของสารอะเซโตนิตโรซอโนนต่อการกำจัดสารปรอททั้งทางน้ำดี

เตรียมสัตว์ทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4.2 เลือกขนาดที่เหมาะสมของสารปรอท 1 ขนาดจากข้อ 4.2 มาศึกษา หลังจากสัตว์ทดลองได้รับสารปรอท (MeHg) เป็นเวลา 1 ชม. จะทำการฉีดสารอะเซโตนิตโรซอโนนเข้าสู่โพรงลำไส้ในขนาดต่างๆกัน โดยสารที่จะใช้คือ 2,4,6-Trihydroxyacetophenone (THA) เนื่องจากเป็นสารที่มีความสามารถในการกระตุ้นการหลั่งน้ำดีได้ดีที่สุด

4 การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารอะเซโตนิตโรซอโนนที่มีผลรบกวนต่อการขับทิ้งของสารปรอทออกทางน้ำดี

- ทำการศึกษาโดยใช้สารที่มีฤทธิ์ deplete GSH จากตับ
- ติดตามการขับทิ้งสารปรอทในปัสสาวะ



แผนผัง แสดงระยะเวลาของการให้สารและเก็บตัวอย่างเลือด น้ำดี และตับจากสัตว์ทดลอง

ผลการวิจัย และอภิปรายผล (Results and Discussion)

อัตราการหลั่งน้ำดีในหนู Wistar rat ที่ใช้ในการศึกษามีอยู่ประมาณ 63-65 $\mu\text{L/kg/min}$ การให้สารประกอบอินทรีย์ของปรอทเมทิลเมอร์คิวรี (MeHg) เข้าทาง portal vein มีผลทำให้อัตราการหลั่งน้ำดีลดลงทันที โดยการลดลงแปรจะตามขนาดของ MeHg ที่ได้รับ ณ ที่เวลา 30 นาทีหลังจากได้รับสารปรอทในขนาด 20, 40, 60 และ 80 $\mu\text{mol/kg BW}$ อัตราการหลั่งน้ำดีลดลงไปอยู่ที่ 151.87 ± 1.11 (81.5% of control), 48.15 ± 0.57 (75.7%), 42.11 ± 1.16 (66.2%) และ 37.94 ± 1.71 $\mu\text{L/kg/min}$ (59.7%) ตามลำดับ (รูปที่ 6.1 ก)

ในขณะเดียวกับปริมาณของ GSH อิสระที่ถูกขับออกในน้ำดีลดลง ปริมาณ GSH ที่ลดลงมีความสัมพันธ์กับขนาดของ MeHg ที่ได้รับเพิ่มขึ้น (รูปที่ 1x) และอัตราการหลั่งน้ำดีลดลง

มีหลักฐานว่าตับจับทั้ง MeHg ออกทางน้ำดีโดย MeHg จะฟอร์มเป็น complex กับ GSH ก่อน การที่ GSH ในรูปอิสระลดลง ทั้งในน้ำดีและในตับหลังจากได้รับสาร MeHg อาจเกิดจากการใช้ GSH ฟอร์มเป็น complex กับ MeHg

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณของ MeHg ที่ถูกขับออกทางน้ำดี พบว่าปริมาณปรอทที่ถูกขับออก แปรตามขนาดของ MeHg ที่ฉีดให้สัตว์ทดลอง (รูปที่ 6.2) แต่เมื่อคำนวณเป็นร้อยละของการจับทั้งของสารปรอทสะสมตามระยะเวลาที่ศึกษา พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 120 นาที ร้อยละของการจับทั้งหรือปริมาณปรอทในน้ำดีเทียบกับปริมาณที่ให้ (dose) จะมีค่าลดลงเมื่อให้ปรอทในขนาดที่สูงขึ้น โดยปรอทขนาด 20 และ 80 $\mu\text{mol/kg}$ มีร้อยละของการจับทั้งสะสมอยู่ที่ $12.6 \pm 0.07\%$ และ $4.77 \pm 0.10\%$ ของขนาดที่ให้ตามลำดับ อย่างไรก็ตามอัตราการจับทั้งของปรอทในน้ำดีจะแตกต่างกันในช่วง 30 นาทีแรก หลังจาก 30 นาทีแรกแล้วกลับไม่มีความแตกต่างตามขนาดที่ให้

เมื่อพิจารณาถึงภาวะความเป็นพิษของปรอทต่อตับ ปริมาณของเอนไซม์ AST, ALT และ ALP จากตับที่รั่วออกมาในเลือดเพิ่มขึ้นตามขนาดและระยะเวลาหลังจากได้รับของสารปรอท แสดงถึงความเป็นพิษจากสารปรอทเพิ่มขึ้น ดังตารางที่ 1 ปรอทขนาด 20 $\mu\text{mol/kg}$ BW ทำให้เอนไซม์ต่าง ๆ เหล่านั้นในเลือดเพิ่มขึ้น แต่ไม่มีผลต่อระดับของเอนไซม์ ALP ในน้ำดี ค่าต่าง ๆ ในเลือดมีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างชัดเจน เมื่อเพิ่มขนาดของปรอทจาก 40 $\mu\text{mol/kg}$ BW เป็นต้นไป มีผลให้ดัชนีทุกตัวที่แสดงความเป็นพิษของปรอทต่อตับเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน

การสะสมของสารปรอทในตับ (รูปที่ 6.3) จะเพิ่มขึ้นตามจำนวนของสารที่ให้และมีผลลดปริมาณของ GSH ในตับอย่างชัดเจน และการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ GSH ในตับจะแปรผันตามขนาดของสารปรอท

ดังนั้นสารปรอทขนาด 40 $\mu\text{mol/kg}$ BW นี้ จะนำไปใช้ในการทดลองต่อไป เพื่อทดสอบฤทธิ์ของ THA ในการกำจัดออก

2. ผลของสารกระตุ้นการหลั่งน้ำดี THA ต่อการทำงานของตับที่ได้รับสารปรอท

จากการศึกษาข้างต้นสารปรอทขนาด 40 $\mu\text{mol/kg}$ เป็นขนาดที่มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดอาการพิษต่อตับ และใช้ทดสอบประสิทธิภาพของ THA ในการกำจัดปรอทออกทางน้ำดี ดังรูปที่ 4 เมื่อให้สาร MeHg ขนาด 40 $\mu\text{mol/kg}$ อัตราการหลั่งน้ำดีลดลงเหลือประมาณ 75% ของค่าควบคุม การให้ THA ในขนาด 300 และ 600 $\mu\text{mol/kg}$ สามารถกระตุ้นการหลั่งน้ำดีที่ลดลงที่เกิดจากความเป็นพิษของปรอทได้ คืออัตราการหลั่งน้ำดีเพิ่มขึ้นเป็น 222 และ 256 % ที่ 30 นาทีหลังจากถูกกระตุ้น ถึงแม้ว่าค่าดังกล่าวจะยังต่ำกว่าค่ากลุ่มควบคุมก็ตาม ในกลุ่มควบคุมสารขนาดดังกล่าวจะกระตุ้นน้ำดีได้ที่ 276.54 และ 300.48 % ตามลำดับ

การให้สาร THA เพียงอย่างเดียวเพื่อกระตุ้นการหลั่งน้ำดี มีผลทำให้ปริมาณของ GSH ในน้ำดีลดลง เช่นเดียวกับการให้สารปรอท โดยระดับของ GSH ในน้ำดีเป็นสัดส่วนกลับกับขนาดของ THA และอัตราการหลั่งน้ำดีที่เพิ่มขึ้น การให้สาร THA ในหนูที่ได้รับสารปรอทนั้น ถึงแม้ว่าสาร THA จะสามารถกระตุ้นการหลั่งน้ำดีในสัตว์ทดลองดังกล่าวได้ก็ตาม แต่สาร THA ไปลดระดับของ GSH ในน้ำดีให้ต่ำลงไปอีก (รูปที่ 5) คาดว่าสาร THA อาจจะถูก biotransform ในตับ เกิดเป็น metabolite ที่ conjugate กับ GSH ก่อนที่จะขับทิ้งออกที่ตับ จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้ระดับของ GSH ในน้ำดีลดลงไปอีก และ metabolite ของ THA ที่ conjugate กับ GSH ในน้ำดีอาจเป็นสารพิษที่ทำให้เกิด osmotic driving force ดึงน้ำให้ออกมาในน้ำดี

ตามที่คาดว่าสาร THA มีประสิทธิภาพดีเด่นในการกระตุ้นการหลั่งน้ำดีจะช่วยลดการคั่งของสารพิษพวกโลหะหนัก เช่น ปรอทในตับ โดยเร่งการขับทิ้งออกไปกับน้ำดีนั้น แต่ปรากฏว่าเมื่อศึกษาถึงสภาพความเป็นจริง ในสถานะที่มีสารทั้งสองอยู่ด้วยกัน กลับให้ผลตรงข้าม คือ สาร THA กลับมีผลลดการขับทิ้งสารปรอท ออกทางน้ำดีดังรูปที่ 5 การขับทิ้งสารปรอทมีแนวโน้มลดลงตามขนาดของสาร THA ที่ให้เพิ่มขึ้น

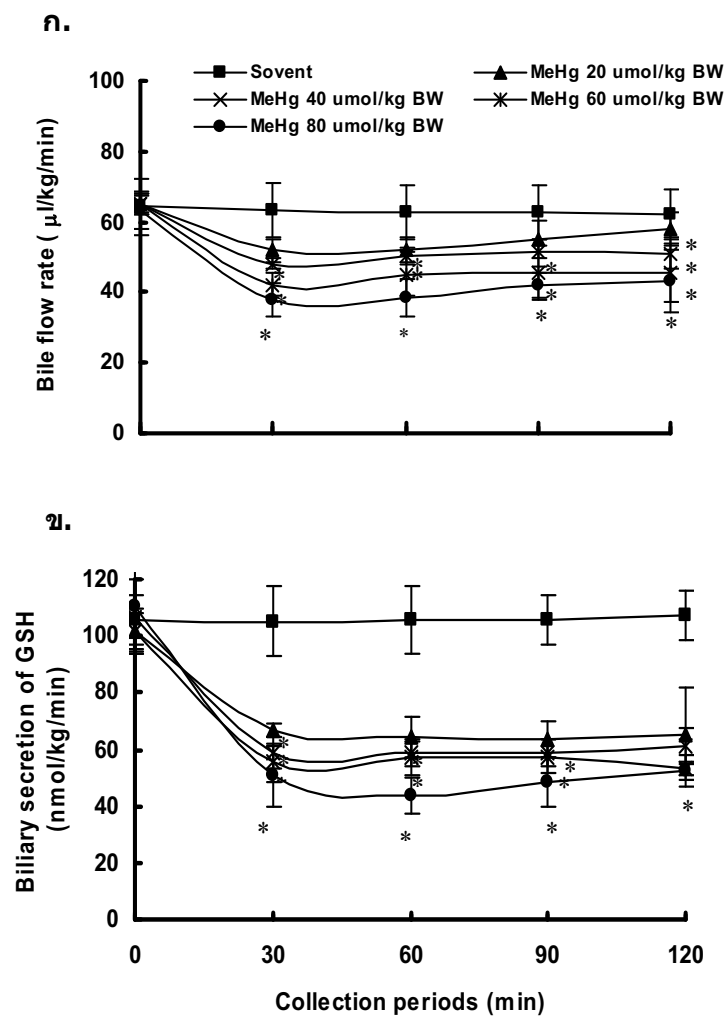
อย่างไรก็ตาม ทั้ง ๆ ที่มีการขับทิ้งลดลงปริมาณของสารปรอทที่สะสมอยู่ในตับไม่ได้เพิ่มขึ้นมากนัก เมื่อเทียบกับการลดลงของการขับทิ้ง ไม่พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) ปริมาณของ GSH ในตับก็เช่นเดียวกันไม่แตกต่างจากกลุ่มปรอทที่ไม่ได้รับสาร THA (รูปที่ 6) นอกจากนี้ยังพบว่า สาร THA มีผลทำให้ activity ของ enzyme glutathione-S-transferase (GST) ในตับเพิ่มขึ้น (รูปที่ 7) ซึ่งเป็นหลักฐานหนึ่ง ที่อาจแสดงว่าสาร THA อาจจะทำให้เกิด biotransform ในตับ โดยกระตุ้นการทำงานของ enzyme GST เกิดเป็น complex ของ THA กับ glutathione

ความสำคัญของ GSH ต่อการกำจัดปรอทออกจากร่างกายสามารถยืนยันได้จากการให้สาร buthionine sulfoximine (BSO) ซึ่งยับยั้งการทำงานของ enzyme γ -glutamyl-cysteine synthetase ซึ่งเป็น rate limiting enzyme ในการสังเคราะห์ GSH หรือ acivicin ซึ่งไปยับยั้งการทำงานของ enzyme γ -glutamyl transferase ที่ canalicular membrane ทำให้ GSH ในน้ำดีไม่ถูกทำลาย เซลล์ตับจะขาด cysteine ที่ใช้ในการสังเคราะห์ GSH ต่อไป พบว่าการให้สารดังกล่าวตัวใดตัวหนึ่งไปจะ deplete glutathione ภายในเซลล์ตับ ระดับ glutathione จะลดลงอย่างมาก อัตราการหลั่งน้ำดีจะลดลง การขับสารปรอทจะลดลงไปด้วย (รูปที่ 6.8, 9)

ในสถานะที่มีการ depletion ของ GSH ในเซลล์ตับนั้น สาร THA ยังสามารถกระตุ้นการหลั่งน้ำดีได้ แสดงว่าฤทธิ์ส่วนหนึ่งของ THA ในการกระตุ้นการหลั่งน้ำดีนั้น ไม่ได้ขึ้นกับการหลั่ง GSH ด้วยสาร THA

เมื่อสาร THA เข้าสู่ตับจำนวนหนึ่งจะ conjugate กับ glucuronide แล้วจึงขับทิ้งออกทางน้ำดี

จากการที่ให้ THA กระตุ้นการหลั่งน้ำดี แต่กลับลดการขับทิ้งของสารปรอทโดยที่ไม่ได้เพิ่มความเข้มข้นให้แก่ตับเลยนั้น คาดว่าร่างกายจะต้องมีกลไกทางอื่นในการกำจัดสารปรอทออกไป จึงได้ติดตามการขับปรอทออกทางปัสสาวะ ซึ่งเป็นอีกทางหนึ่งที่ร่างกายจะขับทิ้งของเสีย พบว่า สาร THA มีฤทธิ์เพิ่มการขับปัสสาวะออกด้วย และยังเพิ่มการขับทิ้งสารปรอทออกทางปัสสาวะดังรูปที่ 10

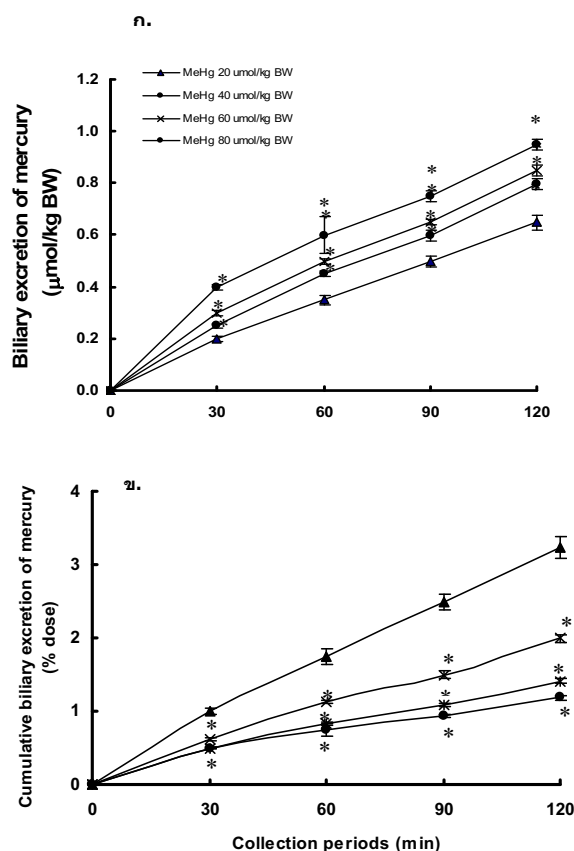


รูปที่ 6.1 Bile flow rate (ก) and biliary secretion of glutathione (GSH) (ข) after a bolus injection of methylmercury chloride (MeHg) into the hepatic portal vein at a dose of 20-80 $\mu\text{mol/kg BW}$. Bile sample was collected in 30-min period for 120 min.

Each point represents mean $\pm$ SEM of 8 rats/group.

* $p < 0.05$ significant difference when compared with the vehicle control at the corresponding time.

ผลจากการวิจัยนี้จะเห็นได้ว่า การที่จะพิจารณาใช้สารใดสารหนึ่ง รวมถึงสารที่มีกำเนิดจากสมุนไพรในการกำจัดสารพิษนั้น มีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องศึกษาให้ได้ข้อมูลที่ชัดเจนของสถานะที่มีสารทั้งสองอยู่ด้วยกันเสียก่อน เพราะสารทั้งสองตัวอาจจะบังเอิญแย่งตัวขนส่งที่จะขับทิ้งออกจากตับ ดังที่พบในการทดลองนี้ ทำให้ร่างกายต้องหันไปใช้การขับออกทางไต ซึ่งอาจจะมีผลในการขับทิ้งของสารมากหรือน้อยกว่าการกำจัดทิ้งออกทางน้ำดี เนื่องด้วยสารปรอทเป็นสารที่มีความสามารถในการจับกับกลุ่ม SH ได้เป็นอย่างดี การขนส่ง complex ของ ปรอทกับ SH ออกทางตับส่วนหนึ่งผ่าน transporter mrp2 ที่ canaliculi เมื่อ transporter มีจำนวนจำกัด การให้ขนาดของสารปรอทที่สูงเกินความสามารถ การขนส่งออกอยู่แล้วนั้น เมื่อมี complex ของสาร THA มาแย่ง ทำให้การขนส่งของ MeHg-SH complex ออกได้น้อยลง จึงต้องหาออกทางอื่น โดยย้อนกลับเข้าสู่ sinusoid และกระแสเลือด เพื่อขับทิ้งที่ไตต่อไป

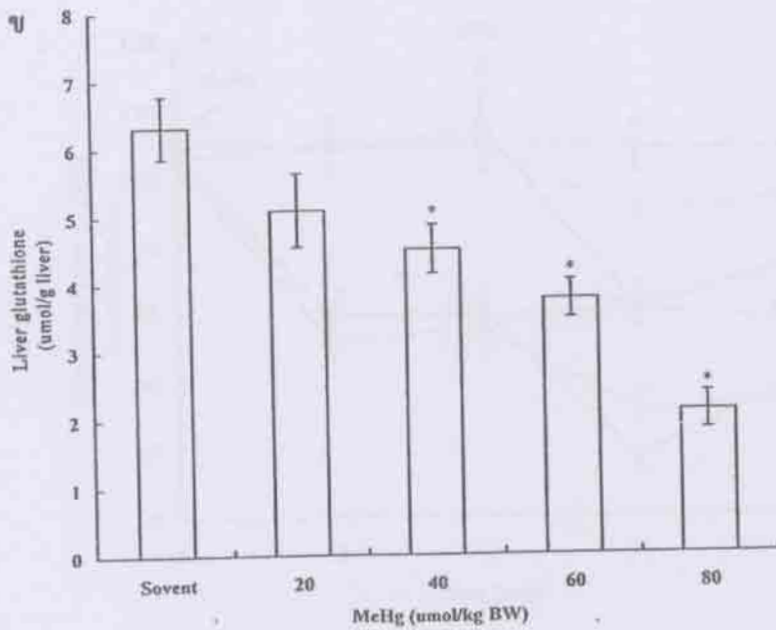
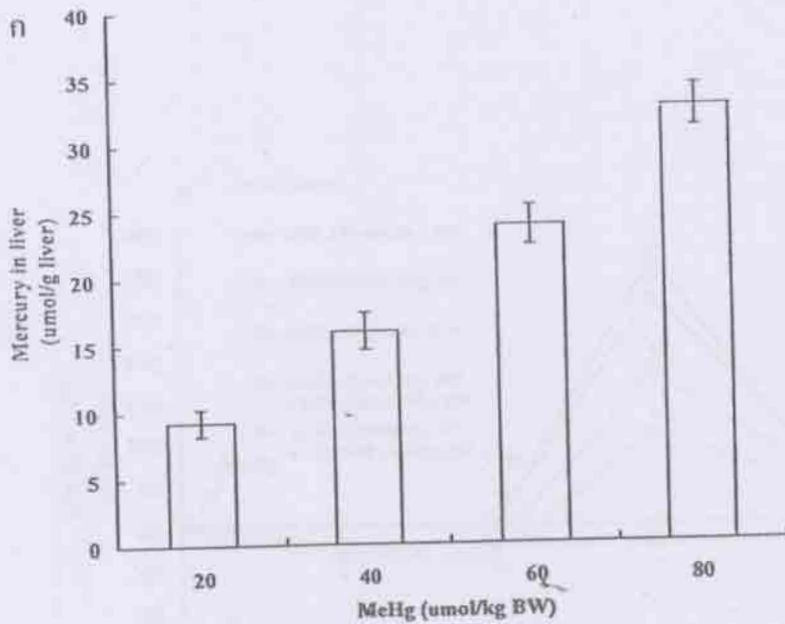


รูปที่ 6.2 Biliary excretion of mercury after a bolus injection of methylmercury chloride (MeHg) into the hepatic portal vein at a dose of 20-80 $\mu\text{mol/kg BW}$. Bile sample was collected in 30-min period for 120 min. Each point represents mean $\pm$ SEM of 8 rats/group.
* $p < 0.05$ significant difference when compared with that treated with MeHg 20 $\mu\text{mol/kg BW}$ at the corresponding time.

ตารางที่ 1 Effect of methylmercury chloride (MeHg) administration on plasma levels of AST, ALT, ALP and Biliary ALP (IU/ml).
The control animals received their respective vehicle. Plasma and bile samples were determined at 30-min periods for 120 min.

Treatment	MeHg (μmol/kg BW)				
	0	20	40	60	80
Before MeHg administration					
Plasma					
AST	65.45 ± 5.51	69.22 ± 2.06	70.61 ± 7.36	67.84 ± 4.31	68.99 ± 4.74
ALT	16.54 ± 3.29	17.39 ± 3.13	17.60 ± 2.31	18.44 ± 2.09	19.54 ± 2.55
ALP	43.49 ± 4.07	43.38 ± 1.80	42.72 ± 1.42	43.49 ± 1.64	44.74 ± 1.45
Bile					
ALP	5.65 ± 0.89	6.07 ± 1.00	6.65 ± 0.85	6.09 ± 1.49	6.08 ± 0.66
60-min after MeHg administration					
Plasma					
AST	68.42 ± 3.08	924.42 ± 93.93*	1679.72 ± 90.80*	1865.04 ± 156.03*	3215.34 ± 213.88*
ALT	16.38 ± 2.09	546.75 ± 107.18*	918.29 ± 126.20*	1182.78 ± 128.10*	1549.54 ± 199.77*
ALP	43.88 ± 2.39	49.79 ± 1.45*	53.18 ± 2.40*	60.64 ± 1.27*	68.89 ± 1.47*
Bile					
ALP	5.91 ± 0.66	7.66 ± 0.45	8.8 ± 0.32*	9.08 ± 0.17*	12.82 ± 0.26*
120-min after MeHg administration					
Plasma					
AST	68.74 ± 3.35	1677.6 ± 176.29*	2348.03 ± 283.84*	2991.00 ± 135.03*	3510.33 ± 509.30*
ALT	15.76 ± 2.51	1482.5 ± 143.19*	1787.85 ± 150.17*	2017.29 ± 213.41*	2296.41 ± 240.81*
ALP	44.69 ± 3.08	55.83 ± 1.60*	60.21 ± 1.78*	64.26 ± 2.50*	75.39 ± 1.84*
Bile					
ALP	6.45 ± 0.74	7.13 ± 0.92	10.57 ± 0.84*	14.83 ± 0.90*	15.29 ± 0.76*

Each value is mean ± SEM of 8 rats/group.
* p< 0.05 significant difference when compared with vehicle control.



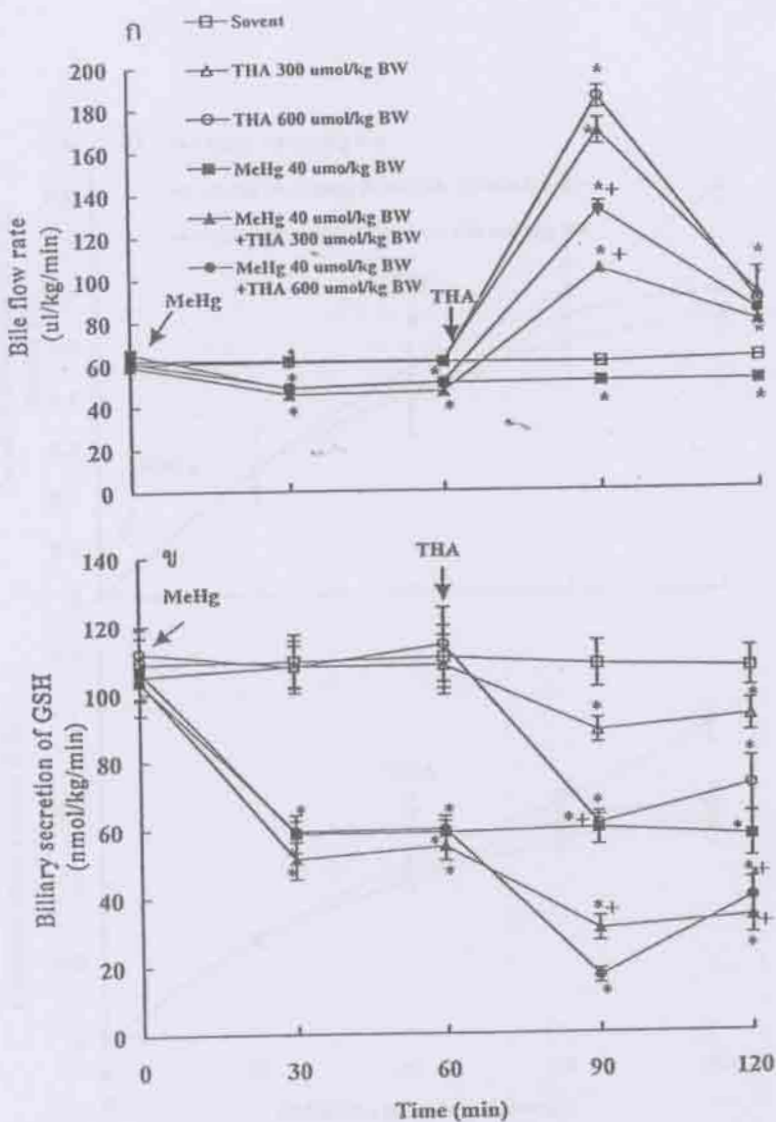
รูปที่ 6.3 (ก) Liver mercury concentration after injection of methylmercury chloride (MeHg) into hepatic portal vein at a dose of 20-80 $\mu\text{mol/kg BW}$.

(ข) Effect of methylmercury chloride (MeHg) on liver glutathione concentration. MeHg was injected into the hepatic portal vein at a dose of 20-80 $\mu\text{mol/kg BW}$.

Liver sample was collected at 120 min after MeHg injection.

Each bar represents mean $\pm$ SEM of 8 rats/group.

* $p < 0.05$ significant difference when compared with vehicle control.

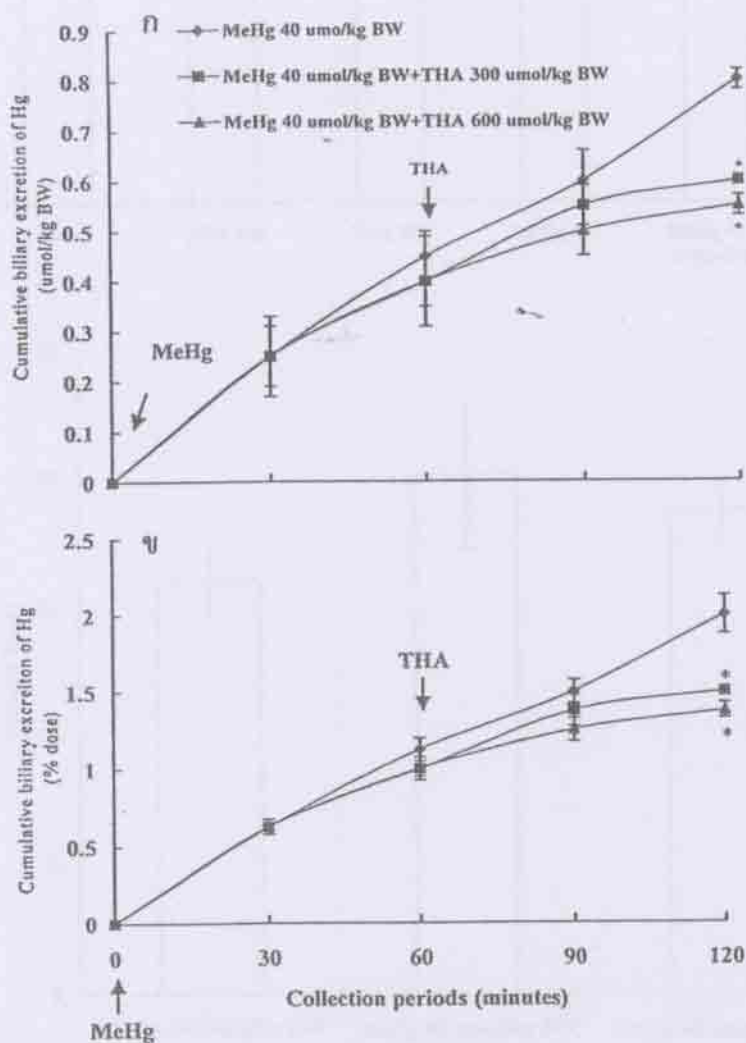


รูปที่ 6.4 Bile flow rate (n) and biliary secretion of glutathione (GSH) (ψ) in rats treated with MeHg (40 μmol/kg BW) before intraduodenal administration of THA (300 or 600 μmol/kg BW). Bile sample was collected in 30-min period for 120 min.

Each point represents mean $\pm$ SEM of 8 rats/group.

*p < 0.05 significant difference when compared with vehicle control.

+p < 0.05 significant difference when compared with the MeHg-treated control at the corresponding time.

