STUDIES ON THE INTESTINAL HANDLING OF BILE ACIDS: EFFECTS OF CHOLERETIC HYDROXYACETOPHENONES ON ILEAL BILE ACID ABSORPTION AND THE MECHANISMS OF BILE ACID-INDUCED COLONIC CHLORIDE SECRETION

JAINUCH KANCHANAPOO

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(PHYSIOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2005

ISBN 974-04-6325-8
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การศึกษาบทบาทของลำไส้ต่อกรดน้ำดี: ผลของสารกระตุ้นการหลั่งน้ำดีไฮดรอกซีอะเซโตฟีโนนต่อการดูดซึมกรดน้ำดีในลำไส้เล็กส่วนปลาย และกลไกการกระตุ้นการหลั่งคลอไรด์ด้วยกรดน้ำดีในลำไส้ใหญ่ (STUDIES ON THE INTESTINAL HANDLING OF BILE ACIDS: EFFECTS OF CHOLERETIC HYDROXYACETOPHENONES ON ILEAL BILE ACID ABSORPTION AND THE MECHANISMS OF BILE ACID-INDUCED COLONIC CHLORIDE SECRETION.)

ใจนุช กาญจนภู SCPS 4236803/D

ปร.ด. (สรีรวิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ภาวิณี ปิยะจตุรวัฒน์, ปร.ด., Mrinalini C. Rao, Ph.D., ชัยวัฒน์ ต่อสกุลแก้ว, ปร.ด., วิสุดา สุวิทยาวัฒน์, Ph.D.

