

Thesis Title	Effects of the Aqueous Extract of <i>Gynostemma pentaphyllum</i> (Thunb.) Makino on Insulin Resistance in High-Fat Diet with Streptozotocin Induced Type 2 Diabetic Rats	
Author	Miss Waranya Keapai	
Degree	Master of Science (Physiology)	
Thesis Advisory Committee	Dr. Narissara Lailerd	Advisor
	Asst. Prof. Dr. Anchalee Pongchaidecha	Co-advisor

ABSTRACT

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a complex heterogeneous group of metabolic disorders including impairment of peripheral tissue to insulin action and/or insulin secretion. Insulin resistance is a major hallmark of T2DM and obesity in the skeletal muscle. The insulin resistance is characterized by the impairment of insulin-mediated glucose transport and glycogen synthesis, and the increased intramyocellular content of lipid metabolites. An elevated plasma free fatty acid (FFA) is a risk factor for developing insulin resistance because it directly inhibits glucose transport to the skeletal muscle and causes triglyceride accumulation in the muscle, which is an early step in the development of FFA-induced insulin resistance. *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino (GP) displays anti-hyperglycemic and lipid-lowering actions in both diabetic patients and diabetic rats. However, the effects of GP on the insulin resistance in diabetic condition have not been investigated. In addition, most of the beneficial health effects of GP previously reported was obtained from the ethanol extract of GP compared with the aqueous extract. In present study, we investigated the effect of aqueous extract of GP (GPE) in ameliorating insulin resistance in the high-fat diet with streptozotocin (STZ) induced type 2 diabetic rat model.

Adult male Wistar rats were divided into four groups of 8 each; normal control (NC), normal with GPE supplement (NC-GPE) group, diabetic control (DMC), and diabetes with GPE supplement (DM-GPE). Type 2 diabetes was induced by a model of high-fat diet fed with a low-dose STZ injection. The extract of GP (300 mg/kg body weight) was daily administered by oral gavage to the NC-GPE and DM-GPE groups for 20 weeks. An oral glucose tolerance test (OGTT) was performed at the end of experiment. At the end of experiment, the animals were sacrificed, and then blood and tissue samples were collected for biochemical analyses. Triglyceride contents in the liver and skeletal muscles were determined. Glucose transporter 4 (GLUT4), insulin receptor substrate-1 (IRS-1) expression, the serine 307 phosphorylation of IRS-1, protein kinase C- θ (PKC- θ) expression and the threonine 538 phosphorylation of PKC- θ were examined using immunoblotting technique.

Visceral obesity with the significant increases of fasting plasma glucose, triglyceride, and FFA levels including the marked triglyceride accumulations in liver and skeletal muscles were observed in the DMC group ($p < 0.05$). There was also, an impaired glucose tolerance as indicated by an increase in total area under the curve for glucose (TAUC_g) and the corresponding increase of HOMA index in the DMC group. In addition, the significant decreases in total GLUT4 protein content and IRS-1 protein expression ($p < 0.05$), with the apparent increases in the IRS-1 Ser 307 phosphorylation, expression and phosphorylation of PKC- θ ($p < 0.05$) were also noted in the soleus muscle of the DMC group.

GPE supplement significantly decreased fasting plasma parameters and triglyceride contents in the liver and skeletal muscle ($p < 0.05$). The significant decreases in HOMA index and TAUC_g in the DM-GPE group indicated an improved insulin sensitivity. In addition, the IRS-1 Ser 307 phosphorylation significantly decreased in parallel with an apparent reduction in the expression and phosphorylation of PKC- θ in soleus muscle of the DM-GPE group compared with the DMC group ($p < 0.05$). Also, the total GLUT4 protein content was significantly restored in the DM-GPE group.

These study results suggested that T2DM rats induced by high-fat diet with STZ injection had hyperglycemia and visceral obesity with apparent insulin resistance.

