

เพิ่มกัมมันตภาพของเอนไซม์กลูตาธัยโอนเอสทรานสเฟอเรสเมื่อได้รับสารสกัด 10 วัน

การทำงานของเอนไซม์กลูตาธัยโอนเอสทรานสเฟอเรสในหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากตะไคร้เป็นเวลา 10 วันต่อเนื่องกัน มีความสามารถเร่งปฏิกิริยาการรวมระหว่าง CDNB กับ GSH อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 9) ทั้งนี้การเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับปริมาณตะไคร้ด้วยความแตกต่างมีนัยสำคัญที่ค่า $p < 0.005$, และ $** p < 0.05$ หลังจากได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อกก.น้ำหนักหนู และ 0.5 กรัมต่อกก.น้ำหนักหนูตามลำดับ แต่เมื่อได้รับสารสกัดทั้งสองความเข้มข้นต่อเนื่องไปเป็นเวลา 30 วัน พบว่ากัมมันตภาพของเอนไซม์ไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปจากกลุ่มควบคุม (ตาราง 10)

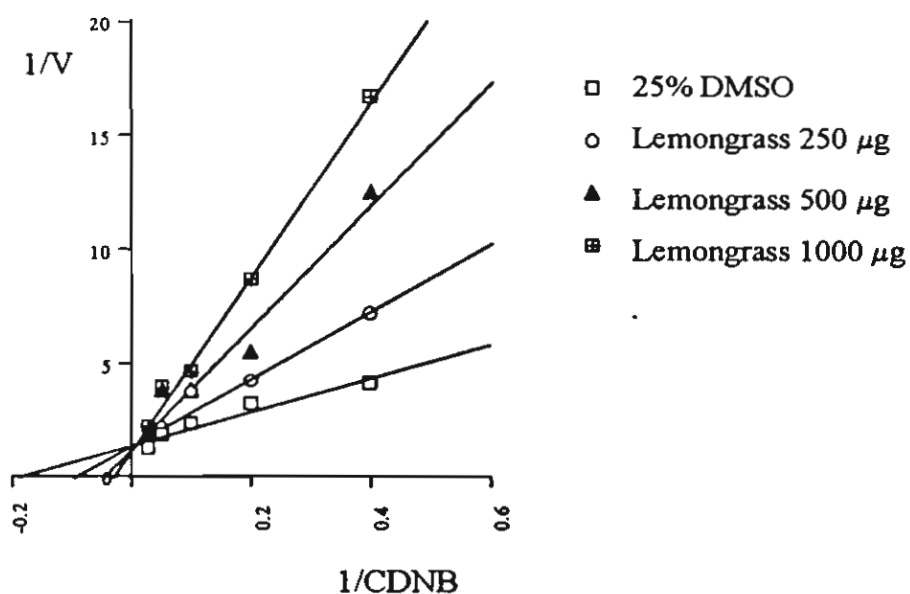
กัมมันตภาพของเอนไซม์กลูตาธัยโอนเอสทรานสเฟอเรสเปลี่ยนแปลงจากการได้รับสารสกัด 30 วัน

การทำงานของเอนไซม์กลูตาธัยโอนเอสทรานสเฟอเรสไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปจากกลุ่มควบคุม (ตาราง 9) จากการได้รับสารสกัดจากตะไคร้ที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อกก.น้ำหนักหนู และ 0.5 กรัมต่อกก.น้ำหนักหนู เป็นเวลา 10 วัน แต่พบว่าเมื่อได้รับสารสกัดจากตะไคร้ที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อกก.น้ำหนักหนูเป็นเวลา 30 วัน เอนไซม์กลูตาธัยโอนเอสทรานสเฟอเรสจะลดความสามารถที่จะเร่งปฏิกิริยา โดยความแตกต่างที่ค่า $p < 0.05$ (ตารางที่ 10)

เอนไซม์ดีทีไออะพอเรสไม่มีการเปลี่ยนแปลง

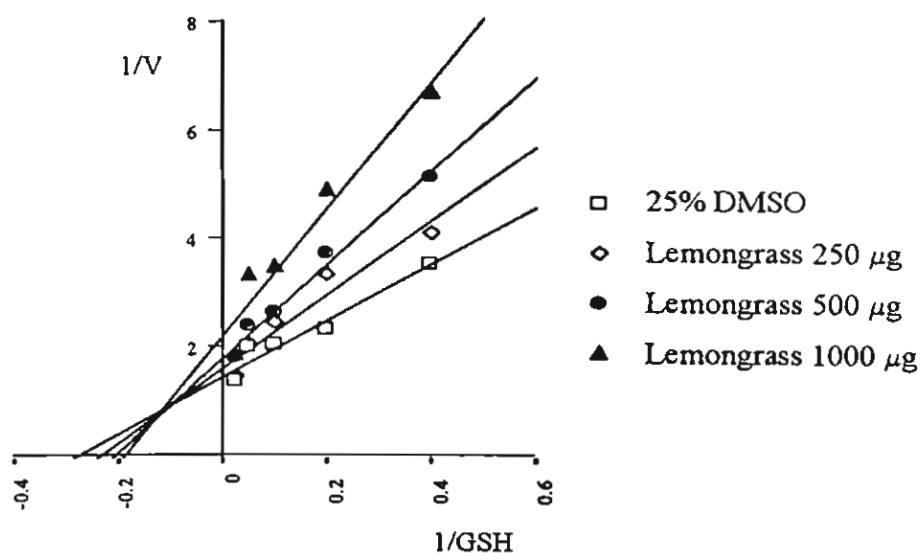
กัมมันตภาพของเอนไซม์ดีทีไออะพอเรส ไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปจากกลุ่มควบคุมจากการได้รับสารสกัดจากตะไคร้ทุกความเข้มข้นเป็นเวลา 30 วัน (ตาราง 9, และ 10)

ผลจากการทดลอง kinetic ของเอนไซม์ GST *in vitro* พบว่าสารสกัดจากตะไคร้แสดงการยับยั้งเอนไซม์แบบ competitive inhibitor เมื่อใช้ 2,4-chloro dinitrobenzene เป็นสับสเตรท แต่จะเป็นแบบ uncompetitive inhibitor เมื่อใช้ GSH เป็นสับสเตรท (รูปที่ 27,28)



