Thesis Title Antioxidant Activities of *Cleistocalyx nervosum* var. *paniala* Extract and Its Effect on Chemicals Induced Multi-step Hepatocarcinogenesis in Rats

Author Miss Sirinya Taya

Degree Master of Science (Biochemistry)

Thesis Advisor Asst. Prof. Dr. Rawiwan Wongpoomchai

ABSTRACT

Cleistocalyx nervosum var. *paniala*, Ma-kiang, is a native plant in northern region of Thailand. So far, there is no study on the *in vivo* biological activities of its fruit. The present study was designed to investigate toxicity, antioxidant activity and chemopreventive effect on hepatocarcinogenesis of an aqueous extract of the pulp of *C. nervosum*. Some major chemical constituents and *in vitro* antioxidant activity of an aqueous extract of *C. nervosum* were performed. One hundred grams of the fresh fruit contained 181.16±0.59 mg GAE of total phenolic compounds and 54.86±3.45 mg CE of total flavonoids. The major anthocyanins in this extract were cyanidin-3,5-diglucoside, cyanidin-3-glucoside and cyanidin-5-glucoside. The *C. nervosum* extract presented antioxidant activity in a dose-dependent manner using *in vitro* DPPH radical scavenging and deoxyribose assays. Its inhibitory mechanism might be involved with either scavenging free radicals or chelating iron generating Fenton reaction.

The toxicity tests in animal model were performed. In acute toxicity test, oral administration of 5000 mg/kg bw of *C. nervosum* extract produced neither mortality nor significant changes in behavior and gross appearance of the internal organs of male and female rats. In subacute toxicity study, no mortality was observed when the two doses of 100 and 500 mg/kg/day of *C. nervosum* extract were administered orally for a period of 4 weeks. There were no significantly differences in hematological analysis and clinical blood chemistry between the controls and the treated animals of both sexes. It was suggested the aqueous extract of *C. nervosum* containing

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

antioxidant activity had no acute and subacute toxic effects on wistar rat. Furthermore, antioxidant activity of *C. nervosum* extract was confirmed in male rats. The results showed the activity of heme oxygenase in rats administrating *C. nervosum* extract for 4 weeks was significantly enhanced but the other antioxidant markers were similar among treatment group.

To study effect of *C. nervosum* extract containing antioxidant activity on oxidative stress induced early stage of hepatocarcinogenesis in rats, the protocol using the combination of diethylnitrosamine (DEN), a genotoxic carcinogen and phenobarbital (PB), a nongenotoxic carcinogen were performed. Male wistar rats were divided into 5 groups. Group 1 was a negative control receiving 0.9% NSS injection once a week for 3 weeks and tap water as drinking water thoughout the experiment. Groups 2 to 5 were intraperitoneally injected with 100 mg/kg bw of DEN once a week for 3 weeks and received 500 ppm of PB in drinking water for 4 weeks. Group 2 was a positive control group receiving distilled water via gavage feeding throughout 8 weeks of the experimental period. Two weeks before the first injection, group 3 was intragastrically fed with 500 mg/kg bw of *C. nervosum* extract for 8 weeks. Group 4 and 5 were fed with 500 mg/kg bw of *C. nervosum* extract and 100 mg/kg bw of silymarin (a known antioxidant), respectively, at the same time of PB administration. The treatments of *C. nervosum* extract both prior and after initiation tended to decrease the number of GST-P positive foci in liver when compared to the positive control. Interestingly, the administration of silymarin, a known antioxidant, significantly increased the number of GST-P positive foci when compared to a positive control. The *C. nervosum* extract did not alter the number of preneoplastic lesions in the liver of DEN-, PB- induced carcinogenesis; this result might be partly due to either strong carcinogenic potency of chemicals in this model or low antioxidant capacity of the *C.nervosum* extract.

The further protocol was designed by reducing potency of carcinogens and increased concentration of the extract. Male wistar rats were divided into 4 groups. Group 1, a negative control, was intraperitoneally injected with 0.9% NSS once a week for 2 weeks and received tap water as drinking water throughout the experiment. Groups 2 to 4 were intraperitoneally injected with 100 mg/kg bw of DEN once a week

for 2 weeks and received 500 ppm of PB in drinking water for 4 weeks after the last injection. Group 2, a positive control, was intragastically fed with distilled water throughout 8 weeks of the experimental period. Two weeks before the first injection, groups 3 and 4 were intragastically fed with 500 and 1000 mg/kg bw of *C. nervosum* extracts, respectively, for 8 weeks until the end of experiment. The results showed that the number of GST-P positive foci was decreased in the liver of rats treated with 1000 mg/kg bw of the aqueous extract. The *C. nervosum* extract reduced malondialdehyde in serum and liver of rats receiving DEN and PB. It also modulated glutathione level and the activities of glutathione peroxidase, catalase and heme oxygenase.

