

กรดไขมันปาล์มิติกกระตุ้นเซลล์ไขมัน ให้เกิดภาวะดื้อต่ออินซูลิน

Palmitic Acid Induces Insulin Resistance in 3T3-L1 Adipocytes

กัญญาณัฐ เปี่ยมงาม*, พิลาวรรณ ศิริพฤกษ์พงษ์ และสุดาวดี คงขำ

ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Kanyanath Piumngam*, Pilaiwan Siripurkpong and Sudawadee Kongkhum

Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University,
Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

โรคเบาหวานชนิดที่ 2 มีอุบัติการณ์เพิ่มขึ้นมากในปัจจุบัน ผู้ป่วยส่วนใหญ่มีภาวะอ้วนร่วมด้วย ทำให้มีกรดไขมันอิสระ (free fatty acids) สูงส่งผลต่อการเกิดภาวะดื้อต่ออินซูลิน ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของโรคนี้ การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลกระทบบของกรดไขมันปาล์มิติกต่อการลดลงของการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ 3T3-L1 adipocyte ที่ทำให้เกิดการดื้อต่ออินซูลิน โดยเฉพาะเลี้ยงเซลล์ 3T3-L1 ให้กลายเป็นเซลล์ไขมัน และกระตุ้นด้วย 1 mM palmitic acid / 1 % bovine serum albumin (BSA) เป็นเวลา 0.5, 1, 2, 4, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง และศึกษาการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์โดยติดตามการนำ 2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-2-deoxyglucose (2-NBDG) เข้าสู่เซลล์ ซึ่ง 2-NBDG เป็นอนุพันธ์เรืองแสงของกลูโคส ผลการวิจัยพบว่าเซลล์ไขมันที่ได้รับการกระตุ้นด้วยกรดไขมันปาล์มิติก มีการนำ 2-NBDG เข้าสู่เซลล์ ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่เวลา 0.5, 2, 4, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีการนำเข้าของ 2-NBDG เป็น 100 % และพบว่าที่เวลา 2 ชั่วโมง มีค่าการนำเข้าลดลงต่ำสุด (63.00 ± 5.60 %) และยังคงลดลงในระดับเดิมเมื่อเพิ่มเวลามากขึ้น สรุปได้ว่าการกระตุ้นเซลล์ไขมันด้วย 1 mM palmitic acid / 1 % BSA เป็นเวลา 2 ชั่วโมง สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะดื้อต่ออินซูลินได้ ประโยชน์จากการศึกษานี้สามารถใช้เป็นแบบจำลองในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงการนำเข้ากลูโคสของเซลล์ไขมันทำให้อยู่ในสภาวะที่ดื้อต่ออินซูลิน

คำสำคัญ : ดื้ออินซูลิน; กรดไขมันปาล์มิติก; 2-NBDG; เซลล์ไขมันชนิด 3T3-L1

Abstract

Type 2 diabetes incidence has increased in recent year and usually associated with obesity. A mechanism by which obesity may lead to insulin resistance is through the elevated level of plasma free fatty acids. The purpose of this research was to study the effect of Palmitic acid on inhibition of glucose transport into adipocytes. The 3T3-L1 cells were differentiated to adipocytes and exposed to 1 mM palmitic acid / 1 % BSA for 0.5, 1, 2, 4, 6, 12, 24 and 48 h. Then, insulin resistance was determined by measuring glucose uptake using 2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-2-deoxyglucose (2-NBDG), a fluorescent derivative of glucose. We found that, 1 mM palmitic acid / 1 % BSA reduced glucose uptake at 0.5, 2, 4, 6, 12, 24 and 48 h ($p < 0.05$) when compared with control (100 % uptake) and at 2 h was reduced to a minimum and constantly decrease later. Our results demonstrate that exposure of 1 mM palmitic acid / 1 % BSA for 2 h (63.00 ± 5.60 %) can induce insulin resistance leads to a decrease of glucose uptake in adipocytes. That may contribute to development of insulin resistance model.

