

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



E42196



THE STUDY OF THE EFFECT OF *CURCUMA COMOSA*
HEXANE EXTRACT ON THE SPATIAL MEMORY AND
BRAIN MORPHOLOGY OF THE OVARECTOMIZED
RATS AND THE ANTIOXIDATIVE ABILITY AND
PHARMACOKINETIC STUDY OF THE EXTRACT

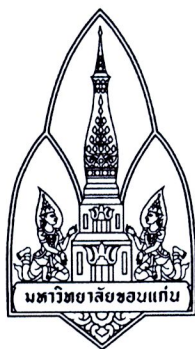
MR. JIAN SU

A THESIS FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
KHON KAEN UNIVERSITY

2009



E42196



**THE STUDY OF THE EFFECT OF *CURCUMA COMOSA*
HEXANE EXTRACT ON THE SPATIAL MEMORY AND
BRAIN MORPHOLOGY OF THE OVARIECTOMIZED
RATS AND THE ANTIOXIDATIVE ABILITY AND
PHARMACOKINETIC STUDY OF THE EXTRACT**



MR. JIAN SU

**A THESIS FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF
PHILOSOPHY KHON KAEN UNIVERSITY**

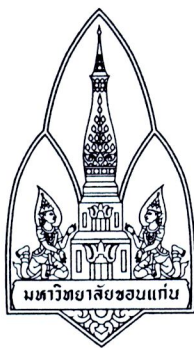
2009

**THE STUDY OF THE EFFECT OF *CURCUMA COMOSA*
HEXANE EXTRACT ON THE SPATIAL MEMORY AND
BRAIN MORPHOLOGY OF THE OVARIECTOMIZED
RATS AND THE ANTIOXIDATIVE ABILITY AND
PHARMACOKINETIC STUDY OF THE EXTRACT**

MR. JIAN SU

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE
REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF
PHILOSOPHY IN PHARMACEUTICAL SCIENCE
GRADUATE SCHOOL KHON KAEN UNIVERSITY**

2009



THESIS APPROVAL
KHON KAEN UNIVERSITY
FOR DOCTOR OF PHILOSOPHY IN PHARMACEUTICAL SCIENCE



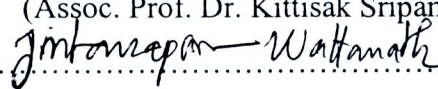
Thesis Title: The Study of the Effect of *Curcuma comosa* Hexane Extract on the Spatial Memory and Brain Morphology of the Ovariectomized Rats and the Antioxidative Ability and Pharmacokinetic Study of the Extract.


Author: Mr. Jian Su

Thesis Examination Committee

Prof. Dr. J. Michael Wyss	Chairperson
Assoc. Prof. Dr. Bungorn Sripanidkulchai	Member
Assoc. Prof. Dr. Kittisak Sripanidkulchai	Member
Prof. Dr. Pawinee Piyachaturawat	Member
Prof. Dr. Apichart Suksamrarn	Member
Assoc. Prof. Dr. Jomjai Peerapattana	Member

Thesis Advisors:

..........Advisor
(Assoc. Prof. Dr. Bungorn Sripanidkulchai)
..........Co-Advisor
(Assoc. Prof. Dr. Kittisak Sripanidkulchai)
..........Co-Advisor
(Assist. Prof. Dr. Jintanaporn Wattanathorn)

..........
(Assoc. Prof. Dr. Lampang Manmart) (Assoc. Prof. Dr. Bungorn Sripanidkulchai)
Dean, Graduate School Dean, Faculty of Pharmaceutical Science

ชู เจียน. 2552. การศึกษาผลของส่วนสกัดชั้นเฮกเซนของว่านชักมดลูกต่อความทรงจำระยะสั้นและลักษณะทางสมองในหนูที่ถูกตัดรังไข่ และความสามารถในการต้านออกซิเดชัน และเภสัชจลนศาสตร์ของสารสกัด. วิทยานิพนธ์ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาวิจัยและพัฒนาเภสัชภัณฑ์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: รศ.ดร.บงอร ศรีพานิชกุลชัย, รศ.ดร.กิตติศักดิ์ ศรีพานิชกุลชัย, ผศ.ดร.จินตนาภรณ์ วัฒนธร

