

ฤทธิ์ของสารสกัดใบมะรุมต่อการสลายไขมันในเซลล์ไขมันจากหนูขาว

Effects of *Moringa oleifera* Lam. Leaf Extract on Lipolysis in Rat Adipocytes

อติกา จารุโชติกมล¹, ปวีตรา พูลบุตร¹, จริยาพร เปริศแก้ว², ปวีณส์สุดา สามสี², รุ่งนภา ปาพรหม², ศิวากรณ์ แदनรัช²
 Atika Jaruchotikamol¹, Pawitra Pulbutr¹, Jariyaporn Prirskae², Paweesuda Samsri²,
 Rungnapa Paprom², Siwakorn Danruck²

Received: 14 March 2012 ;Accepted: 19 May 2012

บทคัดย่อ

มะรุมเป็นพืชในวงศ์ Moringaceae มีการนำมาเป็นอาหารและใช้เป็นยาตามภูมิปัญญาท้องถิ่นพื้นบ้านในประเทศเขตร้อน การศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่า สารสกัดใบมะรุมมีฤทธิ์ลดระดับไขมันและลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ อย่างไรก็ตามกลไกการออกฤทธิ์ดังกล่าวยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด เมื่อการสลายไขมันในเซลล์ไขมันมีความเกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมของไขมันและน้ำตาล การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดใบมะรุมที่สกัดด้วยน้ำและสกัดด้วยเอทานอล ต่อการสลายไขมันในเซลล์ไขมันจากหนูขาวพันธุ์ Wistar เพศผู้ โดยแบ่งหนู 16 ตัวออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 8 ตัว เลี้ยงด้วยอาหารที่แตกต่างกัน 2 ชนิด คือ อาหารปกติ (normal pellet diet; NPD) และอาหารไขมันสูง (high fat diet; HFD) เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ จากนั้นตัดแยกเนื้อเยื่อไขมันบริเวณอวัยวะมาเตรียมเซลล์ไขมันโดยใช้วิธีการย่อยด้วยเอนไซม์ collagenase ทดสอบสารสกัดใบมะรุมที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยทำการทดลองทั้งในสภาวะที่ไม่มี isoprenaline (basal lipolysis) และมี isoprenaline (0.1 μ M; ISO-induced lipolysis) และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง การสลายไขมันของเซลล์ไขมันแสดงด้วยค่าความเข้มข้นของกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นใน incubation media พบว่า สารสกัดใบมะรุมที่สกัดด้วยน้ำที่ความเข้มข้น 1 และ 3 mg/mL เพิ่มการสลายไขมันได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$; $n = 4$) ที่สภาวะ basal lipolysis ทั้งในกลุ่มหนู NFD และ HFD และเป็นที่น่าสนใจคือ สารสกัดด้วยน้ำที่ความเข้มข้น 0.3 และ 1 mg/mL มีฤทธิ์ยับยั้งการสลายไขมันได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$; $n = 4$) ที่สภาวะ ISO-induced lipolysis ทั้งในกลุ่มหนู NFD และ HFD ในขณะที่สารสกัดใบมะรุมที่สกัดด้วยเอทานอลเฉพาะที่ความเข้มข้นสูงสุด คือ 3 mg/mL ที่เพิ่มการสลายไขมันได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$; $n = 4$) ที่สภาวะ basal lipolysis ในกลุ่มหนู NFD แต่ไม่มีผลในกลุ่มหนู HFD อีกทั้งสารสกัดใบมะรุมที่สกัดด้วยเอทานอล ก็ไม่มีผลกับเซลล์ไขมันในสภาวะ ISO-induced lipolysis ในหนูขาวทั้งสองกลุ่ม ฤทธิ์ของสารสกัดใบมะรุมต่อการสลายไขมันที่เกิดขึ้นนี้อาจมีความเกี่ยวข้องกับกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดใบมะรุมในการลดระดับไขมันและระดับน้ำตาลในเลือด อย่างไรก็ตามกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดใบมะรุมยังคงไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด จำเป็นต้องทำการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมต่อไป

คำสำคัญ: มะรุม สารสกัดใบที่สกัดด้วยน้ำ สารสกัดใบที่สกัดด้วยเอทานอล การสลายไขมันในเซลล์ไขมันจากหนูขาว

Abstract

The Moringa oleifera Lam. (MOL), plant in the family Moringaceae, is traditionally used as food or folk medicine in tropical areas. It has been demonstrated in animal models that the leaf extract of MOL has hypocholesterolemic and antidiabetic activities. However, its mechanism of action has not been reported clearly. Adipocyte lipolysis plays an important role in regulating lipid and glucose metabolism. The objective of this study was to investigate the effects of the aqueous and ethanol extract of MOL leaves on rat adipocyte lipolysis. Sixteen male Wistar rats were

¹ อาจารย์, คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม, ² นิสิตเภสัชศาสตร์ (PharmD) คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

¹ Lecturer, Faculty of Pharmacy, Mahasarakham University, ² PharmD Student, Faculty of Pharmacy, Mahasarakham University

* Corresponding author: Atika Jaruchotikamol, Faculty of Pharmacy, Mahasarakham University, Maha Sarakham 44150.

E-mail : atikajaru@yahoo.com

divided into two groups with eight rats in each. Each group was fed with two different types of diet (normal pellet diet; NPD or high fat diet; HFD) for 3 weeks. Adipocytes were isolated and prepared from the rat epididymal fat pads by using the collagenase digestion method. The adipocyte suspensions were treated with various concentrations of the extract both in the absence (basal lipolysis) or the presence of isoprenaline (0.1 μ M; ISO-induced lipolysis) at 37 °C for 2 hr. The level of the adipocyte lipolysis was indicated by the concentrations of free fatty acid (FFA) in the incubation media. The aqueous leaf extract of MOL at the concentrations of 1 and 3 mg/mL significantly ($p < 0.05$; $n = 4$) increased the basal lipolysis both in the adipocytes derived from NPD-fed rats and HFD-fed rats, when compared to controls. Interestingly, the aqueous leaf extract of MOL at the concentrations of 0.3 and 1 mg/mL produced a significant ($p < 0.05$; $n = 4$) inhibitory effect on ISO-induced lipolysis in the adipocytes derived both from NPD-fed rats and HFD-fed rats. On the other hand, the ethanol leaf extract of MOL only at the highest concentration of 3 mg/mL significantly ($p < 0.05$; $n = 4$) increased the basal lipolysis in the adipocytes derived from NPD-fed rats. However, no significant difference was found in the adipocytes derived from HFD-fed rats. Moreover, the ethanol leaf extract could not produce a significant effect on ISO-induced lipolysis in the adipocytes derived both from NPD-fed rats and HFD-fed rats. The lipolytic regulating effect of the MOL leaf extract may probably be related to the therapeutic actions of the MOL extract on dyslipidemia and diabetes. However, their mechanism is still unclear. Further studies on their mechanism of actions are thus needed.