Keyword: insulin resistance; palmitic acid; 2-NBDG; 3T3-L1 adipocytes

1. คำนำ

โรคเบาหวานชนิดที่ 2 (type 2 diabetes mellitus) เป็นปัญหาที่สำคัญทางสาธารณสุขทั่วโลก โดยมีปัจจัยเสี่ยงจากพันธุกรรม โรคอ้วน และความเครียด (Ginsberg, 1974; Reaven, 1978; Harris, 1995; Lyssenko, 2008) โรคเบาหวานมีอุบัติการณ์เพิ่มขึ้นอย่างมากในช่วง 20 ปีที่ผ่านมา และมีการพยากรณ์ว่าจะเพิ่มขึ้นมากกว่า 300 ล้านคนในปี ค.ศ. 2030 (King, 1998) โดยเฉพาะในประเทศที่กำลังพัฒนา (West, 1978; Zimmet, 2000) โรคเบาหวานเป็นโรคเรื้อรังที่ทำให้ผู้ป่วยมีน้ำตาลในเลือดสูงกว่าระดับปกติ (hyperglycemia) ส่งผลให้เกิดความไม่สมดุลของกระบวนการเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต ไขมัน และโปรตีน จึงส่งผลให้เกิดภาวะแทรกซ้อนในอวัยวะต่าง ๆ ปัจจุบันยังไม่มีวิธีการรักษาโรคเบาหวานให้หายขาดได้ การดูแลผู้ป่วยโรคเบาหวานจึงเป็นเพียงการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดให้ใกล้เคียงกับระดับปกติให้มากที่สุด เพื่อป้องกันภาวะแทรก

ซ้อนทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง (Alberti, 1998; Inzucchi, 2012)

การตรวจหาการเกิดภาวะดื้อต่ออินซูลินจะช่วยให้ทราบความเสี่ยงและทำให้มีโอกาที่จะป้องกันหรือชะลอการเกิดโรคได้ ปัจจุบันการตรวจภาวะดื้อต่ออินซูลินในมนุษย์ด้วยวิธี euglycemic hyperinsulinemic clamp (Robert, 1995) ซึ่งเป็นวิธี gold standard รวมถึงการวัดด้วยวิธีอื่น ๆ เช่น steady state plasma glucose (SSPG) following fixed somatostatin/glucose/insulin infusions และ modeling analysis เช่น oral glucose tolerance test (OGTT) หรือ frequently sampled intravenous glucose tolerance test (FSIVGTT) (Bergman, 2007) ยังไม่สามารถวัดระดับภาวะดื้อต่ออินซูลินได้โดยตรง อีกทั้งมีความยุ่งยากและมีค่าใช้จ่ายสูง (Muniyappa, 2008) ดังนั้นการศึกษาสภาวะที่จะทำให้เกิดการดื้อต่ออินซูลินเพื่อใช้เป็นโมเดลสำหรับนำไปพัฒนาเพื่อหาตัวบ่งชี้ที่มีความไวสำหรับตรวจวิเคราะห์ภาวะดื้อต่ออินซูลิน จึงเป็น

ที่มาของงานวิจัยนี้

ภาวะดื้อต่ออินซูลินพบมากในคนอ้วน ซึ่งมีการเจริญของเซลล์ไขมันอยู่ที่ร่างกายจำนวนมาก เซลล์ไขมันเป็นเซลล์ที่นำน้ำตาลกลูโคสเข้าสู่เซลล์ โดยอาศัยการทำงานของอินซูลินผ่านตัวรับ (insulin receptor) ซึ่งส่งสัญญาณไปยัง glucose transporter 4 (GLUT4) ให้รับกลูโคสเข้าสู่เซลล์ นั่นคือเซลล์ไขมันเป็นเซลล์ที่สามารถอยู่ในภาวะดื้อต่ออินซูลิน (Swislocki, 1987; Kennedy, 2009; Maury, 2010) การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าคนอ้วน โดยเฉพาะผู้ที่อ้วนลงพุงจะมีความเสี่ยงต่อการเป็นโรคเบาหวานสูงกว่าคนปกติ เนื่องจาก visceral fat หรือไขมันที่สะสมใน central obesity จะมี metabolically active มากกว่า peripheral fat และสามารถปล่อย non-esterified fatty acid (NEFA) ได้มากกว่า (Frazee, 1985; Lillioja, 1986; Martin, 1992) โดยปัจจัยจากกรดไขมันที่เพิ่มสูงขึ้นในร่างกาย การได้สัมผัสกรดไขมันเป็นระยะเวลานานสามารถทำให้เกิดการดื้อต่ออินซูลินได้ (Boden, 1999) งานวิจัยก่อนหน้านี้รายงานว่ long-chain saturated fatty acids กระตุ้นให้เกิดภาวะดื้อต่ออินซูลินได้ (van Epps-fung, 1997; Wen, 2006) สำหรับการใช้กรดไขมันปาล์มิติกซึ่งเป็นกรดไขมันประเภท long chain saturated fatty acids ที่ประกอบด้วยคาร์บอน 16 อะตอม [$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}_2\text{H}$] ประกอบด้วยหมู่ carboxylic acid และเป็น long aliphatic tail ที่ไม่แตกแขนง เป็นกรดไขมันชนิดแรกที่ได้จากการสร้างไขมัน ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจาก acetyl-CoA เปลี่ยนเป็นไขมันและมีรายงานสนับสนุนถึงความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะดื้อต่ออินซูลินได้ที่ความเข้มข้น 1 mM (Hunnicut, 1994; van Epps-fung, 1997) แต่ระยะเวลาในการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะดื้อต่ออินซูลินยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม

การวิจัยครั้งนี้ใช้เซลล์เพาะเลี้ยง 3T3-L1

preadipocyte (Knutson, 1997) โดยเซลล์ 3T3-L1 สามารถกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ adipogenesis ให้กลายเป็นเซลล์ไขมันได้ เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่เหมาะสมและกระตุ้น transcription factor ที่สำคัญในกระบวนการ adipogenesis ด้วยสาร dexamethasone, 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) และ insulin ส่งผลให้มีการสร้างและสะสมไขมันภายในเซลล์ในรูปของ fat droplets (Green, 1975) จึงมักนำมาใช้เป็นต้นแบบในการทดลองเกี่ยวกับเซลล์ไขมัน

การวัดการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ (glucose uptake measure) สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การติดตามการแสดงออกของโปรตีนหรือยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ โดยอาศัยเทคนิคทางอณูชีววิทยา เช่น PCR, real time PCR (Sivitz, 1991; Watson, 2004; Sartipy, 2003) การวัดปริมาณกลูโคสที่เหลือนอกเซลล์ ซึ่งต้องอาศัยเทคนิคที่มีความไวสูง เพราะปริมาณกลูโคสจะมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก การติดตามการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์โดยใช้ radiolabeled 2-deoxyglucose (2-DG) (Scott, 2009) ซึ่งเป็นการติดตามโดยใช้สารกัมมันตรังสีที่อาจก่ออันตรายกับผู้วิเคราะห์ และการติดตามการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์โดยใช้อนุพันธ์ที่เรืองแสงของกลูโคส 2-NBDG ซึ่งสามารถติดตามการนำเข้าสู่เซลล์ได้โดยตรงแบบ dynamic glucose uptake ซึ่งปัจจุบันนิยมใช้ติดตามการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ของสิ่งมีชีวิต เพราะเป็นวิธีที่วัดการนำเข้าสู่เซลล์ได้อย่างรวดเร็วและเชื่อถือได้ อีกทั้งยังสามารถบอกการมีชีวิตของเซลล์ได้ วิธีนี้ถูกคิดค้นจาก Yoshioka และคณะ ในปี ค.ศ. 1996 โดยนำมาใช้ครั้งแรกในการติดตามการดูดซึมกลูโคสเข้าสู่เซลล์ *E. coli* (Tsytarev, 2012) และมีการนำมาใช้ติดตามการนำเข้าสู่เซลล์กับเซลล์

เพาะเลี้ยงต่าง ๆ (Leira, 2002; Zou, 2005) รวมถึงเซลล์ 3T3-L1 adipocyte (Zhang, 2011)

งานวิจัยนี้ต้องการศึกษาผลกระทบของกรดไขมันปาล์มมีติกต่อการลดลงของการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ 3T3-L1 adipocyte โดยติดตามการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ด้วย 2-NBDG เพื่อใช้เป็นต้นแบบของเซลล์ไขมันที่ทำให้เกิดภาวะดื้อต่ออินซูลินต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ 3T3-L1 ให้เป็นเซลล์ไขมัน

เซลล์ชนิด 3T3-L1 preadipocyte (ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.ศราวุฒิ จิตรภักดี ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล) เพาะเลี้ยงใน Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (25 mM glucose) ที่เติม 10 % fetal bovine serum (FBS) และ antibiotics ในบรรยากาศที่มี CO₂ 5 % ที่อุณหภูมิ 37 °C ใน 96-well black culture plate หลังจากเซลล์เพิ่มจำนวนได้เติมพื้นที่กระตุ้นให้เป็นเซลล์ไขมันโดยเติม 5 µg/mL insulin, 1 µM dexamethasone, 0.5 mM IBMX ใน DMEM ที่มี 10 % FBS และ antibiotics หลังจากนั้น 2 วัน เลี้ยงต่อด้วย DMEM ที่มี 10 % FBS, antibiotics และ 5 µg/mL insulin จนพบลักษณะที่มี lipid droplet ใน cytoplasm ของเซลล์ซึ่งจะเริ่มสังเกตเห็นได้ในวันที่ 4 และเลี้ยงต่อจนครบ 8 วัน จึงนำ 3T3-L1 adipocyte ไปศึกษาต่อ