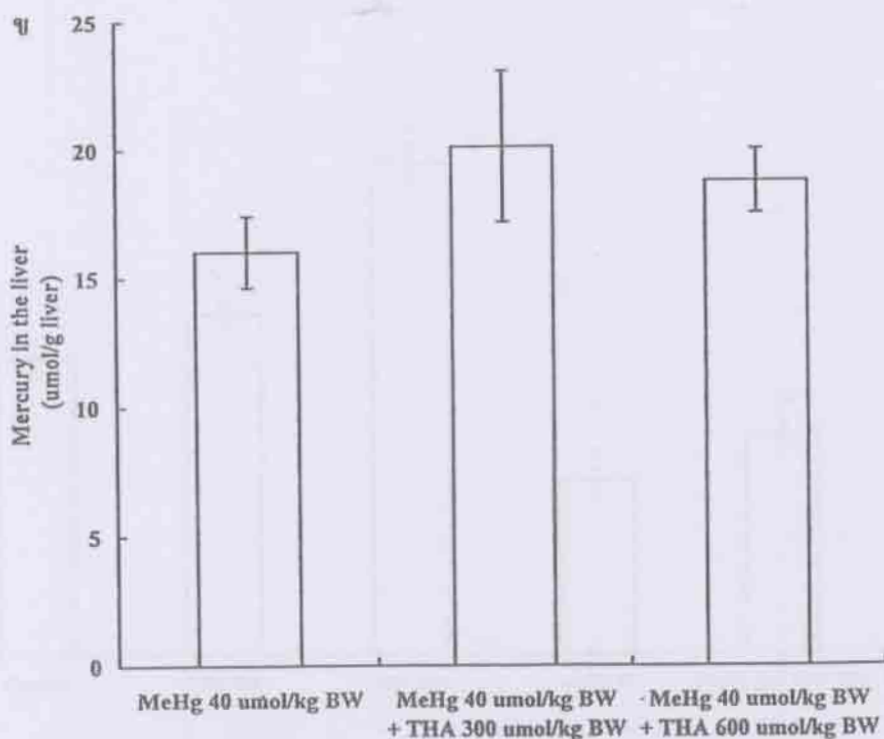
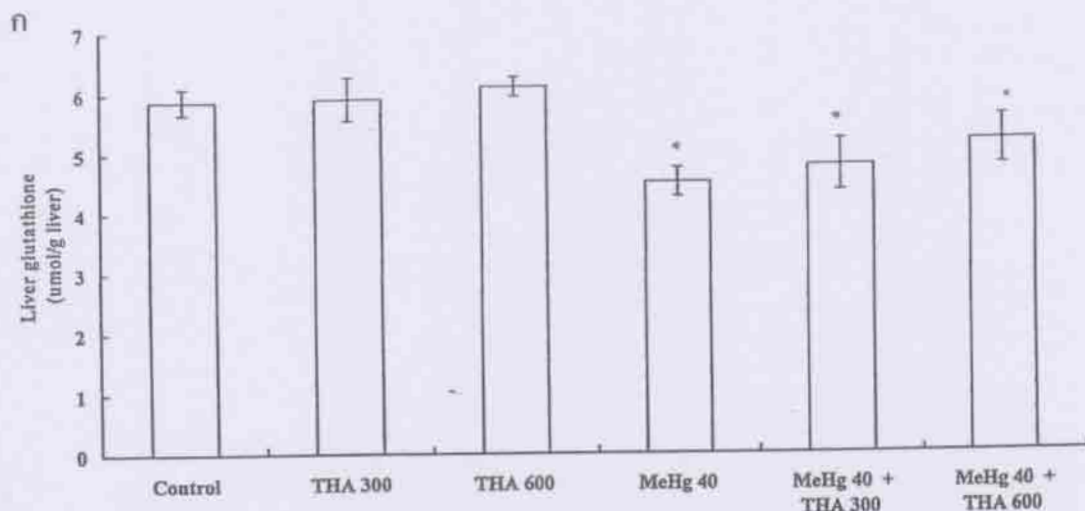


รูปที่ 6.5

The cumulative biliary excretion of mercury in rats treated with MeHg (40 $\mu\text{mol/kg}$ BW) before intraduodenal administration of THA (300 or 600 $\mu\text{mol/kg}$ BW). Bile sample was collected in 30-min period for 120 min.

Each point represents mean $\pm$ SEM of 8 rats/group.

* $p < 0.05$ significant difference when compared with the MeHg-treated rat at the corresponding time.



รูปที่ 6.6(n) Effect of THA (300 or 600 $\mu\text{mol/kg BW}$) administration on liver glutathione concentration in rats treated with MeHg (40 $\mu\text{mol/kg BW}$) at 30 min before intraduodenal administration of THA. The control animals received their corresponding vehicle.

(qj) Effect of THA (300 or 600 $\mu\text{mol/kg BW}$) administration on hepatic mercury concentration in rats treated with MeHg (40 $\mu\text{mol/kg BW}$) at 30 min before intraduodenal administration of THA. The control animals received their corresponding vehicle.

Each bar represents mean $\pm$ SEM of 8 rats/group. Liver sample was collected at the end of experiment, at 120 min after MeHg injection.

* $p < 0.05$ significant difference when compared with the control.

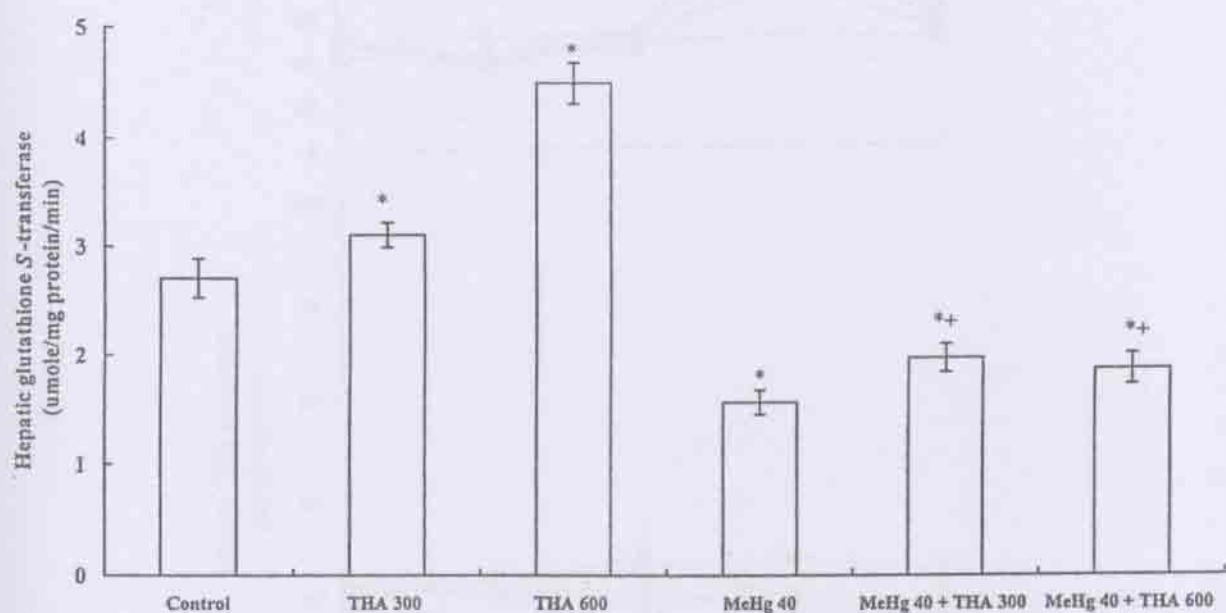
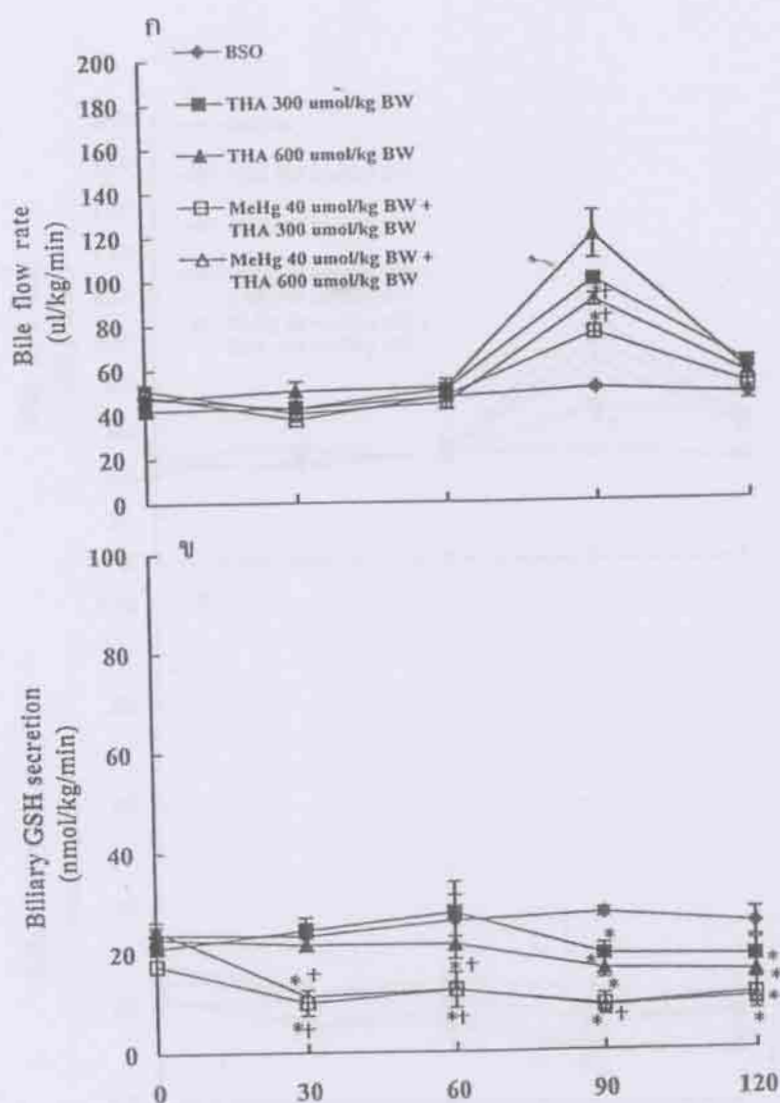


Figure 6.7 Effect of THA (300 or 600 $\mu\text{mol/kg BW}$) administration on hepatic glutathione S-transferase (GST) activity in MeHg-induced hepatotoxicity in adult male rats. GST activity toward CDNB was measured in fresh liver homogenates.

Each bar represents mean $\pm$ SEM of 8 rats/group.

* $p < 0.05$ significant difference when compared with the control group;

+ $p < 0.05$ significant difference when compared with the corresponding THA-control.

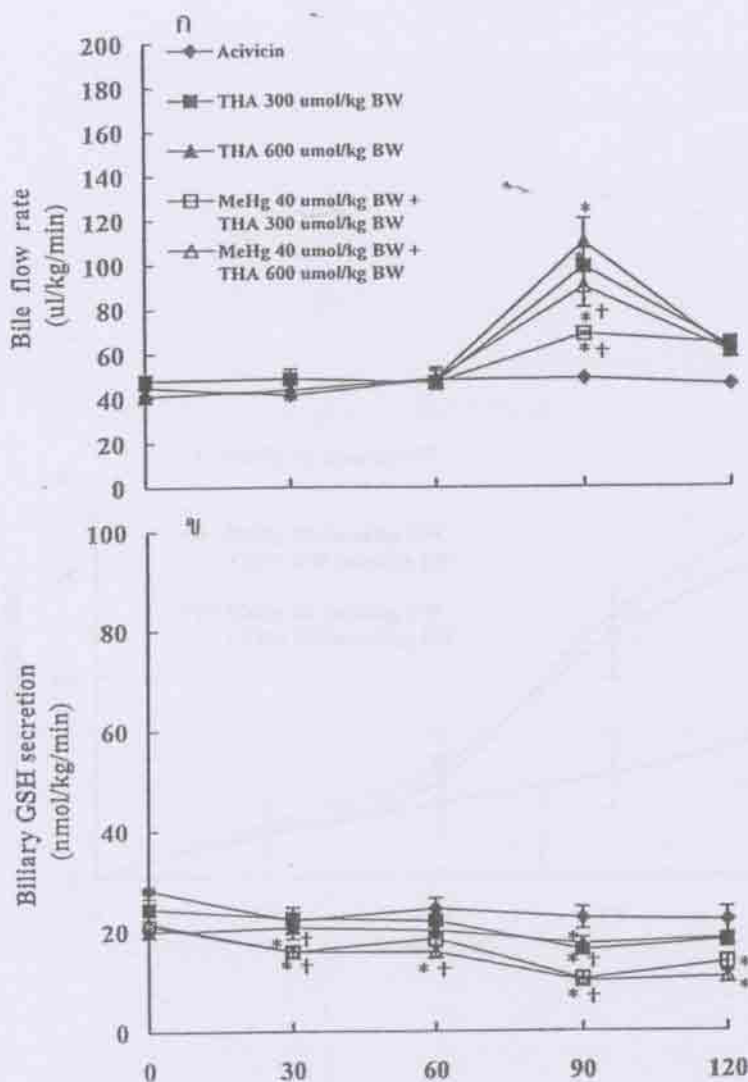


รูปที่ 6.8 The bile flow rate (B) and biliary secretion of glutathione (J) in rats pretreated with BSO before injection of MeHg and intraduodenally administration of THA.

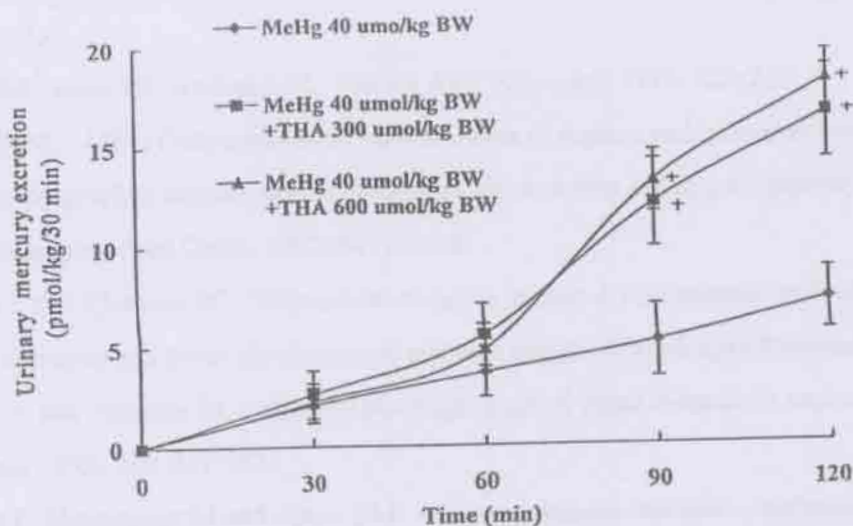
Each point represents mean $\pm$ SEM of 8 rats/group.

* $p < 0.05$ significant difference when compared with BSO at the corresponding time.

+ $p < 0.05$ significant difference when compared with the corresponding THA-treated groups at the corresponding time.



รูปที่ 6.9 The bile flow rate (a) and biliary secretion of glutathione (b) in rats pretreated with acivicin before injection of MeHg and intraduodenally administration of THA. Each point represents mean $\pm$ SEM of 8 rats/group.
 * $p < 0.05$ significant difference when compared with control at the corresponding time.
 + $p < 0.05$ significant difference when compared with the corresponding THA-treated groups at the corresponding time.



รูปที่ 10 Effect of THA administration on the cumulative urinary mercury excretions.

Rats were pretreated with MeHg (40 μ mol/kg BW) at 30th min before intraduodenal administration of THA (300 or 600 μ mol/kg BW). Urine sample was collected in 30-min period for 120 min.

Each point represents mean $\pm$ SEM of 8 rats/group.

+ p < 0.05 significant difference when compared with the MeHg-treated group at the corresponding time.

References:

1. Ashour H, Abdel-Rahman M and Khodair A. The mechanism of methylmercury toxicity in isolated rat hepatocytes. *Toxicol Lett* 1993; 69: 87-96.
2. Ballatori N, Clarkson TW. Biliary secretion of glutathione and of glutathione-metal complexes. *Fundam Appl Toxicol* 1985; 5 (5): 816-31.
3. Ballatori N, Clarkson TW. Biliary transport of glutathione and methylmercury. *Am J Physiol* 1983; 244: G435-G441.
4. Ballatori N, Clarkson TW. Dependence of biliary secretion of inorganic mercury on the biliary transport of glutathione. *Biochem Pharmacol* 1984; 33: 1093-1098.
5. Ballatori N., Anh T. Glutathione as a primary osmotic driving force in hepatic bile formation. *Gastroenterology*. 14, G617-G624, 1992
6. Ballatori N, Truong AT. Multiple canalicular transport mechanisms for glutathione S-conjugates: transport on both ATP-and voltage-dependent carriers. *J Biol Chem* 1995b; 269: 3594-3601.
7. Ballatori N, Truong AT. Mechanisms of hepatic methylmercury uptake. *J Toxicol Environ* 1995c; 46; 343-353.
8. Denny MP, Hare MF, Atchison W. *Toxicol Appl Pharmacol* 1993; 122; 222.
9. Filippelli M., (1987) Determination of trace amounts of organic and inorganic mercury in biological materials by graphite furnace atomic absorption spectrometry and organic mercury speciation by gas chromatography. *Anal Chem*. 1987;59(1):116-8.
10. Gregus Z and Klaassen DC. Disposition of metals in rats: A comparative study of fecal, urinary, and biliary excretion and tissue distribution of eighteen metals. *Toxicol Appl Pharmacol* 1986 85: 24-38.
11. Grosso A and DeSousa BC. Mercury blockage of apical water channels in toad skin (*Bufo marinus*). *J Physiol* 1993; 468; 741-752.
12. Imesch E, Moosmayer M and Anner BM. Mercury weakens membrane anchoring of Na-K-ATPase. *Am J Physiol* 1992; 262; F837-F842.
13. Klaassen CD. Biliary excretion of mercury compounds. *Toxicol Appl Pharmacol* 1975; 33; 356-365.
14. Li L, Meier PJ, Ballatori N. Oatp 2 mediates bidirectional organic solute transport: a role for intracellular glutathione. *Mol Pharmacol* 2000; 58: 335-340.
15. Meredith MJ and Reed DJ. Status of the mitochondria pool of glutathione in the isolated hepatocytes. *J Biol Chem* 1982; 257: 3747-3753.

16. Maulusma CC, van Geer MA, Evers R, Ottenhoff R, Borst PO, Elferink RP. Canalicular multispecific organic anion transporter/multidrug resistance protein 2 mediates low-affinity transport of reduced glutathione. *Biochem J* 1999; 338; 393-401.
17. Sellinger M, Ballatori N and Boyer JL. Mechanism of mercurial inhibition of sodium-coupled alanine uptake in liver plasma membrane vesicles from *Raja erinacea*. *Toxicol Appl Pharmacol* 1991; 107; 369-376.
18. Shenker BJ, Gue TL, Shapiro JM. Induction of apoptosis in human T-cells by methylmercury: temporal relationship between mitochondrial dysfunction and loss of reductive reserve. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999; 157;23.
19. Stacey NH and Klaassen CD. Comparison of the effects of metals on cellular injury and lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes. *J Toxicol Environ Health* 1981; 7: 139-147.
20. Thompson TN and Klaassen CD. Disposition of metals after portal and systemic administration to rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1986; 68; 442-450.
21. Theodorus PM and Helmut S. Assay of Glutathione, Glutathione Disulfide, and Glutathione Mixed Disulfides in Biological Samples. *Methods of Enzymol* 1981; 77: 373-82.
22. Zalupz RK and Lash LH. Toxicology of metals: Interactions between glutathione and mercury in the kidney, liver, and blood. Chang WL Ed, Magos L and Suzuki T Assoc Ed, CRC Press Florida, 1996;

Research Output

1. ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติจากโครงการวิจัยนี้ 6 ชิ้น
ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติแล้ว 3 ชิ้น

Publications

- (1.) Lukmanee Tradtrantip, James L. Boyer, Apichart Suksamrarn, Pawinee Piyachaturawat.
Differential effects of hydroxyacetophenone analogues on the transcytotic vesicular pathway in rat liver. *Eur. J. Pharmacol.* (2006) 2006 Oct 10; 547(1-3):152-159.
- (2.) Chitrawina Mahagita, Khwanchit Tanphichai, Apichart Suksamrarn, Nazzareno Ballatori, Pawinee Piyachaturawat.(2006).4-Hydroxyacetophenone-Induced Cholerisis in Rats is Mediated by the Mrp2-Dependent Biliary Secretion of its Glucuronide Conjugate. *Pharm Res.* Nov;23(11):2603-2610.
- (3.) Jainuch Kanchanapoo, Mrinalini C. Rao, Samaisukh Sophasan, Apichart Suksamrarn, Pawinee Piyachaturawat. Inhibitory effects of choleretic hydroxyacetophenones on ileal bile acid transport in rats. *Life Science* 78 (2006) :1630-1636.

Manuscripts

- (4.) Lukmanee Tradtrantip, Pawinee Piyachaturawat, Carol Soroka, Kathy Harry,Albert Mennone², Chitrawina. Mahagita, Nazzareno Ballatori, and James L. Boyer².Phloracetophenone-Induced Cholerisis in Rats is Mediated Through Mrp2 .
Submitted to Am J. Physiology- Gastroenterology-Liver.
- (5.) Pawinee Piyachaturawat, Supaporn Kongsawat, Aporn Chucharunee Surawat Jariyawat, Krongtong Yoovathaworn and Jutamaad Satayavivad. Modulation of hepatic excretion of methylmercury by choleretic phloracetophenone in rats. In
Preparation to submitted to Tox Letter.
- (6.) Suparat Khamdang, Apichart Suksamrarn, Pawinee Piyachaturawat. Evaluation on the choleretic effect of hydroxyacetophenone on the secreting species of bile acids.
Preparation to submitted to Metabolism.

รวม พิมพ์แล้ว 3 เรื่อง อยู่ระหว่างดำเนินการ 3 เรื่อง

2. หนังสือ:

3. รางวัล: รางวัลผลงานวิจัยสาขาวิทยาศาสตร์ เคมีเภสัช จากสภาวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2546

(รางวัลชมเชย) เรื่อง “ว่านชักมดลูกกับแนวทางการพัฒนาใหม่เพื่อลดไขมันในเลือด และลดการคั่งของน้ำดีในตับ” “*Curcuma comosa* Roxb. and strategies for development of new drugs for lowering plasma lipids and attenuation of cholestasis.” ธีรารังวัล กุมภพันธ์ 2547

4. การเสนอผลงานวิจัยในที่ประชุมวิชาการ

4.1. การเสนอผลงานวิจัยในที่ประชุมวิชาการในประเทศไทย

4.1.1. Mahagita C., Piyachaturawat P, Stimulating effect of 4-Monohydroxy acetophenone on bile acid independent secretion: Analysis of biliary components.

Abstract # S3-P11 RGJ-Ph.D. Congress VI, 28-30 เมษายน 2548

4.1.2. Lukmanee Tradtrantip, James L. Boyer, Apichart Suksamrarn, Pawinee Piyachaturawat Mechanism of phloracetophenone on bile secretion in rats. ประชุมวิชาการสรีรวิทยาสมาคมแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 35 ประจำปี 2549 วันที่ 3-5 พฤษภาคม 2549 ณ โรงแรมเซ็นทรัล ดวงตะวัน อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ Abstract

4.2. การเสนอผลงานวิจัยในที่ประชุมวิชาการนานาชาติในต่างประเทศ

4.2.1. **Piyachaturawat P**, Kongsawat S, Jariyawat S.

Inhibition on hepatobiliary excretion of methylmercury by a choleric phloracetophenone in rats *FASEB J* 18 (4): A696-A697 Suppl. S MAR 23 2004 บทคัดย่อ นำผลงานวิจัยเข้าเสนอในที่ประชุมวิชาการ Experiment Biology-2004 meeting วันที่ 17-21 เมษายน 2547 เมืองวอชิงตัน ดีซี ประเทศสหรัฐอเมริกา

4.2.2.- Piyachaturawat P, Khamdang S, Suksamrarn A

Evaluation on the choleric effect of hydroxy acetophenones on the secreting species of bile acids *FASEB JOURNAL* 19 (4): A749-A749 Part 1 Suppl. S MAR 4 2005 บทคัดย่อ นำผลงานวิจัยเข้าเสนอในที่ประชุมวิชาการ Experiment Biology-2005 meeting ณ กรุง San Diego ในเดือนเมษายน 2548

4.2.3. - Lukmanee Tradtrantip¹, Aporn Chuncharunee², Pawinee Piyachaturawat¹

Modulating effect of Hydroxyacetophenone on hepatobiliary excretion of horseradish peroxidase in rats. *FASEB JOURNAL* 20 (5): A1278-A1278 Part 2

4.3. การสร้างนักวิจัย

ก. ระดับปริญญาโท (พิษวิทยา) 1 คน (ปีที่จบและหัวข้อวิทยานิพนธ์)

- พ.ศ. 2547 น.ส. สุภาพร คงสวัสดิ์ A study of the effect of phloracetophenone on biliary excretion of methylmercury in rats ปัจจุบันเป็นอาจารย์คณะสหเวช มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ จ. นครศรีธรรมราช อยู่ระหว่างรับทุนศึกษาต่อระดับป.เอก ที่ประเทศอังกฤษ

ข. ระดับปริญญาเอก 3 คน (ปีที่จบและหัวข้อวิทยานิพนธ์)

- พ.ศ. 2547 นาง สุภารัตน์ คำแดง (จันทร์เหลือง) A study of the choleretic effect of acetophenones and its interactions with organic anion transporters in comparison with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. ปัจจุบันเป็นอาจารย์คณะเภสัชศาสตร์ ม. อุบล
- พ.ศ. 2548 น.ส. ใจนุช กาญจนภู Effect of phloracetophenone on the intestinal transport of bile acids in rats. ปัจจุบันเป็นอาจารย์คณะเภสัชศาสตร์ ม. อุบล
- พ.ศ. 2549 น.ส. ลักษณมณี ตราดธารทิพย์ เรื่อง Study of a cellular mechanism of phloracetophenone and its analogues on bile secretion in rats ปัจจุบันทำ postdoc เกี่ยวข้องกับ Drug Discovery ที่ Univ of California at San Francisco (UCSF)
- พ.ศ. 2550- น.ส. จิตรวิภา มหาคีตะ อยู่ในช่วงการศึกษา และทำวิจัยที่ University of Rochester, NY, USA.

4.4 ผลงานอื่นๆนอกเหนือจากทุน

รับเชิญเป็นวิทยากรในสถาบันต่างประเทศ

1. วิทยากรให้สัมมนาเรื่อง Choleretic activities of Curcuma comosa, Department of Physiology College of Medicine, U. of Illinois วันที่ 13 เมษายน 2547 เมืองชิคาโก ประเทศสหรัฐอเมริกา
2. วิทยากรให้สัมมนาทางวิชาการในงาน “Frontiers of GI Research Seminars” เรื่อง The modulation of hepatobiliary excretion of methylmercury by a choleretic phloracetophenone in rats”, Department of Medicine, Clinical Sciences Building, U. of Illinois วันที่ 14 เมษายน 2547 เมืองชิคาโก ประเทศสหรัฐอเมริกา

3. วิทยากรให้สัมมนาเรื่อง Different choleretic effects of hydroxyacetophenone analogs.
Dept. of Environmental Medicine, NIEHS Environmental Health Science Center. U. of
Rochester. วันที่ 13 เมษายน 2549 เมือง Rochester ประเทศสหรัฐอเมริกา

4.5. ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์อื่นๆ

1. Khamdang S, Takeda M, Babu E, Noshiro R, Onozato ML, Tojo A, Enomoto A, Huang XL, Narikawa S, Anzai N, **Piyachaturawat P**, Endou H. (2003). Interaction of human and rat organic anion transporter 2 with various cephalosporin antibiotics. *Eur J Pharmacol.* 28;465(1-2):1-7.
2. Khamdang S, Takeda M, Shimoda M, Noshiro R, Narikawa S, Huang XL, Enomoto A, **Piyachaturawat P**, Endou H. Interactions of human- and rat-organic anion transporters with pravastatin and cimetidine. *J Pharmacol Sci.* 2004 Feb; 94 (2):197-202
3. Charoenteeraboon J, Nithipatikom K, Campbell WB, **Piyachaturawat P**, Wilairat P, Rongnoparut P. Induction of human cholesterol 7alpha-hydroxylase in HepG2 cells by 2,4,6-trihydroxyacetophenone. *Eur J Pharmacol.* 2005 May 16; 515 (1-3):43-6.
4. Devakul Na Ayutthaya, W., Pramyothin, P., **Piyachaturawat, P.**, Ekataksin, W., Chavalittumrong, P., Chivapat, S., Caichantipyuth, C. (2005). Hepatotoxic effect of barakol in mice. *J of Trad. Med.* 22 (1): 9-14.
5. Sathaporn Prutipanlai, Sukumal Chongthammakun, **Pawinee Piyachaturawat**, Orapin Wongsawatkul, Piyajit Watcharasit, Jutamaad Satayavivad. Effect of Permethrin on muscarinic cholinergic receptors in mouse striatum. In: International Proceeding "New Trends in Alzheimer and Parkinson Related Disorders: ADPD 2005
6. Jantaratnotai N., Utaisincharoen, P., **Piyachaturawat, P.**, Chongthammakun, S., Sanvarinda, Y. Inhibitory effect of Curcuma comosa on NO production and cytokine expression in LPS-activated microglia. *Life Sci.* 2006 Jan 2;78(6):571-7.
7. Weihrauch D, Kanchanapoo J, Ao M, Prasad R, **Piyachaturawat P**, Rao MC. Weanling, but not adult, rabbit colon absorbs bile acids: Flux is linked to expression of putative bile acid transporters. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006 Mar;290(3):G439-50.

5. ความเชื่อมโยงกับนักวิชาการอื่นๆทั้งในและต่างประเทศ

- มีความร่วมมือกับนักวิชาการในประเทศ ได้แก่ ศ. ดร. อภิชาติ สุขสำราญ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง

- มีความเชื่อมโยงกับนักวิชาการต่างประเทศได้แก่

ก. **Prof. Dr. Mrinalini C. Rao.**, Department of Physiology and Biophysics, College of Medicine, University of Illinois at Chicago ให้ความร่วมมือในข้อมูลการศึกษาเกี่ยวกับ Ileal bile acid transporter ในลำไส้

ข. **Prof. James L. Boyer**, Director, Liver Center School of Medicine, Yale University. ให้ความร่วมมือในการศึกษาเกี่ยวกับกลไกการขับกรดน้ำดีของตับ โดยเฉพาะ Technique การวิจัยที่เป็น Isolated perfused liver, Immunohistochemistry , Bile Couplet และ Sandwich culture model

ค. **Prof. Dr. Ned Ballatori**, Department of Environmental Medicine, Director, Molecular Toxicology and Environmental Medicine Graduate Program, University of Rochester School of Medicine, Rochester, NY ให้ความร่วมมือในการศึกษาเกี่ยวกับการใช้หนูที่ขาดตัวขนส่ง Mrp2 (TR- rat)

จ. **Prof. Dr. Hitoshi Endou**, Department of Pharmacology and Toxicology, Kyorin University, Tokyo, Japan ให้ความร่วมมือในการศึกษาเกี่ยวกับบทบาทของสารต่อการขนส่งเข้าสู่เซลล์ด้วย transporter

ลงนาม _____

(ศ.ดร.ภาวิณี ปิยะจตุรวัฒน์)

ภาคผนวก:

ผลงานวิจัยตีพิมพ์ระดับนานาชาติ และ Manuscript

Publications

- (1.) Lukmanee Tradtrantip, James L. Boyer, Apichart Suksamrarn, Pawinee Piyachaturawat.
Differential effects of hydroxyacetophenone analogues on the transcytotic vesicular pathway in rat liver. *Eur. J. Pharmacol.* (2006) 2006 Oct 10; 547(1-3):152-159.
- (2.) Chitrawina Mahagita, Khwanchit Tanphichai, Apichart Suksamrarn, Nazzareno Ballatori, Pawinee Piyachaturawat.(2006).4-Hydroxyacetophenone-Induced Choleresis in Rats is Mediated by the Mrp2-Dependent Biliary Secretion of its Glucuronide Conjugate. *Pharm Res.* Nov;23(11):2603-2610.
- (3.) Jainuch Kanchanapoo, Mrinalini C. Rao, Samaisukh Sophasan, Apichart Suksamrarn, Pawinee Piyachaturawat. Inhibitory effects of choleretic hydroxyacetophenones on ileal bile acid transport in rats. *Life Science* 78 (2006) :1630-1636.

