การวิจัยนี้เป็นการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของสารกลุ่มอะซีโตฟีโนนกับฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดี ด้วยสารกลุ่มนี้มีโครงสร้างทางเคมีที่คล้ายกัน แต่ฤทธิ์ในการกระตุ้นการหลั่งน้ำดีและคุณภาพของน้ำดีมีความแตกต่างกันอย่างมาก การวิจัยแบ่งออกเป็น 6 ตอนให้ผลดังนี้

1. ศึกษาบทบาทของสารต่อการกระตุ้นการหลั่งน้ำดี โดยหาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการหลั่งน้ำดีและชนิดของเกลือน้ำดีรวมถึงชนิดและปริมาณของเมตาโบไลท์หลักของสาร hydroxy acetophenones (HAs) ที่ขับออกมา ได้ศึกษาสารกลุ่ม HAs ที่มีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดี 4 ตัวคือ 2,4,6-trihydroxy acetophenone (THA), สาร dihydroxy 2 ตัวคือ 2,4 และ 2,6-dihydroxyacetophenone (2,4-DHA; 2,6-DHA) และ 4-monohydroxyacetophenone (MHA) เนื่องจากชนิดของกรดน้ำดีและสารเมตาโบไลท์ที่หลั่งออกมามีความสามารถในการดึงน้ำจึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญต่อปริมาณของน้ำดีที่หลั่งออกมา ผลการ ศึกษาพบว่าหลังจากให้สาร HAs ทำให้อัตราการหลั่งน้ำดีของหนูเพิ่มขึ้นอย่างมาก เมื่อวิเคราะห์ชนิดของกรดน้ำดีด้วย HPLC พบว่าในหนูมีกรดน้ำดีหลักที่ตรวจวัดได้ 4 ชนิด คือ กรดน้ำดี cholic, chenodeoxycholic, deoxycholic และ ursodeoxycholic ปริมาณของกรดน้ำดีที่หลั่งออกมาสนับสนุนว่า สาร 4-MHA กระตุ้นการหลั่งน้ำดีที่ไม่เกี่ยวข้องกับกรดน้ำดี (Bile acid independent fraction, BAIF) และสาร 2,6-DHA กระตุ้นการหลั่งน้ำดีที่ขึ้นตรงกับกรดน้ำดี (Bile acid dependent fraction, BADF) ในขณะที่สาร 2,4-DHA และ 2,4,6-THA กระตุ้นการหลั่งน้ำดีจากกระบวนการทั้งสองแบบ ถึงแม้ว่าปริมาณของน้ำดีที่ออกมาจะแตกต่างกันอย่างมากในฤทธิ์ของสารแต่ละตัว แต่เมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนของกรดน้ำดีชนิดต่างๆที่เป็นชนิดปฐมภูมิ ทุติยภูมิ และตติยภูมิ ที่ถูกขับออกมาในน้ำดีหลังจากถูกกระตุ้นด้วยสาร HAs ทั้ง 4 ชนิดไม่แตกต่างกัน และไม่ต่างจากกลุ่มควบคุม คาดว่าสารเหล่านั้นอาจออกฤทธิ์กระตุ้นการขับกรดน้ำดีจากแหล่งกักเก็บที่มีอยู่เดิมภายในเซลล์ มิได้ออกฤทธิ์กระตุ้นการสร้างกรดน้ำดีที่ขึ้นมาใหม่ และเมื่อศึกษาชนิดและปริมาณของสารเมตาโบไลท์หลักของ HAs ในน้ำดี พบว่าสารเมตาโบไลท์หลักที่พบเป็น glucuronide conjugates ได้แก่ 2,4,6-THA-4-*O*-glucuronide, 2,6-DHA-2-*O*-glucuronide, 2,4-DHA-4-*O*-glucuronide และ 4-MHA-4-*O*-glucuronide ได้พบว่าสารเมตาโบไลท์เหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการให้ฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดีของสารต่อไป

