



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ความสัมพันธ์ระหว่างเฮปไซด์ินและพยาธิวิทยาของหลอดเลือดในหนูที่ถูกชักนำให้เป็น
ความดันโลหิตสูงด้วยอาหารที่มีเกลือสูง

Relationship of hepcidin and vascular histopathology in high salt diet induced
hypertensive rats

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร.กรรณิการ์ วงศ์ดี สาขาวิชาพยาธิวิทยากายวิภาค
สำนักงานการศึกษา คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
รหัสโครงการ (AHS3/2563)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภทเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2563

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2564

กิติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภทเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2563 ของคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา (AHS3/2563) ที่สนับสนุนให้สามารถดำเนินการวิจัยได้อย่างลุล่วงจนสามารถผลิตผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติได้

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
สารบัญ	ข
สารบัญภาพ	ค
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 วรรณกรรมและผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	7
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	11
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและผลผลิตของโครงการ	23
บรรณานุกรม	25
ภาคผนวก ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ จำนวน 3 เรื่อง	

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 พยาธิสภาพของหลอดเลือด ชนิด Hyaline arteriosclerosis ที่ย้อมด้วยสี Periodic Acid Schiff (PAS)	4
รูปที่ 2 พยาธิสภาพของหลอดเลือด ชนิด Hyperplastic arteriosclerosis ที่ย้อมด้วยสี H&E	4
รูปที่ 3 Iron homeostasis ในเซลล์เยื่อบุลำไส้ ควบคุมการกักเก็บเหล็กและการปลดปล่อย เหล็กออกสู่กระแสเลือด	6
รูปที่ 4 แผนภาพแสดงขั้นตอนการศึกษาการเปลี่ยนแปลงเมทาบอลิซึมของแคลเซียมในหนู แรทที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความดันโลหิตสูง โดยการได้รับอาหารที่มีเกลือปริมาณสูง (salt-induced hypertensive male rats)	8
รูปที่ 5 (A) รูปตัวแทนเนื้อเยื่อไตย้อมด้วยสี H&E ที่ขนาดกำลังขยาย 40X แสดงให้เห็น Bowman's capsule และ glomerulus สเกลบาร์ยาว 50 μ m (G, glomerulus; BS, bowman's capsule space; PCT, proximal convolutes tubules; DCT, distal convoluted tubules; RBC, red blood cell) (B) กราฟแสดงขนาดพื้นที่ของ Total Bowman's capsule area, glomerular tuft และ Bowman's space area ที่ได้จากเนื้อเยื่อไตของหนูที่ถูกชักนำให้เป็นความดันโลหิตสูงนาน 1 เดือน และ 5 เดือนเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม ตัวเลขบนบาร์แทนจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองแต่ละกลุ่ม (n = 10) *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ns, non-statistical significant	13
รูปที่ 6 (A) รูปตัวแทนเนื้อเยื่อไตย้อมด้วยสี Mallory's trichrome ที่ขนาดกำลังขยาย 40X แสดงให้เห็นถึงบริเวณที่ย้อมติด collagen สเกลบาร์ยาว 50 μ m (G, glomerulus; BS, bowman's capsule space; PCT, proximal convolutes tubules; DCT, distal convoluted tubules; RBC, red blood cell) (B) กราฟแสดงขนาดพื้นที่ของ collagen ในเนื้อเยื่อไตของหนูที่ถูกชักนำให้เป็นความดันโลหิตสูงนาน 1 เดือน และ 5 เดือนเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม ตัวเลขบนบาร์แทนจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองแต่ละกลุ่ม (n=10) **P<0.01, ***P<0.001	14
รูปที่ 7 (A) รูปตัวแทนเนื้อเยื่อไตย้อมด้วยสี Periodic acid-Schiff ที่ขนาดกำลังขยาย 40X แสดงให้เห็นบริเวณที่ย้อมติด glycoprotein สเกลบาร์ยาว 50 μ m (G, glomerulus; BS, bowman's capsule space; PCT, proximal convolutes tubules; DCT, distal convoluted tubules; RBC, red blood cell) (B) กราฟแสดงขนาดพื้นที่ของ glycoprotein ในเนื้อเยื่อไตของหนูที่ถูกชักนำให้เป็นความดันโลหิตสูงนาน 1 เดือน และ 5 เดือนเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม ตัวเลขบนบาร์แทน	15

- จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองแต่ละกลุ่ม (n=10) **P<0.01
- รูปที่ 8 (A) รูปตัวแทนเนื้อเยื่อหัวใจห้องล่างซ้ายย้อมด้วยสี hematoxylin & eosin ที่ขนาดกำลังขยาย 100X แสดงให้เห็นถึงเซลล์ cardiomyocyte สเกลบาร์ยาว 10 μm (N, nucleus; I, intercalated disc; RBC, red blood cell) (B) กราฟแสดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ cardiomyocyte ในเนื้อเยื่อหัวใจห้องล่างซ้ายของหนูที่ถูกชักนำให้เป็นความดันโลหิตสูงนาน 1 เดือน และ 5 เดือนเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม ตัวเลขบนบาร์แทนจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองแต่ละกลุ่ม (n=10) ***P<0.001
- รูปที่ 9 (A) รูปตัวแทนเนื้อเยื่อหัวใจห้องล่างซ้ายย้อมด้วยสี Mallory's trichrome ที่ขนาดกำลังขยาย 100X แสดงให้เห็นถึงบริเวณที่ย้อมติด glycoprotein ในเซลล์ cardiomyocyte สเกลบาร์ยาว 20 μm (N, nucleus; I, intercalated disc; RBC, red blood cell) (B) กราฟแสดงขนาดพื้นที่ของ collagen ในเนื้อเยื่อหัวใจห้องล่างซ้ายของหนูที่ถูกชักนำให้เป็นความดันโลหิตสูงนาน 1 เดือน และ 5 เดือนเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม ตัวเลขบนบาร์แทนจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองแต่ละกลุ่ม (n=10) **P<0.01
- รูปที่ 10 (A) รูปตัวแทนเนื้อเยื่อหัวใจห้องล่างซ้ายย้อมด้วยสี Periodic acid-Schiff ที่ขนาดกำลังขยาย 100X แสดงให้เห็นถึงบริเวณที่ย้อมติด glycoprotein ในเซลล์ cardiomyocyte สเกลบาร์ยาว 10 μm (N, nucleus; I, intercalated disc; RBC, red blood cell) (B) กราฟแสดงขนาดพื้นที่ของ glycoprotein ในเนื้อเยื่อหัวใจห้องล่างซ้ายของหนูที่ถูกชักนำให้เป็นความดันโลหิตสูงนาน 1 เดือน และ 5 เดือนเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม ตัวเลขบนบาร์แทนจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองแต่ละกลุ่ม (n=10) **P<0.01
- รูปที่ 11 (A) รูปตัวแทนเนื้อเยื่อหลอดเลือด aorta ย้อมด้วยสี hematoxylin & eosin ที่ขนาดกำลังขยาย 40X แสดงให้เห็นถึงความหนาของผนังหลอดเลือด สเกลบาร์ยาว 50 μm (SMC, smooth muscle cells; I, tunica intima; M, tunica media; E, elastic fiber) (B) กราฟแสดงความหนาของผนังหลอดเลือดแดง aorta ในเนื้อเยื่อหลอดเลือด aorta ของหนูที่ถูกชักนำให้เป็นความดันโลหิตสูงนาน 1 เดือน และ 5 เดือนเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม ตัวเลขบนบาร์แทนจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองแต่ละกลุ่ม (n=10) *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001
- รูปที่ 12 รูปตัวแทนการแสดงออกของโปรตีน hepcidin ในเนื้อเยื่อหลอดเลือด aorta ของหนูที่ถูกชักนำให้เป็นความดันโลหิตสูงนาน 1 เดือน และเนื้อเยื่อตับซึ่งเป็น Positive control tissue ที่กำลังขยาย 4X สีน้ำตาลแสดงถึงการแสดงออกของ hepcidin

บทที่ 1 บทนำ (Introduction)

1.1 ความสำคัญและสรุปความเป็นมาของโครงการ

โรคความดันโลหิตสูง เป็นหนึ่งในสาเหตุสำคัญที่ทำให้ประชากรทั่วโลกตายก่อนวัยอันควร และเป็นปัญหาที่กำลังมีความรุนแรงมากขึ้น จากข้อมูลองค์การอนามัยโลก (WHO) ในปี 2013 พบว่า โรคความดันโลหิตสูงเป็นสาเหตุการตายทั่วโลกสูงถึง 7.5 ล้านคน หรือร้อยละ 12.8 ของสาเหตุการตายทั้งหมด จำนวนผู้ที่มีความดันโลหิตสูงทั่วโลกพบว่ามีจำนวนเกือบถึงพันล้านคน ซึ่งสอง ในสามจะอยู่ในประเทศกำลังพัฒนา และคาดการณ์ว่าจะมีความชุกของโรคความดันโลหิตสูงทั่วโลก เพิ่มขึ้นถึงเป็น 1.56 พันล้านคน ในปี พ.ศ. 2568¹ ส่วนสถานการณ์ความดันโลหิตสูงในประเทศไทย จากข้อมูลสำนักนโยบายและยุทธศาสตร์ สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข พบว่าอัตราการป่วยด้วยโรคความดันโลหิตสูง ต่อประชากร 100,000 คน ในรอบ 5 ปีที่ผ่านมา (พ.ศ. 2556–2560) เพิ่มขึ้นจาก 12,342.14 (จำนวน 3,936,171 คน) เป็น 14,926.47 (จำนวน 5,597,671 คน) หรือราว 30%²

ผลกระทบสำคัญที่เกิดจากความดันโลหิตสูงคือการทำลายผนังหลอดเลือด ทำให้ผนังหลอดเลือดทำงานผิดปกติ หรือที่เรียกว่า Hypertension-associated endothelial dysfunction ซึ่งเกิดจากการมีปริมาณอนุมูลอิสระสูงขึ้น มีการอักเสบและกระบวนการซ่อมแซมหลอดเลือดเกิดช้าไปมาอย่างเรื้อรัง เป็นต้น ที่ผ่านมาได้มีการรายงานว่า เซลล์ macrophage บริเวณผนังหลอดเลือดที่สะสมเหล็กอยู่ในเซลล์นั้น มีความสัมพันธ์กับการบ่งชี้การดำเนินของโรคหลอดเลือดแดงแข็ง (Atherosclerosis) ได้ โดยชักนำให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระและสารสื่ออักเสบเพิ่มมากขึ้น [Valenti et al. 2015]

โดยปกติ Ferritin มักถูกใช้เป็นตัวบ่งชี้การสะสมของเหล็กในร่างกายรวมถึงการอักเสบ แต่นอกจาก Ferritin แล้ว ยังมีฮอร์โมนอีกชนิดที่สร้างจากตับที่สามารถควบคุมการสะสมเหล็กในร่างกายได้ นั่นคือฮอร์โมน hepcidin โดยปกติแล้ว hepcidin สร้างจากตับและหลั่งออกสู่กระแสเลือด นอกจากนั้น มีการรายงานการแสดงออกของ hepcidin protein ในหลอดเลือดด้วย โดยพบการแสดงออกของ hepcidin ใน endothelial cells ในสมองของหนู [Raha-Chowdhury et al. 2015] และงานวิจัยในปี 2015 พบว่าภาวะที่ร่างกายมี hyperferritinemia ร่วมกับระดับ hepcidin มีความสัมพันธ์กับ aortic stiffness ในผู้ป่วยความดันโลหิตสูง ซึ่ง hepcidin จะหลั่งเมื่อถูกกระตุ้นโดยภาวะที่มีเหล็กสะสมในร่างกายมาก หรือภาวะที่มีการอักเสบ เป็นต้น

ดังนั้น hepcidin จึงอาจเป็นตัวบ่งชี้ที่สัมพันธ์กับการทำลายหลอดเลือด โดยทำให้เกิดการสะสมเหล็กไว้ในเซลล์ macrophage ซึ่งอยู่ตามผนังหลอดเลือดจุดที่มีการบาดเจ็บ/ซ่อมแซม บนพื้นฐานของสมมติฐานข้างต้น ผู้วิจัยคาดว่าในภาวะความดันโลหิตสูง ที่หลอดเลือดถูกทำลายจากทั้งแรงดันในหลอดเลือดและอนุมูลอิสระ หลอดเลือดแดงจะมีการแสดงออกของ hepcidin ในเซลล์จำพวก macrophage เพิ่มสูงขึ้น และอาจมีการแสดงออกใน endothelial cells เพิ่มสูงขึ้นด้วย

¹ World Health Organization (WHO). (2013). A global brief on hypertension Silent killer, global public health crisis. Retrieved from http://www.who.int/cardiovascular_diseases/publications/global_brief_hypertension/en/

² สำนักนโยบายและยุทธศาสตร์ สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข. สถิติสาธารณสุข พ.ศ.2558. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ สามเจริญพาณิชย์ (กรุงเทพ) จำกัด, 2559.

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อประเมินพยาธิสภาพของหลอดเลือดแดงในหนูที่ถูกชักนำให้เป็นความดันโลหิตสูงเทียบกับหนูปกติ
2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของโปรตีน Hcpidin ในหลอดเลือดแดง ในสัตว์ทดลองที่มีภาวะความดันโลหิตสูงเทียบกับภาวะปกติ

1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

ด้านวิชาการ

1. ผู้วิจัยคาดหวังว่าผลงานวิจัยจากโครงการนี้จะสามารถตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติที่อยู่ในฐานข้อมูล SJR quartile 1–3 จำนวน 1 เรื่อง นอกจากนี้ผู้วิจัยมีแผนที่จะนำเสนอผลงานในที่ประชุมทางวิชาการระดับนานาชาติอีกด้วยตามความเหมาะสม
2. ความรู้ทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ในบทบาทของ Hcpidin ที่ผนังหลอดเลือดสัมพันธ์กับโรคความดันโลหิตสูง

ด้านการพัฒนาทรัพยากรบุคคล

โครงการวิจัยนี้ มีแผนจะให้ทุนสตี ป.ตรี ได้ฝึกหัดกระบวนการวิจัยทางพยาธิวิทยากายวิภาค ซึ่งเป็นการพัฒนาทรัพยากรบุคคลให้มีการคิดเชิงกระบวนการ คิดวิเคราะห์ และค้นคว้าความรู้เพิ่มเติม ซึ่งจะทำให้บัณฑิตที่จบการศึกษามีความคิดเชิงวิเคราะห์และวิจัยติดตัวออกไปหลังจบการศึกษา และทำให้งานวิจัยของคณะสหเวชศาสตร์เข้มแข็งยิ่งขึ้น

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

โครงการวิจัยนี้ ผู้วิจัยศึกษาพยาธิสภาพของหลอดเลือดแดงขนาดใหญ่และขนาดเล็กของหนูทดลองที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะความดันโลหิตสูง และศึกษาการแสดงออกของโปรตีน hepcidin ในเนื้อเยื่อหลอดเลือดแดงของหนูทดลองที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะความดันโลหิตสูงเทียบกับหนูปกติ ด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี และ confocal microscopy โดยผู้วิจัยรับชิ้นเนื้อมาจากทีมวิจัย ไม่ได้ทำการเลี้ยงสัตว์ทดลองเอง

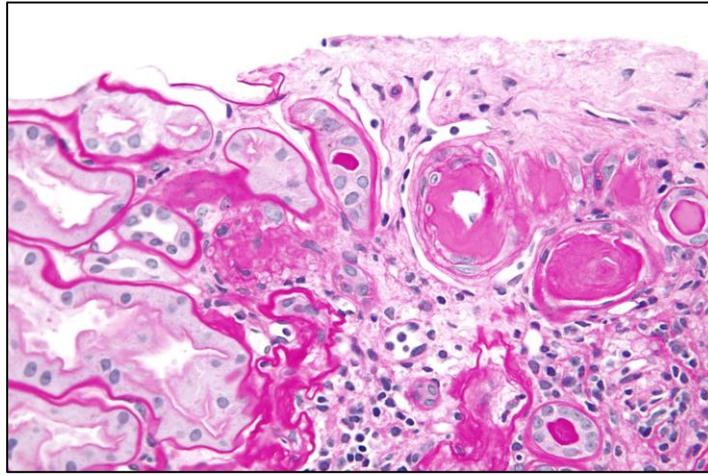
บทที่ 2 การทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง (Literatures review)

2.1 โรคความดันโลหิตสูง

โรคความดันโลหิตสูงและโรคกระดูกพรุนเป็นโรคที่พบได้บ่อยและเป็นโรคที่มีความสำคัญทางสาธารณสุขในกลุ่มผู้สูงอายุทั่วโลก ทั้งนี้พบว่าทั้งโรคความดันโลหิตสูงและกระดูกพรุนมีปัจจัยโน้มนำและภาวะเสี่ยงต่างๆ ของการเกิดโรคร่วมกัน เช่น พบส่วนใหญ่ในผู้สูงอายุ หญิงช่วงหมดประจำเดือน การสูบบุหรี่ หรือการออกกำลังกาย จากการศึกษาพบว่าในผู้ป่วยที่มีความดันโลหิตสูงจะพบว่ามีความเสี่ยงสูงที่พบการหักของกระดูก ซึ่งโรคความดันโลหิตสูงและโรคกระดูกพรุนอาจจะเกิดจากความผิดปกติของยีนเดียวกัน แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานที่แน่ชัดถึงกลไกและความสัมพันธ์ของสาเหตุของการเกิดความดันโลหิตสูงและโรคกระดูกพรุน โรคความดันโลหิตสูงหมายถึงภาวะความดันเลือดในจังหวะที่หัวใจบีบ และ/หรือความดันเลือดในจังหวะที่หัวใจคลายตัว มีค่ามากกว่าค่าความดันเลือดปกติอย่างต่อเนื่อง (มากกว่า 90/140 mmHg) ซึ่งความดันโลหิตสูงแบ่งออกเป็นความดันโลหิตสูงปฐมภูมิ (ไม่ทราบสาเหตุ) ซึ่งเป็นกลุ่มที่พบมากที่สุด (ร้อยละ 90-95) ผู้ป่วยกลุ่มนี้จะเริ่มเป็นโรคความดันโลหิตสูงเมื่ออายุได้ประมาณ 25-55 ปี (พบได้มากในผู้ที่มีอายุตั้งแต่ 40 ปีขึ้นไป) และยิ่งอายุมากขึ้นก็จะมีโอกาสเป็นได้มากขึ้น ปัจจุบันยังไม่ทราบถึงสาเหตุของการเกิดความดันโลหิตสูงชนิดนี้ แต่มีรายงานถึงปัจจัยโน้มนำที่ทำให้เกิดความดันโลหิตสูง ได้แก่ การรับประทานอาหารเค็มจัด หรือมีเกลือโซเดียมสูง การมีอายุมาก ความอ้วน และกรรมพันธุ์ ส่วนความดันโลหิตสูงแบบทุติยภูมิพบว่ามักมีสาเหตุที่มาจาก โรคไตเรื้อรัง หลอดเลือดแดงหรือหลอดเลือดแดงไตตีบแคบ เป็นต้น

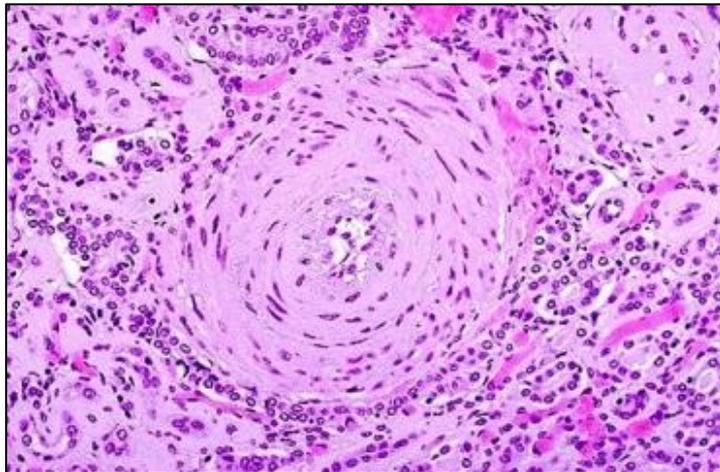
การศึกษาในสัตว์ทดลองที่มีภาวะความดันโลหิตสูงชนิดปฐมภูมิ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษาในสัตว์ทดลองที่มีภาวะความดันโลหิตสูงโดยการเหนี่ยวนำด้วยการได้รับเกลือโซเดียมในอาหารปริมาณสูง (8% NaCl) ซึ่งพบเป็นปัจจัยเสี่ยงหลักของการเกิดความดันโลหิตสูงในสังคมปัจจุบันเนื่องจากพฤติกรรมการกินอาหารที่มีปริมาณโซเดียมสูง จึงมีความสำคัญที่จะทำให้สามารถอธิบายและเข้าใจถึงกลไกและความสัมพันธ์ของการเกิดโรคความดันโลหิตสูงอันที่จะนำไปสู่การป้องกันและรักษาโรคนี้ต่อไปในอนาคต

พยาธิสภาพของหลอดเลือดเมื่อมีความดันโลหิตสูง นอกจากจะเร่งกระบวนการ angiogenesis แล้ว ยังทำลายผนังของหลอดเลือดทั้งในระดับหลอดเลือดขนาดใหญ่และหลอดเลือดขนาดกลาง โดยทำให้เกิดพยาธิสภาพในสองแบบคือ Hyaline และ hyperplastic arteriosclerosis โดยในแบบแรก Hyaline arteriosclerosis พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อจะมีโปรตีนที่มีลักษณะเป็น homogeneous pink ที่ผนังของหลอดเลือด ซึ่งจะพบได้บ่อยในผู้สูงอายุทั้งคนที่ความดันโลหิตปกติและความดันโลหิตสูง แต่จะรุนแรงกว่าในภาวะความดันโลหิตสูง นอกจากนี้ยังพบในโรคเบาหวานอีกด้วย (รูปที่ 1) การเปลี่ยนแปลงแบบ hyaline นี้เป็นลักษณะสำคัญของ benign nephrosclerosis ด้วย ซึ่งแสดงถึงการแคบลงของหลอดเลือดในไต ทำให้ได้รับเลือดมาเลี้ยงน้อยลง



รูปที่ 1 พยาธิสภาพของหลอดเลือด ชนิด Hyaline arteriosclerosis ที่ย้อมด้วยสี Periodic Acid Schiff (PAS)

แบบที่สอง คือ hyperplastic arteriosclerosis สัมพันธ์กับความดันโลหิตสูงอย่างเฉียบพลันและรุนแรง ลักษณะสำคัญทาง histopathology คือ มีเส้นวงรอบ ๆ หลอดเลือดคล้ายหัวหอม (onion skin appearance) ผนังมีลักษณะหนาขึ้นเป็นเส้น ๆ วงกลม และลูเมนของหลอดเลือดแคบลง (concentric, laminated thickening of the walls of vessel) (รูปที่ 2) ซึ่งลักษณะที่เป็นเส้นซ้อนกันเป็นชั้น ๆ นั้นเกิดจากการ duplication ของ basement membrane ของหลอดเลือด นอกจากนี้ hyperplastic change ยังสัมพันธ์กับการสะสมของ fibrinoid และ acute necrosis ของหลอดเลือดอีกด้วย



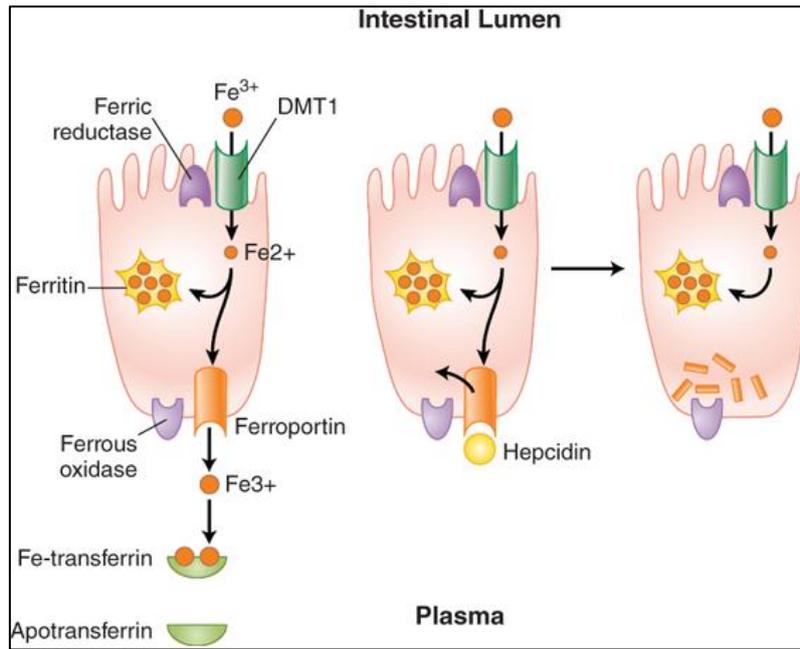
รูปที่ 2 พยาธิสภาพของหลอดเลือด ชนิด Hyperplastic arteriosclerosis ที่ย้อมด้วยสี H&E

2.2 Iron homeostasis และ hepcidin

โดยปกติ กระบวนการควบคุมการขนส่งเหล็กเข้าสู่กระแสเลือด เป็นกระบวนการสำคัญที่จะรักษาระดับเหล็กในเลือดให้อยู่ในปริมาณที่เหมาะสม (ระดับเหล็กในเลือดในภาวะปกติ 12.5 – 30 ไมโครโมลาร์) กระบวนการขนส่งเหล็กในระดับเซลล์ที่ควบคุม systemic iron homeostasis จะพบในเซลล์บางชนิด เช่น เซลล์เยื่อบุลำไส้ (enterocyte), เซลล์ตับ (hepatocyte) และเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด macrophage เป็นต้น

[Coates 2014; Hentze et al. 2010] ตัวอย่างในเซลล์ macrophage เหล็กสามารถเข้าสู่เซลล์ผ่านสองช่องทาง คือ (1) ธาตุเหล็กในรูปของเหล็กเฟอร์ริก (Fe^{3+}) ที่จับกับโปรตีน transferrin จะถูกขนส่งเข้าเซลล์ผ่าน transferrin receptor 1 (TfR1) ซึ่งอยู่บนผิวเซลล์ หรือ (2) เหล็กในรูปเหล็กเฟอร์รัส (Fe^{2+}) ผ่านทาง divalent metal transporter 1 (DMT1) ซึ่งเป็นโปรตีนขนส่งบนเยื่อหุ้มเซลล์ที่สามารถขนส่งธาตุประเภทที่มีประจุ $2+$ (divalent ion; $2+$) หลังจากที่ถูกเหล็กเข้าสู่เซลล์แล้ว Fe^{3+} จะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูป Fe^{2+} ด้วยเอนไซม์ ferric reductase จากนั้น Fe^{2+} จะถูกขับออกจากเซลล์สู่กระแสเลือดผ่าน transmembrane protein ที่ชื่อว่า ferroportin หลังจากนั้น Fe^{2+} จะถูกเปลี่ยนเป็น Fe^{3+} อีกครั้งด้วยเอนไซม์ ceruloplasmin เพื่อให้สามารถจับกับ transferrin และขนส่งในกระแสเลือดได้ เพื่อให้เซลล์อื่น เช่น เซลล์ตับ หรือเซลล์ในไขกระดูกสามารถนำเหล็กไปใช้ในกระบวนการสร้างเม็ดเลือดแดงต่อไป

การทำงานของ ferroportin ยังต้องประสานกับฮอร์โมนตัวอื่นด้วยเช่นกัน อย่าง hepcidin ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่สร้างและหลั่งจากตับ ทำหน้าที่ควบคุมการปลดปล่อยเหล็กจากเซลล์เยื่อบุลำไส้ ออกสู่กระแสเลือด ทำงานร่วมกับ ferroportin ยับยั้งการปลดปล่อยธาตุเหล็กจากเซลล์ออกสู่กระแสเลือด โดยไปลดการทำงานของโปรตีนขนส่งเหล็ก ferroportin 1 ทำให้เกิดการ internalization ของ ferroportin 1 และถูกทำลาย ลดการส่งผ่านธาตุเหล็กเข้าสู่กระแสเลือดและปล่อยให้สะสมไว้ที่ผนังลำไส้ ร่องการหลุดลอกต่อไป ร่างกายจะหลั่ง hepcidin สูงขึ้นในภาวะที่ร่างกายมีเหล็กสะสมมากเกินไปและในภาวะอักเสบ ในทางตรงกันข้ามเมื่อร่างกายเกิดการขาดธาตุเหล็ก เซลล์ตับจะปล่อย hepcidin ออกมาน้อยลง ทำให้มีการดูดซึมเหล็กได้สูงขึ้นและเร่งกระบวนการทำลายเม็ดเลือดแดงที่หมดอายุในม้ามเพื่อให้กลับมาใช้ให้พอดีต่อความต้องการ (รูปที่ 3) นอกจากนี้ยังสามารถพบ hepcidin ได้ที่หัวใจ, ม้าม, ตับ, ภาวะอาหาร และลำไส้เล็ก [Campoverde et al., 2017] มีรายงานพบการแสดงออกของ hepcidin ใน endothelial cell ในเส้นเลือดสมองของหนูด้วย [Raha-Chowdhury 2015] อย่างไรก็ตาม ความสัมพันธ์ระหว่างพยาธิสภาพของหลอดเลือดที่เกิดจากความดันโลหิตสูง กับการแสดงออกของ hepcidin นั้นยังมีข้อมูลอยู่น้อยมาก



รูปที่ 3 Iron homeostasis ในเซลล์เยื่อบุลำไส้ ควบคุมการกักเก็บเหล็กและการปลดปล่อยเหล็กออกสู่กระแสเลือด

บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย (Research methodology)

3.1 สัตว์ทดลอง

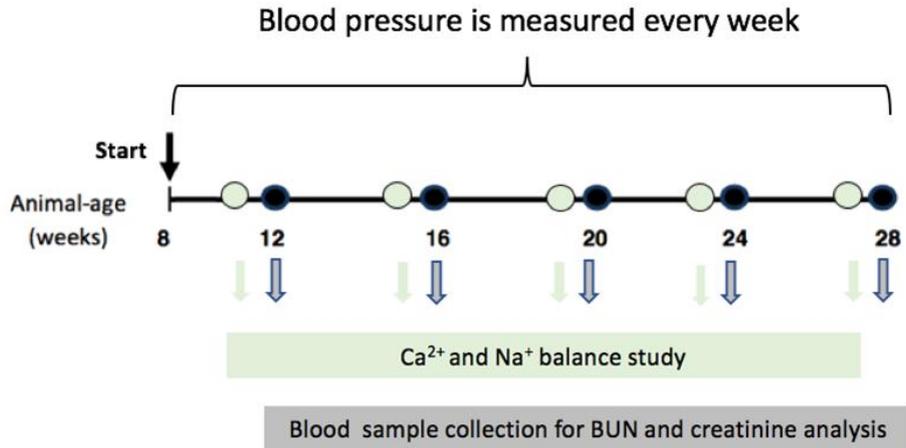
การศึกษาเกี่ยวกับสัตว์ทดลองในโครงการนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาวิจัยร่วมกับ ดร. สพญ.วัชรภรณ์ ตริยะस्थ्यกุลโกวิท (ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) และหน่วยวิจัยด้านแคลเซียมและกระดูก คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ในการเลี้ยงสัตว์ทดลองและเก็บสิ่งส่งตรวจ ซึ่งเป็นไปตามมาตรฐานการกำกับดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์ทดลอง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และโครงการใช้สัตว์ทดลองได้ผ่านการพิจารณาโดยคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์ทดลอง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เป็นที่เรียบร้อยแล้ว (เลขที่ MUSC60-045-395 และ MUSC59-006-339) และได้ครบกำหนดเก็บตัวอย่างไปก่อนหน้า จึงได้มีการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อไปแล้ว โดยเนื้อเยื่อสัตว์ที่ได้รับ ความอนุเคราะห์มานั้น ผ่านการคงสภาพในสารพาราฟอร์มัลดีไฮด์ (paraformaldehyde) มาแล้ว ทำให้ไม่มีเนื้อเยื่อเพียงพอสำหรับการสกัด RNA เพื่อตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของยีนตามที่คุณผู้ทรงคุณวุฒิ เสนอแนะ

3.2 แผนการทดลอง (Experimental design)

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้หนูแรทสายพันธุ์ Sprague-Dawley rat (SD rat) เพศผู้ อายุ 8 สัปดาห์ แบ่งหนู ออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 8 ตัว ดังนี้

- กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม (control) จะได้รับอาหารสูตรที่มี 0.4% sodium (standard diet; 0.4% sodium; SD diet)
- หนูกลุ่มที่ 2 จะได้รับอาหารที่มีปริมาณโซเดียมสูง 8% (High salt diet; 8% sodium; HS diet)

ทำการเลี้ยงสัตว์ทดลองเป็นเวลา 5 เดือน โดยทุกสัปดาห์ ทำการการตรวจวัดความดันโลหิตจากบริเวณโคนหาง (tail cuff method) ตรวจการเปลี่ยนแปลงของแคลเซียมเมทาบอลิซึมโดยวิธี calcium balance study รวมทั้งทำการตรวจประเมินการทำงานของไตโดยตรวจวัดระดับ BUN และ creatinine ใน น้ำเลือด และเมื่อสิ้นสุดการทดลองจะทำการการุณยฆาต และนำเนื้อเยื่อหัวใจ, หลอดเลือด aorta, ไต และ กระดูกมาตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาต่าง ๆ



รูปที่ 4 แผนภาพแสดงขั้นตอนการศึกษาการเปลี่ยนแปลงเมตาบอลิซึมของแคลเซียมในหนูแรพที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความดันโลหิตสูง โดยการได้รับอาหารที่มีเกลือปริมาณสูง (salt-induced hypertensive male rats)

เมื่อ ดร. สพญ. วัชรภรณ์ ดิยะสัตย์กุลโกวิท ได้เก็บชิ้นเนื้อหัวใจ, หลอดเลือด aorta และไตแล้ว จึงนำส่งให้ผู้วิจัย โดยผู้วิจัยได้รับเนื้อเยื่อหัวใจ, หลอดเลือดและไต ที่ผ่านการคงสภาพด้วย Fixative solution และเก็บใน 70% v/v ethanol และนำเนื้อเยื่อมาศึกษาพยาธิสภาพและศึกษาโปรตีน hepcidin ตามวัตถุประสงค์การทดลองต่อไป

วัตถุประสงค์ที่ 1 เพื่อประเมินพยาธิสภาพของหลอดเลือดแดงในหนูที่ถูกชักนำให้เป็นความดันโลหิตสูงเทียบกับหนูปกติ

สมมุติฐาน เนื้อเยื่อหลอดเลือดของหนูที่ถูกชักนำให้เป็นความดันโลหิตสูงจะมีพยาธิสภาพ (blood vessel injury) ที่รุนแรงกว่าเมื่อเทียบกับหนูปกติ เช่น มี endothelial damage, vascular plaque และเซลล์ของการอักเสบเรื้อรัง เป็นต้น

การทดลอง ผู้วิจัยนำเนื้อเยื่อหลอดเลือดและไตไปผ่านกระบวนการทางเนื้อเยื่อวิทยาและฝังในพาราฟิน จากนั้นตัดเนื้อเยื่อเป็นแผ่น 5 ไมโครเมตร แล้วนำไปย้อมสี H&E และสีพิเศษอื่น ๆ เช่น Masson's trichrome นำไปศึกษา histopathology ที่ปรากฏในเนื้อเยื่อหลอดเลือด โดยจำแนกเกรดของพยาธิสภาพที่พบเชิงคุณภาพ โดยใช้ผู้อ่านผลจำนวน 2 คน อ่านเนื้อเยื่อแบบอิสระจากกัน โดยประเมินในตัวแปร ดังนี้ Endothelial detachment, Presence of macrophage และ Inflammatory reaction

วัตถุประสงค์ที่ 2 เพื่อศึกษาการแสดงออกของโปรตีน Hecpudin ในหลอดเลือดแดงของหนูที่มีภาวะความดันโลหิตสูงเทียบกับหนูปกติ

สมมุติฐาน การแสดงออกของโปรตีน Hecpudin จะเพิ่มสูงขึ้น ในหนูที่มีภาวะความดันโลหิตสูง

การทดลอง

การศึกษาในส่วนของที่ 2 นี้ ผู้วิจัยวางแผนจะนำ sections ของหลอดเลือดและเนื้อเยื่อไตของหนูทั้ง 2 กลุ่ม ไปผ่านการย้อมหาโปรตีน hepcidin ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี และนำเนื้อเยื่อไปวิเคราะห์ด้วย semi-quantitative immunohistochemistry ด้วยโปรแกรม NIS-Element (Nikon) เพื่อวัดระดับการแสดงออกของโปรตีน hepcidin ในระดับ light microscope อีกส่วนหนึ่ง ผู้วิจัยจะย้อมโปรตีน hepcidin และนำไปศึกษาและวิเคราะห์ด้วย Confocal microscopy เพื่อให้ได้ข้อมูลถึงตำแหน่งการแสดงออกของโปรตีนที่แม่นยำต่อไป และเนื้อเยื่อของหลอดเลือดและหัวใจ นำไปศึกษาการแสดงออกของยีน Hecpudin และยีนที่เกี่ยวข้องกับ iron transport-related genes เช่น DMT1, ferroportin, transferrin receptor 1 และ 2 ด้วยวิธี qRT-PCR (ตามคำแนะนำของ Reviewer)

3.3 วิธีการประเมินผล/สังเคราะห์ข้อมูล

ผลการทดลองนำไปวิเคราะห์ Unpaired student t-test และเมื่อค่า $p < 0.05$ ถือว่าความน่าจะเป็นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเชิงสถิติ ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 8.0 for Mac OS X (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3.4 แผนการดำเนินงาน/ขั้นตอนการวิจัย

ตารางสรุปแผนงานวิจัย (Gantt chart)

Activities	Year 2020										Year 2021	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	มี.ค.	เม.ย.	พ.ค.	มิ.ย.	ก.ค.	ส.ค.	ก.ย.	ต.ค.	พ.ย.	ธ.ค.	ม.ค.	ก.พ.
Experiment 1 – Histological processing, H&E and Trichrome staining – Vascular injury grading		←→										
Experiment 2 – Hecpudin immunostaining and semi-quantitative analysis – Hecpudin immunostaining and confocal microscopy analysis – qRT-PCR analysis of iron transport-related genes				←→								
Data analysis		←→										
Manuscript preparation/submission									←→			

บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 โครงการวิจัยโดยสรุป

อย่างที่ทราบกันว่าการบริโภคโซเดียมในปริมาณที่สูงนั้นส่งผลให้เกิดความดันโลหิตสูงได้ ซึ่งการมีภาวะโลหิตสูงเป็นระยะเวลาสั้นก็ส่งผลต่อหลอดเลือดซึ่งต้องรับแรงดันของเลือดที่สูงขึ้น นำไปสู่การทำลายผนังของหลอดเลือดทั้งในหลอดเลือดขนาดใหญ่และหลอดเลือดขนาดกลาง และกระตุ้นกระบวนการ angiogenesis นอกจากนี้การอักเสบของหลอดเลือดหรือการเกิดภาวะ aorta stiff ยังส่งผลกระตุ้นการแสดงออกของ hepcidin ซึ่งเป็นฮอร์โมนควบคุมการปล่อยเหล็กจากเซลล์เยื่อบุลำไส้สู่กระแสเลือดเพิ่มมากขึ้น และจากรายงานของ Raha-Chowdhury และคณะ [2015]³ พบการแสดงออกของ hepcidin ใน endothelial cell ในเส้นเลือด จึงเป็นไปได้ว่าเมื่อความดันโลหิตสูงส่งผลให้หลอดเลือดเกิดพยาธิสภาพจะส่งผลกระตุ้นการแสดงออกของ hepcidin

การศึกษาในโครงการนี้ ผู้วิจัยได้รับความอนุเคราะห์เนื้อเยื่อสัตว์ทดลองจาก ดร. สพญ.วัชรภรณ์ ดิยะ สัตย์กุลโกวิท (ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) โดยทำการศึกษาในหนูสายพันธุ์ Sprague-Dawley และแบ่งหนูทดลองเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมจะได้รับอาหารสูตรที่มี 0.4% sodium (control) และหนูกลุ่มที่ 2 จะได้รับอาหารที่มีปริมาณโซเดียมสูง 8% (high salt diet) จากการย้อมสี PAS ในเนื้อเยื่อไตพบว่าไกลเมอรูลัสมีปริมาณ collagen และ glycoprotein น้อยกว่ากลุ่มควบคุม ไม่พบการอักเสบหรือการหนาตัวของ fibrosis แต่พบว่าในกลุ่มที่ได้รับเกลือสูงมีการเพิ่มของพื้นที่ของ Total Bowman's capsule area, glomerular tuft และ Bowman's space area เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมใน ระยะ 5 เดือน และในเนื้อเยื่อหัวใจ พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ cardiomyocyte ในหนูที่ได้รับเกลือสูงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และพบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับเกลือสูงมีปริมาณ glycoprotein ในเนื้อเยื่อหัวใจน้อยกว่ากลุ่มควบคุมในระยะ 5 เดือน ส่วนในหลอดเลือด aorta พบว่าในหนูที่ได้รับเกลือสูงผนังของหลอดเลือด aorta มีความหนาแน่นมากกว่ากลุ่มควบคุมในระยะ 5 เดือน

4.2 ผลการดำเนินงาน สรุปและวิเคราะห์ผลที่ได้ดำเนินการไปแล้ว

4.2.1 พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อไต หัวใจ และหลอดเลือดในหนูที่ถูกชักนำให้เป็นความดันโลหิตสูงเทียบ

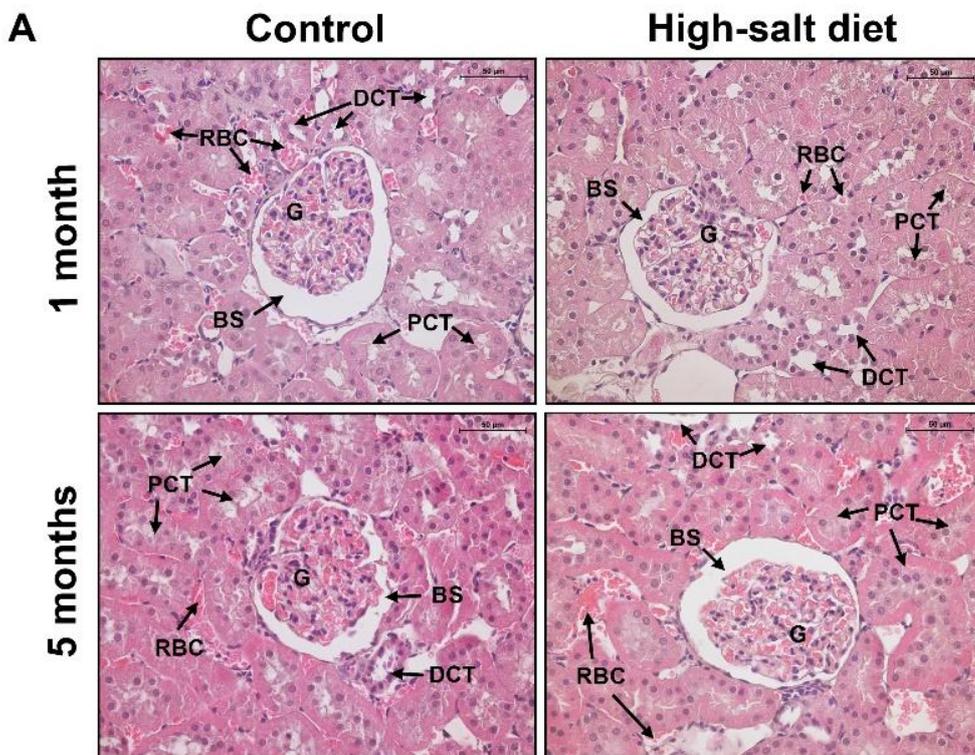
กับหนูปกติ

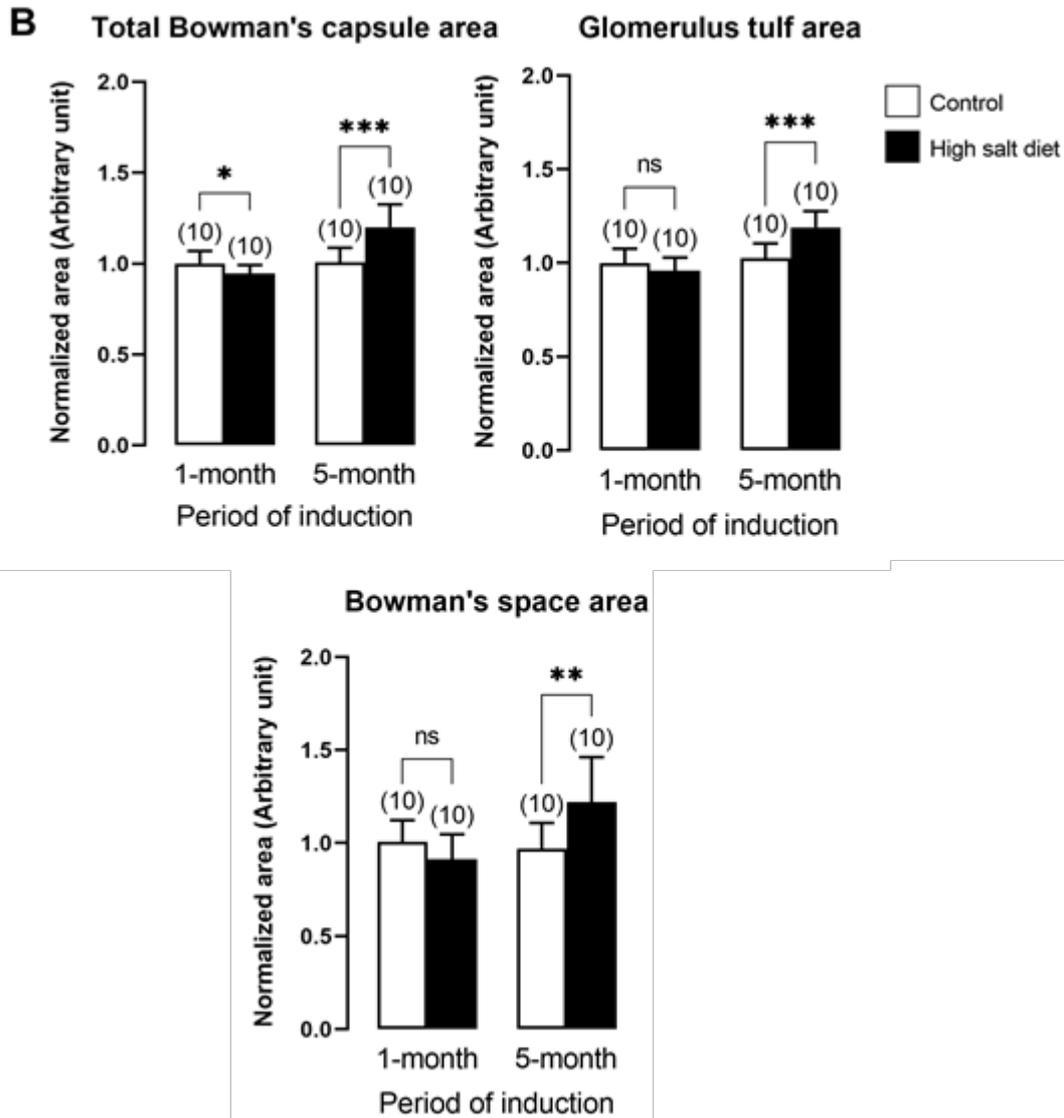
วัตถุประสงค์ เพื่อประเมินพยาธิสภาพของหลอดเลือดแดงในหนูที่ถูกชักนำให้เป็นความดันโลหิตสูงเทียบกับหนูปกติ

ก่อนการศึกษาการแสดงออกของ hepcidin ในภาวะความดันโลหิตสูง ผู้วิจัยจำเป็นต้องศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อไต หัวใจ และหลอดเลือดเพื่อยืนยันถึงการบาดเจ็บจากภาวะความดันโลหิตสูง และอาจนำไปสู่การอักเสบของหลอดเลือด ซึ่งนำไปสู่การกระตุ้นการแสดงออกของ hepcidin ซึ่งโดยปกติแล้วภาวะความดันโลหิตสูงจะส่งผลต่อหลอดเลือดระดับ capillaries ในไกลเมอรูลัสของเนื้อเยื่อไต ผล

³ Raha-Chowdhury R, Raha AA, Forostyak S, Zhao JW, Stott SR, Bomford A. Expression and cellular localization of hepcidin mRNA and protein in normal rat brain. BMC Neurosci. 2015;16:24.

การศึกษาเนื้อเยื่อไตด้วยการย้อมสี H&E เนื้อเยื่อไตอยู่ในสภาพที่ดี เห็น glomerulus และ renal tubule ชัดเจน ไม่มี tissue necrosis ดังแสดงในรูปที่ 5A ผู้วิจัยได้ศึกษา morphometry ของ glomerulus พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับเกลือสูงนาน 1 เดือน มีขนาด Total Bowman's capsule area ใหญ่ขึ้น ในขณะที่ glomerular tuft area และ Bowman's space ไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในหนูกลุ่มที่ได้รับเกลือสูงนาน 5 เดือน พบว่าขนาดของ Total Bowman's capsule area, Bowman's space area รวมถึง Glomerular tuft area มากขึ้นเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม (รูปที่ 5B) ผู้วิจัยได้วิเคราะห์ปริมาณ collagen ใน glomerulus ด้วยการย้อมสี Mallory's trichrome กลับพบว่าในหนูที่ได้รับเกลือสูงมีปริมาณ collagen ใน glomerulus น้อยกว่ากลุ่มควบคุมทั้งในระยะ 1 เดือนและ 5 เดือน เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 6)

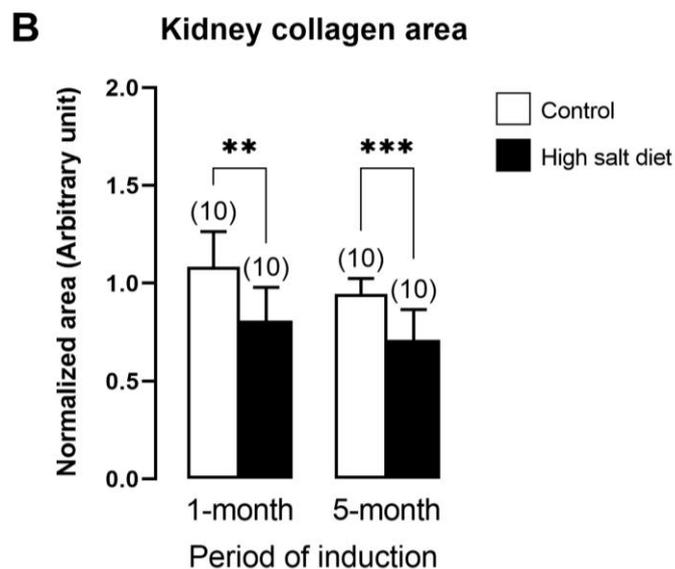
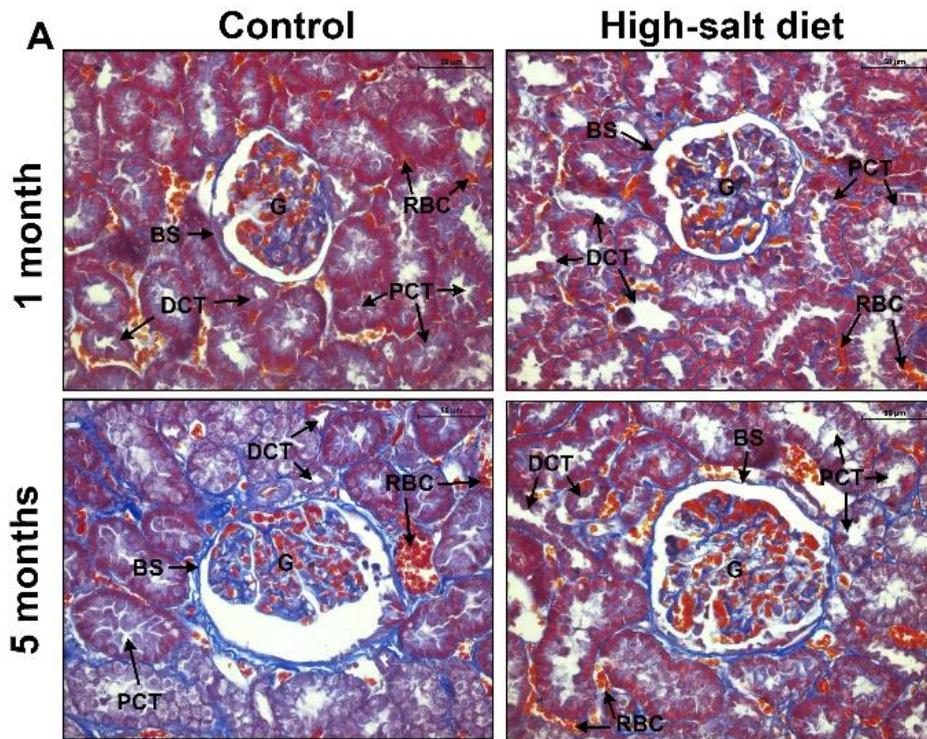




รูปที่ 5 (A) รูปตัวแทนเนื้อเยื่อไตย้อมด้วยสี H&E ที่ขนาดกำลังขยาย 40X แสดงให้เห็น Bowman's capsule และ glomerulus สเกลบาร์ยาว 50 μ m (G, glomerulus; BS, bowman's capsule space; PCT, proximal convolutes tubules; DCT, distal convoluted tubules; RBC, red blood cell) (B) กราฟแสดงขนาดพื้นที่ของ Total Bowman's capsule area, glomerular tuft และ Bowman's space area ที่ได้จากเนื้อเยื่อไตของหนูที่ถูกชักนำให้เป็นความดันโลหิตสูงนาน 1 เดือน และ 5 เดือนเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม ตัวเลขบนบาร์แทนจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองแต่ละกลุ่ม (n = 10) *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ns, non-statistical significant

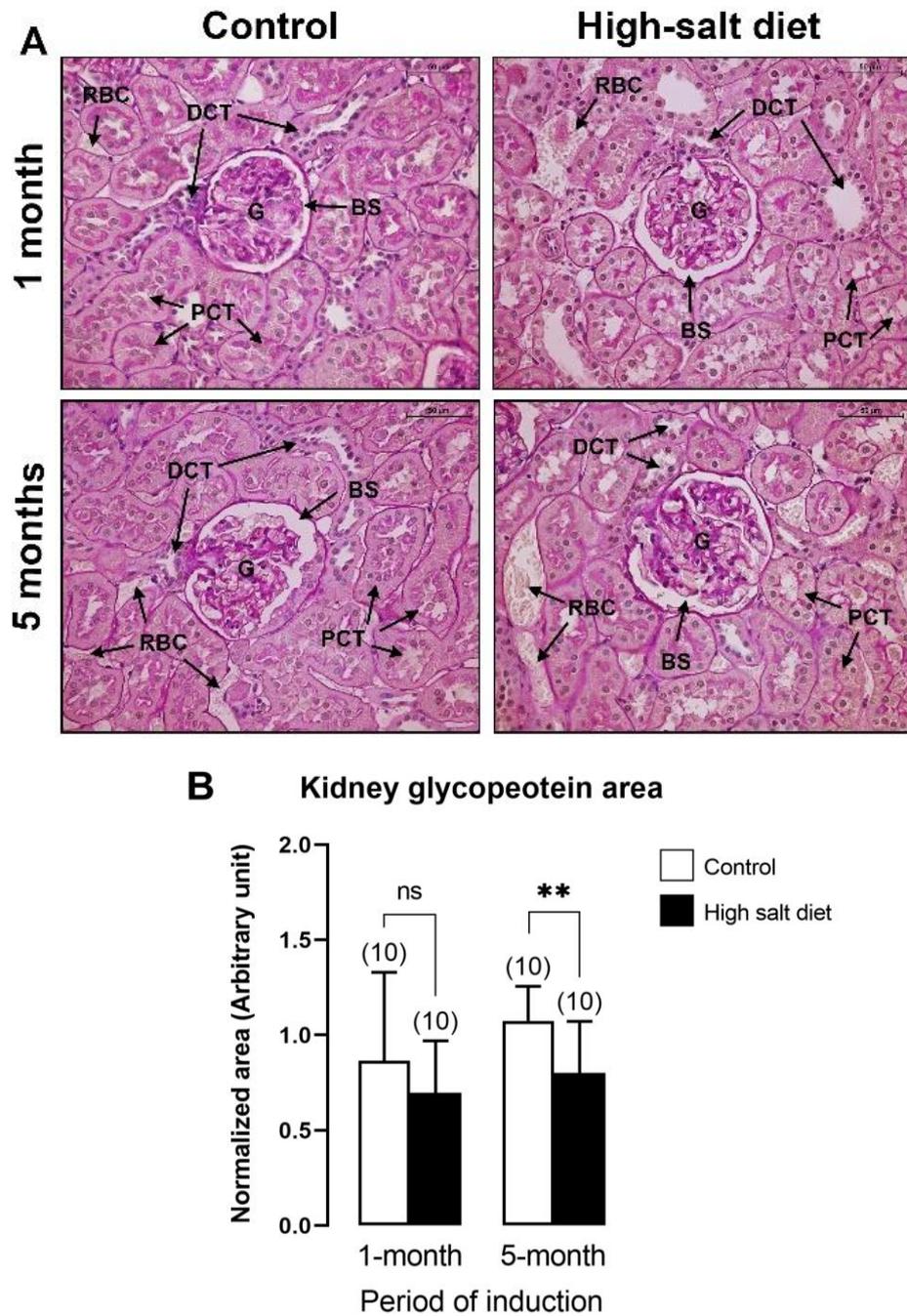
นอกจากนี้หนูที่ได้รับเกลือสูงมีปริมาณ glycoprotein ในโกลเมอรูลัสไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมในระยะเวลา 1 เดือน แต่พบว่าปริมาณ glycoprotein น้อยกว่ากลุ่มควบคุมในระยะเวลา 5 เดือน (รูปที่ 6 และ 7) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงขนาดพื้นที่ภายใน Bowman's capsule ในหนูที่ถูกชักนำให้เป็นความดันโลหิตสูงจากการกินเกลือ สอดคล้องกับรายงานของ Takaya และคณะ [2018]² และงานวิจัยของ Rebeca-Caldeira และคณะ [2015]³ ซึ่งพบว่าเมื่อเกิดพยาธิสภาพจากการเพิ่มแรงดันในการ filtration ของ capillary ในช่วงแรกจะเกิดการขยายพื้นที่ของ Bowman's capsule, glomerular capillary และ

Bowman's space ซึ่งต่อมาจะเกิดการซ่อมแซมเพื่อลดขนาด จึงอาจบ่งบอกได้ว่า สัตว์ทดลองในงานวิจัยนี้เพิ่งเกิดการบาดเจ็บของหน่วยไตในระยะแรกจึงไม่พบการเพิ่มขึ้นของ fibrosis หรือ collagen หรืออาจเกิดจากการใช้ตัวอย่างวิจัยคนละสายพันธุ์ซึ่งสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองอาจไม่ sensitive ต่อการเปลี่ยนแปลงของความดันซึ่งเกิดจากตอบสนองของ RAS system ดังรายงานการวิจัยของ Riccardo และคณะ [2005]⁴ และ Rebeca-Caldeira และคณะ [2015]³



