

ชมพูทับทิมจันทร์เพิ่มกระบวนการส่งสัญญาณ ของอินซูลินในตับของหนูเบาหวาน

Taaptimjann Wax Apple [*Syzygium samarangense* (Blume) Merrill. & L.M. Perry] Improves Insulin Signaling in the Liver of Diabetic Rats

ชญชิตา สีดาดี และวันทนี หาญช้าง*

ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์

ตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000

ทัตดาว ภาษีผล

ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหารและโภชนาการ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

ตำบลขามเรียง อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม 44150

Chananchida Seedadee and Wanthanee Hanchang*

Department of physiology, Faculty of Medical Science, Naresuan University,

Tah Poe, Muang, Phitsanulok 65000

Tatdao Paseephol

Department of Food Technology and Nutrition, Faculty of Technology, Mahasarakham University,

Kham Rieng, Kantharawichai, Mahasarakham 44150

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของชมพูทับทิมจันทร์ [*Syzygium samarangense* (Blume) Merrill. & L.M. Perry var. *Samarangense*] ต่อกระบวนการส่งสัญญาณของอินซูลินภายในตับของหนูเบาหวานเพศผู้ โดยหนี้ยาวหนูขาวให้เป็นเบาหวานด้วยการฉีดสเตรปโทโซโทซิน (65 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว) เข้าทางช่องท้องแบบครั้งเดียว แล้วหนูเบาหวานจะได้รับการป้อนด้วยชมพูทับทิมจันทร์ ขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ หลังจากนั้นศึกษาระดับน้ำตาลในเลือด การเกิด lipid peroxidation และการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณของอินซูลินในตับด้วยเทคนิค Western blotting ผลการศึกษาพบว่าหนูเบาหวานมีระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติ สอดคล้องกับระดับการแสดงออกของโปรตีน insulin receptor- β (InR- β), phospho-insulin receptor substrate 1 [p-IRS1

(Ser307)] และ phospho-JNK [p-JNK (Thr183/Tyr185)] ที่พบเพิ่มขึ้น ซึ่งบ่งชี้ถึงภาวะดื้อต่ออินซูลินที่ต่า นอกจากนี้ยังพบระดับของ malondialdehyde (MDA) เพิ่มขึ้นในตับของหนูเบาหวานด้วย อย่างไรก็ตามการให้ชมพูทับทิมจันทร์ (100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว) แก่หนูเบาหวานพบว่าสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือด การแสดงออกของโปรตีน InR- β , p-IRS1 (Ser307) และ p-JNK (Thr183/Tyr185) รวมทั้งระดับของ MDA ในตับของหนูเบาหวานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นผลการทดลองในการศึกษานี้จึงมีความเป็นไปได้ว่าชมพูทับทิมจันทร์สามารถช่วยเพิ่มกระบวนการส่งต่อสัญญาณของอินซูลินภายในตับของหนูเบาหวาน ซึ่งสอดคล้องกับการลดลงของภาวะเครียดออกซิเดชันในเนื้อเยื่อตับของหนูเบาหวาน

คำสำคัญ : ชมพูทับทิมจันทร์; เบาหวาน; ตับ; กระบวนการส่งสัญญาณของอินซูลิน

Abstract

The aim of this study was to investigate the effect of Taaptimjann wax apple [*Syzygium samarangense* (Blume) Merrill. & L.M. Perry var. *Samarangense*] on hepatic insulin signaling in the liver of male diabetic rats. Diabetic rats were induced in Sprague-Dawley rats using a single intraperitoneal (i.p.) injection of streptozotocin [STZ; 65 mg/kg body weight (b.w.)]. Then, wax apple at dose of 100 mg/kg b.w./day was orally administered to diabetic rats for a period of 4 weeks. At the end of experiment, blood glucose level, and lipid peroxidation were evaluated. Hepatic expression levels of insulin signaling proteins were also measured using Western blot analysis. The results clearly showed STZ induction provided an increase in blood glucose level and maintained hyperglycemia throughout this experiment. Also, the expression levels of insulin signaling-related proteins; insulin receptor- β (InR- β), phospho-insulin receptor substrate 1 [p-IRS1 (Ser307)], and phospho-JNK [p-JNK (Thr183/Tyr185)] were upregulated. Malondialdehyde (MDA) level was also noted in liver of STZ-induced diabetic rats. However, treatment with wax apple at a dose of 100 mg/kg b.w. to STZ-induced diabetic rats produced a significant decrease in blood glucose level, which correlated with downregulation of InR- β , p-IRS1 (Ser307), and p-JNK (Thr183/Tyr185) proteins in the liver. Wax apple also diminished the level of MDA in liver of diabetic rats. These findings therefore suggest that wax apple could improve hepatic insulin signaling pathway in STZ-induced diabetic rats, which is associated with decreased oxidative stress.

Keywords: Taaptimjann wax apple; diabetes; liver; insulin signaling

1. บทนำ

โรคเบาหวานเป็นโรคที่เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญและส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของประชากร

ทั่วโลก สมาพันธ์เบาหวานนานาชาติ (International Diabetes Federation, IDF) รายงานในปี ค.ศ. 2017 ว่าทั่วโลกมีผู้ป่วยเป็นโรคเบาหวาน จำนวน 425 ล้าน

คน และมีแนวโน้มจะเพิ่มถึง 629 ล้านคนในปี ค.ศ. 2045 โดยประเทศไทยพบประชากรที่มีภาวะความทนต่อน้ำตาลกลูโคสบกพร่องอยู่ในอันดับที่ 9 ของโลก [1] อาการแสดงที่สำคัญของโรคเบาหวาน คือ ระดับน้ำตาลในเลือดสูง (hyperglycemia) ร่วมกับความผิดปกติในเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน ซึ่งมีสาเหตุมาจากการหลั่งอินซูลินลดลง และ/หรือ ภาวะดื้อต่ออินซูลิน (insulin resistance) [2] การมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงเป็นระยะเวลานานจะส่งผลกระทบต่ออวัยวะต่าง ๆ ในร่างกาย ทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนต่าง ๆ ตามมา ได้แก่ จอประสาทตาเสื่อม ไตวาย โรคหลอดเลือดหัวใจและสมอง โรคหลอดเลือดส่วนปลายอุดตัน ความดันเลือดสูง เป็นต้น [3]

ภาวะดื้อต่ออินซูลิน คือ ภาวะที่อินซูลินไม่สามารถออกฤทธิ์ที่เซลล์ต่าง ๆ ในร่างกายตามปกติ โดยเฉพาะอวัยวะเป้าหมายหลัก ได้แก่ กล้ามเนื้อ เนื้อเยื่อไขมัน และตับ [4] ภาวะนี้เป็นอวัยวะเป้าหมายที่สำคัญในการตอบสนองต่ออินซูลิน โดยอินซูลินมีหน้าที่เร่งการใช้กลูโคสเป็นพลังงาน กระตุ้นการเก็บกลูโคสในรูปไกลโคเจน (glycogen synthesis) ในตับ และยับยั้งการสร้างน้ำตาลขึ้นมาใหม่ (gluconeogenesis) จากตับ [5,6] ตรงกันข้ามเมื่อเกิดภาวะดื้อต่ออินซูลินที่ตับ จะส่งผลทำให้ไม่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นพลังงาน มีการสลายไกลโคเจน (glycogenolysis) การสร้างน้ำตาลขึ้นมาใหม่ที่ตับและปล่อยออกสู่กระแสเลือดเพิ่มขึ้น ส่งผลให้เกิดภาวะน้ำตาลในเลือดสูง [7]

รายงานการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าระดับความไวต่อกลุ่มอาการที่มีความผิดปกติของเมตาบอลิซึม (metabolic syndrome) ซึ่งมีการบริโภคน้ำมันสูงและเป็นเบาหวาน [8,9] โดยพบการเพิ่มขึ้นของการสะสมของไขมันและการลดลงของระดับไกลโคเจน ซึ่งเป็นผลมาจากภาวะดื้อต่ออินซูลินที่ตับ [10] มีรายงานว่าระดับน้ำตาลกลูโคสที่สูงสามารถไปกระตุ้นการเกิด

ภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ซึ่งส่งผลทำให้ระดับตอบสนองต่ออินซูลินลดลง [11-13] นอกจากนี้ น้ำตาลกลูโคสที่สูงยังสามารถไปกระตุ้น hexosamine biosynthesis pathway และการทำงานของ protein kinase C (PKC) ทำให้เกิดภาวะดื้อต่ออินซูลินได้ด้วย [14,15] ยิ่งไปกว่านั้นยังมีผลไปกระตุ้น pro-inflammatory cytokines และการทำงานของ c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway ทำให้เกิดการยับยั้งการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับกรดอะมิโนไทโรซีน (tyrosine phosphorylation) แต่กระตุ้นการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับกรดอะมิโนเซอรีน (serine phosphorylation) ในโปรตีน insulin receptor substrate-1 (IRS-1) ส่งผลยับยั้งการทำงานของโปรตีนหรือเอนไซม์อื่น ๆ ภายในเซลล์ ดังนั้นการออกฤทธิ์ของอินซูลินที่เซลล์ต่ำจะลดลง [10,16-18]

ปัจจุบันยาที่ใช้รักษาโรคเบาหวานมีหลายกลุ่ม เช่น ยาที่เพิ่มการตอบสนองของอินซูลิน ยากระตุ้นการหลั่งของอินซูลิน ยายับยั้งการดูดซึมกลูโคสที่ระบบทางเดินอาหาร ยาเร่งการขับน้ำตาลกลูโคสทางปัสสาวะ ยาในกลุ่ม incretin และอินซูลิน เป็นต้น ซึ่งยาเหล่านี้มีกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามพบว่าเมื่อใช้ยาเหล่านี้เป็นระยะเวลานานจะส่งผลข้างเคียงรุนแรงต่อร่างกาย ดังนั้นการเลือกใช้พืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์บำบัดรักษาโรค (medicinal herb) น่าจะเป็นทางเลือกที่สำคัญในการรักษาโรคเบาหวาน และลดอาการข้างเคียงที่จะเกิดขึ้นจากการใช้ยา

ชมพูทับทิมจันทร์ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Syzygium samarangense* (Blume) Merrill & L.M. Perry var. *Samarangense* เป็นไม้ผลที่อยู่ในวงศ์ของ Myrtaceae และพบแพร่หลายในทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ ไต้หวัน มาเลเซีย อินโดนีเซีย และไทย [19] การศึกษาก่อนหน้านี้รายงานว่าชมพูทับทิมจันทร์มีสารออกฤทธิ์ทางเคมีที่สำคัญซึ่งมีฤทธิ์ด้านอนุมูล

อิสระหลายชนิด เช่น phenol, flavonoid, flavonol glycoside, anthocyanidin, proanthocyanidin และ ellagitannin [19-21] นอกจากนี้ยังพบว่าสารออกฤทธิ์ทางเคมีที่พบในชมพูทับทิมจันทร์มีฤทธิ์ต้านเบาหวาน ด้านการอักเสบ และต้านแบคทีเรียด้วย [22-24] การศึกษาของ Resurreccion-Magno และคณะ ในปี ค.ศ. 2005 รายงานว่า flavonoid ที่สกัดจากชมพูทับทิมจันทร์สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดสูงของหนูเบาหวานชนิดที่ 1 ที่เหนี่ยวนำด้วยสาร alloxan [22] นอกจากนี้ Shen และคณะ ในปี ค.ศ. 2013 ยังรายงานว่า vescalagin ซึ่งเป็นสารที่อยู่ในชมพูทับทิมจันทร์สามารถลดระดับน้ำตาลและไขมันในเลือดของโมเดลหนูเบาหวานชนิดที่ 2 ด้วย [25] สอดคล้องกับการศึกษาในหลอดทดลองที่รายงานว่าสารสกัดชมพูทับทิมจันทร์มีฤทธิ์ลดภาวะดื้อต่ออินซูลินผ่านการยับยั้งการทำงานของโปรตีน JNK ใน mouse hepatocyte cell line [26] ยิ่งไปกว่านั้นผลการศึกษาก่อนหน้านี้ซึ่งศึกษาในหนูเบาหวานที่เหนี่ยวนำด้วย streptozotocin พบว่าชมพูทับทิมจันทร์มีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูเบาหวานได้เช่นกัน [27] อย่างไรก็ตาม กลไกการออกฤทธิ์ของชมพูทับทิมจันทร์ต่อการต้านภาวะดื้ออินซูลินในระดับของหนูเบาหวานยังไม่มีรายงาน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ทดลองเพื่อยืนยันฤทธิ์ด้านเบาหวานของชมพูทับทิมจันทร์ และเพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของชมพูทับทิมจันทร์ต่อกระบวนการส่งสัญญาณการทำงานของอินซูลินภายในระดับของโมเดลหนูเบาหวานที่เหนี่ยวนำด้วยสารสเตรปโทโซโทซิน โดยวัดระดับน้ำตาลในเลือด การแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณของอินซูลิน และการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันในตับ ซึ่งผลจากการศึกษานี้จะทำให้เข้าใจกลไกการออกฤทธิ์ของชมพูทับทิมจันทร์ในการลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ดียิ่งขึ้น

2. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 สารเคมี

สารสเตรปโทโซโทซินซื้อจากบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา และสารเคมีอื่น ๆ ซื้อจากบริษัทที่ได้มาตรฐานและรับรองคุณภาพ

2.2 สัตว์ทดลอง

หนูแรทสายพันธุ์ Sprague Dawley เพศผู้ อายุ 8-12 สัปดาห์ น้ำหนักประมาณ 180-250 กรัม ซื้อมาจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล จังหวัดนครปฐม ได้รับการดูแลในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองของสถานสัตว์ทดลองเพื่อการวิจัย มหาวิทยาลัยนเรศวร ซึ่งควบคุมอุณหภูมิประมาณ 22 ± 1 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่าง 12 ชั่วโมง และมีมืด 12 ชั่วโมง และให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปและน้ำที่เพียงพอตลอดเวลา งานวิจัยครั้งนี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมสัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยนเรศวร (NU-AE580609) และผู้วิจัยได้ปฏิบัติตามจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลองเพื่องานทางวิทยาศาสตร์

