ฤทธิ์ปกป้องตับของสารสกัดลูกใต้ใบในหนูขาวที่ได้รับเอธานอล

นาย ชานนท์ งามถิ่น

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชวิทยา (สหสาขาวิชา)
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549
ISBN 974-14-3895-8
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I22917585

HEPATOPROTECTIVE EFFECT OF *PHYLLANTHUS AMARUS* SCHUM. ET. THONN. EXTRACT IN ETHANOL TREATED RATS

Mr. Chanon Ngamtin

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Pharmacology
(Inter-Department)
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Years 2006

ISBN 974-14-3895-8

490204

Thesis Title	HEPATOPROTECTIVE EFFECT OF *PHYLLANTHUS AMARUS* SCHUM. ET. THONN. EXTRACT IN ETHANOL TREATED RATS.
By	Mr. Chanon Ngamtin
Field of study	Pharmacology
Thesis Advisor	Associate Professor Pornpen Pramyothin, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Assistant Professor Somlak Poungshompoo, D.V.M., M.Sc.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree.

.....Dean of the Graduate School
(Assistant Professor M.R. Kalaya Tingsabadh, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman
(Assistant Professor Suree Jianmongkol, Ph.D.)

.....Thesis Advisor
(Associate Professor Pornpen Pramyothin, Ph.D.)

.....Thesis Co-advisor
(Assistant Professor Somlak Poungshompoo, D.V.M., M.Sc.)

.....Member
(Associate Professor Chaiyo Chaichantipyuth, Ph.D.)

.....Member
(Assistant Professor Withaya Janthasoot, M.Sc.)

ชานนท์ งามถิ่น: ฤทธิ์ปกป้องตับของสารสกัดลูกใต้ใบในหนูขาวที่ได้รับเอธานอล
(HEPATOPROTECTIVE EFFECT OF *PHYLLANTHUS AMARUS* SCHUM. ET. THONN. EXTRACT IN ETHANOL TREATED RATS)
อาจารย์ที่ปรึกษา: รศ.ดร. พรเพ็ญ เปรมโยธิน, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม: ผศ.สพ.ญ.สมลักษณ์ พวงชมภู
103 หน้า. ISBN 974-14-3895-8.