รูปที่ 27

Kinetic study ของเอนไซม์ GST ในภาวะที่มีสารสกัดจากตะไคร้
สารสกัดจากตะไคร้แสดง competitive inhibitor คือ CDNB
(V_{max} ไม่เปลี่ยน แต่ K_m เปลี่ยนแปลง)



รูปที่ 28

Kinetic study ของเอนไซม์ GST ในภาวะที่มีสารสกัดจากตะไคร้
สารสกัดจากตะไคร้แสดง Uncompetitive inhibitor คือ GSH
(ทั้ง V_{max} และ K_m เปลี่ยนแปลง)

3.1.6.3.2. ผลของการได้รับสารสกัดจากหญ้าปักกิ่ง

การได้รับสารสกัดจากหญ้าปักกิ่งเป็นระยะเวลา 30 วันต่อเนื่องกัน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเอนไซม์ Phase II ที่ใช้ในการเมแทบอลิซึมสารพิษในร่างกาย ดังนี้

ไม่มีผลต่อเอนไซม์กลูตาไธโอนเอสทรานสเฟอเรส

การทำงานของเอนไซม์กลูตาไธโอนเอสทรานสเฟอเรสในหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากหญ้าปักกิ่งที่ความเข้มข้น 1.0 กรัมต่อกก.น้ำหนักหนู และ 0.1 กรัมต่อกก.น้ำหนักหนู เป็นเวลา 10 วัน ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัด (ตารางที่ 11) แต่เมื่อได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อกก.น้ำหนักหนู ต่อเนื่องไปเป็นเวลา 30 วัน พบว่ากัมมันตภาพของเอนไซม์เพิ่มขึ้นจากกลุ่มควบคุม (ตาราง 12)

ลดกัมมันตภาพของเอนไซม์กลูโคโรนิลทรานสเฟอเรส

การทำงานของเอนไซม์กลูโคโรนิลทรานสเฟอเรสลดลงไปจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตาราง 9) จากการได้รับสารสกัดจากหญ้าปักกิ่งที่ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อกก.น้ำหนักหนู เป็นเวลา 10 วัน และการได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้น 1.0 และ 0.1 กรัมต่อกก.น้ำหนักหนูเป็นเวลา 30 วัน เอนไซม์กลูโคโรนิลทรานสเฟอเรสจะลดความสามารถที่จะเร่งปฏิกิริยาโดยความแตกต่างที่ค่า $p < 0.005$ และ $p < 0.05$ ตามลำดับ (ตารางที่ 10)

เอนไซม์ดีทีไออะพอเรสไม่มีการเปลี่ยนแปลง

กัมมันตภาพของเอนไซม์ดีทีไออะพอเรส ไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปจากกลุ่มควบคุมจากการได้รับสารสกัดจากหญ้าปักกิ่งทุกความเข้มข้นเป็นเวลาถึง 30 วัน (ตาราง 9, และ 10)

ผลจากการทดลอง kinetic ของเอนไซม์ GST *in vitro* พบว่าสารสกัดจากหญ้าปักกิ่งแสดงการยับยั้งเอนไซม์แบบ non-competitive inhibitor เมื่อใช้ 2,4-chloro dinitrobenzene และ GSH เป็นสับสเตรท (รูปที่ 29,30) โดยมีแนวโน้มที่แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากหญ้าปักกิ่งอาจจะเร่งให้เกิดปฏิกิริยาการรวมระหว่างสับสเตรทดีขึ้นเพราะค่า K_m ของปฏิกิริยามีค่าน้อยลง

บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การได้รับสารสกัดจากหญ้าปักกิ่งมีแนวโน้มที่จะเปลี่ยนแปลงเมแทบอลิซึมของอะฟลาทอกซินในรูปของการเร่งการรวมตัวกับอัลบูมินเป็นอะฟลาทอกซิน-อัลบูมินแอดคักส์ ในขณะที่สารสกัดจากตะไคร้ไม่มีผลต่อการเกิดอะฟลาทอกซิน-อัลบูมินแอดคักส์

หลังจากที่หนูขาวพันธุ์ Wistar ได้รับ AFB1 เข้าไป จะพบระดับของอะฟลาทอกซิน-อัลบูมินแอดคักส์ในซีรัมได้ในเวลา 1 ชั่วโมงหลังจากการได้รับอะฟลาทอกซิน และปริมาณแอดคักส์จะเพิ่มมากขึ้นจนถึงระดับสูงสุดที่ 12 ชั่วโมง จากนั้นระดับจะลดลงมาคงที่ใกล้เคียงกับค่าที่เริ่มตรวจพบครั้งแรกตั้งแต่ 24, 36 จนถึง 48 ชั่วโมง ทั้งนี้ระดับที่คงที่นี้อาจเป็นปริมาณที่สามารถสะสมได้ในรูปที่รวมกับอัลบูมินหลังจากการได้รับอะฟลาทอกซินบิหนึ่งเพียงครั้งเดียว อะฟลาทอกซิน-อัลบูมินแอดคักส์จึงสามารถใช้เป็น biomarkers ที่บอกระดับของการได้รับ อะฟลาทอกซินเข้าสู่ร่างกายได้และ biomarker นี้มีความเสถียรอยู่ในซีรัมได้เป็นเวลานาน (48 ชั่วโมง) ทั้งนี้เคยมีรายงานว่าผู้ที่ได้รับอะฟลาทอกซินอย่างสม่ำเสมอจะสามารถเกิดการสะสมอะฟลาทอกซินได้มากถึง 30 เท่า เมื่อเทียบกับที่ที่ได้รับอะฟลาทอกซินเพียงครั้งเดียว (9)

สารสกัดจากตะไคร้ไม่สามารถที่จะเปลี่ยนแปลงการเกิดอะฟลาทอกซิน-อัลบูมินแอดคักส์แต่อย่างใด ไม่ว่าจะได้รับสารสกัดก่อน, หลังหรือทั้งก่อนและหลัง จากการได้รับอะฟลาทอกซินบิหนึ่งครั้งเดียวหรือหลาย ๆ ครั้ง

สารสกัดจากหญ้าปักกิ่งสามารถที่จะเปลี่ยนแปลงเมแทบอลิซึมของอะฟลาทอกซิน ดังนี้

- 1.1. การได้รับสารสกัดจากหญ้าปักกิ่งก่อนที่จะได้รับอะฟลาทอกซินบิหนึ่งปริมาณ 250 ไมโครกรัมต่อกก. น้ำหนักตัวครั้งเดียว

