



อิทธิพลของสารสกัดเบตา-กลูแคนจากเห็ดนางฟ้าต่อเซลล์แมคโครฟาจชนิด

RAW264.7 และเซลล์กล้ามเนื้อชนิด L6

The Effect of β -Glucan-Containing Polysaccharide Extract from the Grey Oyster Mushroom [*P. sajor-caju* (Fr.) Sing] on RAW264.7 Macrophages and L6 Muscle Cells

ปิยธิดา จันทรมานันท์

Piyathida Jantaramanant

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

Master of Science in Biochemistry

Prince of Songkla University

2557

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ อิทธิพลของสารสกัดเบตา-กลูแคนจากเห็ดนางฟ้าต่อเซลล์แมคโครฟาจ
ชนิด RAW264.7 และเซลล์กล้ามเนื้อชนิด L6

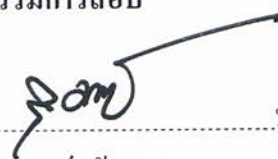
ผู้เขียน นางสาวปิยธิดา จันทรมานันท์

สาขาวิชา ชีวเคมี


อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก


(ดร.เดชา เสริมวิทย์วงศ์)

คณะกรรมการสอบ



..... ประธานกรรมการ
(ดร.กุสุมาลัย น้อยผา)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม


.....
(ศาสตราจารย์ ดร.รพีพรรณ วิทิตสุวรรณกุล)


..... กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร.รพีพรรณ วิทิตสุวรรณกุล)

.....
(ศาสตราจารย์ ดร.รพีพรรณ วิทิตสุวรรณกุล)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.นงพร โตวิณะ)


..... กรรมการ
(ดร.เดชา เสริมวิทย์วงศ์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีวเคมี

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้เป็นผลมาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และขอขอบคุณผู้ที่มีส่วน
เกี่ยวข้องทุกท่านไว้ ณ ที่นี้

ลงชื่อ Decha Sermitayong
(ดร.เดชา เสรมิวิทยวงศ์)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ ปิยธิดา จันทรมานันท์
(นางสาวปิยธิดา จันทรมานันท์)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน
และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ ปิยะธิดา จันทรมานันท์
(นางสาวปิยะธิดา จันทรมานันท์)
นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	อิทธิพลของสารสกัดเบตา-กลูแคนจากเห็ดนางฟ้าต่อเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 และเซลล์กล้ามเนื้อชนิด L6
ผู้เขียน	นางสาวปิยธิดา จันทรมานันท์
สาขาวิชา	ชีวเคมี
ปีการศึกษา	2556

บทคัดย่อ

เบตา-กลูแคนจากเห็ดสามารถกระตุ้นการทำงานของเซลล์ชนิดต่าง ๆ ในร่างกายโดยเฉพาะเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันให้ทำหน้าที่ได้ดีขึ้น รายงานการศึกษาต่าง ๆ ที่ผ่านมาพบว่า เบตา-กลูแคนสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์แมคโครฟาจผลิตไนตริกออกไซด์ได้ผ่านทางตัวรับที่จำเพาะบนผิวเซลล์ นอกจากนี้เบตา-กลูแคนจากเห็ดสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูได้ แต่กลไกของการกระตุ้นการนำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์โดยเบตา-กลูแคนยังต้องรอการศึกษาเพิ่มเติม ดังนั้นในการศึกษาคั้งนี้จึงได้ทำการทดสอบความสามารถของสารสกัดที่มีเบตา-กลูแคนที่แยกได้จากเห็ดนางฟ้า ในการกระตุ้นการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 และการกระตุ้นการนำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อชนิด L6 จากผลการทดลองพบว่า เบตา-กลูแคนชนิด alkaline insoluble β -glucan-containing crude extract และ purified soluble β -glucan ไม่สามารถกระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจให้ผลิตไนตริกออกไซด์ได้ และในส่วนของ β -glucan-containing polysaccharide extract จากเห็ดนางฟ้าที่ได้มาจากการสกัดโดยใช้น้ำร้อน และกำจัดโปรตีนบางส่วนออกโดย Sevag reagent อาจจะสามารถเหนี่ยวนำการสร้างไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 ได้แต่ผลการทดลองยังไม่ชัดเจนและต้องมีการทดลองเพิ่มเติม นอกจากนี้สารสกัดดังกล่าวสามารถกระตุ้นการนำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อชนิด L6 โดยการนำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์อาจเกิดขึ้นผ่านทางการทำงานของเอนไซม์ชนิด PI3K/Akt และ/หรือ p38 MAPK ซึ่งวิถีและกลไกของการกระตุ้นยังคงต้องศึกษาต่อไป

Thesis Title The Effect of β -Glucan-Containing Polysaccharide Extract from the Grey Oyster Mushroom [*P. sajor-caju* (Fr.) Sing] on RAW264.7 Macrophages and L6 Muscle Cells

Author Ms. Piyathida Jantaramanant

Major Program Biochemistry

Academic Year 2013

ABSTRACT

Fungal β -glucan can activate several cells in the body, especially cells in the immune system. Previous studies found that mushroom β -glucan binds to a specific receptor to induce nitric oxide production in mouse macrophages. Moreover, it was shown that mushroom β -glucan-containing extract potentially reduces blood glucose in mouse. However, the mechanism of how β -glucan stimulates cellular glucose uptake requires further investigation. In this study, we analyzed the effects of β -glucan-containing extract from the grey oyster mushroom [*Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Sing] on nitric oxide production in RAW264.7 cells and rat L6 myotubes. The results show that both insoluble β -glucan-containing crude extract and purified soluble β -glucan were not able to induce nitric oxide production in RAW264.7 cells. Additionally, β -glucan-containing polysaccharide extract, which was isolated by hot-water extraction method and protein removal by the Sevag reagent, might be able to induce nitric oxide production in RAW264.7 cells. However, the results remain unclear and additional experiments required. In addition, this polysaccharide extract stimulates the glucose uptake by the L6 muscle cells. The stimulation might be done through PI3K/Akt and/or p38 MAPK proteins. The mechanism and specific pathway of glucose uptake stimulated by β -glucan awaits future studies.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือและสนับสนุนจากบุคคลหลายฝ่าย ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูง ดังนี้

ดร.เดชา เสริมวิทยวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่คอยให้คำปรึกษาแนะนำการแก้ปัญหาต่าง ๆ ของงานวิจัย รวมไปถึงให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมา พร้อมทั้งให้ข้อเสนอแนะเพื่อปรับปรุงแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ศาสตราจารย์ ดร.รพีพรรณ วิทิตสุวรรณกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างเพื่อนำมาทดสอบในงานวิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร.นงพร โต้วัฒน์ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิในการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ข้อเสนอแนะเพื่อปรับปรุงแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ดร.กฤษฎามาลย์ น้อยผา ประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาและสละเวลาในการแนะนำการทำวิจัย

ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ ประจำปีการศึกษา 2555 จากบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

อาจารย์ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ทุกท่าน ที่ให้ความรู้ทางด้านวิชาการที่สามารถนำมาใช้ในการทำวิทยานิพนธ์

เจ้าหน้าที่ภาควิชาชีวเคมีและบัณฑิตวิทยาลัย ที่คอยช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกเกี่ยวกับเครื่องมือการทำวิจัยและเอกสารต่าง ๆ

เพื่อน ๆ พี่ ๆ น้อง ๆ ภาควิชาชีวเคมีที่คอยให้คำแนะนำ และช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ รวมไปถึงให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมา

สุดท้ายนี้ ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ น้องสาว ที่คอยให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจสำคัญให้กับผู้วิจัยมาโดยตลอด

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณทุกท่านมา ณ โอกาสนี้

ปิยธิดา จันทรมานันท์

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ.....	(8)
รายการตาราง.....	(9)
รายการภาพประกอบ.....	(10)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ.....	(12)
บทที่	
1. บทนำ.....	1
1.1 บทนำต้นเรื่อง.....	1
1.2 การตรวจเอกสาร.....	3
1.3 วัตถุประสงค์.....	21
2. วิธีการวิจัย.....	
2.1 วัสดุอุปกรณ์.....	22
2.2 รายการสารเคมี.....	23
2.3 วิธีการทดลอง.....	24
3. ผลการทดลอง.....	31
4. วิเคราะห์ผลการทดลอง.....	47
5. สรุปผลการทดลอง.....	54
เอกสารอ้างอิง.....	55
ภาคผนวก	
สำเนาผลงานตีพิมพ์ในวารสาร International Food Research Journal.....	68
ประวัติผู้เขียน.....	74

รายการตาราง

ตาราง	หน้า
1.1 เบตา-กลูแคนจากเห็ดชนิดต่าง ๆ.....	7
1.2 การจำแนกชนิดของ GLUT ตามตำแหน่งที่พบ.....	19
3.1 ปริมาณโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตที่ได้จากขั้นตอนการสกัด.....	37
4.1 ปริมาณเบตา-กลูแคน (%) อยู่ในส่วนละลายน้ำและส่วนที่ไม่ละลายน้ำ.....	48

รายการภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1.1 การจำแนกชนิดน้ำตาลกลูโคสตามตำแหน่งหมู่ OH	5
1.2 เปรียบเทียบโครงสร้างของน้ำตาลกลูโคสแบบ D กับ L isomer	6
1.3 โครงสร้างเบตา-กลูแคน	7
1.4 ตัวรับที่จำเพาะกับเบตา-กลูแคน	10
1.5 การทำงานของเซลล์แมคโครฟาจเมื่อถูกกระตุ้นด้วยพอลิแซ็กคาไรด์	11
1.6 กลไกการทำงานของเบตา-กลูแคนต่อระบบภูมิคุ้มกัน	12
1.7 กระบวนการดูดซึมน้ำตาลเข้าสู่เซลล์และกระแสเลือด	13
1.8 กลไกการทำงานของอินซูลิน	15
1.9 การนำน้ำตาลกลูโคสเข้าสู่เซลล์ผ่านทางตัวขนส่งชนิด GLUT1 และ GLUT4	16
1.10 กลไกการนำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ เมื่อเกิดการกระตุ้นผ่านทาง insulin receptor และ AMP-activated kinase	17
1.11 แผนภาพต้นไม้แสดงความเหมือนของ GLUT family	18
1.12 โครงสร้างสามมิติของอินซูลิน	20
2.1 ตำแหน่งการนับเซลล์บน hemacytometer	27
3.1 ทดสอบความเป็นพิษของ alkaline insoluble β -glucan-containing crude extract ต่อเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7	33
3.2 ผลของ alkaline insoluble β -glucan-containing crude extract ของเห็ดนางฟ้า ต่อเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7	33
3.3 ผลของ alkaline insoluble β -glucan-containing crude extract ของเห็ดนางฟ้า ที่ผ่านการล้างด้วย 1 M NaOH ต่อเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7	34
3.4 ผลของ alkaline insoluble β -glucan-containing crude extract ของเห็ดนางฟ้า ที่ผ่านการล้างด้วย 1 M NaOH เมื่อบ่มร่วมกับ LPS และไซโมซาน	34
3.5 ผลของส่วนที่เป็น supernatant ของ purified soluble β -glucan ที่ได้จากการปั่นแยก ตะกอนออกต่อเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7	36
3.6 ผลของ purified soluble β -glucan จากเห็ดนางฟ้าที่ผ่านการกรองต่อเซลล์แมคโครฟาจ ชนิด RAW264.7	36
3.7 ผลของ purified soluble β -glucan จากเห็ดนางฟ้าที่ผ่านการกรองต่อเซลล์แมคโครฟาจ ชนิด RAW264.7 เมื่อบ่มร่วมกับ LPS	37

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
3.8 ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FT-IR ของตัวอย่าง BPEG.....	39
3.9 ผลของ BPEG ต่อเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7.....	41
3.10 ผลของ BPEG เมื่อบ่มร่วมกับ LPS.....	41
3.11 ทดสอบประสิทธิภาพของ LPS.....	42
3.12 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์กล้ามเนื้อชนิด L6 ของสารสกัดแต่ละชนิด.....	43
3.13 ผลการทดสอบการนำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อชนิด L6.....	45
3.14 ผลของ BPEG BPEE และ laminarin ต่อเซลล์กล้ามเนื้อชนิด L6.....	45
3.15 ผลของ BPEG ต่อเซลล์กล้ามเนื้อชนิด L6.....	46
3.16 ผลการทดสอบ BPEG ร่วมกับตัวยับยั้งชนิดต่าง ๆ.....	46
4.1 การกระตุ้นการดูดซึมกลูโคสของ lipoic acid.....	52

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

Akt	protein kinase B
AMEM	alpha minimum essential medium
AMPK	5' adenosine monophosphate-activated protein kinase or 5' AMP-activated protein kinase
BPEE	β -glucan-containing polysaccharide extract from ear mushroom
BPEG	β -glucan-containing polysaccharide extract from grey oyster mushroom
CHX	cycloheximide (protein synthesis inhibitor)
com.C	compound C (AMPK inhibitor)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<i>et al.</i>	et ali (Latin) and others
FT-IR	fourier transform infrared spectroscopy
GLUT	glucose transporter
GSK	glycogen synthase kinase
HPLC	high-performance liquid chromatography
Ins	insulin
LPS	lipopolysaccharide
Met	metformin
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NO	nitric oxide
OD	optical density
PD	PD98059 (MEK1/2 inhibitor)
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
Rapa	rapamycin (mTOR inhibitor)
rpm	revolution per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SB	SB203580 (p38 MAPK inhibitor)
WM	wortmannin (PI3K inhibitor)
zym	zymosan

บทที่ 1

บทนำ

1.1 บทนำต้นเรื่อง

ปัจจุบันมีการศึกษาสารสกัดในเห็ดอย่างกว้างขวาง เนื่องจากสารสกัดจากเห็ดนั้นประกอบด้วย พอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) โปรตีน (protein) เลคติน (lectin) และโพลีฟีนอล (polyphenol) ซึ่งสารแต่ละชนิดทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาและมีผลในทางการแพทย์แตกต่างกันออกไป (Smiderle *et al.*, 2010) สำหรับพอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบในเห็ดโดยเฉพาะ เบตา-กลูแคน (β -glucans) เป็นโครงสร้างของผนังเซลล์ที่พบได้ในเห็ด ยีสต์ ข้าวโอ๊ต ข้าวบาร์เลย์และแบคทีเรียบางชนิด ตั้งแต่ศตวรรษที่ 21 เป็นต้นมา ผู้คนนิยมบริโภคอาหารและผลิตภัณฑ์จากแหล่งธรรมชาติ เนื่องจากมีความเป็นพิษต่ำและช่วยส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ดังนั้นเห็ดจึงถูกนำมาใช้เป็นอาหารและผลิตเป็นยา (Zhang *et al.*, 2011) ซึ่งมีประโยชน์ในการรักษาสุขภาพและส่งเสริมการมีอายุยืนยาว (Manzi and Pizzoferrato, 2000)

จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า องค์ประกอบในเห็ดที่เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่พบบริเวณฟรุตบอดี้ (fruit bodies) และไมซีเลียม (mycelium) มีโครงสร้างหลายแบบ เช่น (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6)- β -glucans และ (1 \rightarrow 3)- α -glucans ซึ่งพอลิแซ็กคาไรด์ดังกล่าวมีคุณสมบัติในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ต้านเซลล์มะเร็งและไวรัสได้ (Mizuno *et al.*, 1995) โดยเบตา-กลูแคนสามารถสกัดได้จากเห็ดหลายชนิด เช่น เห็ดหอม (*Lentinus edodes*) เห็ดไมตาเกะ (*Grifola frondosa*) เห็ดแครง (*Schizophyllum commune*) เป็นต้น โดยเฉพาะเลนตินัน (lentinan) ซึ่งเป็นเบตา-กลูแคนชนิดหนึ่งที่ได้จากเห็ดหอมถูกนำมาใช้ทดสอบในผู้ป่วยและสัตว์ทดลองที่เป็นมะเร็งพบว่า เมื่อให้เลนตินันควบคู่ไปกับการบำบัดทางเคมี ทำให้ผู้ป่วยและสัตว์ทดลองดังกล่าวมีอายุที่ยืนยาวขึ้น รวมไปถึงก้อนมะเร็งมีขนาดลดลง โดยทั้งหมดนี้เป็นผลมาจากการปรับปรุงของระบบภูมิคุ้มกันหลังได้รับการกระตุ้นจากเลนตินัน อย่างไรก็ตามพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากเห็ดนั้นไม่สามารถจับกับเซลล์มะเร็งได้โดยตรง แต่จะทำงานผ่านระบบภูมิคุ้มกัน (Wasser, 2002) นอกจากนี้เห็ดในสกุล *Pleurotus* เป็นอีกสายพันธุ์หนึ่งที่ประกอบด้วยพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีความสามารถทางด้านกระตุ้นเซลล์ภูมิคุ้มกัน ต้านอนุมูลอิสระและไวรัส (Croan, 2004; Kashangura *et al.*, 2006) โดยเฉพาะเบตา-กลูแคนที่แยกได้จากเห็ดนางฟ้าพบว่า สามารถ

กระตุ้นการสร้างไนตริกออกไซด์ (nitric oxide: NO) ในเซลล์แมคโครฟาจ (macrophages) ได้ (Carbonero *et al.*, 2012; Satitmanwivat *et al.*, 2012)

นอกจากฤทธิ์ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เบตา-กลูแคนยังมีความสามารถในการรักษาเบาหวานรวมไปถึงโรคที่เกี่ยวข้องกับหลอดเลือด (Chen and Raymond, 2008) การศึกษาที่ผ่านมานิยมใช้เบตา-กลูแคนจากข้าวโอ๊ตในการลดระดับน้ำตาล (Tappy *et al.*, 1996; Jenkins *et al.*, 2002) นอกจากนี้มีการศึกษาโดยใช้เบตา-กลูแคนจากข้าวโอ๊ตและเห็ดราในสัตว์ทดลอง เพื่อทดสอบถึงความสามารถในการลดระดับน้ำตาล (Lo *et al.*, 2006) และเมื่อไม่นานมานี้มีการศึกษาพบว่า เบตา-กลูแคนที่สกัดได้จากเห็ดนางฟ้าช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูที่ถูกทำให้เป็นเบาหวาน (Kanagasabapathy *et al.*, 2012)

ดังนั้นเบตา-กลูแคนจากเห็ดนางฟ้าจึงอาจมีผลต่อการกระตุ้นการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 และกระตุ้นการนำน้ำตาลสู่เซลล์กล้ามเนื้อชนิด L6 งานวิจัยนี้จึงได้เตรียมพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดนางฟ้าโดยการนำเห็ดมาสกัดด้วยน้ำร้อน เพื่อนำไปศึกษาองค์ประกอบ รวมทั้งทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวในช่วงแรกของวิทยานิพนธ์นี้ได้มุ่งเน้นศึกษาการทำงานของพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดนางฟ้าต่อเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 ในการกระตุ้นการผลิตไนตริกออกไซด์ ซึ่งผลการศึกษาไม่สามารถกระตุ้นให้เซลล์ผลิตไนตริกออกไซด์ได้ ผู้วิจัยจึงได้เปลี่ยนทิศทางการศึกษาโดยทดสอบกับเซลล์กล้ามเนื้อชนิด L6 เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการลดระดับน้ำตาลจากการกระตุ้นของพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดนางฟ้า

1.2 การตรวจเอกสาร

1.2.1 เห็ด

เห็ดจัดอยู่ในอาณาจักรฟังไจที่อุดมไปด้วยองค์ประกอบทางชีวภาพหลากหลาย ได้แก่ พอลิแซ็กคาไรด์ โปรตีน เลคติน และโพลีฟีนอล (Volman *et al.*, 2010) และเห็ดบางชนิดได้รับการยอมรับว่าเป็นอาหารที่รับประทานได้และเป็นประโยชน์ต่อร่างกายในแง่ของการรักษาโรค เนื่องจากมีโมเลกุลที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยเฉพาะองค์ประกอบที่เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่อยู่ในส่วนที่เป็นฟรุตโตโอลิโกแซ็กคาไรด์และไมซีเลียม ซึ่งพอลิแซ็กคาไรด์ดังกล่าวจะมีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกันออกไป ยกตัวอย่างเช่น เบตา-กลูแคนที่พบได้ในเห็ดหลายชนิดมีศักยภาพมากที่สุดในการเป็นสารต่อต้านมะเร็งและกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (Mizuno, 1996; Wasser, 2002) โดยเฉพาะเบตา-กลูแคนจากเห็ดหอมถูกนำมาใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็งมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1980

1) องค์ประกอบของเห็ด

โครงสร้างของเห็ดโดยทั่วไปประกอบด้วย เนื้อเยื่อ 3 ชั้น ชั้นนอกสุดประกอบไปด้วยกลูแคนที่ละลายน้ำได้ซึ่งมีลักษณะเป็นเมือก (mucilage) ส่วนที่สองเป็นเนื้อเยื่อที่ประกอบด้วย alkaline-soluble glucan (α -(1 \rightarrow 3)-glucan) และชั้นในสุดประกอบด้วยส่วนที่เป็น alkaline-insoluble glucan (β -(1 \rightarrow 3)-glucan) และไคติน (chitin) จำนวนมาก (Pramanik *et al.*, 2005) โดยพบว่าที่ผนังเซลล์ของเห็ดมีพอลิแซ็กคาไรด์อยู่ 50-90% ซึ่งส่วนใหญ่เป็นเบตา-กลูแคน นอกจากนี้เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดอื่น เช่น ไกลโคเจน (glycogen) ไคตินไซแลน (xylan) และเซลลูโลส (cellulose) (Synytsya *et al.*, 2009) และพบว่า ที่ผนังเซลล์ของเห็ดมีกลูแคนบางชนิดจับอยู่กับโปรตีนด้วยเฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และเซลลูโลส กลายเป็นโครงสร้างที่ซับซ้อน (Leung *et al.*, 2006) นอกจากนี้ Gutiérrez และคณะได้ทำการศึกษาเห็ดในสกุล *Pleurotus* พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากเห็ดทั้ง 6 ชนิด ประกอบไปด้วย มอนแซ็กคาไรด์ (monosaccharide) เป็นหลัก คิดเป็น 95% รวมทั้งมีสัดส่วนของ D-mannose และ D-galactose คิดเป็น 4.5 และ 0.5% ตามลำดับ โดยพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากเห็ดมีโครงสร้างที่หลากหลาย เช่น (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6)- β -glucan และ (1 \rightarrow 3)- α -glucans (Wasser, 2002) โดยเฉพาะโครงสร้างแบบ β -(1 \rightarrow 3) มีลักษณะเป็นสายหลักและมีโซ่ข้าง β -(1 \rightarrow 6) เป็นส่วนที่มีคุณสมบัติในการต้านมะเร็ง (antitumor) และส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกัน แต่หากเป็นเบตา-กลูแคนที่มีสายหลักเป็น β -(1 \rightarrow 6) จะไม่มีคุณสมบัติดังที่กล่าวมา (Mizuno, 1996)

สำหรับการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์มีหลายวิธี เช่น การใช้เอทานอลเข้มข้น การตกตะกอนด้วยกรดอะซิติก การทำบริสุทธิ์ด้วยวิธี ion-exchange chromatography เป็นต้น

(Wasser, 2002) นอกจากนี้ Mizuno และคณะ ได้พัฒนาขั้นตอนการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดให้มีประสิทธิภาพ เริ่มต้นด้วยใช้เอทานอล 80% สกัดส่วนฟรุตบอดี้ เพื่อกำจัดส่วนอื่นที่ไม่ใช่พอลิแซ็กคาไรด์ (พวกที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ) จากนั้นนำส่วนที่เหลือมาต้มด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และสกัดเพิ่มเติมด้วย ammonium oxalate (C₂H₈N₂O₄) 2% ที่ 100°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และ NaOH 5% ที่ 80°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ตามลำดับ (Mizuno *et al.*, 1996)

2) เห็ดนางฟ้า

เห็ดนางฟ้าหรือเห็ดแขก มีแหล่งกำเนิดจากเทือกเขาหิมาลัย ประเทศอินเดีย จัดเป็นเห็ดสกุลเดียวกับเห็ดเป่าฮื้อและเห็ดนางรม เจริญเติบโตได้ดีช่วงหน้าร้อน ประมาณเดือนเมษายน และเป็นเห็ดในสกุล *Pleurotus* ที่จัดว่าเป็นอาหารที่ส่งเสริมสุขภาพ เนื่องจากปริมาณแคลอรีต่ำ อุดมไปด้วย โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไคติน วิตามินและแร่ธาตุ (Manzi and Pizzoferrato, 1999; Bonatti *et al.*, 2004)

3) การจำแนกเห็ดนางฟ้า

ชื่อสามัญ: grey oyster mushroom

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singers

Subdivision Basidiomycotina

Class Hymenomycetes

Subclass Holobasidiomycetidae

Order Agaricales (Agarics)

Family Pleurotaceae

Genus *Pleurotus*

Specie *sajor-caju*

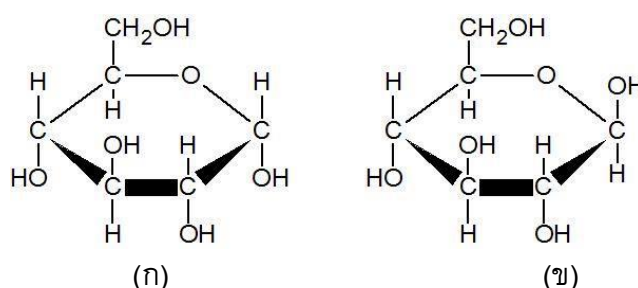
4) องค์ประกอบของเห็ดนางฟ้า

Gutiérrez และคณะ ได้ทำการวิเคราะห์ผลของส่วนที่เป็น water-soluble และส่วนที่เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ (extracellular polysaccharides) ของเห็ดในสกุล *Pleurotus* พบว่า ส่วนของเห็ดนางฟ้าที่เป็น water-soluble ซึ่งมี 15% ของทั้งหมด จะประกอบไปด้วย โปรตีน แมนแนน (mannan) กาแลกโทส (galactose) และกลูโคส (glucose) คิดเป็น 27, 31, 12 และ 30% ตามลำดับ และส่วนที่เป็นองค์ประกอบหลัก (พอลิแซ็กคาไรด์) ซึ่งมี 85% ของทั้งหมด จะประกอบด้วย แมนแนน และกลูโคส คิดเป็น 7 และ 93% ตามลำดับ (Gutiérrez *et al.*, 1996)

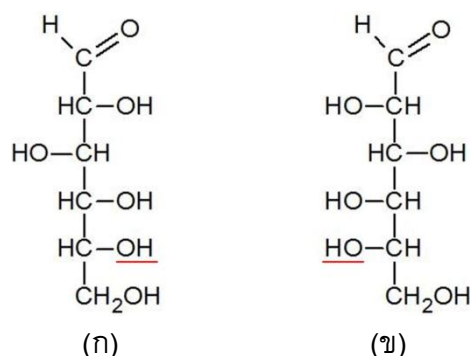
1.2.2 เบตา-กลูแคน

เป็นสารประกอบประเภทน้ำตาลหลายโมเลกุล (พอลิแซ็กคาไรด์) ซึ่งพบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดทั้งพืชและจุลินทรีย์ ได้แก่ ข้าวโอ๊ต ข้าวบาร์เลย์ เห็ด สาหร่าย แบคทีเรียและยีสต์ (Gawronski *et al.*, 1999) โดยประกอบขึ้นจากน้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และมีเซลลูโลส [β -(1 \rightarrow 4)-glucan] รวมอยู่ด้วย (Goodridge *et al.*, 2009)

เบตา-กลูแคนถูกค้นพบครั้งแรกจากไซโมซาน (zymosan) ซึ่งเป็นสารสกัดหยาบ (crude) ที่สกัดได้จากผนังเซลล์ของยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) ซึ่งทดสอบแล้วว่า มีฤทธิ์ในการเพิ่มภูมิคุ้มกัน ต่อต้านเชื้อชนิดต่าง ๆ แต่ไม่ทราบแน่ชัดว่าส่วนใดคือส่วนที่ออกฤทธิ์จนกระทั่งมีการสกัดเพิ่มเติมจนพบว่า ส่วนที่กระตุ้นภูมิคุ้มกัน คือ β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan ซึ่งเกิดจากน้ำตาลกลูโคสโมเลกุลเชิงเดี่ยวที่เป็นรูปร่างแหวนมาเชื่อมต่อกันโดยคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ของกลูโคสโมเลกุลที่ 1 จับกับกลูโคสตัวถัดไปในคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ด้วย glycoside linkage ส่วนเบตา (β) คือ ส่วนของ hydroxyl (OH) ที่ขึ้นด้านบนดังแสดงในภาพที่ 1.1 และสำหรับ D คือ หมู่ -OH ของคาร์บอนอะตอมตัวที่ 5 ของกลูโคส อยู่ทางขวามือ เป็นโครงสร้างแบบ D-isomer แต่ถ้า -OH อยู่ทางซ้ายมือ จะเป็นโครงสร้างแบบ L-isomer ซึ่งในธรรมชาติส่วนใหญ่จะมีโครงสร้างแบบ D-isomer (Malinow, 1996) ดังภาพที่ 1.2



ภาพที่ 1.1 การจำแนกชนิดน้ำตาลกลูโคสตามตำแหน่งหมู่ OH (ก) ตำแหน่ง OH ที่อยู่ด้านล่าง เรียกว่า α -D-glucose ส่วน (ข) ตำแหน่ง OH ที่อยู่ด้านบน เรียกว่า β -D-glucose



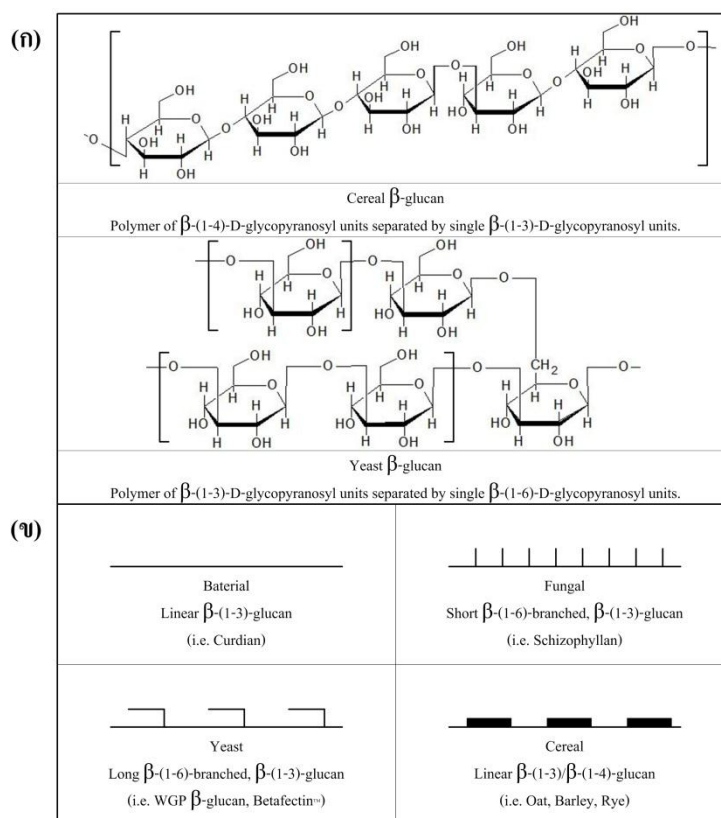
ภาพที่ 1.2 เปรียบเทียบโครงสร้างของน้ำตาลกลูโคสแบบ D กับ L isomer (ก) โครงสร้างแบบ D-isomer (ข) โครงสร้างแบบ L-isomer (Pischetsrieder, 2000)