บทคัดย่อ

E 42196

ว่านชักมดลูกเป็นพืชสมุนไพรที่มีรายงานพบฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน ซึ่งด้วยคุณสมบัตินี้ทำให้ว่านชักมดลูกเป็นหนึ่งในสมุนไพรที่มีศักยภาพที่จะถูกพัฒนาเป็นยาสำหรับรักษาโรคและบรรเทาอาการ ซึ่งรวมถึงการบดบังของความจำที่เกิดจากสมดุลของฮอร์โมนเอสโตรเจนในผู้หญิงวัยทอง การงานวิจัยนี้ได้ศึกษาผลต่อการพัฒนาความจำปริภูมิ รวมทั้งศึกษากลไกและเภสัชจลนศาสตร์ ของส่วนสกัดชั้นเฮกเซนของว่านชักมดลูก ในหนูที่ถูกตัดรังไข่

โดยการศึกษาผลของส่วนสกัดว่านชักมดลูกต่อความจำระยะยาวโดยการสังเกตพฤติกรรมของหนู ซึ่งในการศึกษาหนูแต่ละกลุ่มทางปากได้รับส่วนสกัดว่านชักมดลูก (ขนาด 250 และ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัว) และฮอร์โมนเอสโตรเจน 17 β -estradiol โดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง (ขนาด 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัว) จากนั้นศึกษาการทำงานและการเปลี่ยนแปลงของความจำระยะยาวของหนู ในช่วงเวลาต่างๆ โดยใช้โมเดลการศึกษา Morris water maze (MWM) รวม 3 ครั้ง และ radial arm maze (RAM) รวม 2 ครั้ง ผลการศึกษาพบว่าความบกพร่องของความจำปริภูมิของหนูที่ถูกตัดรังไข่ในการศึกษาครั้งที่ 2 ในโมเดล MWM ในวันที่ 67 หลังการผ่าตัดเอารังไข่ออก และความบกพร่องของความจำดังกล่าว สามารถแก้ไขได้เมื่อหนูได้รับส่วนสกัดว่านชักมดลูก หรือฮอร์โมนเอสโตรเจนชนิด 17 β -estradiol และผลจากโมเดล RAM พบว่าการผ่าตัดรังไข่ของหนูออก ไม่มีผลต่อความจำของหนู

สำหรับการศึกษาของส่วนสกัดว่านชักมดลูกต่อความจำระยะสั้นของหนูที่ได้รับการฝึกก่อนที่จะถูกผ่าตัดเอารังไข่ออก เทียบกับฮอร์โมนเอสโตรเจน โดยหนูแต่ละกลุ่มจะได้รับสารสกัดว่านชักมดลูก (ขนาด 250 และ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัว) และฮอร์โมนเอสโตรเจน (ขนาด 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัว) โดยวิธีการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง พบว่าหนูจะสูญเสียความทรงจำเล็กน้อยในสัปดาห์ที่ 1, 2, และ 4 หลังการผ่าตัด แต่พบว่าสารสกัดว่านชักมดลูกและฮอร์โมนเอสโตรเจนมีผลทำให้การสูญเสียความจำดังกล่าวเพิ่มขึ้น

การศึกษานี้ยังพบผลของสารสกัดว่านชักมดลูก ยังมีผลอย่างจำเพาะเจาะจงต่อการแสดงออกของยีน (mRNA) ตัวรับเอสโตรเจน ชนิดอัลฟา (estrogen receptor; ER) ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูที่ได้ผ่าตัดเอารังไข่ออก การได้รับสารสกัดว่านชักมดลูก (ขนาด 250 และ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ของน้ำหนักตัว) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยใช้เทคนิค reverse transcription

E 42196

polymerase chain reaction (RT-PCR) ในขณะที่ฮอร์โมนเอสโตรเจนทำให้มีการเพิ่มการแสดงออกของ mRNA ทั้งของตัวรับชนิดอัลฟา (α -ER) และ บีต้า (β -ER)