อาจเร่งให้การรวมตัวกันระหว่างเมตาบอไลต์ของอะฟลาทอกซินกับอัลบูมินเกิดเร็วขึ้น เพราะสามารถตรวจพบระดับของอะฟลาทอกซิน-อัลบูมินแอดคักส์สูงสุดที่ 4 ชั่วโมงหลังจากได้รับอะฟลาทอกซินบิหนึ่ง ซึ่งเร็วกว่ากลุ่มควบคุมซึ่งได้รับเพียงอะฟลาทอกซินบิหนึ่งที่แสดงค่าสูงสุดที่ 12 ชั่วโมง ทั้งนี้หญ้าปักกิ่งอาจจะมีผลเร่งขบวนการเกิดอะฟลาทอกซิน-อัลบูมินแอดคักส์ซึ่งอาจเป็นการเร่งปฏิกิริยาการรวมตัวกันเพื่อนำไปขับออก (acceleration of adduct formation & disappearance) เนื่องจากการรวมตัวกันระหว่างเมตาบอไลต์ของอะฟลาทอกซินกับอัลบูมินนั้นอาจเป็นการลดปริมาณของ aflatoxin-8,9-epoxide ซึ่งเป็นสารตัวกลางที่เกิดจากเมแทบอลิซึมอะฟลาทอกซินในตับที่สามารถไปจับโมเลกุลของดีเอ็นเอ การที่สารสกัดหญ้าปักกิ่งเร่งการเกิดอะฟลาทอกซินอัลบูมินแอดคักส์นั้นอาจจะเป็นการเร่งขบวนการ

การกำจัดพิษของอะฟลาทอกซินได้อีกทางหนึ่ง จากรายงานพบว่า การได้รับอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง ปริมาณ 20 มก.ก./กก. น้ำหนักตัวเพียงครั้งเดียวจะสามารถตรวจพบอะฟลาทอกซิน-ดีเอ็นเอแอดดักส์ในตับได้ และทำให้เกิดความผิดปกติของเซลล์ตับตามมา (8,12) เนื่องจากในการทดลองครั้งนี้ยังไม่ได้มีการวัดระดับอะฟลาทอกซิน-ดีเอ็นเอแอดดักส์ที่เกิดขึ้นในตับด้วย ดังนั้นจึงยังไม่สามารถระบุลงไปได้ว่าระดับอะฟลาทอกซิน-อัลบูมินแอดดักส์ที่พบในการทดลองนี้ จะมีความสัมพันธ์ที่จะลดระดับอะฟลาทอกซิน-ดีเอ็นเอแอดดักส์ในตับ หรือการที่หนูปากกิ้งเร่งให้เกิดอะฟลาทอกซิน-อัลบูมินแอดดักส์เร็วขึ้นนั้น อาจจะมีบทบาทเร่งการเกิดอะฟลาทอกซิน-ดีเอ็นเอแอดดักส์ในตับหรือไม่ ซึ่งการวิเคราะห์ระดับดีเอ็นเอแอดดักส์ในตับด้วยนั้น อาจจะทำให้มีข้อมูลที่สามารถนำไปอธิบายบทบาทของสารสกัดจากหนูปากกิ้งต่อการป้องกันความเป็นพิษที่อาจเกิดจากการได้รับอะฟลาทอกซิน

1.2. ผลต่อการได้รับสารสกัดจากหนูปากกิ้งก่อนที่จะได้รับอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง ปริมาณ 250 ไมโครกรัมต่อกก. น้ำหนักตัว หลาย ๆ ครั้ง

พบว่า การได้รับสารสกัดจากหนูปากกิ้งก่อนที่จะได้รับอะฟลาทอกซิน บีหนึ่ง ปริมาณ 250 ไมโครกรัมต่อกก. น้ำหนักตัว หลาย ๆ ครั้ง มีแนวโน้มลดปริมาณอะฟลาทอกซิน-อัลบูมินแอดดักส์ในช่วงอาทิตย์แรกของการได้รับอะฟลาทอกซิน แต่เมื่อได้รับอะฟลาทอกซินมากขึ้น ปริมาณแอดดักส์ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ผลการทดลองครั้งนี้พบว่าระดับ AFB1-albumin adduct หลังจากได้รับอะฟลาทอกซินหลาย ๆ ครั้งจะสูงสุดประมาณ 4.4 เท่าของระดับ adduct ที่พบหลังจากได้รับอะฟลาทอกซินครั้งแรก (first dose) ประมาณวันที่ 14 หลังจากได้รับอะฟลาทอกซินครั้งหนึ่ง ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Wild และคณะ (34) แต่ปริมาณของอะฟลาทอกซินบีหนึ่งที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้สูงกว่าปริมาณอะฟลาทอกซินของเขา

มีรายงานว่าความเป็นพิษของอะฟลาทอกซินขึ้นอยู่กับความสามารถของมันที่จะรวมกับสารชีวโมเลกุลในร่างกายเป็นดีเอ็นเอหรืออัลบูมินแอดดักส์ (35,36) ความสามารถที่จะเกิดการรวมกับสารชีวโมเลกุล เช่น อัลบูมินแอดดักส์หรือดีเอ็นเอแอดดักส์เกี่ยวข้องกับระดับของกลูตาไธโอน (glutathione, GSH) และการทำงานของเอนไซม์กลูตาไธโอนเอสทรานสเฟอเรส (glutathione-S-transferase, GST) การได้รับสารบางชนิด เช่น diethylmaleate ทำให้ระดับ GSH ในตับลดลงและเพิ่มความเป็นพิษของอะฟลาทอกซินต่อตับ มีการเพิ่มของดีเอ็นเอแอดดักส์และโปรตีนแอดดักส์ในตับ (37) การได้รับสาร oltipraz เป็นเวลาหนึ่งอาทิตย์ก่อนที่จะได้รับอะฟลาทอกซินบีหนึ่งจะลดการเกิดอะฟลาทอกซิน-อัลบูมินแอดดักส์มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ อาจเป็นเพราะว่าการได้รับ oltipraz ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ที่ใช้กำจัดพิษสารพิษในตับ เช่น GST (38,39)

