รายงานการวิจัย

เรื่อง

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดแห้มต่อการลดระดับน้ำตาลในกระแสเลือดของหนูขาว การกระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากตับอ่อน และการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟ่า-กลูโคซิเดส

The effects of *Costinium fenestratum* extract on lowering blood glucose level in rats, the stimulatory effect on insulin secretion from perfused rat pancrease and the inhibitory effect on alpha–glucosidase

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดย

รศ.สพ.ญ.ดร. ศิรินทร หยิบโชคอนันต์
ภาควิชา เภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
อ.ดร. ดำรง สมมิตร์
ภาควิชา เคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัย เทคโนโลยีมหานคร

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนเงินทุนวิจัยจากทุนงบประมาณแผ่นดิน ปี พ.ศ. 2548

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

แห้ม *(Coscinium fenestratum)* เป็นสมุนไพรที่มีสรรพคุณในการรักษาโรคเบาหวาน โดยมีผู้นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย ในขณะที่รายงานการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของแห้มยังมีไม่มากนัก จึงเป็นที่มาของการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ โดยวัตถุประสงค์ของการวิจัยคือ การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดเอธานอลจากแห้ม ต่อการลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูปกติและหนูเบาหวาน และศึกษากลไกการออกฤทธิ์ต่อการกระตุ้นการหลั่งอินซูลินโดยตรงจากตับอ่อน และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส โดยเฉพาะเอนไซม์มอลเตส และ ซูเครส

จากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดแห้มต่อการลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูปกติและหนูเบาหวานด้วยวิธี oral glucose tolerance test (OGTT) โดยการป้อนน้ำตาล 3 ชนิด ได้แก่ กลูโคส, มอลโตส และ ซูโครส พบว่า สารสกัดแห้ม ขนาด 250 - 1000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม สามารถยับยั้งระดับน้ำตาลที่เพิ่มขึ้นในหนูปกติกลุ่มที่ได้รับน้ำตาลทั้ง 3 ชนิด และการยับยั้งนี้จะผันแปรตามขนาดของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น ส่วนในหนูเบาหวานพบว่า สารสกัดแห้มขนาด 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม สามารถลดระดับน้ำตาลได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในหนูกลุ่มที่ได้รับการป้อนน้ำตาล กลูโคส และ มอลโตส และไม่มีผลลดระดับน้ำตาลในหนูกลุ่มที่ได้รับการป้อนน้ำตาล ซูโครส

จากนั้นคณะผู้วิจัยได้ทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดแห้มต่อการกระตุ้นการหลั่งอินซูลินโดยตรงจากตับอ่อน และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส จากลำไส้เล็กของหนูขาว โดยเฉพาะเอนไซม์มอลเตส และ ซูเครส พบว่าสารสกัดแห้มขนาด 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถกระตุ้นการหลั่งอินซูลินได้ในลักษณะของ biphasic คือมีการเพิ่มขึ้นของระดับอินซูลินอย่างรวดเร็วจากนั้นระดับอินซูลินจะลดต่ำลงและคงที่อยู่ในระดับหนึ่ง ที่สูงกว่าระยะพักเล็กน้อย ในขณะที่ berberine ณ ความเข้มข้นเดียวกัน สามารถกระตุ้นการหลั่งอินซูลินได้อย่างช้าๆ และเพียงเล็กน้อย โดยรูปแบบการเพิ่มขึ้นเป็นแบบ monophasic ซึ่งผลจากการทดลองบ่งชี้ว่า ฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในกระแสเลือดของสารสกัดแห้มน่าจะมีผลมาจากการกระตุ้นการหลั่งอินซูลินโดยตรงจากตับอ่อน นอกจากนี้สารสกัดแห้มยังสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ มอลเตส ได้ดีกว่า ซูเครส ซึ่งผลที่ได้จะคล้ายคลึงกับ ยา acarbose ที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุม

เมื่อทำการศึกษาฤทธิ์กึ่งเฉียบพลันของสารสกัดเอธานอลจากแห้มทำโดยการป้อนทางปากในขนาด 500 มก./กก./วัน ติดต่อกันนาน 30 วัน ต่อระดับน้ำตาลและไขมันในเลือด รวมทั้งการทำงานของตับและไตในหนูปกติและหนูเบาหวาน พบว่า สารสกัดเอธานอลจากแห้ม ไม่มีผลต่อระดับน้ำตาลในเลือด ระดับไขมัน และการทำงานของตับในหนูปกติ ส่วนในหนูเบาหวานสารสกัดเอธานอลจากแห้มไม่มีผลต่อการเพิ่มของน้ำหนักตัว มีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญ ลดระดับโคเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ได้เล็กน้อย แต่เพิ่มระดับ HDL ได้ และไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการทำงานของตับ แต่อาจมีอันตรายต่อไตได้โดยเฉพาะในหนูปกติ

จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้นสรุปได้ว่า สารสกัดเอธานอลจากแห้ม มีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ทั้งในหนูปกติและหนูเบาหวาน โดยมีกลไกการออกฤทธิ์ผ่านทางการกระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากตับอ่อน และการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ มอลเตส และ ซูเครส ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำสารสกัดเอธานอลจากแห้มมาพัฒนาเป็นยารักษาโรคเบาหวานต่อไปในอนาคต แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดเอธานอลจากแห้มอาจมีอันตรายต่อไตได้ จึงควรจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดแห้มโดยทำการทดสอบในระยะเวลาที่นานขึ้น เช่น 6 เดือน ถึง 1 ปี โดยเฉพาะอย่างยิ่งการทดสอบในหนูเบาหวานต่อไป

Abstract

Coscinium fenestratum (Gaertn.) Colebr. or "Hamm" has been widely used as a traditional medicine. The request to use this plant in diabetes is increasing. However, the scientific information in biological activities of *C. fenestratum* is limited, therefore, the study on pharmacological effects of this plant is necessary. The objective of this study was to investigate 1) the effects of *C. fenestratum* extract (CFE) on blood glucose level in normal and diabetic rats 2) the stimulatory effects on insulin secretion from perfused rat pancreas and 3) the inhibitory effects of rat intestinal enzymes α-glucosidase, maltase and sucrase.

The anti-hyperglycemic effects of CFE on plasma glucose levels were studied in both normal and streptozotocin-induced diabetic rats by performing OGTT with several kinds of sugar, glucose, maltose and sucrose. In normal rats, the CFE at concentrations of 250-1000 mg/kg inhibited increases of plasma glucose levels in all three kinds of sugar-loaded rats in a dose-dependent manner. In diabetic rats, CFE (500 mg/kg) significantly decreased plasma glucose levels in glucose and maltose loaded rats, while it did not demonstrated the statistical hypoglycemic effect in sucrose-loaded rats.

We investigated the stimulatory effect of CFE on insulin secretion from perfused rat pancrease and its inhibitory activity on rat intestinal α-glucosidase, maltase and sucrase. The result showed that CFE (10 μg/ml) significantly increased insulin secretion in a biphasic pattern, a peak followed by a sustained phase. However, berberine at the same concentration had slightly and gradually stimulated insulin secretion in a monophasic pattern. The results indicated that the *in vivo* hypoglycemic effect of CFE was due to stimulation of insulin secretion from pancreatic β-cells. In addition, CFE is able to inhibit *in vitro* activities of maltase better than sucrase, which is similar to acarbose.

Subacute effects of CFE on blood glucose levels and blood chemistry in normal and diabetic rats were studied by feeding CFE 500 mg/kg/day for 30 days. We found that CFE had no effects on blood glucose levels, lipid profiles, and liver functions in normal rats. However, it significantly decreased plasma glucose levels of diabetic rats without affecting the increase of their body weights. The cholesterol and triglyceride levels in diabetic rats were slightly decreased while HDL was significantly increased after CFE feeding. In addition, CFE did not affect the levels of AST and ALT in serum of all rats, but it elevated both serum BUN and creatinine levels in normal rats.

Taken together, it is concluded that the crude ethanol extract of *C. fenestratum* had anti-hyperglycemic action in both normal and STZ-induced diabetic rats. The mechanisms underlying hypoglycemic activity of CFE were at least having a partial stimulation effect on insulin secretion and inhibition of intestinal α-glucosidase, maltase and sucrase. Thus, this compound is potetial to be developed as a new drug for treating diabetes in the future. However, its effect on renal function should be concerned and more toxicological data on renal toxicity is needed to establish the safety of this extract.

สารบัญเรื่อง

หน้า

กิตติกรรมประกาศ 2

บทคัดย่อ (ภาษาไทย) 3

Abstract (English) 4

สารบัญตาราง 6

สารบัญรูปภาพ 7

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ 9

ส่วนประกอบเนื้อเรื่อง

1. บทนำ 10

2. วิธีดำเนินการวิจัย 11

3. ผลการวิจัย 14

4. อภิปรายและสรุปผลการวิจัย 30

บรรณานุกรม 33

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตาราง หน้า

1. ค่าเฉลี่ยของระดับน้ำตาลในเลือดในหนูขาว เมื่อทดสอบด้วยวิธี oral glucose 16
tolerance test (OGTT) โดยใช้น้ำตาลกลูโคส เป็นสารตั้งต้น (n=8)
2. ร้อยละของระดับน้ำตาลในเลือดที่ลดลงในหนูขาวกลุ่มที่ป้อนน้ำตาลกลูโคส.....17
ปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม
3. ค่าเฉลี่ยของระดับน้ำตาลในเลือดในหนูขาว เมื่อทดสอบด้วยวิธี oral glucose.....18
tolerance test (OGTT) โดยใช้น้ำตาลมอลโตส เป็นสารตั้งต้น (n=8)
4. ร้อยละของระดับน้ำตาลในเลือดที่ลดลงในหนูขาวกลุ่มที่ป้อนน้ำตาลมอลโตส 19
เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม
5. ค่าเฉลี่ยของระดับน้ำตาลในเลือดในหนูขาว เมื่อทดสอบด้วยวิธี oral glucose.....20
tolerance test (OGTT) โดยใช้น้ำตาลซูโครส เป็นสารตั้งต้น (n=8)
6. ร้อยละของระดับน้ำตาลในเลือดที่ลดลงในหนูขาวกลุ่มที่ป้อนน้ำตาลซูโครส.....21
เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม
7. แสดงความเข้มข้นของสารสกัดแห้ม และ acarbose ต่อการยับยั้งการทำงาน.....27
ของเอนไซม์อัลฟากลูโคซิเดส จากลำไส้เล็กของหนูขาว

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูปภาพ

รูปภาพ หน้า

1 ผลจาก TLC ของสารสกัดแห้มเปรียบเทียบกับ berberine ที่ใช้อ้างอิง 14

2 แสดงตำแหน่งของ ^{1}H และ ^{13}C ของ berberine 15

3 ค่าเฉลี่ยของระดับน้ำตาลในเลือดในหนูขาว เมื่อทดสอบด้วยวิธี oral glucose tolerance test (OGTT) โดยใช้น้ำตาลกลูโคส เป็นสารตั้งต้น (n=8)… 16

4 ค่าเฉลี่ยของระดับน้ำตาลในเลือดในหนูขาว เมื่อทดสอบด้วยวิธี oral glucose tolerance test (OGTT) โดยใช้น้ำตาลมอลโตสเป็นสารตั้งต้น (n=8)..... 18

5 ค่าเฉลี่ยของระดับน้ำตาลในเลือดในหนูขาว เมื่อทดสอบด้วยวิธี oral glucose tolerance test (OGTT) โดยใช้น้ำตาลซูโครสเป็นสารตั้งต้น (n=8) 20

6 ค่าเฉลี่ยของระดับน้ำตาลในเลือดของหนูปกติกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแห้มติดต่อกัน 30 วันและกลุ่มควบคุม.....21

7 ค่าเฉลี่ยของระดับน้ำตาลในเลือดของหนูเบาหวานกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแห้มติดต่อกัน 30 วันและกลุ่มควบคุม 22

8 ค่าเฉลี่ยของระดับโคเลสเตอรอลในเลือดของหนูปกติและหนูเบาหวานกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแห้มขนาด 500 มก./กก. และกลุ่มควบคุม 22

9 ค่าเฉลี่ยของระดับไตรกลีเซอไรด์ในเลือดของหนูปกติและหนูเบาหวานกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแห้มขนาด 500 มก./กก. และกลุ่มควบคุม 23

10 ค่าเฉลี่ยของระดับ HDL ในเลือดของหนูปกติและหนูเบาหวานกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแห้มขนาด 500 มก./กก. และกลุ่มควบคุม 23

11 ค่าเฉลี่ยของระดับ AST ในเลือดของหนูปกติและหนูเบาหวานกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแห้มขนาด 500 มก./กก. และกลุ่มควบคุม.....24

12 ค่าเฉลี่ยของระดับ ALT ในเลือดของหนูปกติและหนูเบาหวานกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแห้มขนาด 500 มก./กก. และกลุ่มควบคุม 24

13 ค่าเฉลี่ยของระดับ BUN ในเลือดของหนูปกติและหนูเบาหวานกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแห้มขนาด 500 มก./กก. และกลุ่มควบคุม 25

14 ค่าเฉลี่ยของระดับ creatinine ในเลือดของหนูปกติและหนูเบาหวานกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแห้มขนาด 500 มก./กก. และกลุ่มควบคุม 25

15 แสดงค่าเฉลี่ย (Mean ± S.E.M.) ของการหลั่งอินซูลิน จากการผ่านสารสกัดแห้มและ berberine 10 มคก./มล. เข้าไปในตับอ่อนของหนูขาว (n = 3-5)..... 26

รูปภาพ หน้า

16 ค่าเฉลี่ยของพื้นที่ใต้กราฟในช่วง 20 นาทีที่ผ่านสารสกัดแห้ม
และ berberine 10 มคก./มล. เข้าไปในตับอ่อน (n = 3-5)..... 27
17 ความสัมพันธ์เชิงเส้นของความเข้มข้นของสารสกัดแห้มต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์
(Probit unit) เอนไซม์มอลเตสและเอนไซม์ซูเครส จากลำไส้เล็กของหนูขาว (n = 6) 28
18 ความสัมพันธ์เชิงเส้นของความเข้มข้นของ acarbose ต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์
(Probit unit) เอนไซม์มอลเตสและเอนไซม์ซูเครส จากลำไส้เล็กของหนูขาว (n = 6) 29

