

Thesis Title Effects of Curcuminoids Supplement on Insulin-Signaling Cascade in Skeletal Muscle of High-Fat Induced Obese Rats with Impaired Glucose Tolerance

Author Miss Sopida Apichai

Degree Master of Science (Physiology)

Thesis Advisory Committee

Dr. Narissara Laileard

Advisor

Asst. Prof. Dr. Anchalee Pongchaidecha

Co-advisor

ABSTRACT

Impaired glucose tolerance (IGT) is a condition associated with insulin resistance (IR) and an increased risk of type 2 diabetes mellitus (T2DM). Elevated plasma free fatty acid (FFA) accompanied with the accumulation of lipids and lipids metabolite plays an important role in developing IR. A decrease in insulin-stimulated glucose disposal which is due to impaired insulin-signaling cascade has been reported in obese insulin resistant rats. Curcuminoids display antihyperglycemic and lipid-lowering actions in both diabetic and obese rats. Curcuminoids also prevent liver triglyceride (TG) accumulation and epididymal adipose tissue weight gain in high-fat fed rats. However, its effects on insulin signaling have not yet been verified. In the present study, we hypothesized that the administration of curcuminoids supplement ameliorated the defect in insulin-signaling cascade in the skeletal muscle of high-fat induced obese rats with IGT.

The experiments were performed on male Wistar rats. The animals were randomly divided into two groups; the control normal diet (ND, n=10) and the control high-fat diet (CHF, n=30). The animals in the ND group consumed a diet containing fat at 20% of the total energy in the diet (%E) for 20 weeks while those in CHF group received a high-fat diet containing fat at 60%E. After 10 weeks of the dietary period,

the animals in the CHF group were subdivided into 3 groups: high-fat diet (HF), high-fat diet with curcuminoids supplement (CUR) and high-fat diet with pioglitazone treatment (PGT). Curcuminoids (100 mg/kg BW) or pioglitazone (10 mg/kg BW) was administered by oral gavage to the CUR and PGT groups, respectively, from the 11th week until the 20th week. An oral glucose tolerance test (OGTT) was carried out at week 10 and 20. At the end of experiment, the intravenous insulin glucose tolerance test (IVIGTT) was performed to determine the insulin sensitivity. The animals were then sacrificed, and blood and tissue samples were collected for biochemical analysis. Triglyceride content in the liver and skeletal muscle were determined. Glucose transporter 4 (GLUT4), insulin receptor substrate-1 (IRS-1) and the serine 307 phosphorylation of IRS-1 protein expression in skeletal muscle were detected using electrophoresis technique.

The results showed that 10 weeks of high-fat feeding led to a marked increase in body weight accompanied by an increased energy intake ($p<0.05$). Compared with the ND group, fasting plasma glucose, free fatty acid (FFA), and triglyceride (TG) levels were significantly elevated in the CHF group ($p<0.05$), while fasting plasma insulin levels tended to increase ($p>0.05$). HOMA index and both the total and incremental areas under the curve for glucose (TAUC_g and IAUC_g) increased significantly higher in the CHF group than in the ND group ($p<0.05$). These results suggested that the rats that received the high-fat diet for 10 weeks exhibited obesity, whole body insulin resistance and IGT.

After 20 weeks of the dietary period, the visceral obesity and the significant increase of fasting plasma glucose, FFA, TG and insulin levels were observed in the HF group compared with the ND group ($p<0.05$). TG accumulation in the liver and skeletal muscle significantly increased in the HF group ($p<0.05$). The percent changes of TAUC_g and IAUC_g from weeks 10 to 20 indicated that the degree of developed IGT significantly increased ($p<0.05$) while the insulin sensitivity as expressed by K value apparently decreased in the HF group with respect to the ND group ($p<0.05$). The total GLUT4 and IRS-1 expressions significantly decreased while the serine 307 phosphorylation of IRS-1 in the soleus muscle significantly

increased in the HF group compared with the ND groups ($p<0.05$), suggesting defects in the glucose transport system and the early insulin-signaling step.

