



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการบทบาทของ Pregnane x receptor และ
Constitutive androstane receptor ต่อการควบคุมการขนส่ง
คลอไรด์ในเซลล์ลำไส้: ศักยภาพในการรักษาโรคท้องร่วง

โดย อ.ดร.สุริชา กฤตยารักษ์สกุล

มกราคม 2562

สัญญาเลขที่ 5980004

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการบทบาทของ Pregnane x receptor และ
Constitutive androstane receptor ต่อการควบคุมการขนส่ง
คลอไรด์ในเซลล์ลำไส้: ศักยภาพในการรักษาโรคท้องร่วง

อ.ดร.สุริชา กฤตยารักษ์สกุล
คณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล
มหาวิทยาลัยนวมินทราธิราช

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและต้น
สังกัด

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย
สกว.และต้นสังกัดไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : TRG5980004

ชื่อโครงการ : บทบาทของ Pregnane x receptor และ Constitutive androstane receptor ต่อการควบคุมการขนส่งคลอไรด์ในเซลล์ลำไส้: ศักยภาพในการรักษาโรคท้องร่วง

ชื่อนักวิจัย : อ.ดร.สุธิชา กฤตยารักษ์สกุล
คณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล มหาวิทยาลัยนวมินทราธิราช

อีเมล : suticha@nmu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี (มิถุนายน 2559 ถึง พฤษภาคม 2561)

บทคัดย่อ:

Constitutive androstane receptor (CAR) และ pregnane x receptor (PXR) เป็นนิวเคลียร์รีเซพเตอร์ที่มีบทบาทในการควบคุมการแสดงออกของยีนหลายชนิดที่มีความสำคัญในกระบวนการเมตาบอลิซึมและการเปลี่ยนแปลงสภาพของยาและสารเคมีต่างๆ ในร่างกาย มีการศึกษาพบว่า CAR และ PXR ควบคุมการแสดงออกของยีน ATP-binding cassette (ABC) transporters ในลำไส้ ได้แก่ multidrug resistance protein 1 (MDR1) และ multidrug resistance-associated protein 2/3 (MRP2 และ MRP3). โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาบทบาทของ CAR และ PXR ต่อการควบคุมการทำงานของโปรตีนขนส่งคลอไรด์ที่มีชื่อว่า cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) ในเซลล์ลำไส้ของมนุษย์ (T84 cells) และในลำไส้ของหนูถีบจักร ผลการทดลองพบว่าเมื่อมีการกระตุ้น T84 cells เป็นเวลา 24 ชั่วโมงด้วยสารกระตุ้น CAR ทั้ง 2 ชนิด คือ CITCO (1 μ M) และ Phenytoin (5 μ M) หรือสารกระตุ้น PXR ทั้ง 2 ชนิด คือ rifampicin (10 μ M) และ SR12813 (1 μ M) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถลดการหลั่งไอออนใน T84 cells เมื่อถูกเหนี่ยวนำโดย cAMP โดยผลการยับยั้งที่เกิดขึ้นไม่ได้เกิดจากความเป็นพิษของสาร CAR agonist และ PXR agonist ต่อเซลล์ นอกจากนี้ผู้วิจัยยังศึกษาผลของสารกระตุ้น PXR และ CAR ต่อการขนส่งคลอไรด์ผ่านโปรตีนขนส่งคลอไรด์ที่อยู่ทางด้าน apical membrane ใน T84 cells โดยทำการ permeabilize เซลล์ด้าน basolateral membrane ผลการทดลองพบว่าสารกระตุ้น CAR (CITCO 1 μ M) และสารกระตุ้น PXR (rifampicin 10 μ M) มีผลลดการขนส่งคลอไรด์ผ่านผนังลำไส้ใน T84 cells โดยสามารถยับยั้ง cAMP-activated apical Cl^- current เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย cpt-cAMP และ

CFTR activator (Genistein) เมื่อทำการวัดการแสดงออกของยีนและโปรตีน CFTR ในเซลล์ T84 cells หลังจากได้รับสารกระตุ้น CAR agonist (CITCO และ phenytoin) ผลการทดลองพบว่าสารกระตุ้น CAR มีผลลดการแสดงออกของยีนและโปรตีน CFTR ใน T84 cells นอกจากนี้ยังพบว่าสารยับยั้งการทำงานของ CAR (CINPA1) สามารถบล้างฤทธิ์ของสารกระตุ้น CAR ต่อการหลั่งคลอไรด์และการแสดงออกของโปรตีน CFTR ได้ ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาสารกระตุ้น PXR และ CAR ต่อการหลั่งคลอไรด์ที่เหนี่ยวนำโดย cholera toxin ใน T84 cells จากผลการทดลองพบว่า CAR agonist (CITCO) มีผลลดการหลั่งคลอไรด์ผ่านผนังลำไส้ใน T84 cells ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย cholera toxin จากการศึกษาในหนูถีบจักรพบว่าเมื่อหนูถีบจักรได้รับสาร TCPOBOP (3 mg/kgBW) ซึ่งเป็น murine-specific CAR agonist เป็นเวลา 7 วัน สามารถลดการแสดงออกของยีนและโปรตีน CFTR ในลำไส้ นอกจากนี้สาร TCPOBOP สามารถยับยั้งการหลั่งสารน้ำในลำไส้ของหนูถีบจักรเมื่อถูกเหนี่ยวนำโดย cholera toxin จากข้อมูลนี้สรุปได้ว่าการกระตุ้นการทำงานของ CAR มีบทบาทสำคัญต่อการควบคุมการทำงานของ CFTR ในลำไส้ โดยมีผลลดการแสดงออกของ CFTR ดังนั้นการกระตุ้นการทำงานของ CAR มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยารักษาโรคที่มีการทำงานที่มากผิดปกติของ CFTR โดยเฉพาะอย่างยิ่ง โรคท้องร่วงชนิด secretory diarrhea

คำหลัก : นิวเคลียร์รีเซพเตอร์, ตัวรับรู่ยาหรือสารเคมี, การขนส่งอิเล็กโทรไลต์, โปรตีนขนส่งคลอไรด์, โรคท้องร่วง

Abstract

Project Code : TRG5980004

Project Title : Roles of pregnane x receptor and constitutive androstane receptor in the regulation of intestinal chloride transport and potential application for treatment of diarrhea

Investigator : Dr.Suticha Kittayaruksakul

Faculty of Medicine Vajira Hospital, Navamindradhiraj University

E-mail Address : suticha@nmu.ac.th

Project Period: 2 years (June 2016 – May 2018)

Abstract:

Constitutive androstane receptor (CAR) and pregnane x receptor (PXR) belonging to the nuclear receptor superfamily plays an important role in the xenobiotic metabolism and disposition. It has been reported that CAR and PXR regulates the expression of the ATP-binding cassette (ABC) transporters in the intestine, such as multidrug resistance protein 1 (MDR1) and multidrug resistance-associated protein 2/3 (MRP2 and MRP3). In this study, we investigated the role of CAR and PXR in the regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)-mediated chloride transport in T84 human colonic epithelial cells and mouse intestinal tissues. Treatments of T84 cell monolayers with specific CAR agonists (CITCO and phenytoin at concentrations of 1 μ M and 5 μ M, respectively) for 24 h decreased transepithelial Cl⁻ secretion in response to cAMP-dependent agonist. Moreover, exposure the cells to PXR agonists, rifampicin and SR12813, for 24 h led to decreases in cAMP-dependent Cl⁻ secretion. We confirmed that the inhibitory effects were not the result from cytotoxicity of the compounds to T84 cells. Basolateral membrane permeabilization experiments also revealed that CAR agonist (CITCO) and PXR agonist (rifampicin) decreased apical Cl⁻ current stimulated by both cpt-cAMP and genistein (a direct CFTR activator). It was found that activation of CAR by it agonist reduced both mRNA and protein expression of CFTR. This inhibition was abolished by coincubation of CITCO with a CAR antagonist,

CINPA1. Furthermore, CITCO decreased cholera toxin (CT)-induced Cl^- secretion across T84 cell monolayers. In ICR mice, administration of TCPOBOP (3 mg/kgBW), a murine-specific CAR agonist, for 7 days produced significant decreases in CFTR mRNA and protein expressions in intestinal tissues. Interestingly, TCPOBOP also inhibited CT-induced intestinal fluid accumulation in mice. This is the first evidence showing that CFTR was downregulated by CAR activation in the intestine. Our findings suggest that CAR has potential as a new drug target for treatment of condition with hyperactivity/hyperfunction of CFTR especially secretory diarrheas.

Keywords : nuclear receptor, xenobiotic sensors, electrolyte transport, chloride channels, diarrhea

เนื้อหางานวิจัย

1. บทคัดย่อ

Constitutive androstane receptor (CAR) และ pregnane x receptor (PXR) เป็นนิวเคลียร์รีเซพเตอร์ที่มีบทบาทในการควบคุมการแสดงออกของยีนหลายชนิดที่มีความสำคัญในกระบวนการเมตาบอลิซึมและการเปลี่ยนแปลงสภาพของยาและสารเคมีต่างๆ ในร่างกายมีการศึกษาพบว่า CAR และ PXR ควบคุมการแสดงออกของยีน ATP-binding cassette (ABC) transporters ในลำไส้ ได้แก่ multidrug resistance protein 1 (MDR1) และ multidrug resistance-associated protein 2/3 (MRP2 และ MRP3). โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาบทบาทของ CAR และ PXR ต่อการควบคุมการทำงานของโปรตีนขนส่งคลอไรด์ที่มีชื่อว่า cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) ในเซลล์ลำไส้ของมนุษย์ (T84 cells) และในลำไส้ของหนูถีบจักร ผลการทดลองพบว่าเมื่อมีการกระตุ้น T84 cells เป็นเวลา 24 ชั่วโมงด้วยสารกระตุ้น CAR ทั้ง 2 ชนิด คือ CITCO (1 μ M) และ Phenytoin (5 μ M) หรือสารกระตุ้น PXR ทั้ง 2 ชนิด คือ rifampicin (10 μ M) และ SR12813 (1 μ M) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถลดการหลั่งไอออนใน T84 cells เมื่อถูกเหนี่ยวนำโดย cAMP โดยผลการยับยั้งที่เกิดขึ้นไม่ได้เกิดจากความเป็นพิษของสาร CAR agonist และ PXR agonist ต่อเซลล์ นอกจากนี้ผู้วิจัยยังศึกษาผลของสารกระตุ้น PXR และ CAR ต่อการหลั่งคลอไรด์ผ่านโปรตีนขนส่งคลอไรด์ที่อยู่ทางด้าน apical membrane ใน T84 cells โดยทำการ permeabilize เซลล์ด้าน basolateral membrane ผลการทดลองพบว่าสารกระตุ้น CAR (CITCO 1 μ M) และสารกระตุ้น PXR (rifampicin 10 μ M) มีผลลดการหลั่งคลอไรด์ผ่านผนังลำไส้ใน T84 cells โดยสามารถยับยั้ง cAMP-activated apical Cl^- current เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย cpt-cAMP และ CFTR activator (Genistein) เมื่อทำการวัดการแสดงออกของยีนและโปรตีน CFTR ในเซลล์ T84 cells หลังจากได้รับสารกระตุ้น CAR agonist (CITCO และ phenytoin) ผลการทดลองพบว่าสารกระตุ้น CAR มีผลลดการแสดงออกของยีนและโปรตีน CFTR ใน T84 cells นอกจากนี้ยังพบว่าสารยับยั้งการทำงานของ CAR (CINPA1) สามารถบล็ั้งฤทธิ์ของสารกระตุ้น CAR ต่อการหลั่งคลอไรด์และการแสดงออกของโปรตีน CFTR ได้ ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาสารกระตุ้น PXR และ CAR ต่อการหลั่งคลอไรด์ที่เหนี่ยวนำโดย cholera toxin ใน T84 cells จากผลการทดลองพบว่า CAR agonist (CITCO) มีผลลดการหลั่งคลอไรด์ผ่านผนังลำไส้ใน T84 cells ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย cholera toxin จากการศึกษาในหนูถีบจักรพบว่าเมื่อหนูถีบจักรได้รับสาร TCPOBOP (3 mg/kgBW) ซึ่งเป็น murine-specific CAR agonist เป็นเวลา 7 วัน สามารถลดการแสดงออกของยีนและโปรตีน CFTR ในลำไส้ นอกจากนี้สาร TCPOBOP สามารถยับยั้งการหลั่งสารน้ำในลำไส้ของหนูถีบจักรเมื่อถูกเหนี่ยวนำโดย cholera toxin จากข้อมูลนี้สรุปได้ว่าการกระตุ้นการทำงานของ CAR มีบทบาทสำคัญต่อการควบคุมการทำงานของ CFTR ในลำไส้ โดยมีผลลดการแสดงออกของ CFTR ดังนั้นการกระตุ้นการทำงานของ CAR มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยารักษาโรคที่มีการทำงานที่มากผิดปกติของ CFTR โดยเฉพาะอย่างยิ่ง โรคท้องร่วงชนิด secretory diarrhea