2.2 การกระตุ้นเซลล์ด้วยกรดไขมันปาล์มมีติก

เตรียม 1 mM palmitic acid / 1 % BSA โดยละลาย 5 mM palmitic acid ใน 5 % fatty acid-free BSA ที่อุณหภูมิ 55 °C นาน 15 นาที แล้วนำมาเจือจางด้วย DMEM ที่มี 10 % FBS,

antibiotic และ 5 µg/mL insulin ในอัตราส่วน 1:5 (Karaskov, 2006) แล้วทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ 3T3-L1 adipocyte ใน 1 mM palmitic acid / 1 % BSA เป็นเวลา 0.5, 1, 2, 4, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 °C ในสภาวะ CO₂ 5 % หลังจากนั้น จึงนำเซลล์ไปทำการตรวจวัดการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ การทดลองนี้ทำแบบทำซ้ำ 3 หลุม (triplicate) ในแต่ละเวลา และทำทั้งหมด 3 ครั้ง การแปลผลของกรดไขมันปาล์มมีติกต่อ 3T3-L1 adipocyte ทำโดยเปรียบเทียบกับ control ซึ่งไม่เติมกรดไขมันปาล์มมีติก และ blank เป็นหลุมที่ไม่มีเซลล์

2.3 การติดตามการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ (glucose uptake assay)

ตรวจติดตามการนำเข้าสู่กลูโคสโดยอาศัยอนุพันธ์เรืองแสงของกลูโคส 2-NBDG วัดปริมาณกลูโคสตามวิธี fluorescence microplate cell assay (Leira, 2002, Hassanein, 2011) หลังจากกระตุ้นเซลล์ 3T3-L1 adipocyte ด้วยกรดไขมันปาล์มมีติก แล้วล้างเซลล์ด้วย PBS 2 ครั้ง และเติม 100 µM 2-NBDG ใน DMEM ที่มี 5 µg/mL insulin บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C, CO₂ 5 % เป็นเวลา 10 นาที ในที่มืด หลังจากนั้นล้างเซลล์ด้วย PBS 3 ครั้ง แล้ววัดค่า fluorescence intensity ด้วยเครื่อง spectro fluorometer (varioskan flash) ที่ความยาวคลื่น 485 nm (excitation wavelength) และ 520 nm (emission wavelength) แล้วคำนวณการนำเข้าสู่กลูโคสโดยใช้สูตร

การนำเข้าสู่กลูโคส (%) = (Fluorescence intensity ของกรดไขมันปาล์มมีติก X 100) ÷ Fluorescence intensity ของ control

2.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้แสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทำซ้ำ 3 ครั้ง ที่ทำแบบ

triplicate และเปรียบเทียบทางสถิติด้วย Student's t-test โดยค่านัยสำคัญทางสถิติเท่ากับ $p < 0.05$

3. ผลการวิจัย

3.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ 3T3-L1 ให้กลายเป็นเซลล์ไขมัน

เพาะเลี้ยงเซลล์ 3T3-L1 preadipocyte ในอาหารเพาะเลี้ยง DMEM ที่มี 10 % FBS และ antibiotics (Fig. 1) และกระตุ้นให้กลายเป็นเซลล์ 3T3-L1-adipocyte (Fig. 2) การกระตุ้นนี้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ที่มีลักษณะเป็นรูปกระสวย มี cytoplasm ยืดยาว เป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่และมีลักษณะกลมขึ้น โดยพบว่าการสร้าง lipid droplet ใน cytoplasm ของเซลล์ ซึ่งเริ่มสังเกตเห็นได้ตั้งแต่วันที่ 4 และมีการสะสม lipid droplet เพิ่มขึ้นจนเกือบเต็มเซลล์ในวันที่ 8 (Fig. 2)

3.2 ผลกระทบของการกรดไขมันปาล์มิติกที่มีต่อการนำเข้า 2-NBDG ในเซลล์ไขมัน 3T3-L1 adipocyte

การเปรียบเทียบการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ระหว่างเซลล์ไขมันที่ถูกกระตุ้นด้วยกรดไขมันปาล์มิติกที่ระยะเวลาต่าง ๆ เพื่อให้เกิดภาวะที่ดื้อต่ออินซูลินกับ control โดยตรวจวัดการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ด้วยการติดตาม 2-NBDG พบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้รับการกระตุ้นด้วย 1 mM palmitic acid / 1 % BSA มีการนำเข้า 2-NBDG ลดลง เมื่อบ่มเป็นเวลา 0.5 ชั่วโมง (83.00 ± 6.20 %) 1 ชั่วโมง (72.00 ± 11.40 %) 2 ชั่วโมง (63.00 ± 5.60 %) 4 ชั่วโมง (66.00 ± 8.80 %) 6 ชั่วโมง (63.00 ± 5.70 %) 12 ชั่วโมง (81.00 ± 5.00 %) 24 ชั่วโมง (80.00 ± 1.50 %) และ 48 ชั่วโมง (74.00 ± 3.60 %) เมื่อเทียบกับ control ซึ่งคิดเป็น 100 % (ข้อมูลแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบน



Figure 1 3T3-L1 preadipocyte morphology: The 3T3-L1 preadipocytes have a fibroblast-like morphology, spin shape with a branched cytoplasm. (scale bar = 100 μ m)



Figure 2 3T3-L1 adipocyte morphology: The 3T3-L1 adipocytes have been increased in size and have a round shape containing many large lipid droplets the cytoplasm. (scale bar = 100 μ m)

มาตรฐาน) โดยพบว่าการนำเข้า 2-NBDG ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อบ่มเป็นเวลา 0.5, 2, 4, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ($p < 0.05$) และผลการบ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบการนำเข้าของ 2-NBDG ลดลงต่ำสุด (Fig. 3) และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของการนำเข้า 2-NBDG เมื่อบ่มเป็นเวลา

2 ชั่วโมง เทียบกับช่วงเวลาอื่นพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการบ่มเป็นเวลา 4, 6 และ 48 ชั่วโมง ($p = 0.574, 0.973$ และ 0.161 ตามลำดับ) จากข้อมูลชี้ให้เห็นว่ามีการลดลงของการนำเข้าสู่กลูโคสตั้งแต่บ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง และทำให้การนำเข้าสู่กลูโคสอยู่ในภาวะที่คงลดลงอยู่เมื่อบ่มเป็นเวลานานขึ้น ถึงแม้ว่าสำหรับการบ่มเป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง จะพบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ขณะที่การบ่มที่ 0.5 ชั่วโมง แม้จะมีการลดลงของการนำเข้าสู่

2-NBDG อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ที่ 1 ชั่วโมงนั้น การนำเข้าสู่ 2-NBDG ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ control และจากการเปรียบเทียบหาความแตกต่างของการลดลงของการนำเข้าสู่ 2-NBDG เมื่อบ่มที่ 0.5 และ 2 ชั่วโมง พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อาจชี้ได้ว่าในช่วงของการบ่มที่ 0.5 ชั่วโมง ($p < 0.05$) และ 1 ชั่วโมง ($p = 0.052$) ทำให้เกิดการลดลงของการนำเข้าสู่กลูโคสได้ แต่ยังไม่ทำให้การนำเข้าสู่กลูโคสอยู่ในภาวะที่ลดลงอย่างคงที่

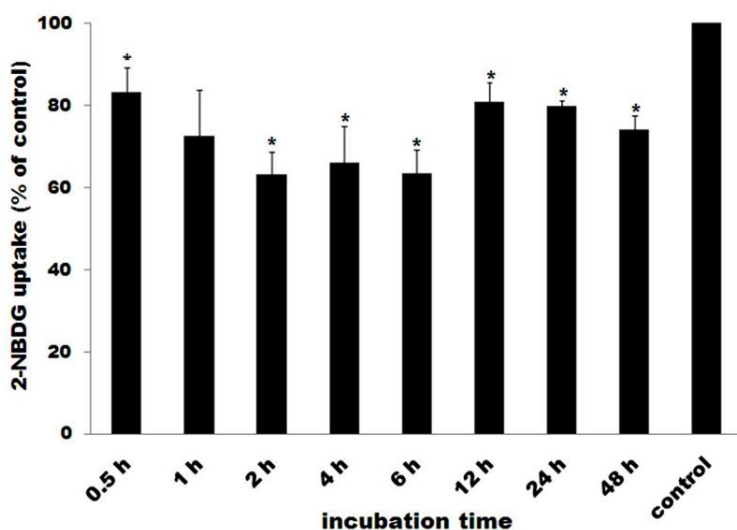


Figure 3 Time dependence of palmitic acid inhibition on glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes: 3T3-L1 adipocytes were exposed to 1 mM palmitic acid / 1 % BSA for 0.5, 1, 2, 4, 6, 12, 24, 48 h. Glucose uptake of palmitic acid treated cells at various incubation times were measured by using 2-NBDG compared with untreated cells (100 % uptake). All data were derived from three separated experiments performed in triplicate and shown as the mean $\pm$ SD, * statistically significant difference ($p < 0.05$) compared with untreated cells (100 % uptake)

4. วิจารณ์

โรคเบาหวานเป็นโรคที่มีอุบัติการณ์สูงขึ้นอย่างมากในหลาย ๆ ประเทศ (King, 1998) การหาทางป้องกันโรคเบาหวานโดยเฉพาะในกลุ่มเสี่ยงต่อการเกิดโรค และการศึกษาหาวิธีคัดกรองหรือตัว