Curcuminoids supplement significantly decreased fasting plasma glucose, insulin, TG, and FFA levels ($p<0.05$). There were significantly decreased TG contents in the liver, and skeletal muscle in the CUR group compared with the HF group ($p<0.05$). Curcuminoids supplement also significantly lowered the serine 307 phosphorylation of IRS-1 and restored the GLUT4 expression in the soleus muscle of high-fat fed rats with IGT (both $p<0.05$). Insulin sensitivity (K value) was significantly higher in the CUR than in HF groups ($p<0.05$). Correspondingly, the degree of deteriorated IGT and the developed HOMA index in high-fat fed rats were significantly decreased by curcuminoids supplement ($p<0.05$).

These findings showed that high-fat feeding induced visceral obesity and IGT with decreased overall insulin sensitivity. The decreased GLUT4 and IRS-1 expressions with an increased IRS-1 Ser 307 phosphorylation in the soleus muscle of high-fat induced obese rats with IGT suggested defects in the insulin-signaling step. Curcuminoids supplement ameliorated the impaired expression and function of the insulin-signaling in the skeletal muscle which partly contributed to improved insulin sensitivity in high-fat induced obese rats with IGT.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

ผู้เขียน

ปริญญา

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผลของเคอร์คูมินอยต์ต่อการส่งสัญญาณอินชูลินใน
กล้ามเนื้อลายของหนูขาวอ้วนที่มีความทนทานต่อ²
กลูโคสบกพร่องจากการได้รับไขมันสูง

นางสาวโสภิญา อภิชัย

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สุริริวิทยา)

ดร. นริศรา ໄลส์เลิศ

พศ. ดร. อัญชลี พงศ์ชัยเดชา

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

ความทนทานต่อกลูโคสบกพร่องเป็นสภาวะที่มีความสัมพันธ์กับภาวะดื้อต่ออินชูลินและการเพิ่มความเสี่ยงของการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 การเพิ่มขึ้นของครดไขมันอิสระในพลาสมา ร่วมกับการสะสมไขมันและผลผลิตจากกระบวนการเมแทบoliซึมของไขมันมีบทบาทสำคัญต่อการเกิดภาวะดื้อต่ออินชูลิน จากรายงานการศึกษาในหนูอ้วนที่มีภาวะดื้อต่ออินชูลินพบว่า ความสามารถในการพากลูโคสเข้าสู่เซลล์ของอินชูลินที่ลดลงนั้นเกี่ยวข้องกับความบกพร่องในการส่งสัญญาณของอินชูลิน สารเคอร์คูมินอยสารธรรมชาติที่ต้านภาวะน้ำตาลในเลือดสูงและลดระดับไขมันในหนูเบาหวานและหนูอ้วน นอกจากนี้สารเคอร์คูมินอยยังช่วยป้องกันการสะสมไตรกลีเซอไรด์ในตับและการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวในหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงอีกด้วย อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาผลของสารเคอร์คูมินอยต่อการส่งสัญญาณอินชูลิน ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมีสมมติฐานว่าการให้สารเคอร์คูมินอยจะช่วยลดความบกพร่องของการส่งสัญญาณอินชูลินในกล้ามเนื้อลายของหนูขาวอ้วนที่มีความทนทานต่อกลูโคสบกพร่องจากการได้รับอาหารไขมันสูง

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาในหนูขาวเพศผู้พันธุ์ Wistar โดยแบ่งสัตว์ทดลองออกเป็นกลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารปกติ (ND, จำนวน 10 ตัว) และกลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารไขมันสูง (CHF, จำนวน 30 ตัว) สัตว์ทดลองในกลุ่ม ND จะได้รับอาหารที่มีปริมาณไขมันร้อยละ 20 ของพลังงานทั้งหมดเป็นเวลา 20 สัปดาห์ ในขณะที่สัตว์ทดลองในกลุ่ม CHF จะได้รับอาหารที่