Keyword: *Moringa oleifera*, leaf aqueous extract, leaf ethanol extract, rat adipocyte lipolysis

บทนำ

ในแต่ละวันคนเรารับประทานอาหารประเภทไขมันประมาณ 60-150 กรัม โดยประมาณ 90% ของไขมันที่รับประทานอยู่ในรูป triglyceride (TG) ส่วนที่เหลือเป็นไขมันชนิดอื่นๆ เช่น cholesterol, cholesterol ester, phospholipid และ free fatty acid (FFA) TG เป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญของมนุษย์และถูกเก็บสะสมในเนื้อเยื่อไขมันได้อย่างไม่จำกัด¹ การสะสม TG มากเกินไปมีผลทำให้เกิดภาวะอ้วน ซึ่งภาวะอ้วนนี้มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคทาง metabolic syndrome เช่น โรคเบาหวานชนิดที่ 2 โรคหัวใจและหลอดเลือด และโรคความดันโลหิตสูง² ซึ่งโรคเหล่านี้ล้วนส่งผลให้รัฐบาลต้องมีการค่าใช้จ่ายในด้านการรักษาพยาบาล และโรคเหล่านี้มีอัตราการตายเพิ่มมากขึ้น³

ช่วงเวลาที่ร่างกายมีพลังงานใช้อย่างเพียงพอ TG จะถูกสังเคราะห์และเก็บไว้ในรูป lipid droplet ในเซลล์ไขมัน (adipocyte) เมื่อร่างกายมีความต้องการใช้พลังงานเพิ่มมากขึ้น เช่น เมื่อร่างกายขาดแคลนพลังงานจากการอดอาหารหรือออกกำลังกายอย่างหนัก หรือเมื่อมีภาวะเครียด เป็นต้น ร่างกายจะเพิ่มการสลายไขมัน (lipolysis) โดยการเกิดปฏิกิริยา hydrolysis ของ TG ซึ่งอาศัยเอนไซม์ hormone-sensitive lipase (HSL) ได้เป็น FFA และ glycerol หลังจากนั้น FFA และ glycerol จะเข้าสู่กระแสเลือด และถูกนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานให้กับเซลล์ต่างๆ ในร่างกายต่อไป⁴ ดังนั้นการเพิ่ม

ขึ้นของการสลายไขมันจึงช่วยในการลดการสะสมไขมันในเซลล์ไขมัน ซึ่งน่าจะมีผลช่วยลดภาวะอ้วนได้⁵ อย่างไรก็ตาม การสลายไขมันมีความสัมพันธ์กับโรคเบาหวาน โดยพบว่า insulin มีฤทธิ์ยับยั้งการสลายไขมันผ่านการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HSL^{4, 6} ดังนั้นการลดลงของการสลายไขมันจึงน่าจะมีส่วนช่วยในการลดระดับน้ำตาลในเลือดเช่นเดียวกับการได้รับ insulin นอกจากนี้ยังพบว่า หากมีระดับ FFA ในเลือดสูงแต่การเผาผลาญไปเป็นพลังงานเกิดขึ้นไม่ทัน จะนำไปสู่การเกิดภาวะ dyslipidemia⁷ ดังนั้นการยับยั้งการสลายไขมันอาจเป็นกลไกหนึ่งของยาลดระดับไขมันในเลือดได้เช่นกัน

ปัจจุบันหลายประเทศทั่วโลกให้ความสนใจในการใช้สมุนไพรช่วยลดระดับไขมันและน้ำตาลในเลือดเพิ่มมากขึ้น มะรุม (*Moringa oleifera* Lam.; MOL) ซึ่งเป็นพืชในวงศ์ Moringaceae เป็นสมุนไพรชนิดหนึ่งที่กำลังได้รับความนิยมมะรุมมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย^{8, 9, 10} ในประเทศอินเดียเชื่อว่าใบมะรุมมีผลในการลดระดับน้ำตาลและ cholesterol และแนะนำให้ใช้ในผู้ป่วยที่มีภาวะอ้วน^{11, 12} มะรุมเป็นพืชที่พบได้ทั่วไปในทุกภูมิภาคของประเทศไทย ประชาชนตามท้องถิ่นต่างๆ นิยมนำมะรุมมาประกอบเป็นอาหาร ใบมะรุมประกอบด้วยสารที่มีคุณค่าทางโภชนาการในปริมาณสูง เช่น vitamin A, β -carotene, plant sterols และสารอื่นๆ^{13, 14, 15} นอกจากนี้ยังมีรายงานผลการวิจัยเกี่ยวกับใบมะรุมว่าสามารถลดระดับไขมันและระดับน้ำตาลในเลือดได้ เช่น การศึกษาโดยให้สาร

สกัดหยาบของใบมะรุมที่สกัดด้วยน้ำแกงหนูขาวพันธุ์ Wistar ที่ได้รับอาหารไขมันสูง ขนาด 1 mg/g/day เป็นเวลา 30 วัน พบว่า ระดับ cholesterol ในเลือดลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม¹¹ และการศึกษาโดยการป้อนสารสกัดใบมะรุม ขนาด 100, 200 และ 300 mg/kg ในหนูขาว Wistar ปกติ และหนูที่เป็นเบาหวานเป็นระยะเวลา 21 วัน พบว่า ระดับ fasting blood glucose (FBG) และระดับ oral glucose tolerance test (OGTT) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม¹² การศึกษาในทางคลินิก โดยการให้ผู้ป่วยโรคเบาหวานและผู้ที่ไม่เป็นโรคเบาหวาน ดื่มน้ำชาจากใบมะรุมแห้งพบว่า กลุ่มผู้ป่วยโรคเบาหวาน มีระดับน้ำตาลในเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม¹⁶ เนื่องจากมีหลายการศึกษาที่พบว่า สารสกัดมะรุมสามารถลดระดับไขมันและระดับน้ำตาลในเลือดได้ อย่างไรก็ตามข้อมูลการศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการลดระดับไขมันและน้ำตาลของสารสกัดใบมะรุมมีค่อนข้างจำกัด ประกอบกับจากการที่พบว่า การสลายไขมันมีความเกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมของไขมันและน้ำตาลในร่างกายดังที่ได้กล่าวไปแล้ว คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดใบมะรุมที่สกัดด้วยน้ำและสกัดด้วยเอทานอลต่อการสลายไขมันในเซลล์ไขมัน โดยทำการทดลองในเซลล์ไขมันจากหนูขาวที่ได้รับอาหารปกติและอาหารไขมันสูง ทั้งในสภาวะเซลล์ไขมันปกติ (basal lipolysis) และสภาวะเซลล์ไขมันถูกกระตุ้นด้วยสารเคมี (isoprenaline-induced lipolysis) ซึ่งผลการวิจัยจะช่วยอธิบายถึงฤทธิ์ของสารสกัดใบมะรุมต่อการลดระดับไขมัน หรือระดับน้ำตาลในเลือดได้ในระดับหนึ่ง อีกทั้งยังเป็นข้อมูลช่วยยืนยันฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของใบมะรุมในการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้มาตรฐานและสามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางคลินิกได้จริงในอนาคต

วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการศึกษา

การศึกษาดังนี้เป็นการศึกษาเชิงทดลอง (experimental study) โดยทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดใบมะรุมที่สกัดด้วยน้ำและสกัดด้วยเอทานอลต่อการสลายไขมันในเซลล์ไขมันจากหนูขาว

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ ได้แก่ Bovine serum albumin (BSA), Collagenase enzyme (type II) และ Isoprenaline ได้จากบริษัท Sigma (USA) สาร Diethyl ether ได้จากบริษัท Fisher Scientific (USA) ชุดทดสอบ Non-esterified fatty acid assay kit ได้จากบริษัท WAKO chemicals (Japan) และสารเคมีอื่นๆ ที่ใช้ในการศึกษาดังนี้เป็นสารเคมีมาตรฐานจากบริษัท

