

**INVESTIGATION OF THE ACUTE EFFECTS OF PROLACTIN  
ON THE ION TRANSPORT PROPERTIES  
OF THE COLONIC EPITHELIUM**

**SUPAPORN PUNTHEERANURAK**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF  
THE REQUIREMENTS FOR  
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY  
(PHYSIOLOGY)  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY  
2007**

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

การศึกษาผลเฉียบพลันและกลไกการออกฤทธิ์ของฮอร์โมนโพรแลคตินต่อคุณสมบัติในการขนส่งไอออนผ่านเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ใหญ่  
(INVESTIGATION OF THE ACUTE EFFECTS OF PROLACTIN ON THE ION TRANSPORT PROPERTIES OF THE COLONIC EPITHELIUM)

สุภาพร พันธุ์ธีรานุกฤษ 4537340 SCPS/D  
ปร.ด. (สรีรวิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: นทีทิพย์ กฤษณามระ, ปร.ด., เลียงชัย ลีมลือม่วงส์, Ph.D.,  
ชัยวัฒน์ ต่อสกุลแก้ว, ปร.ด., ฉัตรศรี เศรษฐปัญญา, Ph.D.

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลเฉียบพลันและกลไกการออกฤทธิ์ของฮอร์โมนโพรแลคตินต่อการดูดซึมและการหลั่งของไอออนผ่านเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ใหญ่ โดยใช้อุปกรณ์อุทซึ่งชนิดเล็กที่มีช่องเปิดเข้าและออกให้สารละลายไหลผ่านได้ต่อเนื่องเพื่อศึกษาการขนส่งไอออนผ่านเซลล์เยื่อบุ อีกทั้งยังใช้เทคนิคการถ่ายภาพแบบเรืองแสงเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับแคลเซียมภายในเซลล์

จากการวิเคราะห์ด้วยปฏิกิริยาเพิ่มสารทางพันธุกรรมด้วยเอนไซม์โพลีเมอเรส พบช่องขนส่งคลอไรด์ชนิดที่ต้องกระตุ้นด้วยแคลเซียมชื่อเบสโทรฟิน และช่องขนส่งโปแตสเซียมชนิดที่ต้องกระตุ้นด้วยแคลเซียมชื่อบีเคบนเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ใหญ่ สารคาบาคอลซึ่งมีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำและไอออนโดยผ่านตัวรับชนิดโมลิเนอจิกมีผลกระตุ้นการหลั่งคลอไรด์ในลำไส้ใหญ่ส่วนต้น ผลดังกล่าวถูกยับยั้งได้ด้วยตัวยับยั้งชื่อ ดิจิตและ เอ็นเอฟเอเมื่อให้สารนี้ทางด้านโพรงลำไส้ ซึ่งออกฤทธิ์จำเพาะเจาะจงที่ช่องขนส่งคลอไรด์ชนิดที่ต้องกระตุ้นด้วยแคลเซียม และยังถูกยับยั้งด้วยสารชื่อ แทรม-34 และเพคซิลิน เมื่อให้สารนี้ทางด้านเลือด ซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้งจำเพาะเจาะจงที่ช่องขนส่งโปแตสเซียมชนิดที่ต้องกระตุ้นด้วยแคลเซียมชนิดยอมให้อิออนผ่านได้ปานกลางและชนิดยอมให้อิออนผ่านได้มากตามลำดับ จากผลนี้แสดงว่าคาบาคอลกระตุ้นการหลั่งคลอไรด์เข้าสู่โพรงลำไส้ใหญ่ โดยให้คลอไรด์ผ่านทางช่องขนส่งคลอไรด์ชนิดที่ต้องกระตุ้นด้วยแคลเซียมที่อยู่บนผนังด้านโพรงลำไส้ และมีแรงขับจากการหมุนเวียนโปแตสเซียมระหว่างเซลล์กับด้านเลือดผ่านทางช่องขนส่งโปแตสเซียมชนิดที่ต้องกระตุ้นด้วยแคลเซียมแบบยอมให้อิออนผ่านได้มากและชนิดผ่านได้ปานกลาง ส่วนผลการศึกษาในลำไส้ใหญ่ส่วนปลายพบว่าเอทีพี, ไอโอโนไมซิน และคาบาคอล กระตุ้นการหลั่งโปแตสเซียมเข้าสู่โพรงลำไส้ผ่านทางช่องขนส่งโปแตสเซียมชนิดที่ต้องกระตุ้นด้วยแคลเซียมแบบยอมให้อิออนผ่านได้มากที่อยู่บนผนังด้านโพรงลำไส้