มีปริมาณไขมันร้อยละ 60 ของพลังงานทั้งหมด เมื่อครบ 10 สัปดาห์แรกหนูในกลุ่ม CHF จะถูกแบ่งเป็นกลุ่มอย่าง 3 กลุ่มคือ กลุ่มได้รับอาหารไขมันสูง (HF) กลุ่มได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับการให้สารเคอร์คูมินอยด์ (CUR) และกลุ่มได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับการให้ยาพิโอกลิตาโซน (PGT) ซึ่งจะให้สารเคอร์คูมินอยด์และยาพิโอกลิตาโซนในขนาด 100 และ 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมตามลำดับ โดยการป้อนทางปากตั้งแต่สัปดาห์ที่ 10 ถึงสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 10 และ 20 ทำการทดสอบความทนทานต่อกลูโคสทางปากและการทดสอบความทนทานต่ออินซูลินโดยการฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำเพื่อศึกษาความไวในการตอบสนองต่ออินซูลินจากนั้นทำการเก็บตัวอย่างเลือดและเนื้อเยื่อเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ทางชีวเคมี ตรวจวัดปริมาณไตรกลีเซอร์ไรด์ในตับและกล้ามเนื้อ นอกจากนี้ยังตรวจวัดปริมาณโปรตีนของตัวตนส่งกลูโคสชนิดที่ 4 (GLUT4) อินซูลินรีเซพเตอร์ซับสเตรทที่ 1 (IRS-1) และปริมาณโปรตีนของอินซูลินรีเซพเตอร์ซับสเตรทที่ 1 ที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตในตำแหน่งของเซอเลน 307 (serine 307 phosphorylation of IRS-1) ในกล้ามเนื้อ โดยใช้เทคนิคอิเล็ก troponin T ให้ทราบว่าการให้อาหารไขมันสูงเป็นเวลา 10 สัปดาห์ มีผลเพิ่มน้ำหนักตัวร่วมกับการเพิ่มค่าพลังงานของอาหารที่ได้รับในกลุ่ม CHF อย่างมีนัยสำคัญ ระดับกลูโคส กรดไขมันอิสระและไตรกลีเซอร์ไรด์ในพลาสmaเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่ระดับอินซูลินในพลาสmaมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในกลุ่ม CHF เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม ND นอกจากนี้ค่าดัชนีที่บ่งบอกถึงภาวะดื้อต่ออินซูลิน (HOMA index) พื้นที่ใต้กราฟของกลูโคสทั้งหมด (TAUC_g) และพื้นที่ใต้กราฟของกลูโคสที่เพิ่มขึ้น (IAUC_g) มีค่าเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่ม CHF เมื่อเทียบกับกลุ่ม ND จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงเป็นเวลา 10 สัปดาห์จะมีภาวะอ้วน ดื้อต่ออินซูลินและความทนทานต่อกลูโคสบกพร่อง เมื่อสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 20 พบร่างกายใน HF มีภาวะอ้วน ระดับกลูโคส กรดไขมันอิสระ ไตรกลีเซอร์ไรด์ และอินซูลินในพลาสmaเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่ม ND เช่นเดียวกับการสะสมของไตรกลีเซอร์ไรด์ในตับและกล้ามเนื้อเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงของพื้นที่ใต้กราฟทั้งหมดและที่เพิ่มขึ้นของกลูโคสจากสัปดาห์ที่ 10 ถึง 20 ในกลุ่ม HF เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญซึ่งบ่งชี้ถึงระดับความทนทานต่อกลูโคสบกพร่องที่แย่ลง ขณะที่ความไวต่ออินซูลินซึ่งแสดงโดยค่า K ที่ได้จากการทดสอบความทนทานต่ออินซูลินมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่ม HF เมื่อเทียบกับกลุ่ม ND ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณโปรตีนของตัวตนส่งกลูโคสชนิดที่ 4 และอินซูลินรีเซพเตอร์ซับสเตรทที่ 1 ที่