การศึกษาผลของสารสกัดจากชั่งมดลูกต่อสมองส่วนฮิปโปแคมปัส โดยใช้อัตราส่วนของปริมาตรของ ฮิปโปแคมปัส ต่อ น้ำหนักตัวของหนู เป็นตัวบ่งชี้การเปลี่ยนแปลง ซึ่งปริมาตรของสมองส่วนฮิปโปแคมปัส สามารถหาได้โดยการพัฒนาเทคนิคที่เรียกว่า section-staining-reconstruction method ซึ่งสามารถบอกปริมาตร และ โครงสร้างภายในของสมองหนูได้ และผลการศึกษาพบว่าสารสกัดจากชั่งมดลูก และ ฮอร์โมนเอสโตรเจนทำให้อัตราส่วนของปริมาตรของฮิปโปแคมปัส ต่อ น้ำหนักตัวของหนู และความหนาแน่นของเซลล์ประสาท (neurons) ชนิด CA1 และ CA3 เพิ่มขึ้น

การศึกษาผลของสารสกัดจากชั่งมดลูกต่อเอนไซม์ที่ด้านการเกิดออกซิเดชันในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส โดยฉีดสารสกัดจากชั่งมดลูกให้กับหนูทางช่องท้อง (intraperitoneal) (ขนาด 100 และ 250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัว) พบว่าสารสกัดจากชั่งมดลูกมีผลด้านการทำงานที่เพิ่มมากขึ้นของเอนไซม์ glutathione peroxidase (Gpx) ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส และ ไฮโปทาลามัส ซึ่งถูกกระตุ้นโดยเอทานอล อย่างไรก็ตาม สารสกัดจากชั่งมดลูกก็สามารถยับยั้งการกระตุ้นเอนไซม์ superoxide-dismutase โดยเอทานอล ในสมอง และพบว่าสารสกัดจากชั่งมดลูก และเอทานอลเสริมฤทธิ์กันในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ catalase ในสมองส่วนคอร์เทกซ์ และ ฮิปปอกาลัม และลดการทำงานของเอนไซม์ catalase และ Gpx ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส และ ฮิปปอกาลัม ตามลำดับ ซึ่งเอทานอลเองไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์แต่อย่างใด

จากการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของสารสกัดจากชั่งมดลูก ส่วนประกอบทางเคมีที่สามารถถูกดูดซึมผ่านทางเดินอาหาร ได้ถูกตรวจสอบ และค่าตัวแปรทางเภสัชจลนศาสตร์ เช่น ปริมาณสารที่ถูกดูดซึม, การกระจายตัวในอวัยวะต่างๆ, ระยะเวลาที่ใช้ในการขับสารออกจากร่างกาย, ความเข้มข้นสูงสุดในกระแสเลือด, และ เวลาในการดูดซึมเพื่อให้ได้ความเข้มข้นในเลือดสูงสุด

Jian Su. 2009. **The Study of the Effect of *Curcuma comosa* Hexane Extract on the Spatial Memory and Brain Morphology of the Ovariectomized Rats and the Antioxidative Ability and Pharmacokinetic Study of the Extract.**
Doctoral of Philosophy Thesis in Research and Development of Pharmaceutics,
Graduate School, Khon Kaen University.

Thesis Advisors: Assoc. Prof. Dr. Bungorn Sripanidkulchai,
Assoc. Prof. Dr. Kittisak Sripanidkulchai,
Assist. Prof. Dr. Jintanaporn Wattanathorn

ABSTRACT

E 42196

Curcuma comosa Roxb. has been reported to have the estrogenic-like effects. This unique feature allows it to be a potential candidate in developing the substitute to replace the estradiol for the estrogen replacement therapy, which is to alleviate the unpleasant postmenopausal syndromes including the cognitive degeneration. In the present study, the effect of *C. comosa* hexane extract (CHE) on the improvement of the spatial memory of the ovariectomized OVX rats and the possible mechanism were reported and the pharmacokinetics study of the CHE was conducted.

In a long-term behaviors test, CHE (at the doses of 250 and 500 mg/kg body weight, orally) and 17 β -estradiol (10 μ g/kg body weight, subcutaneously) were daily administered to the OVX rats. Three periods of Morris water maze (MWM) and 2 periods of radial arm maze (RAM) tasks were used to evaluate the status and follow up the progressing changes of the spatial reference memory and working memory of the animals. The impairment of spatial reference memory on OVX rats was found at 67th day after the OVX surgery in the 2nd MWM test period. This impairment was reversed by the CHE and 17 β -estradiol administration. Of the RAM test, OVX did not affect the spatial working memory in rats. Another separated MWM test was also conducted to evaluate the short-term effects of CHE (250 and 500 mg/kg body weight, orally) and 17 β -estradiol (10 μ g/kg body weight, subcutaneously) on the pre-training OVX rats. OVX slightly impaired the spatial reference memory in rats at 1 week, 2

weeks and 4 weeks after the surgery. Unexpectedly, the treatment of CHE and estradiol augment these impairments.

Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) study on estrogen receptor (ER) mRNA showed the CHE selectively increase the hippocampus ER alpha mRNA concentration of OVX rats after daily administration of 250 and 500 mg/kg body weight for 4 weeks while estrogen increased both ER alpha and beta mRNA.

A section-staining-reconstruction method was developed to create a 3 dimensional model of rat brain and its internal structures, which provided the brain volume for evaluating the morphology changes. By this analysis, the absolute hippocampal volume of the rats was correlated to the animal body weight. CHE and estradiol increased the proportional volume of hippocampus to the body weight. The neuron densities in the CA1 and CA3 area were also increased by the CHE and estradiol treatment.

In a study of evaluating the effects on the antioxidative enzymes of rats, CHE (100 and 250 mg/kg body weight, intraperitoneally) reversed the increased effect of glutathione peroxidase (GPx) activity induced by ethanol in the hippocampus and hypothalamus. However, CHE augmented the ethanol-induced increasing of superoxide dismutase activity in the brain. CHE and ethanol exerted the synergistic effect to increase the catalase activity in cortex and cerebellum; and to decrease the catalase activity in the hippocampus and the GPx in the cerebellum, which ethanol itself did not make any changes in these enzyme activities.

In the pharmacokinetic study of the CHE, compounds that could be absorbed by the gastric-intestine track were identified. Their pharmacokinetic parameters such as bioavailability, distribution in the organs, clearance time, maximum concentration (C_{max}) and time to the maximum concentration (T_{max}) were reported.

To my family

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my sincere gratitude to my advisor, Assoc. Prof. Dr. Bungorn Sripanidkulchai, for her strong support and tolerance in my study and my living in Thailand. The same appreciation is extended to my co-adviser, Assoc. Prof. Dr. Kittisak Sripanidkulchai, who always advises me in the right way with his wealth knowledge; my co-adviser, Assoc. Prof. Dr. Jintanaporn Wattanathorn, who always encourages me to conquer the difficulties; and Prof. Dr. J. Michael Wyss, who helped me to finalize this thesis.

I would not forget Haibin Huang. He guided me to the field of research.

Jian Su

TABLE OF CONTENTS

	Page
ABSTRACT(in Thai)	i
ABSTRACT(in English)	iii
DEDICATION	v
ACKNOWLEDGEMENTS	vi
LIST OF TABLES	x
LIST OF FIGURES	xii
LIST OF ABBREVIATIONS	xix
CHAPTER I INTRODUCTION	
1.1 Background and definition of research problems	1
1.2 Objectives of the research	1
1.3 Hypothesis of the research	2
1.4 The scope of the research	2
1.5 The anticipated outcomes	3
CHAPTER II LITERATURE REVIEWS	5
2.1 Estrogen replacement therapy (ERT) and cognition	5
2.2 Estrogen receptor in the central nervous systems	8
2.3 Phytoestrogen and the brain	10
2.4 Antioxidant stress and the brain	11
2.5 Estrogen	19
2.6 The <i>Curcuma comosa</i>	20
2.7 Brain morphology study	22
CHAPTER III RESEARCH METHODOLOGY	
3.1 Chemicals	27
3.2 Animal and the surgeries	27
3.3 Plant extracts and solution preparation for administration	28
3.4 Short-term effect of estradiol and CHE on the spatial reference memory of the ovariectomized (OVX) rats	28
3.5 RT-PCR quantification of the estrogen receptor mRNA in the hippocampus of the rats.	30

TABLE OF CONTENTS (Cont.)