การเตรียมสารสกัดจากใบมะรุม

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาใช้ใบสดของมะรุมซึ่งเก็บได้จากอำเภอน้ำพอง จังหวัดขอนแก่น ในช่วงเดือนกรกฎาคม 2553 ทำการพิสูจน์ชนิดของพืชและเก็บเป็นตัวอย่างในพิพิธภัณฑ์สมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม โดยอาจารย์ด้านเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม (MSU.PH-MOR-M01) ในการสกัดใช้ใบสดของมะรุมที่เจริญเติบโตเต็มที่ น้ำหนัก 2,320 g และ 3,248 g (สำหรับนำมาสกัดด้วยน้ำและเอทานอลตามลำดับ) เลือกเอาใบที่สดไม่เน่า ล้างทำความสะอาดเอาเศษดินออก และนำไปตากให้แห้งในที่ร่ม ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ สกัดโดยวิธีการหมัก (maceration) นานประมาณ 1 วัน (สำหรับการสกัดด้วยน้ำ) และนานประมาณ 3 วัน (สำหรับการสกัดด้วยเอทานอล) จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรอง 2-3 รอบ (สำหรับการสกัดด้วยเอทานอลจะนำกากกลับมาสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง) นำสารสกัดเหลวที่ได้ไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง rotary vacuum evaporator (สำหรับการสกัดด้วยเอทานอล) ที่อุณหภูมิ 60°C และนำมาระเหิดน้ำออกด้วยเครื่อง lyophilizer (สำหรับการสกัดด้วยน้ำและสกัดด้วยเอทานอล) จนกระทั่งได้สารสกัดที่แห้ง เก็บสารสกัดที่ได้ไว้ในภาชนะที่แห้ง ปิดสนิท ทึบแสง ที่อุณหภูมิ -20 °C จนกระทั่งวันที่ใช้ทดลอง และในการเตรียมสารสกัดความเข้มข้นต่างๆ เพื่อใช้ในการทดลองนั้น จะใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย

การสกัดด้วยน้ำจะได้สารสกัดหยาบเท่ากับ 19.71 g คิดเป็น 0.85% w/w ของใบสด และ การสกัดด้วยเอทานอลจะได้สารสกัดหยาบเท่ากับ 10.20 g คิดเป็น 0.314% w/w ของใบสด

การเตรียมสัตว์ทดลอง

หนูขาว (Wistar rats) เพศผู้ จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา จังหวัดนครปฐม จำนวน 16 ตัว น้ำหนัก 150-200 g นำมาเลี้ยงเพื่อปรับสภาพเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ก่อนเริ่มทำการทดลอง ในห้องสัตว์ทดลอง คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ซึ่งควบคุมสภาพแวดล้อมในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองให้มีระยะเวลาของความสว่าง 12 ชั่วโมง (06.00 น.-18.00 น.) และความมืด 12 ชั่วโมง และควบคุมอุณหภูมิที่ 24±2 °C การปฏิบัติต่อสัตว์ใช้หลักมาตรฐานสากลในการทำวิจัยในสัตว์ทดลอง และงานวิจัยนี้ได้ผ่านจริยธรรมการทดลองในสัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยมหาสารคาม หมายเลขการรับรอง 0006/2554

เมื่อครบ 1 สัปดาห์ สุ่มแบ่งหนูขาวออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 8 ตัว คือ 1) กลุ่มที่ 1: ให้อาหารปกติ (normal pellet

diet; NPD) โดยให้อาหารสัตว์ทดลองชนิดฟันแทะ สูตร 082 บริษัท C.P. ประเทศไทย 2) กลุ่มที่ 2 : ให้อาหารไขมันสูง (high fat diet; HFD) โดยสูตรอาหารสัตว์ทดลองชนิดไขมันสูง จัดแปลงมาจากสูตรอาหารของ Srinivasan และคณะ (2005)¹⁷ เลี้ยงหนูต่อไปนาน 3 สัปดาห์ โดยให้อาหารและน้ำอย่างเพียงพอต่อความต้องการของสัตว์ในแต่ละวัน (*ad libitum*) ชั่งและบันทึกน้ำหนักทุก 7 วัน หลังจากเลี้ยงด้วยอาหารต่างชนิดกัน (วันที่ 0, 7, 14 และ 21 ตามลำดับ)

การเตรียมเซลล์ไขมันจากหนูขาว (adipocyte cell suspension)

หลังจากเลี้ยงหนูขาวเป็นเวลา 3 สัปดาห์ นำหนูขาว มาทำให้หนูสลบและตายอย่างสงบด้วยการให้ดมสารละลาย diethyl ether ทำการตัดแยกเอา epididymal fat pads 1 คู่ตัว จากบริเวณข้างอวัยวะ (ซึ่งน้ำหนักและบันทึกข้อมูลไว้) และเก็บไว้ใน Hanks/BSA buffer solution จากนั้นละลายเอาเส้นเลือดหรือ epididymal tissue อื่นๆ ที่อาจติดมาออก ล้าง epididymal fat pads อีกครั้งด้วย Hanks/BSA buffer solution เพื่อกำจัดเลือดที่เหลือและชนหนูที่ติดมา ใช้กรรไกรตัดเนื้อเยื่อไขมันให้เป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 5 mm เติม collagenase enzyme (type II) ความเข้มข้น 0.5 mg/mL ปริมาตร 10 mL นำส่วนผสมที่ได้เปลี่ยนถ่ายใส่ลงใน Nalgene conical flask ขนาด 25 mL และนำไปแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 7-10 นาที จนได้เป็น milky solution จากนั้นกรอง solution ดังกล่าวด้วยผ้าก๊อซสะอาด 2 ชั้น เพื่อแยกเอาเนื้อเยื่อขนาดใหญ่ออก ปล่อยให้ solution ดังกล่าวให้แยกชั้น (โดยชั้นบนที่เห็นสีขาวเป็นชั้นของ adipocyte ส่วนชั้นที่อยู่ด้านล่างเป็น buffer) ดูดชั้น adipocyte มาล้างด้วย Hanks/BSA buffer solution และนำเซลล์ไขมันที่ได้มาเตรียม adipocyte cell suspension โดยการเติม Hanks/BSA buffer solution ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) เก็บ adipocyte cell suspension ไว้ใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 °C เพื่อทำการทดลองในขั้นต่อไป

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดใบมะรุมที่สกัดด้วยน้ำต่อการสลายไขมัน

นำเซลล์ไขมันของหนูกลุ่ม NPD หรือ HFD ที่ได้เตรียมเป็น cell suspension แล้ว นำมาทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity) โดยการเขย่าเบาๆ และดูดมาปริมาตร 800 μ L ใส่ลงใน microfuge tube ขนาด 1.5 mL เติม Hanks/BSA solution ปริมาตร 200 μ L จากนั้นเติมสารสกัดใบมะรุมที่สกัดด้วยน้ำที่ความเข้มข้นต่างๆ (0, 0.03, 0.1, 0.3, 1, และ 3 mg/mL) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเก็บ incubation media จากตัวอย่างโดยใช้เข็มเบอร์ 25 ที่ต่อ

อยู่กับ syringe ขนาด 1 mL โดยแทงเข็มผ่าน adipocyte layer ลงไปแล้วค่อยๆ ดูดเก็บ incubation media อย่างระมัดระวัง นำ incubation media ที่ได้ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อรอการวิเคราะห์หาปริมาณ FFA โดยชุดทดสอบต่อไป

ในการทดสอบได้ทำการทดสอบในเซลล์ไขมัน 2 สภาวะ คือ

1) สภาวะเซลล์ไขมันปกติ (basal lipolysis) คือ ไม่เติมสารใดๆ ในการกระตุ้นการสลายไขมัน เซลล์ไขมันจึงมีระดับการสลายไขมันต่ำ