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

CFE	*C. fenestratum* extract
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
HDL	High density lipoprotien
IC_{50}	50% inhibit concentration
IDDM	Insulin dependent diabetes mellitus
KRB	Krebs-ringer bicarbonate buffer
LD_{50}	Lethal dose 50%
LDL	Low density lipoprotien
µg	Microgram
ml	Millilitre
NIDDM	Non-insulin dependent diabetes mellitus
NMR	Nuclear magnetic resonance
OGTT	Oral glucose tolerance test
RBCs	Red blood cells
SGLT	Na+-dependent glucose transporters
STZ	Streptozotocin
TLC	Thin layer chromatography
WHO	World Health Organization

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

โรคเบาหวานเป็นภาวะความผิดปกติของระบบเมตาบอลิสม ไขมัน คาร์โบไฮเดรต และโปรตีน โดยจะมีลักษณะสำคัญคือ ระดับน้ำตาลในเลือดสูงและร่างกายไม่สามารถควบคุมให้อยู่ในระดับปกติได้ ทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนต่ออวัยวะต่างๆ โดยเฉพาะ ตา ไต หัวใจ และหลอดเลือด โรคเบาหวานแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด ได้แก่ Type I (Insulin-dependent diabetes mellitus, IDDM) เกิดจาก ß–cell ของตับอ่อนถูกทำลายทำให้ไม่สามารถหลั่งอินซูลินออกมาได้ และ Type II (Non-insulin-dependent diabetes mellitus, NIDDM) เกิดจากการหลั่งและการทำงานของอินซูลินผิดปกติ

องค์การอนามัยโลกคาดว่า จำนวนผู้ป่วยโรคเบาหวานจะเพิ่มขึ้น 35% จากจำนวนผู้ป่วยทั่วโลก 150 ล้านคนในปี ค.ศ.1995 และเพิ่มขึ้นเป็น 300 ล้านคนในปี ค.ศ.2025 (King,1998) สำหรับรายงานในประเทศไทย เมื่อปี ค.ศ.1985 พบว่ามีจำนวนผู้ป่วยเบาหวานประมาณ 33.3 คนจากประชากรทุก 100,000 คน และเพิ่มเป็น 135 คนจากประชากรทุก 100,000 คนในปี ค.ศ.1996 (สำนักงานวางแผนนโยบายสุขภาพ,1996) จะเห็นได้ว่าจำนวนผู้ป่วยเบาหวานมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆทุกปี ทั้งนี้เนื่องจากโรคเบาหวานเป็นโรคเรื้อรังที่ไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ ดังนั้นสิ่งสำคัญในการดูแลผู้ป่วยโรคเบาหวานก็คือการทำให้ผู้ป่วยสามารถควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดให้อยู่ในเกณฑ์ปกติ เพื่อป้องกันภาวะแทรกซ้อนที่อาจเกิดขึ้น ทำให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตที่ดี และมีอายุยืนยาวขึ้น

การรักษาโรคเบาหวานนอกเหนือจากการควบคุมอาหารและออกกำลังกายแล้ว จะให้อินซูลินทดแทนในผู้ป่วยเบาหวาน Type I และให้ยาควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดในผู้ป่วยเบาหวาน Type II ถ้าหากไม่ได้ผลก็จะให้อินซูลินร่วมด้วย ยาควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดมีหลายชนิดได้แก่ 1) sulfonylureas เช่น glibenclamide, tolbutamide และ glipizide ออกฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งอินซูลินจาก ß-cell ของตับอ่อน 2) biguanides เช่น metformin ออกฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของอินซูลิน โดยเพิ่มการทำงานของกลูโคสเมตาบอลิสม 3) alpha-glucosidase inhibitors เช่น acarbose ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ alpha-glucosidase ที่ผนังลำไส้เล็ก ทำให้คาร์โบไฮเดรตไม่ถูกย่อยและดูดซึม มีผลให้ระดับน้ำตาลในเลือดหลังรับประทานอาหารเพิ่มขึ้นทีละน้อยอย่างช้าๆ และ 4) thiazolidinediones เช่น troglitazone และ rosiglitazone ออกฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของอินซูลิน โดยเพิ่มการดูดซึมกลูโคสเข้าสู่กล้ามเนื้อ และลดการสร้างกลูโคสจากตับ ในปัจจุบันยาในกลุ่ม alpha-glucosidase inhibitors เช่น acarbose เป็นยาที่มีประสิทธิภาพสูง ใช้ได้ผลดีในการรักษาและมีผลข้างเคียงน้อย จึงเป็นยาตัวแรกที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยเบาหวาน Type II ที่ไม่สามารถควบคุมอาหารอย่างเดียวได้ (Hanefeld,1991)

การนำสมุนไพรมาใช้ในการรักษาโรคในประเทศไทยมีการใช้กันมาแต่โบราณ รวมทั้งสมุนไพรที่ใช้ในการรักษาโรคเบาหวานมีหลายชนิดเช่น เตยหอม : *Pandanus odorus* RIDL (Peungvicha,1996), บอระเพ็ด : *Tinospora crispa*. (Noor,1998) , ตะลิงปลิง : *Averrhoa billimbi* Linn. (Pushparaj, 2000) แต่การศึกษาถึงฤทธิ์ กลไกการออกฤทธิ์ และผลข้างเคียงของสมุนไพรนั้นกำลังเป็นที่ศึกษากันอยู่

งานวิจัยในครั้งนี้ได้สนใจศึกษาสรรพคุณลดระดับน้ำตาลในกระแสเลือดของสารสกัดแห้มที่สกัดโดยใช้เอธานอล โดยศึกษาผลของสารสกัดแห้มต่อการลดระดับน้ำตาลในกระแสเลือดในหนูปกติและหนูเบาหวาน ฤทธิ์ในการกระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากตับอ่อนของสารสกัดแห้ม โดยใช้เทคนิค In situ pancreatic perfusion ผลต่อระดับไขมัน ในเลือด การทำงานของตับและไต รวมทั้งการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ alpha-glucosidase

วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย

เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดแห้ม ต่อการลดระดับน้ำตาล และระดับไขมันในกระแสเลือด การทำงานของตับและไต ในหนูปกติและหนูเบาหวาน รวมทั้งกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดแห้มในด้านการกระตุ้นการหลั่งอินซูลินโดยตรงจากตับอ่อน และการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส

สมมติฐานและกรอบแนวความคิด

สารสกัดแห้มมีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในกระแสเลือด โดยอาจเป็นผลมาจากการกระตุ้นการหลั่งอินซูลิน และ /หรือ การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสที่อยู่ที่ผนังลำไส้เล็ก ซึ่งหากสมมติฐานนี้เป็นจริงดังที่คาดไว้ จะสามารถพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรแห้มให้เป็นยาสำหรับรักษาโรคเบาหวานได้ในอนาคต โดยจะช่วยลดการนำเข้ายากลุ่ม sulfonylureas และ alpha-glucosidase inhibitors ที่มีราคาแพงลงได้

วิธีดำเนินการวิจัย

สัตว์ทดลองและสารเคมี

หนูขาวเพศผู้สายพันธุ์ Sprague-Dawley น้ำหนัก 200-250 กรัม จำนวน 125 ตัว จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา จังหวัดนครปฐม สารสกัดเอธานอลจากแห้ม สารเคมีและแหล่งที่มาดังนี้ O-dianisidine (Sigma, USA), PGO enzyme (Sigma, USA), streptozotocin (Sigma, USA), microplate reader (Tecan A-5082), glucose strip (Advantage®)

สมุนไพรและแหล่งที่มา

นำเถาของแห้มจากจังหวัดหนองคาย มาสับให้ละเอียด ตากให้แห้ง จากนั้นนำมาแช่ในเอธานอล 95% พอท่วม นำมาต้มเพื่อเร่งปฏิกิริยาด้วยเครื่อง reflux แยกกากและส่วนของเหลวออกจากกัน นำส่วนของเหลวที่ได้มาระเหยเอาเอธานอลออกโดยใช้เครื่อง rotary evaporator จะได้สารสกัดสีน้ำตาลเข้ม คิดเป็น 17.9 % ของปริมาณแห้มทั้งหมดที่นำมาสกัด Singhana (2002) รายงานว่าสารออกฤทธิ์ที่สำคัญในแห้มคือ berberine ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงทำการตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีของสารสกัดเอธานอลจากแห้มที่ได้เปรียบเทียบกับ berberine โดยวิธี thin layer chromatography และ nuclear magnetic resonance

การทดลองที่ 1 การทดสอบฤทธิ์ลดน้ำตาลในกระแสเลือดของสารสกัดเอธานอลจากแห้มในหนูขาว

ศึกษาผลเฉียบพลัน ในการลดระดับน้ำตาลในกระแสเลือดของสารสกัดแห้มในหนูขาว โดยการทำ oral glucose tolerance test (OGTT) โดยใช้น้ำตาล glucose maltose และ sucrose เป็นตัวทดสอบ อดอาหารหนู 12 ชั่วโมงก่อนทำการทดลอง ใช้หนูกลุ่มละ 6 ตัว

glucose

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม ป้อนน้ำกลั่น 1ซีซี/ตัว

กลุ่มที่ 2 ป้อน glibenclamide 5 มก./กก.

กลุ่มที่ 3 ป้อนสารสกัดแห้ม 250 มก./กก.

กลุ่มที่ 4 ป้อนสารสกัดแห้ม 500 มก./กก.

กลุ่มที่ 5 ป้อนสารสกัดแห้ม 1000 มก./กก.

maltose

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม ป้อนน้ำกลั่น 1ซีซี/ตัว

กลุ่มที่ 2 ป้อน acarbose 3 g/kg

กลุ่มที่ 3 ป้อนสารสกัดแห้ม 250 มก./กก.

กลุ่มที่ 4 ป้อนสารสกัดแห้ม 500 มก./กก.

กลุ่มที่ 5 ป้อนสารสกัดแห้ม 1000 มก./กก.

sucrose

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม ป้อนน้ำกลั่น 1ซีซี/ตัว

กลุ่มที่ 2 ป้อน acarbose 3 g/kg

กลุ่มที่ 3 ป้อนสารสกัดแห้ม 250 มก./กก.

กลุ่มที่ 4 ป้อนสารสกัดแห้ม 500 มก./กก.

กลุ่มที่ 5 ป้อนสารสกัดแห้ม 1000 มก./กก.

เก็บเลือดหนูโดยวิธีตัดปลายหางก่อนให้สารทดสอบ (t=0) หลังจากนั้น 5 นาทีจึงป้อนน้ำตาล (glucose maltose หรือ sucrose) แล้วเก็บเลือดที่ระยะเวลา 30 , 60 และ 120 นาทีภายหลังจากป้อนน้ำตาล หลังจากนั้นนำเลือดที่ได้ไปปั่นแยก plasma แล้วนำมาทดสอบหาความเข้มข้นของระดับน้ำตาลใน plasma โดยใช้วิธี Glucose oxidase test (Sigma,U.S.A.) แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer

การทดลองที่ 2 ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดแห้มเมื่อให้ติดต่อกันเป็นเวลา 30 วัน ในหนูปกติและหนูเบาหวาน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเหนี่ยวนำหนูให้เป็นเบาหวาน

อดอาหารหนู 24 ชั่วโมงก่อนทำการทดลอง ฉีด streptozotocin (STZ) ขนาด 50 มก/กก ที่ละลายใน citrate buffer (pH 4.5) เข้าทางหลอดเลือดดำที่หางหนู เพื่อเหนี่ยวนำให้หนูเป็นเบาหวาน (ซึ่งต่อไปจะเรียกว่าหนูเบาหวาน) หลังจากฉีด STZ 48 ชั่วโมง ตรวจเลือดหนูโดยใช้ glucose strip เพื่อคัดเลือกหนูที่มีระดับน้ำตาลมากกว่า 250 มก/ดล สำหรับใช้ในการทดลอง

การทดลองที่ 2.1 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดแห้มในการลดระดับน้ำตาลในกระแสเลือดในหนูปกติและหนูเบาหวานเมื่อให้วันละ 1 ครั้งติดต่อกัน 30 วัน

แบ่งหนูออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว

กลุ่มที่ 1 หนูปกติกลุ่มควบคุม ได้รับการป้อนน้ำกลั่น 1ซีซี/ตัว

กลุ่มที่ 2 หนูปกติ ได้รับการป้อนสารสกัดแห้ม 500 มก./กก.

กลุ่มที่ 3 หนูเบาหวานกลุ่มควบคุม ได้รับการป้อนน้ำกลั่น 1ซีซี/ตัว

กลุ่มที่ 4 หนูเบาหวาน ได้รับการป้อนสารสกัดแห้ม 500 มก./กก.

ป้อนสารทดสอบในหนูทุกกลุ่มวันละครั้งติดต่อกัน 30 วัน พร้อมทั้งชั่งน้ำหนักตัวทุกวันติดต่อกัน ทำการตรวจ fasting blood glucose (FBG) ในวันที่ 0 , 7 , 14 , 21 และ 28 โดยใช้ glucose strip (Advantage®) และต้องอดอาหารก่อนทำการตรวจเลือดอย่างน้อย 12 ชั่วโมง

การทดลองที่ 2.2 ศึกษาผลของสารสกัดแห้มต่อระดับไขมันในเลือด การทำงานของตับและไต ในหนูปกติและหนูเบาหวานเมื่อให้วันละ 1 ครั้งติดต่อกัน 30 วัน

แบ่งหนูออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว

กลุ่มที่ 1 หนูปกติกลุ่มควบคุม ได้รับการป้อนน้ำกลั่น 1ซีซี/ตัว

กลุ่มที่ 2 หนูปกติ ได้รับการป้อนสารสกัดแห้ม 500 มก./กก.

