



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ปฏิสัมพันธ์ของสารสเตียรอยด์และสารเมตาบอไลต์
ต่อโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิด hOAT1 และ hOAT3 ซึ่งทำการแสดงออกใน
renal S2 cells และไข่กบ *Xenopus laevis*

โดย นางสาว ชุติมา ศรีมะเร็ง

กันยายน 2547

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

ปฏิสัมพันธ์ของสารสเตียรอยด์และสารเมตาบอไลต์

ต่อโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิด hOAT1 และ hOAT3 ซึ่งทำการแสดงออกใน

renal S2 cells และไข่กบ *Xenopus laevis*

ผู้วิจัย นางสาว ชุติมา ศรีมะเร็ง

สังกัดภาควิชา สรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นพ้องด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ รศ.ดร.วรณัฐ จัตรสุทธิพงษ์ ที่ช่วยเหลือและสนับสนุนงานในทุกๆด้าน รวมทั้งให้คำปรึกษาและคำแนะนำถึงระเบียบวิธีวิจัยที่ดี เพื่อให้งานวิจัยในครั้งนี้ดำเนินไปอย่างสมบูรณ์และเสร็จสิ้นลุล่วงไปได้ด้วยดี นอกจากนี้ยังเปิดโอกาสให้สัมผัสกับงานวิจัยในประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งถือได้ว่าเป็นประเทศที่มีงานวิจัยที่มีคุณภาพและประสิทธิภาพสูงประเทศหนึ่งของโลก รวมทั้งขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาร่วมต่างประเทศ ได้แก่ Dr. John B. Pritchard ซึ่งได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ อย่างใกล้ชิด ทั้งในขณะทำงานวิจัยอยู่ในประเทศสหรัฐอเมริกา และขณะทำงานวิจัยอยู่ในประเทศไทยต่างประเทศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ รศ.ดร.สมัยศึก โสภาสรรค์ ดร.ชัยวัฒน์ ต่อสกุลแก้ว ผศ. ดร. สุรวัฒน์ จริยาวัฒน์ อาจารย์ประจำภาควิชา สรีรวิทยา รศ. ดร. ชื่นจิตต์ บุญเกิด อาจารย์ประจำภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ดร. พงษ์ศักดิ์ อุทัยสินธุเจริญ หัวหน้าหน่วยสนับสนุนงานวิจัยกลาง (Central Research Facility, CRF) นพ.ดร. ชัยรัตน์ เกิดฉาย อาจารย์ประจำหน่วยไต โรงพยาบาลศิริราช ซึ่งได้ให้การสนับสนุนเป็นอย่างดีทางด้านเครื่องมือ อุปกรณ์ที่ใช้ และยังให้คำแนะนำอันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดลและเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่คอยช่วยเหลือ อำนวยความสะดวก และให้การสนับสนุนการทำงานวิจัยด้วยดีมาตลอดจนทำให้งานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยใคร่ขอกราบขอบพระคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย แห่งประเทศไทย ซึ่งได้ให้เงินทุนสนับสนุนงานวิจัยในครั้งนี้ ทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี มา ณ โอกาสนี้ด้วย

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : BGY4580017

ชื่อโครงการ : ปฏิสัมพันธ์ของสารสเตวียโอไซด์และสารเมตาบอไลต์ต่อโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิด hOAT1 และ hOAT3 ซึ่งทำการแสดงออกใน renal S2 cells และไข่กบ *Xenopus laevis*

ื่อนักวิจัย : นางสาว ชุติมา ศรีมะเร็ง

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ : รศ.ดร. วรณัฐ จิตรสุทธิพงษ์

E-mail Address : sc_tima@yahoo.com, scvcs@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 30 กันยายน พ.ศ. 2545 ถึง 29 กันยายน พ.ศ. 2547

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า สารสกัดจากหญ้าหวานคือ สเตวียโอไซด์และสารเมตาบอไลต์ (สเตวียออล) มีผลยับยั้งการขนส่งสาร *para*-aminohippurate (PAH) ผ่านทางท่อไตส่วนต้นของกระต่าย (S2) โดยน่าจะมีความเกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบการขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบซึ่งอยู่ทางด้าน basolateral ของผนังเซลล์ ปัจจุบันนี้โปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบที่โคลนได้จากเนื้อเยื่อของมนุษย์มีด้วยกันหลายตัว แต่ตัวที่มีความสำคัญและมีบทบาทมากคือ hOAT1 และ hOAT3 ซึ่งพบมากที่ด้าน basolateral ของท่อไตมนุษย์ วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อศึกษาถึงปฏิสัมพันธ์โดยตรงของสเตวียโอไซด์และสเตวียออลต่อ hOAT1 และ hOAT3 รวมทั้งศึกษาถึงกลไกการขนส่งสารทั้งสองตัวโดยใช้ hOAT1 hOAT3 และ fOat1 ซึ่งทำการแสดงออกใน renal S2 cells และในไข่กบ *Xenopus laevis* โดยพบว่า สเตวียโอไซด์ไม่ได้ผลต่อการขนส่งสาร PAH และ estrone sulfate (ES) ผ่านทาง hOAT1 และ hOAT3 ทั้งใน renal S2 cells และในไข่กบ *Xenopus laevis* ในทางตรงกันข้าม สเตวียออลสามารถยับยั้งการขนส่งสาร PAH และ ES ผ่านทาง hOAT1 และ hOAT3 ทั้งใน renal S2 cells และในไข่กบ *Xenopus laevis* ตามความเข้มข้นที่ใช้ ค่า IC_{50} ของสเตวียออลต่อการยับยั้งการขนส่งสาร PAH ผ่านทาง hOAT1 มีค่า 11.4 และ 11.1 μM และเมื่อเปรียบเทียบกับค่า 36.5 และ 62.6 μM ที่ได้จากผลของสเตวียออลต่อการยับยั้งการขนส่งของสาร ES ผ่านทาง hOAT3 ใน renal S2 cells และในไข่กบ *Xenopus laevis* ตามลำดับ เป็นที่น่าสนใจว่าสเตวียออลมีค่า IC_{50} ต่อการยับยั้งการขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบคล้ายกับสาร probenecid อีกด้วย เมื่อทำการศึกษาแบบ *Trans*-stimulation เพื่อศึกษาต่อไปว่าสเตวียออลสามารถถูกขนส่งผ่านทาง hOAT1 และ hOAT3 ได้หรือไม่ ผลที่ได้พบว่า สเตวียออลที่ 1 μM สามารถเพิ่มการขนส่งค่า [3H]-PAH ผ่านทาง hOAT1 และ hOAT3 นอกจากนี้ผลการทดลองโดยใช้เทคนิค Electro-physiology พบว่า สเตวียออลสามารถทำให้เกิดกระแส inward ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงสรุปได้ว่า สเตวียโอไซด์ไม่ได้มีปฏิสัมพันธ์ใดๆกับ hOAT1 และ hOAT3 ทั้งใน renal S2 cells และในไข่กบ *Xenopus laevis* ในขณะที่สเตวียออลมีปฏิสัมพันธ์โดยตรงกับ hOAT1 และ hOAT3 ด้วยความจำเพาะสูง คล้ายกับสาร probenecid รวมทั้งโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิด hOAT1, hOAT3 และ fOat1 ยังสามารถขนส่งสเตวียออลและน่าจะมีความสำคัญในการกำจัดสเตวียออลออกทางไตได้อีกด้วย

คำหลัก: สารสเตวียโอไซด์, สารสเตวียออล, โปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบ, hOAT1, hOAT3

Abstract**Project code : BGJ4580017****Project title : The interactions of stevioside and its metabolite with cloned human organic anion transporter 1 (hOAT1) and 3 (hOAT3) in renal S2 cells and *Xenopus laevis* oocytes****Investigator : Ms. Chutima Srimaroeng****Project Advisor : Assoc.Prof. Dr. Varanuj Chatsudthipong****E-mail Address : sc_tima@yahoo.com, scvcs@mahidol.ac.th****Project Period : September 30, 2002 to September 29, 2004**

The natural sweetening agent stevioside and its aglycone metabolite, steviol, have been shown to inhibit transepithelial transport of *para*-aminohippurate (PAH) in isolated S2 segments of rabbit renal proximal tubules by interfering with the basolateral entry step. Several organic anion transporters are present in the human kidney. Among these, hOAT1 and hOAT3 have been implicated as being key contributors to renal organic anion transport. Both transporters are expressed at the basolateral renal proximal tubule. The aim of the present study was to examine the direct interactions of stevioside and steviol with the specific cloned basolateral organic anion transporters and to determine which of these cloned was/were involved in the renal transport of stevioside and steviol. This question was addressed in renal S2 cells and *Xenopus laevis* oocytes expressing hOAT1, hOAT3 and winter flounder OAT (fOat1). The parent compound, stevioside, had no inhibitory effect on either PAH (hOAT1) or ES (hOAT3) uptake. In contrast steviol showed significant, dose-dependent inhibition of PAH and estrone sulfate (ES) uptake in renal S2 cells and *Xenopus laevis* oocytes expressing hOAT1 or hOAT3. The IC₅₀ of steviol for hOAT1-mediated PAH transport was 11.4 and 11.1 μM, as compared to 36.5 and 62.6 μM for hOAT3-mediated ES uptake in renal S2 cells and *Xenopus laevis* oocytes, respectively. Interestingly, its IC_{50s} was similar to that of probenecid. *Trans*-stimulation of PAH efflux by steviol was assessed to determine if steviol itself was transported by hOAT1 or hOAT3. A low concentration of steviol, 1 μM, increased the efflux of [³H]-PAH (*trans*-stimulated) via both hOAT1 and hOAT3. In addition, it was shown by electrophysiology that steviol entry induced inward positive current in fOat1-expressing oocytes. In conclusion, stevioside had no interaction with either hOAT1 or hOAT3 in both renal S2 cells and *Xenopus laevis* oocytes; whereas, steviol has high specificity for inhibition of PAH and ES transport via hOAT1 and hOAT3 similar to that of probenecid. In addition hOAT1, hOAT3 and fOat1 were all shown to be capable of steviol transport and thus, can play a role in its renal transport and excretion.

Keywords: stevioside, steviol, organic anion transporter, hOAT1, hOAT3

บทนำ

หญ้าหวานเป็นพืชพื้นเมืองของประเทศบราซิล ที่มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า ***Stevia rebaudiana Bertoni*** หรือ สตีเวีย ค้นพบโดย ***Moise Santiago Bertoni*** นักวิทยาศาสตร์ชาวอเมริกาใต้ ในปีค.ศ.1899 หญ้าหวานมีลำต้นสูงประมาณ 30-50 ซม. ลักษณะทั่วๆ ไปคล้ายต้นโหระพา ใบเล็ก ลำต้นแข็ง ปัจจุบันหญ้าหวานกำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างมากและมีการนำมาปลูกในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รวมทั้งประเทศสิงคโปร์, ไต้หวัน, มาเลเซีย, เกาหลีใต้และจีน

ชาวพื้นเมืองปารากวัย ใช้หญ้าหวานผสมกับชาดื่มมานานกว่า 1500 ปี สำหรับในประเทศญี่ปุ่นมีการนำมาใช้อย่างกว้างขวาง ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1982 และได้รับการอนุมัติให้ใช้เป็น Food additive ขณะที่ประเทศสหรัฐอเมริกาและทวีปยุโรปได้รับการอนุมัติให้ใช้เป็น Food supplement ตั้งแต่ปี 1995 เป็นต้นมา สำหรับประเทศไทยมีการปลูกหญ้าหวานกันอย่างแพร่หลายทางภาคเหนือ และมีการจำหน่ายในรูปแบบใบหญ้าหวานแห้งเพื่อการบริโภคมาเป็นเวลานาน แต่ยังไม่ได้รับการอนุมัติให้ใช้อย่างเป็นทางการ

ใบหญ้าหวานประกอบด้วยสารประกอบหลายชนิดเช่น triterpenes, sterol, tannins, volatile oils และสารประกอบที่ให้ความหวาน diterpene glycosides 8 ชนิด ได้แก่ stevioside, steviolbioside, rebaudiosides A, B, C, D, E และ dulcoside A

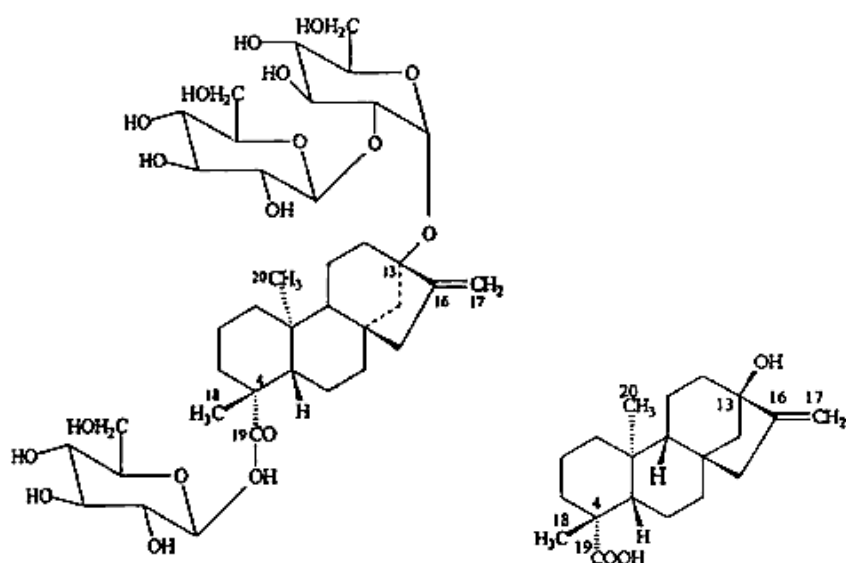
สตีวิโอไซด์ (Stevioside)

สตีวิโอไซด์ เป็นสารสกัดจากใบหญ้าหวาน ที่มีปริมาณมากที่สุด สารตัวนี้มีลักษณะเป็นผลึกสีขาว ไม่มีกลิ่น สตีวิโอไซด์ประกอบด้วย สารสตีวียอล 1 โมเลกุล (รูปที่ 1) (steviol หรือ ent-13-hydroxykaur-16-en-19-noic acid) และ กลูโคส 3 โมเลกุล โดยที่กลูโคส 1 โมเลกุลเชื่อมกับ carboxyl group ของสารสตีวียอลด้วยพันธะเอสเทอร์ ส่วนกลูโคสอีก 2 โมเลกุลต่อเชื่อมกันแบบไกลโคไซด์ โดยจับกับ hydroxyl group ของสารสตีวียอลที่คาร์บอนตัวที่ 13 สารหวานอื่นๆ มีชนิดของน้ำตาลและพันธะไกลโคไซด์ที่แตกต่างกันออกไป จากการวิจัยที่ผ่านมาพบว่าการเติมน้ำตาลกลูโคสลงบนคาร์บอนตัวที่ 13 ของสตีวิโอไซด์ จนครบ 4 หน่วยจะเพิ่มความหวานเพิ่มขึ้น แต่การเติมกลูโคสมากกว่า 4 หน่วย จะทำให้ความหวานลดลงกว่าเดิม สตีวิโอไซด์มีน้ำหนักโมเลกุล 804.9 เป็นโมเลกุลที่ไม่มีประจุ มีสูตรโครงสร้างทางเคมีคือ $C_{38}H_{60}O_{18}$

สตีวิโอไซด์ละลายได้ดีใน ethyl alcohol, methyl alcohol และละลายในน้ำได้ แต่ถ้าสารนี้มีความบริสุทธิ์สูงจะละลายน้ำได้ยาก นอกจากนั้นสตีวิโอไซด์ยังสามารถทนต่อความร้อนได้สูงถึง 100°C ทนต่อความเปลี่ยนแปลงของ pH ได้ในช่วงกว้าง ตั้งแต่ pH 3-9 และเป็นสารที่มีความชื้นต่ำ

หญ้าหวานเป็นพืชที่มีความหวานมากกว่าน้ำตาล 10-15 เท่า สารสกัดจากหญ้าหวานคือ สตีวิโอไซด์ มีความหวานกว่าน้ำตาลถึง 100-300 เท่า จากคุณสมบัติเด่นของสตีวิโอไซด์ คือ เป็นสารที่ให้ความหวานที่ไม่ก่อให้เกิดพลังงาน ดังนั้น จึงมีการนำสตีวิโอไซด์มาปรุงแต่งใน

อาหารหลายชนิดเช่น เบเกอรี่, ลูกกวาด, ซอสปรุงรส อีกทั้งยังนำมาเติมในเครื่องดื่มต่างๆ เช่น กาแฟ, ไวน์และน้ำดื่ม



รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารสตีวิโอไซด์และสารสตีวียอล

สตีวียอล (Steviol)

สตีวียอลเป็นส่วน aglycone ของสาร glycosides ตามธรรมชาติหลายชนิด สตีวียอลมีลักษณะเป็นผลึกสีขาว ไม่มีกลิ่น มีน้ำหนักโมเลกุล 314.88 สูตรโครงสร้างทางเคมีคือ $C_{20}H_{30}O_3$

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า สตีวียอลเป็นสารอนุพันธ์หลักของสตีวิโอไซด์ที่ถูกย่อยได้ โดยแบคทีเรียในลำไส้ของหนูขาว ในภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (Anaerobic condition) และจะถูกดูดซึมในส่วนของลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย (1-3)

นอกจากสารสกัดสตีวิโอไซด์ จะได้รับความสนใจเนื่องจากเป็นสารที่ให้ความหวานที่ไม่ก่อให้เกิดพลังงานแล้วยังมีรายงานว่า สารสตีวิโอไซด์ มีผลต่อระบบต่างๆของร่างกาย จึงได้มีการนำสารสตีวิโอไซด์มาศึกษาถึงผลกระทบต่อระบบต่างๆทางด้านสรีรวิทยา เช่น มีผลลดอัตราการสืบพันธุ์ทั้งเพศหญิงและชาย โดยทำการทดลองในหนูขาว (4, 5), ลดความดันโลหิตโดยมีฤทธิ์ขยายหลอดเลือด (6, 7), ลดระดับน้ำตาลในเลือด โดยการเพิ่มการหลั่งอินซูลิน ใน pancreatic β -cells ในตับอ่อน (8) รวมทั้งมีฤทธิ์ในการขับปัสสาวะ (9-12)

เมื่อพิจารณาจะเห็นว่าหญ้าหวานเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ ดังนั้น ก่อนที่จะนำเอาสารสกัดจากหญ้าหวานมาใช้ปรุงแต่งอาหาร จำเป็นต้องมีการศึกษาถึงความปลอดภัยของสารสกัดจากหญ้าหวาน เพื่อที่จะได้นำข้อมูลไปอธิบายถึงผลทางด้านสรีรวิทยา พิษวิทยาและด้านอื่นๆที่ได้มีรายงานออกมา เพราะถ้าร่างกายไม่สามารถขับสารสตีวิโอไซด์หรือสตีวียอลออกจากร่างกายได้ สารเหล่านี้ก็จะสะสมอยู่ภายในเซลล์ และอาจทำให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ ดังนั้นการ

ศึกษากลไกการขับสารสตีวียอไซด์และสารอนุพันธ์จึงเป็นสิ่งที่มีความสำคัญ เพื่อที่จะนำข้อมูลเหล่านี้มาพิจารณาหาแนวทางการวิจัยและพัฒนาหญ้าหวานและผลิตภัณฑ์ของหญ้าหวานเพื่อการบริโภคทั่วไป รวมทั้งในการนำมาใช้ในกลุ่มผู้ป่วยโรคเบาหวาน ที่จำเป็นต้องควบคุมปริมาณน้ำตาลที่บริโภคต่อไป

จากการศึกษาของ Jutabha และคณะ ในปี 2000 (13) พบว่าสารสตีวียอไซด์ 0.7 mM ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่สามารถละลายได้ในบัฟเฟอร์ มีผลยับยั้งการขนส่งสาร *para*-aminohippurate (PAH) ผ่านทางท่อไตส่วนต้นของกระต่าย (ส่วนของ S2) เพียง 20-30% โดยที่ไม่มีผลต่อ $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ และปริมาณ ATP ในเซลล์ และการเปลี่ยนแปลงนี้เป็นการเปลี่ยนแปลงชั่วคราวเท่านั้น จากการศึกษาดังกล่าวจึงสรุปได้ว่า สารสตีวียอไซด์ในระดับที่คนบริโภคไม่มีผลต่อการขนส่งสาร PAH ดังนั้นสารนี้จึงไม่น่าจะมีอันตรายต่อการทำงานของท่อไต

นอกจากสารสตีวียอไซด์ที่ได้รับความสนใจอย่างมากแล้ว สตีวียอลซึ่งเป็นสารอนุพันธ์หลักซึ่งได้จากการย่อยสลายของสตีวียอไซด์ ก็ได้รับความสนใจเช่นกัน จากรายงานที่ผ่านมาพบว่า สารสตีวียอลที่ระดับความเข้มข้นสูงๆมีผลยับยั้งการทำงานของ mitochondria (14, 15) เป็นพิษต่อมารดาและตัวอ่อนในหนูทดลอง (16) และมีผลต่อการทำงานของไต ซึ่งตรวจสอบได้จากการเพิ่มยูเรียไนโตรเจน (blood urea nitrogen, BUN) และสารครีเอตินีน (Creatinine) ในเลือด (3)

ได้มีการศึกษาผลของสารสตีวียอลต่อการทำงานของไตในหนูขาวเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1992 โดย Melis และคณะ พบว่า สารสตีวียอล มีผลทำให้หนูขาวขับปัสสาวะมากขึ้น โดยการเพิ่มอัตราเร็วในการขับปัสสาวะ (urine flow rate), อัตราการขับโซเดียม (sodium excretion rate) และ renal plasma flow (RPF) โดยที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอัตราการกรอง (glomerular filtration rate, GFR) (10, 17)

เมื่อไม่นานมานี้ Chatsudthipong และคณะ (18) ได้ทำการศึกษาผลของสารสตีวียอลต่อการทำงานของท่อไตของกระต่ายโดยใช้เทคนิค *in vitro* microperfusion พบว่าสารสตีวียอลที่ความเข้มข้น 0.01 mM ใน bathing medium มีผลยับยั้งการขนส่งสาร PAH 50%-60% และที่ความเข้มข้นที่สูงขึ้น 0.05 mM มีผลยับยั้งการขนส่งสาร PAH ถึง 90% แต่ที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้ เมื่ออยู่ทางด้าน lumen มีผลยับยั้งการขนส่งสาร PAH ได้น้อยกว่า 60%-70% จากการศึกษาดังกล่าวจึงสรุปได้ว่า สารสตีวียอลนี้มีผลยับยั้งโดยตรงต่อการขนส่งสาร PAH ผ่านทางท่อไตส่วนต้น โดยน่าจะเกิดจากการแย่งจับที่โปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบ (organic anion transporter, OAT) ในท่อไตส่วนต้นทางด้าน basolateral

จากการศึกษาดังกล่าวพบว่าสารสตีวียอลมีผลต่อการทำงานของท่อไตกระต่าย แต่ถึงแม้ว่าการทำงานของท่อไตกระต่ายจะมีลักษณะคล้ายคลึงกับท่อไตมนุษย์มากเพียงใดก็ตาม ก็ยังไม่สามารถยืนยันว่าจะเกิดผลเช่นเดียวกันในท่อไตของมนุษย์ และขณะนี้ก็ยังไม่มียารายงานการศึกษาถึงผลของสารสตีวียอลต่อการทำงานของท่อไตมนุษย์โดยตรง ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จะ