2) สภาวะเซลล์ไขมันถูกกระตุ้นด้วยสารเคมี (ISO-induced lipolysis) คือ เติมสารเคมีที่มีฤทธิ์กระตุ้นการสลายไขมัน นั่นคือ isoprenaline ความเข้มข้น 0.1 μ M (โดยเติม ISO ลงในเซลล์ไขมันก่อน จากนั้นเติมสารสกัดความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบตามลงไปทันที) การเติม ISO เพื่อเป็นตัวแทนเซลล์ไขมันที่มีสภาวะโดนกระตุ้นให้มีระดับการสลายไขมันสูงขึ้นกว่าปกติ เทียบเคียงกับสภาพเซลล์ไขมันในร่างกายเมื่อร่างกายต้องการพลังงานและมีการกระตุ้นให้การสลายไขมันเพิ่มมากขึ้น ได้แก่ เมื่อร่างกายมีภาวะเครียด หรือเมื่อออกกำลังกายอย่างหนัก เป็นต้น ซึ่งร่างกายต้องการใช้พลังงานจึงมีการเพิ่มการสลายไขมันโดยผ่านการส่งงานของระบบประสาทซิมพาเทติก^{18, 19}

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดใบมะรุมที่สกัดด้วยเอทานอลต่อการสลายไขมัน

วิธีการทดสอบทำเช่นเดียวกับการทดสอบสารสกัดใบมะรุมที่สกัดด้วยน้ำ โดยเปลี่ยนสารทดสอบเป็นสารสกัดใบมะรุมที่สกัดด้วยเอทานอลแทน โดยใช้ความเข้มข้นที่ต่างกัน คือ 0, 0.3, 1, และ 3 mg/mL

การวิเคราะห์ปริมาณ FFA (FFA assay) ด้วยชุดทดสอบ

เมื่อใช้ non-esterified free fatty acid kit (Wako chemical, Japan) เพื่อหาปริมาณ FFA ที่เกิดขึ้นใน incubation media โดยใช้หลักการ enzymatic colorimetric method หลังจาก FFA ทำปฏิกิริยากับสารทดสอบจะได้สาร quinoneimine ซึ่งมีสีม่วงและดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 492 nm วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader (Anthos 2010 standard plus [GF 1755012] serial number 501289) และทำการคำนวณหาความเข้มข้นของ FFA ในตัวอย่างโดยเทียบกับสาร standard ตามสมการดังแสดงไว้ด้านล่าง (#) จากนั้นคำนวณหาปริมาณของ FFA ที่แท้จริงต่อปริมาณเซลล์ไขมัน ปริมาตร 1 mL (mL Packed cell volume; PCV) ค่าการดูดกลืนแสงจะสัมพันธ์กับปริมาณ FFA ที่เกิดขึ้นซึ่งจะเป็นตัวบ่งบอกระดับการสลายไขมันที่เกิดขึ้นเช่นกัน

$$\text{FFA concentration in sample } (\mu\text{M}) = \frac{\text{FFA standard concentration } (\mu\text{M}) \times (\text{Sample absorbance})}{(\text{Standard absorbance})}$$

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

นำเสนอข้อมูลด้วยค่า mean $\pm$ SD (n=4) การทดสอบทางสถิติใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS version 16 วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยใช้สถิติ One-way ANOVA (Analysis of Variance), bonferroni post hoc test และ Independent-sample *t*-test ที่ช่วงความเชื่อมั่น 95% ระดับนัยสำคัญที่ 0.05

ผลการศึกษา

1. น้ำหนักตัวของหนูขาวและน้ำหนักไขมันบริเวณอัณฑะ (epididymal fat pads)

ที่ระยะเวลาการเลี้ยงในวันที่ 0 และ 7 น้ำหนักตัวของหนูขาวกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (NPD) และกลุ่มที่ได้รับอาหาร

ไขมันสูง (HFD) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยน้ำหนักเฉลี่ยของหนูในกลุ่ม NPD เท่ากับ 188.75 ± 8.35 และ 238.75 ± 13.56 g ตามลำดับ และหนูในกลุ่ม HFD เท่ากับ 186.25 ± 10.61 และ 251.25 ± 15.53 g ตามลำดับ อย่างไรก็ตามในวันที่ 14 และ 21 น้ำหนักตัวของหนูกลุ่ม HFD มากกว่ากลุ่ม NPD อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยน้ำหนักเฉลี่ยของหนูกลุ่ม NPD เท่ากับ 272.50 ± 15.81 และ 298.75 ± 15.53 g ตามลำดับ และน้ำหนักเฉลี่ยของหนูกลุ่ม HFD เท่ากับ 307.50 ± 21.21 และ 333.75 ± 23.87 g ตามลำดับ ดังแสดงใน Figure 1

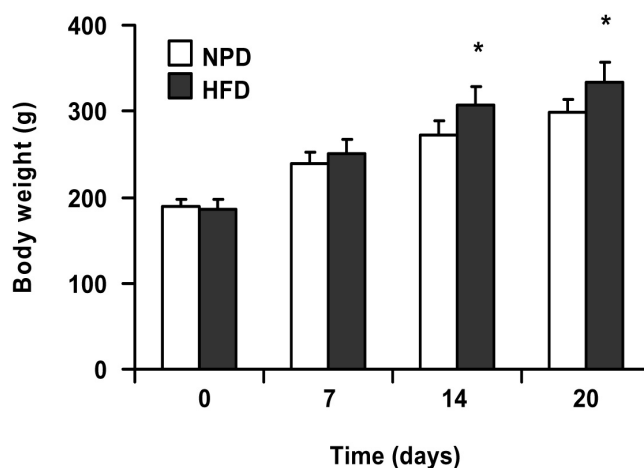


Figure 1 Body weight of Normal Pellet Diet (NPD)-fed rats and High Fat Diet (HFD)-fed rats for 0, 7, 14, and 21 days. Each value represent the mean $\pm$ SD (n=8). Independent sample *t*-test was used for statistical analyses.* $p < 0.05$, mean value was significantly different from NPD-fed group.

หลังจากเลี้ยงหนูเป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ด้วยอาหารต่างชนิดกัน ในวันที่ 21 ของการเลี้ยงด้วยอาหารที่แตกต่างกัน ในขั้นตอนเตรียม adipocyte cell suspension โดยตัดแยกเอาไขมันบริเวณอัณฑะ (epididymal fat pads) ของหนูแต่ละ

ตัวมาชั่งน้ำหนักและบันทึกผลพบว่า น้ำหนักไขมันบริเวณอัณฑะเฉลี่ยในกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง (HFD) มากกว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (NPD) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังแสดงใน Table 1

Table 1 Epididymal fat pads weight of NPD- and HFD-fed rats relative to 100g of body weigh (BW) at day 21

Group	Weight of epididymal fat pads (g/100 g of BW)
NPD	1.60 ± 0.19
HFD	2.54 ± 0.38*

Each value represent the mean ± SD (n=8). Independent sample *t*-test was used for statistical analyses.

* $p < 0.05$, mean value was significantly different from NPD-fed group

2. ผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดใบมะรุมนที่สกัดด้วยน้ำต่อการสลายไขมันในเซลล์ไขมันของหนูขาวกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติและอาหารไขมันสูง

2.1 ที่สภาวะ basal lipolysis

ในกลุ่มควบคุม (คือ กลุ่มที่ไม่มีสารสกัด หรือความเข้มข้นสารสกัดเท่ากับ 0 mg/mL) เมื่อเปรียบเทียบกับระดับ FFA ระหว่างเซลล์ไขมันจากหนูขาวกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (NPD) และกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง (HFD) พบว่า ทั้งสองกลุ่มมีระดับ FFA ไม่แตกต่างกัน (หนูขาวกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (NPD) และกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง (HFD) มีค่า FFA เท่ากับ 533.67 ± 66.29 และ 557.06 ± 13.45 $\mu\text{M/mL}$ PCV/2 hr ตามลำดับ) ดังแสดงใน Figure 2