1) โครงสร้างของเบตา-กลูแคน

เนื่องจากเบตา-กลูแคนเกิดจากน้ำตาลกลูโคสหลายโมเลกุลมาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond) โดยมีโซ่หลักเป็น β -(1 \rightarrow 3)-linked- β -D-glucopyranosyl ซึ่งอาจจะมีโครงสร้างต่างกันไป เช่น เป็นสายสั้นหรือยาว มีแขนงหรือไม่มีแขนง isomers เป็นแบบเบตา (β) ละลายน้ำได้หรือเป็นอนุภาค (ไม่ละลายน้ำ) เป็นต้น ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับแต่ละแหล่งผลิต ซึ่งจะมีโครงสร้างของเบตา-กลูแคนที่หลากหลายและมีชื่อเรียกแตกต่างกันออกไปตามตารางที่ 1 เช่น ผั้วเซลล์ของโอ๊ตและบาร์เลย์เป็นแบบไม่มีแขนง แต่เป็นเส้นตรงจากการเชื่อมต่อกันของ (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4)- β -glucan ส่วนในเห็ดราและยีสต์มีการเชื่อมต่อกันของ (1 \rightarrow 6), (1 \rightarrow 3)- β -glucan เป็นแขนง แต่สำหรับในแบคทีเรีย เช่น curdlan เป็นการเชื่อมต่อกันของ (1 \rightarrow 3)- β -glucan โดยไม่มีแขนง (Volman *et al.*, 2008) ดังภาพที่ 1.3 ซึ่งการที่มีโครงสร้างแตกต่างกันนี้มีผลต่อหน้าที่ทางชีวภาพแตกต่างกันไป และมีผลกับกิจกรรมของเบตา-กลูแคน ไม่ว่าจะเป็นความยาวของสายพอลิแซ็กคาไรด์ ความยาวของแขนงที่เชื่อมต่อ เป็นต้น (Ensley *et al.*, 1994; Yan *et al.*, 2005) ดังเช่นที่ผ่านมามีการค้นพบว่า เบตา-กลูแคนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่หรือเป็นอนุภาค เช่น โซโมซาน มีฤทธิ์กระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวให้มีการผลิตสารต่อต้านจุลินทรีย์ รวมไปถึงกระตุ้นการทำหน้าที่ที่กลืนกินเชื้อโรคของเม็ดเลือดขาว ในส่วนของเบตา-กลูแคนที่มีขนาดโมเลกุลต่ำ เช่น glucan phosphate มีฤทธิ์กระตุ้นในร่างกายได้ แต่การทดสอบกับเซลล์ยังไม่แน่ชัด ส่วนเบตา-กลูแคนสายสั้น ๆ เช่น laminarin (soluble β -glucan จาก *Laminaria digitata*) โดยทั่วไปไม่ออกฤทธิ์ (Akramiene *et al.*, 2007)

ตารางที่ 1.1 เบตา-กลูแคนจากเห็ดชนิดต่าง ๆ (Rop *et al.*, 2009)

ชนิดของเห็ด	ชื่อเบตา-กลูแคน
<i>Pleurotus spp.</i>	Pleuran
<i>Lentinus edodes</i>	Lentinan
<i>Schiophyllum commune</i>	Schizophylan
<i>Ganodema lucidum</i>	Gl-1
<i>Trametes versicolor</i>	Krestin
<i>Grifola fondosa</i>	Grifolan
<i>Flammulina velutipes</i>	Flammulin



ภาพที่ 1.3 โครงสร้างเบตา-กลูแคน (ก) การจับกันของเบตา-กลูแคน จากธัญพืช (cereal) (บน) มีโครงสร้างแบบ (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4)- β -glucan เป็นเส้นตรงไม่มีแขนง และจากยีสต์ (ล่าง) มีโครงสร้างแบบ (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6)- β -glucan ซึ่งเชื่อมต่อกันแบบมีแขนง (ข) โครงสร้างอย่างง่ายของเบตา-กลูแคนที่ได้จากแหล่งต่าง ๆ (Volman *et al.*, 2008)

2) ตัวรับ (receptors) ที่จำเพาะกับเบตา-กลูแคน

เนื่องจากเบตา-กลูแคนไม่ใช่สารที่สังเคราะห์ได้ในมนุษย์ ดังนั้นมันจึงถูกจดจำด้วยตัวรับที่จำเพาะกับเบตา-กลูแคน (Brown, 2005) อย่างเช่น เซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วยพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากพืชนั้น เป็นเพราะมันถูกจดจำด้วยตัวรับที่มีความจำเพาะกับพอลิแซ็กคาไรด์เหล่านั้น (pattern recognition molecules) (Schepetkin and Quinn, 2006) ซึ่งจนถึงปัจจุบันนี้พบว่า มีด้วยกัน 4 ชนิด ได้แก่ (1) Complement receptor 3 (CR3; CD11b/CD18) (2) Lactosylceramide (LacCer) (3) Selected scavenger receptor (Sc) และ (4) Dectin-1 (β -glucan receptor: β GR) (Akramiene *et al.*, 2007) และจากการทำงานผ่านตัวรับเหล่านี้ ส่งผลให้เกิดการส่งสัญญาณภายในเซลล์อย่างเป็นลำดับ (signaling cascades) เพื่อนำไปสู่การสังเคราะห์และผลิต pro-inflammatory cytokines

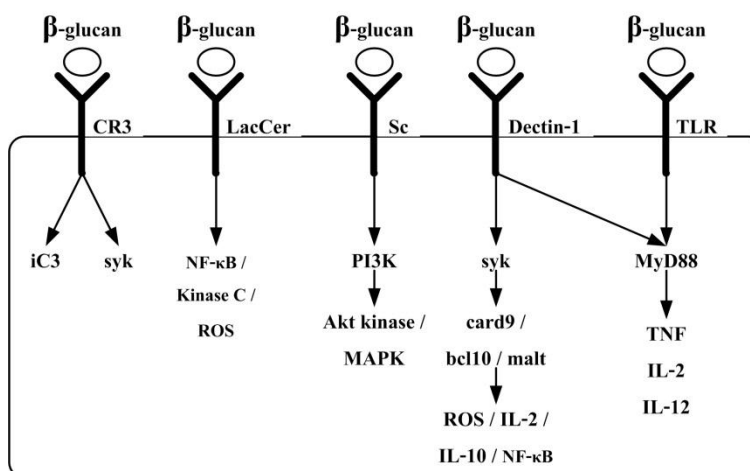
2.1) Complement receptor 3 (CR3) มีโครงสร้างเป็น heterodimeric transmembrane glycoprotein ที่ประกอบด้วย α_m (CD11b) และ β_2 (CD18) โดยมี binding 2 ชนิด คือ ส่วนที่เป็นปลายด้าน N-terminus (I domain) สามารถจดจำ ligands ได้หลายชนิด เช่น intercellular adhesion molecules (ICAMs), extracellular matrix protein และ iC3b opsonized particles เพื่อตอบสนองต่อการกลืนกิน (phagocytosis) และส่วนที่เป็นปลายด้าน C-terminus (lectin domain) ของ CD11b สามารถจับกับคาร์โบไฮเดรต ซึ่งรวมไปถึงเบตา-กลูแคน (Thornton *et al.*, 1996) ตัวรับชนิดนี้พบได้ในเซลล์ชนิดนิวโทรฟิล (neutrophils) โมโนไซต์ (monocytes) และ natural killer cells (NK) ส่วนในเซลล์แมคโครฟาจถือว่าพบน้อย นอกจากนี้มีหลักฐานที่พบว่า เบตา-กลูแคนสามารถกระตุ้นผ่านทาง CR3 นั่นคือ ไซโมซาน ในการเพิ่มจำนวนของ NK ผ่านทาง iC3b เพื่อทำลายเซลล์มะเร็ง (Vetvika and Yvin, 2004; Diniz *et al.*, 2004) นอกจากนี้มีรายงานการศึกษาระหว่างเบตา-กลูแคนกับ CR3 ครั้งแรกพบในเซลล์นิวโทรฟิล โดยกระตุ้นให้มีการสร้างสารที่เป็นพิษผ่านทางโมเลกุล spleen tyrosine kinase (Syk) ซึ่งเกี่ยวข้องกับ LacCer receptor ด้วย (Goodridge *et al.*, 2009) อย่างไรก็ตามกลไกระหว่างเบตา-กลูแคนกับ CR3 ก็ยังไม่ชัดเจนนัก

2.2) Dectin-1 เป็นเลคตินที่ประกอบด้วย 4 ส่วน ได้แก่ ส่วนที่จับกับ ligand ภายนอก คือส่วนที่เรียกว่า carbohydrate-recognition domain (CRD), stalk, transmembrane region และ intracellular cytoplasmic tail ซึ่งตัวรับชนิดนี้พบได้ในหลากหลายเซลล์ ได้แก่ แมคโครฟาจ นิวโทรฟิล dendritic cells (DC) และ T-cells แต่ไม่พบใน NK (Ross, 2000; Willment *et al.*, 2005) มีการค้นพบว่าตัวรับชนิดนี้สามารถจดจำและจับกับคาร์โบไฮเดรตชนิด β -(1 \rightarrow 3)/ β -(1 \rightarrow 6)-glucans (Ariizumi *et al.*, 2000; Marshall *et al.*, 2004) ที่พบได้จากแบคทีเรียและผนังเซลล์ของเห็ดราที่มีขนาดตั้งแต่ 3×10^{-3} ถึง 2×10^{-12} M (Goodridge *et al.*, 2009) การทำงานของตัวรับชนิดนี้ส่งเสริมการตอบสนองของภูมิคุ้มกันผ่านการกระตุ้นการ

กลืนกิน การผลิต reactive oxidation species (ROS) และสร้างไซโตไคน์ชนิดต่าง ๆ ซึ่งการทำงานผ่านทางตัวรับชนิดนี้อาจเกิดขึ้นได้หลายกลไก (pathway) และมีตัวส่งสัญญาณ (signaling molecules) หลายตัวที่เกี่ยวข้อง ดังที่ปรากฏในรายงานก่อนหน้า เช่น การกระตุ้นให้มีการผลิต ROS ซึ่งไม่เกี่ยวข้องกับการกลืนกิน เกิดขึ้นผ่าน tyrosine kinase ที่บริเวณ immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) ของ Dectin-1 นอกจากนี้ tyrosine kinase ยังกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์ tumor necrosis factor (TNF- α), interleukin (IL)-2, IL-10 และ IL-12 (Goodridge *et al.*, 2009) ส่วนการกระตุ้นโมเลกุล NF- κ B นั้นพบว่าผ่านทางกลไกของ caspase recruitment domain-containing protein 9 (CARD9) และ nuclear factor of activated T cells (NFAT) (Goodridge *et al.*, 2007; Gross *et al.*, 2006; Rogers *et al.*, 2005) โดยท้ายที่สุดจะนำไปสู่การหลั่งไซโตไคน์รวมถึง IL-12, IL-10, IL-6, TNF- α (Akramiene *et al.*, 2007) และการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า Dectin-1 มีการทำงานร่วมกับ Toll-like receptors (TLRs) ในการกระตุ้น NF- κ B เพื่อให้ไซโตไคน์ต่าง ๆ (TNF- α , MIP2 และ IL-6) ถูกสร้างขึ้น ซึ่งการทำงานร่วมกันระหว่าง Dectin-1 และ TLR นั้นจะไปเพิ่มการทำลาย I- κ B ทำให้ NF- κ B สามารถเคลื่อนที่ไปยังเป้าหมายได้ (Gantner *et al.*, 2003; Dennehy *et al.*, 2008) นอกจากนี้มีการศึกษาพบว่า TLR2 สามารถกระตุ้น NF- κ B transcription factors ให้ผลิต NF- κ B เพื่อสร้างไซโตไคน์ผ่านทางโปรตีนที่ชื่อว่า MyD88 อีกด้วย (Chen and Seviour, 2007)

2.3) Lactosylceramide (LacCer) มีโครงสร้างเป็น glycolipid ที่มีส่วนไม่ชอบน้ำเป็นลิพิด (lipid) และส่วนที่ชอบน้ำเป็นน้ำตาล โดยเป็นตัวรับที่มีความสามารถในการจดจำเซลล์จุลินทรีย์และเบตา-กลูแคนจากเห็ดรา (1 \rightarrow 3- β -glucans) สำหรับตัวรับชนิดนี้พบได้ในเซลล์นิวโทรฟิลและเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด (endothelial cells) (Zimmerman *et al.*, 1998) โดย β -(1 \rightarrow 3)-glucan ที่ได้จากผนังเซลล์ของราชนิดหนึ่งสามารถกระตุ้นเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด ผ่านทางตัวรับชนิดนี้ให้เพิ่มการสังเคราะห์ NF- κ B ผ่านทางกลไก protein kinase C signaling (Wang *et al.*, 2005; Evans *et al.*, 2005) สำหรับในนิวโทรฟิล การกระตุ้นผ่านตัวรับชนิดนี้เพื่อเพิ่มการสร้าง ROS ในการทำลายจุลินทรีย์แปลกปลอม (Iwabuchi and Nagaoka, 2002) แต่สำหรับการตอบสนองต่อเบตา-กลูแคนยังไม่ชัดเจนนัก

2.4) Scavenger receptor (Sc) มีโครงสร้างแบบ heterogeneous group ซึ่งสามารถจดจำเซลล์แปลกปลอมได้มากมาย เช่น low-density lipoprotein (LDL), high-density lipoprotein (HDL) (Assanasen *et al.*, 2005) และมีหลักฐานที่พบว่าเบตา-กลูแคนชนิดเลนติแนนสามารถจับกับตัวรับชนิดนี้ได้ (Rice *et al.*, 2002) สำหรับตัวรับชนิดนี้พบได้ในเซลล์ไมอีลอยด์ (myeloid) และเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด โดยการกระตุ้นผ่านตัวรับชนิดนี้สามารถส่งสัญญาณผ่านทางโปรตีนหลายชนิดได้แก่ Src kinase, PI3K, Akt รวมไปถึง p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) (Mineo and Shaul, 2003) ดังภาพที่ 1.4

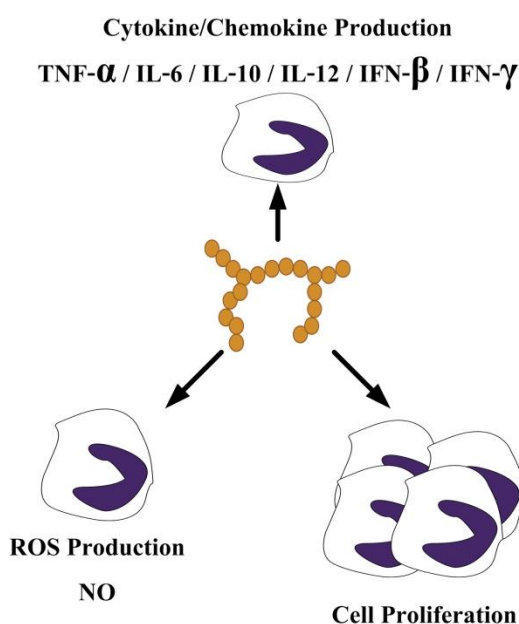


ภาพที่ 1.4 ตัวรับที่จำเพาะกับเบตา-กลูแคน ได้แก่ Dectin-1, Sc, CR3 และ LacCer ซึ่งมีกลไกการทำงานภายในเซลล์แตกต่างกันออกไป ขึ้นอยู่กับการจับกันระหว่างเบตา-กลูแคนกับตัวรับ เช่น เมื่อเบตา-กลูแคนเข้ามาจับกับ LacCer จะเหนี่ยวนำให้เซลล์แมคโครฟาจผลิต macrophage inflammatory protein 2 (MIP2) และกระตุ้นการเพิ่มขึ้นของ NF- κ B ได้ (Akramiene *et al.*, 2007)

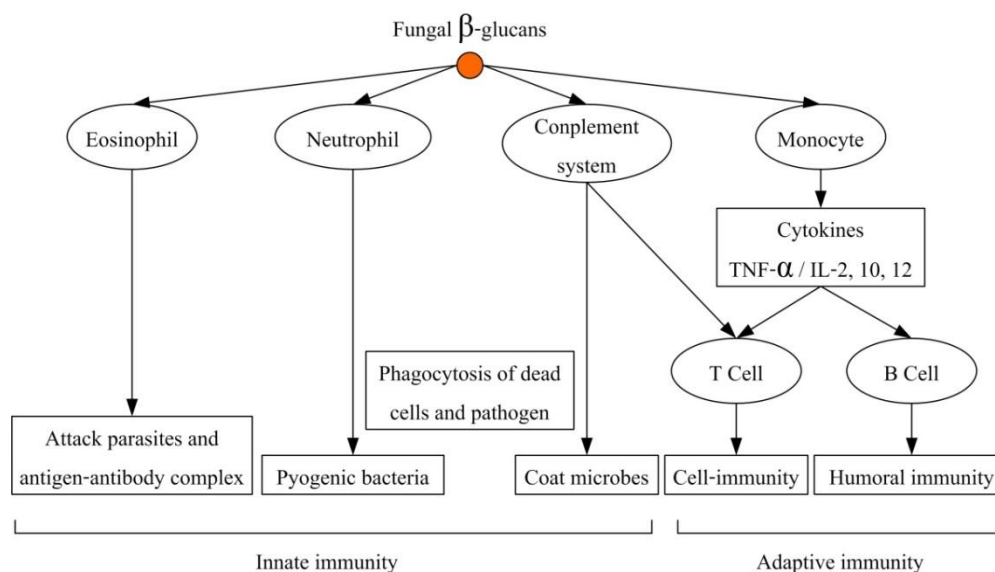
3) กลไกการทำงานของเบตา-กลูแคนต่อระบบภูมิคุ้มกัน

การตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันที่มีแต่กำเนิด (effects on the innate immune system) เป็นการตอบสนองแบบไม่จำเพาะเจาะจง ดังนั้นจึงสามารถทำลายเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมได้ทันที โดยเฉพาะเซลล์แมคโครฟาจซึ่งเป็นเซลล์ที่มีการทำหน้าที่หลากหลาย ได้แก่ การตรวจสอบสิ่งแปลกปลอม การหลั่งสารเคมีที่มีผลต่อเซลล์อื่นหรือมีผลต่อสิ่งแปลกปลอม รวมไปถึงการกลืนกินและการทำลาย ซึ่งมีการศึกษาโดยใช้พอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากพืชชนิดหนึ่งพบว่า มีผลต่อการทำหน้าที่ของเซลล์แมคโครฟาจ (Schepetkin and Quinn, 2006) ดังภาพที่ 1.5 ได้แก่ กระตุ้นการผลิตไซโตไคน์และสารต่าง ๆ เช่น IL, interferon (IFN), TNF- α , NO รวมถึงการเพิ่มจำนวนเซลล์ การที่ระบบภูมิคุ้มกันชนิดนี้จะถูกกระตุ้นด้วยเบตา-กลูแคนได้นั้น จะต้องมีการจับกันของเบตา-กลูแคนกับตัวรับจำเพาะจึงสามารถทำให้เกิดการตอบสนอง รวมไปถึงการหลั่งไซโตไคน์ คีโมไคน์ (chemokines), transcriptional factors และ growth factors (Akramiene *et al.*, 2007) ซึ่งการศึกษาเกี่ยวกับ เบตา-กลูแคนต่อระบบภูมิคุ้มกันชนิดนี้ที่ผ่านมามีพบว่า ไซโมซานและ microparticulate form of β -(1 \rightarrow 3)-glucans จาก *S. cerevisiae* (MG) มีความสามารถในการกระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจให้ผลิตไซโตไคน์ ซึ่งบางชนิดสามารถไปกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันที่มีภายหลัง (adaptive immunity) เช่น IL-2 และ IFN- α เพื่อกระตุ้นให้ T และ B cells ผลิตสารมาทำลายสิ่งแปลกปลอมหรือเพิ่มจำนวนเซลล์ในการเพิ่มประสิทธิภาพการทำลายเชื้อโรค (Chen and Seviour, 2007; Ladányi

et al., 1993; Kurashige *et al.*, 1997) ดังภาพที่ 1.5 และการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ไชโมซานสามารถกระตุ้นให้มีการผลิตไซโตไคน์ชนิด IL-2, IL-10 และ IL-12 (Du *et al.*, 2006; Brown, 2005) นอกจากนี้ SCG (เบตา-กลูแคนจาก *Sparassis cripa*) สามารถเพิ่มการผลิต IL-12, TNF และ IFN- α (Chen and Seviour, 2007) จากการศึกษาที่กล่าวมานี้แสดงให้เห็นว่าเบตา-กลูแคนมีความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้ ดังภาพที่ 1.6



ภาพที่ 1.5 การทำงานของเซลล์แมคโครฟาจเมื่อถูกกระตุ้นด้วยพอลิแซ็กคาไรด์ เมื่อพอลิแซ็กคาไรด์จับกับตัวรับที่อยู่บนเซลล์แมคโครฟาจ ส่งผลให้เกิดการผลิตไซโตไคน์ต่าง ๆ รวมไปถึงการหลั่งไซโตไคน์ชนิดที่ก่อให้เกิดการอักเสบ (TNF- α , IL-1) ที่มีผลทำลายสิ่งแปลกปลอมและการเพิ่มจำนวนของเซลล์แมคโครฟาจเพื่อประสิทธิภาพการทำงานที่มากขึ้น (Schepetkin and Quinn, 2006)



ภาพที่ 1.6 กลไกการทำงานของเบตา-กลูแคนต่อระบบภูมิคุ้มกัน เกิดได้ทั้งการตอบสนองที่มีมาแต่กำเนิดและการปรับตัวเพื่อตอบสนอง นอกจากนี้เบตา-กลูแคนยังช่วยเพิ่มการทำลายเซลล์ การทำงานแบบการกลืนกินและเพิ่มการหลั่งของไซโตไคน์อย่างเป็นลำดับ (Chen and Seviour, 2007)

4) เบตา-กลูแคนกับการลดระดับน้ำตาล

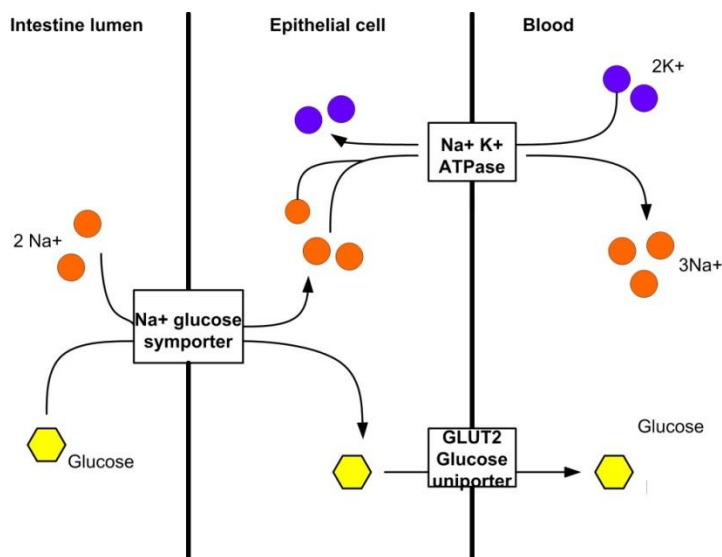
จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า เบตา-กลูแคนที่ได้จากข้าวโอ๊ต ซึ่งมีโครงสร้างเป็น β -(1 \rightarrow 3), β -(1 \rightarrow 4)-D-glucan สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ (Tappy *et al.*, 1996) แสดงให้เห็นถึงการออกฤทธิ์ของเบตา-กลูแคนนอกเหนือจากกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน และเมื่อไม่นานมานี้ยังมีการค้นพบว่า เบตา-กลูแคนจากเห็ดราที่มีความสามารถในการลดระดับน้ำตาลในเลือดของสัตว์ทดลองได้เช่นกัน (Lo *et al.*, 2006) อีกทั้งมีรายงานพบว่า ส่วนที่ละลายน้ำได้ของเบตา-กลูแคนชนิด grifolan สามารถเพิ่มการผลิตอินซูลินได้ถึง 25% แสดงให้เห็นว่ากลูแคนสามารถนำมาใช้รักษาโรคเบาหวานได้ (Adachi *et al.*, 1994; Manohar *et al.*, 2002) ซึ่งการที่เบตา-กลูแคนจากเห็ดรามีความสามารถในการลดระดับน้ำตาลในเลือดได้นั้น หลังจากที่ได้รับประทานอาหารเข้าไปเป็นไปได้อย่างไร อาหารอยู่ในกระเพาะเป็นเวลาหนึ่งทำให้น้ำตาลในอาหารค่อย ๆ ถูกดูดซึมมากขึ้น (Lo *et al.*, 2006)

การศึกษาที่ผ่านมายังไม่มีการทำให้เบตา-กลูแคนมีความบริสุทธิ์ ดังนั้นในการทดสอบแต่ละครั้งจึงเป็นเพียงแค่สารสกัดเห็ดเท่านั้น ซึ่งพบว่ามีความสามารถในการนำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ได้ เช่น สารสกัดเห็ดจาก *Phellinus baumii* สามารถต่อต้านภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำ (hypoglycemia) ในหนูที่เป็นเบาหวาน (Kiho *et al.*, 2000) แต่ถึงอย่างไรก็ตามการทดลองของ Kim และคณะพบว่า หากทำการย่อยด้วยเอนไซม์ endo beta-(1-6)-glucanase

จาก *Bacillus megaterium* จนได้เป็นไดแซ็กคาไรด์ (disaccharides) และไตรแซ็กคาไรด์ (trisaccharides) จะมีความสามารถในการต่อต้านเบาหวานได้เพิ่มมากขึ้น (Kim *et al.*, 2005) แสดงให้เห็นว่าโมเลกุลเล็กมีความสามารถมากกว่าโมเลกุลขนาดใหญ่

1.2.3 การดูดซึมกลูโคสเข้าสู่กระแสเลือด

บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีส่วนที่ไม่ชอบน้ำหันเข้าด้านใน (hydrophobic interior) ทำให้โมเลกุลขนาดเล็ก เช่น กลูโคส ไม่สามารถผ่านเข้าไปได้ ดังนั้นการดูดซึมกลูโคสเข้าสู่เซลล์จึงอาศัยการนำพาของโปรตีนที่สามารถละลายได้ในไขมันที่สามารถเคลื่อนผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ โดยการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่า การนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์มีด้วยกัน 2 กลไก คือ อาศัยโซเดียม (Na^+) เป็นตัวช่วยนำพาเข้าสู่เซลล์ (sodium-glucose cotransporter) และการแพร่ผ่านตัวขนส่งน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ (facilitative glucose transporter) (Mizock, 1995) ดังภาพที่ 1.7 เมื่อน้ำตาลถูกย่อยจนกลายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวนั้นคือกลูโคส ซึ่งยังคงอยู่ในส่วนของลำไส้ (intestinal lumen) โดยการขนส่งกลูโคสเข้าสู่เซลล์นั้นมีการพาโซเดียมเข้าไปในส่วนที่เป็นผนังลำไส้ (epithelial cell) โดยผ่านโปรตีนขนส่งที่เป็นการขนส่งแบบทิศทางเดียวกันและเกิดขึ้นพร้อมกัน (symport transport protein) จากนั้นจึงถูกส่งต่อเข้าสู่กระแสเลือดผ่านทางประตูของโปรตีนขนส่งกลูโคส (glucose uniporter protein) และเกิดการแลกเปลี่ยนระหว่างโซเดียมและโพแทสเซียม (K^+) เกิดขึ้นไปพร้อม ๆ กัน



ภาพที่ 1.7 กระบวนการดูดซึมน้ำตาลเข้าสู่เซลล์และกระแสเลือด โดยกลูโคสจะถูกขนส่งผ่านเข้าไปที่ผนังลำไส้พร้อมกับโซเดียม 2 โมเลกุล ผ่านทาง Na^+ glucose symporter จากนั้นกลูโคสจะถูกขนส่งเข้าสู่กระแสเลือดผ่านทางตัวขนส่งน้ำตาลชนิด GLUT2 พร้อมกับเกิดการแลกเปลี่ยนระหว่างโซเดียม และโพแทสเซียมไปพร้อมกันด้วย (Wright, 1993)

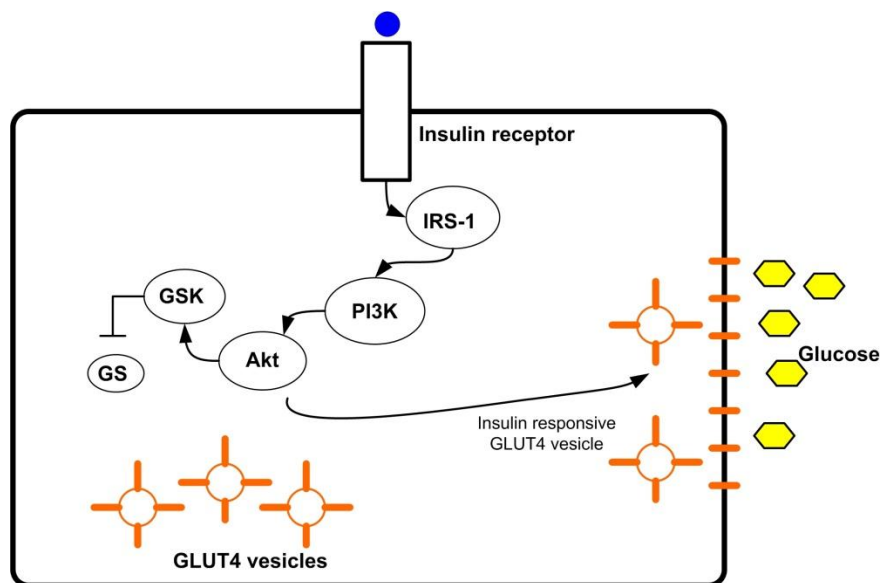
1.2.4 การนำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ (glucose uptake)

โดยปกติแล้วเมื่อมีน้ำตาลเข้าสู่กระแสเลือด ยิ่งโดยเฉพาะหลังรับประทานอาหารเสร็จ ระดับน้ำตาลในกระแสเลือดจะเพิ่มมากขึ้น ร่างกายจะสร้างกลไกเพื่อกระตุ้นให้น้ำตาลในกระแสเลือดถูกนำมาเก็บไว้ที่ตับรวมไปถึงเนื้อเยื่ออื่น ๆ เกิดเป็นกระบวนการสร้างไกลโคเจน (glycogenesis) ทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดลดลงอยู่ในระดับปกติ สำหรับเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อนั้น อินซูลิน การออกกำลังกาย และภาวะขาดออกซิเจน จะเป็นตัวกระตุ้นให้มีการดูดซึมกลูโคสผ่านทาง GLUT4 มากขึ้น (Ojuka *et al.*, 2002)

1) การนำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์แบบอาศัยอินซูลิน (insulin dependent glucose uptake)