ใช้โปรตีนขนส่งที่โคลนมาจากท่อไตของมนุษย์เพื่อนำมาศึกษาถึงผลของสารสตีวียอไซด์และสตีวียอลต่อท่อไตของมนุษย์โดยตรง

เป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปว่า ไตเป็นอวัยวะที่มีความสำคัญต่อการควบคุมและกำจัดสารต่างๆออกจากร่างกาย โดยอาศัยขบวนการกรอง (ultrafiltration) การดูดซึม (reabsorption) และการขับออก (secretion) สารเหล่านั้นได้แก่ โปรตีน, อิเล็กโทรไลต์, สารอินทรีย์ทั้งประจุบวกและลบ รวมทั้งสารพิษต่างๆ

ท่อไตส่วนต้นเป็นส่วนที่มีบทบาทสำคัญที่สุดในการดูดซึมและขับสารต่างๆออกจากร่างกาย มีรายงานวาระบบการขนส่งสารอินทรีย์ที่มีประจุลบ (Organic Anion Transport System) จะพบมากที่ท่อไตส่วนต้นและส่วนที่มีอัตราขนส่งต่อความยาว 1 มิลลิเมตร สูงที่สุดคือ ส่วน S2 (19) ระบบนี้สามารถขนส่งสารอินทรีย์ได้มากมายหลายชนิด เช่น PAH, penicillin, furosemide, ethacrynic acid, aspirin, กรดอะมิโนต่างๆ, ซัลเฟต, สารประกอบในรูป glucuronide conjugate, glutathione conjugate, cyclic nucleotides, prostaglandins, urate, ยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ และสารอื่นๆอีกมากมาย (19, 20)

กลไกการขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบผ่านทางท่อไต จะเกี่ยวข้องกับโปรตีนขนส่งหรือ Transporter หลายตัวทั้งทางด้าน apical และ basolateral ของท่อไตส่วนต้น สาร PAH จะผ่านเข้าเซลล์ทางด้าน basolateral โดยอาศัยขบวนการ tertiary active transport และด้วยเหตุผลที่ว่าความต่างศักย์ภายในเซลล์มีค่าเป็นลบ ดังนั้นสารที่มีประจุลบจะผ่านเข้าไปในเซลล์ได้นั้นจะต้องต้านความแตกต่างทางไฟฟ้า (electrical gradient) และอาศัยพลังงาน (21) ซึ่งกระบวนการ tertiary active transport (รูปที่ 2) ประกอบไปด้วย

1. Organic Anion Transporter (OAT)

สารอินทรีย์ประจุลบซึ่งมักใช้เป็นสารต้นแบบ (Prototype) คือ PAH จะผ่านเข้าเซลล์ทางด้าน basolateral ของท่อไตส่วนต้น โดยแลกเปลี่ยนกับสาร dicarboxylate ผ่านทาง dicarboxylate/organic anion transporter หรือ organic anion transporter (OAT) หรือ PAH transporter, สารกลุ่ม dicarboxylate ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนขนส่งตัวนี้ ได้แก่ alpha-ketoglutarate (α -KG), glutarate, suberate และ adipate สารที่สามารถยับยั้งการขนส่งผ่านโปรตีนขนส่งตัวนี้ ได้แก่ probenecid และ fumarate (22-25)

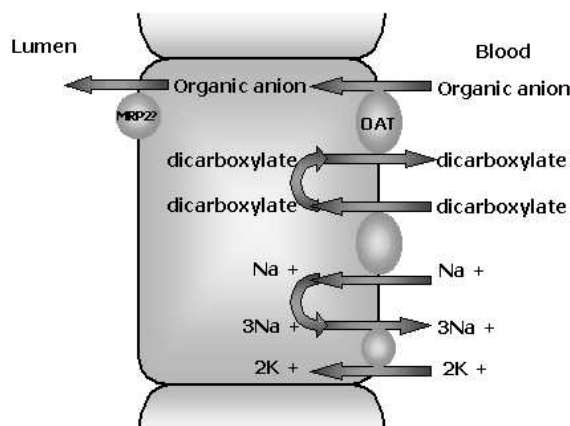
2. Sodium dicarboxylate cotransporter (NaDC)

สาร dicarboxylate ภายในเซลล์ จะแลกเปลี่ยนกับสารอินทรีย์ประจุลบได้เกิดขึ้น เนื่องจากการสร้าง dicarboxylate ขึ้นภายในเซลล์และมีการนำ dicarboxylate เข้าเซลล์พร้อมกับโซเดียม (Na^+) โดยผ่าน $\text{Na}^+/\alpha\text{-KG}$ หรือ $\text{Na}^+/\text{dicarboxylate}$ cotransporter สารที่สามารถยับยั้งการขนส่งผ่านโปรตีนขนส่งตัวนี้ ได้แก่ lithium (26)

3. $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase

ความแตกต่างของปริมาณโซเดียมระหว่าง peritubular capillaries และภายในเซลล์จะถูกรักษาไว้โดย $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase (23)

อย่างไรก็ตาม กลไกการขนส่งสาร PAH ออกจากเซลล์ทางด้าน apical ยังไม่ทราบแน่ชัด คาดว่าน่าจะเกิดขึ้นโดยผ่านกระบวนการ anion exchanger และ/หรือ facilitated diffusion (27)



รูปที่ 2 แสดงตัวอย่างรูปแบบกลไกการขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบผ่านทางท่อไต

ในปัจจุบัน Organic anion transporter (OAT) ที่โคลนจากมนุษย์ มีหลาย isoform ด้วยกันเช่น OAT1, OAT2, OAT3, OAT4 และ OAT5 จากโปรตีนขนส่งทั้งหมดนี้ hOAT1 และ hOAT3 เป็นโปรตีนขนส่ง ที่พบมากที่สุดที่ท่อไตส่วนต้นของมนุษย์ อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ hOAT1 และ hOAT3 จะเป็น transporter หลักในการกำจัดสารต่างๆผ่านทางท่อไตส่วนต้น แต่ความจำเพาะต่อสาร และความสามารถในการขนส่งสาร ของ transporter ทั้งสองนี้มีความแตกต่างกัน

Human Organic Anion Transporter 1 (hOAT1) เป็นโปรตีนขนส่งที่จะใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ซึ่ง transporter ตัวนี้ถูกโคลนขึ้นมาจากเนื้อเยื่อไตของมนุษย์เป็นครั้งแรก โดย Hosoyamada M. และคณะ (28), Race J.E. และคณะ (29), Reid G. และคณะ (30), และ Lu R. (31) cDNA ของ hOAT1 ประกอบด้วย 1,689 คู่เบส มีลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนทั้งหมด 563 ตัว ซึ่งเหมือนกับ rat OAT1 ถึง 86-91% น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 61.813 kDa, โครงสร้างทุติยภูมิ ประกอบด้วย 12 transmembrane domain (TMDs) ระหว่าง TMD ที่ 1 และ 2 มี 3-5 N-glycosylation site ซึ่งสามารถบ่งชี้ได้ว่า loop ส่วนนี้อยู่ทางด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์ ระหว่าง TMD ที่ 6 และ 7 มี phosphorylation site สำหรับ protein kinase C, protein kinase A, casein kinase II และ tyrosine kinase จากการวิเคราะห์โดยเทคนิค Northern blot analysis แสดงให้เห็นว่า mRNA ของ hOAT1 จะพบมากที่สุดที่ไต และสมองตามลำดับ โดยเฉพาะด้าน basolateral ของเยื่อหุ้มเซลล์ท่อไตส่วนต้น เมื่อใช้เทคนิควิเคราะห์โดย fluorescent *in situ* hybridization และ radiation hybrid mapping พบว่ายีน hOAT1 จะอยู่ที่โครโมโซมของ

มนุษย์คู่ที่ 11q13.1 เมื่อทำการแสดงออกในไข่กับ *Xenopus Laevis* พบว่า hOAT1 สามารถขนส่งสาร PAH ซึ่งเป็น prototypic substrate ของ OAT ได้เป็นอย่างดี ($K_m = 9.3 \pm 1.0 \mu M$)

การขนส่งสาร PAH ผ่านทางโปรตีนขนส่ง hOAT1 ถูกยับยั้งจากสารหลายชนิด เช่น benzypenicillin, loop diuretic (furosemide) ยาต้านอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (indomethacin), probenecid, phenol red, α -KG, bumethanide และ urate เป็นต้น แต่ไม่สามารถถูกยับยั้งได้โดย salicylate, choline, amiloride และ hydrochlorothiazide (28-31)

เมื่อเปรียบเทียบ hOAT1 กับโปรตีนขนส่ง species อื่นๆ มีรายงานว่า การขนส่งสาร PAH ผ่าน hOAT1 มีค่า K_m อยู่ในช่วง 5 ถึง $9.3 \mu M$ ในขณะที่การขนส่งสาร PAH ผ่าน mouse (mOAT1) มีค่าเท่ากับ $14 \mu M$, rat (rOAT1) มีค่าเท่ากับ $70 \mu M$ และ winter flounder OAT1 (fOAT1) มีค่าเท่ากับ $21 \mu M$ ซึ่งแสดงว่า hOAT1 มีความจำเพาะต่อสาร PAH มากกว่า OAT ใน species อื่นๆ

นอกเหนือจาก hOAT1 แล้ว hOAT 3 ซึ่งเป็น transporter อีกตัวหนึ่งที่จะใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ hOAT3 ได้รับความสนใจนำมาศึกษาเป็นครั้งแรกในปีค.ศ. 1999 โดย Race และคณะ(29) และต่อมาในปี 2001 โดย Cha และคณะ (32) โปรตีนขนส่งตัวนี้ถูกโคลนขึ้นมาจากเนื้อเยื่อไตของมนุษย์ โดยมีลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนทั้งหมด 568 ตัว ซึ่งเหมือนกับ hOAT1 51% จากการวิเคราะห์โดยเทคนิค Northern blot analysis แสดงให้เห็นว่า mRNA ของ hOAT3 พบมากที่สุดไต, สมอง และกล้ามเนื้อลายตามลำดับ โดยเฉพาะด้าน basolateral ของเยื่อหุ้มไตส่วนต้น เมื่อใช้เทคนิควิเคราะห์โดย radiation hybrid mapping พบว่ายีน hOAT3 จะพบอยู่ที่โครโมโซมของมนุษย์คู่ที่ 11q12-13.3 และเมื่อทำการแสดงออกในไข่กับ *Xenopus Laevis* พบว่า hOAT3 สามารถขนส่งสาร estrone sulfate (ES) ได้ค่า K_m เท่ากับ $3.1 \mu M$ ในขณะที่ขนส่งสาร methotrexate ได้ค่า K_m เท่ากับ $10.9 \mu M$, cimethidine ได้ $57.4 \mu M$ และ PAH ได้ $87.2 \mu M$ ซึ่งแสดงว่า hOAT3 มีความจำเพาะต่อสาร ES มากกว่า PAH

นอกจากนี้สารอื่นๆ เช่น dehydroepiandrosterone sulfate, ochratoxin A, PGE2, estradiol, glucuronide, taurocholate, glutarate, cAMP และ uric acid ก็ยังสามารถถูกขนส่งด้วย hOAT3 อีกด้วย

วัตถุประสงค์/เป้าหมายของการวิจัย

จะเห็นได้ว่า สารสตีวิโอไซด์ นอกจากเป็นสารที่ให้ความหวานแต่ไม่ก่อให้เกิดพลังงานแล้วยังมีผลในทางบวกต่อระบบต่างๆ ทางด้านสรีรวิทยา เช่น ผลต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด โดยมีผลลดความดันโลหิต, ผลต่อขบวนการเมตาบอลิซึมของกลูโคส โดยมีผลลดระดับน้ำตาลในเลือด และยังมีผลต่อการทำงานของไต โดยมีฤทธิ์ในการขับปัสสาวะ แต่เมื่อสารสตีวิโอไซด์เข้าสู่ร่างกายแล้ว จะถูกเปลี่ยนรูปเป็นสารอนุพันธ์หลัก คือ สตีวียอลโดยแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่

สตีวียอล เป็นสารที่มีรายงานในสัตว์ทดลองพบว่า การให้สารสตีวียอลในขนาดสูงมากจะเป็นพิษต่อมารดาและตัวอ่อนในครรภ์, เป็นพิษต่อไมโทคอนเดรีย ซึ่งเป็นออร์แกเนลล์ที่สำคัญของทุกเซลล์ อย่างไรก็ตามการให้สารสตีวียอล ยังส่งผลต่อการทำงานของไตโดยการเพิ่มอัตราเร็วในการขับปัสสาวะ (urine flow rate), อัตราการขับโซเดียม (sodium excretion rate), renal plasma flow (RPF) โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลง อัตราการกรอง (glomerular filtration rate) และจากการศึกษาของ Chatsudthipong และคณะ (18) พบว่า สารเมตาบอไลต์สตีวียอลมีผลยับยั้งการขนส่งสาร PAH ผ่านทางท่อไตส่วนต้น โดยน่าจะมีผลโดยตรงที่ Organic anion transporter (OAT) ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ จะทำการศึกษาให้ทราบถึงผลและกลไกการขับสารสตีวิโอไซด์และสตีวียอลออกจากร่างกายโดยเน้นผลโดยตรงต่อ Organic anion transporter ที่โคลนได้จากไตมนุษย์ ทั้งใน hOAT1 และ hOAT3 เนื่องจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า transporter 2 ตัวนี้ พบมากที่สุด โดยเฉพาะที่ท่อไตส่วนต้นซึ่งเป็นส่วนที่มีความสำคัญอย่างยิ่งในขบวนการขับสารออกจากร่างกาย (Secretion) ประโยชน์ที่ได้จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้ จะสามารถนำสารสตีวิโอไซด์ และสตีวียอลมาใช้ในการบริโภคและทางคลินิคต่อไป

ดังนั้น จุดมุ่งหมายหลักในการศึกษาวิจัยครั้งนี้คือการศึกษาถึงผลและกลไกการขนส่งสารสตีวิโอไซด์และสตีวียอล โดยผ่าน hOAT1 และ hOAT3 ซึ่งโคลนได้จากไตมนุษย์ และเพื่อให้บรรลุตามจุดมุ่งหมายหลักที่ได้กล่าวข้างต้น การศึกษาวิจัยครั้งนี้จะแบ่งเป็น 4 ส่วนซึ่งได้แก่

1. ศึกษาผลของสารสตีวิโอไซด์และสตีวียอลต่อการยับยั้งการขนส่งสาร PAH และ ES ผ่านทาง hOAT1 และ hOAT3 โดยการใช้ *cis-inhibition study* ใน renal S2 cells และ *Xenopus laevis* oocytes
2. วิเคราะห์ค่าทาง kinetics เพื่อกำหนดถึงความจำเพาะ (affinity) ของสารสตีวียอลต่อโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิด hOAT1 และ hOAT3 ที่มีการแสดงออกใน renal S2 cells และ *Xenopus laevis* oocytes
3. ศึกษาผลของสารสตีวียอลเพื่อบ่งชี้ให้ทราบอย่างแน่ชัดว่า สารสตีวียอลสามารถถูกขนส่งผ่านโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิด hOAT1 และ hOAT3 ที่มีการแสดงออกใน *Xenopus laevis* oocytes ได้หรือไม่ โดยใช้ *trans-stimulation study*
4. ศึกษาผลของสารสตีวียอลเพื่อบ่งชี้ให้ทราบแน่ชัดถึงกลไกการขนส่งสารสตีวียอล

ผ่านโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิด fOat1 ที่มีการแสดงออกใน *Xenopus laevis* oocytes ซึ่งเป็น basolateral transporters ที่มีลักษณะการทำงานคล้ายคลึงกับโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิด hOAT1 และ hOAT3 โดยใช้เทคนิค electro-physiology

จากข้อมูลที่ได้จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ จะทำให้เข้าใจถึงผลและกลไกการขนส่งสาร สตีวิโอไซด์และสตีวียอลผ่านทางโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิด hOAT1 และ hOAT3 ซึ่งแสดงออกใน renal S2 cells และ *Xenopus laevis* oocytes อันจะเป็นประโยชน์ในการประยุกต์ใช้สารหวานสตีวิโอไซด์ในทางคลินิกและนำสารอนุพันธ์หลัก สตีวียอล มาใช้ในการวิจัย อีกทั้งอาจนำสารสตีวิโอไซด์มาผลิตเป็นสารหวานที่ไม่ก่อให้เกิดพลังงานแทนที่สารหวานที่ได้จากการสังเคราะห์อื่นๆ นอกจากนี้ยังสามารถนำแนวทางการวิจัยในครั้งนี้มาประยุกต์ใช้เป็นพื้นฐานทางด้านชีววิทยาระดับโมเลกุล ซึ่งกำลังเป็นเทคนิคที่ได้รับการยอมรับและใช้กันอย่างแพร่หลายในต่างประเทศ เพื่อการศึกษาผลและกลไกของสารหรือสมุนไพรต่างๆได้ต่อไป

วิธีการทดลอง

ในการศึกษาครั้งนี้ เราใช้รูปแบบในการทดลอง 2 รูปแบบได้แก่ การแสดงออกของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิด hOAT1, hOAT3 และ winter flounder (fOat1) ในไข่กบ *Xenopus laevis* โดยผู้วิจัยได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก ภายใต้ความร่วมมือของอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ รศ.ดร. วรณัฐ จัตรสุทธิพงษ์ กับ Dr. John B. Pritchard, chief of department of pharmacology and toxicology, National Institute of Environmental Health Science (NIEHS), NC USA ให้เดินทางไปยังประเทศสหรัฐอเมริกา เพื่อทำการโคลนโปรตีนขนส่ง hOAT3 เพื่อใช้ในการทดลองในโครงการนี้ เนื่องจากทางห้องปฏิบัติการของ Dr. Pritchard มีเฉพาะโปรตีน hOAT1 แต่ไม่มีโปรตีนขนส่ง hOAT3 ส่วนการแสดงออกของโปรตีนขนส่ง hOAT1 และ hOAT3 ใน renal S2 cells (S2hOAT1 and S2hOAT3) นั้น ทางผู้วิจัยได้รับความกรุณาจาก Dr. Hitoshi Endou, Kyorin University, Japan ส่งเซลล์ดังกล่าวมาทำการศึกษาในประเทศไทย

การเพาะเลี้ยงเซลล์ (Tissue Culture)

Renal S2 cells ทั้ง 3 ชนิด (S2hOAT1, S2hOAT3 and S2mock (control)) ถูกเลี้ยงไว้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RITC 80-7 เสริมด้วย fetal bovine serum 5% เพนนิซิลิน 100 ยูนิต/มล. และสเตรปโตมัยซิน 100 ไมโครกรัม/มล. ในสภาวะบรรยากาศที่มีความชื้นขึ้นเพียงพอ (humidified atmosphere) ภายในตู้อบซึ่งมีความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37°C

การวิเคราะห์หาปริมาณการขนส่งสารเข้าสู่เซลล์ (Transport assay in renal S2 cells)

ในการทดลองเพื่อวัดปริมาณการขนส่งสารกัมมันตภาพรังสี [¹⁴C]-PAH และ [³H]-ES เข้าสู่เซลล์ ด้วยการศึกษาแบบ *cis*-inhibition นั้น จะทำการทดลองที่อุณหภูมิ 37°C โดยมีขั้นตอนโดยย่อ คือ หลังจากดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจนหมดด้วยเครื่องดูดสูญญากาศ (Vacuum pump) จะทำการล้างเซลล์ซึ่งเรียงตัวกันเป็นชั้นเดี่ยว (monolayer of cells) เติมน้ำที่ผิวกันหลุม ถาดทดลองด้วยสารละลาย D-PBS buffer จำนวน 1 มล. 2 ครั้ง หลังจากนั้นจะทำการแช่เซลล์ที่จะทำการทดลองไว้ในสารละลาย D-PBS buffer จำนวน 1 มล. นาน 10 นาที หลังจากนั้นจึงทำการทดลอง โดยใช้สารละลาย D-PBS buffer ซึ่งมี [¹⁴C]-PAH หรือ [³H]-ES ละลายอยู่ (transport buffer) โดยที่มีการเพิ่มปริมาณสารที่ต้องการจะศึกษาปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนขนส่ง hOAT1 และ hOAT3 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ขึ้นอยู่กับการศึกษาทดลองในแต่ละกรณี ในการศึกษาทางจลนศาสตร์ (Kinetic study) ของการทำงานของโปรตีนขนส่ง hOAT1 และ hOAT3 ต่อสารสตีวอลนั้น เวลาที่ใช้ในการขนส่งสาร [¹⁴C]-PAH หรือ [³H]-ES เข้าสู่เซลล์เป็นเวลาทั้งหมด 2 นาทีซึ่งเป็นเวลาที่ยังอยู่ในระยะอัตราเริ่มต้น (initial rate) ของการขนส่งสาร หลังจากนั้นจะหยุด

การทำงานของโปรตีนขนส่ง โดยทำการดูดสารละลายที่ใช้ในการวัดปริมาณการขนส่งทั้งไป จากนั้นล้างเซลล์ที่อยู่ในแต่ละหลุม 3 ครั้ง ด้วยสารละลาย D-PBS buffer ที่อุณหภูมิ 4°C ปริมาณ 1 มล. เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณของสารกัมมันตภาพ $[^{14}\text{C}]$ -PAH และ $[^3\text{H}]$ -ES ที่ถูกขนส่งเข้าสู่เซลล์ หลังจากเสร็จการทดลองแล้ว เซลล์จะถูกทำให้แตกโดยใช้สารละลาย 0.1 N NaOH ปริมาณ 0.5 มล. แล้วนำสารละลายของเซลล์ที่ได้ใส่เข้าไปในขวดสำหรับวัดสารกัมมันตภาพรังสี (Scintillation vial) ใส่สารละลายสำหรับวัดสารกัมมันตภาพรังสี (Scintillation fluid) จำนวน 4.5 มล. เพื่อวัดหาปริมาณของสารกัมมันตภาพรังสี $[^{14}\text{C}]$ -PAH หรือ $[^3\text{H}]$ -ES ที่สะสมอยู่ภายในเซลล์ต่อไป หลังจากทำการวัดสารกัมมันตภาพรังสีแล้ว นำค่าที่ได้มาคำนวณหาอัตราการขนส่งสารกัมมันตภาพรังสีเข้าสู่เซลล์ โดยมีหน่วยเป็นพิโคโมลของสารรังสีต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อนาที (pmol/mg protein/ min) โดยวัดปริมาณโปรตีนในเซลล์ จากวิธีของ Lowry (modified Lowry's method) หลังจากนั้นนำค่าที่ได้จากกลุ่มทดลองแต่ละกลุ่มมาคำนวณเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีอยู่ โดยมีหน่วยเป็น เปอร์เซ็นต์ของกลุ่มควบคุม (% of Control)

การเตรียม oocytes สำหรับการทดลองในรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนขนส่ง hOAT1, hOAT3 และ winter flounder (fOat1) ในไข่กบ *Xenopus laevis*

ไข่กบ *Xenopus laevis* เพศเมีย ด้วยยาสลบ 0.3% tricaine ประมาณ 20 นาที หลังจากนั้นจะทำการผ่าตัดเพื่อนำเอาไข่กบออกมาด้วย collagenase A (1 mg/ml) เป็นเวลา 90 นาที ซึ่ง cRNA จะถูกเตรียมมาจากการทำ *in vitro* transcription โดยใช้ purified plasmid cDNA ของ hOAT1, hOAT3 และ fOat1 ไข่กบจะถูกฉีดด้วย 20 นาโนกรัมของ cRNA ของ hOAT1, hOAT3 และ fOat1 เพื่อใช้สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณการขนส่งสารเข้าสู่เซลล์ (Transport assay) และ การศึกษาโดยใช้เทคนิค Electro-physiology