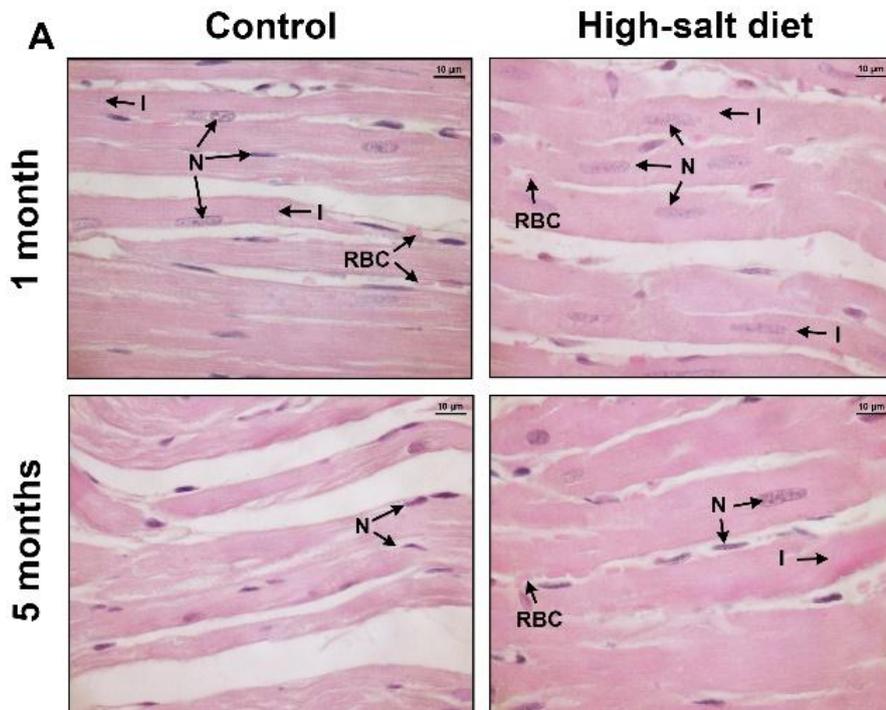
รูปที่ 6 (A) รูปตัวแทนเนื้อเยื่อไตย้อมด้วยสี Mallory's trichrome ที่ขนาดกำลังขยาย 40X แสดงให้เห็นถึงบริเวณที่ย้อมติด collagen สเกลบาร์ยาว 50 μm (G, glomerulus; BS, bowman's capsule space; PCT, proximal convoluted tubules; DCT, distal convoluted tubules; RBC, red blood cell) (B) กราฟแสดงขนาดพื้นที่ของ

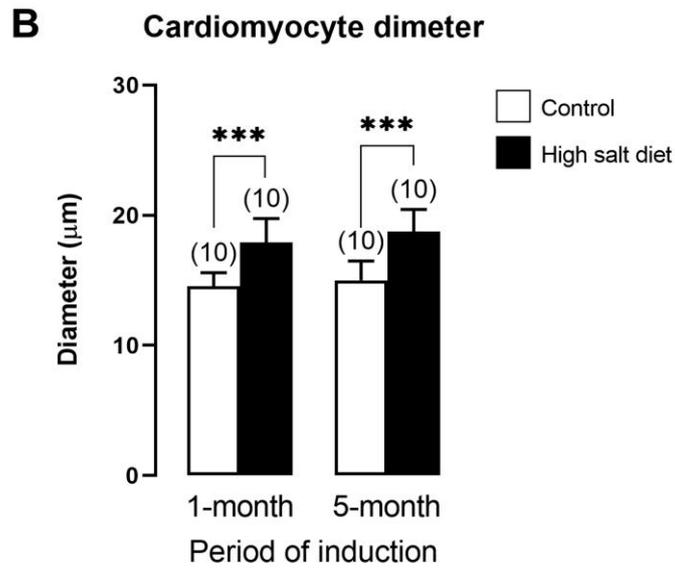
collagen ในเนื้อเยื่อไตของหนูที่ถูกชักนำให้เป็นความดันโลหิตสูงนาน 1 เดือน และ 5 เดือนเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม ตัวเลขบนบาร์แทนจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองแต่ละกลุ่ม (n=10) **P<0.01, ***P<0.001



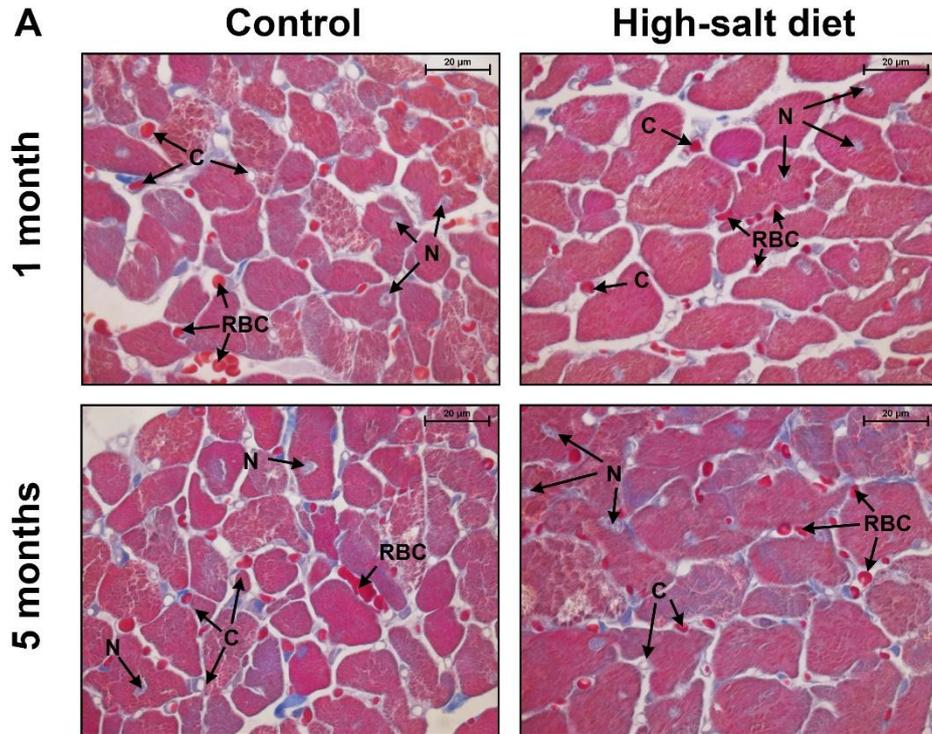
รูปที่ 7 (A) รูปตัวแทนเนื้อเยื่อไตย้อมด้วยสี Periodic acid-Schiff ที่ขนาดกำลังขยาย 40X แสดงให้เห็นบริเวณที่ย้อมติด glycoprotein สเกลบาร์ยาว 50 μ m (G, glomerulus; BS, bowman's capsule space; PCT, proximal convolutes tubules; DCT, distal convoluted tubules; RBC, red blood cell) (B) กราฟแสดงขนาดพื้นที่ของ glycoprotein ในเนื้อเยื่อไตของหนูที่ถูกชักนำให้เป็นความดันโลหิตสูงนาน 1 เดือน และ 5 เดือนเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม ตัวเลขบนบาร์แทนจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองแต่ละกลุ่ม (n=10) **P<0.01

ส่วนในเนื้อเยื่อหัวใจ ในภาวะความดันโลหิตสูงเพิ่มการทำงานให้กับหัวใจ ส่งผลให้เพิ่มการแบ่งตัวและการขยายตัวของเซลล์ cardiomyocyte ซึ่งจากผลการศึกษาพบว่าในหนูที่ได้รับเกลือสูงจะเพิ่มขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ cardiomyocyte เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมทั้งในระยะ 1 เดือนและ 5 เดือน ซึ่งเป็นการแสดงถึงแนวโน้มการขยายตัวของเซลล์ (hypertrophy) (รูปที่ 8) แต่พบว่าในหนูที่ได้รับเกลือสูงมีปริมาณของ collagen น้อยกว่ากลุ่มควบคุมในระยะ 1 เดือน แต่มีปริมาณ collagen ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมในระยะ 5 เดือน (รูปที่ 9) นอกจากนี้หนูที่ได้รับเกลือสูงมีปริมาณ glycoprotein ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมในระยะเวลา 1 เดือน แต่พบว่าปริมาณ glycoprotein น้อยกว่ากลุ่มควบคุมในระยะเวลา 5 เดือน (รูปที่ 10) ซึ่งผลการศึกษาการเพิ่มขึ้นของเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ cardiomyocyte ให้ผลคล้ายคลึงกับงานวิจัยของ Alex P และคณะ [2011]⁶ ซึ่งเกิดจากการเพิ่ม cardiac output และ volume load จึงเกิด compensation mechanism โดยการเพิ่ม cardiac workload และกระตุ้น cardiac remodeling จึงส่งผลให้เกิด cardiac hypertrophy แต่ผลการศึกษาในงานวิจัยครั้งนี้พบการลดลงของ collagen ในกล้ามเนื้อหัวใจซึ่งให้ผลตรงข้ามกับงานวิจัยของ Alex P และคณะ [2011]⁶ และ Yuka และคณะ [2015]⁷ ซึ่งการลดลงหรือไม่แตกต่างของปริมาณ collagen ในกล้ามเนื้อหัวใจเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม อาจเกิดจากการไม่การเพิ่มหรือเพิ่มกระตุ้นเพียงเล็กน้อยของการแสดงออกของ angiotensinogen และ angiotensin II AT1 receptor ในกล้ามเนื้อหัวใจ ซึ่งมีผลกระตุ้น pathway p38MAPK และ HSP27 ส่งผลให้กระตุ้น cardiac fibrosis

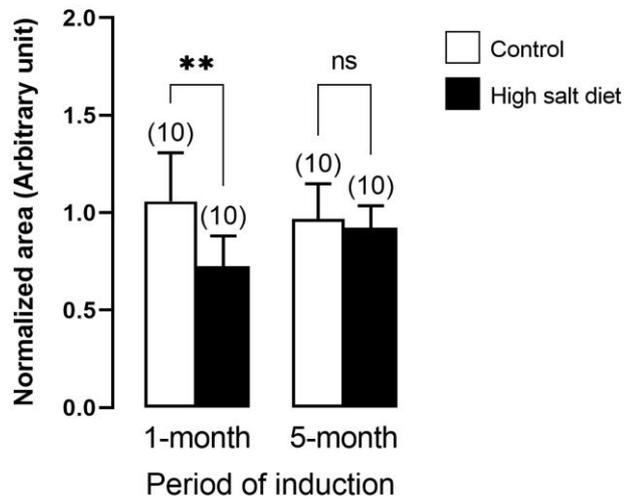




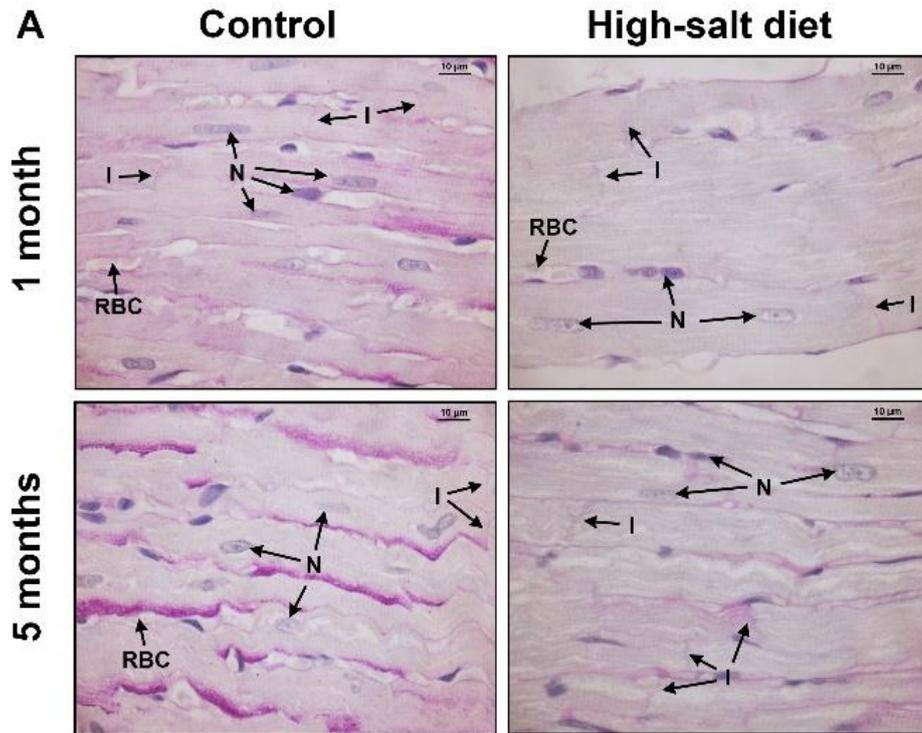
รูปที่ 8 (A) รูปตัวแทนเนื้อเยื่อหัวใจห้องล่างซ้ายย้อมด้วยสี hematoxylin & eosin ที่ขนาดกำลังขยาย 100X แสดงให้เห็นถึงเซลล์ cardiomyocyte สเกลบาร์ยาว 10 µm (N, nucleus; I, intercalated disc; RBC, red blood cell) (B) กราฟแสดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ cardiomyocyte ในเนื้อเยื่อหัวใจห้องล่างซ้ายของหนูที่ถูกชักนำให้เป็นความดันโลหิตสูงนาน 1 เดือน และ 5 เดือนเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม ตัวเลขบนบาร์แทนจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองแต่ละกลุ่ม (n=10) ***P<0.001



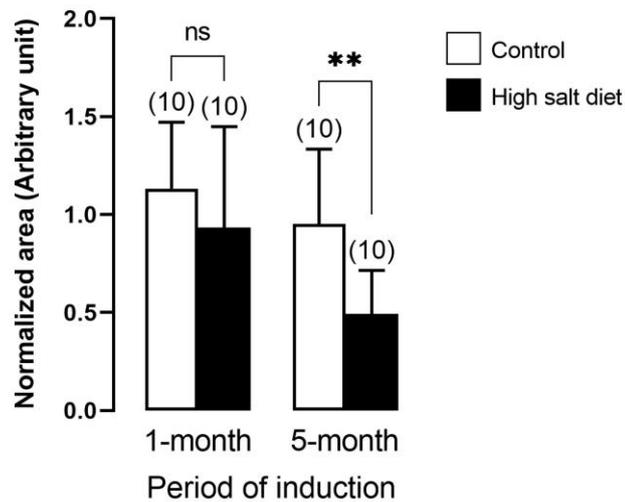
B Heart collagen area



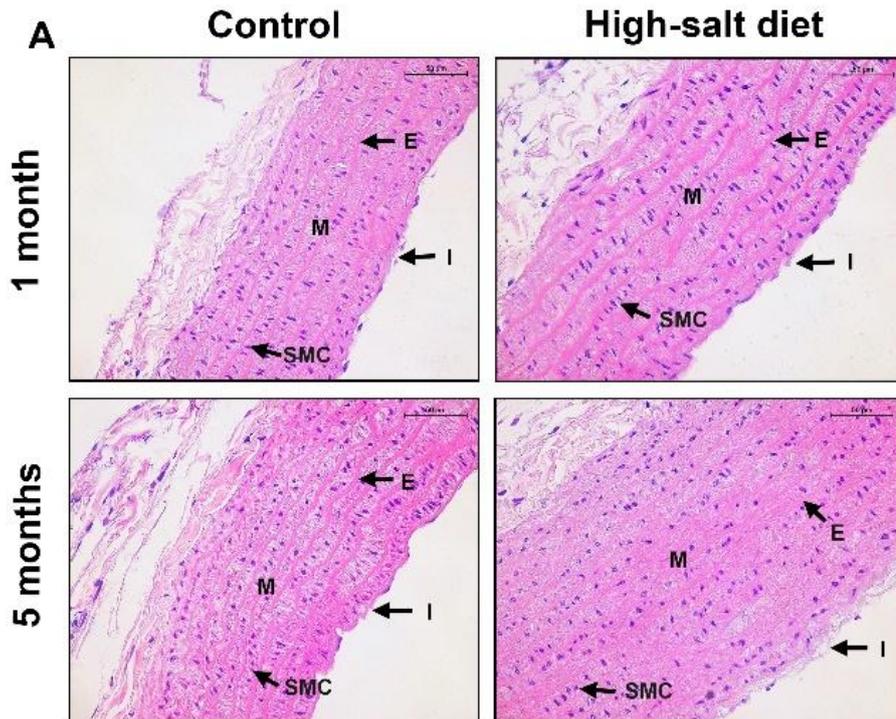
รูปที่ 9 (A) รูปตัวแทนเนื้อเยื่อหัวใจห้องล่างซ้ายย้อมด้วยสี Mallory's trichrome ที่ขนาดกำลังขยาย 100X แสดงให้เห็นถึงบริเวณที่ย้อมติด glycoprotein ในเซลล์ cardiomyocyte สเกลบาร์ยาว 20 μm (N, nucleus; I, intercalated disc; RBC, red blood cell) (B) กราฟแสดงขนาดพื้นที่ของ collagen ในเนื้อเยื่อหัวใจห้องล่างซ้ายของหนูที่ถูกชักนำให้เป็นความดันโลหิตสูงนาน 1 เดือน และ 5 เดือนเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม ตัวเลขบนบาร์แทนจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองแต่ละกลุ่ม (n=10) **P<0.01



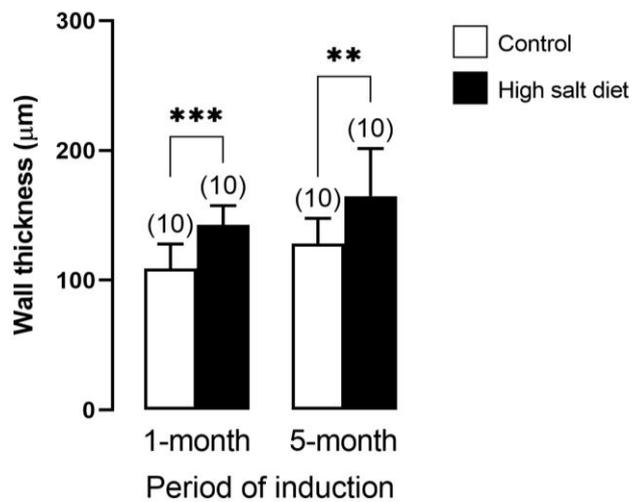
B Heart glycoprotein area



รูปที่ 10 (A) รูปตัวแทนเนื้อเยื่อหัวใจห้องล่างซ้ายย้อมด้วยสี Periodic acid-Schiff ที่ขนาดกำลังขยาย 100X แสดงให้เห็นถึงบริเวณที่ย้อมติด glycoprotein ในเซลล์ cardiomyocyte สเกลบาร์ยาว 10 μm (N, nucleus; I, intercalated disc; RBC, red blood cell) (B) กราฟแสดงขนาดพื้นที่ของ glycoprotein ในเนื้อเยื่อหัวใจห้องล่างซ้ายของหนูที่ถูกชักนำให้เป็นความดันโลหิตสูงนาน 1 เดือน และ 5 เดือนเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม ตัวเลขบนบาร์แทนจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองแต่ละกลุ่ม (n=10) **P<0.01



B Aorta wall thickness



รูปที่ 11 (A) รูปตัวแทนเนื้อเยื่อหลอดเลือด aorta ย้อมด้วยสี hematoxylin & eosin ที่ขนาดกำลังขยาย 40X แสดงให้เห็นถึงความหนาของผนังหลอดเลือด สเกลบาร์ยาว 50 µm (SMC, smooth muscle cells; I, tunica intima; M, tunica media; E, elastic fiber) (B) กราฟแสดงความหนาของผนังหลอดเลือดแดง aorta ในเนื้อเยื่อหลอดเลือด aorta ของหนูที่ถูกชักนำให้เป็นความดันโลหิตสูงนาน 1 เดือน และ 5 เดือนเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม ตัวเลขบนบาร์แทนจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองแต่ละกลุ่ม (n=10) *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

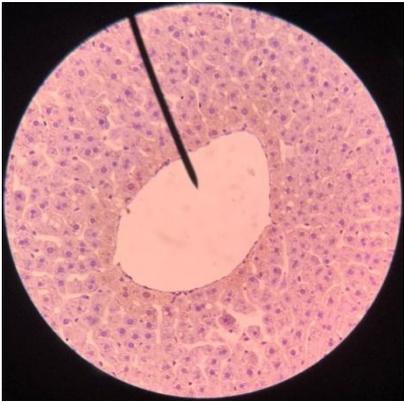
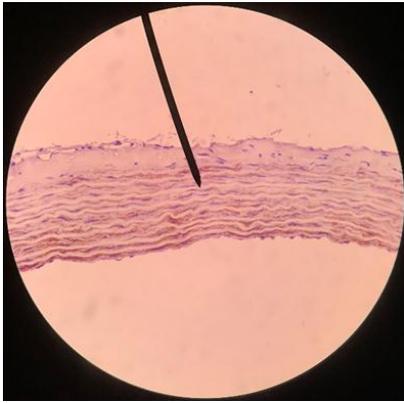
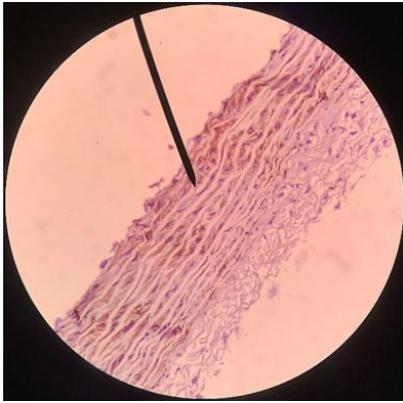
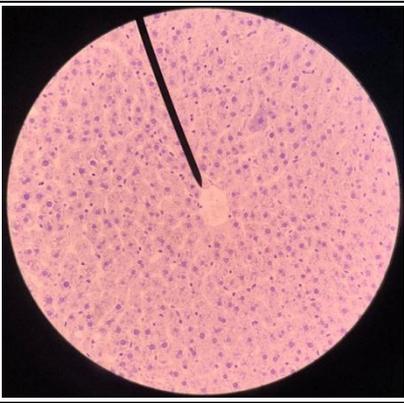
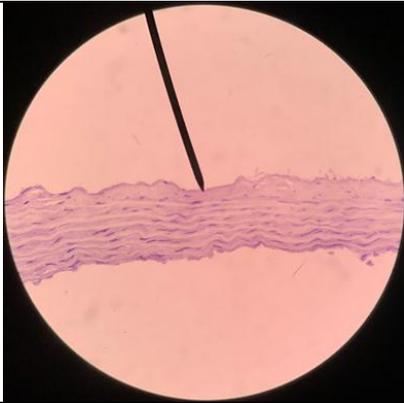
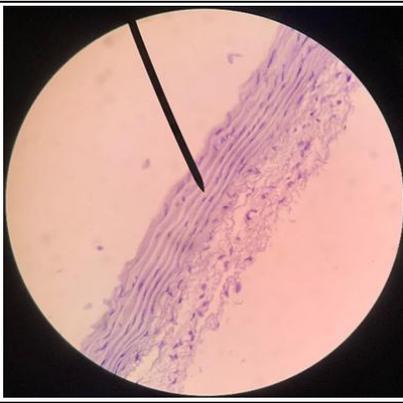
ในส่วนของเนื้อเยื่อหลอดเลือดแดง aorta ซึ่งในภาวะความดันโลหิตสูงจะมีการเพิ่มแรง shear ต่อผนังหลอดเลือด ส่งผลเกิดการบาดเจ็บของผนังหลอดเลือด ซึ่งจากผลการศึกษาพบว่าในหนูที่ได้รับเกลือสูงมีผนังหลอดเลือดแดง aorta หนากว่ากลุ่มควบคุมทั้งในระยะ 1 เดือนและ 5 เดือน (รูปที่ 11) ซึ่ง

ให้ผลคล้ายคลึงกับงานวิจัยของ Patricia-Martinez และคณะ [2018]⁸ ซึ่งความดันโลหิตสูงส่งผลกระตุ้นการแบ่งตัวและการขยายตัวของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด ทำให้ผนังหลอดเลือดหนาตัวขึ้นแบบ inward eutrophic และภาวะความดันโลหิตสูงยังส่งผลให้หลอดเลือดเกิดการอักเสบ ทำให้กระตุ้นการสร้างเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและการเกิดหลอดเลือดของเนื้อเยื่อบุโพรงผนังหลอดเลือด

4.2.2 การแสดงออกของโปรตีน hepcidin ในหลอดเลือดแดงของหนูที่ถูกชักนำให้เป็นความดันโลหิตสูงเทียบกับหนูปกติ

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาการแสดงออกของโปรตีน hepcidin ในหลอดเลือดแดงของหนูที่ถูกชักนำให้เป็นความดันโลหิตสูงเทียบกับหนูปกติ

การศึกษาในส่วนนี้ ผู้วิจัยได้นำ sections ของหลอดเลือดและเนื้อเยื่อไตของหนูทั้ง 2 กลุ่ม ไปผ่านการย้อมหาโปรตีน hepcidin ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี และนำเนื้อเยื่อไปวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน hepcidin ด้วย light microscope ผู้วิจัยได้ศึกษาการแสดงออกของ hepcidin ด้วยวิธี immunoperoxidase โดยใช้ condition Primary Antibody ความเข้มข้น 1:200 และ Secondary Antibody ความเข้มข้น 1:500 โดยผลการศึกษาแสดงในรูปที่ 12 คือผนังหลอดเลือด aorta ของหนูที่ถูกชักนำให้เกิดความดันโลหิตสูงนาน 1 เดือน มีการแสดงออกของ hepcidin ในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของผนังหลอดเลือด (บริเวณที่ติดสีน้ำตาล) เมื่อเทียบระดับความเข้มของการแสดงออกระหว่างกลุ่มความดันโลหิตสูงและกลุ่มควบคุม พบว่าการแสดงออกของ hepcidin ในกลุ่มความดันโลหิตสูงมีความเข้มมากกว่ากลุ่มควบคุม จึงเป็นไปได้ว่าภาวะความดันโลหิตสูงมีความสัมพันธ์โดยตรงกับการแสดงออกของ hepcidin ที่ผนังหลอดเลือด

Liver	Aorta (Control) 1 month	Aorta (High salt diet) 1 month
Positive Control	Primary + Secondary Antibody	Primary + Secondary Antibody
		
Negative control	Negative control	Negative control
		

รูปที่ 12 รูปตัวแทนการแสดงออกของโปรตีน hepcidin ในเนื้อเยื่อหลอดเลือด aorta ของหนูที่ถูกชักนำให้เป็นความดันโลหิตสูงนาน 1 เดือน และเนื้อเยื่อตับซึ่งเป็น Positive control tissue ที่กำลังขยาย 4X สีน้ำตาลแสดงถึงการแสดงออกของ hepcidin

เนื่องจากปัญหาการแพร่ระบาดของโรคโควิด-19 ทั่วโลก ผู้วิจัยจึงดำเนินงานวิจัยส่วนนี้ได้เพียง 1 กลุ่ม คือกลุ่มหนูที่ถูกชักนำให้เป็นความดันโลหิตสูง 1 เดือน เนื่องจากประสบปัญหาในการสั่งและจัดส่ง Commercial antibody ที่ไม่สามารถยืนยันกำหนดเวลาจัดส่งได้อย่างแน่ชัด ทำให้การศึกษาล่าช้าไปมาก อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยได้ดำเนินงานวิจัยส่วนนี้เท่าที่สถานการณ์จะเอื้ออำนวย หากได้ผลการศึกษาหรือได้ตีพิมพ์ผลการศึกษานี้แล้ว จะรายงานให้คณะและมหาวิทยาลัยรับทราบต่อไป ผลการศึกษาบางส่วนจากโครงการวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ ที่อยู่ในฐานข้อมูล SCOPUS จำนวน 3 บทความ รายละเอียดแสดงในบทที่ 5

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและผลผลิตของโครงการ

5.1 สรุปผลการวิจัย

อาหารที่มีเกลือสูง นอกจากจะชดนำให้เกิดภาวะความดันโลหิตสูงแล้ว ยังทำลายโครงสร้างเนื้อเยื่อระดับจุลภาคอีกด้วย เช่น ไต เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ และผนังหลอดเลือด ความดันโลหิตสูงทำให้ช่องว่างในไกลเมอรูลัสมากขึ้น เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจใหญ่ขึ้นและมีไกลโคโปรตีนสะสมมากขึ้น ผนังหลอดเลือดหนาตัว และมีการแสดงออกของ hepcidin สูงขึ้น ความรู้ที่ได้จากการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า hepcidin ซึ่งเป็นโปรตีนที่ควบคุมเมแทบอลิซึมของเหล็กในร่างกาย มีแนวโน้มสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของผนังหลอดเลือดในภาวะความดันโลหิตสูง ซึ่งกลไกโดยรายละเอียดยังคงต้องมีการศึกษาต่อไป

5.2 ผลผลิต (Output) ของโครงการ

ผู้วิจัยได้ตีพิมพ์บทความวิจัยและบทความวิชาการระดับนานาชาติ รวม 3 เรื่อง โดยมีรายละเอียดดังนี้

1. Tiyasatkulkovit W, Aksornthong S, Adulyaritthikul P, Upanan P, **Wongdee K**, Aeimlapa R, Teerapornpuntakit J, Rojviriya C, Panupinthu N, Charoenphandhu N. Excessive salt consumption causes systemic calcium mishandling and worsens microarchitecture and strength of long bones in rats. *Sci Rep* 2021;11(1850):1–15. Doi: 10.1038/s41598-021-81413-2
Journal: Scientific Reports
Impact Factor: 3.998
SJR quartile: Q1 (Top 10 ranking)
Category: Multidisciplinary
2. Chanpaisaeng K, Teerapornpuntakit J, **Wongdee K**, Charoenphandhu N. Emerging roles of calcium-sensing receptor in the local regulation of intestinal transport of ions and calcium. *Am J Physiol–Cell Physiol* 2021. In press.
Journal: American Journal of Physiology–Cell Physiology
Impact Factor: 3.485
SJR quartile: Q1
Category: Physiology
3. **Wongdee K**, Chanpaisaeng K, Teerapornpuntakit J, Charoenphandhu N. Intestinal calcium absorption. *Compre Physiol* 2021. In press.
Journal: Comprehensive Physiology
Impact Factor: 6.604
SJR quartile: Q1 (Top 10 ranking)

Category: Physiology

5.3 ปัญหา/อุปสรรค

เนื่องจากสถานการณ์การแพร่ระบาดของโควิด-19 ในช่วงเดือนมีนาคม-เมษายน 2563 และช่วงเดือนธันวาคม 2563-มกราคม 2564 และการปฏิบัติตามมาตรการของภาครัฐ จึงจำเป็นต้องระงับการเข้ามาปฏิบัติงานวิจัย ส่งผลให้การดำเนินการวิจัยล่าช้า รวมถึงการนำเข้าสารเคมีจากต่างประเทศก็เกิดความล่าช้าด้วยในช่วงเวลาดังกล่าวผู้วิจัยจึงปรับแผนงาน โดยเขียนบทความวิชาการ (review article) ส่งตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติอีกทางหนึ่ง

References

- 1) Ganz T, Nemeth E. Heparin and iron homeostasis. *Biochimica et biophysica acta*. 2012;1823(9):1434-43.
- 2) Gardenghi S, Grady RW, Rivella S. Anemia, ineffective erythropoiesis, and hepcidin: interacting factors in abnormal iron metabolism leading to iron overload in beta-thalassemia. *Hematology/oncology clinics of North America*. 2010;24(6):1089-107.
- 3) Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell*. 2010;142(1):24-38.
- 4) Mozaffarian D, Fahimi S, Singh GM, Micha R, Khatibzadeh S, Engell RE, et al. Global sodium consumption and death from cardiovascular causes. *N Engl J Med*. 2014;371(7):624-34.
- 5) Nemeth E, Ganz T. The role of hepcidin in iron metabolism. *Acta haematologica*. 2009;122(2-3):78-86.
- 6) Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, et al. Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*. 2004;306(5704):2090-3.
- 7) Organization WH. A global brief on hypertension Silent killer, global public health crisis 2013
[Available from:
https://www.who.int/cardiovascular_diseases/publications/global_brief_hypertension/en/.
- 8) Puddu P, Puddu GM, Zaca F, Muscari A. Endothelial dysfunction in hypertension. *Acta Cardiol*. 2000;55(4):221-32.
- 9) Raha-Chowdhury R, Raha AA, Forostyak S, Zhao JW, Stott SR, Bomford A. Expression and cellular localization of hepcidin mRNA and protein in normal rat brain. *BMC Neurosci*. 2015;16:24.
- 10) Schoen FJ. Blood vessels. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, editors. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. 7th ed: Elsevier Saunders. p. 511-54.
- 11) Valenti L, Maloberti A, Signorini S, Milano M, Cesana F, Cappellini F, et al. Iron Stores, Heparin, and Aortic Stiffness in Individuals with Hypertension. *PLoS One*. 2015;10(8):e0134635.
- 12) สำนักงานนโยบายและยุทธศาสตร์ สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข. สถิติสาธารณสุข พ.ศ.2558. กรุงเทพฯ: สามเจริญพาณิชย์ 2559.
- 13) Sasaki T, Tsuboi N, Haruhara K, Okabayashi Y, Kanzaki G, Koike K, et al. Bowman capsule volume and related factors in adults with normal renal function. *Kidney Int Rep*. 2018;3(2):314-20.
- 14) Berger RC, Vassallo PF, Crajoinas Rde O, Oliveira ML, Martins FL, Nogueira BV, et al. Renal effects and underlying molecular mechanisms of long-term salt content diets in spontaneously hypertensive rats. *PLoS One*. 2015;10(10):e0141288.
- 15) Candido R, Carraro M, Fior F, Artero ML, Zennaro C, Burrell LM, et al. Glomerular permeability defect in hypertension is dependent on renin angiotensin system activation. *Am J Hypertens*. 2005;18(6):844-50.
- 16) Yu HC, Burrell LM, Black MJ, Wu LL, Dilley RJ, Cooper ME, et al. Salt induces myocardial and renal fibrosis in normotensive and hypertensive rats. *Circulation*. 1998;98(23):2621-8.

