

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ



E46279

ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF *Cissampelos nervosa* var. *pentala* EXTRACT
AND ITS EFFECT ON CHEMICALS INDUCED MULTI-STEP OF
HEPATOGENESIS IN RATS

SIRINYA TAYA

MASTER OF SCIENCE
IN BIOCHEMISTRY

THE GRADUATE SCHOOL
CHIANG MAI UNIVERSITY

JUNE 2010

600256115



ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



E46279

ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF *Cleistocalyx nervosum* var. *paniala* EXTRACT
AND ITS EFFECT ON CHEMICALS INDUCED MULTI-STEP OF
HEPATOCARCINOGENESIS IN RATS

SIRINYA TAYA

A THESIS SUBMITTED TO THE GRADUATE SCHOOL IN
PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
IN BIOCHEMISTRY

THE GRADUATE SCHOOL
CHIANG MAI UNIVERSITY
JUNE 2010

ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF *Cleistocalyx nervosum* var. *paniala* EXTRACT
AND ITS EFFECT ON CHEMICALS INDUCED MULTI-STEP OF
HEPATOCARCINOGENESIS IN RATS

SIRINYA TAYA

THIS THESIS HAS BEEN APPROVED
TO BE A PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN BIOCHEMISTRY


EXAMINING COMMITTEE

..........CHAIRPERSON


Assoc. Prof. Dr. Ampai Panthong

..........MEMBER


Asst. Prof. Dr. Rawiwan Wongpoomchai

..........MEMBER

Assoc. Prof. Dr. Sugunya Wongpornchai

..........MEMBER

Asst. Prof. Dr. Teera Chewonarin

..........MEMBER

Dr. Piyawan Bunpo

30 June 2010

© Copyright by Chiang Mai University

ACKNOWLEDGEMENTS

The author would like to thank Asst. Prof. Dr. Rawiwan Wongpoomchai for her excellent guidance and encouragement. This thesis would not have been accomplished without her understanding and kind assistance.

She would like to extend her gracious thanks to Assoc. Prof. Dr. Sugunya Wongpornchai, Department of Chemistry, Faculty of Science, for her assistance in analysis of anthocyanin.

She would like to thanks to Asst. Prof. Dr. Teera Chewonarin for his kind suggestions and reading of the manuscript.

The thesis was supported by Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC) and the Endowment Fund for Medical Research, Faculty of Medicine, Chiang Mai University. She would like to thank Ms. Pimwalun Pinthuprapa for providing *C. nervosum*.

She expresses her thanks to the Department of Biochemistry and Medical Science Research Equipment Center, Laboratory Animal House, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, in allowing her to access and use any facilities for the laboratory work completion.

Finally, she would like to express her appreciation to her friends: Ms. Charatda Punvittayagul, Mr. Suphachai Charoensin, Ms. Wanida Inboot, Mrs. Janya Tipsri, Ms. Kanjana Pangjit and Ms. Piyawan Nantabun for their helps over time. She also thanks to her family for their love, support, understanding and encouragement throughout her life.

Sirinya Taya

Thesis Title	Antioxidant Activities of <i>Cleistocalyx nervosum</i> var. <i>paniala</i> 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

E46279

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 significant 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

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 throughout 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

E46279

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

ฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมะเข็ญ และผลต่อการเกิด
มะเร็งตับหลายขั้นตอนที่เหนี่ยวนำด้วยสารเคมีในหนูขาว

