ผลของสารสกัดว่านชักมดลูกต่อสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครมพี 450 ในตับและเคมีคลินิกในเลือดของหนูขาว

นางสาว ชลธิชา กิตติชานันท์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชวิทยา ภาควิชาเภสัชวิทยา
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF *CURCUMA COMOSA* EXTRACTS ON HEPATIC CYTOCHROME P450 ACTIVITY AND BLOOD CHEMISTRY IN RATS

Miss Chonthicha Kittichanun

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy Program in Pharmacology
Department of Pharmacology
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2007
Copyright of Chulalongkorn University

501933

Thesis Title	EFFECTS OF *CURCUMA COMOSA* EXTRACTS ON HEPATIC CYTOCHROME P450 ACTIVITY AND BLOOD CHEMISTRY IN RATS
By	Miss Chonthicha Kittichanun
Field of Study	Pharmacology
Thesis Advisor	Associate Professor Pol.Lt.Col. Somsong Lawanprasert, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Assistant Professor Laddawan Phivthong-ngam, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master 's Degree

Pornpen Pramyothin ..... Dean of the Faculty of Pharmaceutical Sciences
(Associate Professor Pornpen Pramyothin, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

Mayuree Tantisira ..... Chairman
(Associate Professor Mayuree Tantisira, Ph.D.)

Pol. Lt. Col. Somsong Lawanprasert ..... Thesis Advisor
(Associate Professor Pol.Lt.Col. Somsong Lawanprasert, Ph.D.)

Laddawan Phivthongngam ..... Thesis Co-advisor
(Assistant Professor Laddawan Phivthong-ngam, Ph.D.)

Apichart Suksamrarn ..... Member
(Professor Apichart Suksamrarn, Ph.D.)

Wittaya Janthasoot ..... Member
(Assistant Professor Wittaya Janthasoot, M.Sc. Pharmacology)

ชลธิชา กิตติชานันท์: ผลของสารสกัดว่านชักมดลูกต่อสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครมพี 450 ในตับและเคมีคลินิกในเลือดของหนูขาว (EFFECTS OF *CURCUMA COMOSA* EXTRACTS ON HEPATIC CYTOCHROME P450 ACTIVITY AND BLOOD CHEMISTRY IN RATS) อาจารย์ที่ปรึกษา: รศ.ดร.พ.ด.ท. หญิงสมทรง ลาวัณย์ประเสริฐ, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผศ.ดร. ลัดดาวัลย์ ผิวทองงาม 112 หน้า.