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาบทบาทของลำไส้ต่อกรดน้ำดีโดยแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกเป็นการศึกษาผลของสารที่มีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดีและลดไขมัน 2,4,6-trihydroxyacetophenone หรือ THA และ 2,6-dihydroxyacetophenone หรือ DHA ต่อการดูดซึมกรดน้ำดีในลำไส้เล็กส่วนปลายในหนูพุกขาว ผลการทดลองพบว่า THA ยับยั้งการขนส่งกรดน้ำดีผ่านเข้าถุงของ brush border membrane ของลำไส้เล็กส่วนปลายได้ร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 0.5 mM โดยการยับยั้งเป็นแบบแข่งขันกับกรดน้ำดี (competitive) ขณะที่ DHA สามารถยับยั้งการขนส่งของกรดน้ำดีได้อย่างสมบูรณ์ โดยความเข้มข้นที่ให้การยับยั้งได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) คือ 1.58 mM และเป็นการยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (non-competitive) นอกจากนี้ THA และ DHA ยังยับยั้งการทำงานของ Na^+-K^+-ATPase ในลำไส้เล็กส่วนปลายโดยเป็นแบบ uncompetitive มีค่าคงที่การยับยั้ง (K_i) ของ THA เป็น 10.1 mM และของ DHA เป็น 5.0 mM การป้อนสาร THA และ DHA (400 μmol/kg วันละ 2 ครั้ง) แก่หนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีภาวะโคเลสเตอรอลในเลือดสูง สามารถลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือดโดยคิดเป็นประมาณร้อยละ 60 ของหนูกลุ่มควบคุม และยังพบว่าหนูที่ได้รับสาร THA จะมีการขนส่งกรดน้ำดีผ่านถุงของลำไส้เล็กส่วนปลายลดลง ขณะที่การทำงานของ Na^+-K^+-ATPase ไม่เปลี่ยนแปลง สรุปได้ว่า การยับยั้งการขนส่งกรดน้ำดีผ่าน brush border membrane และการทำงานของ Na^+-K^+-ATPase ที่ basolateral membrane อาจจะเป็นกลไกหนึ่งที่สำคัญในการลดระดับโคเลสเตอรอลของสารไฮดรอกซีอะเซโตฟีโนน เนื่องจากภาวะที่มีการดูดซึมกรดน้ำดีในลำไส้ลดลงจะทำให้มีปริมาณกรดน้ำดีเกินในลำไส้ใหญ่และส่งผลทำให้เกิดอาการท้องเสียได้ ดังนั้น การวิจัยในส่วนที่ 2 จะทำการศึกษากลไกของกรดน้ำดีในการกระตุ้นการหลั่งคลอไรด์ในลำไส้ใหญ่ของกระต่าย กรดน้ำดีชนิด taurodeoxycholic acid (TDC) สามารถกระตุ้นการขนส่งคลอไรด์ได้ในเซลล์ลำไส้ของกระต่ายที่โตเต็มวัยเป็นผู้ใหญ่แต่จะไม่พบการกระตุ้นนี้ในเซลล์ของกระต่ายวัยเด็ก ขณะที่ตัวกระตุ้น Protein kinase C (PKC) หรือ phorbol dibutyrate (PDBu) สามารถกระตุ้นการขนส่งคลอไรด์ได้ทั้งในผู้ใหญ่และเด็ก การศึกษาเพื่อหากลไกการกระตุ้นการหลั่งคลอไรด์ว่าผ่าน PKC หรือไม่ จะทำโดยการใช้สารยับยั้ง PKC โดยพบว่า chelerythrine และ Go-6983 สามารถยับยั้งการกระตุ้นการขนส่งคลอไรด์ด้วยกรดน้ำดีได้ในลำไส้กระต่ายวัยผู้ใหญ่ ขณะที่สารยับยั้ง PKC ชนิด conventional (Go-6976) สามารถยับยั้งการกระตุ้นคลอไรด์ของ PDBu แต่ไม่มีผลต่อการกระตุ้นด้วย TDC อย่างไรก็ตามสารยับยั้ง PKC ที่ยับยั้งได้ทั้งชนิด conventional และ novel (Go-6850) และสารยับยั้ง PKC ชนิด novel ชนิดย่อยเดลตา (rottlerin) สามารถยับยั้งการกระตุ้นคลอไรด์ด้วยตัวกระตุ้นทั้งสอง ส่วนผลในเซลล์ลำไส้ใหญ่ของกระต่ายวัยเด็กพบว่า Go-6976 ยับยั้งการกระตุ้นคลอไรด์ด้วย PDBu ได้ ขณะที่ rottlerin ไม่มีผล นอกจากนี้ rottlerin ยังมีผลยับยั้งการกระตุ้นการหลั่งคลอไรด์ด้วย TDC ใน intact epithelia เป็นการยืนยันว่ากรดน้ำดีกระตุ้นการหลั่งคลอไรด์ในลำไส้ใหญ่โดยทำงานผ่าน PKC ชนิดเดลตา การศึกษาระดับโปรตีนพบว่า PKC ชนิดเดลตา จะปรากฏเฉพาะในลำไส้ใหญ่ของกระต่ายในวัยผู้ใหญ่ แต่จะพบน้อยมากในวัยเด็กและวัยแรกเกิด ดังนั้น การที่กรดน้ำดีไม่สามารถกระตุ้นการหลั่งคลอไรด์ในเด็กได้เนื่องจากลำไส้ใหญ่ของเด็กยังไม่มีพัฒนาการในการสร้าง PKC ชนิดเดลตาและพัฒนาการที่ยังไม่สมบูรณ์นี้น่าจะเป็นกลไกสำคัญในการปกป้องร่างกายของสัตว์วัยเด็กจากการถูกกระตุ้นด้วยกรดน้ำดี ช่วยป้องกันการสูญเสียน้ำและเกลือแร่ซึ่งเป็นอันตรายต่อสัตว์วัยเด็ก

193 หน้า ISBN: 974-04-6325-8.

STUDIES ON THE INTESTINAL HANDLING OF BILE ACIDS: EFFECTS OF CHOLERETIC HYDROXYACETOPHENONES ON ILEAL BILE ACID ABSORPTION AND THE MECHANISMS OF BILE ACID-INDUCED COLONIC CHLORIDE SECRETION.

