

ผลกึ่งเรื้องรังของสารสกัดมาตรฐานบัวบกต่อเอนไซม์ไซโตโครมพี 450 ในตับ
ของหนูขาว



นางสาวกรณิพิมล กุลทอง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชวิทยา (สหสาขาวิชา)
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



**SUBCHRONIC EFFECTS OF THE STANDARDIZED EXTRACT OF *CENTELLA ASIATICA*
ON RAT HEPATIC CYTOCHROME P450**

Miss Kornphimol Kulthong

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Pharmacology**

(Interdisciplinary Program)

Graduate School

Chulalongkorn University

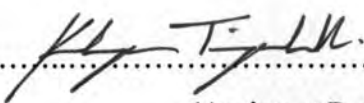
Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

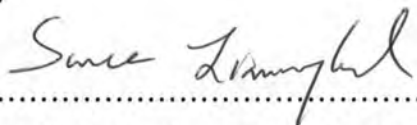
502113

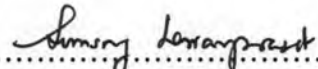
Thesis Title SUBCHRONIC EFFECTS OF THE STANDARDIZED
EXTRACT OF *CENTELLA ASIATICA* ON RAT HEPATIC
CYTOCHROME P450
By Miss Kornphimol Kulthong
Field of study Pharmacology
Thesis Advisor Associate Professor Pol. Lt. Col. Somsong Lawanprasert, Ph.D.
Thesis Co-advisor Associate Professor Mayuree Tantisira, Ph.D.

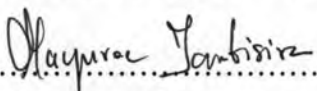
Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in partial
Fulfillment of the Requirement for the Master's Degree

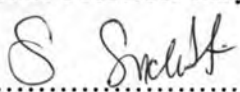
..... Vice President, Acting Dean of the Graduate School
(Assistant Professor M.R. Kalaya Tingsabadh, Ph.D.)

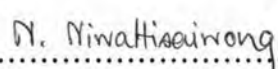
THESIS COMMITTEE

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

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

.....Thesis Co-Advisor
(Associate Professor Mayuree Tantisira, Ph.D.)

.....Member
(Associate Professor Supatra Srichairat, Ph.D.)

.....Member
(Associate Professor Nuansri Niwattisaiwong)

กรณีพิมพ์ กุลทอง: ผลกึ่งเรื้อรังของสารสกัดมาตรฐานบัวบกต่อเอนไซม์ไซโตโครมพี 450 ในตับของหนูขาว. (SUBCHRONIC EFFECTS OF THE STANDARDIZED EXTRACT OF *CENTELLA ASIATICA* ON RAT HEPATIC CYTOCHROME P450) อ.ที่ปรึกษา: รศ.ดร.พ.ต.ท.หญิง สมทรง ลาวัญย์ประเสริฐ, อ.ที่ปรึกษาร่วม: รศ.ดร. มยุรี ดันตีสิริ, 86 หน้า.

