การศึกษากลไกในการลดน้ำตาลในเลือดของเซียงดาและความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน RAGE กับการเกิดโรคแทรกซ้อนในผู้ป่วยเบาหวานไทย

นางสาว อัญชลี เฉียบฉลาด

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาชีวเวชศาสตร์ (สหสาขาวิชา)
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHARACTERIZATION OF THE HYPOGLYCEMIC EFFECT OF *GYMNEMA INODORUM* AND ASSOCIATION STUDY OF RAGE GENE POLYMORPHISMS AND DIABETIC COMPLICATION IN THAI POPULATION

Miss Anchalee Chiabchalard

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Biomedical Sciences
(Interdisciplinary Program)
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic year 2008

Copyright of Chulalongkorn University

510889

Thesis Title	: CHARACTERIZATION OF THE HYPOGLYCEMIC EFFECT OF GYMNEMA INODORUM AND ASSOCIATIONSTUDY OF RAGE GENE POLYMORPHISMS AND DIABETIC COMPLICATION IN THAI POPULATION
By	Miss Anchalee Chiabchalard
Field of Study	Biomedical Sciences
Advisor	Associate Professor Rachana Santiyanont, Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctoral Degree

..... Dean of the Graduated School

(Associate Professor Pornpote Piumsomboon, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman

(Assistant Professor Tewin Tencomnao, Ph.D.)

R. Santiyanont. ..... Advisor

(Associate Professor Rachana Santiyanont, Ph.D.)

Tipaporn Limpaseni ..... Examiner

(Associate Professor Tipaporn Limpaseni, Ph.D.)

Warin Sangkitikomol ..... Examiner

(Associate Professor Warin Sangkitikomol, Ph.D.)

T-chaiyasest ..... External Examiner

(Associate Professor Tianchai Chaiyasest)

อัญชลี เฉียบฉลาด : การศึกษากลไกในการลดน้ำตาลในเลือดของเชียงดาและความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน RAGE กับการเกิดโรคแทรกซ้อนในผู้ป่วยเบาหวานไทย. (CHARACTERIZATION OF THE HYPOGLYCEMIC EFFECT OF GYMNEMA INODORUM AND ASSOCIATIONSTUDY OF RAGE GENE POLYMORPHISMS AND DIABETIC COMPLICATION IN THAI POPULATION) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ. ดร.รัชนา ศานติยานนท์, 103 หน้า.

การวิจัยนี้ได้ศึกษาผลในการลดระดับกลูโคสในเลือด และความเป็นพิษต่อตับของผักเชียงดา (*Gymnema inodorum* ;GI) โดยใช้ oral glucose tolerance test (OGTT) เป็นเครื่องมือในการแสดงรูปแบบการดูดซึมกลูโคส กลุ่มตัวอย่างคือ ชายหญิงอายุ 18 – 25 ปี ที่มีค่าน้ำตาลในเลือดปกติ จำนวน 73 คน แบ่งการทดลองเป็นกลุ่มที่ไม่ได้ดื่มชาเชียงดา (pre-treat) และผู้ทดสอบกลุ่มเดียวกันที่ดื่มชาเชียงดาหลังจากดื่มกลูโคสในระยะเวลาต่างๆกัน (0,15, และ 30 นาที) (post-treat) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าความเข้มข้นกลูโคสสูงสุดในเลือดระหว่างสองการทดลองโดยใช้ pair t-test ประเมินความเป็นพิษต่อตับโดยให้ผู้ทดสอบดื่มชาเชียงดา (1.5 กรัมในน้ำ 150 มล.) วันละครั้งต่อเนื่องกัน 28 วัน และติดตามการทำหน้าที่ของตับโดยการวัดระดับเอนไซม์ AST, ALT, ALP, GGT เมื่อเปรียบเทียบค่าระหว่าง pre-treat และ post- treat พบว่า ที่ 15 นาทีหลังการดื่มกลูโคส ชาเชียงดาทำให้ระดับกลูโคสสูงสุดในเลือดในกลุ่ม post-treat ต่ำกว่ากลุ่ม pre-treat อย่างมีนัยสำคัญ (131 ± 27.3 vs 145 ± 27.2 mg/dL; $p < 0.05$) เมื่อทำการศึกษาโดยใช้อาหารมาตรฐานที่เตรียมแทนการดื่มกลูโคส พบว่าให้ผลในทำนองเดียวกัน การดื่มชาเชียงดาต่อเนื่องนาน 28 วันไม่ทำให้ค่าเอนไซม์ AST, ALT, AL, GGT เปลี่ยนแปลงไปจากระดับปกติ จากการวิจัยนี้พบว่าชาเชียงดาอาจมีประโยชน์ใช้ลดระดับน้ำตาลในเลือด โดยไม่ส่งผลต่อการทำงานของตับ เมื่อศึกษากลไกในการลดน้ำตาลในเลือด พบว่าสารสกัดใบเชียงดาไม่กระตุ้นให้เกิดการหลั่งอินซูลินเพิ่มขึ้นในเซลล์ INS-1 และไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อัลฟากลูโคซิเดส นอกจากนี้ ยังได้ศึกษาความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน RAGE และผู้ป่วยเบาหวานประเภทที่ 2 ที่มีอาการแทรกซ้อนทางระบบประสาท พบว่าความหลากหลายของยีนที่ตำแหน่ง -374 T/A และ -429 T/C ไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคแทรกซ้อนนี้ในผู้ป่วยไทย