	Page
3.6 Long-term effect of estradiol and CHE on the spatial reference memory and working memory of ovariectomized rats	35
3.7 Brain morphology study	42
3.8 The effect of the CHE on the antioxidative enzyme activities of the rat brain against the ethanol-induced oxidative stress	44
3.9 The pharmacokinetics study of CHE	50
3.10 Statistics	52
 CHAPTER IV RESULTS	
4.1 Short-term effect of estradiol and CHE on the spatial reference memory of the ovariectomized (OVX) rats	53
4.2 RT-PCR quantification of the estrogen receptor mRNA in the hippocampus of the rats.	57
4.3 Long-term effect of estradiol and CHE on the spatial reference memory and working memory of ovariectomized rats	59
4.4 Brain morphological study	90
4.5 The effect of the CHE on the antioxidative enzyme activities in the rat brain against ethanol-induced oxidative stress	110
4.6 The a pharmacokinetics study of CHE	117
 CHAPTER V DISCUSSION	
5.1 Short-term effect of estradiol and CHE on the spatial reference memory of the ovariectomized (OVX) rats	129
5.2 RT-PCR quantification of the estrogen receptor mRNA in the hippocampus of the rats.	129
5.3 Long-term effect of estradiol and CHE on the spatial reference memory and working memory of ovariectomized rats	130
5.4 Brain morphological study	133
5.5 The effect of the CHE on the antioxidative enzyme activities in the rat brain against ethanol-induced oxidative stress	135
5.6 The a pharmacokinetics study of CHE	137

TABLE OF CONTENTS (Cont.)

	Page
CHAPTER VI CONCLUSION	138
REFERENCES	140
APPENDICES	153

LIST OF TABLES

	Page
Table 1 Primer sequences of ER alpha, beta and GAPDH	35
Table 2 The average latency of 4 trials of short-term Morris water maze test at the time of training, 1 week, 2 weeks and 4 weeks after OVX	156
Table 3 The average latency of the 1 st trial of short-term Morris water maze test at the time of 1 week, 2 weeks and 4 weeks after OVX	156
Table 4 The uterus weight of the rats of short-term Morris water maze test	156
Table 5 The body weight of the rats of short-term Morris water maze test	157
Table 6 The ER mRNA quantification results	157
Table 7 The result of long-term behaviors test (M-H1, day1)	158
Table 8 The result of long-term behaviors test (M-H1, day2)	158
Table 9 The result of long-term behaviors test (M-H1, day3)	159
Table 10 The result of long-term behaviors test (M-H1, day4)	159
Table 11 The result of long-term behaviors test (M-H1, day5)	160
Table 12 The result of long-term behaviors test (M-P1, day1)	160
Table 13 The result of long-term behaviors test (M-P1, day2)	161
Table 14 The result of long-term behaviors test (M-H2, day1)	161
Table 15 The result of long-term behaviors test (M-H2, day2)	162
Table 16 The result of long-term behaviors test (M-H2, day3)	162
Table 17 The result of long-term behaviors test (M-H2, day4)	163
Table 18 The result of long-term behaviors test (M-H2, day5)	163
Table 19 The result of long-term behaviors test (M-P2, day1)	164
Table 20 The result of long-term behaviors test (M-P2, day2)	164
Table 21 The result of long-term behaviors test (M-H3, day1)	165
Table 22 The result of long-term behaviors test (M-H3, day2)	165
Table 23 The result of long-term behaviors test (M-H3, day3)	166
Table 24 The result of long-term behaviors test (M-H3, day4)	166
Table 25 The result of long-term behaviors test (M-P3, day1)	167
Table 26 The result of long-term behaviors test (M-P3, day2)	167
Table 27 The precision analysis of CHE by HPLC method	119

LIST OF TABLES (Cont.)

	Page
Table 28 Stability study of CHE sample	120
Table 29 The calibration of correlation coefficients	123
Table 30 The calibration of recovery of each peak of CHE in the blood sample	124
Table 31 Bioavailability of 4 compounds obtained from oral feeding and I.V groups	124

