

EFFECTS OF *CURCUMA COMOSA* ETHANOLIC EXTRACT ON HEPATIC CYTOCHROME  
P450 AND CLINICAL BLOOD CHEMISTRY IN RAT

Miss Wanida Suknoy

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Pharmacology (Inter-Department)

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2004

ISBN 974-17-6908-3

ผลของสารสกัดว่านชักมดลูกด้วยเอทานอลต่อเอนไซม์ไซโตโครม พี450 ในตับ  
และค่าเคมีคลินิกในเลือดหนูขาว

นางสาววนิดา สุขน้อย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชวิทยา (สหสาขาเภสัชวิทยา)

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-17-6908-3

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



วนิดา สุขน้อย: ผลของสารสกัดว่านชักมดลูกด้วยเอทานอลต่อเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ในตับ และค่าเคมีคลินิกในเลือดหนูขาว (EFFECTS OF CURCUMA COMOSA ETHANOLIC EXTRACT ON HEPATIC CYTOCHROME P450 AND CLINICAL BLOOD CHEMISTRY IN RAT ). อาจารย์ที่ปรึกษา: รศ.ดร.พ.ต.ท.หญิงสมทรง ลาวันย์ประเสริฐ, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม: รศ.ดร.สุพัตรา ศรีไชยรัตน์

ว่านชักมดลูก (*Curcuma comosa* Roxb.) เป็นพืชในวงศ์ Zingiberacea เป็นสมุนไพรพื้นบ้านที่นิยมใช้ในการรักษาอาการผิดปกติของมดลูก การศึกษานี้ใช้เหง้าของว่านชักมดลูกสกัดด้วย 95% เอทานอล นำสารสกัดว่านชักมดลูกที่ได้มาทำการศึกษาผลต่อเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 (cytochrome P450, CYP) ที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของยา การกระตุ้นฤทธิ์ของสารก่อมะเร็ง/สารก่อการกลายพันธุ์ ได้แก่ CYP 1A1, CYP 1A2, CYP2B1/2B2, CYP 2E1 และ CYP3A ในตับหนูขาว นอกจากนี้ยังได้ศึกษาผลของสารสกัดดังกล่าวต่อค่าเคมีคลินิกและโลหิตวิทยาด้วย การศึกษานี้ใช้หนูขาวเพศเมีย พันธุ์วิสตาร์ จำนวน 40 ตัว แบ่งโดยการสุ่มเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว กลุ่มแรกเป็นกลุ่มควบคุมได้รับน้ำมันข้าวโพด ขนาด 1 มิลลิลิตร/กิโลกรัม/วัน กลุ่มที่สอง, สาม และสี่เป็นกลุ่มที่ได้รับสารสกัดว่านชักมดลูกด้วยเอทานอล ในขนาด 100, 250 และ 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน ตามลำดับ โดยการป้อนทางปากวันละครั้ง เป็นเวลา 30 วัน เมื่อครบระยะเวลา ทำให้หนูหมดความรู้สึก เก็บตัวอย่างเลือดจากหัวใจเพื่อตรวจค่าโลหิตวิทยาและค่าเคมีคลินิก นำตับมาเตรียมไมโครโซม เพื่อใช้วัดปริมาณ total CYP และวัดสมรรถนะของเอนไซม์ CYP แต่ละ isoforms ผลการทดลองพบว่าสารสกัดว่านชักมดลูกไม่มีผลเปลี่ยนแปลงปริมาณ total CYP และสมรรถนะของ CYP1A1, CYP 1A2, CYP 2E1 และ CYP3A และพบว่าสารสกัดว่านชักมดลูกที่ขนาด 250 และ 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน มีผลเพิ่มสมรรถนะของ CYP2B1/2B2 ตามขนาดของสารสกัดที่ได้รับเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม สารสกัดว่านชักมดลูกด้วยเอทานอลที่ขนาด 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน มีผลเพิ่มค่าเคมีคลินิก ดังต่อไปนี้คือ alkaline phosphatase, potassium และที่ขนาด 250 และ 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน มีผลเพิ่ม estradiol ในขณะที่สารสกัดดังกล่าวที่ทุกขนาดที่ทำการทดลอง ไม่มีผลต่อค่าโลหิตวิทยา และค่าเคมีคลินิกดังต่อไปนี้คือ hematocrit, hemoglobin, RBC count, RBC indice, RBC morphology, platelet count, WBC count, %differential WBC, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, total protein, albumin, globulin, total bilirubin, direct bilirubin, blood urea nitrogen, serum creatinine, glucose, total cholesterol, triglyceride, high density lipoprotein-cholesterol, low density lipoprotein-cholesterol, และ electrolytes (Na, K, Ca, Cl) ผลจากการศึกษานี้ทำให้ได้ข้อมูลความเป็นไปได้ของการเกิดอันตริยาระหว่างยาและการเกิดปฏิกิริยาการกระตุ้นฤทธิ์ของสารพิษ สารก่อการกลายพันธุ์และ/สารก่อมะเร็งได้ เมื่อได้รับสารสกัดว่านชักมดลูกด้วยเอทานอลร่วมกับยา สารพิษ สารก่อการกลายพันธุ์ และ/สารก่อมะเร็งที่ถูกเปลี่ยนแปลงหรือถูกกระตุ้นฤทธิ์โดย CYP2B1/2B2

