ผลของว่านชักมดลูกต่อการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับโรคหลอดเลือดแดงแข็งในกระต่ายที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลสูง

สำนักงานวิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นายปัฐวี เจริญวรรณธนัง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชวิทยา ภาควิชาเภสัชวิทยาและสรีรวิทยา
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5 1 7 6 5 7 1 0 3 3

EFFECTS OF *CURCUMA COMOSA* ON THE EXPRESSION OF ATHEROSCLEROSIS-INVOLVED CYTOKINE GENES IN RABBITS FED WITH HIGH CHOLESTEROL DIET

Mr. Puttavee Charoenwanthananag

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Pharmacy Program in Pharmacology

Department of Pharmacology and Physiology

Faculty of Pharmaceutical Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

522286

Thesis Title	EFFECTS OF *CURCUMA COMOSA* ON THE EXPRESSION OF ATHEROSCLEROSIS-INVOLVED CYTOKINE GENES IN RABBITS FED WITH HIGH CHOLESTEROL DIET
By	Mr. Puttavee Charoenwanthanang
Field of Study	Pharmacology
Thesis Advisor	Associate Professor Pol.Lt.Col. Somsong Lawanprasert, Ph.D.
Thesis Co-Advisor	Sureerut Porntadavity, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

Dean of the Faculty of Pharmaceutical Sciences

(Associate Professor Plntip Pongpech, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

Chairman

(Associate Professor Mayuree Tantisira, Ph.D.)

Thesis Advisor

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

Thesis Co-Advisor

(Sureerut Porntadavity, Ph.D.)

Examiner

(Assistant Professor Rataya Luechapudiporn, Ph.D.)

External Examiner

(Associate Professor Laddawal Phivthong-ngam, Ph.D.)

ปัฐวี เจริญวรรณธนัง: ผลของว่านชักมดลูกต่อการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับโรคหลอดเลือดแดงแข็ง ในกระต่ายที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลสูง. (EFFECTS OF *CURCUMA COMOSA* ON THE EXPRESSION OF ATHEROSCLEROSIS-INVOLVED CYTOKINE GENES IN RABBITS FED WITH HIGH CHOLESTEROL DIET) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ภญ. พ.ต.ท.หญิง ดร.สมทรง ลาวัณย์ประเสริฐ, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: อ. ดร.สุรีรัตน์ พรธาดาวิทย์, 76 หน้า.

ว่านชักมดลูก (*Curcuma comosa* Roxb., Zingiberaceae) เป็นพืชพื้นบ้านของไทย ที่ใช้รักษาอาการผิดปกติของมดลูก จากการศึกษาพบว่าว่านชักมดลูกมีฤทธิ์ลดไขมันในเลือดซึ่งมีศักยภาพที่จะใช้ในโรคหัวใจและหลอดเลือด ขณะที่ยาลดไขมันในกลุ่ม HMG-CoA reductase inhibitors ได้แก่ ซิมวาสแททินมีข้อเสียที่อาจทำให้เกิดผลพิษต่อตับ ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมุ่งเน้นศึกษาผลของว่านชักมดลูกในการลดการเกิดโรคหลอดเลือดแดงแข็งและผลพิษต่อตับ โดยศึกษาการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ชนิดก่อการอักเสบและยีนไซโตไคน์ชนิดต้านการอักเสบในเนื้อเยื่อหลอดเลือดแดงใหญ่และตับ ของกระต่ายที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับว่านชักมดลูกเปรียบเทียบกับกระต่ายที่ได้รับเฉพาะอาหารไขมันสูงเท่านั้น และกระต่ายที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับซิมวาสแททินเป็นเวลา 3 เดือน ผลการศึกษาพบว่าว่านชักมดลูกลดการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ชนิดก่อการอักเสบได้แก่ IL-1β, MCP-1 และ TNF-α แต่ไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ชนิดต้านการอักเสบในหลอดเลือดแดงใหญ่ เมื่อเปรียบเทียบกับกระต่ายกลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารไขมันสูง ขณะที่ซิมวาสแททินลดการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ชนิดก่อการอักเสบชนิด IL-1β แต่ไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีนชนิดต้านการอักเสบในหลอดเลือดแดงใหญ่ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ส่วนผลต่อตับพบว่าว่านชักมดลูกไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ชนิดก่อการอักเสบ (IL-1β, MCP-1 และ TNF-α) แต่มีผลเพิ่มการแสดงออกของยีนชนิดต้านการอักเสบชนิด IL-10 โดยไม่มีผลต่อ TGF- β ขณะที่ซิมวาสแททินเพิ่มการแสดงออกของยีนชนิดก่อการอักเสบชนิด MCP-1 และ TNF-α โดยไม่มีผลต่อ IL-1β และไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ IL-10 และ TGF-β เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ผลลดการอักเสบต่อหลอดเลือดโดยไม่มีผลพิษต่อตับของว่านชักมดลูก บ่งชี้ว่าว่านชักมดลูกเป็นสมุนไพรที่มีศักยภาพที่จะพัฒนาเป็นยาทางเลือกสำหรับการรักษาโรคหัวใจและหลอดเลือด