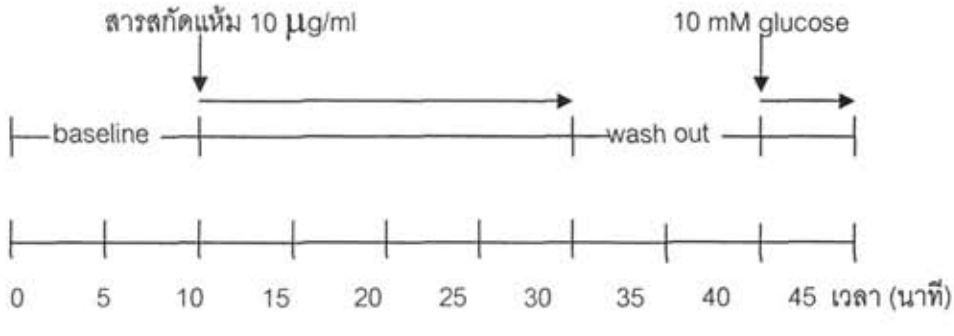
กลุ่มที่ 3 หนูเบาหวานกลุ่มควบคุม ได้รับการป้อนน้ำกลั่น 1ซีซี/ตัว

กลุ่มที่ 4 หนูเบาหวาน ได้รับการป้อนสารสกัดแห้ม 500 มก./กก.

อดอาหารหนูก่อนทำการทดลอง 12 ชั่วโมง เก็บเลือดโดยวิธีตัดปลายหาง เพื่อนำไปตรวจ blood chemical values ได้แก่ blood urea nitrogen (BUN) , creatinine , cholesterol , triglyceride , low density lipoprotein (LDL) , high density lipoprotein (HDL) , asparate aminotransferase (AST) และ alanine aminotransferase (ALT) โดยจะทำการตรวจในวันที่ 0 (day 0) หลังจากนั้น 1 วัน (day 1) จึงทำการป้อนสารทดสอบวันละ 1 ครั้งติดต่อกัน 30 วัน และในวันที่ 31 (day 31) ทำการเก็บเลือดส่งตรวจ blood chemical value ดังกล่าวอีกครั้ง

การทดลองที่ 3 การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการหลั่ง insulin **จากตับอ่อน ของสารสกัดแห้ม โดยใช้วิธี** In situ pancreatic perfusion

อดอาหารหนูก่อนทำการทดลอง 12 ชั่วโมง (n=3) ทำให้หนูสลบโดยฉีด pentobarbital sodium 60 มก./กก. เข้าทางช่องท้อง ทำการผ่าตัดเปิดช่องท้องเพื่อหา celiac arteries สอดสาย cannula ชนิด polyvinyl (0.625 mm. ID) ที่มี Krebs-Ringer bicarbonate buffer (KRB) ซึ่งได้รับ 95%O_2+5%CO_2 และปรับอัตราการไหลให้ได้ 1 ml/min เพื่อให้สารอาหารและสารทดสอบ จากนั้นสอดสาย cannula ชนิด vinyl (1.12 mm. ID) ผ่านทาง portal vein เพื่อเก็บของเหลวที่หลั่งออกจากตับอ่อน โดยให้ 20 นาทีแรกเป็น equilibration period หลังจากนั้นเก็บของเหลวที่ผ่านออกมาจากตับอ่อนทุกนาที และนำไปวิเคราะห์หาระดับ insulin โดยวิธี radioimmunoassay



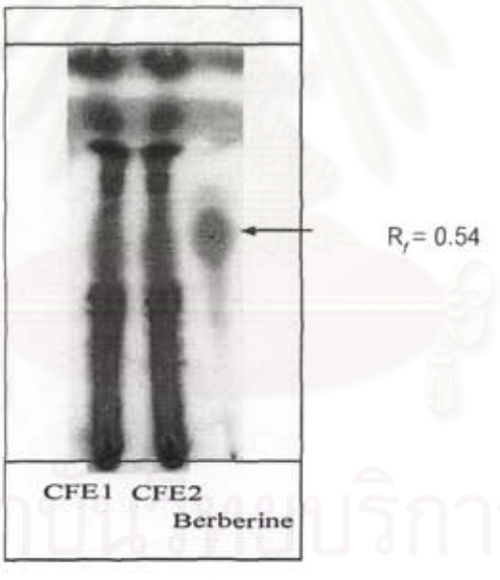
การทดลองที่ 4 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ alpha–glucosidase (AGH) **ของสารสกัดแห้ม**

หาค่าความเข้มข้นของสารสกัดแห้มที่สามารถยับยั้งการทำงานของ AGH ได้ 50% โดยวิธีของ Oki T,1999

ผลการวิจัย

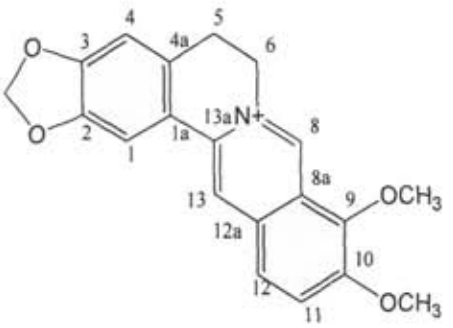
ผลการทดสอบเอกลักษณ์ทางเคมีของสารสกัดเอธานอลจากแห้ม

จากรายงานการศึกษาพบว่า berberine เป็นสารออกฤทธิ์ที่สำคัญในสารสกัดแห้ม (Kaewpradub, 1992; Pinho et al., 1992; Singhana, 2002) เมื่อทดสอบเอกลักษณ์ทางเคมีโดยวิธี TLC เพื่อยืนยันว่ามี berberine ในสารสกัดแห้มที่ใช้ในการทดลอง พบว่าตำแหน่งของ berberine ที่ปรากฏในสารสกัดแห้มเป็นตำแหน่งเดียวกับ berberine ที่ใช้เป็นตัวอ้างอิง (R_f = 0.54) แสดงว่ามี berberine ปรากฏอยู่ในสารสกัดแห้มที่นำมาใช้ในการทดลอง (รูปที่ 1)



รูปที่ 1. ผลจาก TLC ของสารสกัดแห้มเปรียบเทียบกับ berberine ที่ใช้อ้างอิง (R_f = 0.54) CFE1 และ CFE2 คือ สารสกัดแห้มที่ได้จากการสกัดครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 ตามลำดับ

เมื่อตรวจสอบตำแหน่งของ ^{1}H และ ^{13}C ของ berberine ในสารสกัดแห้มที่ใช้ในการทดลอง ด้วยวิธี NMR พบว่าตำแหน่งของ ^{1}H และ ^{13}C ใกล้เคียง berberine ที่ใช้ในการอ้างอิง (Kaewpradub, 1992; Siwon et al., 1980) เช่นกัน (รูปที่ 2)



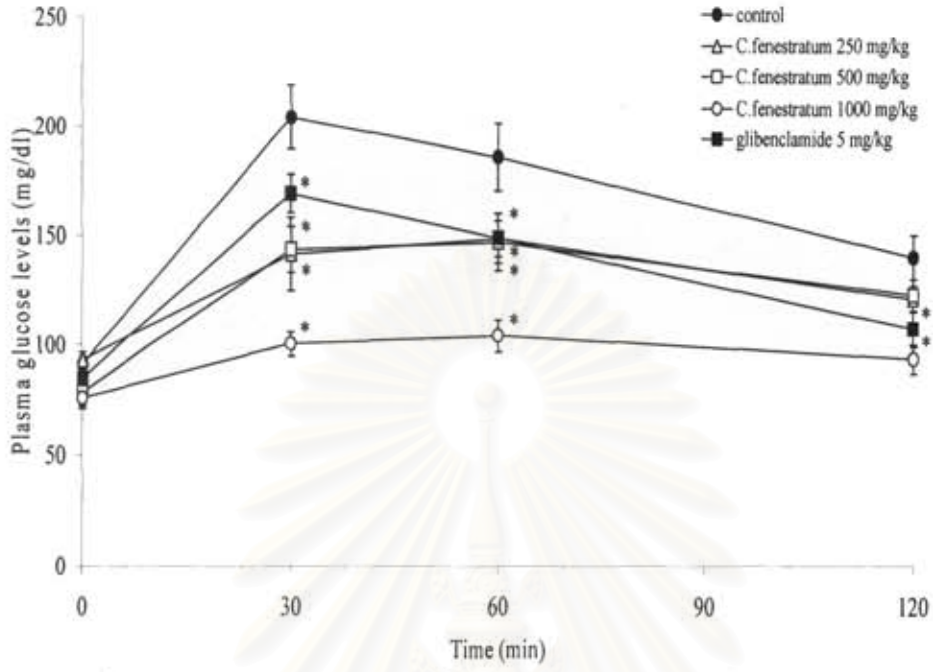
รูปที่ 2. แสดงตำแหน่งของ ^{1}H และ ^{13}C ของ berberine (Singhana, 2002)

การทดลองที่ 1 ฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของสารสกัดเอธานอลจากแห้ม ในหนูขาวที่ได้รับการป้อนน้ำตาลกลูโคส มอลโตส และซูโครส

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดแห้มต่อระดับน้ำตาลในเลือดด้วยวิธี oral glucose tolerance test (OGTT) โดยการป้อนน้ำตาลกลูโคส มอลโตส และซูโครส แบ่งหนูที่ได้รับน้ำตาลแต่ละชนิดออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มควบคุมป้อนน้ำกลั่น 0.5 มล./ตัว อีก 3 กลุ่มป้อนสารสกัดแห้ม ความเข้มข้น 250, 500 และ 1,000 มก./กก. ตามลำดับ และกลุ่ม positive กลุ่มควบคุม ป้อน glibenclamide 5 มก./กก. ในหนูกลุ่มที่ป้อนน้ำตาลกลูโคส หรือ acarbose 3 มก./กก. ในหนูกลุ่มที่ป้อนน้ำตาลมอลโตส หรือน้ำตาลซูโครส ป้อนสารทดสอบทุกชนิด 5 นาทีก่อนป้อนน้ำตาล

กลุ่มที่ได้รับน้ำตาลกลูโคส

ฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลของสารสกัดแห้ม ในหนูขาวกลุ่มที่ได้รับการป้อนน้ำตาลกลูโคส แสดงในรูปที่ 3 และตารางที่ 1 ร้อยละของระดับน้ำตาลที่ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงในตารางที่ 2 ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูทุกกลุ่มก่อนให้สารทดสอบ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สารสกัดแห้ม (250-1,000 มก./กก.) ลดระดับน้ำตาลในเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยแปรผันกับขนาดของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น สารสกัดแห้มความเข้มข้น 250 มก./กก. ลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ 30.55% และ 20.01% ที่ 30 และ 60 นาทีหลังป้อนน้ำตาลกลูโคส ตามลำดับ ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูที่ได้รับสารสกัดแห้มความเข้มข้น 250 มก./กก. ที่ 30, 60 และ 120 นาทีคือ 141.55 ± 16.52, 148.32 ± 7.99 และ 120.84 ± 5.99 มก./ดล. ตามลำดับ และระดับน้ำตาลในเลือดของหนูกลุ่มควบคุมคือ 203.82 ± 14.60, 185.41 ± 15.16 และ 139.66 ± 9.85 มก./ดล. ตามลำดับ สารสกัดแห้มความเข้มข้น 500 มก./กก. ลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ 29.51% และ 20.84% ที่ 30 และ 60 นาทีหลังป้อนน้ำตาลกลูโคส ตามลำดับ และระดับน้ำตาลในเลือดที่ 30, 60 และ 120 นาทีคือ 143.67 ± 10.25, 146.44 ± 12.82 และ 122.55 ± 14.89 มก./ดล. ตามลำดับ สารสกัดแห้มความเข้มข้น 1,000 มก./กก. และ glibenclamide 5 มก./กก. ลดระดับน้ำตาลในเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ระหว่าง 30-120 นาทีหลังป้อนกลูโคส ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูที่ได้รับสารสกัดแห้มความเข้มข้น 1,000 มก./กก. ที่ 30, 60 และ 120 นาทีคือ 100.28 ± 5.58, 103.93 ± 7.46 และ 93.24 ± 6.63 มก./ดล. ตามลำดับ และร้อยละของระดับน้ำตาลที่ลดลงคือ 50.80, 43.95 และ 33.23 % ตามลำดับ ในขณะที่ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูที่ได้รับ glibenclamide คือ 169.15 ± 8.76, 148.54 ± 11.24 และ 107.12 ± 8.38 มก./ดล. ตามลำดับ ร้อยละของระดับน้ำตาลที่ลดลงคือ17.01, 19.89 และ 23.30 % ตามลำดับ



รูปที่ 3 แสดงค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.M.) ของระดับน้ำตาลในเลือดในหนูขาว เมื่อทดสอบด้วยวิธี oral glucose tolerance test (OGTT) โดยใช้น้ำตาลกลูโคส เป็นสารตั้งต้น (n=8),* $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เวลาเดียวกัน

ตารางที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ย (Mean ± S.E.M.) ของระดับน้ำตาลในเลือดในหนูขาว เมื่อทดสอบด้วยวิธี oral glucose tolerance test (OGTT) โดยใช้น้ำตาลกลูโคส เป็นสารตั้งต้น(n=8),* $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เวลาเดียวกัน