ว่านชักมดลูก (*Curcuma comosa* Roxb.) เป็นพืชในวงศ์ Zingiberaceae และเป็นพืชพื้นบ้านของไทย ตามตำราแพทย์แผนไทยนิยมใช้ส่วนเหง้าของว่านชักมดลูกในการรักษาอาการผิดปกติของมดลูก การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดว่านชักมดลูกด้วยเฮกเซนและเอทานอลต่อเอนไซม์ไซโตโครม พี450 (CYP) ในตับของหนูขาว และผลของสารสกัดดังกล่าวต่อเคมีคลินิกในเลือดของหนูขาว ในการศึกษาใช้หนูขาวเพศผู้พันธุ์วิสตาร์ จำนวน 50 ตัว แบ่งกลุ่มโดยการสุ่มออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มควบคุมได้รับน้ำมันข้าวโพด กลุ่มอื่นๆ ได้รับสารสกัดว่านชักมดลูกด้วยเฮกเซน หรือสารสกัดว่านชักมดลูกด้วยเอทานอล ขนาด 250 หรือ 500 มก/กก/วัน โดยการป้อนทางปากเป็นเวลา 30 วัน เมื่อครบกำหนดทำการฆ่าหนู เก็บตัวอย่างเลือดและเตรียมไมโครโซมจากตับของหนูขาว ผลการทดลองพบว่า สารสกัดว่านชักมดลูกด้วยเฮกเซนทั้ง 2 ขนาดและสารสกัดว่านชักมดลูกด้วยเอทานอลขนาด 250 มก/กก/วัน มีผลเพิ่มปริมาณ total CYP และเพิ่มสมรรถนะเอนไซม์ CYP1A1 โดยสารสกัดขนาดต่ำ (250 มก/กก/วัน) มีผลเพิ่มสมรรถนะ CYP1A1 มากกว่าสารสกัดขนาดสูง (500 มก/กก/วัน) สารสกัดว่านชักมดลูกด้วยเฮกเซนและเอทานอลมีผลเพิ่มสมรรถนะของ CYP2B1/2B2 ตามขนาดสารสกัดที่ได้รับ โดยการเพิ่มขึ้นของสมรรถนะของ CYP2B1/2B2 ในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเฮกเซนมากกว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดเอทานอลเมื่อป้อนสารสกัดในขนาดที่เท่ากัน สารสกัดทั้งสองไม่มีผลต่อสมรรถนะของเอนไซม์ CYP1A2, CYP2E1 และ CYP3A สารสกัดว่านชักมดลูกด้วยเฮกเซนขนาด 500 มก/กก/วัน มีผลลดระดับโคเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์และ HDL-C ในเลือดของหนูขาว ขณะที่สารสกัดว่านชักมดลูกด้วยเอทานอลทั้งขนาด 250 และ 500 มก/กก/วัน มีผลลดระดับไตรกลีเซอไรด์ในเลือดของหนูขาวเท่านั้น สารสกัดเฮกเซนและเอทานอลไม่มีผลต่อเคมีคลินิกอื่นๆ และค่าโลหิตวิทยา ดังต่อไปนี้คือ sugar, BUN, creatinine, LDL-C, AST, ALT, ALP, albumin, total bilirubin, direct bilirubin, hematocrit, hemoglobin, RBC count, RBC indices (mean corpuscular volume; MCV, mean corpuscular hemoglobin; MCH, mean corpuscular hemoglobin concentration; MCHC) RBC morphology, platelet count, WBC count และ % differential WBC ผลจากการศึกษานี้ให้ข้อมูลที่บ่งชี้ถึงโอกาสในการเกิดอันตรกิริยาระหว่างยาที่ถูกเปลี่ยนแปลงโดยเอนไซม์ CYP1A1 และ CYP2B1/2B2 กับสารสกัดว่านชักมดลูกด้วย เฮกเซน และเอทานอล และความเป็นไปได้ที่จะเกิดปฏิกิริยาการกระตุ้นฤทธิ์ของสารพิษ สารก่อการกลายพันธุ์และสารก่อมะเร็งเมื่อได้รับสารสกัดว่านชักมดลูกด้วยเฮกเซนและเอทานอลร่วมกับสารพิษ สารก่อการกลายพันธุ์และสารก่อมะเร็งที่ถูกกระตุ้นฤทธิ์โดย CYP1A1 และ CYP2B1/2B2

ภาควิชา เภสัชวิทยา ..... ลายมือชื่อนิสิต ชลธิชา กิตติชานันท์

สาขาวิชา เภสัชวิทยา ..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2550 ..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

4876561133 MAJOR : PHARMACOLOGY
KEYWORDS: *CURCUMA COMOSA*/ HEPATIC CYTOCHROME P450/ CLINICAL BLOOD CHEMISTRY

CHONTHICHA KITTICHANUN: EFFECTS OF CURCUMA COMOSA EXTRACTS ON HEPATIC CYTOCHROME P450 ACTIVITY AND BLOOD CHEMISTRY IN RATS. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. POL.LT. COL SOMSONG LAWANPRASERT Ph.D., THESIS CO-ADVISOR: ASST. PROF. LADDAWAN PHIVTHONG-NGAM Ph.D.