แอลกอฮอล์ (เอธานอล) ทำให้เกิดพิษต่อตับ จัดเป็นหนึ่งในสาเหตุสำคัญของปัญหาสุขภาพทั่วโลก สมุนไพรอาจมีประโยชน์ในการเป็นทางเลือกสำหรับป้องกันและรักษาความเป็นพิษต่อตับเนื่องจากแอลกอฮอล์ได้ ในการศึกษาครั้งนี้ทำการทดลองเพื่อศึกษาฤทธิ์ปกป้องตับและกลไกที่อาจเป็นไปได้ของสารสกัดน้ำของลูกใต้ใบในหนูขาวที่ทำให้เกิดพิษต่อตับจากเอธานอล ในการศึกษาพิษระยะเฉียบพลัน หนูขาวได้รับสารสกัดลูกใต้ใบขนาด 25, 50 และ 75 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ทางปาก ครั้งเดียว เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนการให้เอธานอล 5 กรัม/กิโลกรัม ทางปาก ครั้งเดียว ในการศึกษาพิษระยะกึ่งเฉียบพลัน หนูขาวได้รับเอธานอล 4 กรัม/กิโลกรัม/วัน ทางปาก เป็นเวลา 21 วัน และให้สารสกัดลูกใต้ใบขนาดที่ให้ผลดีที่สุดจากการศึกษาพิษระยะเฉียบพลันแก่หนูขาว เป็นเวลา 7 วัน หลังจากได้รับเอธานอล โดยใช้ซิไลมารีนขนาด 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เป็นสารอ้างอิงฤทธิ์ปกป้องตับของทั้งสองระยะการศึกษา ทำการประเมินฤทธิ์ปกปองตับด้วยตัวบ่งชี้ต่างๆได้แก่ ระดับของ ALT, AST, GSH, MDA, STg, HTg, TNF-α, IL-1β ร่วมกับผลการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยา เมื่อให้เอธานอล 5 กรัม/กิโลกรัม พบว่า ระดับ ALT และ AST เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับหนูขาวปกติ การให้สารสกัดลูกใต้ใบขนาด 25 และ 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม สามารถลดได้เพียงระดับ AST ขณะที่สารสกัดลูกใต้ใบขนาด 75 มิลลิกรัม/กิโลกรัม สามารถลดได้ทั้งระดับ ALT และ AST อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการให้สารสกัดทั้ง 3 ขนาดไม่มีผลแตกต่างกันในระดับ GSH, MDA, STg, HTg, TNF-α และ IL-1β เมื่อเทียบกับหนูขาวที่ให้เอธานอลและหนูขาวปกติ หลังจากหนูขาวได้รับเอธานอล 4 กรัม/กิโลกรัม/วัน เป็นเวลา 21 วัน พบการเกิดพิษต่อตับโดยมีการเพิ่มขึ้นของระดับ ALT, AST, MDA, HTg, TNF-α และ IL-1β เมื่อให้สารสกัดลูกใต้ใบขนาด 75 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน เป็นเวลา 7 วัน หลังจากการได้รับเอธานอล พบว่ามีผลลดระดับ ALT, AST, MDA, HTg และ TNF-α อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่าใกล้เคียงกับระดับปกติและการได้รับซิไลมารีน เมื่อให้สารสกัดลูกใต้ใบอย่างเดียว เป็นเวลา 7 วัน ไม่มีผลทำให้เกิดพิษต่อหนูขาว ผลทางทางจุลพยาธิวิทยา สอดคล้องกับผลของค่าเคมีคลินิก โดยพบการเพิ่มการแบ่งตัวของเซลล์ตับในการเร่งการซ่อมแซมเซลล์ที่ถูกทำลาย และลักษณะของเซลล์ตับดีขึ้นใกล้เคียงกับภาวะปกติเมื่อได้รับสารสกัด โดยสรุป การได้รับสารสกัดลูกใต้ใบขนาด 75 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ก่อนหรือหลังการได้รับเอธานอล แสดงให้เห็นว่าสารสกัดลูกใต้ใบมีฤทธิ์ในการปกป้องตับจากพิษของเอธานอลได้ โดยสารสกัดอาจมีกลไกในการรักษาสภาพเยื่อหุ้มเซลล์, การต้านอนุมูลอิสระ, การยับยั้งการเกิด fatty liver และการสร้าง TNF-α รวมทั้งการเร่งการซ่อมแซมเซลล์ นอกจากนั้นตัวสารสกัดเองไม่ก่อให้เกิดพิษในหนูขาวปกติ

สาขาวิชา เภสัชวิทยา (สหสาขาวิชา).....
ปีการศึกษา 2549.....

ลายมือชื่อนิสิต.....ชานนท์ งามถิ่น.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4789078520 MAJOR: PHARMACOLOGY
KEYWORDS: *PHYLLANTHUS AMARUS* SCHUM. ET. THONN. / HEPATOPROTECTIVE EFFECT / LIVER INJURY/ ETHANOL / RATS
CHANON NGAMTIN: HEPATOPROTECTIVE EFFECT OF *PHYLLANTHUS AMARUS* SCHUM. ET. THONN. EXTRACT IN ETHANOL TREATED RATS. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. PORNPEN PRAMYOTHIN, THESIS CO-ADVISOR: ASST. PROF. SOMLAK POUNGSHOMPOO, 103 PP. ISBN 974-14-3895-8.

