

Thesis Title	Inhibitory Mechanism of Pinostrobin Isolated from <i>Boesenbergia pandurata</i> on Diethylnitrosamine-induced Initiation Stage of Rat Hepatocarcinogenesis	
Author	Mr. Suphachai Charoensin	
Degree	Master of Science (Biochemistry)	
Thesis Advisory Committee	Asst. Prof. Dr. Rawiwan Wongpoomchai	Chairperson
	Asst. Prof. Dr. Teera Chewonarin	Member

ABSTRACT

Pinostrobin (5-hydroxy-7-methoxy flavanone) isolated from *Boesenbergia pandurata* (fingerroot or krachai) is one of flavonoids found in some medicinal plants. Many previous *in vitro* studies suggested that pinostrobin possessed pharmacological and biochemical properties. However, little is known about its property in *in vivo* model. The aims of this study were to evaluate the acute oral toxicity, mutagenicity, and antimutagenicity of pinostrobin in male Wistar rat. To evaluate acute oral toxicity of pinostrobin, rats were orally administered by a single dose of 500 mg/kg of pinostrobin on day 0 and observed for 14 days. There was no death recorded and the animals did not show any sign of toxicity during the experiment. The mutagenicity of pinostrobin was studied using *in vivo* liver micronucleus assay for detecting chromosomal damage. There was no significant difference of micronucleus numbers formed in livers of rats orally administered 1, 10, and 100 mg/kg of pinostrobin. The number of mitotic cells of rats in each group correlated with the result from micronucleus number. These results suggested that pinostrobin did not present mutagenicity in rat liver.

In the study of antimutagenicity, the reduction of micronucleated hepatocytes was not observed in rats orally administered 2-50 mg/kg of pinostrobin for 6 days in

diethylnitrosamine (DEN)-initiated rats. However, pre- and co-treatment of 10-50 mg/kg of pinostrobin with DEN decreased micronucleated hepatocytes in dose-dependent manner compared with control and the significant difference was observed in the highest dose of administration. To clarify chemopreventive mechanism of pinostrobin, some important xenobiotic-metabolizing enzymes and oxidative status were investigated. The expression of hepatic CYP2E1, the major enzyme activating DEN to its DNA-reactive form, in rats administered 50 mg/kg of pinostrobin was significantly decreased compared with control rats. While others, such as P450 reductase, heme oxygenase (HO-1), glutathione *S*-transferase (GST) A and P isozyme were unaffected. Interestingly, glutathione level and GST activity were significantly increased at the same dose of CYP2E1 reduction. In addition, normal rats orally administered 1-100 mg/kg of pinostrobin exhibited no alteration in the expression of CYP2E1, P450 reductase, GSTA and GSTP, while HO-1 expression was dose-dependently decreased compared with control. Also, GST activity was increased in rats administered 100 mg/kg of pinostrobin. From our investigations, pinostrobin possibly inhibited DEN-induced micronucleated hepatocyte formation by decreasing the CYP2E1 expression and inducing both glutathione level and GST activity in the liver. Thus, pinostrobin from Thai fingerroot may exert its chemopreventive effect in an initiation stage of DEN-induced rat hepatocarcinogenesis.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	กลไกยับยั้งการเกิดมะเร็งระยะเริ่มต้นในตับหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยไดเอซิลไนโตรซามีนของสารพิโนสโตรบินที่แยกได้จากกระชาย	
ผู้เขียน	นายศุภชัย เจริญสิน	
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ. ดร. รวีวรรณ วงศ์ภูมิชัย ผศ. ดร. ชีระ ชีโวรินทร์	ประธานกรรมการ กรรมการ