2. Executive summary

2.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

การขนส่งสารของเซลล์เยื่อบุผิวในลำไส้เป็นกระบวนการที่มีความซับซ้อน โดยทั่วไป การขนส่งสารน้ำและเกลือแร่ในร่างกายเกี่ยวข้องกับการขนส่งคลอไรด์แบบอาศัยพลังงานหรือที่เรียกว่า active chloride transport ซึ่งจะขนส่งคลอไรด์จากกระแสเลือดเข้าสู่โพรงลำไส้โดยอาศัยการทำงานของโปรตีนขนส่งคลอไรด์ที่อยู่ทางด้าน apical membrane ของเซลล์ลำไส้ ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนหลักคือโปรตีน CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) จากหลักฐานในงานวิจัยพบว่าโปรตีน CFTR เป็นโปรตีนที่เป็นช่องทางหลักของการหลั่งคลอไรด์ในโรคท้องร่วงที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียที่ผลิต enterotoxins เช่น cholera toxin จากเชื้อ *V. cholerae* และโรคท้องร่วงในนักท่องเที่ยว (Travelers' diarrhea) จากเชื้อ enterotoxigenic *E. coli*

ในปัจจุบันมีการศึกษาถึงกลไกการเกิดโรคท้องร่วงชนิด secretory diarrhea มากขึ้น โดยการศึกษาส่วนใหญ่มุ่งความสนใจในการพัฒนายาใหม่โดยเป้าหมายหลักคือการพัฒนาที่สามารถยับยั้งการหลั่งคลอไรด์ผ่านโปรตีน CFTR แต่อย่างไรก็ตามกลไกในการควบคุมการทำงานของโปรตีน CFTR ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด มีการศึกษาพบว่ากลไกการทำงานของโปรตีน CFTR สามารถถูกควบคุมได้ด้วยโปรตีนหลายชนิด เช่น cAMP-dependent protein kinase A (PKA), protein kinase C (PKC), type II isotype of cGMP dependent protein kinase, tyrosine kinase และ AMP-activated protein kinase (AMPK) อย่างไรก็ตามข้อมูลเกี่ยวกับบทบาทของนิวเคลียร์รีเซพเตอร์ (nuclear receptors) ต่อการควบคุมการทำงานของโปรตีน CFTR ยังคงมีการศึกษาค่อนข้างน้อย ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งที่จะศึกษาถึงกลไกในการควบคุมการทำงานในระดับโมเลกุล และการแสดงออกของยีนและโปรตีน CFTR ซึ่งอาจเป็นเป้าหมายที่น่าสนใจอย่างยิ่งในการพัฒนายาสำหรับรักษาโรคท้องร่วงชนิด secretory diarrhea ได้

Pregnane x receptor (PXR; NR1I2) และ constitutive androstane receptor (CAR; NR1I3) เป็นนิวเคลียร์รีเซพเตอร์ที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีนหลายชนิด โดยทำหน้าที่เป็นตัวตรวจวัดสารแปลกปลอม (xenobiotic sensors) ในร่างกาย ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมและการเปลี่ยนแปลงสภาพของยาหรือสารเคมีต่างๆ PXR และ CAR มีการแสดงออกในหลายอวัยวะที่แตกต่างกัน โดยจะพบมากที่ตับ ไต และลำไส้ เมื่อยาหรือสารเคมีเข้าสู่ร่างกายจะทำให้มีการกระตุ้นการทำงานของ PXR และ CAR โดยยาหรือสารเคมีจะทำหน้าที่เป็น ligands ไปจับกับนิวเคลียร์รีเซพเตอร์ หลังจากนั้น PXR หรือ CAR ก็จะไปจับกับ retinoic x receptors (RXR) เพื่อรวมตัวเป็น PXR-RXR หรือ CAR-RXR complex จากนั้นไปกระตุ้นยีนเป้าหมายโดยการจับกับ specific DNA response element ของ promoters เพื่อควบคุมกระบวนการสร้าง mRNA ของยีนเป้าหมายต่อไป มีการศึกษาพบว่า PXR และ CAR มีบทบาทควบคุมการแสดงออกของยีน เช่น drug-metabolizing enzymes และ drug transporters ในตับและลำไส้ นอกจากนี้ PXR และ CAR พบว่ามีประโยชน์ในการเป็น

โปรตีนเป้าหมายสำหรับรักษาโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน โรคที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ และ metabolic diseases เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับบทบาทของ PXR และ CAR ในการควบคุมการขนส่งน้ำและเกลือแร่ต่างๆ ภายในลำไส้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรตีน CFTR ซึ่งมีบทบาทที่สำคัญในการกำหนดการหลั่งคลอไรด์ในโรคท้องร่วงชนิด secretory diarrhea ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาผลและกลไกการออกฤทธิ์ของ PXR และ CAR ต่อการควบคุมการทำงานของโปรตีนขนส่งคลอไรด์ในเซลล์ลำไส้ และศึกษาศักยภาพในการรักษาอหิวาตกโรค

2.2 วัตถุประสงค์

1. ศึกษาผลของการกระตุ้น PXR และ CAR ต่อการขนส่งไอออนในเซลล์ลำไส้ของมนุษย์ (T84 cells)
2. ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของ PXR และ CAR ต่อการหลั่งคลอไรด์ในเซลล์ลำไส้ของมนุษย์ (T84 cells)
3. ศึกษาผลของการกระตุ้น PXR และ CAR ต่อการหลั่งคลอไรด์ในลำไส้ของหนูถีบจักร
4. ศึกษาศักยภาพของ PXR และ CAR ในการรักษาโรคท้องร่วงที่เกิดจาก cholera toxin และ rotavirus enterotoxin

3. ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 Cell culture

การศึกษาในส่วน *in vitro* study ใช้เซลล์ human colonic epithelial (T84) cells จาก American Type Culture Collection (ATCC) โดย T84 cells นำมาเลี้ยงใน media ที่มีส่วนประกอบของ Dulbecco's Modified Eagle's medium 50% , Ham's F-12 medium (DMEM/F-12) 50% , 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin และ 100 µg/ml streptomycin ซึ่งเซลล์ได้ทำการเลี้ยงในตู้ incubator ที่มีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมคือมีอุณหภูมิ 37°C และมีปริมาณของก๊าซในอากาศ 95% O₂ และ 5% CO₂

3.2 Animals

การศึกษาในส่วน *in vivo* study จะใช้หนูถีบจักร สายพันธุ์ M. Musculus ICR outbred เพศผู้ อายุ 6 สัปดาห์ มีน้ำหนักประมาณ 30-35 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา จ.นครปฐม ซึ่งนำมาเลี้ยงที่คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดลเป็นเวลา 7 วัน และก่อนเริ่มทำการทดลองหนูถีบจักรอดอาหารเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3 การศึกษาทาง electrophysiology

เพื่อศึกษาถึงผลของการกระตุ้น PXR และ CAR ต่อการทำงานของโปรตีนขนส่งไอออนต่างๆ ในเซลล์ลำไส้ของมนุษย์ (T84 cells) เซลล์นี้ได้รับการเลี้ยงบนเมมเบรน (snapwell

inserts) เป็นเวลา 10-14 วัน จนกระทั่งเซลล์มีค่า transepithelial resistance มากกว่า 1,000 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ จากนั้นทำการแบ่งเซลล์เป็น 3 กลุ่ม คือ 1) กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารกระตุ้น 2) กลุ่มที่ได้รับสารกระตุ้น hPXR agonist และ 3) กลุ่มที่ได้รับสารกระตุ้น hCAR agonist ที่ความเข้มข้นและเวลาแตกต่างกัน จากนั้น incubate ด้วย cAMP agonists (10 μM forskolin และ 100 μM CPT-cAMP) เพื่อเพิ่มระดับ cAMP ภายในเซลล์ หลังจากนั้นทำการวัดอัตราการขนส่งไอออนโดยทำการวัดค่า Short-circuit current (Isc) โดยวิธี Ussing technique ซึ่งเป็นการวัดปริมาณไอออนที่ขนส่งผ่าน epithelium ในหนึ่งหน่วยเวลา โดยใช้เครื่องมือ DVC-1000 voltage clamp machine

3.4 การวัดปริมาณ fluid accumulation ในลำไส้โดยใช้ CT-induced diarrhea ในหนูถีบจักร

สำหรับการทดลองในหนูถีบจักร (mice) ทำการแบ่งกลุ่มการทดลองเป็น 3 กลุ่ม คือ 1) กลุ่มที่ได้รับสาร vehicle (corn oil) เป็นเวลา 7 วัน 2) กลุ่มที่ได้รับสาร mPXR agonist (PCN) 100 mg/kg เป็นเวลา 7 วัน 3) กลุ่มที่ได้รับสาร mCAR agonist (TCPOBOP) 3 mg/kg เป็นเวลา 7 วัน โดยหนูถีบจักรถูกทำให้สลบด้วยการฉีดสาร zoletil และ zylaxine เข้าทาง intraperitoneal จากนั้นนำ intestinal closed loops มา incubate ด้วยสารละลาย PBS 100 μl หรือสารละลาย PBS ที่ประกอบด้วย cholera toxin (CT 1 $\mu\text{g}/\text{loop}$) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเวลาที่มีการเกิด fluid accumulation ในลำไส้ จากนั้นนำ intestinal loop มาวัดค่า loop weight per length ratio และทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยเปรียบเทียบข้อมูลระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารกระตุ้น PXR และ CAR เทียบกับกลุ่ม control ซึ่งหนูถีบจักรที่มีค่า intestinal weight/length ratio มากกว่า 0.1 g/cm แสดงว่ามีการเกิดอาการท้องร่วง (positive diarrheal response)

3.5 การวัดการแสดงออกของยีนและโปรตีนโดยใช้เทคนิค western blot analysis และ real-time PCR

เพื่อการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของกระตุ้น PXR และ CAR ในการควบคุมการทำงานของโปรตีน CFTR ใน T84 cells และ mouse intestinal tissues โดยวัดการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีนและโปรตีน CFTR ที่เกิดขึ้น โดยใช้เทคนิค real time PCR และ western blot analysis ตามลำดับ

4. ผลการศึกษา

1. ศึกษาคุณสมบัติของ T84 cells

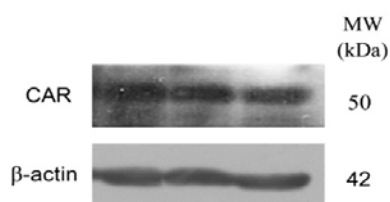
โครงการวิจัยนี้ทำการศึกษาผลของ PXR และ CAR ต่อการควบคุมการทำงานของโปรตีนขนส่งคลอไรด์ในเซลล์ลำไส้ ดังนั้นเพื่อให้แน่ใจว่าเซลล์ T84 ซึ่งใช้เป็นเซลล์ต้นแบบในการศึกษาครั้งนี้ มีการแสดงออกของ PXR และ CAR ผู้วิจัยจึงทำการวัดการแสดงออกของโปรตีน PXR และ CAR โดยใช้เทคนิค western blot analysis พบว่าเซลล์ T84 มีการแสดงออกของโปรตีน PXR (รูปที่ 1A.) และโปรตีน CAR (รูปที่ 1B.)

