

ABSTRACT

Cyst enlargement in ADPKD is associated with cAMP-activated proliferation of cyst-lining epithelial cells and transepithelial fluid secretion into the cyst lumen via cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) chloride channel leading to renal insufficiency and no effective treatment is currently available. This study aimed to investigate an inhibitory effect and detailed mechanisms of steviol and its derivatives on cyst growth using a cyst model in Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells and in a rodent orthologous model of ADPKD (Pkd1flox/flox:Pkhd1-Cre mice). Among 4 steviol-related compounds tested, steviol (100 μM) was found to be the most potent for inhibiting MDCK cyst growth and cyst formation by $72.5 \pm 3.6\%$ and $38.2 \pm 8.5\%$, respectively without effect on MDCK cell viability, proliferation and apoptosis. Steviol had both acute and chronic effects to inhibit forskolin-stimulated apical chloride current in MDCK epithelia, measured by Ussing chamber technique. Interestingly, proteasome inhibitor, MG-132, reduced the effect of steviol on CFTR protein expression. Immunofluorescence studies demonstrated that prolonged treatment (24 h) with steviol (100 μM) markedly reduced CFTR expression at the plasma membrane. Taken together, these data suggest that steviol retards MDCK cyst growth by directly inhibiting CFTR chloride channel activity and by promoting proteasomal degradation of CFTR.

Next, the effect of steviol on renal cystogenesis in ADPKD mouse model was further examined. The results showed that daily treatment with both 200 mg/kg of steviol and 1,000 mg/kg of stevioside for 14 days markedly decreased kidney weight and cystic index in these mice. However, only steviol reduced serum BUN and plasma creatinine by $48.1 \pm 18.3\%$ compared with that of vehicle treated mouse. Steviol also reduced cell proliferation but had no effect on cell apoptosis. In addition, steviol suppressed CFTR expression and mTOR/S6K pathway of renal cyst-lining epithelial cells. Interestingly, steviol also markedly enhanced AMPK protein expression in cyst-lining epithelial cells of ADPKD mouse. These findings indicated that steviol slows cyst progression in Pkd1flox/flox:Pkhd1-Cre mice, in part, by inhibiting CFTR chloride channel expression and renal epithelial cell proliferation via mTOR/S6K pathway and by activating AMPK. It also helps to improve kidney function as indicated by BUN and plasma creatinine. Steviol thus has potential to be used as a therapeutic compound for the treatment of polycystic kidney disease