Alcohol (ethanol) induced hepatotoxicity is one major cause of health problem worldwide. Herbs may be useful as an alternative prevetion and treatment in alcohol induced liver diseases. The present study was undertaken to investigate the hepatoprotective effect and its possible mechanism of aqueous extract from *Phyllanthus amarus* Schum. et. Thonn. (PA) in ethanol induced hepatotoxic rats. In acute toxicity study, rats received single oral dose of PA (25, 50 and 75 mg/kg), 24 hours before single oral dose of ethanol (5 g/kg). In sub-acute toxicity study, rats received ethanol (4 g/kg/day) orally for 21 days. PA at the most effective dose from acute toxicity study was given orally to rats for 7 days after administration of ethanol. Silymarin (5 mg/kg) was used as the reference hepatoprotective agent in both studies.Hepatoprotective parameters were alanine aminotransaminase (ALT), aspartate aminotransaminase (AST), reduced glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), serum triglyceride (STg), hepatic triglyceride (HTg), tumor necrosis factor alpha (TNF-α), interleukin 1 beta (IL-1β), together with histopathological examination. Single oral dose of Ethanol (5 g/kg) significantly increased ALT and AST levels as compared with control rats. Administration of PA (25 and 50 mg/kg) significantly reduced only AST level, while PA (75 mg/kg) significantly reduced both ALT and AST. All doses of PA had no effect on GSH, MDA, STg, HTg, TNF-α and IL-1β. After 21 days of ethanol (4 g/kg/day) administration, the levels of ALT, AST, MDA, HTg, TNF-α and IL-1β were significantly increased. Treatment with PA (75 mg/kg/day) as well as SL (5 mg/kg/day) for 7 days after ethanol offered significant hepatoprotective effect by reducing ALT, AST, MDA, HTg and TNF-α levels back to normal. Administration of PA at 75 mg/kg/day alone for 7 days caused no changes in rats. Histopathological observations were also in correlation with the clinical chemistry parameters by showing reversible regeneration of hepatocytes with mitotic figure and normal liver cell morphology. In conclusions, PA (75 mg/kg) given before or after ethanol administration showed a significant hepatoprotective effect in ethanol treated rats. The possible hepatoprotective mechanism of PA may involve membranes stabilization, antioxidant activity, inhibition of fatty liver formation and TNF-α production and enhancement of liver regeneration. PA by itself caused no toxic effect assessed by parameters used.

Field of study Pharmacology (Inter-Department).. Student's signature Chanon Ngamtin

Academic year 2006..... Advisor's signature....Pornpen.....

Co-advisor's signature...Somlak.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest gratitude and sincere appreciation to my advisor, Assoc. Prof. Dr. Pornpen Pramyothin for her advise, guidance, excellent encouragement, kindness and support throughout my study. My great appreciation is also expressed to my co-advisor, Asst. Prof. Somlak Poungshompoo for her guidance, help, support, comments and suggestions on my research field and laboratory work.

My great appreciation is also extended to Assoc. Prof. Dr. Chaiyo Chaichantipyuth for his guidance about the herb, comments and suggestions on my thesis. My appreciation is also expressed to Asst. Prof. Dr. Suree Jianmongkol and Asst. Prof. Withaya Janthasoot, who are the committee members, for their useful comments and suggestions on this thesis.

I would like to give my sincerely thank to Miss. Hemvala Chirdchupunsare, a researcher at Pharmacological Action of Natural Products Research Unit, Department of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for her help, support, technical guidance and suggestions.

I wish to thank all staff members of several work places as follows: Department of Pharmacology, Pharmacognosy, Biochemistry, Pharmaceutical Research Instrument Center and Animal care facility, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University; Department of Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University for their kind assistances.

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

Finally, I wish to express my deepest appreciation and infinite gratitude to my father and mother for their love, encouragement, and support that they are deserved to be mentioned as a part of my success.