สารสกัดใบมะรุมนที่สกัดด้วยน้ำที่ความเข้มข้น 1 และ 3 mg/mL ทำให้ระดับ FFA ในเซลล์ไขมันของหนูขาวกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (NPD) เท่ากับ 633.60 ± 13.89 และ 844.09 ± 19.79 $\mu\text{M/mL}$ PCV/2 hr ตามลำดับ และทำให้ระดับ FFA ในเซลล์ไขมันของหนูขาวกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง (HFD) เท่ากับ 756.92 ± 61.72 และ 1030.13 ± 19.45 $\mu\text{M/mL}$ PCV/2 hr ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่า สารสกัดใบมะรุมนที่สกัดด้วยน้ำที่ความเข้มข้น 1 และ 3 mg/mL สามารถเพิ่มการสลายไขมันในเซลล์ไขมันของหนูขาวได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ทั้งกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (NPD) และกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง (HFD)

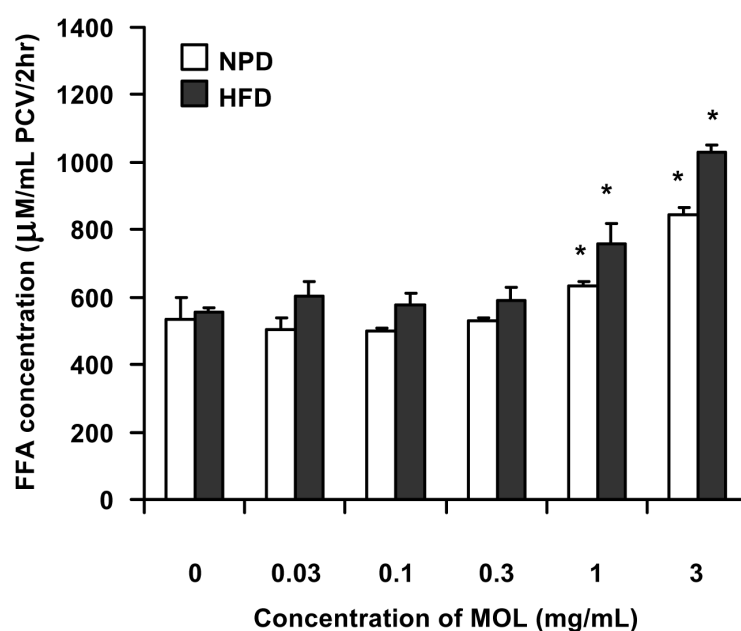


Figure 2 Effect of MOL aqueous extract on basal lipolysis in the adipocytes derived from NPD- and HFD-fed rats. Each value represent the mean ± SD (n=4). One-way ANOVA, bonferroni post hoc test was used for statistical analyses. * $p < 0.05$, mean value was significantly different from control group.

2.2 ที่สภาวะ ISO-induced lipolysis

ในกลุ่มควบคุมเมื่อเติมสาร isoprenaline ความเข้มข้น 0.1 μM พบว่า เซลล์ไขมันมีระดับ FFA เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสาร isoprenaline (ทั้งในกลุ่ม NPD และ HFD)

แต่ในกลุ่มควบคุม เมื่อเปรียบเทียบระดับ FFA ระหว่างเซลล์ไขมันจากหนูกลุ่ม NPD และ HFD พบว่า ทั้งสองกลุ่มมีระดับ FFA ไม่แตกต่างกัน

สารสกัดใบมะรุมนที่สกัดด้วยน้ำสามารถยับยั้งการสลายไขมันได้ โดยในเซลล์ไขมันของหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (NPD) สารสกัดใบมะรุมนที่ความเข้มข้น 0.1, 0.3 และ 1 mg/mL มีผลยับยั้งการสลายไขมันได้อย่างมีนัยสำคัญทาง

สถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($1007.81 \pm 30.86 \mu\text{M/mL PCV/2 hr}$) โดย FFA ลดลงเหลือ 573.00 ± 89.96 , 543.24 ± 20.94 และ $634.66 \pm 13.61 \mu\text{M/mL PCV/2 hr}$ ตามลำดับ (ดังแสดงใน Figure 3)

ส่วนในเซลล์ไขมันของหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง (HFD) มีเพียงสารสกัดใบมะรุมนที่ความเข้มข้น 0.3 และ 1 mg/mL ที่มีผลยับยั้งการสลายไขมันได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($1116.24 \pm 129.61 \mu\text{M/mL PCV/2 hr}$) โดย FFA ลดลงเหลือเท่ากับ 672.93 ± 114.75 และ $820.70 \pm 44.33 \mu\text{M/mL PCV/2 hr}$ ตามลำดับ ดังแสดงใน Figure 3

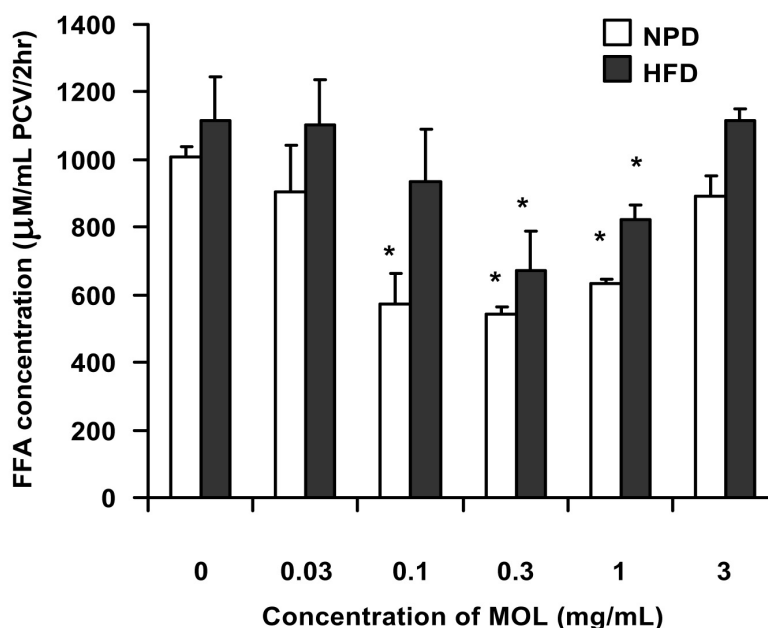


Figure 3 Effect of MOL aqueous extract on ISO-induced lipolysis in the adipocytes derived from NPD- and HFD-fed rats. Each value represent the mean $\pm$ SD ($n=4$). One-way ANOVA, bonferroni post hoc test was used for statistical analyses. * $p < 0.05$, mean value was significantly different from control group.

3. ผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดใบมะรุมนที่สกัดด้วยเอทานอลต่อการสลายไขมันในเซลล์ไขมันของหนูขาวกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติและอาหารไขมันสูง

3.1 ที่สภาวะ basal lipolysis

ในเซลล์ไขมันของหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (NPD) ที่สภาวะ basal lipolysis พบว่า สารสกัดใบมะรุมนที่สกัดด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 3 mg/mL เพิ่มระดับ FFA ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($522.57 \pm 24.62 \mu\text{M/mL PCV/2 hr}$) โดยมีระดับความเข้มข้นของ FFA เพิ่มขึ้นเป็น $571.35 \pm 5.14 \mu\text{M/mL PCV/2 hr}$

อย่างไรก็ตามสารสกัดใบมะรุมนที่สกัดด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 0.3 และ 1 mg/mL พบว่า ระดับความเข้มข้นของ FFA ไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม ดังแสดงใน Figure 4

ในเซลล์ไขมันของหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง (HFD) ที่สภาวะ basal lipolysis กลุ่มควบคุมมีระดับความเข้มข้นของ FFA เท่ากับ $568.36 \pm 56.44 \mu\text{M/mL PCV/2 hr}$ เมื่อทดสอบกับสารสกัดพบว่า สารสกัดใบมะรุมนที่สกัดด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 0.3, 1 และ 3 mg/mL มีระดับความเข้มข้นของ FFA ไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังแสดงใน Figure 4