บัวบก *Centella asiatica* (L.) Urban วงศ์ Umbelliferae เป็นสมุนไพรพื้นบ้านที่มีสรรพคุณในการรักษาโรคหลายชนิด การศึกษานี้มุ่งศึกษาถึงผลกึ่งเรื้อรังของสารสกัดมาตรฐานบัวบก ต่อการทำงานของเอนไซม์ไซโตโครมพี 450 (CYP) ในตับ ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมของยาและสารแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย ได้แก่ CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1/2B2, CYP2E1 และ CYP3A ในหนูขาว การทดลองใช้หนูขาวเพศผู้และเพศเมียพันธุ์วิสตาร์ โดยแบ่งหนูขาวแต่ละเพศเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว กลุ่มแรกเป็นกลุ่มควบคุม ได้รับน้ำกลั่นสำหรับกลุ่มอื่นๆ ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบกขนาด 10, 100 และ 1000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน เป็นเวลา 90 วันต่อเนื่องกัน โดยการป้อนทางปาก เมื่อครบกำหนดเวลาทำการเมตาบอไลต์และนำตับมาเตรียมไมโครโซมเพื่อวัดสมรรถนะของเอนไซม์ ผลการทดลองพบว่า สารสกัดมาตรฐานบัวบกไม่มีผลต่อปริมาณของ CYP โดยรวม และไม่มีผลเหนี่ยวนำสมรรถนะของเอนไซม์ CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1/2B2, CYP2E1 และ CYP3A เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมในหนูขาว ทั้งเพศผู้และเพศเมีย ทำการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งของสารสกัดมาตรฐานบัวบกต่อสมรรถนะของ CYP ในหลอดทดลองโดยใช้ไมโครโซมเตรียมจากตับของหนูขาว พบว่าสารสกัดมาตรฐานบัวบกมีฤทธิ์ยับยั้ง CYP2B1/2B2 และมีผลน้อยมากต่อ CYP1A2 โดยมีค่า IC_{50} ดังนี้ CYP2B1/CYP2B2 (BROD: $IC_{50} = 523 \mu\text{g/ml}$, PROD: $IC_{50} = 563 \mu\text{g/ml}$) CYP1A2 (MROD: $IC_{50} > 1000 \mu\text{g/ml}$) โดยฤทธิ์ในการยับยั้งแปรผันตามความเข้มข้นของสารสกัดมาตรฐานบัวบก แต่ไม่มีผลยับยั้งต่อสมรรถนะของ CYP1A1, CYP2E1 และ CYP3A ที่ความเข้มข้นสูงถึง $2000 \mu\text{g/ml}$ จากผลการทดลองพบว่า ฤทธิ์ในการยับยั้งสารสกัดมาตรฐานบัวบกต่อ CYP2B1/2B2 ปังชี้ถึงแนวโน้มอันเป็นประโยชน์ของสารสกัดนี้ในเรื่องของการลดการกระตุ้นฤทธิ์ของสารก่อมะเร็งและข้อพึงระวังในส่วนของปฏิสัมพันธ์ระหว่างยารักษาโรคที่ถูกเปลี่ยนแปลงโดยเอนไซม์นี้ ควรทำการศึกษาต่อไปถึงผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบกต่อ CYP isoforms อื่นๆ ที่ยังไม่ได้ทำการศึกษาในครั้งนี้

สาขาวิชา เกษษัตริศาสตร์

ปีการศึกษา 2550

ลายมือชื่อนิสิต... รศ.ดร.พ.ต.ท.หญิง สมทรง ลาวัญย์ประเสริฐ

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา... อ.ที่ปรึกษา รศ.ดร.พ.ต.ท.หญิง สมทรง ลาวัญย์ประเสริฐ

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม... อ.ที่ปรึกษาร่วม รศ.ดร. มยุรี ดันตีสิริ

#4889053920: MAJOR PHAMACOLOGY

KEY WORD: *CENTELLA ASIATICA* / CYTOCHROME P450

KORNPHIMOL KULTHONG: SUBCHRONIC EFFECTS OF THE STANDARDIZED EXTRACT OF *CENTELLA ASIATICA* ON RAT HEPATIC CYTOCHROME P450. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. POL. LT. COL. SOMSONG LAWANPRASERT, Ph.D., THESIS COADVISORS: ASSOC. PROF. MAYUREE TANTISIRA, Ph.D., 86 pp.