นอกจากนี้ผู้วิจัยยังทำการทดสอบว่าเมื่อมีการกระตุ้นการทำงานของ PXR และ CAR โดยใช้สารกระตุ้น PXR และ CAR ทั้งสองชนิดที่มีโครงสร้างที่แตกต่างกันสามารถเพิ่มการแสดงออกของ CAR target gene ได้หรือไม่ สารที่กระตุ้น PXR ได้แก่ rifampicin และ SR12813 ที่ความเข้มข้น 10 และ 1 μM ตามลำดับ ส่วนสารกระตุ้น CAR คือ CITCO และ phenytoin ที่ความเข้มข้น 1 และ 5 μM ตามลำดับ โดยทำการวัดการแสดงออกของยีน multidrug resistance protein 1 (MDR1) ซึ่งเป็น target gene ของ PXR และ CAR ใช้เทคนิค real-time PCR ผลการทดลองพบว่าเมื่อมีการกระตุ้น PXR โดย rifampicin และ SR12813 สามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน MDR1 ได้ (รูปที่ 1C.) และยังพบว่า CITCO 1 μM และ phenytoin 5 μM มีผลเพิ่มการแสดงออกของยีน MDR1 (รูปที่ 1D.)

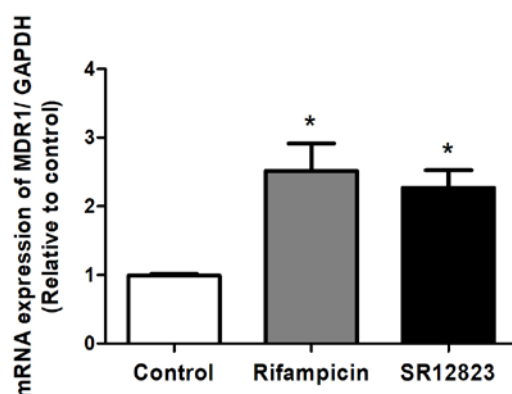
A.



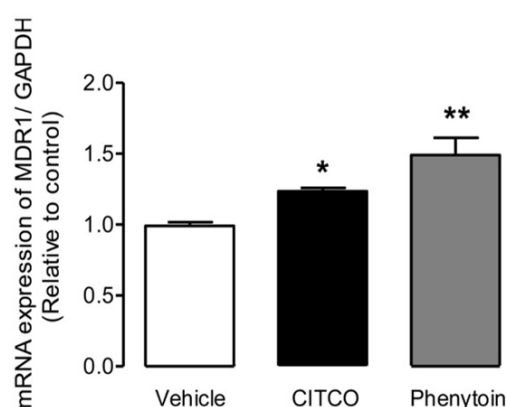
B.



C.



D.



รูปที่ 1. แสดงผลของการแสดงออกของโปรตีน PXR และ CAR และการกระตุ้น target gene ใน T84 cells

A.) แสดงผลของการแสดงออกของโปรตีน PXR โดยใช้เทคนิค western blot analysis

B.) แสดงผลของการแสดงออกของโปรตีน CAR โดยใช้เทคนิค western blot analysis

C.) ผลของของสารกระตุ้น PXR (rifampicin 10 μ M และ SR12813 1 μ M) ต่อการแสดงออกของยีน MDR1

D.) ผลของของสารกระตุ้น CAR (CITCO 1 μ M และ phenytoin 5 μ M) ต่อการแสดงออกของยีน MDR1

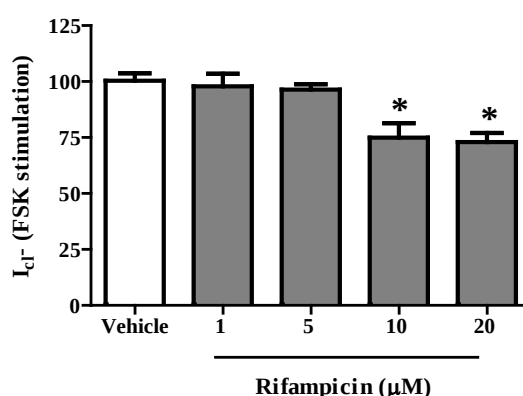
(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม)

2. ศึกษาผลของสารกระตุ้น PXR และ CAR ต่อการหลั่งฮิออนที่เหนี่ยวนำโดย cAMP ใน T84 cells

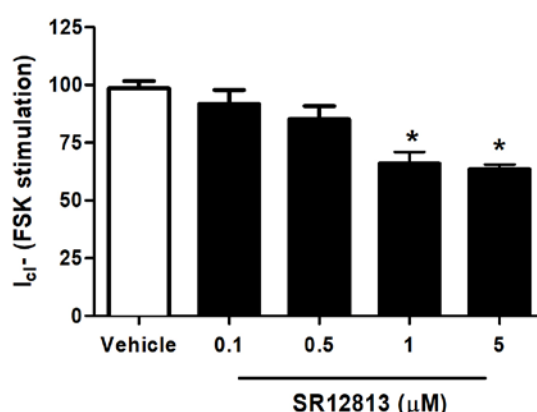
ผู้วิจัยศึกษาถึงบทบาทของ PXR และ CAR ต่อการหลั่งฮิออนผ่านผนังลำไส้ใน T84 cells ซึ่ง จะทำการทดลองโดยใช้ T84 cells โดยเซลล์จะได้รับการเลี้ยงบนเมมเบรน (snapwell inserts) เป็นเวลาอย่างน้อย 10-14 วัน เพื่อให้เซลล์เจริญเต็มที่ จากนั้นจะทำการแบ่งเซลล์ที่อยู่บนเมมเบรนเป็น 3 กลุ่มคือ 1) กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารกระตุ้น 2) กลุ่มที่ได้รับสารกระตุ้น hPXR

agonists (rifampicin และ SR12813) และ 3) กลุ่มที่ได้รับสารกระตุ้น hCAR agonists (CITCO และ phenytoin) ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการ incubate ด้วย cAMP agonists (10 μ M forskolin) เพื่อเพิ่มระดับ cAMP ภายในเซลล์ หลังจากนั้นทำการวัดหาปริมาณการขนส่งไอออน โดยการวัดค่า Short-circuit current (Isc) โดยวิธี Ussing technique ซึ่งจะวัดโดยใช้เครื่องมือ Voltage-Current clamp จากผลการทดลองพบว่า hPXR agonist (rifampicin) ที่ความเข้มข้น 10 μ M และ 20 μ M มีผลลดการหลั่งไอออนผ่านผนังลำไส้ใน T84 cells (รูปที่ 2A.) และพบว่าสาร hPXR agonist (SR12813) สามารถลดการหลั่งไอออนผ่านผนังลำไส้ใน T84 cells ที่ความเข้มข้น 1 μ M และ 5 μ M (รูปที่ 2B.) จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า สารกระตุ้น PXR agonists สามารถลดการหลั่งไอออนในเซลล์ T84 ได้เมื่อถูกกระตุ้นด้วย cAMP

A.

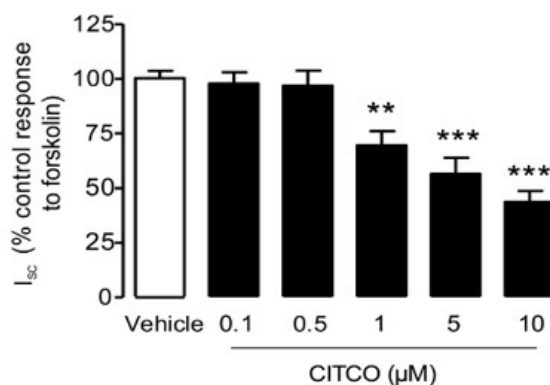


B.

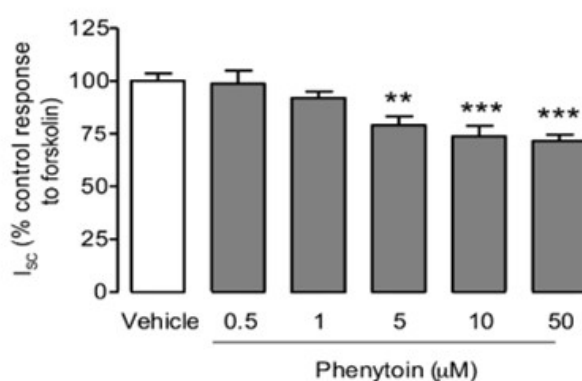


นอกจากนี้ยังพบว่า hCAR agonist (CITCO) ที่ความเข้มข้น 1 μ M, 5 μ M และ 10 μ M สามารถลดการหลั่งไอออนผ่านผนังลำไส้ใน T84 cells และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารกระตุ้น CAR (CITCO 10 μ M) ผลการยับยั้งการหลั่งไอออนจะมีมากขึ้นเมื่อเทียบกับความเข้มข้นที่ 1 μ M (รูปที่ 2C.) และพบว่าสารกระตุ้น hCAR agonist อีกชนิดหนึ่ง (phenytoin) สามารถลดการหลั่งไอออนผ่านผนังลำไส้ใน T84 cells ที่ความเข้มข้น 5 μ M, 10 μ M และ 50 μ M (รูปที่ 2D.)

C.

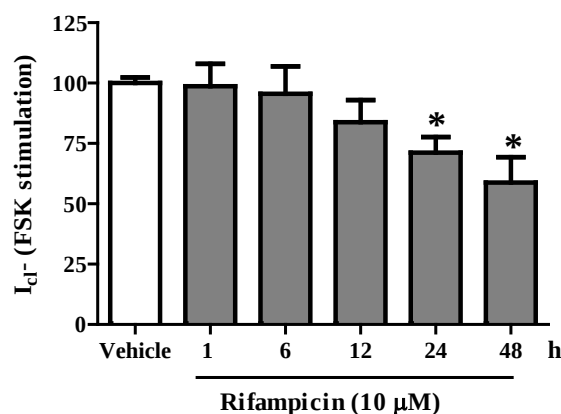


D.