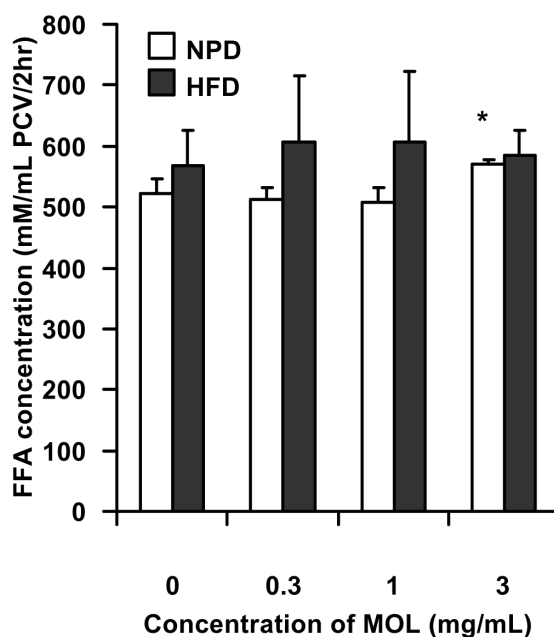


Figure 4 Effect of MOL ethanol extract on basal lipolysis in the adipocytes derived from NPD- and HFD-fed rats. Each value represent the mean $\pm$ SD (n=4). One-way ANOVA, bonferroni post hoc test was used for statistical analyses. * $p < 0.05$, mean value was significantly different from control group.

3.2 ที่สภาวะ ISO-induced lipolysis

ในเซลล์ไขมันของหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (NPD) และอาหารไขมันสูง (HFD) ที่สภาวะ ISO-induced lipolysis กลุ่มควบคุมมีระดับ FFA เท่ากับ 947.60 ± 29.97 และ

1137.71 ± 96.46 $\mu\text{M/mL PCV/2 hr}$ ตามลำดับ สารสกัดใบมะรุ่ยที่สกัดด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 0.3, 1 และ 3 mg/mL มีระดับ FFA ไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Figure 5)

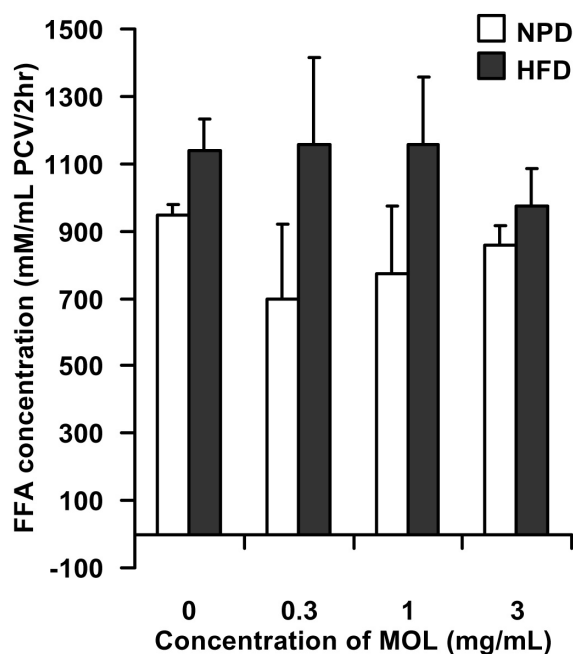


Figure 5 Effect of MOL ethanol extract on ISO-induced lipolysis in the adipocytes derived from NPD- and HFD-fed rats. Each value represent the mean $\pm$ SD (n=4). One-way ANOVA, bonferroni post hoc test was used for statistical analyses. * $p < 0.05$, mean value was significantly different from control group.

สรุปอภิปรายผล

ผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดใบมะรุมที่สกัดด้วยน้ำและสกัดด้วยเอทานอลต่อการสลายไขมันในเซลล์ไขมัน โดยทำการทดลองในเซลล์ไขมันจากหนูขาวที่ได้รับอาหารปกติและอาหารไขมันสูง ทั้งในสภาวะเซลล์ไขมันปกติ (basal lipolysis) และสภาวะเซลล์ไขมันถูกกระตุ้นด้วยสารเคมี (isoprenaline-induced lipolysis) โดยวัดระดับ FFA ที่เกิดขึ้นใน incubation media ซึ่งเป็นตัวบ่งบอกระดับการสลายไขมันที่เกิดขึ้น

ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่า สารสกัดใบมะรุมที่สกัดด้วยน้ำที่ความเข้มข้น 1 และ 3 mg/mL สามารถเพิ่มการสลายไขมันในสภาวะเซลล์ไขมันปกติ (basal lipolysis) ทั้งเซลล์ไขมันจากหนูขาวที่ได้รับอาหารปกติและอาหารไขมันสูง การสลายไขมัน (lipolysis) คือ การเปลี่ยน TG ที่สะสมอยู่ในเซลล์ไขมันให้อยู่ในรูป FFA และ glycerol เมื่อมี lipolysis เพิ่มขึ้น ก็จะเกิด FFA และ glycerol มากขึ้น และจะถูกปลดปล่อยออกสู่กระแสเลือด จากนั้น FFA จะเกิดกระบวนการ β -oxidation ได้เป็นพลังงานแก่เซลล์เพื่อนำไปใช้ต่อไป⁴ ดังนั้นการเพิ่มการสลายไขมันจึงช่วยลดการสะสมไขมันในร่างกาย⁵ และฤทธิ์ดังกล่าวนี้ได้มีการนำมาพัฒนาเป็นยาเพื่อลดความอ้วนแล้ว^{20, 21} จากผลการศึกษาครั้งนี้ที่พบว่า สารสกัดใบมะรุมที่สกัดด้วยน้ำที่ความเข้มข้น 1 และ 3 mg/mL (ในกลุ่ม NPD และ HFD) และสารสกัดใบมะรุมที่สกัดด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 3 mg/mL (ในกลุ่ม NPD) มีฤทธิ์เพิ่มการสลายไขมัน ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่า สารสกัดใบมะรุมจะช่วยลดการสะสมไขมันและอาจจะสามารถพัฒนาเป็นยาลดความอ้วนได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารสกัดจากน้ำที่สามารถออกฤทธิ์ได้ในเซลล์ไขมันจากหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูง ซึ่งน่าจะช่วยเพิ่มการสลายไขมันและลดการสะสมไขมันในคนที่มีการบริโภคอาหารที่มีไขมันสูงได้ด้วย ในขณะที่สารสกัดจากเอทานอลจะออกฤทธิ์เพิ่มการสลายไขมันในความเข้มข้นที่สูงกว่า (หมายถึงมี potency ต่ำกว่าสารสกัดน้ำ) ซึ่งเป็นไปได้ว่าฤทธิ์ในการเพิ่มการสลายไขมันดังกล่าวอาจจะพบได้ในสารที่ขั้ว (polar) ที่มีความชอบน้ำมากกว่า

ในสภาวะที่เซลล์ไขมันได้รับการกระตุ้น เช่น ในสภาวะที่ได้รับสาร isoprenaline (ISO) ซึ่งสารนี้เป็นสารในกลุ่ม catecholamines ที่มีคุณสมบัติเป็น non selective β -adrenergic receptor agonist มีฤทธิ์กระตุ้นการสลายไขมันโดยการกระตุ้นที่ β -adrenergic receptor ทำให้มีการเพิ่มระดับ cyclic adenosine monophosphate (cAMP) ภายในเซลล์ไขมัน ซึ่ง cAMP นี้จะไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ HSL ส่งผลกระตุ้นให้เกิดการสลายไขมันขึ้น^{18, 19} โดยปกติการสลายไขมันจะทำให้มี FFA และ glycerol ออกสู่กระแสเลือด แต่หาก