- 17) Carll AP, Willis MS, Lust RM, Costa DL, Farraj AK. Merits of non-invasive rat models of left ventricular heart failure. *Cardiovasc Toxicol.* 2011;11(2):91-112.
- 18) Hayakawa Y, Aoyama T, Yokoyama C, Okamoto C, Komaki H, Minatoguchi S, et al. High salt intake damages the heart through activation of cardiac (pro) renin receptors even at an early stage of hypertension. *PLoS One.* 2015;10(3):e0120453.
- 19) Martinez-Quinones P, McCarthy CG, Watts SW, Klee NS, Komic A, Calmasini FB, et al. Hypertension Induced morphological and physiological changes in cells of the arterial wall. *Am J Hypertens.* 2018;31(10):1067-78.

ภาคผนวก

ผลงานตีพิมพ์วารสารระดับนานาชาติ เรื่องที่ 1



OPEN

Excessive salt consumption causes systemic calcium mishandling and worsens microarchitecture and strength of long bones in rats

Wacharaporn Tiyasatkulkovit^{1,2}, Sirion Aksornthong^{1,3}, Punyanuch Adulyarittikul^{1,3}, Pornpailin Upanan⁴, Kannikar Wongdee^{1,4}, Ratchaneevan Aeimlapa^{1,3}, Jarinthorn Teerapornpuntakit^{1,5}, Catleya Rojviriyaya⁶, Nattapon Panupinthu^{1,3}✉ & Narattaphol Charoenphandhu^{1,3,7,8}

Excessive salt intake has been associated with the development of non-communicable diseases, including hypertension with several cardiovascular consequences. Although the detrimental effects of high salt on the skeleton have been reported, longitudinal assessment of calcium balance together with changes in bone microarchitecture and strength under salt loading has not been fully demonstrated. To address these unanswered issues, male Sprague–Dawley rats were fed normal salt diet (NSD; 0.8% NaCl) or high salt diet (HSD; 8% NaCl) for 5 months. Elevation of blood pressure, cardiac hypertrophy and glomerular deterioration were observed in HSD, thus validating the model. The balance studies were performed to monitor calcium input and output upon HSD challenge. The HSD-induced increase in calcium losses in urine and feces together with reduced fractional calcium absorption led to a decrease in calcium retention. With these calcium imbalances, we therefore examined microstructural changes of long bones of the hind limbs. Using the synchrotron radiation x-ray tomographic microscopy, we showed that trabecular structure of tibia and femur of HSD displayed a marked increase in porosity. Consistently, the volumetric micro-computed tomography also demonstrated a significant decrease in trabecular bone mineral density with expansion of endosteal perimeter in the tibia. Interestingly, bone histomorphometric analyses indicated that salt loading caused an increase in osteoclast number together with decreases in osteoblast number and osteoid volume. This uncoupling process of bone remodeling in HSD might underlie an accelerated bone loss and bone structural changes. In conclusion, long-term excessive salt consumption leads to impairment of skeletal mass and integrity possibly through negative calcium balance.

Ingestion of table salt (NaCl) in an appropriate amount is essential for the maintenance of osmolarity and volume of the extracellular fluid. However, sodium excess or deficiency can severely affect various organ functions. Current recommendation by the American Heart Association states that individuals should not consume more than 2 g of sodium per day¹. In modern societies, however, average sodium consumption has surpassed this guideline reaching 3.4 g per day². Continued salt loading gradually compromises the function of the cardiovascular and renal systems by increasing plasma osmolarity and fluid retention, thus leading to long-standing hypertension with life-threatening consequences³. A number of studies reported that the mechanisms underlying systemic hypertension due to high salt intake involve disarrays of neuronal and hormonal regulation. These include activation of sympathetic nervous system and renin-angiotensin system^{4,5}, production of atrial natriuretic peptide^{6,7},

¹Center of Calcium and Bone Research (COCAB), Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand. ²Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand. ³Department of Physiology, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Road, Bangkok 10400, Thailand. ⁴Faculty of Allied Health Sciences, Burapha University, Chonburi 20131, Thailand. ⁵Department of Physiology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand. ⁶Synchrotron Light Research Institute (Public Organization), Nakhon Ratchasima 30000, Thailand. ⁷Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University, Nakhon Pathom 73170, Thailand. ⁸The Academy of Science, The Royal Society of Thailand, Dusit, Bangkok 10300, Thailand. ✉email: nattapon.pan@mahidol.ac.th

and induction of oxidative stress^{8,9}. Systemic hypertension due to high salt now emerges as a key causal factor for other metabolic diseases^{10–12}.

Adverse effects of high salt diet (HSD) consumption also extend to calcium homeostasis and the regulation of bone mass at both local and systemic levels. HSD consumption significantly reduced calcium retention in adolescent girls from different ethnic backgrounds¹³. In this regard, perturbation of renal epithelial functions by excess sodium interfered with the ability to handle calcium¹⁴. Salt loading resulted in urinary calcium loss and increased bone turnover in postmenopausal women who already had low bone mass from estrogen deficiency¹⁵. Moreover, consumption of HSD upended the positive calcium balance by high calcium intake, leading to net calcium loss in postmenopausal women¹⁶. Concerning the gut, it has been reported that exposure to excess salt increased the number of apoptotic cells¹⁷, caused inflammation¹⁸, and leakiness¹⁹ of the epithelial layer. Although HSD has long been postulated to cause osteoporosis, longitudinal monitoring of the calcium balance during HSD consumption has not been fully demonstrated. Moreover, it is not known whether HSD directly affects the intestinal calcium absorption, particularly the expression of genes related to calcium transport.

Despite earlier suggestion that low bone mass was a consequence of salt-loading-induced increase in urinary calcium excretion, it remains unclear how excess salt consumption leads to aberrant bone cell functions. Addition of high concentration of NaCl directly into the culture media stimulated differentiation of osteoclasts from their precursors, i.e., mouse bone marrow macrophage and human peripheral blood mononuclear cells²⁰. Interestingly, enhanced production of osteoclastogenic factors induced by HSD led to increased resorptive area and decreased bone mineral density (BMD) in long bones and vertebrae of growing male mice²¹. Mechanistically, it has been shown that an imbalance of immune interaction, i.e., T helper 17 cells and regulatory T cells, was responsible for this increase in bone resorption. However, the complete picture of bone remodeling process and microstructural changes under high salt treatment remained unexplored. In addition, data on how dietary salt affects bone strength is also lacking.

In this study, we employed a systematic approach to tackle the long-term consequence of HSD consumption on calcium handling, bone microarchitecture and strength in growing male rats. A series of calcium balance studies performed over 5 months of HSD consumption revealed mishandling of calcium in both the intestine and kidney. The present study also investigated the expression of genes related to calcium transport in the intestine and kidney. We showed that calcium loss in urine and feces compromised bone strength as determined by three-point bending tests and microarchitecture as analyzed by conventional micro-computed tomography (μ CT). High-resolution synchrotron radiation x-ray tomographic microscopy (SRXTM) was also employed for better visualization of void volume and porosity in bone microstructure.

Materials and methods

Animals. Male Sprague–Dawley rats at 8 weeks of age were obtained from Nomura Siam International Co. Ltd. (Bangkok, Thailand). Upon arrival at the Central Animal Facility, Faculty of Science Mahidol University (MUSC-CAF, an AAALAC-accredited facility), animals were acclimatized for 7 days and maintained in stainless steel cages at 21 ± 1 °C temperature, 12/12 h light–dark cycle, and 50–60% relative humidity. The animals were fed standard chow (Perfect Companion Group Co., Ltd., Bangkok, Thailand) and reverse osmosis (RO) water ad libitum during acclimatized period. The experimental protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC), Faculty of Science, Mahidol University. All studies related to animals were performed in accordance with relevant guidelines and regulations, including the ARRIVE guideline (<http://www.ARRIVEguidelines.org>).

Experimental design. After acclimatization, body weight, systolic and diastolic blood pressure (SBP and DBP, respectively) were monitored. Non-invasive tail cuff method was used to measure SBP and DBP based on CODA tail-cuff blood pressure system (Kent Scientific Corporation, CT, USA). All rats were then randomly allocated into two groups that received normal salt diet (0.8% NaCl, NSD) or high salt diet (8% NaCl, HSD). Nutritional values of NSD (Perfect Companion Group Co., Ltd., Bangkok, Thailand) and HSD (Envigo, IN, USA) were indicated (Supplementary Table S1). There were no significant differences in the baseline values of body weight, SBP, DBP and mean arterial pressure (MAP) between two the groups (Supplementary Table S2). Normal salt and high salt containing rat chow and RO water were provided ad libitum for up to 5 months. SBP, DBP and MAP as well as body weight were recorded weekly in HSD and the corresponding age-match NSD rats throughout the experiments. Calcium balance study was performed at 1, 3 and 5 months after the random allocation. Upon euthanasia at the age of 1, 3 and 5 months in HSD and the corresponding age-match NSD rats, blood was collected by cardiac puncture to determine level of ionized calcium. Heart and kidney were collected to determine the pathological changes by histological staining. In addition, kidney and duodenum were collected to determine mRNA expression of gene related to calcium transport. Furthermore, tibiae and femurs were also collected for bone studies. The timeline of our experiments is depicted in Fig. 1.

Histological staining and analyses. Heart and kidney were removed after euthanasia. Fresh tissue was dissected, cleaned with ice-cold saline and fixed at 4 °C with 4% paraformaldehyde for 12 h. Fixed tissues were dehydrated by graded ethanol immersion and cleared by xylene. Tissues were then embedded in paraffin and thereafter, sliced into 3- μ m-thick sections. Sections from kidney and heart were stained with hematoxylin and eosin (H&E) for structural inspection. Histological analyses were examined under Olympus BX51 light microscope (Tokyo, Japan) and NIS-Elements BR Analysis 4.00 (Nikon Instruments Inc., NY, USA). Measurement of cardiac myocyte diameter was performed as previously described²². The diameters were obtained by measuring across the center of each cardiac myocyte at 100 \times magnification. The myocyte must be longitudinally cut with the presence of nuclei. For Bowman's capsule measurement was modified from the method of Lindahl and co-

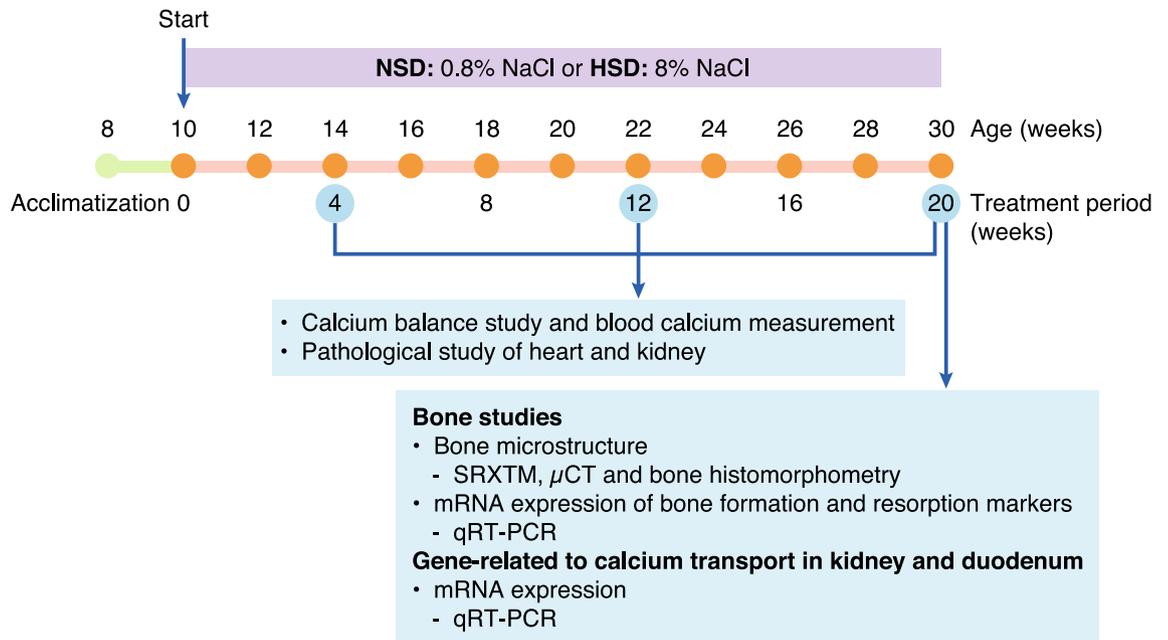


Figure 1. Timelines of the present experiments.

workers²³. Fifty Bowman's capsules pictures (20× magnification) per animal were used for analysis. Total Bowman's capsule area and glomerular tuft area were derived from tracing the outline of parietal layer and visceral epithelial layers, respectively. The difference value between total Bowman's capsule area and glomerular tuft area was defined as Bowman's space area.

Calcium balance study. All animals were subjected for longitudinal assessment of calcium balance at 1, 3 and 5 months by random allocation using metabolic cages (Techniplast, Venice, Italy) to closely monitor the consumption of food and water as well as excretion of urine and feces over 3 days. Food, water, urine and feces were collected at the end of day 3, and the contents of calcium were assessed by atomic absorption spectrometer (PerkinElmer, MA, USA) as described previously²⁴.

Assessment of plasma ionized calcium. Blood samples were collected by cardiac puncture immediately after euthanasia with sterile heparinized syringe (BD Diagnostics, Plymouth, UK). Determination of ionized calcium levels was performed by using ion-selective electrodes (Nova Biomedical, Waltham, MA) under anaerobic conditions at Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand.

RNA isolation. Total RNA was isolated from duodenum, kidneys and long bones of NSD and HSD rats. Rats were anesthetized and median laparotomy was performed. The duodenal segment was cut longitudinally and rinsed with cold normal saline to remove luminal contents. The mucosal cells were collected by scraping with ice-cold glass slide. For kidneys, surrounded connective tissue and renal capsule were removed and tissues were chopped into small pieces. For long bones, tissues were flushed with cold phosphate-buffered saline to remove cells in bone marrow and chopped into small pieces. Duodenal and kidney tissues were homogenized with sterile glass-Teflon Potter–Elvehjem homogenizer. Bone tissues were homogenized with Precellys Evolution Super Homogenizer using ceramic beads according to the manufacturer's protocol (Bertin Instruments, Montigny-le-Bretonneux, France). RNA was extracted by TRIZol reagent according to the manufacturer's protocol. The amount and purity of RNA samples were determined by NanoDrop-2000c spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

Quantitative real-time RT-PCR. Synthesis of cDNA was performed by reverse transcription of one- μ g total RNA with iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad, CA, USA). 18S rRNA (for duodenal and kidney samples) and β -actin (for long bones) were selected as housekeeping genes to evaluate consistency of the reverse transcription (i.e., variation coefficient must be less than 5%; $n = 10$ for each group). Quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR) and melting curve analyses were performed by QuantStudio 3 RT-PCR System (Applied Biosystems, CA, USA) using SsoFastEvaGreen Supermix (Bio-Rad, CA, USA). The reactions were performed for 40 cycles at 95 °C for 60 s, 51–60 °C (see annealing temperature for each primer in Supplementary Tables S3 and S4) for 30 s, and 72 °C for 30 s. All primers have been validated for specificity and efficiency by conventional RT-PCR previously^{25,26}. Relative expression was calculated from the threshold cycles (C_t) based on previously described ΔC_t method²⁷.

Measurement of bone microarchitecture and BMD. Bone length, three-dimensional microarchitecture and volumetric density of cortical and trabecular bone were determined by micro-computed tomography (μ CT; SkyScan Model 1178, Aartselaar, Belgium) with subsequent analyses as previously described²⁸. In brief, right tibia of individual rats was exposed to rotational x-ray source of 180° scanning with 0.54° angular increment using the voltage of 65 kV, the current of 615 μ A and filtered by 0.5-mm aluminum. The images were reconstructed and analyzed by SkyScan CT-analyzer Version 1.11.10 (Aartselaar, Belgium).

Bone histomorphometry. Left tibiae from NSD and HSD rats were used to determine osteoblast- and osteoclast-related parameters. After removal of adhering tissues, samples were dehydrated in serial concentrations of ethanol solutions (i.e., 70% for 3 days, 95% for 3 days and 100% for 2 days) and then embedded in methyl methacrylate resin at 42 °C for another 2 days. These resin-embedded tibiae were cut longitudinally by a tungsten carbide blade-equipped microtome (Leica, Nussloch, Germany) to obtain 7- μ m-thick sections, which were stained with Goldner's trichrome method²⁹ and visualized using Olympus BX51TRF light microscope (Tokyo, Japan). Analyses of tissue sections were performed using the OsteoMeasure histomorphometric system (Osteometric Inc., GA, USA). The region of interest (ROI) in this study was consistently assigned to cover the entire trabecular area of the proximal tibial metaphysis at 1–2 mm distal to the growth plate.

Synchrotron radiation x-ray tomographic microscopy (SRXTM) of long bone. For each bone specimen, the bone was placed in a sample holder filled with cottons soaked in PBS to prevent the tissue dehydration and the displacement of the specimen during measurement. All SRXTM experiments were performed at the x-ray tomographic microscopy beamline (BL1.2W: XTM) of the Siam Photon Source (SPS), Synchrotron Light Research Institute (SLRI), Nakhon Ratchasima, Thailand. The image acquisition and parameters setup used in this experiment were based on the previous method of Tiyasatkulkovit and co-workers³⁰. All tomography datasets were collected with filtered polychromatic x-ray beam at the mean energy of 10.5 keV. The x-ray projections were acquired from the detection system comprising YAG-Ce scintillator coupled microscope (OptiquePeter, France) and PCO.edge 5.5 camera (PCO Imaging, Germany). This setup yielded an effective pixel size of $3.61 \times 3.61 \mu\text{m}^2$. The image processing and tomographic reconstruction was carried out by using Octopus Reconstruction software (Kohoutovice, Czech Republic).

As for the porosity measurement, the pore canals in the bone specimens were segmented and analyzed from the reconstructed slices by using Octopus Analysis software (Kohoutovice, Czech Republic). Herein, a fraction of the void volume over the analyzed volume (referred to as the volume of interest; VOI) were averaged from four regions in each specimen and expressed in terms of the percentage of porosity (% porosity—i.e., percent void volume). The 3D visualization and presentation of the volumetric data were rendered by using Drishti volume software (Canberra, Australia).

Statistical analyses. The results were expressed as means \pm standard error of mean (SEM). For the longitudinal study of blood pressure, which had two contributed factors (HSD and time of induction), were analyzed using two-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni post-tests. For other data, the two sets of data were compared by unpaired Student's *t*-test. The statistical significance was considered when $P < 0.05$. All data were analyzed by GraphPad Prism 7 (GraphPad, San Diego, CA, USA).

Results

Salt loading caused elevated blood pressure, cardiac hypertrophy and glomerular changes. To validate our HSD model, we monitored SBP, DBP and MAP in fully conscious rats using non-invasive tail-cuff method over 5 months. At the beginning, there was no significant difference in blood pressure between the two groups. SBP in HSD group increased by the end of the first month and remained elevated throughout the experiments (Fig. 2A). Consuming HSD also increased DBP, but the effect was delayed until the end of the second month (Fig. 2B). Likewise, MAP in HSD group was gradually increased and reached statistical significance by the end of the second month (Fig. 2C). These data indicated that HSD caused elevation of SBP, DBP and MAP in rats. We next examined the consequences of high blood pressure. In general, rats received HSD remained alert and displayed normal behaviors. These rats, however, exhibited a significant decrease in body weight despite an increase in food intake (Supplementary Fig. S1A,B, respectively). Reduction in body weight rapidly developed $\sim 5\%$ (as compared to the age-matched NSD) during the first month of HSD consumption and reached $\sim 10\%$ at the fifth month. In addition, water consumption was significantly increased in HSD group (Supplementary Fig. S1C). Taken together, we found that salt loading led to hypertension with body weight loss despite increased food and water consumption.

The consequences of elevated blood pressure were examined. Since salt loading normally leads to an expansion of intravascular volume, we asked whether an increased afterload led to structural changes in the heart. It was found that HSD increased the diameters of cardiac muscle fibers within 1 month and 5 months (Fig. 2D,E). These data indicated development of cardiac hypertrophy caused by an elevated blood pressure, thus validating our model of HSD-induced hypertension. Since persistent elevation of blood pressure can damage microvascular and renal structures, we thus examined the histological changes in the kidneys after 1 month and 5 months of HSD. Here, we noticed alteration in total Bowman's capsule area and Bowman's space in HSD group. Quantitative analysis of the Bowman's capsule area indeed revealed a significant increase in Bowman's space after 5-month HSD consumption (Fig. 2F,G) consistently with a significant increase in Bowman's capsule area (Fig. 2F,H). These data confirmed that HSD consumption led to structural changes of the renal glomeruli, which could be an early sign of renal dysfunction in hypertension.

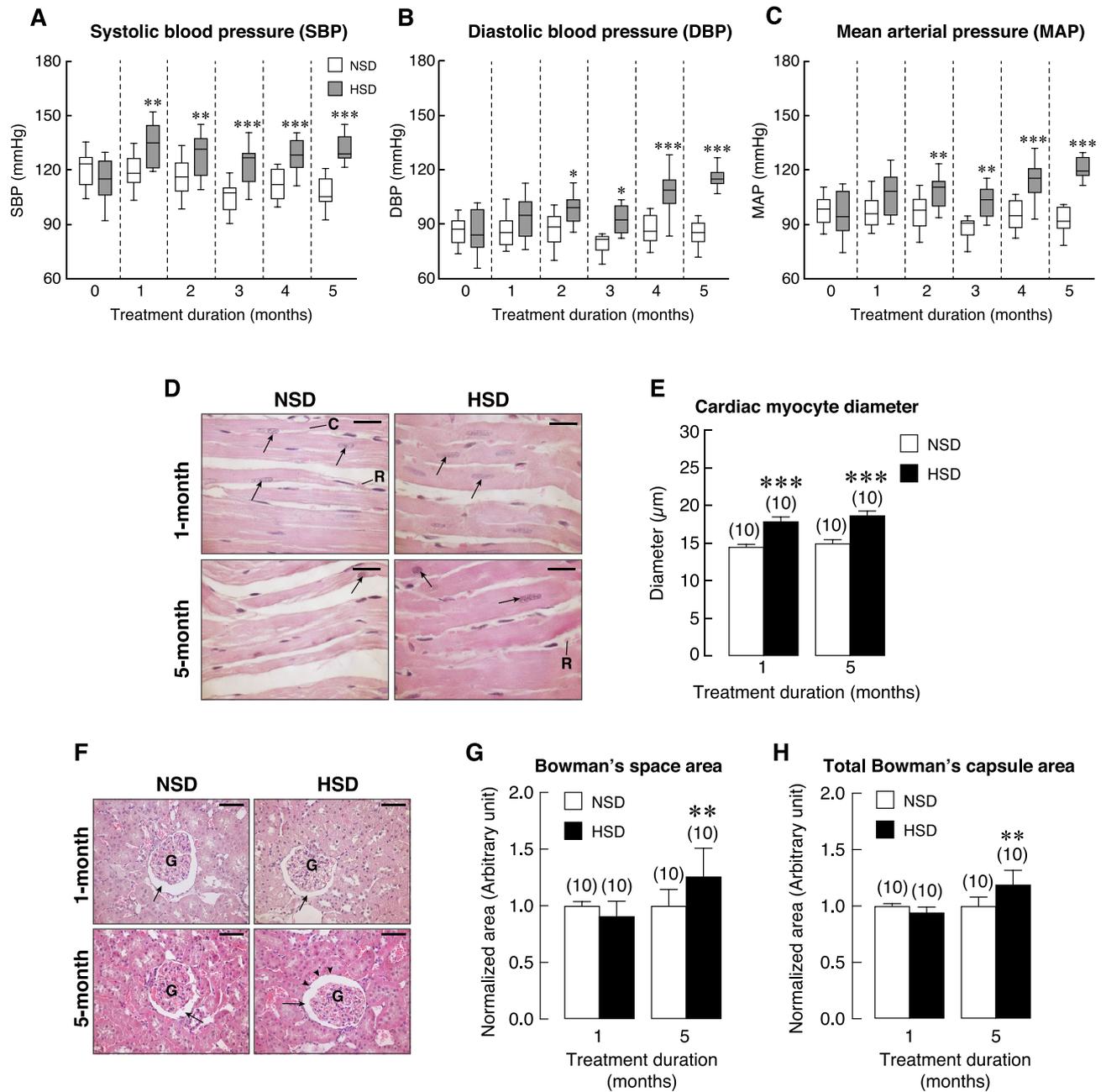


Figure 2. Blood pressure profile of NSD and HSD over 5-months of treatments. (A) Systolic blood pressure (SBP), (B) diastolic blood pressure (DBP) and (C) mean arterial pressure (MAP). (D) Representative H&E photomicrographs of cardiac myocytes obtained from rats fed with HSD or NSD for 1 month and 5 months. Arrow, nucleus of cardiac myocyte; C, vascular capillary; R, red blood cell. Scale bars, 20 μM. (E) Cardiac myocyte diameter of rats receiving HSD or NSD for 1 and 5 months. (F) Representative H&E photomicrographs of renal tissue obtained from rats fed with HSD or NSD for 1 month and 5 months. Bowman's capsule (arrow) and glomerulus (G) were presented. Alteration of Bowman's capsule areas was evident in HSD groups (arrowheads). Scale bars, 50 μm. (G,H) Quantitative analysis of the Bowman's space and total Bowman's capsule areas revealed an increase after the fifth month HSD consumption. Numbers of animals in each group are shown in parentheses. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ compared to period-matched NSD.