Manuscripts

- (4.) Lukmanee Tradtrantip, Pawinee Piyachaturawat, Carol Soroka, Kathy Harry,Albert Mennone², Chitrawina. Mahagita, Nazzareno Ballatori, and James L. Boyer².Phloracetophenone-Induced Choleresis in Rats is Mediated Through Mrp2 .
Submitted to Am J. Physiology- Gastroenterology-Liver.

Differential effects of hydroxyacetophenone analogues on the transcytotic vesicular pathway in rat liver

Lukmanee Tradtrantip^{a,b}, James L. Boyer^b, Apichart Suksamram^c, Pawinee Piyachaturawat^{a,*}

^a Department of Physiology, Faculty of Science, Mahidol University, Rama 6 Road, Bangkok, Thailand

^b Liver Center, Yale University School of Medicine, New Haven, CT, USA

^c Department of Chemistry, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University, Bangkok Thailand

Received 18 February 2006; received in revised form 8 June 2006; accepted 13 July 2006

Available online 25 July 2006

Abstract

Insertion of transporter proteins into the apical canalicular membrane via vesicular transport is one of several choleretic mechanisms. Based on different choleretic activities of hydroxyacetophenone analogues including 4-mono; 2,6-di and 2,4,6-trihydroxy-acetophenone (MHA, DHA and THA), the present study aims to determine if these compounds stimulated vesicular transport in hepatocytes. Hydroxyacetophenone was continuously infused into the duodenum of the bile fistula rat. Bile flow rate was allowed to stabilize and then followed by an intraportal injection of horseradish peroxidase, a marker of the transcytotic vesicle pathway. MHA which stimulates bile acid independent flow, showed a dose-dependent increase in both the early (paracellular) and late (transcellular) peak of horseradish peroxidase excretion in bile. THA, which stimulates both bile acid dependent flow and bile acid independent flow, did not alter the pattern of horseradish peroxidase excretion into bile. However, DHA, which is more hydrophobic and increases only bile acid dependent flow, decreased the late peak. The stimulating effects of MHA on bile flow and horseradish peroxidase excretion were markedly inhibited by colchicine, suggesting that its choleretic action involves stimulation of exocytosis, as well as increase in paracellular permeability. In contrast, the lack of a stimulatory effect of THA and DHA on biliary horseradish peroxidase excretion suggested that their choleretic action is not associated with vesicular exocytosis. These results demonstrate a variable effect of hydroxyacetophenones on the transcytotic vesicular pathway reflecting different choleretic mechanisms and therapeutic potential.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Colchicine; Hydroxyacetophenone; Horseradish peroxidase; Vesicular transport

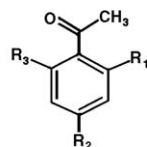
1. Introduction

The secretion of bile is essential for excretion of endogenous and exogenous substances and the intestinal digestion and absorption of dietary lipids. Hepatic bile formation consists of a bile acid dependent fraction, which results from the excretion of bile acid from hepatocytes and a bile acid independent fraction which results from the excretion of glutathione (GSH), and other inorganic and organic solutes (Ballatori and Truong, 1989; Nathanson and Boyer, 1991; Trauner and Boyer, 2003). The bile secretory process is also regulated by endocytotic retrieval and exocytotic insertion of an intracellular pool of vesicles into and out of the apical canalicular membrane domain (Benedetti et al., 1994; Boyer and Soroka, 1995; Crawford, 1996; Kubitz et al., 2005).

Taurocholate, an endogenous choleretic bile acid stimulates this transcytotic vesicular pathway as demonstrated by labeling with horseradish peroxidase in studies in intact animals, isolated hepatocyte couplets and isolated perfused rat livers (Hayakawa et al., 1990b; Beuers et al., 1993; Boyer and Soroka, 1995). Studies using colchicine, an inhibitor of microtubule polymerization, suggest that the transcytotic vesicular pathway is dependent on the normal function of microtubules (Haussinger et al., 1993; Crawford et al., 1994). More recent studies suggest that this pathway regulates the bile secretory process through the insertion of vesicles containing transport proteins into the apical canalicular domain (Beuers et al., 1993; Benedetti et al., 1994; Boyer and Soroka, 1995). This pathway can also be stimulated by cyclic AMP (Boyer and Soroka, 1995; Seino and Shibasaki, 2005) and hypoosmolarity (Bruck et al., 1992) and is impaired in disorders of cholestasis (Gregory et al., 1998; Beuers et al., 2001). Imbalance of the retrieval/insertion of an intracellular pool of vesicles

* Corresponding author. Tel./fax: +66 2 3547154.

E-mail address: scppy@mahidol.ac.th (P. Piyachaturawat).



Compound	R ₁	R ₂	R ₃
(1). 4-OH-acetophenone	H	OH	H
(2). 2,6-(OH) ₂ -acetophenone	OH	H	OH
(3). 2,4,6-(OH) ₃ -acetophenone	OH	OH	OH

Fig. 1. Chemical structure of acetophenone analogues.

containing transporter into and out of the apical membrane may contribute to a number of pathological condition including cholestasis (Trauner and Boyer, 2003). In estradiol-17 β -D-glucuronide induced cholestasis, an insufficient number of transporters on the membrane was associated with a rapid endocytotic internalization of the multispecific resistance-associated protein 2 (Mrp2) (Mottino et al., 2002) and bile salt export pump (Bsep) (Crocenzi et al., 2003). Therefore, any substance which could reduce the rate of endocytotic retrieval or enhance the insertion of transporters at canalicular membrane would have the potential to attenuate the pathogenesis of cholestasis.

Hydroxyacetophenones, a group of compounds which consists of several analogues, are found in medicinal herbs such as *Artemisia capillaries* (Okuno et al., 1988), *Artemisia scoporia* (Zhang and Zhang, 1989), barley tea (Etoh et al., 2004) and *Curcuma comosa* (Suksamram et al., 1997). Earlier studies on the relationship between the chemical structure of hydroxyacetophenone analogues and their choleric activities showed that compounds with similar structures had significantly different activities and effects on bile composition (Piyachaturawat et al., 2000). Among choleric hydroxyacetophenones, 4-mono hydroxyacetophenone (MHA) only induced an increase in bile acid independent flow, while 2,6-dihydroxyacetophenone (DHA) induced only bile acid dependent flow (Piyachaturawat et al., 2000, 2001). THA, which appears to be the most effective choleric agent, induced both bile acid dependent flow and bile acid independent flow (Piyachaturawat et al., 2000). They also had different effects on ileal bile acid absorption (Kanchanapoo et al., 2006). Since insertion of transporter proteins into the canalicular membrane via vesicular transport is an important choleric mechanism, the present study aims to evaluate the effects of these three different choleric hydroxyacetophenones on vesicular transport using horseradish peroxidase, a known marker of the transcytotic vesicular pathway (Lowe et al., 1985; Larocca et al., 1999). The current study demonstrates that hydroxyacetophenones have different effects on horseradish peroxidase excretion and support involvement of vesicular exocytosis as a mechanism for formation of bile acid independent flow particularly by MHA.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

2,4,6-trihydroxyacetophenone (THA) and 4-mono hydroxyacetophenone (MHA) were purchased from Fluka Chemie

AG (Buchs, Switzerland). 2,6-dihydroxyacetophenone (DHA) was purchased from Aldrich Co. Inc. (WI, USA). Taurocholate, purified horseradish peroxidase type II, 4-aminoantipyrine and colchicine were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Hydrogen peroxide was purchased from Merck Schuchardt OHG (Hohenbrunn, Germany).

2.2. Animals and treatments

Adult male Wistar rats (250–280 g) were supplied by the National Animal Center, Salaya, Mahidol University, Nakornprathom, Thailand. All animals were housed in temperature controlled rooms at 25 $\pm$ 2 °C, with a relative humidity of approximately 65%, and a 12-h light–dark cycle. They were fed regular rat chow and tap water *ad libitum*. Prior to each experiment, animals were fasted overnight and allowed free access to water. They were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg body weight, i.p.) and a tracheostomy was performed to facilitate breathing. The common bile duct and femoral vein were cannulated with polyethylene tubing, for collection of secreted bile and for infusion of normal saline at

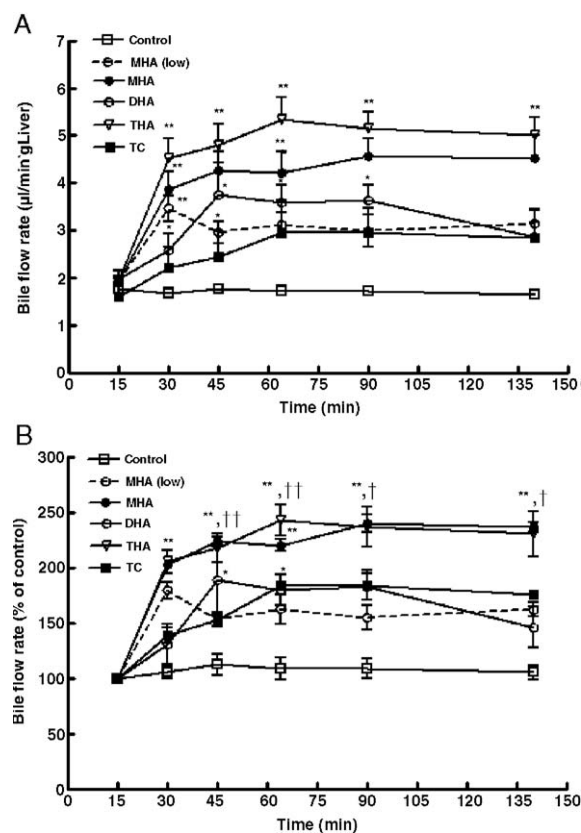


Fig. 2. Effect of hydroxyacetophenones (MHA, DHA, THA) and taurocholate on actual bile flow rates (A) and bile flow rate (% of control) (B). The hydroxyacetophenone compound was continuously infused into the duodenum at a dose of 16 μ mol/min/kg after giving an initial dose of 250 μ mol/kg into the duodenum. Low dose of MHA was continuously infused at a dose of 8 μ mol/min/kg after a bolus injection of 125 μ mol/kg. Taurocholate was continuously infused into femoral vein at a dose of 0.6 μ mol/min/kg. Values are means $\pm$ S.E.M. from 4 to 5 animals. * P <0.05 and ** P <0.01 significant difference from control at the corresponding time. † P <0.05 and †† P <0.01 significant difference from low dose of MHA at the corresponding time.

the rate of 1.2 ml/h, respectively. Body temperature was maintained at 37 ± 0.5 °C with a heat lamp in order to prevent hypothermic alterations in bile secretion. The experimental protocol was approved by the Institute ethics committee and complies with the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals (CIOMS/WHO).

2.3. Effect of hydroxyacetophenones on horseradish peroxidase excretion in bile

Animals were divided into control and hydroxyacetophenones treated groups. Bile samples were collected in pre-weighed tubes at 15-min intervals. After collection of control samples, hydroxyacetophenones (Fig. 1A–B) were injected intraduodenally with an initial bolus of 125 or 250 $\mu\text{mol/kg}$ body weight and then continuously infused into the duodenum at a rate of 8 or 16 $\mu\text{mol/min/kg}$ body weight. Bile flow rate was allowed to stabilize for 45 min, and horseradish peroxidase at a dose of 0.5 mg/100 g body weight was injected into portal vein over a 15-s interval. After the horseradish peroxidase injection, bile samples were collected every 2 min for 10 min, 5 min for 30 min, and 10 min for 40 min, respectively. Bile flow rate was determined gravimetrically, assuming a bile density of 1.0 g/ml. Biliary horseradish peroxidase excretion was subsequently

determined. As a positive control, taurocholate was infused continuously into a femoral vein at a dose of 6 $\mu\text{mol/min/kg}$ body weight, followed by the horseradish peroxidase injection.

2.4. Effect of colchicine pretreatment on choleresis of MHA

To evaluate the effect of colchicine on horseradish peroxidase excretion during infusions of 4-mono hydroxyacetophenone (MHA), rats were pretreated with an intravenous injection of colchicine (2 mg/kg body weight) into the femoral vein 2.5 h prior to the surgery for bile collection. Horseradish peroxidase was then injected after bile flow reached a steady state following administration of MHA. The biliary excretion of horseradish peroxidase was compared to colchicine treated animals without MHA administration.

2.5. Determination of biliary horseradish peroxidase excretion

The concentration of horseradish peroxidase in bile was determined by measuring the rate of oxidation of 4-aminoantipyrine at 510 nm as previously described (Worthington, 1972). The biliary horseradish peroxidase excretion was calculated and expressed as ng/min/g liver after establishing a standard curve. The cumulative horseradish peroxidase output was also

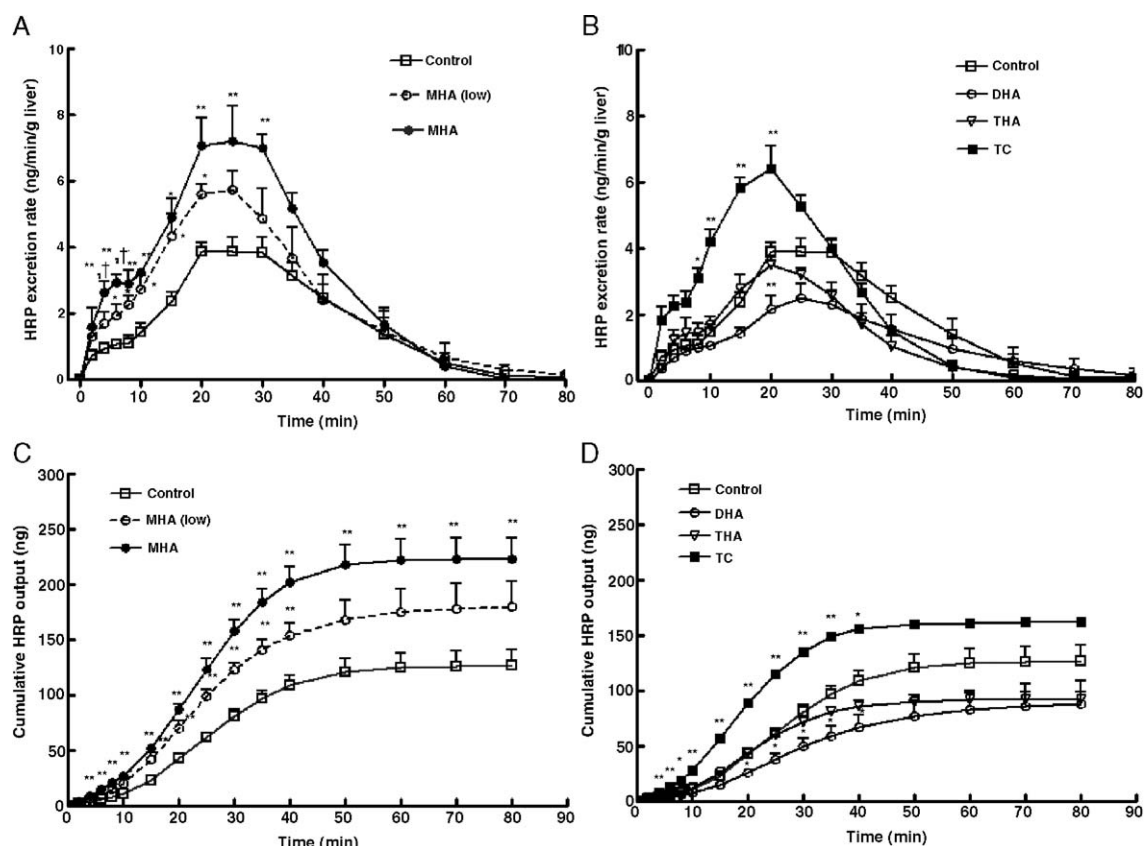


Fig. 3. Effect of hydroxyacetophenones and taurocholate on biliary horseradish peroxidase excretion (A) MHA infusion at low and high doses were continuously infused into the duodenum and allowed to stabilize for 45 min before injection of horseradish peroxidase at a dose of 0.5 mg/100 g body weight into the portal vein; (B) effect of DHA, THA and taurocholate infusion on the biliary horseradish peroxidase excretion; (C) effect of MHA on the cumulative horseradish peroxidase excretion in bile; (D) effects of DHA, THA and taurocholate on the cumulative horseradish peroxidase excretion in bile. Values are means $\pm$ S.E.M. from 4 to 5 animals. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ significant difference from control at the corresponding time. † $P < 0.05$ significant difference from low dose of MHA at the corresponding time.

analyzed from the area under the biliary horseradish peroxidase excretion curve.

2.6. Statistical analysis

All data were expressed as mean $\pm$ S.E.M. The significance of the difference among groups was analyzed using analysis of variance (ANOVA), followed by Student–Newman–Keul's test. Statistical significance was considered at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Effect of hydroxyacetophenones on bile flow rate

Previous studies indicate that a single intraduodenal injection of the hydroxyacetophenones results in an immediate but transient increased in bile flow (Piyachaturawat et al., 1998). To examine the effect of hydroxyacetophenones on horseradish peroxidase excretion, horseradish peroxidase was administered when bile flow was maintained in a steady state by continuous hydroxyacetophenone infusions. As shown in Fig. 2A–B, both MHA and THA doubled the bile flow rate and reached a steady state at 30 min after administration (loading dose of 250 μ mol/kg and infusion rate of 16 μ mol/min/kg). MHA and THA increased bile flow rate to $224.0 \pm 4.5\%$ and $218 \pm 13\%$ of control values, respectively. DHA, the more hydrophobic analogue, had less effect, increasing bile flow rate to $188.8 \pm 33.0\%$ of the control values (Fig. 2B). Taurocholate infusion (6 μ mol/min/kg i.v.) was employed as a positive control, and significantly increased bile flow rate to $184 \pm 3\%$ of control values reaching a steady state at about 60 min. When a lower dose of MHA was infused (loading dose of 125 μ mol/kg and subsequent infusion at a dose of 8 μ mol/min/kg) bile flow rate increased to only $153.0 \pm 6.5\%$ of control, demonstrating a dose related effect.

3.2. Effect of hydroxyacetophenones on biliary excretion of horseradish peroxidase

To assess the effect of hydroxyacetophenones on vesicular exocytosis, a 15-s pulse of horseradish peroxidase, a marker of the transcytotic vesicle and paracellular pathway, was injected into the portal vein and its biliary excretion was then analyzed. As shown in Fig. 3A, in control rats, two peaks of horseradish peroxidase excretion appear in bile, the first at 4–8 min and the second 20–30 min after injection. Administration of MHA at the lower dose significantly enhanced the early and late appearing horseradish peroxidase peaks, increasing horseradish peroxidase excretion from control levels of 1.1 ± 0.2 to 2.0 ± 0.3 ng/min/g liver in the first 6 min and from 3.9 ± 0.3 to 5.8 ± 0.6 ng/min/g liver at 25 min. At the higher dose, MHA also dramatically increased both early and late peaks of horseradish peroxidase excretion to 3.0 ± 0.2 ng/min/g liver in the early peak and to 7.2 ± 1.1 ng/min/g liver in the late peak, significantly different from control values ($P < 0.05$).

The cumulative horseradish peroxidase output, analyzed from the area under the biliary horseradish peroxidase excretion curve is illustrated in Fig. 3C. MHA accelerated the excretion of

horseradish peroxidase in a dose-related manner throughout the 80 min of the experimental period.

In contrast, THA infusion did not alter the profile pattern of the horseradish peroxidase excretion on either the early or late peaks whereas DHA significantly decreased the late peak of excretion to 2.5 ± 0.4 ng/min/g liver from control level of 3.9 ± 0.3 ng/min/g liver (Fig. 3B). Total horseradish peroxidase excretory output following THA and DHA (92 ± 7 ng and 87 ± 21 ng, respectively) was not statistically different from that of control values (126 ± 14 ng) (Fig. 3D). Taurocholate increased both the excretion rate and total output of horseradish peroxidase to 162.0 ± 0.7 ng.

3.3. Effect of colchicine pretreatment on the choleretic effect of MHA

To further determine if vesicular exocytosis was stimulated by MHA, rats were pretreated with colchicine, an inhibitor of the microtubule-dependent exocytotic pathway. As shown in Fig. 4A–B, pretreatment with colchicine (2 mg/kg, i.v.) for 2.5 h did not significantly affect basal bile flow rate, although it slightly declined with time. Pretreatment with colchicine markedly reduced the dose dependent MHA-stimulated bile flow rate. As shown in Fig. 4B, 15 min after MHA administration bile flow rate increased to a maximum level of approximately $118 \pm 10\%$

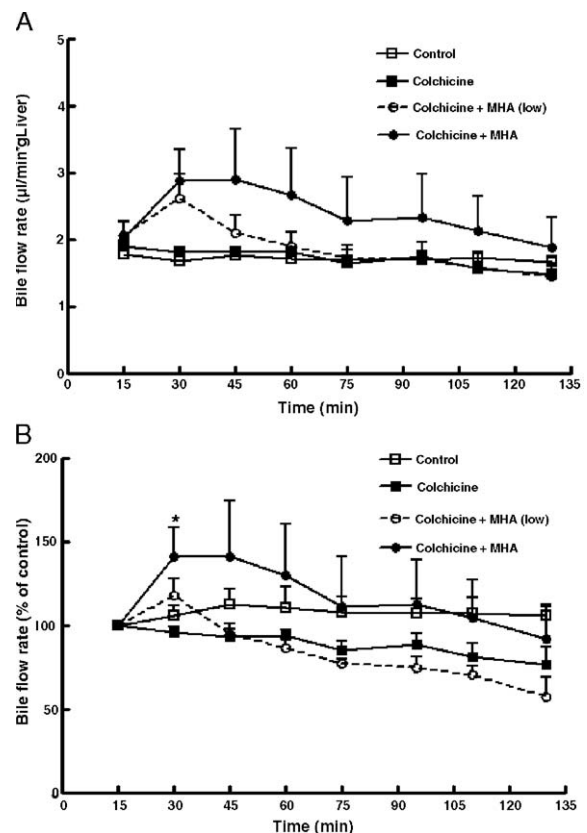


Fig. 4. Effect of colchicine pretreatment on MHA-stimulated bile flow. (A) represents actual bile flow rates, whereas (B) represents bile flow rate (% of control). Colchicine at a dose of 2 mg/kg was intravenously injected 2.5 h prior to experiment. Values are means $\pm$ S.E.M. from 4 to 5 animals. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ significantly different from the control at the corresponding time.

following the low dose and $141 \pm 17\%$ after the high dose compared to control levels, respectively, in contrast to the larger increases observed without colchicine pretreatment (180 ± 8 and $203 \pm 4\%$ increments, respectively, Fig. 1B). Subsequently the MHA-increased bile flow rate declined with time in the colchicine pretreated animals. By 60 min, bile flow rate had declined to $85 \pm 6\%$ in the colchicine treated controls, $77 \pm 3\%$ in low dose MHA, and $111.2 \pm 30.0\%$ at the high dose of MHA. The higher dose of MHA also maintained an increase in bile flow rate for longer times than the lower dose in the colchicine pretreated rats.

In control animals, colchicine pretreatment significantly increased the early peak of horseradish peroxidase excretion at 8 min from 1.1 ± 0.2 ng/min/g liver in the controls to 3.3 ± 0.8 ng/min/g liver, whereas the late phase of horseradish peroxidase excretion was abolished as previously described (Lowe et al., 1985). Colchicine pretreatment completely blocked the effect of MHA on the late peak of horseradish peroxidase excretion and enhanced the dose related effect of MHA on the early horseradish peroxidase peak at 8 min (5.0 ± 1.1 and 6.2 ± 1.0 ng/min/g liver, respectively) compared to that of the control (1.1 ± 0.2 ng/min/g liver) (Fig. 5A). In addition as shown in Fig. 5B, horseradish peroxidase appears in bile more rapidly in the

colchicine pretreated animals. However, the total cumulative horseradish peroxidase output from each of the colchicine treatment groups was not significantly different from the untreated control animals.

4. Discussion

The present study evaluated the effect of choleric hydroxyacetophenones analogues on the vesicular transport of horseradish peroxidase into bile and demonstrated that these analogues affected this pathway differently. Among the three analogues, only MHA, which has been shown previously to stimulate bile acid independent flow, showed a positive correlation between its choleric activity and the excretion of horseradish peroxidase into bile. Both the biliary exocytosis of horseradish peroxidase as well as its choleric activity were significantly reduced by colchicine pretreatment indicating that these bile secretory properties were dependent on the integrity of microtubules and their vesicular transport function. Unlike MHA, DHA and THA, which both are structurally similar to MHA but instead are known to stimulate bile acid dependent flow, showed no stimulatory effects on biliary horseradish peroxidase excretion. Moreover, the more hydrophobic DHA actually suppressed the excretion of horseradish peroxidase. Overall, these findings suggest that the vesicular exocytosis pathway can explain in part the mechanism by which MHA stimulates bile acid independent flow whereas the choleric effects of DHA and THA must depend on other intracellular mechanisms which are not labeled by horseradish peroxidase.

In the present study, two peaks of horseradish peroxidase excretion were detected, the first at 4–8 min and the second, 20–30 min after injection in the control animals. This finding was consistent with previous reports (Lowe et al., 1985; Hayakawa et al., 1990a,b) that attribute the early horseradish peroxidase peak in bile to movement across the paracellular pathway between hepatocytes whereas the late peak represents transcellular exocytosis of horseradish peroxidase (Lowe et al., 1985). In the present study, MHA increased both the early and the late peaks of the horseradish peroxidase excretion. The marked increase in the early peak of horseradish peroxidase in bile suggests that MHA may have increased the permeability of tight junctions contributing in part to its choleric activity. The underlying mechanism for this increase in permeability is not clear but tight junctions can be regulated by both osmotic and hydrostatic pressure (Powell, 1981). During an osmotic choleresis, the accumulation of osmotic active compounds in bile creates an osmotic gradient across the tight junction. (Toyota et al., 1984; Roma et al., 1995). One of the osmotically active biliary metabolites of MHA has previously been identified as 4-hydroxyacetophenone-4-*O*- β -glucuronide and the choleric activity of MHA was demonstrated to partly relate to the excreted amount of this metabolite (Piyachaturawat et al., 2001). While this is the likely explanation, a direct interaction of MHA with tight junction proteins or microfilaments, which maintain the integrity and function of this barrier between blood and bile, cannot be excluded. Indeed, MHA has been reported to specifically bind to several liver cytosolic proteins including class I

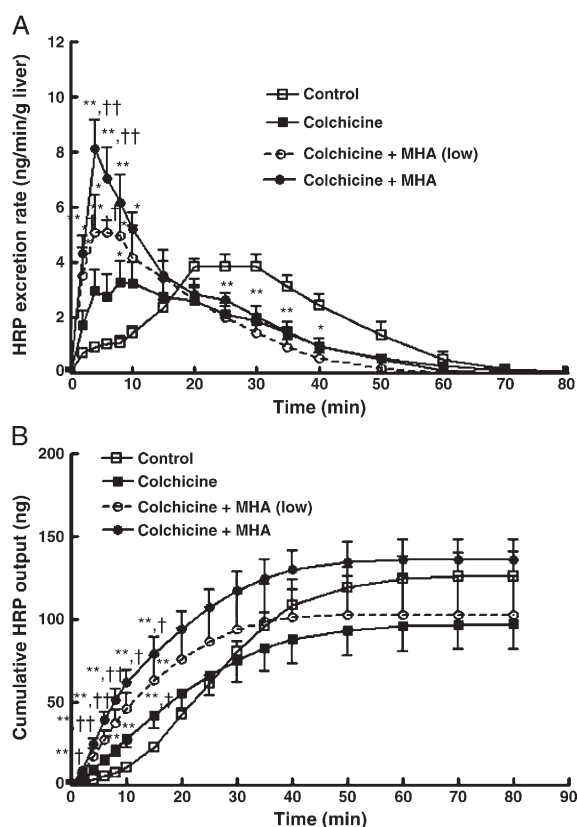


Fig. 5. Effect of colchicine pretreatment on biliary horseradish peroxidase excretion (A) and the cumulative horseradish peroxidase excretion (B). Colchicine (2 mg/kg) was intravenously injected 2.5 h prior to experiment in control rats, and in the MHA-stimulated horseradish peroxidase excretion. Values are means $\pm$ SEM from 4 to 5 animals. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ significant difference from control at the corresponding time. † $P < 0.05$ and †† $P < 0.01$ significant difference from colchicine at the corresponding time.

alcohol dehydrogenase, glycogen phosphorylase, glutathione-S-transferase A2 (Negoro and Wakabayashi, 2004).

Colchicine which disrupts formation of microtubules by inhibiting the polymerization of tubulin, produces an increase in tight junction permeability and enhances the early peak of horseradish peroxidase excretion in control animals as previously described (Lowe et al., 1985). Pretreatment of colchicine also enhanced the effect of MHA on the early peak of horseradish peroxidase excretion (Fig. 5A), suggesting that the choleretic effect of MHA is partly related to the increase in tight junction permeability. In addition, taurocholate which was used as a positive control also increased the excretion of horseradish peroxidase via both the paracellular and transcytotic pathways in a similar fashion (Fig. 3B).

MHA clearly increased the second peak of horseradish peroxidase excretion into bile in a dose dependent manner and the effect was suppressed by colchicine pretreatment, indicating involvement with the transcytotic microtubule-dependent vesicle transport and exocytosis. However, colchicine did not abolish the effect of the high dosage of MHA on the rate of bile flow during the initial period of infusion (Fig. 4A–B). The reasons for that are not clear. However it is likely that some transporters may still persist at the canalicular membrane after colchicine treatment and enable MHA to be excreted into bile when infused at these higher rates. Mrp2, the multispecific resistance-associated protein 2, plays an important role in the biliary excretion of several endogenous and exogenous compounds including glucuronide, glutathione and sulfate conjugates (Gerk and Vore, 2002), and is likely to be responsible for the excretion of osmotically active metabolites of MHA as suggested by studies in Mrp2 deficient rats where the choleretic effect of MHA is impaired (Mahagita et al., *in press*).