จากการวิจัยครั้งนี้ พบว่าการได้รับสารสกัดจากหญ้าปักกิ่งที่ความเข้มข้น 1.0 กรัมต่อกก. น้ำหนักตัวเป็นเวลา 10 วัน มีแนวโน้มจะทำให้การทำงานของ GST ในตับดีขึ้น ซึ่งเมื่อได้รับสารสกัดต่อเนื่องไปอีก 30 วัน กลับไม่มีผลที่จะทำให้เอนไซม์ GST ทำงานดีขึ้น ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าผลต่อการลดระดับเอดคัลส์ในช่วงแรกอาจเป็นเพราะสารสกัดจากหญ้าปักกิ่งเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ แต่หลังจากนั้นเมื่อไม่มีผลต่อเอนไซม์ระดับเอดคัลส์จึงไม่เกิดผลเพราะในเวลาเดียวกันได้รับปริมาณอะฟลาทอกซินบีหนึ่งตลอดเวลา (multiple doses) และการทดลองครั้งนี้ได้ใช้ความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินบีหนึ่งค่อนข้างเข้มข้น เมื่อได้รับต่อเนื่องจึงทำให้ลดความสามารถป้องกันของสารสกัดจากหญ้าปักกิ่งลงไป

ข้อสังเกตที่น่าสนใจจากการวิจัยครั้งนี้ พบว่าการได้รับสารสกัดจากหญ้าปักกิ่งที่ความเข้มข้นต่ำ 0.1 กรัมต่อกก. น้ำหนักตัว เป็นเวลา 30 วัน กลับเพิ่มความสามารถของเอนไซม์ GST ได้ดีกว่าเมื่อได้รับสารสกัดความเข้มข้นสูง แต่เนื่องจากการทดลองผลต่อการเกิดอะฟลาทอกซิน-อัลบูมินเอดคัลส์ไม่ได้ทำการทดลองกับสารสกัดที่ความเข้มข้นนี้ด้วย ดังนั้นจึงทำให้ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าการที่ระดับอะฟลาทอกซิน-อัลบูมินเอดคัลส์ที่ลดลงในระยะแรกอาจเกิดจากระดับเอนไซม์ GST ที่เพิ่มขึ้นเนื่องมาจากการได้รับสารสกัดจากหญ้าปักกิ่ง 1.0 กรัมต่อ กก. น้ำหนักตัว

อย่างไรก็ดีการเปลี่ยนแปลงปริมาณการเกิด AFB1-albumin adduct อาจจะไม่มีความเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ GST เพราะการได้รับสารสกัดจากตะไคร้ทำให้เอนไซม์ GST ในตับของหนูขาวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่กลับไม่พบว่าการได้รับสารสกัดจากตะไคร้ไปเปลี่ยนแปลงการเกิด AFB1-albumin adduct แต่อย่างใด

2. การได้รับสารสกัดจากตะไคร้มีแนวโน้มที่จะป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่จากการได้รับสารก่อมะเร็งเอโซซิมิเทน ในขณะที่สารสกัดจากหญ้าปักกิ่งมีผลป้องกันน้อยกว่า

ผลการวิจัยพบว่าเมื่อให้สารสกัดจากตะไคร้ในปริมาณ 5 กรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัวก่อนได้รับสารเอโซซิมิเทน สามารถป้องกันรอยโรคของมะเร็ง (preneoplastic lesion) ได้แก่การเกิด aberrant crypt foci ที่เซลล์ลำไส้ใหญ่ ทั้งในระยะเริ่มต้นและระยะส่งเสริมของขบวนการเกิดมะเร็ง ได้ดีกว่าการได้รับสารสกัดจากหญ้าปักกิ่ง

จากการวิจัยครั้งนี้ พบว่าการได้รับสารสกัดจากหญ้าปักกิ่งที่ความเข้มข้น 1.0 กรัมต่อกก. น้ำหนักตัวเป็นเวลา 10 วัน มีแนวโน้มจะทำให้การทำงานของ GST ในตับดีขึ้น ซึ่งเมื่อได้รับสารสกัดต่อเนื่องไปอีก 30 วัน กลับไม่มีผลที่จะทำให้เอนไซม์ GST ทำงานดีขึ้น ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าผลต่อการลดระดับแอดคัลส์ในช่วงแรกอาจเป็นเพราะสารสกัดจากหญ้าปักกิ่งเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ แต่หลังจากนั้นเมื่อไม่มีผลต่อเอนไซม์ระดับแอดคัลส์จึงไม่เกิดผลเพราะในเวลาเดียวกันได้รับปริมาณอะฟลาทอกซินบีหนึ่งตลอดเวลา (multiple doses) และการทดลองครั้งนี้ได้ใช้ความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินบีหนึ่งค่อนข้างเข้มข้น เมื่อได้รับต่อเนื่องจึงทำให้ลดความสามารถป้องกันของสารสกัดจากหญ้าปักกิ่งลงไป

ข้อสังเกตที่น่าสนใจจากการวิจัยครั้งนี้ พบว่าการได้รับสารสกัดจากหญ้าปักกิ่งที่ความเข้มข้นต่ำ 0.1 กรัมต่อกก. น้ำหนักตัว เป็นเวลา 30 วัน กลับเพิ่มความสามารถของเอนไซม์ GST ได้ดีกว่าเมื่อได้รับสารสกัดความเข้มข้นสูง แต่เนื่องจากในการทดลองผลต่อการเกิดอะฟลาทอกซิน-อัลบูมินแอดคัลส์ไม่ได้ทำการทดลองกับสารสกัดที่ความเข้มข้นนี้ด้วย ดังนั้นจึงทำให้ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าการที่ระดับอะฟลาทอกซิน-อัลบูมินแอดคัลส์ที่ลดลงในระยะแรกอาจเกิดจากระดับเอนไซม์ GST ที่เพิ่มขึ้นเนื่องมาจากการได้รับสารสกัดจากหญ้าปักกิ่ง 1.0 กรัมต่อ กก. น้ำหนักตัว

อย่างไรก็ดีการเปลี่ยนแปลงปริมาณการเกิด AFB1-albumin adduct อาจจะไม่มีความเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ GST เพราะว่าการได้รับสารสกัดจากตะไคร้ทำให้เอนไซม์ GST ในตับของหนูขาวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่กลับไม่พบว่าการได้รับสารสกัดจากตะไคร้ไปเปลี่ยนแปลงการเกิด AFB1-albumin adduct แต่อย่างใด