2.3 การเตรียมสารสกัด

ชมพูทับทิมจันทร์ซื้อจากตลาดในจังหวัดมหาสารคาม ประเทศไทย โดยเลือกผลชมพูสุีแดงเข้มในระยะแก่ น้ำหนักประมาณ 180-200 กรัม/ผล มีลักษณะสมบูรณ์ ไม่มีรอยโรคหรือรอยบุบที่ผล โดยชมพูทับทิมจันทร์จะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 10 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นเอาเมล็ดออกและหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาด 0.5×0.5 เซนติเมตร แล้วนำมาทำแห้งแบบระเหิด (lyophilisation) ด้วยเครื่อง freeze dryer ภายใต้ความดัน 0.50 Pa และอุณหภูมิ -45 องศาเซลเซียส บดให้เป็นผงและเก็บในขวดสีชาที่ปิดสนิท ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปศึกษาต่อไป

2.4 การออกแบบการทดลอง

แบ่งหนูเพศผู้พันธุ์ Sprague Dawley เป็น

3 กลุ่ม กลุ่มละ 8 ตัว ดังนี้ (1) กลุ่มที่ 1 หนูปกติไม่ได้เป็นเบาหวาน จะป้อนด้วยน้ำกลั่น ขนาด 1 มิลลิลิตร/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน (2) กลุ่มที่ 2 หนูเบาหวาน จะป้อนด้วยน้ำกลั่น ขนาด 1 มิลลิลิตร/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน และ (3) กลุ่มที่ 3 หนูเบาหวาน จะป้อนด้วยชมพูทับทิมจันทร์ ขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน

โดยเหนียนำหนูให้เป็นเบาหวานด้วยการฉีดสารสเตปโทโซโทซินขนาด 65 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว ฉีดผ่านทางช่องท้องแบบครั้งเดียว วัดระดับน้ำตาลในเลือดหลังจากฉีดด้วยสเตปโทโซโทซินเป็นเวลา 3 วัน หนูที่มีระดับน้ำตาลในเลือดมากกว่า 250 มิลลิกรัม/เดซิลิตร ถือว่าเป็นเบาหวาน จากนั้นนำมาทดลองโดยการป้อนด้วยน้ำกลั่นหรือชมพูทับทิมจันทร์ ขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ระหว่างการทดลองจะวัดระดับน้ำตาลและน้ำหนักตัวหนูทุกสัปดาห์ เมื่อสิ้นสุดการทดลองจะการุณฆาตหนูทุกกลุ่ม แล้วนำไปศึกษาต่อไป

2.5 การวิเคราะห์ระดับน้ำตาลในเลือดก่อนอาหารของหนูทดลอง

เจาะเลือดจากปลายหางจำนวนประมาณ 50 ไมโครลิตร ในหนูทุกกลุ่มทดลอง เพื่อวัดระดับน้ำตาลในเลือดด้วยเครื่องวัดระดับน้ำตาลอัตโนมัติ (Advanced Accu-chek glucometer, Roche Diagnostics, USA) โดยประเมินระดับน้ำตาลในเลือดทุก 1 สัปดาห์ ตลอดระยะเวลาการทดลอง

2.6 การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการส่งสัญญาณการทำงานของอินซูลินโดยเทคนิค Western blotting

แยกตัวออกมาจากสัตว์ทดลองทุกกลุ่ม จากนั้นล้างด้วย phosphate buffer saline (PBS) และสกัดโปรตีนด้วย RIPA lysis buffer แล้ววัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วย micro BCATM protein assay

kit (Merck, USA) นำโปรตีนปริมาณ 70 ไมโครกรัม จากทุกกลุ่มการทดลองมาแยกตามขนาดด้วย sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) จากนั้นย้ายโปรตีนลงบนแผ่น polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane และบล็อกโปรตีนที่ไม่จำเพาะด้วย 5 % bovine serum albumin (BSA) ที่ละลายใน 1x Tris-buffered saline Tween (TBST) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นบ่มด้วย primary antibody ที่จำเพาะต่อโปรตีนที่สนใจเป็นเวลา 1 คืน ได้แก่ anti-insulin receptor- β (InR- β), anti-insulin receptor substrate-1 (IRS1), anti-p-IRS1 (Ser307), และ anti-p-JNK (Thr183/Tyr185) antibody แล้วตามด้วยการบ่มกับ secondary antibody ที่เชื่อมอยู่กับเอนไซม์ horseradish peroxidase (HRP) และเขย่าเป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากล้างแผ่นเมมเบรนด้วย 1x TBST เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง แล้วตรวจวัดโมเลกุลของ antigen-antibody complex บนแผ่นเมมเบรนด้วยเทคนิค chemiluminescent และตรวจวิเคราะห์การแสดงผลของโปรตีนที่สนใจด้วยโปรแกรม Image Lab Software (Bio-Rad, USA)

2.7 การวัดระดับของลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation)

การเกิด lipid peroxidation ถูกวิเคราะห์ด้วยวิธี thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) method โดยใช้ 8.1 % sodium dodecyl sulfate (SDS) ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ตามด้วยสารละลายตัวอย่างหรือสารมาตรฐานปริมาณ 25 ไมโครลิตร และ 0.8 % (w/w) thiobarbituric acid (TBA) ปริมาณ 375 ไมโครลิตร จากนั้นเติม 20 % acetic acid solution (pH 3.5) ปริมาณ 375 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและบ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส ซึ่ง malondialdehyde (MDA) จะ

ทำปฏิกิริยากับ TBA ได้สารสีชมพู หลังจาก cooled down เป็นเวลา 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำ supernatant ไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร และเปรียบเทียบกับกราฟของสารมาตรฐาน MDA

2.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ทางสถิติทั้งหมดใช้ Graph Pad Prism 5.0 (San Diego, CA, USA) โดยผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน และวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มการทดลองด้วย one-way analysis of variance (ANOVA) และ Tukey's post hoc test โดยกำหนดค่าความเชื่อมั่น $> 95\%$ ($p < 0.05$)

3. ผลการวิจัย

3.1 ผลของชมพูทับทิมจันทร์ต่อระดับน้ำตาลในเลือดและน้ำหนักตัวในหนูเบาหวาน

ผลการศึกษานี้ยืนยันผลการทดลองที่เคยรายงานก่อนหน้านี้ [27] ว่าหนูเบาหวานที่เหนียว นำด้วยสารสเตรปโทโซโทซินมีระดับน้ำตาลในกระแสเลือดเพิ่มขึ้น แต่มีน้ำหนักตัวลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตาม เมื่อหนูเบาหวานได้รับชมพูทับทิมจันทร์ ขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัวหนู พบว่าระดับน้ำตาลในเลือดลดลงและน้ำหนักตัวของหนูเบาหวานเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 1

Table 1 Effect of wax apple on FBG level and body weight in diabetic rats after 4 weeks of treatment

Groups	Fasting blood glucose (mg/dL)	Body weight (g)
Control	103 $\pm$ 6.19	362.3 $\pm$ 23.49
DM	356.8 $\pm$ 8.88 ^{***}	213.4 $\pm$ 13.77 ^{***}
DM + Wax apple 100 mg/kg b.w.	261.1 $\pm$ 10.40 ⁺⁺⁺	272.9 $\pm$ 8.38 [†]

All values are expressed as means $\pm$ SEM. (n = 8); ^{***}p < 0.001 compared with control group, ⁺⁺⁺p < 0.001, [†]p < 0.05 compared with DM group

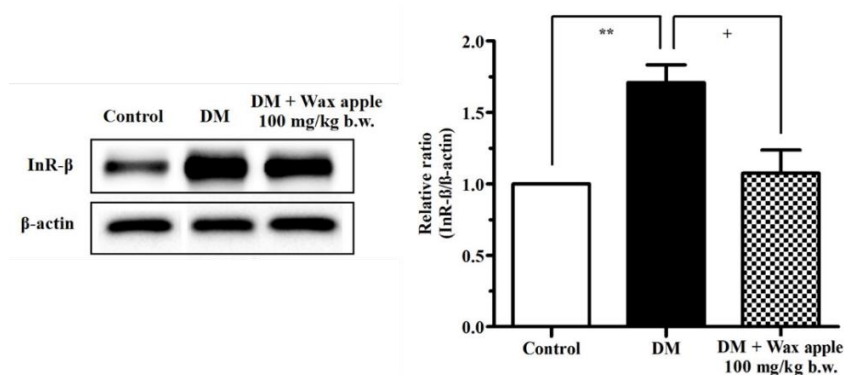


Figure 1 Effect of wax apple on InR- β protein expression in liver of diabetic rats. Hepatic InR- β protein expression was determined by Western blotting. Data are presented as means $\pm$ SEM (N = 4). ^{**}p < 0.01 compared with control group, [†]p < 0.05 compared with DM group.

3.2 ผลของชมพูทับทิมจันทร์ต่อการแสดงออกของโปรตีนตัวรับอินซูลินหน่วยเบต้า (InR- β) ในตับของหนูเบาหวานที่เหนี่ยวนำด้วยสารสเตรปโทโซโทซิน

รูปที่ 1 พบว่าหนูเบาหวานมีระดับการแสดงออกของโปรตีน InR- β ในตับเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับหนูปกติ การให้ชมพูทับทิมจันทร์ขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว แก่หนูเบาหวานสามารถลดการแสดงออกของโปรตีน InR- β ลงจนใกล้เคียงกับหนูปกติ

3.3 ผลของชมพูทับทิมจันทร์ต่อการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการส่งสัญญาณของอินซูลินในตับของหนูเบาหวานที่เหนี่ยวนำด้วยสารสเตรปโทโซโทซิน

การศึกษาฤทธิ์ของชมพูทับทิมจันทร์ต่อการเปลี่ยนแปลงการส่งสัญญาณของอินซูลินในตับของหนูเบาหวานโดยการวัดระดับการแสดงออกของโปรตีน

IRS1, p-IRS1 (Ser307), และ p-JNK (Thr183/Tyr185) ดังแสดงในรูปที่ 2 และ 3 พบการแสดงออกของโปรตีน IRS1 ในตับของหนูทั้ง 3 กลุ่ม ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่พบระดับการแสดงออกของโปรตีน p-IRS1 (Ser307) ในตับของหนูเบาหวานที่เหนี่ยวนำด้วยสเตรปโทโซโทซินเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติ ตรงกันข้ามกับกลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับชมพูทับทิมจันทร์ขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว พบว่าระดับการแสดงออกของโปรตีน p-IRS1 (Ser307) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูเบาหวานที่ไม่ได้รับชมพูทับทิมจันทร์ (รูปที่ 2) เช่นเดียวกับระดับการแสดงออกของโปรตีน p-JNK (Thr183/Tyr185) ที่พบเพิ่มขึ้นในหนูเบาหวาน เมื่อให้ชมพูทับทิมจันทร์ขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว แก่หนูเบาหวาน

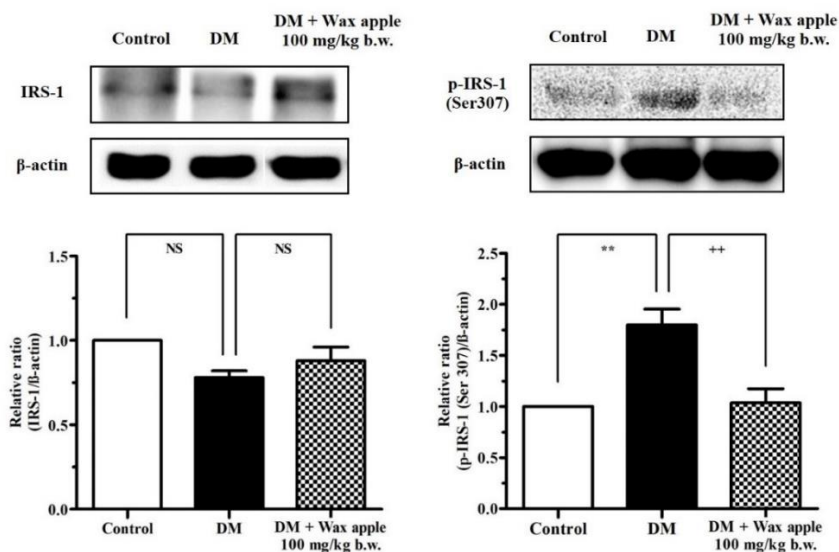


Figure 2 Effect of wax apple on IRS-1 and p-IRS-1 (Ser307) protein expressions in liver of diabetic rats. The expression levels of IRS-1 and p-IRS-1 (Ser307) proteins in liver were determined by Western blotting. Data are expressed as means $\pm$ SEM (N = 3-5). NS, not significant; ** $p < 0.01$ compared with control group, $^{++}p < 0.01$ compared with DM group.

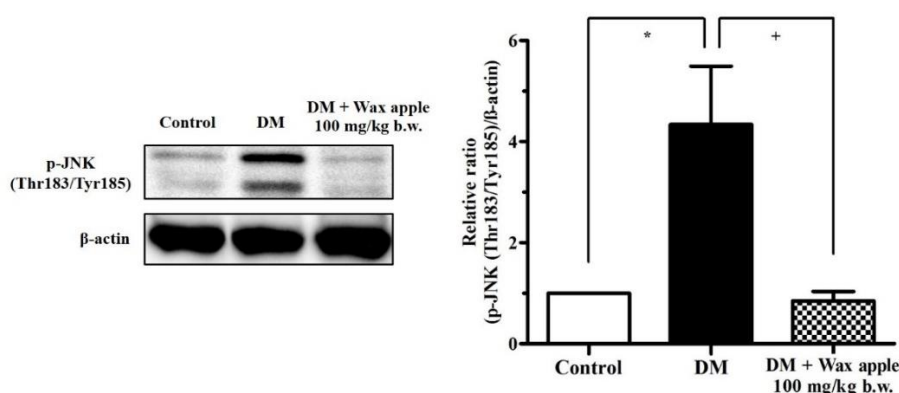


Figure 3 Effect of wax apple on p-JNK (Thr183/Tyr185) protein expression in liver of diabetic rats. Hepatic p-JNK (Thr183/Tyr185) protein was analyzed by Western blotting. Values are expressed as means $\pm$ SEM (N=3). * $p < 0.05$ compared with control group, $^+p < 0.05$ compared with DM group.