While Microtubule (MT)-dependent vesicular transport was originally suggested to involve the secretion of bile acids and other organic ions/electrolyte (Barnwell et al., 1984; Crawford et al., 1988; Tachizawa et al., 2004), its main function is now believed to contribute to the insertion and retrieval of canalicular membrane transporters that determine both bile acid dependent flow and bile acid independent flow (Benedetti et al., 1994; Boyer and Soroka, 1995). Transcytotic vesicle carriers of the polymeric IgA receptor, also accumulate in the liver cells during experimental cholestasis (Larkin and Palade, 1991; Barr and Hubbard, 1993), and are found on the same intracellular vesicles with Mrp2 and bile salt export pump (Bsep) in normal rat liver (Soroka et al., 1999). Likewise, the transcytotic transport of polymeric IgA receptors and of horseradish peroxidase have also been found to be colocalized in the identical subgroup of vesicles in the liver cells (Crawford, 1996). However, since MHA does not stimulate bile acid excretion (Piyachaturawat et al., 2000, 2001), it is not clear whether MHA stimulates the insertion of the particular subgroup of vesicles where Bsep and Mrp2 colocalized. It seems likely that specific subgroups of vesicles may contain different types of transport proteins and be regulated by specific signaling pathways (Gatmaitan et al., 1997). Therefore MHA may be stimulating the insertion of a particular pool of vesicles that contain transporters necessary for bile acid independent flow rather than bile

acid dependent flow. Nevertheless, our findings provide support for the involvement of microtubule dependent canalicular exocytosis as a component of bile acid independent flow (Benedetti et al., 1994; Boyer and Soroka, 1995).

The stimulatory effect of MHA on horseradish peroxidase excretion was rapid in onset consistent with regulation by insertion and retrieval of vesicles into and out of the canalicular membrane (Trauner and Boyer, 2003; Kubitz et al., 2005). Intracellular signaling molecules are involved in these processes particularly cyclic AMP (Hayakawa et al., 1990a), Ca^{2+} -dependent protein kinase C (Kubitz et al., 2001), phosphatidylinositol 3-kinase (Misra et al., 2003), and p38 MAP kinase (Kubitz et al., 2004). The cyclic AMP mediated signaling pathway that modulates exocytosis has been studied extensively in several secretory cells including liver and stimulates biliary excretion of horseradish peroxidase in the perfused rat liver by microtubule dependent mechanisms (Hayakawa et al., 1990a), as well as the apical insertion of vesicles containing Mrp2-protein (Roelofsen et al., 1998). Thus this exocytic pathway is likely to be involved in the choleretic effects of MHA. Ca^{2+} -dependent protein kinase C is another mechanism involved in the regulation of bile secretion. Four PKC isoenzymes participate in PKC activation and stimulation or inhibition of bile secretion in liver. For example, tauroursodeoxycholate increases bile flow via the PKC α isoform (Beuers et al., 1996) whereas tauroolithocholate decreases bile flow via PKC ϵ (Beuers et al., 2003). However, it remains to be determined if MHA cholestasis is regulated by this signaling pathway.

MHA is one of the major components present in Yin Zhi Huang, a Chinese medicine which enhances bilirubin clearance in newborns (Yin et al., 1991) and is widely used for treatment of neonatal jaundice (Yang and Lu, 1984; Chen and Guan, 1985; Fox, 2001). Yin Zhi Huang also regulates the expression of Mrp2 among other determinants of hepatic bilirubin clearance (Huang et al., 2004) although the role of MHA in that study is not clear. Nevertheless our findings on the stimulating effect of MHA on the vesicular pathway would be consistent with this mechanism.

In contrast to MHA, THA and DHA which stimulate bile acid dependent flow had no stimulatory effect on horseradish peroxidase excretion in this study and thus presumably do not involve the transcytotic vesicle pathway. This is in keeping with a lack of effect of colchicine on basal bile acid excretion rates (Crawford et al., 1988) and studies that show no effects of vesicle transport on fluorescent bile acid excretion in rat hepatocyte couplets using confocal fluorescent microscopy (El-Seaidy et al., 1997). Alternative mechanisms for the stimulation of bile acid dependent flow by THA and DHA include insertion of bile acid transporters from vesicles that are not labeled by horseradish peroxidase and/or a direct effect of these analogues on bile acid transporter activity at the canalicular membrane.

The reasons for differential effects of the three hydroxyacetophenones on the biliary horseradish peroxidase excretion are not clear. However, it is well known that minor modifications of structure can lead to major differences in physiochemical properties of closely related chemical structures. The difference in the choleretic actions of the different hydroxyacetophenones

has also been reported to be partly related to the number and position of hydroxyl groups on the acetophenone nucleus (Piyachaturawat et al., 2000). The strong polar hydroxyl group at the 4-position on benzene nucleus appears to be essential to induce bile flow, while hydroxyl groups at 2 and 6 positions are essential for inducing a higher secretion of solid materials including bile acids and cholesterol (Piyachaturawat et al., 2000). In addition to the choleretic effects, DHA and THA have different inhibitory effects on the uptake of bile acids into ileal brush border membrane vesicles (Kanchanapoo et al., 2006). Thus it is likely that the differential effect of the three hydroxyacetophenone analogues on biliary horseradish peroxidase excretion in the present study might be related to differences in their physiochemical properties that results in different protein/transporter or binding site interactions.

In conclusion, we have evaluated the effects of choleretic hydroxyacetophenones on the biliary excretion of horseradish peroxidase. These three hydroxyacetophenone analogues with similar chemical structures exerted significantly different effects on vesicular transport of horseradish peroxidase. MHA was the only analogue that increased both paracellular and transcellular vesicular transport pathways, labeled by horseradish peroxidase, whereas DHA inhibited the latter route. The lack of a stimulatory effect of THA and DHA on biliary horseradish peroxidase excretion suggested that their choleretic action is not associated with the vesicular exocytosis pathway. We speculate that MHA might have a potential therapeutic benefit in cholestatic liver injury where bile acid independent flow and the transcytotic vesicular pathway are impaired.

Acknowledgement

This study was supported by grants from the Golden Royal Jubilee (to LT); the Thailand Research Fund and a research strengthening grant from BIOTEC (to PP and AS); USPHS grants DK 25636 and P30-34989 (to JLB).

References

- Ballatori, N., Truong, A.T., 1989. Relation between biliary glutathione excretion and bile acid-independent bile flow. *Am. J. Physiol.* 256, G22–G30.
- Barnwell, S.G., Lowe, P.J., Coleman, R., 1984. The effects of colchicine on secretion into bile of bile salts, phospholipids, cholesterol and plasma membrane enzymes: bile salts are secreted unaccompanied by phospholipids and cholesterol. *Biochem. J.* 220, 723–731.
- Barr, V.A., Hubbard, A.L., 1993. Newly synthesized hepatocyte plasma membrane proteins are transported in transcytotic vesicles in the bile duct-ligated rat. *Gastroenterology* 105, 554–571.
- Benedetti, A., Strazzabosco, M., Ng, O.C., Boyer, J.L., 1994. Regulation of activity and apical targeting of $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger in rat hepatocyte. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 792–796.
- Beuers, U., Nathanson, M.H., Isales, C.M., Boyer, J.L., 1993. Tauroursodeoxycholic acid stimulates hepatocellular exocytosis and mobilizes extracellular Ca^{++} mechanisms defective in cholestasis. *J. Clin. Invest.* 92, 2984–2993.
- Beuers, U., Throckmorton, D.C., Anderson, M.S., Isales, C.M., Thasler, W., Kullak-Ublick, G., Sauter, G., Koebe, H.G., Paumgartner, G., Boyer, J.L., 1996. Tauroursodeoxycholic acid stimulates protein kinase C in isolated rat hepatocyte. *Gastroenterology* 110, 1553–1563.
- Beuers, U., Bilzer, M., Chittattu, A., Kullak-Ublick, G.A., Keppler, D., Paumgartner, G., Dombrowski, F., 2001. Tauroursodeoxycholic acid inserts the apical conjugate export pump, Mrp2, into canalicular membranes and stimulates organic anion secretion by protein kinase C-dependent mechanisms in cholestatic rat liver. *Hepatology* 33, 1206–1216.
- Beuers, U., Denk, G.U., Soroka, C.J., Wimmer, R., Rust, C., Paumgartner, G., 2003. Taurolithocholic acid exerts cholestasis effects via phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism in perfused rat livers and rat hepatocyte couplets. *J. Biol. Chem.* 278, 17810–17818.
- Boyer, J.L., Soroka, C.J., 1995. Vesicle targeting to the apical domain regulates bile secretory function in isolated rat hepatocytes couplets. *Gastroenterology* 109, 1600–1611.
- Bruck, R., Haddad, P., Graf, J., Boyer, J.L., 1992. Regulatory volume decrease stimulates bile flow, bile acid excretion, and exocytosis in isolated perfused rat liver. *Am. J. Physiol.* 262, G806–G812.
- Chen, Z.L., Guan, W.H., 1985. Approach to the effect and indication of Yin Zhi Huang to treat neonatal jaundice. *J. Clin. Pediatr.* 3, 302–303.
- Crawford, J.M., 1996. Role of vesicle-mediated transport pathways in hepatocellular bile secretion. *Semin. Liver Dis.* 16, 169–189.
- Crawford, J.M., Berken, C.A., Gollan, J.L., 1988. Role of the hepatocyte microtubular system in the excretion of bile salts and biliary lipid: implications for intracellular vesicular transport. *J. Lipid Res.* 29, 144–156.
- Crawford, J.M., Strahs, D.C., Crawford, A.R., Barnes, S., 1994. Role of bile salt hydrophobicity in hepatic microtubule-dependent bile salt secretion. *J. Lipid Res.* 35, 1738–1748.
- Crocenzi, F.A., Mottino, A.D., Cao, J., Voggi, L.M., Sanchez Pozzi, E.J., Vore, M., et al., 2003. Estradiol-17 β -D-glucuronide induces endocytotic internalization of Bsep in rats. *Am. J. Physiol.: Gastrointest. Liver Physiol.* 285, G449–G459.
- El-Seaidy, A.Z., Mills, C.O., Elias, E., Crawford, J.M., 1997. Lack of evidence for vesicle trafficking of fluorescent bile salts in rat hepatocyte couplets. *Am. J. Physiol.* 272, G298–G309.
- Etoh, H., Murakami, K., Yogoh, T., Ishikawa, H., Fukuyama, Y., Tanaka, H., 2004. Anti-oxidative compounds in barley tea. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 2616–2618.
- Fox, T.F., 2001. Neonatal jaundice-traditional Chinese medicine approach. *J. Perinatol.* 21 (Suppl 1), S98–S100 (discussion S104–S107).
- Gatmaitan, Z.C., Nies, A.T., Arias, I.M., 1997. Regulation and translocation of ATP-dependent membrane proteins in rat liver. *Am. J. Physiol.* 272, G1041–G1049.
- Gerk, P.M., Vore, M., 2002. Regulation of expression of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) and its role in drug disposition. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302, 407–415.
- Gregory, D.H., Vlahcevic, Z.R., Prugh, M.F., Swell, L., 1998. Mechanism of secretion of biliary lipids: role of microtubule system in hepatocellular transport of biliary lipids in the rats. *Gastroenterology* 74, 93–100.
- Haussinger, D., Saha, N., Hallbrucker, C., Lang, F., Gerok, W., 1993. Involvement of microtubules in the swelling-induced stimulation of transcellular taurocholate transport in perfused rat liver. *Biochem. J.* 291, 335–360.
- Hayakawa, T., Bruck, R., Ng, O.C., Boyer, J.L., 1990a. DBcAMP stimulates vesicle transport and HRP excretion in the isolated perfused rat liver. *Am. J. Physiol.* 259, G727–G735.
- Hayakawa, T., Ng, O.C., Boyer, J.L., 1990b. Taurocholate stimulates transcytosis vesicular pathways labeled by horseradish peroxidase in the isolated perfused rat liver. *Gastroenterology* 99, 216–228.
- Huang, W., Zhang, J., Moore, D.D., 2004. A traditional herbal medicine enhances bilirubin clearance by activating the nuclear receptor CAR. *J. Clin. Invest.* 113, 137–143.
- Kanchanapoo, J., Rao, M.C., Sophasan, S., Suksamrarn, A., Piyachaturawat, P., 2006. Inhibitory effects of choleretic hydroxyacetophenones on ileal bile acid transport in rats. *Life Sci.* 78, 1630–1636.
- Kubitz, R., Huth, C., Schmitt, M., Horbach, A., Kullak-Ublick, G., Haussinger, D., 2001. Protein kinase C-dependent distribution of the multidrug resistance protein 2 from the canalicular to the basolateral membrane in human HepG2 cell. *Hepatology* 34, 340–350.
- Kubitz, R., Sutfels, G., Kuhlkamp, T., Kolling, R., Haussinger, D., 2004. Trafficking of the bile salt export pump from the Golgi to the canalicular membrane is regulated by the p38 MAP kinase. *Gastroenterology* 126, 541–553.

- Kubitz, R., Helmer, A., Haussinger, D., 2005. Biliary transport system: short-term regulation. *Methods Enzymol.* 400, 252–257.
- Larkin, J.M., Palade, G.E., 1991. Transcytotic vesicular carrier for polymeric IgA receptors accumulate in rat hepatocyte after bile duct ligation. *J. Cell Sci.* 98, 205–216.
- Larocca, M.C., Pellegrino, J.M., Garay, E.A.R., Marinelli, R.A., 1999. Taurocholate-induced inhibition of hepatic lysosomal degradation of horseradish peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 1428, 341–347.
- Lowe, P.J., Kan, K.S., Barnwell, S.G., Sharma, R.K., Coleman, R., 1985. Transcytosis and paracellular movements of horseradish peroxidase across liver parenchyma tissue from blood to bile. Effects of alpha-naphthylisothiocyanate and colchicine. *Biochem. J.* 229, 529–537.
- Mahagita, C., Tanphichai, K., Suksamrarn, A., Piyachaturawat, P., in press. 4-Hydroxyacetophenone-induced cholestasis in rats is mediated by the Mrp2-dependent biliary secretion of its glucuronide conjugate. *Pharm. Res.*
- Misra, S., Varticovski, L., Aris, I.M., 2003. Mechanisms by which cAMP increases bile acid secretion in rat liver and canalicular membrane vesicles. *Am. J. Physiol.* 285, G316–G324.
- Mottino, A.D., Cao, J., Veggi, L.M., Crocenzi, F.A., Roma, M.G., Vore, M., 2002. Altered localization and activity of canalicular Mrp2 in estradiol-17 β -D-glucuronide-induced cholestasis. *Hepatology* 35, 1409–1419.
- Nathanson, H.M., Boyer, J.L., 1991. Mechanisms and regulation of bile secretion. *Hepatology* 14, 551–566.
- Negoro, M., Wakabayashi, I., 2004. Determination of the liver cytosolic proteins that bind to *p*-hydroxyacetophenone. *Biomed. Chromatogr.* 18, 335–340.
- Okuno, I., Uchida, K., Nakamura, M., Sakurawi, K., 1988. Studies on choleretic constituents in *Artemisia capillaris* THUNB. *Chem. Pharm. Bull.* 36, 769–775.
- Piyachaturawat, P., Suwanumpai, P., Komaratat, P., Chuncharunee, A., Suksamrarn, A., 1998. Effect of phloracetophenone on bile flow and biliary lipids in rats. *Hepatol. Res.* 12, 198–206.
- Piyachaturawat, P., Chaingam, N., Chuncharunee, A., Komaratat, P., Suksamrarn, A., 2000. Choleretic activity of phloracetophenone in rats: structure-function studies using acetophenone analogues. *Eur. J. Pharmacol.* 387, 221–227.
- Piyachaturawat, P., Tanphichai, K., Suksamrarn, A., 2001. Stimulatory activity of hydroxy phloracetophenone analogues on bile secretion in rats. *FASEB J.* 15, A820.
- Powell, D.W., 1981. Barrier function of epithelia. *Am. J. Physiol.* 241, G275–G288.
- Roelofsen, H., Soroka, C.J., Keppler, D., Boyer, J.L., 1998. Cyclic AMP stimulates sorting of the canalicular organic anion transporter (Mrp2/cMoat) to the apical domain in hepatocyte couplets. *J. Cell Sci.* 111, 1137–1145.
- Roma, M.G., Marinelli, R.A., Crocenzi, F.A., Rodriguez Garay, E.A., 1995. Effect of cholephilic dyes on hepatic tight junctional permeability in the rat. *Biochem. Pharmacol.* 50, 1079–1086.
- Seino, S., Shibasaki, T., 2005. PKA-dependent and PKA-independent pathways for cAMP-regulated exocytosis. *Physiol. Rev.* 85, 1303–1342.
- Soroka, C.J., Pate, M.K., Boyer, J.L., 1999. Canalicular export pump traffic with polymeric immunoglobulin A receptor on the same microtubule-associated vesicle in rat liver. *J. Biol. Chem.* 274, 26416–26424.
- Suksamrarn, A., Eiamong, S., Piyachaturawat, P., Byrne, L.T., 1997. Phloracetophenone glucoside with choleretic activity from *Curcuma comosa*. *Phytochemistry* 45, 103–105.
- Tachizawa, H., Sano, N., Takikawa, H., 2004. Effects of colchicine on the maximum biliary excretion of cholephilic compounds in rats. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 19, 1016–1022.
- Toyota, N., Miyai, K., Hardison, W.G.M., 1984. Effect of biliary pressure versus high bile acid flux on the permeability of hepatocellular tight junction. *Lab. Invest.* 50, 536–542.
- Trauner, M., Boyer, J.L., 2003. Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol. Rev.* 83, 633–671.
- Worthington, V., 1972. *Worthington Enzyme Manual. Peroxidase (horseradish)*, vol. 71. Worthington Biochemical Corporation Freehold, NJ, USA, pp. 1050–1060.
- Yang, S.H., Lu, C.F., 1984. Effects of decoction of *Artemisia*, *Rheum*, *Gardenia*, *Coptidis* and *Rhizoma* on neonatal jaundice in Chinese newborn infants. *J. Chin. Child Med.* 25, 144–148.
- Yin, J., Wennberg, R.P., Xia, Y.C., Liu, J.W., Zhou, H.Z., 1991. Effect of a traditional Chinese medicine, Yin Zhi Huang, on bilirubin clearance and conjugation. *Dev. Pharmacol. Ther.* 16, 59–64.
- Zhang, Q.W., Zhang, Y.Z., 1989. Determination of choleretic constituents in *Artemisia scoparia* Waldst. Et Kit. By TLC densitometry. *Yao Xue Bao* 24, 43–47.

Inhibitory effects of choleretic hydroxyacetophenones on ileal bile acid transport in rats

Jainuch Kanchanapoo^a, Mrinalini C. Rao^b, Samaisukh Sophasan^a,
Apichart Suksamrarn^c, Pawinee Piyachaturawat^{a,*}

^a Department of Physiology, Faculty of Science, Mahidol University, Rama 6 Rd., Bangkok 10400, Thailand

^b Department of Physiology and Biophysics, University of Illinois at Chicago, Chicago, IL 60612, USA

^c Department of Chemistry, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University, Bangkok 10240, Thailand

Received 15 May 2005; accepted 27 July 2005

Abstract

The effects of the choleretic and cholesterol lowering compound, 2,4,6-trihydroxyacetophenone (THA) and its analog, 2,6-dihydroxyacetophenone (DHA), on ileal bile acid absorption were investigated in rats. THA inhibited taurocholate (TC) uptake into ileal brush-border membrane vesicles (BBMV), showing a maximum inhibition of 50%, whereas DHA completely inhibited TC uptake into ileal BBMV. THA exhibited competitive inhibition with a K_i of 9.88 mM, while DHA showed non-competitive inhibition with a K_i of 7.65 mM. Both total and ouabain-sensitive basolateral membrane (BLM) $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activities, which are essential for maintenance of the Na^+ -gradient for bile acid transport, were inhibited by THA and DHA in a dose-dependent manner. The inhibition of BLM ATPase was uncompetitive with a K_i of 10.1 and 5.0 mM for THA and DHA, respectively. Administration of THA or DHA (400 $\mu\text{mol/kg}$) twice a day, to hypercholesterolemic rats for 3 weeks caused similar and marked reductions in plasma cholesterol to 60% of the cholesterol-fed controls. The data suggest that the inhibitory actions of THA and DHA on two essential components of ileal bile acid recycling to liver could, in part, contribute to the cholesterol lowering effect of the hydroxyacetophenone compounds. These effects on decreasing bile acid recycling, in combination with their potent choleretic effect, accelerating biliary excretion of bile acids, are responsible for the effective cholesterol lowering capacities of these compounds.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Bile acid transport; Cholesterol; Hydroxyacetophenone; Ileum; $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$

Introduction

Hepatic conversion of cholesterol to bile acids, which is mainly catalyzed by cholesterol 7- α hydroxylase (Cyp7A), the first and rate-limiting enzyme in the pathway, has been recognized as an important means of eliminating cholesterol from the body, and accounts for 50% of total cholesterol elimination in man (Spady et al., 1998). Several lines of evidence indicate that bile acids act as a signaling molecule to regulate their own biosynthesis in which the activity of Cyp7A is tightly controlled by negative feedback of bile acids returning to liver via enterohepatic circulation (Chiang et al., 2000; Lu et al., 2000). Thus, inhibition of bile acid absorption

by pharmacological intervention, e.g. via the anion exchange resin, cholestyramine, effectively lowers plasma cholesterol by preventing the bile acids from recycling back to liver; this in turn results in an enhancement of Cyp7A activity (Kuroki et al., 1999).

The circulation of bile acids between the liver and small intestine depends upon several membrane proteins. The bulk of bile acid recycling occurs in the distal ileum via a secondary active transport mechanism (Shneider, 2001). The apical sodium-dependent bile acid transporter (ASBT), a 48-kDa transmembrane protein located at the apical membrane of the distal ileum, is responsible for the transport of bile acids into the ileal enterocytes (Shneider et al., 1995). ASBT has been cloned and described in rats (Shneider et al., 1995), hamsters (Wong et al., 1994), humans (Craddock et al., 1998) and mice (Saeki et al., 1999). The maintenance of the Na^+ gradient, which is driven by the basolateral $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ in these

* Corresponding author. Fax: +66 2 3547154.

E-mail address: scppy@mahidol.ac.th (P. Piyachaturawat).

cells, is essential for the absorption of bile acids by ASBT (Shneider, 2001; Wilson, 1981). Since ileal bile acid absorption is a critical step in enterohepatic recycling, and therefore in modulation of Cyp7A activity, it is of interest to explore inhibitors of this process as potential drugs for therapeutic use in lowering plasma cholesterol.

Phloracetophenone, or 2,4,6-trihydroxyacetophenone (THA), is a naturally occurring compound from *Curcuma comosa* rhizome, family Zingiberaceae, which has recently been demonstrated to lower plasma cholesterol (Piyachaturawat et al., 2002). It increased biliary bile acid output and reduced LDL cholesterol (Piyachaturawat et al., 2000, 2002). The reduction of plasma cholesterol was accompanied with increases in the activity of hepatic Cyp7A and of bile acid excretion into the intestine (Piyachaturawat et al., 2002). However, the mechanisms underlying these actions of THA remain unclear. The compound may directly act on Cyp7A and/or may indirectly interfere with the intestinal absorption of bile acids and subsequently cause an increase in Cyp7A activity and lower plasma cholesterol. In addition to THA, one of its hydroxyl analog, 2,6-dihydroxyacetophenone (DHA), has also been shown to potently stimulate bile acid excretion and lower plasma cholesterol, while other analogs which have different position and number of hydroxyl groups did not lower plasma cholesterol (Piyachaturawat et al., 2000). In this study, we examined the effects of THA and its analog, DHA, on ileal bile acid absorption. The uptake of bile acids at the brush-border membrane (BBM) and the activity of Na^+/K^+ -ATPase at the basolateral membrane (BLM), which are two essential steps for the intestinal absorption, were determined. In the current study, we provide evidence that THA and its analog inhibited these two essential steps *in vitro*. We also confirmed their effectiveness in lowering plasma cholesterol in the hypercholesterolemic rat model.

Materials and methods

Materials

Phloracetophenone (2,4,6-trihydroxyacetophenone, THA) and 2,6-dihydroxyacetophenone (DHA) were purchased from Aldrich Chemical (Milwaukee, WI, USA). The chemical structures of these compounds are shown in Fig. 1. [^3H]-

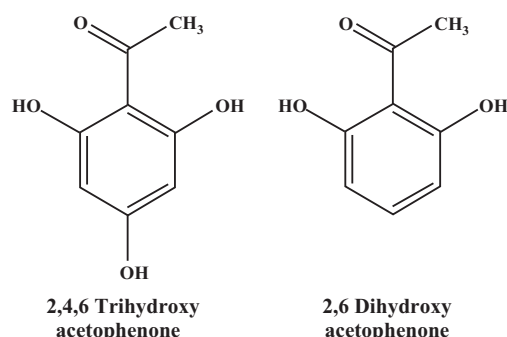


Fig. 1. Chemical structures of 2,4,6-trihydroxyacetophenone and 2,6-dihydroxyacetophenone.

taurocholate (TC) was obtained from Perkin Elmer (Boston, MA, USA). All other reagents were of analytical grade and were purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA).

Animals

Adult male Sprague-Dawley rats weighing 200–250 g (the National Animal Center, Bangkok, Thailand) were maintained on standard laboratory chow in a room with a 12-h light/dark cycle. The room temperature was controlled at 23–25 °C, and relative humidity was set at 50–60%. The experimental protocol was approved by the Laboratory Animal Ethical Committee of Faculty of Science, Mahidol University, which complies with the International Guiding Principles for Biomedical Research involving Animals (CIOMS/WHO).

Ileal brush-border membrane vesicle preparation

Rats were fasted overnight, euthanized under 50 mg/kg (i.p.) sodium pentobarbital, and the distal ilea were dissected for membrane isolation. The ileum was removed and the ileal mucosa was separated from the underlying muscle by blunt scraping with two glass slides. The ileal mucosae from 3 to 4 animals were pooled to prepare brush-border membranes (BBM) and basolateral membranes (BLM).

Brush-border membrane vesicles (BBMV) were prepared by the magnesium precipitation method as previously described (Schmitz et al., 1973; Ulrich, 1990). The purified BBMV were suspended in buffer containing 400 mM mannitol, 20 mM HEPES–Tris (pH 7.5) to yield a protein concentration of 2 mg/ml. The BBMV were stored at –80 °C. Protein concentration was measured by the method of Lowry et al. (1951). The isolated brush-border membrane vesicles were characterized as previously described (Schmitz et al., 1973). The relative enrichment of apical BBM and BLM was determined by assessing marker enzyme activities. Alkaline phosphatase and sucrase were used as BBM markers and the Na^+/K^+ -adenosine triphosphatase (Na^+/K^+ -ATPase) as a BLM marker. The relative enrichments were more than 10-fold.

Taurocholate uptake study

Taurocholate (TC) uptake was measured using the rapid filtration method as previously described (Beesley and Faust, 1979). The optimal uptake period was initially determined to be 15 s. For each reaction, 25 μl of BBMV (50–80 μg protein) was incubated at 25 °C. The uptake was initiated by the addition of 75 μl of uptake solution (150 mM NaCl, 100 mM mannitol, 20 mM HEPES–Tris buffer, pH 7.5) containing 20 μM [^3H]-taurocholate (0.5 μCi) (Perkin Elmer, 2–3 mCi/mmol). The tested compounds were dissolved in DMSO and were added to the uptake solution. The final concentration of DMSO for the high dose was not more than 4%. In the corresponding control, the same volume of solvent was added in an identical manner. The uptake was terminated at 15 s by adding 100 μl of an ice-cold stop solution of a similar composition as the uptake solution, but with 100 μM HgCl_2 .

HgCl₂ has been shown to inhibit a broad range of transport processes (Klip et al., 1980; Miller, 1981; Terlouw et al., 2002) and was used as a wide-specificity inhibitor of transport. A 180 µl aliquot of the assay mixture was immediately filtered through GF/B filters (1 µm pore size) (Whatman®, Middlesex, UK). After rapid filtration, the filters were washed 3 times with 1 ml of stop solution and counted in a liquid scintillation counter (LKB Wallac, Rackbeta Spectral, Turku, Finland). Uptake was measured in triplicate for each of the membrane preparations. Results were expressed as pmol of bile acids taken up per mg of vesicle protein per min. To determine the kinetics of uptake, experiments were conducted with concentrations of TC ranging from 20 to 250 µM. The results of the kinetic studies were subjected to Michaelis–Menten and Lineweaver–Burke reciprocal plot analyses.

Preparation of basolateral membranes and determination of Na⁺–K⁺–ATPase

A basolateral membrane fraction was prepared by centrifugation of the homogenates at 2500×g for 15 min 4 °C to remove nuclei and cell debris, and at 15,000×g for 20 min to remove mitochondria and large organelles. The post-mitochondrial supernatant was then centrifuged at 100,000×g for 1 h. The membrane pellets were resuspended in buffer containing 250 mM sucrose, 20 mM HEPES–Tris, pH 7.4, and 1 mM MgCl₂ to yield a final protein concentration of approximately 2 mg/ml.

Na⁺–K⁺–ATPase activity was determined according to the method previously described (Mircheff and Wright, 1976). The reaction was initiated by adding 25 µl (50–80 µg protein) of basolateral membrane to 500 µl of incubation medium, to achieve a final composition of 3 mM ATP, 100 mM NaCl, 10 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 80 mM Tris, pH 7.4, and 3 mM EDTA. The mixture was incubated at 37 °C for 30 min and the reaction stopped by the addition of 500 µl of 5% trichloroacetic acid. Enzyme activity was determined as the amount of liberated phosphate (Pi) in the supernatant and Pi was determined by the method of Fiske and Subbarow (1925). The data were expressed as nmol of liberated Pi/mg protein/min. Since Na⁺–K⁺–ATPase is often defined as ouabain-sensitive ATPase (Charney and Donowitz, 1978), the reactions were also conducted in the presence and in the absence of ouabain (1.5 mM) over the incubation period. To determine the kinetics of the enzyme, reactions were carried out in the presence of 50–1000 µM ATP.

Induction of hypercholesterolemia and treatment

Hypercholesterolemia was induced by feeding rats a high cholesterol rat chow, containing 1.5% cholesterol and 0.5% cholic acid ad libitum for 3 weeks (Root et al., 2002). To follow the change in plasma cholesterol, all animals were fasted overnight (12 h) from 8:00 P.M. to 8:00 A.M. and blood samples were collected from tail veins weekly. Animals showing plasma cholesterol >200 mg/dl were selected for the

study. The hypercholesterolemic rats were allocated into 3 different groups of treatment, i.e. those receiving either THA, DHA, or vehicle, by intragastric feeding while being maintained on high cholesterol diets. The test compounds dissolved in 10% ethanol and further suspended in corn oil were administered intragastrically at a dose of 400 µmol/kg twice a day (8:00 A.M. and 3:00 P.M.) in a final volume of 0.5 ml (200 mM). At the end of experiment, after 3 weeks of treatment with the test compounds, the animals were anesthetized by pentobarbital injection intraperitoneally and blood samples were collected from the abdominal aorta for determination of plasma cholesterol.

Statistics

Data were expressed as means±S.E.M. and were compared statistically by paired Student's *t*-test. Analysis of variance (ANOVA) test was used to determine statistical significance when more than two means were compared. *p*-Values less than 0.05 were considered statistically significant.