JAINUCH KANCHANAPOO 4236803 SCPS/D

Ph.D. (PHYSIOLOGY)

THESIS ADVISORS: PAWINEE PIYACHATURAWAT, Ph.D., MRINALINI C. RAO, Ph.D. , CHAIVAT TOSKULKAO, Ph.D., WISUDA SUVITAYAVAT, Ph.D.

ABSTRACT

Two aspects of the intestinal handling of bile acids were investigated. First, the effects on ileal bile acid absorption of 2,4,6-trihydroxyacetophenone (THA), and its analog, 2,6-dihydroxyacetophenone (DHA), the choleretic and lowering plasma cholesterol agents, were investigated in rats. THA inhibited taurocholate (TC) uptake into ileal brush border membrane vesicle (BBMV), showing maximum inhibition approximately 50% of the control at a concentration ≥ 0.5 mM. In contrast, DHA completely inhibited TC uptake into ileal BBMV with IC_{50} values of 1.58 mM. THA exhibited competitive inhibition, while DHA showed non-competitive inhibition. Furthermore, THA and DHA uncompetitively inhibited both total and ouabain-sensitive basolateral membrane (BLM) Na^+-K^+-ATPase activity with a K_i of 10.10 mM and 5.01 mM, respectively. Treatment of hypercholesterolemic rats with THA or DHA (400 μmol/kg twice a day) for 3 weeks, effectively reduced plasma cholesterol to 60.4% and 58.9% of the corresponding control, respectively. The THA-treated rats showed a reduction of the ileal bile acid transport activity, but neither THA nor DHA-treated rats showed significant changes in Na^+-K^+-ATPase activity. The results suggest that THA and DHA inhibit two essential components of bile acid absorption; the BBM uptake and the BLM driving force, which may, in part, account for the cholesterol lowering actions of hydroxyacetophenones. Bile acid malabsorption in the ileum can result in excessive excretion of bile acid into the colon leading to deleterious effects, including diarrhea. The second part of the study was to evaluate the signaling mechanisms by which bile acids stimulate Cl^- secretion using the rabbit colon as a model. Cl^- transport was measured in rabbit distal colonocytes using the Cl^- sensitive probe MQAE. Taurodeoxycholic acid (TDC) (50μM), a secondary bile acid, stimulated Cl^- transport only in adult (AD), but not in weanling (WN) rabbit distal colon. The roles of protein kinase C (PKC) isoforms in TDC action were evaluated using various PKC inhibitors and phorbol dibutyrate (PDBu), a PKC activator, as a positive control. Unlike TDC, PDBu stimulated colonic Cl^- transport in all ages. Pan PKC inhibitors chelerythrine and Gö 6983 completely blocked TDC's effects, suggesting a role for PKC in TDC action. In AD colon, the conventional PKC inhibitor Gö-6976 inhibited PDBu, but not TDC action. Gö-6850, a conventional and novel PKC inhibitor, and rottlerin, a novel PKC-δ inhibitor blocked TDC and PDBu -stimulated Cl^- transport. In contrast, in WN distal colon, only Gö-6976 but not rottlerin inhibited PDBu-stimulated Cl^- transport. The effects of rottlerin on AD colon were confirmed in Ussing chambers, where it decreased TDC-stimulated short circuit current, a measure of Cl^- secretion. Immunoblotting revealed that PKCδ was expressed in AD but not in WN or NB. The result suggested that TDC acts via PKCδ whereas PDBu acts via conventional PKCs and PKCδ in the stimulation of colonic Cl^- secretion, and that the age-dependent effect of TDC is due to the inability of the WN colon to express PKCδ. Thus, the delays in an expression of PKCδ protein plays a critical step in the protective mechanism against potentially deleterious luminal levels of bile acids in the developing colon.

KEY WORDS: BILE ACID TRANSPORT/ CHLORIDE SECRETION/ CHOLESTEROL/ HYDROXYACETOPHENONES/ NA^+-K^+-ATPASE/ PROTEIN KINASE C/ TAURODEOXYCHOLIC ACID

193 P. ISBN: 974-04-6325-8.