บ่งชี้จะช่วยให้ผู้ป่วยได้ทราบถึงความเสี่ยงที่จะเกิดโรคได้เร็วขึ้นจึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจศึกษา แนวโน้มของการเกิดภาวะดื้อต่ออินซูลินจากโรคอ้วน และความสัมพันธ์ของโรคอ้วนกับเบาหวาน ชนิดที่ 2 จากข้อมูลพบว่า 80 % ของผู้ป่วยเบาหวาน ชนิดที่

2 จะมีภาวะอ้วน โดยเฉพาะภาวะอ้วนลงพุง (metabolic syndrome) เป็นปัจจัยที่เสี่ยงมากที่สุด เพราะ visceral fat ที่สะสมใน central obesity จะมี metabolically active มากกว่า peripheral fat และสามารถปล่อย free fatty acids ได้มาก การเพิ่มขึ้นของระดับ free fatty acid จะเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะดื้อต่ออินซูลินขึ้น (Boden, 1997; Boden, 1999)

การศึกษาหาสภาวะดื้อต่ออินซูลินในเซลล์ไขมัน 3T3-L1 adipocyte โดยเปรียบเทียบการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ระหว่างเซลล์ไขมันปกติกับเซลล์ไขมันที่ถูกกระตุ้นให้เกิดสภาวะที่ดื้อต่ออินซูลินด้วยกรดไขมันปาล์มมิติกในระยะเวลาต่าง ๆ และตรวจติดตามการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ด้วย 2-NBDG พบว่ามีการลดลงของการนำเข้าสู่เซลล์ตั้งแต่บ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง และทำให้การนำเข้าสู่เซลล์อยู่ในภาวะที่คงลดลงอยู่เมื่อบ่มเป็นเวลานานขึ้นจนถึง 48 ชั่วโมง ถึงแม้ว่าเมื่อบ่มเป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง จะไม่ลดลงเทียบเท่าระดับของการบ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แต่ยังมีผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ control ดังนั้นการกระตุ้นเซลล์เพาะเลี้ยง 3T3-L1 adipocyte ด้วย 1 mM palmitic acid / 1 % BSA เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จึงเป็นระยะเวลาของการบ่มเซลล์ไขมันเพื่อก่อให้เกิดการลดลงของการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ที่เหมาะสมที่จะนำไปใช้เป็นแบบจำลองในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไขมันในสภาวะที่ดื้อต่ออินซูลินเพื่อนำไปพัฒนาหาตัวบ่งชี้ในสภาวะดื้อต่ออินซูลิน ซึ่งเสี่ยงที่จะกลายเป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ซึ่งผลที่ได้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยหลายการศึกษา

ผลการศึกษาสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาของ Hunnicutt และคณะ (1994) รายงานว่า 1 mM palmitic acid (16:0) เหนี่ยวนำให้เกิดการดื้อต่ออินซูลินในเซลล์ไขมันที่สกัดจากหนูทดลองเมื่อบ่มเป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง และผลวิจัยของ van

Epp-Fung และคณะ (1997) รายงานว่า long chain saturated fatty acid และ 1 mM palmitic acid สามารถกระตุ้นให้เซลล์ไขมัน 3T3-L1 adipocyte เกิดภาวะดื้อต่ออินซูลินได้ เมื่อบ่มเป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง นอกจากนี้นงานวิจัยจาก Lee และคณะ (2010) ก็พบว่ากรดไขมันปาล์มมิติกสามารถกระตุ้นให้เกิดภาวะดื้อต่ออินซูลินในเซลล์ HepG2 ได้เช่นกัน แต่จากการศึกษาครั้งนี้พบความแตกต่างของระยะเวลาในการบ่มเซลล์ไขมันด้วยกรดไขมันปาล์มมิติก ซึ่งพบได้เร็วขึ้นกว่าที่เคยรายงานไว้คือพบการลดลงของการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อบ่มเป็นเวลาเพียง 2 ชั่วโมง ซึ่งเมื่อพิจารณาจากเทคนิคที่ใช้ในการติดตามผลของการนำเข้าสู่เซลล์ที่ต่างกัน จากการศึกษาที่ผ่านมาใช้เทคนิคการติดตามการนำเข้าสู่เซลล์โดยใช้ 2-DG ซึ่งติดตามด้วยสารกัมมันตรังสี แต่ครั้งนี้เลือกวิธีการตรวจติดตามการนำเข้าสู่ของน้ำตาลกลูโคสโดยใช้ 2-NBDG ซึ่งเป็นสารอนุพันธ์เรืองแสงของกลูโคสที่ถูกคิดค้นจาก Yoshioka และคณะ (1996) (Leira, 2002) ซึ่งสามารถติดตามการนำเข้าสู่เซลล์แบบ dynamic glucose uptake และเป็นวิธีที่มีความไวสูงกว่า จึงทำให้พบความแตกต่างได้ชัดเจนและรวดเร็วขึ้น ซึ่งการค้นพบนี้จะเป็นประโยชน์ช่วยให้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ไขมันที่ทำให้เกิดภาวะที่ดื้อต่ออินซูลินในระยะเริ่มแรกได้