ภาควิชา เภสัชวิทยาและสรีรวิทยา ลายมือชื่อนิสิต ปัฐวี เจริญวรรณธนัง

สาขาวิชา เภสัชวิทยา ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ปีการศึกษา 2552 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

5176571033: MAJOR PHARMACOLOGY AND PHYSIOLOGY

KEYWORDS: *Cucuma comosa*/ cytokine/ interleukin-1β/ interleukin-10/ monocyte chemotactic factor-1/ liver toxicity/ transforming growth factor-α/ tumor necrosis factor-β

PUTTAVEE CHAROENWANTHANANG: EFFECTS OF *CURCUMA COMOSA* ON THE EXPRESSION OF ATHEROSCLEROSIS-INVOLVED CYTOKINE GENES IN RABBITS FED WITH HIGH CHOLESTEROL DIET. THESIS ADVISOR: ASSOCIATE PROFESSOR POL.LT.COL. SOMSONG LAWANPRASERT, PH.D., THESIS CO-ADVISOR: SUREERUT PORNTADAVITY, PH.D., 76 pp.

Curcuma comosa Roxb. (Zingiberaceae), an indigenous plant in Thailand, has been used traditionally for treatment of abdominal uterine symptoms. It was shown to lower plasma lipid levels thus potentially be used in cardiovascular disease. Lipid lowering drugs like HMG-CoA reductase inhibitors including simvastatin were implicated with manifestation of liver toxicity. In the present study, we therefore investigated anti-atherosIcerosis effects and liver toxicity of *C. comosa* by assessing the expression of pro-inflammatory cytokine genes and anti-inflammatory cytokine genes in aorta and liver isolated from rabbits fed with high cholesterol diet combined with *C. comosa* compared to the rabbits fed with high cholesterol diet either alone or combined with simvastatin for three months. The results showed that *C. comosa* significantly decreased pro-inflammatory cytokines IL-1β, MCP-1, and TNF-α expression but did not affect anti-inflammation cytokines in the aorta as compared to the high cholesterol diet control group while simvastatin decreased the expression of pro-inflammatory cytokine, IL-1β but did not alter anti-inflammatory cytokines expression in aorta as compared to rabbits fed with high-cholesterol diet. In the livers, *C. comosa* did not alter all of the pro-inflammatory cytokines (IL-1β, MCP-1 and TNF-α) but significantly increased the expression of anti-inflammatory cytokine, IL-10 not TGF-β. Simvastatin significantly increased the expression of pro-inflammatory cytokines such as MCP-1 and TNF-α but not IL-1β while the expression of IL-10 and TGF-β were not affected by simvastatin as compared to the high cholesterol diet group. In conclusion, the anti-inflammatory activity in the aorta and non-deteriorated effect in the liver of *C. comosa* shown in this study suggested that *C. comosa* is a potentially candidate to be developed as an alternative agent for cardiovascular disease therapy.

