

ผลของเหง้าว่านชักมดลูกต่อสมรรถนะของเอนไซม์พาราออกซิเนส และภาวะออกซิเดทีฟสเตรส
ในกระต่ายที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลสูง



นางสาวจิรณา ยมโชติ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชวิทยา ภาควิชาเภสัชวิทยา

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



4 9 7 6 5 6 1 2 3 3

EFFECTS OF *CURCUMA COMOSA* RHIZOME ON PARAOXONASE ACTIVITY
AND OXIDATIVE STRESS IN RABBITS FED WITH HIGH-CHOLESTEROL DIET

Miss Cheerana Yomchot

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

Department of Pharmacology

Faculty of Pharmaceutical Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

502097

Thesis Title EFFECTS OF *CURCUMA COMOSA* RHIZOME ON
PARAOXONASE ACTIVITY AND OXIDATIVE STRESS
IN RABBITS FED WITH HIGH-CHOLESTEROL DIET

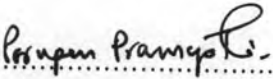
By Miss Cheerana Yomchot

Field of Study Pharmacology

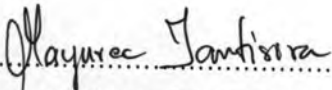
Thesis Principal Advisor Associate Professor Pol.Lt.Col. Somsong Lawanprasert, Ph.D.

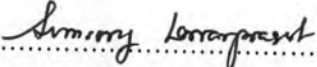
Thesis Co-advisor Sureerut Porntadavity, Ph.D.
Associate Professor Laddawal Phivthong-ngam, Ph.D.

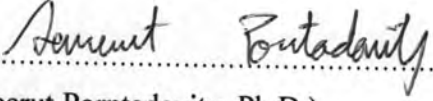
Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University in
Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree


..... Dean of the Faculty of Pharmaceutical Sciences
(Associate Professor Pornpen Pramyothin, Ph.D.)


THESIS COMMITTEE


..... Chairperson
(Associate Professor Mayuree Tantisira, Ph.D.)

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


..... Thesis Co-advisor
(Sureerut Porntadavity, Ph.D.)


..... External Member
(Associate Professor Soontharee Tantrarongroj, M.Sc)


..... Member
(Assistant Professor Withaya Janthasoot, M.Sc. Pharmacology)

จิรณา ยมโชติ: ผลของเหง้าว่านชั้กมดลูกต่อสมรรถนะของเอนไซม์พาราออกซิเนส และภาวะออกซิเดทีฟสเตรสในกระต่ายที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลสูง. (EFFECTS OF CURCUMA COMOSA RHIZOME ON PARAOXONASE ACTIVITY AND OXIDATIVE STRESS IN RABBITS FED WITH HIGH-CHOLESTEROL DIET) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ.ดร.พ.ต.ท.หญิงสมทรง ลาวัณย์ประเสริฐ, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: อ.ดร.สุรวิรัตน์ พรธาดาวิทย์, รศ.ดร.ลัดดาวัลย์ ผิวทองงาม, 114 หน้า.