เป็นการนำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ ได้แก่ เซลล์กล้ามเนื้อ และเซลล์ไขมัน ผ่านตัวรับน้ำตาลชนิด GLUT4 ที่เกิดจากการกระตุ้นผ่านอินซูลิน โดยเมื่อระดับน้ำตาลในเลือดสูง อินซูลินจะถูกหลั่งออกมาเพื่อทำหน้าที่รักษาสมดุล โดยเมื่ออินซูลินจับกับตัวรับจำเพาะ (insulin receptors) ที่อยู่บนผิวเซลล์เกิดการส่งสัญญาณให้ insulin receptor substrate-1 (IRS-1) จากนั้นส่งสัญญาณให้กับ PI3K ทำหน้าที่กระตุ้น Akt ตามลำดับ ให้มีการเติมหมู่ฟอสเฟสให้กับ GSK ทำให้ GSK หยุดการทำงาน นั่นคือไม่สามารถเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ glycogen synthase (GS) ได้ ส่งผลให้มีการสังเคราะห์ไกลโคเจนมากขึ้น อีกทั้ง PKB/Akt ยังช่วยให้เกิดการหลอม (fusion) ของ GLUT4 vesicle ส่งผลให้ที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ มีจำนวนของ GLUT4 เพิ่มขึ้นเพื่อเร่งให้มีการขนส่งกลูโคสสู่เซลล์แสดงในภาพที่ 1.8 (Fang *et al.*, 2000; McManus *et al.*, 2005) นอกจากนี้กระบวนการสังเคราะห์ไกลโคเจนในตับที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนอินซูลินนั้น เกิดขึ้นโดยที่กลูโคสเข้าสู่เซลล์ผ่านทาง GLUT2 ที่พบเฉพาะในเซลล์ตับและเบตาเซลล์ในตับอ่อน และเมื่อกลูโคสถูกเปลี่ยนเป็น glucose 6-phosphate โดยเอนไซม์ glucokinase จะเข้าสู่วิถีของ glycolysis และ glycogenesis ต่อไปเช่นกัน

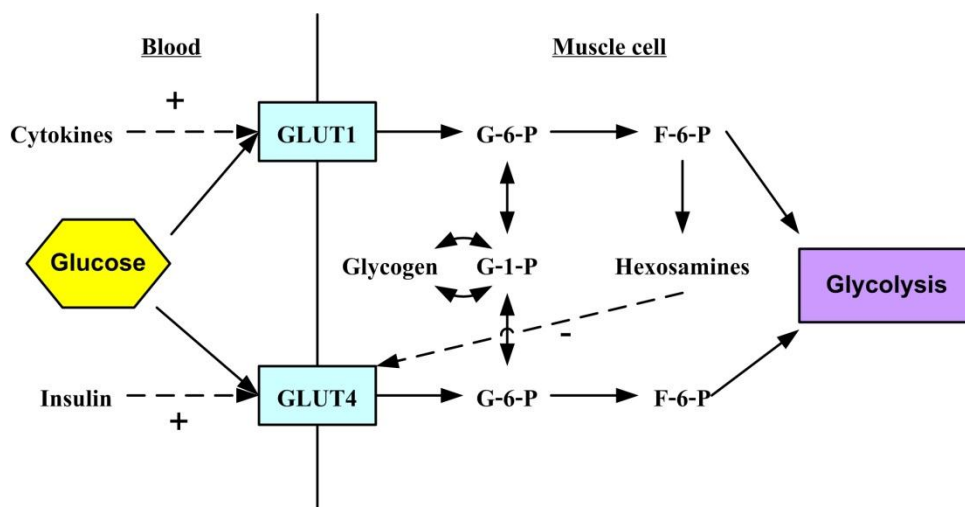
สำหรับ PI3K/Akt พบว่า มีความสำคัญต่อการเพิ่มการทำหน้าที่ของ GLUT4 โดยเฉพาะองค์ประกอบย่อยชนิด p110 α ที่กระตุ้นการโยกย้ายของ GLUT4 เพื่อเพิ่มการดูดซึมน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ (Chen and Raymond, 2008) อย่างไรก็ตามในส่วนของกล้ามเนื้อ การดูดซึมน้ำตาลเข้าเซลล์ผ่านทาง GLUT4 โดยการกระตุ้นของอินซูลินนั้น กลไกการกระตุ้นการทำงานของ GLUT4 อาจเกิดขึ้นจากปัจจัยอื่น เช่น แคลเซียม (Ca^{2+}), ROS, NO และ AMPK (Merry and McConell, 2009)



ภาพที่ 1.8 กลไกการทำงานของอินซูลิน เมื่ออินซูลินเข้าจับกับ insulin receptor ส่วนที่อยู่นอกเซลล์ (extracellular alpha) จะไปกระตุ้นโมเลกุลภายในเซลล์ชนิด tyrosine kinase หลังจากนั้น insulin receptor substrate family (IRS1-4) จึงถูกกระตุ้นตามลำดับ ซึ่ง IRS-proteins ดังกล่าวไปกระตุ้นวิถีการทำงานของกลไก PI3K/Akt ให้เกิดการส่งสัญญาณต่าง ๆ ภายในเซลล์ ซึ่งนำไปสู่กระบวนการ apoptosis, cell growth รวมไปถึงควบคุมการทำงานของ GLUT4 ให้เกิดการโยกย้ายตำแหน่งมาอยู่บริเวณผิวเซลล์เพื่อทำหน้าที่ในการดูดซึมน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ (Torres-Leal *et al.*, 2009)

2) การนำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์แบบไม่อาศัยอินซูลิน (insulin independent glucose uptake)

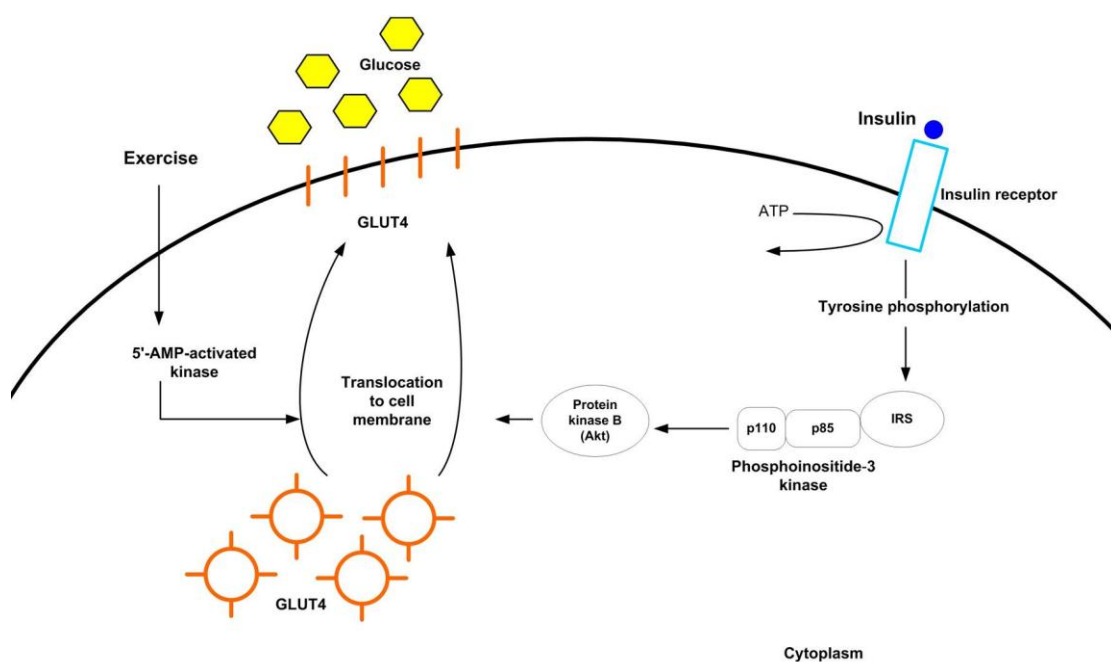
เป็นการนำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ผ่านตัวรับบนเซลล์โดยอาศัยการแพร่ของความเข้มข้นของกลูโคสจากความเข้มข้นสูงไปต่ำ (facilitated transport) ผ่านตัวรับชนิด GLUT1 ซึ่งมีจำนวนมากอยู่แล้วบนผิวเซลล์ ดังนั้นจึงไม่ต้องการกระตุ้นของอินซูลิน แต่เกิดจากการกระตุ้นของไซโตไคน์ที่หลั่งมาจากเซลล์ ซึ่งได้แก่ $\text{TNF-}\alpha$ หรือ IL-1 สำหรับกลไกการทำงานเป็นดังภาพที่ 1.9 จะเห็นได้ว่า ไซโตไคน์จะเป็นตัวส่งเสริมการทำงานให้กับ GLUT1 แต่กีดการทำงานของ GLUT4 และสำหรับการดูดซึมน้ำตาลในลักษณะนี้เกิดขึ้นได้ในกรณีที่ร่างกายมีการต่อต้านอินซูลิน เช่น โรคอ้วน (obesity) การอักเสบ (inflammation) และภาวะน้ำตาลในเลือดสูง (hyperglycemia) (Ebeling *et al.*, 1998)



ภาพที่ 1.9 การนำน้ำตาลกลูโคสเข้าสู่เซลล์ผ่านทางตัวขนส่งชนิด GLUT1 (insulin-independent) และ GLUT4 (insulin-dependent) เมื่อกลูโคสถูกดูดซึมผ่านเข้าทาง GLUT1 จะเกิดการสลายจาก glucose-6-phosphate (G-6-P) เป็น fructose-6-phosphate (F-6-P) จนกระทั่งได้เป็น hexosamines ที่สามารถลดการทำงานของ GLUT4 ส่งผลให้การนำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ผ่านการกระตุ้นของอินซูลินลดลงตามเช่นกัน (Ebeling *et al.*, 1998)

แต่ในกรณีที่มีการดูดซึมกลูโคสผ่านทาง GLUT4 โดยไม่ผ่านการกระตุ้นของอินซูลินนั้น มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับการกระตุ้น AMPK ด้วยเช่นกัน กล่าวคือ เป็นที่ทราบอยู่แล้วว่า กลูโคสเป็นแหล่งที่ให้พลังงานต่อร่างกาย ซึ่งนั่นหมายถึงรวมถึงเซลล์เช่นกัน เมื่อภายในเซลล์มีพลังงานลดลง (อัตราส่วนระหว่าง ATP:AMP ลดลง) เซลล์จึงต้องการพลังงานเพิ่ม โดยปริมาณที่เพิ่มขึ้นของ AMP จะไปกระตุ้น AMPK ได้ ซึ่ง AMPK จัดเป็นตัวที่สามารถวัดระดับพลังงานในเซลล์ เนื่องจากมีความรับรู้ได้ถึงพลังงานที่ลดต่ำลง และสามารถควบคุมโมเลกุลต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องเพื่อรักษาระดับพลังงาน (Holmes and Dohm, 2004) โดยจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า AMPK จะไปกระตุ้น transcription factors ชนิด myocyte enhancer factor 2 (MEF2) และ GLUT4 enhancer factor (GEF) ให้มีการสังเคราะห์ GLUT4 เพิ่มขึ้น และจากการทดลองของ Liu และคณะ ที่ทดสอบ APS ซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดจาก *Astragalus membranaceus* ต่อเซลล์กล้ามเนื้อชนิด L6 เพื่อศึกษากลไกการดูดซึมกลูโคสเข้าสู่เซลล์ แสดงให้เห็นถึงการกระตุ้นของ APS ผ่านทาง AMPK และนำไปสู่การกระตุ้นโมเลกุล Akt (AS160) หรือกลไกของ AMP-AMPK-AS160 (Liu *et al.*, 2012)

จากที่กล่าวมาทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่า การที่ Akt ถูกกระตุ้นจนกระทั่งส่งผลให้ GLUT4 สามารถเคลื่อนย้ายมาบนผิวเซลล์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการดูดซึมกลูโคสได้นั้น เกิดจากการกระตุ้นโดยอินซูลินผ่านตัวรับ IRS และการกระตุ้นผ่านทาง AMPK ดังแสดงในภาพที่ 1.10



ภาพที่ 1.10 กลไกการนำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ เมื่อเกิดการกระตุ้นผ่านทาง insulin receptor และ AMP-activated kinase ซึ่งการทำงานทั้งสองชนิดนี้ท้ายที่สุดจะนำไปสู่การเพิ่มปริมาณของ GLUT4 (Epstein *et al.*, 1999)

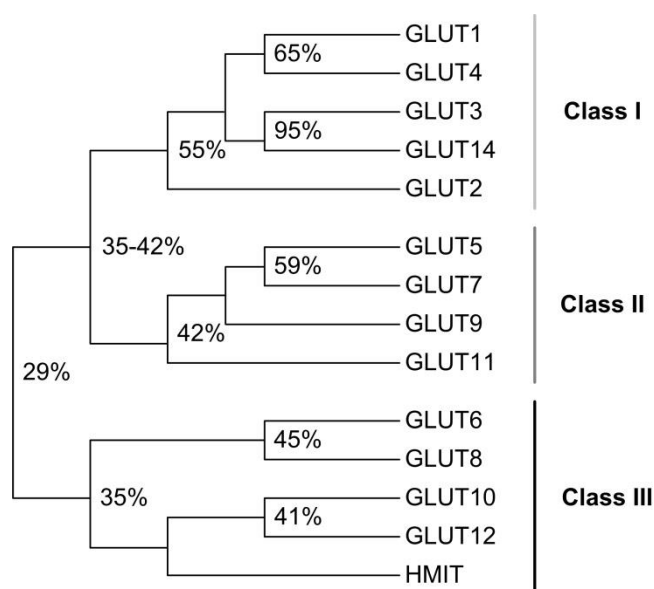
จากการทดลองของ Ho และคณะ พบว่า p38 γ MAPK ช่วยเพิ่มการดูดซึมน้ำตาลของเซลล์กล้ามเนื้อชนิด L6 แต่ลดการทำงานของ 2,4-dinitrophenol (DNP) ซึ่งเป็นตัวที่ทำงานผ่านกลไกที่ไม่เกี่ยวข้องกับอินซูลิน (Ho *et al.*, 2004) โดย DNP เป็นสารประกอบที่ทำให้การสังเคราะห์ ATP ลดลง (Terada, 1990) ในส่วนของการศึกษาของ Huang และคณะ พบว่า อินซูลินเป็นตัวกระตุ้นให้มีการเติมฟอสเฟตให้กับ Akt1 ซึ่งมีผลต่อการเคลื่อนที่ของ GLUT4 ไปยังผิวเซลล์ ซึ่งทั้งหมดเป็นการทำงานผ่านทาง IRS-1 และในขณะที่ IRS-2 เป็นตัวส่งสัญญาณให้กับ ERK, Akt2 และ p38 MAPK (Huang *et al.*, 2005) ที่กล่าวมานี้แสดงให้เห็นว่าการดูดซึมกลูโคสของเซลล์กล้ามเนื้อชนิด L6 นั้น เกี่ยวข้องกับอินซูลิน

สำหรับกลไกการทำงานผ่านการกระตุ้น PI3K/Akt ดังกล่าวพบว่า หากการทำงานของ PI3K/Akt ลดลง จะทำให้เกิดโรคเบาหวานได้มากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามเบตา-กลูแคนได้แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการเพิ่มการทำงานของ PI3K/Akt ผ่านทางตัวรับชนิดต่าง ๆ

(Chen and Seviour, 2007) ซึ่งจากการทดลองพบว่า ไซโมซานและสารสกัดจากเห็ดสามารถกระตุ้นกลไก PI3K/Akt ผ่านการกระตุ้น Syk kinase ซึ่งแสดงให้เห็นว่า มันทำงานผ่านทางตัวรับชนิด Dectin-1 นอกจากนี้เบตา-กลูแคนชนิดเลนติแนนทำงานผ่านตัวรับชนิด scavenger receptor และไปกระตุ้นกลไก PI3K/Akt ผ่านทาง Src tyrosine kinase (Rice *et al.*, 2002) ซึ่งนอกจากตัวรับของเบตา-กลูแคนส่วนใหญ่ที่พบในเซลล์ชนิดโมโนไซต์ แมคโครฟาจ นิวโทรฟิล อีโอซิโนฟิล (eosinophils) และ NK แล้ว ยังพบในเซลล์อื่นที่ไม่ใช่เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ เซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด เซลล์บุถุงลมปอด (alveolar epithelial cells) และไฟโบรบลาสต์ (fibroblasts) (Brown and Gordon, 2003) แต่อย่างไรก็ตามการทำงานของเบตา-กลูแคนต่อเซลล์กล้ามเนื้อชนิด L6 ในการกระตุ้นการนำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ยังไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นการทำงานผ่านตัวรับชนิดใดบนผิวเซลล์ซึ่งต้องศึกษาต่อไป

1.2.5 ตัวขนส่งน้ำตาล (glucose transporter facilitators หรือ GLUT family)

ในยีนของมนุษย์มีอยู่ด้วยกัน 14 ชนิด และยังแบ่งออกเป็น 3 subfamilies ตามลำดับ (sequence) ที่คล้ายคลึงกัน ดังภาพที่ 1.11 และสามารถจำแนกออกเป็น isoform ตามอวัยวะหรือเซลล์ที่พบดังในตารางที่ 1.2



ภาพที่ 1.11 แผนภาพต้นไม้แสดงความเหมือนของ GLUT family จากการวิเคราะห์ด้วย clustal program (Scheepers *et al.*, 2004)

ตารางที่ 1.2 การจำแนกชนิดของ GLUT ตามตำแหน่งที่พบ ดัดแปลงจาก Scheepers และคณะ (Scheepers *et al.*, 2004)

isoform	main expression
GLUT1	erythrocytes, brain (blood-brain barrier)
GLUT2	liver, islet cells, kidney, small intestine
GLUT3	brain (neuronal), testis
GLUT4	adipocytes, muscle
GLUT5	testis, intestine, muscle
GLUT6	brain, spleen, peripheral leukocytes
GLUT7	intestine, testis, prostate
GLUT8	testis, brain (neuronal), adipocytes
GLUT9	liver, kidney
GLUT10	liver, pancreas
GLUT11	pancreas, kidney, placenta, muscle
GLUT12	heart, prostate, breast cancer
HMIT	brain
GLUT14	testis

จากการศึกษาพบว่ามียู้อยู่ด้วยกัน 5 isoforms ที่เกี่ยวข้องกับการดูดซึมกลูโคส และพบในหลากหลายเนื้อเยื่อ โดยแต่ละเนื้อเยื่อและแต่ละเซลล์อาจมีได้มากกว่า 1 isoform และมีการพบว่า มี 3 isoforms ด้วยกันที่มีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับการดูดซึมกลูโคส ได้แก่ GLUT1, GLUT2 และ GLUT4 (Mizock, 1995)

GLUT1 เป็นตัวที่ตอบสนองต่อกลูโคสโดยปกติ และพบได้ในหลายเนื้อเยื่อ โดยพบมากในเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งเลือด เช่น สมองและรก แต่ก็มีความสัมพันธ์กับการขนส่งกลูโคสในกรณีที่เกิดภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำ

GLUT2 พบได้ในเนื้อเยื่อที่เฉพาะมากกว่า GLUT1 โดยพบว่าการแสดงออกในหลายอวัยวะ ได้แก่ ตับ ไต ลำไส้เล็ก และเบตาเซลล์ในตับอ่อน ในส่วนของตับ GLUT2 ทำหน้าที่เป็นตัวกลาง (mediator) ในการดูดซึมและหลั่งกลูโคสผ่านทางเซลล์ตับ (hepatocytes) ในตับอ่อน พบว่า GLUT2 เกี่ยวข้องกับการควบคุมการหลั่งอินซูลิน

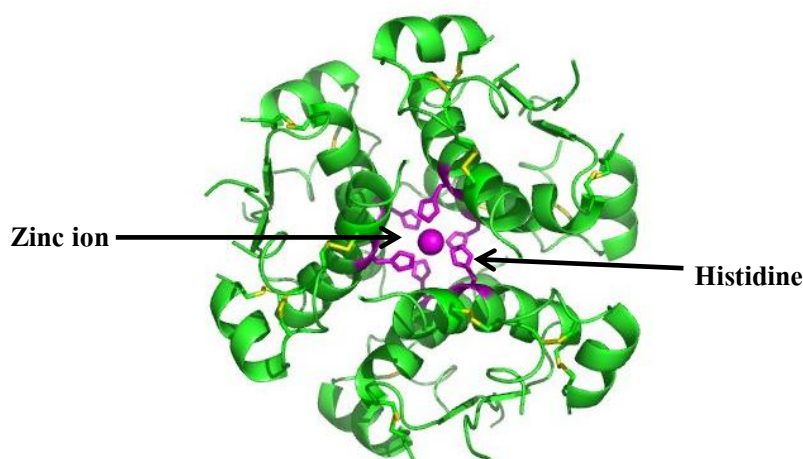
GLUT4 พบได้เฉพาะในเนื้อเยื่อที่มีการดูดซึมกลูโคสผ่านอินซูลิน (insulin-mediated glucose uptake: IMGU) ได้แก่ เซลล์กล้ามเนื้อ เซลล์ไขมัน และกล้ามเนื้อหัวใจ

ภายใต้ภาวะปกติ GLUT4 มีลักษณะเป็นถุงอยู่ภายในเซลล์ (intracellular vesicles) และอยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์เล็กน้อย ในขณะที่ GLUT1 มีการกระจายอย่างสม่ำเสมอระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์กับถุงภายในเซลล์

1.2.6 อินซูลิน

เป็นเปปไทด์ฮอร์โมนชนิดหนึ่ง ถูกสร้างโดยเซลล์ของตับอ่อนชนิดเบตาเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเผาผลาญ (metabolism) ของคาร์โบไฮเดรตและไขมันในร่างกาย โดยมีผลกับเซลล์ชนิดต่าง ๆ เช่น ตับ กล้ามเนื้อ และเซลล์ไขมัน ซึ่งเกี่ยวข้องกับการควบคุมระดับน้ำตาลในกระแสเลือด โครงสร้างดังภาพที่ 1.12 ซึ่งประกอบด้วยอินซูลินจำนวน 6 โมเลกุลที่เชื่อมต่อเข้าด้วยกันด้วย zinc ion แทนด้วยทรงกลม และตำแหน่งของ histidine แทนด้วยกิ่งก้านซึ่งเชื่อมต่อกับ zinc ion เข้าไว้ด้วยกัน เมื่ออยู่ในรูปที่ไม่ทำงานจะจับกันเป็น 6 โมเลกุล (hexamer) ในขณะที่รูปที่พร้อมทำงานจะอยู่เป็นโมเลกุลเดี่ยว (monomer) (Chang *et al.*, 1997)

สำหรับการกระตุ้นการทำงานของอินซูลินนั้นมีรายงานว่า เมื่อน้ำตาลถูกย่อยจนได้เป็นกลูโคส จะเคลื่อนที่ตามกระแสเลือดผ่านมาที่ตับอ่อน ซึ่งเป็นบริเวณที่ผลิตฮอร์โมนอินซูลินดังกล่าว และถูกดูดซึมผ่าน GLUT2 ที่อยู่บนผิวเซลล์ของตับอ่อน ทำให้เกิดการส่งสัญญาณภายในเซลล์จนไปถึงถุงที่บรรจุอินซูลิน เมื่อถูกกระตุ้นถุงดังกล่าวจะเคลื่อนที่มาบริเวณผิวของเซลล์ จนกระทั่งปลดปล่อยอินซูลินที่อยู่ภายในออกมา เพื่อไปกระตุ้นการทำงานของเซลล์ชนิดอื่นต่อไป โดยอินซูลินที่ถูกปล่อยออกมาในปริมาณมากนั้น จะกินเวลาเพียงสั้น ๆ เนื่องจากเป็นฮอร์โมนที่มี half life สั้น และจะถูกกำจัดต่อไป



ภาพที่ 1.12 โครงสร้างสามมิติของอินซูลิน (Chang *et al.*, 1997)

วัตถุประสงค์ของการทดลอง

1. ศึกษาการออกฤทธิ์ของสารสกัด alkaline insoluble β -glucan-containing crude extract และ purified soluble β -glucan จากเห็ดนางฟ้า ต่อเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 ในการกระตุ้นการผลิตไนตริกออกไซด์
2. ศึกษาการออกฤทธิ์ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากเห็ดนางฟ้า (β -glucan-containing polysaccharide extract: BPEG) ต่อเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 และเซลล์กล้ามเนื้อชนิด L6

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

2.1 วัสดุอุปกรณ์

- กล้องจุลทรรศน์
- ขวด duran
- เครื่องชั่งละเอียด 2 ตำแหน่ง
- เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง
- เครื่องผสมสาร (vortex)
- เครื่องวัด pH (pH meter)
- เครื่องหมุนเหวี่ยงตะกอน
- ตู้ควบคุมสภาวะสำหรับเลี้ยงเซลล์ (incubator)
- ตู้ปลอดเชื้อ (laminar airflow)
- ตู้อบ (hot air oven)
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (autoclave)
- หลอด centrifuge
- หลอด eppendorf
- อุปกรณ์สำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ (cells culture)
- hot plate stirrer
- microautopipett ขนาด 0.2-10, 2-20, 10-100, 100-1,000 ไมโครลิตร
- microplate reader spectrophotometer
- rotary evaporator
- sonicator
- spectrophotometer
- thermometer

2.2 รายการสารเคมี

- absolute ethanol	Labscan
- α -MEM(α -minimum essential medium)	GibCo, Invitrogen
- bovine serum albumin (BSA)	NEB
- compound C	Merck
- cycloheximide	Sigma
- dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco
- fetal bovine serum (FBS)	Invitrogen
- Folin-Ciocalteu	Sigma
- glucose (GO) assay kit	Sigma
- Griess assay kit	Sigma
- guanidine hydrochloride	Seromed, Biochrn
- horse serum (HS)	Sigma
- L6 myoblast cells	ATCC
- metformin	GibCo
- 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)	GibCo
- PD98059 (MEK1 inhibitor)	Cell signaling technology
- penicillin/streptomycin	Seromed, Biochrn KG
- phenol reagent	AMRESCO
- RAW264.7 murine macrophage	ATCC [®] TIB-71 [™]
- SB203580	Sigma
- sodium bicarbonate	Sigma
- sulfuric acid	J.T. Baker
- tryphan blue	Sigma
- wortmannin	Sigma
- rapamycin	Sigma

สารสกัด alkaline-insoluble β -glucan-containing crude extract และ purified soluble β -glucan จากเห็ดนางฟ้าได้รับความอนุเคราะห์จาก ศาสตราจารย์ ดร.รพีพรรณ วิทิตสุวรรณกุล ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

2.3 วิธีการทดลอง

2.3.1 การเตรียมพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดนางฟ้า (BPEG)

ขั้นตอนที่ 1

ขั้นตอนการเตรียมดัดแปลงมาจากวิธีการของ Yap และ NG (Yap and NG, 2001) นำเห็ดนางฟ้าสด 400 กรัม มาล้างด้วยน้ำสะอาด จากนั้นนำมาตัดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ และนำไปอบที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลาอย่างน้อย 3 วันจนกระทั่งตัวอย่างแห้ง จากนั้นนำมาปั่นให้เป็นผงละเอียด แล้วจึงนำไปต้มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิประมาณ 80-90°C รอให้ตัวอย่างเย็นลงจึงนำมาตกตะกอนข้ามคืนด้วยเอทานอล 95% ที่อุณหภูมิ 4°C หลังจากนั้นจึงนำไปปั่นเพื่อนำตะกอนที่ได้มาทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dry) นำตะกอนที่ได้มาต้มต่อ 8 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 80-90°C รอจนกระทั่งตัวอย่างเย็นจึงนำไปปั่นข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนทิ้ง นำส่วนใสมาตกตะกอนข้ามคืนด้วยเอทานอล 95% และนำไปปั่นตกตะกอนเพื่อนำไปทำให้แห้งและอบเพื่อไล่ไอน้ำออกที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 1 วัน

ขั้นตอนที่ 2

กำจัดโปรตีนที่เหลือในตัวอย่างด้วย Sevag reagent (อัตราส่วน chloroform:butanol คือ 1:4) โดยใช้อัตราส่วนระหว่างตัวอย่างกับ Sevag 1:1 ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่า จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ตัวอย่างจะแยกออกเป็นสองส่วน ดูดเอาเฉพาะส่วนใสด้านบนถ่ายใส่ในหลอดใหม่ โดยระวังไม่ให้ชั้นของโปรตีนติดขึ้นมาด้วย ทำการสกัดซ้ำด้วย Sevag อีกครั้งหนึ่ง จากนั้นนำมาทำการแยกสารผ่านเยื่อ (dialysis) ที่มี molecular weight cut off อยู่ที่ 12 kD โดยเปลี่ยนน้ำสะอาดทุกวัน จนกระทั่งปริมาตรของตัวอย่างไม่เปลี่ยนแปลง สุดท้ายนำตัวอย่างที่ได้ไปทำให้แห้งและนำไปอบที่อุณหภูมิ 70°C จนกระทั่งตัวอย่างแห้งและเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกระทั่งใช้งาน

2.3.2 การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของตัวอย่างด้วยเทคนิค FT-IR

ตัวอย่างบางส่วนในรูปผงแห้งจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ส่งตรวจวิเคราะห์ห้องปฏิบัติการที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ โดยใช้เครื่อง FT-IR spectrophotometer วิเคราะห์ในช่วงคลื่น 4000-400 cm^{-1}

2.3.3 ทดสอบปริมาณโปรตีน

ทดสอบโปรตีนตามวิธีการของ Lowry และคณะ (Lowry *et al.*, 1951) โดยนำ BPEG แบ่งมาละลายให้ได้ความเข้มข้นเป็น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย alkaline copper (ประกอบด้วย 2% sodium carbonate in 0.1N NaOH และ 0.5% copper sulphate in 1% potassium tartrate) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu 300 ไมโครลิตร และวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ซึ่งโปรตีนที่อยู่ในตัวอย่างจะถูกรีดิวซ์เกิดเป็นสารประกอบสีน้ำเงิน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 และ 650 นาโนเมตร นำค่าดังกล่าวที่วัดได้มาคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานของ BSA

2.3.4 ทดสอบปริมาณคาร์โบไฮเดรต

ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดในตัวอย่างตรวจหาได้โดยใช้ phenol sulfuric method (Dubois *et al.*, 1956) โดยเตรียมตัวอย่างที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เติมสารละลาย 5% phenol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และ sulfuric acid 2 มิลลิลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารและวางให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เพื่อรอให้กรดระเหยหลังทำปฏิกิริยา จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้มาคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูโคส

2.3.5 ศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด BPEG ต่อเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7

1) การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ (complete DMEM)

ซึ่งอาหารผง Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (ประกอบด้วย glucose 4.5 กรัม/ลิตร sodium pyruvate และ phenol red) มา 12.89 กรัม และ NaHCO₃ 3.7 กรัม ลงในบีกเกอร์ เติม milliQ water 800 มิลลิลิตร คนให้ละลายเข้ากัน ปรับ pH ให้อยู่ที่ pH 7 เติม heat-inactivated FBS 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันอย่างช้า ๆ เติม 100xL-glutamine 10 มิลลิลิตร เติมสารละลายยาปฏิชีวนะ penicillin/streptomycin 1 มิลลิลิตร เติม milliQ water ให้ครบปริมาตร 1 ลิตร นำไปกรองผ่าน 0.2 µm membrane filter แบ่งใส่ขวดขนาด 250 มิลลิลิตร ปิดฝาขวดด้วย parafilm อีกชั้นหนึ่ง เก็บที่อุณหภูมิ 4°C จะได้เป็น complete media ซึ่งประกอบด้วยสารละลายยาปฏิชีวนะ penicillin/streptomycin 1% และ FBS 10% สำหรับเลี้ยงเซลล์ (ขั้นตอนหลังจากปรับ pH ทำในตู้ปลอดเชื้อ)

2) การเพาะเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7

ดูดอาหาร cDMEM ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ที่นำมาบ่มให้อุ่นไว้ก่อนล่วงหน้าใส่ลงในหลอด conical tube ขนาด 15 มิลลิลิตร จากนั้นนำเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 ที่อยู่ในหลอดเก็บเซลล์ซึ่งเก็บอยู่ในถังไนโตรเจนเหลวมาทำให้ละลายที่ 37°C (จนเกือบหมด) จากนั้นดูดเซลล์ทั้งหมดมาใส่ในหลอดที่มีอาหารเตรียมไว้ นำไปปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ 2,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นดูดอาหารเก่าออก และทำการละลายให้เข้ากันอย่างช้า ๆ ด้วยอาหารใหม่ 1 มิลลิลิตร จากนั้นดูดทั้งหมดใส่ลงในจานเพาะเชื้อ (petri dish) ขนาด 10 cm ที่มีอาหารอยู่ 9 มิลลิลิตร (จะได้ปริมาตรทั้งหมด 10 มิลลิลิตร) เขย่าจานเพาะเชื้อเล็กน้อยเพื่อให้เซลล์กระจายตัว แล้วจึงนำไปบ่มในตู้บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C และมีปริมาณ CO₂ 5% เป็นเวลา 2 วัน หรือจนกระทั่งเซลล์เติบโตได้ประมาณ 80-90% ของจานเพาะเชื้อแล้วจึงทำการแยกเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ (sub culture)

3) การเพิ่มจำนวนเซลล์

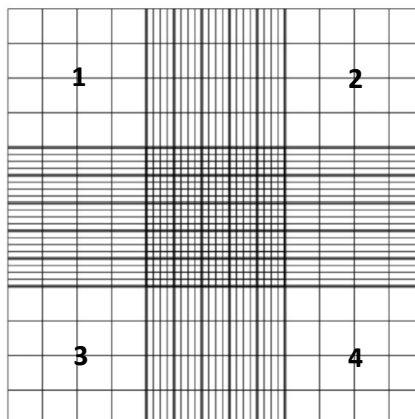
เมื่อครบเวลานำออกมาสองตัวกล้างจุลทรรศน์ เพื่อดูการเจริญเติบโตของเซลล์ เมื่อเซลล์เจริญเติบโตประมาณ 80-90% ของจานเพาะเชื้อ จึงทำการดูดอาหารเก่าออกจนหมด เติมน้ำ 1xPBS 10 มิลลิลิตร เพื่อทำการล้างตะกอนเซลล์ที่หลุดออก จากนั้นจึงดูด 1xPBS ทิ้ง และเติมน้ำลงไป 2 มิลลิลิตร ทำการขูดเซลล์ด้วย scraper โดยขูดจากขอบจานเพาะเชื้อ เข้าหาที่กึ่งกลางจนครบรอบทั้งจานเพาะเชื้อ เติมน้ำลงไปอีก 8 มิลลิลิตร ปิดฝาด้านบนให้เซลล์กระจายทั่ว ๆ จากนั้นจึงดูดมา 2 มิลลิลิตรใส่ลงในจานเพาะเชื้อใหม่ที่ใส่น้ำไว้แล้ว 8 มิลลิลิตร เขย่าจานเพาะเชื้อเพื่อให้เซลล์กระจายทั่ว ๆ แล้วจึงนำไปบ่มในตู้บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C และมีปริมาณ CO₂ 5%

4) การนับจำนวนเซลล์

ก่อนทำการเพิ่มจำนวนเซลล์ให้แบ่งเซลล์มาจำนวนหนึ่งเพื่อคำนวณหาจำนวนเซลล์ทั้งหมด โดยเปิดเซลล์มาประมาณ 10 ไมโครลิตร ใส่ลงใน microcentrifuge tube ที่มีการเติมสีย้อม (0.4% trypan blue) ลงไป 30 ไมโครลิตร (อัตราส่วนเซลล์:สี คือ 1:3) ปิดฝาด้านบนให้เซลล์และสีย้อมกระจายตัวเข้ากัน จากนั้นดูดมา 10 ไมโครลิตร ใส่ลงใน hemacytometer เพื่อทำการนับจำนวนเซลล์ ซึ่งวิธีการนับเซลล์จะนับเฉพาะเซลล์ที่มีลักษณะกลมและใสที่อยู่ในช่องใหญ่ (quadrant) หมายเลข 1, 2, 3 และ 4 แต่ในกรณีที่เซลล์อยู่บริเวณขอบหรือเส้นแบ่งระหว่างช่องให้นับเซลล์นั้นด้วย ส่วนเซลล์ที่อยู่นอกเหนือบริเวณดังกล่าวไม่ต้องนับ หลังจากนั้นจึงนำมาคำนวณเพื่อทราบถึงจำนวนเซลล์ทั้งหมด

การคำนวณหาจำนวนเซลล์ทั้งหมด

$$\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด} = \text{จำนวนเซลล์ใน 4 quadrants} \times 10^4 \text{ cells/ml}$$



ภาพที่ 2.1 ตำแหน่งการนับเซลล์บน hemacytometer

5) การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของ alkaline insoluble β -glucan-containing crude extract จากเห็ดนางฟ้า

seed cell ที่เจือจางไว้ลงใน 96-well plate ให้ได้จำนวนเซลล์ 23,000 cells/well แล้วจึงนำไปบ่มในตู้บ่ม ที่อุณหภูมิ 37°C ปริมาณ CO₂ 5% บ่มไว้ 24 ชั่วโมงเพื่อให้เซลล์เกาะจานเพาะเชื้อ เมื่อครบ 24 ชั่วโมง เตรียม alkaline insoluble β -glucan-containing crude extract ที่ความเข้มข้น 10, 25, 50, 100, 250, 500 และ 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำ alkaline insoluble β -glucan-containing crude extract แต่ละความเข้มข้นใส่ลงใน 96-well plate ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร โดยดูดอาหารเก่าออกก่อน แล้วนำกลับไปบ่มไว้ 24 ชั่วโมง เมื่อครบ 24 ชั่วโมง จึงทดสอบความเป็นพิษในเซลล์ด้วยวิธี MTT assay ทำโดยนำเซลล์ที่ทดสอบมาดูดอาหารเก่าออกให้หมดและเติม MTT ที่ความเข้มข้น 1:20 (MTT:อาหาร cDMEM) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่ 37°C เมื่อครบ 2 ชั่วโมง จึงนำออกมาและปิเปตส่วนของเหลวทิ้ง จะเห็นเป็นผลึก formazan สีม่วงอยู่ที่ก้นหลุม ขั้นตอนนี้ควรระวังไม่ให้ผลึกหลุดติดมากับปิเปต และเติม DMSO เพื่อละลายผลึก formazan จากนั้นจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร โดยมี blank เป็น DMSO แล้วมาคำนวณหาการรอดชีวิตของเซลล์ โดยให้ชุด control หรือ ชุดที่ไม่เติม alkaline insoluble β -glucan-containing crude extract เท่ากับการรอดชีวิต 100% โดยถือว่าหากต่ำกว่า 80% ถือว่า alkaline insoluble β -glucan-containing crude extract เป็นพิษต่อเซลล์

การคำนวณเซลล์ที่รอดชีวิต

$$\% \text{ cell viability} = \text{OD test cell} / \text{OD control} \times 100$$

6) การทดสอบอิทธิพลการกระตุ้นการสร้างไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 โดย alkaline insoluble β -glucan-containing crude extract จากเห็ดนางฟ้า

เมื่อเซลล์เจริญเติบโตประมาณ 80% ของจานเพาะเชื้อ จึงทำการ seed ลงใน 24-well plate ให้ในแต่ละ well มีเซลล์ 3.5×10^5 cells/well หลังจากนั้นนำไปบ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้อากาศชั้นที่ปริมาณ CO_2 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบ 24 ชั่วโมง จึงเตรียมเบตา-กลูแคนที่ต้องการทดสอบในอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยเจือจางให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ต้องการในอาหารเลี้ยงเซลล์ แล้วนำกลับไปบ่มในตู้บ่มเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ครบเวลาจึงเก็บเอาอาหารที่เลี้ยงเซลล์ไปทดสอบการสร้างไนตริกออกไซด์ด้วยชุดทดสอบ Griess assay kit (Invitrogen)

7) การเก็บตัวอย่างและทดสอบการสร้างไนตริกออกไซด์

เมื่อครบ 24 ชั่วโมงจึงนำ 24-well plate ออกจากตู้บ่มเลี้ยงเชื้อและเก็บส่วน supernatant ในแต่ละ well ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร การหาปริมาณการสร้างไนตริกออกไซด์ ทำโดยการดูดส่วน supernatant ที่เก็บมา 120 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate แล้วทำการเติม milliQ water 1,040 ไมโครลิตร และ Griess reagent 40 ไมโครลิตร (โดยเตรียม Griess reagent จาก 0.05% *N*-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และ 0.5% sulfanilic acid ปริมาตร 200 ไมโครลิตร) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้ทำปฏิกิริยา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 548 นาโนเมตร โดยมี blank เป็น milliQ water แล้วนำมาคำนวณหาปริมาณการสร้างไนตริกออกไซด์กับกราฟมาตรฐานของไนไตรท์

2.3.6 ศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดต่อเซลล์กล้ามเนื้อชนิด L6

1) การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ (10% cAMEM)

เอาอาหารผง Alpha Minimum Essential Medium (AMEM) (ประกอบด้วย phenol red และ L-glutamine) 1 ซอง และ NaHCO_3 2.2 กรัม ลงในบีกเกอร์ เติม milliQ water 800 มิลลิลิตร คนให้ละลายเข้ากัน เติม heat-inactivated FBS 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันอย่างช้า ๆ เติมสารละลายยาปฏิชีวนะ penicillin/streptomycin 1 มิลลิลิตร เติม milliQ water ให้ครบปริมาตร 1 ลิตร นำไปกรองผ่าน $0.2 \mu\text{m}$ membrane filter แบ่งใส่หลอด tube ขนาด 50 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4°C จะได้เป็น complete media ซึ่งประกอบด้วยสารละลายยา

ปฏิชีวนะ penicillin/streptomycin 1% และ FBS 10% สำหรับเลี้ยงเซลล์ (ขั้นตอนหลังจากปรับปริมาตรทำในตู้ปลอดเชื้อ)

2) การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ (2% cMEM)

ขั้นตอนการเตรียมทำเช่นเดียวกับ 10% cMEM ในข้อ 1) แต่เปลี่ยนจากการเติม heat-inactivated FBS 100 มิลลิลิตร มาเป็น HS 20 มิลลิลิตร จะได้เป็น complete media ซึ่งประกอบด้วยสารละลายยาปฏิชีวนะ penicillin/streptomycin 1% และ HS 2% สำหรับเลี้ยงเซลล์

3) การเพาะเลี้ยงเซลล์กล้ามเนื้อชนิด L6

ทำเช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 โดยดูดเซลล์ทั้งหมดใส่ลงในจานเพาะเชื้อขนาด 10 cm ที่มีอาหารอยู่ 7 มิลลิลิตร (จะได้ปริมาตรทั้งหมด 8 มิลลิลิตร) เขย่าจานเพาะเชื้อเล็กน้อยเพื่อให้เซลล์กระจายตัว แล้วจึงนำไปบ่มในตู้บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C และมีปริมาณ CO₂ 5% เป็นเวลา 2 วัน

4) การเพิ่มจำนวนเซลล์

เมื่อครบเวลานำออกมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อดูการเจริญเติบโตของเซลล์ เมื่อเซลล์เจริญเติบโตประมาณ 70-80% ของจานเพาะเชื้อ จึงทำการดูดอาหารเก่าออกจนหมด เติม 1xPBS 10 มิลลิลิตร เพื่อทำการล้างตะกอนเซลล์ที่หลุดออก จากนั้นจึงดูด 1xPBS ทิ้งและเติม trypsin ลงไป 1 มิลลิลิตร กลั้วให้ทั่วนำไปบ่มในตู้บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C และมีปริมาณ CO₂ 5% เป็นเวลา 5 นาที เอาออกมาเขย่าเบา ๆ เพื่อให้เซลล์หลุดจากจานเพาะเชื้อ เติมอาหารลงไปอีก 1 มิลลิลิตร เพื่อหยุดการทำงานของ trypsin และบีบเปิดชั้นลงให้เซลล์กระจายทั่ว ๆ จากนั้นจึงดูดมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อใหม่ที่มีอาหารไว้แล้ว 7 มิลลิลิตร เขย่าจานเพาะเชื้อเพื่อให้เซลล์กระจายทั่ว ๆ แล้วจึงนำไปบ่มในตู้บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C และมีปริมาณ CO₂ 5%

5) การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์กล้ามเนื้อชนิด L6

เมื่อเซลล์เจริญเติบโตประมาณ 70-80% ของจานเพาะเชื้อ จึงทำการ seed ลงใน 48-well plate โดยใส่หลุมละ 200 ไมโครลิตร เขย่าจานเพาะเชื้อเพื่อให้เซลล์กระจายทั่ว ๆ แล้วจึงนำไปบ่มในตู้บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C และมีปริมาณ CO₂ 5% เลี้ยงจนกระทั่งเซลล์เติบโต 70-80% ของจานเพาะเชื้อ แล้วจึงทำการเปลี่ยนอาหารเป็น 2% MEM เพื่อชักนำให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนรูปร่างที่พร้อมสำหรับการทดสอบ (differentiate cells) โดยทำการเปลี่ยน

อาหารเป็น 2% AMEM วันเว้นวันประมาณ 3 ครั้ง จึงสามารถลงตัวอย่างได้ โดยเตรียมตัวอย่างเบตา-กลูแคนแต่ละชนิดในอาหาร 2% AMEM ที่ความเข้มข้น 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 และ 2,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำตัวอย่างเบตา-กลูแคนแต่ละความเข้มข้นใส่ลงใน 48-well plate โดยดูดอาหารเก่าออกก่อน แล้วนำกลับไปบ่มไว้ 24 ชั่วโมง เมื่อครบ 24 ชั่วโมง จึงทดสอบความเป็นพิษในเซลล์ด้วยวิธี MTT แล้วมาคำนวณหาการรอดชีวิตของเซลล์ โดยให้ชุด control หรือ ชุดที่ไม่เติมตัวอย่างเบตา-กลูแคน เท่ากับการรอดชีวิต 100% โดยถือว่าหากต่ำกว่า 80% ตัวอย่างเบตา-กลูแคนเป็นพิษต่อเซลล์

6) การทดสอบอิทธิพลการกระตุ้นการนำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อชนิด L6 โดยตัวอย่างเบตา-กลูแคน

หลังจากชักนำให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนรูปร่างที่พร้อมสำหรับการทดสอบ โดยทำการเปลี่ยนอาหารเป็น 2% AMEM วันเว้นวันประมาณ 3 ครั้ง โดยเลี้ยงเซลล์ใน 48-well plate จึงลงตัวอย่างได้ โดยเตรียมตัวอย่างเบตา-กลูแคนแต่ละชนิดในอาหาร 2% AMEM ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ แล้วนำกลับไปบ่มในตู้บ่มเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ครบเวลาจึงเก็บเอาอาหารที่เลี้ยงเซลล์ไปทดสอบระดับน้ำตาลโดยใช้ชุดทดสอบ glucose (GO) assay kit (Sigma)

7) การเก็บตัวอย่างและทดสอบระดับน้ำตาล

เมื่อครบ 48 ชั่วโมงจึงนำ 48-well plate ออกจากตู้บ่มเลี้ยงเชื้อและเก็บส่วน supernatant ในแต่ละ well ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate การทดสอบระดับน้ำตาลที่เหลืออยู่ในอาหาร ทำโดยดูด supernatant ที่เก็บมา 10 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate อันใหม่และทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่น 40 ไมโครลิตร บีบขึ้นลงให้เข้ากันจากนั้นดูดใส่ 96-well plate อันใหม่ปริมาตร 25 ไมโครลิตร และใส่ glucose kit 50 ไมโครลิตร (โดยเตรียม glucose kit reagent จากการละลายแคปซูล glucose oxidase/oxidase ด้วย sterile water 39 มิลลิลิตร จนหมด และละลาย o-Dianisidine reagent ด้วยน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร จากนั้นดูดสารละลาย o-Dianisidine reagent ใส่ผสมกับ glucose oxidase/oxidase แบ่งใส่ขวดเล็กเก็บที่อุณหภูมิ -20°C) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที ครบเวลาหยุดปฏิกิริยาโดยการเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 12 N (12N H₂SO₄) จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยมี blank เป็น sterile water แล้วนำมาคำนวณหาปริมาณน้ำตาลกับกราฟมาตรฐานของกลูโคส

บทที่ 3

ผลการทดลอง

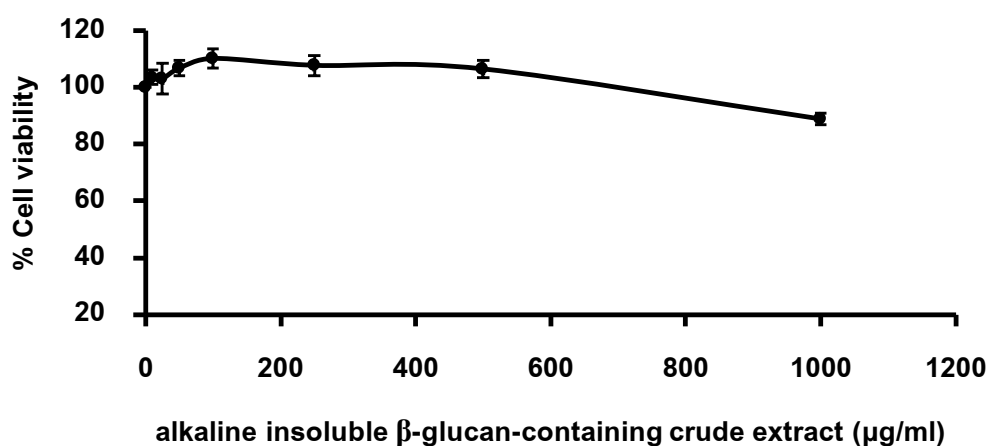
3.1 ผลการกระตุ้นการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 โดย alkaline insoluble β -glucan-containing crude extract

การศึกษาที่ผ่านมาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นความสามารถของ alkaline insoluble β -glucan ต่อระบบภูมิคุ้มกัน ตัวอย่างเช่น การศึกษาของ Volman และคณะ พบว่า สารสกัดจากเห็ด *Agaricus bisporus* มีปริมาณของเบตา-กลูแคนอยู่มาก และมีความสามารถในการกระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจชนิด bone marrow-derived macrophages (BMM) ให้ผลิตไนตริกออกไซด์ได้ อีกทั้งเมื่อทำการวิเคราะห์ห้องค์ประกอบทางเคมีที่เป็น มอนแซ็กคาริไรด์ด้วย เครื่อง HPLC พบว่า มีปริมาณกลูโคสสูงถึง 93.3% โดยเชื่อมต่อกันแบบ β -(1 \rightarrow 4) (Volman *et al.*, 2010) นอกจากนี้การศึกษาของ Byeon และคณะพบว่า เบตา-กลูแคนที่แยกได้จากเห็ด *Tricholoma matsutake* สามารถเหนี่ยวนำการผลิตไนตริกออกไซด์รวมไปถึง TNF- α ในเซลล์แมคโครฟาจ และยังเพิ่ม CD43 ในเซลล์โมโนไซต์อีกด้วย (Byeon *et al.*, 2009) นอกจากนี้ Ljungman และคณะพบว่า alkaline insoluble β -glucan ที่มีโครงสร้างชนิด β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan สามารถเหนี่ยวนำการสร้างไนตริกออกไซด์โดยเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 (Ljungman *et al.*, 1998) เช่นกัน จากหลักฐานดังกล่าวจึงได้ตั้งสมมติฐานว่า alkaline insoluble β -glucan จากเห็ดนางฟ้าจะสามารถเหนี่ยวนำการสร้างไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 ได้เช่นกัน ดังนั้นจึงเริ่มต้นด้วยการทดสอบความเป็นพิษของ alkaline insoluble β -glucan-containing crude extract โดยวิธี MTT assay ผลการทดสอบความเข้มข้นของ alkaline insoluble β -glucan-containing crude extract ตั้งแต่ 10, 25, 50, 100, 250, 500 และ 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบว่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ไม่แตกต่างกับเซลล์ชุดควบคุมที่ไม่มีการเติม alkaline insoluble β -glucan-containing crude extract คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตไม่ต่ำกว่า 80% ซึ่งแสดงให้เห็นว่า alkaline insoluble β -glucan-containing crude extract ไม่เป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 ดังภาพที่ 3.1 เช่นเดียวกับการทดลองที่ผ่านมา ซึ่งรายงานว่ เบตา-กลูแคนจากเห็ดนางฟ้าไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 (Carbonero *et al.*, 2012; Satitmanwivat *et al.*, 2012)

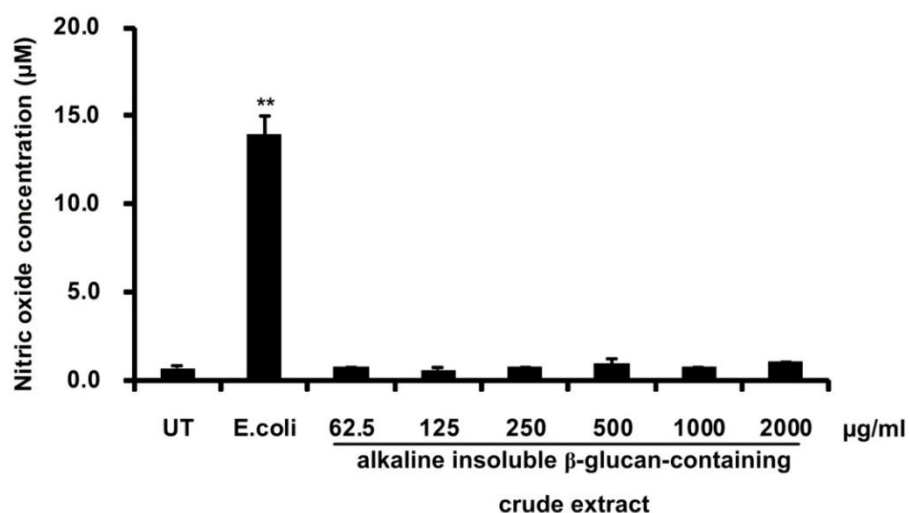
เนื่องจากผลการทดสอบพบว่า alkaline insoluble β -glucan-containing crude extract ไม่เป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 ดังนั้น alkaline insoluble β -glucan จึงอาจมีประสิทธิภาพในการกระตุ้นให้เซลล์มีการผลิตไนตริกออกไซด์ เริ่มจากการทดสอบเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 ด้วยความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของ alkaline insoluble β -glucan-containing crude extract (ตั้งแต่ 62.5-2,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) พบว่า alkaline insoluble β -glucan-containing crude extract ที่ทุกความเข้มข้นไม่สามารถกระตุ้นให้เซลล์ผลิตไนตริกออกไซด์ได้เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่ตัวกระตุ้น (untreated: UT) แต่สำหรับ *Escherichia coli* พบว่าสามารถกระตุ้นให้เซลล์ผลิตไนตริกออกไซด์ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชุดควบคุม คิดเป็น 14 ไมโครโมลาร์ ดังภาพที่ 3.2 ซึ่งผลการทดสอบของ alkaline insoluble β -glucan-containing crude extract ต่อการผลิตไนตริกออกไซด์โดยเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 มีความเป็นไปได้ว่า alkaline insoluble β -glucan-containing crude extract ที่ใช้ทดสอบยังคงมีโปรตีนหลงเหลืออยู่ ซึ่งขัดขวางการเข้าจับกันของเบตา-กลูแคนกับตัวรับ ดังนั้นผู้วิจัยจึงนำ alkaline insoluble β -glucan-containing crude extract มาล้างด้วย 0.1 M NaOH โดยการต้มด้วยหม้ออัดความดันเป็นจำนวน 2 รอบ เพื่อกำจัดโปรตีนที่เหลืออยู่และนำมาทดสอบกับเซลล์อีกครั้ง พบว่า ทุกความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1, 0.5, 1, 5 และ 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ของ alkaline insoluble β -glucan-containing crude extract ยังคงไม่สามารถกระตุ้นให้เซลล์ผลิตไนตริกออกไซด์ได้ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่ตัวกระตุ้น แต่สำหรับไซโมซานและยีสต์ สามารถกระตุ้นให้เซลล์ผลิตไนตริกออกไซด์ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชุดควบคุม คิดเป็น 34 และ 10 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับดังแสดงในภาพที่ 3.3

เนื่องจาก LPS และ alkaline insoluble β -glucan สามารถกระตุ้น inflammatory response ในเซลล์แมคโครฟาจ เช่น การสร้างไนตริกออกไซด์ และจากการศึกษาของ Green และคณะ พบว่า LPS กระตุ้น respiratory burst และกระตุ้น tyrosine kinase enzyme ให้เกิดกระบวนการ tyrosine phosphorylation ในเซลล์แมคโครฟาจชนิด BMM (Green *et al.*, 1992) ดังนั้นผู้วิจัยจึงตั้งสมมติฐานว่า LPS น่าจะช่วยส่งเสริมการกระตุ้น insoluble β -glucan จากเห็ดนางฟ้าให้สามารถสร้างไนตริกออกไซด์ได้ สมมติฐานดังกล่าวจึงนำไปสู่ผลการทดลองที่กระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 ด้วย LPS พร้อมกับ alkaline insoluble β -glucan-containing crude extract จากการทดลองพบว่า ความเข้มข้นของ alkaline insoluble β -glucan-containing crude extract ที่เพิ่มขึ้นไม่สามารถเพิ่มระดับการเหนี่ยวนำการสร้างไนตริกออกไซด์ด้วย LPS ได้ ดังภาพที่ 3.4 แต่การทดสอบ alkaline insoluble β -glucan-containing crude extract พร้อมกับไซโมซานกลับพบว่า ปริมาณของสารสกัดที่เพิ่มขึ้นกลับลดระดับการเหนี่ยวนำการสร้างไนตริกออกไซด์ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำของไซโมซาน การลดลงของไนตริกออกไซด์ยังไม่เป็นที่เข้าใจและต้องรอการตรวจสอบต่อไป จาก

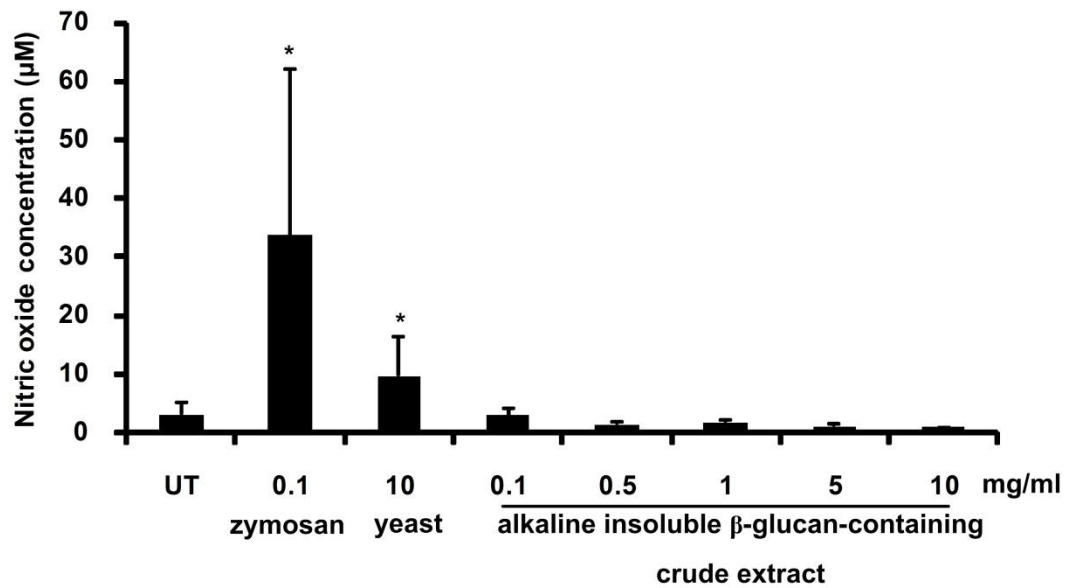
ผลการทดลองดังกล่าวอาจเป็นไปได้ว่า alkaline insoluble β -glucan-containing crude extract ที่กำจัดโปรตีนแล้ว ยังอาจมี polysaccharide หรือน้ำตาลตัวอื่น ๆ ที่ปิดกั้นไม่ให้เบตา-กลูแคน จับกับตัวรับบนผิวเซลล์ได้ ซึ่งการทดลองดังกล่าวต้องมีการกำจัดน้ำตาลตัวอื่น ๆ หรือการทำบริสุทธิ์ (purify) เพิ่มเติม



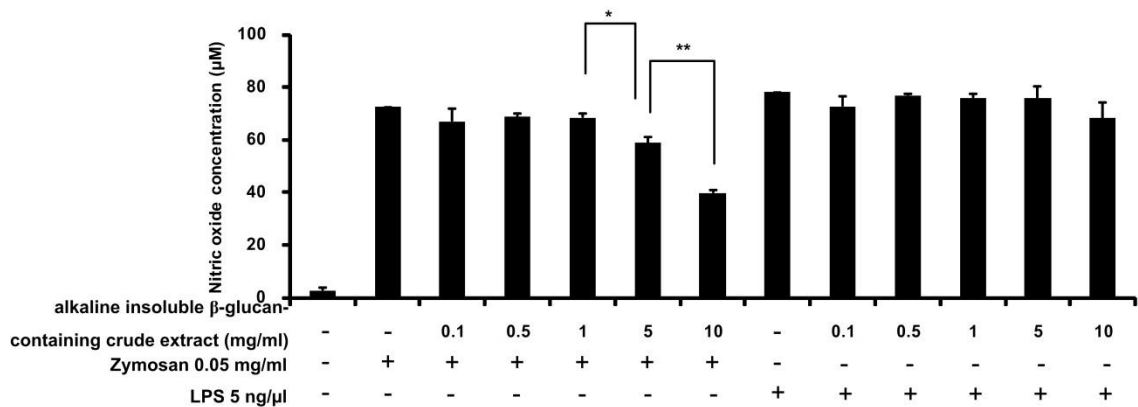
ภาพที่ 3.1 ทดสอบความเป็นพิษของ alkaline insoluble β -glucan-containing crude extract ต่อเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 พบว่าไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ เนื่องจากเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมีค่าสูงกว่า 80% ที่ทุกความเข้มข้น หลังจากบ่มเซลล์กับตัวอย่างเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทดสอบด้วย MTT assay



ภาพที่ 3.2 ผลของ alkaline insoluble β -glucan-containing crude extract ของเห็ดนางฟ้าต่อเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 พบว่า ที่ทุกความเข้มข้นไม่สามารถกระตุ้นเซลล์ในการผลิตไนตริกออกไซด์ เมื่อเปรียบเทียบกับ *E. coli* หลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้เซลล์ 150,000 cells/well ความแตกต่างทางสถิติวิเคราะห์โดยใช้ Two-tailed Student's T-test (* คือ $P < 0.05$, ** คือ $P < 0.001$) โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม untreated (UT)



ภาพที่ 3.3 ผลของ alkaline insoluble β -glucan-containing crude extract ของเห็ดนางฟ้าที่ผ่านการล้างด้วย 1 M NaOH ต่อเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 พบว่าไม่สามารถกระตุ้นเซลล์ให้ผลิตไนตริกออกไซด์ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับไซโมซาน และยีสต์ หลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้เซลล์ 350,000 cells/well ความแตกต่างทางสถิติวิเคราะห์โดยใช้ Two-tailed Student's T-test (* คือ $P < 0.05$) โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม UT