Results

Effects of THA and DHA on ileal bile acid uptake

Fig. 2 shows the effects of THA and DHA on ileal bile acid uptake. Both THA and DHA inhibited the ileal TC uptake in a dose-related manner. However, the maximal inhibition by THA was approximately 50% (Fig. 2) and was observed at a concentration of 0.5 mM. Increasing concentrations of THA to 20 mM did not cause a further significant inhibition of ileal bile acid uptake (*p*>0.05). Unlike THA, DHA showed a greater and dose-dependent inhibition of ileal TC uptake. The concentration eliciting half-maximal inhibition (IC₅₀) was calculated to be 1.58 mM (Fig. 2).

To elucidate the mechanisms by which THA and DHA inhibited ileal bile acid uptake, the kinetics of inhibition was analyzed. As shown in Fig. 3, THA inhibited ileal TC uptake

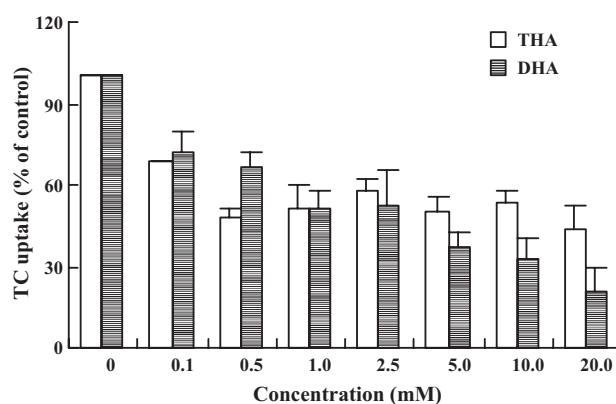


Fig. 2. Effects of 2,4,6-trihydroxyacetophenone (THA) and 2,6-dihydroxyacetophenone (DHA) on the uptake of TC into BBMVs of rat ileum (*n*=3–6). Uptake of 20 µM [³H]-taurocholate into BBMVs was measured at 15 s in the presence of various concentrations of THA or DHA ranging from 0.1 to 20 mM.

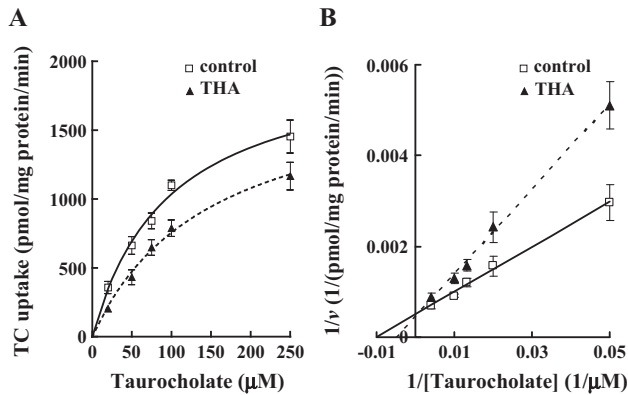


Fig. 3. Kinetics of TC uptake into rat ileal BBMVs: (A) kinetics of THA inhibition of TC uptake into rat ileal BBMVs; (B) Lineweaver–Burke reciprocal plot of THA inhibition. Uptake of [^3H]-taurocholate (20 to 250 μM) was measured over 15 s in the presence or absence of 10 mM THA. The mode of inhibition and K_i for THA were estimated by graphical analysis of Lineweaver–Burke reciprocal plot of $1/v$ as a function of $1/[S]$ in the presence or absence of THA. Solution of the reciprocal velocity equation for competitive inhibition: $1/v = (K_m/V_{\max})(1 + [I]/K_i)(1/[S] + 1/V_{\max})$.

by affecting the apparent Michaelis constant (K_m), but not the maximal transport rate ($V_{\max}$) of TC transport. The apparent K_m of TC uptake was increased significantly from $82 \pm 18 \mu\text{M}$ in control to $166 \pm 39 \mu\text{M}$ in THA-treated vesicles ($p < 0.05$), whereas the calculated $V_{\max}$ of TC uptake was not significantly altered (control: 2044 ± 187 vs. THA: 1885 ± 241 pmol/mg protein/min). As shown in Figs. 3B and 4B, the Lineweaver–Burke plot reflects that the THA-inhibition was competitive. In contrast, DHA inhibited ileal TC uptake in a non-competitive manner. DHA significantly reduced the $V_{\max}$ of TC uptake from 1782 ± 189 to 772 ± 137 pmol/mg protein/min ($p < 0.001$). The apparent K_m of the TC uptake was not significantly altered (control: 77 ± 20 vs. DHA: $63 \pm 29 \mu\text{M}$). The apparent inhibition constants (K_i) calculated from Michaelis–Menten equation were 9.9 and 7.7 mM for THA and DHA, respectively.

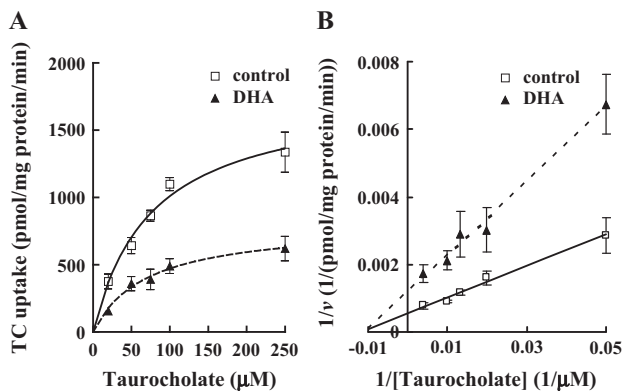


Fig. 4. Kinetics of TC uptake into rat ileal BBMVs: (A) kinetics of DHA inhibition of TC uptake into rat ileal BBMVs; (B) Lineweaver–Burke reciprocal plot of DHA inhibition. Uptake of [^3H]-taurocholate (20 to 250 μM) was measured over 15 s in the presence or absence of 10 mM DHA. The mode of inhibition and K_i for DHA were estimated by graphical analysis of Lineweaver–Burke reciprocal plot of $1/v$ as a function of $1/[S]$ in the presence or absence of DHA. Solution of the reciprocal velocity equation for non-competitive inhibition: $1/v = (K_m/V_{\max})(1 + [I]/K_i)(1/[S] + (1 + [I]/K_i)/V_{\max})$.

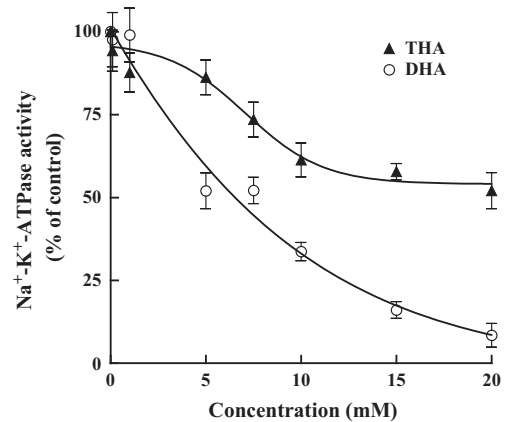


Fig. 5. Dose-dependent inhibition of THA and DHA on the total ATPase activity of rat ileal basolateral membrane ($n = 5-8$). Total ATPase activity in 30 min was measured in the presence or absence of various concentrations (0.1 to 20 mM) of THA and DHA.

Effects of THA and DHA on the activity of ileal basolateral membrane $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$

The intestinal absorption of bile acids in the ileum is driven by the Na^+ gradient, which is maintained by the basolateral $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$. We therefore determined if THA and DHA could modulate bile acid absorption by affecting basolateral $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity. In Fig. 5, THA partially inhibited total $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity. The maximum inhibition was approximately 50% and was observed at a concentration of 15 mM. In contrast, DHA showed a complete and dose-dependent inhibition of ATPase activity (Fig. 5). The calculated IC_{50} for DHA was 6.3 mM.

To analyze further the fraction of ATPase inhibited by THA and DHA, we measured the ATPase activity in the presence of 1.5 mM ouabain and calculated the ouabain-sensitive ATPase. As shown in Fig. 6, the ouabain-sensitive ATPase in our preparation accounted for approximately $19 \pm 3\%$ of total

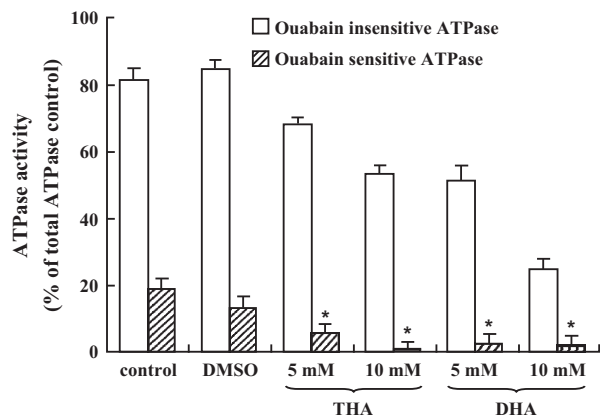


Fig. 6. Effects of THA and DHA on ouabain-sensitive ATPase. The $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ was measured in the presence or absence of 1.5 mM ouabain. Ouabain-sensitive ATPase (hatched bar) was calculated as the difference between total ATPase and ouabain insensitive ATPase. The values were expressed as percent of total ATPase of control. $n = 5$. * $p < 0.05$ significant difference from its corresponding vehicle control.

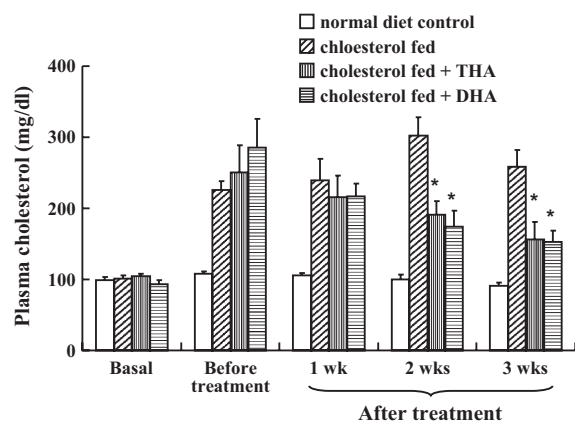


Fig. 7. Effects of THA and DHA treatment on the plasma cholesterol in hypercholesterolemic rats. The compounds were intragastrically administered at a dose of 400 $\mu\text{mol/kg}$ BW twice a day, and plasma cholesterol was followed for 3 weeks during THA and DHA treatment. * $p < 0.05$ significant difference from its corresponding cholesterol fed control ($n = 5-7$).

ATPase activity. Although THA only partially (50%) suppressed total ATPase activity, it completely inhibited the ouabain-sensitive ATPase. The THA inhibition was dose-dependent, attenuating ouabain-sensitive ATPase by 71.3% at 5 mM and 97.3% at 10 mM. DHA strongly inhibited the ouabain-sensitive ATPase by 87.8% and 92.8% at concentrations of 5 and 10 mM, respectively.

To evaluate the mechanism by which THA and DHA inhibited $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$, kinetic studies with various concentrations of ATP were performed. The inhibition of total ATPase by both THA and DHA is uncompetitive associated with decreases in both apparent K_m and $V_{\max}$. At inhibitor concentrations of 10 mM, the apparent K_m was reduced from 202 ± 29 to 102 ± 16 and 68 ± 26 μM by THA and DHA, respectively. $V_{\max}$ was also reduced from 251 ± 13 to 144 ± 6 and 68 ± 6 nmol/mg protein/min by THA and DHA, respectively. K_i values calculated from the Michaelis–Menten equation were 10.1 mM and 5.0 mM for THA and DHA, respectively.

Plasma cholesterol lowering effects of THA and DHA in hypercholesterolemic rats

THA and DHA treatments in hypercholesterolemic animals significantly lowered plasma cholesterol after 2 weeks of treatment and these lowered values were continuously maintained during a third week of treatment (Fig. 7). The plasma cholesterol at the third week was significantly reduced from 259 ± 24 mg/dl to 156 ± 26 mg/dl by THA, and to 152 ± 16 mg/dl by DHA treatment, respectively. The plasma cholesterol values for THA- and DHA-fed rats respectively corresponded to 60.4% and 58.9% of the corresponding cholesterol-fed control rats.

Discussion

The present study examined the effect on ileal bile acid transport of two choleretic hydroxyacetophenones; THA and

DHA, both of which were previously shown to enhance biliary excretion of bile acids and lower plasma cholesterol (Piyachaturawat et al., 2000). In addition, THA increased intestinal content of bile acids and increased activity of hepatic Cyp7A (Piyachaturawat et al., 2002). The detailed mechanisms by which THA and DHA increased biliary bile acid output and THA increased Cyp7A activity were not clear. As bile acids undergo enterohepatic circulation and provide feedback inhibition to their own synthesis, by which Cyp7A is the most highly regulated step in this feedback inhibition (Russell and Setchell, 1992). The possible mechanism for lowering plasma cholesterol by THA and DHA may be to interfere with this autoregulatory feedback mechanism. Our results demonstrated that the two compounds inhibited the returning of bile acids to the liver. Interference with the enterohepatic recycling of bile acids could be, in part, accounted for their action.

The intestinal absorption of bile acids is a multi-step process. It involves an uptake by ASBT at the BBM of the enterocyte followed by intracellular translocation to and transport across the BLM to the portal vein. Prevention of bile acid recycling in the enterohepatic circulation increases the hepatic conversion of cholesterol to bile acids, which subsequently leads to lowering of plasma cholesterol. This pathway is receiving much attention as a potential target for controlling hypercholesterolemia. The cholesterol lowering mechanism of THA and DHA may be associated with this mechanism by accelerating biliary excretion of bile acids and inhibiting its return to the liver. The absorption of bile acids via ASBT is localized to the apical membrane of the ileal enterocytes and is particularly concentrated in the distal ileum. In humans, ASBT can account for 75% of the recycled bile acids (Huff et al., 2002). Measurement of TC uptake in ileal BBMV is widely used as a technique to study ileal bile acid absorption (Beesley and Faust, 1979; Murer and Kinne, 1980). In the present study, THA competitively inhibited the ileal BBM bile acid uptake, whereas DHA completely inhibited it and showed a non-competitive inhibition. This intestinal absorption of bile acids is a secondary active process. ASBT transports bile acids and Na^+ with a 1:2 stoichiometry (Weinman, 1997) and its function is dependent on the activity of basolateral $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$. Inhibition of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ attenuates the ability to uptake bile acids in rat ileal epithelial cells (Wilson and Treanor, 1981). The intestinal basolateral ouabain-sensitive $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ accounts for 26–55% of total ATPase in rat jejunum (Harms and Wright, 1980) and only 32% of total $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ in rabbit ileum (Charney and Donowitz, 1978). In our rat ileal preparation, the ouabain-sensitive ATPase was approximately 19% of the total ATPase which was comparable to that previously reported in the same tissue (Charney and Donowitz, 1978; Harms and Wright, 1980). In addition to inhibiting TC transport across the BBM, the compounds also inhibited the basolateral ATPase activity. THA and DHA showed uncompetitive inhibition with respect to ATP, wherein both K_m and $V_{\max}$ were altered. Both THA and DHA completely inhibited the ouabain-sensitive $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$. Therefore, in the ileum, THA and DHA actions affect

the basolateral $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$, the driving force for transepithelial bile acid absorption, as well as the uptake of bile acids across the apical BBM.

The reasons for the differences in the pattern and the extent of inhibition of ileal bile acid absorption between THA and DHA are not clear. Earlier, we reported a difference in their choleric effect and demonstrated that the difference is partly related to the number and position of hydroxyl groups on the acetophenones nucleus (Piyachaturawat et al., 2000). The strong polar hydroxyl group at the 4-position on the benzene nucleus appears to be essential for hydroxyacetophenone to induce bile volume flow, while hydroxyl groups at 2 and 6 positions were essential for inducing a higher secretion of solid materials (Piyachaturawat et al., 2000). Among a number of hydroxyacetophenones, only 2,4,6-THA and 2,6-DHA were able to lower plasma cholesterol (Piyachaturawat et al., 2000), which showed to inhibit the returning of bile acids to liver. Differences in single hydroxyl group of chemical compounds has been reported to result in different actions and mechanisms (Gordon et al., 1979; Griffin et al., 1993; Tochtrop et al., 2004). For example, bile acids containing a 6- or 7-OH group exhibited a competitive inhibition of taurocholate uptake into the hepatocytes, whereas bile acids without 6- or 7-OH group exhibited non-competitive inhibition (Bellentani et al., 1987). However, a more detailed study on structure–function analysis of DHA and THA at the level of membrane transporters is needed.

In the present study, DHA had a stronger inhibitory effect on both TC uptake and $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ than THA. We had previously reported that DHA is more hydrophobic than THA (Piyachaturawat et al., 2000) which might result in stronger binding to the membranes and therefore may account for the more potent effect of DHA. The greater potency of more hydrophobic compounds in interactions with transport proteins in vitro have been reported (Apiwattanakul et al., 1999; Bellentani et al., 1987). Reduced number of hydroxyl groups in bile acid molecule showed greater potency to inhibit TC uptake into hepatocytes (Bellentani et al., 1987). In contrast to the in vitro differences, the plasma cholesterol lowering effect of DHA in vivo was comparable to that of THA. The differences of in vitro vs. in vivo treatment may due to the multiple sites of action of the compounds as well as their availability and metabolism. In addition to having a direct effect at the intestine, they also exerted effects at liver. Although THA and DHA were able to inhibit two essential steps of the ileal bile acid absorption, these effects were seen at relatively high doses. It remains to be determined whether the pattern of inhibition of TC uptake by DHA and THA observed in vitro, are also seen after long-term oral administration. Their inhibition on these processes is unlikely to be the only determinant of their effective cholesterol lowering capacities. The possible interactions of the compounds with other target molecules cannot be excluded. Currently, the farnesoid X nuclear receptor (FXR) and liver X nuclear receptor (LXR), which are involved in the transcription of Cyp7A activity, are of interest. The transcription of Cyp7A is down regulated by the FXR, the bile acid receptor (Chiang et al., 2000), whereas the feed forward mechanism is mainly regulated by LXR

(Wolf, 1999) to maintain cholesterol homeostasis. The possibility of compounds to directly activate Cyp7A activity, to antagonize FXR as well as to stimulate LXR is undergoing investigation. In addition to their potent choleric effect, another mechanism by which THA and DHA could lower cholesterol is by directly acting on targets promoting bile acid synthesis in hepatocytes.

In summary, we demonstrated that THA and DHA inhibited the ileal transport of bile acids at both brush border and basolateral membranes of the intestinal epithelial cell. As the compounds had multiple sites of actions, the inhibition on these processes was not the only determinant of their cholesterol lowering capacities. We conclude that the inhibitory effects of THA and DHA targeting in these two essential steps, in combination with their potent choleresis, accelerating biliary excretion of bile acids are responsible for the cholesterol lowering effect of these compounds. Optimization of these two lead compounds to manipulate the conversion of cholesterol to bile acids for excretion could possibly lead to the design of a novel therapeutic agent for treatment of hypercholesterolemia.

Acknowledgements

This study was supported by grants from the Royal Golden Jubilee program (to JK), the Thailand Research Fund, a research team strengthening grant from BIOTEC, and DK 58135 (to MCR).

References

- Apiwattanakul, N., Sekine, T., Chairoungdua, A., Kanai, Y., Nakajima, N., Sophasan, S., Endou, H., 1999. Transport properties of nonsteroidal anti-inflammatory drugs by organic anion transporter 1 expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Molecular Pharmacology* 55 (5), 847–854.
- Beesley, R.C., Faust, R.G., 1979. Sodium ion-coupled uptake of taurocholate by intestinal brush-border membrane vesicles. *Biochemical Journal* 178 (2), 299–303.
- Bellentani, S., Hardison, W.G., Marchegiano, P., Zanasi, G., Manenti, F., 1987. Bile acid inhibition of taurocholate uptake by rat hepatocytes: role of OH groups. *American Journal of Physiology* 252 (3 Pt 1), G339–G344.
- Charney, A.N., Donowitz, M., 1978. Functional significance of intestinal $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$: in vivo ouabain inhibition. *American Journal of Physiology* 234 (6), E629–E636.
- Chiang, J.Y., Kimmel, R., Weinberger, C., Stroup, D., 2000. Farnesoid X receptor responds to bile acids and represses cholesterol 7 α -hydroxylase gene (CYP7A1) transcription. *Journal of Biological Chemistry* 275 (15), 10918–10924.
- Craddock, A.L., Love, M.W., Daniel, R.W., Kirby, L.C., Walters, H.C., Wong, M.H., Dawson, P.A., 1998. Expression and transport properties of the human ileal and renal sodium-dependent bile acid transporter. *American Journal of Physiology* 274 (1 Pt 1), G157–G169.
- Fiske, C.H., Subbarow, Y., 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *Journal of Biological Chemistry* 66, 375–400.
- Gordon, S.J., Kinsey, M.D., Magen, J.S., Joseph, R.E., Kowlessar, O.D., 1979. Structure of bile acids associated with secretion in the rat cecum. *Gastroenterology* 77 (1), 38–44.
- Griffin, S.D., Buxton, K.D., Donaldson, I.A., 1993. The alpha-D-glucosyl C-2 hydroxyl is required for binding to the H(+)-sucrose transporter in phloem. *Biochimica et Biophysica Acta* 1152 (1), 61–68.
- Harms, V., Wright, E.M., 1980. Some characteristics of Na/K-ATPase from rat intestinal basal lateral membranes. *Journal of Membrane Biology* 53 (2), 119–128.

- Huff, M.W., Telford, D.E., Edwards, J.Y., Burnett, J.R., Barrett, P.H., Rapp, S.R., Napawan, N., Keller, B.T., 2002. Inhibition of the apical sodium-dependent bile acid transporter reduces LDL cholesterol and apoB by enhanced plasma clearance of LDL apoB. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 22 (11), 1884–1891.
- Klip, A., Grinstein, S., Biber, J., Semenza, G., 1980. Interaction of the sugar carrier of intestinal brush-border membranes with HgCl_2 . *Biochimica et Biophysica Acta* 598 (1), 100–114.
- Kuroki, S., Naito, T., Chijiwa, K., Tanaka, M., 1999. Effects of cholestyramine on hepatic cholesterol 7 α -hydroxylase and serum 7 α -hydroxycholesterol in the hamster. *Lipids* 34 (8), 817–823.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193 (1), 265–275.
- Lu, T.T., Makishima, M., Repa, J.J., Schoonjans, K., Kerr, T.A., Auwerx, J., Mangelsdorf, D.J., 2000. Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Molecular Cell* 6 (3), 507–515.
- Miller, D.S., 1981. HgCl_2 inhibition of nutrient transport in teleost fish small intestine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 216 (1), 70–76.
- Mircheff, A.K., Wright, E.M., 1976. Analytical isolation of plasma membranes of intestinal epithelial cells: identification of Na, K–ATPase rich membranes and the distribution of enzyme activities. *Journal of Membrane Biology* 28 (4), 309–333.
- Murer, H., Kinne, R., 1980. The use of isolated membrane vesicles to study epithelial transport processes. *Journal of Membrane Biology* 55 (2), 81–95.
- Piyachaturawat, P., Chai-ngam, N., Chuncharunee, A., Komaratat, P., Suksamrarn, A., 2000. Choleretic activity of phloracetophenone in rats: structure–function studies using acetophenone analogues. *European Journal of Pharmacology* 387 (2), 221–227.
- Piyachaturawat, P., Srivoraphan, P., Chuncharunee, A., Komaratat, P., Suksamrarn, A., 2002. Cholesterol lowering effects of a choleretic phloracetophenone in hypercholesterolemic hamsters. *European Journal Pharmacology* 439 (1–3), 141–147.
- Root, C., Smith, C.D., Sundseth, S.S., Pink, H.M., Wilson, J.G., Lewis, M.C., 2002. Ileal bile acid transporter inhibition, CYP7A1 induction, and antilipemic action of 264W94. *Journal of Lipid Research* 43 (8), 1320–1330.
- Russell, D.W., Setchell, K.D., 1992. Bile acid biosynthesis. *Biochemistry* 31 (20), 4737–4749.
- Saeiki, T., Matoba, K., Furukawa, H., Kirifuji, K., Kanamoto, R., Iwami, K., 1999. Characterization, cDNA cloning, and functional expression of mouse ileal sodium-dependent bile acid transporter. *Journal of Biochemistry (Tokyo)* 125 (4), 846–851.
- Schmitz, J., Preiser, H., Maestracci, D., Ghosh, B.K., Cerda, J.J., Crane, R.K., 1973. Purification of the human intestinal brush border membrane. *Biochimica et Biophysica Acta* 323 (1), 98–112.
- Shneider, B.L., 2001. Intestinal bile acid transport: biology, physiology, and pathophysiology. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 32 (4), 407–417.
- Shneider, B.L., Dawson, P.A., Christie, D.M., Hardikar, W., Wong, M.H., Suchy, F.J., 1995. Cloning and molecular characterization of the ontogeny of a rat ileal sodium-dependent bile acid transporter. *Journal of Clinical Investigation* 95 (2), 745–754.
- Spady, D.K., Cuthbert, J.A., Willard, M.N., Meidell, R.S., 1998. Overexpression of cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A) in mice lacking the low density lipoprotein (LDL) receptor gene. LDL transport and plasma LDL concentrations are reduced. *Journal of Biological Chemistry* 273 (1), 126–132.
- Terlouw, S.A., Graeff, C., Smeets, P.H., Fricker, G., Russel, F.G., Masereeuw, R., Miller, D.S., 2002. Short- and long-term influences of heavy metals on anionic drug efflux from renal proximal tubule. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 301 (2), 578–585.
- Tochtrop, G.P., DeKoster, G.T., Covey, D.F., Cistola, D.P., 2004. A single hydroxyl group governs ligand site selectivity in human ileal bile acid binding protein. *Journal of the American Chemical Society* 126 (35), 11024–11029.
- Ulrich, H., 1990. Sodium chloride transport pathways in intestinal membrane vesicle. *Methods in Enzymology* 192, 389–408.
- Weinman, S.A., 1997. Electrogenicity of Na^+ -coupled bile acid transporters. *Yale Journal of Biology and Medicine* 70 (4), 331–340.
- Wilson, F.A., 1981. Intestinal transport of bile acids. *American Journal of Physiology* 241 (2), G83–G92.
- Wilson, F.A., Treanor, L.L., 1981. Studies of relationship among bile-acid uptake, Na^+ , K^+ –ATPase, and Na^+ gradient in isolated cells from rat ileum. *Gastroenterology* 81 (1), 54–60.
- Wolf, G., 1999. The role of oxysterols in cholesterol homeostasis. *Nutrition Reviews* 57 (6), 196–198.
- Wong, M.H., Oelkers, P., Craddock, A.L., Dawson, P.A., 1994. Expression cloning and characterization of the hamster ileal sodium-dependent bile acid transporter. *Journal of Biological Chemistry* 269 (2), 1340–1347.

Research Paper

4-Hydroxyacetophenone-Induced Cholerisis in Rats is Mediated by the Mrp2-Dependent Biliary Secretion of Its Glucuronide Conjugate

Chitrawina Mahagita,^{1,2} Khwanchit Tanphichai,¹ Apichart Suksamrarn,³
Nazzareno Ballatori,² and Pawinee Piyachaturawat^{1,4}

Received April 25, 2006; accepted June 22, 2006

Purpose. The present study examined the underlying mechanism by which 4-hydroxyacetophenone (4-HA), a bioactive compound found in several medicinal herbs, exerts its potent stimulatory effects on hepatic bile secretion.

Methods. Bile flow, and biliary excretion of 4-HA, its metabolites, and inorganic electrolytes was examined in both normal Wistar rats and in TR⁻ Wistar rats that have a congenital defect in the multidrug resistance-associated protein-2, Mrp2/Abcc2. The effects of 4-HA were also examined in animals treated with buthionine sulfoximine to decrease hepatic glutathione (GSH) levels.

Results. In normal rats, 4-HA dramatically increased bile flow rate, whereas it failed to exert a choleretic effect in TR⁻ rats. This cholerisis was not explained by increased biliary output of Na⁺, K⁺, Cl⁻ or HCO₃⁻, or by increased biliary GSH excretion. Depletion of hepatic GSH with buthionine sulfoximine had no effect on the 4-HA-induced cholerisis. HPLC analysis revealed that a single major compound was present in bile, namely 4-hydroxyacetophenone-4-O- β -glucuronide, and that the parent compound was not detected in bile. Biliary excretion of the glucuronide was directly correlated with the increases in bile flow. In contrast to normal rats, this 4-HA metabolite was not present in bile of TR⁻ rats.

Conclusions. These results demonstrate that the major biliary metabolite of 4-HA in rats is the 4-O- β -glucuronide, a compound that is secreted into bile at high concentrations, and may thus account in large part for the choleretic effects of 4-HA. Transport of this metabolite across the canalicular membrane into bile requires expression of the Mrp2 transport protein.

KEY WORDS: electrolyte; glucuronide conjugate; hepatic bile secretion; Mrp2/Abcc2; 4-hydroxyacetophenone.

INTRODUCTION

Hepatic bile formation plays a vital role in the elimination of both endogenous and exogenous compounds, including xenobiotics and toxic substances. Impairment of this process leads to retention of these compounds and to many harmful conditions. In addition to causing direct cell damage, the accumulated compounds may interact with nuclear receptors and other transcription factors, thus altering expression of their target genes and leading to other pathological conditions (1). Hence, compounds that are able

to promote cholerisis and facilitate the elimination of toxic compounds may have therapeutic potential to alleviate liver disorders.

Bile is secreted by hepatocytes into bile canaliculi. Canalicular bile formation is regarded as an osmotic water flow generated in response to active solute transport. Bile flow is classified into two components: one is related to bile acid output which is characterized by a correlation between bile acid secretion and bile flow, and the second is a bile-acid independent flow (BAIF), in which bile flow is determined by the output of non-bile acid solutes, including reduced glutathione (GSH) and other organic solutes, as well as inorganic electrolytes. The bile-acid dependent fraction (BADF) accounts for 40–50% of canalicular bile flow in rats, and the rest is BAIF. Biliary excretion of GSH and HCO₃⁻ has been considered as primary driving forces for BAIF (2–4). BAIF may also be generated by active biliary secretion of foreign organic molecules or their metabolites (5–8). Inorganic electrolytes (Na⁺, Cl⁻ and K⁺) function largely as counter-ions that are passively secreted from hepatocytes or/and through tight junctions down their electrochemical gradients.

Recent studies have shown that hydroxyacetophenones are potent stimulants of bile flow, and have described a

¹ Department of Physiology, Faculty of Science, Mahidol University, Rama 6 Rd, Bangkok 10400, Thailand.

² Department of Environmental Medicine, University of Rochester School of Medicine, Rochester, NY 14642, USA.

³ Department of Chemistry, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University, Bangkok 10240, Thailand.

⁴ To whom correspondence should be addressed. (e-mail: scppy@mahidol.ac.th)

ABBREVIATIONS: BADF, bile acid dependent flow; BAIF, bile acid independent flow; BSO, buthionine sulfoximine; GSH, reduced glutathione; Mrp2, multidrug resistance-associated protein-2; 4-HA, 4-hydroxyacetophenone.