2. ด้วยสารกลุ่ม HAs มีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดี มีการขับสารเมตาโบไลท์ หรือ/และกรดน้ำดีออกมาในน้ำดีด้วย จึงทำการศึกษาเพื่อประเมินกลไกการกระตุ้นการหลั่งน้ำดีของสาร HAs ว่าเกี่ยวข้องกับ transcytotic vesicular pathway หรือไม่ และเนื่องจากกระบวนการแทรกตัวของโปรตีนขนส่งเข้าไปที่เยื่อบุผิวโดยวิธีเอกโซไซโตซิสเป็นกลไกหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการหลั่งน้ำดี ได้ศึกษาถึงบทบาทของสารสาร HAs ได้แก่ 2,6-DHA, 4-MHA และ 2,4,6-THA ต่อกระบวนเอกโซไซโตซิสในเซลล์ตับโดยใช้ horseradish peroxidase (HRP) เป็นเครื่องมือในการติดตาม พบว่าสาร MHA ซึ่งเป็นสารที่กระตุ้นการหลั่งน้ำดีแบบ BAIF มีผลเสริมการขับออกของ HRP ในน้ำดีที่ผ่านช่องระหว่างเซลล์ (paracellular pathway) และขนส่งข้ามผ่านเซลล์ (transcellular pathway) ส่วน THA ซึ่งเป็นสารที่กระตุ้นการหลั่งน้ำดีทั้งแบบ BADF และ BAIF กลับไม่มีผลต่อการขับออกของ HRP ในน้ำดี ในขณะที่ DHA ซึ่งเป็นสารที่กระตุ้นน้ำดีแบบ BADF กลับมีผลยับยั้งการขับออกของ HRP ที่ขนส่งข้ามผ่านเซลล์ นอกจากนี้ยังพบว่า colchicine ซึ่งเป็นสารที่ยับยั้งการทำงานของ microtubule จะเพิ่มการขับออกของ HRP ที่ช่องระหว่างเซลล์ สามารถยับยั้งการขับออกของ HRP ที่ขนส่งข้ามผ่านเซลล์ และยับยั้งฤทธิ์ของ MHA ในการกระตุ้นการหลั่งน้ำดีได้ แสดงว่ากลไกการกระตุ้นการหลั่งน้ำดีของ MHA เกี่ยวข้องกับกระบวนการเอกโซไซโตซิส ส่วนฤทธิ์การกระตุ้นน้ำดีของ DHA และ THA

อาจจะไม่เกี่ยวข้องกับกระบวนเอกโซไซโตซิส หรืออาจจะเกี่ยวข้องกับกระบวนเอกโซไซโตซิสที่ไม่สามารถ label ได้ด้วย HRP จึงได้ดำเนินการศึกษาบทบาทของสาร HAs ในการทำให้เกิด BADF และ BAIF ต่อไป

3. ศึกษาถึงกลไกการทำงานของสาร MHA ซึ่งเป็นสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ในสมุนไพรหลายชนิดที่มีสรรพคุณในการรักษาโรค โดยเฉพาะมีผลดีเด่นในการกระตุ้นการหลั่งน้ำดีจากตับ ในการวิจัยนี้ได้วิเคราะห์สารต่างๆที่ออกมากับน้ำดีได้แก่ MHA-metabolites, GSH และ inorganic electrolytes ได้พบว่า MHA ออกฤทธิ์กระตุ้น BAIF ในหนูปกติได้อย่างดี แต่สารนี้ไม่สามารถกระตุ้นการขับน้ำดีในหนู TR^- ซึ่งเป็นหนูที่มีความบกพร่องของตัวขนส่ง multidrug resistance-associated protein-2, Mrp2/Abcc2 มาแต่กำเนิด ฤทธิ์กระตุ้นการขับน้ำดีของ MHA ไม่ได้เกิดจากการขับทิ้งของ Na^+, K^+, Cl^- หรือ HCO_3^- หรือ GSH อย่างไรก็ตามจากกการวิเคราะห์น้ำดีด้วย HPLC พบว่ามีสาร metabolite ถูกขับออกมาในน้ำดีหนึ่งตัว คือสาร4-hydroxyacetophenone-4-O-β glucuronide ในขณะที่ไม่พบสารแม่ในน้ำดี ปริมาณของสาร metabolite นี้ในน้ำดีมีความสัมพันธ์โดยตรงกับอัตราการหลั่งของน้ำดีที่เพิ่มขึ้น ในทางตรงข้ามกับหนูปกติ สาร MHA ไม่สามารถกระตุ้นการหลั่งน้ำดีและขับ MHA metabolite ออกมาในหนู TR- สรุปได้ว่ากลไกที่ทำให้เกิดฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดีของสาร MHA เกิดจากการขับสาร major metabolite ของ MHA เองออกมาในน้ำดี และสารดังกล่าวถูกขนส่งด้วยโปรตีนขนส่ง Mrp2 เข้าไปใน canaliculi ทำให้มีการดึงน้ำตามมาอย่างมาก