ผู้เขียน

นางสาวสิริญา ทายะ

ปริญญา

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผศ. ดร.รวิวรรณ วงศ์ภูมิชัย

บทคัดย่อ**E46279**

มะเข็ญ (*Cleistocalyx nervosum* var *paniala*) เป็นพืชพื้นเมืองพบมากในเขตภาคเหนือตอนบน แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของเนื้อมะเข็ญในสัตว์ทดลอง งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาความเป็นพิษ ฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ป้องกันการเกิดมะเร็งตับของสารสกัดส่วนน้ำของมะเข็ญ จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญและฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมะเข็ญส่วนน้ำ พบว่าเนื้อมะเข็ญสดหนึ่งร้อยกรัมประกอบด้วยสารประกอบฟีนอลิก 181.16 ± 0.59 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกและปริมาณฟลาโวนอยด์ 54.86 ± 3.45 มิลลิกรัมสมมูลของเคทิซิน ส่วนแอนโทไซยานินที่พบมากในสารสกัดมะเข็ญได้แก่ cyanidin-3,5-diglucoside, cyanidin-3-glucoside และ cyanidin-5-glucoside สารสกัดมะเข็ญส่วนน้ำแสดงฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลองด้วยวิธี DPPH radical scavenging และ deoxyribose assays ในหลอดทดลองโดยมีกลไกการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดมะเข็ญส่วนน้ำเกี่ยวข้องกับการจับอนุมูลอิสระและการจับเหล็กที่เป็นตัวการในการเกิดอนุมูลอิสระผ่านปฏิกิริยา Fenton

จากการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของสารสกัดมะเข็ญ พบว่าเมื่อป้อนสารสกัดมะเข็ญ 5000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวไม่ทำให้หนูตายและไม่มีการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมต่างๆ รวมถึงไม่มีความผิดปกติของอวัยวะภายในเมื่อดูด้วยตาเปล่า ส่วนการศึกษาความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลัน พบว่าไม่มีการตายของหนูเมื่อทำการป้อนสารสกัดมะเข็ญ 100 และ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวเป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากการวิเคราะห์ทางโลหิตวิทยา ค่าชีวเคมีในเลือดและน้ำหนักอวัยวะภายในที่สำคัญของหนูทั้งสองเพศ พบว่าไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม จากผลการทดลองอาจสรุปได้ว่าสารสกัดมะเข็ญที่มีฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระไม่มีความเป็นพิษเฉียบพลันและกึ่งเฉียบพลันในหนู นอกจากนี้จากการศึกษาฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระในสัตว์ทดลอง พบว่าสารสกัดมะเข็ญเมื่อป้อนเป็นเวลา 4 สัปดาห์สามารถเหนี่ยวนำกัมมันตภาพของ heme oxygenase อย่างมีนัยสำคัญแต่ไม่มีผลต่อกัมมันตภาพของเอนไซม์ด้านอนุมูลอิสระชนิดอื่นๆ

E46279

เพื่อเป็นการทดสอบผลของสารสกัดมะเขือเทศต่อภาวะเครียดออกซิเดชันในระยะเริ่มต้นของการเกิดมะเร็งตับ ได้ออกแบบการทดลองโดยให้ไคเอทิลโนโตรซามีนซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งแบบพันธุพิษร่วมกับฟีโนบาร์บิทอลซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งแบบอพันธุพิษเหนี่ยวนำให้หนูเกิดรอยโรคก่อนเกิดมะเร็งตับ หนูเพศผู้แบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ทำการฉีด 0.9% Normal saline solution 3 ครั้งและให้น้ำแทนการให้ฟีโนบาร์บิทอล กลุ่มที่ 2 ถึง 5 ทำการฉีดไคเอทิลโนโตรซามีน 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว 3 ครั้งและให้ฟีโนบาร์บิทอล 500 ppm ผสมน้ำดื่มเป็นเวลา 4 สัปดาห์ กลุ่มที่ 1 และ 2 เป็นกลุ่มควบคุมและบวกลบตามลำดับ ป้อนน้ำกลั่นเป็นเวลา 8 สัปดาห์โดยป้อนก่อนการฉีดไคเอทิลโนโตรซามีนครั้งแรก 2 สัปดาห์ หนูกลุ่มที่ 3 ได้รับการป้อนสารสกัดมะเขือเทศ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ส่วนกลุ่มที่ 4 และ 5 ได้รับการป้อนสารสกัดมะเขือเทศ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวและ silymarin (สารต้านอนุมูลอิสระ) 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ร่วมกับการให้ฟีโนบาร์บิทอลในน้ำดื่ม จากการให้สารสกัดมะเขือเทศก่อนและหลังการฉีดไคเอทิลโนโตรซามีน พบว่า จำนวน GST-P positive foci มีแนวโน้มที่ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมบวกลบ แม้ว่าการป้อน silymarin ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระนั้นพบว่าเพิ่มจำนวน GST-P positive foci อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมบวกลบ การที่สารสกัดมะเขือเทศไม่มีผลต่อรอยโรคก่อนการเกิดมะเร็งในตับหนูที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยไคเอทิลโนโตรซามีนร่วมกับฟีโนบาร์บิทอลนั้นอาจเนื่องมาจากฤทธิ์เหนี่ยวนำการเกิดมะเร็งของสารก่อมะเร็งในโมเดลที่ใช้สูงเกินไปและ/หรือความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมะเขือเทศไม่เพียงพอ