CONTENTS

Page

ABSTRACT (THAI) iv
ABSTRACT (ENGLISH) v
ACKNOWLEDGEMENTS vi
CONTENTS vii
LIST OF TABLES x
LIST OF FIGURES xii
LIST OF ABBREVIATIONS xiv
CHAPTER
I **INTRODUCTION** 1
1.1 Background and Rationale 1
1.2 Objectives 2
1.3 Hypothesis 2
1.4 Scope 3
1.5 Expected benefit and Application 3
II **REVIEW OF RELATED LITERATURES** 4
2.1 *Phyllanthus amarus* Schum. et. Thonn 4
2.1.1 General description 4
2.1.2 Botanical description 4
2.1.3 Chemical constituents 5
2.1.4 Traditional medicinal uses 7
2.1.5 Pharmacological and toxicological effects 7
2.2 Liver 18
2.3 Ethanol 23
2.3.1 Ethanol induced liver injury 25
2.3.2 Mechanism of ethanol induced liver injury 26
2.3.3 The parameters indicated ethanol induced liver injury 29
2.4 Silymarin 32

Page

CHAPTER

III **MATERIALS AND METHODS** 33

3.1 Animal 33

3.2 The extract 33

3.3 Equipments and Instruments 34

3.4 Chemicals 34

3.5 Experimental design 36

3.6 Collection of sample and preparation of serum and live homogenate 39

3.7 Determination of clinical chemistry parameters 39

3.7.1 Determination of serum ALT and AST 39

3.7.2 Determination of serum triglyceride (STg) 40

3.7.3 Determination of hepatic triglyceride (HTg) 40

3.7.4 Determination of hepatic glutathione (GSH) 41

3.7.5 Determination of hepatic malondialdehyde (MDA) 42

3.7.6 Determination of serum TNF-α 42

3.7.7 Determination of serum IL-1β 43

3.8 Histopathological examination 44

3.9 Data analysis 49

3.10 Ethical consideration 49

IV **RESULTS** 50

4.1 The results of clinical chemistry parameters 50

4.1.1 Experiment I (acute toxicity study) 50

1.) Effect of PA on levels of ALT and AST 50

2.) Effect of PA on level of STg 51

3.) Effect of PA on level of HTg 52

4.) Effect of PA on level of GSH 53

5.) Effect of PA on level of MDA 54

6.) Effect of PA on level of TNF-α 55

7.) Effect of PA on level of IL-1β 56

Page

CHAPTER

IV RESULTS (cont.)

4.1.2. Experiment II (sub-acute toxicity study)..... 57

1.) Effect of PA on levels of ALT and AST..... 57

2.) Effect of PA on level of STg..... 58

3.) Effect of PA on level of HTg..... 59

4.) Effect of PA on level of GSH..... 60

5.) Effect of PA on level of MDA..... 61

6.) Effect of PA on level of TNF-α..... 62

7.) Effect of PA on level of IL-1β..... 63

4.2 The results of histopathological examinations..... 64

4.2.1 Effect of PA on histopathological changes of Experiment I (acute toxicity study)..... 64

4.2.2 Effect of PA on histopathological changes of Experiment II (sub-acute toxicity study)..... 65

V DISCUSSIONS AND CONCLUSIONS..... 77

REFERENCES..... 82

APPENDIX..... 94

CURRICULUM VITAE..... 103

LIST OF TABLES

Page

Table 1. Effect of PA given 24 hours before single oral dose (5 g/kg) of ethanol: levels of ALT and AST..... 50

Table 2. Effect of PA given 24 hours before single oral dose (5 g/kg) of ethanol: level of STg..... 51

Table 3. Effect of PA given 24 hours before single oral dose (5 g/kg) of ethanol: level of HTg..... 52

Table 4. Effect of PA given 24 hours before single oral dose (5 g/kg) of ethanol: level of GSH..... 53

Table 5. Effect of PA given 24 hours before single oral dose (5 g/kg) of ethanol: level of MDA..... 54

Table 6. Effect of PA given 24 hours before single oral dose (5 g/kg) of ethanol: level of TNF-α..... 55

Table 7. Effect of PA given 24 hours before single oral dose (5 g/kg) of ethanol: level of IL-1β..... 56