Centella asiatica (L.) Urban (Umbelliferae) has been used traditionally in various diseases. The aim of this study was to examine subchronic effects of the standardized extract of *C. asiatica* on hepatic xenobiotic drug metabolizing enzymes, particularly cytochrome P450 (CYP) such as CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1/2B2, CYP2E1 and CYP3A in rats. Forty male and female rats were randomly divided into 4 groups of 10 rats each. Rats in the treatment groups were given orally with the standardized extract of *C. asiatica* at 10, 100 and 1000 mg/kg/day whereas rats in the control group were given distilled water for 90 consecutive days. At the end of treatment, rats were sacrificed and liver microsomes were prepared for enzyme activity assay. The results showed that the standardized extract of *C. asiatica* did not affect total CYP content as well as the activities of CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1/2B2, CYP2E1 and CYP3A in both male and female rats. Inhibitory effect of the standardized extract of *C. asiatica* was examined *in vitro*, using rat liver microsomes. The standardized extract of *C. asiatica* caused a concentration-dependent decrease of the activity of CYP2B1/CYP2B2 (BROD: IC₅₀ = 523 µg/ml, PROD: IC₅₀ = 563 µg/ml) and very slightly effect on CYP1A2 (MROD: IC₅₀ > 1000 µg/ml). The standardized extract of *C. asiatica* had no inhibitory effect on the activities of CYP1A1, CYP2E1 and CYP 3A at concentrations up to 2000 µg/ml. The inhibitory effect of the standardized extract of *C. asiatica* on CYP2B1/2B2 indicated a possibly beneficial effect of the compound regarding the protection of chemical-induced carcinogenesis but the concern regarding the possibilities of drug-drug interaction with the medicines metabolized by these CYPs. Effects of the standardized extract of *C. asiatica* on the activities of other CYP isoformes should be further investigated.

Field of study: Pharmacology

Academic year: 2007

Student's signature... Kornphimol Kulthong

Advisor's signature... Pol. Lt. Col. Somsong Lawanprasert

Co-advisor's signature... Mayuree Tantisira

ACKNOWLEDGEMENTS

First, I would like to express my deepest appreciation and sincere gratitude to my advisor, Associate Professor Pol. Lt. Col. Dr. Somsong Lawanprasert for her helpful advice, encouragement, constant guidance and constructive criticism throughout my research study which enable me to accomplish this thesis.

I also would like to express my deepest and sincere gratitude to my co-advisor, Associate Professor Dr. Mayuree Tantisira for her guidance and helps to support and insightful comments on my research field. Thanks are also extended to Chief Veterinarian Songpol Chivapat and members of the Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Science, Ministry of Public health, for their help on the animal treatment.

I would like to thank Assistant Professor Dr. Suree Jeanmonkol, Associate Professor Dr. Supatra Srichairat, thesis committee members, for their insightful comments. My appreciation is also expressed to Associate Professor Nuansri Niwattisaiwong for her kind assistance on enzyme assay.

This study was supported by the 2006 Faculty Research Fund, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University.

I wish to thank all staff members of the Inter-Department of Pharmacology, The Graduate School, the Department of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University.

Finally, I would like to express my deepest appreciation to my family and friends for their encouragement and moral that made me complete this work.

Contents

	Page
Abstract (Thai).....	iv
Abstract (English).....	v
Acknowledgements.....	vi
Contents.....	vii
List of Tables.....	viii
List of Figures.....	x
List of Abbreviations.....	xii
Chapter	
I Introduction.....	1
II Literature reviews.....	4
III Materials and Methods.....	23
Animals.....	23
Instruments.....	23
Chemicals.....	24
Plant extract.....	24
Methods.....	24
IV Results.....	38
V Discussion and Conclusion.....	51
References.....	55
Appendices.....	60
Vitae.....	86