เอนไซม์พาราออกซิเนส (PONs) ประกอบด้วย PON1, PON2 และ PON3 ซึ่ง PON1 และ PON3 มีการสังเคราะห์ที่ตับและปล่อยออกสู่กระแสเลือดโดยจับอยู่กับ HDL ในขณะที่ PON2 พบได้ในเนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆ แต่ไม่พบใน HDL และ LDL เอนไซม์พาราออกซิเนสมีคุณสมบัติในการป้องกันการเกิดออกซิเดชันของไขมันชนิด LDL และ HDL ซึ่งน่าจะมีส่วนช่วยป้องกันการเกิดหลอดเลือดแดงแข็งตัว อย่างไรก็ตามสมรรถนะของเอนไซม์พาราออกซิเนสขึ้นกับปัจจัยหลายอย่างได้แก่ ยาลดระดับไขมันในเลือด ว่านชั้กมดลูก (*Curcuma comosa* Roxb.) เป็นพืชในวงศ์ Zingiberaceae และเป็นพืชพื้นบ้านของไทย ตามตำราแพทย์แผนไทยนิยมใช้ในการรักษาอาการผิดปกติของมดลูก ปัจจุบันมีการศึกษาฤทธิ์ลดไขมันในเลือดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของว่านชั้กมดลูกกันอย่างกว้างขวาง การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของว่านชั้กมดลูกต่อสมรรถนะของเอนไซม์พาราออกซิเนส รวมทั้งภาวะออกซิเดทีฟสเตรสในกระต่ายที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลสูง ในการศึกษาที่ใช้กระต่ายเพศผู้พันธุ์นิวซีแลนด์ไวท์ จำนวน 12 ตัว แบ่งกลุ่มโดยการสุ่มออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 4 ตัว กระต่ายทั้ง 3 กลุ่มได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอล 1 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 1 เดือนหลังจากนั้นกระต่ายในกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 จะได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอล 0.5 เปอร์เซ็นต์อาหารที่มีคอเลสเตอรอล 0.5 เปอร์เซ็นต์พร้อมกับยาซิมวาสแททินขนาด 5 มิลลิกรัมต่อวัน และอาหารที่มีคอเลสเตอรอล 0.5 เปอร์เซ็นต์พร้อมกับว่านชั้กมดลูกขนาด 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน ตามลำดับ เป็นเวลา 3 เดือน เมื่อครบกำหนด 4 เดือนทำการเก็บตัวอย่างเลือดและหลอดเลือดแดงส่วนท้องของกระต่าย ทำการวิเคราะห์สมรรถนะของเอนไซม์พาราออกซิเนส พารามิเตอร์ของไขมัน และภาวะออกซิเดทีฟสเตรส ผลการทดลองพบว่า ว่านชั้กมดลูกมีผลลดระดับคอเลสเตอรอล และ LDL-C ในเลือดของกระต่ายเหมือนกับยาซิมวาสแททิน นอกจากนี้ว่านชั้กมดลูกมีผลเพิ่มภาวะออกซิเดทีฟสเตรสเช่นเดียวกับยาซิมวาสแททินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่อย่างไรก็ตามทั้งว่านชั้กมดลูกและยาซิมวาสแททิน ไม่มีผลต่อสมรรถนะของเอนไซม์พาราออกซิเนส ผลจากการศึกษานี้ให้ข้อมูลที่บ่งชี้ว่า การได้รับว่านชั้กมดลูกและยาซิมวาสแททินในระยะยาวมีผลลดระดับไขมันในเลือดแต่เพิ่มภาวะออกซิเดทีฟสเตรส โดยที่ไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์พาราออกซิเนส

ภาควิชา เภสัชวิทยา	ลายมือชื่อนิสิต	สุรธดา ยมโชติ
สาขาวิชา เภสัชวิทยา	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ลัดดาวัลย์ ผิวทองงาม
ปีการศึกษา 2550	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	สุรวิรัตน์ พรธาดาวิทย์
	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	จิรณา ยมโชติ

4976561233 MAJOR: PHARMACOLOGY

v

KEYWORD: *CURCUMA COMOSA*/ PARAOXONASE/ OXIDATIVE STRESS/ SIMVASTATIN

CHEERANA YOMCHOT: EFFECTS OF *CURCUMA COMOSA* RHIZOME ON PARAOXONASE ACTIVITY AND OXIDATIVE STRESS IN RABBITS FED WITH HIGH-CHOLESTEROL DIET. THESIS PRINCIPAL ADVISOR: ASSOC. PROF. POL.LT. COL. SOMSONG LAWANPRASERT, Ph.D., THESIS COADVISOR: SUREERUT PORNTADAVITY, Ph.D., ASSOC. PROF. LADDAWAL PHIVTHONG-NGAM, Ph.D., 114 pp.

