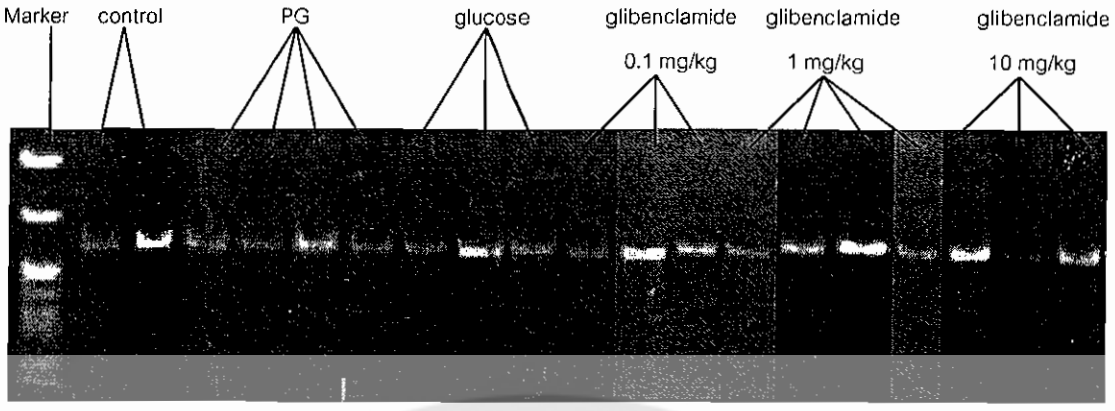
บทที่ 4 รายงานผลและอภิปรายผลการศึกษา

4.1 การแสดงออกของ HNF-1α mRNA

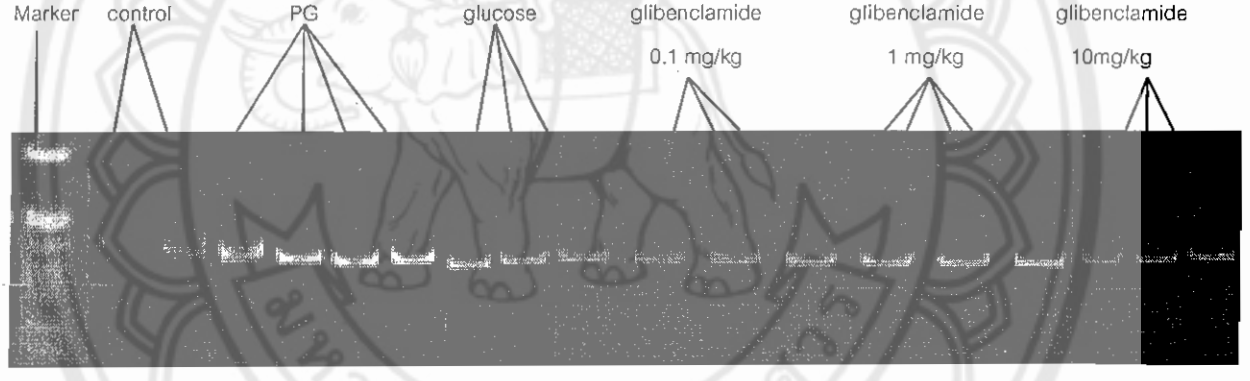
การศึกษานี้เป็นการศึกษาถึงการแสดงออกของ HNF-1α mRNA ในหนูที่ได้กลูโคส หรือยา glibenclamide ร่วมกับกลูโคสในที่นี้ ใช้การแสดงออกของ β- actin mRNA เป็นตัวควบคุมปริมาณของ RNA เริ่มต้นที่ใช้ในแต่ละการทดลอง ผลการศึกษาแสดงออกในรูปของอัตราส่วนระหว่างการแสดงออกของ HNF-1α ต่อ β- actin mRNA โดยพบว่า การแสดงออกของ HNF-1α mRNA ในหนูกลุ่มที่ได้รับกลูโคส (1.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวหนู) ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำกลั่นเพียงอย่างเดียว (รูปที่ 8) และหนูกลุ่มที่ได้รับโพรพิลลิน ไกลคอล ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายของยา glibenclamide ก็มีการแสดงออกของยีนไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมเช่นกัน เมื่อให้ยา glibenclamide ขนาด 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวหนูแก่หนูเป็นเวลา 30 นาที ก่อนที่จะให้กลูโคส พบว่าการแสดงออกของ HNF-1α mRNA ในหนูกลุ่มนี้มากกว่ากลุ่มที่ได้รับกลูโคสเพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.0008$) แต่เมื่อเพิ่มขนาดของยา glibenclamide เป็น 1 และ 10มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวหนู การเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของยีนนี้กลับลดลงอยู่ในระดับต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับยาในขนาด 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวหนู แต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับกลูโคสเพียงอย่างเดียว

ตาราง 3 อัตราส่วน band density ของ HNF-1 alpha ต่อ beta actin

กลุ่มหนู	ค่าเฉลี่ยของอัตราส่วน band density ของ HNF-1 alpha ต่อ beta actin
ควบคุม	3.745
PG	3.235
glucose	3.193
glibenclamide 0.1 mg/kg ร่วมกับ glucose	4.601
glibenclamide 1 mg/kg ร่วมกับ glucose	3.102
glibenclamide 10 mg/kg ร่วมกับ glucose	2.904



รูปภาพ 5 ภาพถ่าย gel electrophoresis ของ HNF-1alpha

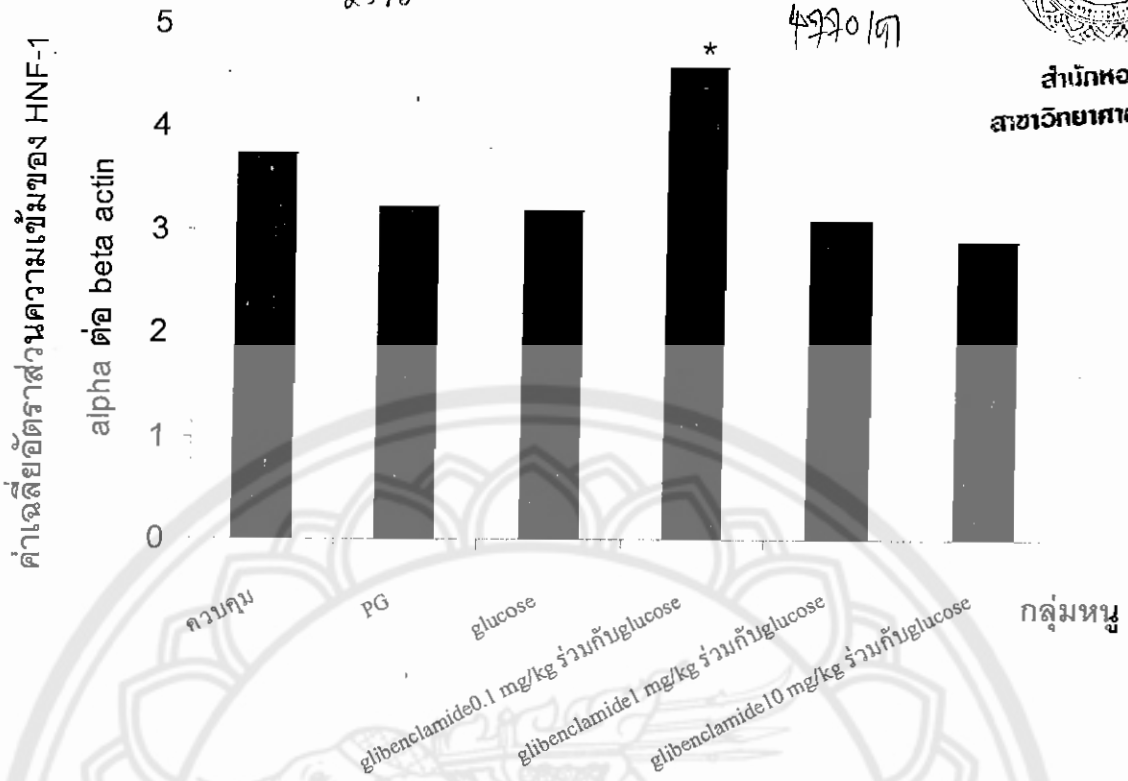


รูปภาพ 6 ภาพถ่าย gel electrophoresis ของ beta actin

T
W4
ว482ค
2546

17 มี.ค. 2547
4770 เล่ม 1

สำนักหอสมุด
สาขาวิทยาศาสตร์สุขภาพ



รูปภาพ 1 กราฟเปรียบเทียบค่าอัตราส่วน HNF-1α ต่อ β actin ในแต่ละกลุ่มหนู (*P=0.0008)

