Thesis Title Effects of Pinocembrin on Initiation and Promotion Stages of Hepatocarcinogenesis in Rats

Author Miss Charatda Punvittayagul

Degree Master of Science (Biochemistry)

Thesis Advisor Asst. Prof. Dr. Rawiwan Wongpoomchai

ABSTRACT

Pinocembrin (5, 7-dihydroxy flavanone) is a flavanone present in some natural products including the rhizome of *Boesenbergia pandurata* or "Kra-chai". Many reports showed its *in vitro* biological benefits without safety indication and *in vivo* biological effects. The mutagenicity and carcinogenicity of pinocembrin isolated from the rhizome of *B. pandurata* were examined in male Wistar rats. The mutagenicity of pinocembrin using liver micronuclei in male Wistar rats was assessed. After feeding rats with 1-100 mg/kg for 7 days, the liver micronucleus formation and mitotic cells in hepatocytes were analyzed. Neither phytochemical affected micronucleus formation nor mitotic index. Our results indicated that pinocembrin was not mutagenic to male Wistar rats within the 1-100 mg/kg interval. Furthermore, the effect of pinocembrin on xenobiotic-metabolizing enzymes was investigated. It was found that the activity of heme oxygenase significantly increased in 10 and 100 mg/kg bw of pinocembrin treated groups ($p<0.05$). However, pinocembrin did not affect on the activities of NADPH: cytochrome P450 reductase, NADPH: quinone reductase, UDP-glucuronosyltransferase and glutathione-*S*-transferase. It also did not affect on the expression of phase I metabolizing enzymes including CYP1A1, CYP2B1, CYP2C11, CYP2E1, CYP3A2, and NADPH: cytochrome P450

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

reductase. Furthermore, the antimutagenic effect of pinocembrin on diethylnitrosamine-initiated mutagenesis in rat liver was investigated. All rats were intraperitoneally injected by 30 mg/kg bw of DEN for 2 times. It was found that the administration of pinocembrin at concentrations of 2, 10 and 50 mg/kg bw for 6 days after initiation, did not inhibit micronucleated hepatocytes formation. However, it slightly reduced number of micronucleated hepatocytes (20-30%) when either increased duration of pinocembrin treatment or decreased concentration of DEN. Moreover, the effect of pinocembrin on promotion stage in DEN-induced rat hepatocarcinogenesis using the medium-term carcinogenicity test was evaluated. Male Wistar rats were divided into 7 experimental groups. At week 3 and 4 of an experiment, groups 1 to 5 were given a double intraperitoneal injection of DEN to initiate hepatocarcinogenesis, while groups 6 and 7 were administrated a normal saline solution instead. Before 2 weeks of the first injection, groups 2 and 3 were orally received 2 and 10 mg/kg bw of pinocembrin, respectively for 15 weeks. While groups 4 and 5 were fed with pinocembrin at the concentrations of 2 and 10 mg/kg bw, respectively, after injections for 1 week, for 10 weeks. Groups 1 and 6 were treated with 5% tween-80 as vehicle controls, while group 7 was fed with pinocembrin at 10 mg/kg. All animals were 2/3 partial hepatectomized at week 6 and were sacrificed at week 15. The livers were immunohistochemically examined for glutathione-*S*-transferase placental form (GST-P) expression, a preneoplastic lesion of rat hepatocellular carcinoma, as the end point marker. These results showed that there was no GST-P positive foci found in livers of pinocembrin treated group and negative control group. Furthermore, 2 and 10 mg/kg bw of pinocembrin did not modulate the number of GST-P positive foci in diethylnitrosamine- induced rat hepatocarcinogenesis. Based on these observations, it could be concluded that pinocembrin did not showed mutagenicity and carcinogenicity in rat liver. It did not present antimutagenicity and anticarcinogenicity in diethylnitrosamine-induced rat hepatocarcinogenesis.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ผลของสารพิโนเซมบรินต่อระยะก่อตัวและระยะส่งเสริมของการเกิดมะเร็งตับในหนูขาว