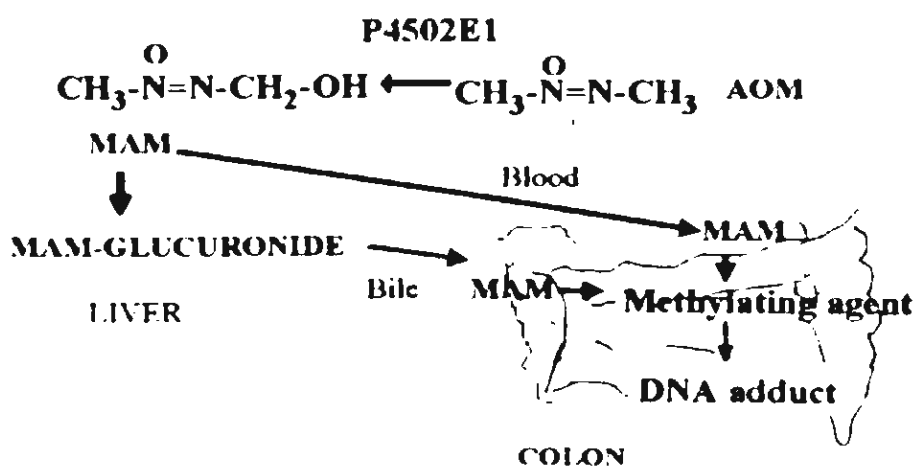
2. การได้รับสารสกัดจากตะไคร้มีแนวโน้มที่จะป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่จากการได้รับสารก่อมะเร็งเอโซซิมิเทน ในขณะที่สารสกัดจากหญ้าปักกิ่งมีผลป้องกันน้อยกว่า

ผลการวิจัยพบว่าเมื่อให้สารสกัดจากตะไคร้ในปริมาณ 5 กรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัวก่อนได้รับสารเอโซซิมิเทน สามารถป้องกันรอยโรคของมะเร็ง (preneoplastic lesion) ได้แก่การเกิด aberrant crypt foci ที่เซลล์ลำไส้ใหญ่ ทั้งในระยะเริ่มต้นและระยะส่งเสริมของขบวนการเกิดมะเร็ง ได้ดีกว่าการได้รับสารสกัดจากหญ้าปักกิ่ง

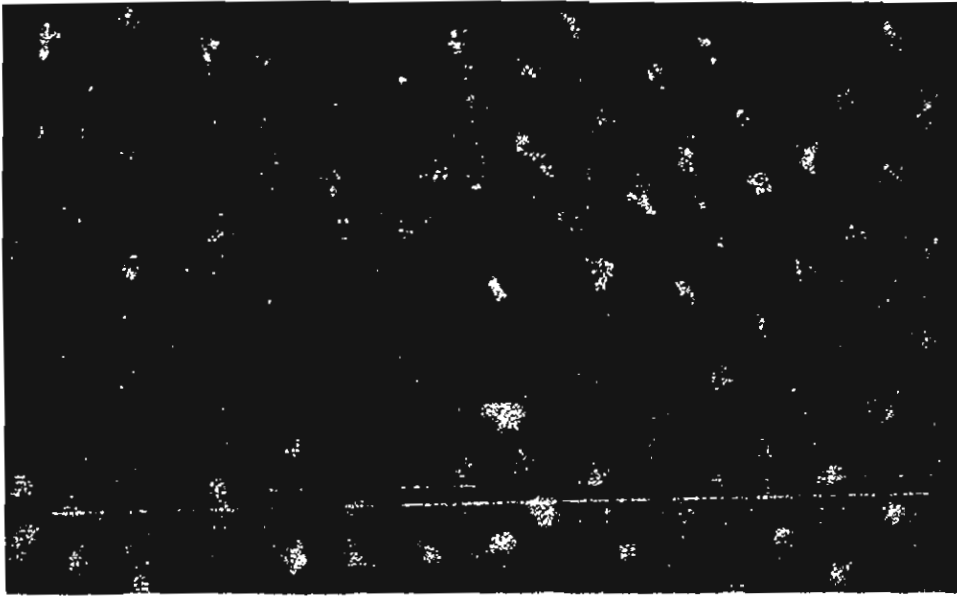
2.1. การป้องกันในระยะเริ่มต้น (Initiation stage)

ภายหลังการได้รับสารก่อมะเร็งเอโซซิมีเทน (AOM) เข้าไป จะเกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่ตับ (รูปที่ 29) โคเอนไซม์ใน xenobiotic-metabolizing system phase I ที่ต้องการ cytochrome P450 2E1 ทำให้เกิดสารตัวกลาง methylazoxymethanol (MAM) ซึ่งอาจจะถูกเอนไซม์ ใน phase II คือ UDP glucuronyl transferase นำไปรวมกับกรดกลูคูโรนิกเป็นสารคอนจูเกต MAM-glucuronide เพื่อผ่านไปลำไส้ใหญ่ส่วน colonic mucosa โคเอนไซม์น้ำดี หรือพาไปในรูปแบบอิสระไม่รวมตัว (free MAM) ทางเลือดไปที่ลำไส้ใหญ่ส่วน colonic muscular อาศัยเอนไซม์ β -glucuronidase ของแบคทีเรียในลำไส้จะสลายได้ MAM อิสระออกมา (40) และถูกเมแทบอลิซึมเกิดเป็นสารที่จะเติมหมู่เมทิลให้กับดีเอ็นเอ (methylating agent) โดยเฉพาะเติมหมู่เมทิลให้แก่เบสกวานีนในดีเอ็นเอ เป็น O^6 -methylguanine หรือ N^7 -methylguanine adduct (41) และความผิดปกตินี้โดยเฉพาะการเกิด O^6 -methylguanine ทำให้เป็นต้นเหตุให้เกิดการแบ่งตัวของเซลล์ลำไส้ใหญ่แบบผิดปกติเกิดเป็น aberrant crypt foci (42,43) ซึ่งระยะนี้จะเรียกว่าเป็นระยะเริ่มต้น หลังจากได้รับสารเอโซซิมีเทนเข้าไป สามารถตรวจพบรอยโรค ACF ได้ประมาณ 3 อาทิตย์ หากให้เวลาผ่านไป ACF จะมีการพัฒนามากขึ้น จนเกิดขนาดใหญ่ขึ้น เช่น จาก 1 crypt จนมากกว่า 3 crypt (รูปที่ 30,31,32) ระยะนี้จะเรียกว่าระยะส่งเสริม และใช้เวลาประมาณ 16 อาทิตย์ การทดสอบนี้จึงเป็นวิธีการที่นิยมอย่างแพร่หลายในการวิจัยหาสารที่จะมีฤทธิ์ป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่จากสารเคมีที่ระยะ initiation และ promotion (44,45,46,47,48)