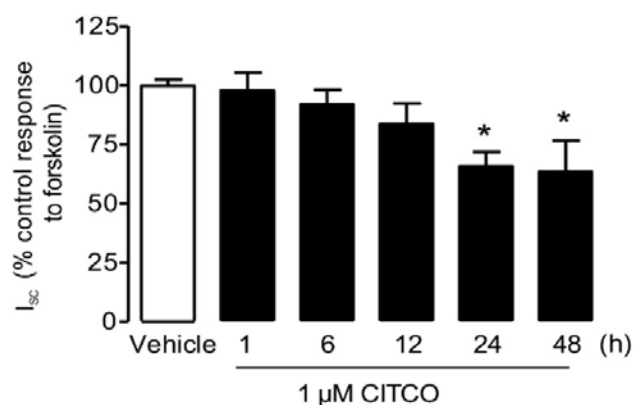


เพื่อศึกษาเวลาที่เหมาะสมของสารกระตุ้น PXR และ CAR ต่อการออกฤทธิ์ในการลดการหลั่งไขมันผ่านผนังลำไส้ใน T84 cells เมื่อถูกเหนี่ยวนำโดย cAMP ผู้วิจัยทำการแบ่ง T84 cells ที่ได้รับการเลี้ยงบนเมมเบรนเป็น 3 กลุ่มคือ 1) กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารกระตุ้น 2) กลุ่มที่ได้รับสารกระตุ้น hPXR agonist (rifampicin) ความเข้มข้น 10 μM และ 3) กลุ่มที่ได้รับสารกระตุ้น hCAR agonist (CITCO) ความเข้มข้น 1 μM ที่เวลาแตกต่างกัน จากผลการทดลองพบว่าการลดลงของการหลั่งไขมันโดยสารกระตุ้น hPXR agonist (10 μM rifampicin) เกิดขึ้นที่เวลา 24 ชั่วโมง และเมื่อเพิ่มเวลาการกระตุ้นเป็น 48 ชั่วโมง สารกระตุ้น PXR มีแนวโน้มจะลดการหลั่งไขมันมากขึ้น เมื่อเทียบกับที่เวลา 24 ชั่วโมง แต่ไม่มีความสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 2E.) ในขณะที่สารกระตุ้น hCAR agonist (1 μM CITCO) สามารถลดการหลั่งไขมันผ่านผนังลำไส้ใน T84 cells ณ เวลา 24 ชั่วโมง และเมื่อเพิ่มเวลามากขึ้นเป็น 48 ชั่วโมง การลดลงของการหลั่งไขมันไม่มีความแตกต่างกับผลที่เกิดขึ้น ณ เวลา 24 ชั่วโมง (รูปที่ 2F.)

E.



F.



รูปที่ 2. แสดงผลของสารกระตุ้น PXR และ CAR ต่อการหลั่งไอออนที่เหนี่ยวนำโดย cAMP ใน T84 cells (n = 5)

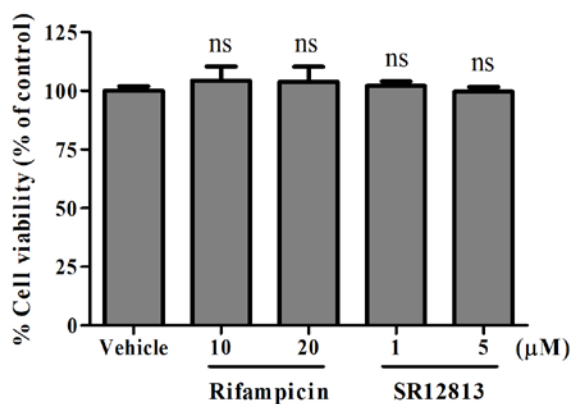
- A.) ผลของของสารกระตุ้น PXR (Rifampicin) ต่อการหลั่งไอออนที่เหนี่ยวนำโดย forskolin ใน T84 cells ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ณ เวลา 24 ชั่วโมง
- B.) ผลของของสารกระตุ้น PXR (SR12813) ต่อการหลั่งไอออนที่เหนี่ยวนำโดย forskolin ใน T84 cells ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ณ เวลา 24 ชั่วโมง
- C.) ผลของของสารกระตุ้น CAR (CITCO) ต่อการหลั่งไอออนที่เหนี่ยวนำโดย forskolin ใน T84 cells ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ณ เวลา 24 ชั่วโมง
- D.) ผลของของสารกระตุ้น CAR (Phenytoin) ต่อการหลั่งไอออนที่เหนี่ยวนำโดย forskolin ใน T84 cells ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ณ เวลา 24 ชั่วโมง
- E.) ผลของสารกระตุ้น PXR (Rifampicin) ความเข้มข้น 10 μ M ต่อการหลั่งไอออนที่เหนี่ยวนำโดย forskolin ใน T84 cells ที่เวลาแตกต่างกัน
- F.) ผลของสารกระตุ้น CAR (CITCO) ความเข้มข้น 1 μ M ต่อการหลั่งไอออนที่เหนี่ยวนำโดย forskolin ใน T84 cells ที่เวลาแตกต่างกัน

(* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม)

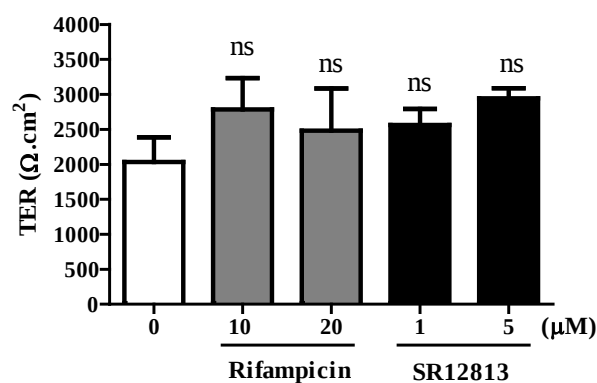
3. ศึกษาความเป็นพิษของสารกระตุ้น PXR และ CAR ใน T84 cells

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อยืนยันผลของการขนส่งไอออนหลังจากที่ได้รับการกระตุ้น PXR agonist และ CAR agonist ใน T84 cells โดยไม่ได้เกิดจากความเป็นพิษของสารในเซลล์ โดยการวัดค่า cell viability ใช้เทคนิค MTT calorimetric assay และวัดค่า transepithelial resistance (TER) จากการศึกษาพบว่าสาร PXR agonist ทั้ง 2 ตัว ได้แก่สาร rifampicin ที่ความเข้มข้น 10 μM และ 20 μM และสาร SR12813 ที่ความเข้มข้น 1 μM และ 5 μM ไม่มีผลต่อค่า cell viability และค่า TER (รูปที่ 3A และ 3B.) นอกส่วนสาร CAR agonist ทั้ง 2 ตัว ได้แก่สาร CITCO ที่ความเข้มข้น 1 μM และ 5 μM และ สาร phenytoin ที่ความเข้มข้น 5 μM และ 10 μM ไม่มีผลต่อค่า cell viability นอกจากนี้ยังพบว่า CITCO และ phenytoin ที่ความเข้มข้นดังกล่าว ไม่มีผลต่อค่า TER (รูปที่ 3C และ 3D.) ดังนั้นผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของสาร agonists ที่กระตุ้นนิวเคลียร์รีเซพเตอร์ชนิด PXR และ CAR ที่ใช้ในการทดลองที่ผ่านมาไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ T84 cells

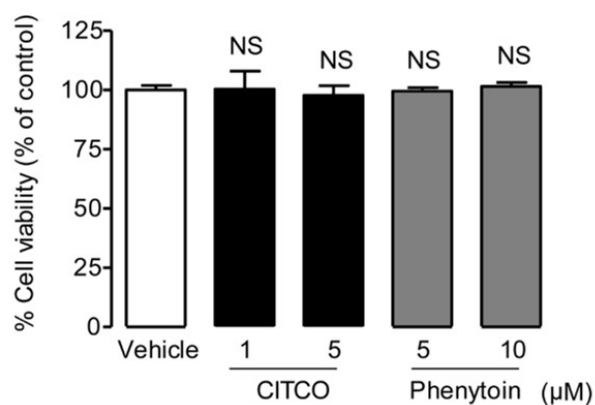
A.



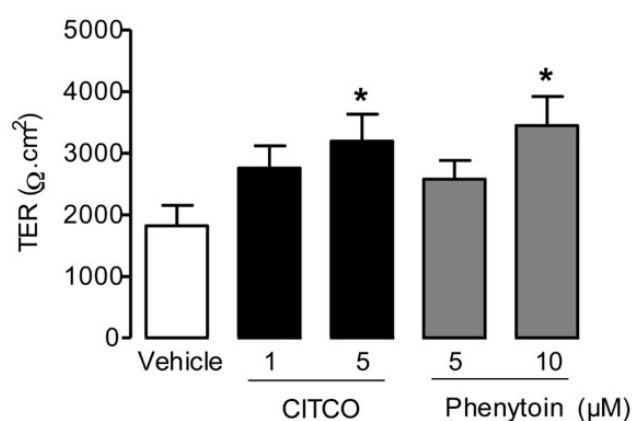
B.



C.



D.



รูปที่ 3. แสดงผลของสารกระตุ้น PXR และ CAR ต่อความเป็นพิษของเซลล์ T84 cells

A.) ผลของของสารกระตุ้น PXR (Rifampicin และ SR12813) ต่อค่า cell viability ใน T84 cells ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ณ เวลา 24 ชั่วโมง

B.) ผลของของสารกระตุ้น PXR (Rifampicin และ SR12813) ต่อค่า transepithelial resistance (TER) ใน T84 cells ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ณ เวลา 24 ชั่วโมง

C.) ผลของของสารกระตุ้น CAR (CITCO และ Phenytoin) ต่อค่า cell viability ใน T84 cells ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ณ เวลา 24 ชั่วโมง

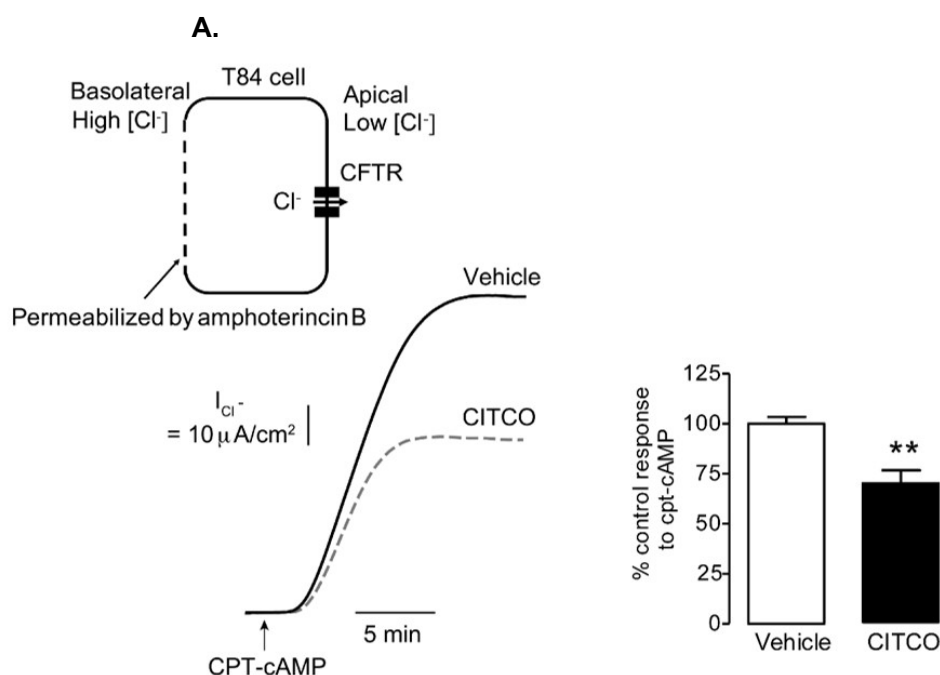
D.) ผลของของสารกระตุ้น CAR (CITCO และ Phenytoin) ต่อค่า transepithelial resistance (TER) ใน T84 cells ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ณ เวลา 24 ชั่วโมง

