

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5380125

ชื่อโครงการ: การศึกษากลไกของไดไฮโดรไอโซสตีไวออลในการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของโปรตีนช่องทางผ่านคลอไรด์ซีเอฟทีอาร์

ชื่อหลักวิจัย และสถาบัน: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นพ.ดร. ฉัตรชัย เหมือนประสาธา
ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

อีเมล: chatchai.mua@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี (15 มิถุนายน 2553 – 14 มิถุนายน 2555)

บทคัดย่อ:

โปรตีนช่องทางผ่านคลอไรด์ซีเอฟทีอาร์ (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator หรือ CFTR) เป็นโปรตีนเป้าหมายในการพัฒนาการรักษาโรคอหิวาตกโรค (cholera) และโรคถุงน้ำในไต (polycystic kidney disease) ในปัจจุบัน สองโรคนี้ถือเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญยิ่ง เนื่องจากยังไม่มีวิธีการรักษาที่จำเพาะ โครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาและศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารจากทรัพยากรชีวภาพของไทยที่มีฤทธิ์ยับยั้งโปรตีนซีเอฟทีอาร์ อันได้แก่ สารไดไฮโดรไอโซสตีไวออล (dihydroisosteviol หรือ DHIS) จากใบหญ้าหวาน (*Stevia rebaudiana*) และ สารไอโซลิกิริทิจินิน (isoliquiritigenin หรือ ISLQ) จากดอกทองกวาว (*Butea monosperma*) ผลการศึกษาพบว่า DHIS ยับยั้งการขนส่งคลอไรด์ของ CFTR ในเซลล์ลำไส้ของมนุษย์ (T84 cell) ด้วย IC_{50} ประมาณ $10 \mu M$ แต่ไม่สามารถยับยั้งการขนส่งคลอไรด์ของ CFTR ซึ่งถูกทำให้แสดงออกในเซลล์ต่อมไทรอยด์ของหนูฟิชเชอร์ (Fisher rat thyroid cell) ได้ ผลการศึกษาดังกล่าวทำให้ผู้วิจัยตั้งสมมติฐานว่า DHIS ไม่ได้ออกฤทธิ์ยับยั้งโปรตีน CFTR โดยตรง แต่ออกฤทธิ์ผ่านโปรตีนอื่นซึ่งควบคุมการทำงานของโปรตีน CFTR ในเซลล์ลำไส้มนุษย์ เช่น Protein kinase A และ โปรตีน AMP-activated protein kinase (AMPK) เป็นต้น ผู้วิจัยจึงศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของ DHIS ในเซลล์ T84 และพบว่าประสิทธิภาพของ DHIS ในการยับยั้งการทำงานของ CFTR ที่กระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น PKA (CPT-cAMP) ไม่ต่างจากผลที่ได้จากการกระตุ้น CFTR โดยตรงด้วย apigenin นอกจากนี้ ยังพบว่า DHIS ยับยั้งการขนส่งคลอไรด์ของโปรตีน CFTR ได้ลดลงในภาวะที่มีการยับยั้งการทำงานของ AMPK นอกจากนี้การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค western blot พบว่า DHIS สามารถกระตุ้นการทำงานของโปรตีน AMPK ด้วยกลศาสตร์ที่สอดคล้องกับฤทธิ์ในการยับยั้งการขนส่ง