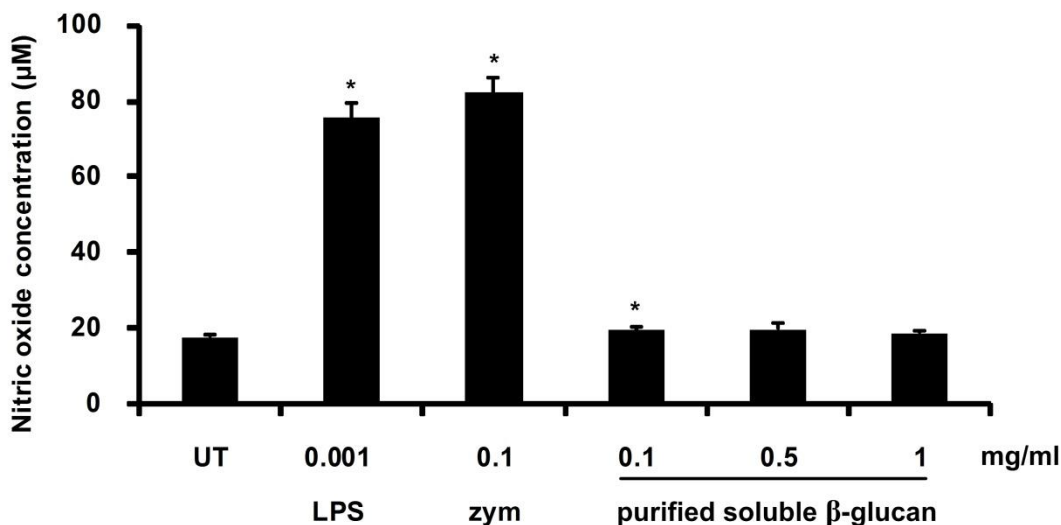
ภาพที่ 3.4 ผลของ alkaline insoluble β -glucan-containing crude extract ของเห็ดนางฟ้าที่ผ่านการล้างด้วย 1 M NaOH เมื่อบ่มร่วมกับ LPS และไซโมซานพบว่า ไม่มีผลต่อการกระตุ้นการผลิตไนตริกออกไซด์ของ LPS แต่มีแนวโน้มลดระดับการกระตุ้นของไซโมซานในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7 หลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้เซลล์ 350,000 cells/well ความแตกต่างทางสถิติวิเคราะห์โดยใช้ Two-tailed Student's T-test (* คือ $P < 0.05$, ** คือ $P < 0.001$)

3.2 ผลการกระตุ้นการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 โดย purified soluble β -glucan

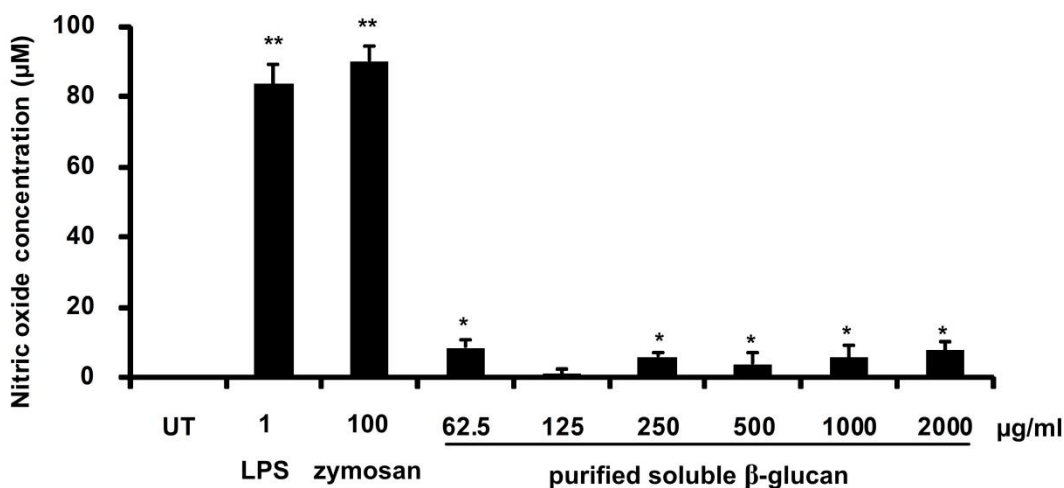
เนื่องด้วยการทดสอบการผลิตไนตริกออกไซด์โดยการกระตุ้นของ alkaline insoluble β -glucan-containing crude extract ไม่สามารถกระตุ้นให้เซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 ผลิตไนตริกออกไซด์ได้ จึงนำมาสู่การทดสอบโดยใช้ส่วน purified soluble β -glucan ที่สกัดได้จากเห็ดนางฟ้าเช่นกัน โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ. ดร.รพีพรรณ วิทิตสุวรรณกุล ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ผ่านการย่อยเป็นเวลา 7 วัน และมีน้ำหนักโมเลกุล 1.0-8.7 kD และจากการรายงานการศึกษาที่ผ่านมาของ Carbonero และคณะ พบว่า soluble β -glucan จากเห็ดนางฟ้ามีฤทธิ์กระตุ้นการผลิตไนตริกออกไซด์และไซโตไคน์บางชนิดได้ (Carbonero *et al.*, 2012)

สำหรับ purified soluble β -glucan ที่นำมาใช้ทดสอบมีส่วนที่เป็นตะกอนซึ่งไม่ละลายน้ำอยู่ด้วย ดังนั้นจึงนำเบตา-กลูแคนดังกล่าวไปปั่นแยกตะกอนเพื่อนำเฉพาะส่วนที่ละลาย (supernatant) โดยทำเป็นความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มาทดสอบพบว่า ที่ทุกความเข้มข้นไม่มีการกระตุ้นให้เซลล์ผลิตไนตริกออกไซด์ แต่สำหรับ LPS ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และไซโมซานความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีการกระตุ้นการผลิตไนตริกออกไซด์อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่ตัวกระตุ้น คิดเป็น 76 และ 82 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ ดังภาพที่ 3.5

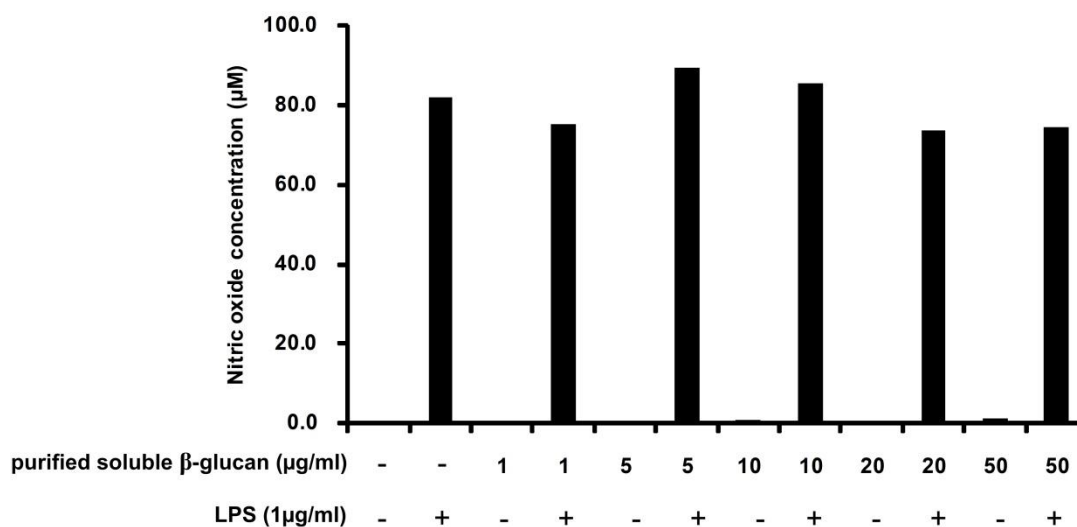
นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ทดสอบ purified soluble β -glucan ที่นำไปผ่านการกรองเพื่อแยกเอาส่วนที่เป็นตะกอนออก โดยทำเป็นความเข้มข้น 62.5, 125, 250, 500, 1,000 และ 2,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบว่าทุกความเข้มข้น ยกเว้นความเข้มข้น 125 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีการกระตุ้นให้เซลล์ผลิตไนตริกออกไซด์ในระดับที่ต่ำเมื่อเทียบกับ LPS ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หรือไซโมซานที่ 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ดังภาพที่ 3.6 และถึงแม้ว่าผลการกระตุ้นจะอยู่ในระดับที่สูงกว่าชุดควบคุมที่ไม่ใส่ตัวกระตุ้น แต่การกระตุ้นอาจไม่ได้มาจากผลของการจับของเบตา-กลูแคนกับตัวรับโดยตรง และนอกจากนี้รายงานวิจัยที่ผ่านมา มีการใช้ soluble β -glucan ที่ได้จากรา (*Candida* spp.) บ่มร่วมกับ LPS พบว่า สามารถเพิ่มการทำงานของ LPS ในการกระตุ้นการผลิตไนตริกออกไซด์ (Tokunaka *et al.*, 2000) ดังนั้นจึงทำการทดสอบ purified soluble β -glucan ที่ผ่านการกรองความเข้มข้น 1, 5, 10, 20 และ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยบ่มร่วมกับ LPS ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบว่า purified soluble β -glucan ทุกความเข้มข้นไม่สามารถกระตุ้นเซลล์ให้เพิ่มระดับการผลิตไนตริกออกไซด์ได้เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่มีเพียง LPS เพียงอย่างเดียว แสดงดังภาพที่ 3.7



ภาพที่ 3.5 ผลของส่วนที่เป็น supernatant ของ purified soluble β -glucan ที่ได้จากการปั่นแยกตะกอนออกต่อเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 พบว่าไม่มีการกระตุ้นให้เซลล์ผลิตไนตริกออกไซด์เมื่อเทียบกับ LPS และไซโมซาน หลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้เซลล์ 350,000 cells/well ความแตกต่างทางสถิติวิเคราะห์โดยใช้ Two-tailed Student's T-test (* คือ $P < 0.05$) โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม UT



ภาพที่ 3.6 ผลของ purified soluble β -glucan จากเห็ดนางฟ้าที่ผ่านการกรองต่อเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 พบว่าทุกความเข้มข้นไม่มีการกระตุ้นให้เซลล์ผลิตไนตริกออกไซด์เมื่อเทียบกับ LPS และไซโมซาน หลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้เซลล์ 350,000 cells/well ความแตกต่างทางสถิติวิเคราะห์โดยใช้ Two-tailed Student's T-test (* คือ $P < 0.05$, ** คือ $P < 0.001$) โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม UT



ภาพที่ 3.7 ผลของ purified soluble β -glucan จากเห็ดนางฟ้าที่ผ่านการกรองต่อเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 เมื่อบ่มร่วมกับ LPS พบว่า ไม่มีการกระตุ้นให้เซลล์ผลิตไนตริกออกไซด์และเมื่อบ่มร่วมกับ LPS ไม่มีผลต่อการกระตุ้นของ LPS ในการผลิตไนตริกออกไซด์เช่นกัน หลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้เซลล์ 350,000 cells/well

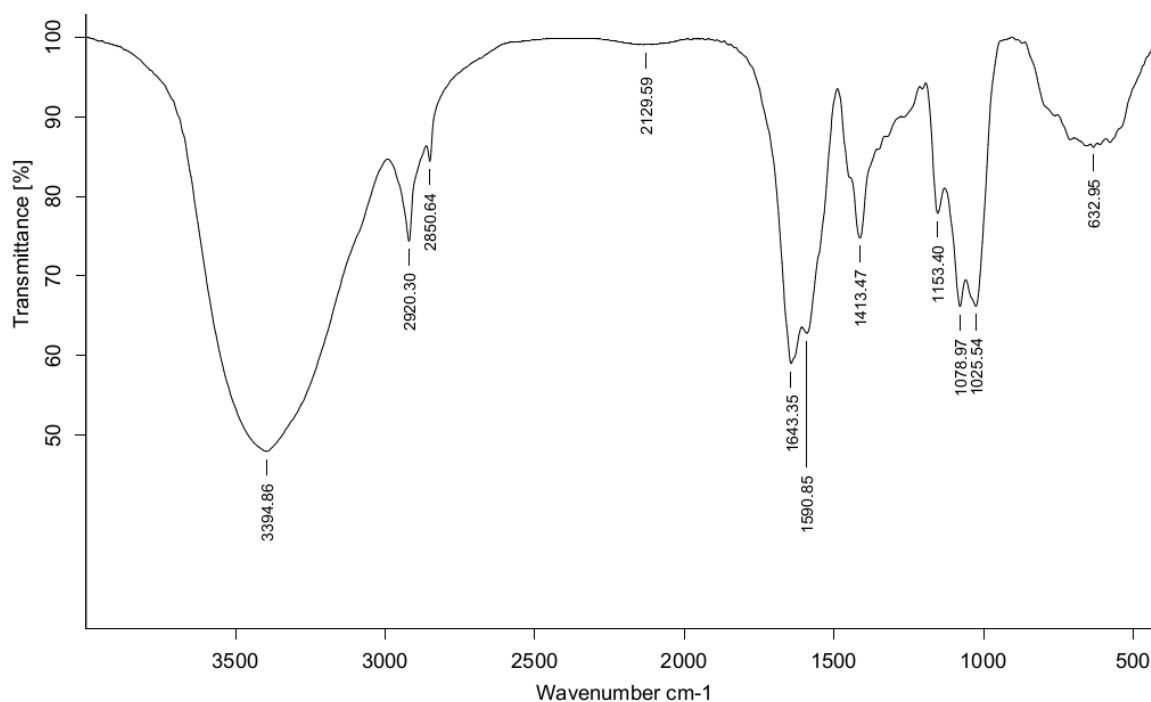
3.3 ผลการเตรียมพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดนางฟ้า (BPEG) และผลการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของตัวอย่างด้วยเทคนิค FT-IR

เมื่อนำเห็ดนางฟ้ามาสกัดด้วยน้ำร้อน และกำจัดโปรตีนออกด้วย Sevag reagent ขั้นตอนสุดท้ายได้ตะกอนมีลักษณะสีน้ำตาลอ่อน จำนวน 0.37 กรัม ซึ่งการเตรียมพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธีการนี้ ทำให้ส่วนที่เป็นเบตา-กลูแคนถูกสกัดออกมาอยู่ในสารละลาย และเมื่อทำการกำจัดโปรตีนด้วย Sevag reagent ทำให้ปริมาณโปรตีนในพอลิแซ็กคาไรด์ลดลงและปริมาณคาร์โบไฮเดรตเพิ่มขึ้นเป็น 93.5% ดังตารางที่ 3.1 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าพอลิแซ็กคาไรด์มีความบริสุทธิ์มากขึ้น

ตารางที่ 3.1 ปริมาณโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตที่ได้จากขั้นตอนการสกัด

องค์ประกอบ	หลังจากสกัดด้วยน้ำร้อน (%)	หลังจากสกัดด้วย Sevag (%)
โปรตีน	7	2
คาร์โบไฮเดรต	56	93.5

ผลการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของตัวอย่างด้วยเทคนิค FT-IR โดยการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันมีจุดประสงค์เพื่อบ่งชี้ถึงเบตา-กลูแคนที่อยู่ในสารสกัด ผลการตรวจสอบพบว่าสารตัวอย่างดูดกลืนรังสีในหลายตำแหน่ง เช่น ที่ตำแหน่ง 1078 cm^{-1} แสดงถึงการมี β -(1 \rightarrow 3)-glucans (Satitmanwivat *et al.*, 2012) และที่ตำแหน่ง 1153 cm^{-1} พบว่าเป็นตำแหน่งของน้ำตาลฟรุกโทส (Gutiérrez *et al.*, 1996) อีกทั้งยังพบ β -(1 \rightarrow 4)-glucans ที่ตำแหน่ง 1025 cm^{-1} (Satitmanwivat *et al.*, 2012; Galichet *et al.*, 2001) แสดงให้เห็นถึงการมีองค์ประกอบที่เป็นเซลลูโลสอยู่ในสารสกัด นอกจากนี้มีรายงานว่าตำแหน่งที่ 1150 - 1160 cm^{-1} เป็น C-O-C stretching ของพันธะไกลโคซิดิก อีกทั้งพบการสั่นสะเทือนแบบ stretching ของหมู่แอลคิล (C-H) ซึ่งมาจากโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคส และหมู่ไฮดรอกซิล (O-H) ที่แสดงถึงการจับกันของสายพอลิแซ็กคาไรด์ที่ตำแหน่ง 2920 และ 3394 cm^{-1} ตามลำดับ (Synytsya *et al.*, 2009) และรายงานการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า การดูดกลืนรังสีของเบตา-กลูแคนมักพบที่ตำแหน่งและบริเวณใกล้เคียงกับตำแหน่ง 1376 , 1317 , 1162 , 1100 , 1080 , 1040 และ 990 cm^{-1} และตำแหน่งของพอลิแซ็กคาไรด์พบที่ตำแหน่ง 1458 - 1464 , 1363 - 1371 , 1258 - 1267 , 1118 - 1131 , 1074 - 1084 และ 1040 - 1048 cm^{-1} นอกจากนี้ตัวอย่างที่สกัดได้พบว่ามี การสั่นสะเทือนของหมู่ฟังก์ชันที่แสดงถึงโปรตีนชนิด amind I ที่ตำแหน่ง 1590 และ 1643 cm^{-1} ซึ่งตำแหน่งของโปรตีนที่พบมีการทับซ้อนกับตำแหน่งของน้ำใกล้กับบริเวณตำแหน่ง 1640 cm^{-1} ดังภาพที่ 3.8 จากองค์ประกอบต่าง ๆ ที่พบจะเห็นได้ว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้ยังคงมีองค์ประกอบชนิดอื่นปนอยู่ด้วย (Synytsya *et al.*, 2009; Satitmanwivat *et al.*, 2012)



ภาพที่ 3.8 ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FT-IR ของตัวอย่าง BPEG พบ β -(1 \rightarrow 3)-glucans ที่ตำแหน่ง 1078 cm^{-1}

3.4 ผลการกระตุ้นการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 โดย BPEG

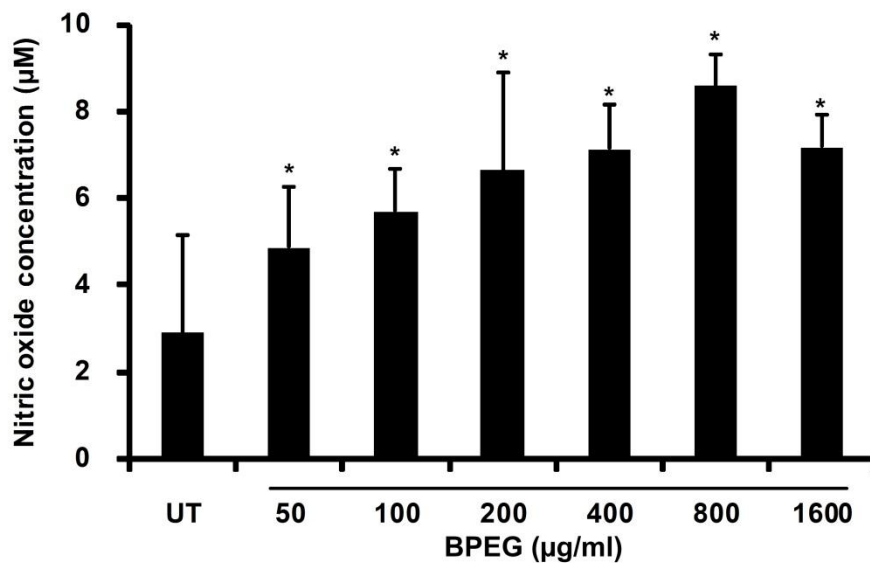
เนื่องด้วยผลการทดสอบการผลิตไนตริกออกไซด์โดยการกระตุ้นของ purified soluble β -glucan ไม่สามารถกระตุ้นให้เซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 ให้ผลิตไนตริกออกไซด์ได้ ผู้วิจัยจึงทำการทดสอบโดยใช้ BPEG ในการกระตุ้นการเหนี่ยวนำการสร้างไนตริกออกไซด์ จากการทดลองพบว่า ที่ความเข้มข้นสูงขึ้นสารสกัดดังกล่าวมีความสามารถในการกระตุ้นการสร้างไนตริกออกไซด์ในระดับต่ำมากถึงแม้ว่าจะมีนัยสำคัญก็ตาม (ภาพที่ 3.9)

โดยทั่วไปแล้ว soluble β -glucan ไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิด inflammatory responses ในเซลล์แมคโครฟาจได้ ตัวอย่างเช่น เบตา-กลูแคนชนิดเลนติแนนที่สกัดโดยวิธี sonication หรือ LNT ไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 อีกทั้งสามารถยับยั้งการสร้าง iNOS และ $\text{TNF-}\alpha$ ในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นโดย LPS (Xu X *et al.*, 2012; Xu X *et al.*, 2011) นอกจากนี้เบตา-กลูแคนที่ได้มาจากข้าวบาร์เลย์สามารถลดระดับของการสร้างไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจอีกด้วย (Yang JL, 2008) ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะทำการกระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 ร่วมกับ LPS จากผลการทดลองในภาพที่ 3.10 พบว่า BPEG ที่ความเข้มข้น 1,000

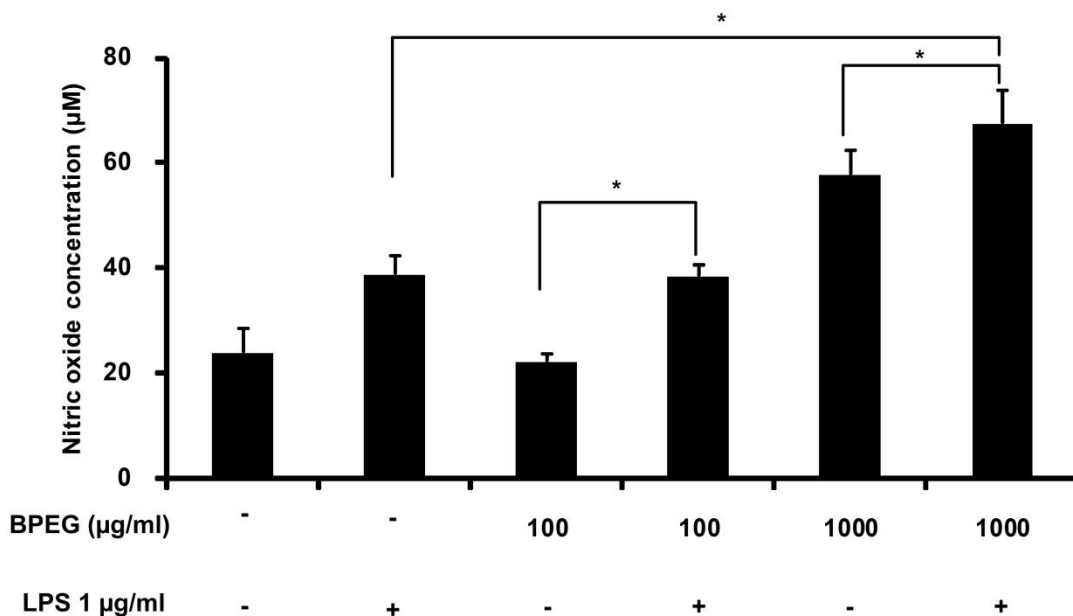
ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถเพิ่มระดับการกระตุ้นการสร้างไนตริกออกไซด์โดยเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย LPS ได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น ในขณะที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ไม่สามารถกระตุ้นเซลล์ร่วมกับ LPS ได้ ผลการทดลองนี้จึงไม่เป็นที่ชัดเจนว่า BPEG สามารถกระตุ้นการสร้างไนตริกออกไซด์ควบคู่กับ LPS ได้

เมื่อพิจารณาระดับของไนตริกออกไซด์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบว่า มีระดับที่ต่ำมาก ๆ เมื่อเทียบกับการทดลองผ่านมา เช่นในภาพที่ 3.6 ผู้วิจัยจึงได้ตั้งสมมติฐานว่า LPS อาจมีการเสื่อมประสิทธิภาพ จึงได้ขอความอนุเคราะห์ LPS จากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ เพื่อนำมาใช้เปรียบเทียบการทดลอง ซึ่งจากการทดลองพบว่า LPS ทั้งสองชนิดมีการกระตุ้นให้ผลิตไนตริกออกไซด์ในระดับที่ต่ำมากเหมือนกันดังแสดงในภาพที่ 3.11 ดังนั้น LPS จึงไม่น่าจะเป็นปัญหาในการทดลอง

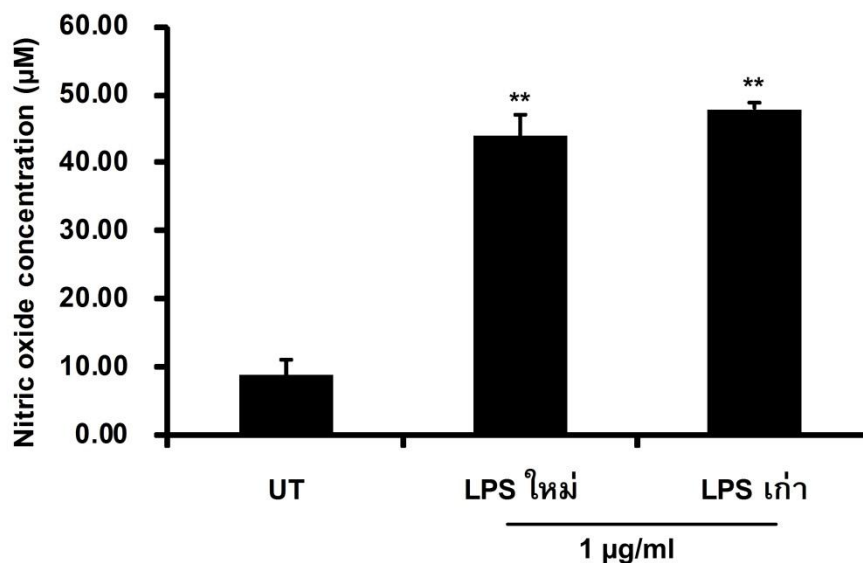
และเนื่องจากการทดลองดังกล่าว ความผิดปกติไม่ได้อยู่ที่ LPS จึงนำมาสู่การทดสอบเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด cDMEM และชนิด RPMI เนื่องจากมีการใช้อาหาร RPMI ในการเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 ในบางรายงาน (Sosroseno *et al.*, 2002; Seo *et al.*, 2001) ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการทดสอบโดยใช้ LPS ที่ความเข้มข้น 3.9, 7.8, 15.6, 31.25, 62.5, 125 และ 250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบว่าระดับการผลิตไนตริกออกไซด์อยู่ในระดับที่ต่ำมากแม้ว่าจะเพิ่มความเข้มข้นของ LPS ก็ตาม ซึ่งการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 ไม่ตอบสนองต่อความเข้มข้นของ LPS ที่เพิ่มขึ้นในอาหารทั้งสองชนิด (ไม่ได้แสดงผล) และถึงแม้ว่าจะนำเซลล์ที่แบ่งเก็บไว้ (original cells) มาทดสอบใหม่พบว่า ผลการทดลองที่ได้ยังคงเหมือนเดิม นั่นคือ เซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 ไม่ตอบสนองต่อ LPS ซึ่งใช้เป็นชุดควบคุมสำหรับการทดลอง (ไม่ได้แสดงผล)



ภาพที่ 3.9 ผลของ BPEG ต่อเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 พบว่ามีการกระตุ้นให้เซลล์ผลิตไนตริกออกไซด์ในระดับต่ำมากเมื่อเทียบกับ UT หลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้เซลล์ 350,000 cells/well ความแตกต่างทางสถิติวิเคราะห์โดยใช้ Two-tailed Student's T-test (* คือ $P < 0.05$) โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม UT



ภาพที่ 3.10 ผลของ BPEG เมื่อบ่มร่วมกับ LPS พบว่า BPEG ที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีการกระตุ้นให้เซลล์ผลิตไนตริกออกไซด์ เมื่อเทียบกับ LPS หลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้เซลล์ 350,000 cells/well ความแตกต่างทางสถิติวิเคราะห์โดยใช้ Two-tailed Student's T-test (* คือ $P < 0.05$)



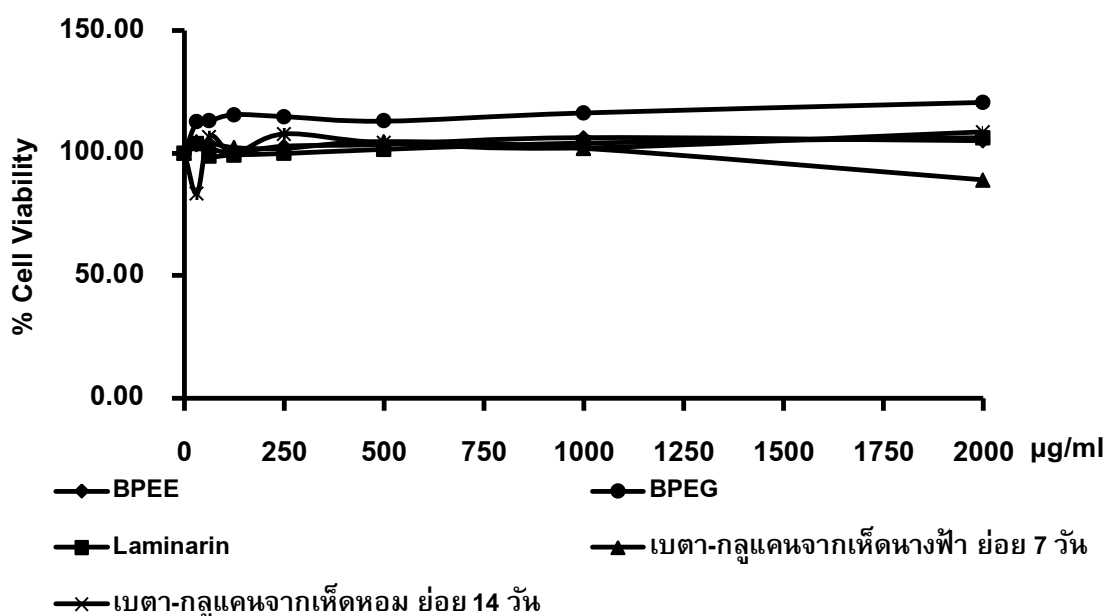
ภาพที่ 3.11 ทดสอบประสิทธิภาพของ LPS พบว่าทั้งสองแหล่งไม่แตกต่างกัน นั่นคือ ระดับการกระตุ้นการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 ใกล้เคียงกัน หลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความแตกต่างทางสถิติวิเคราะห์โดยใช้ Two-tailed Student's T-test (** คือ $P < 0.001$) โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม UT