In conclusion, the aqueous extract of *C. nervosum* containing anthocyanins demonstrated cancer chemopreventive effect on chemicals induced early stages of rat hepatocarcinogenesis. The chemopreventive mechanism might be partly due to either enhancement of the antioxidant status or reduction of oxidative stress in the liver of carcinogens induced rats.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมะเกี๋ยง และผลต่อการเกิดมะเร็งตับหลายขั้นตอนที่เหนี่ยวนำด้วยสารเคมีในหนูขาว

ผู้เขียน นางสาวสิริญญา ทายะ

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ. ดร.รวิวรรณ วงศ์ภูมิชัย

บทคัดย่อ

มะเกี๋ยง (*Cleistocalyx nervosum* var *paniala*) เป็นพืชพื้นเมืองพบมากในเขตภาคเหนือตอนบน แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของเนื้อมะเกี๋ยงในสัตว์ทดลอง งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาความเป็นพิษ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ป้องกันการเกิดมะเร็งตับของสารสกัดส่วนน้ำของมะเกี๋ยง จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมะเกี๋ยงส่วนน้ำ พบว่าเนื้อมะเกี๋ยงสดหนึ่งร้อยกรัมประกอบด้วยสารประกอบฟีนอลิค 181.16±0.59 มิลลิกรัมสมมูลย์ของกรดแกลลิคและปริมาณฟลาโวนอยด์ 54.86±3.45 มิลลิกรัมสมมูลย์ของเคทิชิน ส่วนแอนโธไซยานินที่พบมากในสารสกัดมะเกี๋ยงได้แก่ cyanidin-3,5-diglucoside, cyanidin-3-glucoside และ cyanidin-5-glucoside สารสกัดมะเกี๋ยงส่วนน้ำแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลองด้วยวิธี DPPH radical scavenging และ deoxyribose assays ในหลอดทดลองโดยมีกลไกการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดมะเกี๋ยงส่วนน้ำเกี่ยวข้องกับการจับอนุมูลอิสระและการจับเหล็กที่เป็นตัวการในการเกิดอนุมูลอิสระผ่านปฏิกิริยา Fenton

จากการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของสารสกัดมะเกี๋ยง พบว่าเมื่อป้อนสารสกัดมะเกี๋ยง 5000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวไม่ทำให้หนูตายและไม่มีการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมต่างๆ รวมถึงไม่มีความผิดปกติของอวัยวะภายในเมื่อดูด้วยตาเปล่า ส่วนการศึกษาความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลัน พบว่าไม่มีการตายของหนูเมื่อทำการป้อนสารสกัดมะเกี๋ยง 100 และ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวเป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากการวิเคราะห์ทางโลหิตวิทยา ค่าชีวเคมีในเลือดและน้ำหนักอวัยวะภายในที่สำคัญของหนูทั้งสองเพศ พบว่าไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม จากผลการทดลองอาจสรุปได้ว่าสารสกัดมะเกี๋ยงที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไม่มีความเป็นพิษเฉียบพลันและกึ่งเฉียบพลันในหนู นอกจากนี้จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสัตว์ทดลอง พบว่าสารสกัดมะเกี๋ยงเมื่อป้อนเป็นเวลา 4 สัปดาห์สามารถเหนี่ยวนำกัมมันตภาพของ heme oxygenase อย่างมีนัยสำคัญแต่ไม่มีผลต่อกัมมันตภาพของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระชนิดอื่นๆ