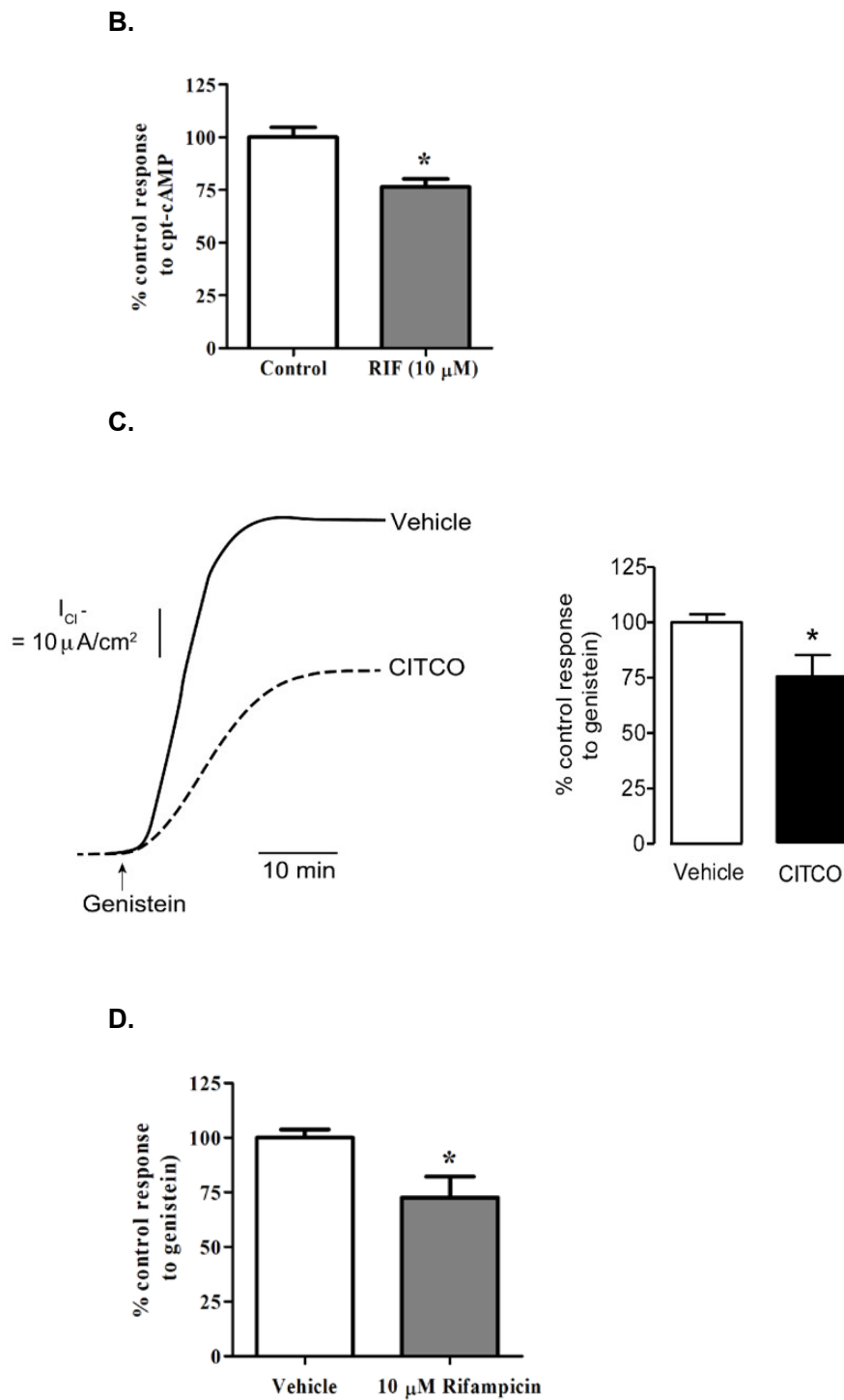
(* $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม control, NS = not significant)

4. ศึกษาผลของการกระตุ้น CAR ต่อการหลั่งคลอไรด์โดยโปรตีนขนส่งคลอไรด์ที่อยู่ทางด้าน apical membrane ใน T84 cells

เนื่องจากการหลั่งคลอไรด์ทางด้าน apical membrane เป็นตัวกำหนดปริมาณ fluid secretion ในลำไส้ ถ้าโปรตีนขนส่งคลอไรด์ทางด้าน apical membrane มีการทำงานที่มาก

เกินไปจะก่อให้เกิดโรคท้องร่วงได้ การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงบทบาทและกลไกการทำงานของ CAR ต่อการทำงานของ apical chloride channels โดยจะทำการแบ่ง T84 cells ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ 1) กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารกระตุ้นใดๆ (vehicle), 2) กลุ่มที่ได้รับสารกระตุ้น hCAR agonist (CITCO) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะนำ T84 cells ที่อยู่บน snapwell inserts ไปตั้งอยู่ใน Ussing chamber ในสารละลาย basolateral-to-apical chloride gradient solution จากนั้นจะทำการ permeabilize เซลล์ด้าน basolateral membrane ด้วยการ incubate สาร Amphotericin B (250 $\mu\text{g/ml}$) เป็นเวลา 30 นาทีเพื่อการ rule out ผลที่เกิดจากการทำงานของโปรตีนขนส่งทางด้าน basolateral membrane จากนั้นทำการยับยั้งการทำงานของโปรตีน ENaC ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการดูดซึมโซเดียม โดยใช้ amiloride เพื่อวัดกระแสของคลอไรด์ที่เกิดขึ้นเท่านั้น จากนั้นเหนี่ยวนำเซลล์ด้วย PKA activator (cpt-cAMP 100 μM) หรือ CFTR activator (Genistein 10 μM) และทำการวัดหา cAMP-activated Cl^- current ที่เกิดขึ้น โดยการวัดค่า Short-circuit current (Isc) โดยใช้เทคนิค Ussing technique จากผลการทดลองพบว่า hCAR agonist (CITCO) ที่ความเข้มข้น 1 μM และ hPXR agonist (rifampicin) ที่ความเข้มข้น 10 μM สามารถลดการหลั่งของคลอไรด์ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ด้าน apical ของ T84 cells ที่เหนี่ยวนำโดย cpt-cAMP อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 4A. และ 4B.) นอกจากนี้ยังพบว่า hCAR agonist (CITCO) ที่ความเข้มข้น 1 μM และ hPXR agonist (rifampicin) ที่ความเข้มข้น 10 μM สามารถลดการหลั่งคลอไรด์ผ่านผนังลำไส้ทางด้าน apical membrane ใน T84 cells ที่เหนี่ยวนำโดย CFTR activator อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 4C. และ 4D.) จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการกระตุ้น CAR และ PXR สามารถลด cAMP-mediated apical Cl^- current ผ่านผนังลำไส้ทางด้าน apical membrane ใน T84 cells ได้





รูปที่ 4. แสดงผลของสารกระตุ้น CAR ต่อการหลั่งคลอไรด์โดยโปรตีนขนส่งคลอไรด์ที่อยู่ทางด้าน apical membrane ใน T84 cells

A. ผลของสารกระตุ้น CAR ต่อการหลั่งคลอไรด์โดยโปรตีน CFTR เมื่อถูกกระตุ้นการทำงานของ CFTR ด้วย cpt-cAMP

B. ผลของสารกระตุ้น PXR ต่อการหลั่งคลอไรด์โดยโปรตีน CFTR เมื่อถูกกระตุ้นการทำงานของ CFTR ด้วย cpt-cAMP

C. ผลของสารกระตุ้น CAR ต่อการหลั่งคลอไรด์โดยโปรตีน CFTR เมื่อถูกกระตุ้นการทำงานของ CFTR ด้วย CFTR activator (genistein)

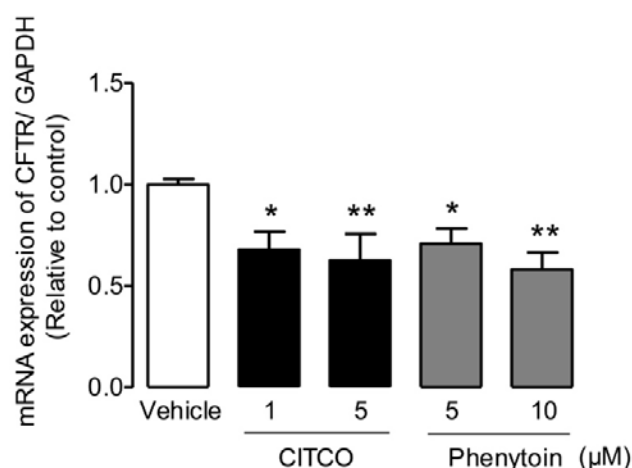
D. ผลของสารกระตุ้น PXR ต่อการหลั่งคลอไรด์โดยโปรตีน CFTR เมื่อถูกกระตุ้นการทำงานของ CFTR ด้วย CFTR activator (genistein)

(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม control)

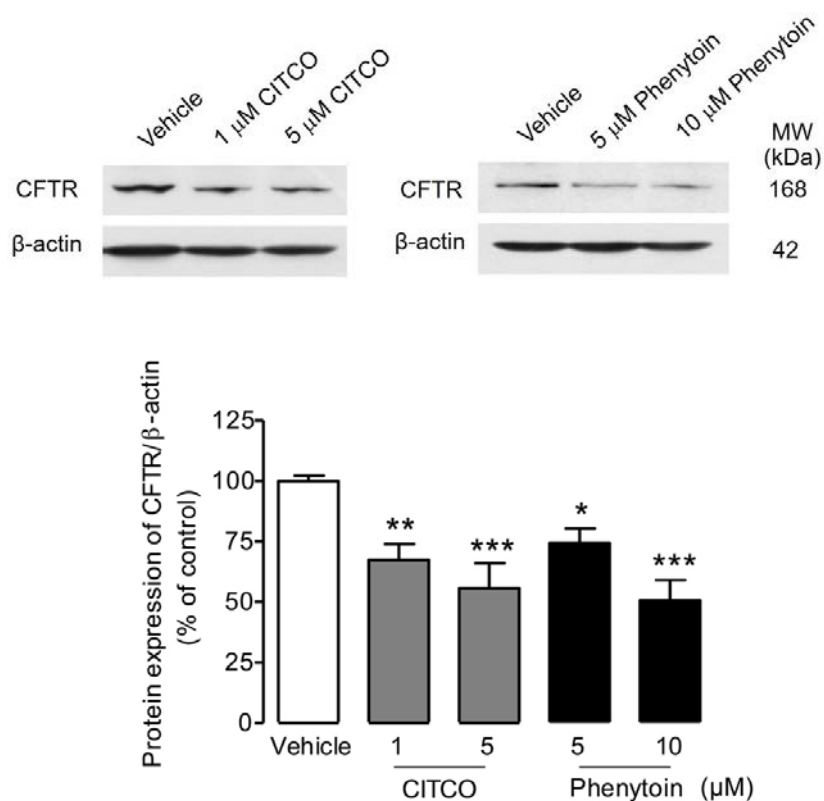
5. ศึกษาผลของการกระตุ้น CAR ต่อการแสดงออกของยีนและโปรตีน CFTR ใน T84 cells

เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของกระตุ้น CAR ในการควบคุมการทำงานของยีนและโปรตีน CFTR โดยทำการศึกษาว่าการกระตุ้นการทำงานของ CAR มีผลต่อการแสดงออกของยีนและโปรตีนด้วยหรือไม่ ดังนั้นจึงทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีนและโปรตีน CFTR ที่เกิดขึ้น โดย T84 cells ที่เจริญเติบโตเต็มที่ที่ได้รับการแบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ 1) กลุ่มควบคุม 2) กลุ่มทดลองที่ได้รับสารกระตุ้น CAR เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการวัดการแสดงออกของยีนโดยใช้เทคนิค real-time PCR และวัดการแสดงออกของโปรตีนโดยใช้เทคนิค western blot analysis ผลการทดลองพบว่า hCAR agonists ทั้ง 2 ตัว ได้แก่ สาร CITCO (ที่ความเข้มข้น 1 μM และ 5 μM) และสาร phenytoin (ที่ความเข้มข้น 5 μM และ 10 μM) สามารถลดการแสดงออกของยีนและโปรตีน CFTR ได้ (รูปที่ 5A. และ 5B.) จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสารกระตุ้นนิวเคลียร์รีเซพเตอร์ชนิด CAR สามารถลดการหลั่งคลอไรด์ในเซลล์ T84 ซึ่งเกิดจากการลดลงของการแสดงออกของยีนและโปรตีน CFTR

A.