5. สรุป

การบ่มเซลล์ไขมันเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง ด้วย 1 mM palmitic acid / 1 % BSA เป็นเวลาที่เหมาะสมที่ก่อให้เกิดการลดลงของการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์เพื่อนำไปใช้เป็นแบบจำลองของเซลล์ไขมันในสภาวะที่ดื้อต่ออินซูลินในระยะเริ่มแรกได้

6. กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ และงานวิจัยที่ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ประจำปี พ.ศ. 2554

7. เอกสารอ้างอิง

Alberti, K.G. and Zimmet, P.Z., 1998, Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation, *Diabet. Med.* 15: 539-553.

Bergman, R.N., 2007, Orchestration of glucose homeostasis: From a small acorn to the California oak, *Diabetes* 56: 1489-1501.

Boden, G., 1997, Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM, *Diabetes* 46: 3-10.

Boden, G., 1999, Free fatty acids, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus, *Proc. Assoc. Am. Phys.* 111: 241-248.

Fraze, E., Donner, C.C., Swislocki, A.L., Chiou, Y.A. and Chen, Y.D.I., 1985, Ambient plasma free fatty acid concentrations in noninsulin-dependent diabetes mellitus: Evidence for insulin resistance, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 61: 807-811.

Ginsberg, H., Olefsky, J.M. and Reaven, G.M., 1974, Further evidence that insulin resistance exists in patients with chemical diabetes, *Diabetes* 23: 674-678.

Green, H. and Kehinde, O., 1975, An established pre-adipose cell line and its

differentiation in culture II: Factors affecting the adipose conversion, *Cell* 5: 19-27.

Harris, M.I., 1995, Epidemiologic studies on the pathogenesis of non-insulindependent diabetes mellitus (NIDDM), *Clin. Invest. Med.* 18: 231-239.

Hassanein, M., Weidow, B., Koehler, E., Bakane, N., Garbett, S., Shyr, Y. and Quaranta, V., 2011, Development of high-throughput quantitative assays for glucose uptake in cancer cell lines, *Mol. Imaging. Biol.* 13: 840-852.

Hunnicut, J.W., Hardy, R.W., Williford, J. and McDonald, J.M., 1994, Saturated fattyacid-induced insulin resistance in rat adipocytes, *Diabetes* 43: 540-545.

Inzucchi, S.E., Bergenstal, R.M., Buse, J.B., Diamant, M., Ferrannini, E., Nauck, M., Peters, A.L., Tsapas, A., Wender, R. and Matthews D.R., 2012, American diabetes association (ADA); European association for the study of diabetes (EASD), Management of hyperglycemia in type 2 diabetes, a patientcentered approach: Position statement of the American diabetes association (ADA) and the european association for the study of diabetes (EASD), *Diabetes Care* 35: 1364-1379.

Karaskov, E., Scott, C., Zhang, L., Teodoro, T., Ravazzola, M. and Volchuk, A., 2006, Chronic palmitate but not oleate exposure induces endoplasmic reticulum stress, which may contribute to INS-1 pancreatic