เพื่อเป็นการทดสอบผลของสารสกัดมะเกี๋ยงต่อภาวะเครียดออกซิเดชั่นในระยะเริ่มต้นของการเกิดมะเร็งตับได้ออกแบบการทดลองโดยให้ไดเอทิลไนโตรซามีนซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งแบบพันธุพิษร่วมกับฟีโนบาร์บิทอลซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งแบบอพันธุพิษเหนี่ยวนำให้หนูเกิดรอยโรคก่อนเกิดมะเร็งตับ หนูเพศผู้แบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ทำการฉีด 0.9% Normal saline solution 3 ครั้งและให้น้ำแทนการให้ฟีโนบาร์บิทอล กลุ่มที่ 2 ถึง 5 ทำการฉีดไดเอทิลไนโตรซามีน 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว 3 ครั้งและให้ฟีโนบาร์บิทอล 500 ppm ผสมน้ำดื่มเป็นเวลา 4 สัปดาห์ กลุ่มที่ 1 และ 2 เป็นกลุ่มควบคุมลบและบวกตามลำดับ ป้อนน้ำกลั่นเป็นเวลา 8 สัปดาห์โดยป้อนก่อนการฉีดไดเอทิลไนโตรซามีนครั้งแรก 2 สัปดาห์ หนูกลุ่มที่ 3 ได้รับการป้อนสารสกัดมะเกี๋ยง 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ส่วนกลุ่มที่ 4 และ 5 ได้รับการป้อนสารสกัดมะเกี๋ยง 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวและ silymarin (สารต้านอนุมูลอิสระ) 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ร่วมกับการให้ฟีโนบาร์บิทอลในน้ำดื่ม จากการให้สารสกัดมะเกี๋ยงก่อนและหลังการฉีดไดเอทิลไนโตรซามีน พบว่า จำนวน GST-P positive foci มีแนวโน้มที่ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมบวก แม้ว่าการป้อน silymarin ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระนั้นพบว่าเพิ่มจำนวน GST-P positive foci อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมบวก การที่สารสกัดมะเกี๋ยงไม่มีผลต่อรอยโรคก่อนการเกิดมะเร็งในตับหนูที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยไดเอทิลไนโตรซามีนร่วมกับฟีโนบาร์บิทอลนั้นอาจเนื่องมาจากฤทธิ์เหนี่ยวนำการเกิดมะเร็งของสารก่อมะเร็งในโมเดลที่ใช้สูงเกินไปและ/หรือความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมะเกี๋ยงไม่สูงพอ

ดังนั้นในการทดลองต่อไปได้ทำการลดความเข้มข้นของสารก่อมะเร็งและเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดมะเกี๋ยง โดยแบ่งหนูเพศผู้ออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ได้รับการฉีด 0.9% Normal saline solution 2 ครั้งและให้น้ำแทนการให้ฟีโนบาร์บิทอล กลุ่มที่ 2 ถึง 4 ทำการฉีดไดเอทิลไนโตรซามีน 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว 2 ครั้งและให้ฟีโนบาร์บิทอล 500 ppm ผสมในน้ำดื่มเป็นเวลา 4 สัปดาห์ กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มควบคุมบวก ทำการป้อนน้ำกลั่นทางปากเป็นเวลา 8 สัปดาห์และก่อนการฉีดไดเอทิลไนโตรซามีน 2 สัปดาห์กลุ่ม 3 และ 4 ได้รับการป้อนสารสกัดมะเกี๋ยง 500 และ 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวตามลำดับ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ผลการทดลองพบว่า สารสกัดมะเกี๋ยง 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว มีแนวโน้มลดจำนวน GST-P positive foci ลง ซึ่งเป็นรอยโรคก่อนเกิดมะเร็งตับ นอกจากนี้สารสกัดมะเกี๋ยง 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ยังสามารถลดปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ในซีรั่มและตับที่เกิดจากการเหนี่ยวนำด้วยสารก่อมะเร็ง และเพิ่มระดับกลูตาไธโอนและกัมมันตภาพของเอนไซม์ glutathione peroxidase, catalase และ heme oxygenase

จากการวิจัยสามารถสรุปได้ว่า สารสกัดมะเกี๋ยงส่วนน้ำที่ประกอบด้วยสารกลุ่มแอนโธไซยานินมีฤทธิ์ป้องกันการเกิดมะเร็งตับในระยะเริ่มต้นนั้นโดยกลไกการป้องกันที่เป็นไปได้อาจเกี่ยวข้องกับการเหนี่ยวนำระบบต้านอนุมูลอิสระและการลดภาวะเครียดออกซิเดชั่นในตับหนูที่ได้รับสารก่อมะเร็ง