B.



รูปที่ 5. แสดงผลของสารกระตุ้น PXR และ CAR ต่อการแสดงออกของยีนและโปรตีน CFTR ใน T84 cells

A. ผลของสารกระตุ้น CAR (CITCO และ phenytoin) ต่อแสดงออกของยีน CFTR ใน T84 cells

B. ผลของสารกระตุ้น CAR (CITCO และ phenytoin) ต่อแสดงออกของโปรตีน CFTR ใน T84 cells

(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม control)

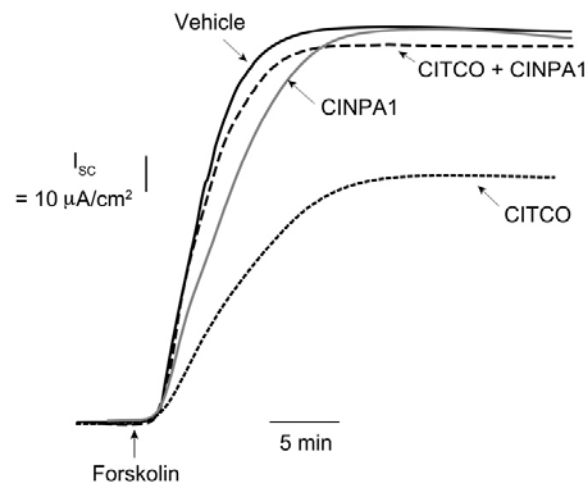
6. ศึกษาถึงบทบาทของกระตุ้น CAR ในการควบคุมการขนส่งไอออน ใน T84 cells

เพื่อที่จะ confirm ว่าผลของสารกระตุ้น CAR ไม่ได้เกิดจาก non-specific effects ของสาร แต่เป็นผลจากการกระตุ้นนิวเคลียร์รีเซพเตอร์ชนิด CAR ซึ่งจะทำให้การทดลองโดยใช้สาร antagonist โดย T84 cells จะถูกแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มดังนี้ 1). กลุ่ม control 2). กลุ่ม CAR agonist (CITCO ที่ความเข้มข้น 1 μM) 3). กลุ่ม CAR antagonist (CINPA1 ที่ความเข้มข้น 1 μM) 4). กลุ่ม CAR agonist + antagonist (CITCO 1 μM + CINPA1 1 μM) และทำการวัดค่า Isc และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม control และ treatment จากผลการทดลองพบว่า สาร CITCO 1 μM มีผลลดการหลั่งไอออนผ่านผนังลำไส้ใน T84 cells เมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วย cAMP ส่วนสาร CAR antagonist (CINPA1 1 μM) ไม่มีผลต่อการหลั่งไอออนผ่านผนังลำไส้ใน T84 cells นอกจากนี้ CAR antagonist (CINPA1 1 μM) สามารถยับยั้งผลของ CAR agonist

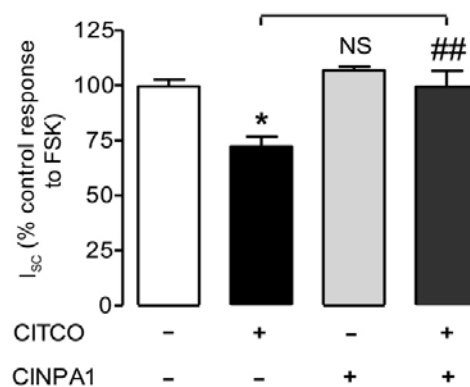
(CITCO 1 μM) ในการลดการหลั่งไอออนได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 6A และ 6B.) ดังนั้นจากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการกระตุ้นนิวเคลียร์รีเซพเตอร์ชนิด CAR สามารถลดการหลั่งไอออนในเซลล์ T84 cells

นอกจากนี้ผู้วิจัยทำการทดสอบผลของ CAR antagonist ต่อการแสดงออกของโปรตีน CFTR เมื่อได้รับสาร hCAR agonist ใน T84 cells ในการทดลองนี้พบว่าสาร hCAR agonist (CITCO 1 μM) มีผลลดการแสดงออกของโปรตีน CFTR ใน T84 cells และสาร CAR antagonist (CINPA1 1 μM) ไม่มีผลต่อการแสดงออกของโปรตีน CFTR นอกจากนี้ผู้วิจัยพบว่า CAR antagonist (CINPA1 1 μM) สามารถยับยั้งผลของ CAR agonist (CITCO 1 μM) ในการลดการแสดงออกของโปรตีน CFTR (รูปที่ 6C.) ดังนั้นจากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการกระตุ้นนิวเคลียร์ รีเซพเตอร์ชนิด CAR สามารถลดการหลั่งคลอไรด์ในเซลล์ T84 cells ซึ่งเกิดจากการลดลงของการแสดงออกของยีนและโปรตีน CFTR

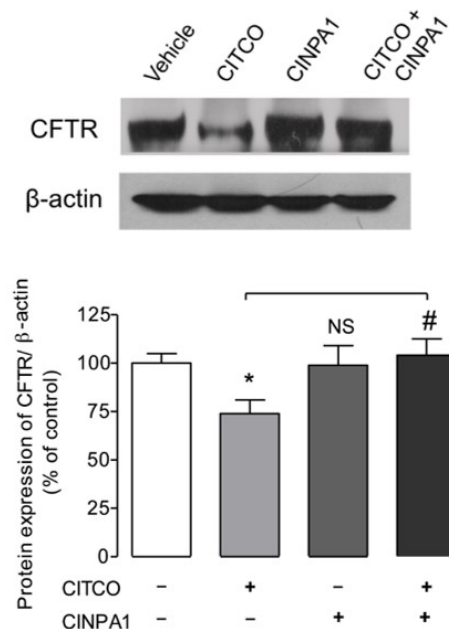
A.



B.



C.



รูปที่ 6. แสดงผลของสาร CAR antagonist ต่อการหลั่งไอออนที่เหนี่ยวนำโดย cAMP ใน T84 cells หลังจากถูกกระตุ้นด้วย CAR agonist

A). แสดง Representative tracing ของ short-circuit current เมื่อเหนี่ยวนำโดย forskolin หลังจากได้รับสาร CAR agonist และ/หรือ antagonist

B). แสดงผลของสาร CAR antagonist ต่อการหลั่งไอออนที่เหนี่ยวนำโดย cAMP ใน T84 cells หลังจากถูกกระตุ้นด้วย CAR agonist

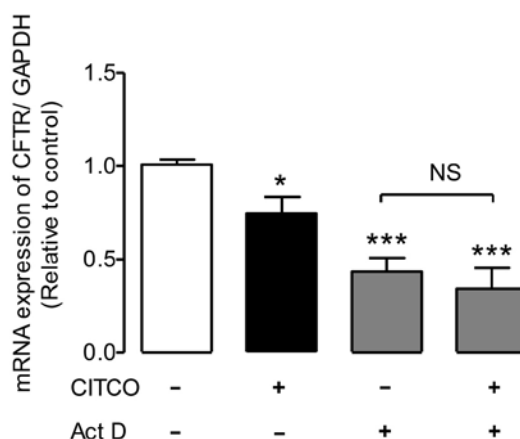
C). ผลของสาร CAR antagonist ต่อการแสดงออกของโปรตีน CFTR ใน T84 cells หลังจากถูกกระตุ้นด้วย CAR agonist

(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม control, NS = not significant และ # $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม CITCO ที่ความเข้มข้น 1 μM)

7. ศึกษาผลของการกระตุ้น CAR ต่อการแสดงออกของยีน CFTR ในขณะที่มีการยับยั้งการสร้าง mRNA ใน T84 cells

เนื่องจากการแสดงออกของโปรตีน CFTR มีกลไกที่ซับซ้อนและมีการควบคุมเป็นอย่างดี ซึ่งสามารถถูกควบคุมได้หลายระดับ เช่น ระดับ Transcription, Posttranscription, Translation และ Posttranslation เพื่อให้การทำงานของโปรตีน CFTR มีประสิทธิภาพ ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการศึกษาถึงบทบาทของ CAR ต่อการควบคุมการแสดงออกของโปรตีน CFTR ว่ามีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการ posttranscription ด้วยหรือไม่ ซึ่งจะทำการทดลองโดยใช้สาร actinomycin D เพื่อ inhibit RNA synthesis โดยใช้ทำการแบ่ง T84 cells ออกเป็น 4 กลุ่มดังนี้ 1) กลุ่ม control 2) กลุ่ม CAR agonist (CITCO) 3) กลุ่ม actinomycin D 4) กลุ่ม CITCO + actinomycin D และทำการวัดการแสดงออกของ CFTR mRNA และเปรียบเทียบความแตกต่าง

ระหว่างกลุ่ม control และ treatment ผลการทดลองนี้พบว่า CITCO หรือ actinomycin D มีผลลดการแสดงออกของโปรตีน CFTR ใน T84 cells แต่อย่างไรก็ตามการลดลงของ CFTR expression ในกลุ่ม CAR agonist + actinomycin D ไม่ได้เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่ม actinomycin D (รูปที่ 7.) จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการลดลงของการแสดงออกของยีน CFTR เมื่อมีการกระตุ้นนิวเคลียร์รีเซพเตอร์ชนิด CAR น่าจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการ transcriptional process