List of Table

	Page
Table 1 The human cytochrome P450 superfamily.....	13
Table 2 CYP Enzymes: Contribution to Drug Metabolism	14
Table 3 Differences in induction mechanisms for cytochrome P450.....	16
Table 4 Common inducers of human cytochromes P450.....	16
Table 5 The selective inhibitors of the major CYP.....	19
Table 6 Drugs which are metabolized by individual CYP isoforms.....	19
Table 7 The activation of potentially carcinogenic and mutagenic xenobiotics by selected CYP isoforms.....	21
Table 8 Effect of the standardized extract of <i>C. asiatica</i> on CYP1A1 in an <i>in vitro</i> study	49
Table 9 Effect of the standardized extract of <i>C. asiatica</i> on CYP2E1 in an <i>in vitro</i> study.....	49
Table 10 Effect of the standardized extract of <i>C. asiatica</i> on CYP3A in an <i>in vitro</i> study.....	50
Table B1 Microsomal protein concentration of individual male rat	72
Table B2 Microsomal protein concentration of individual female rat	72
Table B3 Hepatic microsomal total CYP content of individual male rat.....	73
Table B4 Hepatic microsomal total CYP content of individual female rat	73
Table B5 Hepatic microsomal EROD activity of individual male rat.....	74
Table B6 Hepatic microsomal EROD activity of individual female rat	74
Table B7 Hepatic microsomal MROD activity of individual male rat.....	75
Table B8 Hepatic microsomal MROD activity of individual female rat	75
Table B9 Hepatic microsomal BROD activity of individual male rat	76
Table B10 Hepatic microsomal BROD activity of individual female rat	76
Table B11 Hepatic microsomal PROD activity of individual male rat.	77
Table B12 Hepatic microsomal PROD activity of individual female rat.....	77
Table B13 Hepatic microsomal aniline 4-hydroxylase activity of individual male rat	78
Table B14 Hepatic microsomal aniline 4-hydroxylase activity of individual female rat	78

	Page
Table B15 Hepatic microsomal erythromycin N-demethylase activity of individual male rat.....	79
Table B16 Hepatic microsomal erythromycin N-demethylase activity of individual female rat.....	79
Table C1 Effect of the standardized extract of <i>C. asiatica</i> on CYP1A1 in an <i>in vitro</i> study.....	81
Table C2 Effect of the standardized extract of <i>C. asiatica</i> on CYP1A2 in an <i>in vitro</i> study	81
Table C3 Effect of the standardized extract of <i>C. asiatica</i> on CYP2B1/2B2 in an <i>in vitro</i> study.....	82
Table C4 Effect of the standardized extract of <i>C. asiatica</i> on CYP2B1/2B2 in an <i>in vitro</i> study.....	82
Table C5 Effect of the standardized extract of <i>C. asiatica</i> on CYP2E1 in an <i>in vitro</i> study.....	83
Table C6 Effect of the standardized extract of <i>C. asiatica</i> on CYP3A in an <i>in vitro</i> study.....	83

List of Figures

	Page
Figure 1 <i>Centella asiatica</i> leaves and plant	4
Figure 2 Structures of asiatic acid , asiaticoside , madecassic acid and Madecassoside.....	5
Figure 3 The equation for P450-dependent mixed-function oxidase (oxygenase) reactions and the two types of electron transport carrier systems functional with different P450s depending on their sub-cellularocalization.....	12
Figure 4 Synthesis and degradation of the functional components of the hepatic Mixed function oxidase system	15
Figure 5 Effect of the standardized extract of <i>C. asiatica</i> on hepatic total CYP Content.....	39
Figure 6 Effect of the standardized extract of <i>C. asiatica</i> on hepatic CYP1A1 activity.....	40
Figure 7 Effect of the standardized extract of <i>C. asiatica</i> on hepatic CYP1A2 activity.....	41
Figure 8 Effect of the standardized extract of <i>C. asiatica</i> on hepatic CYP2B1/2B2 (BROD) activity.....	42
Figure 9 Effect of the standardized extract of <i>C. asiatica</i> on hepatic CYP2B1/2B2 (PROD) activity.....	43
Figure 10 Effect of the standardized extract of <i>C. asiatica</i> on hepatic CYP2E1 activity	44
Figure 11 Effect of the standardized extract of <i>C. asiatica</i> on hepatic CYP3A activity.....	45
Figure 12 Effects of the standardized extract of <i>C. asiatica</i> on CYP2B1/2B2 in an <i>in</i> <i>vitro</i> study	47
Figure 13 Effects of the standardized extract of <i>C. asiatica</i> on CYP1A2 in an <i>in vitro</i> study	48
Figure A1 Linearity of the ethoxyresorufin O-dealkylation assay.....	60
Figure A2 Linearity of the methoxyresorufin O-dealkylation assay	62
Figure A3 Linearity of the benzyloxyresorufin O-dealkylation assay	63
Figure A4 Linearity of the penthoxyresorufin O-dealkylation assay.....	64
Figure A5 Linearity of the aniline 4- hydroxylation assay.....	65