ผลการทดสอบทั้งหมดพบว่า อาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ รวมไปถึงสมมติฐานที่ว่า LPS เสื่อมประสิทธิภาพไม่เป็นจริง ทำให้สรุปได้ว่าปัญหาเกิดจากตัวเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7 ซึ่งปกติระดับไนตริกออกไซด์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS จะอยู่ที่ 80 ไมโครโมลาร์ ซึ่งทำให้ไม่สามารถระบุได้แน่ชัดว่า BPEG ที่ใช้นำมาทดสอบมีการกระตุ้นเซลล์ได้หรือไม่ แต่จากงานวิจัยของ Carbonero และคณะ ที่สกัดเห็ดนางฟ้าด้วยน้ำร้อนและน้ำเย็นพบว่า มีปริมาณกลูโคสสูงถึงประมาณ 80% และยังคงมีน้ำตาลชนิดอื่นปนอยู่ด้วยแต่มีปริมาณน้อย และเมื่อทำการวิเคราะห์พบโครงสร้างชนิด β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan และเมื่อทดสอบกับเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 พบว่า สามารถกระตุ้นเซลล์ให้เพิ่มการสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์และไซโตไคน์ชนิด TNF- α และ IL-1 β ได้ (Carbonero *et al.*, 2012) เช่นเดียวกับกับ Satitmanwivat และคณะที่พบว่าเบตา-กลูแคนที่แยกได้จากฟรุตบอดี้ของเห็ดนางฟ้าสามารถกระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจชนิด J774A.1 ให้ผลิตไนตริกออกไซด์ได้ (Satitmanwivat *et al.*, 2012) นอกจากนี้ Volman และคณะพบว่า สารพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดมีผลต่อการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจชนิด BMM แต่ขึ้นอยู่กับโครงสร้างของพอลิแซ็กคาไรด์ กล่าวคือพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดจากฟรุตบอดี้ (cap, stem และ mycelium) ของ *Agaricus bisorus* และส่วนสปอร์ของ *G. lucidum* และ *Coprinus comatus* เพิ่มการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ แต่สำหรับพอลิแซ็กคาไรด์จากฟรุตบอดี้ของ *Agaricus blazei* Murill, *Phellinus linteus* และ *G. lucidum* ไม่สามารถ

เหนี่ยวนำการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจชนิด BMM ได้ (Volman *et al.*, 2010) จากการทดลองในส่วนของเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 จึงตั้งสมมติฐานได้ว่า หากเซลล์มีประสิทธิภาพ ดังนั้น BPEG จะสามารถกระตุ้นการผลิตไนตริกออกไซด์ได้เช่นกัน อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยได้เปลี่ยนทิศทางการทดลอง ซึ่งทดสอบการกระตุ้นของ BPEG ในการลดระดับน้ำตาลในเซลล์กล้ามเนื้อชนิด L6 แทน

3.5 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์กล้ามเนื้อชนิด L6 ของ BPEG

มีรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ใช้พอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดจากพืชชนิดหนึ่งพบว่า มีการกระตุ้นให้เซลล์กล้ามเนื้อชนิด L6 สามารถดูดซึมกลูโคสได้มากขึ้น (Liu *et al.*, 2012) และเพื่อทดสอบการกระตุ้นดังกล่าวจึงได้นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากเห็ดมาเริ่มทำการทดสอบความเป็นพิษ ผลการทดสอบความเป็นพิษของ BPEG และตัวอย่างเบตา-กลูแคนแต่ละชนิด โดยวิธี MTT assay โดยทดสอบความเข้มข้นของเบตา-กลูแคน ตั้งแต่ 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 และ 2,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบว่า เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ไม่แตกต่างกับเซลล์ชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเบตา-กลูแคน และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตไม่ต่ำกว่า 80% แสดงให้เห็นว่า เบตา-กลูแคนไม่เป็นพิษต่อเซลล์กล้ามเนื้อชนิด L6 ดังภาพที่ 3.12

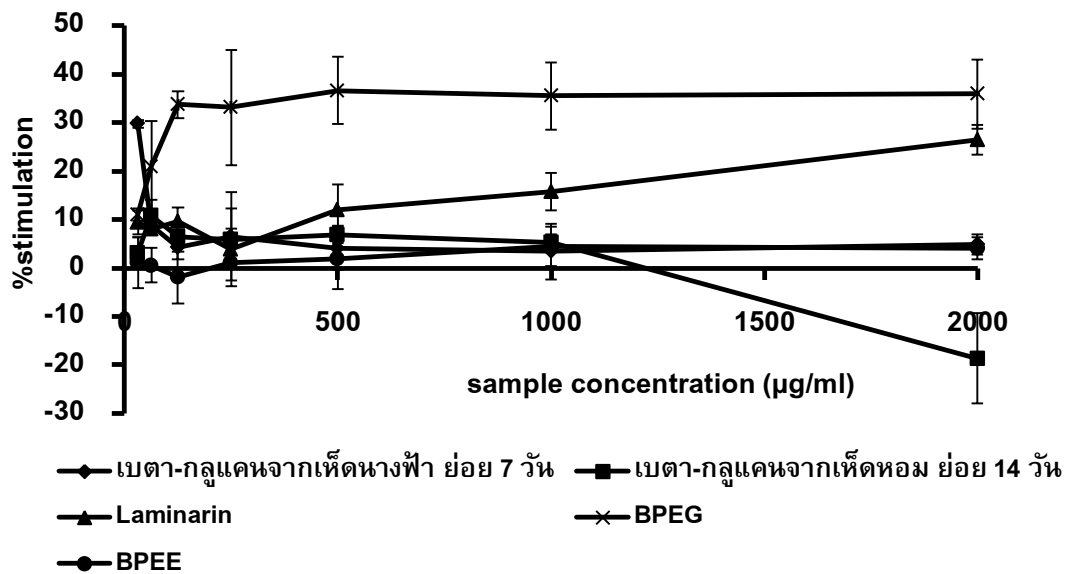


ภาพที่ 3.12 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์กล้ามเนื้อชนิด L6 ของสารสกัดแต่ละชนิด พบว่า สารสกัดแต่ละชนิดไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ หลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เทียบกับค่าเฉลี่ยในการทดสอบทั้ง 3 ครั้ง (mean \pm SD)

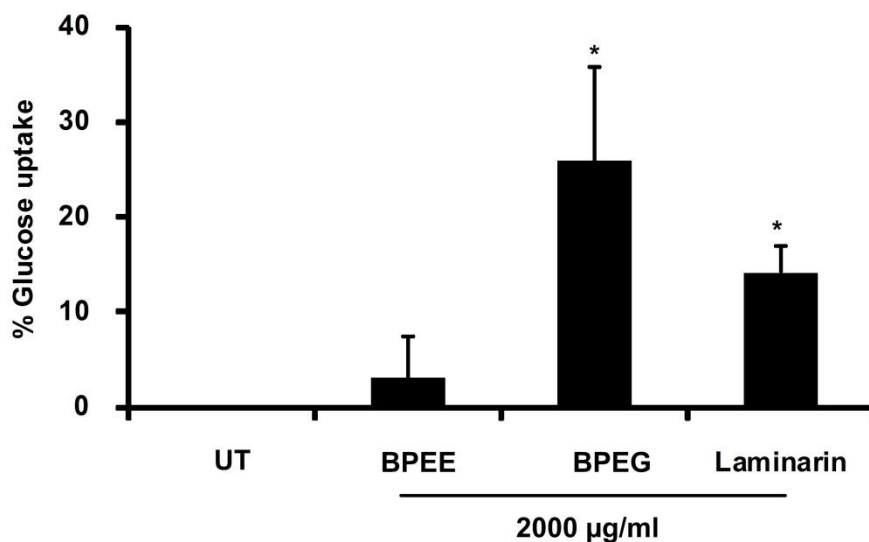
3.6 ผลการกระตุ้นการนำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อชนิด L6 โดย

BPEG

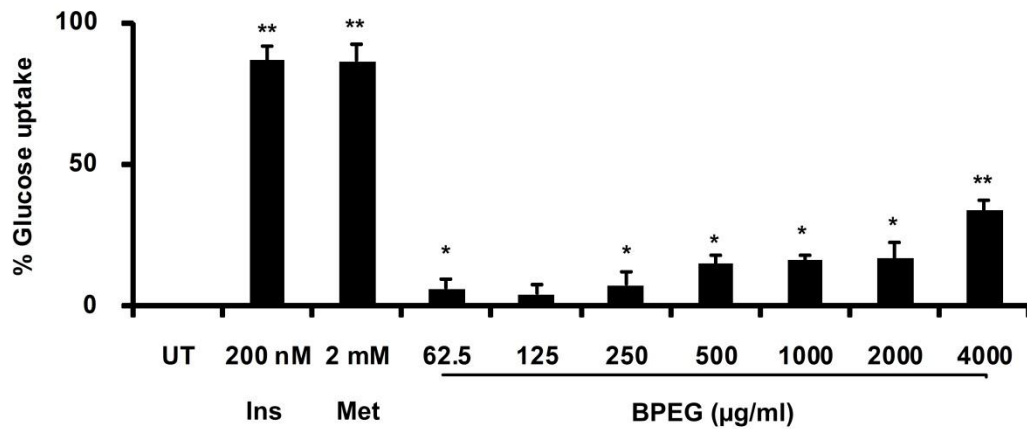
ผลการทดสอบความเป็นพิษของเบตา-กลูแคนแต่ละชนิดต่อเซลล์พบว่า ไม่เป็นพิษต่อเซลล์กล้ามเนื้อชนิด L6 ดังนั้นจึงอาจมีประสิทธิภาพในการกระตุ้นให้มีการนำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ได้ สำหรับการทดสอบเบื้องต้นของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากเห็ดนางฟ้าหรือ BPEG รวมไปถึงเบตา-กลูแคนจากแหล่งต่าง ๆ พบว่า BPEG และ laminarin มีฤทธิ์ในการกระตุ้นให้มีการดูดซึมน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ได้โดยเฉพาะความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ของ laminarin มีการกระตุ้นสูงสุด ส่วน BPEG พบว่า การกระตุ้นไม่ต่างกันมากนักที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 500 – 2,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ดังภาพที่ 3.13 และเมื่อนำผลการทดสอบ BPEG พอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดหูหนู (BPEE) และ laminarin ที่ความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มาเขียนเป็นกราฟแบ่งพบว่า BPEG และ laminarin มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการนำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่ตัวกระตุ้น คิดเป็น 26% ดังแสดงในภาพที่ 3.14 จากผลการทดลองดังกล่าวจึงนำมาสู่การทดสอบ BPEG ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 62.5, 125, 250, 500, 1,000, 2,000 และ 4,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เทียบกับ positive control ที่เป็นอินซูลิน (Ins) และเมทฟอร์มิน (Met) พบว่า เหนือความเข้มข้น 62.5, 250, 500, 1,000, 2,000 และ 4,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร กระตุ้นให้เซลล์นำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่ตัวกระตุ้น คิดเป็น 6, 7, 15, 16, 17 และ 34% ตามลำดับ ดังภาพที่ 3.15 ผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า BPEG มีผลต่อการกระตุ้นเซลล์กล้ามเนื้อชนิด L6 ผ่านโปรตีนต่าง ๆ ที่อยู่ภายในเซลล์ ซึ่งอาจจะเป็น IRS-1 ที่ทำหน้าที่ส่งสัญญาณให้กับ PI3K/Akt อย่างเป็นลำดับ ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของ GLUT4 ที่ผิวเซลล์ ส่งผลให้มีการดูดซึมน้ำตาลเข้าสู่เซลล์มากขึ้น หรืออาจเกิดจากการทำงานผ่านทาง AMPK ที่สามารถส่งสัญญาณให้กับ Akt ได้เช่นกัน ดังนั้นเพื่อต้องการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับกลไกการทำงานภายในเซลล์กล้ามเนื้อชนิด L6 จึงได้ทดสอบ BPEG กับตัวยับยั้ง (inhibitor) ชนิดต่าง ๆ พบว่า ตัวยับยั้งชนิด CHX, SB และ WM มีผลทำให้การนำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ BPEG 4,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยการกระตุ้นของ CHX, Rapa, PD, com.C, SB, WM คิดเป็น 25, 26, 51, 24, 14, 12% ตามลำดับ ดังภาพที่ 3.16 ดังนั้นจึงอาจบอกได้เพียงเบื้องต้นเกี่ยวกับกลไกการทำงานของเซลล์กล้ามเนื้อชนิด L6 ที่ถูกกระตุ้นด้วย BPEG สำหรับในอนาคตยังต้องศึกษาเกี่ยวกับกลไกการทำงานของเซลล์ในเชิงลึกต่อไป



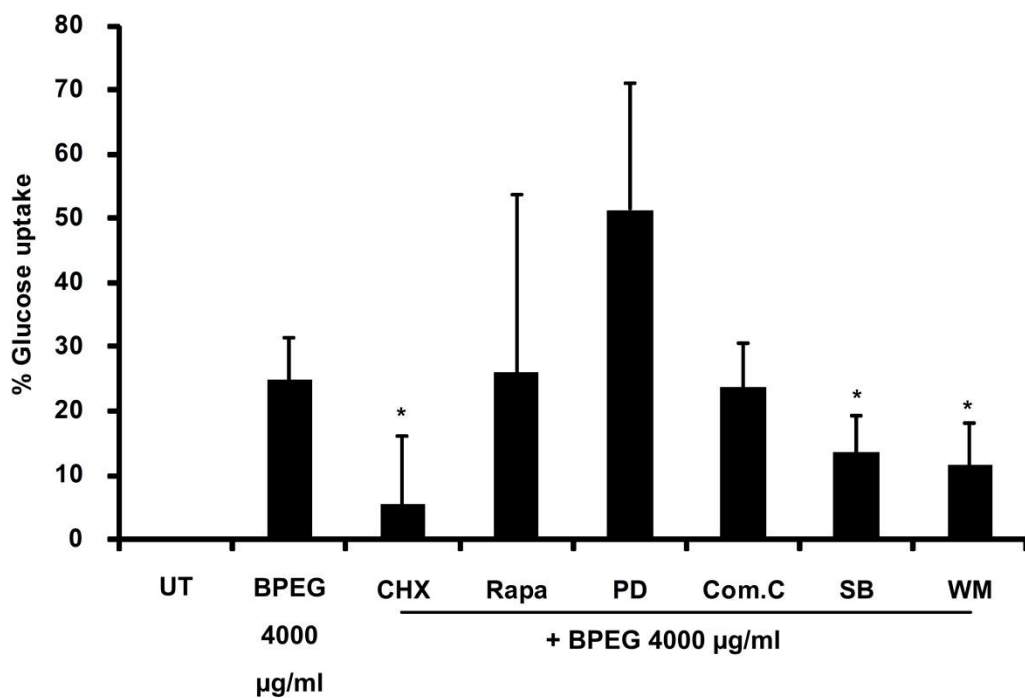
ภาพที่ 3.13 ผลการทดสอบการนำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อชนิด L6 พบว่าที่ความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัม/มิลลิเมตร ของ BPEG และ laminarin มีแนวโน้มกระตุ้นเซลล์ได้หลังจากบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (mean ± SD)



ภาพที่ 3.14 ผลของ BPEG BPEE และ laminarin ต่อเซลล์กล้ามเนื้อชนิด L6 พบว่า ที่ความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัม/มิลลิเมตร ของ BPEG สามารถกระตุ้นการนำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อชนิด L6 ได้ หลังจากบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ความแตกต่างทางสถิติวิเคราะห์โดยใช้ Two-tailed Student's T-test (* คือ $P < 0.05$) โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม UT



ภาพที่ 3.15 ผลของ BPEG ต่อเซลล์กล้ามเนื้อชนิด L6 พบว่า ที่ความเข้มข้น 4,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถกระตุ้นเซลล์ได้คิดเป็น 34% เมื่อเทียบกับชุดควบคุมหลังจากบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ความแตกต่างทางสถิติวิเคราะห์โดยใช้ Two-tailed Student's T-test (* คือ $P < 0.05$, ** คือ $P < 0.001$) โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม UT



ภาพที่ 3.16 ผลการทดสอบ BPEG ร่วมกับตัวยับยั้งชนิดต่าง ๆ พบว่า ตัวยับยั้งชนิด CHX, SB และ WM มีผลทำให้การนำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ หลังจากบ่ม BPEG กับ inhibitor แต่ละชนิดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความแตกต่างทางสถิติวิเคราะห์โดยใช้ Two-tailed Student's T-test (* คือ $P < 0.05$) โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (BPEG 4,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การเตรียมพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดนางฟ้า (BPEG)

การศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นขั้นตอนของการเตรียมสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ให้บริสุทธิ์มากขึ้นโดยการทำ gel-permeation chromatography เพิ่มเติมหลังจากการแยกสารผ่านเยื่อซึ่งพบว่า fraction ที่เก็บได้ส่วนหนึ่งเป็น soluble glucan และอีกส่วนพบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวชนิดอื่นด้วย (Pramanik *et al.*, 2005; Roy *et al.*, 2008) แสดงให้เห็นว่า ในส่วนของพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้ยังคงมีน้ำตาลชนิดอื่นปนอยู่ ซึ่งนอกจากจะมีน้ำตาลชนิดอื่นแล้วยังคงมีองค์ประกอบอื่นอยู่ด้วย เช่น โปรตีน โดยการทดลองของ Satitmanwivat และคณะที่ทำการสกัดองค์ประกอบที่เป็น α -glucan-protein complex จากเห็ดนางฟ้าพบว่า มีปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ 82% และโปรตีน 13% (Satitmanwivat *et al.*, 2011) นอกจากนี้ Satitmanwivat และคณะได้ทำการสกัดเบตา-กลูแคนจากเห็ดนางฟ้าด้วยวิธีการที่คล้ายคลึงกัน กล่าวคือ ใช้น้ำร้อนในการสกัด (120°C) จากนั้นนำส่วนใสมากำจัดโปรตีนด้วย Sevag reagent ได้ออกมาเป็นสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดหนียวพบว่า เมื่อทำการสกัดเพิ่มเติมจนได้ส่วนที่เป็นเบตา-กลูแคนบริสุทธิ์โดยใช้เอนไซม์ xylanase และ cellulose ปริมาณของเบตา-กลูแคนใน crude polysaccharide เพิ่มขึ้นจาก 44.9% เป็น 54.6% หรือเพิ่มขึ้นจากเดิมเกือบ 10% (Satitmanwivat *et al.*, 2012) ซึ่งเป็นไปได้ว่า องค์ประกอบที่เป็นน้ำตาลชนิดอื่นถูกกำจัดออกไป อีกทั้งเนื่องจากผนังเซลล์ของเห็ดมีโครงสร้างหลายชั้นซึ่งกลูแคนบางชนิดจะจับอยู่กับโปรตีนกลายเป็นโครงสร้างที่ซับซ้อน โดยโครงสร้างที่ซับซ้อนนี้จะจับอยู่กับเซลลูโลสกลายเป็นองค์ประกอบที่ใหญ่ขึ้น ซึ่งการจะแยกกลูแคนออกจากโครงสร้างเหล่านี้จึงต้องใช้เอนไซม์ แต่เนื่องจากข้อจำกัดทางทรัพยากรและเวลา ดังนั้นจึงไม่ได้ทำการสกัดให้มีความบริสุทธิ์และไม่ได้ทดสอบปริมาณของเบตา-กลูแคนในสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ อย่างไรก็ตาม Kanagasabapathy และคณะได้ทำการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดนางฟ้าด้วยวิธีการที่คล้ายคลึงกันและพบว่า มีปริมาณของเบตา-กลูแคนอยู่ในสารสกัดคิดเป็น 80% (Kanagasabapathy *et al.*, 2012) และนอกจากนี้ยังมีรายงานว่าพบ β -(1 \rightarrow 3) และ β -(1 \rightarrow 6)-D-glucan ในพอลิแซ็กคาไรด์ของเห็ดชนิด *P. ostreatus* และ *P. eryngii* (Synytsya *et al.*, 2009) ดังนั้นในการทดสอบด้วย FT-IR จึงสามารถบอกได้ว่าพบเบตา-กลูแคนอยู่ในสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ อย่างไรก็ตามในอนาคตมีความสนใจในการทำให้ crude polysaccharide จากเห็ดนางฟ้ามีความบริสุทธิ์มากขึ้น โดยการ

กำจัดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวชนิดอื่นรวมไปถึงการทดสอบปริมาณเบตา-กลูแคนที่สามารถสกัดได้ และจากการศึกษาของ Mizuno และคณะพบว่า การแยกพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากการสกัดด้วยกรดใช้วิธีการทำ ion-exchange chromatography ผ่าน DEAE-cellulose จากนั้นจึงทำ filtration และ affinity chromatography เพื่อแยก β -glucan (ส่วนที่ไม่อยู่ใน fraction) ออกจาก α -glucan (ส่วนที่อยู่ใน fraction) (Mizuno *et al.*, 1999)

นอกจากนี้ Manzi และ Pizzoferrato พบว่า เห็ดในตระกูล *Pleurotus* บางสายพันธุ์มีเบตา-กลูแคนกระจายตัวอยู่ในส่วนที่ไม่ละลายน้ำมากกว่าส่วนที่ละลายน้ำได้ (Manzi and Pizzoferrato, 2000) ดังตารางที่ 4.1 แตกต่างจากเห็ดหอมที่พบเบตา-กลูแคนอยู่ในส่วนที่ละลายน้ำได้มากกว่า ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองที่ผ่านมา นั่นคือส่วนที่ละลายน้ำได้จะมีประสิทธิภาพดีกว่าส่วนอนุภาค ดังนั้นในอนาคตการเปรียบเทียบปริมาณเบตา-กลูแคนทั้งสองส่วนของเห็ดนางฟ้าอาจต้องมีการทดสอบเพิ่มเติม

ตารางที่ 4.1 ปริมาณเบตา-กลูแคน (%) อยู่ในส่วนละลายน้ำและส่วนที่ไม่ละลายน้ำ ข้อมูลดัดแปลงจาก Manzi และ Pizzoferrato (Manzi and Pizzoferrato, 2000)

ชนิดเห็ด	เบตา-กลูแคนในส่วนละลายน้ำ (water-soluble β -glucan)	เบตา-กลูแคนในส่วนที่ไม่ละลายน้ำ (water-insoluble β -glucan)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	37.8%	62.2%
<i>Pleurotus eryngii</i>	16.8%	83.2%
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	8.7%	81.3%
<i>Lentinus edodes</i>	46.%	53.9%

4.2 การกระตุ้นของ alkaline insoluble β -glucan-containing crude extract และ β -glucan-containing polysaccharide extract จากเห็ดนางฟ้าต่อเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7

จากการศึกษาที่ผ่านมา Chang และคณะได้ทำการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดชนิด *Phellinus baumii* (PBP) และทดสอบกับเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 พบว่าสามารถลดระดับการผลิตไนตริกออกไซด์ที่เกิดจากการกระตุ้นของ LPS (Chang *et al.*, 2007) นอกจากนี้ Tomassen และคณะทำการสกัดเลนติแนน [β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan] จากเห็ดหอมด้วยวิธีการเดียวกันพบว่า สารสกัดดังกล่าวสามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ที่เกิดจากการ

เหนียวนาของ LPS ในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 ได้เช่นเดียวกัน (Tomassen *et al.*, 2011) การทดลองของ Ji และคณะที่ใช้พอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดหลินจือ (*G. lucidum*) กับเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์ดังกล่าวมีฤทธิ์กระตุ้นให้เซลล์ผลิตไนโตรริกออกไซด์รวมไปถึงกระตุ้นการผลิตไซโตไคน์ต่าง ๆ (Ji *et al.*, 2007) Carbonero และคณะพบว่า โครงสร้างชนิด (1→3), (1→6)-linked- β -glucan ที่พบในเห็ดนางฟ้าเป็นส่วนที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อระบบภูมิคุ้มกันในการกระตุ้นการสร้างไนโตรริกออกไซด์ของเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 (Carbonero *et al.*, 2012) รวมถึงพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากเห็ดชนิดอื่นก็มีผลในการเหนี่ยวนำการสร้างไนโตรริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจเช่นกัน (Kim *et al.*, 2004; Yeon *et al.*, 2008) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าพอลิแซ็กคาไรด์ดังกล่าวมีโครงสร้างที่ไม่ซับซ้อนหรืออาจมีองค์ประกอบอื่นเหลืออยู่เพียงเล็กน้อย ซึ่งการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่อยู่ในเห็ดโดยใช้น้ำร้อนและทำการตกตะกอนด้วยเอทานอลมีรายงานว่า สามารถกระตุ้นการสร้างไนโตรริกออกไซด์ได้ (Volman *et al.*, 2010) ดังนั้นการศึกษาในขั้นตอนนี้ผู้วิจัยได้มุ่งเน้นการกระตุ้นการสร้างไนโตรริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจเป็นหลัก ซึ่งจากการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรริกออกไซด์ที่ถูกกระตุ้นด้วย alkaline insoluble β -glucan-containing crude extract จากเห็ดนางฟ้าพบว่า ไม่สามารถกระตุ้นให้เซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 ผลิตไนโตรริกออกไซด์ได้ รวมถึงไม่มีผลในการลดระดับหรือยับยั้งการผลิตไนโตรริกออกไซด์ที่เกิดจากการกระตุ้นของ LPS ทั้งนี้อาจเป็นเพราะโครงสร้างของสารสกัดที่ได้ไม่เหมือนกับการศึกษาที่ผ่านมา อีกทั้งอาจเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่จึงอาจส่งผลให้การเข้าจับกันของ (1→3)- β -glucan กับตัวรับถูกรบกวน

ในส่วนของ BPEG นั้นผลการทดลองยังไม่ชัดเจน สารสกัดดังกล่าวอาจจะมีความสามารถในการกระตุ้นการผลิตไนโตรริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจ เนื่องจากเกิดปัญหาที่ตัวเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 ทำให้เมื่อนำ BPEG มาทดสอบกับเซลล์จึงไม่แสดงฤทธิ์ในการกระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 จากปัญหาดังกล่าวและความซ้ำซ้อนของงานที่ตีพิมพ์ไปแล้ว (Satitmanwivat *et al.*, 2012; Carbonero *et al.*, 2012) ทำให้ผู้วิจัยตัดสินใจเปลี่ยนแนวทางการวิจัยมาศึกษาผลของสารสกัดดังกล่าวต่อเซลล์กล้ามเนื้อชนิด L6 แทน

นอกจากนี้พอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้เมื่อตรวจสอบพบว่า ยังมีองค์ประกอบอื่นปนอยู่ ถึงแม้จะพบ β -(1→3)-glucan ก็ตาม โดยเฉพาะโปรตีนที่พบว่ามีจับอยู่กับพอลิแซ็กคาไรด์ (Synytsya *et al.*, 2009; Leung *et al.*, 2006) ซึ่งการทำงานของเบตา-กลูแคนนั้นขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางโครงสร้าง เช่น ความยาวของสายโพลีเมอร์ โครงสร้างสามมิติ และน้ำหนักโมเลกุล (Graham *et al.*, 2006) เช่น เอนติแนนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ๆ จะมีความสามารถในการต้านมะเร็งได้สูง (Zhang *et al.*, 2005) เช่นเดียวกันหากเบตา-กลูแคนเป็นชนิดที่มีโซ่ข้าง β -(1→6) จะมีความสามารถในการต่อต้านมะเร็งได้มากขึ้น นอกจากนี้หากมีการเปลี่ยนแปลงทางเคมีโดยเกิดจากขั้นตอนการสกัดก็มีส่วนในการกระตุ้นการทำงานที่เพิ่มขึ้นด้วย เช่น การ

สกัดพอลิแซ็กคาไรด์จาก *P. ostreatus* ที่มี β -(1 \rightarrow 3)-linked-glucan เมื่อถูกทำให้เป็น carboxymethylated ปฏิกริยาการแทนที่หมู่ -OH บนกลูโคสด้วยหมู่คาร์บอกซีเมทิล (-CH₂COO⁻) จะแสดงคุณสมบัติเกี่ยวกับภูมิคุ้มกันโดยเฉพาะเพิ่มการทำหน้าที่กลืนกินมากขึ้น (Paulik *et al.*, 1996) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารเคมีที่นำมาใช้ในการสกัดนั้นส่งผลต่อการทำงานของพอลิแซ็กคาไรด์ได้

4.3 การกระตุ้นของ purified soluble β -glucan ต่อเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7

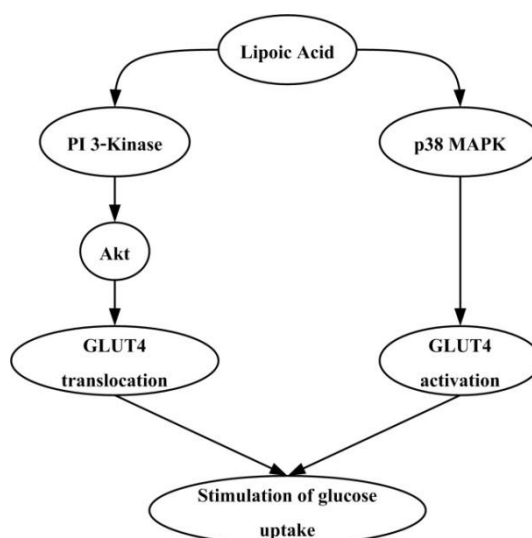
จากการวิเคราะห์ปริมาณไนตริกออกไซด์ที่ถูกกระตุ้นด้วย purified soluble β -glucan ต่อเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 โดยเมื่อเทียบกับการทดลองที่ไม่ได้ใส่ตัวกระตุ้นพบว่า purified soluble β -glucan สามารถกระตุ้นการสร้างไนตริกออกไซด์ได้ แต่เมื่อเทียบกับ positive control ถือว่ากระตุ้นได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้นหรือแทบจะไม่กระตุ้น ทั้งนี้เมื่อเทียบกับ alkaline insoluble β -glucan-containing crude extract มีแนวโน้มว่าจะกระตุ้นการผลิตไนตริกออกไซด์ได้มากกว่า เนื่องจาก purified soluble β -glucan ที่ได้ในขั้นตอนนี้ค่อนข้างมีความบริสุทธิ์และมีขนาดโมเลกุลเล็ก (มีขนาดน้อยกว่า 10 kD) และเมื่อตรวจสอบจึงพบว่ามีเบตา-กลูแคนทั้งชนิด β -(1 \rightarrow 3)-glucan และ β -(1 \rightarrow 6)-glucan ซึ่งตัวรับบนเซลล์ชนิด Dectin-1 มีความจำเพาะเจาะจงกับ β -(1 \rightarrow 3) และ/หรือ β -(1 \rightarrow 6)-glucans และมีหลักฐานที่บ่งชี้ว่า Dectin-1 มีความจำเพาะกับ β -(1 \rightarrow 3)-glucan ที่ต่ออยู่กับเป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์ (oligosaccharide) อย่างน้อย 10 ตัวขึ้นไป (Chen and Seviour, 2007) จึงทำให้การจับกันของตัวรับกับเบตา-กลูแคนเกิดขึ้นได้ เช่นเดียวกับการศึกษาที่ผ่านมา มีรายงานว่า ส่วนที่เป็น soluble β -glucan มีความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้มากกว่าส่วนที่เป็น insoluble β -glucan เนื่องจาก insoluble β -glucan อาจถูกย่อยให้มีขนาดโมเลกุลเล็กหลังจากถูกนำเข้าไปในร่างกาย นอกจากนี้มีการศึกษาส่วนที่เป็น soluble β -glucan พบว่ามีการเหนี่ยวนำให้มีการผลิต IFN γ ในหนู (Xiao *et al.*, 2004) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าเกิดจากผลการเข้าจับกันของเบตา-กลูแคนกับตัวรับมากกว่าที่จะเป็นการกลืนกินของเซลล์ (Di Luzio *et al.*, 1979)

