รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาฤทธิ์ของสารอนุพันธ์ชาลโคนในการยับยั้งการเติบโตของซีสต์ในเซลล์โมเดลโรคถุงน้ำในไต

Effect of chalcone derivatives on cyst enlargement in an *in vitro* model of polycystic kidney disease

เชาวลิต ยั่วจิตร
พีระฉัตร วีรพันธ์
วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงบประมาณแผ่นดิน
ประจำปีงบประมาณ 2562

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย ม.อบ. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยเรื่องการศึกษาฤทธิ์ของสารอนุพันธ์ชาลโคนในการยับยั้งการเติบโตของซีสต์ในเซลล์โมเดลโรคถุงน้ำในไต ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากโครงการยกระดับสมรรถนะนักวิจัยไทยฯ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ทางคณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ผู้บริหาร คณาจารย์ บุคลากร สังกัดวิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี เป็นอย่างสูงที่ให้การสนับสนุน ช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ เอื้อเฟื้อสถานที่และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง จนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงได้ ขอขอบคุณสำนักงานส่งเสริมบริหารงานวิจัย บริการวิชาการและทำนุบำรุงศิลปวัฒนธรรม มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ให้คำแนะนำด้วยดีมาโดยตลอด และท้ายสุดนี้ขอขอบคุณสำนักงบประมาณแผ่นดินและมหาวิทยาลัยอุบลราชธานีที่สนับสนุนทุนวิจัย ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

คณะผู้วิจัย

บทสรุปผู้บริหาร

การวิจัยเรื่องการศึกษาฤทธิ์ของสารอนุพันธ์ชาลโคนในการยับยั้งการเติบโตของซีสต์ในเซลล์โมเดลโรคถุงน้ำในไต เป็นการวิจัยเพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารอนุพันธ์ชาลโคน ซึ่งเป็นสารในกลุ่มของฟลาโวนอย มีฤทธิ์ทางชีววิทยามากมาย จากผลการทดลองพบว่าสารอนุพันธ์ชาลโคน (CHAL-005) สามารถชะลอการเติบโตของซีสต์จากเซลล์ MDCK เมื่อเลี้ยงในคอลลาเจนเจล และยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน CFTR และ ERK1/2 การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าสารอนุพันธ์ชาลโคน มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยารักษาโรคถุงน้ำในไต ทั้งนี้ต้องขอขอบคุณคณะผู้วิจัยทุกท่านที่มุ่งมั่นในการทำวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ซึ่งงานส่งเสริมวิจัย บริการวิชาการฯ วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี จะได้นำผลการวิจัยนี้ไปเผยแพร่และประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด ท้ายสุดนี้ขอขอบคุณสำนักงบประมาณแผ่นดินและมหาวิทยาลัยอุบลราชธานีที่สนับสนุนทุนวิจัย ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 ผู้บริหารและคณะผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

บทคัดย่อ

โรคถุงน้ำในไตชนิดพันธุกรรมเด่น (autosomal dominant polycystic kidney disease, ADPKD) เป็นโรคทางพันธุกรรมของระบบไตที่พบบ่อย มีสาเหตุจากการผ่าเหล่าของยีน *PKD1* หรือ *PKD2* การเติบโตของซีสต์ในไตเกิดจากกระบวนการแบ่งเซลล์ซีสต์ใหม่และการหลั่งสารน้ำลงสู่ถุงซีสต์ ส่งผลให้ซีสต์กดเบียดเนื้อไตและทำให้เกิดภาวะไตวายเรื้อรังในที่สุด ปัจจุบันยังไม่มีการรักษาโรคถุงน้ำในไตที่มีความจำเพาะต่อโรค สารอนุพันธ์ชาลโคน (chalcone isoliquiritigenin) มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามากมาย อาทิ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านจุลชีพ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านโรคมะเร็ง จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสารอนุพันธ์ชาลโคลสามารถชะลอการเติบโตของซีสต์จากเซลล์ MDCK ได้ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารอนุพันธ์ชาลโคนต่อการชะลอการเติบโตของซีสต์จากเซลล์ MDCK จากผลการทดลองพบว่าสาร CHAL-005 เป็นสารอนุพันธ์ชาลโคนที่ดีที่สุดที่ชะลอการเติบโตของซีสต์จากเซลล์ MDCK ตามการเพิ่มความเข้มข้นของสาร โดยสาร CHAL-005 สามารถลดลดการแสดงออกของโปรตีน CFTR และยังสามารถลดการแสดงออกของโปรตีนที่กระตุ้นการแบ่งเซลล์ใหม่อย่าง phosphorylation ERK1/2 และ phosphorylation S6K ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลของการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารอนุพันธ์ชาลโคนชะลอการเติบโตของซีสต์ในเซลล์ MDCK ผ่านการลดการทำงานของโปรตีนขนส่งคลอไรด์ CFTR และยังยับยั้งโปรตีนแบ่งเซลล์ใหม่ ERK1/2 และ mTOR/S6K ดังนั้นสารอนุพันธ์ชาลโคนจึงถือเป็นสารสมุนไพรที่มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยารักษาโรคถุงน้ำในไตได้

คำสำคัญ: สารอนุพันธ์ชาลโคน, โรคถุงน้ำในไต, การเติบโตของซีสต์ในเซลล์โมเดลโรคถุงน้ำ MDCK, โปรตีน CFTR, โปรตีน ERK1/2

Abstract

Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) is the most common inherited renal disorder caused by mutations of either *PKD1* or *PKD2* gene. Bilateral fluid filled-cyst is associated with abnormal epithelial cell proliferation and transepithelial fluid secretion. The progressive cyst enlargement could lead to end-stage renal disease and no specific intervention is currently available. A chalcone derivative, chalcone isoliquiritigenin (ISLQ), had various pharmacological properties such as anti-inflammatory, antimicrobial, antioxidant, and anticancer activities. Previously, it was found that ISLQ slows MDCK cyst growth. The present study was aimed to determine an inhibitory effect and detailed mechanism of chalcone derivatives on MDCK cyst progression. Among 5 compounds of chalcone derivatives tested, CHAL-005 (100 μM) was found to be the most potent for inhibiting MDCK cyst growth in a dose-dependent manner without cytotoxicity. CHAL-005 inhibited CFTR protein expression in MDCK cell. CHAL-005 strongly reduced phosphorylation ERK1/2 and phosphorylation S6 kinase in MDCK cell. Taken together, these findings suggested that CHAL-005 slows MDCK cyst progression by inhibiting CFTR expression and by reducing ERK1/2 and mTOR/S6K signaling pathways. Therefore, a chalcone derivative could represent as a promising natural plant-based drug candidate for the treatment of polycystic kidney disease.

Keywords: chalcone derivative, ADPKD, MDCK cyst enlargement, CFTR, ERK1/2

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	3
บทสรุปผู้บริหาร	4
บทคัดย่อ	5
Abstract	6
สารบัญ	7
สารบัญภาพ	8
บทนำ	9-11
ทบทวนวรรณกรรม	12-15
วิธีดำเนินการวิจัย	16-18
ผลการวิจัย	19-25
อภิปรายผลการทดลอง	26-27
สรุปและข้อเสนอแนะ	28
เอกสารอ้างอิง	29-33
ภาคผนวก	3 4 -6 8

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 ผลของสารอนุพันธ์ชาลโคนต่อการเติบโตของซีสต์จากเซลล์ MDCK (รูปซีสต์) 18

รูปที่ 2 กราฟผลของสารอนุพันธ์ชาลโคนต่อการเติบโตของซีสต์จากเซลล์ MDCK 19

รูปที่ 3 กราฟผลของสาร CHAL-005 ตามความเข้มข้นต่อการเติบโตของซีสต์
จากเซลล์ MDCK 20

รูปที่ 4 ผลของสารอนุพันธ์ CHAL-005 ต่อการยับยั้งการแสดงออกของ
โปรตีนขนส่งคลอไรด์ CFTR ในเซลล์ MDCK 21

รูปที่ 5 ผลของสารอนุพันธ์ CHAL-005 ต่อการยับยั้งการแสดงออกของ
โปรตีนที่กระตุ้นการแบ่งเซลล์ซีสต์ใหม่ phosphorylation of ERK1/2 ในเซลล์ MDCK 23

รูปที่ 6 ผลของสารอนุพันธ์ CHAL-005 ต่อการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน
ที่กระตุ้นการแบ่งเซลล์ซีสต์ใหม่ phosphorylation of S6K ในเซลล์ MDCK 24

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โรคถุงน้ำในไต (autosomal-dominant polycystic kidney disease, ADPKD) เป็นโรคทางพันธุกรรมที่ถ่ายทอดผ่านยีนเด่น ส่วนใหญ่พบมากในประชากรในทวีปยุโรปและอเมริกา อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าผู้ป่วยโรคถุงน้ำในไตพบบ่อยขึ้นในประเทศไทย โรคถุงน้ำในไตมีสาเหตุจากการผ่าเหล่าของยีน *PKD1* และ *PKD2* ที่ควบคุมการแสดงออกของโปรตีน polycystin 1 (PC1) และ polycystin 2 (PC2) ตามลำดับ [1] ส่งผลทำให้ปริมาณแคลเซียมภายในเซลล์หลอดไตลดลงและนำไปสู่การเพิ่มขึ้นของปริมาณของ cAMP และถือเป็นปัจจัยหลักในการกระตุ้นการเกิดพยาธิสรีรวิทยาของโรคถุงน้ำในไตในการสร้างเซลล์ซีสต์ใหม่ (cell proliferation) ที่บริเวณหลอดไตผ่อยส่วนต่างๆ หลายการศึกษาพบว่าเกิดจากการกระตุ้นการทำงานของโปรตีน MAPK/ERK pathway ที่ถูกกระตุ้นโดยสาร cAMP ในเซลล์ท่อไต [2, 3] นอกจากนี้ยังมีอีกหลายกลไกที่สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ซีสต์ใหม่อาทิ mTOR signaling pathway [4] และ canonical Wnt/β-catenin pathway [5] เป็นต้น อีกทั้งเซลล์ซีสต์ที่เกิดขึ้นยังสามารถหลั่งคลอไรด์และน้ำลงในซีสต์ (fluid secretion) ผ่านทางช่องโปรตีนขนส่งคลอไรด์ที่มีชื่อว่า cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) [6] ปัจจุบันพบว่า CFTR เป็นโปรตีนขนส่งสำคัญในการหลั่งคลอไรด์ลงสู่ถุงซีสต์พร้อมทั้งดึงโซเดียมและน้ำหลั่งตามสู่ซีสต์ทำให้ซีสต์มีขนาดโตขึ้น [7] ปัจจุบันยังไม่มีการรักษาใดที่มีความจำเพาะ การรักษาผู้ป่วยโรคถุงน้ำในไตส่วนใหญ่เป็นการรักษาแบบประคับประคองตามอาการของผู้ป่วย อาทิ การให้ยาลดอาการปวด, ลดความดันโลหิตสูง, และการฟอกไต เป็นต้น [8] อย่างไรก็ตามงานวิจัยในด้านการพัฒนายาที่ใช้ในการรักษาโรคถุงน้ำในไตมีความน่าสนใจทั้งทางด้านการค้นหายา สารเคมี หรือสารสมุนไพรใหม่ๆ ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งกลไกที่ทำให้เกิดพยาธิสภาพของโรค ซึ่งส่วนใหญ่ยังอยู่ในขั้นตอนการทดลองในคน (clinical trial phase III) จากการศึกษาที่ผ่านมารายงานว่า การยับยั้งกลไกของการสร้างซีสต์ใหม่ อาทิ การยับยั้ง MAPK/ERK pathway [9], การใช้ยา rapamycin (mTOR inhibitor) [10] ในการยับยั้ง mTOR signaling, หรือแม้แต่การยับยั้ง Wnt/β-catenin pathway สามารถชะลอการเจริญเติบโตของซีสต์ได้ดีทั้งในหนูโมเดลโรคถุงน้ำชนิดต่างๆ

ปัจจุบันมีการศึกษากันอย่างแพร่หลายในการนำเอาสารสมุนไพรหรือสารสกัดจากพืชธรรมชาติมาศึกษาฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ในการเสริมสร้างสุขภาพ ป้องกันและรักษาโรคทางการแพทย์ สำหรับการพัฒนายาที่มีประสิทธิภาพที่ใช้รักษาโรคถุงน้ำในไต มีหลายการศึกษาใช้สารสกัดจากสมุนไพรและพืชธรรมชาติมาทดลองกับหนูโมเดลโรคถุงน้ำและได้ผลดี อาทิ สารสกัดจากขมิ้น (curcumin) [11, 12], สารสกัดจากสมุนไพรจีน (Triptolide) [13], สารสกัดจากใบแปะก๊วย (Ginkolide B) [14], สารสกัดจากใบหญ้าหวาน (steviol) [15, 16] ซึ่งกลไกการออกฤทธิ์ของสารเหล่านี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากพืชธรรมชาติสามารถยับยั้งการเติบโตของซีสต์ในโรคถุงน้ำในไตได้หลายกลไกและเป็นผลดีถ้านำมาประยุกต์ใช้รักษาโรคถุงน้ำร่วมกันกับยาหรือสารสังเคราะห์อื่นๆ เพื่อให้ออกฤทธิ์เสริมกัน สารอนุพันธ์จากชาลโคน (chalcone isoliquiritigenin, ISLQ) เป็นสารสมุนไพรในกลุ่ม flavonoid ที่มีฤทธิ์ทาง biological activity ที่หลากหลาย การศึกษาที่ผ่านมารายงานว่า สาร isoliquiritigenin มีคุณสมบัติในการรักษาโรคต่างๆ อาทิ มีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็ง (anti-cancer), ต้านเชื้อแบคทีเรีย (anti-bacteria), ลดการอักเสบ (anti-inflammation), ลดการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร (anti-peptic ulcer) และลดการแข็งตัวของเม็ดเลือด (anti-platelet aggregation) นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidant) [17-19] สาร isoliquiritigenin สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งในหนูโมเดลโรคมะเร็งเต้านมผ่านการลดทำงานของโปรตีน β-catenin [20] อีกทั้งสาร isoliquiritigenin ยังกระตุ้นการทำงานของโปรตีน AMP kinase-mediated inhibitory phosphorylation GSK3β ในการต้านอนุมูลอิสระและการลดการทำลายไมโตคอนเดรียในเซลล์ HepG2 [21] นอกจากนี้การศึกษาที่ผ่านมาของคณะผู้วิจัยพบว่าสารอนุพันธ์จากชาลโคน (isoliquiritigenin) สามารถลดการหลั่งคลอไรด์โดยการยับยั้งการทำงานของโปรตีนขนส่งคลอไรด์ CFTR ซึ่งฤทธิ์ดังกล่าวสามารถใช้รักษาโรคท้องร่วงในหนูโมเดลโรคท้องร่วง (mouse closed-loop model of secretory diarrhea) [22] และเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งว่าสาร isoliquiritigenin สามารถชะลอการเจริญเติบโตของซีสต์จากเซลล์ท่อไต MDCK [22] เพื่อเป็นการศึกษากลไกเชิงลึกในการชะลอการเติบโตของซีสต์ในเซลล์ท่อไต MDCK ผ่านการยับยั้งโปรตีนขนส่งคลอไรด์และโปรตีนที่กระตุ้นการแบ่งเซลล์ซีสต์ใหม่ อีกทั้งการพัฒนาสารอนุพันธ์ชาลโคนมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นและนำไปสู่การพัฒนาเป็นยารักษาโรคถุงน้ำในไตในอนาคต การศึกษานี้จึงสนใจศึกษาฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์เชิงลึกของสารอนุพันธ์ชาลโคนในการชะลอการเติบโตของซีสต์ในเซลล์ท่อไต MDCK ผ่านกลไกการยับยั้งการทำงานของโปรตีนขนส่งคลอไรด์และกลไกการยับยั้งโปรตีนที่เกี่ยวข้องในการแบ่งตัวของเซลล์ซีสต์ใหม่ในเซลล์ท่อไต MDCK

วัตถุประสงค์

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ของสารอนุพันธ์ชาลโคนในการยับยั้งการเติบโตของซีสต์ในเซลล์ท่อไต MDCK โดยศึกษากลไกเชิงลึกในการออกฤทธิ์ของสารอนุพันธ์ชาลโคนต่อการยับยั้งการทำงานของโปรตีนขนส่งคลอไรด์และโปรตีนที่กระตุ้นการแบ่งเซลล์ซีสต์ใหม่

ทบทวนวรรณกรรม

โรคถุงน้ำในไต

โรคถุงน้ำในไต (polycystic kidney disease, PKD) เป็นโรคพันธุกรรมของไตที่พบบ่อยที่สุด โดยมีถุงน้ำถูกสร้างขึ้นจำนวนมากในหลอดไตและกดเบียดการทำงานของเนื้อไตปกติ ทำให้ผู้ป่วยเกิดภาวะไตวายเรื้อรังได้ (end-stage renal disease, ESRD) โรคถุงน้ำในไตแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ โรคถุงน้ำในไตชนิดพันธุกรรมเด่น (autosomal dominant polycystic kidney disease, ADPKD) มักเกิดขึ้นในผู้ใหญ่ และพบบ่อยที่สุด อีกชนิดคือโรคถุงน้ำในไตชนิดพันธุกรรมด้อย (autosomal recessive polycystic kidney disease, ARPKD) เป็นชนิดที่เกิดขึ้นในเด็กแรกเกิด มีความรุนแรงของโรคค่อนข้างสูง ผู้ป่วยโรคนี้จะตายในวัยทารก [8]

อัตราการเกิดโรคถุงน้ำในไตชนิดพันธุกรรมเด่นมักพบในกลุ่มประชากร 1:500 ถึง 1:1000 คนในประชากรของทวีปยุโรปและอเมริกา ซึ่งเกิดจากการผ่าเหล่าของยีน *PKD1* หรือ *PKD2* ในเซลล์ท่อไตส่งผลให้การทำงานของโปรตีน PC1 และ PC2 ผิดปกติไป การผ่าเหล่าของยีน *PKD1* จะส่งผลต่อการเกิดโรคร้อยละ 85 ในขณะที่การผ่าเหล่าของยีน *PKD2* จะเกิดรอยโรคเพียงร้อยละ 15 [8] ความผิดปกติของโปรตีน PC1 และ PC2 จากการผ่าเหล่าของยีนทั้งสองทำให้ปริมาณแคลเซียมภายในเซลล์ลดน้อยลงและมีปริมาณ cAMP ในเซลล์ท่อไตเพิ่มขึ้นส่งผลกระตุ้นกระบวนการสร้างเซลล์ใหม่เป็นเซลล์ถุงน้ำหรือซีสต์ (cell proliferation) ในขณะเดียวกันซีสต์ที่สร้างขึ้นจะมีการหลั่งคลอไรด์และน้ำ (fluid secretion) [3, 23] ซีสต์ที่โตขึ้นจะไปกดเบียดและทำลายเซลล์เนื้อไตปกติ ทำให้การทำงานของไตลดประสิทธิภาพลง มากกว่าร้อยละ 50 ของผู้ป่วยโรคถุงน้ำในไตจะเกิดภาวะไตวายเรื้อรัง และเป็นสาเหตุการตายของโรคนี้ ปัจจุบันการรักษาโรคถุงน้ำในไตยังไม่มีวิธีใดที่มีประสิทธิภาพ ผู้ป่วยจะต้องรักษาด้วยวิธีการฟอกไต (hemodialysis) หรือการเปลี่ยนถ่ายไต (renal transplantation) [8, 24]

โรคหรือภาวะแทรกซ้อนที่พบในผู้ป่วยโรคถุงน้ำในไต ได้แก่ อาการปวดท้องและหลัง (abdominal and back pain) ซึ่งเกิดได้จากการมีเลือดออก หรือติดเชื้อที่ไต ภาวะความดันโลหิตสูง (hypertension) ซึ่งจะพบบ่อยในผู้ป่วยโรคถุงน้ำในไตเนื่องจากมีการทำงานของไตลดลง ภาวะเลือดออกกับปัสสาวะ (gross hematuria) เป็นอาการต่อจากการเกิดความดันโลหิตสูงและการมีถุงน้ำฉีกขาด ซึ่งเกิดได้เมื่อ

ผู้ป่วยมีไตขนาดใหญ่มาก ภาวะติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ (urinary tract infection) จากการที่ถุงน้ำฉีกขาดและมีการติดเชื้อร่วมด้วย และสามารถเกิดภาวะนิ่วในไต (nephrolithiasis) ได้บ่อยกว่าปกติ [8]

พยาธิวิทยาของโรคถุงน้ำในไต

เนื่องจากการผ่าเหล่าของยีน *PKD1* หรือ *PKD2* ซึ่งมีผลของการสร้างและการทำงานของโปรตีน PC1 และ PC2 ตามลำดับ โปรตีนเหล่านี้แสดงออกที่ซีเลียของเซลล์หลอดไตเพื่อตรวจจับการเปลี่ยนแปลงของอัตราการไหลของของเหลวในหลอดไต อีกทั้งโปรตีนนี้ยังกระตุ้นการเจริญของไตในทารกที่อยู่ในครรภ์มารดา โปรตีน PC1 มีหลากหลายหน้าที่ ทั้งยับยั้งการทำงานของวิถีสัญญาณที่กระตุ้นการแบ่งเซลล์ใหม่และยังทำงานร่วมกับโปรตีน PC2 ที่ทำหน้าที่เป็นโปรตีนขนส่งแคลเซียม ดังนั้นโปรตีน PC1 & PC2 complex จึงทำหน้าที่ร่วมกันในการรักษาระดับแคลเซียมภายในเซลล์หลอดไต เพื่อกระตุ้นการเติบโตของเซลล์หลอดไต ดังนั้นเมื่อเกิดการผ่าเหล่าของยีนในโรคถุงน้ำในไต จึงทำให้ระดับของแคลเซียมในเซลล์หลอดไตลดลง ส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณสาร cAMP ในเซลล์และกระตุ้นการทำงานของหลายวิถีสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งเซลล์ใหม่ ทำให้เกิดพยาธิสรีรวิทยาของโรคถุงน้ำในไต ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 กระบวนการหลักดังนี้

การแบ่งตัวของเซลล์ซีสต์ใหม่ (cell proliferation)

การแบ่งตัวของเซลล์ซีสต์ใหม่เป็นกลไกที่ทำให้เพิ่มจำนวนของเซลล์ซีตส์ในโรคถุงน้ำในไต จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า มีหลายกลไกที่สามารถกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ซีสต์ ซึ่งเกิดจากการกระตุ้นของ cAMP ทำให้โปรตีนที่ควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์ใหม่คือ cAMP-induced ERK pathway ทำงานมากกว่าปกติ [2, 25] นอกจากนี้ยังพบว่า กลไกอื่นก็สามารถกระตุ้นการแบ่งเซลล์ซีสต์ใหม่ได้ด้วย อาทิ mTOR pathway [4], Wnt/β-catenin pathway , STAT5 signaling, การยับยั้ง cell cycle arrest กลไกดังกล่าวมีผลให้เซลล์ท่อไตเกิดการแบ่งตัวใหม่และเจริญเติบโตเป็นซีสต์ในไต

การหลั่งสารน้ำเข้าสู่ถุงซีสต์ (fluid secretion)

การหลั่งสารน้ำลงสู่ถุงซีสต์เป็นกระบวนการที่ทำให้มีการขยายขนาดของซีสต์ ทำให้กดเบียดทำลายเนื้อไตบริเวณข้างเคียง จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการเพิ่มขึ้นของ cAMP จะกระตุ้นการทำงานของโปรตีนขนส่งคลอไรด์ชนิด CFTR โปรตีนนี้เป็นโปรตีนหลักที่ทำให้เกิดการหลั่งคลอไรด์ลงสู่ซีสต์ [7, 26] เมื่อคลอไรด์เคลื่อนที่ลงในซีสต์จะเกิดแรงดึงดูดโซเดียมและน้ำตามเข้ามาในซีสต์ ผ่านทางกลไก transcellular and paracellular pathway เกิดการขยายขนาดและกดเบียนเนื้อไต การหลั่งคลอไรด์ลงสู่ถุงซีสต์เกิดจากกลไกการนำคลอไรด์เข้าเซลล์ท่อไตผ่านทาง basolateral membrane ผ่านโปรตีนขนส่ง Na^+-K^+-$2Cl^-$

cotransport, Na^+-K^+ ATPase, potassium channel KCa3.1 และกลไกการหลั่งคลอไรด์ลงสู่ถุงซีสต์เกิดจากการกระตุ้นการทำงานของโปรตีนขนส่งคลอไรด์ CFTR (cAMP-mediated CFTR chloride channel activity) นอกจากนี้การทำงานของโปรตีนขนส่งน้ำ aquaporin (AQP2) ยังทำให้สารน้ำหลั่งสู่ถุงซีสต์ได้ด้วย

การรักษาโรคถุงน้ำในไต (treatment of polycystic kidney disease)

ปัจจุบันการรักษาผู้ป่วยโรคถุงน้ำในไตใช้วิธีการรักษาแบบประคับประคองและรักษาตามอาการ อาทิ การให้ยาระงับปวด การให้ยาฆ่าเชื้อ การฟอกไต และการเปลี่ยนถ่ายไต เป็นต้น [8, 27] อย่างไรก็ตาม การศึกษาพยาธิสรีรวิทยาของโรคถุงน้ำในไตทำให้ได้มาซึ่งข้อมูลเพื่อใช้เป็นแนวทางในการคิดค้นยารักษาโรคชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพ จากการศึกษาในหนูโมเดลโรคถุงน้ำในไตพบว่า มีสารหลายชนิดที่สามารถชะลอการเจริญเติบโตของซีสต์ในไตและรักษาการทำงานของไตได้ [4, 28] ซึ่งสารเหล่านี้ประกอบด้วย สารสังเคราะห์ สารสมุนไพร หรือยาที่มีกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งปริมาณ cAMP ในเซลล์ (inhibition of cAMP level) ตัวอย่างเช่น vasopressin V2 antagonist [29], somatostatin analog [30] เป็นต้น สารที่มีกลไกยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ซีตส์ใหม่ (inhibition of cell proliferation) อาทิ mTOR inhibitor [10], MEK inhibitor [31], epidermal growth factor and Src inhibitor [32] เป็นต้น และสารที่มีกลไกยับยั้งการหลั่งกระแสคลอไรด์ อาทิ CFTR inhibitor [28], KCa3.1 inhibitor [33] เป็นต้น สารที่ออกฤทธิ์ผ่านกลไกเหล่านี้สามารถชะลอการเจริญเติบโตของซีสต์และเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของไตในเซลล์ท่อไตและในหนูโมเดลโรคถุงน้ำ และสามารถนำไปพัฒนายารักษาโรคถุงน้ำในไต ซึ่งสารหรือยาบางชนิดอยู่ระหว่างการทดลองในมนุษย์ (clinical trials)

สารอนุพันธ์ชาลโคน (chalcone isoliquiritigenin)

สาร isoliquiritigenin เป็นสาร chalcone ในกลุ่ม flavonoid ที่มีฤทธิ์ bioactive พบมากใน Licorice root หรือรากของต้นชะเอมเทศ ซึ่งเป็นพืชที่พบมากในประเทศจีน นอกจากนี้สารกลุ่มนี้ยังพบได้ในผลไม้ ผัก หรืออาหารที่มีสาร flavonoid สูง มีรายงานว่าสาร isoliquiritigenin สามารถสกัดได้จากดอกทองกวาว (flower of the *Butea monosperma*) [34] ซึ่งเป็นไม้ดอกที่พบมากในเขตภาคเหนือและภาคอีสานของประเทศไทย สาร isoliquiritigenin มีฤทธิ์ biological activity มากมายอาทิ anti-cancer, anti-inflammation, anti-fungal, anti-microbial activity, anti-peptic ulcer, anti-platelet aggregation, anti-diabetic anti-diarrhea, and anti-oxidant [17-19] จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสาร

สำนักวิทยบริการ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

isoliquiritigenin มีประโยชน์ในการรักษาโรคต่างๆ อาทิเช่น มีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็งในหนูโมเดลโรคมะเร็งเต้านมโดยลดการทำงานของโปรตีน beta-catenin [20] นอกจากนี้สาร isoliquiritigenin ยังมีฤทธิ์ต้านการสร้างเซลล์สลายกระดูก (anti-osteoclastogenic activity) ผ่านกลไกการยับยั้งการตายของเซลล์แบบ NK-$_{\kappa B}$-dependent autophagy [35] นอกจากนี้สาร isoliquiritigenin ยังสามารถยับยั้งโรคท้องร่วงและลดการเติบโตของซีสต์จากเซลล์ท่อไต MDCK ผ่านการยับยั้งการทำงานของโปรตีนขนส่งคลอไรด์ CFTR [22]

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมสารอนุพันธ์ของ isoliquiritigenin

สารอนุพันธ์ชาลโคนได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัย Excellent Center of Drug Discovery คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งมีความร่วมมือกับนักเคมีจากหลายสถาบัน โดยได้รวบรวมสารสังเคราะห์และสารบริสุทธิ์ของ chalcone ไว้ประมาณ 20 สาร ซึ่งความบริสุทธิ์ของสาร chalcone isoliquiritigenin ถูกตรวจสอบโดยวิธี thin layer chromatography และ nuclear magnetic resonance spectroscopy โดยความบริสุทธิ์ของสาร chalcone isoliquiritigenin มีค่ามากกว่าร้อยละ 99

สารอนุพันธ์ชาลโคน 5 สาร (CHAL-005, CHAL-006, CHAL-007, CHAL-011, CHAL-025) ถูกละลายด้วย 1% dimethyl sulfoxide (DMSO) เก็บในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ซึ่งในการทดลองผู้วิจัยจะหลีกเลี่ยงการ freeze-thaw cycling น้อยกว่า 5 ครั้งต่อ 1 aliquot และศึกษาฤทธิ์เพื่อยืนยันความคงตัวของสาร ด้วยวิธี HPLC ทุก 3 เดือน

เซลล์ท่อไต MDCK

เซลล์ Madin-darby canine kidney (MDCK) เป็นเซลล์หลอดไตสุนัข ได้รับการสนับสนุนจาก Prof. David N. Sheppard, University of Bristal, Bristal, UK โดยลักษณะของเซลล์ MDCK เป็นเซลล์หลอดไตปกติในส่วนของ collecting duct เซลล์ MDCK นิยมนำมาใช้ในการทดลอง *in vitro* cyst model ของโรคถุงน้ำในไต เนื่องจากเซลล์นี้สามารถเจริญเติบโตเป็นซีสต์ในคอลลาเจนได้ เมื่อใส่สาร forskolin กระตุ้นการเจริญเติบโตผ่าน cAMP/PKA pathway

เซลล์ MDCK ถูกเลี้ยงด้วยอาหาร DMEM/F12-Ham ที่ผสม 10% FBS และใส่ supplement insulin, transferrin, selenium X (ITS) และผสม P/S และเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

วิธีการทดลอง

วิธีการทำให้เกิดซีสต์จากเซลล์ MDCK (MDCK cyst growth model)

ทำการทดลองโดยเพาะเลี้ยงเซลล์ท่อไต MDCK ในคอลลาเจนเจล เซลล์ท่อไต MDCK ฝังตัวอยู่ในคอลลาเจนเจลที่แข็งตัว ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์และสาร forskolin (10 μM) กระตุ้นการเจริญเติบโตของซีสต์ในคอลลาเจน โดยเลี้ยงไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสาร forskolin ทุกสองวัน รวมระยะเวลาทั้งสิ้นหกวัน เมื่อถึงวันที่ 6 ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสาร forskolin กับสาร DMSO (กลุ่มควบคุม), สาร GlyH-101 (กลุ่มควบคุมเชิงบวก) และสารอนุพันธ์ชาลโคนที่ความเข้มข้น 10 ถึง 100 μM (กลุ่มทดลอง) บ่มกับซีสต์จากเซลล์ MDCK และเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกสองวัน ตั้งแต่วันที่ 6 ถึงวันที่ 12 ทำการถ่ายรูปซีสต์ทุกสามวัน ณ วันที่ 6, 9, และ 12 ด้วยกล้อง inverted microscopy (Nikon, TE 2000-S) จากนั้นทำการวัดขนานเส้นผ่านศูนย์กลางของซีสต์ (cyst diameter) ด้วยโปรแกรม image J ผลการทดลองจะแสดงด้วยค่าเฉลี่ยของขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของซีสต์ เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ใส่สารอนุพันธ์ชาลโคนและกลุ่มควบคุม

วิธีวัดการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี western blot analysis

ทำการทดลองโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ท่อไต MDCK ใน petri-dish ขนาด 60 x 20 mm เลี้ยงไว้เป็นเวลา 1 วัน บ่มเซลล์ด้วยสารอนุพันธ์ชาลโคนที่ความเข้มข้น 10 ถึง 100 μM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเก็บโปรตีนโดยใช้สารละลายย่อยสลายเซลล์ (RIPA lysis buffer) จากนั้นนำไปปั่นตกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 10000 g เป็นเวลา 20 นาที ดูดเอาส่วนใสนำไปแยกด้วยหลักการของ gel electrophoresis (8-10% gel SDS-PAGE) จากนั้นย้ายโปรตีนบนเจลลงสู่ไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (nitrocellulose membrane) บ่มเมมเบรนด้วยนมพร่องไขมัน 5% (non-fat dry milk) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นบ่มเมมเบรนกับ primary antibody ต่อ polyclonal CFTR (cell signaling), phosphorylation ERK, total-ERK, phosphorylation S6K, total-S6K, β-actin antibodies ข้ามคืนในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วแช่ secondary antibody เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างเมมเบรน แล้วนำเมมเบรนไปวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนด้วยการย้อมสารละลาย chemilumunescence (ECL) เพื่อหาความเข้มของแบน (band intensity) ของโปรตีนที่ศึกษา ผลการทดลองจะแสดงออกในรูปที่เปอร์เซ็นต์ความเข้มของแบนโปรตีนที่ศึกษา ระหว่างกลุ่มใส่สารอนุพันธ์ชาลโคนเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

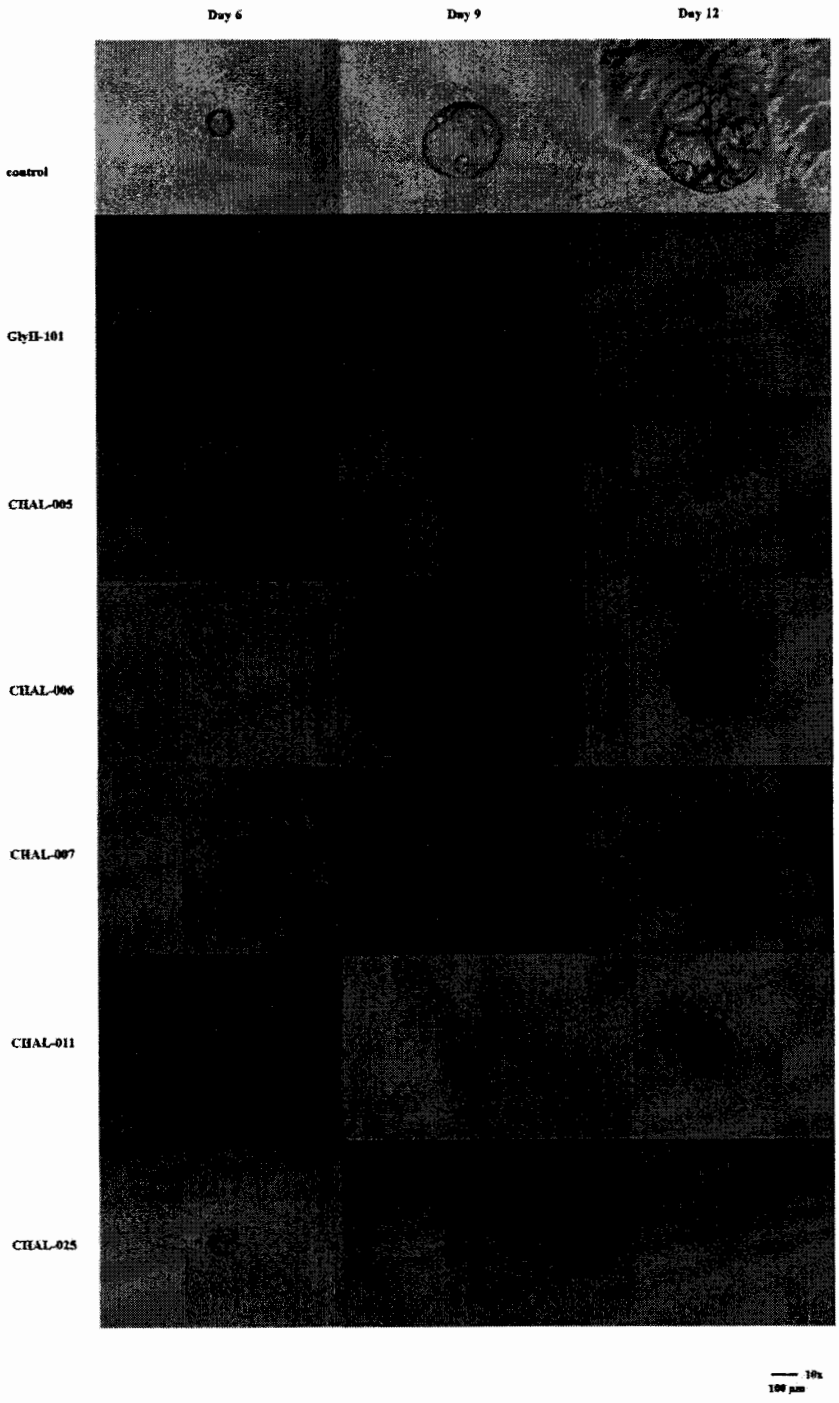
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ใช้สถิติเชิงพรรณนา โดยการแจกแจงค่าเฉลี่ยและค่าความแปรปรวนและเปรียบเทียบข้อมูลระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง (กลุ่มใส่สารอนุพันธ์ซาลโคน) ด้วยสถิติ one-way ANOVA post hoc Bonferroni test กำหนดค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ค่า *p*-value น้อยกว่า 0.05

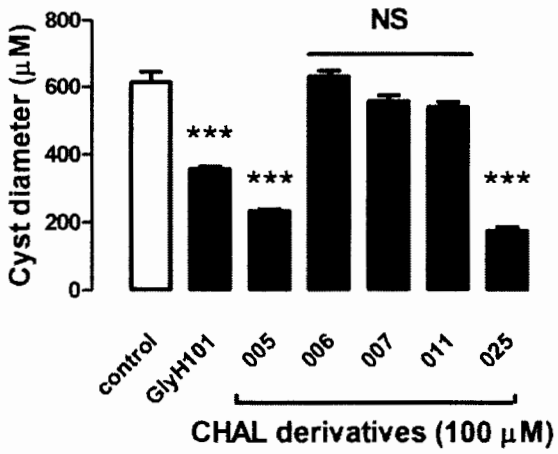
ผลการวิจัย

ผลของสารอนุพันธ์ชาลโคนในการยับยั้งการเจริญเติบโตของซีสต์ในเซลล์โมเดลโรคถุงน้ำ MDCK

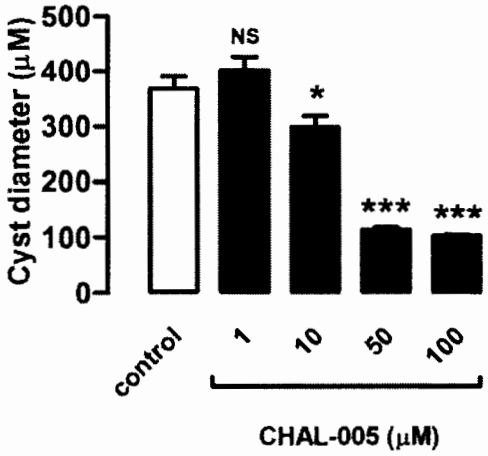
ผู้วิจัยทำการศึกษาฤทธิ์ของสารอนุพันธ์ชาลโคนทั้ง 5 อนุพันธ์ (CHAL-005, CHAL-006, CHAL-007, CHAL-011, CHAL-025) ในการชะลอการเติบโตของซีสต์จากเซลล์ท่อไต MDCK ด้วยวิธีการเลี้ยงซีสต์จากเซลล์ MDCK จากผลการทดลองพบว่าสารอนุพันธุ์ชาลโคน 2 ชนิดคือ CHAL-005 และ CHAL-025 สามารถชะลอการเติบโตของซีสต์จากเซลล์ MDCK ในวันที่ 12 โดยขนานของเส้นผ่านศูนย์กลางของซีสต์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 1 และ 2) และเมื่อทำการศึกษาฤทธิ์ของสารอนุพันธ์ชาลโคน CHAL-005 ในการยับยั้งการเติบโตของซีสต์จากเซลล์ MDCK ตามความเข้มข้นของสาร พบว่าสาร CHAL-005 สามารถชะลอการเติบโตของซีสต์แบบ dose-dependent manner อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 3 จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสาร CHAL-005 และ CHAL-025 สามารถชะลอการเติบโตของซีสต์จากเซลล์ MDCK และจากผลการทดสอบความเป็นพิษของสารต่อการฆ่าเซลล์ MDCK (data not shown) พบว่าสาร CHAL-005 ไม่มีฤทธิ์ต่อการฆ่าเซลล์ MDCK ในขณะที่สาร CHAL-025 มีฤทธิ์ในการฆ่าเซลล์ MDCK ดังนั้นในการทดลองต่อไป ผู้วิจัยจึงเลือกศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสาร CHAL-005 ในการชะลอการเติบโตของซีสต์จากเซลล์ MDCK



รูปที่ 1 ผลของสารอนุพันธ์ชาลโคนทั้ง 5 ชนิด (CHAL-005, 006, 007, 011, 025) ต่อการเติบโตของซีสต์จากเซลล์ MDCK เมื่อกระตุ้นด้วยสาร forskolin ที่ความเข้มข้น 10 μM เป็นเวลา 12 วัน รูปแสดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของซีสต์จากเซลล์ MDCK เมื่อใส่สารละลาย DMSO (กลุ่มควบคุม, รูปบน) สาร GlyH-101 (positive control), CHAL-005, CHAL-006, CHAL-007, CHAL-011, CHAL-025 ที่ความเข้มข้น 100 μM ณ วันที่ 6, 9, 12