The paraoxonases (PONs) family consists of three members, PON1, PON2, and PON3. PON1 and PON3 are expressed primarily in the liver and excreted in the blood by associated with high density lipoprotein (HDL) while PON2 expressed widely in a number of tissues and cells and undetectable in HDL and low density lipoprotein (LDL). PONs have been shown to reduce the oxidation of LDL and HDL, thus possibly protecting against atherosclerosis. Activity of PONs is modulated by various factors including hypolipidemic agents. *Curcuma comosa* Roxb. (Zingiberaceae) is an indigenous plant of Thailand and has been widely used in Thai traditional medicine for treatment of abnormal uterine symptoms. Recently, hypolipidemic effect and antioxidant effect of *C. comosa* were extensively investigated. The purpose of this study was to investigate effects of *C. comosa* on PONs activities and oxidative stress in rabbits fed with high-cholesterol diet. Twelve male New Zealand White (NZW) rabbits were randomly divided into three treatment groups of 4 rabbits each. All treatment groups were treated with 1.0% cholesterol for 1 month and subsequently treated with either 0.5% cholesterol or 0.5% cholesterol combined simvastatin at the dosage of 5 mg/day or 0.5% cholesterol combined *C. comosa* at the dosage of 400 mg/kg/day for 3 months. At 4 months after treatment, blood as well as abdominal aorta were collected from all rabbits for determination of lipid parameters, PONs activities and oxidative stress parameters. The results showed that *C. comosa* significantly decreased levels of total cholesterol and LDL similarly to simvastatin. In addition, *C. comosa* significantly increased oxidative stress similarly to simvastatin. We found that both *C. comosa* and simvastatin did not affect PONs activities. Thus, long term treatment of *C. comosa* exhibited hypolipidemic effect and increased oxidative stress similarly to simvastatin but did not affect PONs activities.

Department:Pharmacology.....

Field of Study: ...Pharmacology.....

Academic Year: 2007.....

Student's Signature:Cheerana Yomchot.....

Principal Advisor's Signature: Pol. Lt. Col. Somsong Lawanprasert

Co-advisor's Signature: Sureerut Porntadavity

Co-advisor's Signature: Laddawal Phivthong-Ngam

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-adviser, Dr. Sureerut Porntadavity for her valuable helps, guidance, comments, 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-adviser, Associate Professor Dr. Laddawal Phivthong-ngam for her valuable helps, guidance and comments for the animal handling technique.

I also would like to thank Professor Dr. Apichart Suksamrarn for supplying the *C. comosa* rhizome. Thanks are also extended to the committee members, Associate Professor Dr. Mayuree Tantisira, Assistant Professor Withaya Janthasoot and Associate Professor Soontharee Tantrarongroj for their worth comments and suggestions.

I would like to express my deepest appreciation to Mr. Thinnakorn Permpongpaiboon for his kind assistance on the enzyme assay technique.

This study was supported by National Research Council of Thailand.

I wish to thank all staff members of Department of the Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, all staff members of the Department of Clinical Chemistry, Faculty of Medical Technology, Mahidol University, as well as all staff members of the Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University for providing laboratory facilities and helps.

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.....	xii
CHAPTER I. INTRODUCTION.....	1
Hypothesis.....	5
Study design and process.....	5
Anticipated benefits from the study.....	5
CHAPTER II. LITERATURE REVIEWS.....	6
CHAPTER III. MATERIALS AND METHODS.....	35
Experimental animals.....	35
Instruments.....	35
Chemicals.....	35
Methods.....	37
1. Preparation of <i>C. comosa</i> rhizome.....	37
2. Animal treatment.....	38
3. Samples collection.....	38
4. Clinical blood chemistry.....	39
5. Determination of total peroxide (TP).....	39
6. Determination of total antioxidant status (TAS).....	40
7. Determination of oxidative stress index (OSI).....	41
8. Determination of serum PON1 activity.....	41
9. Preparation of cell lysate.....	43
10. Determination of protein assay.....	44
11. Determination of PON2 activity.....	44

	Page
12. Determination of PON3 activity.....	45
13. Verification of the method	46
Statistical analysis.....	47
CHAPTER IV. RESULTS.....	48
1. Precision assay for determination of oxidative stress parameters and PON activities.....	48
2. Effects of <i>C. comosa</i> and simvastatin on lipid parameters	49
3. Effects of <i>C. comosa</i> and simvastatin on oxidative stress parameters.....	52
4. Effects of <i>C. comosa</i> and simvastatin on PON1 and PON3 activities.....	55
5. Effect of <i>C. comosa</i> and simvastatin on PON2 activity	56
CHAPTER V. DISCUSSION AND CONCLUSION.....	58
REFERENCES.....	63
APPENDICES.....	74
VITAE.....	114

LIST OF TABLES

Table	Page
1. Specific enzymatic activities of the purified recombinant human PONs.....	15
2. Evidence for human PON1 antiatherogenicity.....	18
3. Definitions of potential muscle adverse experiences due to statins.....	28
4. Precision of the assay for determination.....	48
5. Lipid parameters at baseline of the 3 treatment groups.....	49
6. Lipid parameters at baseline and 4 months of the 3 treatment groups.....	50
A1. OCV precisions of the assay for determination of total peroxide.....	76
A2. OCV precisions of the assay for determination of total antioxidant status.....	78
A3. OCV precisions of the assay for determination of PON1 activity (using paraoxon as a substrate).....	80
A4. OCV precisions of the assay for determination of PON1 activity (using phenyl acetate as a substrate).....	82
A5. OCV precisions of the assay for determination of PON2 activity (using control serum).....	84
A6. OCV precisions of the assay for determination of PON2 activity (using rat vascular).....	86
A7. OCV precisions of the assay for determination of PON3 activity.....	87
C1. Oxidative stress parameters of individual rabbit.....	94
C2. Paraoxonase activities of individual rabbit.....	95
D1. Lipid parameters at baseline of individual rabbit.....	97
D2. Lipid parameters at 4 months of individual rabbit.....	98
D3. Renal function at 4 months of individual rabbit.....	99
D4. Liver function at 4 months of individual rabbit.....	100

LIST OF FIGURES

x

Figure	Page
1. Mechanism of atherosclerosis	7
2. Pleiotropic effects of HDL in the vessel wall	10
3. Paraoxonases (PONs) family	11
4. Tissue distribution of the human PONs family	12
5. General structure of human serum paraoxonase I (PON1)	13
6. Overall structure of PON1	14
7. Biological effects and modulation of PON1	17
8. PON1 and macrophage foam cell formation	19
9. Cholesterol biosynthetic pathway and its inhibition by statins	23
10. Mechanisms for anti-atherosclerosis of statins	24
11. The effects of statins on PONs	25
12. Chemical structure of the simvastatin	26
13. <i>Curcuma comosa</i> Roxb. plant and rhizome	30
14. Effects of <i>C. comosa</i> and simvastatin on lipid parameters at 4 months	51
15. Effect of <i>C. comosa</i> and simvastatin on lipid peroxide (TP) levels	52
16. Effect of <i>C. comosa</i> and simvastatin on total antioxidant status (TAS) levels	53
17. Effect of <i>C. comosa</i> and simvastatin on oxidative stress index (OSI)	54
18. Effects of <i>C. comosa</i> and simvastatin on PON1 and PON3 activities	55
19. Linearity of the assay for determination of protein concentration	56
20. Effect of <i>C. comosa</i> and simvastatin on PON2 activity at 4 months	57
A1. RCV precisions of the assay for determination of total peroxide (TP)	77
A2. RCV precisions of the assay for determination of total antioxidant status (TAS)	79
A3. RCV precisions of the assay for determination of PON1 activity (using paraoxon as a substrate)	81
A4. RCV precisions of the assay for determination of PON1 activity (using phenyl acetate as a substrate)	83
A5. RCV precisions of the assay for determination of PON2 activity (using control serum)	85

Figure	Page
A6. RCV precisions of the assay for determination of PON2 activity (using rat vascular).....	86
A7. RCV precisions of the assay for determination of PON3 activity.....	88
B1. Standard curve of total peroxide (TP).....	90
B2. Standard curve of total antioxidant status (TAS).....	91
B3. Standard curve of total protein assay.....	92

LIST OF ABBREVIATIONS

β	= beta
$^{\circ}\text{C}$	= degree celcius
μg	= microgram
μl	= microlitre
μmol	= micromole
μM	= micromolar
α	= alpha
ABTS	= 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)
ACS	= acute coronary syndrome
Alk	= alkaline phosphatase
ALT	= alanine aminotransferase
ALP	= alkaline phosphates
AP-1	= activated protein-1
ARE	= arylesterase
AST	= aspatate aminotransferase
BHT	= butylated hydroxytoluene
BSA	= bovine serum albumin
BUN	= blood urea nitrogen
Ca^{2+}	= calcium ion
CAD	= coronary artery disease
CBVD	= cerebrovascular disease
CETP	= cholesterol ester transfer protein
CHD	= coronary heart disease
CK	= creatine kinase
cm	= centimeter
Cr	= creatinine
CVD	= cardiovascular diseases

CYP	= cytochrome P450
Cys	= cysteine
DB	= direct bilirubin
DBP	= diastolic blood pressure
DHC	= dihydrocoumarin
dL	= deciliter
EDTA	= ethylenediaminetetraacetic acid
e.g.	= example gratia
et al.	= et alii
g	= gram
g	= gravity
HDL	= high density lipoprotein
HDL-C	= high density lipoprotein-cholesterol
Hg	= mercury
hr	= hour
IHD	= ischemic heart disease
kDa	= kilo dalton
kg	= kilogram
L	= litre
LCAT	= lecithin-cholesterol acyltransferase
LDL	= low density lipoprotein
LDL-C	= low density lipoprotein-cholesterol
M	= molar
mEq	= milliequivalent
min	= minute
mg	= milligram
mg/kg	= milligram per kilogram body weight
mL	= millilitre

mM	= millimolar
MM-LDL	= minimally modified low density lipoprotein
mmole	= millimole
MCV	= mean corpuscular volume
MCH	= mean corpuscular hemoglobin
MI	= myocardial infarction
MW	= molecular weight
NCEP	= National Cholesterol Education Program
nm	= nanometer
NZW	= New Zealand White
OCV	= Optimal Condition Variance
OSI	= oxidative stress index
Ox-LDL	= oxidized low density lipoprotein
Ox-MQ	= oxidized macrophage
PAD	= peripheral arterial disease
PBS	= phosphate buffer saline
pH	= potential of hydrogen
PLTP	= phospholipid transfer protein
PMA	= phorbol-12-myristate-13-acetate
PON1	= paraoxonase1
PON2	= paraoxonase2
PON3	= paraoxonase3
PONs	= paraoxonases
RBC	= red blood cell
RCV	= Routine Condition Variance
r.p.m.	= revolution per minute
SBP	= systolic blood pressure

SD	= standard deviation
sec	= second
SEM	= standard error of the mean
SGOT	= serum glutamic-pyruvic transaminase
SGPT	= serum glutamic-oxaloacetic transaminease
SH	= sulfhydryl
SOD	= superoxide dismutase
TAS	= total antioxidant status
TB	= total bilirubin
TC	= total cholesterol
TG	= triglyceride
THA	= 2,4,6-trihydroacetophenone
TP	= total peroxide
Tris	= tris (hydroxymethyl) aminomethane
U	= unit
ULN	= upper limit of normal
VLDL	= very low density lipoprotein
WHO	= World Health Organization