สาขาวิชาเภสัชวิทยา (สหสาขาวิชา)

ลายมือชื่อนิสิต.....*วนิดา สุขน้อย*

ปีการศึกษา 2547

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....*สมทรง ลาวันย์ประเสริฐ*

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....*สุพัตรา ศรีไชยรัตน์*

# # 4689142920: MAJOR PHARMACOLOGY

KEYWORDS: CURCUMA COMOSA/ HEPATIC CYTOCHROME P450/ CLINICAL BLOOD CHEMISTRY

WANIDA SUKNOY: EFFECTS OF *CURCUMA COMOSA* ETHANOLIC EXTRACT ON HEPATIC CYTOCHROME P450 AND CLINICAL BLOOD CHEMISTRY IN RAT. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. POL. LT. COL. SOMSONG LAWANPRASERT Ph.D., THESIS CO-ADVISORS: ASSOC. PROF. SUPATRA SRICHAIRAT Ph.D.

*Curcuma comosa* Roxb. (Waan chak mod look) is a plant in family Zingiberaceae. Rhizome of this plant has been used traditionally for abnormal symptoms of uterus. In this study, rhizome of *C. comosa* was extracted with 95% ethanol and effects of the extract on rat hepatic cytochrome P450 (CYP) involving in drug metabolism and carcinogenic/mutagenic bioactivation such as CYP 1A1, CYP 1A2, CYP2B1/2B2, CYP 2E1 and CYP3A were examined. Effects of this extract on clinical blood chemistry and hematology were also determined. Forty female Wistar rats were randomly divided into 4 groups of 10 rats each. Rats in the control group were given corn oil at 1 ml/kg/day whereas rats in the other three groups received *C. comosa* ethanolic extract (which was dissolved in corn oil) orally at dosages of 100, 250 and 500 mg/kg/day, respectively, for 30 consecutive days. At the end of the treatment period, rats were anesthetized. Blood samples were collected by heart puncture and were determined for hematology and clinical blood chemistry. Microsomes were prepared from livers for enzyme assays. The results showed that *C. comosa* ethanolic extract did not affect total CYP contents and the activities of CYP 1A1, CYP 1A2, CYP 2E1 and CYP3A. The activities of CYP2B1/2B2 were significantly dose-dependent increased by *C. comosa* administration at the dosages of 250 and 500 mg/kg/day. Serum alkaline phosphatase and potassium levels were significantly increased in rats receiving the extract at 500 mg/kg/day. Estradiol levels were significantly increased in rats receiving the extract at 250 and 500 mg/kg/day. Except indicated earlier, *C. comosa* ethanolic extract at all dosages used in this experiment did not affect these following hematology and clinical blood chemistry: hematocrit, hemoglobin, RBC count, RBC indice, RBC morphology, platelet count, WBC count, %differential WBC, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, total protein, albumin, globulin, total bilirubin, direct bilirubin, blood urea nitrogen, serum creatinine, glucose, total cholesterol, triglyceride, high density lipoprotein-cholesterol, low density lipoprotein-cholesterol, and electrolytes (Na, K, Ca, Cl). Results from this study provided a possibility information of drug-drug interactions and the increase risks from bioactivation reactions of the drugs or compounds that are metabolized or bioactivated via CYP2B1/2B2.