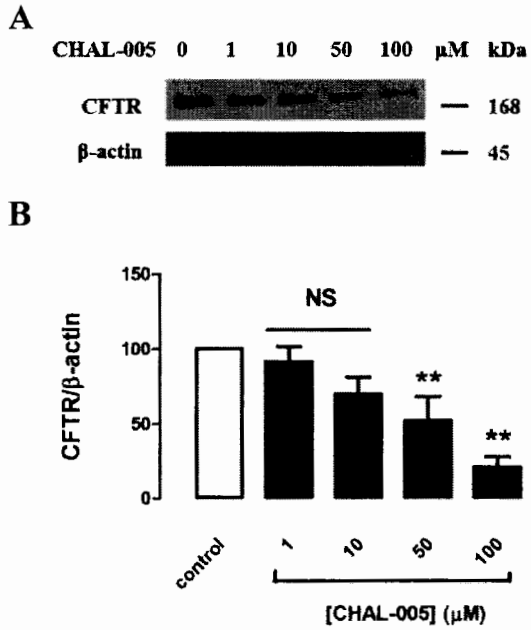
รูปที่ 2 ผลของสารอนุพันธ์ชาลโคนทั้ง 5 ชนิด (CHAL-005, 006, 007, 011, 025) ต่อการเติบโตของซีสต์จากเซลล์ MDCK เมื่อกระตุ้นด้วยสาร forskolin ที่ความเข้มข้น 10 μM เป็นเวลา 12 วัน กราฟแสดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของซีสต์ (μm) เมื่อใส่สาร DMSO (กลุ่มควบคุม) สาร GlyH-101 (positive control) สารอนุพันธ์ CHAL-005, 006, 007, 011, 025 ความเข้มข้น 100 μM วัดด้วยโปรแกรม image *J* ณ วันที่ 12 (mean ± SE, 4 independent experiment, $n > 45$ cysts/condition, $^{*}P < 0.05$, $^{***}P < 0.001$, NS; not significant as compared with control)



รูปที่ 3 ผลของสาร CHAL-005 ต่อการเติบโตของซีสต์จากเซลล์ MDCK เมื่อกระตุ้นด้วยสาร foskolin ที่ความเข้มข้น 10 μM เป็นเวลา 12 วัน รูปแสดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของซีสต์ เมื่อใส่สาร DMSO (กลุ่มควบคุม) สารอนุพันธุ์ CHAL-005 ความเข้มข้น 1, 10, 50, 100 μM วัดด้วยโปรแกรม image *J* ณ วันที่ 12 (mean ± SE, 4 independent experiment, $n > 45$ cysts/condition, $^{*}P < 0.05$, $^{***}P < 0.001$, NS; not significant as compared with control)

ผลของสารอนุพันธ์ชาลโคนในการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนขนส่งคลอไรด์ CFTR ในเซลล์ท่อไต MDCK

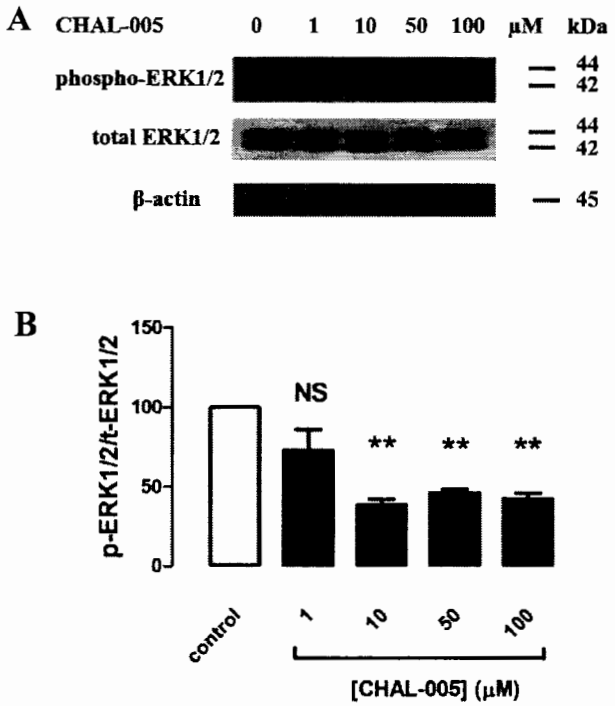
ทำการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสาร CHAL-005 ในการชะลอการเติบโตของซีสต์จากเซลล์ MDCK ด้วยวิธีวัดการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการหลั่งสารน้ำ (CFTR) ผลการทดลองพบว่า สาร CHAL-005 สามารถยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน CFTR ที่ความเข้มข้น 50 ถึง 100 μM อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 4) จากการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าสาร CHAL-005 สามารถชะลอการเติบโตของซีสต์ผ่านการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนที่ขนส่งคลอไรด์ CFTR



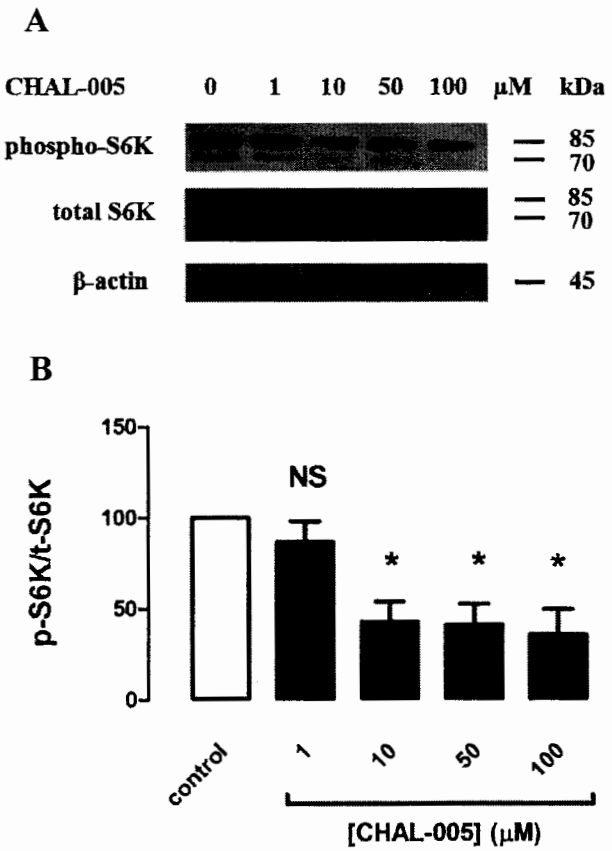
รูปที่ 4 แสดงผลของสารอนุพันธ์ชาลโคน CHAL-005 ต่อการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนขนส่งคลอไรด์ CFTR ในเซลล์ MDCK เมื่อใส่สาร CHAL-005 ที่ความเข้มข้น 0, 1, 50, 100 μM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง รูป A แสดงปริมาณการแสดงออกของโปรตีน CFTR และ β-actin รูป B คือกราฟแสดงร้อยละของโปรตีน CFTR ต่อ β-actin (mean of % control ± SE, n = 4, $^{**}P < 0.01$, NS; not significant เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม)

ผลของสารอนุพันธ์ชาลโคนต่อการลดการแสดงออกของโปรตีน ERK1/2 และ S6K ที่กระตุ้นการเกิดการแบ่งเซลล์ใหม่

ทำการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสาร CHAL-005 ในการชะลอการเติบโตของซีสต์จากเซลล์ MDCK ด้วยวิธีวัดการแสดงออกของโปรตีนที่แบ่งเซลล์ใหม่ (p-ERK & p-S6K) ผลการทดลองพบว่า สาร CHAL-005 สามารถยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน phosphorylation of ERK1/2 ที่ความเข้มข้น 10 ถึง 100 μM (รูปที่ 5) และยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน mTOR/S6K ที่ความเข้มข้น 10 ถึง 100 μM (รูปที่ 6) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม จากการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าสาร CHAL-005 สามารถชะลอการเติบโตของซีสต์ผ่านการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน ERK1/2 และโปรตีน mTOR/S6K ที่กระตุ้นการแบ่งเซลล์ซีสต์ใหม่



รูปที่ 5 แสดงผลของสารอนุพันธ์ CHAL-005 ต่อการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนที่กระตุ้นการแบ่งเซลล์ซีสต์ใหม่ phosphorylation of ERK1/2 ในเซลล์ MDCK เมื่อใส่สาร CHAL-005 ที่ความเข้มข้น 0, 1, 50, 100 μM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง รูป A แสดงปริมาณการแสดงออกของโปรตีน phosphorylation of ERK1/2, total ERK1/2, และ β-actin รูป B คือกราฟแสดงร้อยละของโปรตีน p-ERK1/2 ต่อ t-ERK1/2 (mean of % control ± SE, $n = 4$, $^{**}P < 0.01$, NS; not significant เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม)



รูปที่ 6 แสดงผลของสารอนุพันธ์ CHAL-005 ต่อการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนที่กระตุ้นการแบ่งเซลล์ซีสต์ใหม่ phosphorylation of S6K ในเซลล์ MDCK เมื่อใส่สาร CHAL-005 ที่ความเข้มข้น 0, 1, 50, 100 μM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง รูป A แสดงปริมาณการแสดงออกของโปรตีน phosphorylation of S6K, total S6K, และ β-actin รูป B คือกราฟแสดงร้อยละของโปรตีน p-S6K ต่อ t-S6K (mean of % control ± SE, n = 4, $^{**}P < 0.01$, NS; not significant เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม)

อภิปรายผลการทดลอง

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ของสารอนุพันธ์ชาลโคนในการชะลอการเติบโตของซีสต์จากเซลล์ MDCK โดยเซลล์โมเดลโรคถุงน้ำในไตนิยมใช้เซลล์ MDCK เลี้ยงในเจลคอลลาเจนและใส่อาหารเลี้ยงเซลล์และสาร forskolin กระตุ้นการเติบโตของซีสต์ ซึ่งมีลักษณะทางพยาธิสรีรวิทยาคล้ายกับโรคถุงน้ำในไตคือมีการหลั่งสารน้ำ (fluid secretion) และมีการแบ่งเซลล์ซีสต์ใหม่ (cell proliferation) [7] จากการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการหลั่งคลอไรด์ของสารอนุพันธ์ชาลโคนทั้ง 27 ชนิดในเซลล์ MDCK เมื่อวัดด้วยวิธี Ussing chamber experiment พบว่ามีสารอนุพันธ์ 5 ชนิดที่สามารถยับยั้งการหลั่งคลอไรด์ในเซลล์ MDCK จึงนำสารอนุพันธ์ชาลโคนจำนวน 5 ชนิด (CHAL-005, CHAL-006, CHAL-007, CHAL-011, CHAL-025) ที่ความเข้มข้น 100 μM มาทดสอบฤทธิ์ในการชะลอการเติบโตของซีสต์จากเซลล์ MDCK ผลการทดลองพบว่ามีสารอนุพันธ์ชาลโคนเพียง 2 ชนิดคือสาร CHAL-005 และ CHAL-025 ที่มีฤทธิ์ชะลอการเติบโตของซีสต์จากเซลล์ MDCK อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาว่า สารชาลโคน ISLQ สามารถชะลอการเติบโตของซีสต์ในเซลล์ MDCK ได้ [22] และเมื่อเปรียบเทียบผลในการชะลอการเติบโตของซีสต์ในเซลล์ท่อไต MDCK กับสาร GlyH-101 ที่ยับยั้งโปรตีน CFTR พบว่าสาร CHAL-005 มีฤทธิ์ในการยับยั้งดีกว่า อีกทั้งสาร CHAL-005 ไม่มีฤทธิ์ในการฆ่าเซลล์ MDCK ดังนั้นจึงนำสาร CHAL-005 ไปศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในการชะลอการเติบโตของซีสต์จากเซลล์ MDCK ผ่านการยับยั้งการหลั่งคลอไรด์และลดการแบ่งเซลล์ใหม่

ในการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสาร CHAL-005 ผู้วิจัยเริ่มต้นจากการศึกษาฤทธิ์ของสาร CHAL-005 ต่อการยับยั้งกระบวนการหลั่งคลอไรด์และน้ำลงในซีสต์ (fluid secretion) ซึ่งเป็นกระบวนการสำคัญในการทำให้ซีสต์ขยายขนาดเพิ่มขึ้น โดยการทำงานของโปรตีนขนส่งคลอไรด์ CFTR ทำหน้าที่หลักในการหลั่งคลอไรด์ [6, 36] จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า สารอนุพันธ์ชาลโคน (CHAL-025) สามารถยับยั้งโปรตีน CFTR ในเซลล์ลำไส้ T84 และรักษาโรคท้องร่วงได้ [37] จากการวัดการแสดงออกของโปรตีน CFTR ด้วยวิธี western blot analysis ผลการทดลองพบว่าสาร CHAL-005 สามารถลดการแสดงออกของโปรตีน CFTR ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาว่าสารอนุพันธ์ชาลโคน ISLQ สามารถยับยั้งการเติบโตของซีสต์จากเซลล์ MDCK ผ่านการยับยั้งการทำงานของโปรตีน CFTR

[22, 37] นอกจากนี้ ผลการชะลอการเติบโตของซีสต์ของสาร CHAL-005 ยังสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาว่าสารที่ยับยั้งการทำงานของโปรตีน CFTR (CFTR-inh$_{172}$, GlyH-101) สามารถชะลอการเติบโตของซีสต์จากเซลล์ MDCK และหนูโมเดลโรคถุงน้ำในไตได้ [28] และสอดคล้องกับการศึกษาที่รายงานฤทธิ์ของสารสตีวิออลที่ชะลอการเติบโตของซีสต์ผ่านกลไกการลดการหลั่งคลอไรด์และลดการแสดงออกของโปรตีน CFTR ทั้งในเซลล์และหนูโมเดลโรคถุงน้ำในไต [15, 16] ดังนั้นสาร CHAL-005 จึงชะลอการเติบโตของซีสต์จากเซลล์ MDCK ผ่านการลดการแสดงออกของโปรตีน CFTR

กระบวนการแบ่งเซลล์ใหม่ (cell proliferation) เป็นอีกหนึ่งกลไกสำคัญในการสร้างและขยายขนาดของซีสต์ในโรคถุงน้ำในไต จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการทำงานของโปรตีน MAPK/ERK pathway ที่เกิดจากปริมาณ cAMP ในเซลล์หลอดไตมีมากไปกระตุ้น PKA และ MAPK/ERK [2] นอกจากนี้การศึกษาที่ผ่านมาพบว่ากลไกของ mTOR signaling pathway [4] และ Wnt/β-catenin pathway [38] สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ซีสต์ได้ และการยับยั้งการทำงานของโปรตีน p-ERK1/2 [39] และโปรตีน mTOR [40, 41] สามารถชะลอการเติบโตของซีสต์ในหนูโมเดลโรคถุงน้ำในไตได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นการยับยั้งการทำงานของโปรตีน p-ERK1/2 และ mTOR จึงเป็นอีกหนึ่งแนวทางในการพัฒนาการรักษาโรคถุงน้ำในไตได้ จากการศึกษาที่ผ่านมารายงานว่าสารซาลโคน ISLQ สามารถยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็ง adenoid cystic carcinoma ผ่านการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน mTOR และ ERK1/2 [42] อย่างไรก็ตามกลไกของสารอนุพันธ์ซาลโคนในการชะลอการเติบโตของซีสต์ในเซลล์โมเดลโรคถุงน้ำในไตผ่านการยับยั้งกลไกการแบ่งเซลล์ใหม่ยังไม่มีความชัดเจน จากผลการทดลองในการศึกษานี้พบว่า สาร CHAL-005 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการแบ่งเซลล์ใหม่ผ่านกลไกการลดการแสดงออกของโปรตีน phosphorylation ERK1/2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาที่รายงานว่าสารอนุพันธ์ซาลโคนยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็ง adenoid cystic carcinoma ผ่านการลดการแสดงออกของโปรตีน p-ERK1/2 [42] นอกจากนี้สาร CHAL-005 ยังลดการแสดงออกของโปรตีน mTOR/S6K ในเซลล์ MDCK ด้วย จากผลการทดลองนี้มีรายงานสนับสนุนว่าสารอนุพันธ์ซาลโคน ISLQ สามารถยับยั้งการแบ่งเซลล์และการกระจายตัวของเซลล์มะเร็งปอดผ่านการยับยั้งกลไกการแบ่งเซลล์ใหม่ PI3K/AKT/mTOR [43] จากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าสาร CHAL-005 ชะลอการเติบโตของซีสต์ในเซลล์โมเดลโรคถุงน้ำในไตผ่านการยับยั้งโปรตีนที่กระตุ้นการแบ่งเซลล์ใหม่อย่าง ERK1/2 และ mTOR/S6K

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

การศึกษานี้รายงานฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ของสารอนุพันธ์ชาลโคนในการชะลอการเติบโตของซีสต์ในเซลล์ MDCK ซึ่งเป็นเซลล์โมเดลของโรคถุงน้ำในไต ผลการทดลองพบว่าสาร CHAL-005 สามารถชะลอการเติบโตของซีสต์จากเซลล์ MDCK ผ่านการลดการแสดงออกของโปรตีนขนส่งคลอไรด์ CFTR และลดการแสดงออกของโปรตีนที่แบ่งเซลล์ใหม่ phosphorylation ERK1/2 และ mTOR/S6K จากผลการศึกษาข้างต้นนี้แสดงให้เห็นว่าสารอนุพันธ์ชาลโคน (CHAL-005) เป็นสารสมุนไพรที่มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยารักษาโรคถุงน้ำในไต อีกทั้งยังสามารถใช้สารอนุพันธ์ชาลโคนร่วมกับการใช้ยาอื่นในการรักษาโรคถุงน้ำในไตเพื่อให้ออกฤทธิ์เสริมกัน

การศึกษาต่อไปควรทำการศึกษาฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ของสารอนุพันธ์ชาลโคนในการชะลอการเติบโตของซีสต์ในหนูโมเดลโรคถุงน้ำในไต นอกจากนี้การศึกษากลไกเชิงลึกของสารอนุพันธ์ชาลโคนที่มีผลต่อการลดการแสดงออกของโปรตีน CFTR, ERK1/2, S6K และกลไกของ cell proliferation pathways อื่น จะทำให้สารอนุพันธ์ชาลโคนมีความน่าเชื่อถือ และเป็นหนทางที่ดีในการนำเอาสารอนุพันธ์ชาลโคนไปพัฒนาเป็นยารักษาโรคถุงน้ำในไตได้ในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

[1] P. Igarashi, S. Somlo, Genetics and pathogenesis of polycystic kidney disease, J Am Soc Nephrol13(9) (2002) 2384-98.

[2] D.P. Wallace, Cyclic AMP-mediated cyst expansion, Biochim Biophys Acta 1812(10) (2011) 1291-300.

[3] J.P. Calvet, The Role of Calcium and Cyclic AMP in PKD, in: X. Li (Ed.), Polycystic Kidney Disease, Codon Publications Copyright: The Author., Brisbane (AU), 2015.

[4] J.M. Shillingford, N.S. Murcia, C.H. Larson, S.H. Low, R. Hedgepeth, N. Brown, C.A. Flask, A.C. Novick, D.A. Goldfarb, A. Kramer-Zucker, G. Walz, K.B. Piontek, G.G. Germino, T. Weimbs, The mTOR pathway is regulated by polycystin-1, and its inhibition reverses renal cystogenesis in polycystic kidney disease, Proc Nati Acad Sci USA 103(14) (2006) 5466-71.

[5] M.A. Lancaster, J.G. Gleeson, Cystic kidney disease: the role of Wnt signaling, Trends Mol Med 16(8) (2010) 349-60.

[6] C.J. Davidow, R.L. Maser, L.A. Rome, J.P. Calvet, J.J. Grantham, The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mediates transepithelial fluid secretion by human autosomal dominant polycystic kidney disease epithelium in vitro, Kidney int 50(1) (1996) 208-18.

[7] L.P. Sullivan, D.P. Wallace, J.J. Grantham, Chloride and fluid secretion in polycystic kidney disease, J Am Soc Nephrol 9(5) (1998) 903-16.

[8] V.E. Torres, P.C. Harris, Autosomal dominant polycystic kidney disease: the last 3 years, Kidney int 76(2) (2009) 149-68.

[9] S. Omori, M. Hida, H. Fujita, H. Takahashi, S. Tanimura, M. Kohno, M. Awazu, Extracellular signal-regulated kinase inhibition slows disease progression in mice with polycystic kidney disease, J Am Soc Nephrol 17(6) (2006) 1604-14.

[10] J.M. Shillingford, K.B. Piontek, G.G. Germino, T. Weimbs, Rapamycin ameliorates PKD resulting from conditional inactivation of Pkd1, J Am Soc Nephrol 21(3) (2010) 489-97.

[11] J. Gao, H. Zhou, T. Lei, L. Zhou, W. Li, X. Li, B. Yang, Curcumin inhibits renal cyst formation and enlargement in vitro by regulating intracellular signaling pathways, Eur J Pharmacol 654(1) (2011) 92-9.