การวิเคราะห์หาปริมาณการขนส่งสารเข้าสู่เซลล์โดยใช้ไข่กบ *Xenopus laevis*

ในการทดลองเพื่อวัดปริมาณการขนส่งสารกัมมันตภาพรังสี $[^3\text{H}]$ -PAH และ $[^3\text{H}]$ -ES เข้าสู่เซลล์โดยผ่านทางโปรตีนขนส่ง hOAT1 และ hOAT3 (*cis*-inhibition) นั้น จะทำการทดลองที่อุณหภูมิห้อง โดยมีขั้นตอนโดยย่อ คือ ภายหลังจากฉีด cRNA เข้าสู่ไข่กบ *Xenopus* เป็นเวลา 3 วันแล้ว ไข่กบจะถูกแช่ไว้ในสารละลาย OR 2-buffer ซึ่งมีสารกัมมันตภาพรังสี $[^3\text{H}]$ -PAH หรือ $[^3\text{H}]$ -ES ละลายอยู่ โดยที่มีการเพิ่มปริมาณสารที่ต้องการจะศึกษาปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิด hOAT1 และ hOAT3 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ขึ้นอยู่กับการทดลองในแต่ละกรณี เป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้น จะหยุดการทำงานของโปรตีนขนส่ง โดยการดูดสารละลายทิ้งไป จากนั้นทำการล้างไข่กบ (8-10 oocytes ต่อ 1 กลุ่มการทดลอง) ด้วยสารละลาย OR-2 buffer ที่อุณหภูมิ 4 °C ปริมาณ 1 มล. จำนวน 5 ครั้ง นำไข่กบแต่ละฟองใส่ในขวดสำหรับวัดสารกัมมันตภาพรังสี (Scintillation polyvinyl vial) หลังจากนั้นไข่กบแต่ละฟอง จะถูกทำให้แตกด้วยสารละลาย 1 N NaOH ปริมาณ 0.2 มล. จากนั้นจะทำการใส่สารละลายเป็น

กลาง (neutralization) ด้วย 1 N HCl ปริมาณ 0.2 มล. ใส่สารละลายสำหรับวัด สารกัมมันตภาพรังสี (Scintillation fluid) จำนวน 4 มล. เพื่อวัดหาปริมาณของสารกัมมันตภาพรังสี [³H]-PAH หรือ [³H]-ES ที่สะสมอยู่ในไข่กบแต่ละฟอง หลังจากทำการวัดแล้ว ค่าที่ได้จะนำมาคำนวณหาอัตราการขนส่งสารกัมมันตภาพรังสีเข้าสู่เซลล์ โดยมีหน่วยเป็นพิโคโมลต่อไข่กบ 1 ฟอง ต่อ 60 นาที (pmol/ oocyte/60 min) แล้วนำค่าดังกล่าวที่ได้จากกลุ่มทดลองแต่ละกลุ่มมาคำนวณเทียบกับกลุ่มที่มีอยู่ โดยมีหน่วยเป็น เปอร์เซ็นต์ของกลุ่มควบคุม (% of Control)

ในการศึกษาทางจลนศาสตร์ (Kinetic study) ของการทำงานของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิด hOAT1 และ hOAT3 ต่อสารสเตียออลนั้นเวลาที่ใช้ในการขนส่งสารกัมมันตภาพรังสี [³H]-PAH หรือ [³H]-ES เข้าสู่ไข่กบ เป็นเวลาทั้งหมด 30 นาที ซึ่งเป็นเวลาที่ยังอยู่ในระยะอัตราเริ่มต้น (initial rate) ของการขนส่งสาร หลังจากนั้นจะทำการหยุดการทดลองและทำให้ไข่กบแตก ตลอดจนถึงวัดปริมาณสารกัมมันตภาพรังสี [³H]-PAH หรือ [³H]-ES ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น

การทดลองเพื่อวัดปริมาณการขนส่งสารกัมมันตภาพรังสี [³H]-PAH ออกนอกเซลล์เพื่อดูความสามารถในการผ่านเข้าเซลล์ของสารสเตียออล โดยผ่านทางโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิด hOAT1 และ hOAT3 (*Trans-stimulation*) นั้น มีขั้นตอนโดยย่อดังนี้ คือ นำไข่กบซึ่งมีการแสดงออกของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิด hOAT1 หรือ hOAT3 แขนในสารละลาย OR-2 buffer ซึ่งมีสารกัมมันตภาพรังสี [³H]-PAH ที่ความเข้มข้น 10 μ M ละลายอยู่เป็นเวลา 120 นาที ซึ่งเป็นเวลาที่มากพอที่จะสะสมสารกัมมันตภาพรังสี [³H]-PAH ไว้ภายในไข่กบได้ หลังจากนั้นไข่กบในแต่ละกลุ่มการทดลอง (10 ฟอง) จะถูกล้างด้วยสารละลาย OR-2 buffer ที่อุณหภูมิห้อง ปริมาณ 1 มล. จำนวน 3 ครั้ง หลังจากนั้นไข่กบในแต่ละกลุ่มการทดลองจะถูกแช่อีกครั้งด้วยสารละลาย OR-2 buffer ซึ่งมีสาร PAH หรือ สารยับยั้ง probenecid ที่มีความเข้มข้น 1mM หรือสารสเตียออลที่มีความเข้มข้นต่างๆ ในช่วงเวลาสุดท้ายของการทดลอง (ณ นาทีที่ 90) สารกัมมันตภาพรังสี [³H]-PAH ที่อยู่ในสารละลาย OR-2 และที่อยู่ในไข่กบจะถูกนำมาวัดและคำนวณอัตราการขนส่งสารกัมมันตภาพรังสี [³H]-PAH ออกจากเซลล์ซึ่งแตกต่างกับสารสเตียออล โดยผ่านโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิด hOAT1 และ hOAT3

การศึกษากลไกการขนส่งสารสเตียออลผ่านทางโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิด fOat1 โดยใช้เทคนิค Electro-physiology

จากการศึกษาที่ผ่านมา มีรายงานว่า สาร PAH สามารถผ่านโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิด rat OAT (rOAT1), hOAT1 หรือ winter flounder OAT (fOat1) ที่แสดงออกในไข่กบ โดยทำให้เกิดกระแส inward (inward current) ได้ แต่กระแสไฟฟ้าที่พบใน fOat1 นั้นชัดเจนกว่าใน rOAT1 (33, 34) อีกทั้งจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า substrates ของ fOat1 มีความคล้ายคลึงกันกับ hOAT1 (adefovir) และ hOAT3 (ES) (34, 35) แต่ fOat1 สามารถทำให้เกิดกระแสไฟฟ้าได้มากกว่า ดังนั้นในการศึกษาดังนี้ เราจึงเลือกใช้ fOat1 ในการศึกษากลไกการ

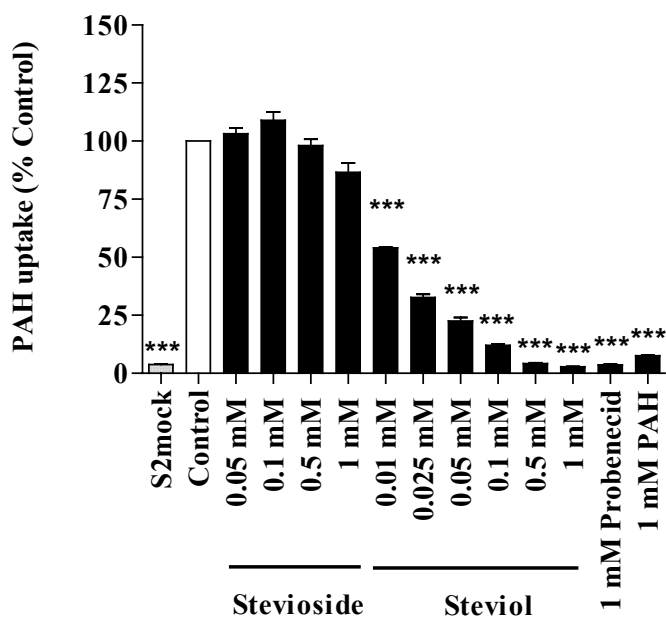
ขนส่งสารสตีวอลโดยใช้เทคนิค Electro-physiology หลักการโดยย่อของเทคนิคนี้ คือ นำไข่กบซึ่งมีการแสดงออกของโปรตีนขนส่ง fOat1 เข้าใน ภาตวาง (oocyte recording chamber) ซึ่งมีสารละลาย OR-2 ไหลผ่านด้วยความเร็ว 4 มล. ต่อ นาที (4 ml/min) ณ อุณหภูมิห้อง ในการทดลองนี้ได้ใช้วิธี conventional two-electrode voltage clamp method ในการวัดค่ากระแสไฟฟ้า (current) ที่เมมเบรนของไข่กบ ไข่กบจะถูก clamp ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า -80 มิลลิโวลต์ (mV) หลังจากนั้นจะมีการเปลี่ยนสารละลาย OR-2 เป็น สารละลายที่มี OR-2 ที่มีสาร PAH หรือ สารสตีวอล แล้วแต่การทดลองเพื่อวัดค่ากระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง

ผลการทดลอง

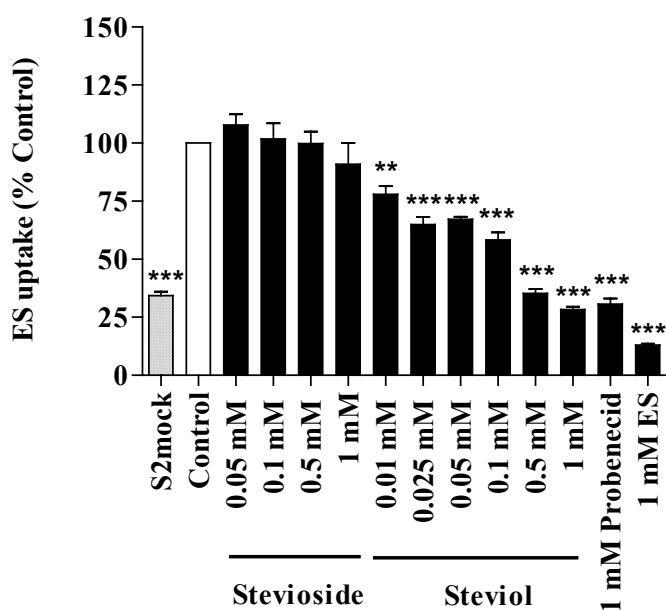
1. การศึกษาปฏิสัมพันธ์ของสารสตีวียโอไซด์และสารสตีวียอลต่อการขนส่งสารอินทรีย์ ประจุลบโดยผ่านโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบที่โคลนได้จากไตมนุษย์ชนิด hOAT1 และ hOAT3

เพื่อการศึกษาถึงผลโดยตรงของสารสตีวียโอไซด์และสารสตีวียอลต่อ โปรตีนตัวขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบที่โคลนได้จากไตมนุษย์ชนิด hOAT1 และ ชนิด hOAT3 การศึกษาแบบ *cis-inhibition* ได้ถูกทำการทดลองทั้งใน renal S2 cells และ *Xenopus laevis* oocytes ดังแสดงในรูปที่ 3 (A และ B) สารสตีวียโอไซด์ที่ความเข้มข้น 50 μM ถึง 1 mM ไม่ได้มีผลต่อการขนส่งสาร PAH และ ES ผ่านทาง hOAT1 และ hOAT3 ตามลำดับ การทดลองดังกล่าวยังได้ทำใน *Xenopus oocyte* เนื่องจากเป็นโมเดลที่เหมาะสมต่อการศึกษาถึงผลของสารตัวใดตัวหนึ่งต่อโปรตีนตัวขนส่งเพียง 1 ตัว ซึ่งผลที่ได้ ดังรูปที่ 4 (A และ B) พบว่าสารสตีวียโอไซด์ มิได้มีผลการขนส่งสาร PAH และ ES ผ่านทาง hOAT1 และ hOAT3 เช่นกัน ในทางตรงกันข้ามสารสตีวียอลที่ความเข้มข้น 10 μM สามารถเกิดผลยับยั้งการขนส่งของสาร PAH และ ES ได้ทั้งใน renal S₂ cells และ *Xenopus oocyte* (รูปที่ 3A,B และ 4A,B) ตามลำดับ นอกจากนี้ผลการยับยั้งการขนส่งสาร PAH และ ES ทั้งใน renal S2 cells และ *Xenopus oocyte* เกิดขึ้นแบบ concentration-dependent เมื่อทำการคำนวณค่า inhibition constants ($\text{IC}_{50\text{s}}$) ของสารสตีวียอลใน renal S₂ cells และ *Xenopus oocytes* พบว่าค่า IC_{50} ของสตีวียอลต่อการขนส่งสาร PAH ผ่านทาง hOAT1 มีค่า 11.4 และ 11.1 μM ในโมเดลทั้งสองตามลำดับ ในขณะที่ค่า IC_{50} ของสารสตีวียอลต่อการขนส่งสาร ES ผ่านทาง hOAT3 มีค่า 36.5 และ 62.6 μM ในโมเดลทั้งสองตามลำดับ ซึ่งค่าดังกล่าวสามารถสรุปได้ดังตารางสรุปที่ 1

3A.

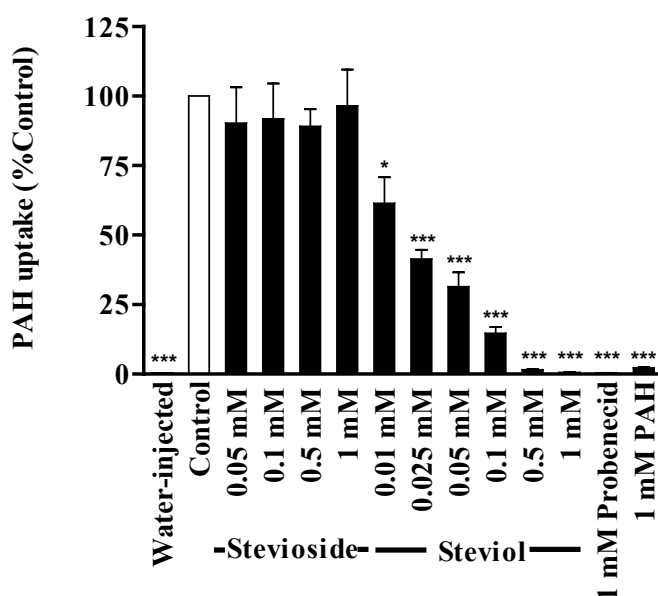


3B.

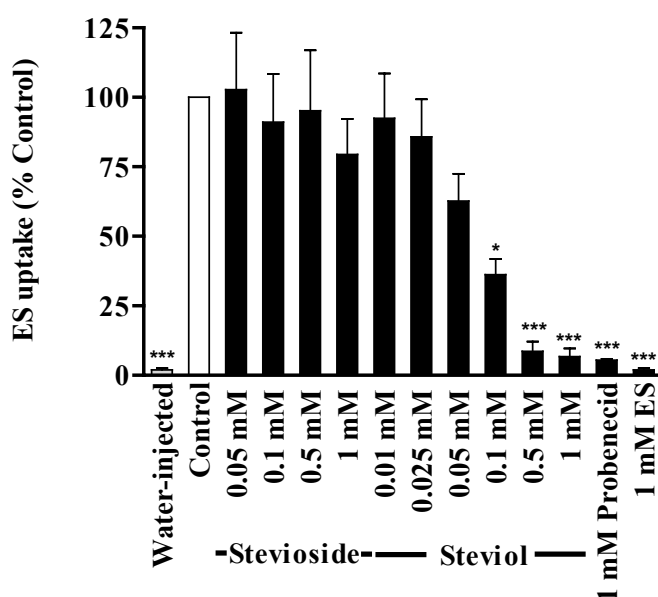


รูปที่ 3 การยับยั้งกระบวนการขนส่งสารกัมมันตภาพรังสี [14 C]-PAH (A) และ [3 H]-ES (B) เข้าสู่เซลล์โดยอาศัยการทำงานของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบที่โคลนได้จากไตมนุษย์ชนิด hOAT1 (A) และ ชนิด hOAT3 (B) ที่มีการแสดงออกอย่างถาวรใน renal S2 cells โดยสารสตีวิโอไซด์และสารสตีวียอลที่หลายความเข้มข้น ข้อมูลในกราฟแสดงถึงปริมาณสารกัมมันตภาพรังสี [14 C]-PAH (A) และ [3 H]-ES (B) ที่ถูกขนส่งเข้าสู่เซลล์ มีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับปริมาณสารกัมมันตภาพรังสี [14 C]-PAH (A) และ [3 H]-ES (B) ที่วัดได้ในเซลล์กลุ่มควบคุมที่ไม่มีการใส่สารสตีวิโอไซด์และสารสตีวียอล ซึ่งคิดเป็นปริมาณการขนส่งเท่ากับ 100%

4A.



4B.



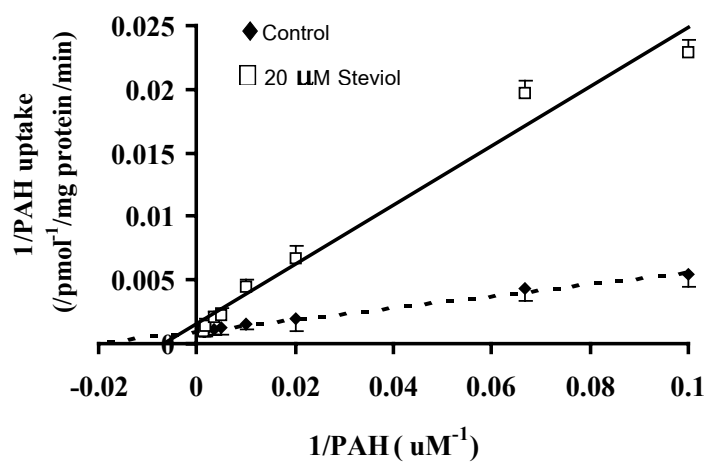
รูปที่ 4 การยับยั้งกระบวนการขนส่งสารกัมมันตภาพรังสี [^3H]-PAH (A) และ [^3H]-ES (B) เข้าสู่เซลล์โดยอาศัยการทำงานของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบที่โคลนได้จากไตมนุษย์ชนิด hOAT1 (A) และ ชนิด hOAT3 (B) ที่มีการแสดงออกชั่วคราวในไข่ของ *Xenopus laevis* โดย สารสตีวิโอไซด์และสารสตีวียอลที่หลายความเข้มข้น ข้อมูลในกราฟ แสดงถึงปริมาณสารกัมมันตภาพรังสี [^3H]-PAH (A) และ [^3H]-ES (B) ที่ถูกขนส่งเข้าสู่เซลล์ มีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับปริมาณสารกัมมันตภาพรังสี [^3H]-PAH (A) และ [^3H]-ES (B) ที่วัดได้ในเซลล์ กลุ่มควบคุมที่ไม่มีการใส่สารสตีวิโอไซด์และสารสตีวียอล ซึ่งคิดเป็น ปริมาณการขนส่งเท่ากับ 100%

2. ผลการวิเคราะห์ทางจลศาสตร์ของ สารสตีวียอลต่อการขนส่งสาร PAH และ ES ผ่านทางโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบที่โคลนได้จากไตมนุษย์ ชนิด hOAT1 และ hOAT3 ตามลำดับ

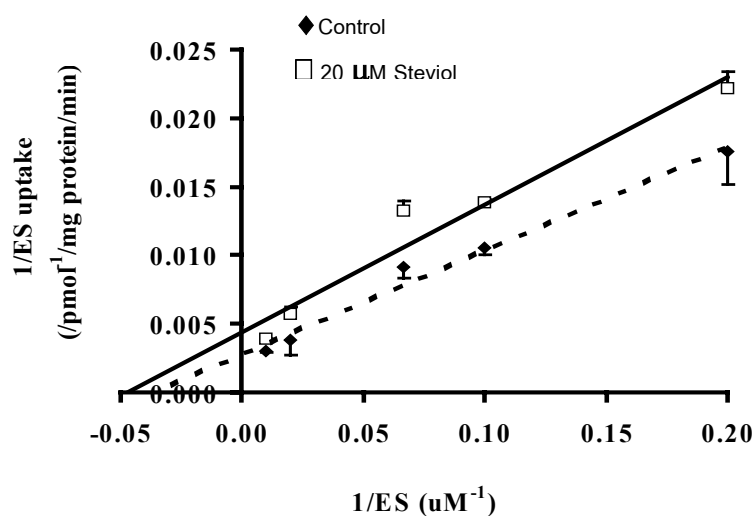
จากรูปที่ 5 (A และ B) แสดงถึงผลของสารสตีวียอลต่อการขนส่งสาร PAH และ ES ผ่านทางโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิด hOAT1 และ hOAT3 ใน renal S2 cells ค่า Michaelis Menten constant (K_m) ของการขนส่งสาร PAH ในกลุ่มควบคุมมีค่า $46.4 \mu\text{M}$ ในขณะที่กลุ่มที่มีสารสตีวียอล $20 \mu\text{M}$ มีค่า apparent $K_m = 155.2 \mu\text{M}$ โดยมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมประมาณ 3 เท่า ซึ่งเมื่อนำมาคำนวณหาค่า Michaelis Menten Inhibition Constant (K_i) = $8.5 \mu\text{M}$ การทดลองแบบเดียวกันได้ถูกทำใน renal S2 cells expressing hOAT3 โดยศึกษาผลของสารสตีวียอลต่อการขนส่งสาร ES ผ่านทางโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิด hOAT3 ผลที่ได้พบว่า ค่า K_m ในกลุ่มควบคุมมีค่า $21.1 \mu\text{M}$ ในขณะที่ค่า apparent K_m เมื่อมีสารสตีวียอล $20 \mu\text{M}$ มีค่า $28.2 \mu\text{M}$ ซึ่งมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมเพียงเล็กน้อย และเมื่อนำมาคำนวณหาค่า K_i แล้วจะได้ค่า $31.5 \mu\text{M}$

การวิเคราะห์ทางจลศาสตร์ของสารสตีวียอลต่อการขนส่งสาร PAH และ ES ผ่านทางโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิด hOAT1 และ hOAT3 ได้ทำการทดลองอีกครั้งใน *Xenopus laevis* oocytes โดยผลที่ได้ดังแสดงในรูป 6 (A และ B) ค่า Michaelis Menten constant (K_m) ของการขนส่งสาร PAH ในกลุ่มควบคุมมีค่า $11.0 \mu\text{M}$ ในขณะที่กลุ่มที่มีสารสตีวียอล $50 \mu\text{M}$ มีค่า apparent $K_m = 21.8 \mu\text{M}$ โดยมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมประมาณ 2 เท่า ซึ่งเมื่อนำมาคำนวณหาค่า Michaelis Menten Inhibition Constant (K_i) = $2.0 \mu\text{M}$ การทดลองแบบเดียวกันได้ถูกทำใน oocytes-expressing hOAT3 โดยศึกษาผลของสารสตีวียอลต่อการขนส่งสาร ES ผ่านทางโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิด hOAT3 ผลที่ได้พบว่า ค่า K_m ในกลุ่มควบคุมมีค่า $4.8 \mu\text{M}$ ในขณะที่ค่า apparent K_m เมื่อมีสารสตีวียอล $50 \mu\text{M}$ มีค่า $10.1 \mu\text{M}$ ซึ่งมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมเพียงเล็กน้อย เมื่อนำมาคำนวณหาค่า K_i แล้วจะได้ค่า $5.4 \mu\text{M}$

5A.