บทคัดย่อ

สารพิโนสโตรบิน (5-ไฮดรอกซี-7-เมทออกซีฟลาวาโนน) ที่แยกจากกระชายเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่พบได้ในพืชสมุนไพรหลายชนิด จากการศึกษาในระดับหลอดทดลองพบว่าสารพิโนสโตรบินมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและชีวเคมี อย่างไรก็ตามมีงานวิจัยไม่มากนักที่ศึกษาผลของสารพิโนสโตรบินในสัตว์ทดลองและเพื่อให้ได้ข้อมูลเบื้องต้นในการนำไปศึกษาคุณสมบัติการป้องกันมะเร็ง ในการศึกษานี้ได้ทดสอบฤทธิ์ก่อความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน ฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ และฤทธิ์ด้านการกลายพันธุ์ของสารพิโนสโตรบินในหนูขาว โดยในการศึกษาความเป็นพิษแบบเฉียบพลันทำการให้สารทดสอบทางปากความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม หนึ่งครั้งในวันแรกของการทดลองและทำการสังเกตเป็นเวลา 14 วัน พบว่าสารพิโนสโตรบินไม่มีความเป็นพิษเฉียบพลันในหนูขาว จึงทำการศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารพิโนสโตรบินโดยใช้การเกิดไมโครนิวเคลียสซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานในการบ่งชี้การแตกหักของแท่งโครโมโซม และในการทดลองนี้ได้ศึกษาการเกิดไมโครนิวเคลียสในเซลล์ตับ พบว่ากลุ่มที่ได้รับสารพิโนสโตรบินความเข้มข้น 1, 10 และ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีจำนวนไมโครนิวเคลียสและดัชนีการแบ่งตัวแบบไมโทซิสของเซลล์ตับไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 สรุปได้ว่าสารพิโนสโตรบินไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ในระดับของหนูขาว

จากการศึกษาฤทธิ์ด้านการกลายพันธุ์ในหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับสารฟิโนสโตรบินความเข้มข้น 2 - 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ร่วมกับสารไดเอธิลไนโตรซามีน (DEN) ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่ามีจำนวนไมโครนิวเคลียสในตับไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามหนูที่ได้รับสารฟิโนสโตรบินความเข้มข้น 10 - 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ก่อนและพร้อมกับการได้รับ DEN ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่ามีจำนวนไมโครนิวเคลียสในตับลดลงแปรผันกับความเข้มข้นของสารฟิโนสโตรบิน และมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในกลุ่มที่ได้รับสารความเข้มข้นสูงสุดเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม การศึกษากลไกยับยั้งการเกิดไมโครนิวเคลียสระดับโมเลกุลพบว่าสารฟิโนสโตรบินสามารถลดระดับการแสดงออกของเอนไซม์ CYP2E1 ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัวหลักที่กระตุ้นการออกฤทธิ์ก่อมะเร็งของ DEN อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ขณะที่เอนไซม์ P450 reductase, heme oxygenase (HO-1), glutathione S-transferase (A และ P ไอโซไซม์) ไม่มีความแตกต่างเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม อีกทั้งพบว่าสารฟิโนสโตรบินเพิ่มกัมมันตภาพของเอนไซม์ GST และระดับของกลูตาไธโอนอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามในหนูขาวที่ได้รับเฉพาะสารฟิโนสโตรบินความเข้มข้น 1, 10 และ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าไม่มีความแตกต่างของการแสดงออกของเอนไซม์ดังกล่าวยกเว้นเอนไซม์ HO-1 ที่มีการแสดงออกลดลงตามความเข้มข้นของสารฟิโนสโตรบินที่เพิ่มขึ้น และพบว่าสารฟิโนสโตรบินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมสามารถเพิ่มกัมมันตภาพของเอนไซม์ GST เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสารฟิโนสโตรบินสามารถลดจำนวนไมโครนิวเคลียสในตับหนูที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย DEN โดยมีผลต่อการลดระดับของเอนไซม์ที่กระตุ้นการออกฤทธิ์ก่อมะเร็งร่วมกับการเหนี่ยวนำระบบการกำจัดพิษของ DEN ในตับ ด้วยเหตุนี้สารฟิโนสโตรบินอาจมีคุณสมบัติป้องกันการเกิดมะเร็งตับระยะเริ่มต้นในหนูขาว