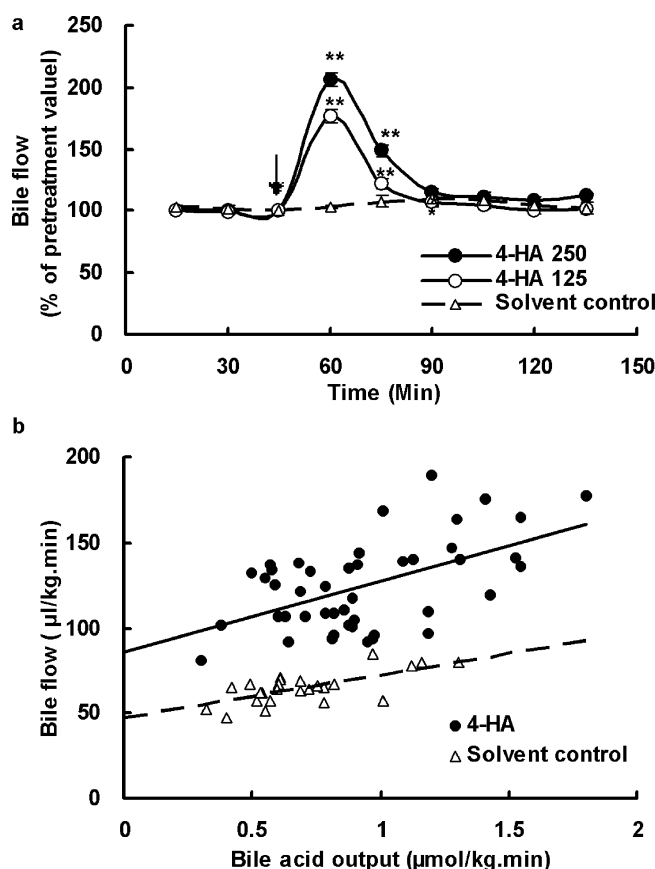


Fig. 1. Effect of 4-HA on bile flow in normal Wistar rats. (a) Choleric activity of 125 (open circle) and 250 (filled circle) $\mu\text{mol/kg}$ body weight of 4-HA or solvent control (open triangle). (b) Relationship between bile flow and bile acid output. Bile samples were collected for 15 min after intraduodenal injection of 4-HA (filled circle); $y=41.95x+85.29$, $r^2=0.2972$, $p<0.005$, or solvent control (open triangle); $y=25.37x+47.01$, $r^2=0.4785$, $p<0.005$. Values are means $\pm$ SEM from five to ten animals. $**p<0.005$ and $*p<0.05$ significantly different from individual control at the corresponding time.

relationship between the structures of hydroxyacetophenones and their choleric activities (9). The acetophenone with a single hydroxyl group at the 4-position (4-hydroxyacetophenone; 4-HA) exhibited a potent choleresis with low lithogenic index (9). This compound has been reported as an active ingredient in plants used in indigenous medicines of several Asian countries, including *Aster batangensis* (10), barley tea (11), and *Artemisia capillare* (12). *A. capillare* is a component of Chinese medicines that are used to enhance bilirubin clearance in newborns (12). However, the choleric mechanism of 4-HA has not yet been identified, and is the focus of the present study.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

4-HA was purchased from Fluka Chemie AG (Buchs, Switzerland). 3α -Hydroxysteroid dehydrogenase, β -NAD, β -NADPH, 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid), GSH, and GSSG reductase were purchased from the Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). All the other reagents were commercially obtained and are of analytical grade.

Animal Treatments and Bile Sample Collections

Male Wistar rats weighing 220–290 g (7–8 weeks) were obtained from the National Animal Center, Bangkok, Thailand and were maintained on a standard diet and water *ad libitum*. A colony of TR⁻ rats is maintained at the University of Rochester School of Medicine Animal Facility, and studies with these animals were performed at the University of Rochester. Overnight fasted animals were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) and prepared for collection of bile samples as previously described (9). A tracheostomy was performed to facilitate breathing. The common bile duct and femoral vein were cannulated using polyethylene (PE) tubing for collection of secreted bile and

Table I. Effect of 4-HA on Biliary Concentrations of Inorganic Electrolytes (Na^+ , K^+ , Cl^- and HCO_3^-)

	BFR ($\mu\text{l}/\text{min.kg}$)	Na^+ (mM)	K^+ (mM)	Cl^- (mM)	HCO_3^- (mM)
Solvent control					
Before	65.8 $\pm$ 2.5	150.5 $\pm$ 0.3	5.78 $\pm$ 0.3	95 $\pm$ 2.5	22.4 $\pm$ 3.6
After	67.6 $\pm$ 3.3	152.5 $\pm$ 0.3	5.46 $\pm$ 0.2	94 $\pm$ 2.8	24.4 $\pm$ 3.3
4-HA 125 $\mu\text{mol/kg}$					
Before	69.4 $\pm$ 2.5	150.8 $\pm$ 0.6	4.71 $\pm$ 0.2	93.6 $\pm$ 1	28.2 $\pm$ 0.6
After	118.0 $\pm$ 3.9**	147.2 $\pm$ 0.6**	4.82 $\pm$ 0.2	86.9 $\pm$ 0.8**	26.4 $\pm$ 0.7**
4-HA 250 $\mu\text{mol/kg}$					
Before	68.5 $\pm$ 1.3	152.1 $\pm$ 0.9	4.52 $\pm$ 0.2	95.4 $\pm$ 1.4	28.2 $\pm$ 1.0
After	140.5 $\pm$ 3.9**	148.2 $\pm$ 0.8**	4.93 $\pm$ 0.2**	86.3 $\pm$ 1.5**	26.3 $\pm$ 1.0
UDCA 50 $\mu\text{mol/kg}$					
Before	70.1 $\pm$ 6.3	150.7 $\pm$ 0.3	5.85 $\pm$ 0.6	89.7 $\pm$ 1.3	26.5 $\pm$ 1.6
After	85.4 $\pm$ 6.3**	155.7 $\pm$ 0.9*	6.42 $\pm$ 0.6*	84.7 $\pm$ 1.3*	28.9 $\pm$ 1.4*
UDCA 100 $\mu\text{mol/kg}$					
Before	67.1 $\pm$ 5.1	151.0 $\pm$ 0.5	5.15 $\pm$ 0.5	90.7 $\pm$ 0.8	27.2 $\pm$ 0.4
After	88.3 $\pm$ 2.1*	153.3 $\pm$ 1.33*	5.37 $\pm$ 0.4*	84.7 $\pm$ 1.8*	30.9 $\pm$ 0.7*

Bile samples were collected for 15 min after intraduodenal injection of 4-HA (125 or 250 $\mu\text{mol/kg}$ body weight) and after UDCA injection into the portal vein (50 or 100 $\mu\text{mol/kg}$ body weight). Values are means $\pm$ SEM from 10–11 animals.

* $p<0.05$ significantly different from individual control before administration.

** $p<0.005$ significantly different from individual control before administration.

for 0.9% saline infusion at the rate of 1.2 ml/h by using an infusion pump. The body temperature of animals was maintained at $37\pm0.5^\circ\text{C}$ with a heating lamp to prevent hypothermic alterations of bile flow. The experimental protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committees.

Bile samples were collected at 15-min intervals into pre-weighed tubes. After collection of three control samples, 4-HA dissolved in a solvent mixture (dimethyl sulfoxide: ethanol: water, at 25:15:60) was injected intraduodenally at various doses. Control rats received a similar volume of solvent (0.5 ml). The effects of ursodeoxycholic acid (UDCA), administered as a single injection into the duodenum, was examined as a positive control. UDCA was dissolved in dimethyl sulfoxide: ethanol: water (25:15:60). Buthionine sulfoximine (BSO), 6 mmol/kg body weight, i.p., was given 4 h before 4-HA administration to examine the effect of GSH depletion on the 4-HA cholerisis. Bile flow rate was determined by gravimetry, assuming a bile density of 1.0 g/ml. The biliary excretion rate was calculated as the product between bile flow and biliary concentration.

Analysis of Biliary Components

Bile acid concentrations were determined using the 3α -hydroxysteroid dehydrogenase procedure (13). Biliary electrolytes including Na^+ , K^+ , Cl^- and HCO_3^- concentrations were determined using ion selective electrodes (DADE Dimension RxL, Dade Behring Holdings, USA). Bile samples were collected under mineral oil to prevent volatilization of CO_2 . The electrolyte operating range was 50–200 mmol/l for Na^+ , 1–10 mmol/l for K^+ , 50–200 mmol/l for Cl^- and 5–45 mmol/l for total CO_2 .

Biliary and hepatic content of total glutathione was determined using the enzymatic methods of Tietze (14) and Griffith (15). Bile was collected under 500 μl of 6% sulfosalicylic acid to precipitate protein and prevent auto-oxidation. Samples were centrifuged at 4°C for 10 min to precipitate the denatured proteins, and the supernatant was stored at -70°C until assayed by spectrophotometry. Livers samples were placed in tared tubes containing ice-chilled 5% perchloric acid with 1 mM EDTA, and minced. Livers were homogenized on ice and centrifuged at $7,500\times g$ at 4°C for

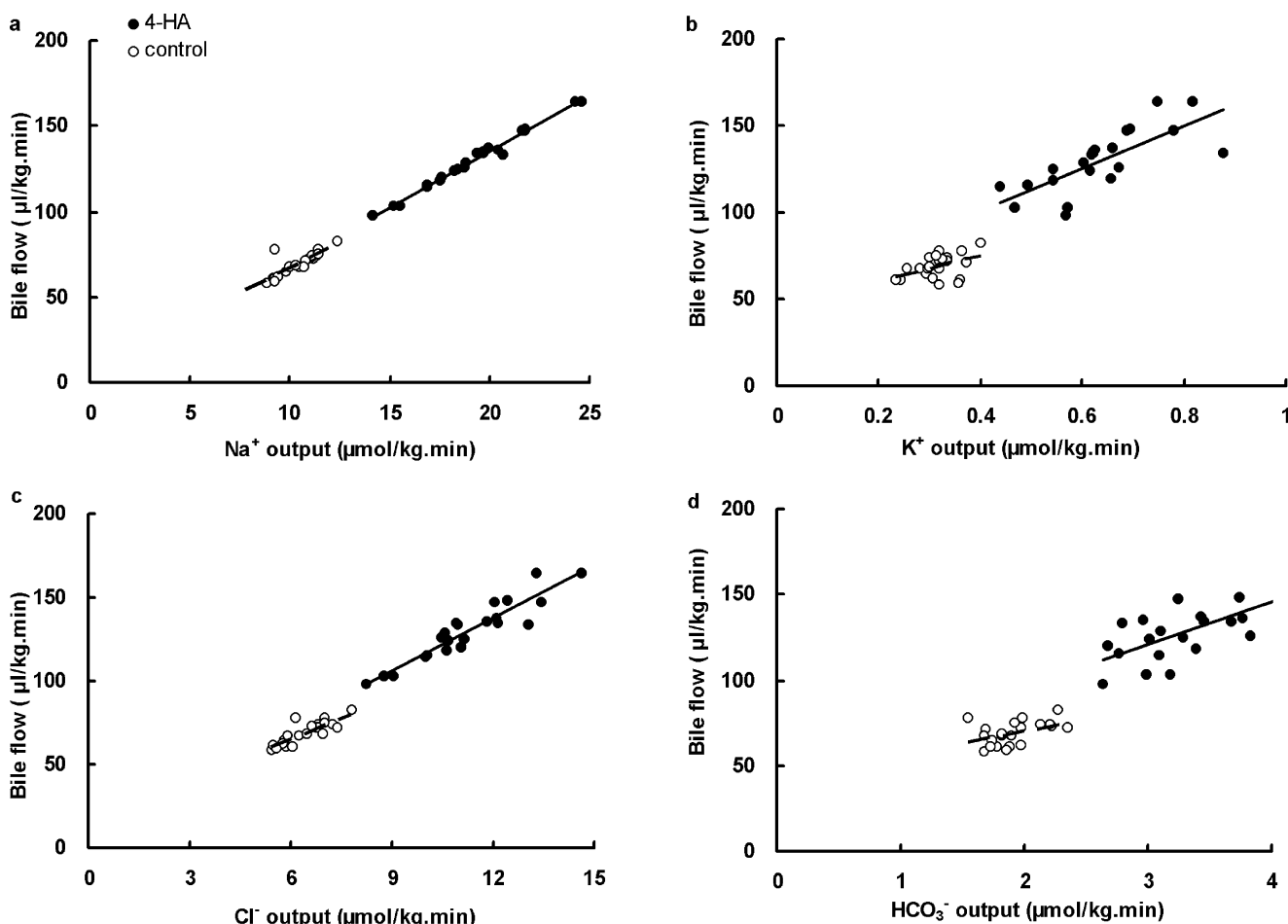


Fig. 2. Relationship between bile flow and electrolyte output. Bile samples were collected for 15 min after intraduodenal injection of 4-HA (filled circle) or solvent control (open circle). Bile samples were analyzed for correlation between bile flow and output of Na^+ (a); $y=5.78x+9.06$, $r^2=0.6973$, $p<0.005$ (control), $y=6.56x+4.08$, $r^2=0.9871$, $p<0.005$ (4-HA), K^+ (b); $y=76.25x+44.89$, $r^2=0.2219$, $p=0.0269$ (control), $y=122.3x+52.65$, $r^2=0.5578$, $p<0.0001$ (4-HA), Cl^- (c); $y=8.32x+15.18$, $r^2=0.6798$, $p<0.0001$ (control), $y=10.5x+11.81$, $r^2=0.8707$, $p<0.005$ (4-HA), HCO_3^- (d); $y=14.08x+42.17$, $r^2=0.2128$, $p=0.0307$ (control), $y=25.02x+45.48$, $r^2=0.5954$, $p<0.0001$ (4-HA).

5 min. Supernatant was removed and samples were diluted further for measurement of hepatic glutathione content.

Isolation and Structure Elucidation of Biliary Components

Bile samples collected for 15 min after administration of 4-HA were diluted with 20 volume of absolute ethanol, boiled for 30 min and left overnight. Thereafter, they were filtered through Whatman no. 1 paper. The filtrates were dried using a speed vacuum, then redissolved with 5% acetic acid in methanol (mobile phase). For HPLC analysis, a Waters 600 system controller and pump, a Waters 996 diode array detector, and a Waters manual injector (Waters Associates, Milford, MA, USA) were employed. Separation and quantization was achieved by using μ -Bondapak C18, 10 μ m, 3.9×300 mm column (Waters Associates), a mobile phase of 5% acetic acid in methanol, a flow rate of 1.0 ml/min, and a wavelength of 264 nm. The HPLC peak corresponding to the single major metabolite (retention time 8–10 min) was collected and the solvent was removed by co-evaporation with n-butanol under reduced pressure. The nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded on a Bruker AVANCE 400 FT-NMR spectrometer (Faellanden, Switzerland). The residual nondeuterated dimethyl sulfoxide- d_6 signal at 2.49 ppm was used as reference for ^1H -NMR spectra. High-resolution fast atom bombardment mass spectra

were measured with a Finnigan MAT 90 instrument (Bremen, Germany). The amount of 4-hydroxyacetophenone-4- O - β -glucuronide in bile was determined spectrophotometrically at a wavelength of 264 nm. Standards were prepared from 4-hydroxyacetophenone-4- O - β -glucuronide isolated by HPLC from bile samples collected from rats treated with 4-HA.

Statistical Analyses

All data are expressed as mean $\pm$ SEM. Data obtained after treatment was compared with their respective controls before treatment using ANOVA, followed by Student–Newman–Keul's test. The relation between bile flow and biliary excretion rate was examined by linear regression analysis. Statistical significance was considered at $p < 0.05$.

RESULTS

Dose Response Effect of 4-HA on Bile Secretion

In normal Wistar rats, 4-HA produced an immediate and dramatic increase in bile flow. In the first 15-min collection interval after 4-HA administration, bile flow was increased to 176 ± 6 and $206 \pm 5\%$ of control by 4-HA doses of 125 and 250 $\mu\text{mol/kg}$, respectively. However, the choleresis was transient, and bile flow rate rapidly returned to baseline levels (Fig. 1).

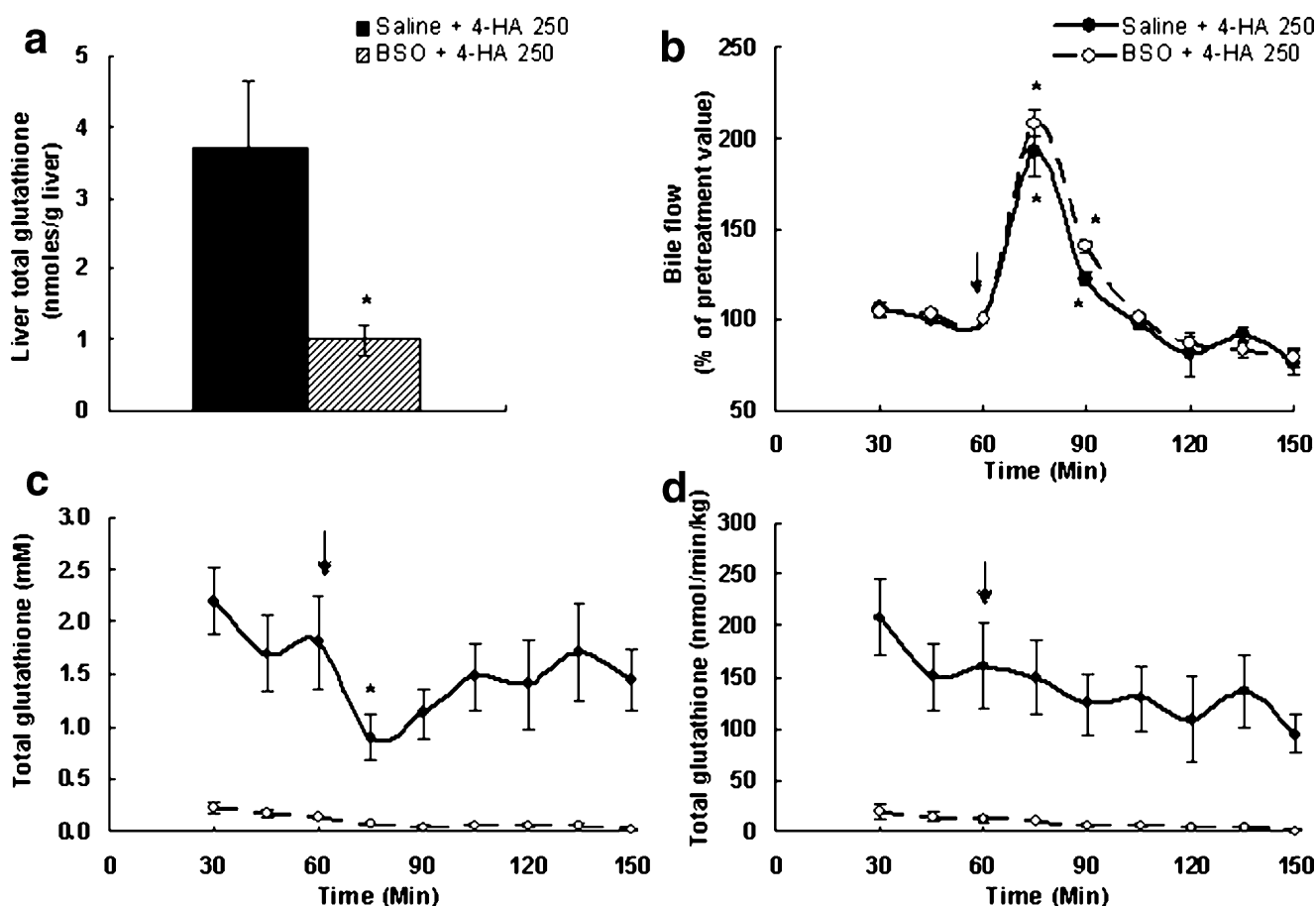


Fig. 3. The 4-HA-induced choleresis does not depend on GSH. Saline (filled circle) or BSO (open circle), 6 mmol/kg BW, i.p., was injected 4 h before 4-HA administration. Liver was removed at the end of each experiment and analyzed for total glutathione (a). Bile flow (b), and total glutathione concentration (c) and output (d) were measured. * $p < 0.05$ significantly different from individual control (b).

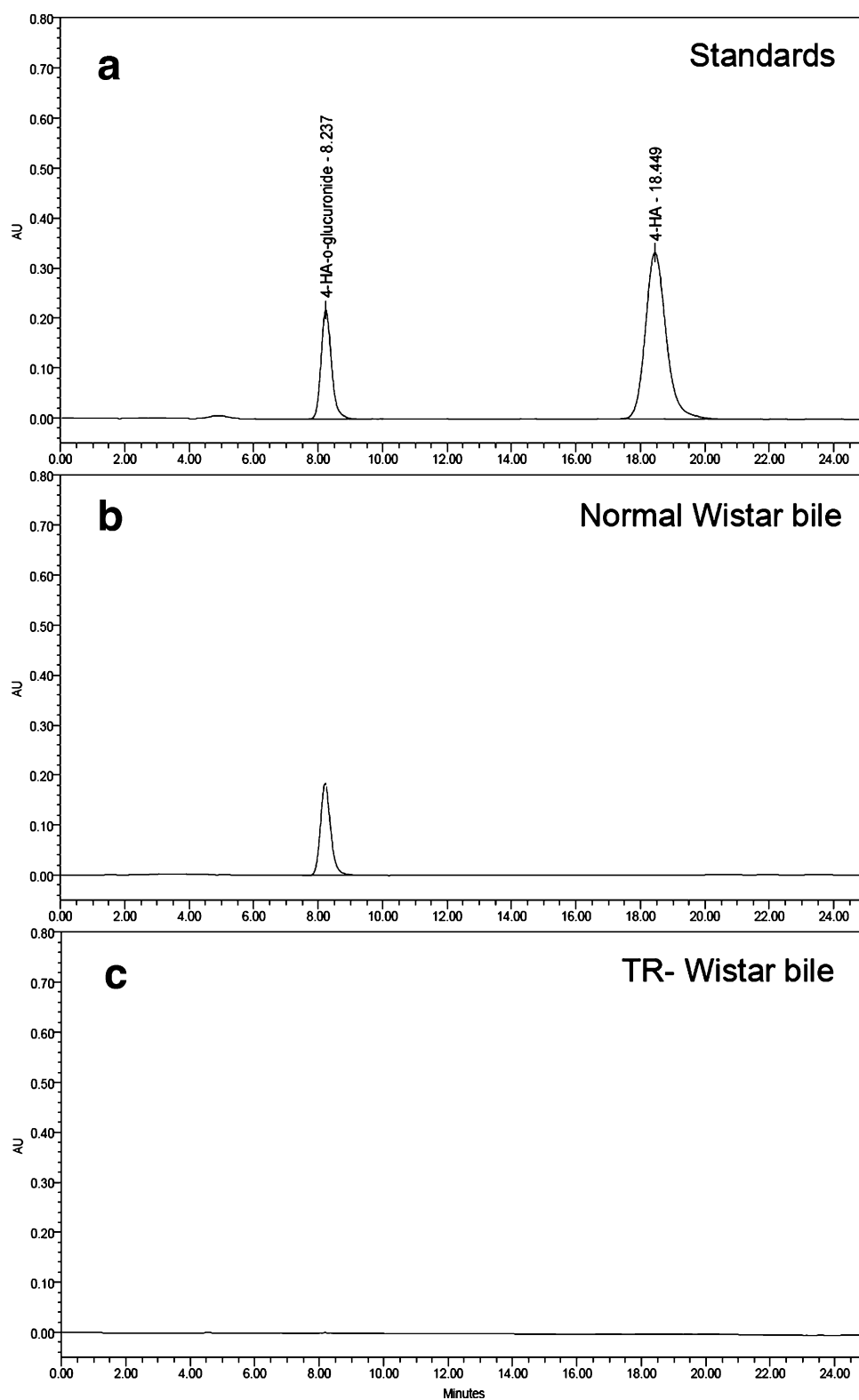


Fig. 4. HPLC analysis of possible 4-HA metabolites in bile. (a) Retention times of a standard solution containing 4-hydroxyacetophenone-4-*O*- β -glucuronide and 4-HA. (b) Bile was found to contain one major metabolite in Wistar rats treated with 4-HA, and this compound was subsequently identified as 4-hydroxyacetophenone-4-*O*-glucuronide. (c) Neither 4-HA nor any metabolites were detected in bile from TR⁻ rats treated with 4-HA.

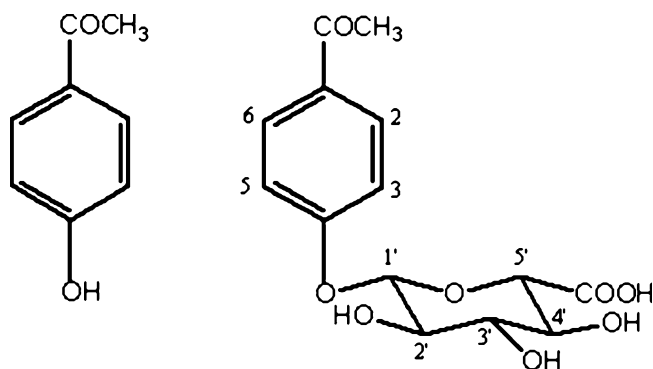


Fig. 5. Structures of 4-hydroxyacetophenone (4-HA) (left), and 4-hydroxyacetophenone-4-*O*- β -glucuronide (right).

Concurrent with the increased bile flow, bile acid concentration was decreased. As illustrated in Fig. 1, the slope of the line that defines the relation between bile flow and bile acid output in the 4-HA-treated rats was similar to that of control. These observations indicate that the increase in bile flow is due to an increase in BAIF.

Effect of 4-HA on Biliary Electrolyte and GSH Excretion

To examine which osmotically active solute(s) may be responsible for the increase in BAIF, biliary levels of Na^+ , K^+ , Cl^- and HCO_3^- and GSH were analyzed. As shown in Table I, 4-HA slightly reduced the biliary concentrations of Na^+ , Cl^- , HCO_3^- and increased the concentration of K^+ . When bile flow was increased, the outputs of these inorganic electrolytes were increased. UDCA, which elicits a choleresis that is associated with an increase in HCO_3^- and a decrease in Cl^- concentration (16) was also examined for comparison. After UDCA treatment, the choleresis was associated with an elevation of HCO_3^- and a reduction of Cl^- concentrations in bile (Table I). Linear regression analyses of bile flow rates and electrolyte outputs are shown in Fig. 2. In both control and 4-HA treated animals, bile flow rates were positively correlated with electrolyte outputs; however, all of the electrolyte outputs showed similar changes, suggesting that they are not the prime determinants for drawing water into bile after 4-HA administration.

Because GSH is a key osmotically active solute contributing to BAIF (2,3), studies were performed to examine whether GSH is involved in the 4-HA-induced choleresis. GSH levels in bile were measured in both control animals and in animals pre-treated with BSO to deplete hepatic GSH levels. Although BSO produced a significant depletion of hepatic GSH content (Fig. 3), it had no effect on the 4-HA-induced choleresis (Fig. 3). Moreover, total GSH output into bile was not changed significantly after 4-HA administration (Fig. 3), indicating that GSH is not involved in the 4-HA-induced choleresis.

Biliary Excretion of 4-HA and Its Metabolites

To examine whether the choleresis may be attributed to the biliary excretion of 4-HA itself or of a metabolite, HPLC was used to detect and quantify these compounds in bile. Bile from normal Wistar rat that received 4-HA revealed the presence of a single major new peak that eluted with a

retention time of 8–10 min (Fig. 4). No parent compound was detected in bile (the parent compound eluted at a retention time of 17–19 min; Fig. 4). NMR and mass spectral analysis were used to determine the structure of this compound. The compound showed a pseudomolecular ion $[\text{M}-\text{H}]^-$ at m/z 311.0768 in the negative ion high-resolution fast atom bombardment (HR-FAB) mass spectrum, compatible with a molecular formula of $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{O}_8$. The ^1H -NMR spectral data were consistent with a 4-hydroxyacetophenone moiety, based on the three-proton singlet of the acetyl group at δ 2.51, the proton doublet ($J=8.7$ Hz) of H-3 and H-5 at δ 7.10, and the two-proton doublet ($J=8.7$ Hz) of H-2 and H-6 at δ 7.92. The presence of a glucuronide moiety was suggested by a doublet signal at δ 5.18 corresponding to the anomeric proton, H-1', and broad triplet signals of H-2', H-3' and H-4' at δ 3.30, 3.26 and 3.35 with apparent coupling constants of 8.5–8.7 Hz. The relatively large coupling constant (7.0 Hz) of H-1' indicates a β -orientation of the sugar acid residue. Thus, these data indicate that this biliary constituent is 4-hydroxyacetophenone-4-*O*- β -glucuronide (Fig. 5, right).

Of significance, this 4-HA metabolite was present in bile in relatively high concentrations (up to 13 mM; Fig. 6). The amount of 4-HA administered correlated well with and the amount of the metabolite in bile, and a significant positive correlation between bile flow rate and the amount of the secreted metabolite was observed (Fig. 6). The excreted bile volume per micromole of 4-hydroxyacetophenone-4-*O*- β -glucuronide was 34 μl (Fig. 6), which is comparable to that of bile acids (Fig. 1). Hence, the choleric effect of 4-HA may be explained in large part by the excretion of this metabolite into bile.

4-HA Fails to Induce a Choleresis in Mrp2-Deficient Rats

In contrast to the normal Wistar rats, 4-HA failed to produce a choleresis in TR^- rats that lack the canalicular Mrp2 transport protein (Fig. 7). In addition, 4-hydroxyacetophenone-4-*O*- β -glucuronide was not detected in bile from TR^- rats

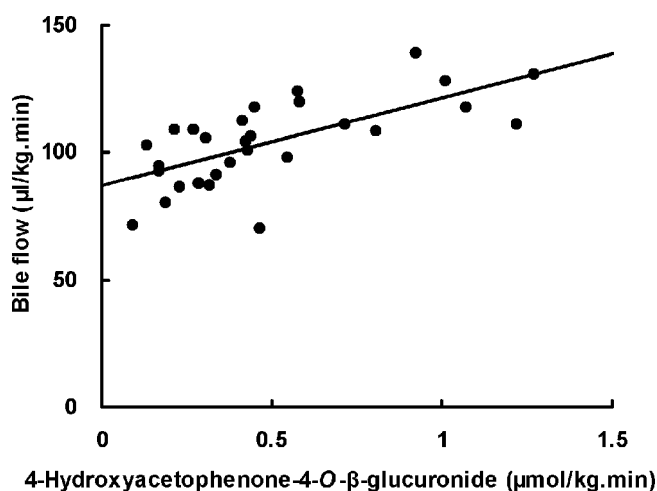


Fig. 6. Relationship between bile flow and 4-hydroxyacetophenone-4-*O*- β -glucuronide excretion rate after 4-HA administration. Bile samples were collected and analyzed for 4-hydroxyacetophenone-4-*O*- β -glucuronide output by HPLC as described in materials and methods, $y=34.48x+86.89$, $r^2=0.4583$, $p<0.005$.