เมื่อสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 20 พบร่างกายใน HF มีภาวะอ้วน ระดับกลูโคส กรดไขมันอิสระ ไตรกลีเซอร์ไรด์ และอินซูลินในพลาสmaเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่ม ND เช่นเดียวกับการสะสมของไตรกลีเซอร์ไรด์ในตับและกล้ามเนื้อเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงของพื้นที่ใต้กราฟทั้งหมดและที่เพิ่มขึ้นของกลูโคสจากสัปดาห์ที่ 10 ถึง 20 ในกลุ่ม HF เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญซึ่งบ่งชี้ถึงระดับความทนทานต่อกลูโคสบกพร่องที่แย่ลง ขณะที่ความไวต่ออินซูลินซึ่งแสดงโดยค่า K ที่ได้จากการทดสอบความทนทานต่ออินซูลินมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่ม HF เมื่อเทียบกับกลุ่ม ND ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณโปรตีนของตัวตนส่งกลูโคสชนิดที่ 4 และอินซูลินรีเซพเตอร์ซับสเตรทที่ 1 ที่

มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนปริมาณโปรตีนของอินซูลินรีเซพเตอร์ชั้บสเตรทที่ 1 ที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตในตำแหน่งของเซอเลิน 307 เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในกล้ามเนื้อโขรเลียสในกลุ่ม HF เมื่อเทียบกับกลุ่ม ND แสดงให้เห็นว่ามีความผิดปกติของกระบวนการขนส่งกลูโคสและการส่งสัญญาณอินซูลินส่วนต้นเกิดขึ้น

การให้สารเคอร์คูมินอย์ในกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงเป็นเวลา 10 สัปดาห์ มีผลช่วยลดระดับกลูโคส อินซูลิน ไตรกลีเซอร์ไรด์และกรดไขมันอิสระในพลาสมาอย่างมีนัยสำคัญ การสะสมไตรกลีเซอร์ไรด์ที่ตับและกล้ามเนื้อลายลดลงอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน นอกจากนี้ยังพบว่ามีการลดปริมาณโปรตีนของอินซูลินรีเซพเตอร์ชั้บสเตรทที่ 1 ที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตในตำแหน่งของเซอเลิน 307 และเพิ่มปริมาณโปรตีนของตัวขนส่งกลูโคสชนิดที่ 4 ให้กลับสู่ระดับปกติในกล้ามเนื้อโขรเลียส ลดคลื่องกับความไวต่ออินซูลิน (K value) ที่เพิ่มสูงกว่ากลุ่ม HF รวมทั้งระดับความรุนแรงของภาวะความทันต่อกลูโคสบกพร่องและค่าดัชนีของภาวะดื้อต่ออินซูลินที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ

จากการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการให้อาหารไขมันสูงเป็นเวลา 20 สัปดาห์สามารถเห็นได้ในภาวะอ้วน ความทันต่ออินซูลิน ลดลงของตัวขนส่งกลูโคสชนิดที่ 4 และอินซูลินรีเซพเตอร์ชั้บสเตรทที่ 1 ร่วมกับการเพิ่มขึ้นของอินซูลินรีเซพเตอร์ชั้บสเตรทที่ 1 ที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตในตำแหน่งของเซอเลิน 307 ในกล้ามเนื้อโขรเลียส ซึ่งเป็นการแสดงให้เห็นว่าเกิดความบกพร่องในการส่งสัญญาณอินซูลินส่วนต้น และการให้สารเคอร์คูมินอย์สามารถช่วยบรรเทาความผิดปกติที่มีอยู่ในส่วนของปริมาณของโปรตีนและการทำงานของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณอินซูลินในกล้ามเนื้อลาย ส่งผลให้หมูที่ได้รับอาหารไขมันสูงที่มีภาวะอ้วนและความทันต่อกลูโคสบกพร่องมีความไวต่อการตอบสนองต่ออินซูลินเพิ่มขึ้น