จากการศึกษายังพบอีกว่า โพรแลคตินที่ความเข้มข้น 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีผลต่อการดูดซึมโซเดียมผ่านทางช่องขนส่งโซเดียมชนิดที่ยับยั้งได้ด้วยสารอะมิโลไลด์ และไม่มีผลต่อการขนส่งคลอไรด์ชนิดที่ต้องกระตุ้นด้วยโซเดียมชื่อเอเอ็มพี แต่พบว่าโพรแลคตินสามารถลดการขนส่งโปแตสเซียมและคลอไรด์ที่ถูกกระตุ้นด้วยคาบาคอล โดยออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของช่องขนส่งโปแตสเซียมชนิดที่ต้องกระตุ้นด้วยแคลเซียมแบบยอมให้อิออนผ่านได้มากและชนิดผ่านได้ปานกลางซึ่งปกติมีหน้าที่หมุนเวียนโปแตสเซียมทางด้านเลือดเพื่อเป็นแรงขับของการหลั่งคลอไรด์ โดยโพรแลคตินมีกลไกการออกฤทธิ์ผ่านทางเอนไซม์ฟิไอที-3-ไคนาส, เอ็มเอพี-ไคนาส และแคลเซียม นอกจากนี้ยังพบอีกว่าโพรแลคตินมีผลลดการเพิ่มขึ้นของแคลเซียมภายในเซลล์เยื่อบุส่วนคริปต์ของผนังลำไส้ใหญ่จากการกระตุ้นด้วยคาบาคอล โดยมีผลลดการเพิ่มแคลเซียมทั้งจากการปลดปล่อยจากแหล่งเก็บภายในเซลล์และที่มาจากภายนอก

ดังนั้นสรุปว่าโพรแลคตินมีผลยับยั้งอย่างเฉียบพลันต่อการหลั่งโปแตสเซียมและคลอไรด์ที่ต้องกระตุ้นด้วย คาบาคอล โดยมีกลไกการออกฤทธิ์ผ่านทางเอนไซม์ฟิไอที-3-ไคนาส, เอ็มเอพี-ไคนาส และแคลเซียม

**INVESTIGATION OF THE ACUTE EFFECTS OF PROLACTIN ON THE ION TRANSPORT PROPERTIES OF THE COLONIC EPITHELIUM**

SUPPORN PUNTHEERANURAK 4537340 SCPS/D

Ph.D. (PHYSIOLOGY)

THESIS ADVISORS: NATEETIP KRISHNAMRA, Ph.D. (PHYSIOLOGY), LIANGCHAI LIMLOMWONGSE, Ph.D. (PHYSIOLOGY), CHAIVAT TOSKULKAO, Ph.D. (PHYSIOLOGY), CHATSRI DECHAPUNYA, Ph.D. (PHYSIOLOGY).

**ABSTRACT**

The purposes of this study were to investigate the acute effect of prolactin (PRL) and its intracellular signaling transduction pathway on the absorptive and secretory functions of the colonic epithelium. The action of PRL on ionic transport was studied by using the continuously perfused micro-Ussing chamber technique. Changes in the intracellular calcium were measured by the fluorescence imaging technique.

The  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{Cl}^-$  channels, bestrophin-1, and the large conductance (BK)  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^+$  channels mRNA were demonstrated here by RT-PCR analyses in both proximal and distal colonic epithelia. In the proximal colon, carbachol (CCh), a cholinergic  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent secretagogue, stimulated  $\text{Cl}^-$  secretion which was sensitive to luminal DIDS and NFA, the inhibitors of the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{Cl}^-$  channels. The CCh-induced  $\text{Cl}^-$  secretion also decreased in the presence of basolateral TRAM-34, the inhibitor of the intermediate conductance (IK)  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^+$  channel, and paxillin, the inhibitor of the BK channel, indicating that CCh induced  $\text{Cl}^-$  secretion by activating the luminal  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{Cl}^-$  channels as the exit and basolateral IK and BK channels as  $\text{K}^+$  recycling to drive  $\text{Cl}^-$  secretion. In the distal colon, ATP, ionomycin ( $\text{Ca}^{2+}$ -ionophore) and CCh stimulated  $\text{K}^+$  secretion that was nearly abolished by luminal paxillin, suggesting that  $\text{K}^+$  exited via luminal BK channels.

PRL (200 ng/ml) had no acute effect either on the absorptive function, i.e., the amiloride-sensitive  $\text{Na}^+$  absorption or the cAMP-dependent CFTR  $\text{Cl}^-$  secretion. On the other hand, PRL reduced the CCh-stimulated KCl secretion by attenuating  $\text{K}^+$  recycling that serves as a driving force for  $\text{Cl}^-$  secretion in the proximal colon via basolateral IK and BK channels, and by inhibiting luminal BK channels which are the exit of  $\text{K}^+$  secretion in the distal colon. In both the proximal and distal colon, the acute inhibitory actions of PRL were abolished by inhibiting PI-3 kinase with wortmannin, MAP-kinases with SB203580 or U0126, and by reducing the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  with BAPTA-AM. PRL also reduced the CCh-induced increase in the intracellular calcium of the colonic crypt cells by suppressing both the release of internal stored calcium and calcium influx.

In conclusion, the acute inhibitory actions of PRL on CCh-stimulated KCl secretion in the proximal and distal colon were mediated via the PI-3 kinase, the MAP-kinases either p38 MAP-kinase or p42/44 MAP-kinase, and the intracellular calcium.

**KEY WORDS: PROLACTIN/COLON / IONIC TRANSPORT /BK CHANNELS /  $\text{Ca}^{2+}$ -DEPENDENT  $\text{Cl}^-$  CHANNELS / SIGNALING PATHWAYS**

165 pp.