สาขาวิชา ชีวเวชศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต อัญชลี เฉียบฉลาด

ปีการศึกษา 2551 ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก รัชนา ศานติยานนท์

#468 970 1720 : MAJOR BIOMEDICAL SCIENCES

KEYWORDS : *Gymnema inodorum* / hypoglycemic / RAGE / polymorphism

ANCHALEE CHIABCHALARD: CHARACTERIZATION OF THE HYPOGLYCEMIC EFFECT OF GYMNEMA INODORUM AND ASSOCIATION STUDY OF RAGE GENE POLYMORPHISMS AND DIABETIC COMPLICATION IN THAI POPULATION.

ADVISOR : ASSOCIATE PROFESSOR RACHANA SANTIYANONT, Ph.D., 103 pp.

The effects of *Gymnema inodorum* (GI) tea consumption on glucose absorption and liver toxicity were evaluated in this study. The study was done in 73 healthy subjects of both sexes, aged between 18-25 years, who have normal fasting glucose level. Standard oral glucose tolerance test (OGTT) was used as a tool to demonstrate glucose absorption pattern. The pre-treated experiment was studied in the subjects without GI tea consumption and the post-treat was the same group of subjects who consumed GI tea at 0,15, and 30 minutes after the oral glucose load in OGTT. Peaks of glucose absorption of both experiments were compared using pair t-test. To evaluate the toxicity to human liver, GI tea (1.5 g in 150 ml water) was consumed once a day for 28 consecutive days, and the liver function tests (AST, ALT, ALP, GGT) were monitored throughout the study. The mean peak glucose concentration in the 15 minute post-treated group is significantly lower than the pre-treated group (131 $\pm$ 27.3 vs. 145$\pm$27.2 mg/dl; $p<0.05$). Experiments using standard meal instead of glucose load gave similar results. All liver enzymes revealed no change along the study. So, GI may have potential use for suppressing glucose absorption in diabetes mellitus with no apparent acute and long-term toxicity on liver. Investigation of the underlying mechanism of the hypoglycemic effect revealed that GI extract did not increase insulin secretion in INS-1 cells and had no inhibitory effect on α-glucosidase. Our study also suggested that there was no association between -374 T/A and -429 T/C polymorphisms of RAGE gene and the development of neuropathy in Thais with type 2 diabetes.

Field of Study : Biomedical Sciences Student's Signature Anchalee Chiabchalard.

Academic Year : 2008 Advisor's Signature R-Santiyanont.

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest sincere gratitude to my advisor, Associated Professor Dr. Rachana Santiyanont, for her meaningful supervision, creative guidance, and full encouragement which enable me to carry out my study successfully throughout this thesis.

My special gratitude is also extended to Assistant Professor Dr. Tewin Tencomnao, for his valuable comments and useful suggestion.