4. การศึกษากลไกการกระตุ้นการหลั่งน้ำดีของสาร THA ในตับที่แยกออกมาจากตัว (isolated perfused rat liver) พบว่า THA มีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดีที่ตับโดยตรง และฤทธิ์การกระตุ้นขึ้นอยู่กับขนาดที่ให้ โดยที่ THA ไม่มีผลต่อการขับออกของกรดน้ำดี, บิลิรูบิน และ GSH จากการศึกษาบทบาทของ THA ภายในเซลล์พบว่า THA มีฤทธิ์ยับยั้งการขนส่งของ Mrp2-substrate และ THA ไม่สามารถกระตุ้นการหลั่งน้ำดีในหนู TR- ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าฤทธิ์ในการกระตุ้นการหลั่งน้ำดีแบบ BAIF ของ THA เกิดจากการขับออกของเมตาบอไลซ์ผ่าน Mrp2 เมื่อตรวจสอบผลของ THA ต่อปริมาณของโปรตีนขนส่ง Bsep, Mrp2 และ tight junction protein, Zo-1 ไม่พบการเปลี่ยนแปลง นอกจากนี้ THA ยังมีศักยภาพในการบรรเทาภาวะคั่งของน้ำดีที่เกิดจาก estradiol-17 β-D-glucuronide (E_2-17G) ได้ จากการที่ THA มีฤทธิ์การกระตุ้นการหลั่งน้ำดีที่เกิดจากการขับทิ้งของสารที่มีคุณสมบัติในการดึงน้ำสูง โดยอาศัยการทำงานของโปรตีนขนส่ง Mrp2 ดังนั้น THA นับว่ามีศักยภาพสำคัญในการพัฒนายาในการลดความเป็นพิษของสารที่ผ่านวิถีและกระบวนการขับออกในลักษณะเดียวกัน เมื่อพิจารณาผลของ THA ต่อการขับออกของกรดน้ำดีนั้นพบว่าฤทธิ์ของ THA ต่อ BADF ขึ้นอยู่กับปริมาณกรดน้ำดีภายในเซลล์โดยจะเห็นผลเมื่อให้กรดน้ำดีจากภายนอกเสริม คาดว่าการทำงานของ Mrp2 จะเร่งการทำงานของ Bsep ที่ทำหน้าที่ขนกรดน้ำดีได้ด้วย

5. ได้ทำการศึกษาบทบาทและกลไกของสาร THA ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งกรดน้ำดีและลดไขมันในเลือดได้ โดยศึกษาหากลไกการทำงานของ THA ที่ออกฤทธิ์ลดไขมันในเลือดว่าเกี่ยวข้องกับการขัดขวางการขนส่งกรดน้ำดีที่ลำไส้เล็กหรือไม่ ได้ใช้สาร HAs ที่มีฤทธิ์ลดไขมันในเลือด 2 ตัวมาศึกษา ได้แก่ สาร THA และ 2,6-DHA ต่อการดูดซึมกรดน้ำดีในลำไส้เล็กส่วนปลายในหนูแรท พบว่าสาร THA ที่ความเข้มข้น 0.5 mM สามารถยับยั้งการขนส่งกรดน้ำดี taurocholate ผ่านเข้าถุงของ brush border membrane ของลำไส้เล็กส่วนปลายได้ประมาณร้อยละ 50 โดยการยับยั้งเป็นแบบแข่งขันกับกรดน้ำดี (competitive) ขณะที่ DHA มีฤทธิ์ดีกว่าสามารถยับยั้งการขนส่งของกรดน้ำดีได้อย่างสมบูรณ์ โดยความเข้มข้นที่ให้การยับยั้งได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) เท่ากับ 1.58 mM และเป็นการยับยั้งแบบไม่แข่งขันกับกรดน้ำดี (non-competitive) มีค่า K_i เท่ากับ 7.65 mM นอกจากนี้สาร THA และ DHA ยังยับยั้งการทำงานของ Na^+-K^+-ATPase ใน basolateral membrane ของลำไส้เล็กส่วนปลายได้ด้วย โดย

การยับยั้งเป็นแบบ uncompetitive และเพื่อเป็นการยืนยันฤทธิ์ดังกล่าวได้ป้อนสาร THA และ DHA ในขนาด 400 μmol/kg วันละ 2 ครั้ง ให้แก่หนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีโคเลสเตอรอลสูงด้วยอาหารไขมันสูงร่วมกับการให้กรดน้ำดีเป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าสาร THA และ DHA สามารถลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือดคิดเป็นร้อยละ 60.4 และ 58.9 ของหนูกลุ่มควบคุมได้ นอกจากนี้ยังพบว่าสาร THA มีผลทำให้การขนส่งกรดน้ำดีในลำไส้เล็กส่วนปลายลดลง ขณะที่ระดับการทำงานของ Na^+-K^+-ATPase ไม่เปลี่ยนแปลง เนื่องจากการออกฤทธิ์ยังยั้งการหลั่งกรดน้ำดีเข้าลำไส้ดังกล่าวต้องใช้ความเข้มข้นสูง ซึ่งสามารถไปลดการทำงานของ enzyme อื่นในลำไส้เล็กได้ด้วย จึงสรุปได้ว่าฤทธิ์ของสาร THA และ DHA ในการการยับยั้งการขนส่งกรดน้ำดีผ่าน brush border membrane และลดการทำงานของ Na^+-K^+-ATPase ที่ basolateral membrane ไม่ใช้กลไกหลัก หากเป็นส่วนหนึ่งของกลไกที่จะทำงานร่วมกับฤทธิ์อื่นๆ เช่นฤทธิ์โดยตรงของสารต่อ Cyp7A1 ในการเร่งการสังเคราะห์และขับกรดน้ำดีออกจากร่างกายเพื่อลดระดับโคเลสเตอ รอลของสาร HAs เป็นต้น

6. นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาบทบาทของสารกลุ่ม HAs ที่มีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดีว่าสามารถเร่งการกำจัดสารพิษออกจากร่างกายได้หรือไม่ ในการวิจัยได้เลือกใช้เมทิลเมอร์คิวรี่ซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ของปรอทที่ร่างกายขับทิ้งออกทางน้ำดี พบว่าสารปรอทมีความเป็นพิษต่อตับ ทำให้อัตราการหลั่งน้ำดีลดลงทันที ในขณะเดียวกันระดับของเอนไซม์ ALT และ AST และ Alkaline phosphatase ในพลาสมาและในน้ำดีเพิ่มขึ้น ปริมาณของ GSH ในตับและในน้ำดีลดลง การให้สาร THA เข้าทางลำไส้เล็กส่วนต้น สามารถกระตุ้นการขับน้ำดีในหนูที่ได้รับสารปรอทมาก่อนให้เพิ่มขึ้นได้ แต่ปรากฏว่าทำให้ปริมาณของสารปรอทและ GSH ซึ่งเคยถูกขับออกทางน้ำดีกลับลดลงอย่างมาก อย่างไรก็ตามปริมาณสารปรอทและ GSH ในตับ และดัชนีที่ใช้แสดงความเป็นพิษต่อตับไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับค่าเหล่านั้นในหนูที่ได้รับสารปรอทอย่างเดียว แสดงว่าสาร THA ไม่ได้เพิ่มความเป็นพิษ จึงน่าจะมีทางอื่นที่ร่างกายกำจัดปรอทออกได้ พบว่าสาร THA สามารถกระตุ้นการขับปัสสาวะพร้อมกับการขับสารปรอทออกทางปัสสาวะเพิ่มมากขึ้น แสดงว่าการให้สาร THA มีผลเปลี่ยนการขับทิ้งสารปรอทจากทางน้ำดีให้ไปใช้ทางอื่น โดยเร่งการขับออกทางปัสสาวะ ความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกการกำจัดสารพิษต่างๆโดยตับ และปฏิสัมพันธ์โดยตรงระหว่างสารกับระบบตัวขนส่งสารต่างๆออกจากตับนับว่ามีความสำคัญอย่างมากในการกำหนดวิธีการในการกำจัดสารพิษ เพื่อลดอาการพิษที่เกิดขึ้น โดยสารอาจจะเกิดการแย่งกันเองที่ตัวขนส่งออกจากตับ(transporter) เช่น กรณีนี้เป็นต้น ซึ่งจำเป็นจะต้องมีการศึกษาให้ชัดเจนก่อนนำไปใช้จริง โดยสาร THA อาจจะช่วยขนสารอื่นได้ที่ไม่ใช่โลหะหนัก