LIST OF FIGURES

	Page
Figure 1 The research frame work	2
Figure 2 The pathway of ethanol metabolism	14
Figure 3 Apparatus (side view) of Morris water maze test in short-term behaviors study	29
Figure 4 The time line of the experimental design of short-term behaviors study	30 32
Figure 5 The apparatus (side view) of Morris water maze test in the long-term behaviors study	36
Figure 6 The planform (A) and the side view of the radial arm maze apparatus	37
Figure 7 The platform location in the swimming pool (planform) for the Morris water maze	38
Figure 8 The experiment timeline of long-term behaviors test	42
Figure 9 The position of a inserted needle for alignment in the 3D reconstruction	43
Figure 10 The time to the platform (Mean \pm SEM) of each groups before OVX	53
Figure 11 The latency (Mean \pm SEM) of average of 4 trails at 1 week, 2 weeks and 4 weeks after OVX	54
Figure 12 The time to the platform (Mean+SEM) of the 1 st trail of each group at 1 week, 2 weeks and 4 weeks after OVX	55
Figure 13 The mean body weight recorded from the day of OVX to the end of short-term behaviors study	56
Figure 14 The uterus weight (Mean \pm SEM) of each group in the short term behavior study	56
Figure 15 The RT-PCR results of hippocampal ER alpha, ER beta and GAPDH of each group	57
Figure 16 ER mRNA concentration (Mean \pm SEM) in hippocampus of 6 groups	58
Figure 17 ER beta mRNA concentration (Mean \pm SEM) in hippocampus of 6 groups	58
Figure 18 The swimming track of the animal at the MWM test	59

LIST OF FIGURES (Cont.)

	Page
Figure 19 The time to the platform at the 1 st period long-term hidden platform test	60
Figure 20 The path to the platform at the 1 st period long-term hidden platform test	61
Figure 21 The path parallel to the wall at the 1 st period long-term MWM test	62
Figure 22 The time spent in the current goal quadrant (NE) at the 1 st period long-term probe test	63
Figure 23 The swimming speed of the rats at the 1 st period long-term MWM test	64
Figure 24 The active time of the rats at the 1 st period long-term MWM test	65
Figure 25 The latency of move of the rats at the 1 st period long-term MWM test	66
Figure 26 The number of stops of the rats at the 1 st period long-term MWM test	67
Figure 27 The time to the platform at the 2 nd period long-term hidden platform test	69
Figure 28 The path to the platform at the 2 nd period long-term hidden platform test.	70
Figure 29 The time spent in the current goal quadrant at the 2 nd period long-term probe test	71
Figure 30 The path move parallel to the wall at the 2 nd period MWM test	72
Figure 31 The swimming speed of the rats at the 2 nd period of the MWM test	73
Figure 32 The active time of the rats at the 2 nd period of the MWM test	74
Figure 33 The latency to move of the rats at the 2 nd period of the MWM test	75
Figure 34 The number of stops of the rats at the 2 nd period of the MWM test	76
Figure 35 The time to the platform of the rats at the 3 rd period of long-term hidden platform test.	78
Figure 36 The path to the platform of the rats at the 3 rd period of long-term hidden platform test.	79

LIST OF FIGURES (Cont.)

	Page
Figure 37 The path move parallel to the platform of the rats at the 3 rd period of MWM test.	80
Figure 38 The path move parallel to the platform of the rats at the 3 rd period of MWM test.	81
Figure 39 The swimming speed of the rats at the 3 rd period of long-term MWM test.	82
Figure 40 The active time of the rats at the 3 rd period of long-term MWM test.	83
Figure 41 The latency to move of the rats at the 3 rd period of long-term MWM test.	84
Figure 42 The number of stops of the rats at the 3 rd period of long-term MWM test.	85
Figure 43 The comparison of the time to the platform from 1 st to 3 rd period of each group	86
Figure 44 The error times (mean±SEM) at free accessible test (A), 10 minutes delay (B), 1 hour delay (C) and 2 hours delay (D) DNMTS test	88
Figure 45 The body weight (Mean) of each group from day0 to day 30 after OVX	89
Figure 46 The uterus weight (mean±SEM) of each group in the long term behavior test	89
Figure 47 The AChE staining (A) and Nissl staining (B) results and the brain atlas (C) for identifying the segment of the specific region	90
Figure 48 The calibration of voxel width for 3D reconstruction	91
Figure 49 The calculation of the thickness between sections for 3D reconstruction	92
Figure 50 The location of the 3D reconstructed cerebra, anterior commissure, cortex, caudate putamen, basolateral amygdale, 3 rd vertical, thalamus and hippocampus	93
Figure 51 The shape and volume of the reconstructed basolateral amygdaloid and its location in the brain.	94

LIST OF FIGURES (Cont.)