Table 8. Enhancement of rat liver recovery by PA (75 mg/kg) and SL (5 mg/kg) given daily for 7 days after 21 days with ethanol (4 g/kg): levels of ALT and AST..... 57

Table 9. Enhancement of rat liver recovery by PA (75 mg/kg) and SL (5 mg/kg) given daily for 7 days after 21 days with ethanol (4 g/kg): level of STg..... 58

Table 10. Enhancement of rat liver recovery by PA (75 mg/kg) and SL (5 mg/kg) given daily for 7 days after 21 days with ethanol (4 g/kg): level of HTg..... 59

Table 11. Enhancement of rat liver recovery by PA (75 mg/kg) and SL (5 mg/kg) given daily for 7 days after 21 days with ethanol (4 g/kg): level of GSH..... 60

Table 12. Enhancement of rat liver recovery by PA (75 mg/kg) and SL (5 mg/kg) given daily for 7 days after 21 days with ethanol (4 g/kg): level of MDA..... 61

Page

Table 13. Enhancement of rat liver recovery by PA (75 mg/kg) and SL (5 mg/kg) given daily for 7 days after 21 days with ethanol (4 g/kg): level of TNF-α..... 62

Table 14. Enhancement of rat liver recovery by PA (75 mg/kg) and SL (5 mg/kg) given daily for 7 days after 21 days with ethanol (4 g/kg): level of IL-1β..... 63

Table 15. The histopathology of PA extract given 24 hours before single oral dose (5 g/kg) of ethanol (n=6)..... 65

Table 16. The histopathology of PA extract given 7 days after administration of ethanol (4 g/kg) for 21 days (n=8)..... 66

Table 17. Summary of clinical chemistry values and histopathological grading in effect of PA extract given 24 hours before single oral dose of ethanol (5 g/kg) (acute toxicity study, n=6)..... 95

Table 18 Summary of clinical chemistry values and histopathological grading in effect of PA extract given 7 days after administration of ethanol (4 g/kg) for 21days (sub-acute toxicity study, n=8)..... 96

Table 19. Clinical chemistry values of each rats in control and ethanol groups (acute toxicity study, n=6)..... 97

Table 20. Clinical chemistry values of each rats in PA 25 mg/kg and PA 50 mg/kg groups (acute toxicity study, n=6)..... 98

Table 21. Clinical chemistry values of each rats in PA 75 mg/kg and SL 5 mg/kg groups (acute toxicity study, n=6)..... 99

Table 22. Clinical chemistry values of each rats in control and ethanol 4 g/kg groups (sub-acute toxicity study, n=8)..... 100

Table 23. Clinical chemistry values of each rats in ethanol (self recovery) and PA 75 mg/kg treatment groups (sub-acute toxicity study, n=8). 101

Table 24. Clinical chemistry values of each rats in PA 75 mg/kg alone and SL 5 mg/kg treatment groups (sub-acute toxicity study, n=8)..... 102

LIST OF FIGURES

Page

Figure 1. *Phyllanthus amarus* Schum. et. Thonn. (Thai as "Luk tai bai").... 6
Figure 2. The organelles of the liver cell..... 19
Figure 3. The direction of blood and bile flow in the liver..... 20
Figure 4. Diagram of the functional unit of the liver as acinus..... 21
Figure 5. Morphology changes of apoptosis and necrosis..... 22
Figure 6. Mechanism of lipid peroxidation..... 28
Figure 7. Diagram illustrated the preparation of aqueous extract of *Phyllanthus amarus*..... 35
Figure 8. Diagram illustrated administration of PA extract 24 hours before single oral dose of ethanol (5 g/kg) in acute toxicity study..... 37
Figure 9. Diagram illustrated administration of PA extract 7 days after ethanol (4 g/kg) for 21 days in sub-acute toxicity study..... 38
Figure 10. Light micrograph of normal rat liver (received distilled water) (H&Ex400)..... 67
Figure 11. Light micrograph of rat liver after administration of ethanol (5 g/kg) (H&Ex400)..... 67
Figure 12. Light micrograph of rat liver after administration of PA 25 mg/kg before ethanol (5 g/kg)(H&Ex200)..... 68
Figure 13. Light micrograph of rat liver after administration of PA 50 mg/kg before ethanol (5 g/kg).)(H&Ex400)..... 68
Figure 14. Light micrograph of rat liver after administration of PA 75 mg/kg before ethanol (5 g/kg)(H&Ex200)..... 69
Figure 15. Light micrograph of rat liver after administration of SL 5 mg/kg before ethanol (5 g/kg)(H&Ex400)..... 69
Figure 16. Light micrograph of normal rat liver (received distilled water) (H&Ex400)..... 70
Figure 17. Light micrograph of rat liver after administration of ethanol (4 g/kg) for 21 days (H&Ex100)..... 70
Figure 18. Light micrograph of rat liver after administration of ethanol (4 g/kg) for 21 days (H&Ex200)..... 71