โดยสรุปสาร HAs ซึ่งเป็นสารที่พบได้ในพืชสมุนไพรหลายชนิดรวมถึงว่านชักมดลูก มีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดีที่แรง กลไกการออกฤทธิ์เกิดจากการขับทิ้งของสาร metabolite ของ HAs เองซึ่งมีคุณสมบัติในการดึงน้ำออกทางท่อน้ำดีที่แรง และสารดังกล่าวขนส่งโดยโปรตีน Mrp2 นำผ่านเข้าสู่ canaliculi จากคุณสมบัตินี้จะทำให้ HAs รวมถึงพืชสมุนไพรอื่นๆที่มีสาร HAs มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยาลดการเกิดพิษของสารที่ผ่านวิถี และกระบวนการขับออกในลักษณะเดียวกันที่ตับ อย่างไรก็ตามการที่จะนำไปประยุกต์ใช้ฤทธิ์ดังกล่าวในการรักษาความผิดปรกติที่เกิดจากการคั่งของน้ำดีในตับนั้น จำเป็นต้องรู้สาเหตุที่ทำให้เกิดภาวะของความผิดปรกตินั้นๆและกระบวนการขับออกให้ชัดเจนก่อนจึงจะเกิดประโยชน์

This study aims to elucidate the choleretic effect and mechanism of hydroxyacetophenones (HAs). The compounds differently increased bile flow rate with varying biliary bile acids output in which the secretion varied from essential bile acid dependence (BADF) to essential bile acid independence (BAIF). The mechanisms by which these compounds exerted different actions remain unclear. Multi-component studies were conducted and reported.

1. We determined bile flow rate, biliary bile acid species and major biliary metabolites of hydroxyacetophenones. The compounds used were 2,4,6-trihydroxyacetophenone (THA); 2,4, and 2,6-dihydroxyacetophenone (2,4-DHA and 2,6-DHA) and 4-monohydroxy acetophenone (4-MHA). By using HPLC analysis, four major bile acids species were detected in normal rat bile. They were cholic, chenodeoxycholic, deoxycholic and ursodeoxycholic acids. Although the secreted bile acid outputs were markedly increased, their percent distribution of individual species was not different among compounds and from the control. It is suggested that HAs stimulated biliary secretion of bile acids from the intracellular storage pool in the hepatocyte, not from newly synthesized bile acids. 4-MHA did not alter the output which confirmed that 4-MHA stimulated BAIF. The chemical structures of the major metabolites from HAs in bile were identified as 2,4,6-THA-4-*O*-β-glucuronide, 2,6-DHA-2-*O*-β–glucuronide, 2,4-DHA-4-*O*- β-glucuronide, and 4-MHA-4-*O*- β-glucuronide. These metabolites were main factors responsible for BAIF which were demonstrated in the subsequent studies.

2. Insertion of transporter proteins into the apical canalicular membrane via vesicular transport is one of several choleretic mechanisms. Based on different choleretic activities of HAs, the present study aims to determine if these compounds stimulated vesicular transport in hepatocytes using horseradish peroxidase (HRP), a marker of the transcytotic vesicle pathway. MHA which stimulates BAIF, showed a dose-dependent increase in both the early (paracellular) and late (transcellular) peak of HRP excretion in bile. THA, which stimulates both BADF and BAIF, did not alter the pattern of HRP excretion into bile. However, DHA, which is more hydrophobic and increases only BADF, decreased the late peak. The stimulating effects of MHA on bile flow and HRP excretion were markedly inhibited by colchicine, suggesting that its choleretic action involves stimulation of exocytosis, as well as increase in paracellular permeability. In contrast, the lack of a stimulatory effect of THA and DHA on biliary HRP excretion suggested that their choleretic action is not associated with vesicular exocytosis. These results demonstrate a variable effect of hydroxyacetophenones on the transcytotic vesicular pathway reflecting different choleretic mechanisms and therapeutic potential.

3. The present study examined the underlying mechanism by which 4-hydroxyacetophenone (4-HA), a bioactive compound found in several medicinal herbs, exerts its potent stimulatory effects on hepatic bile secretion. In normal rats, MHA (4-HA) dramatically increased bile flow rate, whereas it failed to exert a choleretic effect in TR^- rats that have a congenital defect in the multidrug resistance-associated protein-2, Mrp2/Abcc2. This choleresis was not explained by increased biliary output of Na^+, K^+, Cl^- or $HCO3^-$, or by increased biliary GSH excretion. Depletion of hepatic GSH with buthionine sulfoximine had no effect on the 4-HA-induced choleresis. HPLC analysis revealed that a single major compound was present in bile, namely 4-hydroxyacetophenone-4-O-β-glucuronide, and that the parent compound was not detected in bile. Biliary excretion of the glucuronide was directly correlated with the increases in bile flow. In contrast to normal rats, this 4-HA metabolite was not present in bile of TR^- rats. In conclusions, these results demonstrate that the major biliary metabolite of 4-HA in rats is the 4-O-β-glucuronide, a compound that is secreted into bile at high concentrations, and may thus account in large part for the choleretic effects of 4-HA. Transport of this metabolite across the canalicular membrane into bile requires expression of the Mrp2 transport protein.