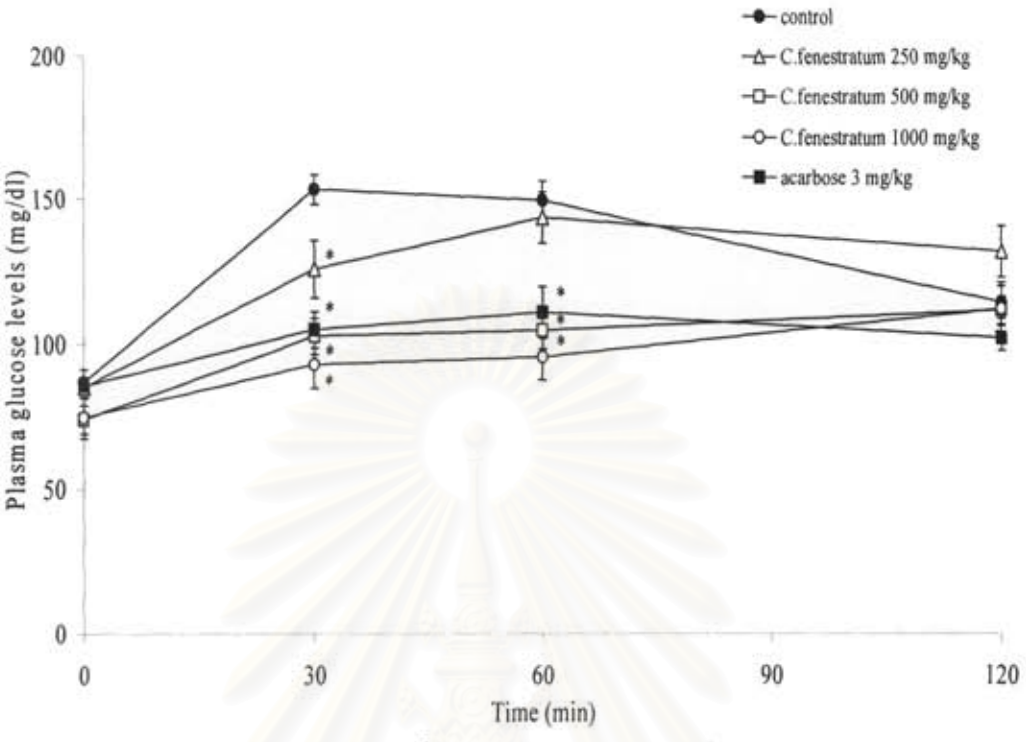
กลุ่มการทดลอง	ระดับน้ำตาลในเลือด (มก./ดล.)			
	เวลา (นาที) หลังจากป้อนน้ำตาล			
	0	30	60	120
ควบคุม	91.16±3.62	203.82±14.60	185.41±15.16	139.66±9.85
C. fenestratum 250 มก./กก.	93.06±3.67	141.55±16.52*	148.32±7.99*	120.84±5.99
C. fenestratum 500 มก./กก.	78.72±6.11	143.67±10.25*	146.77±12.82*	122.55±14.89
C. fenestratum 1000 มก./กก.	76.27±5.05	100.28±5.58*	103.93±7.46*	93.24±6.63*
Glibenclamide 5 มก./กก.	85.09±11.47	169.15±8.76*	148.54±11.24*	107.12±8.38*

ตารางที่ 2 แสดงร้อยละของระดับน้ำตาลในเลือดที่ลดลงในหนูขาวกลุ่มที่ป้อนน้ำตาลกลูโคส เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม, * $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เวลาเดียวกัน

กลุ่มการทดลอง	% ลดลงของระดับน้ำตาลในเลือด			
	เวลา (นาที) หลังจากป้อนน้ำตาล			
	0	30	60	120
C. fenestratum 250 มก./กก.	-2.09	30.55*	20.01*	13.47
C. fenestratum 500 มก./กก.	13.65	29.51*	20.84*	12.25
C. fenestratum 1000 มก./กก.	16.33	50.80*	43.95*	33.23*
Glibenclamide 5 มก./กก.	6.66	17.01*	19.89*	23.30*

กลุ่มที่ได้รับน้ำตาลมอลโตส

ฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลของสารสกัดแห้ม ในหนูขาวกลุ่มที่ได้รับการป้อนน้ำตาลมอลโตส แสดงในรูปที่ 4 และตารางที่ 3 ร้อยละของระดับน้ำตาลที่ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงในตารางที่ 4 ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูทุกกลุ่มก่อนให้สารทดสอบ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติสารสกัดแห้ม (250 และ 500 มก./กก.) ลดระดับน้ำตาลในเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยแปรผันกับขนาดของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น แต่ไม่มีผลเช่นเดียวกันนี้ในสารสกัดแห้มขนาด 1,000 มก./กก. สารสกัดแห้มความเข้มข้น 250 มก./กก. ลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ 16.28% และ 36.19% ที่ 60 และ 120 นาทีหลังป้อนน้ำตาลมอลโตส ตามลำดับ สารสกัดแห้มความเข้มข้น 500 มก./กก. ลดระดับน้ำตาลในเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ 34.04%, 24.43% และ 18.42% ที่ 30, 60 และ 120 นาทีหลังป้อนน้ำตาลมอลโตส ตามลำดับ ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูที่ได้รับสารสกัดแห้มความเข้มข้น 250 มก./กก. ที่ 30, 60 และ 120 นาทีคือ 154.22 ± 5.31, 146.39 ± 5.18 และ 97.51 ± 2.97 มก./ดล. ตามลำดับ และระดับน้ำตาลในเลือดของหนูกลุ่มควบคุมคือ 183.89 ± 19.74, 174.87 ± 14.25 และ 152.81 ± 5.57 มก./ดล. ตามลำดับ ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูที่ได้รับสารสกัดแห้มความเข้มข้น 500 มก./กก. ที่ 30, 60 และ 120 นาทีคือ 121.30 ± 9.49, 132.15 ± 7.34 และ 124.66 ± 5.79 มก./ดล. กลุ่ม positive กลุ่มควบคุมที่ได้รับ acarbose 3 มก./กก. ลดระดับน้ำตาลในเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) 25.84% และ 29.14% ที่ 30 และ 120 นาทีหลังป้อนน้ำตาลมอลโตส ตามลำดับ และระดับน้ำตาลในเลือดที่ 30, 60 และ 120 นาทีคือ 136.38 ± 4.21, 156.62 ± 3.60 และ 108.28 ± 5.23 มก./ดล.ตามลำดับ



รูปที่ 5 แสดงค่าเฉลี่ย (Mean ± S.E.M.) ของระดับน้ำตาลในเลือดในหนูขาว เมื่อทดสอบด้วยวิธี oral glucose tolerance test (OGTT) โดยใช้น้ำตาลซูโครสเป็นสารตั้งต้น (n=8),* $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เวลาเดียวกัน

ตารางที่ 5 แสดงค่าเฉลี่ย (Mean ± S.E.M.) ของระดับน้ำตาลในเลือดในหนูขาว เมื่อทดสอบด้วยวิธี oral glucose tolerance test (OGTT) โดยใช้น้ำตาลซูโครสเป็นสารตั้งต้น (n=8),* $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เวลาเดียวกัน

กลุ่มการทดลอง	ระดับน้ำตาลในเลือด(มก./ดล.)			
	เวลา (นาที) หลังจากป้อนน้ำตาล			
	0	30	60	120
กลุ่มควบคุม	87.02±4.32	153.32±5.19	149.44±6.65	114.44±5.68
C. fenestratum 250 มก./กก.	85.10±3.66	126.02±9.99*	143.65±8.66	131.91±8.79
C. fenestratum 500 มก./กก.	73.91±4.80	102.79±6.15*	104.73±6.21*	111.59±4.91
C. fenestratum 1000 มก./กก.	74.58±7.06	93.16±8.36*	95.66±7.92*	112.13±9.29
Acarbose 3 มก./กก.	85.73±2.84	104.97±6.19*	111.00±8.87*	102.20±4.11

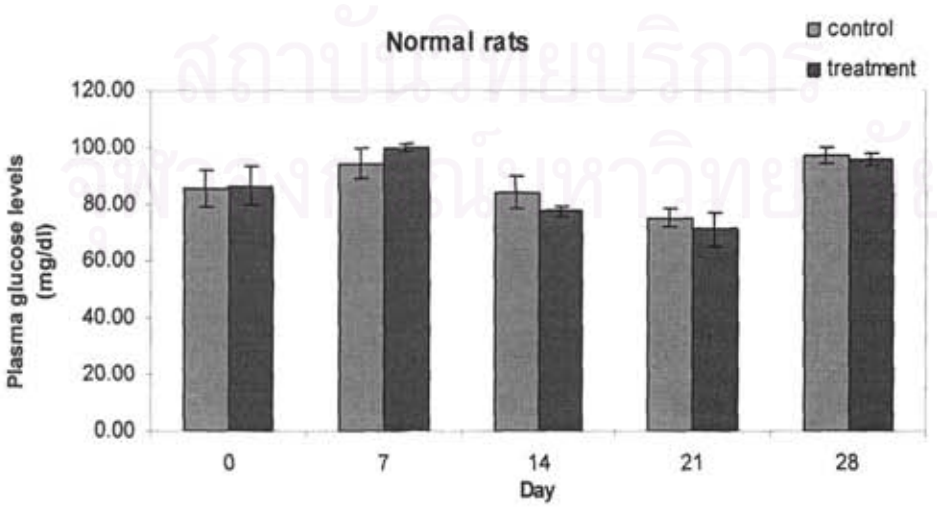
ตารางที่ 6 แสดงร้อยละของระดับน้ำตาลในเลือดที่ลดลงในหนูขาวกลุ่มที่ป้อนน้ำตาลซูโครส เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม, * $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เวลาเดียวกัน

กลุ่มการทดลอง	% ลดลงของระดับน้ำตาลในเลือด			
	เวลา (นาที) หลังจากป้อนน้ำตาล			
	0	30	60	120
C. fenestratum 250 มก./กก.	2.21	17.81*	3.88	-15.27
C. fenestratum 500 มก./กก.	15.07	32.96*	29.92*	2.49
C. fenestratum 1000 มก./กก.	14.30	39.24*	35.99*	2.01
Acarbose 3 มก./กก.	1.49	31.54*	25.73*	10.70

การทดลองที่ 2 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดแห้มเมื่อให้ติดต่อกันวันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 30 วัน

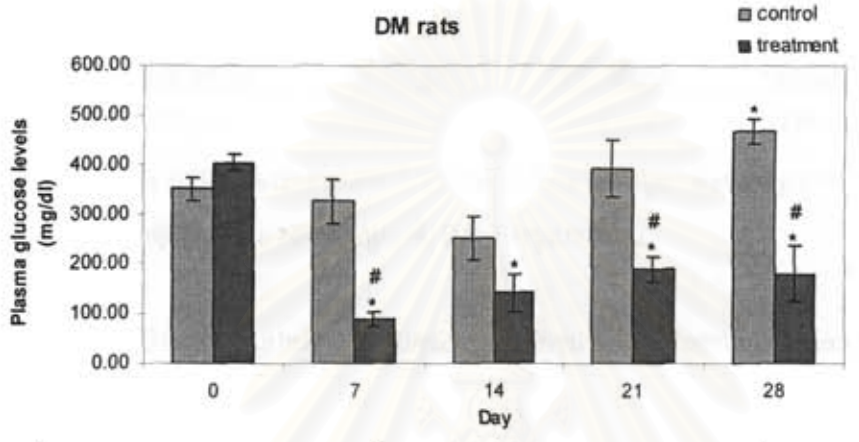
ฤทธิ์ของสารสกัดแห้มในการลดระดับน้ำตาลในกระแสเลือดในหนูปกติและหนูเบาหวาน

เมื่อเปรียบเทียบระดับน้ำตาลในเลือดของหนูปกติที่ได้รับการป้อนสารสกัดแห้มกับกลุ่มควบคุมพบว่าระดับน้ำตาลในเลือดไม่แตกต่างกันตลอดระยะเวลาที่ทำการทดสอบ และเมื่อเปรียบเทียบระดับน้ำตาลในเลือดของหนูทั้งสองกลุ่มข้างต้น ในวันที่ 7, 14, 21 และ 28 หลังป้อนสารทดสอบ กับวันก่อนเริ่มทำการทดลอง พบว่าระดับน้ำตาลของหนูทั้ง 2 กลุ่มไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 ค่าเฉลี่ย (mean ± SEM) ของระดับน้ำตาลในเลือดของหนูปกติกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแห้มและกลุ่มควบคุม

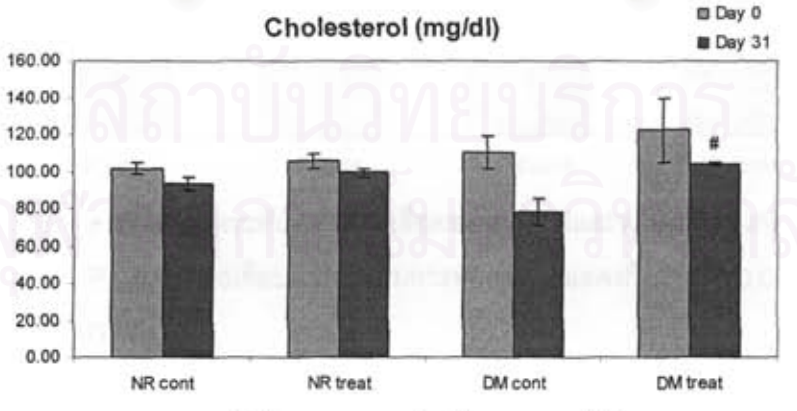
ผลของสารสกัดแห้มต่อระดับน้ำตาลในเลือดของหนูเบาหวาน พบว่าระดับน้ำตาลในเลือดของหนูเบาหวานกลุ่มควบคุมไม่แตกต่างกับวันเริ่มทำการทดลอง ยกเว้นวันที่ 28 ของการทดลอง พบว่ามีระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) สำหรับหนูเบาหวานกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแห้มมีระดับน้ำตาลในเลือดในวันที่ 7, 14, 21 และ 28 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับวันเริ่มทำการทดลอง และเมื่อเปรียบเทียบระดับน้ำตาลในเลือดของหนูเบาหวานกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแห้มในวันที่ 7, 14, 21 และ 28 กับหนูเบาหวานกลุ่มควบคุมในวันเดียวกัน พบว่าระดับน้ำตาลในเลือดของหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแห้มในวันที่ 7, 14, 21 และ 28 ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ตลอดการทดลองเช่นกัน (รูปที่ 7)