ดังนั้นในการทดลองต่อไปได้ทำการลดความเข้มข้นของสารก่อมะเร็งและเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดมะเขือเทศ โดยแบ่งหนูเพศผู้ออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ได้รับการฉีด 0.9% Normal saline solution 2 ครั้งและให้น้ำแทนการให้ฟีโนบาร์บิทอล กลุ่มที่ 2 ถึง 4 ทำการฉีดไคเอทิลโนโตรซามีน 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว 2 ครั้งและให้ฟีโนบาร์บิทอล 500 ppm ผสมในน้ำดื่มเป็นเวลา 4 สัปดาห์ กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มควบคุมบวกลบ ทำการป้อนน้ำกลั่นทางปากเป็นเวลา 8 สัปดาห์และก่อนการฉีดไคเอทิลโนโตรซามีน 2 สัปดาห์ กลุ่ม 3 และ 4 ได้รับการป้อนสารสกัดมะเขือเทศ 500 และ 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวตามลำดับ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ผลการทดลองพบว่า สารสกัดมะเขือเทศ 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว มีแนวโน้มลดจำนวน GST-P positive foci ลง ซึ่งเป็นรอยโรคก่อนเกิดมะเร็งตับ นอกจากนี้สารสกัดมะเขือเทศ 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ยังสามารถลดปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ในซีรัมและตับที่เกิดจากการเหนี่ยวนำด้วยสารก่อมะเร็ง และเพิ่มระดับกลูตาไธโอนและกัมมันตภาพของเอนไซม์ glutathione peroxidase, catalase และ heme oxygenase

E46279

จากการวิจัยสามารถสรุปได้ว่า สารสกัดมะเขือขื่นส่วนน้ำที่ประกอบด้วยสารกลุ่มแอนโธไซยานินมีฤทธิ์ป้องกันการเกิดมะเร็งตับในระยะเริ่มต้นนั้นโดยกลไกการป้องกันที่เป็นไปได้ อาจเกี่ยวข้องกับการเหนี่ยวนำระบบต้านอนุมูลอิสระและการลดภาวะเครียดออกซิเดชันในตับหนูที่ได้รับสารก่อมะเร็ง

TABLE OF CONTENTS

	Page
ACKNOWLEDGEMENT	iii
ENGLISH ABSTRACT	iv
THAI ABSTRACT	vii
LIST OF TABLES	xiii
LIST OF FIGURES	xv
ABBREVIATIONS AND SYMBOLS	xvii
CHAPTER I INTRODUCTION	
1.1 Statement of the problems	1
1.2 Literature reviews	3
1.2.1 Oxidative stress and reactive oxygen species	3
1.2.2 Oxidative stress in the cancer process	7
1.2.3 Classification of carcinogens	9
1.2.4 Medium-term bioassay system	13
1.2.5 Antioxidant defense system	15
1.2.6 Mechanisms of chemopreventive agents	21
1.2.7 Anthocyanins	26
1.2.8 <i>Cleistocalyx nervosum</i> var. <i>paniala</i>	32
1.3 Objectives of the study	33
CHAPTER II MATERIALS AND METHODS	
2.1 Chemicals and instruments	34
2.2 Preparation of <i>Cleistocalyx nervosum</i>	34
2.3 Extraction of <i>Cleistocalyx nervosum</i>	34
2.4 Determination of chemical constituents	35
2.4.1 Determination of total phenolic compounds	35
2.4.2 Determination of total flavonoids	35