[12] W.N. Leonhard, A. van der Wal, Z. Novalic, S.J. Kunnen, R.T. Gansevoort, M.H. Breuning, E. de Heer, D.J. Peters, Curcumin inhibits cystogenesis by simultaneous interference of multiple signaling pathways: in vivo evidence from a Pkd1-deletion model, Am J Physiol Renal physiol 300(5) (2011) F1193-202.

[13] S.J. Leuenroth, D. Okuhara, J.D. Shotwell, G.S. Markowitz, Z. Yu, S. Somlo, C.M. Crews, Triptolide is a traditional Chinese medicine-derived inhibitor of polycystic kidney disease, Proc Nati Acad Sci USA 104(11) (2007) 4389-94.

[14] H. Zhou, J. Gao, L. Zhou, X. Li, W. Li, Y. Xia, B. Yang, Ginkgolide B inhibits renal cyst development in in vitro and in vivo cyst models, Am J Physiol Renal Physiol 302(10) (2012) F1234-42.

[15] C. Yuajit, C. Muanprasat, A.R. Gallagher, S.V. Fedeles, S. Kittayaruksakul, S. Homvisasevongsa, S. Somlo, V. Chatsudthipong, Steviol retards renal cyst growth through reduction of CFTR expression and inhibition of epithelial cell proliferation in a mouse model of polycystic kidney disease, Biochem Pharmacol 88(3) (2014) 412-21.

[16] C. Yuajit, S. Homvisasevongsa, L. Chatsudthipong, S. Soodvilai, C. Muanprasat, V. Chatsudthipong, Steviol reduces MDCK Cyst formation and growth by inhibiting CFTR channel activity and promoting proteasome-mediated CFTR degradation, PloS one 8(3) (2013) e58871.

[17] F. Peng, Q. Du, C. Peng, N. Wang, H. Tang, X. Xie, J. Shen, J. Chen, A Review: The Pharmacology of Isoliquiritigenin, Phytother Res 29(7) (2015) 969-77.

[18] X. Zhao, W. Mei, M. Gong, W. Zuo, H. Bai, H. Dai, Antibacterial activity of the flavonoids from Dalbergia odorifera on Ralstonia solanacearum, Molecules 16(12) (2011) 9775-82.

[19] V.R. Yadav, S. Prasad, B. Sung, B.B. Aggarwal, The role of chalcones in suppression of NF-kappaB-mediated inflammation and cancer, Int Immunopharmacol 11(3) (2011) 295-309.

[20] N. Wang, Z. Wang, C. Peng, J. You, J. Shen, S. Han, J. Chen, Dietary compound isoliquiritigenin targets GRP78 to chemosensitize breast cancer stem cells via beta-catenin/ABCG2 signaling, Carcinogenesis 35(11) (2014) 2544-54.

[21] S.H. Choi, Y.W. Kim, S.G. Kim, AMPK-mediated GSK3beta inhibition by isoliquiritigenin contributes to protecting mitochondria against iron-catalyzed oxidative stress, Biochem Pharmacol 79(9) (2010) 1352-62.

[22] C. Muanprasat, L. Sirianant, S. Soodvilai, R. Chokchaisiri, A. Suksamrarn, V. Chatsudthipong, Novel action of the chalcone isoliquiritigenin as a cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) inhibitor: potential therapy for cholera and polycystic kidney disease, J Pharmacol Sci 118(1) (2012) 82-91.

[23] V.E. Torres, P.C. Harris, Mechanisms of Disease: autosomal dominant and recessive polycystic kidney diseases, Nat Clin Pract Nephrol 2(1) (2006) 40-55; quiz 55.

[24] V.E. Torres, P.C. Harris, Polycystic kidney disease: genes, proteins, animal models, disease mechanisms and therapeutic opportunities, J Intern Med 261(1) (2007) 17-31.

[25] T. Yamaguchi, S. Nagao, D.P. Wallace, F.A. Belibi, B.D. Cowley, J.C. Pelling, J.J. Grantham, Cyclic AMP activates B-Raf and ERK in cyst epithelial cells from autosomal-dominant polycystic kidneys, Kidney Int 63(6) (2003) 1983-94.

[26] L.P. Sullivan, D.P. Wallace, J.J. Grantham, Epithelial transport in polycystic kidney disease, Physiol Rev 78(4) (1998) 1165-91.

[27] V. Patel, R. Chowdhury, P. Igarashi, Advances in the pathogenesis and treatment of polycystic kidney disease, Curr Opin Nephrol Hypertens 18(2) (2009) 99-106.

[28] B. Yang, N.D. Sonawane, D. Zhao, S. Somlo, A.S. Verkman, Small-molecule CFTR inhibitors slow cyst growth in polycystic kidney disease, J Am Soc Nephrol 19(7) (2008) 1300-10.

[29] V.H. Gattone, 2nd, X. Wang, P.C. Harris, V.E. Torres, Inhibition of renal cystic disease development and progression by a vasopressin V2 receptor antagonist, Nat Med 9(10) (2003) 1323-6.

[30] T.V. Masyuk, A.I. Masyuk, V.E. Torres, P.C. Harris, N.F. Larusso, Octreotide inhibits hepatic cystogenesis in a rodent model of polycystic liver disease by reducing cholangiocyte adenosine 3',5'-cyclic monophosphate, Gastroenterology 132(3) (2007) 1104-16.

[31] J.P. Calvet, MEK inhibition holds promise for polycystic kidney disease, J Am Soc Nephrol 17(6) (2006) 1498-500.

[32] W.E. Sweeney, Jr., R.O. von Vigier, P. Frost, E.D. Avner, Src inhibition ameliorates polycystic kidney disease, J Am Soc Nephrol 19(7) (2008) 1331-41.

[33] M. Albaqumi, S. Srivastava, Z. Li, O. Zhdnova, H. Wulff, O. Itani, D.P. Wallace, E.Y. Skolnik, KCa3.1 potassium channels are critical for cAMP-dependent chloride secretion and cyst growth in autosomal-dominant polycystic kidney disease, Kidney Int 74(6) (2008) 740-9.

[34] R. Chokchaisiri, C. Suaisom, S. Sriphota, A. Chindaduang, T. Chuprajob, A. Suksamrarn, Bioactive flavonoids of the flowers of Butea monosperma, Chem Pharm Bull (Tokyo) 57(4) (2009) 428-32.

[35] S. Liu, L. Zhu, J. Zhang, J. Yu, X. Cheng, B. Peng, Anti-osteoclastogenic activity of isoliquiritigenin via inhibition of NF-kappaB-dependent autophagic pathway, Biochem Pharmacol 106 (2016) 82-93.

[36] H. Li, I.A. Findlay, D.N. Sheppard, The relationship between cell proliferation, Cl- secretion, and renal cyst growth: a study using CFTR inhibitors, Kidney Int 66(5) (2004) 1926-38.

[37] C. Yibcharoenporn, P. Chusuth, C. Jakakul, T. Rungrotmongkol, W. Chavasiri, C. Muanprasat, Discovery of a novel chalcone derivative inhibiting CFTR chloride channel via AMPK activation and its anti-diarrheal application, J Pharmacol Sci 140(3) (2019) 273-83.

[38] A. Li, Y. Xu, S. Fan, J. Meng, X. Shen, Q. Xiao, Y. Li, L. Zhang, X. Zhang, G. Wu, C. Liang, D. Wu, Canonical Wnt inhibitors ameliorate cystogenesis in a mouse ortholog of human ADPKD, JCI insight 3(5) (2018).

[39] S. Shibazaki, Z. Yu, S. Nishio, X. Tian, R.B. Thomson, M. Mitobe, A. Louvi, H. Velazquez, S. Ishibe, L.G. Cantley, P. Igarashi, S. Somlo, Cyst formation and activation of the extracellular regulated kinase pathway after kidney specific inactivation of Pkd1, Hum Mol Genet 17(11) (2008) 1505-16.

[40] S.J. Holditch, C.N. Brown, D.J. Atwood, A.M. Lombardi, K.N. Nguyen, H.W. Toll, K. Hopp, C.L. Edelstein, A study of sirolimus and mTOR kinase inhibitor in a hypomorphic Pkd1 mouse model of autosomal dominant polycystic kidney disease, Am J Physiol Renal Physiol 317(1) (2019) F187-96.

[41] K. Ravichandran, I. Zafar, A. Ozkok, C.L. Edelstein, An mTOR kinase inhibitor slows disease progression in a rat model of polycystic kidney disease, Nephrol Dial Transplant 30(1) (2015) 45-53.

[42] Z.J. Sun, G. Chen, W. Zhang, X. Hu, C.F. Huang, Y.F. Wang, J. Jia, Y.F. Zhao, Mammalian target of rapamycin pathway promotes tumor-induced angiogenesis in adenoid cystic carcinoma: its suppression by isoliquiritigenin through dual activation of c-Jun NH2-terminal kinase and inhibition of extracellular signal-regulated kinase, J Pharmacol Exp Ther 334(2) (2010) 500-12.

[43] T. Tian, J. Sun, J. Wang, Y. Liu, H. Liu, Isoliquiritigenin inhibits cell proliferation and migration through the PI3K/AKT signaling pathway in A549 lung cancer cells, Oncol Lett 16(5) (2018) 6133-9.

ภาคผนวก

ประวัตินักวิจัยหัวหน้าโครงการ

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นายเชาวลิต ยั่วจิตร

   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr.Chaowalit Yuajit

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 1340700088887

3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์

4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก ห้อง 324 ตึกสมจิตต์ ยอดเศรณี วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี หมายเลขโทรศัพท์ 045-353900 (5865) โทรสาร 045-353901 และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail) yuajit.chaow@gmail.com

5. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา	ชื่อปริญญา	สาขา	สถาบันการศึกษา	ประเทศ
2556	เอก	ปร.ด	สรีรวิทยา	มหาวิทยาลัยมหิดล	ไทย
2551	ตรี	วท.บ (เกียรตินิยมอันดับ 1)	กายภาพบำบัด	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	ไทย

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

   - Renal physiology and renal disease
   - Herb medicine
   - Membrane transport

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการดำเนินงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ (*โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัย ในแต่ละผลงานวิจัย ระบุในระยะเวลา 5 ปีย้อนหลัง*

7.1 โครงการวิจัยที่ได้รับทุนสนับสนุน

1) เรื่อง "การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบหญ้าหวาน (สตีวิออล) ต่อการแสดงออกของโปรตีน polycystin 1 เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของซีสต์ในโรคถุงน้ำในไต (Effect of plant-derived steviol on polycystin 1 protein for inhibiting cyst enlargement in polycystic kidney disease)" ระยะเวลาที่ใช้ในการทำวิจัย 1 ปี (1 ตุลาคม 2557–30 กันยายน 2558) แหล่งทุนวิจัย: สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (หัวหน้าโครงการ: ปิดโครงการแล้ว)

2) เรื่อง "ผลการใช้การอภิปรายกลุ่มย่อยที่มีต่อการเรียนรู้และความพึงพอใจในการเรียนรู้เรื่องสรีรวิทยาของนักศึกษาแพทย์ วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข (Effect of Small Group Discussion to Learning Outcomes and Learning Satisfaction on Physiological Study of the Pre-Medical Students, College of Medicine and Public Health)" ระยะเวลาที่ใช้ในการทำวิจัย 1 ปี (25 พฤษภาคม 2558–24 พฤษภาคม 2559) แหล่งทุนวิจัย: ทุนวิจัยสถาบัน ปีงบประมาณ 2558 มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี (หัวหน้าโครงการ: ปิดโครงการแล้ว)

3) เรื่อง "การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารที่เปลี่ยนแปลงโครงสร้างจากสารอนุพันธ์จากใบหญ้าหวาน (ASEN 023) ในการยับยั้งการเติบโตของซีสต์ในโรคถุงน้ำในไต (Effect of the modified structure of plant-derived steviol compound (ASEN 023) on renal cyst progression in polycystic kidney disease)" ระยะเวลาที่ใช้ในการทำวิจัย 2 ปี (1 กรกฎาคม 2558–30 มิถุนายน 2560) แหล่งทุนวิจัย: ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ ประจำปี 2558 สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี (หัวหน้าโครงการ: ปิดโครงการแล้ว)

4) เรื่อง "การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารอนุพันธ์จากใบหญ้าหวาน (สตีวิออล) ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของซีสต์ในเซลล์ท่อไต MDCK: การประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคถุงน้ำในไต (The pharmacological studies on effect of steviol on MDCK cyst growth: potential application for treatment of polycystic kidney disease)" ระยะเวลาที่ใช้ในการทำวิจัย 1 ปี (1 ตุลาคม 2558–30 กันยายน 2559) แหล่งทุนวิจัย: ทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณแผ่นดิน ปีงบประมาณ 2559 มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี (หัวหน้าโครงการ: ปิดโครงการแล้ว)

5) เรื่อง "การศึกษาฤทธิ์ของสารอนุพันธ์ของ isoliquiritigenin จากดอกทองกวาวในการชะลอการเติบโตของซีสต์ในโรคถุงน้ำในไต (Effect of isoliquiritigenin derivatives extracted from the flower of *Butea monosperma* for slowing renal cyst enlargement in polycystic kidney disease)" ระยะเวลาที่ใช้ในการทำวิจัย 1 ปี (1 ตุลาคม 2560–30 กันยายน 2561) แหล่งทุนวิจัย: ทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ปีงบประมาณ 2561 มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี (หัวหน้าโครงการ: ส่งร่างรายงานฉบับสมบูรณ์ กำลังอยู่ระหว่างตีพิมพ์ผลงานวิจัย)

6) เรื่อง "การศึกษาฤทธิ์ของโพรไบโอติกส์ต่อการชะลอการเติบโตของซีสต์ในโรคถุงน้ำในไต (Effects of probiotic (*Lactobacillus rhamnosus*) on renal cyst growth in polycystic kidney disease)" ระยะเวลาที่ใช้ในการทำวิจัย 2 ปี (1 พฤษภาคม 2561–30 เมษายน 2563) แหล่งทุนวิจัย: ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ ประจำปี 2561 สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (หัวหน้าโครงการ: อยู่ระหว่างดำเนินโครงการ)

7.2 ผลงานตีพิมพ์

- Bunprajun T, **Yuajit C**, Noitem R, Chatsudthipong V. (2018). Exhaustive exercise decreases renal organic anion transporter 3 function. Journal of Physiological Science.
- Noitem R, **Yuajit C**, Soodvilai S, Muanprasat C, Chatsudthipong V. (2018). Steviol slows renal cyst growth by reducing AQP2 expression and promoting AQP2 degradation. Biomedicine and Pharmacotherapy. 101: 754-762.
- **Yuajit C**, Deandee S. (2017) Steviol stimulates proteasomal-mediated β-catenin degradation in Madin-Darby canine kidney cells. Isan Journal of Pharmaceutical Sciences. 13(4):77-85.
- **Yuajit C**, Muanprasat C, Homvisasevongsa S, Chatsudthipong V. (2017) Steviol stabilizes polycystin 1 expression and promotes lysosomal degradation of CFTR and β-catenin proteins in renal epithelial cells. Biomedicine & Pharmacotherapy. Oct;94: 820-826
- **Yuajit C**, Chatsudthipong V. (2016) Nutraceutical for autosomal dominant polycystic kidney disease therapy. Journal of the Medical Association of Thailand. Jan;99 Suppl 1:S97-103.

- **Yuajit C**, Muanprasat C, Gallagher AR, Fedeles SV, Kittayaruksakul S, Homvisasevongsa S, Somlo S, Chatsudthipong V. (2014) Steviol retards renal cyst growth through reduction of CFTR expression and inhibition of epithelial cell proliferation in a mouse model of polycystic kidney disease. Biochemical Pharmacology. Apr 1;88(3):412-21. doi: 10.1016/j.bcp.2014.01.038.

- **Yuajit C**, Homvisasevongsa S, Chatsudthipong L, Soodvilai S, Muanprasat C, et al. (2013) Steviol Reduces MDCK Cyst Formation and Growth by Inhibiting CFTR Channel Activity and Promoting Proteasome-Mediated CFTR Degradation. PLoS ONE 8(3): e58871. doi:10.1371/journal.pone.0058871

- สุวภรณ์ แดนดี, นันทยา กระสวยทอง, จารุวรรณ์ วงบุตดี, **เชาวลิต ยั่วจิตร**. ผลของวิธีสอนแบบอภิปรายกลุ่มย่อยต่อการเรียนรู้และความพึงพอใจในการเรียนปฏิบัติการสรีรวิทยาของนักศึกษาแพทย์ชั้นปรีคลินิก วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. เอกสารสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 13 ประจำปี 2561 เรื่องกลยุทธ์ดิจิทัลสำหรับอุดมศึกษา: การเสริมสร้างการเรียนการสอนและการประเมินผล "Digital strategies for higher education: enhancing teaching, learning and assessment" ระหว่างวันที่ 29-30 มีนาคม พ.ศ. 2561 ณ ห้องคอนเวนชั่น โรงแรมแอมบาสเดอร์ (สุขุมวิท 11) กรุงเทพมหานคร

เอกสารแนบ 1

รวมบทคัดย่อ
ABSTRACT BOOK
RESEARCH AND INNOVATIONS
TO STRENGTHEN THE NEW ECONOMY
การวิจัยและนวัตกรรมเพื่อสร้างความเข้มแข็งของเศรษฐกิจกระแสใหม่
การประชุมวิชาการระดับชาติ มอบ วิจัย ครั้งที่ 13
11-12 กรกฎาคม 2562
ณ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
สกสว
TSRI

เอกสารแนบ 1

Chalcone Derivative Retards an *in vitro* cyst Enlargement Through The Inhibition of Cell Proliferation Pathway

Peerachat Veeraphan[1] Suwaporn Deandee[2] and Chaowalit Yuajit[2*]
[1]Biomedical Science Program, College of Medicine and Public Health, Ubon Ratchathani University
[2]Division of Physiology, College of Medicine and Public Health, Ubon Ratchathani University
*E-mail; chaowalit.y@ubu.ac.th

Abstract

Polycystic kidney disease (PKD) is an inherited renal disorder caused by mutations of either *PKD1* or *PKD2* gene. Bilateral fluid filled-cyst is associated with abnormal epithelial cell proliferation. The progressive cyst enlargement destroys the renal parenchymal cells, leading to end-stage renal disease and no effective treatment is currently available. Isoliquiritigenin (ISLQ), a chalcone derivative, has various pharmacological properties such as anti-inflammatory, antimicrobial, antioxidant and anticancer activities. Previously, it was found that ISLQ could slow MDCK cyst growth by inhibiting CFTR chloride channel activity. The present study was aimed to determine an inhibitory effect and detailed mechanism of ISLQ on MDCK cyst growth (an *in vitro* model of PKD). The results showed that ISLQ strongly retards MDCK cyst growth in a dose-dependent manner without cytotoxicity effect. Using BrdU cell proliferation assay, it was found that ISLQ (100 μM) significantly suppresses MDCK cell proliferation compared to that of control. Interestingly, ISLQ diminished phosphorylation of ERK1/2 protein expression in dose and time dependent manners. Taken together, these finding suggested that ISLQ slows MDCK cyst progression by reducing cell proliferation through the suppression of ERK1/2 signaling pathway. ISLQ represented a promising natural plant-based drug candidate for polycystic kidney disease intervention.

Keywords : Chalcone, PKD, ERK1/2, MDCK

เอกสารแนบ 2

A chalcone derivative retards renal cyst enlargement by inhibiting fluid secretion and cell proliferation in an *in vitro* model of polycystic kidney disease

Peerachat Veeraphan[1], Warinthorn Chavasiri[2], Chatchai Muanprasat[3], Varanuj Chatsudthipong[4], Chaowalit Yuajit[5*]

[1]Biomedical Science Program, College of Medicine and Public Health, Ubon Ratchathani University, Warin Chamrap, Ubon Ratchathani, 34190, Thailand

[2]Center of Excellence in Natural Products Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Phayathai, Bangkok, 10330, Thailand

[3]Chakri Naruebodindra Medical Institute, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangpli, Samutprakarn, 10540, Thailand

[4]Research Center of Transport Proteins for Medical Innovation, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Road, Rajathevi, Bangkok, 10400, Thailand

[5]College of Medicine and Public Health, Ubon Ratchathani University, Warin Chamrap, Ubon Ratchathani, 34190, Thailand

*Corresponding author

Chaowalit Yuajit, Ph.D., College of Medicine and Public Health, Ubon Ratchathani University, Sathonlamark Road, Warin Chamrap, Ubon Ratchathani, 34190, Thailand. Tel: 66-4-535-3900; Fax: 66-4-535-3901; E-mail: chaowalit.y@ubu.ac.th

The number of words in manuscript: 3979

Abstract

Background Renal bilateral fluid filled-cyst in polycystic kidney disease (PKD) is associated with abnormal epithelial cell proliferation and transepithelial fluid secretion which leads to end-stage renal disease (ESRD). At present, there is no specific intervention for the treatment of PKD. A chalcone derivative, isoliquiritigenin (ISLQ), has been shown to have various pharmacological properties. Since several studies have shown that ISLQ could inhibit CFTR channel activity, it is interesting to see whether it can inhibit renal cyst enlargement. The present study was aimed to determine an inhibitory effect and the mechanism of chalcone derivatives on MDCK cyst progression and *Pkd1* mutant cells.