Department: Pharmacology and Physiology Student's Signature Puttavee Charoenwanthanang

Field of Study: Pharmacology Advisor's Signature Pol.Lt.Col. Somsong Lawanprasert

Academic Year: 2009 Co-Advisor's Signature Sureerut Porntadavity

Acknowledgements

I would like to express my sincere gratitude and appreciation to my advisor, Associate Professor Pol. Lt. Col. Dr. Somsong Lawanprasert for her valuable advice and guidance, kindness, and encouragement during the course of experimental work, preparing, and presentation of this thesis.

I would like to express my deepest and sincere appreciation to my co-advisor, Dr. Sureerut Porntadavity for her valuable helps, guidance, comments, and encouragement during the course of experimental work, preparing and presentation of this thesis.

I also would like to thank Professor Dr. Apichart Suksamrarn for supplying the *C. comosa* rhizome and Associate Professor Dr. Laddawal Phivthong-ngam for supplying the experimental animals. Thanks are also extended to the committee members, Associate Professor Dr. Mayuree Tantisira, and Assistant Professor Dr. Rataya Luechapudiporn.

I would like to express my deepest appreciation to Miss Cheerana Yomchot for her kind assistance on the tissue preparation and cell lysate technique and Miss Nurdina Charong for her kind advice on the RNA extraction and real-time PCR technique.

I wish to thank all staff members of Department of the Pharmacology and Physiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, all staff members of the Department of Clinical Chemistry, Faculty of Medical Technology, Mahidol University.

Finally, I would like to thank my family and my friends for their love and encouragement.

CONTENTS

Page

ABSTRACT (THAI) iv

ABSTRACT (ENGLISH) v

ACKNOWLEDGEMENTS vi

CONTENTS vii

LIST OF TABLES ix

LIST OF FIGURES x

LIST OF ABBREVIATIONS xi

CHAPTER I: INTRODUCTION 1

Hypothesis 6

Study design and process 6

Anticipated benefits from the study 6

CHAPTER II: LITERATURE REVIEWS 7

CHAPTER III: MATERIALS AND METHODS 30

Materials 30

1. Tissue of New Zealand White rabbits 30

2. Instruments 30

3. Chemicals 30

Methods 33

1. Primer design 33

2. Tissue preparation 34

3. RNA extraction by TRIzol® reagent 35

4. Reverse transcription 36

5. Polymerase chain reaction (PCR) 36

6. DNA electrophoresis 38

7. Determination of cytokines expression by real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) 38

Statistical analysis 39

Page

CHAPTER IV: RESULTS 40

1. Primer sequences of rabbit's cytokines 40

2. The optimal of PCR conditions for cytokine genes 41

3. Effects of *C. comosa* on the expression of abdominal aorta cytokines 43

4. Effects of *C. comosa* on the expression of liver cytokines 44

CHAPTER V: DISCUSSION AND CONCLUSION 45

REFERENCES 50

APPENDICES 64

Appendix A Preparation of *C. comosa* rhizome, chemical identification, and preparation of *C. comosa* suspension 65

Appendix B Preparation of simvastatin 67

Appendix C Experimental diets 69

Appendix D Experimental animals treatment and samples collection 71

Appendix E Study Protocol Approval 73

VITAE 76

LIST OF TABLES

Table		Page
1.	Definitions of potential muscle adverse experiences due to statins	25
2.	PCR thermocycling conditions	37
3.	Real-time PCR thermo cycling conditions	39
4.	Primer sequences, melting temperature, and PCR product size of rabbit's cytokines primer	40
5.	Specific PCR and Real-time PCR thermocycling conditions	41