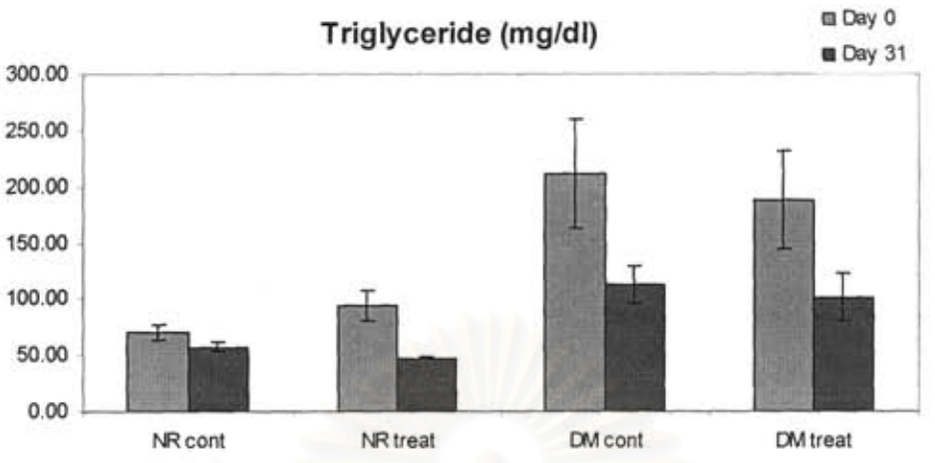
รูปที่ 7 ค่าเฉลี่ย (mean ± SEM) ของระดับน้ำตาลในเลือดของหนูเบาหวานกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแห้ม และหนูเบาหวานกลุ่มควบคุม (*แสดงถึงค่า $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับวันเริ่มต้นทำการทดลองในกลุ่มเดียวกัน, # แสดงถึงค่า $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมในวันเดียวกัน)

ฤทธิ์ของสารสกัดแห้มต่อระดับไขมันในเลือด การทำงานของตับและไต ในหนูปกติและหนูเบาหวาน

จากการทดลองพบว่า ระดับโคเลสเตอรอล และไตรกลีเซอไรด์ในเลือดของหนูปกติ และหนูเบาหวานทั้งก่อนและหลังได้รับสารทดสอบไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 8 และ 9)

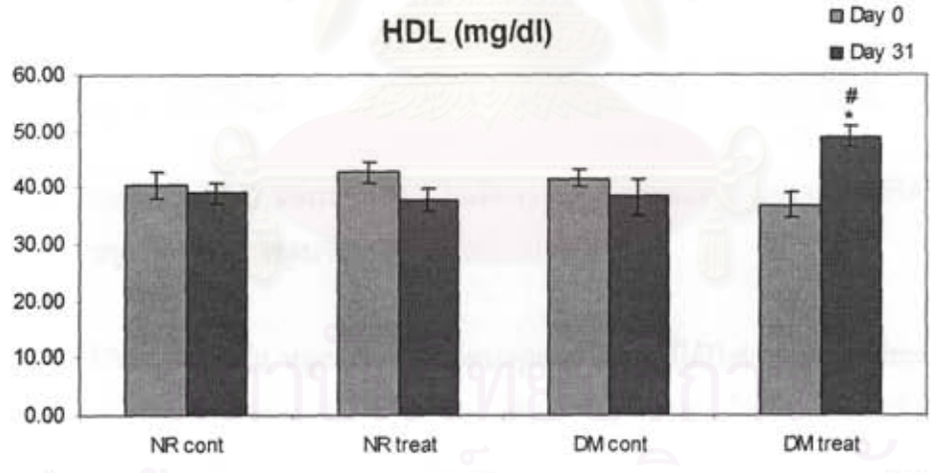


รูปที่ 8 ค่าเฉลี่ย (mean ± SEM) ของระดับโคเลสเตอรอลในเลือดของหนูปกติและหนูเบาหวานกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแห้มขนาด 500 มก./กก. และกลุ่มควบคุม (# แสดงถึงค่า $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม) NR = หนูปกติ, DM = หนูเบาหวาน



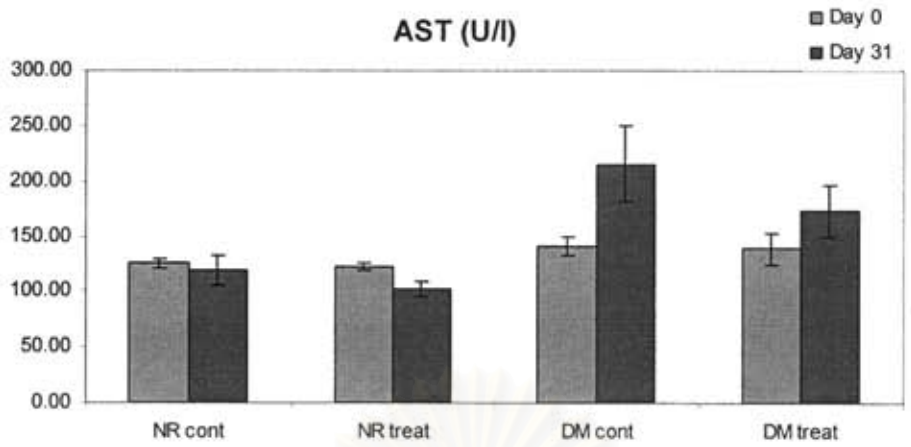
รูปที่ 9 ค่าเฉลี่ย (mean ± SEM) ของระดับไตรกลีเซอไรด์ ในเลือดของหนูปกติและหนูเบาหวานกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแห้ม ขนาด 500 มก./กก. และกลุ่มควบคุม NR = หนูปกติ, DM = หนูเบาหวาน

ระดับ HDL ในเลือดของหนูปกติกลุ่มควบคุม หนูปกติกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแห้ม และหนูเบาหวานกลุ่มควบคุม ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับก่อนเริ่มการทดลอง ยกเว้นหนูเบาหวานกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแห้มติดต่อกัน 30 วัน มีระดับ HDL ในเลือดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับก่อนเริ่มการทดลองและเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 10)

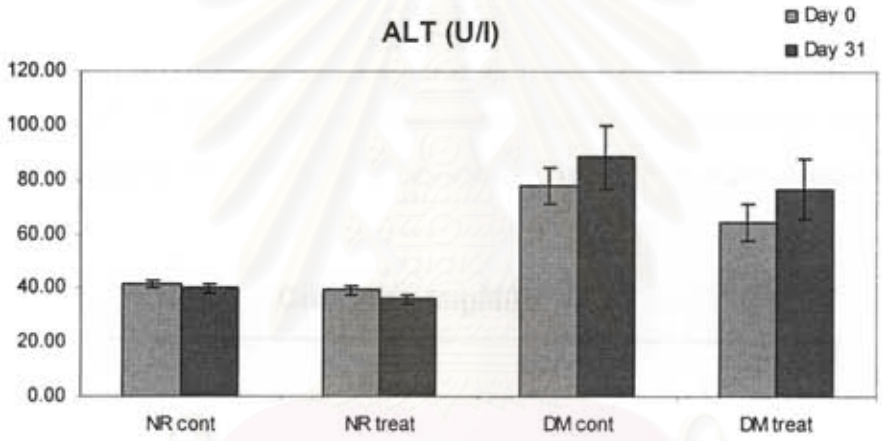


รูปที่ 10 ค่าเฉลี่ย (mean ± SEM) ของระดับ HDL ในเลือดของหนูปกติและหนูเบาหวานกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแห้ม และกลุ่มควบคุม (* แสดงถึงค่า $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับก่อนเริ่มการทดลอง, # แสดงถึงค่า $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม) NR = หนูปกติ, DM = หนูเบาหวาน

ระดับ AST และ ALT ในเลือดของหนูปกติและหนูเบาหวานหลังได้รับสารสกัดแห้มไม่แตกต่างจากของหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับก่อนให้สารทดสอบ และเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 11 และ 12)

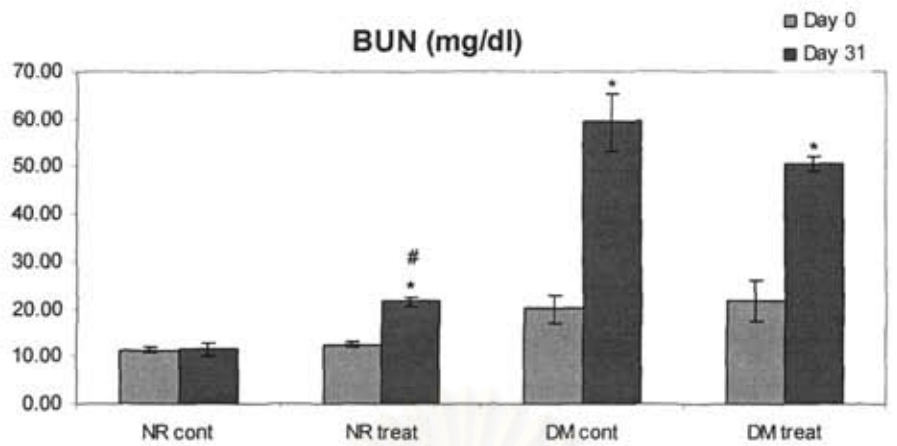


รูปที่ 11 ค่าเฉลี่ย (mean ± SEM) ของระดับ AST ในเลือดของหนูปกติและหนูเบาหวานกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแห้มขนาด 500 มก./กก. และกลุ่มควบคุม NR = หนูปกติ, DM = หนูเบาหวาน



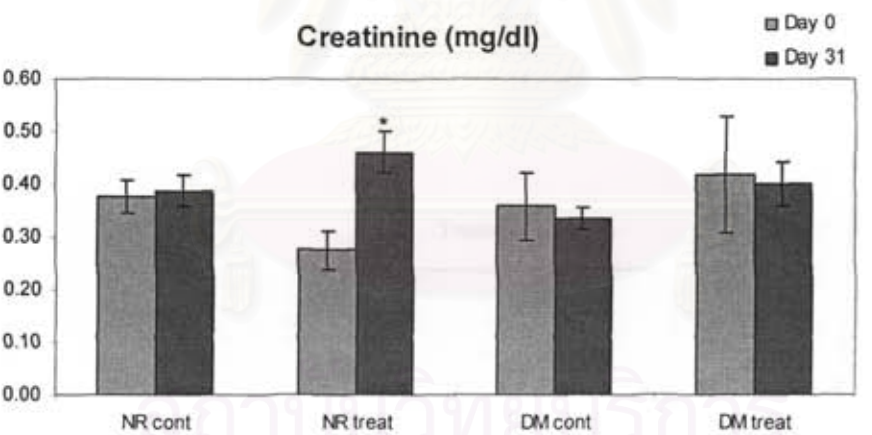
รูปที่ 12 ค่าเฉลี่ย (mean ± SEM) ของระดับ ALT ในเลือดของหนูปกติและหนูเบาหวานกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแห้ม และกลุ่มควบคุม NR = หนูปกติ, DM = หนูเบาหวาน

หนูปกติที่ได้รับสารสกัดแห้ม หนูเบาหวานกลุ่มควบคุมรวมทั้งกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแห้มมีระดับ BUN ในเลือดเมื่อสิ้นสุดการทดลองสูงกว่าก่อนการทดลองอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนระดับ BUN ในเลือดของหนูปกติกลุ่มควบคุมไม่มีการเปลี่ยนแปลงที่มีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) หนูปกติที่ได้รับสารสกัดแห้มมีระดับ BUN ในเลือดสูงกว่าหนูปกติกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) (รูปที่ 13)



รูปที่ 13 ค่าเฉลี่ย (mean ± SEM) ของระดับ BUN ในเลือดของหนูปกติและหนูเบาหวานกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแห้ม และกลุ่มควบคุม (* $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับก่อนเริ่มการทดลอง, # $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม) NR = หนูปกติ, DM = หนูเบาหวาน

ระดับ creatinine ในเลือดของหนูปกติกลุ่มควบคุม และหนูเบาหวานกลุ่มควบคุม และหนูเบาหวานกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแห้ม ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับวันก่อนการทดลอง ขณะที่หนูปกติกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแห้มมีระดับ creatinine ในเลือดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับวันก่อนการทดลอง (รูปที่ 14)



รูปที่ 14 ค่าเฉลี่ย (mean ± SEM) ของระดับ creatinine ในเลือดของหนูปกติและหนูเบาหวานกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแห้ม และกลุ่มควบคุม (* $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับก่อนเริ่มการทดลอง) NR = หนูปกติ, DM = หนูเบาหวาน