คลอไรด์ของโปรตีน CFTR จึงสรุปได้ว่า DHIS ออกฤทธิ์ยับยั้งการขนส่งคลอไรด์ของโปรตีน CFTR ในเซลล์ลำไส้มนุษย์โดยการกระตุ้นโปรตีน AMPK นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการขนส่งคลอไรด์ผ่าน CFTR ของ ISLQ พบว่า ISLQ ออกฤทธิ์ยับยั้งการขนส่งคลอไรด์ของโปรตีน CFTR ได้โดยตรงด้วย IC_{50} ประมาณ $20 \mu M$ โดยไม่มีผลต่อระดับของ cAMP ภายในเซลล์ และไม่มีผลยับยั้งการทำงานของโปรตีนขนส่งคลอไรด์อื่นในเซลล์ลำไส้มนุษย์ อันได้แก่ calcium-activated chloride channel และ inward rectifying chloride channel เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่า ISLQ ไม่มีพิษต่อเซลล์ลำไส้มนุษย์ที่ความเข้มข้นที่ยับยั้ง CFTR ได้สมบูรณ์ ($100 \mu M$) สามารถยับยั้งการคัดหลั่งคลอไรด์ในเซลล์ลำไส้มนุษย์ที่เหนี่ยวนำด้วย cholera toxin และลดการคัดหลั่งของน้ำในลำไส้ของหนูถีบจักรที่เหนี่ยวนำด้วย cholera toxin ได้ร้อยละ 90 อีกทั้งสามารถยับยั้งการคัดหลั่งคลอไรด์ผ่านโปรตีน CFTR ในเซลล์ท่อไต (Madine-darby canine kidney/ MDCK cells) และลดอัตราการเจริญเติบโตของถุงน้ำของเซลล์ท่อไต (MDCK cyst) ได้ร้อยละ 90 สรุปได้ว่า DHIS จากใบหญ้าหวานออกฤทธิ์ยับยั้งการขนส่งคลอไรด์ของ CFTR ผ่านการกระตุ้นการทำงานของโปรตีน AMPK ส่วน ISLQ จากดอกทองกวาวออกฤทธิ์ยับยั้งการขนส่งคลอไรด์ของโปรตีน CFTR ได้โดยตรงโดยที่ไม่มีผลต่อโปรตีนขนส่งคลอไรด์ชนิดอื่นและมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยารักษาโรคคอหิวดกโรคและโรคถุงน้ำในไต

คำหลัก : โปรตีนขนส่งคลอไรด์; สมุนไพร; ท้องร่วง; โรคไต

Abstract

Project Code : MRG5380125

Project Title : A study on mechanisms of CFTR inhibition by dihydroisosteviol

Investigator : Assistant Professor Chatchai Muanprasat, M.D., Ph.D.

E-mail Address : chatchai.mua@mahidol.a.th

Project Period : 2 years (June 15, 2010 – June 14, 2012)

Abstract:

Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) is a cAMP-activated chloride channel, which is proposed as a drug target for cholera and polycystic kidney disease. The objective of this project is to identify and characterize mechanism of action of CFTR inhibitors derived from Thai plants, including dihydroisosteviol (DHIS) from *Stevia rebaudiana* and isoliquiritigenin (ISLQ) from *Butea monosperma*. DHIS inhibited CFTR-mediated apical chloride current in human intestinal epithelial cells (T84 cells) with an $IC_{50} \sim 10 \mu M$. Surprisingly, DHIS failed to inhibit CFTR-mediated apical chloride current in Fisher rat thyroid cells expressing human CFTR, leading us to hypothesize that DHIS inhibits CFTR-mediated chloride secretion in T84 cells via other proteins that regulate CFTR function. It was found that CFTR inhibitory effect of DHIS in T84 cells is AMPK-dependent. In addition, western blot analysis showed that DHIS treatment resulted in activation of AMPK with the activation kinetics resembling its inhibitory effect on CFTR-mediated chloride transport. These findings led to the conclusion that DHIS inhibits CFTR-mediated chloride secretion in human intestinal epithelial cells by activating AMP-activated protein kinases. In addition to investigating mechanism of CFTR inhibition by DHIS, we identified ISLQ, a chalcone-type small molecule isolated from flowers of *Butea monosperma*, as a novel potent CFTR inhibitors, and characterized its mechanism of action as well as illustrated its potential therapeutic applications. ISLQ inhibited CFTR-mediated chloride secretion in T84 cells with an $IC_{50} \sim 20 \mu M$ without affecting cell viability and intracellular cAMP content. In contrast, ISLQ had no effect on other apical chloride channels expressing in T84 cells, including calcium-activated chloride channels and inward rectifying chloride channels. ISLQ was

effective in inhibiting cholera toxin-induced chloride secretion in T84 cells and reduced by 90% of cholera toxin-induced intestinal fluid secretion in mouse closed loop models. In addition, ISLQ completely inhibited CFTR-mediated chloride secretion in Madine-Darby canine kidney cells (MDCK cells) and reduced by 90% of MDCK cyst growth. In conclusion, DHIS inhibits CFTR in human intestinal epithelial cells through AMPK activation. ISLQ is a novel, potent and specific CFTR inhibitor, which holds promise in the treatment of cholera and polycystic kidney disease.

Keywords : chloride channel; herb; diarrhea; kidney disease