HSD consumption led to calcium mishandling in the kidneys and intestine. We adopted a systematic approach to explore the effect of HSD on calcium handling. Specifically, animals were subjected to calcium balance study after 1-, 3- and 5-month of HSD consumption. Data were compared with those from rats receiving NSD at corresponding times. Focusing on the kidneys, HSD consumption led to progressive loss of calcium in the urine over 5 months (Fig. 3A). Rapid increase in calcium loss was apparent initially between time points of 1 to 3 months of HSD intake. In addition, HSD induced significant fecal calcium loss at 5 months (Fig. 3B). Next, fractional calcium absorption and calcium retention were calculated based on the results from

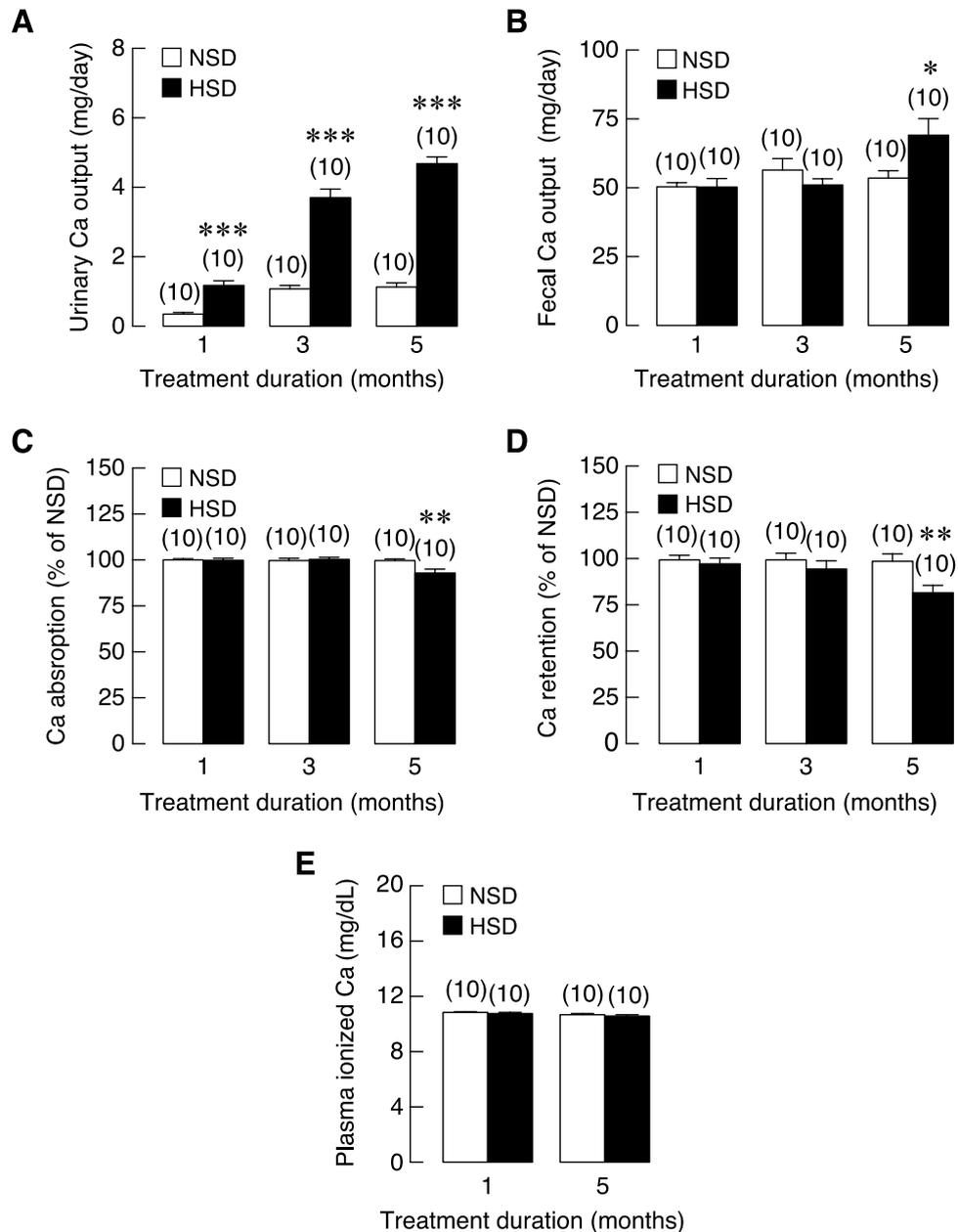


Figure 3. Longitudinal study of calcium balance in NSD and HSD. (A) Calcium output from urine, (B) calcium output from feces, (C) percentages of calcium absorption, (D) percentages of calcium retention, and (E) plasma ionized calcium. Numbers of animals in each group are shown in parentheses. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ compared to NSD.

urine and fecal outputs. We found that fractional calcium absorption was significantly decreased by 6% in HSD groups after 5 months of dietary manipulation (Fig. 3C). Reduction in calcium intake together with urinary and fecal calcium loss thus led to significant decrease in calcium retention (Fig. 3D). Nevertheless, the plasma ionized calcium remained unchanged in both groups at 1 and 5 months after dietary manipulation (Fig. 3E). In addition, it was possible that HSD-induced calcium mishandling in the kidney and intestine might have resulted from alteration at the transcriptional levels. Nevertheless, the mRNA expression levels of five candidate genes that were directly involved in the transcellular calcium transport of both kidney and intestine— i.e., TRPV5, TRPV6, S100g, PMCA_{1b} and NCX1—did not alter in HSD vs. control groups (Supplementary Figs. S2A–E for kidney and S3A–E for intestine).

SRXTM and μ CT analyses revealed microarchitectural defects in the long bones of rats receiving HSD. Since chronic HSD consumption induced calcium loss in urine and feces, which, in turn, led to negative calcium retention, this negative impact on calcium homeostasis was expected to trigger a response by

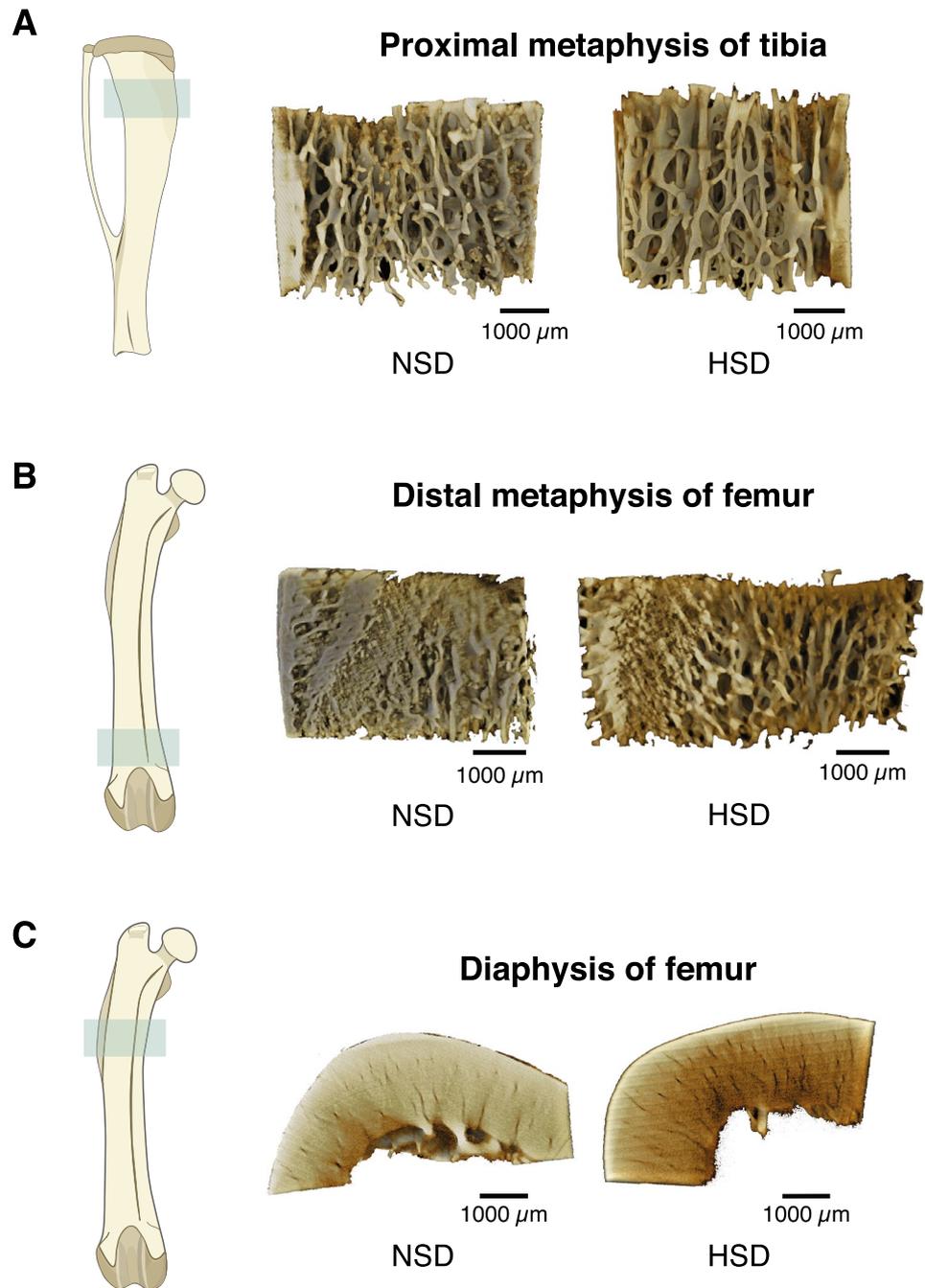


Figure 4. The representative images of bone specimens and their microstructures obtained from SRXTM, scale bar: 1000 μm . (A) Longitudinal section trabecular bone at proximal metaphysis of tibiae, (B) trabecular bone at distal metaphysis of femurs and (C) cross-sectional cortical bone at diaphysis of femurs in NSD and HSD.

promoting calcium release from bone to maintain normal level of calcium in the blood. This highly efficient minute-to-minute regulation is possible due to the sensitive calcium-sensing receptors in the parathyroid glands. As expected, we did not detect any change in the levels of plasma ionized calcium in both groups at 1 and 5 months after dietary manipulation. We thus further hypothesized that long-term continuous release of calcium from bone could affect bone microstructure. Femurs and tibiae from rats receiving HSD or NSD for 5 months were isolated and subjected to structural and quantitative analyses using SRXTM. We examined changes in the microarchitecture of trabecular bone at metaphyses and cortical bone at midshafts. Longitudinal and cross-sectional analyses of these areas were depicted in Fig. 4A–C. Superior to those obtained from conventional μCT , the SRXTM has enabled the 3D visualization of the pore networks inside the cortical bone, which contributed the porosity. As shown in Fig. 5A,B, the porosity in cortical bone, as a measurable outcome, regarding the relative volume of cortical canals was significantly increased in HSD as compared with NSD. In addition, an increase in bone porosity was also observed in the trabecular bone of tibia and femur of HSD compared with NSD (Fig. 5C).

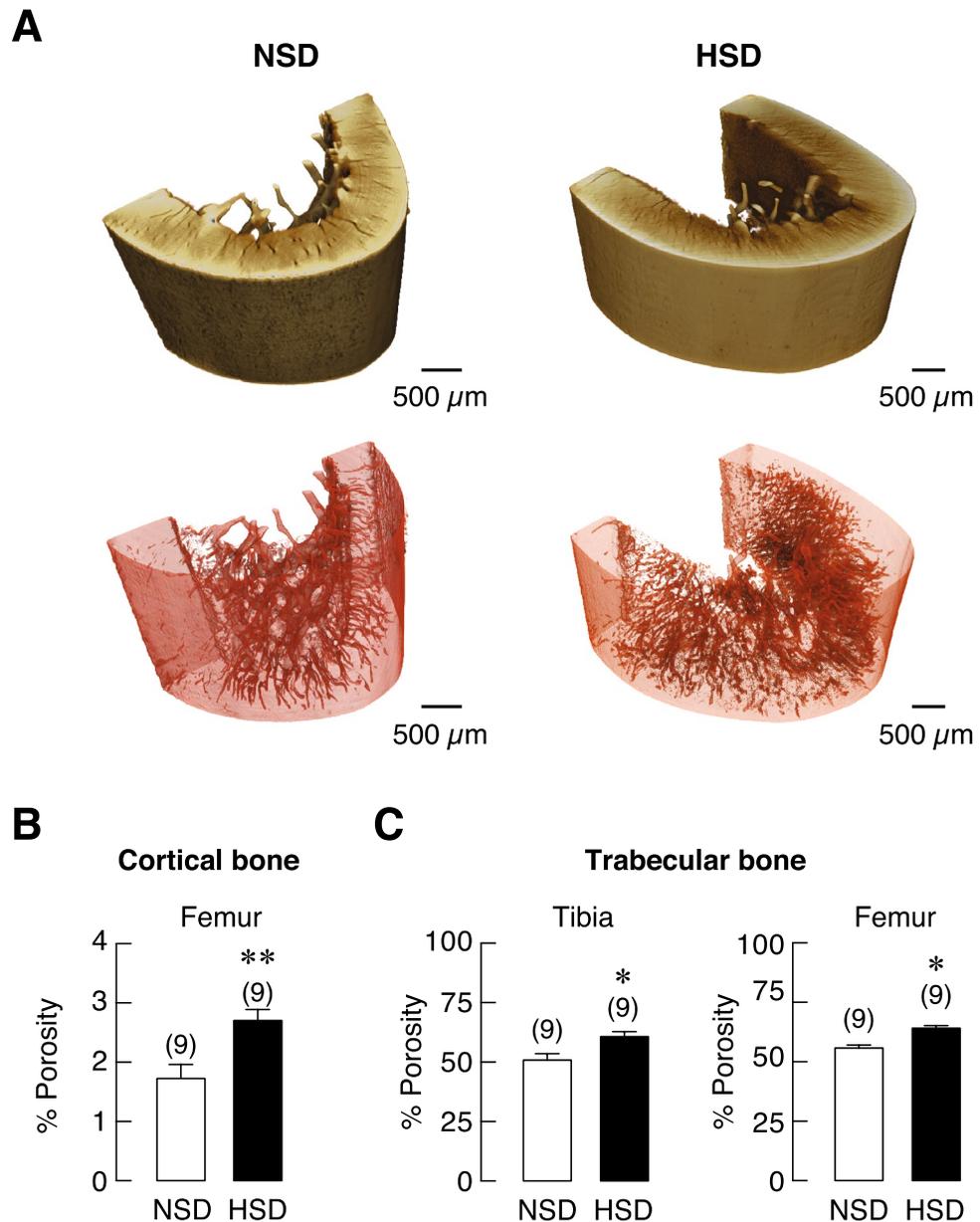


Figure 5. The segmentation and analysis for pore measurement in the 3D volumes of cortical bone specimens obtained from SRXTM. **(A)** 3D volume representatives of the cortical bone at diaphysis of femur from NSD and HSD group are shown in brown color gradient. The segmentation of pore canals inside the bones is rendered in red color enclosed with a transparent background for porosity measurement. All scale bars are depicted 500 μm . **(B)** quantitative analyses of the porosity of cortical bone at diaphysis of femurs and **(C)** trabecular bone at proximal metaphysis of tibiae and trabecular bone at distal metaphysis of femurs. The number of animals in each group are indicated in parentheses. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared to NSD.

Next, we used conventional μCT analysis to determine geometry and BMD of long bones. HSD consumption led to a significant increase in cross-sectional area of proximal tibial metaphysis (Fig. 6A) without affecting bone length (Fig. 6G). This geometric change in HSD group prompted us to perform analyses across the surface of bone circumference of tibial metaphysis. Medullary area of tibiae metaphysis of HSD rats was markedly expanded (Fig. 6B) with a significant increase in endosteal perimeter that lined the bone marrow (Fig. 6C). We applied similar analyses to the distal metaphyses of femurs but found no significant change between HSD and NSD groups. It was also found that the circumferential areas of trabecular known as the cortical thickness was unaffected by HSD consumption (Fig. 6D). Interestingly, volumetric BMD (vBMD) of the proximal tibial metaphysis was significantly reduced in HSD groups (Fig. 6E), while there was no change in vBMD of femoral trabecular bone. Likewise, vBMD of cortical bone at both sites was unchanged (Fig. 6F). Taken together, the aforementioned data indicated that prolonged salt loading had unfavorable impacts on the long bones by increasing porosity at trabecular and cortical parts, inducing medullary expansion and decreasing trabecular BMD.

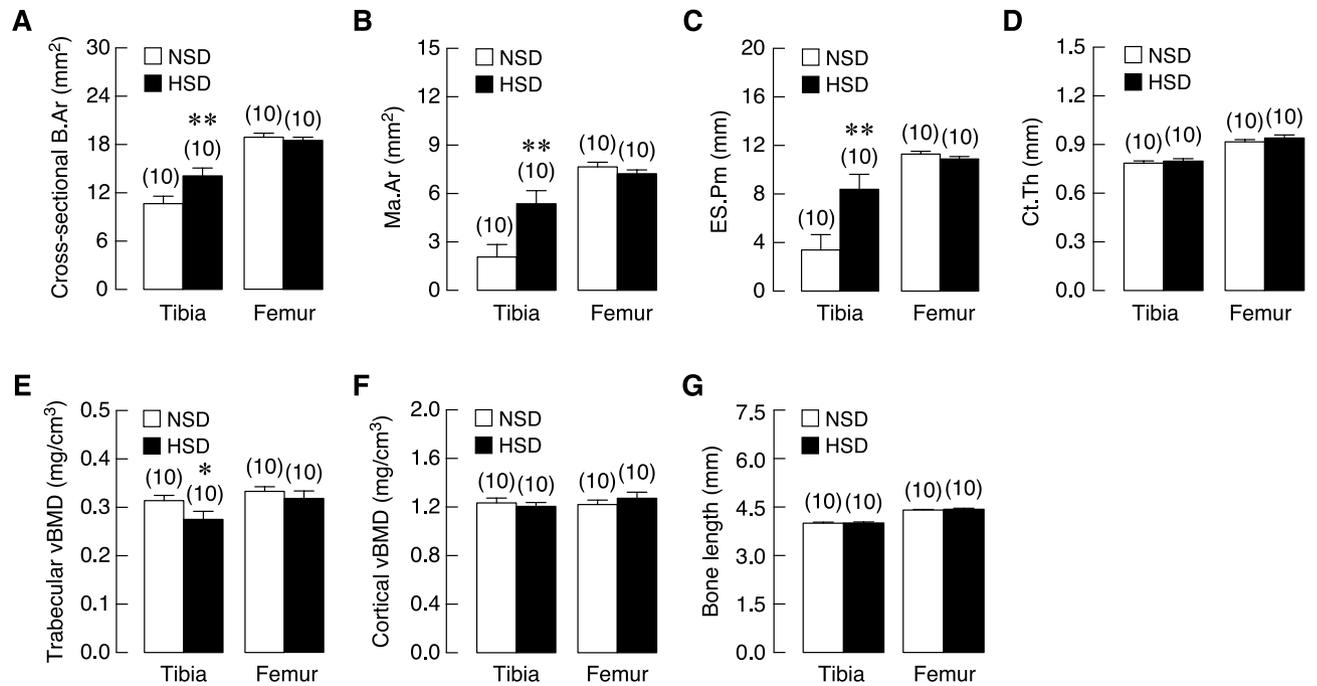


Figure 6. Microstructural parameters of tibiae and femurs of NSD and HSD. (A) Cross-sectional bone area; B.Ar, (B) medullary area; Ma.Ar, (C) endosteal perimeter; ES.Pm, (D) cortical thickness; Ct.Th, (E) trabecular volumetric BMD; vBMD, (F) cortical vBMD, and (G) bone length. Numbers of animals in each group are shown in parentheses. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared to NSD.

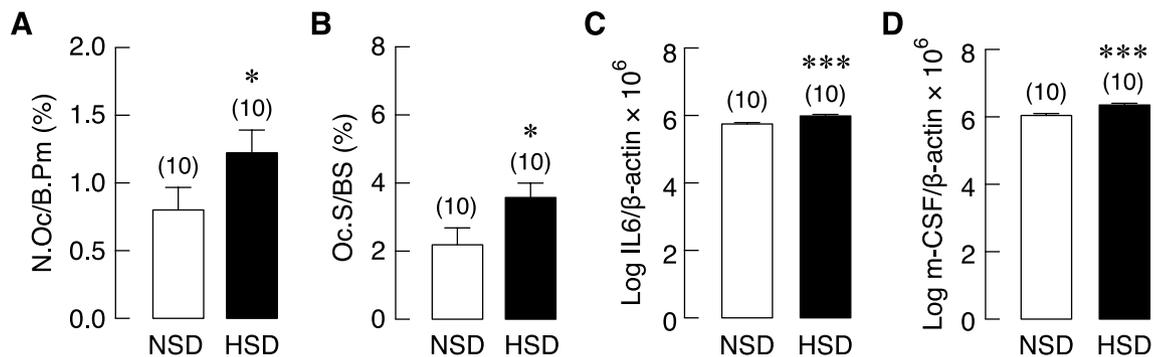


Figure 7. Bone histomorphometric analysis of bone resorption markers of tibiae and the mRNA expression levels of osteoblast-derived osteoclastogenic factors in long bone (humerus and radius) of NSD and HSD. (A) Percentages of osteoclast number per bone perimeter (N.Oc/B.Pm) and (B) osteoclast surface per bone surface (Oc.S/BS), and expression of (C) IL-6 and (D) m-CSF. The mRNA expression of each gene was normalized by β -actin expression. Numbers in parentheses are numbers of animals in each group. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ compared to NSD.

HSD consumption disrupted the balance of bone remodeling. A decrease in trabecular vBMD had suggested that bone remodeling process was imbalance in rats with HSD treatment. We then employed bone histomorphometry to demonstrate the changes associated with bone resorption and bone formation. Regarding bone resorption, osteoclast numbers and surface were significantly increased in rats that received HSD for 5 months (Fig. 7A,B, respectively), suggesting that salt loading promoted osteoclastogenesis. Freshly isolated tibiae from HSD and NSD rats were collected for qRT-PCR to access mRNA expression of cytokine genes related to osteoclastogenesis, i.e., interleukin-6 (IL-6) and macrophage colony-stimulating factor (m-CSF). These osteoclastogenic cytokines were significantly increased in HSD group (Fig. 7C,D, respectively). Regarding bone formation, bone histomorphometry was used to visualize and quantify osteoblast number and activity from the same sets of samples. HSD consumption markedly decreased osteoblast numbers and surface (Fig. 8A,B, respectively). Moreover, we found that salt loading markedly reduced osteoid surface and volume (Fig. 8C,D, respectively). Despite the apparent changes in osteoblast number and activity, the expression levels of markers associated with osteoblast differentiation, i.e., Runx2 and osterix, as well as those associated with osteoblast activity, i.e., alkaline phosphatase and osteocalcin in HSD group were not different from NSD controls

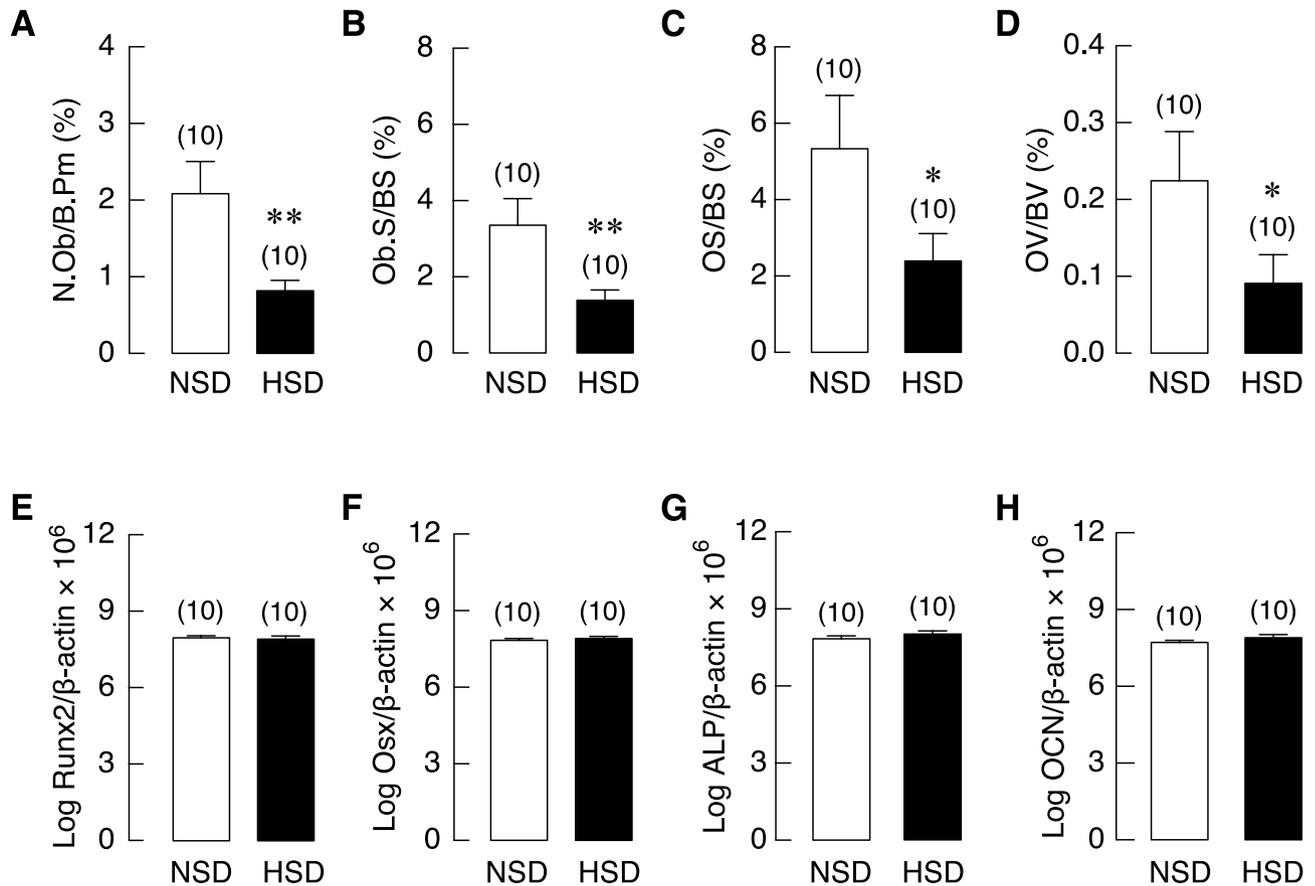


Figure 8. Bone histomorphometric analysis of tibiae and the mRNA expression levels of bone formation markers in long bone (humerus and radius) of NSD and HSD. (A) Percentages of osteoblast number per bone perimeter (N.Ob/B.Pm), (B) osteoblast surface per bone surface (Ob.S/BS), (C) osteoid surface per bone surface (OS/BS) and (D) osteoid volume per bone volume (OV/BV). The mRNA expression of (E) Runx2, (F) Osterix (Osx), (G) alkaline phosphatase (ALP) and (H) osteocalcin (OCN) were determined by quantitative real-time PCR and was normalized by β -actin expression. Data were analyzed by unpaired t-test. Mostly from cells of the osteoblast lineage in HSD group were similar to those in NSD controls. Numbers in parentheses are numbers of animals in each group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared to period-matched NSD.

(Fig. 8E–H, respectively). These data thus indicated that HSD uncoupled bone remodeling cycle by enhancing bone resorption and suppressing bone formation.

Salt loading caused transient mechanical defects in long bones. We then turned to examine changes in the skeleton over the 5-month period. We began the process with a series of three-point bending tests to evaluate whether HSD induced cumulative mechanical defects within bone tissues. We found that HSD compromised the mechanical properties mostly after 1 month of HSD consumption. Specifically, HSD intake decreased yield load, which was the force required for the transition of elastic to plastic deformation (Fig. 9A). While there was no change in yield displacement—i.e., the bending distance prior to plastic state (Fig. 9B), HSD reduced the ultimate displacement, which was the bending distance prior to fracture (Fig. 9C), suggesting that long bones from HSD rats, once deformed, had greater tendency to break. Moreover, the capacity of energy absorption was reduced in long bones from HSD-fed rats (Fig. 9D). Consistently, flexure strain observed at the initial point of fracture was significantly reduced in HSD group (Fig. 9E). There was no change in the flexure stress observed at the initial point of fracture between two groups (Fig. 9F). Taken together, HSD led to compromised bone mechanics within the first month. However, all these mechanical changes due to salt loading disappeared in the following 3- to 5-month period (except the yield displacement at 3-month time point), suggesting that mechanical defects in bone due to salt loading were transient and correctable despite persisting calcium mishandling in chronic HSD consumption condition.

Discussion

Herein, we demonstrated integrated findings on the effects of HSD on calcium and bone metabolism. The present dietary intervention compromised fractional calcium absorption in the gut and continuous losses of calcium in the urine, which could lead to negative consequences on the skeleton. Impaired bone strength was found after HSD consumption, whereby long bones became less resistant to external forces. Advance image analyses using

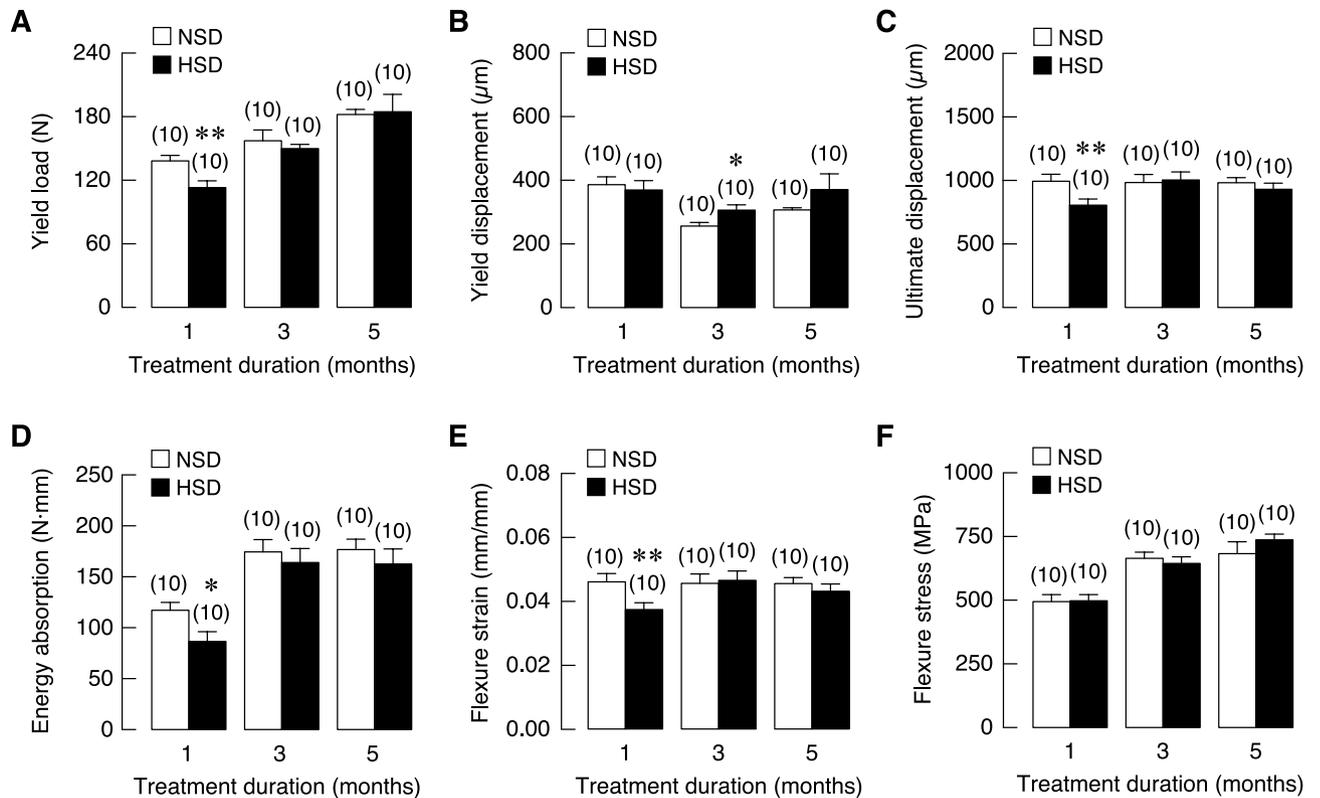


Figure 9. Mechanical property analysis of femurs of NSD and HSD. (A) Yield load, (B) yield displacement, (C) ultimate displacement, (D) energy absorption, (E) flexure strain and (F) flexure stress. Numbers in parentheses are numbers of animals in each group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared to period-matched NSD.