4.4 การกระตุ้นของ BPEG ต่อเซลล์กล้ามเนื้อชนิด L6

เนื่องจากการทดสอบ BPEG กับเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 เกิดปัญหา อีกทั้งมีรายงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับเบตา-กลูแคนจากเห็ดต่อเซลล์แมคโครฟาจค่อนข้างมาก ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้เปลี่ยนเอา BPEG มาทดสอบกับเซลล์กล้ามเนื้อชนิด L6 แทน เนื่องจากยังไม่เคยมีการศึกษาวิจัยมาก่อน อีกทั้งมีการรายงานพบว่า พอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดนางฟ้าซึ่งมีปริมาณของเบตา-กลูแคนอยู่ค่อนข้างมากสามารถป้องกันการเกิดน้ำตาลในเลือดสูงในหนูที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารที่มีไขมันสูง (Kanagasabapathy *et al.*, 2012) นอกจากนี้เบตา-กลูแคนจากเห็ดที่สกัดด้วยน้ำร้อนพบว่า มีความสามารถในการต้านภาวะน้ำตาลในเลือดสูงรวมไปถึงภาวะที่มีโคเลสเตอรอลสูงในหนูที่เป็นเบาหวาน (Kim *et al.*, 2005) ดังนั้นการศึกษานี้จึงได้ทดสอบการดูดซึมกลูโคสในเซลล์กล้ามเนื้อชนิด L6 พบว่า BPEG ที่สกัดจากเห็ดนางฟ้าด้วยน้ำร้อนสามารถกระตุ้นให้เซลล์กล้ามเนื้อชนิด L6 ดูดซึมกลูโคสได้ อีกทั้งในการทดลองนี้ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบ laminarin และ BPEE ร่วมด้วยพบว่า laminarin และ BPEE สามารถกระตุ้นเซลล์กล้ามเนื้อชนิด L6 ให้ดูดซึมกลูโคสได้ แต่ BPEE ไม่มีฤทธิ์กระตุ้นการนำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าสารที่อยู่ใน BPEG ที่เป็นตัวทำหน้าที่ออกฤทธิ์คือเบตา-กลูแคน เช่นเดียวกับ Kanagasabapathy และขณะที่พบความสามารถในการลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูทดลองของเบตา-กลูแคนที่อยู่ในสารสกัด พอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดนางฟ้า (Kanagasabapathy *et al.*, 2012) แต่อย่างไรก็ตามกลไกการทำงานของพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดนางฟ้าต่อเซลล์กล้ามเนื้อชนิด L6 ยังไม่เป็นที่แน่ชัด แต่การทดลองก่อนหน้าที่ใช้พอลิแซ็กคาไรด์จากพืชชนิดหนึ่งพบว่า สามารถกระตุ้นให้เซลล์กล้ามเนื้อชนิด L6 ดูดซึมกลูโคสได้ผ่านทางกลไก AMPK/Akt (Liu *et al.*, 2012) ซึ่งการทำงานของ AMPK เกี่ยวข้องกับการควบคุมระดับน้ำตาลแต่การส่งสัญญาณภายในเซลล์ยังไม่ทราบแน่ชัด ถึงอย่างไรก็ตามมีการพบว่า Akt เป็นตัวรับสัญญาณต่อจาก AMPK ไปยังตัวขนส่งน้ำตาลเข้าเซลล์ชนิด GLUT 4 ซึ่งพบที่เนื้อเยื่อกล้ามเนื้อและเซลล์ไขมันให้เคลื่อนที่ไปอยู่ผนังเซลล์เพื่อให้สามารถดูดซึมกลูโคสได้มากขึ้น (Liu *et al.*, 2012) นอกจากนี้ Akt เกี่ยวข้องกับการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ การมีชีวิตของเซลล์ และการควบคุมระดับน้ำตาล (Hajduch *et al.*, 2001; Lawlor and Alessi, 2001)

ดังนั้นวิทยานิพนธ์นี้ได้ศึกษากลไกการทำงานของพอลิแซ็กคาไรด์ในเบื้องต้นโดยใช้ mTOR inhibitor (Rapa), MEK1/2 inhibitor (PD), AMPK inhibitor (com.C), protein synthesis inhibitor (CHX), p38 MAPK inhibitor (SB), PI3K (WM) พบว่า BPEG ที่มีการเติม CHX, SB และ WM ระดับการดูดซึมกลูโคสลดลงเมื่อเทียบกับ BPEG เพียงอย่างเดียว ดังนั้นการทำงานของ BPEG จึงน่าจะเกี่ยวข้องกับ PI3K และกลไกของ p38 MAPK (Chen and Raymond, 2008; Chen and Seviour, 2007) เนื่องจากตัวยับยั้งชนิด WM ยับยั้ง PI3K

โดยตรงและตามรายงานที่ผ่านมามีความสัมพันธ์ระหว่าง Akt เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของ ยีน GLUT4 และพบว่า p38 เป็นตัวส่งสัญญาณที่มีส่วนในการกระตุ้นการทำงานของ GLUT4 นั่นคือ เมื่อทำการยับยั้งการทำงานของ p38 พบว่า การดูดซึมกลูโคสลดลง (Niu *et al.*, 2003; Konrad *et al.*, 2001) เนื่องจาก p38 เป็นตัวควบคุมการสร้าง GLUT4 (Montessuit *et al.*, 2004) ดังภาพที่ 4.1 แสดงให้เห็นกลไกของ p38 MAPK และ PI3K ในการมีส่วนเกี่ยวข้องกับ GLUT4 (Konrad *et al.*, 2001) และจากรายงานการศึกษาที่ผ่านมามีพบว่า ตัวรับของอินซูลินที่ ติดอยู่กับโมเลกุลภายในเซลล์ชนิด IRS-1 และ PI3K เป็นตัวสำคัญในการส่งต่อสัญญาณการ ตอบสนองต่ออินซูลินในการทำให้ GLUT4 เกิดการโยกย้ายมาที่เยื่อหุ้มเซลล์ (Cong *et al.*, 1997) รวมถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่าง IRS และ PI3K จำเป็นต่อการกระตุ้นที่เหมาะสมเพื่อให้ เอนไซม์หรือโมเลกุลภายในเซลล์นั้นคือ Akt เคลื่อนไปหาเป้าหมาย (GLUT4 vesicles) ได้อย่าง ถูกต้อง (Pessin and Saltiel, 2000)



ภาพที่ 4.1 การกระตุ้นการดูดซึมกลูโคสของ lipoic acid โดยแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ PI3K และ p38 MAPK โดยโปรตีนทั้งสองชนิดนี้ต่างทำงานร่วมกันในการกระตุ้นการทำงานของ GLUT4 vesicle ให้เคลื่อนที่ไปยังเยื่อหุ้มเซลล์เพื่อเพิ่มการดูดซึมกลูโคสเข้าสู่เซลล์ (Konrad *et al.*, 2001)

ในอนาคตยังต้องมีการศึกษาเกี่ยวกับตัวรับที่มีการตอบสนองของเซลล์กล้ามเนื้อชนิด L6 ต่อบีตา-กลูแคน ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า บีตา-กลูแคนสามารถจับกับตัวรับได้หลายชนิด (Chen and Seviour, 2007) และนอกจากนี้ยังคงต้องมีการศึกษาเกี่ยวกับวิถีการทำงานของ BPEG ในการกระตุ้นการดูดซึมกลูโคสโดยเฉพาะการศึกษาเกี่ยวกับกลไกของ p38 MAPK และ PI3K อีกทั้งการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับ AMPK ในการตอบสนองต่อการดูดซึมน้ำตาลก็เป็นที่น่าสนใจเช่นกัน และจากรายงานวิจัยที่ผ่านมาใช้ 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside (AICAR) พบว่า สามารถกระตุ้น AMPK ให้เพิ่มการดูดซึมน้ำตาลได้ในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจและเซลล์กล้ามเนื้อ (Hayashi *et al.*, 1998; Russell *et al.*, 1999) โดย AMPK อาจมีความเกี่ยวข้องกับ p38 MAPK ซึ่งที่ผ่านการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนทั้งสองชนิดนี้มีน้อยมาก แต่ก็พบว่าอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกัน นอกจากนี้ Li และคณะรายงานว่า AMPK สามารถส่งเสริมการทำงานของ p38 MAPK ได้โดยไม่ผ่านกลไกของ PI3K (Li *et al.*, 2005) ดังนั้นการตรวจสอบว่าการกระตุ้นนี้เกี่ยวข้องกับ AMPK หรือไม่อาจต้องมีการทำ immunoblotting รวมไปถึงการตรวจสอบโปรตีนชนิดอื่นอาจต้องใช้วิธีการเดียวกันนี้ในการทดสอบเช่นกัน

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การศึกษากการเตรียม BPEG และผลการทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 และเซลล์กล้ามเนื้อชนิด L6 สามารถสรุปผลการทดลองดังนี้

1. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 และเซลล์กล้ามเนื้อชนิด L6 พบว่า BPEG ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ทั้งสองชนิด
2. Alkaline insoluble β -glucan-containing crude extract และ purified soluble β -glucan จากเห็ดนางฟ้าไม่มีฤทธิ์กระตุ้นให้เซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 สร้างไนตริกออกไซด์
3. BPEG สามารถกระตุ้นให้เซลล์กล้ามเนื้อชนิด L6 นำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ได้ (glucose uptake) แต่กลไกการทำงานยังคงต้องศึกษาต่อไปในอนาคต

รายการเอกสารอ้างอิง

- Adachi, Y., Okazaki, M., Ohno, N. and Yadomae, T. 1994. Enhancement of cytokine production by macrophages stimulated with (1→3)- β -D-glucan, grifolan (Grn), isolated from *Grifola frondosa*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 17(12): 1554-1560.
- Akramiene, D., Kondrotas, A., Didziapetriene, J. and Kevelaitis, E. 2007. Effects of β -glucans on the immune system. *Medicina (Kaunas)* 43(8): 597-606.
- Ariizumi, K., Shen, GL., Shikano, S., Xu, S., Ritter, R., Kumamoto, T., Edelbaum, D., et al. 2000. Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning. *Journal of Biological Chemistry* 275(26): 20157-20167.
- Assanasen, C., Mineo, C., Seetharam, D., Yuhanna, IS., Marcel, YL., Connelly, MA., Williams, DL., et al. 2005. Cholesterol binding, efflux, and a PDZ-interacting domain of scavenger receptor-BI mediate HDL-initiated signaling. *Journal of Clinical Investigation* 115(4): 969-977.
- Bonatti, M., Karnopp, P., Soares, HM. and Furlan, SA. 2004. Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes. *Food Chemistry* 88(3): 425-428.
- Brown, GD. 2005. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nature Reviews Immunology* 6(1): 33-43.
- Brown, GD. and Gordon, S. 2003. Fungal β -Glucans and mammalian immunity. *Immunity* 19(3): 311-315.
- Byeon, SE., Lee, J., Lee, E., Lee, SY., Hong, EK., Kim, YE. and Cho, JY. 2009. Functional activation of macrophages, monocytes and splenic lymphocytes by polysaccharide fraction from *Tricholoma matsutake*. *Archives of Pharmacal Research* 32(11): 1565-1572.
- Carbonero, ER., Ruthes, AC., Freitas, CS., Utrilla, P., Gálvez, J., da Silva, EV., Sasaki, GL., et al. 2012. Chemical and biological properties of a highly branched β -glucan from edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. *Carbohydrate Polymers* 90(2): 814-819.
- Chang, X., Jorgensen, AM., Bardrum, P. and Led, JJ. 1997. Solution structures of the R6 human insulin hexamer. *Biochemistry* 36(31): 9409-9422.

- Chang, ZQ., Oh, BC., Rhee, MH., Kim, JC., Lee, SP. and Park, SC. 2007. Polysaccharides isolated from *Phellinus baumii* stimulate murine splenocyte proliferation and inhibit the lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW264.7 murine macrophages. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23(5): 723-727.
- Chen, J. and Raymond, K. 2008. Beta-glucans in the treatment of diabetes and associated cardiovascular risks. *Vascular Health and Risk Management* 4(6): 1265-1272.
- Chen, J. and Seviour, R. 2007. Medicinal importance of fungal β -(1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 6)-glucans. *Mycological Research* 111(6): 635-652.
- Cong, LN., Chen, H., Li, Y., Zhou, L., McGibbon, MA., Taylor, SI. and Quon, MJ. 1997. Physiological role of Akt in insulin-stimulated translocation of GLUT4 in transfected rat adipose cells. *Molecular Endocrinology* 11(13): 1881-1890.
- Croan, SC. 2004. Conversion of conifer wastes into edible and medicinal mushrooms. *Forest Products Journal* 54(2): 68-76.
- Dennehy, KM., Ferwerda, G., Faro-Trindade, I., Pyz, E., Willment, JA., Taylor, PR., Kerrigan, A., et al. 2008. Syk kinase is required for collaborative cytokine production induced through Dectin-1 and Toll-like receptors. *European Journal of Immunology* 38(2): 500-506.
- Di Luzio, NR., Williams, DL., McNamee, RB., Edwards, BF. and Kitahama, A. 1979. Comparative tumor-inhibitory and anti-bacterial activity of soluble and particulate glucan. *International Journal of Cancer* 24(6): 773-779.
- Diniz, SN., Nomizo, R., Cisalpino, PS., Teixeira, MM., Brown, GD., Mantovani, A., Gordon, S., et al. 2004. PTX3 function as an opsonin for the dectin-1-dependent internalization of zymosan by macrophages. *Journal of Leukocyte Biology* 75(4): 649-656.
- Du, Z., Kelly, E., Mecklenbräuker, I., Agle, L., Herrero, C., Paik, P. and Ivashkiv, LB. 2006. Selective regulation of IL-10 signaling and function by zymosan. *The Journal of Immunology* 176(8): 4785-4792.
- Dubois, Mi., Gilles, KA., Hamilton, JK., Rebers, PA. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28(3): 350-356.

- Ebeling, P., Koistinen, HA. and Koivisto, VA. 1998. Insulin-independent glucose transport regulates insulin sensitivity. *FEBS Letters* 436(3): 301-303.
- Ensley, HE., Tobias, B., Pretus, HA., McNamee, RB., Jones, EL., Browder, IW. and Williams, DL. 1994. NMR spectral analysis of a water-insoluble (1→3)- β -D-glucan isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. *Carbohydrate Research* 258: 307-311.
- Evans, SE., Hahn, PY., McCann, F., Kottom, TJ., Pavlovic, ZV. and Limper, AH. 2005. Pneumocystis cell wall β -glucans stimulate alveolar epithelial cell chemokine generation through nuclear factor- κ b-dependent mechanisms. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 32(6): 490-497.
- Fang, X., Yu, SX., Lu, Y., Bast, RC., Woodgett, JR. and Mills, GB. 2000. Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase A. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(22): 11960-11965.
- Galichet, A., Sockalingum, GD., Belarbi, A. and Manfait, M. 2001. FTIR spectroscopic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: study of an anomalous strain exhibiting a pink-colored cell phenotype. *FEMS Microbiology Letters* 197(2): 179-186.
- Gantner, BN., Simmons, RM., Canavera, SJ., Akira, S. and Underhill, DM. 2003. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *Journal of Experimental Medicine* 197(9): 1107-1117.
- Gawronski, M., Park, JT., Magee, AS. and Conrad, H. 1999. Microfibrillar structure of PGG-glucan in aqueous solution as triple-helix aggregates by small angle x-ray scattering. *Biopolymers* 50(6): 569-578.
- Goodridge, HS., Simmons, RM. and Underhill, DM. 2007. Dectin-1 stimulation by *Candida albicans* yeast or zymosan triggers NFAT activation in macrophages and dendritic cells. *Journal of Immunology* 178(5): 3107-3115.
- Goodridge, HS., Wolf, AJ. and Underhill, DM. 2009. β -glucan recognition by the innate immune system. *Immunological Reviews* 230(1): 38-50.
- Graham, LM., Tsoni, SV., Willment, JA., Williams, DL., Taylor, PR., Gordon, S., Dennehy, K. and Brown, GD. 2006. Soluble Dectin-1 as a tool to detect β -glucans. *Journal of Immunological Methods* 314(1): 164-169.

- Green, SP., Hamilton, JA. and Phillips, WA. 1992. Zymosan-triggered tyrosine phosphorylation in mouse bone-marrow-derived macrophages is enhanced by respiratory-burst priming agents. *Biochemical Journal* 288(2): 427-432.
- Gross, O., Gewies, A., Finger, K., Schäfer, M., Sparwasser, T., Peschel, C., Förster, I. and Ruland, J. 2006. Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. *Nature* 442(7103): 651-656.
- Gutiérrez, A., Prieto, A. and Martínez, AT. 1996. Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by fungi from the genus *Pleurotus*. *Carbohydrate Research* 281(1): 143-154.
- Hajduch, E., Litherland, GJ. and Hundal, HS. 2001. Protein kinase B (PKB/Akt) – a key regulator of glucose transport. *FEBS Letters* 492(3): 199-203.
- Hayashi, T., Hirshman, MF., Kurth, EJ., Winder, WW. and Goodyear, LJ. 1998. Evidence for 5' AMP-activated protein kinase mediation of the effect of muscle contraction on glucose transport. *Diabetes* 47(8): 1369-1373.
- Ho, RC., Alcazar, O., Fujii, N., Hirshman, MF. and Goodyear, LJ. 2004. p38 γ MAPK regulation of glucose transporter expression and glucose uptake in L6 myotubes and mouse skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 286(2): R342-R349.
- Holmes, B. and Dohm, GL. 2004. Regulation of GLUT4 gene expression during exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 36(7): 1202-1206.
- Huang, C., Thirone, AC., Huang, X. and Klip, A. 2005. Differential contribution of insulin receptor substrates 1 versus 2 to insulin signaling and glucose uptake in L6 myotubes. *Journal of Biological Chemistry* 280(19): 19426-19435.
- Iwabuchi, K. and Nagaoka, I. 2002. Lactosylceramide-enriched glycosphingolipid signaling domain mediates superoxide generation from human neutrophils. *Blood* 100(4): 1454-1464.
- Jenkins, AL., Jenkins, DJ., Zdravkovic, U., Würsch, P. and Vuksan, V. 2002. Depression of the glycemic index by high levels of β -glucan fiber in two functional foods tested in type 2 diabetes. *European Journal of Clinical Nutrition* 56(7): 622-628.
- Ji, Z., Tang, Q., Zhang, J., Yang, Y., Jia, W. and Pan, Y. 2007. Immunomodulation of RAW264.7 macrophages by GLIS, a proteopolysaccharide from *Ganoderma lucidum*. *Journal of Ethnopharmacology* 112(3): 445-450.

- Kanagasabapathy, G., Kuppusamy, UR., Malek, SNA., Abdulla, MA., Chua, KH. and Sabaratnam, V. 2012. Glucan-rich polysaccharides from *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer prevents glucose intolerance, insulin resistance and inflammation in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 12(1): 261.
- Kashangura, C., Hallsworth, JE. and Mswaka, AY. 2006. Phenotypic diversity amongst strains of *Pleurotus sajor-caju*: implications for cultivation in arid environments. *Mycological Research* 110(3): 312-317.
- Kiho, T., Kobayashi, T., Morimoto, H., Usui, S., Ukai, S., Hirano, K., Aizawa, K. and Inakuma, T. 2000. Structural features of an anti-diabetic polysaccharide (TAP) from *Tremella aurantia*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin-Tokyo*-48(11): 1793-1795.
- Kim, GY., Choi, GS., Lee, SH. and Park, YM. 2004. Acidic polysaccharide isolated from *Phellinus linteus* enhances through the up-regulation of nitric oxide and tumor necrosis factor- α from peritoneal macrophages. *Journal of Ethnopharmacology* 95(1): 69-76.
- Kim, YW., Kim, KH., Choi, HJ. and Lee, DS. 2005. Anti-diabetic activity of β -glucans and their enzymatically hydrolyzed oligosaccharides from *Agaricus blazei*. *Biotechnology Letters* 27(7): 483-487.
- Konrad, D., Somwar, R., Sweeney, G., Yaworsky, K., Hayashi, M., Ramlal, T. and Klip, A. 2001. The antihyperglycemic drug α -lipoic acid stimulates glucose uptake via both GLUT4 translocation and GLUT4 activation potential role of p38 mitogen-activated protein kinase in GLUT4 activation. *Diabetes* 50(6): 1464-1471.
- Kurashige, S., Akuzawa, Y. and Endo, F. 1997. Effects of *Lentinus edodes*, *Grifola frondosa* and *Pleurotus ostreatus* administration on cancer outbreak, and activities of macrophages and lymphocytes in mice treated with a carcinogen, N-Butyl-N-butanolnitrosoamine. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 19(2): 175-183.
- Ladányi, A., Tímár, J. and Lapis, K. 1993. Effect of lentinan on macrophage cytotoxicity against metastatic tumor cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 36(2): 123-126.
- Lawlor, MA. and Alessi, DR. 2001. PKB/Akt a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses. *Journal of Cell Science* 114(16): 2903-2910.

- Lee, JY., Kim, JY., Lee, YG., Rhee, MH., Hong, EK. and Cho, JY. 2008. Molecular mechanism of macrophage activation by exopolysaccharides from liquid culture of *Lentinus edodes*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 18(2): 355-364.
- Leung, MY., Liu, C., Koon, JC. and Fung, KP. 2006. Polysaccharide biological response modifiers. *Immunology Letters* 105(2): 101-114.
- Li, J., Miller, EJ., Ninomiya-Tsuji, J., Russell, RR. and Young, LH. 2005. AMP-activated protein kinase activates p38 mitogen-activated protein kinase by increasing recruitment of p38 MAPK to TAB1 in the ischemic heart. *Circulation Research* 97(9): 872-879.
- Liu, J., Zhang, JF., Lu, JZ., Zhang, DL., Li, K., Su, K., Wang, J., et al. 2012. Astragalus polysaccharide stimulates glucose uptake in L6 myotubes through AMPK activation and AS160/TBC1D4 phosphorylation. *Acta Pharmacologica Sinica* 34(1): 137-145.
- Ljungman, AG., Leanderson, P. and Tagesson, C. 1998. (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan stimulates nitric oxide generation and cytokine mRNA expression in macrophages. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 5(4): 273-281.
- Lo, HC., Tsai, FA., Wasser, SP., Yang, JG. and Huang, BM. 2006. Effects of ingested fruiting bodies, submerged culture biomass, and acidic polysaccharide glucuronoxylomannan of *Tremella mesenterica* Retz.: Fr. on glycemic responses in normal and diabetic rats. *Life Sciences* 78(17): 1957-1966.
- Lowry, OH., Rosebrough, NJ., Farr, AL. and Randall, RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193(1): 265-275.
- Malinow, MR. 1996. Cholesterol sequestrant glycosides that inhibit intestinal cholesterol absorption. US5502038 A, March 26.
- Manohar, V., Talpur, NA., Echard, BW., Lieberman, S. and Preuss, HG. 2002. Effects of a water-soluble extract of maitake mushroom on circulating glucose/insulin concentrations in KK mice. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 4(1): 43-48.
- Manzi, P., Gambelli, L., Marconi, S., Vivanti, V. and Pizzoferrato, L. 1999. Nutrients in edible mushrooms: an inter-species comparative study. *Food Chemistry* 65(4): 477-482.
- Manzi, P. and Pizzoferrato, L. 2000. Beta-glucans in edible mushrooms. *Food Chemistry* 68(3): 315-318.

- Marshall, AS., Willment, JA., Lin, HH., Williams, DL., Gordon, S. and Brown, GD. 2004. Identification and characterization of a novel human myeloid inhibitory C-type lectin-like receptor (MICL) that is predominantly expressed on granulocytes and monocytes. *Journal of Biological Chemistry* 279(15): 14792-14802.
- McManus, EJ., Sakamoto, K., Armit, LJ., Ronaldson, L., Shpiro, N., Marquez, R. and Alessi, DR. 2005. Role that phosphorylation of GSK3 plays in insulin and Wnt signalling defined by knockin analysis. *EMBO Journal* 24(8): 1571-1583.
- Merry, TL. and McConell, GK. 2009. Skeletal muscle glucose uptake during exercise: a focus on reactive oxygen species and nitric oxide signaling. *IUBMB Life* 61(5): 479-484.
- Mineo, C. and Shaul, PW. 2003. HDL stimulation of endothelial nitric oxide synthase: a novel mechanism of HDL action. *Trends in Cardiovascular Medicine* 13(6): 226-231.
- Mizock, BA. 1995. Alterations in carbohydrate metabolism during stress: a review of the literature. *American Journal of Medicine* 98(1): 75-84.
- Mizuno, M., Minato, K., Ito, H., Kawade, M., Terai, H. and Tsuchida, H. 1999. Anti-tumor polysaccharide from the mycelium of liquid-cultured *Agaricus blazei* mill. *IUBMB Life* 47(4): 707-714.
- Mizuno, T. 1996. Development of antitumor polysaccharides from mushroom fungi. *Foods & Food Ingredients Journal of Japan* 167: 69-85.
- Mizuno, T., Saito, H., Nishitoba, T. and Kawagishi, H. 1995. Antitumor-active substances from mushrooms. *Food Reviews International* 11(1): 23-61.
- Montessuit, C., Rosenblatt-Velin, N., Papageorgiou, I., Campos, L., Pellieux, C., Palma, T. and Lerch, R. 2004. Regulation of glucose transporter expression in cardiac myocytes: p38 MAPK is a strong inducer of GLUT4. *Cardiovascular Research* 64(1): 94-104.
- Niu, W., Huang, C., Nawaz, Z., Levy, M., Somwar, R., Li, D., Bilan, PJ. and Klip, A. 2003. Maturation of the regulation of GLUT4 activity by p38 MAPK during L6 cell myogenesis. *Journal of Biological Chemistry* 278(20): 17953-17962.
- Ojuka, EO., Jones, TE., Nolte, LA., Chen, M., Wamhoff, BR., Sturek, M. and Holloszy, JO. 2002. Regulation of GLUT4 biogenesis in muscle: evidence for involvement

- of AMPK and Ca^{2+} . *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 282(5): 1008-1013.
- Pessin, JE and Saltiel, AR. 2000. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation* 106(2): 165-169.
- Pramanik, M., Mondal, S., Chakraborty, I., Rout, D. and Islam, SS. 2005. Structural investigation of a polysaccharide (Fr. II) isolated from the aqueous extract of an edible mushroom, *Pleurotus sajor-caju*. *Carbohydrate Research* 340(4): 629-636.
- Rice, PJ., Kelley, JL., Kogan, G., Ensley, HE., Kalbfleisch, JH., Browder, IW. and Williams, DL. 2002. Human monocyte scavenger receptors are pattern recognition receptors for (1→3)- β -D-glucans. *Journal of Leukocyte Biology* 72(1): 140-146.
- Rogers, NC., Slack, EC., Edwards, AD., Nolte, MA., Schulz, O., Schweighoffer, E., Williams, DL., et al. 2005. Syk-dependent cytokine induction by dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. *Immunity* 22(4): 507-517.
- Rop, O., Mlcek, J. and Jurikova, T. 2009. Beta-glucans in higher fungi and their health effects. *Nutrition Reviews* 67(11): 624-631.
- Ross, GD. 2000. Regulation of the adhesion versus cytotoxic functions of the Mac-1/CR3/ α M β 2-integrin glycoprotein. *Critical Reviews in Immunology* 20(3).
- Roy, SK., Maiti, D., Mondal, S., Das, D. and Islam, SS. 2008. Structural analysis of a polysaccharide isolated from the aqueous extract of an edible mushroom, *Pleurotus sajor-caju*, cultivar Black Japan. *Carbohydrate Research* 343(6): 1108-1113.
- Russell, RR., Bergeron, R., Shulman, GI. and Young, LH. 1999. Translocation of myocardial GLUT-4 and increased glucose uptake through activation of AMPK by AICAR. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 277(2): 643-649.
- Satitmanwiwat, S., Ratanakhanokchai, K., Laohakunjit, N., Chao, LK., Chen, ST., Pason, P., Tachaapaikoon, C. and Kyu, KL. 2012. Improved purity and immunostimulatory activity of β -(1→3)(1→6)-glucan from *Pleurotus sajor-caju* using cell wall-degrading enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(21): 5423-5430.

- Satitmanwivat, S., Ratanakhanokchai, K., Laohakunjit, N., Pason, P., Tachaapaikoon, C. and Kyu, KL. 2011. Purification and partial characterization of an acidic α -glucan-protein complex from the fruiting body of *Pleurotus sajor-caju* and its effect on macrophage activation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 76(10): 1884-1890.
- Scheepers, A., Joost, HG. and Schürmann, A. 2004. The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 28(5): 364-371.
- Schepetkin, IA. and Quinn, MT. 2006. Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *International Immunopharmacology* 6(3): 317-333.
- Seo, WG., Pae, HO., Oh, GS., Kim, NY., Kwon, TO., Shin, MK., Chai, KY. and Chung, HT. 2011. The aqueous extract of *Rhodiola sachalinensis* root enhances the expression of inducible nitric oxide synthase gene in RAW264.7 macrophages. *Journal of Ethnopharmacology* 76(1): 119-123.
- Shepherd, PR. and Kahn, BB. 1999. Glucose transporters and insulin action—implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine* 341(4): 248-257.
- Smiderle, FR., Sasaki, GL., Van Arkel, J., Iacomini, M., Wichers, HJ. and Van Griensven, LJ. 2010. High molecular weight glucan of the culinary medicinal mushroom *Agaricus bisporus* is an α -glucan that forms complexes with low molecular weight galactan. *Molecules* 15(8): 5818-5830.
- Sosroseno, W., Barid, I., Herminajeng, E. and Susilowati, H. 2002. Nitric oxide production by a murine macrophage cell line (RAW264.7) stimulated with lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Oral Microbiology and Immunology* 17(2): 72-78.
- Synytsya, A., Míčková, K., Synytsya, A., Jablonský, I., Spěváček, J., Erban, V., Kovářiková, E. and Čopíková, J. 2009. Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: structure and potential prebiotic activity. *Carbohydrate Polymers* 76(4): 548-556.
- Tappy, L., Gügolz, E. and Würsch, P. 1996. Effects of breakfast cereals containing various amounts of β -glucan fibers on plasma glucose and insulin responses in NIDDM subjects. *Diabetes Care* 19(8): 831-834.

- Terada, H. 1990. Uncouplers of oxidative phosphorylation. *Environmental Health Perspectives* 87: 213-218.
- Thornton, BP., Větvicka, V., Pitman, M., Goldman, RC. and Ross, GD. 1996. Analysis of the sugar specificity and molecular location of the beta-glucan-binding lectin site of complement receptor type 3 (CD11B/CD18). *Journal of Immunology* 156(3): 1235-1246.
- Tokunaka, K., Ohno, N., Adachi, Y., Tanaka, S., Tamura, H. and Yadomae, T. 2000. Immunopharmacological and immunotoxicological activities of a water-soluble (1→3)-β-D-glucan, CSBG from *Candida* spp. *International Journal of Immunopharmacology* 22(5): 383-394.
- Tomassen, MMM., Hendrix, EAHJ., Sonnenberg, ASM., Wichers, HJ. and Mes, JJ. 2011. Variation of bioactive lentinan-containing preparations in *Lentinula edodes* strains and stored products. Proceedings of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products, Arcachon, France, 4-7 October, 2011.
- Torres-Leal, FL., Capitani, MD. and Tirapegui, J. 2009. The effect of physical exercise and caloric restriction on the components of metabolic syndrome. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 45(3): 379-399.
- Vetvicka, V. and Yvin, JC. 2004. Effects of marine β-1,3 glucan on immune reactions. *International Immunopharmacology* 4(6): 721-730.
- Volman, JJ., Helsper, JP., Wei, S., Baars, JJ., van Griensven, LJ., Sonnenberg, AS., Mensink, RP. and Plat, J. 2010. Effects of mushroom-derived β-glucan-rich polysaccharide extracts on nitric oxide production by bone marrow-derived macrophages and nuclear factor-κB transactivation in Caco-2 reporter cells: Can effects be explained by structure?. *Molecular Nutrition & Food Research* 54(2): 268-276.
- Volman, JJ., Ramakers, JD. and Plat, J. 2008. Dietary modulation of immune function by β-glucans. *Physiology & Behavior* 94(2): 276-284.
- Wang, J., Gigliotti, F., Maggirwar, S., Johnston, C., Finkelstein, JN. and Wright, TW. 2005. *Pneumocystis carinii* activates the NF-κB signaling pathway in alveolar epithelial cells. *Infection and Immunity* 73(5) 2766-2777.

