

ABSTRACT

This study is aimed to evaluate potential applications of a stevioside derivative dihydroisosteviol, and , pento-*m*-digalloyl glucose (PDG), as an antidiarrheal therapy. Our previous studies demonstrated that dihydroisosteviol inhibits human intestinal chloride secretion by blocking cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR), a cAMP-activated chloride channel with IC₅₀ values of 10. In mouse cholera closed-loop models, dihydroisosteviol reduced intestinal fluid secretion by more than 90 %. In this study, target specificity of dihydroisosteviol was investigated and it was found that dihydroisosteviol inhibits cAMP-activated chloride channels.

PDG is a plant-derived polyphenol which has been known for its antimutagenic and antioxidative effects. This study investigated effects of PDG on CFTR, a validated pharmacological target for secretory diarrhea. In Fisher rat thyroid cells stably expressing human CFTR (FRT-CFTR cells), forskolin-induced apical chloride current was reversibly inhibited by PDG in a dose-dependent manner with an IC₅₀ of 10 μ M. Similarly, PDG inhibited apical Cl⁻ current induced by both CPT- cAMP, a cell-permeable cAMP, and apigenin, a direct CFTR activator with IC₅₀ values of 11, and 22 μ M, respectively. Furthermore, PDG was found to have no effect on intracellular cAMP content and do not produce changes in cell viability in FRT-CFTR cells. Short- circuit current analysis in human intestinal cells (T84) showed that PDG effectively inhibited active Cl⁻ secretion induced by both CPT-cAMP and cholera toxin. In a mouse closed-loop model of cholera, a single intraluminal injection of PDG (0.6 mg/kg) reduced cholera toxin-induced intestinal fluid secretion by 71.3 % without disrupting intestinal fluid absorption. Therefore, dihydroisosteviol and PDG represent new candidates of CFTR inhibitors with therapeutic potential as a new pharmacological treatment for secretory diarrhea.

Keywords: Stevioside, secretory diarrhea, cholera toxin, Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR), hydrolysable tannin

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาศักยภาพของสารไอโอสโตรไอโอสติไวโอลซึ่งเป็นสารอนุพันธ์ของสติวไอซ์ที่สกัดจากใบหญ้าหวานและสาร Penta-m-digalloyl glucose (PDG) ซึ่งเป็นสารแทนนินจากผลสมอติง (Chinese gallnut) ในการพัฒนาเป็นยารักษาโรคท้องร่วงเฉียบพลัน โดยศึกษาผลของสารดังกล่าวต่อการคัดหลั่งของคลอไรด์ในเซลล์ลำไส้ซึ่งถือเป็นแรงดึงดูดสำคัญทำให้เกิดการคัดหลั่งของน้ำตามมาเข้าสู่โพรงลำไส้ในโรคท้องร่วง จากการศึกษาก่อนหน้านี้ ผู้วิจัยพบว่าไอโอสโตรไอโอสติไวโอลออกฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งของคลอไรด์ในเซลล์ลำไส้มนุษย์โดยการยับยั้งการทำงานของโปรตีนช่องทางผ่านคลอไรด์ไอออนที่เรียกว่า Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) ด้วย $IC_{50} \sim 10$ ไมโครโมลาร์ และสามารถลดการสูญเสียน้ำและเกลือแร่ในหนูถีบจักรที่ทำให้เกิดอหิวาตกโรคได้มากกว่าร้อยละ 90 และเพื่อศึกษาเพิ่มเติมถึงความจำเพาะในการออกฤทธิ์ของไอโอสโตรไอโอสติไวโอล ผู้วิจัยจึงทดสอบผลของสารนี้ต่อการทำงานของโปรตีนขนส่งโพแทสเซียมและพบว่ามันมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของโปรตีนขนส่งโพแทสเซียมได้ด้วย ซึ่งจะเป็นการเสริมฤทธิ์ของไอโอสโตรไอโอสติไวโอลในการยับยั้งการหลั่งของคลอไรด์เพิ่มมากขึ้น

PDG เป็นสารแทนนินที่สกัดได้จากเปลือกของผลสมอติง สารนี้มีฤทธิ์ที่น่าสนใจหลายอย่างเช่น ฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์และต้านอนุมูลอิสระ ผู้วิจัยจึงมีความสนใจศึกษาฤทธิ์ของสารนี้ในการยับยั้งการทำงานของ CFTR ซึ่งเป็นโปรตีนเป้าหมายที่สำคัญในการพัฒนายารักษาโรคท้องร่วง การศึกษาในเซลล์ต่อมไทรอยด์ของหนูพิษเฟอร์ที่ถูกทำให้มีการแสดงออกอย่างถาวรของ CFTR ของมนุษย์พบว่า PDG สามารถยับยั้งการทำงานของ CFTR ซึ่งถูกกระตุ้นด้วย forskolin ในระดับต่างๆ ตามความเข้มข้นที่ใช้โดยมีค่า $IC_{50} \sim 10$ ไมโครโมลาร์ พบว่าการยับยั้งนี้ไม่มีผลต่อระดับของ cAMP ภายในเซลล์และไม่มีผลต่ออัตราการอยู่รอดของเซลล์ ต่อมาการศึกษาในเซลล์ลำไส้มนุษย์ก็พบว่า PDG สามารถยับยั้งการคัดหลั่งของคลอไรด์ผ่าน CFTR ซึ่งกระตุ้นโดยทั้ง cAMP และสารพิษที่สร้างโดยเชื้ออหิวาห์ (cholera toxin) ได้เช่นกันโดยมีค่า $IC_{50} \sim 10-20$ ไมโครโมลาร์ นอกจากนี้ยังพบว่า PDG ไม่มีผลต่อการทำงานของโปรตีนขนส่งคลอไรด์ที่สำคัญอีกตัวหนึ่ง (CaCC) ที่สามารถกระตุ้นด้วยการเพิ่มขึ้นของระดับแคลเซียมภายในเซลล์ เมื่อทดสอบในหนูถีบจักรพบว่า PDG สามารถลดอาการท้องร่วงในหนูที่ได้รับสารพิษ cholera toxin ได้อย่างมีประสิทธิภาพเช่นเดียวกับไอโอสโตรไอโอสติไวโอล ดังนั้น ทั้งไอโอสโตรไอโอสติไวโอลและ PDG จึงเป็นสารจากธรรมชาติที่มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยารักษาโรคท้องร่วงโดยชนิดที่เกิดจากการคัดหลั่งของน้ำมากผิดปกติ (secretory diarrhea) ได้