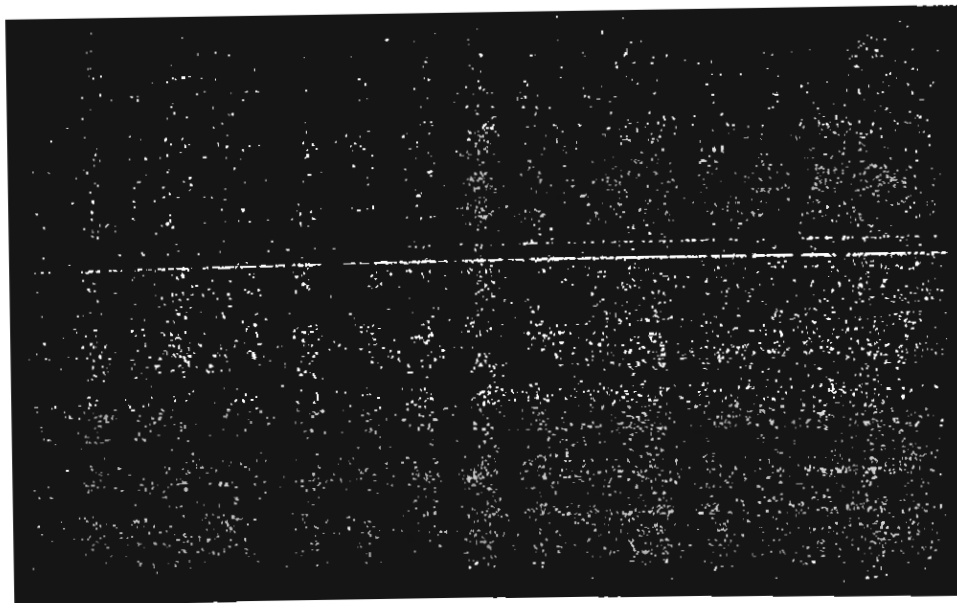
Azoxymethane metabolism



รูปที่ 29 เมแทบอลิซึมของเอโซซิมีเทน



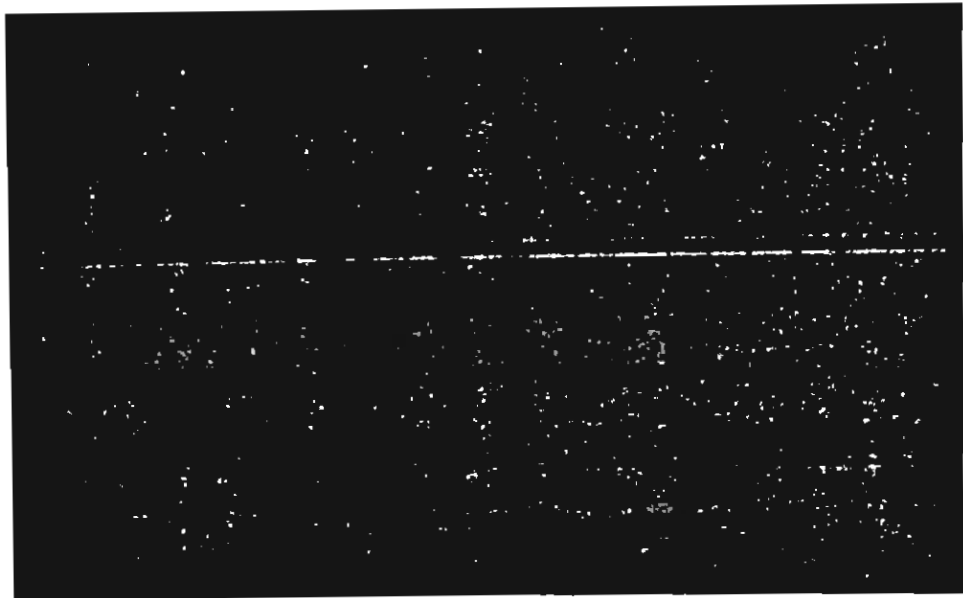
รูปที่ 30 แสดง aberrant crypt foci : 1 crypt/focus



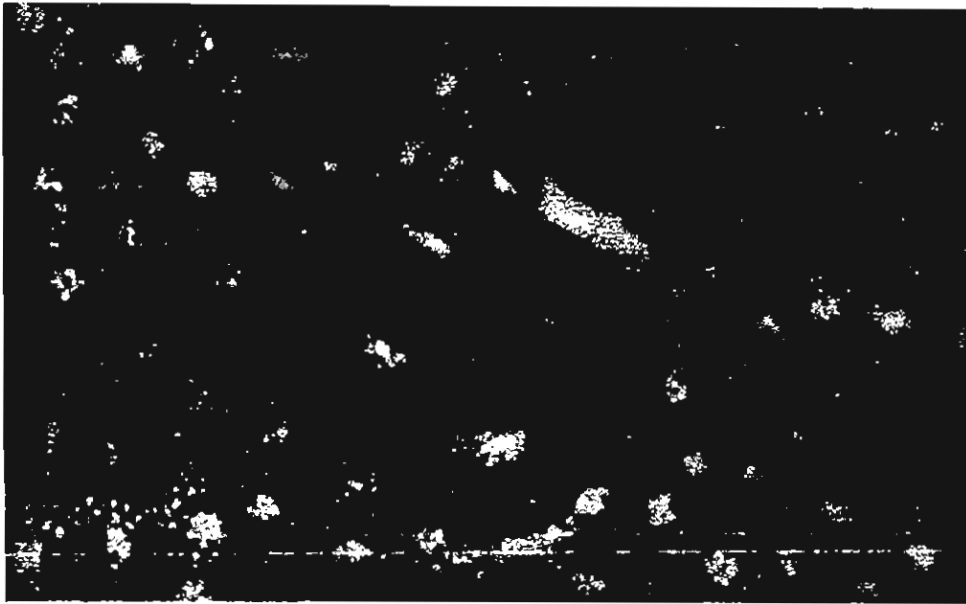
รูปที่ 31 แสดง aberrant crypt foci : 3 crypt/focus