- Wasser, S. 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60(3): 258-274.
- Willment, JA., Marshall, AS., Reid, DM., Williams, DL., Wong, SY., Gordon, S. and Brown, GD. 2005. The human β -glucan receptor is widely expressed and functionally equivalent to murine Dectin-1 on primary cells. *European Journal of Immunology* 35(5): 1539-1547.
- Wright, EM. 1993. The intestinal Na⁺/glucose cotransporter. *Annual Review of Physiology* 55(1): 575-589.
- Xiao, Z., Trincado, CA. and Murtaugh, MP. 2004. β -glucan enhancement of T cell IFN γ response in swine. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 102(3): 315-320.
- Xu, X., Pan, C., Zhang, L. and Ashida, H. 2011. Immunomodulatory β -glucan from *Lentinus edodes* activates mitogen-activated protein kinases and nuclear factor- κ b in murine RAW264.7 macrophages. *Journal of Biological Chemistry* 286(36): 31194-31198.
- Xu, X., Yasuda, M., Mizuno, M. and Ashida, H. 2012. β -glucan from *Saccharomyces cerevisiae* reduces lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW264.7 macrophages. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1820(10): 1656-1663.
- Yan, J., Allendorf, DJ. and Brandley, B. 2005. Yeast whole glucan particle (WGP) β -glucan in conjunction with antitumour monoclonal antibodies to treat cancer. *Expert Opinion on Biological Therapy* 5(5): 691-702.
- Yang, JL., Jang, JH., Radhakrishnan, V., Kim, YH. and Song, YS. 2008. β -glucan suppresses LPS-stimulated NO production through the down-regulation of iNOS expression and NF- κ B transactivation in RAW264.7 macrophages. *Food Science and Biotechnology* 17(1): 106-113.
- Yap, AT. and Ng, ML. 2001. An improved method for the isolation of lentinan from the edible and medicinal Shiitake mushroom, *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (Agaricomycetideae). *International Journal of Medicinal Mushrooms* 3(1).

- Zhang, L., Li, X., Xu, X. and Zeng, F. 2005. Correlation between antitumor activity, molecular weight, and conformation of lentinan. *Carbohydrate Research* 340(8): 1515-1521.
- Zhang, Y., Li, S., Wang, X., Zhang, L. and Cheung, PCK. 2011. Advances in lentinan: isolation, structure, chain conformation and bioactivities. *Food Hydrocolloids* 25(2): 196-206.
- Zimmerman, JW., Linderuth, J., Fish, PA., Palace, GP., Stevenson, TT. and DeMong, DE. 1998. A novel carbohydrate-glycosphingolipid interaction between a β -(1-3)-glucan immunomodulator, PGG-glucan, and lactosylceramide of human leukocytes. *Journal of Biological Chemistry* 273(34): 22014-22020.

ภาคผนวก

β -glucan-containing polysaccharide extract from the grey oyster mushroom [*Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Sing.] stimulates glucose uptake by the L6 myotubes

¹Piyathida Jantaramanant, ^{1*}Decha Sermwittayawong, ²Kusumarn Noipha, ^{1,3}Nongporn Hutadilok-Towatana and ¹Rapepun Witisuwannakul

¹Department of Biochemistry, ³Natural Product Research Center of Excellence, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90110, Thailand

²Faculty of Health and Sports Science, Thaksin University, Phatthalung, 93110, Thailand

Article history

Received: 23 September 2013

Received in revised form:

21 November 2013

Accepted: 24 November 2013

Keywords

Pleurotus sajor-caju
 β -glucans
Polysaccharides
L6 myotubes
Glucose uptake

Abstract

Mushroom β -glucan has the ability to affect many cellular functions, including cellular glucose uptake. Although cumulative evidence in literature suggests a connection between β -glucan and reduction of blood glucose concentration, a mechanism of how β -glucan affects cellular glucose uptake has not been demonstrated. In this study, we analyzed the effect of β -glucan containing polysaccharide extract from mushrooms on glucose uptake by the L6 myotubes. We extracted crude polysaccharide from fruiting bodies of the grey oyster mushroom (*Pleurotus sajor-caju*), using hot water and protein removed by the Sevag reagent. The presence of β -glucan in the extract was confirmed by FT-IR analysis. We found that the partially purified polysaccharide extract from the grey oyster mushroom stimulated glucose uptake by the rat L6 muscle cells. In addition, laminarin, a small soluble β -glucan, enhanced the cellular glucose uptake. Results from this study suggest that β -glucan in the extract might promote the effect to the cells. The effect of purified mushroom β -glucan on the L6 cells requires additional analyses, and mechanistically how the mushroom β -glucan affects blood glucose concentration becomes our future goal.

© All Rights Reserved

Introduction

β -glucans are polysaccharides found in the cell wall of fungi, plants and some bacteria (Gawronski *et al.*, 1999). They consist of glucose molecules that link through $\beta(1\rightarrow3)$, $\beta(1\rightarrow4)$ and $\beta(1\rightarrow6)$ glycosidic bonds. As part of the pathogen associated molecular patterns (PAMPs), β -glucan affects several pathways in the immune and non-immune systems. For example, it can induce cytokines and nitric oxide production in macrophages and promote monocyte adhesion (Byeon *et al.*, 2009; Carbonero *et al.*, 2012; Satitmanwiwat *et al.*, 2012) and activate neutrophils and natural killer cells combat against cancer cells (Yoon *et al.*, 2008). Furthermore, β -glucan was shown to reduce total and LDL cholesterol level of hypercholesterolemic in adult individuals (Braaten *et al.*, 1994; Kerckhoffs *et al.*, 2003) and blood glucose in both animals and humans (Lo *et al.*, 2006). In addition, it also has the ability to prevent occurrence of glucose intolerance in mice high-fat diet (Kanagasabapathy *et al.*, 2012). Thus, β -glucan possesses several activities, which depend on structure, size, solubility, and the degree of branching (Graham *et al.*, 2006). For example, highly branched β -glucan was shown to be a better immune stimulator

than one with less frequent branches (Kubala *et al.*, 2003).

One of the best sources for $\beta(1\rightarrow3)$ with $\beta(1\rightarrow6)$ glucan is mushroom. β -glucan isolated from mushrooms has been subjects for many intense research investigations. One of the mushrooms: the grey oyster mushroom [*Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Sing.], which is easily found in Thailand, has been used for β -glucan isolation. It was found that β -glucan from this mushroom was highly branched - it contained a single $\beta(1\rightarrow6)$ glucose side chains on every second and third glucose residues (Carbonero *et al.*, 2012). This β -glucan was shown to stimulate nitric oxide production in macrophages (Carbonero *et al.*, 2012; Satitmanwiwat *et al.*, 2012). In addition to the immunomodulatory activity, β -glucan from this mushroom was shown to reduce blood glucose concentration in mice fed with high-fat diets (Kanagasabapathy *et al.*, 2012).

Glucose, the major metabolic fuel in animals, enters cells through glucose transporter proteins especially, through the isoform 4 (GLUT-4), which is expressed in skeletal muscles, heart muscles, and fat tissue (Shi and Kandror, 2008). The L6 myotube cell line is the best-characterized cellular model of skeletal muscle origin for studying glucose uptake (Klip

*Corresponding author.

Email: decha.s@psu.ac.th

2009). Recently, it was shown that the polysaccharide extract from *Astragalus membranaceus* Bunge stimulated glucose uptake in the L6 muscle cells (Liu *et al.*, 2013). However, this study failed to show the presence of β -glucan in the polysaccharide extract. In addition, the effect of β -glucan on glucose uptake by the L6 muscle cells has yet to be illustrated. Although the recent study showed the ability of β -glucan-rich polysaccharide extract from the grey oyster mushroom to reduce blood glucose (Kanagasabapathy *et al.*, 2012), the direct effect of the polysaccharide on the L6 myotube has not been shown. Therefore, we carried out experiments to test the effect of carbohydrate extract from the grey oyster mushroom on the L6 cells. We found that the β -glucan-containing polysaccharide extract from this mushroom stimulated glucose uptake in the L6 myotube in time- and dose-dependent fashions. Likewise, laminarin, a small soluble β -glucan from plant, showed the same effect.

Materials and Methods

Extraction of polysaccharide from mushroom

The polysaccharide was extracted using the method from Yap and NG with some modifications (Yap and Ng, 2001). First, 400 g of fresh fruiting bodies of grey oyster mushroom (*P. sajor-caju*) were washed and diced into small pieces. Then, they were baked in a hot air oven at 60°C for 3 days or until completely dry, and subsequently grinded into powder. The dried, powdered mushroom weighed approximately 35 g. They were boiled for 3 hours on a heating plate stirrer at 80-90°C. After cooling down at room temperature, the polysaccharide was precipitated by adding one volume of 95% ethanol and incubated for 14-18 h at 4°C. The whole mixture was centrifuged at 3,024 x g for 20 minutes at 4°C, and the supernatant was discarded. The pellets were combined and flash frozen with liquid nitrogen prior to lyophilization. The sample was dissolved in one volume of water and boiled for 8 hours on a heating plate stirrer at 80-90°C. After cooling down at room temperature, the sample was incubated at 4°C for 14-18 hours to allow precipitation of impurities. The precipitates were removed by centrifugation at the same speed, and the soluble material was mixed with one volume of 95% ethanol to precipitate the polysaccharides. After 14-18 hours of incubation at 4°C, the precipitated polysaccharides were collected by centrifugation at respectively 3,024 x g and 5,927 x g for 20 minutes each at 4°C. They were then flash frozen and lyophilized. The trace moisture in the lyophilized sample was completely removed by

baking at 70°C hot air oven for 1 day.

To remove proteins from crude polysaccharide, the Sevag reagent (chloroform:butanol ratio of 4:1) was employed. Briefly, the crude polysaccharide was dissolved with water to 10 mg/ml. The Sevag reagent was added to the sample with a ratio of 1:1, and subsequently mixed and vortexed. The mixture was centrifuged at 12,096 x g for 10 minutes at room temperature. After centrifugation, the sample was separated into two layers. The top layer is the aqueous solution, which contains the polysaccharides and the bottom layer is the Sevag reagent. The top layer was carefully pipetted without picking up the interface, which contains some proteins, and transferred to a clean tube. The solution was pooled and the extraction was repeated twice. Then, the aqueous layer was dialysed against 2L distilled water. Water used for dialysis was changed everyday until the volume of sample did not change. Finally, the dialysed sample was frozen at -80°C, lyophilized and subsequently dried at 70°C. The weight of the sample was recorded, and the sample was kept at -20°C until needed. The components of the extract were analyzed with fourier transformed infrared spectroscopy (FT-IR).

Determination of protein

Proteins were determined by the Lowry assay (Lowry *et al.*, 1951). Briefly, 100 μ l 1 mg/ml sample was mixed with 3 ml alkaline copper solution (2% Na₂CO₃ in 0.1 M NaOH, 1% sodium potassium tartrate, 1% CuSO₄·7H₂O). After incubation at room temperature for 10 minutes, 300 μ l of Folin and Ciocalteu's phenol reagent was added, and the incubation was continued for another 30 minutes. The optical density (OD) at 500 and 650 nm of the sample was measured, and the amount of protein was calculated by comparing with a standard curve from bovine serum albumin (BSA).

Determination of carbohydrate

Total carbohydrate in the sample was determined using the phenol-sulfuric acid method (DuBois *et al.*, 1956). Briefly, 500 μ l 0.25 mg/ml sample was mixed with 500 μ l 5% phenol. Then, 2 ml sulfuric acid was added to the mixture and incubated for 20 minutes at room temperature. The OD at 470 nm was measured, and the total sugar was calculated by comparing with a standard curve from glucose.

Effect of crude polysaccharide on glucose-uptake

Glucose uptake was determined using a glucose (GO) assay kit. Briefly, L6 rat skeletal muscle cells were grown in α -MEM (low glucose) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) at 37°C under 5%

CO₂. L6 cells were differentiated to L6 myotubes by 2% horse serum (HS)-containing medium in 48 well culture plates. The various concentrations of crude extracts were added to the cells and incubated for 24 and 48 hours. Insulin (500 nM) and metformin (2 mM) were used as positive controls. After incubation, medium was collected and used to determine the glucose level. The assay reagent (Glucose Oxidase/Peroxidase Reagent and o-Dianisidine Reagent) was added to the sample and incubated for 30 minutes at 37 °C. The reaction was stopped by adding 50 µl 12 N H₂SO₄. The remaining glucose in the sample was measured using the A₅₄₀ absorbance. This reagent specifically reacts with glucose, which is ultimately converted them into a colored substance.

Results and Discussion

Purification of the crude polysaccharide extract from P. sajor-caju

In this study, the crude polysaccharide was extracted using hot water. Proteins in the extract were removed using the Sevag reagent. The total polysaccharide was estimated by the phenol-sulfuric modified method (DuBois *et al.*, 1956). We found that the polysaccharide content before and after the Sevag extraction was increased from 56% to 93.5%, respectively. A previous study also used the Sevag reagent to remove proteins from the polysaccharide purify β-glucan (Satitmanwiwat *et al.*, 2012). In this work, we did not further purify the polysaccharide after the Sevag extraction and did not determine the amount of β-glucan in the partially purified extract. However, a study done by Kanagasabapathy and colleagues also extracted the polysaccharides from the grey oyster mushroom using hot-water extraction method and found approximately 80% β-glucan in their crude extract (Kanagasabapathy *et al.*, 2012). Additional studies reported that the branched β(1→3) and β(1→6)-D-glucan is predominated in the hot water polysaccharide extract from *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii* (Synytsya *et al.*, 2009). Collectively, these studies suggest that β-glucan is the major component in our partially purified polysaccharide from the grey oyster mushroom.

FT-IR analysis

To further confirm the presence of β(1→3)-glucan in our partially purified extract from the dried mushroom, the FT-IR spectroscopy technique was employed. Previous FT-IR analysis of the yeast polysaccharide cell wall and purified β-glucan

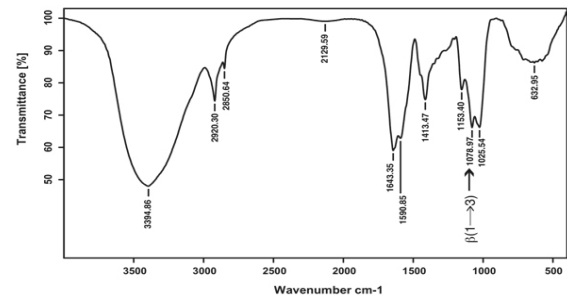


Figure 1. FT-IR spectra of the partially purified polysaccharide extracted from the dried grey oyster mushroom

was used as references (Galichet *et al.*, 2001; Satitmanwiwat *et al.*, 2012). For example, the peaks in the range of 950 - 1,200 cm⁻¹ indicate the presence of polysaccharides. The peaks at 1,150 - 1,160 cm⁻¹ define the stretching of glycosidic bonds. Other peaks and shoulders for β-glucan can be found at 1,376, 1,317, 1,162, 1,100, 1,080, 1,040 and 990 cm⁻¹ (Synytsya *et al.*, 2009). As shown in Figure 1, we found a peak at 1,078 cm⁻¹, which represents the β(1→3)-glucans. Additional peaks at 1,153 and 1,025 cm⁻¹ correspond to the pyranose ring and β(1→4) glucans, respectively (Galichet *et al.*, 2001; Satitmanwiwat *et al.*, 2012), suggesting cellulose contamination in our sample. No evidence of other sugars was found in the FT-IR analysis. In addition to the sugar, the two peaks at 1,590 cm⁻¹ and 1,643 cm⁻¹ represent vibration of proteins (Figure 1). Proteins are overlapped with water near 1,640 cm⁻¹ (Synytsya *et al.*, 2009). Other peaks at 2,920, 3,394 cm⁻¹ are C-H stretching vibration and hydroxyl stretching vibration, respectively (Synytsya *et al.*, 2009; Satitmanwiwat *et al.*, 2012).

Our FT-IR result shows that the sample still contains some proteins, which might not completely be removed by the Sevag reagent (Synytsya *et al.*, 2009). We also found a significant loss in the total carbohydrate after the Sevag extraction (data not shown). Therefore, this extraction method might not be the best technique for eliminating proteins from the polysaccharide. Consistently, it has been suggested that this extraction technique might not be able to remove polysaccharide-binding proteins (Synytsya *et al.*, 2009). Previous studies used specific enzymes to eliminate some unwanted carbohydrates (e.g. cellulose and hemicellulose) in β-glucans (Ookushi *et al.*, 2008; Satitmanwiwat *et al.*, 2012). Thus, a similar technique using an enzyme to remove proteins could also be utilized. This enzymatic digestion might be a better technique than the Sevag extraction method because it might confer a better yield and purity to

the polysaccharide.

Effect of the partially purified polysaccharide extract on glucose uptake

The relationship between polysaccharide and reduction of blood glucose has been demonstrated. For example, a previous study found that the effect of polysaccharide extracted from the fruiting bodies of *Tremella aurantia* reduced blood glucose in diabetic rats (Kihō *et al.*, 1995). In addition, polysaccharide from *Pleurotus tuber-regium* has many properties such as, antihyperglycemia, antihyperlipidemic, and antioxidant in diabetic rat model (Huang *et al.*, 2012). Moreover, extracellular polysaccharide from *Phellinus linteus* prevented high blood glucose in diabetes patients (Kim *et al.*, 2001). Together, these data led us to investigate the effect of our partially purified β -glucan from the grey oyster mushroom and the ear mushroom (*Auricularia auricula*) on glucose uptake by the L6 cells. We also included laminarin, a small soluble β -glucan from *Laminaria digitata* in the experiment. Results in figure 2 show that polysaccharide extracted from the grey oyster mushroom and laminarin stimulated glucose uptake in the L6 cells, suggesting that β -glucan in the extract probably caused the effect. Unlike those samples, polysaccharide extracted from the ear mushroom showed no effect on the cells (Figure 2). These polysaccharides did not affect viability of the cells (data not shown). From these data, we continued to investigate the effect of the polysaccharide extract from the grey oyster mushroom on glucose uptake in this cell type. We found that the level of glucose uptake increased as the concentration of the extract increased, and the stimulation of the uptake was clearly evident in 48-hour incubation (Figure 3).

The role of polysaccharide in regulation of glucose uptake has been illustrated. A recent study showed that *Astragalus* polysaccharide (APS) extracted from *Astragalus membranaceus* stimulated glucose uptake in the L6 myotubes through the AMP-activated protein kinase (AMPK) pathway (Liu *et al.*, 2013). It was found that the APS-dependent AMPK pathway stimulation subsequently promoted the phosphorylation of Akt substrate of 160 kDa (AS160), which led to the exocytosis of the glucose transporter 4 (GLUT-4) to promote glucose uptake by this cell type (Liu *et al.*, 2013). GLUT-4 has been shown to be a major glucose transporter in the skeletal muscle cells (Sakamoto and Holman 2008). The involvement of the Akt pathway and AS160 in glucose uptake by skeletal muscles has been demonstrated (Treebak *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2012). This Akt/AMPK pathway might be responsible for β -glucan-induced

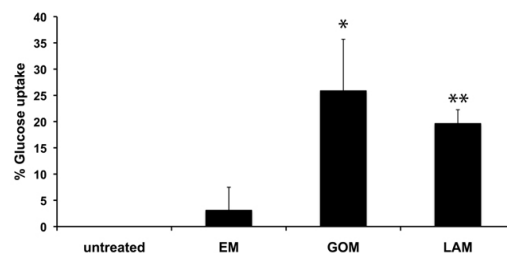


Figure 2. Differential effects of polysaccharides on glucose uptake. L6 myotubes were incubated with different treatments [2 mg/ml crude polysaccharide from the ear mushroom (EM), 2 mg/ml crude polysaccharide from the grey oyster mushroom (GOM), and 2 mg/ml Laminarin] for 48 hours. The histogram shows the average percentages of glucose remaining in the media, calculated from 3 repeats. The error bars represent standard deviations of the data. Statistical differences compare with the control set (untreated) were calculated by two-tailed Student's T-test (* for $P < 0.05$ and ** for $P < 0.001$).

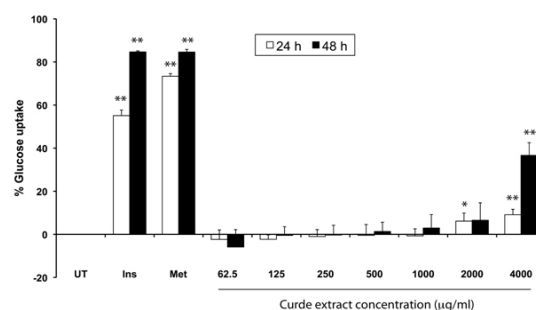


Figure 3. Polysaccharide from fruiting bodies of *P. sajor-caju* stimulated glucose uptake in time- and dose-dependent manners. (A) L6 cells were incubated with the various concentrations of the polysaccharide (62.5-4000 $\mu\text{g/ml}$). Ins (Insulin) at 500 nM and Met (Metformin) at 2 mM were used as positive controls. UT is abbreviated for untreated. Each represented data point was calculated from 6 repeats, and the glucose uptake experiment was repeated for 3 times. The error bars represent standard deviations of the data. Statistical differences compare with the control set (untreated) were calculated by two-tailed Student's T-test (* for $P < 0.05$ and ** for $P < 0.001$).

glucose uptake by the L6 cells, although the direct connection between β -glucan and glucose uptake has not been confirmed. Another study also showed that β -glucan-rich polysaccharide extract from the grey oyster mushroom decreased the overall blood glucose concentration in mice fed with high-fat diet (Kanagasabapathy *et al.*, 2012). This group showed that their β -glucan-rich extract upregulated GLUT-4 gene expression and downregulated the expression of many proinflammatory cytokines, including interleukine-6 (IL-6) and TNF- α (Kanagasabapathy *et al.*, 2012). However, the experiment was performed in mice, but not in the context of the cell line. Therefore, we hypothesize that β -glucan might activate the expression or exocytosis of GLUT-4 on the L6 cells through the activation of Akt/AMPK

pathway.

The ability of the L6 cell to respond to β -glucan suggests the existent of β -glucan receptor on the cell surface. It has been shown that β -glucan can signal through several receptors on the cell surface. These receptors include dectin-1, complement receptor 3 (CR3), lactosylceramide (LacCer), scavenger receptors (SR) and toll like receptors (TLRs), and the expression of these receptors is cell type specific (Chen and Seviour, 2007). Each of these receptors can signal through different signaling pathway, including PI3K/Akt, Extracellular signal-regulated kinase (Erk), p38 mitogen-activated protein kinase (p38-MAPK) pathways (Chen and Seviour, 2007; Chen and Raymond, 2008). To our knowledge, the specific β -glucan receptor on the L6 myotubes has not been suggested. Thus, identification of the specific β -glucan receptor and characterization of the signaling pathway for the glucose uptake by the L6 myotube await the future investigation.

Conclusion

Partially purified polysaccharide isolated from *Pleurotus sajor-caju* increased glucose uptake in the L6 muscle cells, possibly due to the presence of β -glucan in the extract. This finding suggests that β -glucan from this mushroom might be used with diabetes patients to help reducing blood glucose concentration. However, additional experiments are required to confirm that this activity is due to β -glucan in the extract. Furthermore, the specific β -glucan receptor and the signaling pathway that lead to the stimulation of glucose uptake by this cell remain our priority tasks in future experimentation.

Acknowledgments

This work was partially supported by Thesis Support Fund from the Graduate School, Prince of Songkla University.

References

- Braaten, J.T., Wood, P.J., Scott, F.W., Wolynetz, M.S., Lowe, M.K., Bradley-White, P. and Collins, M.W. 1994. Oat beta-glucan reduces blood cholesterol concentration in hypercholesterolemic subjects. *European Journal of Clinical Nutrition* 48(7): 465-474.
- Byeon, S.E., Lee, J., Lee, E., Lee, S.Y., Hong, E.K., Kim, Y.E. and Cho, J.Y. 2009. Functional activation of macrophages, monocytes and splenic lymphocytes by polysaccharide fraction from *Tricholoma matsutake*. *Archives of Pharmacal Research* 32(11): 1565-1572.
- Carbonero, E.R., Ruthes, A.C., Freitas, C.S., Utrilla, P., Galvez, J., da Silva, E.V., Sasaki, G.L., Gorin, P.A. and Iacomini, M. 2012. Chemical and biological properties of a highly branched beta-glucan from edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. *Carbohydrate Polymers* 90(2): 814-819.
- Chen, J. and Raymond, K. 2008. Beta-glucans in the treatment of diabetes and associated cardiovascular risks. *Vascular Health and Risk Management* 4(6): 1265-1272.
- Chen, J. and Seviour, R. 2007. Medicinal importance of fungal beta-(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6)-glucans. *Mycological Research* 111(6): 635-652.
- Choi, S.S., Cha, B.Y., Lee, Y.S., Yonezawa, T., Teruya, T., Nagai, K. and Woo, J.T. 2012. Honokiol and magnolol stimulate glucose uptake by activating PI3K-dependent Akt in L6 myotubes. *Biofactors* 38(5): 372-377.
- DuBois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry* 28(3): 350-356.
- Galichet, A., Sockalingum, G.D., Belarbi, A. and Manfait, M. 2001. FTIR spectroscopic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: study of an anomalous strain exhibiting a pink-colored cell phenotype. *FEMS Microbiology Letters* 197(2): 179-186.
- Gawronski, M., Park, J.T., Magee, A.S. and Conrad, H. 1999. Microfibrillar structure of PGG-glucan in aqueous solution as triple-helix aggregates by small angle X-ray scattering. *Biopolymers* 50(6): 569-578.
- Graham, L.M., Tsoni, S.V., Willment, J.A., Williams, D.L., Taylor, P.R., Gordon, S., Dennehy, K. and Brown, G.D. 2006. Soluble Dectin-1 as a tool to detect beta-glucans. *Journal of Immunological Methods* 314(1-2): 164-169.
- Huang, H.Y., Korivi, M., Chaing, Y.Y., Chien, T.Y. and Tsai, Y.C. 2012. *Pleurotus tuber-regium* Polysaccharides Attenuate Hyperglycemia and Oxidative Stress in Experimental Diabetic Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2012: 856381.
- Kanagasabapathy, G., Kuppusamy, U.R., Abd Malek, S.N., Abdulla, M.A., Chua, K.H. and Sabaratnam, V. 2012. Glucan-rich polysaccharides from *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer prevents glucose intolerance, insulin resistance and inflammation in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 12: 261.
- Kerckhoffs, D.A., Hornstra, G. and Mensink, R.P. 2003. Cholesterol-lowering effect of beta-glucan from oat bran in mildly hypercholesterolemic subjects may decrease when beta-glucan is incorporated into bread and cookies. *American Journal of Clinical Nutrition* 78(2): 221-227.
- Kiho, T., Morimoto, H., Sakushima, M., Usui, S. and Ukai, S. 1995. Polysaccharides in fungi. XXXV. Anti diabetic activity of an acidic polysaccharide from the fruiting bodies of *Tremella aurantia*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 18(12): 1627-1629.
- Kim, D.-H., Yang, B.-K., Jeong, S.-C., Park, J.-B., Cho, S.-P., Das, S., Yun, J.-W. and Song, C.-H.

2001. Production of a hypoglycemic, extracellular polysaccharide from the submerged culture of the mushroom, *Phellinus linteus*. *Biotechnology Letters* 23(7): 513-517.
- Klip, A. 2009. The many ways to regulate glucose transporter 4. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism* 34(3): 481-487.
- Kubala, L., Ruzickova, J., Nickova, K., Sandula, J., Ciz, M. and Lojek, A. 2003. The effect of (1→3)-beta-D-glucans, carboxymethylglucan and schizophyllan on human leukocytes *in vitro*. *Carbohydrate Research* 338(24): 2835-2840.
- Liu, J., Zhang, J.F., Lu, J.Z., Zhang, D.L., Li, K., Su, K., Wang, J., Zhang, Y.M., Wang, N., Yang, S.T. *et al.* 2013. Astragalus polysaccharide stimulates glucose uptake in L6 myotubes through AMPK activation and AS160/TBC1D4 phosphorylation. *Acta Pharmacologica Sinica* 34(1): 137-145.
- Lo, H.C., Tsai, F.A., Wasser, S.P., Yang, J.G. and Huang, B.M. 2006. Effects of ingested fruiting bodies, submerged culture biomass, and acidic polysaccharide glucuronoxylomannan of *Tremella mesenterica* Retz.:Fr. on glycemic responses in normal and diabetic rats. *Life Sciences* 78(17): 1957-1966.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193(1): 265-275.
- Ookushi, Y., Sakamoto, M. and Azuma, J. 2008. Extraction of beta-glucan from the water-insoluble residue of *Hericium erinaceum* with combined treatments of enzyme and microwave irradiation. *Journal of Applied Glycoscience* 55(4): 225-229.
- Sakamoto, K. and Holman, G.D. 2008. Emerging role for AS160/TBC1D4 and TBC1D1 in the regulation of GLUT4 traffic. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism* 295(1): E29-37.
- Satitmanwiwat, S., Ratanakhanokchai, K., Laohakunjit, N., Chao, L.K., Chen, S.T., Pason, P., Tachaapaikoon, C. and Kyu, K.L. 2012. Improved purity and immunostimulatory activity of beta-(1→3)(1→6)-glucan from *Pleurotus sajor-caju* using cell wall-degrading enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(21): 5423-5430.
- Shi, J. and Kandror, K.V. 2008. Study of glucose uptake in adipose cells. *Methods in Molecular Biology* 456: 307-315.
- Synytsya, A., Míčková, K., Synytsya, A., Jablonský, I., Spěváček, J., Erban, V., Kovářiková, E. and Čopíková, J. 2009. Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. *Carbohydrate Polymers* 76(4): 548-556.
- Trebbak, J.T., Glund, S., Deshmukh, A., Klein, D.K., Long, Y.C., Jensen, T.E., Jorgensen, S.B., Viollet, B., Andersson, L., Neumann, D. *et al.* 2006. AMPK-mediated AS160 phosphorylation in skeletal muscle is dependent on AMPK catalytic and regulatory subunits. *Diabetes* 55(7): 2051-2058.
- Yap, A.-T. and Ng, M.-L. 2001. An Improved Method for the Isolation of Lentinan from the Edible and Medicinal Shiitake Mushroom, *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (Agaricomycetideae). *International Journal of Medicinal Mushrooms* 3(1): 11.
- Yoon, T.J., Kim, T.J., Lee, H., Shin, K.S., Yun, Y.P., Moon, W.K., Kim, D.W. and Lee, K.H. 2008. Antitumor metastatic activity of beta-glucan purified from mutated *Saccharomyces cerevisiae*. *International Immunopharmacology* 8(1): 36-42.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล	นางสาวปิยธิดา จันทрманันท์	
รหัสประจำตัวนักศึกษา	5410220088	
วุฒิการศึกษา		
วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2552
(เทคโนโลยีชีวภาพ)		

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Jantaramanant, P., Sermwittayawong, D., Noipha, K., Hutadilok-Towatana, N. and Witisuwannakul, R. 2014. β -glucan-containing polysaccharide extract from the grey oyster mushroom [*Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Sing.] stimulates glucose uptake by the L6 myotubes. *International Food Research Journal* 21(2): 779-784.