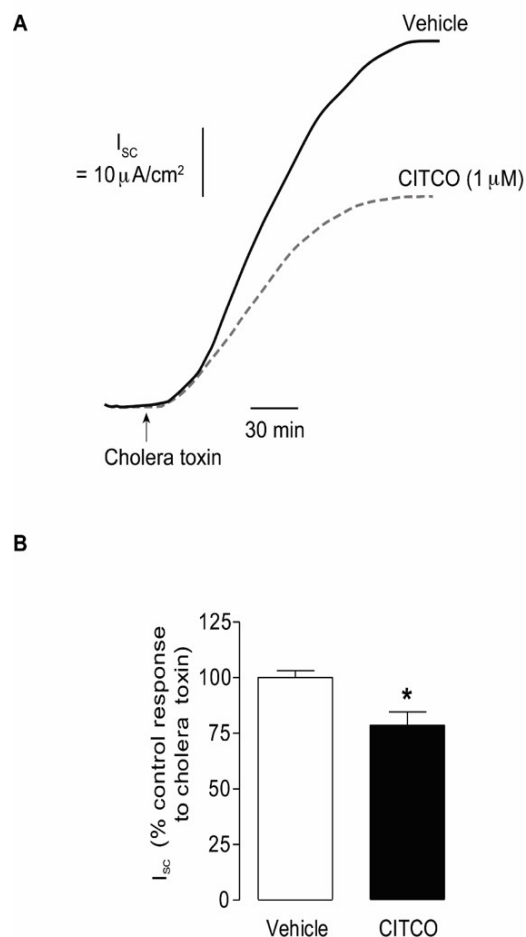


รูปที่ 7. แสดงผลของสารกระตุ้น CAR ต่อการแสดงออกของยีน CFTR ในขณะที่มีการยับยั้งการสร้าง mRNA ใน T84 cells

(* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม control, NS = not significant)

8. ศึกษาผลของสารกระตุ้น CAR ต่อการหลั่งคลอไรด์ที่เหนี่ยวนำโดย cholera toxin ใน T84 cells

เพื่อศึกษาถึงศักยภาพของ CAR ในการพัฒนาเป็นยารักษาอหิวาตกโรค ดังนั้นผู้วิจัยจึงศึกษาผลของสารกระตุ้น CAR ต่อการหลั่งคลอไรด์ที่เหนี่ยวนำโดย cholera toxin ใน T84 cells ซึ่งทำการทดลองโดยแบ่ง T84 cells ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ 1) กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารกระตุ้นใดๆ (control vehicle), 2) กลุ่มที่ได้รับสารกระตุ้น hCAR agonist (CITCO) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจากนั้น incubate ด้วย cholera toxin (CT 1 $\mu\text{g/ml}$) หลังจากนั้นทำการวัดหาปริมาณการขนส่งคลอไรด์ โดยการวัดค่า Short-circuit current (Isc) โดยวิธี Ussing Technique จากผลการทดลองพบว่า hCAR agonist (CITCO) ที่ความเข้มข้น 1 μM มีผลลดการหลั่งคลอไรด์ผ่านผนังลำไส้ใน T84 cells ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย cholera toxin อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 8.)



รูปที่ 8. แสดงผลของสารกระตุ้น CAR ต่อการหลั่งคลอไรด์ที่เหนี่ยวนำโดย cholera toxin ใน T84 cells

A). แสดง Representative tracing ของ short-circuit current เมื่อเหนี่ยวนำโดย cholera toxin หลังจากได้รับสาร hCAR agonist

B). แสดงผลของการกระตุ้น CAR ต่อการหลั่งไอออนที่เหนี่ยวนำโดย cholera toxin ใน T84 cells หลังจากถูกกระตุ้นด้วย hCAR agonist

(* $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม control)

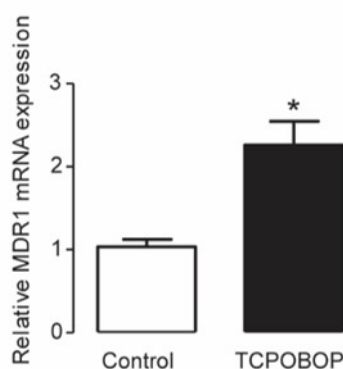
9. การศึกษาถึงผลของการกระตุ้น CAR ต่อการขนส่งคลอไรด์ในลำไส้ของหนูถีบจักร (intact mouse intestine)

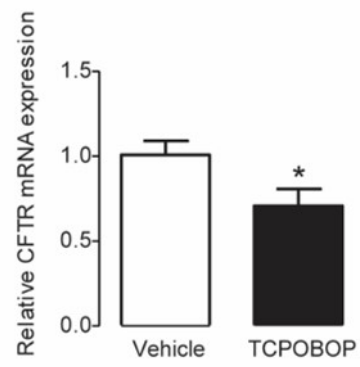
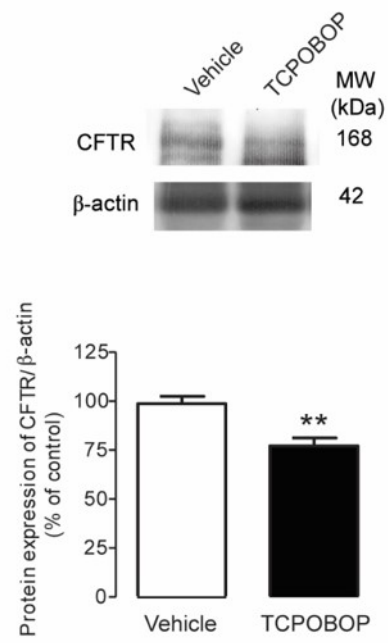
การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อให้แน่ใจว่าผลของ CAR ต่อการขนส่งคลอไรด์ที่เกิดขึ้นในเซลล์ T84 cells จะมีผลอย่างไรในสัตว์ทดลอง ซึ่งผู้วิจัยทำการศึกษาถึงบทบาทของ CAR ต่อการขนส่งคลอไรด์ใน *in vivo* study โดยการนำหนูถีบจักร (mice) แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ 1) กลุ่มที่ได้รับสาร vehicle (corn oil) เป็นเวลา 7 วัน, 2) กลุ่มที่ได้รับสาร mCAR agonist (TCPOBOP) 3 mg/kg เป็นเวลา 7 วัน โดยหนู mice จะถูกทำให้สลบด้วยการฉีดสาร zoletil (20 mg/kg) และ

xylazine (5 mg/kg) ทาง intraperitoneal หลังจากนั้นนำลำไส้ของหนู mice วัดปริมาณการแสดงออกของยีน MDR1 ซึ่งเป็น mCAR target gene โดยใช้เทคนิค real time PCR จากผลการทดลองพบว่า สาร TCPOBOP มีผลเพิ่มการแสดงออกของ MDR1 mRNA ในลำไส้ของหนู mice (รูปที่ 9A.) นอกจากนี้จากผลการทดลองโดยใช้เทคนิค real time PCR และ western blot analysis พบว่าสาร TCPOBOP มีผลลดการแสดงออกของยีนและโปรตีน CFTR ในลำไส้ของหนู mice อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 9B และ 9C.) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการกระตุ้นนิวเคลียร์รีเซพเตอร์ชนิด CAR สามารถลดการแสดงออกของ CFTR

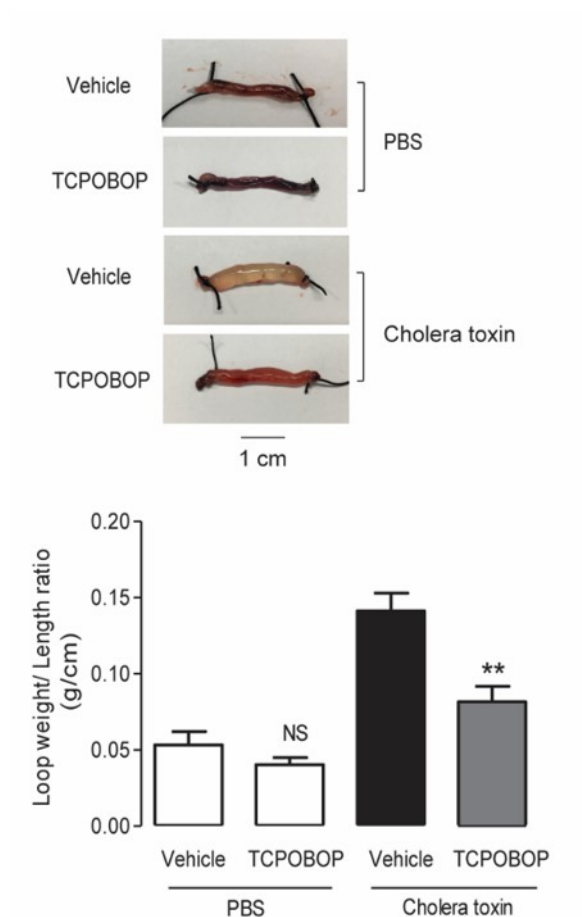
เพื่อศึกษาถึงศักยภาพในการพัฒนาเป็นยารักษาโรคท้องร่วงชนิด secretory diarrhea ดังนั้นผู้วิจัยจึงศึกษาผลของสารกระตุ้น CAR ในหนู mice ที่เหนี่ยวนำให้เป็นโรคท้องร่วงโดยการฉีด cholera toxin (CT) เพื่อเหนี่ยวนำให้เป็นอหิวาตกโรค โดยใช้ mouse closed-loop model ซึ่งทำการทดลองโดยแบ่งหนูถีบจักรออกเป็น 2 กลุ่ม คือ 1) กลุ่มที่ได้รับสาร vehicle (corn oil) เป็นเวลา 7 วัน, 2) กลุ่มที่ได้รับสาร mCAR agonist (TCPOBOP) 3 mg/kg เป็นเวลา 7 วัน โดยการฉีดเข้าทาง intraperitoneal หลังจากนั้นจะนำ intestinal closed loops มาฉีดสารละลาย PBS 100 μ l, หรือสารละลาย PBS ที่ประกอบด้วย cholera toxin (CT 1 μ g/loop) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเวลาที่มีการเกิด fluid accumulation ในลำไส้ หลังจากนั้นนำ intestinal loop มาวัดค่า loop weight per length ratio โดยการชั่งน้ำหนักเทียบกับขนาดของลำไส้ และทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยเปรียบเทียบข้อมูลระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารกระตุ้น CAR เทียบกับกลุ่ม control จากผลการทดลองพบว่าสาร TCPOBOP มีผลยับยั้งการเกิด fluid accumulation ในลำไส้ เมื่อถูกเหนี่ยวนำโดย cholera toxin ประมาณ ประมาณ 33% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามผลของสาร TCPOBOP ไม่มีผลต่อ fluid accumulation ในลำไส้หลังจากฉีดสารละลาย PBS (รูปที่ 9D.) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการกระตุ้นการทำงานของ CAR มีศักยภาพในการลดการหลั่งของสารน้ำในลำไส้ในโรคท้องร่วงชนิด secretory diarrhea

A.



B.**C.**

D.