	Page
2.4.3 Determination of condensed tannins	35
2.4.4 Determination of anthocyanins	36
2.5 Determination of <i>in vitro</i> antioxidant activity	36
2.5.1 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical-scavenging assay	36
2.5.2 Non-site-specific and site-specific hydroxyl radical-scavenging activity by deoxyribose assay	36
2.6 The evaluation the oral acute and subacute toxicities of <i>Cleistocalyx nervosum</i> in Wistar rats	37
2.6.1 Experimental animals	37
2.6.2 Acute toxicity test	37
2.6.3 Subacute toxicity test	38
2.7 The effect of <i>Cleistocalyx nervosum</i> extract on oxidative status in Wistar rats	38
2.8 The preliminary study for protocol of carcinogens induced oxidative stress in early stages of rat hepatocarcinogenesis	38
2.9 Effect of aqueous extract of <i>Cleistocalyx nervosum</i> on oxidative stress induced early stage of hepatocarcinogenesis	39
2.9.1 Protocol I	39
2.9.2 Protocol II	42
2.10 Determination of oxidative stress and antioxidant markers	44
2.10.1 Determination of lipid peroxidation	44
2.10.2 Determination of total glutathione	45
2.10.3 Preparation of the cytosolic and microsomal fractions	46
2.10.4 Glutathione peroxidase activity assay	46
2.10.5 Glutathione reductase activity assay	47
2.10.6 Catalase activity assay	48
2.10.7 Heme oxygenase activity assay	48
2.10.8 Total protein determination detect	49
2.11 Glutathione-S-transferase P form positive foci	50
2.12 Statistical analysis	50

	Page
CHAPTER III RESULTS	
3.1 Chemical constituents and antioxidant activities of <i>Cleistocalyx nervosum</i> aqueous extract	51
3.2 Acute toxicity test	53
3.3 Subacute toxicity test	53
3.4 The effect of <i>Cleistocalyx nervosum</i> extract on oxidative stress and antioxidant system	58
3.5 The preliminary study for protocol of carcinogens induced oxidative stress in early stages of rat hepatocarcinogenesis	60
3.6 Effect of <i>Cleistocalyx nervosum</i> extract on oxidative stress induced early stage of hepatocarcinogenesis	62
3.6.1 Protocol I	62
3.6.2 Protocol II	67
CHAPTER IV DISCUSSION AND CONCLUSION	72
REFERENCES	78
APPENDICES	99
APPENDIX A	100
APPENDIX B	103
APPENDIX C	104
APPENDIX D	107
VITA	117

LIST OF TABLES

Table		Page
1-1	Reactive oxygen and nitrogen species generation and removal in the cell	4
1-2	Pathways for intercellular oxidant generation	6
1-3	Classification of carcinogens according to mode of actions	11
1-4	Potential mechanisms of dietary chemopreventive compounds	24
3-1	Chemical constituents and antioxidant activities of <i>Cleistocalyx nervosum</i> aqueous extract	52
3-2	Body and relative organ weights of rats in acute toxicity of the aqueous extract from <i>Cleistocalyx nervosum</i>	54
3-3	Body weight, diet and water intakes and relative organ weights of rats in subacute toxicity of the aqueous extract from <i>Cleistocalyx nervosum</i>	55
3-4	Hematological values of male rats in subacute toxicity of the aqueous extract from <i>Cleistocalyx nervosum</i>	56
3-5	Blood chemistry values of rats in subacute toxicity of the aqueous extract from <i>Cleistocalyx nervosum</i>	57
3-6	Effect of aqueous extract from <i>Cleistocalyx nervosum</i> on antioxidant status in male rat liver	59
3-7	Effect of DEN administration on various biological parameters in chemicals induced hepatocarcinogenesis in rat	61
3-8	Effect of <i>Cleistocalyx nervosum</i> extract on various biological parameters in protocol I	63
3-9	Effect of <i>Cleistocalyx nervosum</i> extract on Glutathione-S-transferase P positive foci in protocol I	65
3-10	Effect of aqueous extract from <i>Cleistocalyx nervosum</i> on oxidative stress and antioxidant status in protocol I	66