Field of Study Pharmacology (Inter-Department)

Academic Year 2004

Student's Signature.....*Wanida Suknoy*.....

Advisor's Signature.....*Pol. Lt. Col. Somsong Lawanprasert*.....

Co-Advisor's Signature.....*S. Srichairat*.....

## ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest gratitude to my advisor, Associate Professor Pol. Lt. Col. Dr. Somsong Lawanprasert for her excellent advice, help, encouragement and constructive criticism throughout my research study which enable me to accomplish this thesis.

I also would like to express my deepest and sincere appreciation to my co-advisor, Associate Professor Dr. Supatra Srichairat for her guidance, help and comments on my research work.

I would like to thank Assistant Professor Dr. Laddawal Phivthong-ngam for her valuable helps, guidance and comments for the animal handling technique. Thanks are also extended to the committee members, Associate Professor Supeecha Wittayalerpanya and Associate Professor Dr. Chaiyo Chaichantipyuth for their useful comments.

My appreciation is also expressed to Associated Professor Nuansri Niwattisaiwong for her kind assistance on identification technique.

This study was supported partly by the Graduate School, Chulalongkorn University.

I wish to thank all staff members of the Inter-Department of Pharmacology, The graduate School; the Department of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University as well as all staff members of the Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University for their helps.

Finally, I would like to express my deepest appreciation to my family and friends for their encouragement and moral that have made me to complete this work.

## Contents

	PAGE
Abstract (Thai).....	iv
Abstract (English).....	v
Acknowledgements.....	vi
Contents.....	vii
List of tables.....	viii
List of figures.....	xi
List of abbreviations.....	xiii
Chapter	
I    Introduction.....	1
II   Literature reviews.....	5
<i>C. comosa</i> Roxb.....	5
Phytoestrogen.....	14
Xenobiotic Metabolism.....	17
III  Material and Methods.....	29
Animals.....	29
Instruments.....	29
Chemicals.....	30
Methods.....	31
IV  Results.....	44
V   Discussion and conclusion.....	60
References.....	66
Appendices.....	77
Vitae.....	142

## List of Tables

	Page
Table 1	Chemical structures of compounds found in rhizome of <i>C. comosa</i> .....7
Table 2	The principal reactions in the biotransformation of xenobiotics ..... 19
Table 3	Human CYP enzymes, their endogenous substrates, inducers, inhibitor of drug metabolism.....23
Table 4	Carcinogens and toxins bioactivated by human P450s..... 25
Table 5	Effect of <i>C. comosa</i> ethanolic extract on body weight, liver weight and %relative liver weight.....47
Table 6	Effect of the <i>C. comosa</i> ethanolic extract on clinical blood chemistry and hematology.....50
Table A1	Body weight of an individual rat in the control group..... 79
Table A2	Body weight of an individual rat in <i>C. comosa</i> group I..... 80
Table A3	Body weight of an individual rat in <i>C. comosa</i> group II.....81
Table A4	Body weight of an individual rat in <i>C. comosa</i> group III.....82
Table A5	Terminal body weight of individual rat.....83
Table A6	Food consumption of individual rat in the control group.....84
Table A7	Food consumption of individual rat in <i>C. comosa</i> group I..... 85
Table A8	Food consumption of individual rat in <i>C. comosa</i> group II.....86
Table A9	Food consumption of individual rat in <i>C. comosa</i> group III.....87
Table A10	Water consumption of an individual rat in the control group.....88
Table A11	Water consumption of an individual rat in <i>C. comosa</i> group I..... 89
Table A12	Water consumption of an individual rat in <i>C. comosa</i> group II.....90
Table A13	Water consumption of an individual rat in <i>C. comosa</i> group III.....91
Table A14	Liver weight of individual rat.....92
Table C1	Microsomal protein concentration of individual rat..... 98
Table C2	Hepatic microsomal total CYP content of individual rat..... 98
Table C3	Hepatic microsomal EROD activity of individual rat.....99
Table C4	Hepatic microsomal MROD activity of individual rat.....99
Table C5	Hepatic microsomal BROD activity of individual rat..... 100