Keywords: Steviol, Stevioside, Cyst growth, CFTR, ADPKD

บทคัดย่อ

การเจริญเติบโตของถุงน้ำหรือซิสต์ในโรคถุงน้ำในไตเกิดจากการแบ่งตัวมากเกินไปผิดปกติของเซลล์หลอดไตจนกลายเป็นซิสต์ ร่วมกับการหลังคลอดไรต์มากเกินไปผิดปกติผ่านทางช่องโปรตีนขนส่งคลอไรด์ CFTR โดยซิสต์เมื่อมีขนาดโตขึ้นจะกดเบียดเนื้อไต ทำให้การทำงานของไตเสียหายและในที่สุดเกิดภาวะไตวาย ปัจจุบันโรคถุงน้ำในไตยังไม่มีการรักษาที่มีประสิทธิภาพ แต่การลดหรือยับยั้งการทำงานของช่องโปรตีนขนส่งคลอไรด์ CFTR เพื่อลดการเจริญเติบโตของซิสต์ก็น่าจะช่วยให้การทำงานของไตไม่เสียหายมากนัก การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากใบหญ้าหวานและอนุพันธ์ทั้งสี่ชนิด (steviol, isosteviol, dihydroisosteviol, 16-oxime isosteviol) ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของซิสต์ในเซลล์โมเดลถุงน้ำที่เกิดจากเซลล์ MDCK ทั้งยังศึกษาฤทธิ์ของสารในหนูโมเดลโรคถุงน้ำ (Pkd1flox/flox:Pkh1-Cre mice) เพื่อยืนยันผลที่พบในเซลล์โมเดลถุงน้ำ จากสารอนุพันธ์ทั้งสี่ชนิดที่ทดสอบ พบว่าสาร steviol มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของซิสต์ (cyst growth) และยับยั้งการเพิ่มจำนวนซิสต์ (cyst formation) แต่ไม่มีผลต่อการอยู่รอดของเซลล์ (cell viability) การเกิดใหม่ของเซลล์ (cell proliferation) และการตายของเซลล์แบบ apoptosis โดยที่สาร steviol จะลดการเจริญเติบโตของซิสต์โดยออกฤทธิ์ยับยั้งการหลังคลอดไรต์ทั้งแบบฉับพลันและแบบเรื้อรังในเซลล์หลอดไต MDCK เมื่อตรวจสอบด้วยการวัดกระแสการหลังคลอดไรต์โดย Ussing chamber experiment นอกจากนี้สาร steviol ยังลดการแสดงออกของโปรตีนขนส่งคลอไรด์ CFTR ในเซลล์หลอดไต MDCK ได้ในช่วงเวลา 6-24 ชั่วโมง อีกทั้งผลการทดลองด้วย immunofluorescence พบว่าสาร steviol ลดการแสดงออกของโปรตีนขนส่งคลอไรด์ CFTR ที่ผิวเซลล์ และเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งว่า สาร MG-132 (proteasome inhibitor) สามารถยับยั้งฤทธิ์ของสาร steviol ในการลดการแสดงออกของโปรตีนขนส่งคลอไรด์ CFTR จากผลการทดลองข้างต้นสรุปได้ว่า สาร steviol ยับยั้งการเจริญเติบโตของซิสต์ในเซลล์โมเดลถุงน้ำ MDCK ผ่านทางการยับยั้งการทำงานของโปรตีนขนส่งคลอไรด์ CFTR และการกระตุ้นการสลายโปรตีนขนส่งคลอไรด์ CFTR ที่ผิวเซลล์ผ่าน proteasome

การทดลองต่อมาคือการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบหญ้าหวาน (stevioside) และสารอนุพันธ์ steviol ต่อการยับยั้งการเติบโตของซิสต์ในหนูโมเดลโรคถุงน้ำ พบว่าเมื่อให้สาร steviol และ stevioside ความเข้มข้น 200 mg/kg และ 1,000 mg/kg ตามลำดับ กับหนูที่เป็นโรคถุงน้ำ (Pkd1flox/flox:Pkh1-Cre mice) วันละ 1 ครั้ง ติดต่อกันเป็นเวลา 14 วัน พบว่า สาร steviol และ stevioside สามารถลดน้ำหนักของไต ขนาดของไต เปอร์เซ็นต์พื้นที่ซิสต์ในไต ได้อย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามพบว่าเฉพาะสาร steviol เท่านั้นที่มีผลช่วยเพิ่มการทำงานของไตเมื่อเปรียบเทียบกับหนูโรคถุงน้ำแบบควบคุม โดยที่สาร steviol สามารถลดการเกิดและแบ่งตัวใหม่ของเซลล์หลอดไต (cell proliferation) แต่ไม่มี

ผลต่อการตายของเซลล์แบบ apoptosis นอกจากนี้ steviol ยังมีผลลดการแสดงออกของโปรตีนขนส่งคลอไรด์ CFTR, โปรตีนใน mTOR/S6K pathway และกระตุ้นการทำงานของโปรตีน AMPK ในไตของหนูโรคถุงน้ำ จากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า สาร steviol สามารถช่วยชะลอการเติบโตของซีสต์ในหนูโมเดลโรคถุงน้ำโดยการลดการแสดงออกโปรตีนขนส่งคลอไรด์ CFTR ซึ่งเชื่อมโยงกับการทำงานของโปรตีน AMPK ทั้งยังช่วยยับยั้งการเกิดเซลล์ถุงน้ำใหม่ผ่าน mTOR/S6K pathway อันส่งผลทำให้การทำงานของไตของหนูโมเดลโรคถุงน้ำดีขึ้น ดังนั้นสารอนุพันธ์จากใบหญ้าหวาน steviol มีศักยภาพสูงที่สามารถนำไปพัฒนาเป็นยารักษาโรคถุงน้ำในไต เพราะสารนี้มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของซีสต์ได้หลายกลไกพร้อมกัน