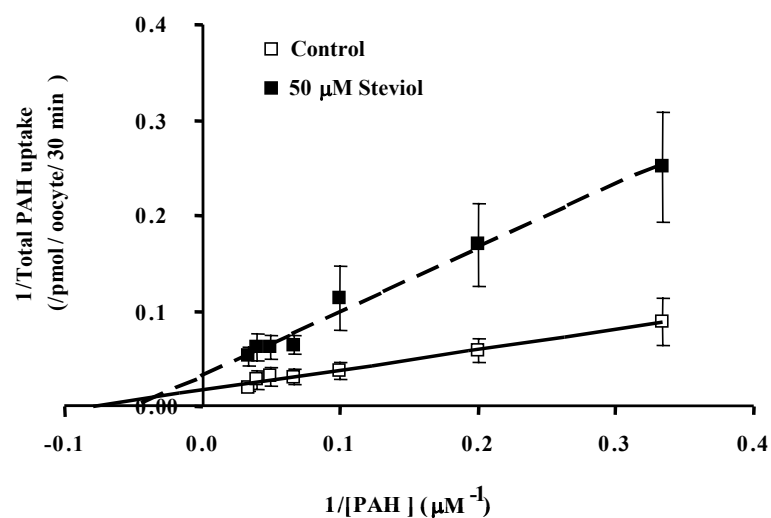


5B.

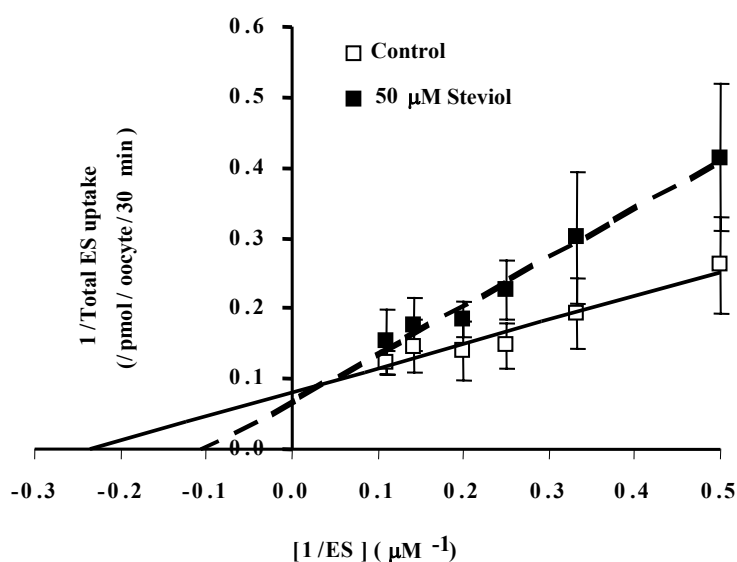


รูปที่ 5 แสดงค่าทางจลนศาสตร์ของการขนส่งสารกัมมันตภาพรังสี [¹⁴C]-PAH (A) และ [³H]-ES (B) ที่ถูกขนส่งเข้าสู่เซลล์ โดยอาศัยการทำงานของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบที่โคลนได้จากไตมนุษย์ชนิด hOAT1 (A) และ ชนิด hOAT3 (B) ที่มีการแสดงออกอย่างถาวรใน renal S2 cells เมื่อใส่สารสตีวียอลที่ความเข้มข้น 20 μM เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการใส่สารสตีวียอล ค่า K_i ที่ได้จากการคำนวณเท่ากับ 8.5 (A) 31.5 (B) μM ตามลำดับ

6A.



6B.



รูปที่ 6 แสดงค่าทางจลนศาสตร์ของการขนส่งสารกัมมันตภาพรังสี [3H]-PAH (A) และ [3H]-ES (B) ที่ถูกขนส่งเข้าสู่เซลล์ โดยอาศัยการทำงานของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบที่โคลนได้จากไตมนุษย์ชนิด hOAT1 (A) และ ชนิด hOAT3 (B) ที่มีการแสดงออกชั่วคราวใน ไข่กบ *Xenopus laevis* เมื่อใส่สารสตีวียอลที่ความเข้มข้น 50 μM เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการใส่สารสตีวียอล ค่า K_i ที่ได้จากการคำนวณเท่ากับ 2.0 (A) 5.4 (B) μM ตามลำดับ

ตารางสรุปที่ 1 แสดงค่าทางจลนศาสตร์ของสารสตีวียอลต่อโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบที่โคลนได้จากไตมนุษย์ชนิด hOAT1 (A) และ ชนิด hOAT3 (B) ใน renal S2 cells และ *Xenopus laevis* oocytes

Cloned	IC ₅₀ (μM)		K _i (μM)	
	S2 cells	Oocytes	S2 cells	Oocytes
HOAT1	11.4	11.1	8.5	2.0
HOAT3	36.5	62.6	31.8	5.4

อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าจะทราบว่าสารสตีวียอลมีผลโดยตรงต่อการขนส่งสารผ่านทางโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิด hOAT1 และ hOAT3 แต่ก็ยังไม่ทราบแน่ชัดว่า สารสตีวียอล จะสามารถถูกนำเข้าสู่เซลล์และกำจัดออกจากร่างกายโดยผ่านโปรตีนขนส่งทั้งสองตัวนี้ ได้หรือไม่ หรืออีกนัยหนึ่งคือ ยังไม่ทราบแน่ชัดว่า สารสตีวียอล เป็น substrate ของ transporter ทั้งสองตัวนี้หรือไม่

ดังนั้นในการศึกษาวิจัยครั้งนี้จะทำการศึกษาต่อไปเพื่อให้ทราบแน่ชัดว่า สารสตีวียอลจะสามารถถูกขนส่งผ่านทางโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิด hOAT1 และ hOAT3 ได้หรือไม่

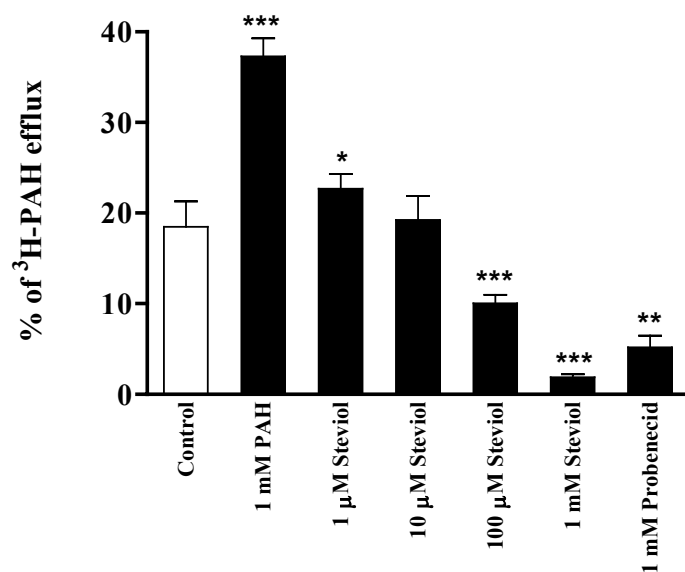
3. การทดสอบกลไกการขนส่งสารสตีวียอลผ่านโปรตีนตัวขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบที่โคลนได้จากไตมนุษย์ชนิด hOAT1 และ hOAT3 โดยทำการแสดงออกในไข่กบ *Xenopus laevis* oocytes และทำการศึกษาโดยวิธี *trans-stimulation*

ในรูปที่ 7A แสดงผลการทดลองที่เกิดในไข่กบ ที่มีการแสดงออกของโปรตีนขนส่ง hOAT1 พบว่า ค่าสารกัมมันตภาพรังสี [³H]-PAH มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (เกิด *trans-stimulation*) เมื่อใส่สาร PAH ที่ความเข้มข้น 1 mM ที่อยู่ในสารละลาย OR-2 ซึ่งใช้เป็นกลุ่ม positive control เทียบกับสารละลาย OR-2 เพียงอย่างเดียว (กลุ่มควบคุม) ในกลุ่มที่มีสารสตีวียอล 1 μM แสดงให้เห็นผลคล้ายกันกับสาร PAH ซึ่งหมายถึง มีปริมาณสารกัมมันตภาพรังสี [³H]-PAH เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (เกิด *trans-stimulation*) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตาม ในกลุ่มที่มีสารสตีวียอลที่ความเข้มข้น 10 μM ถึง 1 mM ไม่พบการเกิด *trans-stimulation*

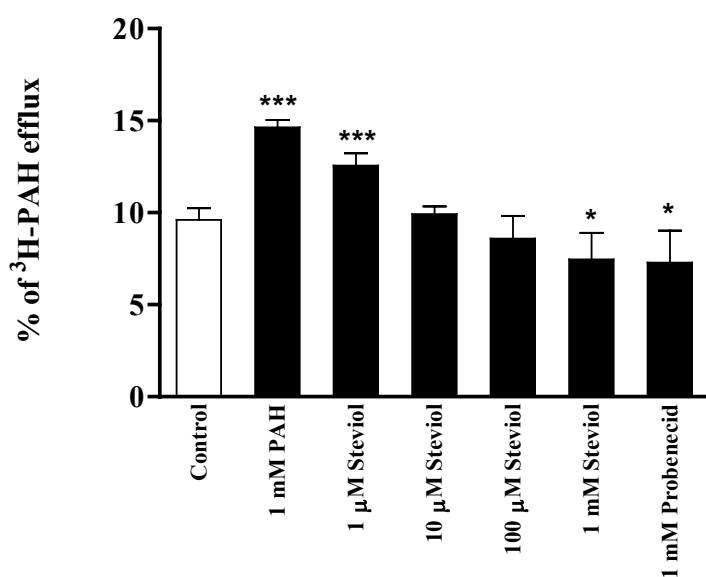
และเมื่อพิจารณากลุ่มที่มีสารสเตียวอลที่ความเข้มข้น 100 μM และ 1 mM พบว่า 2 กลุ่มดังกล่าวมีค่าสารกัมมันตภาพรังสี [^3H]-PAH ในสารละลาย OR-2 น้อยกว่ากลุ่มควบคุม หรือการเกิด *trans*-inhibition ซึ่งผลที่พบดังกล่าวคล้ายคลึงกันกับผลของกลุ่มที่มีสารยับยั้งการขนส่งสาร PAH ผ่านทาง hOAT1 และ hOAT3 ซึ่งก็คือ 1 mM Probenecid

ในรูปที่ 7B แสดงผลการทดลองที่เกิดขึ้นในไขกบที่มีการแสดงออกของโปรตีนขนส่ง hOAT3 ต่อการเกิด *trans*-stimulation ของสารสเตียวอล โดยใช้สาร PAH ที่ความเข้มข้น 1 mM เป็น positive control ซึ่งจากการทดลองพบว่า สารสเตียวอลที่ความเข้มข้น 1 μM ส่งผลให้ค่าสารกัมมันตภาพรังสี [^3H]-PAH มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (เกิด *trans*-stimulation) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามผลของการเกิด *trans*-stimulation ไม่ได้เกิดขึ้นในกลุ่มสารสเตียวอลที่ความเข้มข้น 10 และ 100 μM ส่วนกลุ่มความเข้มข้นของสารสเตียวอลที่ 1 mM และกลุ่มสาร Probenecid แสดงผลเหมือนกันคือ เกิด *trans*-inhibition

7A.



7B.

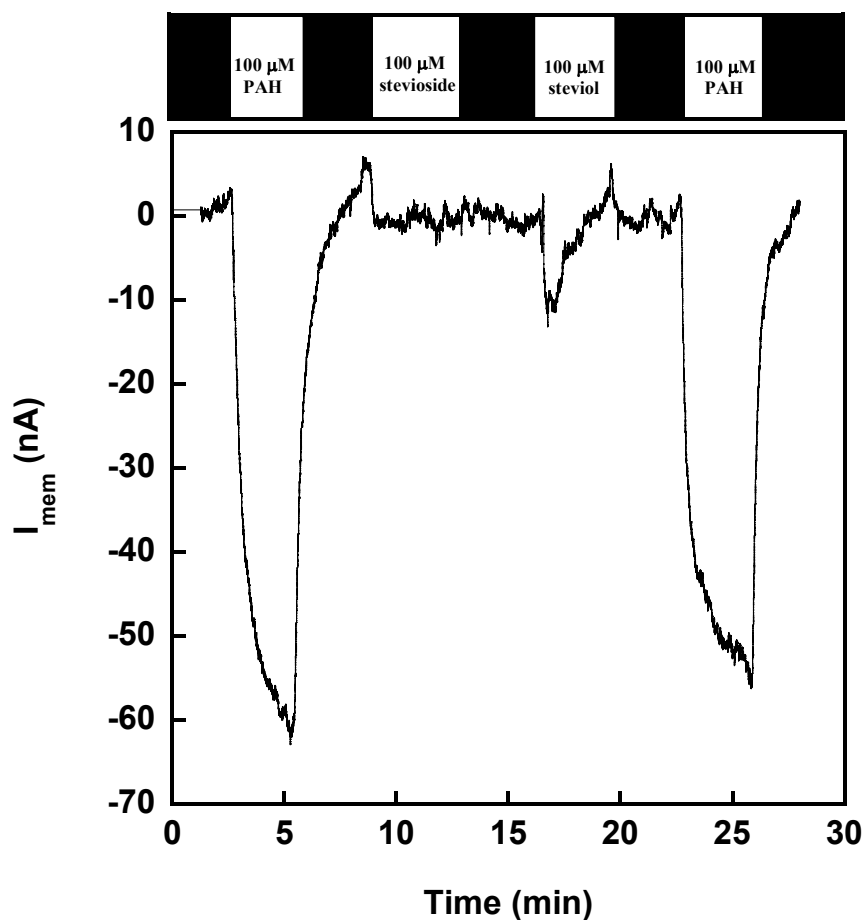


รูปที่ 7 แสดงค่าสารกัมมันตภาพรังสี [³H]-PAH ที่วัดได้ในสารละลาย OR-2 หลังจากทำการแช่ไขกับ *Xenopus laevis* ที่มีการแสดงออกของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบที่โคลนได้จากไตมนุษย์ชนิด hOAT1 (A) และ ชนิด hOAT3 (B) ในสารละลาย OR-2 ที่มีสารกัมมันตภาพรังสี [³H]-PAH 10 μM เป็นเวลา 120 นาที และถูกนำไปแช่ในสารละลาย OR-2 ที่มีสารสตีวียอล หลายความเข้มข้น เป็นเวลา 90 นาที ปริมาณสารกัมมันตภาพรังสี [³H]-PAH ที่วัดได้ในสารละลาย OR-2 ในแต่ละกลุ่ม มีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับปริมาณสารกัมมันตภาพรังสี [³H]-PAH ที่วัดได้ในกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการใส่สารสตีวียอล

4. การทดสอบกลไกการขนส่งสารสตีวียอลผ่านโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบที่โคลนได้จาก winter flounder OAT (fOat1) โดยทำการแสดงออกในไข่กบ *Xenopus laevis* oocytes และทำการศึกษาโดยวิธี Electro-physiology

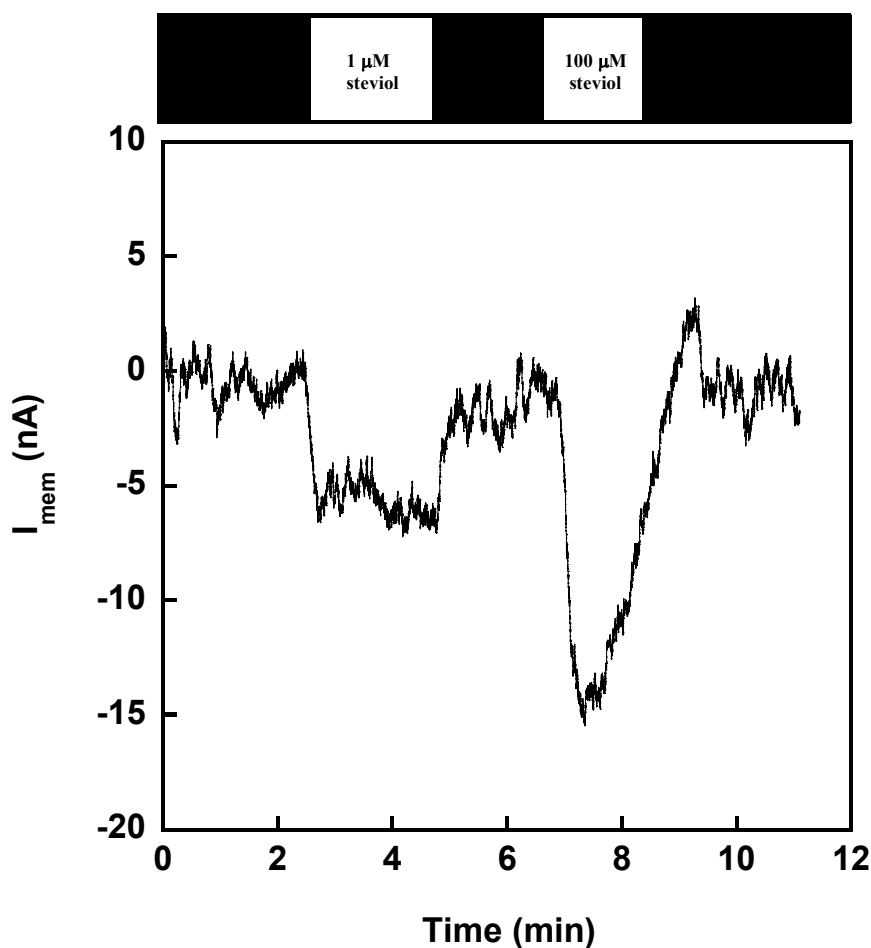
ดังแสดงในรูปที่ 8A หลังจาก clamp ไข่กบที่มีการแสดงออกของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิด fOat1 ที่ความต่างศักย์ -80 mV แล้วพบว่า เมื่อใส่สารละลาย OR-2 ที่มี $100\text{ }\mu\text{M}$ PAH แล้ว สารดังกล่าวสามารถทำให้เกิดกระแส inward (inward current) ซึ่งมีค่า -61.9 ± 2.4 นาโนแอมป์ (nA) ในขณะที่สารสตีวียอลที่ความเข้มข้นเดียวกันสามารถทำให้เกิด inward current ได้เพียง -11.7 ± 1.0 nA ส่วนสารสตีวียโอไซด์ที่ความเข้มข้น $100\text{ }\mu\text{M}$ ไม่ส่งผลใดๆต่อกระแสไฟฟ้า ทำให้สามารถสรุปได้ว่า สารสตีวียอลสามารถขนส่งผ่านทางโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิด fOat1 ได้

8A.



เมื่อพิจารณารูปที่ 8B จะเห็นว่า สารสตีวียอลสามารถทำให้เกิด inward current ได้มากขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารมากขึ้น จึงสรุปได้ว่า ผลของสารสตีวียอลทำให้เกิด inward current แบบขึ้นกับความเข้มข้น (concentration-dependent) ได้

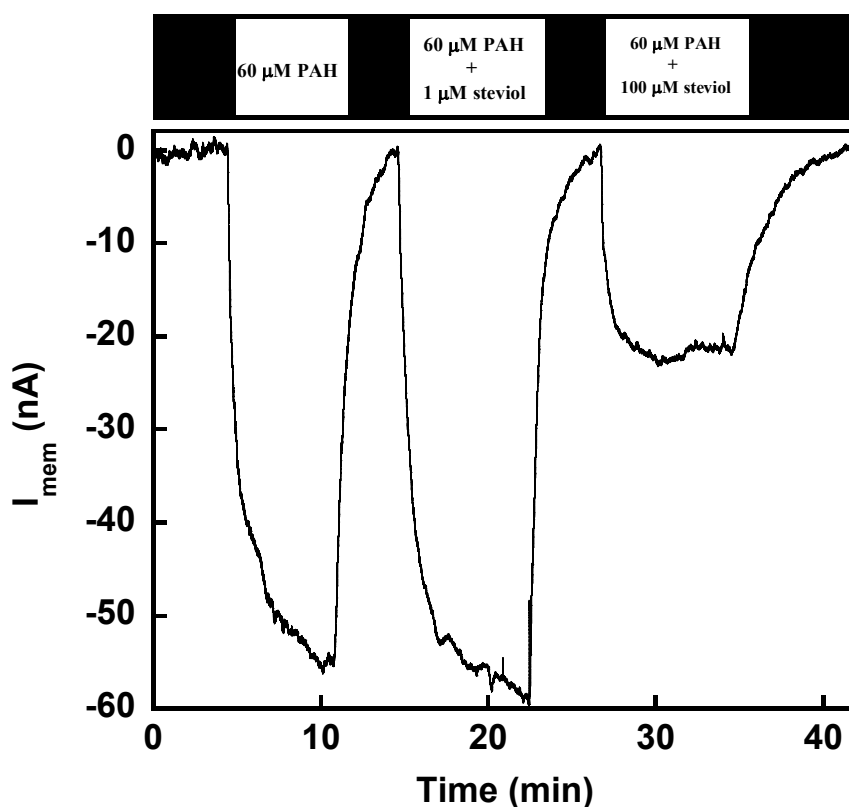
8B.



เมื่อทำการทดลองต่อไปเพื่อพิสูจน์ว่าสารสตีวียอลสามารถขนส่งผ่านทางโปรตีนขนส่งขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิด fOat1 ได้ช้ากว่าสาร PAH หรือไม่ เราทำการทดลองโดยใช้สารละลาย OR-2 ที่มีทั้งสาร PAH (ณ ความเข้มข้นที่ K_{50} ซึ่งเท่ากับ $60 \mu\text{M}$) และสารสตีวียอลที่ความเข้มข้นสูงและต่ำ พบว่า เมื่อใช้สารละลาย OR-2 ที่มีทั้งสาร PAH $60 \mu\text{M}$ รวมกับสารสตีวียอลที่ความเข้มข้น $1 \mu\text{M}$ นั้น สามารถทำให้เกิด inward current ได้มากกว่าการใช้สารละลาย OR-2 ที่มีสาร PAH เพียงอย่างเดียว ($103.9 \pm 1.2 \%$ of control PAH current) นอกจากนี้เมื่อใช้สารละลาย OR-2 ที่มีสาร PAH $60 \mu\text{M}$ รวมกับสารสตีวียอลที่ความเข้มข้น $100 \mu\text{M}$ นั้น พบว่า ค่า inward current ที่เกิดขึ้นลดลงต่ำกว่าการใช้สารละลาย OR-2 ที่มีสาร PAH เพียงอย่าง

เดียว (47.3 ± 5.4 % of control PAH current) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า สารสตีวียอลสามารถขนส่งผ่าน โปรตีนขนส่งขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิด fOat1 ได้แต่ในอัตราที่ช้ากว่าสาร PAH ซึ่งเป็นสารต้นแบบ (prototypic substrate) ของ organic anion transporters (OATs)

8C.