SRXTM combined with conventional μ CT revealed microarchitectural changes in the skeleton from HSD-fed rats. Indeed, HSD consumption further compromised bone microarchitecture and reduced vBMD. Consistently, bone histomorphometric data showed that osteoclast numbers were increased together with decreases in osteoblast numbers and osteoid volume, thus indicating an uncoupling of bone remodeling process.

Prior to studying bone microarchitectural changes, we began by validating our model of HSD-induced hypertension in rats. Early rise in salt loading-induced SBP indicated a greater sensitivity of SBP changes³¹. Complete aberration of blood pressure regulation at the fourth and the fifth month confirmed the condition of salt-induced essential hypertension. It was evident that HSD-fed rats exhibited a significant weight loss despite marked increase in food intake. Likewise, this aberrant energy metabolism was reported in another HSD-induced hypertensive model—the Dahl salt-sensitive rats³². It has been proposed that corticosteroid-induced muscle wasting occurred in the high catabolic state due to salt loading³³. However, in humans, excessive salt consumption was usually associated with obesity, which did not fully recapitulate this condition in HSD rat models. Indeed, salt when given with sugar mixture led to systemic hypertension and obesity in male mice compared to those that received only sugar mixture¹⁰.

The disturbances in cardiovascular functions then led to subsequent changes in the kidneys. Normally, an optimal ratio of glomerular and Bowman's capsule volumes implicates effective filtration³⁴. However, we found an enlargement of Bowman's capsule area developed as a response to HSD, which was likely to be a result of a massive filtration volume, a consequence of a long-standing intake of HSD. In general, the HSD-induced hypertension often causes kidney damages in animals and men. For example, in spontaneously hypertensive rats, chronic HSD consumption led to severe damage of renal corpuscle, i.e., glomerular hypertrophy and loss of podocyte integrity³⁵. Moreover, depletion of podocytes in the glomeruli was implicated in specimens from patients with hypertension³⁶. Herein, we propose that Bowman's area enlargement may be included as another critical indicator of progressive glomerular changes due to chronic HSD consumption.

Calcium concentrations in the blood and extracellular fluids are tightly controlled through the regulated translocation of calcium ions via intestinal absorption, renal reabsorption and the formation and breakdown of bone. Calcium absorption in the intestine and calcium reabsorption in the kidney involve similar processes, i.e., passive paracellular and active transcellular pathways. The transcellular pathway is a multi-carrier-mediated process, in which TRPV5 and TRPV6 allow calcium entry across the apical membrane while calbindin- D_{28k} (kidney) or calbindin- D_{9k} (intestine) translocating calcium across the cell, and finally PMCA_{1b} and NCX1 extruding calcium across the basolateral membrane. In addition, tight junction proteins, e.g., claudins, contribute to formation of ion-selective pores that mediate paracellular calcium movement³⁷. The present result, however, showed no significant alteration in the mRNA levels of the calcium transport-related genes (for either paracellular passive or transcellular active transport) in the intestine and kidney. This was consistent with the previous report that showed an increased abundance of calcium transport protein calbindin- D_{28k} in HSD rats without

change in the mRNA level¹⁴. Interestingly, HSD could alter NCX1 expression in other tissues. For example, the increased NCX1 expression on mitochondrial membrane played a pivotal role in mitochondrial calcium overload and cardiac hypertrophy induced by HSD consumption³⁸. Therefore, the cellular and molecular mechanisms of how HSD consumption induced calcium mishandling in the intestine and kidney require further investigation.

Emerging evidence indicated that HSD disrupted the balance of gut microbiota that underlay the pathogenesis of hypertension³⁹. Thus, it is conceivable that this HSD-induced dysbiosis compromised calcium absorption by, for example, impairing gut barrier⁴⁰ or decreasing beneficial bacteria that normally promote calcium absorption^{41,42}. Furthermore, it was proposed that disruption of gut barrier due to HSD led to early kidney injury and hypertension¹⁹ that could interfere with calcium reabsorption. On the other hand, consumption of the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH), which contained low salt content together with high proportions of fruits, vegetables and dairy products, helped reduce the risk of urinary calcium oxalate stone formation⁴³. These findings suggested that appropriate amount of salt consumption must be achieved to maintain calcium balance by intestine and kidney. Whether consumption of beneficial probiotics would counter calcium loss in HSD consumption requires more investigation. Careful examination of the host-microbe interaction in the intestine and kidneys may be helpful to uncover the mechanism of HSD-induced calcium mishandling.

Bone is a highly organized structure of calcified connective tissue and undergoes constant remodeling in a dynamic multi-step process with precise timing and coordination. Interference with any steps would likely compromise bone mass and integrity. High salt intake worsened bone microstructure along with enhancing bone loss, as seen in increased trabecular and cortical porosity and decreased trabecular vBMD in this study. Interestingly, the use of high-resolution 3D SRXTM allowed us to explore cortical bone porosity, which characterized as an important predictor of bone of fracture in human⁴⁴. Other negative effects on bone, such as an imbalance of immune interaction (T helper 17 and regulatory T cells), have also been reported¹⁹. Moreover, the imbalance of calcium metabolism as well as an elevation of blood pressure might have direct influence on bone phenotype⁴⁵. The present results that demonstrated uncoupling of bone remodeling in HSD rats, i.e., decreased formation with increased resorption, was consistent with the previous reports of HSD stimulating osteoclastogenesis and bone resorption^{20,21}.

It is also possible that the accumulation of salt in bone tissue could have attracted macrophages similar to the previous findings in skin layers^{46,47}. It was explained that salt deposition could alter skin microenvironment and disturb resident cells⁴⁸. In addition, high salt concentration found in the cerebrospinal fluid led to the release of excitatory neurotransmitters, reactive oxygen species and inflammatory cytokines, which could, in turn, affect nearby cells⁴⁹. Here, we provided evidence that HSD induced expression of osteoclastogenic factors along with increased osteoclast numbers and expansion of endosteal surface. Since deposition of sodium at the cutaneous layers was an active process that depended on the abundance of glycosaminoglycan⁵⁰, it was plausible that excess dietary sodium could directly deposit in glycosaminoglycan-rich bone matrix and the increase in readiness of sodium in the microenvironment enhanced the migration and differentiation of osteoclast precursors. Surprisingly, although salt accumulation has been shown in bone marrow of mice fed low salt diet⁵¹, osteoclastogenesis was suppressed under this low salt condition. Thus, it is likely that salt-directed osteoclastogenesis and bone resorption are dependent on the readiness of sodium in bone matrix rather than the salt concentration in bone marrow.

Less is known about the effects of HSD on osteoblast functions. We demonstrated herein that rats fed HSD over 5 months had fewer osteoblasts and less matrix production. It has been shown that excess salt consumption rewired the sympathetic response causing over-activation along with an increase in blood pressure^{52,53}. Since it was well established that an increase in the sympathetic activity inhibited bone formation⁵⁴, elevation of sympathetic nerve activity after HSD could be the culprit of bone defects. On the other hand, attenuation of these signals, for example, the use of β_2 -adrenergic antagonist⁵⁵ or endocannabinoid⁵⁶, promoted osteoblast functions and prevented bone loss. Thus, the uses of these drugs should provide protective benefits in HSD-induced bone loss. At the cellular level, HSD did not cause any significant changes in the mRNA expression of major regulators of bone formation, i.e., Runx2 and osterix. Likewise, our previous work in spontaneous hypertensive rats also showed no change in the expression of these transcription factors³⁰. Recently, salt-inducible kinase 1 (SIK1) was identified as a downstream effector for the signaling of bone morphogenetic protein (BMP)-2 in cells of the osteoblast lineage during bone formation⁵⁷. Therefore, it would be of interest to determine the role of BMP2-SIK1 signaling axis in bone under hypertensive conditions of various etiologies.

The ultimate consequences of HSD consumption on bone fragility and the risk of fracture are not known. This study revealed for the first time that salt-induced hypertensive rats has less resistance to deformation prior to breaking in the first month of salt loading before returning to normal by the end of the fifth month. It was likely that excess salt intake had an immediate effect on bone microarchitecture and strength, which later on adapted, compensated and restored to normality. A previous study reported that bone physical property was altered in HSD-fed rats due to a decrease in heterogeneity of mineralization together with an increase in crystallinity at the cortex²¹. This uniform and highly crystalized matrix may easily permit an initiation of microcracks contributing to fracture^{58,59}. Since bone calcium accretion is dependent on intestinal calcium supply in vitamin D-dependent manner⁶⁰, the hypertension-associated dysregulation of vitamin D metabolism⁶¹ might aggravate bone mineralization defect and related mechanical properties (e.g., stress and yield load). Further investigations especially in human volunteers are needed to address the microarchitectural changes, deterioration of mechanical properties and their adverse consequences.

Having elaborated the negative impacts on calcium and bone metabolism caused by HSD consumption, there are some limitations needed to be addressed. The amount of dietary salt given in HSD groups was at ten times greater than those in control groups (i.e., 8% vs. 0.8% NaCl). Sodium content used in HSD group was intended to induce an obvious aberration in calcium and bone metabolism. However, such a high amount of sodium intake is unlikely to occur in human. Indeed, the sodium intake in HSD population was approximately two times greater

than that in normal population². Thus, it is likely that this moderate yet significant increase in salt intake is one of several factors that collectively worsens calcium metabolism and bone mass in human^{15,16}.

In addition, timing and coordination of HSD-induced dysregulation of calcium and bone metabolism needed to be addressed. Here, we found that fecal calcium loss was evident only after 5 months of HSD consumption agreeing with a decrease in the intestinal calcium absorption, while urinary calcium loss and impaired bone strength was evident within the first month. It was conceivable that negative calcium balance occurred initially via urinary calcium loss. Since regulation of plasma calcium concentration was highly robust in the expense of the skeleton, this led to impaired bone resistance to the external forces by the end of the first month. Nevertheless, persistent insult of salt loading was detrimental to calcium and bone metabolism leading to increased bone porosity and decreased bone mass by the end of study. Therefore, the effects of HSD consumption on body calcium balance are highly dynamic and dependent on a number of factors. It would be interesting to incorporate dynamic tracing of calcium and sodium together with longitudinal monitoring of skeletal changes in vivo after HSD consumption.

In conclusions, our work has provided evidence on the detrimental effects of HSD on bone. Specifically, excessive salt consumption disrupts calcium balance, skeletal mass and integrity. Our approach should be beneficial in providing relevant platform and facilitating the identification of potential targets or therapeutic approach for improving bone mass and strength under prolonged high salt consumption and long-standing hypertension. Findings from our current work further establish the association of excessive salt intake, bone loss and tendency to fracture. Additional experiments in humans are required to confirm the long-lasting effects of HSD on calcium and bone metabolism.

Received: 3 October 2020; Accepted: 6 January 2021

Published online: 20 January 2021

References

1. WHO. *Guideline: Sodium Intake for Adults and Children* (WHO, Geneva, 2012).
2. U.S. Department of Health and Human Services and U.S. Department of Agriculture. 2015–2020 Dietary Guidelines for Americans. 8th Edition. <https://health.gov/our-work/food-and-nutrition/2015-2020-dietary-guidelines/> (2015).
3. Braam, B., Huang, X., Cupples, W. A. & Hamza, S. M. Understanding the two faces of low-salt intake. *Curr. Hypertens. Rep.* **19**, 49 (2017).
4. Su, Q. *et al.* Renin-angiotensin system acting on reactive oxygen species in paraventricular nucleus induces sympathetic activation via AT1R/PKC γ /Rac1 pathway in salt-induced hypertension. *Sci. Rep.* **7**, 43107 (2017).
5. Fujita, T. Mechanism of salt-sensitive hypertension: Focus on adrenal and sympathetic nervous systems. *J. Am. Soc. Nephrol.* **25**, 1148–1155 (2014).
6. Della Penna, S. L. *et al.* Renal overexpression of atrial natriuretic peptide and hypoxia inducible factor-1 α as adaptive response to a high salt diet. *Biomed. Res. Int.* **2014**, 936978 (2014).
7. Ma, T. *et al.* TRPC3 deficiency attenuates high salt-induced cardiac hypertrophy by alleviating cardiac mitochondrial dysfunction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **519**, 674–681 (2019).
8. Drenjančević-Perić, I. *et al.* High-salt diet and hypertension: Focus on the renin-angiotensin system. *Kidney Blood Press. Res.* **34**, 1–11 (2011).
9. Cosic, A. *et al.* Attenuated flow-induced dilatation of middle cerebral arteries is related to increased vascular oxidative stress in rats on a short-term high salt diet. *J. Physiol.* **594**, 4917–4931 (2016).
10. Lanaspá, M. A. *et al.* High salt intake causes leptin resistance and obesity in mice by stimulating endogenous fructose production and metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **115**, 3138–3143 (2018).
11. Tanaka, M. & Itoh, H. Hypertension as a metabolic disorder and the novel role of the gut. *Curr. Hypertens. Rep.* **21**, 63 (2019).
12. Fujita, T. Mineralocorticoid receptors, salt-sensitive hypertension, and metabolic syndrome. *Hypertension* **55**, 813–818 (2010).
13. Wigertz, K. *et al.* Racial differences in calcium retention in response to dietary salt in adolescent girls. *Am. J. Clin. Nutr.* **81**, 845–850 (2005).
14. van der Wijst, J. *et al.* Effects of a high-sodium/low-potassium diet on renal calcium, magnesium, and phosphate handling. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **315**, 110–122 (2018).
15. Park, M., Lee, J. S., Lee, J. H., Oh, S. H. & Park, M. K. Prevalence and risk factors of chronic otitis media: The Korean National Health and Nutrition Examination Survey 2010–2012. *PLoS ONE* **10**, e0125905 (2015).
16. Teucher, B. *et al.* Sodium and bone health: Impact of moderately high and low salt intakes on calcium metabolism in postmenopausal women. *J. Bone Miner. Res.* **23**, 1477–1485 (2008).
17. Xiao, F. *et al.* Intestinal metaplasia with a high salt diet induces epithelial proliferation and alters cell composition in the gastric mucosa of mice. *Cancer Biol. Ther.* **4**, 669–675 (2005).
18. Aguiar, S. L. F. *et al.* High-salt diet induces IL-17-dependent gut inflammation and exacerbates colitis in mice. *Front. Immunol.* **8**, 1969 (2017).
19. Hu, J. *et al.* Enteric dysbiosis-linked gut barrier disruption triggers early renal injury induced by chronic high salt feeding in mice. *Exp. Mol. Med.* **49**, e370 (2017).
20. Wu, L. *et al.* Increased levels of sodium chloride directly increase osteoclastic differentiation and resorption in mice and men. *Osteoporos. Int.* **28**, 3215–3228 (2017).
21. Dar, H. Y. *et al.* High dietary salt intake correlates with modulated Th17-Treg cell balance resulting in enhanced bone loss and impaired bone-microarchitecture in male mice. *Sci. Rep.* **8**, 2503 (2018).
22. Baudouy, D., Michiels, J. F., Vukolic, A., Wagner, K. D. & Wagner, N. Echocardiographic and histological examination of cardiac morphology in the mouse. *J. Vis. Exp.* **128**, 55843 (2017).
23. Lindahl, J. P. *et al.* In patients with type 1 diabetes simultaneous pancreas and kidney transplantation preserves long-term kidney graft ultrastructure and function better than transplantation of kidney alone. *Diabetologia* **57**, 2357–2365 (2014).
24. Suntornsaratooon, P., Krishnamra, N. & Charoenphandhu, N. Positive long-term outcomes from presuckling calcium supplementation in lactating rats and the offspring. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **308**, E1010–1022 (2015).
25. Nuntapornsak, A., Wongdee, K., Thongbunchoo, J., Krishnamra, N. & Charoenphandhu, N. Changes in the mRNA expression of osteoblast-related genes in response to β_2 -adrenergic agonist in UMR106 cells. *Cell Biochem. Funct.* **28**, 45–51 (2010).
26. Wongdee, K., Tulalamba, W., Thongbunchoo, J., Krishnamra, N. & Charoenphandhu, N. Prolactin alters the mRNA expression of osteoblast-derived osteoclastogenic factors in osteoblast-like UMR106 cells. *Mol. Cell Biochem.* **349**, 195–204 (2011).

27. Charoengphandhu, N. *et al.* Two-step stimulation of intestinal Ca²⁺ absorption during lactation by long-term prolactin exposure and suckling-induced prolactin surge. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **297**, E609–619 (2009).
28. Charoengphandhu, N., Suntornsaratoon, P., Jongwattapanisan, P., Wongdee, K. & Krishnamra, N. Enhanced trabecular bone resorption and microstructural bone changes in rats after removal of the cecum. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **303**, E1069–1075 (2012).
29. Suntornsaratoon, P. *et al.* Defective bone microstructure in hydronephrotic mice: A histomorphometric study in ICR/Mlac-hydro mice. *Anat. Rec.* **297**, 208–214 (2014).
30. Tiyasatkulkovit, W. *et al.* Impairment of bone microstructure and upregulation of osteoclastogenic markers in spontaneously hypertensive rats. *Sci. Rep.* **9**, 12293 (2019).
31. He, F. J., Li, J. & Macgregor, G. A. Effect of longer term modest salt reduction on blood pressure: Cochrane systematic review and meta-analysis of randomised trials. *BMJ* **346**, f1325 (2013).
32. Ogihara, T. *et al.* High-salt diet enhances insulin signaling and induces insulin resistance in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension* **40**, 83–89 (2002).
33. Kitada, K. *et al.* High salt intake reprioritizes osmolyte and energy metabolism for body fluid conservation. *J. Clin. Investig.* **127**, 1944–1959 (2017).
34. Sasaki, T. *et al.* Bowman capsule volume and related factors in adults with normal renal function. *Kidney Int. Rep.* **3**, 314–320 (2018).
35. Berger, R. C. *et al.* Renal effects and underlying molecular mechanisms of long-term salt content diets in spontaneously hypertensive rats. *PLoS ONE* **10**, e0141288 (2015).
36. Puelles, V. G. *et al.* Human podocyte depletion in association with older age and hypertension. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **310**, F656–668 (2016).
37. Peng, J. B. *et al.* A rat kidney-specific calcium transporter in the distal nephron. *J. Biol. Chem.* **275**, 28186–28194 (2000).
38. Lu, Z. *et al.* Deficiency of PKD2L1 (TRPP3) exacerbates pathological cardiac hypertrophy by augmenting NCX1-mediated mitochondrial calcium overload. *Cell Rep.* **24**, 1639–1652 (2018).
39. Smiljanec, K. & Lennon, S. L. Sodium, hypertension, and the gut: Does the gut microbiota go salty?. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **317**, H1173–1182 (2019).
40. Marion-Letellier, R., Amamou, A., Savoye, G. & Ghosh, S. Inflammatory bowel diseases and food additives: To add fuel on the flames!. *Nutrients* **11**, 1111 (2019).
41. Gilman, J. & Cashman, K. D. The effect of probiotic bacteria on transepithelial calcium transport and calcium uptake in human intestinal-like Caco-2 cells. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* **7**, 1–5 (2006).
42. Miranda, P. M. *et al.* High salt diet exacerbates colitis in mice by decreasing *Lactobacillus* levels and butyrate production. *Microbiome* **6**, 57 (2018).
43. Taylor, E. N., Fung, T. T. & Curhan, G. C. DASH-style diet associates with reduced risk for kidney stones. *J. Am. Soc. Nephrol.* **20**, 2253–2259 (2009).
44. Boughton, O. R. *et al.* Computed tomography porosity and spherical indentation for determining cortical bone millimetre-scale mechanical properties. *Sci. Rep.* **9**, 7416 (2019).
45. Ye, Z., Lu, H. & Liu, P. Association between essential hypertension and bone mineral density: A systematic review and meta-analysis. *Oncotarget.* **8**, 68916–68927 (2017).
46. Machnik, A. *et al.* Macrophages regulate salt-dependent volume and blood pressure by a vascular endothelial growth factor-C-dependent buffering mechanism. *Nat. Med.* **15**, 545–552 (2009).
47. Wiig, H. *et al.* Immune cells control skin lymphatic electrolyte homeostasis and blood pressure. *J. Clin. Investig.* **123**, 2803–2815 (2013).
48. Karlsen, T. V. *et al.* High-salt diet causes expansion of the lymphatic network and increased lymph flow in skin and muscle of rats. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **38**, 2054–2064 (2018).
49. Stocker, S. D., Monahan, K. D. & Browning, K. N. Neurogenic and sympathoexcitatory actions of NaCl in hypertension. *Curr. Hypertens. Rep.* **15**, 538–546 (2013).
50. Titze, J. *et al.* Glycosaminoglycan polymerization may enable osmotically inactive Na⁺ storage in the skin. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **287**, H203–208 (2004).
51. Schröder, A. *et al.* Osteoprotective action of low-salt diet requires myeloid cell-derived NFAT5. *JCI Insight* **4**, e127868 (2019).
52. Simmonds, S. S., Lay, J. & Stocker, S. D. Dietary salt intake exaggerates sympathetic reflexes and increases blood pressure variability in normotensive rats. *Hypertension* **64**, 583–589 (2014).
53. Stocker, S. D., Lang, S. M., Simmonds, S. S., Wenner, M. M. & Farquhar, W. B. Cerebrospinal fluid hypernatremia elevates sympathetic nerve activity and blood pressure via the rostral ventrolateral medulla. *Hypertension* **66**, 1184–1190 (2015).
54. Takeda, S. *et al.* Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell* **111**, 305–317 (2002).
55. Ma, Y. *et al.* β₂-Adrenergic receptor signaling in osteoblasts contributes to the catabolic effect of glucocorticoids on bone. *Endocrinology* **152**, 1412–1422 (2011).
56. Ofek, O. *et al.* Peripheral cannabinoid receptor, CB₂, regulates bone mass. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**, 696–701 (2006).
57. Kim, M. K. *et al.* Salt-inducible kinase 1 regulates bone anabolism via the CRTCL-CREB-Id1 axis. *Cell Death Dis.* **10**, 826 (2019).
58. Burr, D. Microdamage and bone strength. *Osteoporos. Int.* **14**(Suppl 5), S67–72 (2003).
59. Davison, K. S. *et al.* Bone strength: The whole is greater than the sum of its parts. *Semin. Arthritis Rheum.* **36**, 22–31 (2006).
60. Wongdee, K. & Charoengphandhu, N. Vitamin D-enhanced duodenal calcium transport. *Vitam. Horm.* **98**, 407–440 (2015).
61. Chen, S., Sun, Y. & Agrawal, D. K. Vitamin D deficiency and essential hypertension. *J. Am. Soc. Hypertens.* **9**, 885–901 (2015).

Acknowledgements

We appreciate access to XTM beamline (BL1.2W) and technical support from the XTM team at Synchrotron Light Research Institute (Public Organization), Thailand. This work was supported by grants from Mahidol University (A22/2561 to N.P.), Mahidol University–Multidisciplinary Research Cluster (MU–MRC) grant (to N.C. and N.P.), Central Instrumental Facility (CIF/CNI), Faculty of Science Mahidol University (to N.C. and N.P.), Thailand Toray Science Foundation (to N.P.), National Research Council of Thailand and Mahidol University (to N.C., W.T., K.W., R.A., J.T., and N.P.), Thailand Research Fund (TRF) through International Research Network Program (IRN60W0001 to K.W. and N.C.), the Medical Association of Thailand–Prasert Prasartong-Osoth Initiative (to N.C. and N.P.), TRF–Royal Golden Jubilee Ph.D. Program (PHD/0003/2561 to P.U.), Faculty of Allied Health Sciences, Burapha University (to K.W. and P.U.) and Chulalongkorn University (CU_GR_63_67_23_11 to W.T.). P.A. is supported by post-doctoral fellowship grant awarded by Mahidol University.

Author contributions

W.T. designed and performed all experiments, analyzed data, wrote the first draft and prepared figures and manuscript. S.A. assisted on experiment, analysis and evaluation of bone morphology, analyzed data and prepare

manuscript. P.A. and C.R. designed and performed experiment concerning SRXTM. P.U. and K.W. designed and performed experiment concerning histological staining and analyses. R.A. and J.T. analyzed data and prepared figures and manuscript. N.P. and N.C. provided concepts and designed experiments, prepared and edited manuscript and figures.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81413-2>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to N.P.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021

ภาคผนวก

ผลงานตีพิมพ์วารสารระดับนานาชาติ เรื่องที่ 2

MINI-REVIEW

Emerging roles of calcium-sensing receptor in the local regulation of intestinal transport of ions and calcium

Krittikan Chanpaisaeng,^{1,2} Jarinthorn Teerapornpantakit,^{1,3} Kannikar Wongdee,^{1,4} and Narattaphol Charoenphandhu^{1,5,6,7}

¹Center of Calcium and Bone Research (COCAB), Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand; ²Functional Ingredients and Food Innovation Research Group, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Pathum Thani, Thailand; ³Department of Physiology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand; ⁴Faculty of Allied Health Sciences, Burapha University, Chonburi, Thailand; ⁵Department of Physiology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand; ⁶Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University, Nakhon Pathom, Thailand; and ⁷The Academy of Science, The Royal Society of Thailand, Bangkok, Thailand

Abstract

Whether the intestinal mucosal cells are capable of sensing calcium concentration in the lumen and pericellular interstitium remains enigmatic for decades. Most calcium-regulating organs, such as parathyroid gland, kidney, and bone, are capable of using calcium-sensing receptor (CaSR) to detect plasma calcium and trigger appropriate feedback responses to maintain calcium homeostasis. Although both CaSR transcripts and proteins are abundantly expressed in the crypt and villous enterocytes of the small intestine as well as the surface epithelial cells of the large intestine, the studies of CaSR functions have been limited to amino acid sensing and regulation of epithelial fluid secretion. Interestingly, several lines of recent evidence have indicated that the enterocytes use CaSR to monitor luminal and extracellular calcium levels, thereby reducing the activity of transient receptor potential channel, subfamily V, member 6, and inducing paracrine and endocrine feedback responses to restrict calcium absorption. Recent investigations in zebra fish and rodents have also suggested the role of fibroblast growth factor (FGF)-23 as an endocrine and/or paracrine factor participating in the negative control of intestinal calcium transport. In this review article, besides the CaSR-modulated ion transport, we elaborate the possible roles of CaSR and FGF-23 as well as their crosstalk as parts of a negative feedback loop for counterbalancing the seemingly unopposed calciotropic effect of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on the intestinal calcium absorption.

enterocyte; fibroblast growth factor-23; parathyroid hormone; TRPV6; vitamin D

INTRODUCTION

Calcium-sensing receptor (CaSR) in the parathyroid chief cells is known for its role in regulating the extracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_o$). CaSR senses minute changes in $[Ca^{2+}]_o$ from the physiological range of 1.1–1.3 mM (1). Under hypocalcemic conditions, a reduced calcium binding to parathyroid CaSR triggers a multi-tissue axis—kidney, intestine, and bone—to restore $[Ca^{2+}]_o$. Its extracellular domain consists of two lobes with the calcium-binding sites locating in the cleft (2). In the presence of extracellular calcium binding, CaSR initiates downstream responses in the parathyroid chief cells through $G_{q\alpha}$ and phospholipase C pathway to diminish parathyroid hormone (PTH) vesicle fusion and release, thereby reducing its systemic calciotropic activity (3).

It is well known that calcium homeostasis is also regulated by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ [1,25(OH)₂D₃], which promotes intestinal calcium absorption when the extracellular calcium is depleted. On the contrary, when there is high dietary

calcium intake, there is no known minute-to-minute prevention of excessive calcium entry into the body. The only known response is a reduction in 1,25(OH)₂D₃ production that takes a long time to yield the result. Since the maintenance of plasma calcium with a narrow range is of utmost importance, there must be a specific protective mechanism that could detect and immediately respond to excessive calcium uptake across the gut epithelium. Recent investigations have suggested that intestinal CaSR may be involved in the regulation of calcium homeostasis through additional mechanisms beyond that occur in the parathyroid gland (4–6). In addition, since phosphate metabolism that is regulated by fibroblast growth factor (FGF)-23/Klotho system is closely linked to calcium homeostasis, the interplay between the CaSR and FGF-23 is inevitable (5, 6).

In this review, we focus on the local functions of CaSR in regulating intestinal ion transport and its potential interactions with transient receptor potential channel, subfamily V, member 6 (TRPV6) and FGF-23. We have also provided new



evidence that shed some light on the modulation of intestinal calcium absorption by CaSR.

CaSR AND INTESTINAL ANION TRANSPORT

Anion secretion in the small and large intestine is an integral mechanism to maintain an appropriate environment, i.e., pH and osmotic balance for effective nutrient absorption, normal intestinal mucosa integrity, and prevention of mucosal ulcerations. Functional CaSR that is expressed on the apical and basolateral membrane of colonic crypt cells in both rat and human has been implicated in intestinal fluid secretion and ion transport (7). Specifically, CaSR is involved in the intestinal transport of two major anions, i.e., HCO_3^- and Cl^- , as well as K^+ . The intestinal HCO_3^- secretion is mediated predominantly by cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and anion exchangers, for

example, SLC26A3, SLC26A6 ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ antiporter), and SLC4A9 (8). The CFTR is highly expressed in the crypt cells while anion exchangers are expressed at different levels of the villous epithelial cells (Fig. 1A).