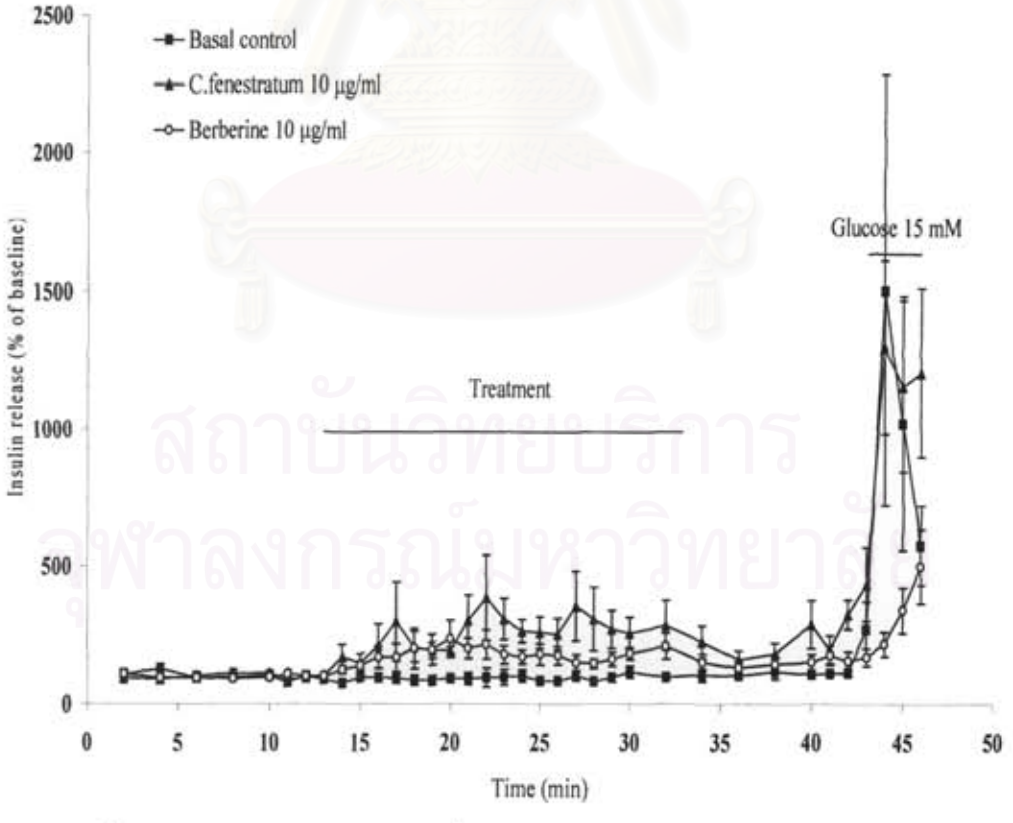
ผลทางจุลพยาธิวิทยา

ผลจากการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาในอวัยวะต่างๆ คือ ตับ ตับอ่อน ไต หัวใจ ม้าม และปอดไม่พบความผิดปกติใดๆในหนูทุกกลุ่ม ยกเว้นในไตของหนูปกติกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแห้ม พบมีการเสื่อมฝ่อของเซลล์ท่อไตฝอยในหนู และการตายของเซลล์ไต ในหนูทุกตัว

การทดลองที่ 3 ฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งฮอร์โมนอินซูลินจากตับอ่อนของสารสกัดแห้ม โดยวิธี In situ pancreatic perfusion

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดแห้ม และ berberine ต่อการกระตุ้นการหลั่งอินซูลิน ด้วยวิธี *in situ* pancreatic perfusion โดยผ่านสารสกัดแห้ม และ berberine ขนาด 10 มคก./มล. เข้าไปในตับอ่อนเป็นเวลา 20 นาที รูปแบบการหลั่งของอินซูลินแสดงในรูปที่ 16 พร้อมกับกลุ่มควบคุมที่ผ่าน KRB เข้าไปในตับอ่อนอย่างเดียวเป็นเวลา 40 นาที สารสกัดแห้มกระตุ้นการหลั่งอินซูลินได้ในลักษณะ biphasic คือมีการเพิ่มขึ้นของระดับอินซูลินอย่างรวดเร็ว จากนั้นระดับอินซูลินจะลดต่ำลงและคงที่อยู่ในระดับหนึ่ง ที่สูงกว่าระยะพักเล็กน้อย ในระหว่าง 20 นาทีที่ผ่านสารทดสอบเข้าไปในตับอ่อน มีการกระตุ้นการหลั่งอินซูลิน 3 ช่วง โดยกระตุ้นสูงสุดเป็น 2.98, 3.85 และ 3.55 เท่าของกลุ่มควบคุม ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม berberine ในขนาดเดียวกับสารสกัดแห้ม กระตุ้นการหลั่งอินซูลินได้อย่างช้าๆ และเพียงเล็กน้อย โดยกระตุ้นสูงสุดเป็น 1.33 เท่าของกลุ่มควบคุม ระดับอินซูลินจะลดต่ำลงสู่ระดับ baseline ในระยะเวลา 10 นาที (washing period) และเพิ่มขึ้นเป็น 4 ถึง 13.02 เท่าจากระดับ baseline เมื่อผ่านกลูโคส 15 มิลลิโมล่าห์เข้าไปในตับอ่อน (positive control) (รูปที่ 15)

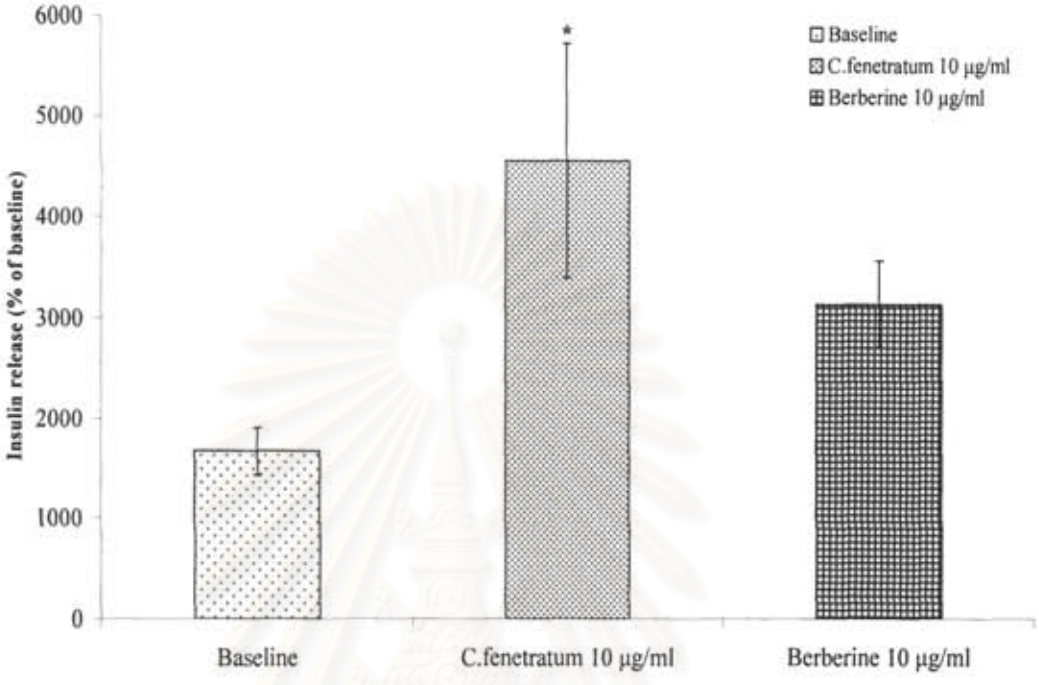
จากการคำนวนพื้นที่ใต้กราฟในช่วง 20 นาทีที่ผ่านสารทดสอบเข้าไปในตับอ่อน (รูปที่ 16) สารสกัดแห้ม กระตุ้นการหลั่งอินซูลินได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งตรงข้ามกับ berberine เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม



รูปที่ 15 แสดงค่าเฉลี่ย (Mean ± S.E.M.) ของการหลั่งอินซูลิน จากการผ่านสารสกัดแห้ม และ berberine 10 มคก./มล. เข้าไปในตับอ่อนของหนูขาว (n = 3-5), * P < 0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ค่าเฉลี่ยของ baseline insulin ในแต่ละกลุ่ม:

Basal control : 16.01 ± 12.53 ng/ml

C. fenestratum : 6.52 ± 4.04 ng/ml Berberine : 1.73 ± 0.32 ng/ml



รูปที่ 16 แสดงค่าเฉลี่ย(Mean ± S.E.M.) ของพื้นที่ใต้กราฟในช่วง 20 นาทีที่ผ่านสารสกัดแห้ม และ berberine 10 มคก./มล. เข้าไปในดับอ่อน (n = 3-5), * $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

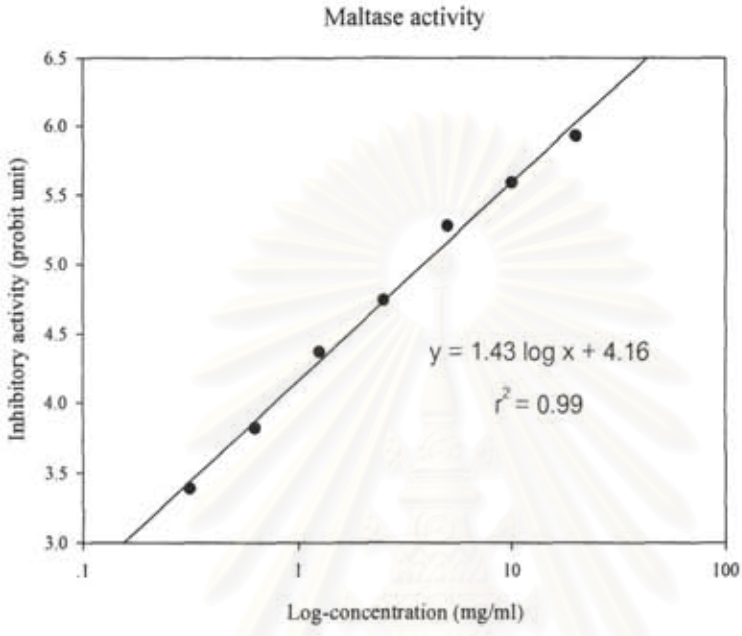
การทดลองที่ 4 ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลฟ่ากลูโคซิเดส จากลำไส้เล็กของหนูขาว

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดแห้ม เปรียบเทียบกับ acarbose ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลฟ่ากลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนูขาว จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดแห้มสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์มอลเตสได้ดีกว่าซูเครส โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.89 มก./มล. และ 11.22 มก./มล. ตามลำดับ (รูปที่ 17 และตารางที่ 7) และเช่นเดียวกันกับสารสกัดแห้ม acarbose สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์มอลเตสได้ดีกว่าซูเครสโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.66 มคก./มล. และ 6.76 มคก./มล. ตามลำดับ (รูปที่ 18 และตารางที่ 7) อย่างไรก็ตามฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองชนิดของ acarbose สูงกว่าฤทธิ์ของสารสกัดแห้ม

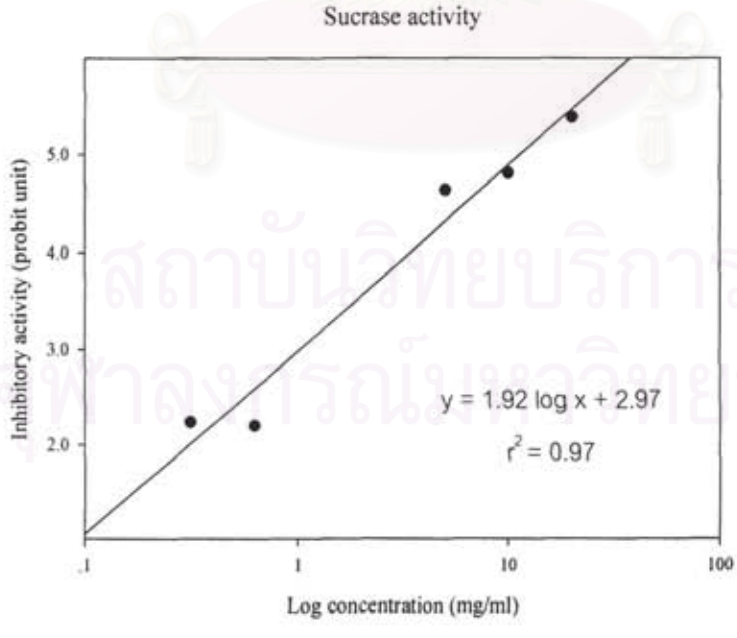
ตารางที่ 7 แสดงความเข้มข้นของสารสกัดแห้ม และ acarbose ต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลฟ่ากลูโคซิเดส จากลำไส้เล็กของหนูขาว

Enzyme (Substrate concentration)	IC_{50} (Concentration)	
	CFE (มก./มล.)	Acarbose (มคก./มล.)
Maltase (37 mM)	3.89	0.66
Sucrase (37 mM)	11.22	6.76

(A)



(B)

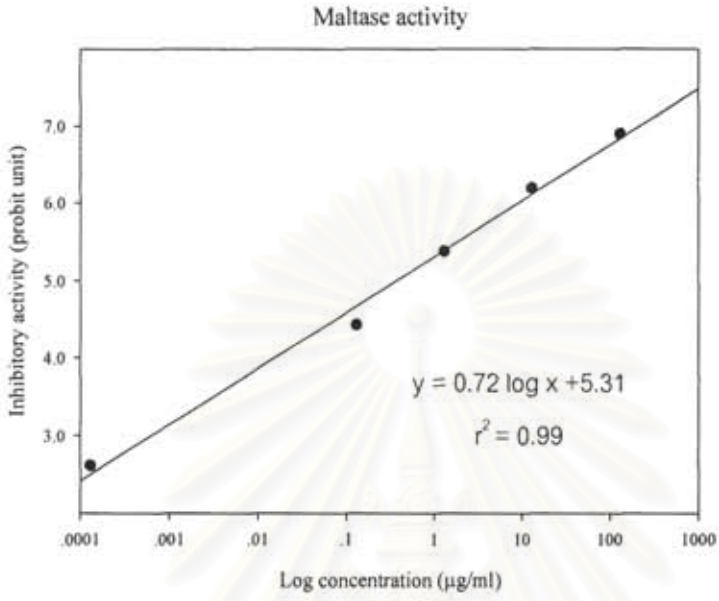


รูปที่ 17 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นของความเข้มข้นของสารสกัดแห้ม (0.3125-20 มก./มล.) ต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (Probit unit) เอนไซม์มอลเตสและเอนไซม์ซูเครส จากลำไส้เล็กของหนูขาว (n = 6)

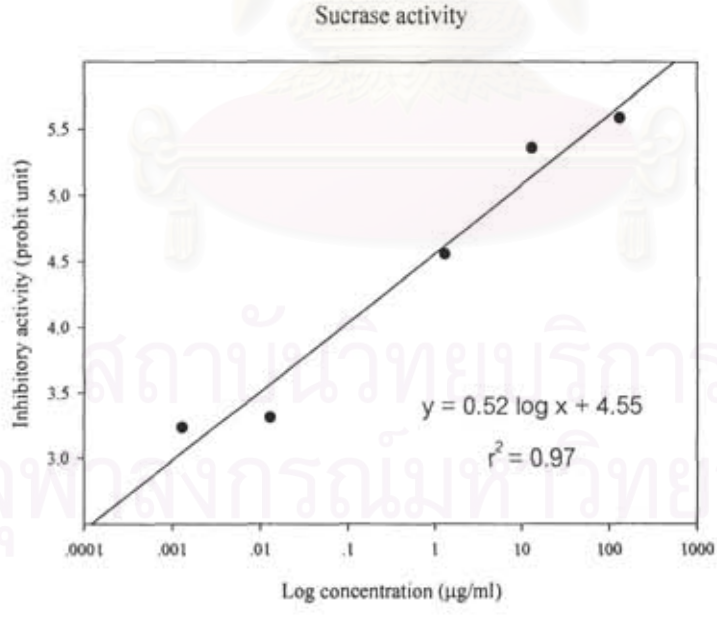
(A) การทำงานของเอนไซม์มอลเตส (B) การทำงานของเอนไซม์ซูเครส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(A)