I would like to thank all friends at Department of Clinical Chemistry, Faculty of Allied health Sciences, for their support, sincerity and friendship.

Last , but not least, I would like to express my gratitude and deepest appreciation to my family for their love, understanding and full encouragement.

CONTENTS

	Page
ABSTRACT (THAI)	iv
ABSTRACT (ENGLISH)	v
ACKNOWLEDGEMENT	vi
CONTENT	vii
LIST OF TABLES	x
LIST OF FIGURES	xiii
LIST OF ABBREVIATIONS	xiv
CHAPTER I INTRODUCTION	1
Background and rationale	1
Research question	5
The objective of the study	5
Hypothesis	5
Conceptual framework	7
The benefit of the study	10
CHAPTER II LITERATURE REVIEW	11
Diabetes mellitus	11
Side effects of medicine for diabetes mellitus	14
Complication of diabetes mellitus	17
Diabetic nephropathy	17
Diabetic ocular disease	18
Diabetic peripheral neuropathy	18
Atherosclerotic disease	19
Diabetic cardiomyopathy and peripheral arterial disease (PAD)	20
Hypoglycemic effect of *Gymnema sylvestre*	20
Hypoglycemic effect of *Gymnema inodorum*	23

page

Advanced glycation endproducts and the progress of diabetic vascular complication 27
Polymorphism of RAGE and diabetes..... 29
CHAPTER III MATERIALS AND METHODS..... 31
Materials..... 31
A. Raw materials..... 31
B. Glass wares..... 31
C. Chemicals..... 31
D. Instruments..... 32
Methodology..... 35
A. Study hypoglycemic effect of *G. inodorum* tea in human..... 35
B. Hypoglycemic effect of GI tea, using standard meal..... 38
C. Effect of GI tea consumption on liver function test..... 38
D. Preparation of *G. inodorum* extract..... 38
E. Culture of *INS-1* cells..... 42
F. Measure of Insulin secretion..... 42
G. Measurement of alpha-glucosidase inhibitory activity..... 43
H. Data analysis..... 44
I. RAGE polymorphism study..... 44
CHAPTER IV RESULTS..... 46
Hypoglycemic effect of *G. inodorum* tea in human 46
Hypoglycemic effect of GI tea on standard meal..... 49
Effect of GI tea assumption on liver function test..... 51
Effect of GI extract on insulin secretion of INS-1 cells..... 56
Alpha glucosidase inhibitor determination..... 59
Polymorphism of RAGE gene and complication of diabetes..... 64
CHAPTER V DISCUSSION..... 80
CHAPTER VI SUMMARY AND CONCLUSION..... 89
REFERENCES..... 90

BIOGRAPHY..... 103

LIST OF TABLES

TABLE		Page
1	Definition of glucose tolerance states according to the ADA 1997 and the WHO 1999 criteria	12
2	Oral agents used in the treatment of type 2 diabetes	16
3	Glucose oxidase method for determine plasma glucose	37
4	Hypoglycemic effects of GI tea on plasma glucose in healthy human	47
5	Hypoglycemic effect of GI tea on standard meal	50
6	Liver function test (AST,ALT, ALP, GGT) in healthy subjects after 28 days of GI tea assumption	52
7	Plasma glucose monitoring of healthy subjects during 28 days of GI tea assumption	54
8	Effects of GI extract on insulin secretion in INS-1 cells	57
9	Effect of GI extracted with boiling water on inhibition of alpha glucosidase activity	60
10	Effect of GI extracted with 70% methanol on inhibition of alpha glucosidase activity	62
11	Gene and allele frequency of -429 T/C RAGE gene polymorphism in healthy subjects (control) and diabetic patients (DM) groups	65
12	Genotype distribution and frequency of -429T/C RAGE gene polymorphism in healthy subjects (control) and diabetic patients (DM) with and without complication	66
13	Genotype distribution and frequency of -429T/C RAGE gene polymorphism in healthy subjects (control) and diabetic patients (DM) with and without diabetic nephropathy	67
14	Genotype distribution and frequency of -429T/C RAGE gene polymorphism in healthy subjects (control) and diabetic patients (DM) with and without diabetic retinopathy	68