## List of Tables

	Page
Table C6	Hepatic microsomal PROD activity of individual rat..... 100
Table C7	Hepatic microsomal aniline 4-hydroxylase activity of individual rat..... 101
Table C8	Hepatic microsomal erythromycin N-demethylase activity of individual rat..... 101
Table D1	AST concentration of individual rat..... 103
Table D2	ALT concentration of individual rat..... 104
Table D3	Serum ALP concentration of individual rat..... 105
Table D4	Serum total bilirubin concentration of individual rat..... 106
Table D5	Serum direct bilirubin concentration of individual rat..... 107
Table D6	Serum total Protein concentration of individual rat..... 108
Table D7	Serum albumin concentration of individual rat..... 109
Table D8	Serum globulin concentration of individual rat..... 110
Table D9	BUN concentration of individual rat..... 111
Table D10	SCr concentration of individual rat..... 112
Table D11	Serum glucose concentration of individual rat..... 113
Table D12	Serum total cholesterol concentration of individual rat..... 114
Table D13	Serum TG concentration of individual rat..... 115
Table D14	Serum HDL-C concentration of individual rat..... 116
Table D15	Serum LDL-C concentration of individual rat..... 117
Table D16	Serum sodium concentration of individual rat ..... 118
Table D17	Serum potassium concentration of individual rat..... 119
Table D18	Serum calcium concentration of individual rat..... 120
Table D19	Serum chloride concentration of individual rat..... 121
Table D20	Serum estradiol concentration of individual rat..... 122
Table E1	Hct of individual rat..... 123
Table E2	Hb of individual rat..... 124

## List of Tables

	Page
Table E3 RBC count of individual rat.....	125
Table E4 MCV of individual rat.....	126
Table E5 MCH of individual rat.....	127
Table E6 MCHC of individual rat.....	128
Table E7 RBC morphology of individual rat.....	129
Table E8 Platelet count of individual rat.....	130
Table E9 WBC count of individual rat.....	131
Table E10 Neutrophil of individual rat.....	132
Table E11 Eosinophil of individual rat.....	133
Table E12 Lymphocyte of individual rat.....	134
Table E13 Monocyte of individual rat.....	135
Table E14 Normal lab values of rats.....	136

## List of Figures

	Page
Figure 1 <i>Curcuma comosa</i> Roxb. Plant.....	6
Figure 2 HPLC chromatograms of <i>C. comosa</i> ethanolic extract.....	45
Figure 3 Standard curve of 1,7 diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol.....	46
Figure 4 Effect of <i>C. comosa</i> ethanolic extract on body weight gain.....	48
Figure 5 Effect of <i>C. comosa</i> ethanolic extract on food consumption .....	48
Figure 6 Effect of <i>C. comosa</i> ethanolic extract on water consumption.....	49
Figure 7 Effects of <i>C. comosa</i> ethanolic extract on hepatic total CYP contents.....	52
Figure 8 Effects of the <i>C. comosa</i> ethanolic extract on hepatic CYP1A1 activity.....	54
Figure 9 Effects of the <i>C. comosa</i> ethanolic extract on hepatic CYP1A2 activity.....	55
Figure 10 Effects of the <i>C. comosa</i> ethanolic extract on hepatic CYP 2B1/2B2 activity.....	56
Figure 11 Effects of the <i>C. comosa</i> ethanolic extract on hepatic CYP 2B1/2B2 activity.....	57
Figure 12 Effects of the <i>C. comosa</i> ethanolic extract on hepatic CYP 2E1 activity.....	58
Figure 13 Effects of the <i>C. comosa</i> ethanolic extract on hepatic CYP 3A activity.....	59
Figure B1 Verification of alkoxyresorufin O-dealkylation.....	94
Figure B2 Verification of aniline 4- hydroxylation.....	95
Figure B3 Verification of erythromycin N-demethylation.....	96
Figure 14 Chromatogram of 1,7 diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol.....	137