(B)



รูปที่ 18 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นของความเข้มข้นของ acarbose (1.2912×10^{-4} – 1.2912×10^{2} มคก./มล.) ต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (Probit unit) เอนไซม์มอลเตสและเอนไซม์ซูเครส จากลำไส้เล็กของหนูขาว (n = 6)

(A) การทำงานของเอนไซม์มอลเตส (B) การทำงานของเอนไซม์ซูเครส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อภิปรายและวิจารณ์ผลการวิจัย

การทดลองที่ 1 ฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของสารสกัดเอธานอลจากแห้ม ในหนูขาวที่ได้รับการป้อนน้ำตาลกลูโคส มอลโตส และซูโครส

จากผลการทดลองที่ 1 พบว่า สารสกัดเอธานอลจากแห้มขนาด 250-1000 มก./กก. มีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูขาวปกติได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหลังจากป้อนด้วยน้ำตาลชนิดต่างๆ คือ กลูโคส ซูโครส และมอลโตส

ในหนูกลุ่มที่ได้รับการป้อนน้ำตาลกลูโคส พบว่า สารสกัดเอธานอลจากแห้ม มีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูขาวปกติได้โดยแปรผันตามขนาดที่เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งพบว่าสารสกัดแห้มในขนาด 250 และ 500 มก./กก. สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ภายใน 30-60 นาทีหลังจากป้อนน้ำตาลกลูโคส และที่ขนาด 1000 มก./กก. มีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ดีกว่าและนานกว่าขนาดอื่นๆ นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดเอธานอลจากแห้มออกฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดได้นานกว่าสารสกัดน้ำจากแห้ม ซึ่งเคยมีรายงานจากเผ่าเผด็จการ (2002)ว่า สารสกัดน้ำจากแห้มในขนาด 0.1-1 ก./กก. สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้เพียง 30 นาที หลังจากป้อนน้ำตาลกลูโคส ซึ่งบ่งบอกถึงความแตกต่างของชนิดและปริมาณของสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ได้ระหว่างสารสกัดเอธานอลและสารสกัดน้ำจากแห้ม

นอกจากนี้เราได้ทำการทดลองเปรียบเทียบฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของสารสกัดเอธานอลจากแห้ม และยา glibenclamide ขนาด 5 มก./กก. พบว่าฤทธิ์ในการลดระดับน้ำตาลของสารสกัดเอธานอลจากแห้ม ดีกว่า glibenclamide โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ขนาด 1000 มก./กก. ซึ่ง glibenclamide เป็นยากลุ่ม sulfonylureas ที่ใช้สำหรับลดระดับน้ำตาลในเลือด โดยออกฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากตับอ่อน (Schmid-Antomarchi, et al., 1987; Luzi and Pozza, 1997) ดังนั้นจากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้นอาจเป็นไปได้ว่า สารสกัดเอธานอลจากแห้มออกฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดได้โดยกระตุ้นการหลั่งอินซูลินเหมือนกับยา glibenclamide และ/หรือมีผลอื่นๆ เช่น การออกฤทธิ์คล้ายกับเป็นอินซูลิน

สำหรับหนูกลุ่มที่ได้รับการป้อนน้ำตาลมอลโตส พบว่า สารสกัดเอธานอลจากแห้ม มีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูขาวปกติได้โดยแปรผันตามขนาดที่เพิ่มสูงขึ้นเช่นกัน แต่อย่างไรก็ตามในการทดลองนี้ พบว่าสารสกัดแห้มขนาด 1000 มก./กก.ไม่สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญ จึงเป็นไปได้ว่าขนาด 1000 มก./กก. ที่ใช้ในการทดลองนี้สูงเกินไป นอกจากนี้ได้ทำการเปรียบเทียบ ฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของสารสกัดเอธานอลจากแห้ม กับยา acarbose ซึ่งเป็นยาในกลุ่มที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ alpha-glucosidase ขนาด 3 มก./กก. พบว่า สารสกัดเอธานอลจากแห้มออกฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ใกล้เคียงกับ acarbose ในหนูกลุ่มที่ได้รับการป้อนน้ำตาลซูโครส สารสกัดเอธานอลจากแห้ม มีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูขาวปกติได้โดยแปรผันตามขนาดที่เพิ่มสูงขึ้น และฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ใกล้เคียงกับ acarbose เช่นกัน ซึ่งจากผลการทดลองนี้สรุปได้ว่า สารสกัดเอธานอลจากแห้มน่าจะมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ alpha-glucosidase ที่บริเวณลำไส้เล็ก โดยเฉพาะ เอนไซม์ maltase และ sucrase ทำให้การย่อยคาร์โบไฮเดรต และน้ำตาลโมเลกุลคู่ให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดเป็นไปได้ช้าลง ส่งผลให้การเพิ่มขึ้นของระดับน้ำตาลในกระแสเลือดหลังจากการรับประทานอาหารช้าลงด้วย (Andre and Pierre, 2000)

การทดลองที่ 2 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดแห้มเมื่อให้ติดต่อกันวันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 30 วัน

เมื่อทำการป้อนสารสกัดเอธานอลจากแห้มขนาด 500 มก./กก./วัน ในหนูปกติและหนูเบาหวาน พบว่าการเพิ่มของน้ำหนักตัวในหนูปกติลดลงแต่ไม่มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวในหนูเบาหวาน ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูปกติกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแห้ม ไม่มีความแตกต่างกันตลอดการทดลอง ขณะที่ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูเบาหวานกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแห้มลดลงตลอดการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบกับก่อนเริ่มการทดลอง (day 0) แสดงว่าสารสกัดเอธานอลจากแห้ม สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูเบาหวานได้ แต่ไม่มีผลต่อหนูปกติ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Paopadetkarn (2002) ที่ทำการทดลองโดยป้อนสารสกัดน้ำจากแห้มติดต่อกันเป็นเวลา 14 วัน และเมื่อทำการตรวจวัดค่าเคมีในเลือดหลังป้อนสารสกัดเอธานอลจากแห้มติดต่อกันเป็นเวลา 30 วัน พบว่าระดับโคเลสเตอรอลในหนูปกติไม่มีการเปลี่ยนแปลง แต่มีแนวโน้มลดลงในหนูเบาหวาน ระดับไตรกลีเซอไรด์มีแนวโน้มลดลง ทั้งในหนูปกติและหนูเบาหวาน ระดับ HDL ไม่มีการเปลี่ยนแปลงในหนูปกติ แต่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในหนูเบาหวาน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Paopadetkarn (2002) ที่ทำการทดลองโดยป้อนสารสกัดน้ำจากแห้มติดต่อกันเป็นเวลา 14 วันเช่นเดียวกัน

ระดับ AST และ ALT ไม่มีการเปลี่ยนแปลงหลังป้อนสารสกัดแห้ม ทั้งในหนูปกติและหนูเบาหวาน เช่นเดียวกับผลทางพยาธิวิทยาที่ไม่พบความผิดปกติของเซลล์ตับ พบการสะสมของของไขมันในหนูปกติทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแห้ม แต่ไม่มีการสะสมของไขมันในหนูเบาหวานทั้ง 2 กลุ่ม ซึ่งแสดงว่าสารสกัดเอธานอลจากแห้มไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการทำงานของตับ ซึ่งผลการทดลองนี้แตกต่างจาก Yin และคณะ (2002) ที่เคยรายงานถึงความเป็นพิษของ berberine ต่อเซลล์ตับในคนหรือ HepG2 cells ซึ่ง berberine เป็นสารออกฤทธิ์สำคัญที่เคยมีรายงานว่าพบในสารสกัดแห้ม (Kaewpradub, 1992; Pinho et al., 1992; Singhana, 2002) จึงเป็นไปได้ว่าในสารสกัดเอธานอลจากแห้มอาจมีสารอื่นที่ช่วยป้องกันความเป็นพิษของ berberine ต่อตับ หรืออาจเนื่องจากแห้มที่นำมาสกัดนั้นต่างสายพันธุ์กัน หรือมาจากแหล่งปลูกที่ต่างกัน

สำหรับระดับ BUN และ creatinine ที่เพิ่มสูงขึ้นในหนูปกติที่ได้รับสารสกัดแห้ม จะสอดคล้องกับผลทางจุลพยาธิวิทยาที่พบว่ามีการเสื่อมฝ่อของท่อไตฝอย และมีการตายของเซลล์ไตในหนูปกติที่ได้รับสารสกัดแห้ม แสดงว่าสารสกัดแห้มน่าจะมีผลเสียต่อการทำงานของไตในหนูปกติ เนื่องจากระดับ BUN ในเลือดเป็นตัวบ่งชี้ถึงปริมาณโปรตีนที่ร่างกายได้รับ ความสามารถของตับในการเปลี่ยนแปลงสารต่างๆและความสามารถในการขับออกของเสียของไต ส่วน creatinine เป็นของเสียที่เกิดจากเมตาบอลิสมของกล้ามเนื้อและถูกขับออกโดยไต และระดับของ BUN และ creatinine ในเลือดมักจะเพิ่มสูงขึ้นในกรณีที่เกิดความผิดปกติของการทำหน้าที่ของไต (Daniel, 2002) อย่างไรก็ตามในหนูเบาหวาน ผลการทดลองที่ได้ไม่แน่ชัด เนื่องจากระดับ BUN ในเลือดหลังสิ้นการทดลองเพิ่มสูงขึ้นในหนูเบาหวานทั้งกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแห้ม แต่ระดับ creatinine กลับไม่แตกต่างกันทั้ง 2 กลุ่ม ซึ่งการทำงานของไตที่ลดลงในหนูเบาหวาน อาจเกิดจากพยาธิสภาพของโรคเบาหวานเองที่ส่งผลทำให้ไตทำหน้าที่ได้ลดลง และ/หรือเป็นผลมาจากสารสกัดแห้มร่วมด้วยก็ได้ แต่จากผลทางจุลพยาธิวิทยาไม่พบความผิดปกติของเซลล์ไต ในหนูเบาหวานทั้ง 2 กลุ่มเช่นกันซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Namking (2002) ที่พบว่าสารสกัดแห้มไม่มีพิษแบบเฉียบพลัน ต่อการทำงานของตับ ไต หัวใจ ปอด อัณฑะ และรังไข่ จึงเป็นไปได้ว่าสารสกัดเอธานอลจากแห้มน่าจะมีผลทำให้ไตของหนูปกติทำงานได้ลดลง จึงไม่ควรใช้ในหนูปกติ แต่ยังไม่

สามารถสรุปผลได้แน่ชัดในหนูเบาหวาน จึงควรจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดแห้มโดยทำการทดสอบในระยะเวลาที่นานขึ้น เช่น 3 เดือน และ 6 เดือนโดยเฉพาะอย่างยิ่งการทดสอบในหนูเบาหวานต่อไป

การทดลองที่ 3 ฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งฮอร์โมนอินซูลินจากตับอ่อนของสารสกัดแห้ม โดยวิธี In situ pancreatic perfusion

เพื่อที่จะยืนยันผลจากการทดลองที่ 1 ซึ่งทำในตัวสัตว์ว่าสารสกัดเอธานอลจากแห้มมีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดผ่านทางกลไกการกระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากตับอ่อน ทางคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดแห้มต่อการกระตุ้นการหลั่งอินซูลินโดยตรงจากตับอ่อนโดยใช้เทคนิค *In situ* pancreatic perfusion ซึ่งจากการทดลองพบว่า สารสกัดแห้มกระตุ้นการหลั่งอินซูลินได้ในลักษณะ biphasic และในระหว่าง 20 นาทีที่ผ่านสารทดสอบเข้าไปในตับอ่อน พบว่าสารสกัดแห้มสามารถกระตุ้นการหลั่งอินซูลินได้ 3 ช่วง โดยกระตุ้นสูงสุดเป็น 2.98, 3.85 และ 3.55 เท่าของกลุ่มควบคุม ตามลำดับ และเนื่องจากเคยมีรายงานว่า สารออกฤทธิ์สำคัญที่พบในสารสกัดแห้ม คือ berberine (Kaewpradub, 1992; Pinho et al., 1992; Singhana, 2002) ดังนั้นทางกลุ่มผู้วิจัยจึงทำการทดสอบฤทธิ์ของ berberine ต่อการกระตุ้นการหลั่งอินซูลินโดยตรงจากตับอ่อน พบว่า berberine ในขนาด 10 มคก./มล. สามารถกระตุ้นการหลั่งอินซูลินได้เพียงเล็กน้อย โดยกระตุ้นสูงสุดเพียง 1.33 เท่าของกลุ่มควบคุมเท่านั้น และจากการคำนวนพื้นที่ใต้กราฟในช่วง 20 นาทีที่ผ่านสารทดสอบเข้าไปในตับอ่อน พบว่าสารสกัดแห้ม กระตุ้นการหลั่งอินซูลินได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งตรงข้ามกับ berberine ที่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้นช่วยยืนยันผลที่ได้จากการทดลองที่ 1 ว่า สารสกัดเอธานอลจากแห้มมีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดได้โดยผ่านทางกลไกกระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากตับอ่อน อย่างไรก็ตามสารสกัดเอธานอลจากแห้มมีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งอินซูลินได้ดีกว่า berberine ค่อนข้างมาก จึงเป็นไปได้ว่า มีสารออกฤทธิ์ตัวอื่นนอกเหนือจาก berberine ที่พบในสารสกัดเอธานอลจากแห้มที่สามารถออกฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งอินซูลินได้ ซึ่ง Basnet และคณะ (1993) ได้เคยรายงานว่าพบสารออกฤทธิ์ตัวอื่น เช่น sitosterol ในแห้มซึ่งสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้เช่นกัน จึงเป็นไปได้ว่าสาร sitosterol นี้เป็นตัวที่ออกฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งอินซูลิน อย่างไรก็ตามควรต้องมีการทดสอบต่อไปในอนาคตว่าสาร sitosterol นี้เป็นตัวที่ออกฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งอินซูลิน จริงหรือไม่ ผลจากการทดลองนี้คล้ายคลึงกับที่เคยมีรายงานโดย Yin และคณะ (2002) ว่า berberine ไม่มีผลกระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากเซลล์ βTC3 ซึ่งเป็น β-cell line ที่ได้จาก transgenic mice นอกจากนี้ยังมีจุดที่น่าสนใจอีกจุดหนึ่งในช่วงท้ายของการทดลองที่มีการผ่านกลูโคส ขนาด 15 มิลลิโมล่าร์ เข้าไปในตับอ่อนเพื่อเป็นการทดสอบว่าเซลล์ตับอ่อนยังคงมีชีวิตและตอบสนองกับกลูโคสได้ตามปกติ (positive control) หรือไม่นั้น พบว่าในกลุ่มที่ได้รับ berberine ผลการกระตุ้นการหลั่งอินซูลินของกลูโคสในช่วง positive control น้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดแห้มหรือกลุ่มควบคุมค่อนข้างมาก จึงเป็นไปได้ว่า berberine ที่ใช้ในการทดลองมีขนาดสูงเกินไปจนอาจเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ตับอ่อน หรือ berberine เองมีความเป็นพิษต่อเซลล์ตับอ่อนโดยตรง ซึ่ง Yin และคณะ (2002) ก็เคยรายงานถึงความเป็นพิษของ berberine ต่อเซลล์ตับในคนมาแล้วเช่นกัน เป็นไปได้ว่าในสารสกัดเอธานอลจากแห้มอาจมีสารอื่นที่ช่วยป้องกันความเป็นพิษของ berberine ต่อตับอ่อนทำให้ยังคงหลั่งอินซูลินได้

