ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E47253

EFFECTS OF PINOCEMBRIN ON INITIATION AND PROMOTION STAGES OF HEPATOCARCINOGENESIS RATS

CHARATIDA PUNVITTAYAGUL

MASTER OF SCIENCE
IN BIOCHEMISTRY

THE GRADUATE SCHOOL
CHIANG MAI UNIVERSITY
JUNE 2010

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E47253

EFFECTS OF PINOCEMBRIN ON INTIATION AND PROMOTION STAGES OF HEPATOCARCINOGENESIS IN RATS

CHARATDA PUNVITTAYAGUL

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

EFFECTS OF PINOCEMBRIN ON INTIATION AND PROMOTION STAGES OF HEPATOCARCINOGENESIS IN RATS

CHARATDA PUNVITTAYAGUL

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

EXAMINING COMMITTEE

Ampai Panthong ..... CHAIRPERSON

Assoc. Prof. Dr. Ampai Panthong

Rawiwan Wongpoomchai ..... MEMBER

Asst. Prof. Dr. Rawiwan Wongpoomchai

W. Pompimon ..... MEMBER

Asst. Prof. Dr. Wilart Pompimon

Rawiwan Maniratanachote ..... MEMBER

Dr. Rawiwan Maniratanachote

Pichapat Piamrojanaphat. ..... MEMBER

Asst. Prof. Dr. Pichapat Piamrojanaphat

7 JUNE 2010

© Copyright by Chiang Mai University

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my sincere gratitude and appreciation to the members of the advisory and examining committee, Asst. Prof. Dr. Rawiwan Wongpoomchai, Assoc. Prof. Dr. Ampai Panthong, Asst. Prof. Dr. Wilart Pompimon, Dr. Rawiwan Maniratanachote and Asst. Prof. Dr. Pichapat Piamrojanaphat for their continuous guidance and kindness, valuable advices, encouragement and behave to be everything throughout the course of my study.

Special acknowledgement is directed to The Center for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), The National Research Council of Thailand (NRCT) and The Endowment Fund for Medical Research (CMB) for funding my study and research.

I want to thank the Department of Biochemistry, Laboratory Animal House and Instrumental Center for Medicine Research, Faculty of Medicine, Chiang Mai University for giving me permission to commence this thesis in the first instance, to do the necessary research work and to use instrument. I feel very grateful to Assoc. Prof. Dr. Nirush Lertprasertsuke, Department of Pathology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Thailand for providing livers section.

My former colleagues from the Department of Biochemistry supported me in my research work. I want to thank them for all their help, support, interest and valuable hints. Especially, I would like to give my special thanks to my colleagues Miss Sirinya Taya, Mr. Suphachai Charoensin and Miss Wanida Inbut who enabled and helped me to complete this work.

Charatda Punvittayagul

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

E47253

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

E47253

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.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	**ผลของสารพิโนเซมบรินต่อระยะก่อตัวและระยะส่งเสริมของการเกิดมะเร็งตับในหนูขาว**
ผู้เขียน	**นางสาวชรัชดา พันธุ์วิทยากูล**
ปริญญา	**วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)**
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	**ผศ.ดร. รวิวรรณ วงศ์ภูมิชัย**

บทคัดย่อ

E47253

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:

E47253

cytochrome P450 reductase อีกด้วย จากนั้นศึกษาฤทธิ์ในการต้านการกลายพันธุ์จากการเหนี่ยวนำด้วยสารไดเอทธิลไนโตรซามีนของพิโนเซมบริน โดยฉีดไดเอทธิลไนโตรซามีนความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว 2 ครั้ง พบว่าการพิโนเซมบรินความเข้มข้น 2, 10 และ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ต่อเนื่องกันเป็นเวลา 6 วันหลังจากเริ่มฉีดไดเอทธิลไนโตรซามีน พบว่าพิโนเซมบรินไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการกลายพันธุ์จากสารไดเอทธิลไนโตรซามีน อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการให้สารพิโนเซมบรินก่อนการให้สารก่อมะเร็งและ/หรือลดความเข้มข้นของ ไดเอทธิลไนโตรซามีนลงสามารถป้องกันการเกิดไมโครนิวเคลียสได้เพียงเล็กน้อย (20-30%) และไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาผลของสารพิโนเซมบรินต่อระยะส่งเสริมของกระบวนการเกิดมะเร็งตับจากการเหนี่ยวนำด้วยสารไดเอทธิลไนโตซามีนโดยใช้การทดสอบฤทธิ์ก่อมะเร็งแบบระยะกลาง 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