Curcuma comosa Roxb. (Zingiberaceae) is an indigenous plant of Thailand. The rhizome of this plant has been widely used in Thai traditional medicine for treatment of abnormal uterine symptoms. The purpose of this study was to investigate effects of *C. comosa* hexane extracts and ethanolic extract on hepatic cytochrome P450 (CYP) in rats. Fifty male Wistar rats were randomly divided into 5 groups. Rats were given orally with *C. comosa* hexane extract or ethanolic extract (250 and 500 mg/kg/day) or corn oil in a control group for 30 consecutive days. At the end of the treatment, rats were sacrified, blood samples were collected and liver microsomes were prepared. The results showed that both dosages of *C. comosa* hexane extract and ethanolic extracts at 250 mg/kg/day caused a significant increase of total CYP contents and the activity of CYP1A1. Lower dose of both extracts (250 mg/kg/day) caused a more increase of CYP1A1 activity than the higher dose (500 mg/kg/day). Also, both *C. comosa* hexane and ethanolic extracts caused a dose-dependent increase of CYP2B1/2B2 activities and the increase was higher in the hexane extract group than the ethanolic extract group. Hexane and ethanolic extracts of *C. comosa* did not affect CYP1A2, CYP2E1 and CYP3A activities. *C. comosa* hexane extract at the dose of 500 mg/kg/day caused a decrease of serum cholesterol, triglyceride and HDL-C while *C. comosa* ethanolic extract at the doses of 250 and 500 mg/kg/day decreased only triglyceride level. Furthermore, *C. comosa* hexane extract and ethanolic extract did not show any effects on these following clinical blood chemistry and hematology: sugar, BUN, creatinine, LDL-C, AST, ALT, ALP, albumin, total bilirubin, direct bilirubin, hematocrit, hemoglobin, RBC count, RBC indices (mean corpuscular volume; MCV, mean corpuscular hemoglobin; MCH, mean corpuscular hemoglobin concentration; MCHC) RBC morphology, platelet count, WBC count and % differential WBC. These results indicated the possibilities *C. comosa* hexane and ethanolic extracts on drug-drug interactions and the increase risk of toxicity, mutagenesis and/or carcinogenesis of drugs or compounds that are metabolized or bioactivation via CYP1A1 and CYP2B1/2B2.

Department .....Pharmacology... Student's signature.....Chonthicha Kittichanun
Field of study ..Pharmacology... Advisor's signature.....Pol. Lt. Col. Somsong Lawanprasert
Academic year ..2007..... Co-advisor's signature.....L. Phivthong-ngam

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere gratitude and appreciation to my advisor, Associate Professor Pol. Lt. Col. Dr. Somsong Lawanprasert for her valuable advice and guidance, kindness, and encouragement during the course of experimental work, preparing and presentation of this thesis.

I would like to express my deepest and sincere appreciation to my co-adviser, Assistant Professor Dr. Laddawan Phivthong-ngam for her valuable helps, guidance and comments for the animal handling technique.

My appreciation is also expressed to Associate Professor Nuansri Niwattisaiwong for her kind assistance on the enzyme assay technique.

I also would like to thank Professor Apichart Suksamrarn for supplying the *C. comosa* hexane extract and ethanolic extract. Thanks are also extended to the committee members, Associate Professor Mayuree Tantisira and Assistant Professor Withaya Janthasoot for their worth comments and suggestions.

I would like to express my deepest appreciation to Mr. Khemchat Apipalakul for his guidance, help and comments on my research work.

This study was support by National Research Council of Thailand.

I wish to thank all staff members of Department of the Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University as well as all staff members of the Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University for providing laboratory facilities and helps.

Finally, I would like to thank my family and my friends for their love and encouragement.