4.2 อภิปรายผลการศึกษา

ในสภาวะปกติ เมื่อระดับกลูโคสในกระแสเลือดสูงขึ้น กลูโคสสามารถเข้าสู่เบต้าเซลล์ของตับอ่อนได้โดยผ่านทาง glucose transporter-2 (GLUT-2) เข้าสู่กระบวนการ glycolysis มีผลเพิ่มอัตราส่วนของ ATP/ADP จึงเกิดการปิดของ ATP-sensitive K^+-channels ส่งผลให้โปแตสเซียมไอออนในเซลล์ไม่สามารถผ่านออกมานอกเซลล์ได้ จึงเกิดภาวะ depolarization ที่เยื่อหุ้มเซลล์เหนี่ยวนำให้เปิด voltage gated Ca^{2+}-channels ทำให้แคลเซียมไอออนจากภายนอกเซลล์ไหลเข้าสู่เซลล์ทำให้ปริมาณของแคลเซียมไอออนภายในเซลล์เพิ่มมากขึ้น จึงเกิดการกระตุ้นกระบวนการ exocytosis ปลดปล่อยอินซูลินที่เก็บไว้ในถุงเก็บออกสู่ภายนอกเซลล์ ทั้งนี้กระบวนการดังกล่าวจำเป็นต้องอาศัยการทำงานของ transcription factors ต่างๆ เช่น HNF-1α , HNF-4α และ Pdx1 (7) ดังนั้นเมื่อยา glibenclamide ออกฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในกระแสเลือดโดยจับกับ ATP-sensitive K-channels ส่งผลทำให้โปแตสเซียมออกไปนอกเซลล์ไม่ได้ จึงเกิด depolarization ของ β-cell เป็นผลให้ voltage-operated calcium channel เปิดออก และแคลเซียมไอออนเข้าไปในเซลล์ได้มากขึ้น โดย แคลเซียมไอออนดังกล่าวจะจับกับ Calmodulin ซึ่งจะไปกระตุ้น kinase เช่น myosin light chain kinase ซึ่งอยู่ใน granule หรือ protein kinase C ทำให้เกิดการแตกของ granule ปล่อย insulin ออกมา (9) ดังนั้นการให้ยา glibenclamide ร่วมกับกลูโคสจึงเสริมฤทธิ์ในการเพิ่มการแสดงออกของ HNF -1α mRNA ให้มากขึ้นด้วย แต่ในทางกลับกัน เมื่อเพิ่มขนาดยา glibenclamide เป็น 1 และ 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมของน้ำหนักตัวหนูร่วมกับกลูโคสพบว่าการเสริมการแสดงออกของ HNF -1α mRNA กลับลดลง โดยคาดว่ายาในขนาดสูง มีความจำเพาะเจาะจงในการจับกับตัวรับลดลง ทำให้ยาส่วนที่เหลือจากการจับกับ

sensitive K^+-channels อาจเข้าไปจับที่ voltage-operated calcium channel ด้วย ทำให้แคลเซียมไอออนไม่สามารถไหลเข้าสู่เซลล์ได้ จึงไม่เกิดการหลั่งอินซูลิน ดังนั้นการแสดงออกของ HNF -1α mRNA จึงลดลง

สำหรับหนูที่ได้รับ กลูโคสเพียงอย่างเดียว มีผลการแสดงออกของ HNF -1α mRNA ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม ซึ่งผลไม่สอดคล้องกับผลการศึกษาทดลองที่ผ่านมา (16) ซึ่งทำการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงโดยการทดลองที่ผ่านมาพบว่า เซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้รับกลูโคสเพียงอย่างเดียว จะมีการแสดงออกของ HNF -1α mRNA มากกว่าเซลล์เพาะเลี้ยงกลุ่มควบคุม ทั้งนี้อาจเกิดจาก การดูดซึมกลูโคสจากระบบทางเดินอาหารซึ่งในการดูดซึมกลูโคสเข้ากระแสเลือดนั้นจำเป็นต้องอาศัยเวลานานระยะหนึ่ง เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้ใช้เวลา 30 นาที หลังจากหนูได้รับกลูโคสจึงทำการเก็บตัวอย่างตับมาวิเคราะห์หาปริมาณ HNF -1α mRNA โดยการอ้างอิงจากการศึกษาของ Efrat S และคณะ (17) จึงอาจเป็นไปได้ว่า ที่ระยะเวลาดังกล่าวการดูดซึมกลูโคสเข้ากระแสเลือดของหนูยังไม่สมบูรณ์ หรือเป็นผลจากความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสที่เตรียมขึ้นเพื่อจะให้หนูอาจไม่เหมาะสม เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้ใช้ความเข้มข้นของสารละลายกลูโคส 1.5 กรัม/กิโลกรัมของน้ำหนักตัวหนู โดยการอ้างอิงจากการศึกษาของ mouse glucose tolerance (18) ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติม คือ โดยการกำหนดระยะเวลาในการดูดซึมกลูโคสที่เวลาต่างๆ และเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลายกลูโคส เพื่อดูผลว่าสอดคล้องกับผลการศึกษาทดลองครั้งนี้หรือไม่

สำหรับหนูที่ได้รับโพรพิลลิน ไกลคอล ซึ่งใช้ปั่นตัวทำละลายยา glibenclamide มีผลการแสดงออกของ HNF -1α mRNA ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมแสดงให้เห็นว่า โพรพิลลิน ไกลคอล ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ HNF -1α mRNA

การแสดงออกของ beta actin ในหนูแต่ละกลุ่มมีความแตกต่างกัน ทั้งนี้คาดว่า อาจเกิดจากการเปื้อนของฟีนอล ในขั้นตอนการสกัด RNA ซึ่งส่งผลให้ปริมาณ RNA ที่นำมาเตรียม cDNA ไม่เท่ากัน ดังนั้น ผู้วิจัยจึงลดความผิดพลาดในการแปรผลการทดลอง โดยนำค่าเฉลี่ยของอัตราส่วนความเข้มของ HNF-1α ต่อ beta actin มาเปรียบเทียบกัน