Apical efflux of HCO_3^- through CFTR is induced by both cAMP and intracellular calcium signaling. In support of this notion, dietary calcium and CaSR activators, e.g., spermine and Gd^{3+} , have been shown to stimulate duodenal HCO_3^- secretion in wild-type mice but not CFTR knockout mice (9). Interestingly, blockade of intermediate conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels (IK_{Ca}) markedly diminished the CaSR activator-induced HCO_3^- secretion (9). IK_{Ca} hyperpolarizes the basolateral membrane, thus facilitating the increase in intracellular calcium concentration, which promotes duodenal HCO_3^- secretion (9). A recent investigation has also suggested that CaSR could modulate HCO_3^- secretion in the colon. Using the rat distal colonic mucosa mounted onto

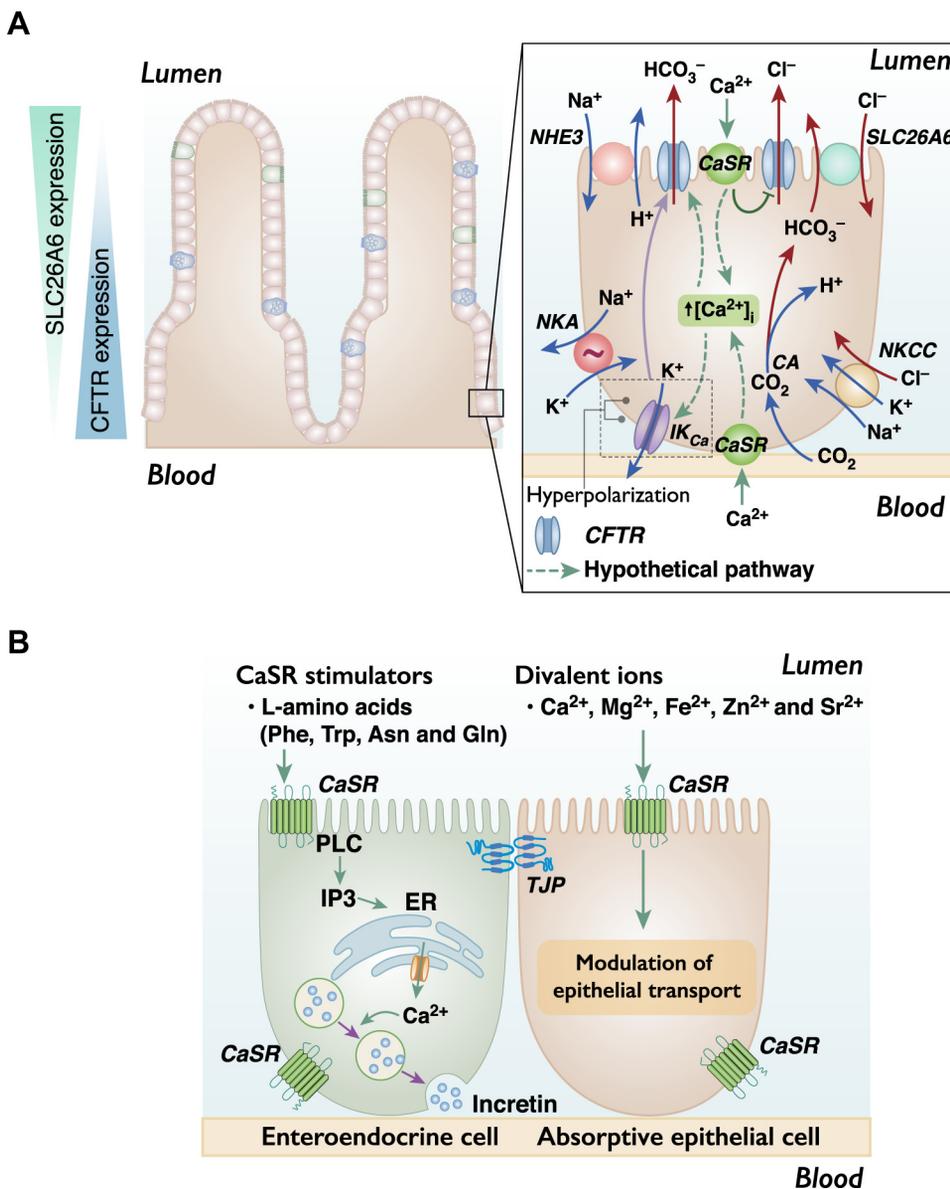


Figure 1. Calcium-sensing receptor (CaSR) regulates anion secretions and acts as a sensor for amino acids and divalent ions. **A:** CaSR expressed in absorptive epithelial cells promotes HCO_3^- and Cl^- secretion by mechanisms that involve cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR), $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ antiporter (SLC26A6), and intermediate conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel (IK_{Ca}). Green dashed line represents the proposed model for duodenal HCO_3^- secretion by Xie et al. (9). **B:** CaSR expressed in enteroendocrine cells acts as a primary L-aromatic amino acid-sensing receptor that, when activated, results in the release of incretins. Besides calcium ions, other divalent ions may also stimulate CaSR in the absorptive epithelial cells to modulate absorption of these ions. Asn, asparagine; CA, carbonic anhydrase; $[\text{Ca}^{2+}]_i$, intracellular calcium concentration; ER, endoplasmic reticulum; Gln, glutamine; IP3, inositol trisphosphate; NHE3, Na^+/H^+ -exchanger 3; NKCC, $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter; Phe, phenylalanine; PLC, phospholipase C; TJP, tight junction proteins; Trp, tryptophan.

Ussing chamber, Tang et al. showed that a specific CaSR activator, NPS-R568, activated Cl^- and short chain fatty acid (SCFA)-dependent HCO_3^- secretion while inhibiting cAMP-dependent HCO_3^- secretion. These effects were absent in colonic mucosa from CaSR-null mice (10). These findings consistently showed that both duodenal and colonic HCO_3^- secretions are modulated by CaSR although more experiment is required to determine how CaSR activates CFTR and/or anion exchanger for HCO_3^- secretion.

Excessive intestinal Cl^- secretion is a major pathological pathway of diarrheal conditions, e.g., fluid and electrolyte loss induced by cholera toxin and *Escherichia coli* enterotoxin. In contrast to the stimulatory effect of CaSR on HCO_3^- secretion, Giebel et al. (11) showed that CaSR played a role in inhibiting the toxin-stimulated Cl^- secretion in the rat colon. Recent studies further explained that the underlying mechanisms were related to both neuronal and nonneuronal secretagogue action (12, 13). Since CaSR is also expressed in neurons of the enteric nervous system, Sun et al. (13) used conditional knockout model to specifically delete *Casr* gene in either neurons or myenteric neurons and was able to demonstrate that the antisecretory effect of CaSR was mediated primarily through the inhibition of myenteric neurons. Direct inhibition of CFTR-mediated Cl^- secretion by enterocytic CaSR is possible but the cellular mechanism is inconclusive.

Furthermore, evidence in marine organisms has introduced a new paradigm for exploring how intestinal HCO_3^- or Cl^- secretion works or interacts with calcium metabolism and/or CaSR function. Seawater fish utilize drinking to compensate for osmotic water loss. Thus, the high drinking rate leads to an increase in calcium uptake. A study in the Gulf toadfish revealed that HCO_3^- secretion through the $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ -antiporter (SLC26A6) in the rectum functioned as a luminal osmolality regulator by binding to luminal Ca^{2+} to form insoluble CaCO_3 precipitates (14). The guanylin family of intestinal peptides (e.g., guanylin) has been known to induce luminal fluid retention. By activating guanylyl cyclase-C receptors, this peptide increased Cl^- secretion through apical CFTR (15). An increase in Cl^- secretion into the intestinal lumen reduces water absorption, thereby enhancing removal of insoluble CaCO_3 precipitates from the gut lumen. Hence, this Cl^- secretory machinery helps remove excessive calcium content from the rectum of marine fish. Existing data on CaSR-mediated HCO_3^- secretion and Cl^- -induced water flow in the intestine of marine fish and mammals have suggested a plausible involvement of intestinal CaSR-modulated anion secretion in the regulation of intestinal calcium absorption. Further investigations of direct involvement of CaSR-mediated anion secretion in intestinal calcium absorption are required to define the implications in humans or rodents.

CaSR AS A SENSOR FOR AMINO ACIDS AND DIVALENT IONS

There are three main amino acid sensing receptors located in intestinal enteroendocrine L cells, i.e., G protein-coupled receptor family C group 6 subtype A (GPC6A), sodium-dependent neutral amino acid transporter 2, and CaSR (16), the

latter of which is sensitive to L-aromatic amino acids, e.g., L-phenylalanine, L-tryptophan, L-asparagine, and L-glutamine (Fig. 1B). These amino acids probably stimulate the secretion of appetite- and satiety-regulating factors (17–19). For example, Mace et al. reported that L-phenylalanine, L-tryptophan, L-asparagine, L-arginine, and L-glutamine stimulated secretion of gluco-insulinotropic peptide, glucagon-like peptide (GLP)-1, and peptide tyrosine-tyrosine (PYY) in isolated loops of rat small intestine (18). Although these responses were augmented by the CaSR agonist, NPS-R568, these L-amino acids were without effect in the absence of extracellular calcium or in the presence of the CaSR inhibitor Calhex 231 (18). In support of these *in vitro* data, Acar et al. (20) confirmed the role of the CaSR in promoting GLP-1, but not PYY secretion, in the acute response to an intraduodenal administration of L-tryptophan in male rats. Furthermore, studies in mice and swine showed that CaSR can detect L-amino acids and mediate cholecystokinin secretion from the duodenum (21, 22). These findings indicate that L-amino acids act as agonists for CaSR to promote incretin/endocrine factor secretion.

Because certain L-amino acids can bind to and activate CaSR (23), they potentially affect calcium homeostasis. A randomized controlled trial of protein-depleted healthy subjects showed that the subjects who received a fivefold increase of L-phenylalanine and L-histidine supplementation had significantly higher 24-h urinary calcium excretion than the subjects who received branched-chain amino acids (i.e., leucine and isoleucine). Interestingly, bone turnover markers were not different between the two groups, suggesting that calciuria was likely to occur as a result of an increased calcium absorption (24). Whether the increase in calcium excretion in the subjects receiving L-aromatic amino acids is a consequence of intestinal CaSR-mediated calcium absorption remains a question for future research.

Recently, substrates of H^+ -dependent peptide transporter (PEPT)-1, e.g., dipeptide Gly-Sar, were shown to stimulate CaSR at the basolateral side of enterocytes, accompanying by phospholipase C activation and the increased intracellular calcium, the latter of which triggered IK_{Ca} opening (25). This IK_{Ca} opening led to hyperpolarization, which, in turn, promoted more dipeptide absorption (25). Therefore, IK_{Ca} is not only involved in the CaSR-induced HCO_3^- secretion but also modulates PEPT1 function.

Besides L-amino acids and dipeptides, CaSR is probably activated by several divalent ions, e.g., Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , and Sr^{2+} in the lumen (26). Nevertheless, interdependent actions of calcium and magnesium on CaSR have been extensively studied at the systemic level, particularly in parathyroid gland and kidney (27–29). Although calcium is a predominant regulator of PTH secretion, several findings infer that magnesium can modulate the secretion of PTH under normal conditions with physiological concentrations of these two ions in the plasma. Magnesium was reported to upregulate the mRNA and protein expression of CaSR, vitamin D receptor (VDR), fibroblast growth factor receptor (FGFR)-1, and Klotho—a co-receptor of fibroblast growth factor (FGF)-23—but only in the presence of moderately low $[\text{Ca}^{2+}]_o$ (0.8–1.2 mM) (29). This line of evidence showed that CaSR is involved in the homeostasis of other divalent ions aside of calcium ions.

An emerging area of interest is the regulation of phosphate metabolism by CaSR. A recent study investigated the role of phosphate in the parathyroid gland and revealed that hyperphosphatemia (1.4–3 mM) inhibits parathyroid CaSR to promote PTH secretion, thus enhancing renal phosphate excretion (30). Interestingly, the effect of phosphate on CaSR was probably noncompetitive since the x-ray crystallography and mutagenesis studies of the extracellular domain of CaSR showed that the phosphate-binding site of CaSR was different from that of calcium (30, 31). Although the effect of hyperphosphatemia on intestinal CaSR is unclear, an activation of intestinal CaSR can induce FGF-23 release (32), which might, in turn, enhance the renal phosphate excretion (please see the following section for more detail about CaSR-mediated FGF-23 release). Similar gut-kidney axis for the regulation of ion homeostasis has been reported previously. For example, high sodium intake is known to induce intestinal secretion of prorenin, thereby enhancing renal sodium excretion to eliminate excessive salt (33).

INTESTINAL CALCIUM ABSORPTION AND POSSIBLE REGULATION BY CaSR

Although CaSR is the major sensor for extracellular calcium, whether CaSR expressed in the enterocytes is able to detect changes in luminal calcium and/or calcium in the interstitial fluid to fine-tune calcium uptake remains elusive. It is possible that intestinal CaSR contributes to local, paracrine, and/or neurocrine regulation of intestinal calcium absorption (32).

Mechanism of Intestinal Calcium Transport and Systemic Regulation by CaSR

Intestinal calcium transport consists of two major pathways, i.e., concentration-dependent paracellular and energy-dependent transcellular pathways (34, 35). While the former takes place in a nonsaturable passive manner, the latter is an active, yet saturable process that mainly occurs when whole body calcium pool is below the physiological range. The activation of this transcellular pathway is controlled by $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ through the parathyroid gland–kidney–intestine axis, i.e., CaSR in the parathyroid gland helps detect a drop in $[\text{Ca}^{2+}]_o$ and induces the release of PTH. An increase in serum PTH enhances release of bone calcium and phosphate and renal $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ production, which later promotes intestinal calcium absorption and renal calcium reabsorption (Fig. 2). Renal calcium reabsorption can occur paracellularly through tight junctions in the proximal tubule and the thick ascending limb of Henle's loop (36). During this process, PTH also activates the renal excretion of excessive phosphate ion.

Growing evidence suggests that CaSR may also work independently of PTH to prevent hypercalcemia. By using mice lacking PTH alone (PTH KO), PTH and CaSR (DKO), or wild-type mice, Kantham et al. (37) found that PTH KO and wild-type mice, but not DKO mice, had higher serum calcitonin levels to defend against hypercalcemia after an oral calcium load. Moreover, DKO mice excreted less calcium than the other two genotypes. This means that high $[\text{Ca}^{2+}]_o$ -induced inhibition of PTH secretion is not the only mechanism for protecting against hypercalcemia.

The same group used these knockout mice to study the effect of a single intraperitoneal dose of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (0.5 ng/g body wt) on serum calcium concentrations in calcium-replete mice (38). At 24 h after injection, calcium-replete DKO mice showed a greater increase in serum calcium levels from the baseline than wild-type and PTH KO mice (7 and 2–3 mg/dL, respectively). This difference was adequate to put these DKO mice into moderate hypercalcemia (serum calcium levels of 12–13 mg/dL). On the other hand, when feeding mice with 0.01% calcium w/w for 48–72 h, the difference between serum calcium levels of PTH KO and DKO mice at 24 h post injection was only 0.9 mg/dL, much less than that of mice fed calcium-replete diet (~4 mg/dL). Therefore, hypercalcemia observed in these calcium-replete DKO mice likely resulted from a difference in calcium absorption (38). Thus, the aforementioned findings clearly demonstrated that CaSR plays a pivotal role in preventing $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -induced hyperabsorption of calcium in normocalcemic animals. It is tempting to postulate that this observed defense mechanism against hypercalcemia (systemic control) could be attributed to protective mechanisms mediated by the CaSR in other organs such as the intestine (local control).

CaSR and TRPV6

TRPV6 is a calcium-selective transporter abundantly expressed in the duodenal enterocytes. Under habitually low calcium consumption, the parathyroid gland–kidney–intestine axis stimulates the renal production of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ resulting in $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -mediated upregulation of calcium transport genes including TRPV6, which increases transcellular active intestinal calcium transport (35). In addition, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ through a negative feedback regulation suppresses the PTH gene transcription to maintain effective calcium homeostasis (39).

Although CaSR has been shown to express in both apical and basolateral membranes of the enterocytes in humans, rats, and mice (40, 41), existing data confirming the direct action of CaSR on transcellular calcium absorption is scant. By studying calcium transport across the intestinal epithelium-like Caco-2 monolayer in the Ussing chamber setup, our group demonstrated that low-dose CaSR inhibitors (Calhex 231 or NPS2143) were capable of preventing the $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -induced transcellular active calcium uptake (32). We further showed that the CaSR expressed in the apical membrane of the intestinal epithelium may act as a sensor of luminal calcium concentration and could serve as a local protective mechanism that responds rapidly and in anticipation to potential intestinal hyperabsorption of calcium.

Another line of research further showed that CaSR expressed on the basolateral membrane of enterocytes can also influence transcellular calcium transport through regulating the expression of TRPV6. Lee et al. (4) reported that an increase in $[\text{Ca}^{2+}]_o$ or applying the calcimimetic cinacalcet to the basolateral side of Ussing chamber led to a decrease in net calcium absorption across the intestinal epithelium. These responses were not observed in the intestine from mice expressing nonfunctional TRPV6 (TRPV6^{D541A}). To confirm the causal relationship between CaSR and decreased calcium fluxes through TRPV6, the investigators co-expressed TRPV6 and CaSR in *Xenopus* oocytes. They

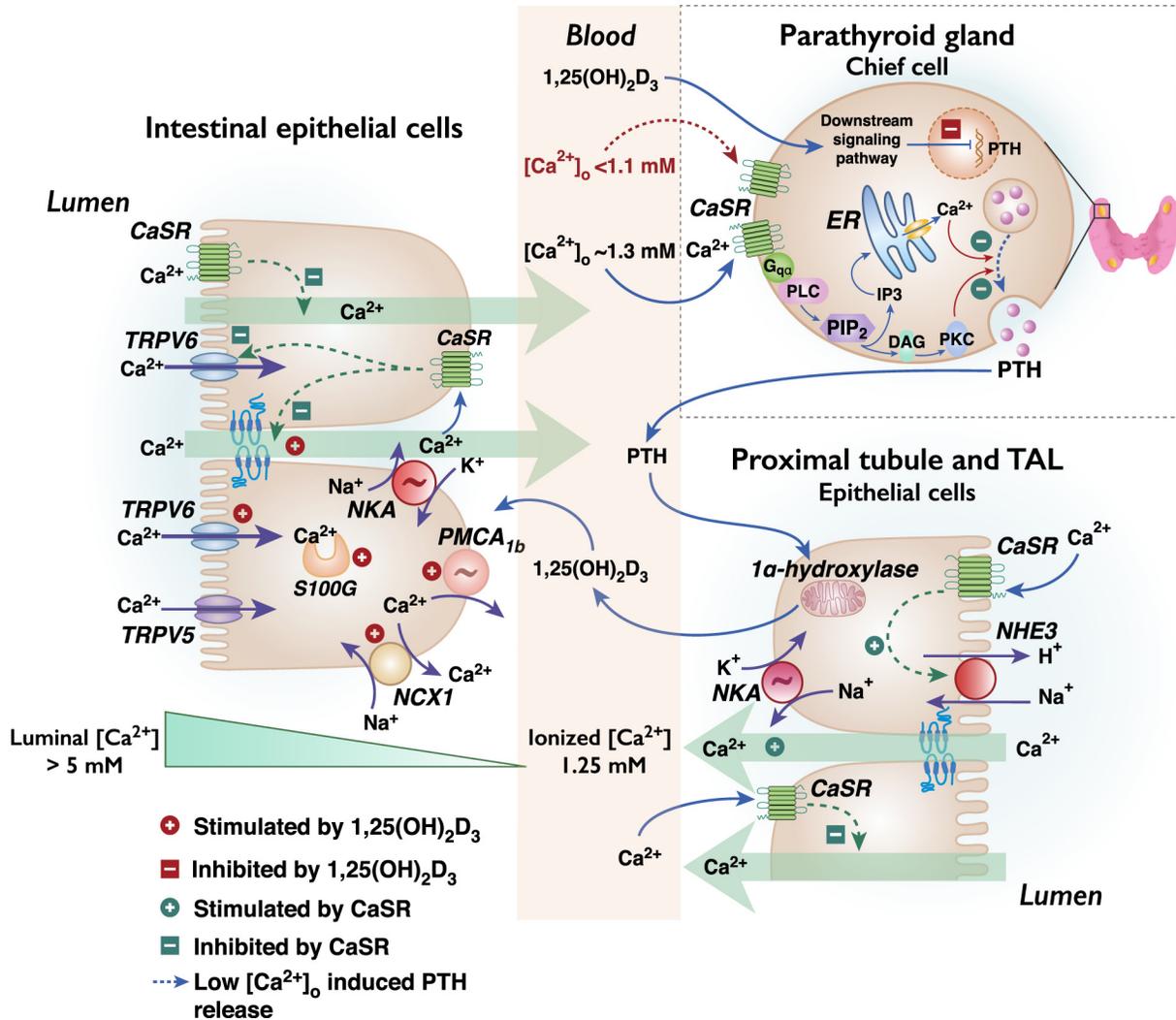


Figure 2. Conventional model of calcium homeostasis regulated by the parathyroid gland–kidney–intestine axis and proposed local regulatory roles of calcium-sensing receptor (CaSR) in the enterocytes. In the presence of extracellular calcium binding, CaSR initiates downstream responses in the parathyroid chief cells through $G_{\alpha q}$ and phospholipase C pathway to diminish parathyroid hormone (PTH) vesicle fusion and release, thereby reducing its systemic calcitropic activity. When ionized calcium concentration is below the physiological range ($< 1.1 \text{ mM}$), decreased binding of Ca^{2+} to CaSR induces PTH secretion and delays PTH degradation (top right). PTH activates the conversion of 25-hydroxyvitamin D_3 to 1,25-dihydroxyvitamin D_3 [$1,25(OH)_2D_3$] in the kidney. $1,25(OH)_2D_3$ upregulates calcium transport genes in the enterocytes, thereby promoting transcellular calcium absorption. On the other hand, CaSR localized in the enterocytes is proposed to sense superfluous calcium influx and suppress both transcellular and paracellular calcium absorption. NCX1, Na^+/Ca^{2+} -exchanger 1; NHE3, Na^+/H^+ -exchanger 3; NKA, Na^+/K^+ -ATPase; PMCA $_{1b}$, plasma membrane Ca^{2+} -ATPase-1b; S100G, S100 calcium-binding protein G or calbindin- D_{9k} ; TAL, the thick ascending limb of Henle’s Loop; TRPV5/6, transient receptor potential channel, subfamily V, member 5/6.

observed that CaSR activation by cinacalcet in these oocytes led to a decrease in TRPV6-mediated calcium currents, indicating the existence of a local regulatory action of CaSR in modulating transcellular calcium movement. In vivo study using intestinal specific knock-out of CaSR is required to demonstrate its physiological relevance.

Intestinal CaSR and Phosphate

The concept of intestinal CaSR as a potential sensor of phosphate has been proposed. Duodenal infusion of sodium phosphate in normal rats could acutely increase plasma PTH and phosphate within 5 and 30 min after infusion, respectively, while ionized calcium level remained

unaltered (42). When phosphonoformate—a nonabsorbable form of phosphate—or an inhibitor of sodium phosphate cotransporter was administered, an elevated plasma PTH was still observed but plasma phosphate took three times longer to rise to the same level as triggered by sodium phosphate. Based on these data, the investigators suggested that a phosphate sensor may exist in the intestine (42). These findings together with the data from a study of Centeno et al. (30) demonstrating the role of phosphate in modulating PTH secretion via CaSR in the parathyroid gland led us to hypothesize that the direct action of phosphate in the small intestine could be mediated by intestinal CaSR, but more in vivo studies are required to confirm this hypothesis.

CaSR and FGF-23

FGF-23 is primarily known as a phosphate-regulating hormone produced by osteoblasts and osteocytes (43). It controls inorganic phosphate (Pi) homeostasis via the orchestration of three organs, i.e., bone, kidney, and intestine. The classical action of FGF-23 is to prevent hyperphosphatemia by inhibiting the renal Na⁺-dependent Pi cotransporter (NaPi)-2 and thus enhancing phosphate excretion. Whenever phosphate level exceeds the physiological range of 0.97–1.61 mM, FGF-23 secretion is markedly enhanced (44). Although some cellular pathways were proposed, e.g., increased production of reactive oxygen species (45), the exact mechanism by which bone cells sense fluctuation of phosphate is still unclear.

After reaching the kidney, FGF-23 mainly controls calcium/phosphate reabsorption at the proximal renal tubules by binding to FGFR-1 and its co-receptor α -Klotho, both of which activate FGF receptor substrate 2 α (FRS2 α)/Ras/MAPK signaling pathway (46), resulting in internalization of NaPi-2a and -2c and reduction of tubular phosphate reabsorption (43, 47). In addition, FGF-23 may indirectly control phosphate uptake in the intestine by upregulating the 1,25(OH)₂D₃ inactivating enzyme 24-hydroxylase, thereby promoting catabolism of 1,25(OH)₂D₃ (48). This could decrease both intestinal phosphate and calcium absorption.

In the past decade, several lines of evidence have suggested the role of FGF-23 as a calcium-regulating hormone that directly modulates intestinal calcium absorption via humoral and local mechanisms (4, 49, 50). Regarding the humoral mechanism, Khuituan et al. (49, 50) demonstrated the role of FGF-23 as a suppressor of 1,25(OH)₂D₃-stimulated duodenal calcium absorption in mice. Therein, mice injected with 1 μ g/kg 1,25(OH)₂D₃ once a day for three days showed ~1.8-fold increase in duodenal calcium transport that was completely diminished by 140 μ g/kg FGF-23 injection. Such inhibitory action of FGF-23 affected both paracellular and transcellular transport, the latter of which probably resulted from downregulation of calcium transport genes (e.g., TRPV5, TRPV6, and calbindin-D_{9k}) via MAPK/ERK, p38 MAPK, and PKC signaling pathways (5, 49). As for the paracellular pathway, FGF-23 modestly but significantly reduces the 1,25(OH)₂D₃-induced paracellular calcium flux and calcium permeability (50). These findings provide an explanation of how the duodenum prevents excessive calcium transport during high-calcium intake.

The local production of FGF-23 and four types of FGFR isoforms in the small and large intestine have been reported by our group (6, 49, 51) and others (52, 53). Upon stimulation by 1,25(OH)₂D₃ or prolonged exposure to high apical calcium, the intestinal epithelium-like Caco-2 monolayer was capable of secreting FGF-23 into the culture media in both apical and basolateral compartments. Moreover, lactating rats, which physiologically exhibit calcium hyperabsorption, had greater FGF-23 expression in small and large intestine than age-matched controls (6). Nevertheless, whether the small intestine can express α -Klotho is unclear (49). Since α -Klotho is a coreceptor required for FGF-23 signaling (54), we postulate that the local regulation of FGF-23 is mediated by soluble α -Klotho in the circulation. Soluble α -Klotho is the

extracellular domain of the transmembrane α -Klotho, which is cleaved by secretases and can circulate in the blood to other tissues to support FGF-23 signaling (54). Thus, the aforementioned data strongly support the idea of FGF-23 as a local regulator of intestinal calcium absorption (6, 51, 53).

Recent investigations further revealed that the local effect of FGF-23 in the intestine somehow could be regulated by CaSR (5, 6). By using Caco-2 cells treated with 10 nM 1,25(OH)₂D₃ or directly exposed to high apical calcium (30 mM), our group demonstrated that CaSR inhibitors (Calhex-231 and NPS2143) suppressed 1,25(OH)₂D₃-induced upregulation of FGF-23, whereas CaSR activation by cinacalcet and AC-265347 diminished the 1,25(OH)₂D₃-mediated transcellular calcium transport, most likely via the upregulation of FGF-23 (6). Consistent with our studies, early-stage zebrafish expressing both CaSR and FGF-23 showed an increased FGF-23 expression when raised in high-calcium water (5). The upregulation of FGF-23 was intensified in CaSR knockdown zebrafish while the downregulation of another hypocalcemic hormone stanniocalcin 1 (STC1) was observed in these fish compared with controls (5). Furthermore, STC1-overexpressing zebrafish had lower levels of FGF-23 transcript than controls. Because lack of CaSR suppressed STC1 expression and STC1 negatively modulated FGF-23 expression, the investigators proposed that, in high-calcium environment, CaSR directly upregulated FGF-23 to suppress branchial calcium uptake in fish. On the other hand, STC1 became a negative regulator of FGF-23 to prevent superfluous FGF-23 production. Future research is warranted to explore whether these observations are relevant in the regulation of mammalian intestinal calcium absorption. Taken these findings into consideration, CaSR could act as a local calcium sensor to fine-tune calcium absorption in the intestine by modulating FGF-23 expression (Fig. 3).

PERSPECTIVES AND CONCLUDING REMARKS

CaSR is involved in the regulation of intestinal transport of various ions, e.g., HCO₃⁻, Cl⁻, K⁺, phosphate, and Ca²⁺. It is currently clear that CaSR in the enterocytes contributes to the local regulation of intestinal calcium absorption. It probably conveys the negative feedback signals directly to calcium transporters, e.g., TRPV6, or indirectly by controlling the 1,25(OH)₂D₃-dependent calcium transport machinery via a paracrine factor, FGF-23. Despite being an osteokine produced by osteoblasts and osteocytes, this humoral factor is widely expressed in several other cell types including the enterocytes and skeletal muscle tissue and is regulated by various factors such as hypocalcemia, hyperphosphatemia, inflammation, and iron overload (55). Under conditions with high luminal calcium and/or intestinal calcium hyperabsorption, an increase of pericellular calcium concentration is apparently sensed by CaSR, which, in turn, induces local FGF-23 production and secretion to suppress transcellular calcium transport. This phenomenon is probably a part of the ultra-short negative feedback loop to prevent excessive calcium uptake by the enterocytes. In contrast to most humoral factors, e.g., 1,25(OH)₂D₃, 17 β -estradiol,

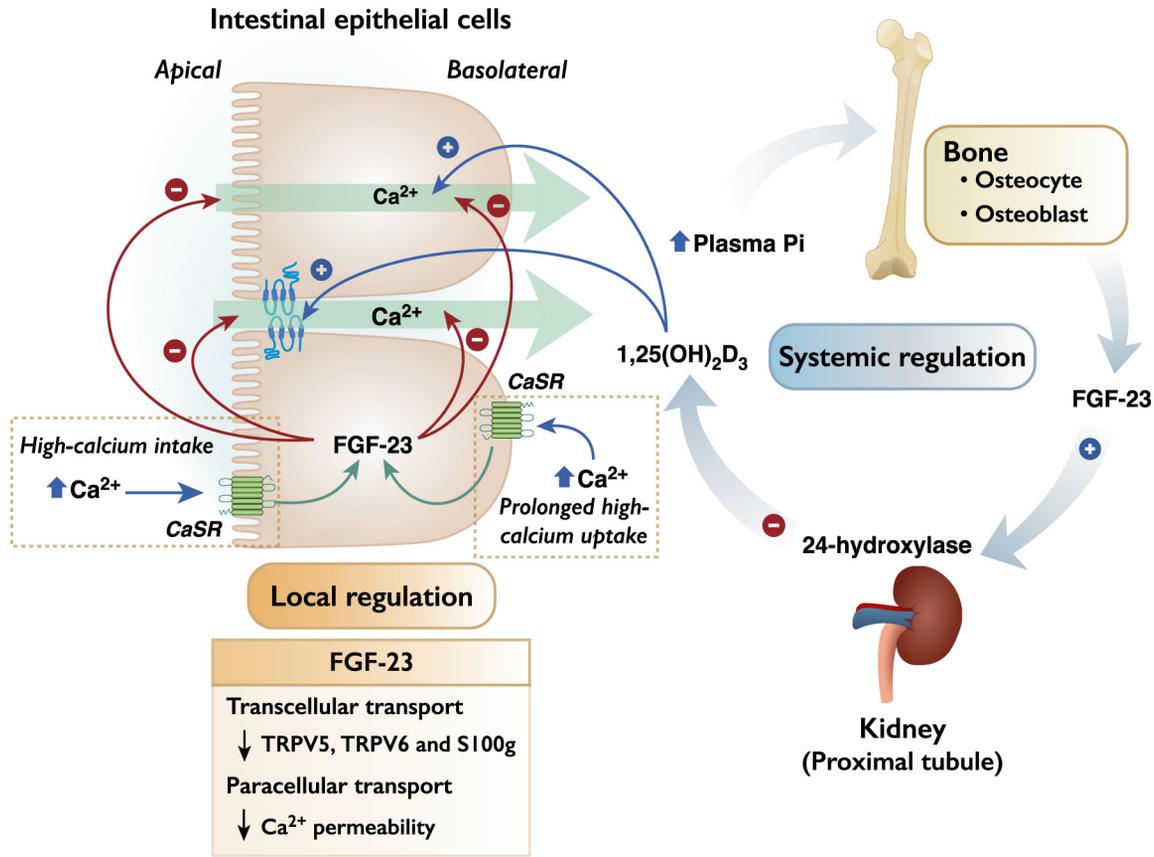


Figure 3. A schematic diagram of possible mechanisms of CaSR-FGF-23 local regulation of calcium absorption. Calcium-sensing receptor (CaSR) localized to the apical membrane is proposed to serve as anticipatory response to high luminal calcium to prevent hyperabsorption of calcium. CaSR at the basolateral membrane is hypothesized to counterbalance increased calcium absorption under prolonged high calcium intake. Activation of CaSR by high luminal calcium or CaSR agonists upregulates fibroblast growth factor (FGF)-23 in the enterocytes, which inhibits 1,25-dihydroxyvitamin D₃-mediated transcellular and paracellular calcium transport. FGF-23, fibroblast growth factor 23; S100G, S100 calcium-binding protein G or calbindin-D_{9k}; TRPV5/6, transient receptor potential channel, subfamily V, member 5/6.

prolactin, and growth hormone that are calciotropic (56, 57), FGF-23 appears to be the salient counterregulatory endocrine and paracrine factor for the regulation of calcium absorption. Furthermore, whether the role of CaSR in dampening excessive absorption of calcium is specific to certain intestinal segments—particularly the proximal small intestine where transcellular calcium transport predominantly occurs—remains inconclusive. Although there are a number of molecules and ions (e.g., magnesium, amino acids, and positively charged compounds) that can activate CaSR, it is unclear how they contribute to the regulation of calcium transport and/or how the enterocytes distinguish the signals from these compounds from those induced by calcium.