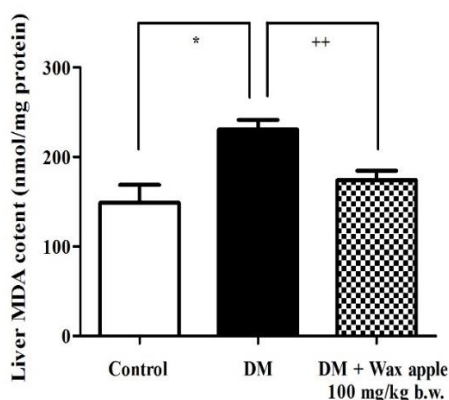


Figure 4 Effect of wax apple on MDA content in the liver of diabetic rats. The MDA content in liver was detected by TBARS method. Data are expressed as means $\pm$ SEM (N=5). * $p < 0.05$ compared with control group, $^{++}p < 0.01$ compared with DM group.

พบระดับการแสดงออกของโปรตีน p-JNK (Thr183/Tyr185) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 3) ดังนั้นผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าชมพูทับทิม

จันทร์ขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว สามารถทำให้กระบวนการส่งสัญญาณของอินซูลินในระดับของหนูเบาหวานดีขึ้น

3.4 ผลของชมพูทับทิมจันทร์ต่อการเกิด lipid peroxidation ในระดับของหนูเบาหวานที่เหนี่ยวนำด้วยสารสเตโรบโทโซโทซิน

รูปที่ 4 พบว่าหนูเบาหวานมีระดับของ malondialdehyde (MDA) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติ ซึ่งแสดงถึงการเกิด lipid peroxidation อย่างไรก็ตาม การให้ชมพูทับทิมจันทร์ขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว แก่หนูเบาหวานสามารถลดระดับของ MDA ในตับได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูเบาหวาน

4. วิจารณ์

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของชมพูทับทิมจันทร์ต่อการควบคุมการส่งสัญญาณการทำงานของอินซูลินในระดับของหนูเบาหวานที่เหนี่ยวนำด้วยสารสเตโรบโทโซโทซิน ผลการศึกษาพบว่าทำให้

ชมพูทับทิมจันทร์ขนาด 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัวของหนู เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดและอาการแสดงของเบาหวาน รวมทั้งทำให้การออกฤทธิ์ของอินซูลินผ่านทาง insulin receptor substrate-1 (IRS-1) ในตับของหนูเบาหวานดีขึ้น ซึ่งการศึกษาก่อนหน้านี้ของคณะผู้วิจัยพบว่าการให้สารสเตรปโทโซโทซินซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะที่ได้จาก *Streptomyces achromogenes* สามารถเหนี่ยวนำให้หนูเป็นเบาหวาน [27] โดยสเตรปโทโซโทซินจะเข้าสู่เบต้าเซลล์ของตับอ่อนผ่านทาง glucose transporter-2 (GLUT-2) ส่งผลให้เกิด alkylation ของ DNA และนำไปสู่การเกิด poly ADP-ribosylation ซึ่งเป็นสาเหตุของการลดลงของ NAD^+ และ ATP ทำให้เกิดการตายและการสูญเสียหน้าที่การทำงานของเบต้าเซลล์ในตับอ่อน [28,29] การให้ชมพูทับทิมจันทร์ขนาด 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัวของหนู สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดและอาการแสดงของหนูเบาหวาน [27] ซึ่งยืนยันด้วยผลการทดลองครั้งนี้ที่พบว่าชมพูทับทิมจันทร์มีฤทธิ์ต้านเบาหวานในโมเดลหนูเบาหวานที่เหนี่ยวนำด้วยสเตรปโทโซโทซิน

ภาวะสมดุลของน้ำตาลถูกควบคุมโดยการทำงานของอินซูลิน อินซูลินสามารถออกฤทธิ์ได้โดยการจับกับตัวรับของอินซูลิน (insulin receptor) ที่เยื่อหุ้มเซลล์ แล้วจะเกิดการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ไทโรซีนไคเนส (tyrosine kinase) โดยการเติมหมู่ฟอสเฟต (autophosphorylation) ให้กับกรดอะมิโนไทโรซีน (tyrosine) ซึ่งอยู่ในหน่วยเบต้า (β -subunit) ของตัวรับของอินซูลิน จากนั้นจึงเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับโปรตีน insulin receptor substrate-1 (IRS-1) บนตำแหน่งของกรดอะมิโนไทโรซีน (Try-1146, Tyr-1150 และ Tyr-1151) ทำให้ IRS1 ทำงานไปกระตุ้นโปรตีนหรือเอนไซม์อื่น ๆ ภายในเซลล์ ซึ่งมีผลทำให้เซลล์ต่าง ๆ ในร่างกายตอบสนองต่ออินซูลิน [30] โดย

จะพบการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์และมีการใช้กลูโคสเป็นพลังงานเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังมีผลกระทบต่อการเก็บกลูโคสไว้ในรูปของไกลโคเจน (glycogenesis) ที่กล้ามเนื้อและตับ ยับยั้งการสลายไขมัน (lipolysis) ที่เซลล์ไขมัน และลดการสร้างกลูโคสขึ้นมาใหม่ (gluconeogenesis) ที่ตับ ทำให้การผลิตและส่งน้ำตาลกลูโคสออกสู่กระแสเลือดลดลง [30] อย่างไรก็ตามเมื่อเกิดภาวะดื้อต่ออินซูลินขึ้น ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการลดลงของตัวรับของอินซูลิน (downregulation of insulin receptor) หรือตัวรับจับกับอินซูลินได้ไม่ดี (defect in insulin binding to receptor) หรือตัวรับจับกับอินซูลินได้แต่ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ เป้าหมายเนื่องจากความผิดปกติในการส่งสัญญาณของอินซูลิน (impaired insulin signal transduction) จะส่งผลทำให้อินซูลินไม่สามารถออกฤทธิ์ควบคุมการทำงานของเซลล์ต่าง ๆ ในร่างกายได้ตามปกติ ดังนั้นมีผลทำให้เกิดภาวะน้ำตาลในเลือดสูง [4]