Page

Figure 19. Light micrograph of rat liver after administration of ethanol (4 g/kg) for 21 days (H&Ex200)..... 71

Figure 20. Light micrograph of rat liver after administration of ethanol (4 g/kg) for 21 days and then self recovery (H&Ex200)..... 72

Figure 21. Light micrograph of rat liver given PA 75 mg/kg treatment for 7 days after ethanol (4 g/kg) administration for 21 days (H&Ex200)..... 72

Figure 22. Light micrograph of rat liver after administration of PA 75 mg/kg alone for 7 days (H&Ex200)..... 73

Figure 23. Light micrograph of rat liver given SL 5 mg/kg treatment for 7 days after ethanol (4 g/kg) administration for 21 days (H&Ex200)..... 73

Figure 24. Light micrograph of normal rat liver (received distilled water) (Oil red Ox400)..... 74

Figure 25. Light micrograph of rat liver after administration of ethanol (4 g/kg) (Oil red Ox400)..... 74

Figure 26. Light micrograph of normal rat liver (received distilled water) (PASx400)..... 75

Figure 27. Light micrograph of rat liver after administration of ethanol (4 g/kg) for 21days (PASx400)..... 75

Figure 28. Light micrograph of normal rat liver (received distilled water) (Masson's Trichrome x400)..... 76

Figure 29. Light micrograph of rat liver after administration of ethanol (4 g/kg) for 21days (Masson's Trichrome x400)..... 76

LIST OF ABBREVIATIONS

ADH	=	alcohol dehydrogenase
ALDH	=	aldehyde dehydrogenase
ALT	=	alanine aminotransaminase
AST	=	aspartate aminotransaminase
ATP	=	adenosine 5'-triphosphate
cm	=	centimeter
CV	=	central vein
CYP	=	cytochrome P450
dl	=	deciliter
DW	=	distilled water
e.g.	=	exampli gratia (for example)
et al.	=	*et alii* (and other)
etc.	=	et cetera
g/kg	=	gram per kilogram body weight
GSH	=	reduced glutathione
HTg	=	hepatic triglyceride
H&E	=	haematoxylin and eosin
IL-1β	=	interleukin 1 beta.
MDA	=	malondialdehyde,
mg	=	milligram
min	=	minute
ml	=	milliliter
mM	=	millimolar (millimole per liter)
MEOS	=	microsomal ethanol oxidizing system
NAD	=	nicotinamide adenine dinucleotide
NADH	=	reduced nicotinamide adenine dinucleotide
No	=	number
nm	=	nanometer
PBS	=	phosphate buffer saline
pH	=	log concentration of H^+
PA	=	*Phyllanthus amarus* Schum. et. Thonn.
PV	=	portal vein

rpm	=	round per minute
w/w	=	weight by weight
SEM	=	standard error of mean
SL	=	silymarin
STg	=	serum triglyceride
TNF-α	=	tumor necrosis factor alpha
%	=	percent
^{0}C	=	degree Celsius
µl	=	microliter