รูปที่ 30 แสดง aberrant crypt foci : 1 crypt/focus



รูปที่ 31 แสดง aberrant crypt foci : 3 crypt/focus



รูปที่ 32 แสดง aberrant crypt foci : 4 crypts/focus

การได้รับสารสกัดจากตะไคร้ป้องกันการเกิด ACF ที่เซลล์ลำไส้ใหญ่จากการเหนี่ยวนำด้วยเอโซซิมิเทนได้ดีทั้งระยะเริ่มต้นและระยะส่งเสริม พบว่ากลไกที่อาจเป็นไปได้คือการยับยั้งการเกิด O^6 -methylguanine adduct ที่ colonic mucosa ในระยะเริ่มต้น ส่วนการได้รับสารสกัดจากหญ้าปักกิ่งจะยับยั้งการเกิด ACF ได้น้อยกว่า และพบว่าสารสกัดจากหญ้าปักกิ่งยับยั้งการเกิด DNA-adduct เช่นกันแต่เป็นการยับยั้ง N^7 -methylguanine มากกว่า O^6 -methylguanine และการยับยั้งจะผ่านส่วน colonic muscular มากกว่า

นอกจากนี้เมื่อดูผลของการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง พบว่าการได้รับสารสกัดจากตะไคร้หรือสารสกัดจากหญ้าปักกิ่งเป็นเวลา 30 วัน ทำให้เอนไซม์ aminopyrine demethylase ซึ่งเป็น cytochrome P450 2B และเอนไซม์ UDP-glucuronyl transferase ลดความสามารถเร่งปฏิกิริยาที่ตับ อาจเป็นไปได้ว่าการได้รับสารสกัดจากพืชทั้งสองเข้าไป ทำให้ปฏิกิริยาการกระตุ้นเอโซซิมิเทนและขณะเดียวกันการรวมตัวกับกรดกลูคิวโรนิกที่ตับก็เกิดได้น้อยลง เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงต่อความสามารถของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง ทำให้ปริมาณ MAM-glucuronide ที่ผ่านมายังลำไส้ใหญ่มีน้อยลง อัตราการเกิดแอดดักส์จึงลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานการเกิด O^6 -methylguanine adduct ที่ตับพบมากขึ้นจากการได้รับสารสกัดจากตะไคร้ (49) เนื่องจากอาจมี MAM ที่ตับมากขึ้น แต่อัตราการซ่อมแซม DNA-adduct ที่ตับส่วนมากจะดี และพบว่าตับไม่ได้เป็น target ของเอโซซิมิเทน (เอโซซิมิเทนเป็นสารก่อมะเร็งลำไส้ใหญ่)

2.2. การป้องกันการเกิด ACF ที่เซลล์ลำไส้ใหญ่จากการเหนี่ยวนำด้วยเอโซซิมิเทนในระยะส่งเสริม พบว่ากลไกที่อาจเป็นไปได้ อาจมาจากฤทธิ์ antioxidant activity ของสารสำคัญในสารสกัดจากพืช ทั้งสอง ทั้งนี้พบมีรายงานว่าสารสกัดจากตะไคร้แสดง antioxidant activity แรงกว่าสารสกัดจากหญ้าปักกิ่ง (49,50)

3. การป้องกันการเกิดมะเร็งระดับจากการได้รับอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง

การวิจัยครั้งนี้พบว่าไม่สามารถสรุปผลการป้องกันการเกิดมะเร็งระดับจากการได้รับอะฟลาทอกซิน บีหนึ่งโดยสารสกัดจากตะไคร้หรือสารสกัดจากหญ้าปักกิ่งได้ เพราะไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดก้อน มะเร็งระดับในหนูขาวทดลอง ภายหลังจากการป้อนอะฟลาทอกซินบีหนึ่งขนาด 250 ไมโครกรัมต่อ กก. น้ำหนักตัวเป็นเวลา 3 อาทิตย์ติดต่อกันได้ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าระยะเวลาในการให้อะฟลาทอกซิน บีหนึ่งที่จะสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดก้อนมะเร็งสั้นไป จากที่มีรายงานพบว่าการให้อะฟลาทอกซินบีหนึ่ง ขนาด 1 มก.ต่อกก.น้ำหนักตัวของหนูพันธุ์ Fischer เป็นเวลา 5 วันต่ออาทิตย์รวม 6 อาทิตย์ พบว่า Fischer rats ทั้งหมดเกิด hepatocellular carcinoma ที่ 46 อาทิตย์ (34) และจากการเปรียบเทียบความรุนแรงของ การเกิดก้อนมะเร็งในหนูสายพันธุ์ต่าง ๆ พบว่า หนูขาว (Wistar) เช่นเดียวกับหนูที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ พบว่า AFB1 carcinogenic potency มีขนาด 680 มก.ต่อ กก.น้ำหนักตัว [E.Cardis, C.P.Wild, S Moolgavkar, M, Schwarz and L. Zeise, unpublished data, (34)] ซึ่งมากกว่าปริมาณที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ (250 ไมโครกรัมต่อกก.น้ำหนักตัว)

4. ผลของการได้รับสารสกัดจากตะไคร้หรือหญ้าปักกิ่ง ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความสามารถของ เอนไซม์ในขบวนการเมแทบอลิซึมสารพิษ

4.1 ลดปฏิกิริยาการกระตุ้นความเป็นพิษของสารพิษ

การได้รับสารสกัดจากตะไคร้ขนาด 5 กรัมต่อ กก. น้ำหนักตัวหรือสารสกัดจากหญ้าปักกิ่งขนาด 1.0 กรัมต่อ กก. น้ำหนักตัว เป็นเวลา 30 วัน ทำให้เอนไซม์ที่ต้องการ cytochrome P450 มีความสามารถ ลดลง ซึ่งจะทำให้ลดปฏิกิริยาการกระตุ้นสารพิษบางชนิด การวิจัยครั้งนี้ใช้ aminopyrine demethylase เป็นตัวแทนของเอนไซม์ที่ต้องการ cytochrome P450 2B (51) ซึ่งพบว่าการทำงานของมันลดลงจากการ ได้รับสารสกัด