การศึกษาก่อนหน้านี้รายงานว่าภาวะเครียดออกซิเดชันและการเพิ่มขึ้นของ proinflammatory cytokine จากระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดสูงสามารถทำให้เกิดภาวะดื้อต่ออินซูลินที่ตับ [31] โดยพบมีการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับโปรตีน IRS-1 บนตำแหน่งของกรดอะมิโนเซอรีน (serine) หรือธรีโอนีน (threonine) มีผลทำให้การจับกันระหว่าง IRS-1 และ insulin receptor ลดลง และยับยั้งการ phosphorylation ของไทโรซีน (tyrosine) ซึ่งอยู่ใน IRS-1 ดังนั้นกระบวนการส่งสัญญาณของอินซูลินผ่าน PI3K/AKT pathway ถูกยับยั้งและอินซูลินไม่สามารถออกฤทธิ์ที่อวัยวะเป้าหมาย [32] สาเหตุของการเกิด phosphorylation ของ serine 307 ใน IRS-1 เป็นผลจากการทำงานของโปรตีน JNK [33] มีรายงานว่า tumor necrosis factor-alpha ($\text{TNF-}\alpha$) กระตุ้นการทำงานของ JNK และ pro-inflammatory cytokine

อื่น ๆ เช่น interleukin-1 และ 6 (IL-1 และ IL-6) ส่งผลยับยั้งการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับกรดอะมิโนไทโรซีน แต่ไปกระตุ้นการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับกรด อะมิโนเซอรีนบน IRS-1 และ IRS-2 แทน มีผลทำให้อินซูลินไม่สามารถส่งสัญญาณผ่านตัวรับของอินซูลิน [17]

การศึกษาของ Al-Attar และคณะ ในปี ค.ศ. 2017 ซึ่งศึกษาในโมเดลหนูเบาหวานที่เหนี่ยวนำด้วยสเตรปโตโซโทซิน พบการแสดงออกของ IR- α mRNA และ IRS-1 mRNA ลดลงในตับของหนูเบาหวาน [34] เช่นเดียวกับการศึกษาของ Jayachandran และคณะ ในปี ค.ศ. 2018 ที่พบระดับการแสดงออกของ IR mRNA, IRS-1 mRNA, IRS-2 mRNA, และ Akt mRNA ในเนื้อเยื่อตับของหนูเบาหวานที่เหนี่ยวนำด้วยสเตรปโตโซโทซินลดลง [35] นอกจากนี้การศึกษาของ Vinayagam และคณะ ในปี ค.ศ. 2018 ยังพบการแสดงออกของโปรตีน IR, IRS-1, IRS-2, PI3K และ p-AKT ลดลงในเนื้อเยื่อตับของหนูเบาหวานที่เหนี่ยวนำด้วยสเตรปโตโซโทซินด้วย [36] ยิ่งไปกว่านั้นการแสดงออกของโปรตีน nuclear factor kappa-B (NF- κ B) ซึ่งเป็น transcription factor ที่กระตุ้นการทำงานของ TNF- α และ pro-inflammatory cytokine ต่าง ๆ ยังพบเพิ่มขึ้นในตับ ซึ่งสอดคล้องกับการระดับการแสดงออกของโปรตีน IRS-1 (Ser307) ในเนื้อเยื่อตับ และระดับของ TNF- α และ IL-6 ที่พบเพิ่มขึ้นในหนูเบาหวาน มีผลทำให้เกิดภาวะดื้อต่ออินซูลิน [37] ผลการทดลองที่ผ่านมาสอดคล้องกับผลการศึกษาในงานวิจัยนี้พบว่าหนูเบาหวานที่เหนี่ยวนำด้วยสเตรปโตโซโทซินมีระดับการแสดงออกของโปรตีน IRS-1 (Ser307) ในตับเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งบ่งชี้ถึงความบกพร่องในการส่งสัญญาณการทำงานของอินซูลิน ทำให้ความสามารถของอินซูลินในการกระตุ้นเอนไซม์ไทโรซีนไคเนส (tyrosine kinase) และ downstream target ลดลง เป็นผลให้อินซูลินออก

ฤทธิ์ที่ตับเพื่อยับยั้งการสร้างน้ำตาล การสลายไกลโคเจน และการใช้น้ำตาลกลูโคสที่ตับลดลง อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาระดับการแสดงออกของโปรตีน insulin receptor- β (InR- β) ในตับของหนูเบาหวานจากงานวิจัยครั้งนี้พบว่าการแสดงออกโปรตีน InR- β ในตับของหนูเบาหวานเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติ ซึ่งอาจเป็นผลจากการ upregulation ของตัวรับอินซูลินจากภาวะอินซูลินในเลือดต่ำ (hypoinsulinemia) เพราะได้รับสารสเตรปโตโซโทซินซึ่งมีฤทธิ์ทำลายเบต้าเซลล์ ทำให้การสังเคราะห์และหลั่งของอินซูลินน้อยลง โดยผลการศึกษาที่สอดคล้องกับรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบ insulin receptor mRNA เพิ่มขึ้นในตับของหนูเบาหวานที่ได้รับการฉีดด้วยสเตรปโตโซโทซิน [38,39]

นอกจากนี้การศึกษารังนี้ยังพบว่าตับของหนูเบาหวานที่เหนี่ยวนำด้วยสเตรปโตโซโทซิน มีการแสดงออกของโปรตีน p-JNK (Thr183/Tyr185) เพิ่มขึ้น ซึ่งแสดงถึงสภาวะการทำงานของโปรตีน JNK โดยโปรตีน JNK มีหน้าที่ในการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ IRS-1 บนตำแหน่ง serine 307 ทำให้กลไกการออกฤทธิ์ของอินซูลินผ่าน IRS-1 ที่ตับไม่สามารถเกิดขึ้น [17] สิ่งสำคัญเมื่อหนูเบาหวานได้รับการป้อนด้วยชมพูทับทิมจันทร์ ขนาด 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัว เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบระดับการแสดงออกของโปรตีน InR- β ในตับลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูเบาหวานที่ไม่ได้รับการป้อนด้วยชมพูทับทิมจันทร์ ทั้งนี้อาจเนื่องจากสารออกฤทธิ์ทางเคมีที่สำคัญในชมพูทับทิมจันทร์มีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งของอินซูลินจากเบต้าเซลล์ ทำให้ไม่เกิดภาวะอินซูลินในเลือดต่ำ ดังนั้นฮอร์โมนอินซูลินจะไม่ไปกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของตัวรับอินซูลินที่ตับ นอกจากนี้ยังพบระดับการแสดงออกของโปรตีน IRS-1 (Ser307) และ p-JNK (Thr183/Tyr185) ในตับของหนูเบาหวานที่

ได้รับชมพูทับทิมจันทร์ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับหนูเบาหวาน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าชมพูทับทิมจันทร์สามารถช่วยทำให้การส่งสัญญาณของอินซูลินผ่านทาง IRS-1 ในตับของหนูเบาหวานดีขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากสารออกฤทธิ์ทางเคมีที่พบในชมพูทับทิมจันทร์ ได้แก่ phenol, flavonoid, chalcone, quercetin, และ anthocyanidin เป็นต้น [26,33,35,36] ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของคณะผู้วิจัยก่อนหน้านี้ที่พบว่าในชมพูทับทิมจันทร์มี phenol, flavonoid, quercetin, gallic acid และ anthocyanidin จำนวนมาก [27]