รูปที่ 8 แสดงการศึกษากลไกการขนส่ง สารสตีวียอไซด์และสารสตีวียอล (A) ผ่านโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิด fOat1 โดยใช้สาร PAH เป็น positive control และพบว่า (B) สารสตีวียอลสามารถทำให้เกิดกระแส inward ได้แบบขึ้นกับความเข้มข้น (concentration-dependent) และ (C) สารสตีวียอลสามารถขนส่งผ่านโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิด fOat1 ได้ในอัตราที่ช้ากว่าสาร PAH ซึ่งเป็นสารต้นแบบของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบทั่วไป

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

สารสกัดจากหญ้าหวานและสารสตีวิโอไซด์เป็นสารที่ได้รับความสนใจและมีการนำหญ้าหวานมาปลูกเพื่อใช้เป็นสารหวานในหลายประเทศรวมทั้งในประเทศญี่ปุ่น, สิงคโปร์, ไต้หวัน, มาเลเซีย, เกาหลีใต้และจีน และได้รับการอนุมัติให้ใช้เป็น Food supplement ในประเทศสหรัฐอเมริกาตั้งแต่ ปีค.ศ. 1995 เป็นต้นมา จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสารสตีวิโอไซด์มีผลทางพิษวิทยาน้อยมากหรือแทบเรียกได้ว่าไม่ส่งผลทางพิษวิทยาเลย (16) จากการศึกษาที่ผ่านมา โดย Yamada และคณะ (36) พบว่าเมื่อให้สารสตีวิโอไซด์ในหนูขาวเป็นเวลานานถึง 2 ปี ด้วยความเข้มข้นสูงถึง 550 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนัก (mg/kg BW) (สูงถึง 200 เท่าของความเข้มข้นสูงสุดที่มนุษย์ควรบริโภค ซึ่งเท่ากับ 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนัก) ก็ยังไม่ส่งผลกระทบในทางลบแต่อย่างใด จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสารสตีวิโอไซด์สามารถช่วยลดความดันโลหิตและลดระดับน้ำตาลในเลือดในมนุษย์ได้ (6, 8, 37, 38) ในขณะที่สารสตีวียอล (สารเมตาบอไลต์ของสตีวิโอไซด์) มีรายงานว่า ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ใน *Salmonella typhimurium* TM677 (39) ดังนั้นผลทางชีววิทยาและผลทางด้านปฏิสัมพันธ์ของสารดังกล่าวกับยาอื่นๆ ยังไม่แน่ชัด

ขบวนการดูดซึม การแพร่กระจายและเมตาบอลิซึมของสารสตีวิโอไซด์ ได้ถูกนำมาศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่า การดูดซึมของสารสตีวิโอไซด์เกิดขึ้นน้อยมากเมื่อทำการทดลองใน everted sacs ของหนูขาวและ Caco-2 เซลล์ ในขณะที่การดูดซึมของสารสตีวียอลเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว (40, 41) เป็นที่ทราบกันแล้วว่าสารสตีวิโอไซด์สามารถถูกย่อยเป็นสารสตีวียอลได้โดยแบคทีเรียในลำไส้ของสัตว์หลายชนิดรวมทั้งในมนุษย์ (3, 40, 42, 43) จากรายงานที่ผ่านมาพบว่า เมื่อให้สารสตีวิโอไซด์ในสัตว์ทดลองแล้ว เฉพาะสารสตีวียอลเท่านั้นที่ถูกดูดซึม อีกทั้งมีรายงานการว่าสารสตีวิโอไซด์และสารเมตาบอไลต์สามารถถูกกำจัดออกจากร่างกายได้อย่างรวดเร็ว การศึกษาในปีค.ศ. 1996 โดย Cardoso และคณะ (42) พบว่า เมื่อฉีดสารกัมมันตภาพรังสี สตีวิโอไซด์ [¹³¹I]-stevioside ในหนูขาวแล้ว สารกัมมันตภาพรังสีที่ตรวจพบในเลือด ณ นาทีที่ 60 มีค่าลดลงอย่างรวดเร็วจนเหลือเพียงแค่ 6% ของความเข้มข้นที่ฉีดเข้าไป สารกัมมันตภาพรังสีที่ตรวจพบได้ในปัสสาวะและในอุจจาระยังมีใกล้เคียงกันอีกด้วย นอกจากนี้การศึกษาที่ผ่านมายังพบว่าค่า clearance ของสารสตีวิโอไซด์ มีค่าสูงกว่าค่า clearance ของสาร inulin ซึ่งสามารถบอกได้ว่า สารสตีวิโอไซด์ (หรือสารสตีวียอล) สามารถถูกขับออกทางไตได้โดยวิธี active transport เมื่อพิจารณาถึงความเป็นไปได้ดังกล่าวแล้ว ยังพบอีกว่า สารสตีวียอลสามารถยับยั้งการขนส่งของสาร PAH ใน renal cortical slices ของหนูขาว

เป็นที่ทราบกันดีว่าโปรตีนขนส่งซึ่งพบทางด้าน basolateral ของท่อไต 2 ชนิด คือ hOAT1 และ hOAT3 สามารถขนส่งสาร PAH และสามารถขับสารอินทรีย์ประจุลบและสาร xenobiotic ต่างๆ โดยอาศัยพลังงาน อีกทั้งยังทำหน้าที่กำจัดสาร endogenous และ exogenous ออกจากร่างกายได้ (28, 32) จากการที่พบค่า clearance ของสารสตีวิโอไซด์หรือ

สารสตีวียอล มีค่าสูง และผลของสารสตีวียอลสามารถยับยั้งการขนส่งของสาร PAH ทำให้คาดเดาได้ว่า สารตัวใดตัวหนึ่งหรือทั้งสองตัวดังกล่าว น่าจะใช้โปรตีนขนส่ง hOAT1 และ hOAT3 เป็นทางผ่านเพื่อขับสารดังกล่าวออกจากร่างกาย เพื่อลดความเข้มข้นของสารนั้นๆในร่างกาย รวมทั้งลดความเสี่ยงต่อการเกิดพิษต่อร่างกาย อย่างไรก็ตามถ้าสารนั้นๆสามารถขนส่งผ่านทางโปรตีนขนส่ง hOAT1 และ /หรือ hOAT3 แล้วสารนั้นก็อาจจะแสดงให้เห็นการสะสมของสารดังกล่าวในท่อไต ถึงขั้นอาจทำให้เกิดความเสียหายต่อไตได้เช่นกัน นอกจากนี้สารนั้นๆ อาจจะเปลี่ยนแปลงการขับสารอินทรีย์ประจุลบอื่นๆ ซึ่งอาศัยโปรตีนขนส่ง hOAT1 และ hOAT3 ทำให้เกิดการสะสมของสารอินทรีย์ประจุลบในร่างกายได้เช่นกัน ดังนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งในการศึกษาถึงกลไกการขนส่งของสารสตีวียโอไซด์หรือสารสตีวียอลผ่านทางไต โดยอาศัยความรู้ทางด้านชีวโมเลกุล

จากการศึกษาของ Jutabha และคณะ (13) แสดงให้เห็นผลของสารสตีวียโอไซด์ที่ความเข้มข้น 0.7 mM สามารถลดการขนส่งสาร PAH ในขณะที่สารสตีวียอลที่ความเข้มข้นเพียงแค่ 10 μM ก็สามารถยับยั้งการขนส่งสาร PAH ในระดับท่อไตได้ อย่างไรก็ตาม การศึกษาในครั้งนั้นไม่ได้ทำการทดลองอย่างเฉพาะเจาะจงถึงปฏิสัมพันธ์ และกลไกการขนส่งของสารสตีวียโอไซด์หรือสารสตีวียอลต่อโปรตีนขนส่งชนิด basolateral OATs ซึ่งจากผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่า สารสตีวียโอไซด์ไม่ได้ยับยั้งการขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบผ่านทาง hOAT1 และ hOAT3 ซึ่งทำการแสดงออกทั้งใน renal S2 cells และในไขกบ *Xenopus laevis* (ดังแสดงในรูป 3A,B; 4A,B) อีกทั้งผลการศึกษาโดยอาศัยเทคนิค Electro-physiology พบว่า สารสตีวียโอไซด์ ไม่ได้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง ความต่างศักย์ไฟฟ้าของเมมเบรนของไขกบ ที่มีการแสดงออกของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิด fOat1 (ดังแสดงในรูป 8A) ซึ่งสามารถบ่งชี้ได้ว่า สารสตีวียโอไซด์ไม่ได้ถูกขนส่งด้วยโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบที่อยู่ทางด้าน basolateral ของท่อไต ผลการศึกษาในครั้งนี่ยังสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาโดยพบว่า สารสตีวียโอไซด์ไม่ได้ส่งผลต่อการเผาผลาญพลังงาน (energy metabolism) ใน intact cells (44) ดังนั้นจึงหมายความว่า สารสตีวียโอไซด์ไม่น่าที่จะมีผลในแง่ลบต่อการทำหน้าที่ของเซลล์ เหตุผลของการที่สารสตีวียโอไซด์ไม่ได้มีปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบน่าจะเกิดจากลักษณะโครงสร้างทางเคมีของสารสตีวียโอไซด์ซึ่งมีขนาดค่อนข้างใหญ่ (MW 804.9) จึงไม่สามารถจับกับโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิด hOAT1 และ hOAT3 ได้ ถึงแม้ว่าการศึกษาผลของสารสตีวียโอไซด์ต่อการขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบในครั้งนี้แตกต่างกับการศึกษาของ Jutabha และคณะ ซึ่งทำการศึกษาในท่อไตของกระต่าย จากการศึกษาความแตกต่างทางด้านการจับแน่นของ substrate ต่อโปรตีนขนส่งและกลไกการขนส่งของสารอินทรีย์ประจุลบในแต่ละ species นั้นได้ถูกรายงานไว้เช่นกัน ดังตัวอย่างเช่น ความจำเพาะของสาร PAH ต่อโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบที่โคลนได้จากไตของมนุษย์ (hOAT1) นั้นมีค่าสูงกว่าที่โคลนได้จากสัตว์ชนิดอื่นๆ ด้วยค่า inhibition constant (K_i) ประมาณ 5 – 9.3 μM ในขณะที่ค่า K_i ของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบที่โคลนได้จากไตของหนูเม้าส์ (mOAT1) มีค่า 37 μM ค่า K_i ของโปรตีนขนส่งสาร

อินทรีย์ประจุลบที่โคลนได้จากไตของหนูแรท (rOAT1) มีค่า 14-70 μM และค่า K_t ของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบที่โคลนได้จากไตของ winter flounder (fOat1) มีค่า 21 μM ส่วนค่า K_t ของสาร PGE_2 ต่อโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิด mOAT2 มีค่าประมาณ 5 μM ซึ่งสูงกว่า hOAT2 และ rOAT2 ซึ่งมีค่าประมาณ 713 nM และ 39 μM ตามลำดับ (45) ดังนั้นความแตกต่างที่เกิดขึ้นจากผลของสารสเตียรอยด์ต่อการขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบในกระต่ายและโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบที่โคลนได้จากไตของมนุษย์จึงน่าจะเกิดขึ้นได้เช่นกัน

ทางในทางตรงกันข้าม สารเมตาบอไลต์ของสารสเตียรอยด์ หรือที่เรียกว่าสารสเตียรอยด์ออกลับให้ผลที่แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด โดยการศึกษาในครั้งนี้พบว่า สารสเตียรอยด์สามารถยับยั้งการขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบโดยผ่านโปรตีนขนส่ง hOAT1 และ hOAT3 ได้เป็นอย่างดี ในรูปแบบขึ้นกับความเข้มข้น (dose-dependent) (ดังแสดงในรูป 3A,B; 4A,B) ผลยับยั้งการขนส่งของสารกัมมันตภาพรังสี [^3H]-PAH ที่เกิดขึ้นจากสารสเตียรอยด์นั้นเกิดขึ้นเท่ากับสาร PAH ที่ความเข้มข้นเดียวกัน (ดังแสดงในรูป 3A) ซึ่งบ่งชี้ได้ว่า ความจำเพาะของสารสเตียรอยด์ต่อโปรตีนขนส่ง hOAT1 นั้นมีความใกล้เคียงกับสาร PAH อย่างไรก็ตาม การศึกษาการขนส่งสารโดยใช้วิธี *cis-inhibition* บ่งชี้เพียงว่า สารสเตียรอยด์นั้นมีความจำเพาะสูงในการจับกับโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิด basolateral OAT แต่ก็ยังไม่สามารถบอกได้ว่า สารสเตียรอยด์นั้นจะสามารถถูกขนส่งผ่านทางต่อไตโดยผ่านทางโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิด basolateral OAT หรือไม่ ดังนั้นเพื่อพิสูจน์สมมติฐานดังกล่าว เราจึงใช้โปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิด fOat1 ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิด hOAT1 และ hOAT3 ในแง่ของสาร substrate (adefovir and estrone sulfate ตามลำดับ) แต่การใช้โปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิด fOat1 สามารถทำให้เกิดกระแสไฟฟ้าได้ชัดเจนกว่า hOAT1 และ hOAT3 เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบผ่านทางโปรตีนขนส่งเหล่านี้ (34, 35) ดังนั้นเราจึงเลือกใช้โปรตีนขนส่ง fOat1 ในการทดสอบผลของสารสเตียรอยด์ต่อการเปลี่ยนแปลงของกระแสไฟฟ้าในไขกบที่มีการแสดงออกของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิด fOat1

รูปที่ 8A และ B แสดงผลการทดสอบด้วยสารสเตียรอยด์ที่ความเข้มข้น 1 และ 100 μM สามารถทำให้เกิดกระแส inward (inward current) ในไขกบที่มีการแสดงออกของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิด fOat1 อีกทั้งผลที่เกิดขึ้น นั้นยังสอดคล้องกับผลการศึกษาด้วยวิธี *trans-stimulation* ซึ่งพบว่าสารสเตียรอยด์ที่ความเข้มข้น 1 μM สามารถทำให้เกิด *trans-stimulation* ของสารกัมมันตภาพรังสี [^3H]-PAH โดยผ่านทางโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิด hOAT1 และ hOAT3 อย่างไรก็ตามสารสเตียรอยด์ที่ความเข้มข้นสูงๆ กลับแสดงให้เห็นถึงการเกิด *trans-inhibition* ของสารกัมมันตภาพรังสี [^3H]-PAH เหมือนกับผลของสารยับยั้ง probenecid ซึ่งจะจับแน่นกับโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบโดยทั่วไป เหตุผลที่ทำให้เกิดผลที่แตกต่างกันของสารสเตียรอยด์ที่ความเข้มข้นต่ำ (1 μM) และสูง (100 μM) นั้นยังไม่เป็นที่ทราบอย่างแน่ชัด แต่อาจบ่งชี้ได้ว่าการขนส่งของสารสเตียรอยด์เกิดขึ้นอย่างช้าๆ ดังนั้น ณ ความ

เข้มข้นสูงๆ สารสตีวียอลอาจจะจับที่ binding site ของโปรตีนขนส่งเหมือนที่สาร probenecid จับ แล้วจึงเกิดเป็น *trans*-inhibition ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า สารสตีวียอลมีอัตราการขนส่งผ่านโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบในอัตราที่ช้ากว่าสาร PAH ซึ่งจะเห็นได้จากการเปลี่ยนแปลงของกระแส inward ดังแสดงในรูปที่ 8A, B และ C ผลที่เกิดขึ้นในครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้โดย Groves และคณะ (46) ซึ่งพบว่า substrate ตัวหนึ่งที่จับแน่นกับโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุบวก organic cation transporter (OCT) ได้แก่ สาร tetrapentylammonium (TPeA) สามารถยับยั้งการขนส่งออก (เกิด *trans*-inhibition) ของสารกัมมันตภาพรังสี tetraethylammonium (TEA) เมื่อทำการทดลองในท่อไตของกระต่าย ซึ่งเมื่อสาร TPeA จับกับ OCT แล้ว จะลดอัตราการขนส่งของโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุบวกนั้น การศึกษาในครั้งนี้ได้ถูกยืนยันอีกครั้งในการศึกษาเกี่ยวกับโครงสร้างและหน้าที่ของ substrate ต่อโปรตีนขนส่ง (structure-activity) โดยการใช้การศึกษาแบบ 3 มิติ (three-dimensional quantitative) (47)

โดยสรุป สารสกัดจากหญ้าหวานสตีวียอไซด์ไม่ได้ถูกขนส่งผ่านทางโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบที่อยู่ทางด้าน basolateral (basolateral organic anion transporter) ในทางตรงกันข้าม โปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิด hOAT1 และ hOAT3 สามารถขนส่งสารสตีวียอลซึ่งเป็นสารเมตาบอไลต์ของสารสตีวียอไซด์ ซึ่งบ่งชี้ได้ว่า การขนส่งสารสตีวียอลผ่านทางโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิด hOAT1 และ hOAT3 นั้นอาจมีความสำคัญในการขับสารกัมมันตภาพรังสีที่เกิดจากการเมตาบอไลต์ของสารสตีวียอไซด์ที่เห็นก่อนหน้านี้นี้ในสัตว์ทดลอง (*in vivo* study) นอกจากนี้ สารสตีวียอลยังมีความจำเพาะสูงต่อ โปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบ ชนิด hOAT1 และ hOAT3 คล้ายกันกับสาร probenecid ดังนั้น สารสตีวียอลจึงน่าจะมีความสำคัญ ในการกำจัดสารอินทรีย์ประจุลบและสารเมตาบอไลต์อื่นๆ ออกจากไต ได้ด้วยเช่นกัน

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

สามารถนำแนวทางการวิจัยในครั้งนี้ มาประยุกต์ใช้เป็นพื้นฐานทางด้านชีววิทยาระดับโมเลกุล ซึ่งกำลังเป็นเทคนิคที่ได้รับการยอมรับและใช้กันอย่างแพร่หลายในต่างประเทศ เพื่อการศึกษาผลและกลไกของสารหรือสมุนไพรไทยต่าง ๆ ได้ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Wingard RE, Jr., Brown JP, Enderlin FE, Dale JA, Hale RL, Seitz CT. Intestinal degradation and absorption of the glycosidic sweeteners stevioside and rebaudioside A. *Experientia* 1980;36(5):519-20.
2. Nakayama K, Kasahara D, Yamamoto F. Absorption, distribution, metabolism and excretion of stevioside in rats. *J Food Hyg Soc Japan* 1986;27(Abstract in English).
3. Hutapea AM, Toskulkao C, Buddhasukh D, Wilairat P, Glinsukon T. Digestion of stevioside, a natural sweetener, by various digestive enzymes. *J Clin Biochem Nutr.* 1997;23:177-186.
4. Planas GM, Kuc J. Contraceptive properties of stevia rebaudiana. *Science.* 1968;162:1007.
5. Melis MS. Effects of chronic administration of *Stevia rebaudiana* on fertility in rats. *J Ethnopharmacol* 1999;67(2):157-61.
6. Chan P, Xu DY, Liu JC, Chen YJ, Tomlinson B, Huang WP, et al. The effect of stevioside on blood pressure and plasma catecholamines in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci* 1998;63(19):1679-84.
7. Chan P, Tomlinson B, Chen YJ, Liu JC, Hsieh MH, Cheng JT. A double-blind placebo-controlled study of the effectiveness and tolerability of oral stevioside in human hypertension. *Br J Clin Pharmacol* 2000;50(3):215-20.
8. Jeppesen PB, Gregersen S, Poulsen CR, Hermansen K. Stevioside acts directly on pancreatic beta cells to secrete insulin: actions independent of cyclic adenosine monophosphate and adenosine triphosphate-sensitive K⁺-channel activity. *Metabolism* 2000;49(2):208-14.
9. Melis MS, Sainati AR. Participation of prostaglandins in the effect of stevioside on rat renal function and arterial pressure. *Braz J Med Biol Res* 1991;24(12):1269-76.
10. Melis MS. Renal excretion of stevioside in rats. *J Nat Prod.* 1992;55(5):688-690.
11. Melis MS. Stevioside effect on renal function of normal and hypertensive rats. *J Ethnopharmacol* 1992;36(3):213-7.
12. Melis MS. Chronic administration of aqueous extract of *Stevia rebaudiana* in rats: renal effects. *J Ethnopharmacol* 1995;47(3):129-34.
13. Jutabha P, Toskulkao C, Chatsudhipong V. Effect of stevioside on PAH transport by isolated perfused rabbit renal proximal tubule. *Can J Physiol Pharmacol* 2000;78(9):737-44.

14. Vignais PV, Duee ED, Vignais PM, Huet J. Effects of atractyligenin and its structural analogues on oxidative phosphorylation and on the translocation of adenine nucleotides in mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1966;118(3):465-83.
15. Kelmer Bracht AM, Kemmelmeier FS, Ishii EM. Effect of stevia rebaudiana natural products on cellular and sub-cellular metabolism. *Arg Biol Technol* 1985;28(3):431-455.
16. Toskulkao C, Chaturat L, Temcharoen P, Glinsukon T. Acute toxicity of stevioside, a natural sweetener, and its metabolite, steviol, in several animal species. *Drug Chem Toxicol* 1997;20(1-2):31-44.
17. Melis MS. Effects of steviol on renal function and mean arterial pressure in rats. *Phytomedicine*. 1997;3:349-352.
18. Chatsudhipong V, Jutabha P. Effect of steviol on para-aminohippurate transport by isolated perfused rabbit renal proximal tubule. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;298(3):1120-7.
19. Pritchard JB, Miller DS. Mechanisms mediating renal secretion of organic anions and cation. *Physiol Rev* 1993;73(4):765-96.
20. Dantzler WH, Evans KK, Wright SH. Kinetics of interactions of para-aminohippurate, probenecid, cysteine conjugates and N-acetyl cysteine conjugates with basolateral organic anion transporter in isolated rabbit proximal renal tubules. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;272:663-73.
21. Burckhardt G, Bahn A, Wolff NA. Molecular physiology of renal *p*-aminohippurate secretion. *News Physiol Sci* 2001;16:114-118.
22. Shimada H, Moewes B, Burckhardt G. Indirect coupling to Na of *p*-aminohippuric acid uptake into rat renal basolateral membrane vesicles. *Am J Physiol* 1987;253:F795-801.
23. Pritchard JB. Coupled transport of *p*-aminohippurate by rat kidney basolateral membrane vesicles. *Am J Physiol* 1988;255(4 Pt 2):F597-604.
24. Pritchard JB. Rat renal cortical slices demonstrate *p*-aminohippurate/glutarate exchange and sodium/glutarate coupled *p*-aminohippurate transport. *J Pharmacol Exp Ther* 1990;255(3):969-75.
25. Schmitt C, Burckhardt G. *P*-aminohippurate/ α -ketoglutarate exchange in bovine renal brush-border and basolateral membrane vesicles. *Pflugers Arch* 1993;423:280-90.
26. Burckhardt G. Sodium-dependent dicarboxylate transport in rat renal basolateral membrane vesicles. *Pflugers Arch* 1984;401:254-61.