TABLE OF CONTENTS

	Page
ACKNOWLEDMENT	iii
ENGLISH ABSTRACT	iv
THAI ABSTRACT	vi
LIST OF TABLES	xi
LIST OF FIGURES	xii
ABBREVIATIONS	xiv
CHAPTER I INTRODUCTION	1
1.1 Statement of the problems	1
1.2 Literature reviews	4
1.2.1 Multistep chemicals carcinogenesis	4
1.2.2 Carcinogenicity test	8
1.2.3 Diethylnitrosamine and hepatocarcinogenesis	13
1.2.4 Cancer chemoprevention and carcinogenesis	14
1.2.5 Xenobiotic-metabolizing enzymes	16
1.2.6 Effect of flavanones on xenobiotic-metabolizing enzymes	24
1.2.7 Pinocembrin	27
1.3 Objectives	28
CHAPTER II MATERIALS AND METHODS	29
2.1 Chemicals and instruments	29
2.2 Animals	29
2.3 Extraction and isolation of pinocembrin from *Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schltr. rhizome.	29
2.4 Mutagenicity study of pinocembrin in rat liver	30

Page

2.5 Partial hepatectomy 32
2.6 Isolation of hepatocytes 32
2.7 Microscopic observation and micronucleus determination 33
2.8 Inhibitory effect of pinocembrin on diethylnitrosamine-induced micronucleated hepatocyte formation in rat 33
2.9 Preventive effect of pinocembrin on 30 mg/kg bw of diethylnitrosamine-induced micronucleated hepatocyte formation in rat 34
2.10 Protective effect of pinocembrin on 20 mg/kg bw of diethylnitrosamine-induced micronucleated hepatocyte formation in rat 34
2.11 Effect of pinocembrin on promotion stage in diethylnitrosamine-induced rat hepatocarcinogenesis 38
2.12 Immunohistochemistry for GST-P 39
2.13 Quantitative assessment of GST-P positive foci 39
2.14 Determination of lipid peroxidation by thiobarbituric acid reactive substances assay 42
2.15 Determination of the expression and activities of phase I and phase II xenobiotic-metabolizing enzymes 43
2.16 Statistical analysis 50

CHAPTER III RESULTS 51
3.1 Mutagenicity study of pinocembrin in rat liver 51
3.2 Effect of pinocembrin on lipid peroxidation in rat liver 51
3.3 Effect of pinocembrin on xenobiotic-metabolizing enzymes in rat liver 52
3.4 Inhibitory effect of pinocembrin on diethylnitrosamine-induced micronucleated hepatocyte formation in rat 57
3.5 Preventive effect of pinocembrin on diethylnitrosamine-induced micronucleus formation in rat liver 57

	Page
3.6 Effect of pinocembrin on promotion stage in diethylnitrosamine-induced rat hepatocarcinogenesis	62
CHAPTER IV DISCUSSION AND CONCLUSION	69
REFERENCES	74
APPENDICES	89
APPENDIX A	90
APPENDIX B	93
APPENDIX C	95
APPENDIX D	102
CURRICULUM VITAE	106

LIST OF TABLES

Table		Page
3-1	Mutagenicity of pinocembrin in rat liver	53
3-2	Effect of pinocembrin on the expression of cytochrome P450 isoenzymes and cytochrome P450 reductase in rat liver.	55
3-3	Effect of pinocembrin on the activities of some phase I and phase II enzymes in rat liver	56
3-4	Inhibitory effect of pinocembrin on diethylnitrosamine-induced micronucleus formation in rat liver	59
3-5	Preventive effect of pinocembrin on 30 mg/kg bw of diethylnitrosamine-induced micronucleated hepatocyte formation in rat	60
3-6	Protective effect of pinocembrin on 20 mg/kg bw of diethylnitrosamine-induced micronucleus formation in rat liver	61
3-7	General appearance of rats in medium-term carcinogenicity experiment	64
3-8	Relative organ weight of rats in medium-term carcinogenicity experiment	65
3-9	Blood biochemicals analysis of rats in medium-term carcinogenicity experiment	66
3-10	Lipid peroxidation of rats in medium-term carcinogenicity experiment	67
3-11	Number and the distribution of size of GST-P positive foci of rats in medium-term carcinogenicity experiment	68