รูปที่ 9. แสดงผลของการกระตุ้น CAR ต่อการขนส่งคลอไรด์ในลำไส้ของหนูถีบจักร (intact mouse intestine)

- A). ผลของสารกระตุ้น CAR (TCPOBOP) ต่อแสดงออกของยีน MDR1 ในลำไส้ของหนูถีบจักร
- B). ผลของสารกระตุ้น CAR (TCPOBOP) ต่อแสดงออกของยีน CFTR ในลำไส้ของหนูถีบจักร
- C). ผลของสารกระตุ้น CAR (TCPOBOP) ต่อแสดงออกของโปรตีน CFTR ในลำไส้ของหนูถีบจักร
- D). ผลของสารกระตุ้น CAR (TCPOBOP) ต่อการหลั่งของสารน้ำในลำไส้ของหนูถีบจักรที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย cholera toxin
- (* $p < 0.05$, ** $P < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม control, NS = not significant)

5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง และข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

โครงการงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาทบทวนของ PXR และ CAR ต่อการควบคุมการทำงานของโปรตีนขนส่งคลอไรด์ CFTR ในเซลล์ลำไส้ของมนุษย์ (T84 cells) และในลำไส้ของหนูถีบจักร ทั้งนี้เซลล์ T84 cells ได้ถูกนำมาใช้เป็นต้นแบบในการศึกษา ซึ่งพบว่าเซลล์นี้มีการแสดงออกของโปรตีน PXR และ CAR และเมื่อมีการกระตุ้น PXR โดย rifampicin และการกระตุ้น CAR โดย CITCO สามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน MDR1 ได้ เมื่อทำการศึกษาผลของของสารกระตุ้น PXR และ CAR ต่อการหลั่งไอออนที่เหนี่ยวนำโดย cAMP ใน T84 cells พบว่าเมื่อมีการกระตุ้น T84 cells เป็นเวลา 24 ชั่วโมงด้วยสาร PXR agonist (rifampicin และ SR12813) และ CAR agonist (CITCO และ phenytoin) มีผลลดการหลั่งไอออนใน T84 cells เมื่อถูกเหนี่ยวนำโดย forskolin ทั้งนี้การลดลงของการหลั่งคลอไรด์เมื่อได้รับสาร CAR agonist และ PXR agonist ไม่ได้เกิดจากความผิดปกติของสารดังกล่าวต่อเซลล์ T84 เนื่องจากสารทั้ง 2 ชนิดไม่มีผลต่อค่า cell viability และค่า transepithelial resistance (TER) ซึ่งผลของสารกระตุ้น CAR และ PXR จะพบที่ ณ เวลา 24 ชั่วโมงเป็นต้นไป แสดงให้เห็นว่าการออกฤทธิ์ของสารดังกล่าวน่าจะเกิดขึ้นแบบ long-term action

ผู้วิจัยยังศึกษาผลของสารกระตุ้น PXR และ CAR ต่อการหลั่งคลอไรด์โดยโปรตีนขนส่งคลอไรด์ที่อยู่ทางด้าน apical membrane ใน T84 cells ผลการทดลองพบว่าสารกระตุ้น PXR และ CAR มีผลลดการหลั่งคลอไรด์ผ่านผนังลำไส้ใน T84 cells โดยสามารถยับยั้ง cAMP-activated apical Cl^- current เมื่อถูกเหนี่ยวนำโดย CPT-cAMP (cell-permeable cAMP analog) หรือ genistein (direct CFTR activator) จากผลการทดลองเห็นได้ว่ากลไกการออกฤทธิ์ของสารกระตุ้น CAR มีเป้าหมายที่ apical cAMP-dependent Cl^- channels ทั้งนี้กลไกการทำงานของสารกระตุ้น CAR ในการลดการทำงานของโปรตีน CFTR อาจเกิดจากการลดการแสดงออกของยีนและโปรตีน หรืออาจจะเกิดจากการลดลงของการทำงานของโปรตีน CFTR ก็ได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการวัดการแสดงออกของยีนและโปรตีน CFTR ในเซลล์ T84 cells หลังจากได้รับสารกระตุ้น CAR ผลการทดลองพบว่าสารกระตุ้น CAR มีผลลดการแสดงออกของยีนและโปรตีน CFTR ในเซลล์ T84 และในลำไส้ของหนูถีบจักร ทั้งนี้ผลของสารกระตุ้น CAR สามารถถูกยับยั้งโดย CAR antagonist (CINPA1) ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่าการทำงานของโปรตีน CFTR ที่ลดลงหลังจากได้รับสาร CAR agonist เกิดจากการกระตุ้นการทำงานของ CAR ซึ่งกลไกการทำงานของ PXR และ CAR ในการลดการแสดงออกของยีน CFTR น่าจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการ transcriptional process ซึ่งงานวิจัยในอนาคตควรจะศึกษากลไกการทำงานของ CAR ในการควบคุมการทำงานของโปรตีน CFTR ในเชิงลึกต่อไป

เนื่องจาก CFTR เป็นโปรตีนที่เป็นช่องทางหลักในการหลั่งคลอไรด์ในโรคท้องร่วงชนิด secretory diarrhea ดังนั้นเพื่อศึกษาถึงศักยภาพของ CAR ในการพัฒนาเป็นยารักษาโรคท้องร่วง ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาสารกระตุ้น CAR ต่อการหลั่งคลอไรด์ที่เหนี่ยวนำโดย cholera toxin ใน T84 cells ผลการทดลองพบว่า CAR agonist มีผลลดการหลั่งคลอไรด์ผ่านผนังลำไส้ใน T84 cells ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย cholera toxin และจากการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่าเมื่อหนูถีบจักรได้รับสารกระตุ้น CAR สามารถยับยั้งการหลั่งสารน้ำในลำไส้ของหนูถีบจักรเมื่อถูกเหนี่ยวนำโดย cholera toxin อีก

ด้วย ซึ่งบ่งชี้ว่าการกระตุ้นการทำงานของ CAR มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยารักษาโรคท้องร่วงชนิด secretory diarrhea นอกจากนี้ยาบางชนิด เช่น phenobarbital, phenytoin, buprenorphine และ carbamazepine ซึ่งเป็น CAR ligands ยังมีรายงานว่าเมื่อใช้ยาเหล่านี้เป็นระยะเวลานานๆ จะมีผลข้างเคียงที่เกิดขึ้น เช่น อาการท้องผูก เป็นต้น ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าผลข้างเคียงดังกล่าว อาจเกิดจากการลดลงของการแสดงออกของโปรตีน CFTR เมื่อได้รับยา CAR activating drugs เป็นระยะเวลานาน

มีงานวิจัยพบว่าผู้ป่วยที่เป็นโรคลำไส้อักเสบชนิด ulcerative colitis จะมีอาการที่พบคือ อาการท้องเสีย ซึ่งกลไกของอาการท้องเสียในผู้ป่วยโรคนี้เกิดจากการมีการแสดงออกของโปรตีน CFTR ในลำไส้มากขึ้น ทำให้เกิดการหลั่งคลอไรด์และสารน้ำเข้าสู่โพรงลำไส้ และเมื่อไม่นานมานี้ยังมีการศึกษาวิจัยพบว่าผู้ป่วยโรคลำไส้อักเสบชนิด ulcerative colitis จะมีการแสดงออกของยีน CAR ที่ลดลง ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าการกระตุ้นการทำงานของ CAR ที่ลดลงในผู้ป่วยโรคนี้ ทำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน CFTR มากขึ้น ซึ่งเป็นกลไกที่ทำให้เกิดโรคท้องร่วงในผู้ป่วยที่เป็นโรคลำไส้อักเสบชนิด ulcerative colitis

ผลที่ได้จากโครงการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าการกระตุ้น CAR และ PXR มีผลลดการทำงานของโปรตีน CFTR ทำให้ลดการหลั่งคลอไรด์ในเซลล์ลำไส้ โดยกลไกเกิดจากการลดลงของการแสดงออกของยีนและโปรตีน CFTR ในเซลล์ T84 cells และในลำไส้ของหนูถีบจักร จากผลดังกล่าว อาจเป็นข้อมูลในการอธิบายถึงอาการท้องผูกซึ่งเป็น side effect ที่พบในผู้ป่วยที่ได้รับยาที่มีกลไกการออกฤทธิ์ผ่านทางการกระตุ้นการทำงานของ CAR เป็นระยะเวลานานๆ นอกจากนี้การกระตุ้นการทำงานของ CAR มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยาเพื่อลดการหลั่งของสารน้ำในลำไส้ในโรคท้องร่วงชนิด secretory diarrhea

6. ภาคผนวก

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่มที่ เลขที่ และหน้า) หรือผลงานตามที่คาดไว้ในสัญญาโครงการ

1.1 ผลงานวิจัยที่ได้รับการตอบรับให้ตีพิมพ์

Suticha Kittayaruksakul, Sutthipong Sawasvirojwong, Rattikarn Noitem,

Pawin Pongkorpsakol, Chatchai Muanprasat, Varanuj Chatsudthipong*

Activation of constitutive androstane receptor inhibits intestinal CFTR-mediated chloride transport. *Biomed Pharmacother* (2019). (impact factor 2018 = 3.457)

1.2 Manuscript

ผลงานวิจัยที่กำลังอยู่ในระหว่างการเตรียม manuscript เพื่อส่งตีพิมพ์ในวารสาร

วิชาการระดับนานาชาติ ซึ่งคาดว่าจะส่งผลงานตีพิมพ์ในวารสาร Biochemical Pharmacology (impact factor 2018 = 4.235)

Suticha Kittayaruksakul*, Sutthipong Sawasvirojwong, Rattikarn Noitem, Pawin Pongkorpsakol, Chatchai Muanprasat, Varanuj Chatsudthipong.

Pregnane x receptor downregulates CFTR-mediated chloride transport in the intestine

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- เชิงพาณิชย์ (มีการนำไปผลิต/ขาย/ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการนำไปประยุกต์ใช้โดยภาคธุรกิจ/บุคคลทั่วไป)

เนื่องจาก PXR และ CAR มีการค้นพบว่าเป็นโปรตีนเป้าหมายในการพัฒนายาสำหรับรักษาโรคต่างๆ ในผู้ป่วย เช่น โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน โรคเกี่ยวกับกระบวนการอักเสบ โรค metabolic syndrome และโรคตับ เป็นต้น การศึกษาวิจัยนี้ได้รับการตีพิมพ์ในวารสาร Biomedicine & Pharmacotherapy (2019) ซึ่งสามารถทำให้เกิดงานวิจัยต่อยอดในการพัฒนาสารที่สามารถกระตุ้น PXR และ CAR เป็นยาที่ใช้ในการรักษาโรคที่มีการทำงานของ CFTR มากเกินไป เช่น โรคท้องร่วงชนิด secretory diarrhea และ polycystic kidney disease เป็นต้น

- เชิงนโยบาย (มีการกำหนดนโยบายอิงงานวิจัย/เกิดมาตรการใหม่/เปลี่ยนแปลงระเบียบข้อบังคับหรือวิธีทำงาน)

ไม่มี

- เชิงสาธารณะ (มีเครือข่ายความร่วมมือ/สร้างกระแสความสนใจในวงกว้าง)

ยาที่ใช้ในการรักษาโรคต่างๆ ในปัจจุบัน จะมีกลไกการทำงานผ่านทางการกระตุ้นการทำงานของนิวเคลียร์รีเซพเตอร์ต่างๆ หลายชนิด เช่น PXR และ CAR ดังนั้นถ้าหาก PXR และ CAR มีผลต่อการขนส่งสารน้ำและเกลือแร่ในร่างกาย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง CFTR อาจจะเป็นประโยชน์สำหรับแพทย์ในการที่จะพิจารณาถึงข้อควรระวังในการให้ยาที่มีกลไกกระตุ้นการทำงานของนิวเคลียร์รีเซพเตอร์ชนิด PXR และ CAR แก่ผู้ป่วย เป็นต้น

- เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)

การศึกษานี้ก่อให้เกิดองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับบทบาทของนิวเคลียร์รีเซพเตอร์คือ PXR และ CAR ในการควบคุมโปรตีน CFTR ซึ่งมีผลต่อการหลั่งคลอไรด์และสารน้ำในร่างกาย ซึ่งผู้วิจัยจะนำไปถ่ายทอดองค์ความรู้ให้กับนักศึกษาแพทย์หรือนักศึกษา

วิทยาศาสตร์สุขภาพ คณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล ในหัวข้อสรีรวิทยาระบบทางเดินอาหาร

3. อื่นๆ (เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ หนังสือ การจดสิทธิบัตร)
- ไม่มี