27. Remon AMH, Aubel V, Masereeuw R. Molecular pharmacology of renal organic anion transporters. *Am J Physiol (Renal Physiol)* 2000;279:F216-F232.
28. Hosoyamada M, Sekine T, Kanai Y, Endou H. Molecular cloning and functional expression of a multispecific organic anion transporter from human kidney. *Am J Physiol* 1999;276(1 Pt 2):F122-8.
29. Race JE, Grassl SM, Williams WJ, Holtzman EJ. Molecular cloning and characterization of two novel human renal organic anion transporters (hOAT1 and hOAT3). *Biochem Biophys Res Commun* 1999;255(2):508-14.
30. Reid G, Wolff NA, Dautzenberg FM, Burckhardt G. Cloning of a human renal p-aminohippurate transporter, hROAT1. *Kidney Blood Press Res* 1998;21:233-237.
31. Lu R, Chan BS, Schuster VL. Cloning of the human kidney PAH transporter: narrow substrate specificity and regulation by protein kinase C. *Am J Physiol* 1999;276(2 Pt 2):F295-303.
32. Cha SH, Sekine T, Fukushima JI, Kanai Y, Kobayashi Y, Goya T, et al. Identification and characterization of human organic anion transporter 3 expressing predominantly in the kidney. *Mol Pharmacol* 2001;59(5):1277-86.
33. Burckhardt BC, Wolff NA, Burckhardt G. Electrophysiologic characterization of an organic anion transporter cloned from winter flounder kidney (fROAT). *J Am Soc Nephrol* 2000;11(1):9-17.
34. Aslamkhan AG, Bleasby K, Wolff NA, Miller DS, Pritchard JB. fROAT has mixed substrate specificity compared to mammalian OAT1 and OAT3 orthologs. *Experimental Biology* 2003;Late Breaking Abstract:21.
35. Aslamkhan AG, Barros SA, Wolff NA, Miller DS, Pritchard JB. Basolateral organic anion transport in *Fundulus heteroclitus* (killifish) proximal tubules appears to be mediated by a single OAT. *FASEB Journal* 2004;18(5):A1250.
36. Yamada A, Ohgaki S, Noda T, Shimiqu M. Chronic toxicity study of dietary stevia extracts in F344 rats. *J Food Hyg Soc Japan* 1985;26:183-196.
37. Jeppesen PB, Gregersen S, Alstrup KK, Hermansen K. Stevioside induces antihyperglycaemic, insulinotropic and glucagonostatic effects in vivo: studies in the diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats. *Phytomedicine* 2002;9(1):9-14.
38. Jeppesen PB, Gregersen S, Rolfsen SE, Jepsen M, Colombo M, Agger A, et al. Antihyperglycemic and blood pressure-reducing effects of stevioside in the diabetic Goto-Kakizaki rat. *Metabolism* 2003;52(3):372-8.

39. Perzzuto JM, Compadre CM, Swanson SM, Nanayakkara PD, Kinghorn AD. Metabolically activated steviol, the aglycone of stevioside, is mutagenic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:2478-2482.
40. Geuns JM, Augustijns P, Mols R, Buyse JG, Driessen B. Metabolism of stevioside in pigs and intestinal absorption characteristics of stevioside, rebaudioside A and steviol. *Food Chem Toxicol* 2003;41(11):1599-607.
41. Koyama E, Sakai N, Ohori Y, Kitazawa K, Izawa O, Kakegawa K, et al. Absorption and metabolism of glycosidic sweeteners of stevia mixture and their aglycone, steviol, in rats and humans. *Food Chem Toxicol* 2003;41(6):875-83.
42. Cardoso VN, Barbosa MF, Muramoto E, Mesquita CH, Almeida MA. Pharmacokinetic studies of ¹³¹I-stevioside and its metabolites. *Nucl Med Biol* 1996;23(1):97-100.
43. Koyama E, Kitazawa K, Ohori Y, Izawa O, Kakegawa K, Fujino A, et al. In vitro metabolism of the glycosidic sweeteners, stevia mixture and enzymatically modified stevia in human intestinal microflora. *Food Chem Toxicol* 2003;41(3):359-74.
44. Bracht AK, Alvarez M, Bracht A. Effect of *Stevia rebaudiana* natural products on rat liver mitochondria. *Biochem Pharmacol* 1985;34:873-882.
45. Wright SH, Dantzler WH. Molecular and Cellular Physiology of Renal Organic Cation and Anion Transport. *Physiol Rev* 2003;84:987-1049.
46. Groves CE, Evans KK, Dantzler WH, Wright SH. Peritubular organic cation transport in isolated rabbit proximal tubules. *Am J Physiol* 1994;266(3 Pt 2):F450-8.
47. Bednarczyk D, Ekins S, Wikel JH, Wright SH. Influence of molecular structure on substrate binding to the human organic cation transporter, hOCT1. *Mol Pharmacol* 2003;63(3):489-98.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ

ผลงานที่กำลังจัดทำเพื่อตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ (ภาคผนวก 1)

ชื่อผู้แต่ง : Chutima Srimaroeng, Promsuk Jutabha, John B. Pritchard, Hitoshi Endou and Varanuj Chatsudthipong

ชื่อเรื่อง : Interactions of stevioside and steviol with renal organic anion transporters in S2 cells and mouse renal cortical slices

ชื่อวารสาร : Journal of Pharmacological Sciences

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

จากข้อมูลที่ได้จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ จะทำให้เข้าใจถึงผลและกลไกการขนส่งสาร สตีวิโอไซด์และสตีวียอลผ่านทางโปรตีนขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบชนิด hOAT1 และ hOAT3 ซึ่งแสดงออกใน renal S2 cells และ *Xenopus laevis* oocytes อันจะเป็นประโยชน์ในการประยุกต์ใช้สารหวานสตีวิโอไซด์ในทางคลินิก และนำสารอนุพันธ์หลัก สตีวียอล มาใช้แทนสาร probenecid เพื่อใช้ในการวิจัยต่อไปในอนาคต และเป็นข้อมูลเพื่ออาจนำสารสตีวิโอไซด์มาผลิตเป็นสารหวานที่ไม่ก่อให้เกิดพลังงานแทนที่สารหวานที่ได้จากการสังเคราะห์อื่นๆ

3. อื่นๆ

ผลงานวิจัยในครั้งนี้ได้ถูกนำเสนอในการประชุมวิชาการ ดังนี้

- 3.1 ระดับนานาชาติ “American Society for Cell Biology 2003” 43rd ณ เมือง San Francisco มลรัฐ California ระหว่างวันที่ 7 – 13 ธันวาคม 2546 (ภาคผนวก 2)
- 3.2 โครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก ครั้งที่ 3 ณ โรงแรมจอมเทียน ปาร์มบีช รีสอร์ท เมืองพัทยา ชลบุรี ระหว่างวันที่ 25 – 27 ธันวาคม 2545 (ภาคผนวก 2)

ภาคผนวก

1. Manuscript for Journal of Pharmacological Sciences
2. Abstract for poster presentation at American Society for Cell Biology 2003
3. บทความย่อเสนอในการประชุมวิชาการโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก ครั้งที่ 3

Full Paper: Receptors/Channels/Transport systems, Renal Pharmacology

**Interactions of stevioside and steviol with renal organic anion transporters
in S2 cells and mouse renal cortical slices**

**Chutima Srimaroeng^{1,2}, Promsuk Jutabha³, John B. Pritchard²,
Hitoshi Endou³ and Varanuj Chatsudthipong¹**

¹Department of Physiology, Mahidol University, Bangkok, Thailand 10400,

²Laboratory of Pharmacology and Chemistry, NIEHS, National Institute of Health,
Research Triangle Park, NC 27709, ³Department of Pharmacology and Toxicology,
Kyorin University School of Medicine, Tokyo, Japan

Address correspondence to:

Varanuj Chatsudthipong, Ph.D.

Department of Physiology

Mahidol University

Bangkok, Thailand 10400

Phone: (+66) 2201-5614

Fax: (+66) 2354-7154

Email: scvcs@mahidol.ac.th

Running title: Interactions of stevioside and steviol with organic anion transporters

A list of nonstandard abbreviations:

PAH, *para*-aminohippurate; hOAT, human organic anion transporter; PGF_{2α}, prostaglandin F_{2α}; ES, estrone sulfate; D-PBS, dulbecco's modified phosphate-buffer saline; TEA, tetraethylammonium

Our previous studies have shown that both stevioside and steviol inhibited transepithelial transport of *para*-aminohippurate (PAH) in isolated S2 segments of rabbit renal proximal tubules by interfering with organic anion transport system. Several organic anion transporters are present in the renal proximal tubule including OAT1, OAT2, OAT3, and OAT4. The purpose of this study was to examine the direct interactions of stevioside and steviol with specific organic anion transporters using S2 cells expressing hOAT1, hOAT2, hOAT3, and hOAT4 (S2hOAT1, S2hOAT2, S2hOAT3 and S2hOAT4) and to compare these effects with those seen in an intact renal epithelium. Stevioside at the concentrations range between 0.5 – 1 mM showed no interaction with any OATs. In contrast, steviol markedly inhibited organic substrates uptake in all cell types with different potencies. Among these, steviol has a low IC₅₀ for hOAT1 (11.4 μM) and hOAT3 (36.5 μM) similar to that of probenecid. Results obtained in mouse renal cortical slices were very similar, *i.e.*, stevioside was without inhibitory effect and steviol was a potent inhibitor of PAH and ES transport. These results indicate that stevioside has no interaction with human or mouse OATs. In contrast, steviol interacts directly with human OATs, in particular, hOAT1 and hOAT3 with a potency approximating probenecid, suggesting that competitive inhibition of OAT-mediated transport by steviol may alter renal drug clearance.

Keywords: stevioside, steviol, organic anion, organic anion transporter, renal cortical slices

Stevioside is the major sweet component isolated from the leaves of *Stevia rebaudiana*. It is about 300 times sweeter than sucrose, but it is non-caloric (1). Therefore, it has become popular as a sweetener in Asia, South America and has been used as a dietary supplement in USA (2). Stevioside can be degraded to its major metabolite, steviol, by intestinal bacterial microflora from various animal species including man (3-5). The chemical structures of stevioside and steviol are shown in Figure 1. Stevioside has been shown to have therapeutic value as an anti-hypertensive or anti-hyperglycemic agent (6-10). However, the issue of the safety use of stevioside and its major metabolite, steviol, has been raised. Stevioside has been shown to be non-toxic, non-mutagenic and non-carcinogenic compounds in various mammalian species (11, 12). Long-term oral consumption of stevioside in amounts as high as 550 mg/kg BW/day for 2 years had no toxic, carcinogenic, or growth effects in the rat (13). This finding suggests that stevioside, which has a likely maximum intake in man of only 2 mg/kg BW/day (11), should be quite safe. In contrast, its aglycone metabolite, steviol, has been reported to be mutagenic in *S.typhimurium* TM677 (14). Likewise, at doses ~6 g/kg BW steviol was lethal to the hamster, and its LD₅₀ value was ~15 g/kg BW in rats and mice (12). Thus, questions remain concerning the toxicity of stevioside and steviol that should be addressed prior to their widespread commercial use as a food additives or drugs.

In particular, the renal handling of these agents is critical, since it determines the ease with which they are cleared from the body, or conversely the potential for their accumulation upon chronic consumption. Previous studies have shown that stevioside and steviol inhibited PAH uptake in rat renal cortical slices (20), suggesting that one or both compounds may be handled by the organic anion secretory system of the kidney. Indeed, our own earlier study indicated that a pharmacological

concentration (0.7 mM) of stevioside inhibited transepithelial transport of PAH without changes in Na^+/K^+ -ATPase activity or cellular ATP content in isolated S2 segments of rabbit renal proximal tubule (21). We also found that steviol inhibited transepithelial transport of PAH at the basolateral entry step by competitive inhibition, suggesting that steviol binds to basolateral OATs (22). However, this *in vitro* study did not permit the clear differentiation between the interactions of stevioside and steviol with the specific organic anion transporters. Thus, it is important to examine the specific transporter that interacts with these compounds. Currently, several organic anion transporter isoforms have been cloned and identified. In humans, OAT1, OAT2 and OAT3 are expressed at the basolateral membrane (15-17); whereas OAT4 is expressed at the apical membrane of the proximal tubule (18, 19). These transporters play important roles for the net elimination and excretion of various organic anion compounds including therapeutic drugs. The inhibition of basolateral OATs activity would reduce a clearance of those therapeutic drugs transported by the OATs, potentially leading to altered therapeutic efficacy or even increased toxic side-effects of these drugs. For example, probenecid is commonly used in the treatment of gout, but it is also widely used as a prototypical inhibitor of the OATs to prolong the clearance time of drugs. Thus, probenecid coadministration has been used to reduce renal excretion of ciprofloxacin, benzylpenicillin, and acyclovir (23-25). Recently, it was shown that its inhibition of hOAT1, hOAT3 and hOAT4 contributed to the interactions between probenecid and penicillin G, methotrexate and NSAID (26). Therefore, these human OATs are potential sites of interactions between stevioside and steviol with anionic drugs as well.

The purpose of this present study was to investigate the direct interactions of stevioside and steviol with specific renal organic anion transporters. Both S2 cells

expressing specific organic anion transporter, hOAT1, hOAT2, hOAT3, hOAT4 and mouse renal cortical slices were used to determine the inhibitory effect of stevioside and steviol on organic anion transport.

Materials and Methods

Cell Cultures. The S2 cell lines used in this work were generated previously (27). They are derived from transgenic mice harboring the temperature-sensitive simian virus 40 large T-antigen genes. Briefly, S2hOAT1, S2hOAT2, S2hOAT3 and S2hOAT4 were obtained by transfection of S2 cells with pcDNA 3.1-hOAT1, -hOAT2, -hOAT3 and -hOAT4 coupled with pSV2neo, a neomycin resistance gene, using Tfx-50 according to the manufacturer's instructions. S2 cells transfected with pcDNA 3.1 lacking an insert and pSV2neo were designated as S2pcDNA 3.1 (S2mock) and used as control group. These cells were grown in RITC 80-7 medium containing 5% fetal bovine serum, 10 mg/ml transferrin, 0.08 U/ml insulin, 10 ng/ml recombinant epidermal growth factor and 400 mg/ml geneticin in a humidified incubator under 5% CO₂/ 95% air at 33°C. The cells were subcultured in the medium containing 0.05% trypsin-EDTA solution (in mM: 137 NaCl, 5.4 KCl, 5.5 glucose, 4 NaHCO₃, 0.5 EDTA and 5 HEPES, pH 7.2).

PAH and ES uptake in S2 cells expressing hOAT1, hOAT2, hOAT3 and hOAT4 and S2mock. The transfected S2 cell lines (S2hOAT1, S2hOAT2, S2hOAT3, S2hOAT4 and S2mock) were seeded in 24-well tissue culture plates at a cell density of 1×10^5 cells/well. After culturing for 2 days, uptake experiments were performed at 37°C. The cells were first washed three times with Dulbecco's modified phosphate-buffered saline (D-PBS) solution (in mM: 137 NaCl, 3 KCl, 8 NaHPO₄, 1 KH₂PO₄, 1 CaCl₂, 0.5 MgCl₂ and 5.6 D-glucose, pH 7.4), and pre-incubated in the same solution for 10 min. The cells were then incubated for 2 min in the D-PBS solution containing specific substrates, [¹⁴C]-PAH for hOAT1, [³H]-PGF_{2α} for hOAT2 or [³H]-ES for hOAT3 and hOAT4 in the absence and presence of stevioside and steviol. Uptake was stopped by the addition of ice-cold D-PBS solution and the cells were washed

three times with the same solution. The cells in each well were lysed with 0.5 ml of 0.1 N NaOH and the radioactivity was measured by liquid scintillation spectrometry (1214 Rackbeta, LKB Wallac, Sweden).

Kinetic analysis of steviol inhibition of PAH and ES uptake. S2 cells expressing hOAT1 and hOAT3 were pre-incubated in D-PBS solution at 37°C for 10 min as described above. They were then incubated in D-PBS containing with either [¹⁴C]-PAH for hOAT1 or [³H]-ES for hOAT3 at various concentrations in the absence and presence of steviol for 2 min. The data were plotted as a Lineweaver-Burk plot (1/[PAH] versus 1/[PAH] uptake and 1/[ES] versus 1/[ES] uptake) and the K_m (Michaelis-Menten constant) was estimated from the *x*-axis intercept. The maximal rate of either PAH or ES uptake (V_{max}) mediated by hOAT1 or hOAT3 was estimated from the *y*-axis intercept. The K_i of steviol for PAH and ES transport were calculated to determine the affinity of steviol for these transporters as shown in the following equation;

$$K_i = \frac{\text{Concentration of steviol}}{\left\{ \frac{K_m \text{ of PAH or ES uptake (with steviol)}}{K_m \text{ of PAH or ES uptake (without steviol)}} - 1 \right\}}$$

Cytotoxicity. Cell viability was determined using a modified colorimetric assay with sulforhodamine B (SRB) as described previously (28). Briefly, the cells were seeded into 96-well microtiter plate at a cell density 1.5×10^4 cells/well, and incubated at 33°C in the medium containing various concentrations of stevioside and steviol. At day 3 of incubation, the medium was removed and the monolayer cells were fixed with cold 20% (W/V) trichloroacetic acid (TCA) for 30 min at 4°C. They were then washed five times with distilled water and air-dried. Subsequently, the cells were stained for 30 min at room temperature by 0.4% (W/V) SRB dissolved in 1% acetic acid. At the end

of staining period, SRB was removed and quickly rinsed five times with 1% acetic acid. The cellular protein contents were extracted with 10 mM Tris–base [tris (hydroxymethyl) aminomethane] and measured the absorbance at 515 nm using a computer-interfaced, 96 well microtiter plate reader (EL 312, Bio-Kinetics reader, Bio-Tek Instrument Inc, Finland).

Animals. Adult male C57BL/6 mice raised in the National Institute of Environmental Health Sciences (Research Triangle Park, NC, USA) were used in renal cortical slice experiments. All animal procedures were approved by the NIEHS Animal Care and Use Committee.

Renal slice preparation and uptake study. Tissue slices were prepared according to published methods (29). Briefly, animals were euthanized by CO₂ inhalation and decapitated. Renal cortical slices (≤ 0.5 mm; 5 – 20 mg, wet weight) were cut with a Stadie-Riggs microtome and maintained in ice-cold oxygenated modified Cross and Taggart buffer (in mM: 95 NaCl, 80 mannitol, 5 KCl, 0.74 CaCl₂ and 9.5 Na₂HPO₄, pH 7.4). The slices were incubated in 1 ml of buffer containing either [³H]-PAH or [³H]-ES in the absence and presence of stevioside, steviol and various compounds for 60 min. Uptake was stopped by the addition of ice-cold buffer. Slices were washed, blotted, weighed, dissolved in 1 ml of 1 N NaOH and neutralized with 1 ml of 1 N HCl. Nine ml of scintillation fluid (Ecolume™, ICN, Irvine, CA, USA) was added and radioactivity was measured using a Tri-Carb™ 2900TR Liquid Scintillation Analyzer (Packard, Meriden CT, USA). The uptake of PAH and ES were calculated as tissue to medium (T/M) ratio (i.e. dpm/mg of tissue divided by dpm/ul of medium) and then expressed as a mean percentage of the control.

Chemicals. [³H]-PAH (40 Ci/mmol) was purchased from American Radiolabeled Chemicals, Inc. (St. Louis, MO, USA), [¹⁴C]-PAH (1.50 GBq/mmol), [³H]-PGF_{2 α}

(6808 GBq/mmol) and [^3H]-ES (1861 GBq/mmol) were purchased from New England Nuclear Corp (Boston, MA, USA). Unlabeled PAH and ES, probenecid, α -ketoglutarate, glutarate, furosemide, bumetanide, indomethacin, cimetidine, methotrexate, tetraethylammonium (TEA), transferrin and SRB were purchased from Sigma (St.Louis, MO, USA). Epidermal growth factor was purchased from Wakunaga, Hiroshima. Insulin was purchased from Shimizu, RITC 80-7 culture medium was purchased from Iwaki Co., Tokyo. Stevioside and steviol were kindly provided by Dr. Chaivat Toskulkao, Mahidol University, Thailand. All other chemicals and reagents used were analytical graded and obtained from commercial sources.

Statistical analysis. Data were expressed as means $\pm$ S.E. Statistical differences were assessed using one-way analysis of variance. Differences were considered to be significant when *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$ versus control.

Results

Interactions of stevioside and steviol with specific organic anion transporters.

To determine the direct interactions of stevioside and steviol with organic anion transporters, *cis*-inhibition studies were conducted in S2hOAT1, S2hOAT2, S2hOAT3 and S2hOAT4 cells. Steviol markedly inhibited PAH uptake in S2hOAT1, PGF_{2α} uptake in S2hOAT2 and ES uptake in S2hOAT3 and S2hOAT4 cells. The calculated IC₅₀ of steviol were 11, 1000, 36 and 285 μM for S2hOAT1, S2hOAT2, S2hOAT3 and S2hOAT4, respectively (Summarized in Table 1). In contrast, the parent compound, stevioside, at concentrations up to 1 mM did not affect substrate uptake in any of the OAT-expressing cell lines (data not shown). Steviol showed higher affinity for hOAT1 and hOAT3 than for hOAT2 and hOAT4 (Table 1). Therefore, we focused our further study on the effects of stevioside and steviol on PAH transport by S2hOAT1 cells and ES transport by S2hOAT3 cells.

As shown in Figure 2A, stevioside had no inhibitory effect on PAH uptake in S2hOAT1 cells at all tested-concentrations; whereas, 10 μM to 1 mM steviol very effectively inhibited hOAT1 mediated PAH transport in dose-dependent manner. Stevioside at low concentrations slightly enhanced ES uptake mediated by S2hOAT3 cells, but this effect was not significant. Steviol significantly inhibited ES uptake in dose-dependent manner at the concentrations from 10 μM – 1 mM (Figure 2B). Importantly, 1 mM steviol inhibited PAH and ES uptake as very nearly as effectively as probenecid in both S2hOAT1 and S2hOAT3 cells. As shown in Table 1, the IC₅₀ of steviol and probenecid were 11.4 and 11.9 μM for S2hOAT1 cells and were 36.5 and 4.7 μM for S2hOAT3 cell, respectively.

Inhibitory effectiveness of steviol on organic anion uptake. The inhibitory profiles of various organic compounds including stevioside and steviol against PAH uptake via S2hOAT1 cells was assessed. All compounds were tested at concentration of 100 μ M. As shown in Figure 3A, PAH uptake by S2hOAT1 cells was markedly reduced by cimetidine, unlabeled ES and PAH, bumetanide, furosemide, probenecid, steviol and indomethacin; whereas, several compounds including stevioside, TEA and methotrexate had no effect on PAH uptake. The inhibitory effectiveness of various organic compounds on ES uptake by S2hOAT3 cells was also investigated. As shown in Figure 3B, 100 μ M stevioside had no effect on ES uptake mediated by S2hOAT3 cells; whereas, methotrexate, furosemide, TEA, unlabeled PAH, steviol, bumetanide, cimetidine, probenecid, unlabeled ES and indomethacin all significantly inhibited ES uptake by S2hOAT3.

Kinetic analysis of steviol. To determine the affinity of steviol for hOAT1 and hOAT3, kinetic analysis was performed. As shown in Figure 4A, the kinetics of PAH uptake by S2hOAT1 cells was determined in the absence and presence of 20 μ M of steviol. The estimated K_m for PAH uptake in the presence of 20 μ M of steviol was 155.2 μ M, three times the control K_m of 46.4 μ M. The V_{max} for PAH uptake in the presence of steviol was not markedly different from control (666.7 versus 990.1 pmol/mg protein/min), consistent with competitive inhibition. The calculated K_i of steviol on PAH uptake mediated by hOAT1 was 8.5 μ M. In S2hOAT3 cells, the K_m of ES uptake in the presence of 20 μ M of steviol was 28.2 μ M, which was slightly higher than control group (21.1 μ M). The V_{max} for ES uptake in the presence of 20 μ M steviol was not different from the control (227.3 versus 370.4 pmol/mg protein/min). The calculated K_i value of steviol on ES uptake mediated hOAT3 was 31.5 μ M (Figure 4B).

Cell viability. We also examined cell viability after exposure to stevioside and steviol. As shown in Figure 5A, stevioside in the range between 1 – 100 μ M did not affect the percentage of cell viability of S2hOAT1, S2hOAT3 and S2mock cells. At 1 – 10 μ M, steviol did not affect cell viability in S2hOAT1, S2hOAT3, or S2mock cells, but at concentrations from 25 – 100 μ M steviol reduced the cell viability of all cell types, with the greatest toxicity observed in the hOAT1 and hOAT3 expressing cells (Figure 5B).