TABLE Page

15 Genotype distribution and frequency of -429T/C RAGE gene polymorphism in healthy subjects (control) and diabetic patients (DM) with and without diabetic neuropathy..... 69

16 Genotype distribution and frequency of -429T/C RAGE gene polymorphism in healthy subjects (control) and diabetic patients (DM) with and without diabetic CAD..... 70

17 Genotype distribution and frequency of -429T/C RAGE gene polymorphism in healthy subjects (control) and diabetic patients (DM) with and without diabetic CVD..... 71

18 Genotype distribution and frequency of -429T/C RAGE gene polymorphism in healthy subjects (control) and diabetic patients (DM) with and without skin disease..... 72

19 Gene and allele frequency of -374 T/A RAGE gene polymorphism in healthy subjects (control) and diabetic patients (DM) groups..... 74

20 Genotype distribution and frequency of -374 T/A RAGE gene polymorphism in healthy subjects (control) and diabetic patients (DM) with and without complication..... 75

21 Genotype distribution and frequency of -374 T/A RAGE gene polymorphism in healthy subjects (control) and diabetic patients (DM) with and without diabetic retinopathy..... 76

22 Genotype distribution and frequency of -374 T/A RAGE gene polymorphism in healthy subjects (control) and diabetic patients (DM) with and without diabetic neuropathy..... 77

23 Genotype distribution and frequency of -374 T/A RAGE gene polymorphism in healthy subjects (control) and diabetic patients (DM) with and without CAD..... 78

24 Genotype distribution and frequency of -374 T/A RAGE gene polymorphism in healthy subjects (control) and diabetic patients (DM)

TABLE Page

with and without CVD..... 79

LIST OF FIGURES

FIGURE		Page
1	Structure of gymnemic acid from *Gymnema sylvertre*.....	22
2	Structure formula of triterpenoids in *Gymnema inodorum*.....	26
3	Commercial *Gymnema inodorum* tea.....	34
4	Isolation diagram of triterpenoid extracted from *G. inodorum* leaves	41
5	Hypoglycemic effects of GI tea on plasma glucose (OGTT) in healthy human.....	48
6	Average liver function profile (AST,ALT,ALP,GGT) in healthy subjects within 28 day period of GI tea consumption.....	53
7	Fasting plasma glucose monitoring in healthy subjects within 28 day period of GI tea consumption.....	55
8	Effects of GI extract on insulin secretion in *INS-1* cells.....	58
9	Effect of GI extracted with boiling water on inhibition of alpha glucosidase activity.....	61
10	Effect of GI extracted with 70% methanol on inhibition of alpha glucosidase activity	63
11	-Sodium-depend glucose transport mechanism.....	84

LIST OF ABBREVIATIONS

ADA	=	the American Diabetes Association
AGE	=	advanced glycation endproduct
ALP	=	Alkaline phosphatase
ALT	=	Alanine transaminase
AST	=	Aspatate transaminase
ATP	=	adenosine triphosphate
^{o}C	=	degree Celcius
CAD	=	coronary artery disease
CML	=	N (carboxymethyl) lysine
CVD	=	cardiovascular disease
g	=	gram
GGT	=	gamma glutamyl transferase
GI	=	*Gymnema inodorum*
GS	=	*Gymnema sylvestre*
HbA1c	=	glycosylated hemoglobin
IFG	=	impaired fasting glucose
IGT	=	impaired glucose tolerance
IPH	=	isolated postchallenge hyperglycemic
kg	=	kilogram
L	=	liter
LDL	=	low-density lipoprotein
µl	=	microliter
mg	=	milligram
min	=	minute
ml	=	milliliter
mmol	=	millimole
µmol	=	micromole
NDDG	=	National Diabetes Data Group

NF-κB	=	nucleus factor-κB
NIDDK	=	the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Disease
PPARγ	=	peroxisome proliferators-activated receptor-γ
RAGE	=	receptor for advanced glycation endproduct
T1D	=	type 1 diabetes
T2D	=	type 2 diabetes
WHO	=	World Health Organization