Finally, CaSR also plays an important inhibitory role in the regulation of the intestinal secretion of anions, particularly through CFTR, which can transport Cl⁻, HCO₃⁻, and some other halide anions. Both Cl⁻ and HCO₃⁻ as well as the resulting osmotic water flow are also crucial for calcium and phosphate absorption. Although it remains elusive whether similar mechanism occurs in mammals and whether CaSR contributes to the process, our recent investigations showed that the hypophosphatemic action of PTH could be explained by the stimulatory effect of PTH on HCO₃⁻ secretion and lumi-

nal fluid accumulation in the intestine (58) that favor precipitation of phosphate, and thus reduce phosphate absorption. On the other hand, appropriate fluid secretion and pH are required for calcium solubility. Future investigations are required to demonstrate whether calcium-induced CaSR activation is able to modulate anion and water secretion, which, in turn, alters calcium solubility and thus fine-tunes the amount of absorbed calcium.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Professor Nateetip Krishnamra for valuable comments on this review article.

GRANTS

Our research was supported by Grants from Mahidol University—Multidisciplinary Research Cluster Grant (to N.C.), the National Research Council of Thailand (to N.C.), Thailand Research Fund (TRF) through the International Research Network Program (IRN60W0001 to K.W. and N.C.), TRF—Office of the Higher Education Commission Research Grant for New Scholar (MRG6280198 to J.T.), Faculty of Allied Health Sciences, Burapha University (to K.W.), and Faculty of Science, Mahidol University (CIF and CNI Grant, to N.C.).

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

J.T. and N.C. prepared figures; K.C., J.T., K.W., and N.C. drafted manuscript; K.C., J.T., K.W., and N.C. edited and revised manuscript; K.C., J.T., K.W., and N.C. approved final version of manuscript.

REFERENCES

- Brown EM.** Extracellular Ca^{2+} sensing, regulation of parathyroid cell function, and role of Ca^{2+} and other ions as extracellular (first) messengers. *Physiol Rev* 71: 371–411, 1991. doi:10.1152/physrev.1991.71.2.371.
- Hendy GN, Canaff L, Cole DE.** The CASR gene: alternative splicing and transcriptional control, and calcium-sensing receptor (CaSR) protein: structure and ligand binding sites. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 27: 285–301, 2013. doi:10.1016/j.beem.2013.02.009.
- Ferrè S, Hoenderop JG, Bindels RJ.** Sensing mechanisms involved in Ca^{2+} and Mg^{2+} homeostasis. *Kidney Int* 82: 1157–1166, 2012. doi:10.1038/ki.2012.179.
- Lee JJ, Liu X, O'Neill D, Beggs MR, Weissgerber P, Flockerzi V, Chen XZ, Dimke H, Alexander RT.** Activation of the calcium sensing receptor attenuates TRPV6-dependent intestinal calcium absorption. *JCI Insight* 5: e128013, 2019. doi:10.1172/jci.insight.128013.
- Lin CH, Hu HJ, Hwang PP.** Molecular physiology of the hypocalcemic action of fibroblast growth factor 23 in zebrafish (*Danio rerio*). *Endocrinology* 158: 1347–1358, 2017. doi:10.1210/en.2016-1883.
- Wongdee K, Rodrat M, Keadsai C, Jantarajit W, Teerapornpantakit J, Thongbunchoo J, Charoenphandhu N.** Activation of calcium-sensing receptor by allosteric agonists cinacalcet and AC-265347 abolishes the $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -induced Ca^{2+} transport: evidence that explains how the intestine prevents excessive Ca^{2+} absorption. *Arch Biochem Biophys* 657: 15–22, 2018. doi:10.1016/j.abb.2018.09.004.
- Cheng SX, Okuda M, Hall AE, Geibel JP, Hebert SC.** Expression of calcium-sensing receptor in rat colonic epithelium: evidence for modulation of fluid secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283: G240–250, 2002. doi:10.1152/ajpgi.00500.2001.
- Kiela PR, Ghishan FK.** Ion transport in the intestine. *Curr Opin Gastroenterol* 25: 87–91, 2009. doi:10.1097/MOG.0b013e3283260900.
- Xie R, Dong X, Wong C, Vallon V, Tang B, Sun J, Yang S, Dong H.** Molecular mechanisms of calcium-sensing receptor-mediated calcium signaling in the modulation of epithelial ion transport and bicarbonate secretion. *J Biol Chem* 289: 34642–34653, 2014. doi:10.1074/jbc.M114.592774.
- Tang L, Peng M, Liu L, Chang W, Binder HJ, Cheng SX.** Calcium-sensing receptor stimulates Cl^- - and SCFA-dependent but inhibits cAMP-dependent HCO_3^- secretion in colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 308: G874–883, 2015. doi:10.1152/ajpgi.00341.2014.
- Geibel J, Sritharan K, Geibel R, Geibel P, Persing JS, Seeger A, Roepke TK, Deichstetter M, Prinz C, Cheng SX, Martin D, Hebert SC.** Calcium-sensing receptor abrogates secretagogue-induced increases in intestinal net fluid secretion by enhancing cyclic nucleotide destruction. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 9390–9397, 2006. doi:10.1073/pnas.0602996103.
- Cheng SX.** Calcium-sensing receptor inhibits secretagogue-induced electrolyte secretion by intestine via the enteric nervous system. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 303: G60–70, 2012. doi:10.1152/ajpgi.00425.2011.
- Sun X, Tang L, Winesett S, Chang W, Cheng SX.** Calcimimetic R568 inhibits tetrodotoxin-sensitive colonic electrolyte secretion and reduces c-fos expression in myenteric neurons. *Life Sci* 194: 49–58, 2018. doi:10.1016/j.lfs.2017.12.019.
- Ruhr IM, Takei Y, Grosell M.** The role of the rectum in osmoregulation and the potential effect of renoguanlylin on SLC26a6 transport activity in the Gulf toadfish (*Opsanus beta*). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 311: R179–191, 2016. doi:10.1152/ajpregu.00033.2016.
- Ruhr IM, Mager EM, Takei Y, and Grosell M.** The differential role of renoguanlylin in osmoregulation and apical $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange activity in the posterior intestine of the Gulf toadfish (*Opsanus beta*). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 309: R399–409, 2015. doi:10.1152/ajpregu.00118.2015.
- Ding X, Hu CA, Huang P, Li Y, He S, Yang H, Li J, Xie H, Yin Y.** Intestinal enteroendocrine L cells in amino acid sensing and diseases. *Front Biosci (Landmark Ed)* 23: 1740–1753, 2018. doi:10.2741/4670.
- Brennan SC, Davies TS, Schepelmann M, Riccardi D.** Emerging roles of the extracellular calcium-sensing receptor in nutrient sensing: control of taste modulation and intestinal hormone secretion. *Br J Nutr* 111: S16–22, 2014.
- Mace OJ, Schindler M, Patel S.** The regulation of K- and L-cell activity by GLUT2 and the calcium-sensing receptor CasR in rat small intestine. *J Physiol* 590: 2917–2936, 2012. doi:10.1113/jphysiol.2011.223800.
- Pais R, Gribble FM, Reimann F.** Signalling pathways involved in the detection of peptones by murine small intestinal enteroendocrine L-cells. *Peptides* 77: 9–15, 2016. doi:10.1016/j.peptides.2015.07.019.
- Acar I, Cetinkaya A, Lay I, Ileri-Gurel E.** The role of calcium sensing receptors in GLP-1 and PYY secretion after acute intraduodenal administration of L-Tryptophan in rats. *Nutr Neurosci* 23: 481–489, 2020. doi:10.1080/1028415X.2018.1521906.
- Feng J, Kang C, Wang C, Ding L, Zhu W, Hang S.** L-phenylalanine increased gut hormone secretion through calcium-sensing receptor in the porcine duodenum. *Animals (Basel)* 9: 476, 2019. doi:10.3390/ani9080476.
- Liou AP, Sei Y, Zhao X, Feng J, Lu X, Thomas C, Pechhold S, Raybould HE, Wank SA.** The extracellular calcium-sensing receptor is required for cholecystokinin secretion in response to L-phenylalanine in acutely isolated intestinal I cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 300: G538–546, 2011. doi:10.1152/ajpgi.00342.2010.
- Conigrave AD, Quinn SJ, Brown EM.** L-amino acid sensing by the extracellular Ca^{2+} -sensing receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 4814–4819, 2000. doi:10.1073/pnas.97.9.4814.
- Dawson-Hughes B, Harris SS, Rasmussen HM, Dallal GE.** Comparative effects of oral aromatic and branched-chain amino acids on urine calcium excretion in humans. *Osteoporos Int* 18: 955–961, 2007. doi:10.1007/s00198-006-0320-x.
- Xu J, Zeug A, Riederer B, Yeruva S, Griesbeck O, Daniel H, Tuo B, Ponimaskin E, Dong H, Seidler U.** Calcium-sensing receptor regulates intestinal dipeptide absorption via Ca^{2+} signaling and IK_{Ca} activation. *Physiol Rep* 8: e14337, 2020. doi:10.14814/phy2.14337.
- Leach K, Hannan FM, Josephs TM, Keller AN, Moller TC, Ward DT, Kallay E, Mason RS, Thakker RV, Riccardi D, Conigrave AD, Brauner-Osborne H.** International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CVIII. Calcium-sensing receptor nomenclature, pharmacology, and function. *Pharmacol Rev* 72: 558–604, 2020. doi:10.1124/pr.119.018531.
- Habener JF, Potts JT, Jr.** Relative effectiveness of magnesium and calcium on the secretion and biosynthesis of parathyroid hormone *in vitro*. *Endocrinology* 98: 197–202, 1976. doi:10.1210/endo-98-1-197.
- Quinn SJ, Thomsen AR, Egbuna O, Pang J, Baxi K, Goltzman D, Pollak M, Brown EM.** CaSR-mediated interactions between calcium and magnesium homeostasis in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 304: E724–733, 2013. doi:10.1152/ajpendo.00557.2012.
- Rodríguez-Ortiz ME, Canalejo A, Herencia C, Martínez-Moreno JM, Peralta-Ramírez A, Perez-Martinez P, Navarro-González JF, Rodríguez M, Peter M, Gundlach K, Steppan S, Passlick-Deetjen J, Muñoz-Castañeda JR, Almaden Y.** Magnesium modulates parathyroid hormone secretion and upregulates parathyroid receptor expression at moderately low calcium concentration. *Nephrol Dial Transplant* 29: 282–289, 2014. doi:10.1093/ndt/gft400.
- Centeno PP, Herberger A, Mun HC, Tu C, Nemeth EF, Chang W, Conigrave AD, Ward DT.** Phosphate acts directly on the calcium-sensing receptor to stimulate parathyroid hormone secretion. *Nat Commun* 10: 4693, 2019. doi:10.1038/s41467-019-12399-9.
- Geng Y, Mosyak L, Kurinov I, Zuo H, Sturchler E, Cheng TC, Subramanyam P, Brown AP, Brennan SC, Mun HC, Bush M, Chen Y, Nguyen TX, Cao B, Chang DD, Quick M, Conigrave AD,**

- Colecraft HM, McDonald P, Fan QR.** Structural mechanism of ligand activation in human calcium-sensing receptor. *Elife* 5: e13662, 2016. doi:10.7554/eLife.13662.
32. **Rodrat M, Wongdee K, Panupinthu N, Thongbunchoo J, Teerapornpantakit J, Krishnamra N, Charoenphandhu N.** Prolonged exposure to 1,25(OH)₂D₃ and high ionized calcium induces FGF-23 production in intestinal epithelium-like Caco-2 monolayer: a local negative feedback for preventing excessive calcium transport. *Arch Biochem Biophys* 640: 10–16, 2018. doi:10.1016/j.abb.2017.12.022.
33. **Moss NG, Fellner RC, Qian X, Yu SJ, Li Z, Nakazato M, Goy MF.** Uroguanylin, an intestinal natriuretic peptide, is delivered to the kidney as an unprocessed propeptide. *Endocrinology* 149: 4486–4498, 2008. doi:10.1210/en.2007-1725.
34. **Duflos C, Bellaton C, Pansu D, Bronner F.** Calcium solubility, intestinal sojourn time and paracellular permeability codetermine passive calcium absorption in rats. *J Nutr* 125: 2348–2355, 1995. doi:10.1093/jn/125.9.2348.
35. **Thongon N, Nakkrasae LI, Thongbunchoo J, Krishnamra N, Charoenphandhu N.** Enhancement of calcium transport in Caco-2 monolayer through PKC ζ -dependent Ca_v1.3-mediated transcellular and rectifying paracellular pathways by prolactin. *Am J Physiol Cell Physiol* 296: C1373–1382, 2009. doi:10.1152/ajpcell.00053.2009.
36. **Alexander RT, Rievaj J, Dimke H.** Paracellular calcium transport across renal and intestinal epithelia. *Biochem Cell Biol* 92: 467–480, 2014. doi:10.1139/bcb-2014-0061.
37. **Kantham L, Quinn SJ, Egbuna OI, Baxi K, Butters R, Pang JL, Pollak MR, Goltzman D, Brown EM.** The calcium-sensing receptor (CaSR) defends against hypercalcemia independently of its regulation of parathyroid hormone secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297: E915–923, 2009. doi:10.1152/ajpendo.00315.2009.
38. **Egbuna O, Quinn S, Kantham L, Butters R, Pang J, Pollak M, Goltzman D, Brown E.** The full-length calcium-sensing receptor dampens the calcemic response to 1 α ,25(OH)₂ vitamin D₃ in vivo independently of parathyroid hormone. *Am J Physiol Renal Physiol* 297: F720–728, 2009. doi:10.1152/ajprenal.00164.2009.
39. **Silver J, Naveh-Manly T, Mayer H, Schmelzer HJ, Popovtzer MM.** Regulation by vitamin D metabolites of parathyroid hormone gene transcription in vivo in the rat. *J Clin Invest* 78: 1296–1301, 1986. doi:10.1172/JCI112714.
40. **Chattopadhyay N, Cheng I, Rogers K, Riccardi D, Hall A, Diaz R, Hebert SC, Soybel DI, Brown EM.** Identification and localization of extracellular Ca²⁺-sensing receptor in rat intestine. *Am J Physiol* 274: G122–130, 1998. doi:10.1152/ajpgi.1998.274.1.G122.
41. **Gama L, Baxendale-Cox LM, Breitwieser GE.** Ca²⁺-sensing receptors in intestinal epithelium. *Am J Physiol* 273: C1168–1175, 1997. doi:10.1152/ajpcell.1997.273.4.C1168.
42. **Martin DR, Ritter CS, Slatopolsky E, Brown AJ.** Acute regulation of parathyroid hormone by dietary phosphate. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289: E729–734, 2005. doi:10.1152/ajpendo.00065.2005.
43. **Vervloet M.** Renal and extrarenal effects of fibroblast growth factor 23. *Nat Rev Nephrol* 15: 109–120, 2019. doi:10.1038/s41581-018-0087-2.
44. **Rodriguez-Benot A, Martin-Malo A, Alvarez-Lara MA, Rodriguez M, Aljama P.** Mild hyperphosphatemia and mortality in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 46: 68–77, 2005. doi:10.1053/j.ajkd.2005.04.006.
45. **Hori M, Kinoshita Y, Taguchi M, Fukumoto S.** Phosphate enhances Fgf23 expression through reactive oxygen species in UMR-106 cells. *J Bone Miner Metab* 34: 132–139, 2016. doi:10.1007/s00774-015-0651-9.
46. **Richter B, Faul C.** FGF23 actions on target tissues-with and without klotho. *Front Endocrinol (Lausanne)* 9: 189, 2018. doi:10.3389/fendo.2018.00189.
47. **Erben RG, Andrukhova O.** FGF23-Klotho signaling axis in the kidney. *Bone* 100: 62–68, 2017. doi:10.1016/j.bone.2016.09.010.
48. **Shimada T, Hasegawa H, Yamazaki Y, Muto T, Hino R, Takeuchi Y, Fujita T, Nakahara K, Fukumoto S, Yamashita T.** FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *J Bone Miner Res* 19: 429–435, 2004. doi:10.1359/JBMR.0301264.
49. **Khuituan P, Teerapornpantakit J, Wongdee K, Suntornsaratoon P, Konthapakdee N, Sangsaksri J, Sripong C, Krishnamra N, Charoenphandhu N.** Fibroblast growth factor-23 abolishes 1,25-dihydroxyvitamin D₃-enhanced duodenal calcium transport in male mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302: E903–913, 2012. doi:10.1152/ajpendo.00620.2011.
50. **Khuituan P, Wongdee K, Jantarajit W, Suntornsaratoon P, Krishnamra N, and Charoenphandhu N.** Fibroblast growth factor-23 negates 1,25(OH)₂D₃-induced intestinal calcium transport by reducing the transcellular and paracellular calcium fluxes. *Arch Biochem Biophys* 536: 46–52, 2013. doi:10.1016/j.abb.2013.05.009.
51. **Wongdee K, Teerapornpantakit J, Sripong C, Longkunan A, Chankamngoen W, Keadsai C, Kraidith K, Krishnamra N, Charoenphandhu N.** Intestinal mucosal changes and upregulated calcium transporter and FGF-23 expression during lactation: contribution of lactogenic hormone prolactin. *Arch Biochem Biophys* 590: 109–117, 2016. doi:10.1016/j.abb.2015.11.038.
52. **Murgue B, Tsunekawa S, Rosenberg I, deBeaumont M, Podolsky DK.** Identification of a novel variant form of fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3 IIIb) in human colonic epithelium. *Cancer Res* 54: 5206–5211, 1994.
53. **Takaishi S, Sawada M, Morita Y, Seno H, Fukuzawa H, Chiba T.** Identification of a novel alternative splicing of human FGF receptor 4: soluble-form splice variant expressed in human gastrointestinal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 267: 658–662, 2000. doi:10.1006/bbrc.1999.2010.
54. **Chen G, Liu Y, Goetz R, Fu L, Jayaraman S, Hu MC, Moe OW, Liang G, Li X, Mohammadi M.** α -Klotho is a non-enzymatic molecular scaffold for FGF23 hormone signalling. *Nature* 553: 461–466, 2018. doi:10.1038/nature25451.
55. **Bar L, Stournaras C, Lang F, Foller M.** Regulation of fibroblast growth factor 23 (FGF23) in health and disease. *FEBS Lett* 593: 1879–1900, 2019. doi:10.1002/1873-3468.13494.
56. **Diaz de Barboza G, Guizzardi S, Tolosa de Talamoni N.** Molecular aspects of intestinal calcium absorption. *World J Gastroenterol* 21: 7142–7154, 2015. doi:10.3748/wjg.v21.i23.7142.
57. **Thongon N, Nakkrasae LI, Thongbunchoo J, Krishnamra N, Charoenphandhu N.** Prolactin stimulates transepithelial calcium transport and modulates paracellular permselectivity in Caco-2 monolayer: mediation by PKC and ROCK pathways. *Am J Physiol Cell Physiol* 294: C1158–1168, 2008. doi:10.1152/ajpcell.00020.2008.
58. **Laohapitakworn S, Thongbunchoo J, Nakkrasae LI, Krishnamra N, Charoenphandhu N.** Parathyroid hormone (PTH) rapidly enhances CFTR-mediated HCO₃⁻ secretion in intestinal epithelium-like Caco-2 monolayer: a novel ion regulatory action of PTH. *Am J Physiol Cell Physiol* 301: C137–149, 2011. doi:10.1152/ajpcell.00001.2011.

ภาคผนวก

ผลงานตีพิมพ์วารสารระดับนานาชาติ เรื่องที่ 3

Comprehensive Physiology - Decision on Manuscript ID CPHY-20-0014.R2 [email ref: DL-RW-1-a]



Pradeep Dudeja <onbehalf@manuscriptcentral.com>

naratt@narattsys.com; jarintee@gmail.com

Friday, 25 December AD 2020 1:46 AM

[Show Details](#)

24-Dec-2020

Dear Prof. Charoenphandhu:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Intestinal calcium absorption" in its current form for publication in Comprehensive Physiology. The comments of the reviewer(s) who reviewed your manuscript are included at the foot of this letter.

Please note although the manuscript is accepted the files will now be checked to ensure that everything is ready for publication, and you may be contacted if final versions of files for publication are required.

Unless you have already sent them, permission letters, if applicable, are now due. Your manuscript will not go into production until they have been sent as scanned pdfs to mareich@wiley.com. Remember that you do not need to request permission from the APS to reuse any content from APS Journals or Handbooks, as long as it is referenced.

If you have not done so already you should now supply your completed Copyright form, which can be located under "Instructions and Forms" on the submission site at <https://mc.manuscriptcentral.com/cphy>. Please print it out, sign it and have your co-authors sign it, scan it and attach it to an email to cphy@wiley.com.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of Comprehensive Physiology, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,
Dr. Pradeep Dudeja
Editor, Comprehensive Physiology
pkdudeja@uic.edu



Intestinal calcium absorption

Journal:	<i>Comprehensive Physiology</i>
Manuscript ID	CPHY-20-0014.R2
Wiley - Manuscript type:	Overview Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Wongdee, Kannikar; Burapha University, Faculty of Allied Health Sciences Chanpaisaeng, Krittikarn; National Science and Technology Development Agency, Functional Ingredients and Food Innovation Research Group, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) Teerapornpuntakit, Jarinthorn; Naresuan University, Department of Physiology, Faculty of Medical Science Charoenphandhu, Narattaphol; Mahidol University Faculty of Science, Physiology
Keywords:	parathyroid hormone < Endocrinology and Metabolism, absorption < Gastrointestinal and Liver Physiology, intestine < Gastrointestinal and Liver Physiology
Abstract:	In this review article, we focus on mammalian calcium absorption across the intestinal epithelium in normal physiology. Intestinal calcium transport is essential for supplying calcium for metabolism and bone mineralization. Dietary calcium is transported across the mucosal epithelia via saturable transcellular and non-saturable paracellular pathways, both of which are under the regulation of 1,25-dihydroxyvitamin D ₃ and several other endocrine and paracrine factors, such as parathyroid hormone, prolactin, 17 β -estradiol, calcitonin and fibroblast growth factor-23. Calcium absorption occurs in several segments of the small and large intestine with varying rates and capacities. Segmental heterogeneity also includes differential expression of calcium transporters/carriers (e.g., transient receptor potential cation channel and calbindin-D _{9k}) and the presence of favorable factors (e.g., pH, luminal contents and gut motility). Other proteins and transporters (e.g., plasma membrane vitamin D receptor and voltage-dependent calcium channels) as well as vesicular calcium transport that probably contributes to intestinal calcium absorption are also discussed.

Manuscript ID CPHY-20-0014.R2

REVISED MANUSCRIPT

Intestinal calcium absorption

Kannikar Wongdee^{1,2}, Krittikarn Chanpaisaeng^{2,3}, Jarinthorn Teerapornpuntakit^{2,4},
Narattaphol Charoenphandhu^{2,5,6,7*}

¹ Faculty of Allied Health Sciences, Burapha University, Chonburi, Thailand

² Center of Calcium and Bone Research (COCAB), Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand

³ Functional Ingredients and Food Innovation Research Group, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), Thailand Science Park, Pathum Thani, Thailand

⁴ Department of Physiology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand

⁵ Department of Physiology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand

⁶ Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University, Nakhon Pathom, Thailand

⁷ The Academy of Science, The Royal Society of Thailand, Bangkok, Thailand

Type of article: Overview article

Short title: Intestinal calcium absorption

To whom correspondence should be addressed:

Narattaphol Charoenphandhu, M.D., Ph.D.

Department of Physiology

Faculty of Science, Mahidol University

Rama VI Road, Bangkok 10400

Thailand

Tel & Fax: +66-2-354-7154

E-mail: naratt@narattsys.com

Keywords: endocrine control of calcium absorption; paracellular calcium transport; segmental heterogeneity; transcellular calcium transport; vitamin D

Abstract

In this review article, we focus on mammalian calcium absorption across the intestinal epithelium in normal physiology. Intestinal calcium transport is essential for supplying calcium for metabolism and bone mineralization. Dietary calcium is transported across the mucosal epithelia via saturable transcellular and non-saturable paracellular pathways, both of which are under the regulation of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and several other endocrine and paracrine factors, such as parathyroid hormone, prolactin, 17β-estradiol, calcitonin and fibroblast growth factor-23. Calcium absorption occurs in several segments of the small and large intestine with varying rates and capacities. Segmental heterogeneity also includes differential expression of calcium transporters/carriers (e.g., transient receptor potential cation channel and calbindin-D_{9k}) and the presence of favorable factors (e.g., pH, luminal contents and gut motility). Other proteins and transporters (e.g., plasma membrane vitamin D receptor and voltage-dependent calcium channels) as well as vesicular calcium transport that probably contributes to intestinal calcium absorption are also discussed.

Didactic synopsis

Major teaching points:

- Polarity is an important aspect of epithelia. Epithelial cells including intestinal enterocytes have 2 domains, i.e., apical and basolateral domains. Apical domain is exposed to lumen or external environment and responsible for absorption and protection. Basolateral domain is associated with neighboring epithelial cells and the basement membrane.
- Calcium (Ca²⁺—as free-ionized calcium) traverses the intestinal epithelia via transcellular and paracellular pathways.

- Transcellular Ca^{2+} transport is a three-step process consisting of TRPV6-mediated apical calcium uptake, cytoplasmic diffusion of Ca^{2+} -laden calbindin- D_{9k} , and PMCA_{1b} - and NCX1 -mediated basolateral calcium extrusion.
- Paracellular Ca^{2+} transport is determined by tight junction permselectivity and the expression of tight junction proteins, e.g., claudin-2, -12 or -15 as well as perijunctional actomyosin ring remodeling.
- The calcitropic hormone 1,25-dihydroxyvitamin D_3 (an active form of vitamin D) is a potent positive regulator of transcellular and paracellular calcium absorption.
- A number of humoral factors (e.g., fibroblast growth factor-23 and calcitonin) and certain luminal factors (e.g., iron and alkaline pH in the bulk phase of intestinal lumen) can reduce intestinal calcium absorption.
- Neural regulation of intestinal calcium absorption by enteric nervous system is plausible but direct evidence to support this notion is scant and inconclusive.

1
2
3 The information pertaining to negative regulators or counterbalancing factors is scant.
4
5 Local and systemic FGF-23 system as well as CaSR expressed in the enterocytes probably help
6
7 prevent calcium hyperabsorption as parts of a negative feedback loop, but little is known on how
8
9 these mediators regulate the function of calcium transporters in the absorptive villous epithelial
10
11 cells. Since the rate of calcium absorption is dependent on nutrient contents in meals, such as
12
13 sodium, amino acids, oligopeptides, prebiotic derivatives and small acidic molecules (60, 80, 95,
14
15 240), the cellular mechanisms of calcium absorption must be different among different human
16
17 populations and species in different habitats with a wide variety of diets. However, intestinal
18
19 calcium absorption of some species (e.g., *Cryptomys damarensis* and *Heterocephalus glaber*) has
20
21 been reported to be independent of vitamin D (188). Therefore, there are other calciotropic factors
22
23 yet to be identified.
24
25
26
27
28
29
30

31 **Acknowledgments**

32
33 The authors thank Professor Nateetip Krishnamra for valuable comments on this review article
34
35 and Thitapha Kiattisirichai for artwork. Our research was supported by grants from Mahidol
36
37 University–Multidisciplinary Research Cluster Grant (to NC), the Thailand Research Fund (TRF)
38
39 through the TRF Senior Research Scholar Grant (RTA6080007 to NC), TRF International
40
41 Research Network Program (IRN60W0001 to KW and NC), TRF–Office of the Higher Education
42
43 Commission Research Grant for New Scholar (MRG6280198 to JT), Faculty of Allied Health
44
45 Sciences, Burapha University (to KW), National Research Council of Thailand (NRCT, to NC),
46
47 and Faculty of Science, Mahidol University (CIF and CNI grant, to NC).
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60