การทดลองที่ 4 ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลฟ่ากลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนูขาว

จากที่เคยกล่าวมาแล้วข้างต้นว่ากลไกการลดระดับน้ำตาลในเลือดของสารสกัดเอธานอลจากแห้มน่าจะเกี่ยวข้องมากกว่าหนึ่งกลไก คือ 1) การกระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากตับอ่อน และ 2) กลไกอื่นที่ไม่เกี่ยวข้องกับตับอ่อน เนื่องจากเคยมี

รายงานว่า berberine สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ maltase และ sucrase ในเซลล์ Caco2 ซึ่งเป็น differentiated intestinal epithelial cells (Pan, et al., 2003) ดังนั้นเราจึงทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดแห้มต่อการการทำงานของเอนไซม์ *alpha-glucosidase* ที่ได้จากลำไส้เล็กของหนูขาวในหลอดทดลอง

ผลจากการทดลองพบว่า สารสกัดเอธานอลจากแห้มยับยั้งเอนไซม์ maltase ได้ดีกว่า sucrase ซึ่งผลที่ได้คล้ายคลึงกับ acarbose แต่อย่างไรก็ตามค่า IC_{50} ของสารสกัดเอธานอลจากแห้มสูงกว่า acarbose ค่อนข้างมาก โดยค่า IC_{50} ของสารสกัดเอธานอลต่อเอนไซม์ maltase และ sucrase เป็น 3.89 และ 11.22 มก./มล. ตามลำดับ ในขณะที่ IC_{50} ของ acarbose ต่อเอนไซม์ maltase และ sucrase เป็น 0.66 และ 6.76 มคก./มล. ตามลำดับ นอกจากนี้ผลการทดลองที่ได้นี้ยังแตกต่างจากที่รายงานโดย Pan et al. (2003) ว่า berberine สามารถยับยั้งเอนไซม์ sucrase ได้ดีกว่า maltase ในเซลล์ Caco2 จึงเป็นไปได้ว่า berberine อาจออกฤทธิ์แตกต่างไปในเซลล์ต่างชนิดกัน หรือ เป็นไปได้ว่าสารออกฤทธิ์ตัวอื่นในสารสกัดเอธานอลจากแห้มเป็นตัวที่แสดงบทบาทในกลไกนี้ ซึ่งต้องทำการทดสอบต่อไปในอนาคต

สรุปและข้อเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไป

จากผลการทดลองที่กล่าวมาแล้วทั้งหมด สรุปได้ว่า สารสกัดเอธานอลจากแห้ม มีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูปกติและหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานโดย streptozotcin โดยมีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ดีกว่า glibenclamide ภายหลังป้อนด้วยน้ำตาลกลูโคส และมีฤทธิ์ใกล้เคียงกับ acarbose ในการลดระดับน้ำตาลในเลือดภายหลังป้อนด้วยน้ำตาลมอลโตสและซูโครส สารสกัดเอธานอลจากแห้มยังมีผลกระตุ้นการหลั่งอินซูลินได้โดยตรงจากตับอ่อน โดยออกฤทธิ์ได้ดีกว่า berberine ซึ่งเป็นสารที่เคยมีรายงานว่าเป็นสารออกฤทธิ์ที่สำคัญในแห้ม จึงเป็นไปได้ว่า สารออกฤทธิ์ตัวอื่นนอกเหนือจาก berberine ที่พบในสารสกัดเอธานอลจากแห้มสามารถออกฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งอินซูลินได้ จึงควรต้องมีการทดสอบต่อไปในอนาคตว่าสารสำคัญตัวใดที่พบในสารสกัดแห้มเป็นตัวที่ออกฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งอินซูลิน นอกจากนี้ทางคณะผู้วิจัยยังพบว่า สารสกัดเอธานอลจากแห้มสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ maltase และ sucrase ที่พบในลำไส้เล็ก และจากการทดสอบฤทธิ์กึ่งเฉียบพลันของสารสกัดเอธานอลจากแห้มโดยการป้อนสารสกัดแห้มให้หนูปกติและหนูเบาหวานกินวันละครั้ง ติดต่อกัน 30 วัน พบว่าสารสกัดแห้มมีแนวโน้มลดระดับโคเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ได้เล็กน้อย แต่เพิ่มระดับ HDL ในกระแสเลือดได้ โดยไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการทำงานของตับ แต่อาจมีผลเสียต่อการทำงานของไตได้โดยเฉพาะในหนูปกติ จึงควรทำการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับพิษของสารสกัดแห้มต่อไตและพิษเรื้อรังในอนาคต โดยการป้อนสารสกัดแห้มให้หนูขาวกินติดต่อกันอย่างน้อย 6 เดือน ถึง 1 ปี

บรรณานุกรม

ประนอม เดชวิศิษฏ์สกุล, รพีพล ภโววาท, ไพรินทร์ ทองคุ้ม, ตถาพร ไม้สน.ลักษณะทางเภสัชเวชของแห้ม . ว กรมวิทย์ พ . 2545; 44 (1): 1-10.

สำนักงานวางแผนนโยบายสุขภาพ (กระทรวงสาธารณสุข). Chronic disease heart disease and diabetes: Public health in Thailand; 1995-1996.

Andre, J. S., and Pierre, J.L. Treatment of diabetes mellitus. In Cesare, S. (ed.), Clinical pharmacology, pp.685-698. England: McGraw-Hill, 2000.

Basnet, P., Kadota, S., Terashima, S., Shimizu, M., and Namba, T. Two new 2-arylbenzoferan derivertives from hypoglycemic activity-bearing fraction of Morus insignis. Chem. Pharm. Bull (Tokyo) 1993; 41(7): 1238-1243.

Daniel R. Delmar's guide to laboratory and diagnostic test. New York: Delmar; adivision of Thomson Learning, 2002.

Dechwissakul P, Babovada R, Thongkhoom P, Maison T. Pharmacognostic identification of hamm. Thai J Pharm Sci. 2000; 24(suppl): 31.

Hanefeld M, Fischer S, Schulze J, Spengler M, Wargenau M, Schoolberg K, Fucker K. Therapeutic potentials of acarbose as first-line drug in NIDDM insufficiently treated with diet alone. Diabetes Care. 1991; 14(8):732-737.

Hattori M, Nakabayashi T, Lim YA, Miyashiro H, Kurokawa M, Shiraki K, Gupta MP, Correa M, Pilapitiya U. Inhibitory effect of various ayurvedic and panamanian medicinal plants on the infection of herpes simplex virus-1 in vitro and in vivo . Phytother res. 1995; 9 (4): 270-276.

Kaewpradub S. The alkaloids from the stem of *Coscinium fenestratum* Colebr. Master's Thesis, Department of Pharmacognosy, Graduate school, Chulalongkorn University, 1992.

King H, Aubert R.E., Herman W.H. Global durden of diabetes 1995-2025 prevalene,numberical estimates and projections . Diabetes Care . 1998; 21: 1414-1431.

Luzi, L., and Pozza, G. Gilbenclamide: an old drug with a novel mechanism of action. Acta. Diabetol. 1997; 34: 239-244.

Namba T, Sawa K, Gewali MB, Hattori M, Naruse Y, Kagamimori S . Studies on development of immunomodulating drugs (II) effect of ayurvedic medicines on blastogenesis of lymphocytes from mice . Shoyakugaku zasshi . 1989; 43 (3): 250-255.

Namba T, Tsunezuka M, Dissanayake DMRB, Pilapitiya U, Saito K, Kakiuchi N, Hattori M. Studies on dental caries prevention by Traditional medicines (part VII) screening of ayurvrdic medicines for anti-plaque action . Shoyakugaku zasshi . 1985 ; 39 (2) : 146-153 .

Namking, M. Acute toxicity of *Coscinium fenestratum* on liver, kidney, heart, lung and testis in rats. Master Thesis 2002. Faculty of Medicine, Khon Kean University.

Noor H, Ashcroft SJ. Pharmacological characterization of the antihyperglycemic properties of *Tinospora crispa* extract . J Ethnopharmacol . 1998; 62:7-13.

Oki, T., Matsui, T., Osajima, Y. Inhibitory effect of alphaglucosidase inhibitors varies according to its origin. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1999; 47:550–553.

Palasuntheram C, Iyer KS, De Silva LB, De Silva T. Antibacterial activity of *Cosinium fenestratum* Colebr against *Clostridium tetani* . Indian J med res . 1982; 76:71-76.

Pan, GY, Huang JJ, Wang GJ, Fawcett JP, Liu XD, Zhao XC, Sun JG, Xie YY. The hyperglycemic activity of berberine arises from a decrease of glucose absorption. *Planta Med* 2003; 69(7):632-636.

Paopadetkarn, A. Effect of water extract from *COSCINIUM FENESTRATUM* on blood glucose in rats. Degree of Master Science in Biomedicinal Chemistry. Department of Biochemistry Faculty of Pharmaceutical Sciences Chulalongkorn University, 2002.

Peungvicha P, Thirawarapan S, Watanabe H . Hyperglygemic effect of water extract of the root of *Pandanus odorus* RIDL . Biol pharm Bull . 1996;19(3):364-366.

Pinho PMM, Pinto MMM, Kijjoa A, Pharadai K, Diaz JG, Herz W. Protoberberine alkaloids from *Cosinium fenestratum* . Phytochemistry . 1992; 31(4):1403-1407.

Pushparaj P, TanCH, Tan BKH. Effect of Averrhoa bilimbi leaf extract on blood glucose and lipids in streptozotocin-diabetic rats . J Ethnopharmacol . 2000; 72:69-76 .

Siwon J, Verpoerte R, Van Essen FA, Svendsen AB. Studies on Indonesian medicinal plants. Planta Med 1980; 38:24-32.

Singh GB, Singh S, Malhotra S. Hypotensive action of a *Cosinium fenestratum* stem eatract. *J Ethnopharmacol.* 1990; 30 (2):151-155.

Singhana, B. Biological active compounds from *Coscinium fenestratum* (Gaertn.) Colebr. Degree of Master of Science in Chemistry. Department of Chemistry Faculty of Sciences Chulalongkorn University, 2002.

Schmid-Antomarchi, H., De Weille, J., Fosset, M., and Lazdunski, M. *The receptor for antidiabetic sulfonylureas* controls the activity of the ATP-modulated K+ channel in insulin-secreting cells. J. Biol. Chem. 1987;262: 15840-15844.

The Forest Herbarium . Royal Forest Department Flora of Thailand. 1991;5(3):334-335 .

Tran QL, Tezuka Y, Ueda JY, Nguyen NT, Maruyama Y, Begum K, Kim HS, Wataya Y, Tran QK, Kadota S, In vitro antiplasmodial activity of antimalarial medicinal plants used in Vietnamese traditional medicine . J Ethnopharmacol . 2003;86 (2-3):249-252.

Ueda JY, Tezuka Y, Banskota AH, Le Tran Q, Tran QK, Harimaya Y, Saiki I, Kadota S. Antiproliferative activity of Vienamese medicinal plants . Biol Pharm Bull . 2002; 25 (6):753-760.

Varier NS, Pillai PP. Alkaloids of *Cosinium fenestratum* . Curr Sci . 1943;12:228-229.

Venukumar MR, Latha MS. Antioxidant effect of *Cosinium fenestratum* in carbon tetracholide treated rats . Indian J Physiol Pharmacol. 2002;46(2):223-228 .

Yibchock-anun S, Cheng H, Heine PA, HSU WH. Characterization of receptors mediating AVP-and OT-induced glucagon release from the rat pancreas . Am J Physiol . 1999;277 (Endocrinol metab.40) : E56-E62 .

Yin J, Hu R, Chen M, Tang J, Li F, Yang Y, Chen J. Effects of berberine on glucose metabolism in vitro. Metabolism 2002; 51(11): 1439-1443.