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1.	The development of an atherosclerotic lesion	9
2.	Categorization of cytokines into pro-atherogenic and anti-atherogenic cytokines	10
3.	Intrahepatic cell populations	16
4.	Acute liver injury and the involvement of cytokines	18
5.	Chronic liver injury and the involvement of cytokines	19
6.	Chemical structure of simvastatin	21
7.	Cholesterol biosynthetic pathway and its inhibition by statins	22
8.	*Curcuma comosa* Roxb. plant and rhizomes	26
9.	The flow chart of experimental study	33
10.	Agarose gel electrophoresis of RT-PCR product using liver cDNA of high-cholesterol diet fed rabbit	42
11.	Effects of *C. comosa* on the expression of cytokines in abdominal aorta after 3 months of treatment	43
12.	Effects of *C. comosa* on the expression of cytokines in liver after 3 months of treatment	44

LIST OF ABBREVIATIONS

α	= alpha
β	= beta
°C	= degree celcius
µg	= microgram
µL	= microlitre
µmol	= micromole
ABC	= ATP-binding cassette
ACS	= acute coronary syndrome
ALP	= alkaline phosphatase
ALT	= alanine aminotransferase
ANOVA	= analysis of variance
Apo	= apolipoprotein
AST	= aspartate aminotransferase
BLAST	= Basic Local Alignment Search Tool
CCL2	= Chemokine (C-C motif) ligand 2
cDNA	= complementary DNA
CHD	= coronary heart disease
CSIF	= cytokine synthesis inhibitory factor
CT	= computed tomography
DEPC	= Diethyl pyrocarbonate
DNA	= deoxyribonucleic acid
EDTA	= ethylenediaminetetra acetic acid
et al.	= et alii
^{18}FDG-PET	= ^{18}fluorodeoxyglucose positron emission tomography
g	= gram
g	= gravity

G-CSF	= granulocyte colony-stimulating factor
GAPDH	= glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GGT	= gamma-glutamyl transferase
GM-CSF	= granulocyte macrophage colony-stimulating factor
HDL	= high density lipoprotein
HDL-C	= high density lipoprotein-cholesterol
HMG-CoA	= 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A
HuBTg	= Human apolipoprotein B transgenic
ICAM	= intercellular cell adhesion molecule
IFN	= interferon
IHD	= ischemic heart disease
IL	= interleukin
IL-1RA	= interleukin-1 receptor antagonist
kg	= kilogram
L	= liter
LDL	= low density lipoprotein
LDL-C	= low density lipoprotein-cholesterol
LPS	= lipopolysaccharide
M	= molar
mg	= milligram
mg/kg	= milligram per kilogram body weight
mL	= milliliter
mM	= millimolar
mmLDL	= minimally oxidized LDL
MMP	= matrix metalloproteinase
MRI	= magnetic resonance imaging
NAFLD	= nonalcoholic fatty liver disease
NASH	= nonalcoholic steatohepatitis
NCBI	= National Center for Biotechnology Information

NCEP	= National Cholesterol Education Program
NF-κB	= nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NZW	= New Zealand White
oxLDL	= oxidized LDL
PBMC	= peripheral blood mononuclear cell
PBS	= phosphate buffer saline
PCR	= polymerase chain reaction
pH	= potential of hydrogen
PMA	= phorbol-12-myristate-13-acetate
RNA	= ribonucleic acid
SD	= standard deviation
SEM	= standard error of mean
SOCS-1	= the suppressor of cytokine-signaling-1
SR	= scavenger receptor
TC	= total cholesterol
TG	= triglyceride
TBE	= Tris-Borate-EDTA
TNF	= tumor necrosis factor
TGF	= transforming growth factor
T_H	= T helper cell
TIMP	= tissue inhibitor of metalloproteinases
Tm	= melting temperature
Tris	= tris (hydroxymethyl) aminomethane
U	= unit
ULN	= upper limit of normal
VCAM	= vascular cell adhesion molecule
VLDL	= very low density lipoprotein
WHO	= World Health Organization