หลาย ๆ การศึกษารายงานว่า flavonoid ที่พบในพืชหลายชนิดสามารถลดภาวะดื้อต่ออินซูลินและเบาหวาน [40] และยังพบว่า flavonoid ที่สกัดจาก *Oxytropis falcata* มีฤทธิ์ลดการสร้างของ proinflammatory cytokine ได้แก่ TNF- α และ IL-6 ผ่านการยับยั้ง NF- κ B และการคุมการทำงานของ IRS-1/PI3-AKT pathway ส่งผลทำให้การแสดงออกของโปรตีน glucose transporter type 4 (GLUT-4) เพิ่มขึ้นในกล้ามเนื้อของหนูเบาหวาน [41] นอกจากนี้ quercetin ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการอักเสบพบว่าสามารถกระตุ้นการส่งสัญญาณการทำงานของอินซูลินในสมองของหนูเบาหวานที่เหนี่ยวนำด้วยสเตรปโทโซโทซิน โดยการเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน IRS-1, p-PI3K และ p-AKT [42] ยิ่งไปกว่านั้น anthocyanidin ในมันม่วงสามารถยับยั้งการกระตุ้น JNK โดยการลดการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน มีผลทำให้การออกฤทธิ์ของอินซูลินผ่าน IRS-1/PI3-AKT pathway ในตับของหนูอ้วนดีขึ้น [43] การศึกษาใน mouse macrophage พบว่า chalcone ที่สกัดมาจากชมพูทับทิมจันทร์สามารถยับยั้งการแสดงออกของ TNF- α mRNA และ IL-6 mRNA โดยการยับยั้งการทำงานของ NF- κ B ได้ [44] เช่นเดียวกับการศึกษาในหลอดทดลองของเซลล์ตับที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะดื้อ

ต่ออินซูลินด้วย TNF- α พบว่าสารสกัดชมพูทับทิมจันทร์กระตุ้นการสร้างไกลโคเจนและการใช้น้ำตาลที่ตับ สัมพันธ์กับการระดับการแสดงออกของโปรตีน p-JNK ที่ลดลง และการแสดงออกของโปรตีน IRS-1 (Tyr), PI3K, และ p-AKT ที่เพิ่มขึ้น [26,45] ดังนั้นผลการทดลองเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าสารออกฤทธิ์ทางเคมีที่สำคัญในชมพูทับทิมจันทร์น่าจะเสริมฤทธิ์กันในการช่วยทำให้การส่งสัญญาณของอินซูลินผ่าน IRS1 ดีขึ้น โดยการยับยั้งการทำงานของ JNK ในตับของหนูเบาหวานที่เหนี่ยวนำด้วยสเตรปโทโซโทซิน

5. สรุป

การ phosphorylation ของ serine 307 ใน IRS-1 มีผลยับยั้งการส่งสัญญาณของอินซูลินภายในเซลล์ และนำไปสู่ภาวะดื้อต่ออินซูลิน การให้ชมพูทับทิมจันทร์แก่หนูเบาหวานที่เหนี่ยวนำด้วยสเตรปโทโซโทซินสามารถช่วยลดภาวะดื้อต่ออินซูลินที่ตับ โดยการยับยั้งการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน และการทำงานของ JNK pathway มีผลทำให้การออกฤทธิ์ของอินซูลินผ่าน IRS1 ในตับดีขึ้น อย่างไรก็ตาม กลไกการออกฤทธิ์ของสารประกอบทางเคมีที่สำคัญในชมพูทับทิมจันทร์ต่อการทำงานของอินซูลินจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมในอนาคต

6. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากทุนงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนเรศวร ปีงบประมาณ 2560 (R2560B132)

7. References

- [1] Karuranga, S., Fernandes, J.d.R., Huang, Y. and Malanda, B. (Eds.), 2017, IDF Diabetes Atlas, 8th Ed., International Diabetes Fede

- ration, Brussels.
- [2] American Diabetes Association, 2009, Diagnosis and classification of diabetes mellitus, *Diab. Care* 32: 62-67.
 - [3] Forbes, J.M. and Cooper, M.E., 2013, Mechanisms of diabetic complications, *Physiol. Rev.* 93: 137-188.
 - [4] Wilcox, G., 2005, Insulin and insulin resistance, *Clin. Biochem. Rev.* 26: 19-39.
 - [5] Postic, C., Dentin, R. and Girard, J., 2004, Role of the liver in the control of carbohydrate and lipid homeostasis, *Diab. Metab.* 30: 398-408.
 - [6] Rui, L., 2014, Energy metabolism in the liver, *Compr. Physiol.* 4: 177-197.
 - [7] Edgerton, D.S., Kraft, G., Smith, M., Farmer, B., Williams, P.E., Coate, K.C., Printz, R.L., O'Brien, R.M. and Cherrington, A.D., 2017, Insulin's direct hepatic effect explains the inhibition of glucose production caused by insulin secretion, *JCI Insight* 2: 91863.
 - [8] Parveen, K., Khan, M.R., Mujeeb, M. and Siddiqui, W.A., 2010, Protective effects of Pycnogenol® on hyperglycemia-induced oxidative damage in the liver of type 2 diabetic rats, *Chem. Biol. Interact.* 186: 219-227.
 - [9] Trauner, M., Arrese, M. and Wagner, M., 2010, Fatty liver and lipotoxicity, *Biochim. Biophys. Acta* 1801: 299-310.
 - [10] Meshkani, R. and Adeli, K., 2009, Hepatic insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular disease, *Clin. Biochem.* 42: 1331-1346.
 - [11] Adiels, M., Taskinen, M.R. and Boren, J., 2008, Fatty liver, insulin resistance, and dyslipidemia, *Curr. Diab. Rep.* 8: 60-64.
 - [12] King, G.L. and Loeken, M.R., 2004, Hyperglycemia-induced oxidative stress in diabetic complications, *Histochem. Cell Biol.* 122: 333-338.
 - [13] Tomas, E., Lin, Y.S., Dagher, Z., Saha, A., Luo, Z., Ido, Y. and Ruderman, N.B., 2002, Hyperglycemia and insulin resistance: Possible mechanisms, *Ann. N Y Acad. Sci.* 967: 43-51.
 - [14] Buse, M.G., 2006, Hexosamines, insulin resistance, and the complications of diabetes: current status, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 290: 1-8.
 - [15] McClain, D.A. and Crook, E.D., 1996, Hexosamines and insulin resistance, *Diabetes* 45: 1003-1009.
 - [16] Shulman, G.I., 2000, Cellular mechanisms of insulin resistance, *J. Clin. Invest.* 106: 171-176.
 - [17] Aguirre, V., Uchida, T., Yenush, L., Davis, R. and Whitei, M.F., 2000, The c-Jun NH2-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser307, *J. Biol. Chem.* 275: 9047-9054.
 - [18] Yang, R. and Trevillyan, J.M., 2008, c-Jun N-terminal kinase pathways in diabetes, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40: 2702-2706.
 - [19] Khandaker, M.M. and Boyce, A.N., 2016,