4. The underlying mechanism by which THA induces bile secretion was conducted. THA inhibited the excretion of typical multidrug resistance proteins 2 (Mrp 2) substrates. These results suggest that its choleretic activity is mainly related to the increase in BAIF caused by the excretion of osmotically active solutes via Mrp2. THA had no effect on the subcellular localization and distribution of either Mrp2 or the bile salt export pump (Bsep), nor the integrity of the tight junction. In contrast, the choleretic activity of THA was completely absent in the TR^- rat, an animal model that lacks Mrp2, directly implicating this canalicular export pump as the mechanisms by which THA is excreted in bile. THA also partially reversed the cholestatic effects of estradiol-17β-D-glucuronide (E_2-17G) a process also dependent on Mrp2. In conclusion, the choleretic activity of THA and its possible metabolites is dependent on Mrp2. THA appears to stimulate BF by its osmotic effects, and may attenuate the cholestatic effects of hepatotoxins undergoing biotransformation and excretion via similar pathways.

5. The effects of the choleretic and cholesterol lowering compound, 2,4,6-THA and its analog, 2,6-DHA, on ileal bile acid absorption were investigated in rats. THA inhibited taurocholate (TC) uptake into ileal brush-border membrane vesicles (BBMV), showing a maximum inhibition of 50%, whereas DHA completely inhibited TC uptake into ileal BBMV. THA exhibited competitive inhibition with a Ki of 9.88 mM, while DHA showed non-competitive inhibition with a Ki of 7.65 mM. Both total and ouabain-sensitive basolateral membrane (BLM) Na^+–K^+–ATPase activities, which are essential for maintenance of the Na+-gradient for bile acid transport, were

inhibited by THA and DHA in a dose-dependent manner. The inhibition of BLM ATPase was uncompetitive with a Ki of 10.1 and 5.0 mM for THA and DHA, respectively. Administration of THA or DHA (400 μmol/kg) twice a day, to hypercholesterolemic rats for 3 weeks caused similar and marked reductions in plasma cholesterol to 60% of the cholesterol-fed controls. The data suggest that the inhibitory actions of THA and DHA on two essential components of ileal bile acid recycling to liver could, in part, contribute to the cholesterol lowering effect of the hydroxyacetophenone compounds. These effects on decreasing bile acid recycling, in combination with their potent choleretic effect, accelerating biliary excretion of bile acids, are responsible for the effective cholesterol lowering capacities of these compounds.

6. The effect of THA, a choleretic agent, on biliary excretion of MeHg was investigated in adult male rats. Administration of MeHg into the portal vein immediately decreased bile secretion and toxic to liver. Concurrent with the decreased bile flow rate by the MeHg, activities of plasma alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and alkaline phosphatase (ALP) in both plasma and bile were increased whereas hepatic and biliary glutathione (GSH) contents were decreased. Administration of THA enhanced bile secretion in the MeHg-treated animals but markedly reduced the biliary excretion of the mercury and GSH. However, the liver GSH, Hg content and others toxic signs were not significantly altered. The biliary secretion of GSH and Hg were further decreased after administration of THA in the GSH-depleted rats. However, THA induced an increase in urine flow rate and enhanced Hg excretion in the urine. It is suggested that THA modulated the hepatic excretion of mercury by diverting the excretion to other routes such as via urinary excretion. An understanding on the excretory mechanism of mercury, and the actual interactions to the transport systems are essential for setting detoxification strategies.

In conclusion, HAs, a bioactive compound found in several medicinal herbs including *Curcuma comosa*, exerts potent stimulatory effects on hepatic bile secretion. Their choleretic activities are mainly related to the increase in BAIF caused by the excretion of metabolites which are osmotically active solutes via Mrp2. These HAs as well as plants containing HAs may have therapeutic potential to attenuate the cholestatic effects of hepatotoxins undergoing biotransformation and excretion via similar pathways. However, the formation of toxic compound in the liver, its excretory mechanism and interactions to the transport systems are essential for setting detoxification strategies using HAs.