- beta-cell apoptosis, *Endocrinology* 147: 3398-3407.
- Kennedy, A., Martinez, K., Chuang, C.C., LaPoint, K. and McIntosh, M., 2009, Saturated fatty acid-mediated inflammation and insulin resistance in adipose tissue: mechanisms of action and implications, *J. Nutr.* 139: 1-4.
- King, H., Aubert, R.E. and Herman, W.H., 1998, Global burden of diabetes, 1995-2025: Prevalence, numerical estimates, and projection, *Diabetes Care* 21: 1414-1431.
- Knutson, V.P. and Balba, Y., 1997, 3T3-L1 adipocytes as a cell culture model of insulin resistance, *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 33: 77-81.
- Lee, J.Y., Cho, H.K. and Kwon, Y.H., 2010, Palmitate induces insulin resistance without significant intracellular triglyceride accumulation in HepG2 cells, *Metabolism* 59: 927-934.
- Leira, F., Louzao, M.C., Vieites, J.M., Botana, L.M. and Veytes, M.R., 2002, Fluorescent microplate cell assay to measure uptake and metabolism of glucose in normal human lung fibroblasts, *Toxicol. In Vitro* 16: 267-273.
- Lillioja, S., Foley, J., Bogardus, C., Mott, D. and Howard, B.V., 1986, Free fatty acid metabolism, and obesity in man: *In vivo* and *in vitro* comparisons, *Metabolism* 35: 505-514.
- Lyssenko, V., Jonsson, A., Almgren, P., Pulizzi, N., Isomaa, B., Tuomi, T., Berglund, G., Altshuler, D., Nilsson, P. and Groop, L., 2008, Clinical risk factors, DNA variants, and the development of type 2 diabetes, *N. Engl. J. Med.* 359: 2220-2232.
- Martin, B.C., Warram, J.H., Krolewski, A.S., Bergman, R.N., Soeldner, J.S. and Kahn, C.R., 1992, Role of glucose, and insulin resistance in development of type 2 diabetes mellitus: results of a 25-year follow-up study, *Lancet* 340: 925-929.
- Maury, E. and Brichard, S.M., 2010, Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome, *Mol. Cell. Endocrinol.* 314: 1-16.
- Muniyappa, R., Lee, S., Chen, H. and Quon, M.J., 2008, Current approaches for assessing insulin sensitivity and resistance *in vivo*: Advantages, limitations, and appropriate usage, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 294: E15-26.
- Reaven, G.M. and Olefsky, J.M., 1978, The role of insulin resistance in the pathogenesis of diabetes mellitus, *Adv. Metab. Disord.* 9: 313-331.
- Robert, J.J., 1995, Methods for the measurement of insulin resistance: Hyperinsulinemic euglycemic clamp, *Presse. Med.* 24: 730-734.
- Sartipy, P. and Loskutoff, D.J., 2003, Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100: 7265-7270.
- Scott, J., Tidball, A., Uitvlugt, J.M., Lucia, M., Vander, Griend, D.A. and Louters, L.L., 2009, Methyl-beta-cyclodextrin directly

- p>binds methylene blue and blocks both its cell staining and glucose uptake stimulatory effects,
- Biochimie*
- 91: 271-276.
- Sivitz, W.I. and Lee, E.C., 1991, Assessment of glucose transporter gene expression using the polymerase chain reaction, *Endocrinology* 128: 2387-2394.
- Swislocki, A.L.M., Chen, Y.D.I., Golay, A., Chang, M.O. and Reaven, G.M., 1987, Insulin suppression of plasma-free fatty acid concentration in normal individuals, and patients with Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes, *Diabetologia* 30: 622-626.
- Tsytsarev, V., Maslov, K.I., Yao, J., Parameswar, A.R., Demchenko, A.V. and Wang, L.V., 2012, *In vivo* imaging of epileptic activity using 2-NBDG, a fluorescent deoxyglucose analog, *J. Neurosci. Methods*. 203: 136-140.
- van Epps-fung, M., Williford, J., Wells, A. and Hardy, A.W., 1997, Fatty acid-induced insulin resistance in adipocytes, *Endocrinology* 138: 4338-4345.
- Watson, R.T., Kanzaki, M. and Pessin, J.E., 2004, Regulated membrane trafficking of the insulin-responsive glucose transporter 4 in adipocytes, *Endocr. Rev.* 25: 177-204.
- Wen, Y., Wang, H.W., Wu, J., Lu, H.L., Hu, X.F. and Cianflone, K., 2006, Effects of fatty acid regulation on visfatin gene expression in adipocytes, *Chin. Med. J.* 119: 1701-1708.
- West, K.M., 1978, Diabetes in American Indians, pp. 29-34, in Levine, R. and Luft, R. (Eds.), *Advances in Metabolic Disorders*, Vol. 9, Academic Press, New York.
- Yoshioka, K., Oh, K.B., Saito, M., Nemoto, Y. and Matsuoka, H., 1996, Evaluation of 2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) amino]-2-deoxyglucose, a new fluorescent derivative of glucose, for viability assessment of yeast *Candida albicans*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46: 400-404.
- Zhang, WY., Lee, J.J., Kim, I.S., Kim, Y. and Myung, C.S., 2011, Stimulation of glucose uptake and improvement of insulin resistance by aromadendrin, *Pharmacology* 88: 266-274.
- Zimmet, P., 2000, Globalization, coca-colonization and the chronic disease epidemic: Can the doomsday scenario be averted ?, *J. Intern. Med.* 247: 301-310.
- Zou, C., Wang, Y. and Shen, Z., 2005, 2-NBDG as a fluorescent indicator for direct glucose uptake measurement, *J. Biochem. Biophys. Methods*. 64: 207-215.