HYPOGLYCEMIC EFFECT AND MECHANISMS OF ACTION OF EXTRACT FROM *ABUTILON INDICUM* SWEET

CHUTWADEE KRISANAPUN

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(BIOPHARMACEUTICAL SCIENCES)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2009

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

HYPOGLYCEMIC EFFECT AND MECHANISMS OF ACTION OF EXTRACT FROM *ABUTILON INDICUM* SWEET

CHUTWADEE KRISANAPUN 4636671 PYBS/D

Ph.D. (BIOPHARMACEUTICAL SCIENCES)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: PENCHOM PEUNGVICHA, PH.D. (BIOPHARMACEUTICAL SCIENCES), RUNGRAVI TEMSIRIRIRKKUL, M.S. (PHARMACY), SEUNG JOON BAEK, PH.D. (HUMAN GENETICS), AMPOL MITREVEJ, PH.D. (PHARMACEUTICS)

ABSTRACT

In this study, the hypoglycemic activity of *Abutilon indicum* Sweet was investigated. In oral glucose tolerance tests (OGTT), the aqueous crude extract of the whole plant of *A. indicum* Sweet at doses of 0.5 and 1 g/kg significantly reduced plasma glucose in moderately diabetic rats (FPG ~ 200-300 mg/dl) from 30 - 120 minutes of the study ($P<0.05$). In normal rats and severely diabetic rats (FPG > 300 mg/dl), the extract showed only some hypoglycemic effect but not significantly different from the untreated group. After repeated daily oral administration of the extract for 14 days in the moderately diabetic rats, plasma glucose after 2 hrs. fasting at day 7 and day 14 was significantly reduced ($P<0.05$) when compared with the control group.

To find out the mechanism of action, the inhibition of glucose absorption through the small intestine of mice was examined by the everted sac method. The result showed that the crude extract can inhibit glucose absorption in a dose dependent manner, and the maximum response showed at the concentration of 2.5 mg/ml. The promotion of the crude extract on insulin secretion was examined by incubating β-cell of pancreatic islets and INS-1E insulinoma cells with the extract at 1-1000 µg/ml. The crude extract showed significant increase in insulin secretion but did not show a concentration dependent manner.

The subsequent experiments examined the activity of the crude extract, water fraction, and butanol fraction in the improvement of insulin resistance. The results revealed that butanol fraction partition from crude extract bound to PPARγ and activated 3T3-L1 differentiation. Furthermore, the peripheral glucose consumption was also studied in rat diaphragms. The peripheral glucose uptake was 0.68 ± 0.18/10 mg dry weight in the control group, and increased to 1.08 ± 0.5/10 mg dry weight, and 1.13 ± 0.18/10 mg dry weight in the test groups at concentrations of 1 and 5 mg/ml, respectively ($P<0.05$, compared with the control group). The data indicated that the crude extract, and the fractions that were partitioned from the crude extract did not affect the activity of kinases involved in Akt and GSK-3β pathways; however, the reporter assay showed that the crude extract could activate glucose transporter 1 promoter activity.

In conclusion, this study provides the scientific data to support *A. indicum* Sweet for antidiabetes via PPARγ stimulation, enhancing insulin secretion, increasing peripheral glucose consumption through activated GLUT-1 promoter activity, and inhibition of glucose absorption.

The phytochemical screening revealed that the extract contained alkaloids, flavonoids, tannins, glycosides, and saponins - chemical compounds which could account for the observed pharmacological effects of the plant extract. Moreover, the acute toxicity test showed LD_{50} was more than 5 g/kg and did not affect liver cell proliferation.

KEY WORDS: *ABUTILON INDICUM* SWEET/HYPOGLYCEMIC EFFECT/ORAL GLUCOSE TOLERANCE TEST/INTESTINAL GLUCOSE ABSORPTION/INSULIN SECRETION/PPARγ/GLUT-1

146 pages

Copyright by Mahidol University

ฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือด และกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากครอบฟันสี

HYPOGLYCEMIC EFFECT AND MECHANISMS OF ACTION OF EXTRACT FROM *ABUTILON INDICUM* SWEET

ฉัตรวดี กฤษณพันธุ์ 4636671 PYBS/D

ปร.ด. (เภสัชศาสตร์ชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : เพ็ญโฉม พึ่งวิชา, Ph.D. (Biopharmaceutical Sciences), รุ่งระวี เต็มศิริฤกษ์กุล, M.S. (Pharmacy), Seung Joon Baek, Ph.D. (Human Genetics), อำพล ไมตรีเวช, Ph.D. (Pharmaceutics)