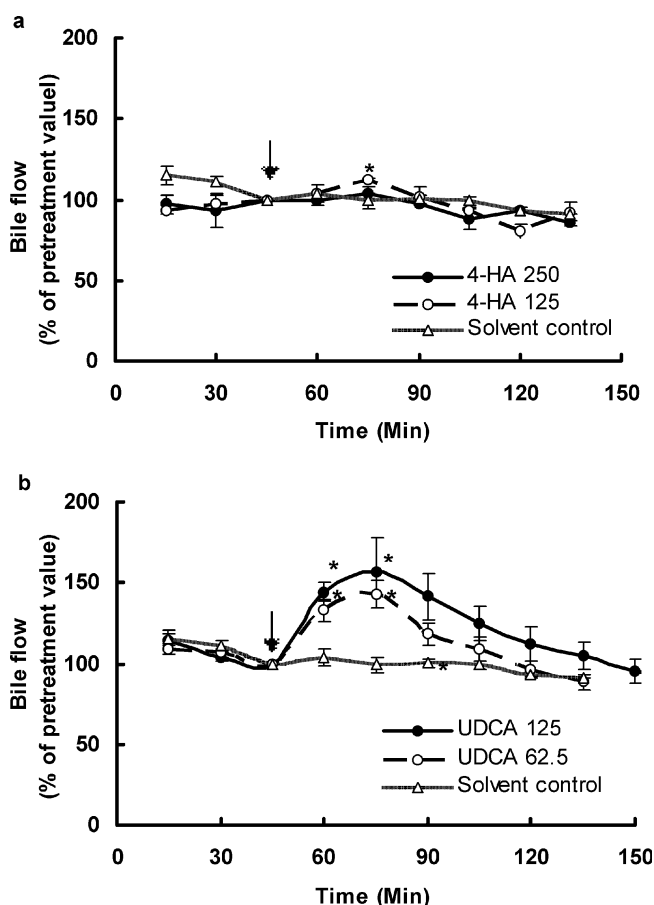


Fig. 7. Lack of choleric effect of 4-HA in TR⁻ Wistar rats. (a) Animals treated with 125 (open circle), 250 (filled circle) µmol/kg body weight of 4-HA or solvent control (open triangle). (b) Animals treated with 62.5 (open circle), 125 (filled circle) µmol/kg body weight of UDCA or solvent control (open triangle). **p* < 0.05 significantly different from pretreatment value at the corresponding time.

(Fig. 4). As expected, TR⁻ animals treated with UDCA demonstrated a robust choleresis (Fig. 7). These results indicate that Mrp2-mediated transport is required for the choleresis, and that 4-hydroxyacetophenone-4-*O*-β-glucuronide is a likely substrate for Mrp2.

DISCUSSION

4-HA is a naturally occurring bioactive compound found in several plants. It exerts potent stimulatory effects on hepatic bile secretion, and may thus be a useful compound to treat a variety of conditions associated with impaired bile secretion (9). The present study identifies the mechanism for this choleric effect by showing that the major biliary metabolite of 4-HA in rats is the 4-*O*-β-glucuronide, a compound that is secreted into bile at high concentrations. Canalicular transport of the glucuronide requires the presence of Mrp2, and the concentrative accumulation of this metabolite in bile accounts in large part for the choleric effect.

Canalicular bile formation is an osmotic process, in which water and electrolytes enter bile canaliculi in response to the active transport of solutes into this space. The major

solutes that drive bile secretion are bile acids (i.e., BADF); however non-bile acid solutes, including reduced glutathione (GSH) and other organic solutes, including many foreign chemicals, also drive bile secretion. The biliary excretion of GSH (2,3), and HCO₃⁻ (4) have been widely considered as the major solutes for BAIF. After giving 4-HA, the concentrations of Na⁺, K⁺, Cl⁻ and HCO₃⁻ were only slightly modified, and were close to those in blood plasma. There was also no change in biliary GSH excretion. As bile flow was increased after receiving 4-HA, the outputs of Na⁺, K⁺, Cl⁻ and HCO₃⁻ were all increased in a similar manner and were positively correlated with the increase of bile secretion. UDCA, which stimulates BAIF mainly by promoting biliary output of HCO₃⁻ in exchange with Cl⁻ at canalicular and ductular membranes (16), was examined for comparison. A single injection of UDCA produced an increase in biliary HCO₃⁻ concentration and a decrease in Cl⁻ concentration from control, and these results differ from those of 4-HA showing a decrease in biliary HCO₃⁻ concentration. Although 4-HA choleresis was associated with increases in biliary output of inorganic electrolytes, these do not appear to be the primary stimulus for the choleresis. GSH, another osmotically active solute contributing to BAIF (2,3), also did not contribute to the choleric activity 4-HA. Bile flow was still increased after 4-HA administration, even when GSH levels in the liver were depleted to 30% of control. In addition, the 4-HA-induced choleresis occurred with only a small increase in bile acid output, confirming previous results that the effect of 4-HA is largely on BAIF (9). On the other hand, as demonstrated by the present data, 4-hydroxyacetophenone-4-*O*-β-glucuronide was secreted into bile in concentrations up to 13 mM, and the excretion of this metabolite directly correlated with the increase in bile flow. 4-HA exhibits low water solubility, and thus it is anticipated that it would need to be modified in the liver in order to facilitate its membrane transport and excretion from the cell. The excreted bile volume per micromole of 4-hydroxyacetophenone-4-*O*-β-glucuronide in bile was 34 µl (Fig. 6), which is similar to that of bile acids (Fig. 1), and thus may completely explain the choleresis. In contrast, the parent compound was not detected in bile.

To test whether Mrp2, the major canalicular transport protein for secretion of glucuronide conjugates into bile is involved in the secretion of 4-hydroxyacetophenone-4-*O*-β-glucuronide, studies were carried out in TR⁻ rats that lack functional Mrp2 transport activity. TR⁻ rats failed to demonstrate a choleresis, and no 4-hydroxyacetophenone-4-*O*-β-glucuronide was detected in their bile. These results support the hypothesis that the Mrp2-mediated excretion of 4-hydroxyacetophenone-4-*O*-β-glucuronide generates the osmotic driving force responsible for the enhanced bile flow observed after 4-HA administration. Because a number of plants contain 4-HA (10–12,17) and several polyphenol can be degraded into 4-HA (18,19), the present findings on the effect of 4-HA may explain some of the pharmacological effects of these plant-derived products.

In conclusion, the choleric effect of 4-HA may be explained by the osmotic activity of a 4-HA metabolite that is secreted into bile in high concentrations by an Mrp2-dependent mechanism. An understanding of the mechanisms by which bioactive compounds in medicinal plants, including

4-HA, stimulate biliary excretion is of interest with respect to possible therapeutic interventions in liver dysfunction, and for developing new drugs.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Mr. Sirichai Kositarat (Central Instrument Facility, Faculty of Science, Mahidol University) for his technical assistance with HPLC analysis of 4-hydroxyacetophenone-4-*O*- β -glucuronide in bile samples of normal Wistar and TR⁻ rats.

This study was supported by grants from the Royal Golden Jubilee program (to CM), the Thailand Research Fund, a research team strengthening grant from BIOTEC, and grants DK48823 and ES01247 from the USA National Institutes of Health (to NB).

REFERENCES

1. M. Trauner, M. Wagner, P. Fickert, and G. Zallner. Molecular regulation of hepatobiliary transport systems: Clinical implications for understanding and treating cholestasis. *J. Clin. Gastroenterol.* **39**:S111-S124 (2005).
2. N. Ballatori and A. T. Truong. Relation between biliary glutathione excretion and bile acid-independent bile flow. *Am. J. Physiol.* **256**:G22-G30 (1989).
3. N. Ballatori and A. T. Truong. Glutathione as a primary osmotic driving force in hepatic bile formation. *Am. J. Physiol.* **263**:G617-G624 (1992).
4. M. H. Nathanson and J. L. Boyer. Mechanism and regulation of bile secretion. *Hepatology* **14**:551-556 (1991).
5. P. Calhoun, K. B. Brown, R. Strunk, D. A. Krusch, M. Scheld, and J. B. Hanks. Experimental studies of biliary excretion of piperacillin. *Ann. Surg.* **205**:420-427 (1987).
6. J. Chenderovitch, A. Raizman, and R. Infante. Mechanism of ethacrynic acid-induced cholestasis in rat. *Am. J. Physiol.* **229**:1180-1187 (1975).
7. J. Gonzalez, C. Fernandez, E. Marino, A. Morales, and R. Jimenez. Biliary excretion and choleretic effect of cefmetazole in rats. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**:1970-1974 (1989).
8. K. Ito, T. Koresawa, K. Nakano, and T. Horie. Mrp2 is involved in benzylpenicillin-induced cholestasis. *Am. J. Gastroint. Liv. Physiol.* **287**:42-49 (2004).
9. P. Piyachaturawat, N. Chai-ngam, A. Chuncharunee, P. Komaratat, and A. Suksamrarn. Choleretic activity of phloracetophenone in rats: Structure-function studies using acetophenone analogues. *Eur. J. Pharmacol.* **387**:221-227 (2000).
10. Y. Shao, Y. L. Li, and B. N. Zhou. Phenolic and triterpenoid glycosides from *Aster batangensis*. *Phytochemistry* **41**:1593-1598 (1996).
11. E. Hideo, K. Murakami, T. Yogoh, H. Ishikawa, Y. Fukuyama, and H. Tanaka. Anti-oxidative compounds in Barley tea. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**:2616-2618 (2004).
12. I. Okuno, K. Uchida, M. Nakamura, and K. Sakurawi. Studies on choleretic constituents in *Artemisia capillaris* THUNB. *Chem. Pharm. Bull.* **36**:769-775 (1988).
13. L. A. Turnberg and A. Anthony-Mote. The quantitative determination of bile salt using thin layer chromatography and 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase. *Clin. Chim. Acta* **24**:253-259 (1969).
14. F. Tietze. Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* **27**:502-522 (1969).
15. O. W. Griffith. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* **106**:207-212 (1980).
16. D. Alvaro, A. Mennone, and J. L. Boyer. Effect of ursodeoxycholic acid on intracellular pH regulation in isolated rat bile duct epithelial cells. *Am. J. Physiol.: Gastrointest. Liver Physiol.* **266**:G783-G791 (1993).
17. N. Ballatori, C. L. Hammond, J. B. Cunningham, S. M. Krance, and R. Marchan. Molecular mechanisms of reduced glutathione transport: Role of the MRP/CFTR/ABCC and OATP/SLC21A families of membrane proteins. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **204**:238-255 (2005).
18. N. Vrchotova, J. Triska, O. Urban, and L. Peknic. Variability of catechin and 4-hydroxyacetophenone distribution in Norway spruce needles in relation to their position, age, and growing conditions. *Environ. Pollut.* **131**:55-59 (2004).
19. M. Shimizu and I. B. Weinstein. Modulation of signal transduction by tea catechins and related phytochemicals. *Mutat. Res.* **591**(1-2):147-160 (2005).

Submitted To American Journal of Physiology

**Phloracetophenone-Induced Choleresis in Rats
is Mediated Through Mrp2**

Lukmanee Tradtrantip^{1,2}, Pawinee Piyachaturawat¹, Carol Soroka², Kathy Harry²,
Albert Mennone², Chitrawina. Mahagita^{1,3}, Nazzareno Ballatori³, and James L. Boyer².

¹Department of Physiology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand,

²Liver Center, Yale University School of Medicine, New Haven, CT, and

³Department of Environmental Medicine, University of Rochester School of Medicine,
Rochester, NY.

Running head:

Corresponding address:

James L. Boyer, M.D.

Ensign Professor of Medicine

Department of Medicine

Yale University School of Medicine

333 Cedar Street/1080 LMP, PO Box 208019

New Haven, CT 06520-8019

Phone: 203-785-5279

Fax: 203-785-7273

Email: james.boyer@yale.edu

Fed Express address

One Gilbert Street

TAC, Room #S241

New Haven, CT 06519

Abstract

Phloracetophenone (2,4,6-trihydroxy acetophenone, THA) is a potent choleretic in the bile fistula rat, although the mechanism is unknown. In the present study, we examined how THA enhances bile secretion. Step-wise infusions of THA (1-4 $\mu\text{mol}/\text{min}$) in the isolated perfused rat liver resulted in an immediate and dose-dependent increase in bile flow (BF), which reached saturation. The increase in BF was not associated with a change in the excretion of bile acids, suggesting that THA stimulated bile acid-independent bile flow (BAIF). To further define the mechanism, the effect of THA on the excretion of sulfobromophthalein (BSP) and disulfobromophthalein (DBSP), typical multidrug resistance proteins-2 (Mrp2) substrates was examined. THA inhibited the biliary excretion of both substrates. Because DBSP is excreted without conjugation to glutathione, in contrast to BSP, the findings suggest that THA might compete with DBSP and BSP metabolites at a common canalicular transport site, presumably Mrp2. THA infusions had no effect on the subcellular localization and distribution of either Mrp2 or the bile salt export pump (Bsep), nor the integrity of the tight junction. In contrast, the choleretic activity of THA was completely absent in the TR⁻ rat, an animal model that lacks Mrp2, directly implicating this canalicular export pump as the mechanisms by which THA is excreted in bile. THA also partially reversed the cholestatic effects of estradiol-17 β -D-glucuronide (E₂-17G) a process also dependent on Mrp2. In conclusion, the choleretic activity of THA and its possible metabolites is dependent on Mrp2. THA appears to stimulate BF by its osmotic effects, and may attenuate the cholestatic effects of hepatotoxins undergoing biotransformation and excretion via similar pathways.

Key words: Phloracetophenone, hepatobiliary excretion, choleresis, Mrp2

Introduction

Canalicular bile flow is formed from the excretion of bile acids (bile acid dependent flow, BAIF), and a bile acid-independent component (BAIF) that results from the excretion of glutathione (GSH) and other organic and inorganic solutes (2,20,36). The biliary excretion of these osmotically active compounds which also includes metabolic by-products and xenobiotics, are the major driving force for the passive movement of fluid and electrolytes across the hepatocyte epithelium and the tight junctions between these cells (4). The secretion of bile is a vital function for eliminating endogenous and exogenous compounds which often undergo biotransformation by phase I and II hepatic enzymes prior to their excretion into bile. The therapeutic potential of a number of these compounds is dependent upon this metabolic pathway.

For example, Genipin, an intestinal bacterial metabolite of geniposide which is the major active compound in Inchin-ko-to (ICKT), is an herbal medicine used in China and Japan for treatment of jaundice. Genipin has been shown to have potent choleretic activity (32) and is conjugated with glucuronide in the liver before excretion. Genipin stimulates the insertion of the multidrug-resistance-associated protein 2 (Mrp2) into the bile canalicular membrane, and thereby increases the biliary excretion of reduced glutathione and BAIF (31).

Ursodeoxycholic acid (UDCA), an anti-cholestatic drug, prevents the cholestatic effects of ethinylestradiol by inhibiting both the activity and expression of the hepatic microsomal enzyme involved in ethinylestradiol glucuronidation (29). This *in vivo* effect appears to be mediated by the major metabolite of UDC, tauroursodeoxycholate which inhibits ethinylestradiol glucuronidation non-competitively *in vitro* (29).

Phloracetophenone or 2,4,6-trihydroxyacetophenone (THA), the aglycone component of phloracetophenone glucoside, is a naturally occurring compound obtained from the rhizome of *Curcuma comosa* (Family Zingiberaceae) (24). When administered intraduodenally to rats, THA stimulates bile flow and enhances the biliary excretion of bile acids, leading to a lowering in the plasma levels of cholesterol (25-26). Thus THA may have potential as a therapeutic drug for the treatment of cholestasis and prevention of gallstones (3, 22). However, the underlying mechanism by which THA enhances bile flow remains unknown. In the present study, we utilized the isolated perfused rat liver (IPRL) to examine the effects of THA on bile flow, and defined the possible pathways that may account for its choleretic effects. The isolated perfused rat liver model was employed since it facilitates study of the direct action of compounds on the liver without the confounding effects of blood flow or extrahepatic tissue involvement (21). Our findings indicate that the choleretic effect of THA is primarily dependent on Mrp2, and that THA may have therapeutic potential to attenuate E₂-17G induced cholestasis.

Materials and Methods

1. Chemicals

THA was purchased from Fluka Chemie AG (Buchs, Switzerland). Taurocholate (TC), estradiol-17 β -D-glucuronide (E₂-17G), glutathione reductase, the reduced form of glutathione (GSH), the reduced form of β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, tetrasodium (β -NADPH), 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and sulfobromophthalein (BSP) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Phenol-3,6-dibromophthalein disulfonate (DBSP) was from Societe d-Etudes et de Recherches Biologiques (Paris, France). Bile Acid Reagent A and B for bile acid determination were from Trinity Biotech Co. (Wicklow, Ireland). All other chemicals were of analytical grade.

2. Isolated perfused rat liver studies.

Male Sprague-Dawley rats (190-200g) were obtained from Charles River Laboratories (Wilmington MA, USA), and all experimental protocols were conducted under the National Institutes of Health guidelines and were approved by The Yale Animal Care and Use Committee.

Rat livers were isolated and perfused in the Cellular and Molecular Physiology Core of the Yale Liver Center as described previously (6). Following sodium pentobarbital anesthesia (50 mg/kg body weight, i.p.), the bile duct and portal vein were cannulated with PE-10 tubing (Becton Dickinson Primary Care Diagnostics, Sparks, MD, USA) and a 14-gauge Teflon intravenous catheter (Mckesson General Medical, Cheshire, CT, USA), respectively. The liver was perfused immediately at a rate of 30 ml/min with oxygenated (95% O₂-5% CO₂) Krebs-Ringer's bicarbonate (KRB) buffer (pH 7.4) containing 0.1% glucose and maintained at 37°C $\pm$ 0.5°C. After cannulation of the inferior vena cava, the liver was transferred into a temperature-controlled chamber and then perfused at a constant flow rate of 40 ml/min with oxygenated KRB buffer (4.4-5.7 ml/min/g liver). KRB buffer was gassed continuously with a humidified mixture of 95% O₂/5% CO₂ and maintained at 37°C $\pm$ 0.5°C by monitoring the temperature with a thermister probe (Yellow Springs Instrument Co., Yellow Springs, OH, USA) inserted between the lobes of the liver. The viability of the liver was determined by continuously monitoring perfusion pressure and O₂ consumption throughout the course of experiment. At the end of the experiment, trypan blue was injected into the liver to evaluate the uniformity of perfusion from the distribution of the staining dye.

All isolated perfused rat liver studies utilized a single-pass system with oxygenated (95% O₂-5% CO₂) KRB (pH 7.4). Following a 15 min period of equilibration, THA was infused and bile flow and biliary excretion of bile acid and total glutathione were assessed. THA was dissolved in solvent (DMSO: absolute ethanol:

KRB, 25:15:60) and was infused into the perfusate at a rate of 1, 2, or 4 $\mu\text{mol}/\text{min}$ (25, 50, and 100 μM , respectively) in a step-wise fashion at 20 min intervals. Bile samples were collected at 5 min intervals into pre-weighed tubes throughout the experiment. Six percent sulfosalicylic acid was added when GSH was determined. The volume of bile was determined gravimetrically by assuming a density of 1.0 g/ml, and bile flow was expressed as microliters per min per gram of liver. Bile samples were analyzed for biliary bile acid and total glutathione concentration. To evaluate the effect of THA on BSP or DBSP excretion, THA was added to the perfusion media at a constant rate of 40 $\mu\text{mol}/\text{min}$ (1mM) forty-five minutes after BSP or DBSP were infused at a constant rate of 0.04 $\mu\text{mol}/\text{min}$ (1 μM) to maintain a steady state of excretion. Bile samples were analyzed for BSP or DBSP concentrations and excretion rates determined.

To further evaluate the therapeutic potential of THA, its effect on E₂-17G - induced cholestasis was examined. After an initial 15-min control period, taurocholate (TC) at a dose of 0.5 $\mu\text{mol}/\text{min}$ (12.5 μM) was continuously infused for the entire experiment. After the excretion of TC reached a steady state (30 min later) THA was added into the perfusion medium at a rate of 40 $\mu\text{mol}/\text{min}$ (1 mM) together with a single bolus injection of E₂-17G (1 $\mu\text{mol}/100$ g body weight). Bile flow rate, biliary bile acid and total glutathione concentrations were then determined.

3. Bile fistula rat study in TR⁻ rats.

TR⁻ rats were maintained at the University of Rochester School of Medicine Faculty (Rochester, NY, USA). Overnight fasted TR⁻ and normal Wistar rats were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg body weight, i.p.). A tracheostomy was performed to facilitate breathing. The common bile duct and femoral vein were cannulated with polyethylene tubing for collection of the secreted bile into pre-weighed tubes over 15-min period and for infusion of normal saline at the rate of 1.2 ml/h, respectively as previously described (23). Body temperature was maintained at 37 $\pm$ 0.5°C with a heating lamp.

After collection of the control samples, THA dissolved in the solvent mixture was injected into the proximal part of duodenum at the dose of 125 or 250 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ body weight (volume of injection 0.5 ml). Bile samples were continuously collected for 90 min. Sample tubes were re-weighed and bile flow rate was calculated.

4. Immunohistochemistry and confocal analysis.

A separate set of experiments were conducted to examine the effect of THA on the intracellular distribution of the bile salt export pump (Bsep), the multidrug resistance-associated protein 2 (Mrp2), and the tight junction-associated protein, zonula occludens (ZO-1). THA was infused into the IPRL for 25 min, the liver was removed and cut into a small cubic pieces, immediately frozen in Freon/liquid nitrogen, and kept

at -80°C until use. For tissue preparation, small cubic pieces of liver tissue were cut into 4-6 µm-thick sections, and mounted on slides. Liver slices were fixed in cold acetone (-20°C) for 20 min. Then, tissues were then rehydrated by incubation in blocking buffer (PBS, 1% BSA, 0.05% Triton X-100) for 20 min. For Bsep and Mrp2 labeling, tissues were incubated with Bsep antibody (1:200) and Mrp2 antibody (1:100) diluted in blocking buffer for 2 h at room temperature. After washing in PBS-0.05% Triton x-100, secondary antibody for Bsep (Alexa594-conjugated goat anti-rabbit) (1:500) and for Mrp2 (Alexa488-conjugated goat anti-mouse) (1:500) diluted in blocking buffer were incubated for 60 min. For ZO-1 labeling, liver slices were incubated with primary antibody to ZO-1 (1:400) for 2 h, washed, and incubated with secondary antibody (1:500) for 60 min. Fluorescent localization was viewed using a Zeiss LSM 510 confocal microscope (Carl Zeiss Inc, NY, USA).

5. Analytical methods.

Total bile acid excretion was determined by using Sigma diagnostic bile acid reagent kit (Trinity Biotech, Co Wicklow, Ireland) which is based on 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase enzymatic method (17). Total glutathione in bile was measured immediately from bile samples collected in pre-weighed tubes containing 6% sulfosalicylic acid to minimize oxidation of GSH and was determined spectrophotometrically by the enzymatic recycling procedure of Tietze (33) as modified by Griffith (8). Concentration of BSP and DBSP in bile were measured spectrophotometrically at the absorption maximum (580 nm) after appropriate dilution with 0.1 N NaOH.

6. Statistical analysis.

All data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. The differences in pair of samples between control and THA-treated group in isolated perfused rat liver were compared by using *Student's* pair *t*-test. For comparing more than 2 groups, the significance of the difference among groups was analyzed using analysis of variance (ANOVA), followed by Student-Newman-Keul's test. Values of $P < 0.05$ were considered to be significantly different.

Results

Effect of THA on bile flow rate

The choleric effect of THA infusion into the isolated perfused rat liver was characterized utilizing a step-wise infusion of THA (1, 2, and 4 µmol/min). This caused a dose-dependent increase in BFR which attained a steady state at 10-15 min after starting the infusion (Fig. 1). THA at a dose of 1 µmol/min caused an immediate increase in bile flow and maintained BFR at 1.8 ± 0.1 µl/min/g liver (n=4) compared to

1.0 ± 0.1 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$ liver under basal condition. THA at 2 $\mu\text{mol}/\text{min}$ further increased BFR to a maximum level of 2 ± 0.2 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$ liver, whereas THA at 4 $\mu\text{mol}/\text{min}$ did not induce any further increase in BFR. In control animals, BFR slightly declined with time. Thus, THA directly stimulated bile flow in a dose dependent manner but reached a maximum effect.

Effect of THA on biliary secretion of bile acids and total glutathione (GSH+GSSG)

To examine the determinants of bile secretion, the effect of THA on the two major endogenous osmotically active solutes; bile acids and glutathione, was determined. In the isolated perfused liver, the concentration of biliary bile acids in control animals rapidly declined with time and reached a minimal level of 0.9 ± 0.2 mM after 30-35 min of perfusion, as shown in Fig. 2A. The THA-infused livers showed a similar decline in the concentration of bile acids to that of the control. Fifteen min after THA infusion, bile acid concentration significantly decreased to 0.4 ± 0.04 mM ($P < 0.05$) (Fig. 2A). However, the total output of biliary bile acids was not significantly different from that of control (Fig. 2B). THA also markedly decreased both the concentration and total amount of excretion of biliary glutathione (GSH + GSSG), in contrast to control animals where glutathione levels were maintained throughout the course of the experiment (Fig. 2C&D). THA, at a dose of 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$, significantly reduced the concentration of biliary total glutathione to 67.3 ± 5.1 % of control values within 10 min before infusing higher doses of THA and further declines were noted during the remaining course of the experiment (Fig. 2C). Biliary GSH excretion rates also decreased significantly after THA infusions at a dose of 4 $\mu\text{mol}/\text{min}$ by 45.0 ± 7.9 % compared to controls (Fig. 2D). However during the first 5 min, THA transiently increased the rate of excretion of glutathione to 130.2 ± 4.8 % of control while the GSH concentration was not significantly altered. This effect was most likely a “washout” phenomenon.

Effect of THA on BSP excretion

The multidrug resistance-associated protein 2 (Mrp2) is responsible for the biliary excretion of many glucuronide, sulfate, and glutathione *S*-conjugates, as well as GSH itself (7). Because THA infusions inhibited the excretion of GSH, Mrp2 was presumed to be a candidate for THA excretion. Therefore we examined the effect of THA on the excretion of BSP and DBSP, two typical substrates of the Mrp2 canalicular membrane transporter. As shown in Fig. 3A, infusion of BSP, at a rate of 0.04 $\mu\text{mol}/\text{min}$ did not alter BFR which was steadily maintained at ~ 1 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$ liver. In contrast, simultaneous infusions of THA (40 $\mu\text{mol}/\text{min}$) caused an immediate and marked ~ 2 fold increase in BFR approximately within the first 5 min of infusion which subsequently slightly declined with time (Fig. 3A). Concurrent with the increase in

BFR, both the concentration and excretion rate of BSP in bile were markedly decreased (Fig. 3B&C). Biliary BSP concentration was significantly decreased from 4.8 ± 0.2 mM in control to 2.6 ± 0.6 mM 10 min after THA infusions. These findings suggest that THA may compete with BSP for excretion into bile. The small increase in BSP excretion in the first 10 min and the decrease in biliary BSP excretion that persisted for about 10 min after stopping THA infusion is likely due to the effect of the increase and decrease in bile flow respectively on previously secreted BSP residing within the bile canaliculi and biliary tree, i.e., a washout phenomenon (Fig. 3C).

Effect of THA on biliary DBSP excretion

Because BSP is conjugated with glutathione, we studied the effect of THA on the excretion of DBSP, a non-metabolizable analogue of BSP which is readily excreted into bile but does not require conjugation as does BSP (5,9,14). As seen in Fig. 4A, DBSP infusion did not alter basal BFR at the dose used. Simultaneous infusion of THA with DBSP also caused a rapid increase in BFR from 0.9 ± 0.1 to 1.4 ± 0.2 μ l/min/g liver. However, the increase was not statistically different from the control and it declined with time. THA caused an immediate decrease in both biliary concentration and excretion of DBSP (Fig. 4B&C). Note that the onset of inhibition of THA on biliary DBSP excretion was more rapid and the effect greater than observed on BSP excretion. Together these findings suggest that THA inhibits the bile excretory phase rather than the preceding intracellular step of phase II conjugation of BSP.

Given that THA on immunofluorescent localizations of Mrp2, Bsep, and ZO-1 in the liver

Since THA infusions acutely induced a transient increase in bile flow rate, this short term action of THA might result from the canalicular insertion of submembranous vesicles containing canalicular transport proteins. To examine this possibility, Bsep and Mrp2 proteins in control and THA treated livers were examined using fluorescent confocal microscopy. As shown in Fig. 5, Bsep and Mrp2 are mainly localized on the canalicular membrane in control livers and no significant changes in the expression or localization of these two transporters were observed after THA was infused at 1,2,4, or 8 μ mol/min. The possibility that THA increased the permeability of tight junction was also evaluated. However, the structure and localization of tight junction protein (ZO-1) was unaltered by THA either at a low or high dose (1 and 8 μ mol/min) when compare to control livers (Fig. 6).

Effect of THA on bile flow rate in TR⁻ mutant rat

To directly determine if Mrp2 is the putative canalicular transporter for THA and responsible for its choleretic activity, the choleretic effect of THA was examined in TR⁻

mutant rats, genetically deficient in Mrp2 transporter (13), using a bile fistula. As shown in Fig. 7, choleric activity of THA at doses of 125 and 250 $\mu\text{mol/kg}$ body weight is not observed in the TR⁻ mutant rat, whereas in normal rats THA at a dose of 250 $\mu\text{mol/kg}$ body weight markedly increased BFR to 197.3 ± 13.4 % of control. These studies unequivocally establish that Mrp2 is required for the choleric activity of THA.

Effect of THA on estradiol-17 β -D-glucuronide (E₂-17G) induced cholestasis

Finally we examined the therapeutic potential of THA by determining if THA could reduce the cholestatic effects of the steroid, E₂-17G. Taurocholate (TC) at a dose of 0.5 $\mu\text{mol/min}$ was infused into the IPRL to supplement endogenous bile acid throughout the experiment. As shown in Fig. 8, TC significantly increased BFR by ~ 190% of the initial BFR ($P < 0.05$). A single injection of E₂-17G rapidly decreased BFR from 191.2 ± 22.7 % to 52.6 ± 15.5 % of the initial BFR, reaching a minimum value at 10 min after the E₂-17G injection. Thereafter, BFR gradually returned toward the TC-stimulated level. In contrast, THA infusions partially prevented the E₂-17G induced cholestasis. In addition, the decrease in BFR induced by E₂-17G was delayed in time. Moreover, recovery of BFR in THA-infused liver occurred faster, returning to control values 20 min after E₂-17G administration (Fig. 8). E₂-17G administration rapidly decreased biliary bile acid concentration and excretion in control animals (Fig. 9A&B). However, after reaching minimum values at 10-15 min, they returned toward normal levels. With THA-infusions, the concentration of bile acids continued to be maintained at low levels compared to E₂-17G administration alone ($P < 0.05$) (15.5 ± 1.4 mM with and 24.8 ± 2.0 mM without THA infusion (Fig. 9A). However, the transient decrease in bile acid excretion in the THA-infused livers was comparable to controls without THA infusion (Fig. 9B). E₂-17G had no effect on the total concentration of glutathione in bile of control animals (Fig. 9C). However when THA was infused with E₂-17G, a marked decrease in biliary total glutathione concentration was observed from $103.0 \pm 6.3\%$ in the control group to $27.5 \pm 7.0\%$ of pretreatment value (before E₂-17G administration) resulting in a transient decrease in excretion of total glutathione in bile to 9.4 ± 3.1 % of pretreatment value which was significantly different from TC-control value, 39.3 ± 5.8 % of pretreatment value at 15 min after THA infusion ($P < 0.05$) (Fig. 9D).