Methods MDCK cyst growth and cyst formation experiments, MTT assay, Ussing chamber experiment, BrdU cell proliferation assay and western blot analysis were performed in this study.

Results Among 4 compounds of chalcone derivatives tested, CHAL-005 (100 μM) was found to inhibit MDCK cyst growth in a dose-dependent manner without cytotoxicity. It inhibited short-circuit current of chloride secretion as well as CFTR protein expression in MDCK cells. CHAL-005 significantly suppressed cell proliferation. In addition, CHAL-005 strongly reduced phosphorylation ERK1/2 and phosphorylation S6 kinase in MDCK cells. Interestingly, CHAL-005 activated phosphorylation of AMP kinase protein expression in MDCK and *Pkd1* mutant cells.

Conclusion CHAL-005 slowed MDCK cyst progression by inhibiting CFTR expression and reducing ERK1/2 and mTOR/S6K signaling pathways as well as activating AMPK expression. Therefore, a chalcone derivative could represent as a promising drug candidate for polycystic kidney disease intervention.

Keywords Chalcone, MDCK cyst enlargement, CFTR, ERK1/2, mTOR/S6K

Introduction

Renal cyst progression in polycystic kidney disease (PKD), a common renal inherited disorder, caused by mutation of either *PKD1* or *PKD2* gene encoding polycystin-1 and polycystin-2 protein, respectively [1]. The characteristics of PKD is the proliferation and accumulation of fluid-filled cysts along the nephron [2]. The numerous fluid-filled cysts destroyed normal renal parenchymal cells leading to the loss of renal function and ending up with end-stage renal disease [3]. Currently, there is no specific intervention for PKD.

It is known that cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) chloride channel activity is involved in fluid secretion in PKD pathophysiology [4]. Of note, several compounds which inhibited CFTR channel activity and expression could slow renal cyst enlargement both in an *in vitro* and *in vivo* model of PKD [5-7]. In addition, it was found that several complex pathways including the upregulation of Raf/MEK/ERK pathway [8, 9] and mTOR/S6K signaling pathway [10] were involved in cyst-lining epithelial cell growth. In contrast, the activation of AMP kinase, a cellular energy sensor, was found to strongly retard renal cystogenesis in a mouse model of PKD through the inhibition of both CFTR channel and mTOR/S6K signaling [11]. Therefore, the combination of target therapies might be more effective for the inhibition of renal cyst enlargement in polycystic kidney disease intervention.

Chalcone derivatives have found to possess several pharmacological properties such as anti-inflammation [12], antiproliferation [13], and anticancer [14]. In addition, there was a report that chalcone derivatives have an anti-diarrheal effect by inhibition of CFTR though the activation of AMPK activity [15]. Chalcone isoliquiritigenin (ISLQ) was found to inhibit ERK1/2 and mTOR signaling in adenoid cystic carcinoma cell [16]. Moreover, the chalcone ISLQ derivative has been shown to inhibit CFTR activity in human colonic epithelial (T84) and MDCK cells [17]. However, the mechanism of chalcone derivatives to slow an *in vitro* cyst progression on fluid secretion and cell proliferation pathway was unclear. Therefore, this present study was aimed to determine the inhibitory effect and the possible mechanisms of chalcone derivatives on fluid secretion and cell proliferation using an *in vitro* model of PKD.

Materials and Methods

Reagents and compounds

Chalcone derivatives were synthesized and their identities were checked by spectroscopic data. Collagen type I (PureCol) was purchased from Advanced BioMatrix (Fremont, CA, USA). DMEM/Ham F-12, penicillin, streptomycin, and FBS were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Interferon γ, blasticidin,

GlyH101, and ECL-solution were obtained from Calbiochem (San Diego, CA, USA). Primary antibodies including anti-CFTR, anti-p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204), anti-t-ERK1/2, anti-pS6K (Thr421/Ser424), anti-t-S6K, anti-p-AMPK (Thr172), anti-AMPKα, anti-β-actin, were purchased from Cell Signaling (Beverly, MA, USA). Protease inhibitor was obtained from Roche (Indianapolis, IN, USA).

Cell cultures and treatments

Madin-Darby canine kidney (MDCK) type I cells [18] were kindly give from Prof.David N. Sheppard, University of Bristol, Bristol, UK. Cells were cultured in DMEM/F-12 Ham medium supplemented with 10% FBS, 5 μg/ml insulin, 5 μg/ml transferrin, 5 μg/ml selenium X, 100 U/ml penicillin, and 100 μg/ml streptomycin. Mouse renal cystic epithelial cells (*Pkd1* mutant) *Pkd1*$^{-/-}$ (PN24, homozygous) and *Pkd1*$^{+/-}$ (PH2, heterozygous) cells [9] were kindly give from Prof.Stefan Somlo, Yale University School of Medicine, Connecticut, USA. Cells were cultured in DMEM/F-12 Ham medium supplemented with 2% FBS, 5 μg/ml insulin, 5 μg/ml transferrin, 5 μg/ml selenium X, 5 μg/ml interferon γ, 100 U/ml penicillin, and 100 μg/ml streptomycin. These cells were grown at 37 °C and 33 °C, respectively, in a humidified atmosphere with 5% CO_2, 95% O_2. Cells were trypsinized with 0.25% trypsin and centrifuged at 600 g before seeding.

MDCK cyst experiment

Type I MDCK cells were added in an individual well of a 24-wells plate and suspended in 0.4 ml of 3.0 mg/ml ice-cold collagen supplemented with 10% 10× minimum essential medium (MEM), 27 mM $NaHCO_3$, 10 mM HEPES, 100 U/mL penicillin, and 100 μg/ml streptomycin (pH 7.4 with NaOH) as described previously [6]. For MDCK cyst growth experiment, MDCK cyst photographs were captured at ×10 magnifications using an inverted microscope (Nikon, TE 2000-S) at day 6. Then, the MDCK media containing either chalcone derivatives (CHAL-005, CHAL-006, CHAL-007, CHAL-011) (100 μM) and forskolin (10 μM) were incubated with cysts on this day. The MDCK media containing forskolin and test compounds were changed every two days for 6 days onwards. Photographs of individual cyst were taken before adding the test compounds. Cyst diameter (μm) was measured using the Image J software. For MDCK cyst formation experiment, the MDCK media containing forskolin (10 μM) with either modified structure of chalcone (CHAL-005) (100 μM) or GlyH-101 (50 μM) were incubated with cysts for 6 days onwards. MDCK cyst photographs were captured at ×10 magnifications using an inverted microscope (Nikon, TE 2000-S) at day 6. Cyst diameter > 50 μm were counted as cyst colonies and cyst diameter < 50 μm were count as non-cyst colonies.

Cell viability assay

The 20,000 cells of MDCK were seeded and grown for 24 h on individual well of 96-wells plate. Chalcone derivative compounds (CHAL-005, CHAL-006, CHAL-007, CHAL-011) at doses of 100 μM were added and incubated with MDCK cells for 24 h. Media containing test compounds were removed, and adherent cells were exposed to serum free media containing 10% MTT solutions (5 mg/ml) for 4 h in humidified atmosphere of 5% CO_2, 95% O_2 at 37 °C. Then, the serum free media containing MTT were removed and 100 μl of DMSO was added. The absorbance of the solution was measured at 530 nm and percentage of cell viability was expressed as 100% of control.

Cell proliferation assay

Cell proliferation assay was measured using BrdU cell proliferation kit (Calbiochem, San diego, CA, USA). MDCK cell (8,000 cells) were seeded into 96-wells plate in DMEM/Ham's F-12 media supplemented with 10% FBS and ITS-supplement and grown for 24 h. Then, cells were incubated with serum free media in the presence or absence of a chalcone derivative at doses of 1-100 μM for 24 h. BrdU reagent was added at 18 h later and incubated for 6 h. Blasticidin (20 μg/ml) treatment was used as a positive control. The absorbance was measured at 490 nm by automated microplate reader and BrdU cell proliferation was calculated as 100% of control.

Ussing chamber experiment

MDCK cells (5×10^5 cells/well) were seeded on Snapwell inserts. MDCK media were changed every two days. On day 8, media from the apical side of MDCK cell monolayer were removed to form an air-liquid interface to enhance CFTR expression in MDCK epithelia. On day 10, only MDCK polarized epithelia monolayers with resistance > 2,000 Ohm.cm^2 were used for subsequent Ussing chamber experiments. Apical chloride current measurements were performed as previously described [6].

Western blot analysis

Western blot analysis was performed as described previously [6, 19]. Briefly, MDCK, *Pkd1*$^{+/-}$, *Pkd1*$^{-/-}$ cells were lysed with ice-cold RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton-X 100, 1 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4, and 1 mM PMSF) containing protease inhibitor cocktail. Samples were centrifuged at 10000 × g and supernatant proteins (40 μg) were separated in 8-10% SDS-PAGE gel. Then, samples were transferred to a nitrocellulose membrane. After blocking non-specific binding by 5% non-fat dry milk at room temperature for 1 h, membranes were incubated with primary antibodies of interested proteins overnight at 4°C. The membranes were washed by TBS-Tween 20 solution three times followed by incubation with secondary

antibody for 1 h. After that the membranes were washed by TBS-Tween 20 solution three times, the band intensity of interested proteins was developed by chemiluminescence (ECL solution).

Statistical analysis

The data of all experiment were expressed as mean ± SEM. The statistical significance of data between control and the treatment groups was determined by one way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's post hoc test, and repeated measure ANOVA, where appropriate. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Chalcone derivatives slowed MDCK cyst enlargement

Previously, it was found that 4 chalcone derivatives (CHAL-005, CHAL-006, CHAL-007, CHAL-011) could inhibit chloride secretion mediated by forskolin in permeabilized MDCK cell monolayers (data not shown). Therefore, these 4 compounds were examined for their inhibitory effect on MDCK cyst enlargement. To rule out the toxic effect, firstly, the effect of chalcone derivative compounds on MDCK cell viability was examined prior to the evaluation of their effects on MDCK cyst growth and cyst formation. Using MTT assay, it was found that all chalcone derivatives tested had no effect on MDCK cell viability (Fig. 1b). To further determine the inhibitory effect of the chalcone derivative compounds on MDCK cyst progression, MDCK cells were suspended in the collagen gel media with or without chalcone derivative compounds at the concentration of 100 μM in the presence of forskolin for 6 days (between day 6 to day 12). The result showed that among 4 compounds examined, only CHAL-005 could significantly inhibit MDCK cyst growth compared to that of control (Fig. 1c). Then, the dose-response of an inhibitory effect of CHAL-005 on MDCK cyst growth was performed. The result showed that CHAL-005 could also slow MDCK cyst growth in a dose-dependent manner (10-100 μM) (Fig. 1d, f). To test whether an inhibitory effect of CHAL-005 on inhibiting cyst colony, MDCK cyst formation experiment was performed. It was found that CHAL-005 inhibited cyst formation by 79% compared with GlyH-101 (a CFTR inhibitor) and the control group (Fig. 1e). These results suggested that CHAL-005 significantly inhibits MDCK cyst progression in a dose-dependent manner without cytotoxicity. Therefore, only CHAL-005 was selected for further study on mechanism of actions in slowing cyst progression in MDCK cells (*in vitro*) and *Pkd1* mutant cells.

CHAL-005 inhibited apical chloride secretion and CFTR expression in MDCK cell

The effect of chalcone derivative (CHAL-005) on CFTR-mediated apical chloride secretion was determined by short-circuit current measurement in basolaterally permeabilized MDCK cell monolayers. Of note, the CHAL-005 at doses of 50-150 μM significantly reduced an apical chloride current stimulated by 20 μM of forskolin in a dose-dependent manner (Fig. 2). To determine the effect of chalcone derivatives on CFTR expression, western blot analysis was performed. Incubation MDCK cell monolayers with CHAL-005 at the concentrations between 50-100 μM for 24 h significantly suppressed CFTR expression in these cells (Fig. 3). Taken together, these findings suggested that CHAL-005 inhibits MDCK cyst progression, in part, by inhibiting CFTR chloride channel activity and expression.

CHAL-005 inhibited cell proliferation through the suppression of ERK1/2 and mTOR/S6K signaling in MDCK cell

An inhibitory effect of CHAL-005 on cell proliferation was investigated using BrdU cell proliferation assay. The results showed that CHAL-005 at a dose of 100 μM markedly suppressed cell proliferation in MDCK cell compared to that of the control (Fig. 4). To determine the mechanism by which chalcone derivative compound (CHAL-005) suppressed cell proliferation, western blot analysis of ERK1/2 and S6 kinase phosphorylation levels was performed. It was found that CHAL-005 at doses between 10-100 μM significantly diminished the expression of phosphorylation ERK1/2 in MDCK cell monolayers (Fig. 5a, b). In addition, CHAL-005 at these doses also strongly reduced the expression of phosphorylation of S6K in MDCK cell monolayers (Fig. 5c, d). Therefore, our findings suggested that CHAL-005 slows MDCK cyst progression, in part, by suppressing cell proliferation through the suppression of ERK1/2 and mTOR/S6K signaling pathways.

CHAL-005 stimulated AMP-activated protein kinase in MDCK and *Pkd1* mutant cells

It has been shown that an activation of AMPK strongly retarded renal cystogenesis through the inhibition of CFTR and mTOR/S6K expression in a mouse model of PKD [11]. Since CHAL-005 could reduce CFTR expression as well as mTOR/S6K expression in MDCK cell, its action to slow MDCK cyst enlargement may involve AMPK-dependent mechanism. Thus, the effect of CHAL-005 on AMPK protein expression was determined. Using western blot analysis, the result showed that CHAL-005 at dose of 100 μM stimulated AMPK expression both in MDCK and *Pkd1* mutant cells (Fig. 6). These results indicated that CHAL-005 retards MDCK cyst progression through the stimulation of AMP-activated protein kinase.

Discussion

Chalcone, an α-β unsaturated ketone, has been shown to possess several biological activities including antiproliferative effect [20], anti-inflammatory effect [12], anti-diarrheal effect [15], and antitumor effect [13]. Considering the effect of chalcone derivative, we performed the experiment using MDCK cyst model to determine whether chalcone derivative could retard renal cyst growth and cyst formation in this *in vitro* model of PKD. An induction of MDCK cyst model to mimic the renal cystogenesis in PKD, MDCK cells were grown and suspended in three-dimensional collagen gels containing forskolin [21]. Chalcone derivatives were incubated with MDCK cyst from day 6 to day 12 onwards. Our results showed that among 4 chalcone derivatives examined (CHAL-005, CHAL-006, CHAL-007, CHAL-011), only CHAL-005 markedly inhibited MDCK cyst enlargement without cytotoxicity. Interestingly, the effect of CHAL-005 in reducing MDCK cyst growth and cyst formation was much greater than that of GlyH-101 (a CFTR inhibitor). This finding suggested that CHAL-005 may slow MDCK cyst progression not only through an inhibition of fluid secretion but also through the inhibition of cell proliferation pathways as well.

Transepithelial fluid secretion is an important mechanism for cyst enlargement. Several previous reports revealed that CFTR chloride channel plays a major role in drawing fluid into the cyst lumen [4, 18]. Inhibition of CFTR function by CFTR inhibitor (thiazolidinone & glycine hydrazide) could retard renal cystogenesis in MDCK and ADPKD mouse model [5]. In the present study, we demonstrated that CHAL-005 significantly inhibited chloride current-mediated by forskolin in permeabilized MDCK cell monolayers in a dose dependent manner. Furthermore, our western blot analysis confirmed that CHAL-005 significantly reduced CFTR expression at doses between 50-100 μM in MDCK cell. This result correlated well with the previous study showing the ability of a chalcone ISLQ to retard MDCK cyst growth by inhibiting CFTR channel activity [17]. The cell proliferation pathways that trigger the cyst formation are also important for PKD progression [3]. Inhibition of several cell proliferation pathways could retard renal cystogenesis and improved renal function in cell and mouse models of PKD [9, 10, 22]. In this study, we found that CHAL-005 suppressed MDCK cell proliferation through the reduction of phosphorylation of ERK1/2 expression. Moreover, it also significantly inhibited mTOR/S6 kinase expression at doses between 10-100 μM after 24 h incubation in MDCK cell monolayers. These findings suggested that CHAL-005 inhibited cell proliferation through ERK1/2 and mTOR/S6K expression. In line with this notion, chalcone ISLQ was found to inhibit lung cancer cell proliferation and migration through the suppression of PI3K/AKT/mTOR signaling [20]. In addition, it was reported that ISLQ and chalcone derivative significantly suppressed adenoid cystic carcinoma cell growth via the inhibition of mTOR

signaling and ERK1/2 pathways by an upregulation of TSC2 protein [16]. Previous study reported that chalcone ISLQ did not alter cAMP levels in human colonic epithelial (T84) cells [17]. Therefore, the broad effects of CHAL-005 in slowing MDCK cyst progression did not likely to involve an alteration of intracellular cAMP level. Taken together, CHAL-005 slowed MDCK cyst growth in part by inhibiting CFTR expression and by reducing of ERK1/2 and mTOR/S6K signaling pathways.

Cell metabolism is one of the targets for the treatment of PKD [23]. AMP-activated protein kinase is a regulation of cell sensing energy. In line with this notion, it was fund that PC1 regulated mTOR activity via phosphorylation of ERK [24]. In addition, an upregulation of AMPK by metformin can downregulate ERK1/2 and mTOR activity in *Pkd1*$^{-/-}$ cell [25]. It has been revealed that an activation of AMPK by metformin strongly slowed MDCK cyst growth and rodent model of ADPKD by inhibiting mTOR/S6K signaling as well as CFTR channel activity and expression [11]. CHAL-005 was also demonstrated to retard MDCK cyst enlargement by inhibiting CFTR activity and expression as well as suppressing mTOR/S6K signaling. Therefore, CHAL-005 might exert its effect to slow MDCK cyst progression via AMPK dependent mechanism. As expected, CHAL-005 (100 μM) was found to significantly increase the level of AMPK both in MDCK and *Pkd1* mutant cells. This result was correlated with the previous study reported that a novel chalcone derivative (CHAL-025) inhibits CFTR chloride channel via AMPK activation and has antidiarrheal effect in a mouse closed loop model of cholera toxin induced fluid secretion [15]. Several lines of evidence suggested that ISLQ stimulated AMPK-mediated GSK3β which protected mitochondrial against iron-catalyzed oxidative stress [26]. In addition, ISLQ also had a cardioprotective effect against ischemic injury through the activation of AMPK [27]. Therefore, it is interesting to observe in the present study that chalcone derivative (CHAL-005) also activated AMPK expression which suppressed MDCK cyst progression.

The pharmacological effect of CHAL-005 to slow MDCK cyst progression observed in the present study was found to involve multitarget proteins. CHAL-005 at low concentration (10 μM) was significantly inhibit cell proliferation through the suppression of ERK1/2 and mTOR/S6K expression. While, the high concentration of CHAL-005 (50-100 μM) was found to suppress CFTR expression and activated AMPK expression, respectively. These combination effects of CHAL-005 in inhibiting cyst enlargement may offer the effective treatment since it likely to suppress several pathways of PKD pathogenesis. However, the detailed mechanisms of CHAL-005 on CFTR, ERK1/2, mTOR, and AMPK are further needed to elucidate.

In conclusion, the present study demonstrates novel mechanisms by which CHAL-005 slows MDCK cyst progression. These occur via the stimulation of AMPK and inhibition of CFTR, ERK1/2 and

mTOR/S6K signaling. However, further study is required to elucidate the detailed mechanism of chalcone derivative (CHAL-005) on renal cystogenesis in an *in vivo* model of PKD. Our findings suggested that chalcone derivative (CHAL-005) could represent as a drug candidate for the treatment of polycystic kidney disease.

Acknowledgements

This work was supported by Ubon Ratchathani University (grant to CY), Thailand Research Fund (TRF) and Office of the Higher Education Commission (MRG6180153 to CY). Financial support from TRF through the grant DBG6180029 (to CM) was also acknowledged.

Conflict of interest

All the authors have declared no competing interests.

Human and animal rights

This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

References

[1] Igarashi P, Somlo S. Genetics and pathogenesis of polycystic kidney disease. J Am Soc Nephrol. 2002;13(9):2384-98.

[2] Wallace DP. Cyclic AMP-mediated cyst expansion. Biochim Biophys Acta. 2011;1812(10):1291-300.

[3] Torres VE, Harris PC. Autosomal dominant polycystic kidney disease: the last 3 years. Kidney Int. 2009; 76(2):149-68.

[4] Davidow CJ, Maser RL, Rome LA, Calvet JP, Grantham JJ. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mediates transepithelial fluid secretion by human autosomal dominant polycystic kidney disease epithelium in vitro. Kidney Int. 1996;50(1):208-18.

[5] Yang B, Sonawane ND, Zhao D, Somlo S, Verkman AS. Small-molecule CFTR inhibitors slow cyst growth in polycystic kidney disease. J Am Soc Nephrol. 2008;19(7):1300-10.

[6] Yuajit C, Homvisasevongsa S, Chatsudthipong L, Soodvilai S, Muanprasat C, Chatsudthipong V. Steviol reduces MDCK Cyst formation and growth by inhibiting CFTR channel activity and promoting proteasome-mediated CFTR degradation. PloS One. 2013;8:e58871.