- Growth, distribution and physiochemical properties of wax apple (*Syzygium samarangense*): A review, Aust. J. Crop Sci. 10: 1640-1648.
- [20] Kuo, Y.C., Yang, L.M. and Lin, L.C., 2004, Isolation and immunomodulatory effect of flavonoids from *Syzygium samarangense*, Plant. Med. 70: 1237-1239.
- [21] Nair, A.G.R., Krishnan, S., Ravikrishna, C. and Madhusudan, K.P., 1999, New and rare flavonol glycosides from leaves of *Syzygium samarangense*, Fitoterapia 70: 148-151.
- [22] Resurreccion-Magno, M.H., Villasenor, I.M., Harada, N. and Monde, K., 2005, Anti hyperglycaemic flavonoids from *Syzygium samarangense* (Blume) Merr. and Perry, Phytother. Res. 19: 246-251.
- [23] Khandaker, M.M., Boyce, A.N., Osman, N. and Hossain, A.S., 2012, Physiochemical and phytochemical properties of wax apple (*Syzygium samarangense* [Blume] Merrill & L. M. Perry var. Jambu Madu) as affected by growth regulator application, Sci. World J. 2012: 728613.
- [24] Srivastava, R., Shaw, A.K. and Kulshreshtha, D.K., 1995, Triterpenoids and chalcone from *Syzygium samarangense*, Phytochemistry 38: 687-689.
- [25] Shen, S.C. and Chang, W.C., 2013, Hypotriglyceridemic and hypoglycemic effects of vescalagin from Pink wax apple [*Syzygium samarangense* (Blume) Merrill and Perry cv. Pink] in high-fructose diet-induced diabetic rats, Food Chem. 136: 858-863.
- [26] Shen, S.C., Chang, W.C. and Chang, C.L., 2012, Fraction from Wax Apple [*Syzygium samarangense* (Blume) Merrill and Perry] Fruit extract ameliorates insulin resistance via modulating insulin signaling and inflammation pathway in tumor necrosis factor α -treated FL83B mouse hepatocytes, Int. J. Mol. Sci. 13: 8562-8577.
- [27] Khamchan, A., Paseephol, T. and Hanchang, W., 2018, Protective effect of wax apple [*Syzygium samarangense* (Blume) Merr. & L.M. Perry] against streptozotocin-induced pancreatic β -cell damage in diabetic rats, Biomed. Pharm. 108: 634-645.
- [28] Goyal, S.N., Reddy, N.M., Patil, K.R., Nakhate, K.T., Ojha, S., Patil, C.R. and Agrawal, Y.O., 2016, Challenges and issues with streptozotocin-induced diabetes: A clinically relevant animal model to understand the diabetes pathogenesis and evaluate therapeutics, Chem. Biol. Interact. 244: 49-63.
- [29] Lenzen, S., 2008, The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes, Diabetologia 51: 216-226.
- [30] Boucher, J., Kleinridders, A. and Kahn, C.R., 2014, Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states, Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 6(1): a009191.

- [31] Rains, J.L. and Jain, S.K., 2011, Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes, *Free Rad. Biol. Med.* 50: 567-575.
- [32] Boucher, J., Kleinriders, A. and Kahn, C.R., 2014, Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states, *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 6(1): a009191.
- [33] Zhou, J., Xu, G., Bai, Z., Li, K., Yan, J., Li, F., Ma, S., Xu, H. and Huang, K., 2015, Selenite exacerbates hepatic insulin resistance in mouse model of type 2 diabetes through oxidative stress-mediated JNK pathway, *Toxicol. Appl. Pharm.* 289: 409-418.
- [34] Al-Attar, A.M. and Alsalmi, F.A., 2017, Effect of *Olea europaea* leaves extract on streptozotocin induced diabetes in male albino rats, *Saudi. J. Biol. Sci.* 26: 118-128.
- [35] Jayachandran, M., Zhang, T., Ganesan, K., Xu, B. and Chung, S.S.M., 2018, Isoquercetin ameliorates hyperglycemia and regulates key enzymes of glucose metabolism via insulin signaling pathway in streptozotocin-induced diabetic rats, *Eur. J. Pharm.* 829: 112-120.
- [36] Vinayagam, R., Jayachandran, M., Chung, S.S.M. and Xu, B., 2018, Guava leaf inhibits hepatic gluconeogenesis and increases glycogen synthesis via AMPK/ACC signaling pathways in streptozotocin-induced diabetic rats, *Biomed Pharm.* 103: 1012-1017.
- [37] Wei, Y., Gao, J., Qin, L., Xu, Y., Wang, D., Shi, H., Xu, T. and Liu, T., 2017, Tanshinone I alleviates insulin resistance in type 2 diabetes mellitus rats through IRS-1 pathway, *Biomed Pharm.* 93: 352-358.
- [38] Kadowaki, T., Kasuga, M., Akanuma, Y., Ezaki, O. and Takaku, F., 1984, Decreased autophosphorylation of the insulin receptor-kinase in streptozotocin-diabetic rats, *J. Biol. Chem.* 259: 14208-14216.
- [39] Tozzo, E. and Desbuquois, B., 1992, Effects of STZ-induced diabetes and fasting on insulin receptor mRNA expression and insulin receptor gene transcription in rat liver, *Diabetes* 41: 1609.
- [40] Vinayagam, R. and Xu, B., 2015, Antidiabetic properties of dietary flavonoids: A cellular mechanism review, *Nutr. Metab. (Lond)*. 12: 60.
- [41] Yang, L., Wang, Z., Jiang, L., Sun, W., Fan, Q. and Liu, T., 2017, Total flavonoids extracted from *Oxytropis falcata* Bunge improve insulin resistance through regulation on the IKK β /NF- κ B inflammatory pathway, *Evid. Based Complementary Altern Med.* 2017: 2405124.
- [42] M., S.S. and C., D.N., 2017, Influence of quercetin, naringenin and berberine on glucose transporters and insulin signalling molecules in brain of streptozotocin-induced diabetic rats, *Biomed Pharma.* 94: 605-611.

- [43] Zhang, Z.F., Lu, J., Zheng, Y.L., Wu, D.M., Hu, B., Shan, Q., Cheng, W., Li, M.Q. and Sun, Y.Y., 2013, Purple sweet potato color attenuates hepatic insulin resistance via blocking oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in high-fat-diet-treated mice, *J. Nutr. Biochem.* 24: 1008-1018.
- [44] Kim, Y.J., Kim, H.C., Ko, H., Amor, E.C., Lee, J.W. and Yang, H.O., 2012, Inhibitory effects of aurentiacin from *Syzygium samarangense* on lipopolysaccharide-induced inflammatory response in mouse macrophages, *Food Chem. Toxicol.* 50: 1027-1035.
- [45] Shen, S.C., Chang, W.C. and Chang, C.L., 2013, An extract from wax apple [*Syzygium samarangense* (Blume) Merrill & Perry] effects glycogenesis and glycolysis pathways in tumor necrosis factor- α -treated FL83B mouse hepatocytes, *Nutrients* 5: 455-467.