Discussion

The present study confirms the potent choleric effect of THA using the isolated perfused rat liver and provides new findings concerning the mechanism by which this choleresis occurs. First, THA infusions resulted in an immediate dose dependent increase in bile secretion which reached saturation at the higher infusions rate. The latter effect is characteristic of a carrier mediated transport maximum (Fig. 1). Second, there was no effect on bile acid excretion in these experiments so that the bile salt independent

fraction was stimulated. Third, THA selectively inhibited the biliary excretion of BSP and DBSP, both substrates for the multidrug resistance-associated protein 2 (Mrp2). Together these findings suggest that the choleric effect of THA was determined by the excretion of osmotically active solutes via Mrp2. Finally, the choleric properties of THA were ablated in TR⁻ rats, genetically deficient in Mrp2, which substantiated that the bile canalicular transporting system, Mrp2, is required for THA to stimulate bile acid independent bile flow. Moreover, the choleric effect of THA did not influence the subcellular localization of the transporter nor its targeting from its submembranous intracellular compartment into the apical membrane suggesting this post-transcriptional modification of Mrp2 expression was probably not involved.

In earlier studies in the bile fistula rat, THA increased both BAIF and BADF (23,26). However its mechanism of action was unclear particularly whether THA had direct effects on the liver or acted indirectly via signaling molecules derived from the intestine. The present study, using the isolated perfused rat liver, clearly demonstrates that THA mediates its choleric effect by a direct effect on the liver. It is also evident that THA increases BFR without stimulating biliary bile acid or glutathione secretion. The lack of an effect of THA on bile acid excretion in the present study does not agree with the earlier finding in the bile fistula rat where THA enhanced bile acid excretion and subsequently lowered plasma cholesterol (23,26). These differences might be due to the depletion of bile acids in the isolated perfused rat liver with time and to a wash out phenomenon of bile acids in the intact animal.

Since THA did not stimulate the biliary excretion of bile acids and glutathione, the two major determinants of bile flow, the mechanism by which THA increases BFR in the isolated liver is most likely due to the excretion of osmotically active solutes of the biotransformed THA. Indeed, two glucuronide metabolites of THA have been identified (Khamdang et al., unpublished observation). This finding is consistent with an earlier report that the glucuronide conjugation of phloracetophenone is the major biliary metabolite (11,16). Mrp2, the multispecific resistance-associated protein 2, plays an important role in the biliary excretion of a number of endogenous and exogenous compounds including glucuronide, glutathione and sulfates conjugates (7), and thus is most likely responsible for the excretion of THA metabolites in the present study.

Because THA infusions markedly reduced the excretion of free glutathione, it was not clear if THA was conjugated with GSH before being excreted and/or competed with GSH transport via the canalicular transporter, Mrp2. The rate limited effects of THA on BFR also could be explained by such a competitive effect or by a direct inhibitory effect on the transport mechanism. Since the biliary excretion of BSP, which largely is dependent on prior conjugation with GSH (5,9) was also abruptly inhibited by THA co-infusion, this concern was heightened. To clarify whether THA was interfering with GSH conjugation or excretion, we examined the excretion of DBSP, a dibrominated

analog of BSP which does not require conjugation with GSH or other biotransformation prior to excretion in bile (14). The finding that THA also abruptly inhibited biliary DBSP excretion indicates that THA's inhibitory effects are at the level of the canalicular transporter. This conclusion is also consistent with the findings that pre-infusions of DBSP, but not BSP, markedly suppressed the stimulating effect of THA on BFR and that THA inhibited DBSP excretion earlier than BSP. Together these findings suggest that THA competed with these other Mrp2 substrates at the transporter's substrate or transporter binding sites.

While the biliary excretion of osmotically active metabolites is the most likely explanation for THA's choleretic effects, we can not exclude the possibility that the compound(s) might directly stimulate the activity of Mrp2 and or the insertion of the transporter from intracellular compartments to the canalicular membrane (15). However, confocal immunofluorescence microscopy indicated that THA had no detectable effect on the subcellular localization of either the canalicular bile salt export pump (Bsep) or Mrp2 even when infused with the highest dose (Fig. 7). Thus it seems unlikely that THA stimulated insertion of vesicles containing new transporters to the canalicular membrane. This conclusion is also supported by our earlier study showing that THA does not increase the hepatobiliary excretion of horseradish peroxidase (HRP), a marker of exocytosis (35).

Tight junction permeability can be regulated by changes in osmotic and hydrostatic pressure (28) created by osmotic gradients across the tight junction (30,34). However, neither low or high choleretic doses of THA altered the structure and localization of the tight junction protein, Zonula Occluden 1 (ZO-1) (Fig. 5). This finding is also consistent with our prior studies that indicated that THA does not stimulate the paracellular pathway in rat liver when marked by horseradish peroxidase (35). Thus the choleretic effects of THA are unlikely to be mediated by increasing the permeability of the paracellular pathway. .

Finally we examined the therapeutic potential of THA in a model of cholestasis induced by estradiol-17 β -D-glucuronide (E₂-17G). E₂-17G is an endogenous estrogen metabolite that induces an acute, dose-dependent, and completely reversible cholestasis in rat (18-19). Although the mechanism by which E₂-17G induces cholestasis is incompletely understood, Mrp2 mediated E₂-17G excretion into bile is required for its cholestatic effect (12). Since THA has a high choleretic activity and also interacts with Mrp2, we anticipated that THA might attenuate E₂-17G-induced cholestasis, presumably by competing with E₂-17G for excretion via Mrp2 as shown for BSP and DBSP. As illustrated in Fig. 8-9, the findings support this hypothesis. THA infusions in isolated perfused rat livers receiving a constant infusion of taurocholate, attenuated the cholestatic effects of E₂-17G on bile flow although there was no difference in bile acid excretion between THA and the controls. As seen in prior studies, THA rapidly reduced

the biliary excretion of GSH suggesting again that competition for excretion of Mrp2 substrates accounted for attenuation of E₂-17G's acute cholestatic effect. Thus THA might be an effective anti-cholestatic agent by competing with binding of the toxic agent to or excretion by Mrp2. THA has also been shown to have a protective effect on ethinyl estradiol-induced impairment of bile secretory function when this estrogen was administered subacutely to rats (27). A number of other compounds including phenobarbital (10), ursodeoxycholate (29), and diosgenin (1) can attenuate cholestasis induced by ethinylestradiol (EE) or E₂-17G. Since these compounds presumably mediate their anti-cholestatic effect by different mechanisms, combinations of drugs might lead to more effective therapy. THA might also be used to attenuate the acute effects of a hepatotoxin which is metabolized and excreted by similar pathways.

In summary, we have described a potent choleric effect of the herbal compound, THA, in an isolated rat liver perfusion system. THA stimulates bile flow by the saturable excretion of osmotically active solutes into bile via the canalicular transporter, Mrp2. THA's choleric effect occurs without alteration of the distribution and localization of canalicular transporters Mrp2, Bsep or the tight junction protein ZO-1. Its anti-cholestatic effect appears to be mediated by competing with the excretion of Mrp2 substrates. THA might be an effective and safe candidate for further development as an anti-cholestatic therapeutic agent.

Acknowledgements

This study was supported by grants from the Royal Golden Jubilee, Ph.D. Program (Grant No. PHD/0177/2543 to LT, PP); the Thailand Research Fund (BRG 4680009 to PP); and USPHS grants DK25636 and P30 DK34989 (to JLB), and DK48823 and P30 ES01247 (to NB).

References

1. **Accatino L, Pizarro M, Solis N, Koenig C.** Effects of diosgenin, a plant-derived steroid, on bile secretion and hepatocellular cholestasis induced by estrogens in the rat. *Hepatology* 28: 129-140, 1998.
2. **Ballatori N and Truong AT.** Relation between biliary glutathione excretion and bile acid-independent bile flow. *Am J Physiol* 256: G22-30, 1989.
3. **Berenson MM, Marin JJG, Gunther C.** Effect of bile acid hydroxylation on biliary protoporphyrin excretion in rat liver. *Am J Physiol* 255: G382-G388, 1988.
4. **Boyer JL.** Milestones in liver disease: a commentary. *J Hepatol* 36: 4-7, 2002.
5. **Combes B and Stakelum GS.** Conjugation of sulfobromophthalein sodium with glutathione linkage by the rat. *J Clin Invest* 39: 1214-1222, 1960.

6. **Corasanti JG, Smith ND, Gordon ER, Boyer JL.** Protein kinase C agonists inhibit bile secretion independently of effects on the microcirculation in the isolated perfused rat liver. *Hepatology* 10: 8-13, 1989.
7. **Gerk PM and Vore M.** Regulation of expression of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) and its role in drug disposition. *J Pharmacol Exp Ther* 302: 407-415, 2002.
8. **Griffith OW.** Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem* 106: 207-212, 1980.
9. **Grodsky GM, Carbone JV, Fanska R.** Biosynthesis of bromophthalein mercaptide with glutathione. *Proc Soc Exp Biol Med* 106: 526-530, 1961.
10. **Gumucio JJ, Accatino L, Macho AM, Contreras A.** Effect of Phenobarbital on the ethynyl estradiol-induced cholestasis in the rat. *Gastroenterology* 65: 651-657, 1973.
11. **Haley TJ and Bassin M.** Metabolism and urinary excretion of several flavonoid compounds. *Proc Soc Exp Biol Med* 81: 298-300, 1952.
12. **Huang L, Smit JW, Meijer DKF, Vore M.** Mrp2 is essential for estradiol-17 β (β -D-glucuronide)-induced cholestasis in rats. *Hepatology* 32: 66-72, 2000.
13. **Jansen PLM, Groothuis GMM, Peters WHM, Meijer DKF.** Selective hepatobiliary transport defect for organic anions and neutral steroids in mutant rats with hereditary-conjugated hyperbilirubinemia. *Hepatology* 7: 71-76, 1987.
14. **Javitt NB.** Phenol 3,6-dibromophthalein disulfonate, a new compound for the study of liver disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 117: 254-257, 1964.
15. **Kubitz R, Helmer A, Haussinger D.** Biliary transport system: short-term regulation. *Methods Enzymol* 400: 252-257, 2005.
16. **Mahagita C, Tanphichai K, Suksamrarn A, Ballatori N, and Piyachaturawat P.** 4-Hydroxyacetophenone-induced cholestasis in rats is mediated by the Mrp2-dependent biliary secretion of its glucuronide conjugate. *Pharmaceutical Res.* 23:2602-2610, 2006
17. **Mashige F, Osuga T, Tanaka N, Yamanaka M.** Continuous-flow determination of bile acids in serum and its clinical application. *Clin Chem* 24: 1150, 1978.
18. **Meyers M, Slikker W, Pascoe G, Vore M.** Characterization of cholestasis induced by estradiol-17 β -D-glucuronide in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 214: 87-93, 1980.
19. **Meyers M, Slikker W, Vore M.** Steroid D-ring glucuronide: characterization of a new class of cholestatic agents in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 218: 63-73, 1981.
20. **Nathanson HM and Boyer JL.** Mechanisms and regulation of bile secretion. *Hepatology* 14: 551-566, 1991.
21. **Ookhtens M and Kaplowitz N.** The use of isolated perfused liver in studies of biological transport processes. *Methods Enzymol* 192: 485-495, 1990.
22. **Palmer KR, Gurantz D, Hofmann AF, Clayton LM, Hagey LR, Cecchetti S.** Hypercholestasis induced by norchenodeoxycholate in biliary fistula rodent. *Am J Physiol* 253: G219-G228, 1987.

23. **Piyachaturawat P, Chaingam N, Chuncharunee A, Komaratat P, Suksamrarn A.** Choleric activity of phloracetophenone in rats: structure-function studies using acetophenone analogues. *Eur J Pharmacol* 387: 221-227, 2000.
24. **Piyachaturawat P, Gansar R, Suksamrarn A.** Choleric effect of *Curcuma comosa* rhizome extracts in rats. *Int J Pharmacogn* 34: 174-187, 1996.
25. **Piyachaturawat P, Suwanampai P, Komaratat P, Chuncharunee A, Suksamrarn A.** Effect of phloracetophenone on bile flow and biliary lipids in rats. *Hepatol Res* 12: 198-206, 1998.
26. **Piyachaturawat P, Srivoraphan P, Chuncharunee A, Komaratat P, Suksamrarn, A.** Cholesterol lowering effects of a choleric phloracetophenone in hypercholesterolemic hamsters. *Eur J Pharmacol.* 439: 141-7, 2002.
27. **Piyachaturawat P, Tubtim C, Chuncharunee A, Komaratat P, Suksamrarn A.** Evaluation of the acute and subacute toxicity of a choleric phloracetophenone in experimental animals. *Toxicol Let* 129: 123-132, 2002.
28. **Powell DW.** Barrier function of epithelia. *Am J Physiol* 241: G275-G288, 1981.
29. **Pozzi EJS, Crocenzi FA, Pellegrino JM, Catania VA, Luquita MG, Roma MG, Garay EAR, Mottino AD.** Ursodeoxycholate reduces ethinylestradiol glucuronidation in the rat: Role in prevention of estrogen-induced cholestasis. *J Pharmacol Exp Ther* 306: 279-286, 2003.
30. **Roma MG, Marinelli RA, Crocenzi FA, Rodriguez GEA.** Effect of cholephilic dyes on hepatic tight junctional permeability in the rat. *Biochem Pharmacol* 50, 1079-1086, 1995.
31. **Shoda J, Muira T, Utsunomiya H, Oda K, Yamamoto M, Kano M, Ikegami T, Tanaka N, Akita H, Ito K, Suzuki H, Sugiyama Y.** Genipin enhances Mrp2 (Abcc2) –mediated bile formation and organic transport in rat liver. *Hepatology* 39: 167-178, 2004.
32. **Takeda S, Endo T, Aburada M.** Pharmacological studies on iridoid compounds. III. The choleric mechanism of iridoid compounds. *J Pharm Dyn* 4: 612-623, 1981.
33. **Tietze F.** Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Application to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* 27: 502-522, 1969.
34. **Toyota N, Miyai K, Hardison WGM.** Effect of biliary pressure versus high bile acid flux on the permeability of hepatocellular tight junction. *Lab Invest* 50: 536-542, 1984.
35. **Tradtrantip L, Boyer JL, Suksamrarn A, Piyachaturawat P.** Differential effects of hydroxyacetophenone analogues on the transcytotic vesicular pathway in rat liver. *Eur J Pharmacol* 547: 152-159, 2006.
36. **Trauner M and Boyer JL.** Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev* 83: 33-671, 2003.

Figure legends

- Fig. 1** Effect of THA on bile flow rate in the isolated perfused rat liver. THA at a dose of 1, 2, and 4 $\mu\text{mol}/\text{min}$ was step-wise infused into the liver. Each dose was continuously infused for 20 min-period intervals. Values are means $\pm$ S.E.M. from 4 animals. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ significant difference from control at the corresponding time.
- Fig. 2** Effect of THA on biliary bile acid concentration (A), bile acid excretion rate (B), biliary total glutathione (GSH + GSSH) concentration (C), and total glutathione (GSH + GSSH) excretion rate (D) in the isolated perfused rat liver. THA at a dose of 1, 2, and 4 $\mu\text{mol}/\text{min}$ was step-wise infused into the liver. Each dose was continuously infused for 20 min-period intervals. Values are means $\pm$ S.E.M. from 4 animals. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ significant difference from control at the corresponding time.
- Fig. 3** Effect of THA on bile flow rate (A), biliary sulfobromophthalein (BSP) concentration (B) and BSP excretion rate (C) in the isolated perfused rat liver. BSP at a dose of 0.04 $\mu\text{mol}/\text{min}$ was continuously infused to the liver throughout the course of experiment. THA was added into the perfusion medium for co-perfusion at a constant rate of 40 $\mu\text{mol}/\text{min}$ at indicated time point. Values are means $\pm$ S.E.M. from 4 animals. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ significant difference from control at the corresponding time.
- Fig. 4** Effect of THA on bile flow rate (A), biliary dibromosulfobromophthalein (DBSP) concentration (B) and DBSP excretion rate (C) the isolated perfused rat liver. DBSP at a dose of 0.04 $\mu\text{mol}/\text{min}$ was continuously infused to the liver throughout the course of experiment. THA was added into the perfusion medium for co-perfusion at a constant rate of 40 $\mu\text{mol}/\text{min}$ at indicated time point. Values are means $\pm$ S.E.M. from 4 animals. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ significant difference from control at the corresponding time.
- Fig. 5** Effect of THA on immunofluorescent localization of bile salt export pump (Bsep) and multispecific resistance-associated protein 2 (Mrp2). Confocal microscopy analysis of Bsep and Mrp2 transporters were performed in liver that infused with vehicle or THA at a dose of 1, 2, 4, and 8 $\mu\text{mol}/\text{min}$ for 25 min. Fluorescent signal of Bsep and Mrp2 are red and green, respectively. Merge is the overlapping of staining for these two transporters.
- Fig. 6** Effect of THA on immunofluorescent localization of zonula occluden 1 protein (ZO-1). Confocal microscopy analysis of ZO-1 was performed in liver that was

infused with vehicle or THA (1 and 8 $\mu\text{mol}/\text{min}$). A and B panel are the detection pictures visualized at different areas of the liver with the same magnification, C panel is the detection pictures visualized with high magnification.

Fig. 7. Effect of THA on bile flow rate in TR⁻ and normal rat. A single intraduodenal injection of THA at the doses of 125 and 250 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ body weight at 45 min. Values are means $\pm$ S.E.M. from 4 animals.
** P < 0.01 significant difference from control at the corresponding time.

Fig. 8 Effect of THA on E₂-17G –induced cholestasis. Taurocholate at a dose of 0.5 $\mu\text{mol}/\text{min}$ was continuously infused to supplement the endogenous bile acid in the liver start from 15 min to the end of experiment. THA was added into the perfusion medium for co-perfusion at a constant rate of 40 $\mu\text{mol}/\text{min}$ from 45 to 90 min of perfusion. E₂-17G at a dose of 1 $\mu\text{mol}/100$ g. body weight was administered as a bolus injection into the liver immediately before starting THA infusion.
Values are means $\pm$ S.E.M. from 4 animals.
P < 0.05 and ** P < 0.01 significant difference from control at the corresponding time.

Fig. 9 Effect of THA on biliary bile acid concentration (A), bile acid excretion rate (B) and on biliary total glutathione (GSH + GSSH) concentration (C) and total glutathione (GSH + GSSH) excretion rate (D) in E₂-17G –induced cholestasis. Taurocholate at a dose of 0.5 $\mu\text{mol}/\text{min}$ was continuously infused to supplement the endogenous bile acid in the liver start from 15 min to the end of experiment. THA was added into the perfusion medium for co-perfusion at a constant rate of 40 $\mu\text{mol}/\text{min}$ from 45 to 90 min of perfusion. E₂-17G at a dose of 1 $\mu\text{mol}/100$ g. body weight was administered as a bolus injection into the liver immediately before starting THA infusion.
Values are means $\pm$ S.E.M. from 4 animals.
* P < 0.05 and ** P < 0.01 significant difference from control at the corresponding time.

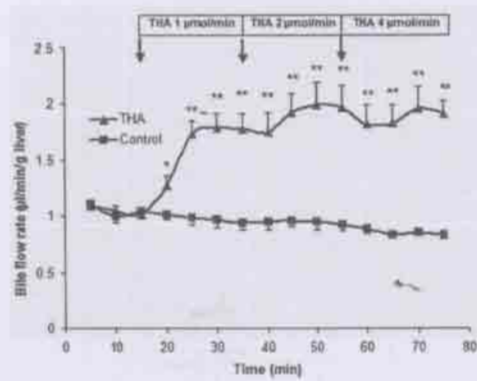


Fig. 1

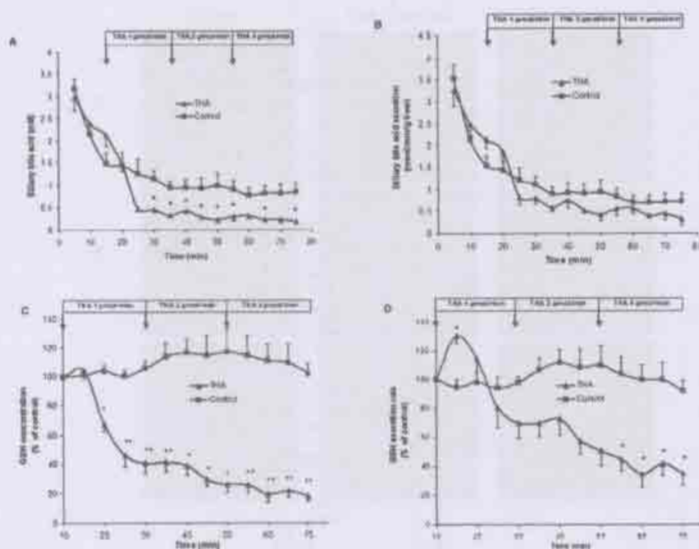


Fig. 2

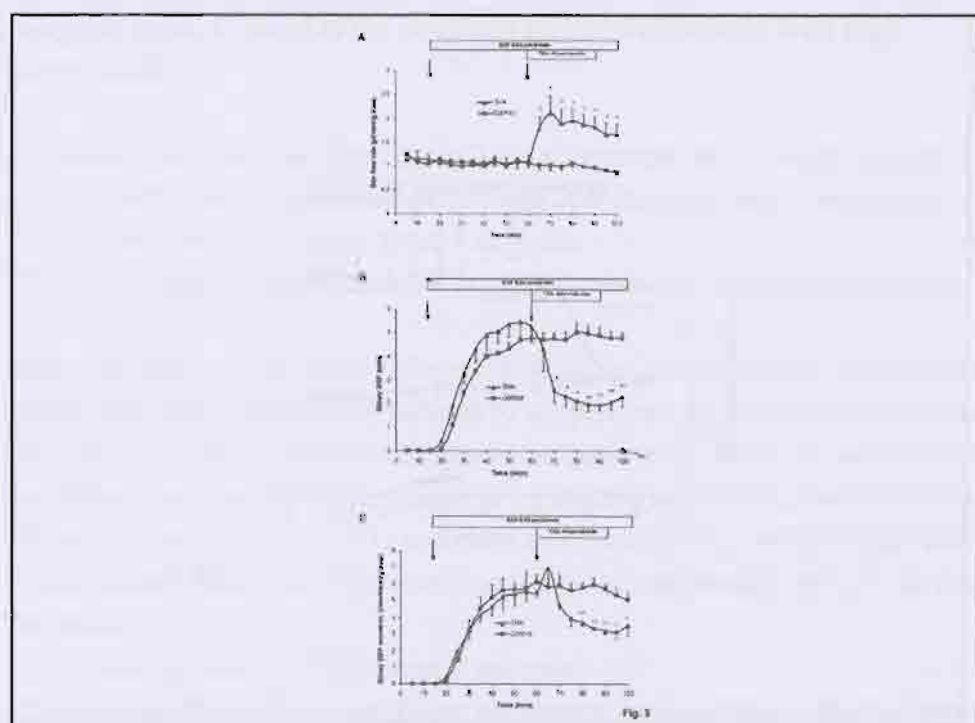


Fig. 3

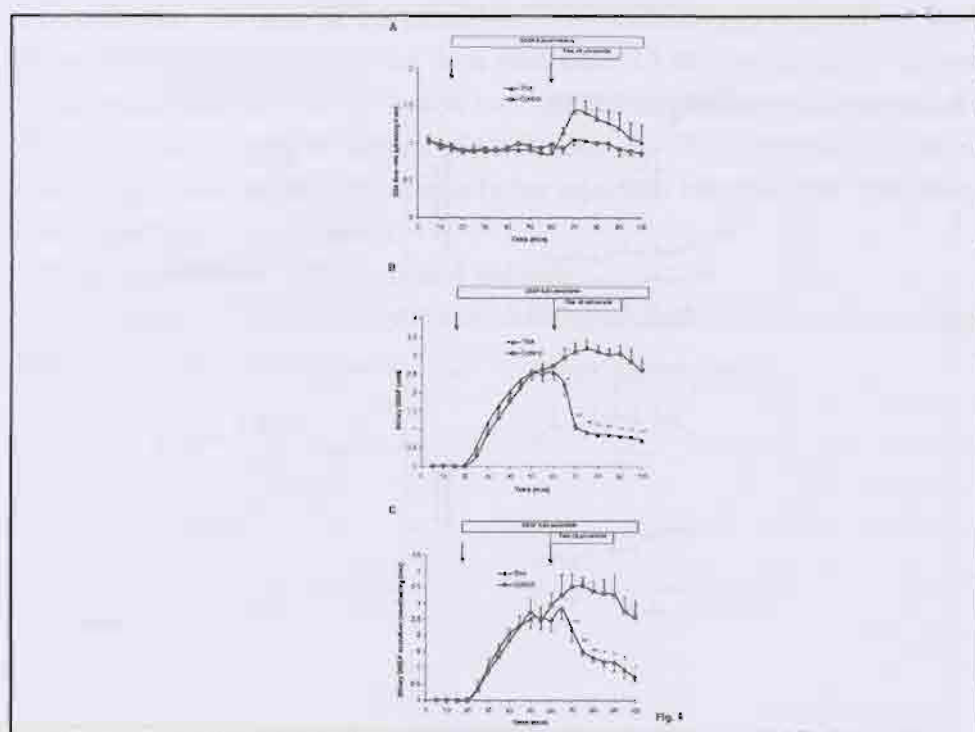


Fig. 4

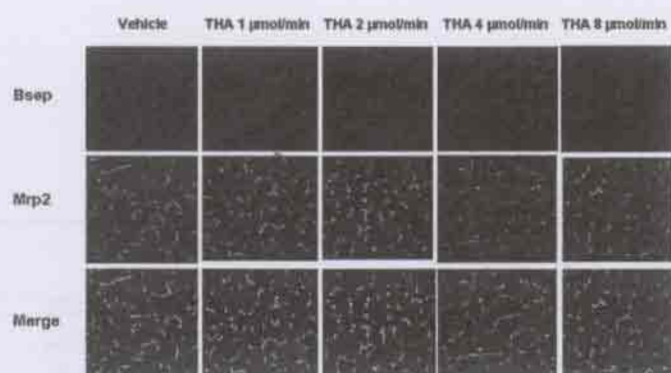


Fig. 5

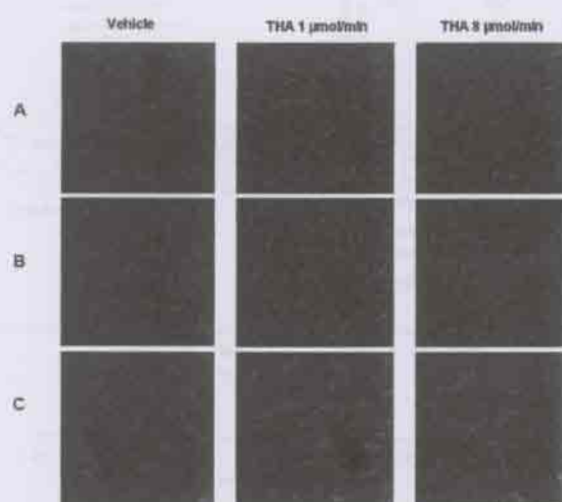


Fig. 6

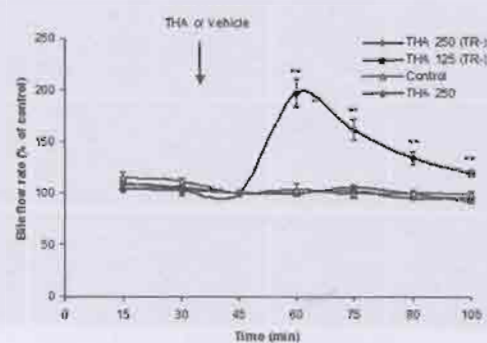


Fig. 7

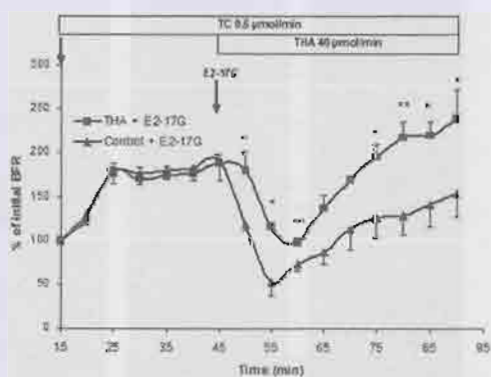


Fig. 8

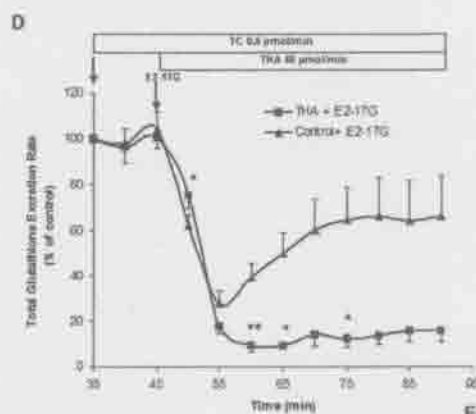
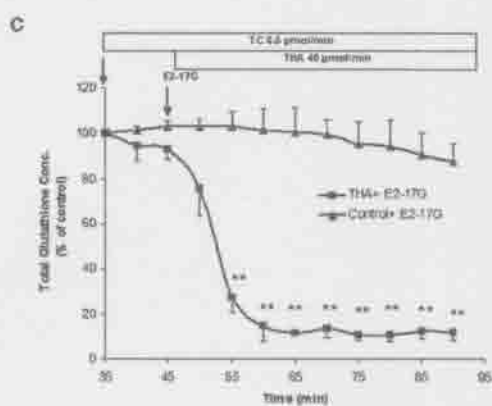
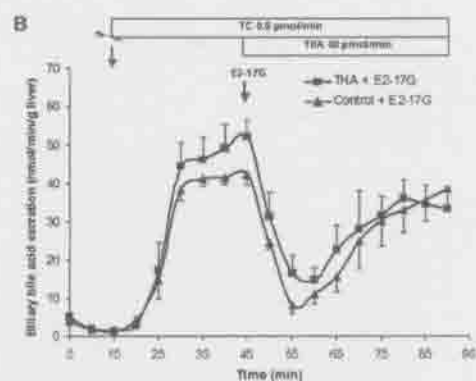
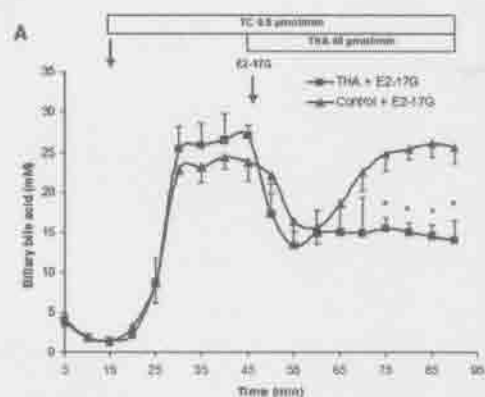


Fig 9