CONTENTS

Page

ABSTRACT (THAI) iv

ABSTRACT (ENGLISH) v

ACKNOWLEDGEMENTS vi

CONTENTS vii

LIST OF TABLES ix

LIST OF FIGURES x

LIST OF ABBREVIATIONS xvii

CHAPTER I. INTRODUCTION 1

Hypothesis 3

Study design and process 3

Anticipated benefits from the study 3

CHAPTER II. LITERATURE REVIEWS 5

CHAPTER III. MATERIALS AND METHODS 28

Experimental animals 28

Instruments 28

Chemicals 29

Method 29

1. Preparation of *C. comosa* extracts 29

2. Animal treatment 30

3. Blood sampling for determination of clinical blood chemistry and hematology 30

4. Clinical blood chemistry 31

5. Hematology 31

6. Hepatic microsomal preparation 31

7. Determination of protein concentrations in liver microsomes 32

8. Determination of total CYP contents in liver microsomes 33

9. Analysis of hepatic microsomal CYP activities 34

Page

Statistical Analysis 41

CHAPTER IV. RESULTS 42

1. Effect of *C. comosa* extracts on body weight, food and water consumption and liver weight 42

2. Effects of *C. comosa* extracts on clinical blood chemistry and hematology 45

3. Effect of *C. comosa* on rat hepatic CYP 49

CHAPTER V. DISCUSSION AND CONCLUSION 56

REFERENCES 63

APPENDICES 69

Curriculum vitae 114

LIST OF TABLES

Table Page

1. Chemical structures of compounds found in rhizome of *C. comosa* 6
2. The main human CYP isoforms (CYP1-4) involved in drug biotransformation and their occurrence 12
3. Differences in the induction mechanisms of CYP 14
4. Polycyclic aromatic hydrocarbon like inducers of CYP 15
5. Drugs and chemicals that act as phenobarbitone-type inducers of CYP 17
6. Substrates and inducers of human liver CYP3A4 19
7. An overview of commonly known inhibitors of the CYP isozyme activity 22
8. Reversible CYP inhibitors 23
9. Drugs that act as quasi irreversible inhibition via metabolic intermediate complexation 23
10. Drugs act as irreversible inhibitor 24
11. Drugs which are substrates of the individual CYP 24
12. Protoxicants and procarcinogens activated by human P450s 26
13. Effects of *C. comosa* extracts on body weight, liver weight and % relative liver weight 43
14. Effects of *C. comosa* extracts on clinical blood chemistry and hematology 46

LIST OF FIGURES

Figure Page

1. *Curcuma comosa* plant and rhizomes 5
2. Synthesis and degradation of functional components of the hepatic mixed-function oxidase system 14
3. Proposed mechanism of CYP2E1 induction 19
4. Receptor-dependent regulation of the CYP3A4 gene 21
5. Effect of *C. comosa* extracts on body weight gain 43
6. Effect of *C. comosa* extracts on food and water consumption 44
7. Effect of *C. comosa* hexane extract and ethanolic extract on total CYP contents 49
8. Effect of *C. comosa* hexane extract and ethanolic extract on rat hepatic CYP1A1 activity 51
9. Effect of *C. comosa* hexane extract and ethanolic extract on rat hepatic CYP1A2 activity 52
10. Effect of *C. comosa* hexane extract and ethanolic extract on rat hepatic CYP2B1/2B2 activity 53
11. Effect of *C. comosa* hexane extract and ethanolic extract on rat hepatic CYP2E1 activity 54
12. Effects of the *C. comosa* hexane extract and ethanolic extract on rat hepatic CYP3A activity 55

LIST OF ABBREVIATIONS

β	beta
°C	degree celcius
µg	microgram
µl	microlitre
µmol	micromole
µM	micromolar
α	alpha
Ah receptor	aliphatic hydrocarbon receptor
Ach	acetylcholine
ALP	alkaline phosphatase
ALT	alanine aminotransferase
AST	aspatate aminotransferase
BFR	bile flow rate
BR	benzyloxyresolufin
BROD	benzyloxyresorufin o-dealkylation
BSA	bovine serum albumin
BUN	blood urea nitrogen
Ca^{2+}	calcium ion
CBC	complete blood count
cm	centimeter
cumm	cubic millimeter
CVD	cardiovascular diseases
CYP	cytochrome P450
dL	deciliter
DMSO	dimethylsulfoxide
EC_{50}	effective concentration
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid

ER	ethoxyresorufin
EROD	ethoxyresorufin o-dealkylation
e.g.	example gratia
et al.	et alii
EtOAc	ethyl acetate
FSH	follicle stimulating hormone
g	gram
g	gravity
G6P	glucose 6-phosphate
G6PD	glucose 6-phosphate dehydrogenase
GST	glutathione S-transferase
Hb	hemoglobin
Hct	hematocrit
HDL-C	high density lipoprotein cholesterol
i.e.	id est (that is)
i.p.	intraperitonium
kg	kilogram
L	litre
LD_{50}	median lethal dose
LDL-C	low density lipoprotein cholesterol
M	molar
3-MC	3-methylcholanthrene
mEq	milliequivalent
min	minute
mg	milligram
mg/kg	milligram per kilogram body weight
ml	millitre
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
$PGF_{2\alpha}$	prostaglandin F_2 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 the mean
TCA	trichloroacetic acid
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin
TG	triglyceride
NO	nitric oxide
THA	2,4,6-trihydroacetophenone
TLC	thin layer chromatography
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethane
U	unit
vs	versus
v/v	volume by volume
w/v	weight by volume

WBC	white blood cell