	Page
Figure A6 Linearity of the erythromycin N-demethylation assay.....	66
Figure A7 Effect of β -NF on rat hepatic CYP1A2 activity.....	67
Figure A8 Effect of β -NF on rat hepatic CYP1A1 activity.....	68
Figure A9 Effect of phenobarbital on rat hepatic CYP1A1 activity.....	69
Figure A10 Effect of phenobarbital on rat hepatic CYP1A1 activity.....	70

List of Abbreviations

ALP	= alkaline phosphatase
ALT	= alanine aminotransferase
Ara	= arabinose
AST	= aspartate aminotransferase
BR	= benzyloxyresorufin
BROD	= benzyloxyresorufin o-dealkylation
BSA	= bovine serum albumin
CAT	= catalase
cm	= centimeter
CPA	= cyproterone acetate
CPK	= creatine phosphokinase
CYP	= cytochrome P450
DLA	= dalton's lymphoma ascites tumors
DDC	= diethyldithiobarbarmate
DMSO	= dimethylsulfoxide
DNA	= Deoxyribonucleic acid
ECA	= ehrlich ascites tumour cell
EDTA	= ethylene diamine tetra acetic acid
ER	= ethoxyresorufin
EROD	= ethoxyresorufin o-dealkylation
e.g.	= <i>exempli gratia</i>
et al.	= <i>et alii</i> (and other)
FAD	= flavin adenine dinucleotide
FMN	= flavin mononucleotide
g	= gram
g	= gravity
Gal	= galactose
GalA	= galacturonic acid
Glc	= glucose
GOT	= glutamate oxaloacetate transaminase
GPT	= glutamate pyruvate tranaminase
G6P	= glucose 6-phosphate

G6PD	= glucose 6-phosphate dehydrogenase
GPx	= glutathione peroxidase
GSH-Px	= glutathione peroxidase
GST	= glutathione S-transferase
IC ₅₀	= 50% inhibition concentration
i.e.	= id est (that is)
IFN-g	= Gamma-Interferon
IgG	= Immunoglobulin G
IL	= Interleukin
i.p.	= intraperitonium
ISP	= iron sulfur protein
kg	= kilogram
L	= litre
LDH	= Lactate dehydrogenase
LD ₅₀	= median lethal dose
M	= molar
mEq	= milliequivalent
min	= minute
mg	= milligram
mg/kg	= milligram per kilogram body weight
ml	= milliliter
mm	= millimeter
mM	= millimolar
mmole	= millimole
mRNA	= messenger ribonucleic acid
MDA	= malondialdehyde
MI	= metabolite intermediate
MPO	= myeloperoxidase
MR	= methoxyresorufin
MROD	= methoxyresorufin o-dealkylation
MW	= molecular weight
NADP	= nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NADPH	= nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form)
NF	= naphthofalvone

nm	= nanometer
nmol	= nanomole
PAH	= polycyclic aromatic hydrocarbon
PTZ	= pentylenetetrazole
pH	= potential of hydrogen
pmol	= picomole
PR	= pentoxyresorufin
PROD	= pentoxyresorufin o-dealkylation
RG-I	= rhamnogalacturonan I
Rha	= rhamnose
r.p.m.	= revolution per minute
SAC	= <i>Staphylococcus aureus</i> cowan strain
SEM	= standard error of mean
SOD	= superoxidase dismutase
TAO	= troleandomycin
TCA	= trichloroacetic acid
TCDD	= 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin
Tris	= tris (hydroxymethyl) aminomethane
U	= unit
v/v	= volume by volume
w/v	= weight by volume
Xyl	= xylose
β	= beta
°C	= degree celcius
μg	= microgram
μl	= microlitre
μmol	= micromole
μM	= micromolar
α	= alpha