[7] Yuajit C, Muanprasat C, Gallagher AR, Fedeles SV, Kittayaruksakul S, Homvisasevongsa S, et al. Steviol retards renal cyst growth through reduction of CFTR expression and inhibition of epithelial cell proliferation in a mouse model of polycystic kidney disease. Biochem Pharmacol. 2014;88(3):412-21.

[8] Yamaguchi T, Nagao S, Wallace DP, Belibi FA, Cowley BD, Pelling JC, et al. Cyclic AMP activates B-Raf and ERK in cyst epithelial cells from autosomal-dominant polycystic kidneys. Kidney Int. 2003;63(6):1983-94.

[9] Shibazaki S, Yu Z, Nishio S, Tian X, Thomson RB, Mitobe M, et al. Cyst formation and activation of the extracellular regulated kinase pathway after kidney specific inactivation of Pkd1. Hum Mol Genet. 2008;17(11):1505-16.

[10] Shillingford JM, Murcia NS, Larson CH, Low SH, Hedgepeth R, Brown N, et al. The mTOR pathway is regulated by polycystin-1, and its inhibition reverses renal cystogenesis in polycystic kidney disease. Proc Nati Acad Sci USA. 2006;103(14):5466-71.

[11] Takiar V, Nishio S, Seo-Mayer P, King JDJr, Li H, Zhang L, et al. Activating AMP-activated protein kinase (AMPK) slows renal cystogenesis. Proc Nati Acad Sci USA. 2011;108(6):2462-7.

[12] Li W, Sun YN, Yan XT, Yang SY, Kim S, Lee YM, et al. Flavonoids from Astragalus membranaceus and their inhibitory effects on LPS-stimulated pro-inflammatory cytokine production in bone marrow-derived dendritic cells. Arch Pharm Res. 2014;37(2):186-92.

[13] Zhang XR, Wang SY, Sun W, Wei C. Isoliquiritigenin inhibits proliferation and metastasis of MKN28 gastric cancer cells by suppressing the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. Mol Med Rep. 2018;18(3):3429-36.

[14] Peng F, Du Q, Peng C, Wang N, Tang H, Xie X, et al. A review: the pharmacology of isoliquiritigenin. Phytother Res. 2015;29(7):969-77.

[15] Yibcharoenporn C, Chusuth P, Jakakul C, Rungrotmongkol T, Chavasiri W, Muanprasat C. Discovery of a novel chalcone derivative inhibiting CFTR chloride channel via AMPK activation and its anti-diarrheal application. J Pharmacol Sci. 2019;140(3):273-83.

[16] Sun ZJ, Chen G, Zhang W, Hu X, Huang CF, Wang YF, et al. Mammalian target of rapamycin pathway promotes tumor-induced angiogenesis in adenoid cystic carcinoma: its suppression by isoliquiritigenin through dual activation of c-Jun NH2-terminal kinase and inhibition of extracellular signal-regulated kinase. The J Pharmacol Exp Ther. 2010;334(2):500-2.

[17] Muanprasat C, Sirianant L, Soodvilai S, Chokchaisiri R, Suksamrarn A, Chatsudthipong V. Novel action of the chalcone isoliquiritigenin as a cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) inhibitor: potential therapy for cholera and polycystic kidney disease. J Pharmacol Sci. 2012;118(1):82-91.

[18] Li H, Findlay IA, Sheppard DN. The relationship between cell proliferation, Cl- secretion, and renal cyst growth: a study using CFTR inhibitors. Kidney Int. 2004;66(5):1926-38.

[19] Fedeles SV, Tian X, Gallagher AR, Mitobe M, Nishio S, Lee SH, et al. A genetic interaction network of five genes for human polycystic kidney and liver diseases defines polycystin-1 as the central determinant of cyst formation. Nat Genet. 2011;43(7):639-47.

[20] Tian T, Sun J, Wang J, Liu Y, Liu H. Isoliquiritigenin inhibits cell proliferation and migration through the PI3K/AKT signaling pathway in A549 lung cancer cells. Oncol Lett. 2018;16(5):6133-9.

[21] Sullivan LP, Wallace DP, Grantham JJ. Chloride and fluid secretion in polycystic kidney disease. J Am Soc Nephrol. 1998;9(5):903-16.

[22] Li A, Xu Y, Fan S, Meng J, Shen X, Xiao Q, et al. Canonical Wnt inhibitors ameliorate cystogenesis in a mouse ortholog of human ADPKD. JCI insight. 2018;doi:10.1172/jci.insight.95874

[23] Chang MY, CM Ong A. Targeting new cellular disease pathways in autosomal dominant polycystic kidney disease. Nephrol Dial Transplant. 2018;33(8):1310-6.

[24] Distefano G, Boca M, Rowe I, Wodarczyk C, Ma L, Piontek KB, et al. Polycystin-1 regulates extracellular signal-regulated kinase-dependent phosphorylation of tuberin to control cell size through mTOR and its downstream effectors S6K and 4EBP1. Mol Cell Biol. 2009;29(9):2359-71.

[25] Rowe I, Chiaravalli M, Mannella V, Ulisse V, Quilici G, Pema M, et al. Defective glucose metabolism in polycystic kidney disease identifies a new therapeutic strategy. Nat Med. 2013;19(4):488-93.

[26] Choi SH, Kim YW, Kim SG. AMPK-mediated GSK3beta inhibition by isoliquiritigenin contributes to protecting mitochondria against iron-catalyzed oxidative stress. Biochem Pharmacol. 2010;79(9):1352-62.

[27] Zhang X, Zhu P, Zhang X, Ma Y, Li W, Chen JM, et al. Natural antioxidant-isoliquiritigenin ameliorates contractile dysfunction of hypoxic cardiomyocytes via AMPK signaling pathway. Mediators Inflamm. 2013;2013:390890.

Figures legend

Fig. 1 Effect of CHAL-005 on MDCK cyst progression.

a The structure of CHAL-005 compound. **b** MDCK cell viability was assayed by MTT assay. The graph represented cell viability after incubated with DMSO (control) or CHAL-005, CHAL-006, CHAL-007, CHAL-011 (100 μM) for 24 h (mean of percent control ± SE, $n = 4$, NS; not significant). **c** An Inhibitory effect of the chalcone derivative compounds on MDCK cyst growth was shown. The graph represented MDCK cyst diameter

at day 12 after treatment with DMSO (control), GlyH-101 (50 μM), CHAL-005, CHAL-006, CHAL-007, CHAL-011 (100 μM) for 6 day onward (cyst diameter ± SE, $n > 50$ cysts, 4 independent experiments, ***$P < 0.001$, NS; not significant). **d** Dose-response of CHAL-005 on MDCK cyst growth was shown. The graph represented MDCK cyst growth at day 12 after treatment with CHAL-005 at doses of 0, 1, 10, 50, 100 μM for 6 day onward (cyst diameter ± SE, $n > 54$-66 cysts, 4 independent experiments, *$P < 0.05$, ***$P < 0.001$, NS; not significant). **e** An Inhibitory effect of CHAL-005 on MDCK cyst formation was shown. The graph represented percent of MDCK cyst colonies at day 6 after treatment with DMSO (control), GlyH-101 (50 μM), and CHAL-005 (100 μM) for 6 days (mean ± SE, 4 independent experiments, $n = 4$ well/condition, ***$P < 0.001$). **f** Representative of light micrographs of MDCK cyst growth in collagen gels was shown. Light micrograph was captured at day 6-12 after cell seeding of MDCK cell presenting with 10 μM of forskolin (control), 1, 10, 50, and 100 μM of CHAL-005 were added for 6 day onward after cell seeding in gels. Scale bar = 100 μm and 10× magnification.

Fig. 2 Effect of CHAL-005 on forskolin-mediated chloride secretion in MDCK cells.

Under permeabilized condition, MDCK cell monolayers were mount in hemichamber bathing with chloride gradient buffer. **a** Representative current of apical chloride current after stimulating by forskolin. CHAL-005 at all dose was added into both apical and basolateral hemichamber. The current was record at dose of 20, 50, 100, 150 μM and at the end of the experiment, GlyH-101 (50 μM), a CFTR inhibitor, was added. **b** Representative of apical short-circuit current tracing after incubation of CHAL-005 at dose of 20-150 μM was shown as a bar graph (6 independent experiments, mean of percent control ± SE, *$P < 0.05$, ***$P < 0.001$, NS; not significant).

Fig. 3 Effect of CHAL-005 on CFTR protein expression in MDCK cells.

a MDCK cells were incubated with CHAL-005 at all dose for 24h and were performed by western blot analysis. Representative bands of CFTR and β-actin were shown. **b** The band intensity was represented as a histogram of indicated proteins in CHAL-005 at dose of 0, 1, 10, 50, 100 μM in MDCK cells. Data were expressed as mean of 100% control ± S.E, 4 independent experiments, **$P < 0.01$, NS; not significant.

Fig. 4 Effect of CHAL-005 on cell proliferation in MDCK cells.

MDCK cell proliferation was measured by BrdU incorporation. **a** The graph represented mean of percent MDCK cell proliferation after incubation with DMSO (control), CHAL-005 at dose of 100 μM, and 20 μg/ml of blasticidin (a positive control) for 24 h (mean of percent control ± SE, $n = 4$, ***$P < 0.001$ compared to that of control).

Fig. 5 Effect of CHAL-005 on phosphorylation of ERK1/2 and phosphorylation of S6K proteins expression in MDCK cells.

a MDCK cell lysates were performed by western blot analysis. Representative bands of p-ERK1/2, t-ERK1/2, and β-actin were shown. **b** The band intensity was represented as a histogram of indicated proteins in CHAL-005 treated MDCK cells (0, 1, 10, 50, 100 μM). Data were expressed as mean of 100% control ± S.E, 4 independent experiments, $^{**}P < 0.01$, NS; not significant. **c** MDCK cell lysates were performed by western blot analysis. Representative bands of p-S6K, t-S6K, and β-actin were shown. **d** The band intensity was represented as a histogram of indicated proteins in CHAL-005 treated MDCK cells (0, 1, 10, 50, 100 μM). Data were expressed as mean of 100% control ± S.E, 4 independent experiments, $^{*}P < 0.05$, NS; not significant.

Fig. 6 Effect of CHAL-005 on phosphorylation of AMP-activated protein kinase expression in MDCK and *Pkd1* mutant cells.

a MDCK cell lysates were performed by western blot analysis. Representative bands of p-AMPK, AMPKα, and β-actin were shown. **b** The band intensity was represented as a histogram of indicated proteins in CHAL-005 treated MDCK cell (0, 1, 10, 50, 100 μM). Data were expressed as mean of 100% control ± S.E, 4 independent experiments, $^{**}P < 0.01$, NS; not significant. **c** $Pkd1^{+/-}$ cell lysates were performed by western blot analysis. Representative bands of p-AMPK, AMPKα, and β-actin were shown. **d** The band intensity was represented as a histogram of indicated proteins in CHAL-005 treated $Pkd1^{+/-}$ cell (0, 1, 10, 50, 100 μM). Data were expressed as mean of 100% control ± S.E, 4 independent experiments, $^{**}P < 0.01$, NS; not significant. **e** $Pkd1^{-/-}$ cell lysates were performed by western blot analysis. Representative bands of p-AMPK, AMPKα, and β-actin were shown. **f** The band intensity was represented as a histogram of indicated proteins in CHAL-005 treated $Pkd1^{-/-}$ cell (0, 1, 10, 50, 100 μM). Data were expressed as mean of 100% control ± S.E, 4 independent experiments, $^{*}P < 0.05$, NS; not significant.

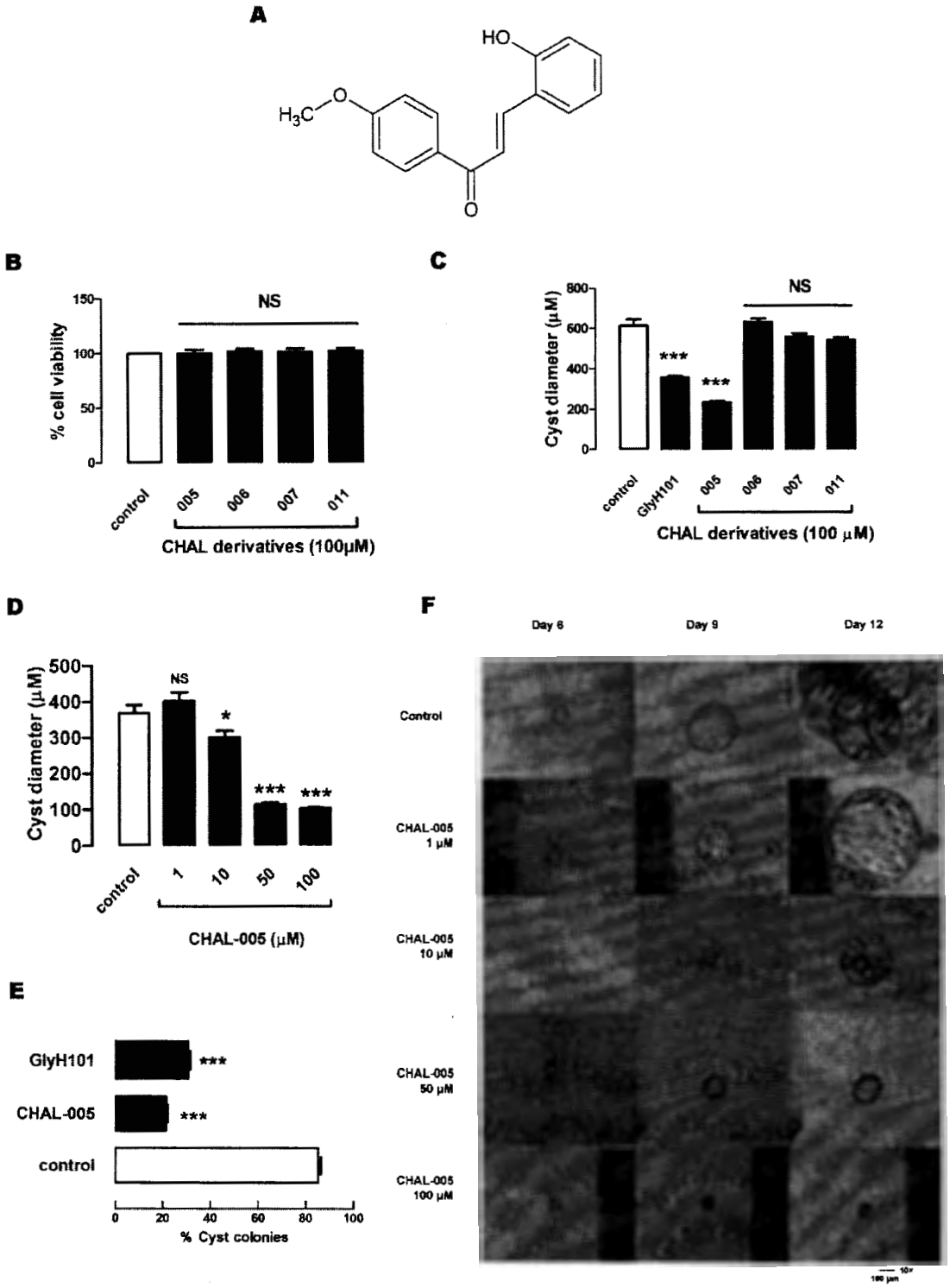

A
HO
H_3C
O
O
B
% cell viability
150
100
50
0
NS
control
005
006
007
011
CHAL derivatives (100μM)
C
Cyst diameter (μM)
800
600
400
200
0
NS
***
***
control
GlyH101
005
006
007
011
CHAL derivatives (100 μM)
D
Cyst diameter (μM)
500
400
300
200
100
0
NS
*
***
***
control
1
10
50
100
CHAL-005 (μM)
E
GlyH101
***
CHAL-005
***
control
0
20
40
60
80
100
% Cyst colonies
F
Day 6
Day 9
Day 12
Control
CHAL-005 1 μM
CHAL-005 10 μM
CHAL-005 50 μM
CHAL-005 100 μM

Figure 1

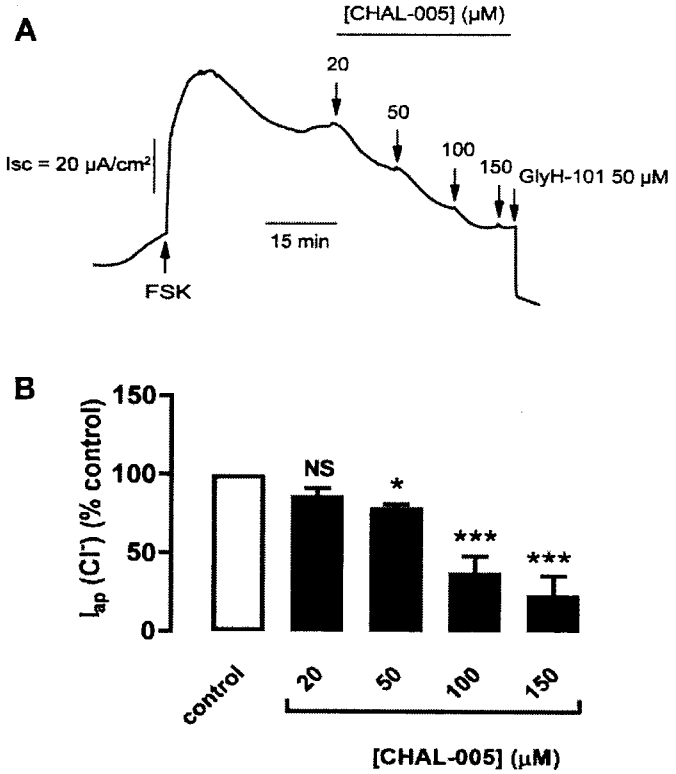

A
[CHAL-005] (μM)
20
50
100
150
GlyH-101 50 μM
Isc = 20 μA/cm²
15 min
FSK
B
150
100
50
0
I_{ap} (Cl^-) (% control)
NS
*
***
***
control
20
50
100
150
[CHAL-005] (μM)

Figure 2

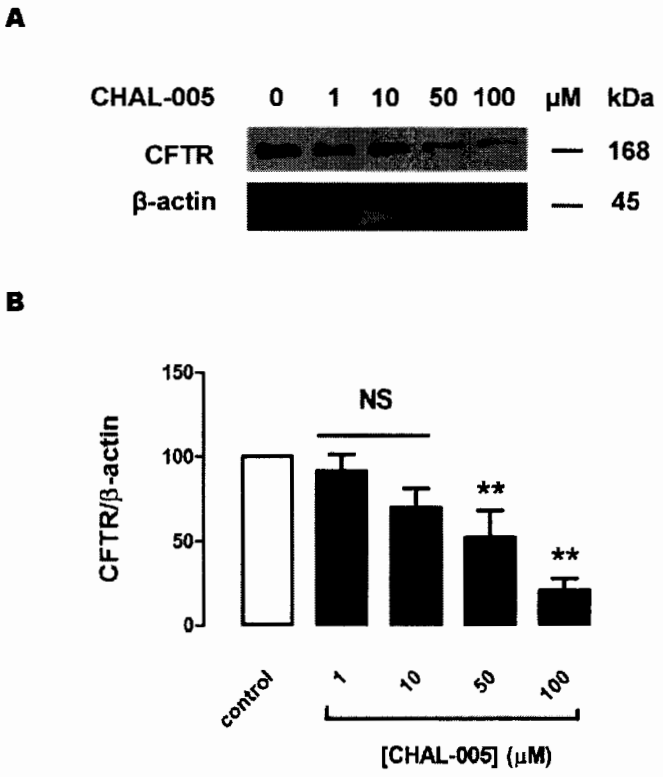

A
CHAL-005 0 1 10 50 100 μM kDa
CFTR
β-actin
168
45
B
CFTR/β-actin
150
100
50
0
NS
**
**
control
1
10
50
100
[CHAL-005] (μM)

Figure 3

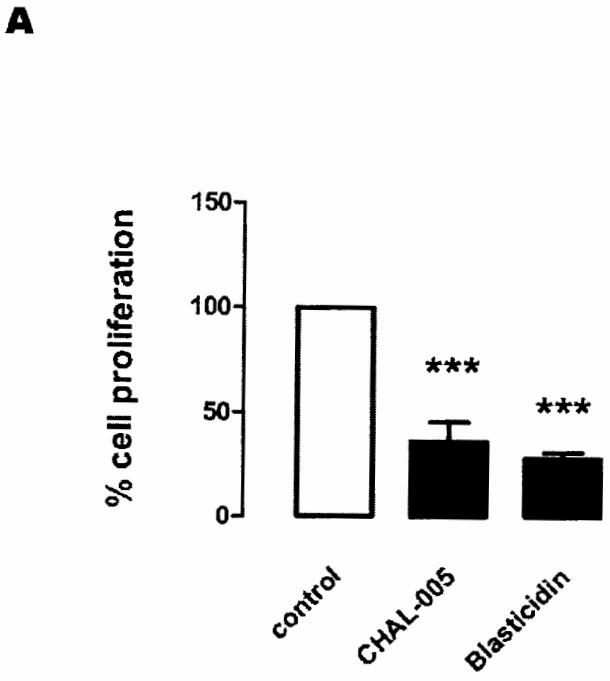


Figure 4

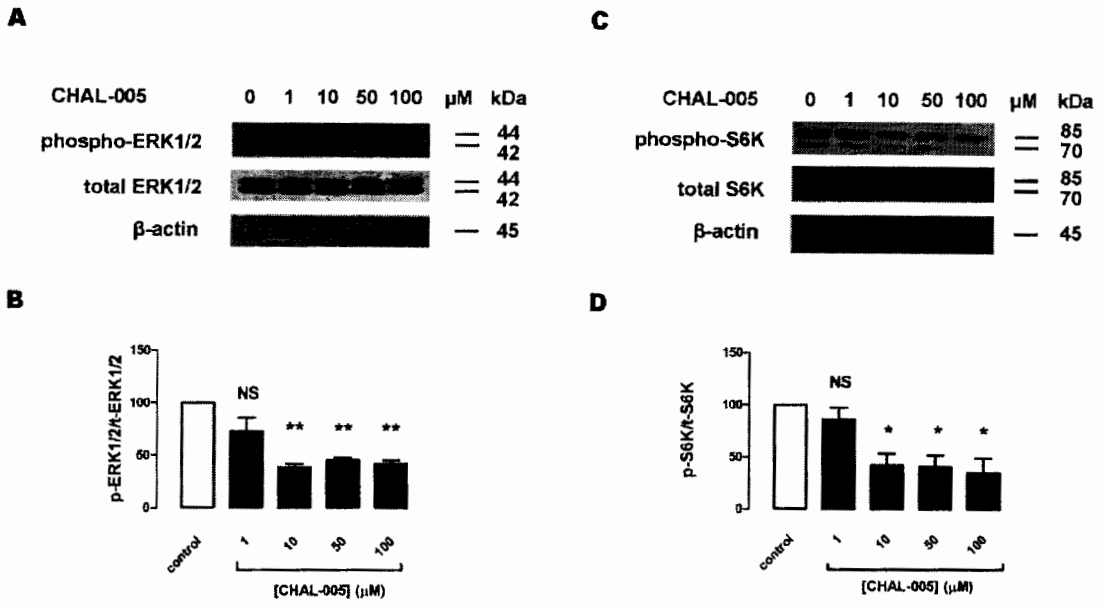


Figure 5

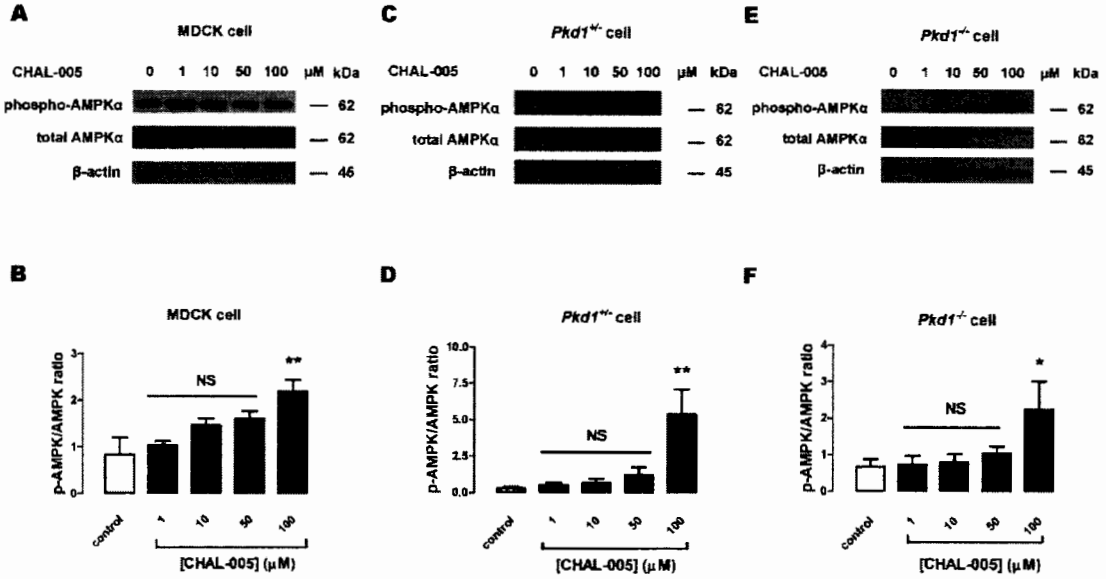

A
MDCK cell
CHAL-005 0 1 10 50 100 μM kDa
phospho-AMPKα — 62
total AMPKα — 62
β-actin — 46
C
Pkd1+/- cell
CHAL-005 0 1 10 50 100 μM kDa
phospho-AMPKα — 62
total AMPKα — 62
β-actin — 45
E
Pkd1-/- cell
CHAL-005 0 1 10 50 100 μM kDa
phospho-AMPKα — 62
total AMPKα — 62
β-actin — 45
B
MDCK cell
p-AMPK/AMPK ratio
NS
**
control 1 10 50 100
[CHAL-005] (μM)
D
Pkd1+/- cell
p-AMPK/AMPK ratio
NS
**
control 1 10 50 100
[CHAL-005] (μM)
F
Pkd1-/- cell
p-AMPK/AMPK ratio
NS
*
control 1 10 50 100
[CHAL-005] (μM)

Figure 6

PROCEEDINGS

Research and Innovations for All

ผลงานนำเสนอแบบโปสเตอร์

ประมวลบทความในการประชุมวิชาการระดับชาติ มอบ.วิจัย ครั้งที่ 14

3-4 กันยายน 2563
ณ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

RESEARCH AND INNOVATIONS FOR ALL

สารอนุพันธ์ชาลโคนชะลอการเติบโตของซีสต์ในเซลล์โมเดลโรคถุงน้ำในไต ผ่านการยับยั้งกระบวนการแบ่งเซลล์ใหม่

พีระฉัตร วีระพันธ์[1] สุวภรณ์ แดนดี[2] และ เชาวลิต ยั่วจิตร[2*]
[1]หลักสูตรชีวเวชศาสตร์ วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
[2]กลุ่มวิชาแพทยศาสตร์ วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
*E-mail: chaowalit.y@ubu.ac.th

บทคัดย่อ

โรคถุงน้ำในไตแบบพันธุกรรมเด่นเป็นโรคทางพันธุกรรมของไตที่พบบ่อย มีสาเหตุเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *PKD1* หรือยีน *PKD2* กระตุ้นการสร้างถุงน้ำขึ้นทั่วไตทั้งสองข้าง พยาธิสรีรวิทยาของโรคเกี่ยวข้องกับการทำงานของกระบวนการแบ่งเซลล์ที่ผิดปกติ ที่สามารถถูกกระตุ้นจากการเพิ่มการทำงานของโปรตีน p-ERK1/2 ควบคู่กับการหลั่งของสารน้ำเข้าสู่ถุงซีสต์ ส่งผลให้ลดประสิทธิภาพการทำงานของไตจนเป็นอีกหนึ่งสาเหตุของโรคไตวายเรื้อรังและเสียชีวิตในที่สุด ในปัจจุบันยังไม่มียาที่รักษาโรคที่มีความจำเพาะ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบสารอนุพันธ์ชาลโคนมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามากมาย อาทิ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง นอกจากนี้ยังพบว่าสารอนุพันธ์ชาลโคนสามารถชะลอการเจริญของซีสต์ในเซลล์โมเดล MDCK ได้ โดยยับยั้งการหลั่งของคลอไรด์ผ่านการทำงานของโปรตีนขนส่ง CFTR อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาฤทธิ์ของสารอนุพันธ์ชาลโคนในการยับยั้งการแบ่งเซลล์ใหม่ในโรคถุงน้ำในไต การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ของสารอนุพันธ์ชาลโคน (CHAL-025) ต่อการยับยั้งกระบวนการแบ่งเซลล์ใหม่ของซีสต์ในเซลล์โมเดลโรคถุงน้ำในไต MDCK ผลการทดลองพบว่าสาร CHAL-025 สามารถชะลอการเติบโตของซีสต์ในเซลล์โมเดลโรคถุงน้ำในไต MDCK อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อใช้วิธี BrdU cell proliferation assay ในการวัดการแบ่งตัวใหม่ของเซลล์ท่อไต MDCK พบว่า สาร CHAL-025 สามารถลดการแบ่งเซลล์ใหม่ของเซลล์ MDCK ได้อย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี western blot analysis เป็นที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งว่าสาร CHAL-025 สามารถลดการแสดงออกของโปรตีน p-ERK1/2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารอนุพันธ์ชาลโคน (CHAL-025) สามารถชะลอการเจริญเติบโตของถุงซีสต์ในเซลล์โมเดล MDCK โดยยับยั้งกระบวนการแบ่งเซลล์ใหม่ผ่านการลดการแสดงออกของโปรตีน p-ERK1/2 ดังนั้นสาร CHAL-025 น่าจะสามารถนำไปพัฒนาเป็นยารักษาโรคถุงน้ำในไตได้

คำสำคัญ : สารอนุพันธ์ชาลโคน การแบ่งเซลล์ โปรตีน ERK1/2 การเจริญของถุงซีสต์ในเซลล์ MDCK

Chalcone Derivative slows MDCK cyst Growth through the Inhibition of Cell Proliferation Pathway

Peerachat Veeraphan[1], Suwaporn Deandee[2] and Chaowalit Yuajit[2*]
[1]Biomedical Science Program, College of Medicine and Public Health, Ubon Ratchathani University
[2]Division of Medicine, College of Medicine and Public Health, Ubon Ratchathani University
*E-mail: chaowalit.y@ubu.ac.th

Abstract

Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) is the most common renal genetic disorder. It caused by mutation of either *PKD1* or *PKD2* gene which activates fluid filled-cysts along the nephron. ADPKD pathophysiology is characterized by abnormal cell proliferation which could stimulate through the activation of p-ERK1/2 signaling corroborates with fluid secretion. Cyst progression reduces renal function and could lead to end-stage renal disease. Currently, there are no specific interventions. Chalcone derivatives have various pharmacological properties such as anti-bacterial, anti-inflammation, antioxidant, and anticancer. In addition, chalcone was found to slow MDCK cyst progression through the inhibition of CFTR activity. However, the effect of chalcone derivative on cell proliferation in PKD was still unknow. Therefore, the present study was aimed to determine an effect

and underlying mechanism of chalcone derivative (CHAL-025) on cell proliferation in MDCK cyst model of PKD. The results showed that CHAL-025 significantly retards MDCK cyst growth. Using BrdU cell proliferation assay, it was found that CHAL-025 strongly suppresses MDCK cell proliferation. Interestingly, CHAL-025 reduced phosphorylation of ERK1/2 protein expression. Taken together, these findings suggested that CHAL-025 slows MDCK cyst enlargement by inhibiting cell proliferation via the reduction of ERK1/2 pathway. CHAL-025 can be used as a drug candidate for the treatment of autosomal dominant polycystic kidney disease.

Keywords : Chalcone derivative, Cell proliferation, ERK1/2, MDCK cyst growth

บทนำ

โรคถุงน้ำในไตแบบพันธุกรรมเด่น (Autosomal dominant polycystic kidney disease หรือ ADPKD) เป็นโรคทางพันธุกรรมของไตที่พบบ่อยในผู้ใหญ่ มีสาเหตุเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *PKD1* หรือยีน *PKD2* ซึ่งถอดรหัสได้โปรตีน polycystin-1 และ polycystin-2 ตามลำดับ (Harris & Torres, 2009) ความสำคัญของทั้งสองยีนนี้เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของเซลล์ท่อไต เมื่อเกิดความผิดปกติของยีนดังกล่าวทำให้กระตุ้นการสร้างและการเติบโตของถุงซีสต์ทั่วไตทั้งสองข้างและกดเบียดส่วนของเนื้อไตที่ปกติ ทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของไตลดลงจนนำไปสู่โรคไตวายเรื้อรังในที่สุด ผู้ป่วยจะได้รับการรักษาโดยการฟอกไตและเปลี่ยนถ่ายอวัยวะ (Chebib & Torres, 2016) ปัจจุบันยังไม่มียาที่มีความจำเพาะในการรักษา

การสร้างและการเติบโตของถุงซีสต์ในโรคถุงน้ำในไต อาศัยกระบวนการแบ่งตัวใหม่ของเซลล์ท่อไต (cell proliferation) กระตุ้นให้เกิดการสร้างถุงซีสต์และกระบวนการหลั่งสารน้ำเข้าสู่ถุงซีสต์ (fluid secretion) ทำให้ซีสต์ขยายขนาด มีหลายการศึกษาพบว่า วิถีสัญญาณ (signaling pathway) หลายชนิดเกี่ยวข้องกับการเติบโตของซีสต์ และหนึ่งในวิถีสัญญาณที่สำคัญคือการเพิ่มปริมาณของ cAMP ที่เกิดจากความไม่สมดุลของแคลเซียมภายในเซลล์ ส่งผลให้ระดับของ cAMP เพิ่มขึ้น ทำให้กระตุ้นการทำงานของโปรตีนขนส่งคลอไรด์ CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) เกิดการหลั่งคลอไรด์และน้ำเข้ามาภายในถุงซีสต์ และ cAMP ยังกระตุ้นการทำงานของ MEK/ERK1/2 pathway นำไปสู่การแบ่งเซลล์ที่เพิ่มมากขึ้น (Wallace, 2011) นอกจากโปรตีน ERK1/2 จะเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์ใหม่แล้ว ยังสามารถกระตุ้นการทำงานของโปรตีน mTOR/S6K pathway ได้โดยการ phosphorylation โปรตีน TSC1/2 complex ทำให้ไม่สามารถไปยับยั้งการทำงานของ mTOR เป็นผลให้เกิดการแบ่งเซลล์ใหม่ จะเห็นได้ว่าการยับยั้งการทำงานของโปรตีน ERK1/2 เป็นอีกหนึ่งเป้าหมายในการรักษาโรคถุงน้ำในไต (Chapin & Caplan, 2010)

สารชาลโคนเป็นสารสกัดจากธรรมชาติ ได้จากดอกทองกวาวเหลือง ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรที่สามารถพบได้ทั่วไปในประเทศไทย มีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยามากมาย เช่น มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์และยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง (Gomes et al., 2017) สารอนุพันธ์ชาลโคนสามารถต้านการหลั่งของสารน้ำในโมเดลของโรคท้องร่วง (diarrhea) โดยยับยั้งการทำงานของโปรตีน CFTR ผ่านการกระตุ้นการทำงานโปรตีน AMPK (Yibcharoenporn et al., 2019) นอกจากนี้ยังสามารถชะลอการเจริญของซีสต์ในเซลล์โมเดล MDCK โดยยับยั้งการทำงานของโปรตีน CFTR (Muanprasat et al., 2012) อย่างไรก็ตามกลไกของสารอนุพันธ์ชาลโคนในการชะลอการเติบโตของซีสต์ผ่านการยับยั้งกลไกการแบ่งเซลล์ใหม่ในเซลล์โมเดล MDCK ยังไม่ทราบแน่ชัด ดังนั้นการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ของสารอนุพันธ์ชาลโคนในการชะลอการเติบโตของซีสต์ผ่านการยับยั้งกระบวนการแบ่งเซลล์ใหม่ในเซลล์โมเดลโรคถุงน้ำในไต MDCK

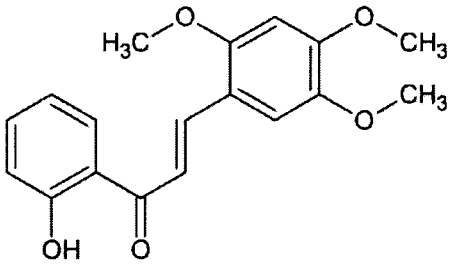
วิธีการวิจัย

1. สารเคมี

สารอนุพันธ์ชาลโคน (CHAL-025) (รูปที่ 1) ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรินทร ชวศิริ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ความบริสุทธิ์ของสารอนุพันธ์ชาลโคน ถูกตรวจสอบโดยวิธี thin layer chromatography และ nuclear magnetic resonance spectroscopy โดยความบริสุทธิ์ของสารอนุพันธ์

ชาลโคน (CHAL-025) มีค่ามากกว่าร้อยละ 99 ในการเตรียมสารละลายของสารอนุพันธ์ชาลโคน (CHAL-025) จะละลายด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) ที่ความเข้มข้น 1% เพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดพิษต่อเซลล์ท่อไต ในการทดลองจะหลีกเลี่ยงการ freeze-thaw cycling น้อยกว่า 5 ครั้งต่อ 1 aliquot เพื่อให้ฤทธิ์ของสาร CHAL-025 คงที่ตลอดการทดลอง

สารเคมีที่ใช้ในการศึกษานี้ได้แก่ Collagen type I (PureCol) จาก Advanced BioMatrix (Fremont, CA, USA), DMEM/Ham F-12, penicillin, streptomycin, และ FBS จาก Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), Interferon γ, blasticidin, GlyH101, และ ECL-solution จาก Calbiochem (San Diego, CA, 86 USA), Primary antibodies ได้แก่ anti-p-ERK1/2, anti-t-ERK1/2, และ anti-β-actin จาก Cell Signaling (Beverly, MA, USA) และ Protease inhibitor จาก Roche (Indianapolis, IN, USA)



รูปที่ 1 โครงสร้างของสารอนุพันธ์ชาลโคน (CHAL-025)

2. ชนิดของเซลล์และการเพาะเลี้ยง

เซลล์ท่อไตสุนัข MDCK (Madin-Darby canine kidney) เป็นเซลล์ท่อไตส่วน collecting duct ชนิดที่ 1 ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof.David N. Sheppard, University of Bristol, Bristol, UK โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร DMEM/F-12 Ham ที่เติม 10% fetal bovine serum, 5 μg/mL insulin, 5 μg/mL transferrin, 5 μg/mL selenium X, 100 U/mL penicillin, and 100 μg/mL streptomycin และเลี้ยงในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีความชื้น 5% CO_2, 95% O_2

3. การศึกษาการเติบโตของซีสต์ในเซลล์โมเดลโรคถุงน้ำในไต MDCK

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ MDCK จำนวน 800 เซลล์ต่อหลุม ในคอลลาเจนเจล ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตรที่ประกอบด้วย 10% 10× minimum essential medium (MEM), 27 mM $NaHCO_3$, 10 mM HEPES, 100 U/mL penicillin, and 100 μg/mL streptomycin (pH 7.4 with NaOH) ใน 24-wells plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที เพื่อให้เจลแข็งตัว จากนั้นใส่ MDCK media ที่ผสม 10% FBS และ forskolin 10 ไมโครโมลาร์ ลงไปเพื่อกระตุ้นให้เซลล์ MDCK สร้างซีสต์ ปริมาตรหลุมละ 1.5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 6 วัน ซึ่งจะเปลี่ยนมีเดียทุก 2 วัน เมื่อเกิดซีสต์แล้วจะใส่สาร DMSO ในกลุ่มควบคุม และสาร CHAL-025 ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ในกลุ่มทดลอง ผสมกับมีเดียและ forskolin 10 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 วัน เปลี่ยนมีเดียทุก 2 วัน ถ่ายภาพซีสต์ ณ วันที่ 6, 9, และ 12

4. การศึกษาการแบ่งเซลล์ใหม่ด้วยวิธี BrdU cell proliferation

วัดการแบ่งเซลล์ใหม่ด้วยวิธี BrdU cell proliferation ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์จำนวน 8,000 เซลล์ ใน 96-well plate ด้วยมีเดียเลี้ยงเซลล์ที่ผสม 10% FBS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใส่สาร DMSO (กลุ่มควบคุม) และในกลุ่มทดลอง ใส่สาร CHAL-025 ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ โดยผสมกับมีเดียที่ปราศจากซีรัมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมสาร BrdU ในชั่วโมงที่ 18 และบ่มต่อให้ครบ 24 ชั่วโมง ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร โดย microplate reader และคำนวณ % cell proliferation เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยการคำนวณ

$$\% \text{ cell proliferation} = \frac{\text{OD ของกลุ่มตัวอย่าง}}{\text{OD ของกลุ่มควบคุม}} \times 100$$

5. การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนโดยวิธี western blot analysis

วัดการแสดงออกของโปรตีน ERK1/2, p-ERK1/2, β-actin ด้วยวิธี western blot analysis โดยทำการสกัดโปรตีนจากเซลล์ด้วย RIPA buffer จากนั้นทำการแยกโปรตีนโดยใช้ 10% SDS-PAGE gel electrophoresis จากนั้นย้ายโปรตีนลงแผ่น nitrocellulose membrane และบ่มด้วย 5% nonfat dry milk ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดทำการบ่มเมมเบรนกับ primary antibody ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นทำการล้างแผ่นเมมเบรนด้วย TBST solution ประมาณ 3 ครั้ง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นบ่มด้วย secondary antibody เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย TBST solution และเติม chemiluminescence (ECL) วัดความเข้มของโปรตีนโดยใช้โปรแกรม Image J

6. การวิเคราะห์ทางสถิติ

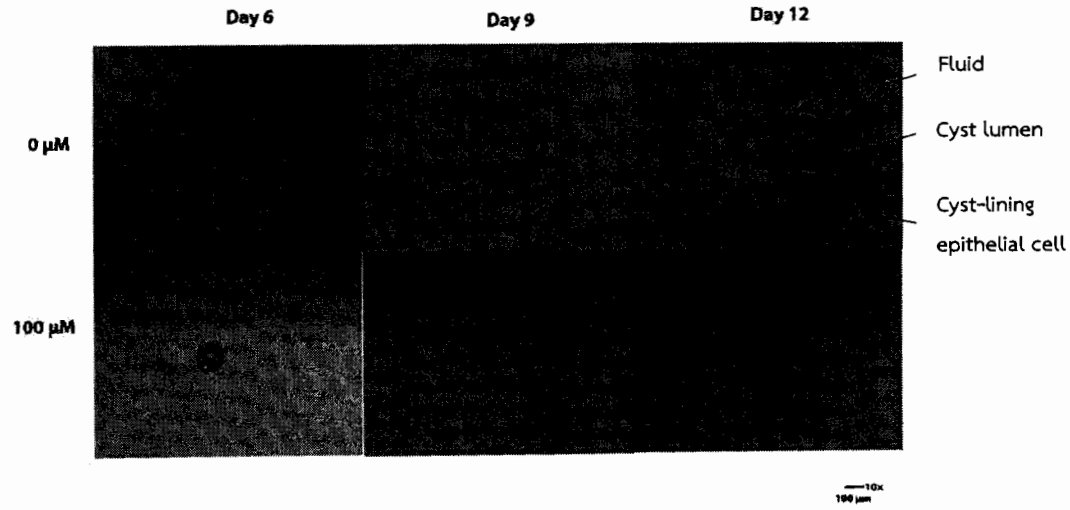
ข้อมูลทั้งหมดจะประเมินค่านัยสำคัญทางสถิติโดยการเปรียบเทียบค่า mean ±SEM โดยใช้สถิติ one way ANOVA (Bonferroni's post hoc test) เพื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม กำหนดค่านัยสำคัญทางสถิติอยู่ที่ $P < 0.05$ คำนวณค่าทางสถิติโดยใช้โปรแกรม GraphPad prism

ผลการวิจัย

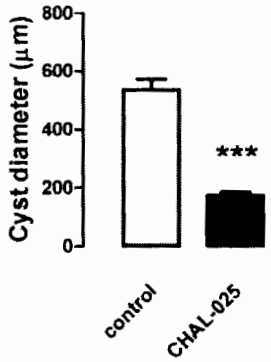
1. ฤทธิ์ของสารอนุพันธ์ชาลโคน (CHAL-025) ต่อการเติบโตของซีสต์ในเซลล์โมเดลโรคถุงน้ำในไต MDCK

ศึกษาฤทธิ์ของสารอนุพันธ์ชาลโคน CHAL-025 ต่อการเติบโตของซีสต์ในเซลล์โมเดลโรคถุงน้ำในไต MDCK โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ท่อไต MDCK ในคอลลาเจนเจลและกระตุ้นด้วยสาร forskolin ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ เพื่อกระตุ้นให้เกิดการสร้างซีสต์เป็นเวลา 6 วัน จากนั้นในวันที่ 6 ถึง 12 ใส่สาร DMSO (กลุ่มควบคุม) และสาร CHAL-025 ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ผสมกับ forskolin เปลี่ยนมีเดียที่ผสมสารทุก 2 วัน ทำการถ่ายรูปและวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของซีสต์ในวันที่ 6, 9, และ 12 ผลการทดลองปรากฏว่าสาร CHAL-025 ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ สามารถชะลอการเติบโตของซีสต์ในเซลล์โมเดลโรคถุงน้ำในไต MDCK ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 2A และ 2B) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสาร CHAL-025 สามารถชะลอการเติบโตของซีสต์ในเซลล์โมเดลโรคถุงน้ำในไต MDCK ได้

A



B

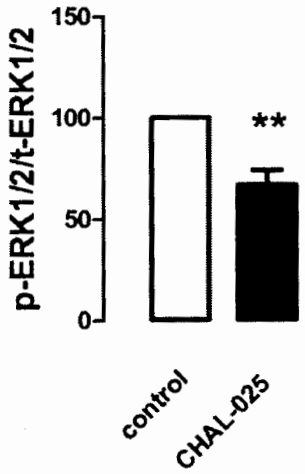


รูปที่ 2 ฤทธิ์ของสารอนุพันธ์ชาลโคน CHAL-025 ต่อการเติบโตของซีสต์ในเซลล์โมเดลโรคถุงน้ำในไต MDCK รูป A แสดงภาพการเติบโตของซีสต์จากเซลล์ MDCK ที่เพาะเลี้ยงในคอลลาเจนเจล เมื่อใส่สาร CHAL-025 ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ณ วันที่ 6, 9, และ 12 (scale bar = 100 µm และ 10× magnification) รูป B แสดงกราฟขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของซีสต์ในวันที่ 12 หลังจากที่ทดสอบด้วยสาร CHAL-025 100 ไมโครโมลาร์ (mean ± SEM, $n > 40$ cysts, $^{***}P < 0.001$)

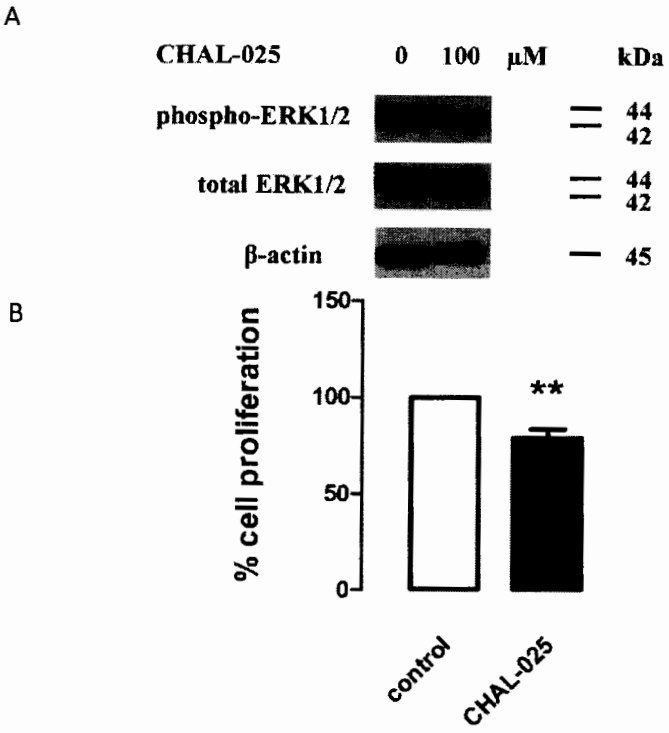
2. ฤทธิ์ของสารอนุพันธ์ชาลโคน (CHAL-025) ต่อการยับยั้งกระบวนการแบ่งเซลล์ใหม่ในเซลล์ท่อไต MDCK

ทำการศึกษาฤทธิ์ของสาร CHAL-025 ต่อการยับยั้งการแบ่งตัวใหม่ของเซลล์ท่อไต MDCK ด้วยวิธี BrdU cell proliferation assay ผลการทดลองพบว่าสาร CHAL-025 ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ สามารถยับยั้งการแบ่งเซลล์ใหม่ของเซลล์ท่อไต MDCK อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 3) จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสาร CHAL-025 สามารถยับยั้งกระบวนการแบ่งเซลล์ได้

จากนั้นทำการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสาร CHAL-025 ต่อการแสดงออกของโปรตีน p-ERK1/2 ซึ่งเป็นโปรตีนที่กระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ ด้วยวิธี western blot analysis ผลปรากฏว่าสาร CHAL-025 ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ สามารถลดการแสดงออกของโปรตีน p-ERK1/2 ในเซลล์ท่อไต MDCK อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 4A และ 4B)



รูปที่ 3 ฤทธิ์ของสาร CHAL-025 (100 µM) ต่อการแบ่งเซลล์ใหม่ในเซลล์ท่อไต MDCK เมื่อใส่สาร CHAl-025 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และวัดการแบ่งเซลล์ใหม่ด้วยวิธี BrdU cell proliferation assay (mean ± SEM, $n > 4$, $^{**}P<0.01$)



รูปที่ 4 ฤทธิ์ของสาร CHAL-025 ต่อการแสดงออกของโปรตีน p-ERK1/2 ในเซลล์ MDCK รูป A แสดงการแสดงออกของโปรตีน p-ERK1/2, t-ERK1/2 และ β-actin รูป B แสดงกราฟความเข้มของโปรตีน p-ERK1/2/ERK1/2 ในกลุ่มควบคุม (DMSO) และกลุ่มที่ใส่สาร CHAL-025 ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (mean ± SEM, n = 4, $^{**}P < 0.01$)

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

ปัจจุบันการรักษาโรคถุงน้ำในไตแบบพันธุกรรมเด่นยังไม่มียารักษาอย่างจำเพาะ ดังนั้นการวิจัยเพื่อพัฒนายารักษาโรคถุงน้ำในไตจึงมุ่งเน้นไปที่การหากลไกของสารสังเคราะห์ ยา หรือสารสมุนไพรที่สามารถลดระดับ cAMP ภายในเซลล์ (reduction of intracellular cAMP level) ยับยั้งกระบวนการแบ่งตัวของเซลล์ (inhibition of cell proliferation) และยับยั้งการหลั่งสารน้ำลงสู่ถุงซีสต์ (inhibition of fluid secretion) หลายการศึกษารายงานเกี่ยวกับสารสังเคราะห์และยาที่สามารถยับยั้งการเติบโตของซีสต์ได้ทั้งในเซลล์โมเดล (*in vitro*) และในหนูโมเดลโรคถุงน้ำในไต (*in vivo*) (Y. Sun, Zhou, & Yang, 2011) นอกจากนี้ยังพบว่ามีสารสมุนไพรมากมายที่มีฤทธิ์ในการชะลอการเติบโตของซีสต์โดยยับยั้งกระบวนการแบ่งเซลล์ใหม่และการหลั่งสารน้ำได้ เช่น สารสกัดจากขมิ้นชัน (curcumin) (Gao et al., 2011) สารสกัดจากแป๊ะก๊วย (ginkgolide B) (Zhou et al., 2012) และสารสกัดจากใบหญ้าหวาน (steviol) (Yuajit et al., 2014) สารอนุพันธ์ชาลโคน (chalcone isoliquiritigenin) สามารถยับยั้งการเจริญของซีสต์ในเซลล์โมเดลโรคถุงน้ำในไต MDCK ได้ ผ่านการลดการทำงานของโปรตีนขนส่งคลอไรด์ CFTR (Muanprasat et al., 2012) การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ของสารอนุพันธ์ชาลโคน (CHAL-025) ในการชะลอการเติบโตของซีสต์ในเซลล์โมเดลโรคถุงน้ำในไต MDCK ผ่านการยับยั้งการแบ่งเซลล์ใหม่ โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ท่อไต MDCK ในคอลลาเจนเจล แล้วกระตุ้นการเติบโตของซีสต์ด้วยสาร forskolin การเพาะเลี้ยงซีสต์จากเซลล์ท่อไต MDCK เป็นเซลล์โมเดลโรคถุงน้ำในไตที่นิยมกันอย่างแพร่หลาย ซีสต์ที่เกิดขึ้นมีลักษณะเหมือนกับพยาธิสรีรวิทยาของโรคถุงน้ำในไตนั่นคือมีการแบ่งเซลล์ซีสต์ใหม่และมีการหลั่งสารน้ำลงสู่ถุงซีสต์ (Sullivan, Wallace, & Grantham, 1998) ผลการทดลองพบว่าสารอนุพันธ์ชาลโคน (CHAL-025) สามารถยับยั้งการเจริญของซีสต์ในเซลล์โมเดล MDCK ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมารายงานว่าฤทธิ์ของสารอนุพันธ์ชาลโคน (chalcone isoliquiritigenin) สามารถชะลอการเติบโตของซีสต์ในเซลล์โมเดลโรคถุงน้ำในไต (Muanprasat et al., 2012)

กระบวนการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวน (cell proliferation) เป็นอีกหนึ่งกลไกสำคัญที่กระตุ้นการสร้างและการเติบโตของซีสต์ในโรคถุงน้ำในไต (Wallace, 2011) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ามีหลายโปรตีนที่สามารถกระตุ้น

กระบวนการแบ่งเซลล์ซีสต์ใหม่ได้ มีการรายงานว่าโปรตีน ERK1/2 มีความสำคัญในการกระตุ้นกระบวนการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนซีสต์ของผู้ป่วยโรคถุงน้ำในไต โดยการเพิ่มปริมาณ cAMP ในเซลล์ซีสต์จะสามารถกระตุ้นการทำงานของโปรตีน p-ERK1/2 และเคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียสและไปกระตุ้นยีนที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งเซลล์ เป็นผลให้กระตุ้นการแบ่งเซลล์ซีสต์ใหม่เพิ่มมากขึ้น (Chapin & Caplan, 2010) และการยับยั้งการทำงานของโปรตีน p-ERK1/2 สามารถชะลอการเติบโตของซีสต์ในหนูโมเดลโรคถุงน้ำในไตได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Shibazaki, 2008) ดังนั้นการยับยั้งการทำงานของโปรตีน p-ERK1/2 จึงเป็นอีกหนึ่งแนวทางในการพัฒนาการรักษาโรคถุงน้ำในไตได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสารอนุพันธ์ชาลโคนสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ adenoid cystic carcinoma โดยยับยั้งการทำงานของโปรตีน p-ERK1/2 (Z.-J. Sun et al., 2010) อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับกลไกการยับยั้งกระบวนการแบ่งเซลล์ซีสต์ใหม่ของสารอนุพันธ์ชาลโคน CHAL-025 ในเซลล์โมเดลโรคถุงน้ำในไต MDCK เมื่อทำการทดสอบการแบ่งเซลล์ใหม่ด้วยวิธี BrdU incorporation พบว่าสาร CHAL-025 สามารถยับยั้งการแบ่งเซลล์ใหม่ได้ การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสาร CHAL-025 ชะลอการเติบโตของซีสต์จากเซลล์โมเดลโรคถุงน้ำในไต MDCK ผ่านการยับยั้งการแบ่งเซลล์ใหม่ และเมื่อวัดการแสดงออกของโปรตีนที่กระตุ้นการแบ่งเซลล์ใหม่ p-ERK1/2 ด้วยวิธี western blot analysis ผลการทดลองเป็นที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งว่า สาร CHAL-025 ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ สามารถลดการแสดงออกของโปรตีน p-ERK1/2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมามีรายงานว่าสารอนุพันธ์ชาลโคนยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็ง adenoid cystic carcinoma ผ่านการลดการแสดงออกของโปรตีน p-ERK1/2 (Z.-J. Sun et al., 2010) จากผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าสาร CHAL-025 สามารถชะลอการเติบโตของซีสต์ในเซลล์ MDCK ผ่านการลดการแสดงออกของโปรตีน ERK1/2

การศึกษานี้สรุปได้ว่าสารอนุพันธ์ชาลโคน (CHAL-025) มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในการชะลอการเติบโตของซีสต์ในเซลล์โมเดลโรคถุงน้ำในไต MDCK โดยยับยั้งกระบวนการแบ่งเซลล์ใหม่ผ่านกลไกการลดการแสดงออกของโปรตีน p-ERK1/2 อย่างไรก็ตามต้องมีการศึกษาฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ของสาร CHAL-025 ในเซลล์ท่อไตที่มีความผิดปกติของยีน *PKD1* และในสัตว์ทดลองต่อไป จากผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าสารอนุพันธ์ชาลโคน (CHAL-025) น่าจะสามารถนำไปพัฒนาเป็นยารักษาสำหรับโรคถุงน้ำในไตได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับเงินอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ผู้วิจัยขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรินทร ชวศิริ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในการให้สารอนุพันธ์ชาลโคนในการทำวิจัย และ Prof.David N. Sheppard, University of Bristol, Bristol, UK ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการให้เซลล์ท่อไตสุนัข MDCK (Madin-Darby canine kidney) มาใช้ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Chapin, H. C., & Caplan, M. J. (2010). The cell biology of polycystic kidney disease. *The Journal of Cell Biology*, 191(4), 701-710.

Chebib, F. T., & Torres, V. E. (2016). Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: Core Curriculum 2016. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*, 67(5), 792-810.

Gao, J., Zhou, H., Lei, T., Zhou, L., Li, W., Li, X., & Yang, B. (2011). Curcumin inhibits renal cyst formation and enlargement in vitro by regulating intracellular signaling pathways. *European Journal of Pharmacology*, 654(1), 92-99.

Gomes, N. M., Muratov, N. E., Pereira, M., Peixoto, C. J., Rosseto, P. L., Cravo, V. P., . . . Neves, J. B. (2017). Chalcone Derivatives: Promising Starting Points for Drug Design. *Molecules*, 22(8).

Harris, P. C., & Torres, V. E. (2009). Polycystic Kidney Disease. Annual review of medicine, 60, 321-337.

Muanprasat, C., Sirianant, L., Soodvilai, S., Chokchaisiri, R., Suksamrarn, A., & Chatsudthipong, V. (2012). Novel Action of the Chalcone Isoliquiritigenin as a Cystic Fibrosis Transmembrane

Conductance Regulator (CFTR) Inhibitor: Potential Therapy for Cholera and Polycystic Kidney Disease. *Journal of Pharmacological Sciences*, 118(1), 82-91.

Sullivan, L. P., Wallace, D. P., & Grantham, J. J. (1998). Chloride and fluid secretion in polycystic kidney disease. *Journal of American Society of Nephrol*, 9(5), 903-916.

Sun, Y., Zhou, H., & Yang, B.-x. (2011). Drug discovery for polycystic kidney disease. *Acta Pharmacologica Sinica*, 32(6), 805-816.

Sun, Z.-J., Chen, G., Zhang, W., Hu, X., Huang, C.-F., Wang, Y.-F., . . . Zhao, Y.-F. (2010). Mammalian Target of Rapamycin Pathway Promotes Tumor-Induced Angiogenesis in Adenoid Cystic Carcinoma: Its Suppression by Isoliquiritigenin through Dual Activation of c-Jun NH2/Terminal Kinase and Inhibition of Extracellular Signal-Regulated Kinase. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 334(2), 500.

Wallace, D. P. (2011). Cyclic AMP-Mediated Cyst Expansion. *Biochimica et biophysica acta*, 1812(10), 1291-1300.

Yibcharoenporn, C., Chusuth, P., Jakakul, C., Rungrotmongkol, T., Chavasiri, W., & Muanprasat, C. (2019). Discovery of a novel chalcone derivative inhibiting CFTR chloride channel via AMPK activation and its anti-diarrheal application. *Journal of Pharmacological Sciences*, 140(3), 273-283.

Yuajit, C., Muanprasat, C., Gallagher, A.-R., Fedeles, S. V., Kittayaruksakul, S., Homvisasevongsa, S., . . . Chatsudthipong, V. (2014). Steviol retards renal cyst growth through reduction of CFTR expression and inhibition of epithelial cell proliferation in a mouse model of polycystic kidney disease. *Biochemical Pharmacology*, 88(3), 412-421.

Zhou, H., Gao, J., Zhou, L., Li, X., Li, W., Li, X., . . . Yang, B. (2012). Ginkgolide B inhibits renal cyst development in in vitro and in vivo cyst models. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 302(10), F1234-F1242.

กิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์

1. การนำเสนอผลงานวิจัยในรูปแบบบรรยายในงานประชุมวิชาการระดับชาติ มอบ. วิจัย ครั้งที่ 13 ณ โรงแรมยูเพลส มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี จังหวัดอุบลราชธานี วันที่ 11-12 กรกฎาคม 2562 ในหัวข้อเรื่อง "Veeraphan P, Deandee S, Yuajit C. Chalcone derivative retards an *in vitro* cyst enlargement through the inhibition of cell proliferation pathway." (เอกสารแนบ 1)

2. การเผยแพร่ผลงานวิจัยในวารสารระดับนานาชาติ (Clinical and Experimental Nephrology) ซึ่งกำลังอยู่ในขั้นตอนของการส่ง submit (เอกสารแนบ 2)

3. การนำเสนอผลงานวิจัยในรูปแบบโปสเตอร์และตีพิมพ์ผลงานในรูปแบบ proceedings ในงานประชุมวิชาการระดับชาติ มอบ. วิจัย ครั้งที่ 14 ณ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี จังหวัดอุบลราชธานี วันที่ 3-4 กันยายน 2563 ในหัวข้อเรื่อง "สารอนุพันธ์ชาลโคนชะลอการเติบโตของซีสต์ในเซลล์โมเดลโรคถุงน้ำในไต ผ่านการยับยั้งกระบวนการแบ่งเซลล์ใหม่" (เอกสารแนบ 3)

4. การส่งรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ให้สำนักงานส่งเสริมบริหารงานวิจัย บริการวิชาการและทำนุบำรุงศิลปวัฒนธรรม สำนักงานอธิการบดี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

5. การส่งองค์ความรู้ที่ได้จากการวิจัยให้กับงานส่งเสริมวิจัย บริการวิชาการฯ ของวิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข เพื่อนำไปเผยแพร่ในงานประชุมวิชาการต่างๆ