มีการสลายไขมันที่มากเกินไปจะมีผลทำให้ระดับ FFA และ glycerol ในเลือดสูง ซึ่งการมีระดับ FFA ในเลือดสูงเป็นระยะเวลานานมีผลรบกวน insulin signaling pathway เนื่องจากเกิด phosphorylation ของ Serine residues บน insulin receptor substrate-1 จะทำให้การทำงานของ insulin ลดลงและทำให้เกิดภาวะ insulin resistance ขึ้นประกอบกับการที่ระดับ glycerol ในเลือดที่มีมากเกินไปสามารถเปลี่ยนเป็น glucose ได้ โดยกระบวนการ intrahepatic pathway ทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดสูงขึ้น ดังนั้นการเพิ่มการสลายไขมันที่มากเกินไปอาจสามารถพัฒนาจนเกิดเป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ได้^{22, 23} จะเห็นได้ว่าการสลายไขมันมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคเบาหวาน ดังนั้นการยับยั้งการสลายไขมันจึงน่าจะเป็นกลไกหนึ่งของการลดระดับน้ำตาลในเลือดและรักษาโรคเบาหวานได้ ฮอร์โมน insulin ซึ่งมีการนำมาใช้ในยาลดระดับน้ำตาลในเลือดในผู้ป่วยโรคเบาหวาน โดยกลไกหนึ่งของ insulin ในการลดระดับน้ำตาลในเลือดก็คือ การยับยั้งการสลายไขมัน โดยลดระดับ cAMP ผ่านการกระตุ้นเอนไซม์ phosphodiesterase 3B มีผลทำให้ protein kinase A (PKA) ไม่มีการเติม phosphate group (phosphorylation) ให้แก่ perilipin และเอนไซม์ HSL ซึ่ง perilipin เป็นโปรตีนที่อยู่บนผิวของ lipid droplet มีบทบาทในการควบคุมการสลายไขมันและเมื่อเอนไซม์ HSL ไม่ถูกกระตุ้น ทำให้มีผลลดการสลายไขมัน^{4, 6, 7} จากการศึกษาที่ผ่านมาที่พบว่า ใบมะรุมที่สกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ในการลดระดับน้ำตาลในเลือดได้^{12, 16} และจากผลการศึกษาครั้งนี้ที่เมื่อเซลล์ไขมันได้รับการกระตุ้นให้เกิดการสลายไขมันเพิ่มมากขึ้น (เซลล์ที่สภาวะ ISO-induced lipolysis) สารสกัดใบมะรุมที่สกัดด้วยน้ำที่ความเข้มข้น 0.1, 0.3 และ 1 mg/mL สามารถยับยั้งการสลายไขมันในเซลล์ไขมันของหนูขาวกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (NPD) และที่ความเข้มข้น 0.3 และ 1 mg/mL สามารถยับยั้งการสลายไขมันในเซลล์ไขมันของหนูขาวกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง (HFD) จึงเป็นที่น่าสนใจว่าฤทธิ์การลดระดับน้ำตาลในเลือดของใบมะรุมที่สกัดด้วยน้ำอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับกลไกการยับยั้งการสลายไขมันในเซลล์ไขมัน (adipocyte lipolysis) และการที่สารสกัดใบมะรุมที่สกัดด้วยเอทานอลไม่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการสลายไขมันในการศึกษาครั้งนี้ นั้น อาจเพราะสารสำคัญของสารสกัดใบมะรุมที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งการสลายไขมัน แตกต่างจากสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ในการกระตุ้นการสลายไขมัน

เมื่อเกิดการสลายไขมัน เกิด FFA และ glycerol ขึ้น FFA ที่ถูกปลดปล่อยไปในกระแสเลือดจะจับกับ serum albumin เพื่อนำส่งต่อไปที่อวัยวะต่างๆ คือ กล้ามเนื้อ ตับ หัวใจ และเนื้อเยื่ออื่นๆ ในร่างกาย ซึ่ง FFA บางส่วนจะเกิด

β -oxidation ได้เป็นพลังงานดังที่กล่าวไปแล้ว FFA ส่วนที่เหลือจะเกิดการ re-esterification กลับเป็น TG ส่วน FFA ที่ตับจะทำหน้าที่เป็น substrate ในการสร้าง very low density lipoprotein (VLDL) ออกสู่กระแสเลือด²³ ดังนั้นหากมีระดับ FFA ในเลือดสูงและเผาผลาญเป็นพลังงานไม่ทัน จะนำไปสู่การเกิดภาวะ dyslipidemia ได้ ซึ่งภาวะนี้เป็นปัจจัยหนึ่งของการเกิดโรค metabolic syndrome ต่างๆ⁷ ดังนั้นการยับยั้งการสลายไขมันจึงเป็นกลไกหนึ่งในการลดระดับไขมันในเลือดได้เช่นเดียวกับที่พบในการออกฤทธิ์ลดระดับไขมันในเลือดของสารหลายชนิด ได้แก่ niacin²⁴ และ clofibrate²⁵ จากข้อมูลข้างต้นและจากผลการศึกษาที่ผ่านมาที่พบฤทธิ์ลดระดับไขมันในเลือดของสารสกัดใบมะรุมที่สกัดด้วยน้ำ^{11, 26} ประกอบกับจากผลการศึกษาครั้งนี้ที่พบว่า สารสกัดใบมะรุมที่สกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ยับยั้งการสลายไขมัน จึงเป็นไปได้ว่าฤทธิ์ลดระดับไขมันในเลือดของสารสกัดใบมะรุมที่สกัดด้วยน้ำ อาจเกิดจากกลไกการยับยั้งการสลายไขมัน

จากผลการทดลองครั้งนี้พบฤทธิ์ของสารสกัดใบมะรุมที่สกัดด้วยน้ำ มีฤทธิ์แบบ dual action โดยฤทธิ์ที่เกิดขึ้นกับสองปัจจัย คือ ระดับการสลายไขมันของเซลล์ไขมัน และความเข้มข้นของสารสกัด ทั้งนี้สารสกัดจะมีฤทธิ์เพิ่มการสลายไขมัน เมื่อเซลล์ไขมันอยู่ในสภาวะที่เซลล์ไขมันไม่ได้รับการกระตุ้นใดๆ หรือมีระดับการสลายไขมันค่อนข้างต่ำ (Figure 2) และสารสกัดจะมีฤทธิ์ยับยั้งการสลายไขมัน เมื่อเซลล์ไขมันนั้นถูกกระตุ้นให้มีระดับการสลายไขมันสูงขึ้น (Figure 3) และฤทธิ์การยับยั้งการสลายไขมันนั้นสามารถพบได้ที่ความเข้มข้นของสารสกัดที่ต่ำกว่าในขณะที่ฤทธิ์การเพิ่มการสลายไขมันจะพบในสารสกัดที่มีความเข้มข้นสูง

นอกจากนี้แล้วจากการทบทวนวรรณกรรมพบว่า สารสกัดใบมะรุมที่สกัดด้วยเอทานอล หรือเมทานอลสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้เช่นกัน²⁷ (ไม่มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ลดระดับไขมันในเลือดของสารสกัดใบมะรุมที่สกัดด้วยเอทานอล) จากผลการศึกษาครั้งนี้ที่พบว่า สารสกัดใบมะรุมที่สกัดด้วยเอทานอลไม่มีผลยับยั้งการสลายไขมัน เป็นไปได้ว่ากลไกการลดระดับน้ำตาลในเลือดของใบมะรุมนั้นอาจจะมีกลไกมากกว่าหนึ่งกลไก ซึ่งฤทธิ์การลดระดับน้ำตาลในเลือดของสารสกัดจากเอทานอลนั้น อาจไม่เกี่ยวกับการยับยั้งการสลายไขมัน ทั้งนี้ฤทธิ์อาจขึ้นกับสารสำคัญที่ถูกสกัดออกมาอย่างไรก็ตามจำเป็นต้องทำการศึกษาถึงกลไกเหล่านี้เพิ่มเติมต่อไป