GPE supplement showed anti-hyperglycemic and lipid-lowering effects together with enhanced insulin sensitivity in diabetic rats. GPE supplement also ameliorated the impaired proximal insulin signaling, PKC- θ signaling and glucose transport system in skeletal muscle of diabetic rats which might be secondary to the decreased hyperlipidemia. These findings indicate that GPE used in the present study may have potential in prevention and/or in treatment of diabetes and the pre-diabetic state of insulin resistance.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	ผลของสารสกัดน้ำของปัญจันธุ์ต่อภาวะคืออินซูลินในหนูที่เหนียวทำให้เกิดเบาหวานชนิดที่ 2 ด้วยอาหารไขมันสูงร่วมกับสเตปโตโซโตซิน	
ผู้เขียน	นางสาววิญญา เกื้ออภัย	
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สรีรวิทยา)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ดร. นริศรา ไล่เลิศ	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	ผศ. ดร. อัญชลี พงศ์ชัยเดชา	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

โรคเบาหวานชนิดที่ 2 เป็นกลุ่มอาการที่มีความผิดปกติของเมแทบอลิซึมที่ซับซ้อน ซึ่งประกอบด้วยความผิดปกติของการตอบสนองและ/หรือการหลั่งฮอร์โมนอินซูลิน ภาวะคือต่ออินซูลิน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกล้ามเนื้อเนื้อลายเป็นลักษณะสำคัญที่พบในโรคเบาหวานชนิดที่ 2 และโรคอ้วน มีผลให้เกิดความบกพร่องของการขนส่งกลูโคสเข้าสู่เซลล์ที่พึ่งฮอร์โมนอินซูลินและการสร้างไกลโคเจน รวมทั้งก่อให้เกิดการเพิ่มปริมาณของไขมันภายในกล้ามเนื้อ การเพิ่มขึ้นของกรดไขมันอิสระในพลาสมาเป็นอีกปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญต่อการเกิดภาวะคือต่ออินซูลิน เนื่องจากกรดไขมันอิสระมีผลยับยั้งกระบวนการขนส่งกลูโคสเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อและทำให้เกิดการสะสมของไตรกลีเซอไรด์ในกล้ามเนื้อเนื้อลาย ซึ่งถือว่าเป็นภาวะแรกเริ่มในการพัฒนาไปสู่ภาวะคือต่ออินซูลินที่ถูกเหนียวมาโดยกรดไขมันอิสระ ปัญจันธุ์ (*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino, GP) หรือเจียวกู่หลานเป็นสมุนไพรที่มีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลและไขมันในเลือดจากการศึกษาในคนและสัตว์ทดลองที่มีภาวะเบาหวาน แต่อย่างไรก็ตามผลของปัญจันธุ์หรือสารสกัดปัญจันธุ์ต่อภาวะคือต่ออินซูลินในโรคเบาหวานยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน นอกจากนี้การศึกษาที่เกี่ยวข้องกับประโยชน์ต่อสุขภาพนั้นมักใช้สารสกัดปัญจันธุ์ด้วยเอทานอลเป็นส่วน

ใหญ่ ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงได้ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดด้วยน้ำของปัญจขันธ์ต่อการลดการเกิดภาวะ
 คีโตอินซูลินในหนูเบาหวานชนิดที่ 2 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยอาหารไขมันสูงร่วมกับการฉีดสเตรปโต
 โซโตซิน

หนูขาวเพศผู้พันธุ์ Wistar แบ่งเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 8 ตัว ประกอบด้วย กลุ่มหนูปกติควบคุม
 (NC) กลุ่มหนูปกติที่ได้รับสารสกัดปัญจขันธ์ (NC-GPE) กลุ่มหนูเบาหวานควบคุม (DMC)
 และกลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับสารสกัดปัญจขันธ์ (DM-GPE) การเหนี่ยวนำภาวะเบาหวานชนิดที่
 2 ทำโดยการให้อาหารไขมันสูงร่วมกับการฉีดสารพิษสเตรปโตโซโตซินในขนาดต่ำ ทำการป้อน
 สารสกัดปัญจขันธ์ขนาด 300 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมทางปากเป็นเวลา 20 สัปดาห์
 ในสัปดาห์ที่ 20 ทำการทดสอบความทนทานต่อการให้กลูโคสทางปาก และเมื่อสิ้นสุดการทดลอง
 ทำการเก็บตัวอย่างเลือดและเนื้อเยื่อเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ทางชีวเคมี ตรวจวัดไตรกลีเซอไรด์ใน
 ดับและกล้ามเนื้อ นอกจากนี้ยังทำการตรวจวัดการแสดงออกของโปรตีนขนส่งกลูโคสชนิดที่ 4
 (GLUT4) อินซูลินรีเซพเตอร์ซับสเตรทที่ 1 (IRS-1) อินซูลินรีเซพเตอร์ซับสเตรทที่ 1 ซึ่งถูกเติม
 หมู่ฟอสเฟตในตำแหน่งของเซอธิน 307 (IRS-1 Ser 307 phosphorylation) โปรตีนไคเนสซี
 ที่ต่ำ (PKC- θ) และโปรตีนไคเนสซี ที่ต่ำที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตในตำแหน่งที่ไธโอนีน 538 (PKC- θ
 Thr 538 phosphorylation) ในกล้ามเนื้อโซเลียสโดยใช้เทคนิคอิมมูโนบลอตทิ้ง