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1-1	Overview of genotoxic and non-genotoxic effects of carcinogens	7
1-2	Mechanisms of multistage carcinogenesis	7
1-3	A schematic diagram show the origin of micronucleus	9
1-4	Standard protocol of the medium-term liver bioassay	10
1-5	Hypothetical model for the development of GST-P positive lesions	12
1-6	Regulation of the GST-P gene expression in normal liver cells and in the pre-neoplastic lesion	12
1-7	Biotransformation of diethylnitrosoamine and mechanism of DNA-adduct formation	13
1-8	Role of dietary detoxifying enzyme inducers in chemoprevention	15
1-9	Major detoxification activities in drug metabolism	17
1-10	The microsomal NADPH-cytochrome P450 reductase system	18
1-11	The pathway of heme degradation in mammalian cells	19
1-12	NADPH: quinone oxidoreductase 1	21
1-13	Consequences of quinone metabolism	21
1-14	Role of UDP-glucuronyltransferase	22
1-15	Role of glutathione-*S*-transferase	23
1-16	The basic structure of flavonoids	25
1-17	Chemical structures of some representative flavanone	25
1-18	Flavanones that block or suppress multistage carcinogenesis	26
1-19	Structure of pinocembrin	27
2-1	The protocol for mutagenicity study of pinocembrin in male Wistar rat	31

Figure **Page**

2-2 The protocol for inhibitory effect of pinocembrin on DEN-induced micronucleus formation in rat liver 35

2-3 The protocol for preventive effect of pinocembrin on 30 mg/kg bw of DEN-induced micronucleus formation in rat liver 36

2-4 The protocol for protective effect of pinocembrin on 20 mg/kg bw of DEN-induced micronucleus formation in rat liver 37

2-5 The protocol for the effect of pinocembrin on promotion stage in diethylnitrosamine-induced rat hepatocarcinogenesis 40

2-6 The procedure of GST-P immunohistochemistry in rat liver 41

2-7 MDA-TBA adduct 42

2-8 The preparation of microsomal and cytosolic fractions obtained from rat liver 44

2-9 SDS-PAGE and Western blot procedures 46

3-1 Effect of pinocembrin on lipid peroxidation 54

3-2 Western blot analysis of liver microsomes from rat treated with various doses of pinocembrin. 54

3-3 Growth curve of rats in medium-term carcinogenicity experiment 63

S-1 Extraction scheme of *Boesenbergia pandurata* 103

S-2 Isolation scheme of pinocembrin 104

ABBREVIATIONS

β- NADPH	β-nicotinamide adenine nucleotide phosphate (Reduced form)
°C	degree celcius
µg	microgram
µl	microliter
µM	micromolar
µm	micrometer
A	Ampere
ALP	alkaline phosphatase
ALT	alanine aminotransferase
AST	aspartate aminotransferase
BSA	bovine serum albumin
bw	body weight
CDNB	1-Chloro-2, 4-dinitrobenzene
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	copper sulphate pentahydrate
CYP	cytochrome P450
DAB	3, 3'-diaminobenzidine
DCPIP	2, 6-dichlorophenolindophenol
DEN	diethylnitrosamine
DI	deionized water
DTT	dithiothreitol
DW	distilled water
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid

FAD	flavin adenine dinucleotide
g	gram
GSH	glutathione (Reduced form)
GST-P	glutathione-*S*-transferase placental form
H_2O_2	hydrogen peroxide
HCl	hydrochloric acid
i.g.	intragastium
i.p.	intraperitoneum
IgG	immunoglobulin G
KCl	potassium chloride
KCN	potassium cyanide
kg	kilogram
KH_2PO_4	potassium dihydrogen phosphate
KOH	potassium hydroxide
L	liter
M	molar
mA/cm^2	milli ampere per square centimeter
MDA	malondialdehyde bis(dimethyl acetal)
mg	milligram
$MgCl_2$	magnesium chloride
min	minute
ml	milliliter
mm	millimeter
mM	milli molar
MNHEPs	micronucleated hepatocytes
NaCl	sodium chloride
$NaHCO_3$	sodium bicarbonate
NaH_2PO_4	sodium dihydrogen phosphate
Na_2HPO_4	sodium hydrogen phosphate
Na_2CO_3	sodium carbonate
NaOH	sodium hydroxide

NSS	normal saline solution
nm	nanometer
PBS	phosphate buffer saline
PC	pinocembrin
PH	partial hepatectomy
PMSF	phenylmethanesulphonylfluoride
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TBA	thiobarbituric acid
TBARS	thiobarbituric acid reactive substances
TCA	trichloroacetic acid
v/v	volume by volume
w/v	weight by volume