	Page
Figure 52 The shape and volume of a reconstructed anterior commissure and its location in the brain	94
Figure 53 The shape and volume of a reconstructed cortex (left half) and its location in the brain	95
Figure 54 The shape and volume of the reconstructed caudate putamen and its location in the brain	95
Figure 55 The shape and volume of a reconstructed 3 rd ventricle and its location in the brain.	96
Figure 56 The shape and volume of a reconstructed thalamus and its location in the brain.	96
Figure 57 The shape and volume of a reconstructed hippocampus and its location in the brain	97
Figure 58 The hippocampal volume (mean \pm SEM) of each group	98
Figure 59 The body weight (mean \pm SEM) of each group at the day of sacrificed	98
Figure 60 The hippocampus volume per gram body weight (mean \pm SEM) of each group	99
Figure 61 The Nissl staining section-hippocampal area	100
Figure 62 The absolute neuron density (mean \pm SEM) in CA1 area of each group	101
Figure 63 The absolute neuron density (mean \pm SEM) in CA1 area in anterior hippocampus of each group	101
Figure 64 The absolute neuron density (mean \pm SEM) in CA1 area in middle hippocampus of each group	102
Figure 65 The absolute neuron density (mean \pm SEM) in CA1 area in posterior hippocampus of each group	102
Figure 66 The proportional neuron density (mean \pm SEM) in CA1 area of each group.	103
Figure 67 The proportional neuron density (mean \pm SEM) in CA1 area in anterior hippocampus of each group.	103

LIST OF FIGURES (Cont.)

	Page
Figure 68 The proportional neuron density (mean \pm SEM) in CA1 area in middle hippocampus of each group.	104
Figure 69 The proportional neuron density (mean \pm SEM) in CA1 area in posterior hippocampus of each group.	104
Figure 70 The absolute neuron density (mean \pm SEM) in CA3 area of each group.	105
Figure 71 The absolute neuron density (mean \pm SEM) in CA3 area in anterior hippocampus of each group.	106
Figure 72 The absolute neuron density (mean \pm SEM) in CA3 area in middle hippocampus of each group.	106
Figure 73 The absolute neuron density (mean \pm SEM) in CA3 area in posterior hippocampus of each group.	107
Figure 74 The proportional neuron density (mean \pm SEM) in CA3 area of each group.	107
Figure 75 The proportional neuron density (mean \pm SEM) in CA3 area in anterior hippocampus of each group.	108
Figure 76 The proportional neuron density (mean \pm SEM) in CA3 area in middle hippocampus of each group.	108
Figure 77 The proportional neuron density (mean \pm SEM) in CA3 area in posterior hippocampus of each group.	109
Figure 78 The CAT activities (mean \pm SEM) in cerebellum, pituitary, hypothalamus, hippocampus and cortex of each group.	111
Figure 79 CAT activity (mean \pm SEM) in the hypothalamus of each group.	111
Figure 80 CAT activity (mean \pm SEM) in the hippocampus of each group.	112
Figure 81 CAT activity (mean \pm SEM) in the cortex of each group	112
Figure 82 CAT activity (mean \pm SEM) in the cerebellum of each group.	113
Figure 83 The SOD activity (mean \pm SEM) in cerebellum, pituitary, hypothalamus, hippocampus and cortex of each group.	114

LIST OF FIGURES (Cont.)