Table	Page
3-11 Effect of <i>Cleistocalyx nervosum</i> extract on various biological parameters in protocol II	68
3-12 Effect of <i>Cleistocalyx nervosum</i> extract on Glutathione-S-transferase P positive foci in protocol II	69
3-13 Effect of aqueous extract from <i>Cleistocalyx nervosum</i> on oxidative stress and antioxidant status in protocol II	71
S1 Structural assignment of anthocyanins in <i>Cleistocalyx nervosum</i> extract	116

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1-1	Three stages model of carcinogenesis	8
1-2	The level of carcinogenic effect and level of free radicals at various stages of carcinogenic process	9
1-3	Chemical structure of diethylnitrosamine	12
1-4	Chemical structure of phenobarbital	13
1-5	Glutathione-S-transferase placental form (GST-P) positive foci as an marker of liver medium-term bioassay system	14
1-6	Schematic outlines of cellular defenses against oxidative stress mediated cellular damage	15
1-7	General anthocyanins structure	27
1-8	Structures of known naturally occurring anthocyanidins, sugar moieties, and acylated substitutes	28
1-9	A schematic molecular view of cancer chemoprevention by Anthocyanidins	30
1-10	<i>Cleistocalyx nervosum</i> var. <i>paniala</i>	32
2-1	The protocol for the preliminary study of effect of diethylnitrosamine concentration on oxidative stress induced early stage hepatocarcinogenesis	40
2-2	Treatment protocol I for effect of aqueous extract of <i>C. nervosum</i> on oxidative stress induced early stage of hepatocarcinogenesis	41
2-3	Treatment protocol II for effect of aqueous extract of <i>C. nervosum</i> on oxidative stress induced early stage of hepatocarcinogenesis	43
2-4	Principle of thiobarbituric acid reactive substances (TBARs) assay	45
2-5	The principle of glutathione measurement	46

Figure		Page
2-6	Principle of glutathione peroxidase (1) and glutathione reductase (2) activities assay	48
2-7	Enzymatic reaction of heme oxygenase	49
S1	Concentration–response curve of total phenolic compounds	107
S2	Concentration–response curve of total flavonoids	108
S3	Concentration–response curve condensed tannins	108
S4	Chromatograms obtained by LC-DAD at wavelength 520 nm of extracts from Ma-kiang (1, 2); (A) Ma-kiang 1 (MK-1) (B) Ma-kiang 2 (MK-2)	111
S5	UV-Vis spectra of the peaks shown in Figure 21 obtained by LC-DAD of an extract from Ma-kiang (1) (A) Peak 1, (B) Peak 2, and (C) Peak 3	112
S6	Chromatograms obtained by LC-ESI-MS of the extracts from; (A) Ma-kiang 1 (MK 1) (B) Ma-kiang 2 (MK 2)	113
S7	Full scan ESI-MS spectrum of component at retention time 17.80 (Peak number 1)	114
S8	Full scan ESI-MS spectrum of component at retention time 20.83 (Peak number 2)	115
S9	Full scan ESI-MS spectrum of component at retention time 42.82 (Peak number 3)	116

ABBREVIATIONS AND SYMBOLS

%	Percentage
°C	Degree Celsius
AST	Aspartate aminotransferase
ALT	Alanine aminotransferase
ALP	Alkaline phosphatase
BSA	Bovine serum albumin
CE	Catechin equivalents
DEN	Diethylnitrosamine
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EDTA	Ethylene dinitro tetra acetic acid
g	gram
GAE	Gallic acid equivalents
GST-P	Glutathione- <i>S</i> -transferase placental form
HO	Heme oxygenase
hr	Hour
ig	Intragavage
ip	Intraperitoneum
KH ₂ PO ₄	Potassium dihydrogen phosphate
K ₂ HPO ₄	Dipotassium hydrogen phosphate
l	Liter
M	Molar
MDA	Malondialdehyde
MgCl ₂	Magnesium chloride
mg/kg bw	Milligram per kilogram body weight
mg	Milligram
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar

μl	Microliter
μM	Micromolar
nm	Nanometer
OD	Optical density
OECD	The Organization of Economic Co- operation and development
pH	Power of hydrogen
rpm	Round per minute
TBARs	Thiobarbituric acid reactive substances
Wks	Weeks