บทคัดย่อ

การศึกษาฤทธิ์ลดน้ำตาลในพลาสมาของสมุนไพรครอบฟันสีด้วยวิธี Oral glucose tolerance test (OGGT) พบว่า ในหนูเบาหวานระดับปานกลาง สารสกัดด้วยน้ำของสมุนไพรทั้งต้น (สารสกัดหยาบ) ในขนาด 0.5 และ 1 ก./กก. สามารถลดระดับน้ำตาลในพลาสมาได้แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนในหนูปกติ และหนูเบาหวานระดับรุนแรง พบว่าสารสกัดหยาบสามารถลดระดับน้ำตาลในพลาสมาเพียงเล็กน้อย (แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ) เมื่อป้อนสารสกัดสมุนไพรอย่างต่อเนื่องวันละครั้ง ทุกวัน นาน 14 วัน ในหนูเบาหวานระดับปานกลาง พบว่า ในวันที่ 7 และ 14 ของการป้อนสารสกัดน้ำตาลในพลาสมาหลังอาหาร 2 ชั่วโมงของกลุ่มที่ได้รับสารสกัดลดลงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัด พบว่าสารสกัดหยาบสามารถยับยั้งการดูดซึมของกลูโคสผ่านลำไส้เล็กเมื่อใช้วิธีกลับลำไส้ (everted sac) ของหนูถีบจักรได้ การยับยั้งการดูดซึมพบมากขึ้นแปรผันตามขนาดของสารสกัด และสารสกัดแสดงขนาดยาที่ทำให้เกิดการตอบสนองสูงสุดที่ 2.5 มก./มล. การศึกษาการกระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากเบต้าเซลล์ของตับอ่อนของหนูถีบจักร และในเซลล์มะเร็งชนิด INS-1E ที่สามารถหลั่งอินซูลิน พบว่า สารสกัดหยาบสามารถกระตุ้นการหลั่งอินซูลินได้อย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่แสดงผลการตอบสนองแบบแปรผันตรงกับความเข้มข้นของสารสกัด

การศึกษาฤทธิ์ในการช่วยเพิ่มการตอบสนองต่ออินซูลินของสารสกัดหยาบ และส่วนต่างๆที่แยกได้จากสารสกัด (ส่วนของชั้นน้ำ และส่วนของชั้นบิวทานอล) พบว่าส่วนของบิวทานอลซึ่งได้แยกได้จากสารสกัดหยาบแสดงฤทธิ์ในการจับกับ PPARγ และสามารถกระตุ้น 3T3-L1 differentiation การศึกษาการใช้กลูโคสของกล้ามเนื้อกระบังลม พบว่าการใช้กลูโคสของกลุ่มควบคุม เท่ากับ 0.68 ± 0.18/10 มก.ของกระบังลมแห้ง และการใช้กลูโคสเพิ่มเป็น 1.08 ± 0.5 และ 1.13 ± 0.18 มก./10 มก. ของกระบังลมแห้ง ในกลุ่มที่ใช้สารสกัดหยาบในขนาด 1 และ 5 มก./มล. ตามลำดับ ($P<0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม) นอกจากนี้ยังศึกษาพบว่าสารสกัดหยาบ และส่วนต่างๆที่สกัดแยกมาจากสารสกัดหยาบไม่มีผลต่อระดับ Akt และ GSK-3β ที่ได้รับการเติมฟอสเฟต อย่างไรก็ตาม สารสกัดหยาบแสดงผลในการกระตุ้น promoter ของ GLUT-1

โดยสรุป การศึกษานี้ให้ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์สนับสนุนการใช้สมุนไพรครอบฟันสีเพื่อต้านเบาหวาน โดยผ่านกลไกกระตุ้น PPARγ การกระตุ้นการหลั่งอินซูลิน การกระตุ้นการใช้กลูโคสของเซลล์ ผ่านทางการกระตุ้น promoter ของ GLUT-1 และยับยั้งการดูดซึมกลูโคสที่ลำไส้เล็ก

การตรวจสารสำคัญในพืชทางด้านเภสัชวินิจฉัย รวมทั้งจากการทบทวนวรรณกรรมพบว่ามี สารสกัดมีสารกลุ่มอัลคาลอยด์ ฟลาโวนอย แทนนิน ไกลโคไซด์ และซาโปนินซึ่งคาดว่าจะเป็นสารที่ทำให้สารสกัดมีฤทธิ์ต้านเบาหวาน การทดสอบพิษแบบเฉียบพลันพบว่าสารสกัดหยาบมี LD_{50} มากกว่า 5 ก./กก. และไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ตับ

146 หน้า

Copyright by Mahidol University