จากผลการศึกษาทั้งหมดของสารสกัดใบมะรุมในครั้งนี้ แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ที่มีความน่าสนใจของสารสกัดใบมะรุมที่สกัดด้วยน้ำต่อการสลายไขมันในเซลล์ไขมัน โดย

เห็นถึงความสัมพันธ์กับฤทธิ์ลดการสะสมไขมัน ฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลและระดับไขมันในเลือด แต่เนื่องจากยังไม่มีข้อมูลการศึกษาที่จะอธิบายถึงกลไกในระดับเซลล์ ประกอบกับผลการศึกษาครั้งนี้ทำการศึกษาในหลอดทดลองเท่านั้น และการที่ยังไม่สามารถระบุสารสำคัญที่ทำให้เกิดฤทธิ์ดังกล่าว รวมถึงข้อมูลการศึกษาถึงความเป็นพิษที่อาจเกิดจากการได้รับสารสกัดใบมะรุมยังมีไม่เพียงพอ ดังนั้นมะรุมจึงยังเป็นพืชที่น่าทำการศึกษาเพิ่มเติมในประเด็นต่างๆ ต่อไป ซึ่งจะทำให้ได้ข้อมูลที่จะสามารถนำมาประยุกต์ใช้พืชนี้ให้เกิดประโยชน์ทางคลินิกในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม และมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.ทรงศักดิ์ จำปาวงศ์ อาจารย์ประจำคณะสัตวแพทย์และสัตวศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม สำหรับความเอื้อเฟื้อในการเตรียมอาหารสัตว์ทดลอง และขอขอบพระคุณ อาจารย์ยิธรัตน์ สมดี อาจารย์ประจำคณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม สำหรับความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือวัดระดับความเข้มข้นของ FFA และขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร.วันดา ไทรขมภู คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม สำหรับการตรวจพิสูจน์พืชที่ใช้ทดสอบครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. สมทรง เลขะกุล. เมตะบอลิซึมของไลปิด ใน ชีวเคมี 1 บรรณาธิการโดย นิโบล เนื่องตัน. กรุงเทพฯ: บริษัทธรรมสาร จำกัด; 2542. p.305-51.
2. World Health Organization (WHO). Global InfoBase for Overweight and Obesity [Online] 2011 Mar. Available from: URL:<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html> Accessed Jan 12, 2012.
3. ชื่นฤทัย กาญจนจิตรา, ชัย โพธิ์สิต, กฤตยา อาชวนิจกุล และคณะ. สุขภาพคนไทย 2552 เพื่อสุขภาวะแห่งมวลมนุษยชาติ หยุดความรุนแรง. พิมพ์ครั้งที่ 1 นครปฐม: สถาบันประชากรและสังคม ม.มหิดล; 2552.
4. Duncan RE, Ahmadian M, Jaworski K, Sarkadi E, Nagy E, Sul HS. Regulation of lipolysis in adipocytes. Annu Rev Nutr 2007;27:79-101.
5. Frayn KN. Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux. Diabetologia 2002;45(9):1201-10.

6. Burns TW, Terry BE, Langley PE, Robison GA. Insulin inhibition of lipolysis of human adipocytes: the role of cyclic adenosine monophosphate. *Diabetes* 1979;28(11):957-61.
7. Langin D. Control of fatty acid and glycerol release in adipose tissue lipolysis. *C R Biol* 2006;329(8): 598-607.
8. Fahey JW. *Moringa oleifera*: A Review of the Medical Evidence for Its Nutritional, Therapeutic, and Prophylactic Properties. Part 1. *Trees life J* 2005;1:1-15.
9. Anwar F, Latif S, Asharf M, Gilani AH. Review Article: *Moringa oleifera*: A Food Plant with Multiple Medicinal Uses. *Phytother Res* 2007;21:17-25.
10. Paliwal R, Sharma V, Pracheta. A Review on Horse Radish Tree (*Moringa oleifera*): A Multipurpose Tree with High Economic and Commercial Importance. *Asian J Biotechnol* 2011;3(4):317-28.
11. Ghasi S, Nwobodo E, Ofili JO. Hypocholesterolemic effects of crude extract of leaf of *Moringa oleifera* Lam. in high-fat diet fed Wistar rats. *J Ethnopharmacol* 2000;69(1):21-5.
12. Jaiswal D, Kumar RP, Kumar A, Mehta S, Watal G. Effect of *Moringa oleifera* Lam. Leaves aqueous extract therapy on hyperglycemic rats. *J Ethnopharmacol* 2009;123(3):392-6.
13. Makkar HPS, Becker K. Nutritional value and antinutritional components of whole and ethanol extracted *Moringa oleifera* leaves. *Animal Feed Science and Technology* 1996;63,211-28.
14. Seshadri S, Nambiar VS. Kanjero (*Digera arvensis*) and Drumstick leaves (*Moringa oleifera*): Nutrient profile and potential for Human consumption. In: *plants in Human Health and Nutrition policy*. World Rev Nutr Diet 2003;91:41-56.
15. Sánchez MDI, López CJ, Vázquez NJ. High-performance liquid chromatography method to measure alpha- and gamma-tocopherol in leaves, flowers and fresh beans from *Moringa oleifera*. *J Chromatogr A* 2006;105:111-14.
16. Ples M, Ho H. Comparative Effects of *Moringa Oleifera* Lam. Tea on Normal and Hyperglycemic Patients, *eHealth Internal J* 2009;5(1):30-4.
17. Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, Kaul CL, Ramarao P. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacol Res* 2005;52(4):313-20.
18. Galitzky J, Carpenne C, Bousquet A, Melou A, Berlan M, Lafontan M. Differential activation of beta 1-, beta 2- and beta 3-adrenoceptors by catecholamines in white and brown adipocytes. *Fundam Clin Pharmacol* 1995;9(4):324-31.
19. Shi Y, Burn P. Lipid metabolic enzymes: emerging drug targets for the treatment of obesity. *Nat Rev Drug Discov* 2004;3(8):695-710.
20. Zahorska-Markiewicz B, Kucio C, Piskorska D. Adrenergic control of lipolysis and metabolic responses in obesity. *Horm Metab Res* 1986;18(10):693-7.
21. Nisoli E, Carruba MO. Emerging aspects of pharmacotherapy for obesity and metabolic syndrome. *Pharmacol Res* 2004;50(5):453-69.
22. Nurjhan N, Consoli A, Gerich J. Increased lipolysis and its consequences on gluconeogenesis in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1992;89(1):169-75.
23. Gutierrez DA, Puglisi MJ, Hasty AH. Impact of increased adipose tissue mass on inflammation, insulin resistance, and dyslipidemia. *Curr Diab Rep* 2009;9(1):26-32.
24. Karpe F, Frayn KN. The nicotinic acid receptor-a new mechanism for an old drug. *Lancet* 2004;363:1892-4.
25. Costa MA, Angel A. Inhibition of hormone-stimulated lipolysis by clofibrate: A possible mechanism for its hypolipidemic action. *J Clin Invest* 1975;55(1):138-48.
26. Chumark P, Khunawat P, Sanvarinda Y, Phornchirasilp S, Morales NP, Phivthong-ngam L, et al. The in vitro and ex vivo antioxidant properties, hypolipidaemic and antiatherosclerotic activities of water extract of *Moringa oleifera* Lam. leaves. *J Ethnopharmacol* 2008;116(3):439-46.
27. Adisakwattana S, Chanathong B. Apha-glucosidase inhibitory activity and lipid-lowering mechanisms of *Moringa oleifera* leaf extract. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2011; 15(7):803-8.