Mouse renal cortical slices. The data presented above indicate that in hOAT1 and hOAT3 expressing cell lines, steviol was an effective inhibitor; whereas, stevioside was not. To assess whether these same properties are expressed in an intact renal epithelium, the effects of both agents were determined in mouse renal cortical slices. PAH is a substrate for both OAT1 and OAT3, so its uptake by the mouse slice reflects the action of both carriers. As shown in Figure 6A, control PAH uptake in renal cortical slice was increased when 50 μ M glutarate were added to the medium, as previously reported (30). Therefore, 50 μ M glutarate was applied in all renal cortical slice experiments. The presence of 100 μ M methotrexate, bumetanide, furosemide, unlabeled PAH, steviol, indomethacin and probenecid significantly decreased PAH uptake; whereas, stevioside, TEA, unlabeled ES and cimetidine did not affect PAH uptake by mouse renal cortical slices. To examine the effects of stevioside and steviol on the mouse OAT3, the uptake of ES was assessed, as this substrate is only transported across the basolateral membrane of the proximal tubule via OAT3. As shown in Figure 6B, the presence of 100 μ M bumetanide, furosemide, probenecid, steviol, indomethacin and unlabeled ES inhibited ES uptake whereas stevioside, TEA, cimetidine, unlabeled PAH and methotrexate had no effect. The effects of increasing stevioside and steviol concentration on PAH and ES uptake by mouse renal cortical

slices were also tested (Figure 7A and 7B). Stevioside was without effect on either PAH or ES transport by the mouse renal slice at all tested-concentrations (0.05 to 1 mM). On the other hand, steviol inhibited both PAH and ES uptake in a dose-dependent manner. The IC_{50} of steviol on PAH and ES uptake in renal cortical slices were 12.8 and 67.6 μ M, respectively. As summarized in Table 1, the effects of steviol were very comparable in both stable cell lines and renal cortical slices.

Discussion

The present study examined the interactions of stevioside and steviol with specific renal organic anion transporters using renal S2 cells expressing hOAT1, hOAT2, hOAT3 and hOAT4 and mouse renal cortical slices. The use of stable cell lines allows us to be able to determine the direct interactions of both compounds with specific human OATs. Of course, it is desirable to confirm the predictions derived from expressed transporters in the intact renal epithelium. Since intact human renal tissues were not available, we used mouse renal cortical slices to confirm the interactions of stevioside and steviol with organic anion transporters in intact tissue.

It was demonstrated that stevioside at concentration maximally dissolved in buffer and also at a pharmacological concentration (0.7 mM) had a small and reversible inhibitory effect on rabbit renal proximal tubular transport of PAH but had no effect on cellular ATP content and Na^+/K^+ -ATPase activity whereas its metabolite, steviol, demonstrated significant inhibition of PAH transepithelial transport. Although the precise mechanism by which stevioside and steviol inhibited transepithelial transport of PAH was still unclear, they proposed that stevioside and steviol might inhibit and (or) interfere with the basolateral OATs (21, 22). However, the data from previous studies demonstrated the net transepithelial transport of PAH at the tubular level, which may involve several OATs that expressed in renal proximal tubule. Thus, present study was performed to investigate the direct interactions of stevioside with specific basolateral and apical OATs. To follow up this proposal, we studied single organic anion transporter, which expressed in renal S2 cells. Our results showed that stevioside did not inhibit organic anion uptake in S2hOAT1, S2hOAT2, S2hOAT3 and S2hOAT4 cells (Figure 2A and 2B). Similarly, stevioside showed no inhibitory effect on PAH and ES uptake in mice renal cortical slices (Figure 6A and 6B). This

was in agreement with previous study that stevioside was not affect energy metabolism in intact cells (31). Therefore, it seems likely that stevioside does not harm or affect cellular function. The main reason of no interaction of stevioside with any human OATs may be due to a large complex molecule of stevioside that composes of one molecule of steviol and three glucose molecules (Figure 1). Our finding was clearly suggested that stevioside did not interact with any hOATs and had no effect on organic anion transport in intact renal tissue. We observed no effect of stevioside on organic anion transport; whereas, Jutabha et al. found small and reversible inhibitory effect of stevioside on PAH transport of rabbit renal proximal tubule. The differences in substrate recognition and transport properties of organic anion transporters among species have been observed. For instance, the affinity of human OAT1 for PAH transport is comparatively higher than OATs from other species with K_m values 5 - 9.3, 37, 14 – 70 and 21 μM for hOAT1, mOAT1, rOAT1 and fOat1, respectively (32) whereas mOAT2 has higher affinity for PGE_2 than that of hOAT2 and rOAT2 with K_t values 5 nM, 713 nM and 39 μM , respectively (33). Thus, the different effects of stevioside on organic anion transport observed between study in rabbit by Jutabha et al. and human and mouse species in the present study were not surprising. It has been reported that renal elimination of stevioside involved its secretory process (34). Our study showed that organic anion transporters (hOAT1, hOAT2, hOAT3 and hOAT4) might not involve in the renal secretion of stevioside. However, the other transporters may play a role in the renal transport of stevioside. In fact, two other recent transporters at basolateral membrane that appear to handle organic anions including a high affinity digoxin transporter, a novel organic anion transporter from human kidney (OATP4C1) (35) and a sodium-dependent high affinity steroid sulfate transporter (Soat), the new member of the SLC10 family, have

been cloned. (36). They may involve renal tubular transport of stevioside. Therefore, this possibility needs to be explored.

Due to potential toxic effects of stevioside and its metabolites, in particular steviol, have been proposed, we then performed cytotoxic study to determine whether both compounds, stevioside and steviol, involved in cytotoxic-induced mechanisms via hOAT1 and hOAT3. As shown in Figure 5A, stevioside in the range of 1 – 100 μ M did not produce any cytotoxicity in S2hOAT1, S2hOAT3 and S2mock cells. The results from this study differ from previous study by Toskulkao et al. (20) that showed nephrotoxicity in rat renal cortical slices induced by 6.25 - 100 μ M stevioside at the purity $\geq$ 90% (37). In our study, we used stevioside with high purity (98%) for determination of cytotoxic effect in renal S2 cells. Therefore, the contaminations in stevioside used ($\geq$ 90% vs. 98%) might be the cause of nephrotoxic effect observed in previous study.

Stevioside can be degraded to steviol by the intestinal microflora from various animal species including man (3, 5, 38). Recently, steviol has been found to inhibit transepithelial transport of PAH (J_{PAH}) by isolated perfused rabbit renal proximal tubule (22). Consistently, the present study showed inhibitory effect of steviol on organic anion uptake mediated by S2 cells expressing hOAT1, hOAT2, hOAT3 and hOAT4 with different potencies (Summarized in Table 1). Comparing the IC_{50} values of steviol among hOATs examined, hOAT1 and hOAT3 showed high affinity for steviol while hOAT2 exhibited the lowest affinity. Steviol markedly inhibited [^{14}C]-PAH and [3H]-ES uptake via hOAT1 and hOAT3 in dose-dependent manner (Fig 2A and 2B). Our study also showed that steviol inhibited PAH and ES transport in mice renal cortical slices, indicating that steviol interacts with OAT1 and OAT3 in both renal S2 cells expressing OAT1 and OAT3 and in intact renal tissue. Although

hOAT4 was found to express at the apical membrane and has been proposed to have potential role in renal organic anion secretion (19). It was found that steviol did not interact well with this transporter. Thus, hOAT4 may not be the primary transporter that is responsible for exit step of steviol from cells. However, other apical transporters may play crucial role for the exit of steviol eg, human multidrug resistance-associated proteins (MRP2) (39), Na⁺-phosphate cotransporter (NPT1) (40) and a novel voltage-driven organic anion transporter (OAT_V1) from pig renal proximal tubules that has been recently cloned (41).

Interestingly, as shown in Figure 2A, 2B, 7A and 7B, steviol inhibited PAH and ES uptake in both stable cell lines and renal cortical slices similar to that of several organic anion compounds including furosemide, bumetanide, probenecid and indomethacin. Probenecid is a potent organic anion inhibitor and has been widely used for combination therapy in many cases. Coadministration of probenecid inhibited renal excretion of furosemide, ciprofloxacin, benzylpenicillins and acyclovir (23, 25, 42). This approach was used to increase half-life of these drugs in blood circulation. The present study found that the IC₅₀ of steviol was similar to that of probenecid on hOAT1 mediated PAH uptake (11.4 μM and 11.9 μM). Whereas IC₅₀ of steviol on hOAT3 mediated ES uptake was slightly higher than IC₅₀ of probenecid (36.5 μM and 4.7 μM), indicating that hOAT1 has high affinity for steviol similar to probenecid. As the basolateral entry step of organic compounds is known to be a rate-limiting step. The inhibition of steviol with any of these basolateral OATs would affect the plasma level of various organic anions including therapeutic drugs and thus resulting in enhances the therapeutic efficacy of the drugs. Thus, steviol, which is a natural product, may be used in placed of probenecid for this purpose. Steviol, even though, at high concentrations (25 – 100 μM) was revealed to have cytotoxic effect in renal

S2 cells, it was noted that steviol at 10 μ M, which was capable to inhibit organic anion transport effectively, did not show any cytotoxic effect in renal S2 cells (Figure 2A, 2B and 5B). Therefore, steviol at 10 μ M or lower may be used as a natural organic anion inhibitor of OATs similar to that of probenecid in combination therapy mediated by OATs. However, further study for evaluating the appropriate therapeutic concentrations of steviol used in human being should be considered.

In conclusion, the consistent of the data from both stable cell lines expressing human organic anion transporters and renal cortical slices suggested that stevioside did not interact with renal organic anion transport; whereas, steviol directly interacted with both hOAT1 and hOAT3 with higher affinity than hOAT2 and hOAT4. Stevioside did not induce cytotoxicity mediated by hOAT1 and hOAT3 whereas steviol at concentrations higher than 25 μ M produced cytotoxic effect in renal S2 cells. The affinity of steviol to hOAT1 and hOAT3 was similar to that of probenecid, suggesting that steviol may be used as a new natural organic anion inhibitor for enhancement of therapeutic efficacy of drugs. The present study further supports the safety use of stevioside in human being and also provides a new information concerning steviol as a new natural inhibitor in clinical uses.

References

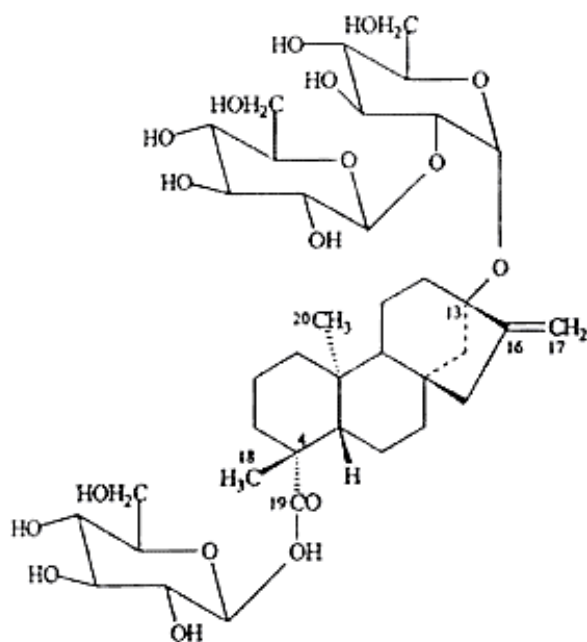
1. Bridel M, Lavieille R. The sweet principle of Kaa-he-e (*Stevia rebaudiana*). *J Pharm Clin* 1931;14:99-154.
2. Geuns JM. Stevioside. *Phytochemistry* 2003;64(5):913-21.
3. Hutapae AM, Toskulkao C, Wilairat P, Buddhasukh D. High-performance liquid chromatographic separation and quantitation of stevioside and its metabolites. *J Liq Chrom & Rel Technol* 1999;22:1161-1170.
4. Gardana C, Simonetti P, Canzi E, Zanchi R, Pietta P. Metabolism of stevioside and rebaudioside A from *Stevia rebaudiana* extracts by human microflora. *J Agric Food Chem* 2003;51(22):6618-22.
5. Koyama E, Sakai N, Ohori Y, Kitazawa K, Izawa O, Kakegawa K, et al. Absorption and metabolism of glycosidic sweeteners of stevia mixture and their aglycone, steviol, in rats and humans. *Food Chem Toxicol* 2003;41(6):875-83.
6. Chan P, Xu DY, Liu JC, Chen YJ, Tomlinson B, Huang WP, et al. The effect of stevioside on blood pressure and plasma catecholamines in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci* 1998;63(19):1679-84.
7. Chan P, Tomlinson B, Chen YJ, Liu JC, Hsieh MH, Cheng JT. A double-blind placebo-controlled study of the effectiveness and tolerability of oral stevioside in human hypertension. *Br J Clin Pharmacol* 2000;50(3):215-20.
8. Hsu YH, Liu JC, Kao PF, Lee CN, Chen YJ, Hsieh MH, et al. Antihypertensive effect of stevioside in different strains of hypertensive rats. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)* 2002;65(1):1-6.
9. Liu JC, Kao PK, Chan P, Hsu YH, Hou CC, Lien GS, et al. Mechanism of the antihypertensive effect of stevioside in anesthetized dogs. *Pharmacology* 2003;67(1):14-20.

10. Jeppesen PB, Gregersen S, Rolfsen SE, Jepsen M, Colombo M, Agger A, et al. Antihyperglycemic and blood pressure-reducing effects of stevioside in the diabetic Goto-Kakizaki rat. *Metabolism* 2003;52(3):372-8.
11. Xili L, Chengjiany B, Eryi X, Reiming S, Yuengming W, Haodong S, et al. Chronic oral toxicity and carcinogenicity study of stevioside in rats. *Food Chem Toxicol* 1992;30(11):957-65.
12. Toskulkao C, Chaturat L, Temcharoen P, Glinsukon T. Acute toxicity of stevioside, a natural sweetener, and its metabolite, steviol, in several animal species. *Drug Chem Toxicol* 1997;20(1-2):31-44.
13. Yamada A, Ohgaki S, Noda T, Shimiqu M. Chronic toxicity study of dietary stevia extracts in F344 rats. *J Food Hyg Soc Japan* 1985;26:183-196.
14. Matsui M, Matsui K, Kawasaki Y, Oda Y, Noguchi T, Kitagawa Y, et al. Evaluation of the genotoxicity of stevioside and steviol using six in vitro and one in vivo mutagenicity assays. *Mutagenesis* 1996;11(6):573-579.
15. Hosoyamada M, Sekine T, Kanai Y, Endou H. Molecular cloning and functional expression of a multispecific organic anion transporter from human kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 1999;276(1 Pt 2):F122-8.
16. Cha SH, Sekine T, Fukushima JI, Kanai Y, Kobayashi Y, Goya T, et al. Identification and characterization of human organic anion transporter 3 expressing predominantly in the kidney. *Mol Pharmacol* 2001;59(5):1277-86.
17. Motohashi H, Sakurai Y, Saito H, Masuda S, Urakami Y, Goto M, et al. Gene expression levels and immunolocalization of organic ion transporters in the human kidney. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:866-874.

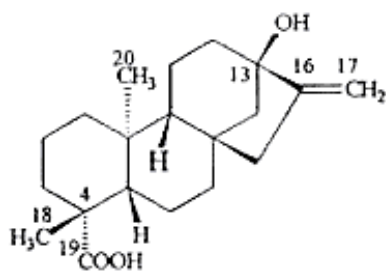
- 18.Babu E, Takeda M, Narikawa S, Kobayashi Y, Yamamoto T, Cha SH, et al. Human organic anion transporters mediate the transport of tetracycline. *Jpn J Pharmacol* 2002;88(1):69-76.
- 19.Cha SH, Sekine T, Kusuhara H, Yu E, Kim JY, Kim DK, et al. Molecular cloning and characterization of multispecific organic anion transporter 4 expressed in the placenta. *J Biol Chem* 2000;275(6):4507-12.
- 20.Toskulkao C, Deechakawan W, Temcharoen P, Buddhasukh D, Glinsukon T. Nephrotoxic effects of stevioside and steviol in rat renal cortical slices. *J Clin Biochem Nutr* 1994;16:123-131.
- 21.Jutabha P, Toskulkao C, Chatsudthipong V. Effect of stevioside on PAH transport by isolated perfused rabbit renal proximal tubule. *Can J Physiol Pharmacol* 2000;78(9):737-44.
- 22.Chatsudthipong V, Jutabha P. Effect of steviol on para-aminohippurate transport by isolated perfused rabbit renal proximal tubule. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;298(3):1120-7.
- 23.Overbosch D, Van Gulpen C, Hermans J, Mattie H. The effect of probenecid on the renal tubular excretion of benzylpenicillin. *Br J Clin Pharmacol* 1988;25(1):51-8.
- 24.Tsuji A, Terasaki T, Tamai I, Takeda K. In vivo evidence for carrier-mediated uptake of beta-lactam antibiotics through organic anion transport systems in rat kidney and liver. *J Pharmacol Exp Ther* 1990;253(1):315-20.
- 25.Jaehde U, Sorgel F, Reiter A, Sigl G, Naber KG, Schunack W. Effect of probenecid on the distribution and elimination of ciprofloxacin in humans. *Clin Pharmacol Ther* 1995;58(5):532-41.

26. Takeda M, Khamdang S, Narikawa S, Kimura H, Hosoyamada M, Cha SH, et al. Characterization of methotrexate transport and its drug interactions with human organic anion transporters. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;302(2):666-71.
27. Takeda M, Tojo A, Sekine T, Hosoyamada M, Kanai Y, Endou H. Role of organic anion transporter 1 (OAT1) in cephaloridine (CER)-induced nephrotoxicity. *Kidney Int* 1999;56(6):2128-36.
28. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 1990;82(13):1107-12.
29. Pritchard JB. Intracellular alpha-ketoglutarate controls the efficacy of renal organic anion transport. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;274(3):1278-84.
30. Pritchard JB. Rat renal cortical slices demonstrate p-aminohippurate/glutarate exchange and sodium/glutarate coupled p-aminohippurate transport. *J Pharmacol Exp Ther* 1990;255(3):969-75.
31. Bracht AK, Alvarez M, Bracht A. Effect of *Stevia rebaudiana* natural products on rat liver mitochondria. *Biochem Pharmacol* 1985;34:873-882.
32. Burckhardt G, Bahn A, Wolff NA. Molecular physiology of renal *p*-aminohippurate secretion. *News Physiol Sci* 2001;16:114-118.
33. Wright SH, Dantzler WH. Molecular and Cellular Physiology of Renal Organic Cation and Anion Transport. *Physiol Rev* 2003;84:987-1049.
34. Melis MS. Renal excretion of stevioside in rats. *J Nat Prod* 1992;55(5):688-90.
35. Mikkaichi T, Suzuki T, Onogawa T, Tanemoto M, Mizutamari H, Okada M, et al. Isolation and characterization of a digoxin transporter and its rat homologue expressed in the kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(10):3569-74.

36. Geyer J, Godoy JR, Petzinger E. Identification of a sodium-dependent organic anion transporter from rat adrenal gland. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;316(2):300-6.
37. Toskulkao C, Deechakawan W, Leardkamolkarn V, Glinsukon T, Buddhasukh D. The low calorie natural sweetener stevioside-nephrotoxicity and its relationship to urinary enzyme excretion in the rat. *Phytother Res* 1994;8:281-286.
38. Wingard RE, Brown JP, Enderlin FE, Dale JA, Hale RL, Seitz CT. Intestinal degradation and absorption of glycosidic sweeteners stevioside and rebaudioside A. *Experientia* 1980;36:519-520.
39. Schaub TP, Kartenbeck J, Konig J, Vogel O, Witzgall R, Kriz W, et al. Expression of the MRP2 gene-encoded conjugate export pump in human kidney proximal tubules and in renal cell carcinoma. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:1159-1169.
40. Uchino H, Tamai I, Yamashita K, Minemoto Y, Sai Y, Yabuuchi H, et al. *p*-Aminohippuric acid transport at renal apical membrane mediated by human inorganic phosphate transporter NPT1. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;270:254-259.
41. Jutabha P, Kanai Y, Hosoyamada M. Identification of a novel voltage-driven organic anion transporter present at apical membrane of renal proximal tubule. *J Biol Chem* 2003;278:27930-27938.
42. Uwai Y, Saito H, Hashimoto Y, Inui KI. Interaction and transport of thiazide diuretics, loop diuretics, and acetazolamide via rat renal organic anion transporter rOAT1. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;295(1):261-5.



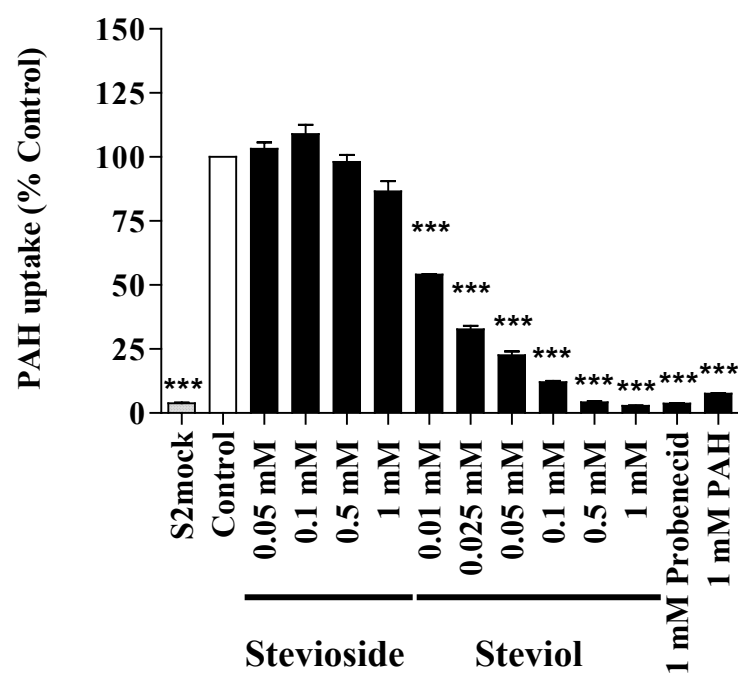
Stevioside (MW. 809.4)



Steviol (MW. 318.4)

Figure 1

A.



B.