List of Figures

Page

Figure 15 Study Protocol Approval by Ethic Committee of the  
Faculty of Pharmaceutical Sciences.....140

## List of Abbreviations

$\beta$	= beta
$^{\circ}\text{C}$	= degree celcius
$\mu\text{g}$	= microgram
$\mu\text{l}$	= microlitre
$\mu\text{mol}$	= micromole
$\mu\text{M}$	= micromolar
$\alpha$	= alpha
Ah receptor	= aliphatic hydrocarbon receptor
Ach	= acetylcholine
ALP	= alkaline phosphatase
ALT	= alanine aminotransferase
AST	= aspartate aminotransferase
BAP	= bone specific alkaline phosphatase
BFR	= bile flow rate
BMD	= bone mineral density
BR	= benzyloxyresorufin
BROD	= benzyloxyresorufin o-dealkylation
BSA	= bovine serum albumin
BUN	= blood urea nitrogen
$\text{Ca}^{2+}$	= calcium ion
CBC	= complete blood count
cm	= centimeter
CVD	= cardiovascular diseases
CYP	= cytochrome P450
dL	= decilitre
DMSO	= dimethylsulfoxide
$\text{EC}_{95}$	= effective concentration
EGTA	= ethylene glycol bis( $\beta$ -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetracetic acid

## List of Abbreviations

EDTA	= ethylene diamine tetra acetic acid
ER	= ethoxyresorufin
EROD	= ethoxyresorufin o-dealkylation
e.g.	= exempli gratia
et al.	= et alii (and other)
FSH	= follicle stimulating hormone
g	= gram
<i>g</i>	= gravity
G6P	= glucose 6-phosphate
G6PD	= glucose 6-phosphate dehydrogenase
GST	= glutathione S-transferase
Hb	= hemoglobin
Hct	= hematocrit
HDL-C	= high density lipoprotein cholesterol
HRT	= hormone replacement therapy
5-HT	= 5-hydroxytryptamine
i.e.	= id est (that is)
i.p.	= intraperitonium
kg	= kilogram
L	= litre
LD <sub>50</sub>	= median lethal dose
LDL-C	= low density lipoprotein cholesterol
LH	= luteinizing hormone
M	= molar
3-MC	= 3-methylcholanthrene
mEq	= milliequivalent
min	= minute
mg	= milligram

## List of Abbreviations

mg/kg	= milligram per kilogram body weight
ml	= milliliter
mm	= millimeter
mM	= millimolar
mmole	= millimole
MCV	= mean corpuscular volume
MCH	= mean corpuscular hemoglobin
MCHC	= mean corpuscular hemoglobin concentration
MR	= methoxyresorufin
MROD	= methoxyresorufin o-dealkylation
MW	= molecular weight
NADP	= nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NADPH	= nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form)
nm	= nanometer
nmol	= nanomole
PAH	= polycyclic aromatic hydrocarbon
PGF <sub>2α</sub>	= prostaglandin F <sub>2</sub> alpha
pH	= potential of hydrogen
pmol	= picomole
PR	= pentoxyresorufin
PROD	= pentoxyresorufin o-dealkylation
RBC	= red blood cell
r.p.m.	= revolution per minute
SCr	= serum creatinine
SEM	= standard error of mean
TCA	= trichloroacetic acid
TCDD	= 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin
TG	= triglyceride

### List of Abbreviations

THA	= 2,4,6-trihydroacetophenone
Tris	= tris (hydroxymethyl) aminomethane
U	= unit
v/v	= volume by volume
w/v	= weight by volume
WBC	= white blood cell