	Page
Figure 84 The GPx activity (mean±SEM) in cerebellum, pituitary, hypothalamus, hippocampus and cortex of each group.	115
Figure 85 GPx activities (mean±SEM) in the hypothalamus of each group.	115
Figure 86 GPx activity (mean±SEM) in the hippocampus of each group.	116
Figure 87 GPx activity (mean±SEM) in the cerebellum of each group.	116
Figure 88 HPLC chromatogram of CHE (1 mg/ml) at 302 nm (A) and 250 nm (B).	117
Figure 89 HPLC chromatogram of 1,7-dipheny-5-hydroxy-(1E, 3E)-1,3-heptadiene (0.1 mg/ml) at 302 nm (A) and 250 nm (B).	118
Figure 90 Chromatogram of CHE extract (1 mg/ml) at the wavelength from 210 to 390 nm.	119
Figure 91 HPLC chromatograms at 302 nm. 1 mg/ml CHE (A), 45 mg/ml olive oil (H) and blank tissue samples including blood (B), brain (C), kidney (D), liver (E), ovary (F) and uterus (G).	121
Figure 92 HPLC chromatograms of CHE at 250 nm. 1 mg/ml CHE (A), 45 mg/ml olive oil (H) and blank tissue samples including blood (B), brain (C), kidney (D), liver (E), ovary (F) and uterus (G).	122
Figure 93 The concentration time curve and the AUC of compound 1, 5, 11, 12 after the intravenous injection of CHE at a dose of 125 mg/kg body weight.	125
Figure 94 The blood concentration time curve and the AUC of compound 1, 5, 11, 12 after the oral feeding of CHE at a dose of 125 mg/kg body weight.	126
Figure 95 Comparison of the distribution of 4 compounds in the same tissue after oral feeding.	127
Figure 96 Comparison of each compound distribution in different tissues after oral feeding.	128
Figure 97 Regression curve of hippocampal volume and body weight from 5 groups of animals	134

LIST OF FIGURES (Cont.)

	Page
Figure 98 Regression curve of hippocampal volume and body weight from individual animal.	134

LIST OF ABBREVIATION

3D	three dimensions
3MS	mini-mental state
β-NADPH	beta- nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
β-NADP	beta- nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidized form
AA	arachidonic acid
ABS	absorbance
AChE	acetylcholinesterase
AD	Alzheimer's disease
ADH	alcohol dehydrogenase
AhP	amyloid-h-peptide
ALDH2	aldehyde dehydrogenase 2
ANOVA	analysis of variance
AUC	area under the curve
ATP	adenosine triphosphate
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
B.W.	body weight
bp	base pair
BSA	bovine serum albumin
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
CA1	cornu ammonis I
CA2	cornu ammonis II
CA3	cornu ammonis III
CAT	catalase
cDNA	complementary DNA
CHE	<i>Curcumsa comosa</i> hexane extract
CNS	central nervous system
CSF	cerebrospinal fluid
%CV	percentage of coefficient of variation
DG	dentate gyrus

LIST OF ABBREVIATION (Cont.)

DNMTS	delay non-match to sample
E ₁	estrone
E ₂	estradiol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ER	estrogen receptor
ER α	estrogen receptor alpha
ER β	estrogen receptor beta
ERT	estrogen replacement therapy
EtOH	ethanol
Fe ²⁺	ferrous ion
Fe ³⁺	ferric ion
FSH	follicle-stimulating hormone
GABA	gamma-aminobutyric acid
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GPx	glutathione peroxidase
GR	glutathione reductase
GSH	glutathione reduced form
GSSG	glutathione oxidized form
hCG	human chorionic gonadotropin
HPLC	high pressure liquid chromatography
IGF	insulin-like growth factor
I.V	intravenous
MAP	mitogen-activated protein
mRNA	messenger ribonucleic acid
MCI	mild cognitive impairment
MRI	magnetic resonance imaging
M-H1	Morris water maze, hidden platform test, the 1 st period
M-P1	Morris water maze, probe test, the 1 st period
MWM	Morris water maze
NaN ₃	Sodium azid

LIST OF ABBREVIATION (Cont.)

NE	north-east
NW	north-west
NBT	nitroblue tetrazolium
OVX	ovariectomized
PD	Parkinson's disease
PNS	peripheral nervous system
RAM	radial arm maze
ROS	reactive oxygen species
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
SE	south-east
SW	south-west
SEM	standard error of the mean
SOD	superoxide dismutase
VBM	voxel-based optimized morphometry
XOD	xanthine oxidase
tim	time to platform (s)
pth	total path moved (m)
eff	path efficiency index (%)
ppw	path moved parallel to wall (%)
dcg	average distance to current goal (m)
qcq	time in current goal quadrant (%)
spd	average speed (m/s)
act	active time (%)
lat	latency to move (s)
imb	time spent immobile (s)
stp	number of stops (x)
rst	number of rests (x)
rtm	time spent resting (s)
qne	time in NE quadrant (%)
qnw	time in NW quadrant (%)

LIST OF ABBREVIATION (Cont.)

qsw	time in SW quadrant (%)
qse	time in SE quadrant (%)