ผลการศึกษาพบว่าหนูกลุ่ม DMC มีลักษณะอ้วนลงพุง (visceral obesity) ร่วมกับมีภาวะ
 น้ำตาลในพลาสมาสูง การเพิ่มขึ้นของไตรกลีเซอไรด์และกรดไขมันอิสระในพลาสมา รวมทั้งการ
 สะสมของไตรกลีเซอไรด์ในเนื้อเยื่อดับและกล้ามเนื้อเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังพบ
 ภาวะบกพร่องของความทนทานต่อกลูโคสโดยมีข้อบ่งชี้จากการเพิ่มขึ้นของพื้นที่ใต้กราฟของ
 กลูโคส (TAUC_g) และดัชนีบ่งชี้ภาวะคีโตอินซูลิน (HOMA index) อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่ง
 สอดคล้องกับการลดลงของการแสดงออกของโปรตีน GLUT4 และ IRS-1 ร่วมกับการเพิ่มขึ้นของ
 IRS-1 Ser 307 phosphorylation การแสดงออกของโปรตีน PKC- θ และ PKC- θ Thr 538
 phosphorylation ในกล้ามเนื้อโซเลียสอย่างมีนัยสำคัญ

การให้สารสกัดปัญจขันธ์ในหนูกลุ่ม DM-GPE พบว่าระดับกลูโคสและสารชีวเคมีอื่นๆใน
 พลาสมาลดลงอย่างมีนัยสำคัญร่วมกับการลดลงของปริมาณสะสมของไตรกลีเซอไรด์ในดับและ
 กล้ามเนื้อ การลดลงอย่างมีนัยสำคัญของ TAUC_g และ HOMA index ซึ่งบ่งชี้ว่ามีระดับความไว

ต่อการตอบสนองต่ออินซูลินเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบการลดลงของ IRS-1 Ser 307 phosphorylation ร่วมกับการแสดงออกของโปรตีน PKC- θ และ PKC- θ Thr 538 phosphorylation ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับหนูกลุ่ม DMC ซึ่งสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของโปรตีน GLUT4

จากผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าหนูเบาหวานชนิดที่ 2 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยอาหารไขมันสูงร่วมกับการฉีดสารสเตโรยโตโซโตซินจะมีภาวะน้ำตาลกลูโคสในเลือดสูงและภาวะอ้วนร่วมกับภาวะดื้อต่ออินซูลิน การให้สารสกัดปัญจชันเป็นเวลา 20 สัปดาห์สามารถลดระดับกลูโคสและไขมันในเลือดร่วมกับการเพิ่มความไวต่อการตอบสนองต่ออินซูลินในหนูเบาหวานได้ นอกจากนี้การให้สารสกัดปัญจชันยังสามารถช่วยบรรเทาความผิดปกติของการส่งสัญญาณอินซูลินในส่วนต้นและการส่งสัญญาณผ่าน PKC- θ รวมถึงระบบการขนส่งกลูโคสในกล้ามเนื้อลายของหนูเบาหวานได้ ซึ่งกลไกส่วนหนึ่งนี้น่าจะเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ในการลดระดับไขมันในเลือดของสารสกัดปัญจชัน ดังนั้นการศึกษานี้จึงแสดงให้เห็นศักยภาพของสารสกัดปัญจชันที่ใช้ในการวิจัยนี้ในการป้องกันและ/หรือเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาทั้งโรคเบาหวานและภาวะดื้อต่ออินซูลินซึ่งเป็นพยาธิสภาพสำคัญที่มักพบก่อนการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2