ผู้เขียน นางสาวชรัชดา พันธุ์วิทยากูล

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร. รวิวรรณ วงศ์ภูมิชัย

บทคัดย่อ

พิโนเซมบริน หรือ 5, 7-dihydroxyflavanone เป็นสารประกอบประเภทฟลาวาโนนชนิดหนึ่งที่พบในผลิตภัณฑ์ธรรมชาติบางชนิดรวมทั้งเหง้ากระชาย (*Boesenbergia pandurata*) จากการศึกษาที่ผ่านมาในหลอดทดลองพบว่าสารนี้มีฤทธิ์ทางชีวภาพ แต่ยังไม่มีการศึกษาถึงความปลอดภัยในการใช้ในสิ่งมีชีวิต ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์และฤทธิ์ก่อมะเร็งของสารพิโนเซมบรินที่สกัดจากเหง้ากระชายในหนูวิสต้าร์เพศผู้ ในการศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารพิโนเซมบริน โดยใช้วิธีการทดสอบการเกิดไมโครนิวเคลียสในตับ ผลการวิจัยพบว่าการให้สารพิโนเซมบรินความเข้มข้น 1-100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อเนื่องกันเป็นเวลา 7 วัน ไม่มีฤทธิ์ในการเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสในเซลล์ตับและไม่มีผลต่อดรรชนีการแบ่งเซลล์แบบไมโตซีสเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ทำการศึกษาผลของสารพิโนเซมบรินต่อเอนไซม์กำจัดสารแปลกปลอม ผลการทดลองพบว่าพิโนเซมบรินความเข้มข้น 10 และ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวเหนี่ยวนำกัมมันตภาพของเอนไซม์ heme oxygenase ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม *($p<0.05$)* แต่อย่างไรก็ตาม พิโนเซมบรินความเข้มข้น 1, 10 และ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวนั้นไม่มีผลต่อกัมมันตภาพของเอนไซม์ NADPH: cytochrome P450 reductase, NADPH: quinone oxidoreductase, UDP-glucuronyltranferase และ glutathione-*S*-transferase นอกจากนี้ยังไม่มีผลต่อการแสดงออกของเอนไซม์ CYP1A1, CYP2B1, CYP2C11, CYP2E1, CYP3A2, และ NADPH:

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

cytochrome P450 reductase อีกด้วย จากนั้นศึกษาฤทธิ์ในการต้านการกลายพันธุ์จากการเหนี่ยวนำด้วยสารไดเอทธิลไนโตรซามีนของพิโนเซมบริน โดยฉีดไดเอทธิลไนโตรซามีนความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว 2 ครั้ง พบว่าการพิโนเซมบรินความเข้มข้น 2, 10 และ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อเนื่องกันเป็นเวลา 6 วันหลังจากเริ่มฉีดไดเอทธิลไนโตรซามีน พบว่าพิโนเซมบรินไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการกลายพันธุ์จากสารไดเอทธิลไนโตรซามีน อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการให้สารพิโนเซมบรินก่อนการให้สารก่อมะเร็งและ/หรือลดความเข้มข้นของ ไดเอทธิลไนโตรซามีนลงสามารถป้องกันการเกิดไมโครนิวเคลียสได้เพียงเล็กน้อย (20-30%) และไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาผลของสารพิโนเซมบรินต่อระยะส่งเสริมของกระบวนการเกิดมะเร็งตับจากการเหนี่ยวนำด้วยสารไดเอทธิลไนโตซามีน โดยใช้การทดสอบฤทธิ์ก่อมะเร็งแบบระยะกลาง โดยแบ่งหนูพันธุ์วิสตาร์เพศผู้ออกเป็น 7 กลุ่ม ในสัปดาห์ที่ 3 และ 4 ของการทดลอง กลุ่มที่ 1-5 ฉีดไดเอทธิลไนโตรซามีนความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ส่วนกลุ่มที่ 6-7 ฉีด Normal Saline Solution ทางช่องท้อง กลุ่ม 2 และ 3 ป้อนสารพิโนเซมบรินความเข้มข้น 2 และ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวตามลำดับเป็นเวลา 15 สัปดาห์ โดยป้อนก่อนฉีดไดเอทธิลไนโตรซามีน 2 สัปดาห์ กลุ่ม 4 และ 5 ป้อนสารพิโนเซมบรินความเข้มข้น 2 และ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวเป็นเวลา 10 สัปดาห์ โดยเริ่มป้อนหลังจากฉีดไดเอทธิลไนโตรซามีน 1 สัปดาห์ กลุ่ม 1 และ 6 ป้อน 5% Tween-80 ส่วนกลุ่มที่ 7 ป้อนพิโนเซมบรินความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนัก ทำการตัดตับออกบางส่วนในสัปดาห์ที่ 6 และทำการุณยฆาตสัปดาห์ที่ 15 ของการทดลอง และตรวจดูการแสดงออกของ GST-P positive foci ซึ่งเป็นรอยโรคก่อนเกิดมะเร็งตับด้วยวิธี Immunohistochemistry ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าไม่พบ GST-P positive foci ในตับของกลุ่มควบคุมลบและกลุ่มที่ได้รับสารพิโนเซมบรินเพียงอย่างเดียวและ พิโนเซมบรินความเข้มข้น 2, 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวไม่สามารถลดจำนวน GST-P positive foci จากการเหนี่ยวนำด้วยไดเอทธิลไนโตรซามีนได้ จากผลการทดลองสรุปได้ว่าพิโนเซมบรินไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ และไม่มีฤทธิ์ก่อมะเร็งตับในหนูขาว และพบว่าพิโนเซมบรินไม่มีฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์และไม่มีฤทธิ์ต้านการเกิดมะเร็งตับจากการเหนี่ยวนำด้วยสารไดเอทธิลไนโตรซามีนในหนูขาว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved