



**EVALUATION OF BIOLOGICAL ACTIVITIES OF  
PHYTOESTROGENS IN *Curcuma comosa* Roxb.**

**JITTIMA WEERACHAYAPHORN**  
๒

**With compliments  
of**  
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล  
.....

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR  
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (PHYSIOLOGY)  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY  
2001**

**ISBN 974-04-1081-2**

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

TH  
J612V  
2001  
C.2

4137565 SCPS/M : MAJOR : PHYSIOLOGY : M.Sc. (PHYSIOLOGY)  
 KEY WORDS : *Curcuma comosa* Roxb. / PHYTOESTROGEN / CYP2E1 /  
 PROTECTION / CARBON TETRACHLORIDE /  
 OVARIECTOMIZED MICE / OSTEOPENIA / BONE  
 CALCIUM CONTENT

JITTIMA WEERACHAYAPORN : EVALUATION OF BIOLOGICAL  
 ACTIVITIES OF PHYTOESTROGENS IN *Curcuma comosa* Roxb. THESIS  
 ADVISORS: PAWINEE PIYACHATURAWAT, Ph.D., KULAWEE SUJARIT,  
 Ph.D., MATHUROSE PONGLIKITMONGKOL, Ph.D., 212 p. ISBN 974-04-1081-2.

The present study aimed to determine whether the hexane extract of *C. comosa* has any beneficial effect in the prevention and treatment of bone loss in osteopenic mice. Its chemopreventive effect against hepatotoxicity induced by CCl<sub>4</sub> was also investigated.

The preventive effect of phytoestrogen on bone loss was investigated in mature Swiss albino female mice. The experimental groups were ovariectomized and received treatment with the plant extract one day after the operation. Five weeks after the operation, the ovariectomized untreated group showed a marked decrease in total bone calcium content of the lumbar vertebrae, femur and tibia bone in comparison with the intact control group. The poor development of endochondral bone formation observed in bone histology, and the decreased activity of plasma bone specific alkaline phosphatase confirmed the osteopenia condition in these animals. Treatment with *C. comosa* at a dose of 500 mg/kg/BW/day or estradiol (E<sub>2</sub>) at a dose of 2.5 µg/kg/BW/day body weight commenced one day after the operation and continued for 5 weeks, significantly prevented the loss of total bone calcium content in both trabecular and cortical bones. It also increased the number of active osteoblasts indicating osteogenesis. Bone alkaline phosphatase in plasma and uterine weight both increased due to *C. comosa* and E<sub>2</sub> treatment.

The therapeutic effect of the *C. comosa* extract was examined in mice which were ovariectomized to induce osteopenia. Six weeks after the operation, the ovariectomized mice were treated with *C. comosa* or E<sub>2</sub> for 5 weeks. All measured parameters in the ovariectomized mice improved and showed a similar effect to those in the intact control group. However, *C. comosa* extract had less effect than E<sub>2</sub> treatment. Full uterine stimulation and recovery of bone mass were observed exclusively in E<sub>2</sub> treatment.

The chemopreventive effect of the *C. comosa* extract was evaluated in CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity in mice by giving them the plant extract at a dose of 500 mg/kg body weight at various periods before treating with CCl<sub>4</sub>. Treatment with *C. comosa* 12-24 h prior to CCl<sub>4</sub> reversed changes of several hepatotoxic markers to control levels including PGPT (plasma glutamic pyruvic transaminase), and PGOT (plasma glutamic oxaloacetic transaminase). The histology of the liver section confirmed the preventive effect of *C. comosa* extract against CCl<sub>4</sub>. The possible mechanisms by which *C. comosa* prevented the CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity were further investigated. CCl<sub>4</sub> treatment dramatically decreased the cytochrome P450, CYP2E1 catalytic activity, aniline hydroxylase activity, and the hepatic CYP2E1 polypeptide level. *C. comosa* treatment reversed the suppressing effect of CCl<sub>4</sub>, whereas *C. comosa* alone did not alter the catalytic activity or the expression of CYP2E1. Furthermore, hepatic glutathione-S-transferase, glutathione content, and UDP-glucuronosyltransferase, which are indices of the drug detoxifying enzyme system, were also evaluated. *C. comosa* treatment accelerated drug detoxification by increasing glutathione-S-transferase.

The study suggests that *C. comosa* is effective for the prevention and treatment of bone loss in ovariectomized osteopenia. It may be a significant alternative to estrogen therapy, not only for prevention, but also for the treatment of postmenopausal osteoporotic conditions. *C. comosa* also possesses a chemopreventive effect. It attenuated CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity. *C. comosa* may also be of value in treatment of liver diseases.

4137565 SCPS/M : สาขาวิชา : สรีรวิทยา วท.ม. (สรีรวิทยา)

จิตติมา วีระชาภรณ์: การประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่มีฤทธิ์เอสโตรเจนในว่านชักมดลูก (EVALUATION OF BIOLOGICAL ACTIVITIES OF PHYTOESTROGENS IN *Curcuma comosa* Roxb.) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ภาวณี ปิยะจตุรวัฒน์, ปร.ด., กุลวิณี สุจริต, Ph.D., มรุรส พงษ์ลิขิตมงคล, Ph.D., 212 หน้า ISBN: 974-04-1081-2

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาและประเมินถึงความสามารถของสารสกัดจากว่านชักมดลูกในตัวทำลายเซลล์มะเร็งและการป้องกันและรักษาภาวะกระดูกบางในหนูถีบจักร และยังได้ศึกษาถึงฤทธิ์และกลไกของว่านชักมดลูกต่อการป้องกันการทำลายตัวอ่อนเนื่องจากสารพิษคาร์บอนเตตระคลอไรด์

การศึกษาฤทธิ์ในการป้องกันภาวะกระดูกบาง ในหนูถีบจักรเพศเมียพันธุ์ Swiss albino โดยทำการตัดรังไข่หนูถีบจักรเพศเมียโตเต็มวัย 1 วันแล้วให้สารสกัดหรือเอสโตรเจนทันทีเป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่าในหนูกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัดภายหลังการตัดรังไข่มีปริมาณแคลเซียมในกระดูก lumbar L5-6, femur และ tibia ลดลงจากหนูปกติในกลุ่มควบคุม จากการศึกษาเนื้อเยื่อกระดูกในบริเวณดังกล่าว มีการพัฒนาการสร้างกระดูกลดลง ตัวบ่งชี้ของการสร้างกระดูกได้แก่ bone specific alkaline phosphatase ก็ลดลง การให้สารสกัดจากว่านชักมดลูกขนาด 500 mg/kg/day และฮอร์โมนเอสโตรเจนขนาด 2.5 µg/kg/day เป็นเวลานาน 5 สัปดาห์ ทำให้ปริมาณแคลเซียมในกระดูกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยที่ระดับแคลเซียมที่เพิ่มขึ้นมีค่าใกล้เคียงหนูปกติ และยังมีผลในการกระตุ้นการสร้างกระดูก รวมทั้งน้ำหนักมดลูกด้วย

ส่วนการศึกษาถึงฤทธิ์ในการรักษาของสารสกัดจากว่านชักมดลูก ทำโดยเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะกระดูกบางด้วยการตัดรังไข่หนู 6 สัปดาห์ และให้สารสกัดหรือเอสโตรเจนเป็นเวลานาน 5 สัปดาห์ ผลการศึกษาพบว่า หนูตัวชี้วัดในกลุ่มหนูที่ได้รับสารสกัดจากว่านชักมดลูกหรือเอสโตรเจนทำให้การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในหนูตัดรังไข่กลับเข้าสู่หนูกลุ่มปกติ จากผลการทดลองว่านชักมดลูกให้ผลที่สอดคล้องกับผลของเอสโตรเจน แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดจากว่านชักมดลูกมีผลที่อ่อนกว่าเอสโตรเจน ผลการกระตุ้นมดลูกและการฟื้นฟูสภาพของกระดูกจะสมบูรณ์กว่าในกลุ่มที่ให้เอสโตรเจน

การศึกษาถึงผลและกลไกของสารสกัดจากว่านชักมดลูกต่อการทำลายตัวอ่อนเนื่องจากคาร์บอนเตตระคลอไรด์ในหนูถีบจักร ทำโดยให้สัตว์ทดลองได้รับสารสกัดจากว่านชักมดลูกในขนาด 500 mg/kg BW โดยฉีดเข้าทางช่องท้องที่ระยะเวลาต่างๆ ก่อนที่จะได้รับสารพิษคาร์บอนเตตระคลอไรด์ พบว่าการฉีดสารสกัดจากว่านชักมดลูกเข้าทางหน้าท้องเป็นเวลา 12-24 ชั่วโมงก่อนได้รับคาร์บอนเตตระคลอไรด์ทำให้การเกิดพิษที่ตัวอ่อนเนื่องจากคาร์บอนเตตระคลอไรด์ลดลงอย่างชัดเจน คือมีการลดลงของตัวบ่งชี้การเกิดพิษทางตับซึ่งรวมถึง PGPT (plasma glutamic pyruvic transaminase), PGOT (plasma glutamic oxaloacetic transaminase) จากการศึกษาถึงกลไกของสารสกัดจากว่านชักมดลูกต่อการป้องกันการทำลายตัวอ่อนเนื่องจากคาร์บอนเตตระคลอไรด์นั้นพบว่า สารสกัดจากว่านชักมดลูกสามารถยับยั้งการทำลายเอนไซม์ Aniline hydroxylase และ CYP2E1 polypeptide level จากผลของการเกิดพิษของคาร์บอนเตตระคลอไรด์ นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากว่านชักมดลูกสามารถออกฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ซึ่งเป็นตัวสำคัญในการกำจัดสารพิษออกจากร่างกายคือ Glutathione S-transferase ซึ่งผลดังที่กล่าวมาเป็นตัวบ่งชี้ถึงสภาพทั่วไปและการทำงานของตับในระดับโมเลกุลซึ่งจะถูกเปลี่ยนแปลงไปในทางที่ดีขึ้นได้ด้วย

จากผลการทดลองนี้สรุปได้ว่า ว่านชักมดลูกมีความสามารถในการป้องกันและรักษาภาวะกระดูกบางซึ่งถูกเหนี่ยวนำโดยการตัดรังไข่, สารสกัดว่านชักมดลูกอาจเป็นสารทางเลือกที่สำคัญตัวหนึ่งในการใช้เป็นฮอร์โมนทดแทนในอนาคต ไม่เพียงแต่ในการป้องกันแต่ยังเป็นทางเลือกสำหรับการรักษาภาวะกระดูกพรุนในหญิงวัยหมดประจำเดือน และในสารสกัดดังกล่าวยังสามารถลดการเกิดพิษที่ตัวอ่อนเนื่องจากคาร์บอนเตตระคลอไรด์และสารสกัดจากว่านชักมดลูกอาจสามารถนำมาใช้ในการรักษาโรคตับได้