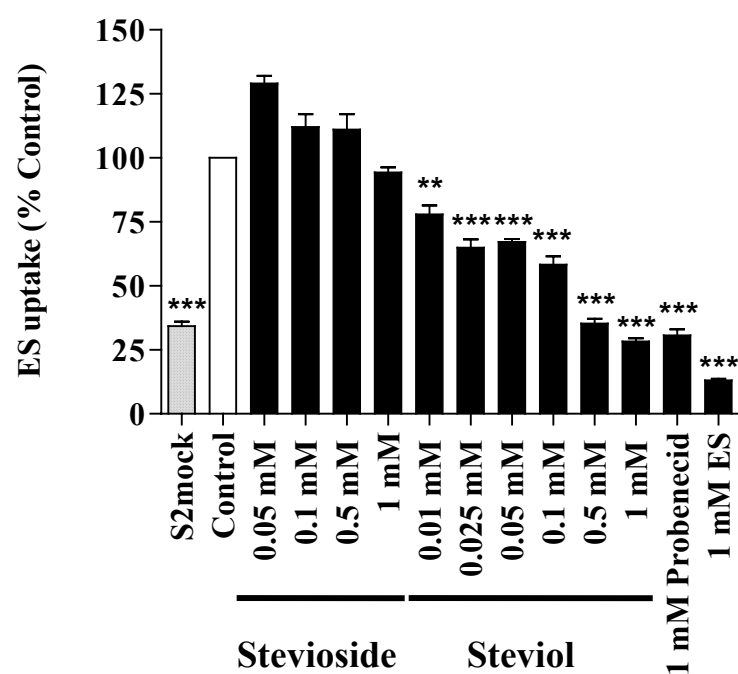
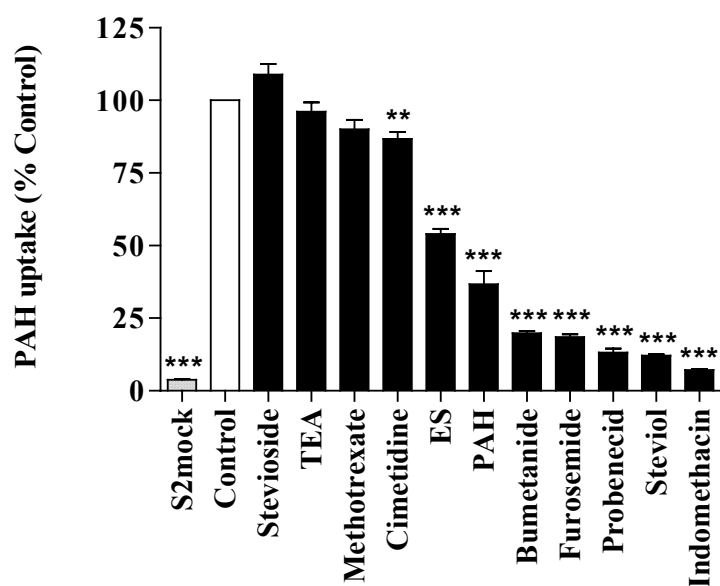


Figure 2

A.



B.

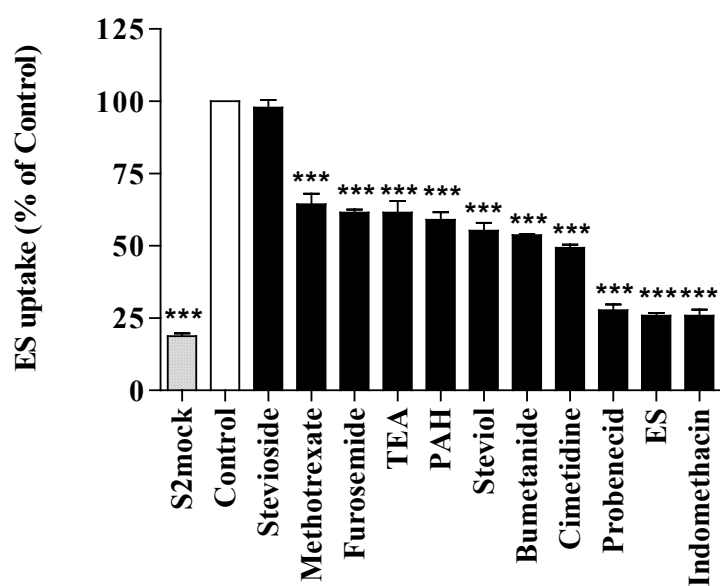
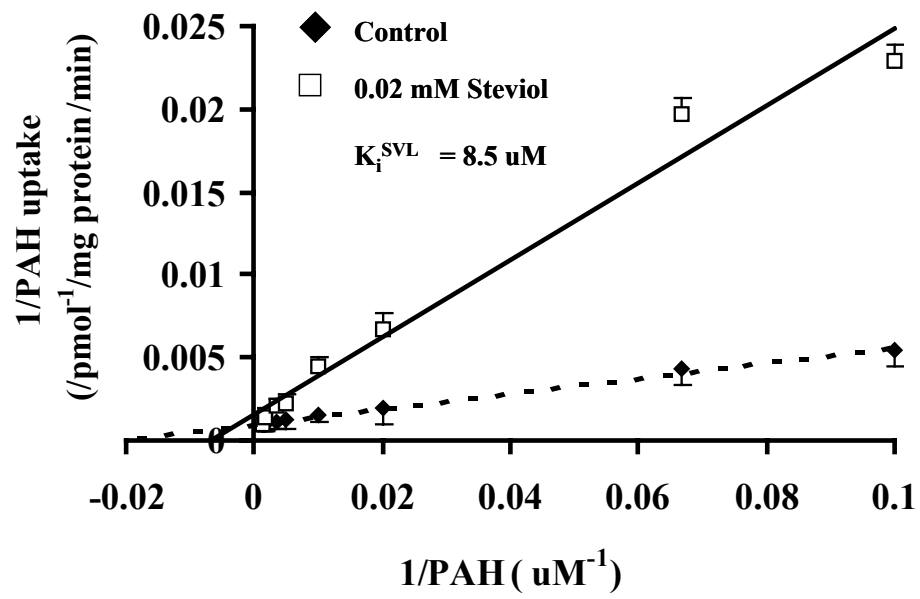


Figure 3

A.



B.

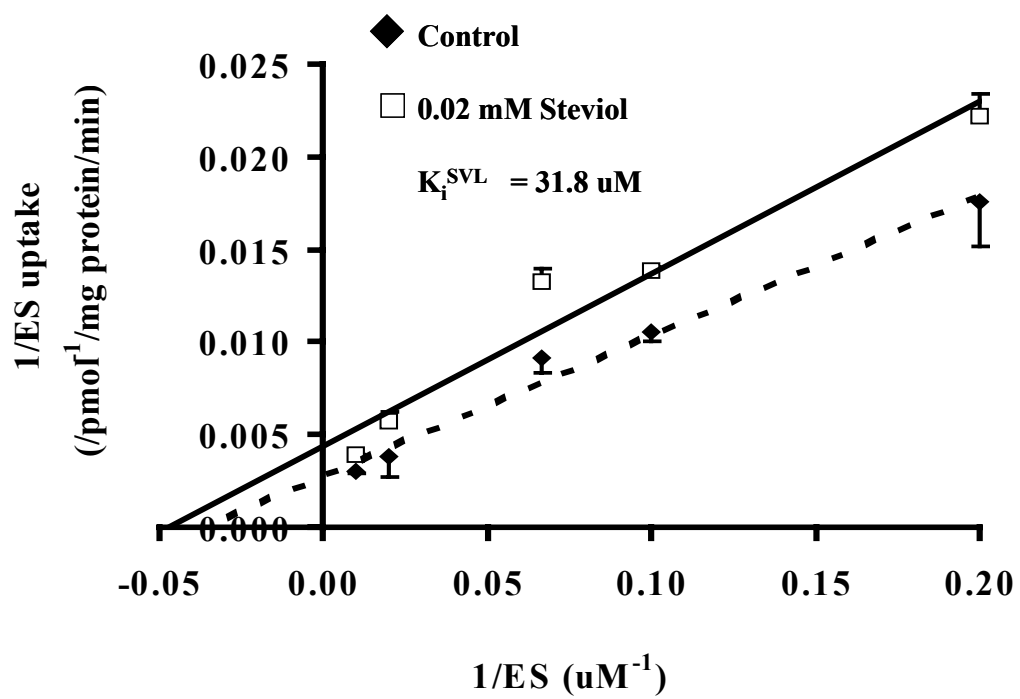
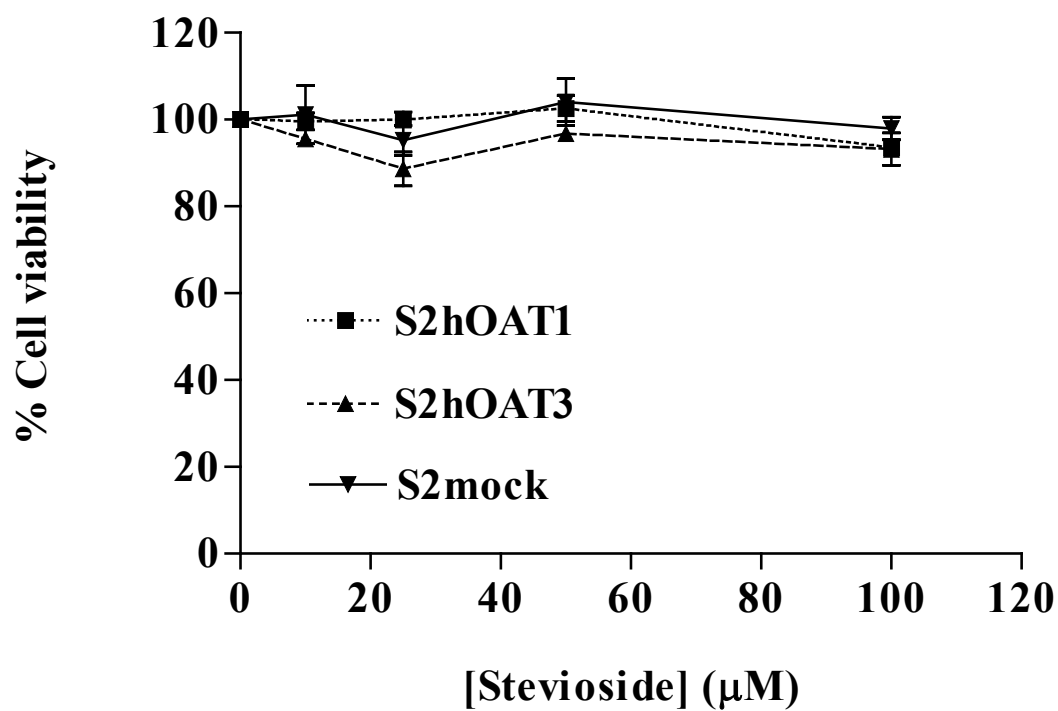


Figure 4

A.



B.

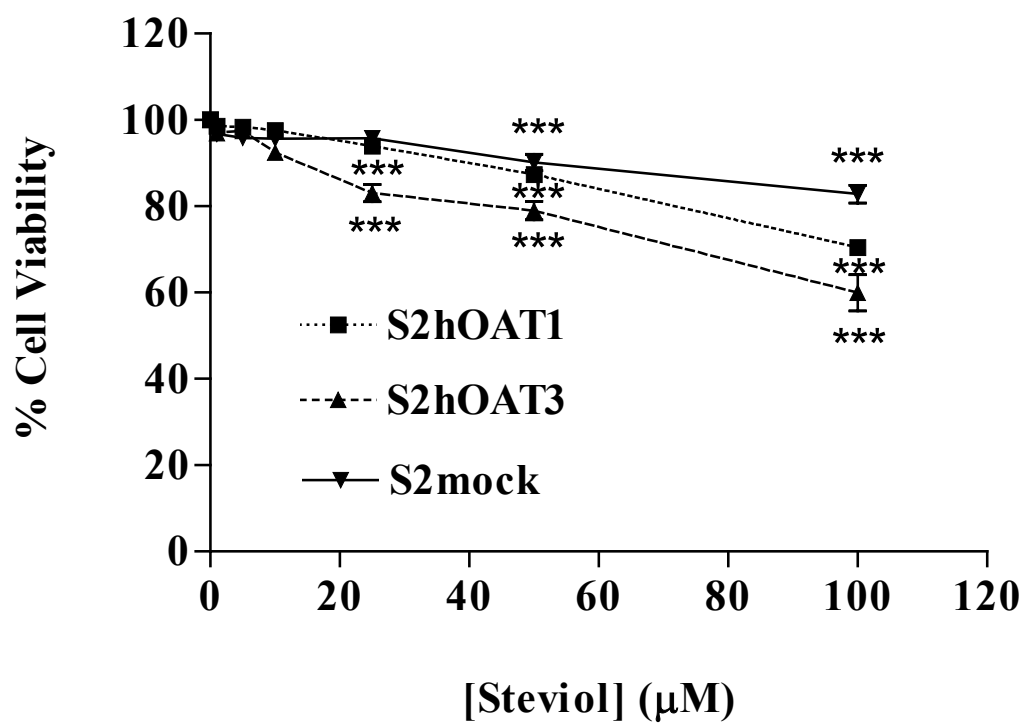


Figure 5

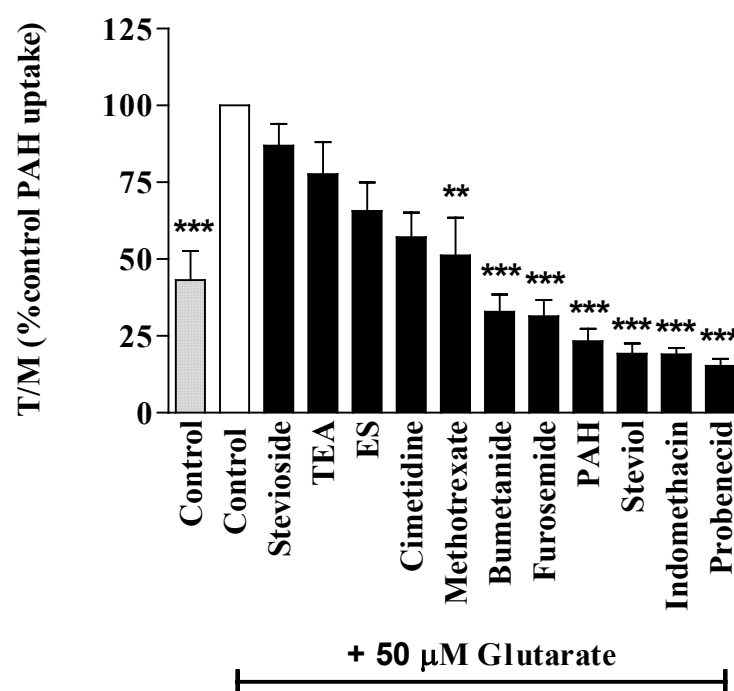


Figure 6A

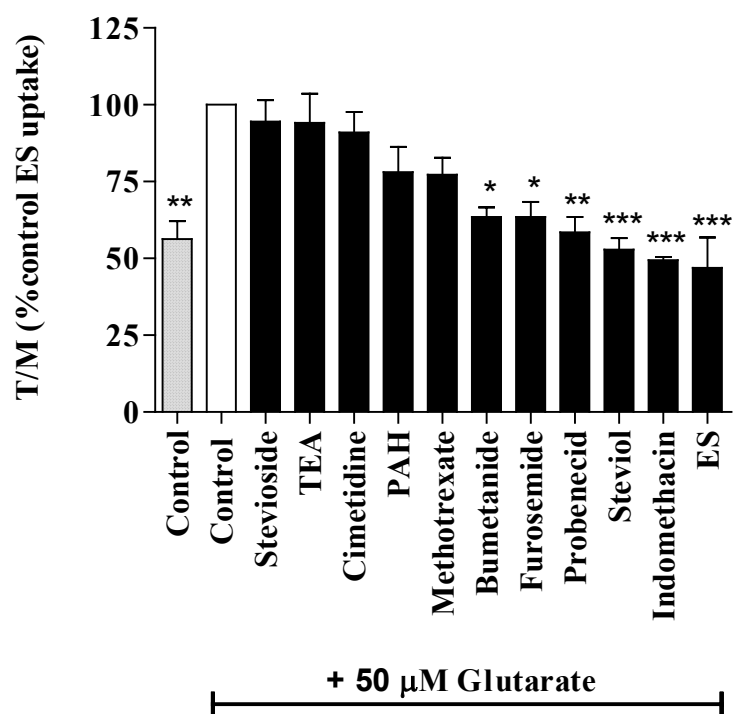


Figure 6B

A.

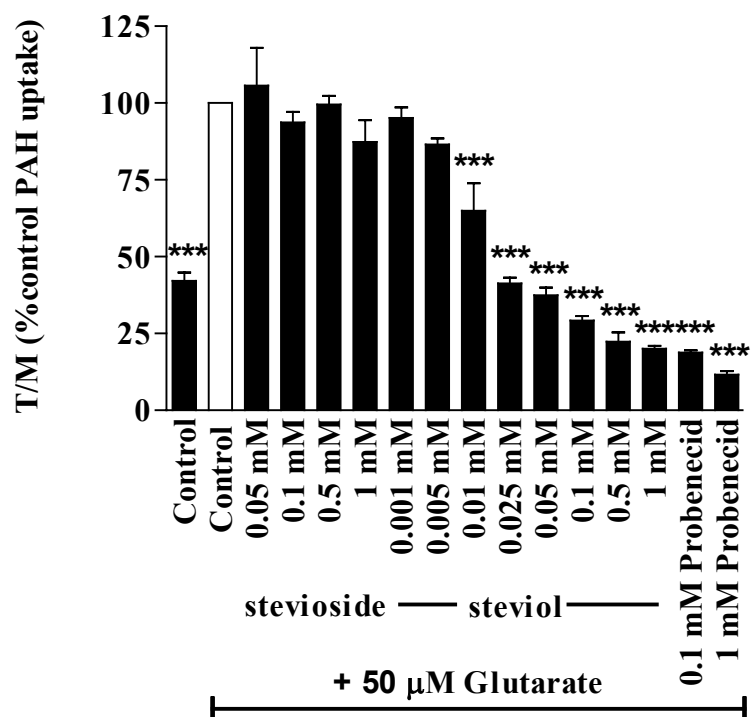


Figure 7A

B.

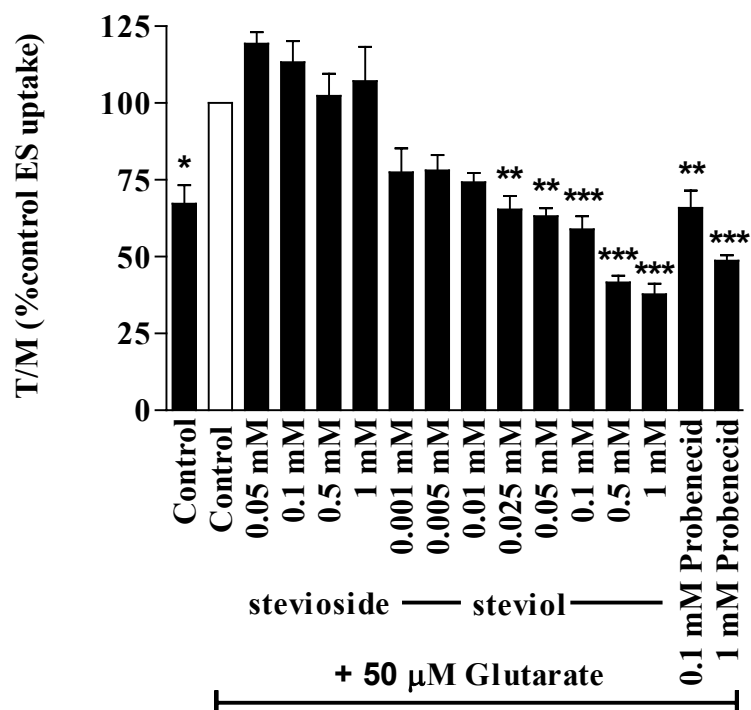


Figure 7B

Acknowledgements

We thank Dr. Chaivat Toskulkao (Mahidol University, Thailand) for kindly providing stevioside and steviol in this study. We are also grateful Ramsey Walden (NIEHS, NC, USA) for his assistance with renal cortical slices preparation and Ms. Kanoknetr Suksen (Mahidol University, Thailand) for her assistance with cytotoxicity study.

Table 1. The inhibition constant (IC₅₀) of steviol on organic anion transport mediated by hOAT1, hOAT2, hOAT3 and hOAT4.

Cloned	Stable cell lines	Cortical slices
	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)
hOAT1	11.4	12.8
hOAT2	1000	N/D
hOAT3	36.5	67.6
hOAT4	285	N/D

N/D; Not determined

Legends for figures

Figure 1. The chemical structures of stevioside and steviol

Figure 2. The effects of stevioside and steviol on hOAT1 (A) and hOAT3 (B)-mediated [^{14}C]-PAH and [^3H]-ES uptake in S2 cells. The uptake measurements were carried out in the presence of stevioside and steviol at various concentrations for 2 min. Unlabeled PAH, unlabeled ES and probenecid were used to block the PAH and ES uptake in comparison with stevioside and steviol. The uptake is expressed as a mean percentage of control (mean $\pm$ SE) from three separate experiments. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$ versus control.

Figure 3. The inhibitory profiles of stevioside, steviol and various compounds on [^{14}C]-PAH and [^3H]-ES uptake mediated by S2 cells expressing hOAT1 (A) and hOAT3 (B). S2hOAT1 and S2hOAT3 cells were incubated for 2 min in the medium containing 5 μM of [^{14}C]-PAH (hOAT1) and 50 nM of [^3H]-ES (hOAT3) in the absence (control) and presence of 100 μM of the compounds. Each value represents the mean $\pm$ SE from three separate experiments. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$ versus control.

Figure 4. The Lineweaver-Burk plot of PAH uptake mediated by hOAT1 (A) and ES uptake mediated by hOAT3 (B). The S2 cells expressing hOAT1 and hOAT3 were incubated with buffer containing either [^{14}C]-PAH (hOAT1) or [^3H]-ES (hOAT3) at various concentrations in the absence ($\blacklozenge$) and presence ($\square$) of steviol (20 μM). Data are shown as the reciprocal of PAH and ES uptake on the ordinate versus the reciprocal of PAH and ES concentrations in the medium on the abscissa. Each point represents the mean $\pm$ SE of three separate experiments.

Figure 5. Effects of stevioside (A) and steviol (B) on cell viability. The S2 cells expressing hOAT1, hOAT3 and S2mock were subcultivated in 96-well plates with

various concentrations of either stevioside or steviol. The cell viability of S2hOAT1 (■), S2hOAT3 (▲) and S2mock (▼) were measured after 3 days of incubation. Each point represents the percentage of cell viability in the absence of either stevioside or steviol (mean $\pm$ SE) of three separate experiments.

Figure 6. The relative inhibition of stevioside, steviol and various compounds on PAH (A) and ES (B) transport in mice renal cortical slices. The fresh renal slices were incubated in the medium containing 10 μ M of [3 H]-PAH and 100 nM of [3 H]-ES with and without 100 μ M of compounds for 60 min at room temperature. The data is calculated as tissue/medium ratio, and expressed as a mean percentage of control uptake (mean $\pm$ SE) of three separate experiments. Each experiment used 3 – 5 animals. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$ versus control.

Figure 7. The effects of stevioside and steviol on PAH (A) and ES (B) uptake in mice renal cortical slices. Renal cortical slices were incubated in the medium containing 10 μ M of [3 H]-PAH and 100 nM of [3 H]-ES with or without various concentrations of stevioside and steviol for 60 min at room temperature. The uptake was calculated as tissue/medium ratio and then transformed to a mean percentage of control. The data represent the mean $\pm$ SE of three separate experiments. Each experiment used 3 – 5 animals. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$ versus control.

Table 1. The calculated IC₅₀ of steviol and probenecid on organic anions (PAH, PGF_{2 α} and ES) uptake in stable cell lines (S2hOAT1, S2hOAT2, S2hOAT3 and S2hOAT4) and mice renal cortical slices.

Footnotes

This work was financial supported from the Thailand Research Fund through the Royal Golden Jubilee Ph.D. Program (Grant no. PHD/0044/2544 and BGJ4580017). A preliminary report of these data was made at the Royal Golden Jubilee 3rd 2002 Annual Meeting at Pattaya, Chonburi, Thailand.

Send reprint request to:

Varanuj Chatsudthipong, Ph.D.

Department of Physiology, Faculty of Sciences, Mahidol University, Rama VI road,
Bangkok, Thailand, 10400