4.2. เพิ่มการทำงานของเอนไซม์ glutathione-s-transferase (GST)

การได้รับสารสกัดจากตะไคร้หรือหญ้าปักกิ่งที่ขนาดความเข้มข้นต่ำ ๆ เป็นเวลานาน 30 วัน มี แนวโน้มที่จะเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ GST

GST เป็นเอนไซม์ที่ช่วยลดความเป็นพิษของสารแปลกปลอม (52) ดังนั้นการได้รับสารสกัดจากตะไคร้หรือหญ้าปักกิ่งจึงมีแนวโน้มที่จะนำไปลดความเป็นพิษของอะฟลาทอกซินได้ โดยเฉพาะหญ้าปักกิ่ง ที่แสดงแนวโน้มต่อการยับยั้งการเกิดอะฟลาทอกซิน-อัลบูมินแอดคักส์

4.3. ลดการทำงานของเอนไซม์ UDP-glucuronyl transferase (UDP-GT)

การได้รับสารสกัดจากหญ้าปักกิ่งที่ขนาดความเข้มข้นต่ำ ๆ เป็นเวลานาน 30 วัน ลดการทำงานของเอนไซม์ UDP-GT

การศึกษาทางระบาดวิทยาพบว่าการรับประทานพืชผักและผลไม้เพิ่มขึ้น จะช่วยลดอัตราเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็ง เนื่องจากสารเคมีหลายชนิดในพืชผักสามารถยับยั้งขบวนการเกิดมะเร็ง โดยการเพิ่มศักยภาพของเอนไซม์กำจัดความเป็นพิษของสารพิษในร่างกาย (53,54) จึงเกิดการทำลายสารก่อมะเร็งก่อนจะเกิดพิษ หรือยับยั้งการเกิดสารตัวกลางที่ว่องไวในร่างกาย

การวิจัยครั้งนี้พบว่าสารสกัดจากตะไคร้หรือจากหญ้าปักกิ่งมีคุณสมบัติดังนี้

1. ลดความสามารถเอนไซม์ที่ใช้กระตุ้นพิษของสารก่อมะเร็งบางชนิด
2. เพิ่มความสามารถเอนไซม์ที่ใช้กำจัดพิษของสารก่อมะเร็งบางชนิด

อย่างไรก็ตามเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องทั้ง GST, UDP-GT หรือ cytochrome P450 dependent enzymes เป็นเอนไซม์ที่สามารถถูกเหนี่ยวนำได้ และเป็นเอนไซม์ที่มีหลายรูป (isoforms) ซึ่งแต่ละชนิดอาจจะมีคุณสมบัติแตกต่างกันและทำให้เกิดการสนองหรือรับรู้ต่อการเกิดพิษต่างกัน เช่น Cyp450 3A4 และ 1A2 สามารถกระตุ้นอะฟลาทอกซินบีหนึ่งให้แสดงความเป็นพิษมากขึ้นในขณะที่ Cyp450 ชนิดอื่นจะลดพิษอะฟลาทอกซิน (55,56)

สารหลายชนิดจากธรรมชาติมีคุณสมบัติกระตุ้นเอนไซม์ในขบวนการเมแทบอลิซึมสารพิษแบบ Bifunctional inducer ซึ่งกระตุ้นเอนไซม์ทั้ง phase I และ phase II และ Monofunctional inducer ซึ่งกระตุ้นเอนไซม์ phase II มากกว่า ทั้งนี้ monofunctional inducer จะแสดงคุณสมบัติของ cancer chemoprotective activity มากกว่า ตัวอย่างเช่น Oltipraz ซึ่งกำลังเป็นที่สนใจที่จะพัฒนามาใช้ป้องกันมะเร็งในคน (38,39) โดยพบว่าเป็นสารที่สามารถเหนี่ยวนำเอนไซม์ glutathione-S-transferase (GST) ให้ทำงานดีขึ้นในหนูทดลองที่ได้รับสารชนิดนี้

ผลจากการวิจัยนี้ มีแนวโน้มแสดงว่าสารสกัดจากตะไคร้และหญ้าปักกิ่งสามารถเปลี่ยนแปลงเอนไซม์ที่จะใช้ในการลดความเป็นพิษของสารพิษ การวิจัยเพิ่มมากขึ้นจะช่วยขยายข้อมูลคุณสมบัติของสมุนไพรทั้งสองชนิดต่อการทำงานของเอนไซม์ในการกำจัดพิษสมบูรณ์ขึ้น เช่นการวิจัยถึงรูปแบบ isoforms ของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง ตัวอย่างเช่นในการ biotransformation ซึ่งเป็นขบวนการสำคัญที่จะเปลี่ยนแปลงสารพิษเช่นอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง พบว่า Cyp450 ที่มีอยู่หลายชนิดสามารถกระตุ้นอะฟลา

ทอกซิน โดยเอนไซม์แต่ละชนิดมีความสามารถที่จะรวมกับอะฟลาทอกซินแตกต่างกัน เพราะมีค่า K_m ต่าง ๆ กันไปตามชนิดของไอโซฟอร์มของมัน (57) และในขั้นตอน biotransformation นั้นเมื่อเกิดการกระตุ้นอะฟลาทอกซินป็นหนึ่งโดยปฏิกิริยา Cytochrome P450 dependent epoxidation แล้ว กลูตาไธโอน และเอนไซม์ GST จะเป็นตัวที่สามารถเปลี่ยนแปลงปริมาณสารอีพอกไซด์ได้เช่นกันเพราะเอนไซม์ GST สามารถจะนำ (trap) สารอีพอกไซด์ไปรวมกับกลูตาไธโอน เพื่อกำจัดออก (58) ทำให้เกิดการกำจัดพิษของ อะฟลาทอกซินได้

จากรูปที่ 33 จะเห็นว่ากลไกการป้องกันมะเร็งอาจแบ่งได้เป็น 4 กลไกที่สำคัญ (59)

กลไกในการป้องกันขบวนการเกิดมะเร็ง

❖ ANTIMUTAGENESIS

❖ ANTI-OXIDANT ACTIVITY

❖ MODULATION OF DRUG-METABOLIZING ENZYMES

❖ ANTICARCINOGENESIS

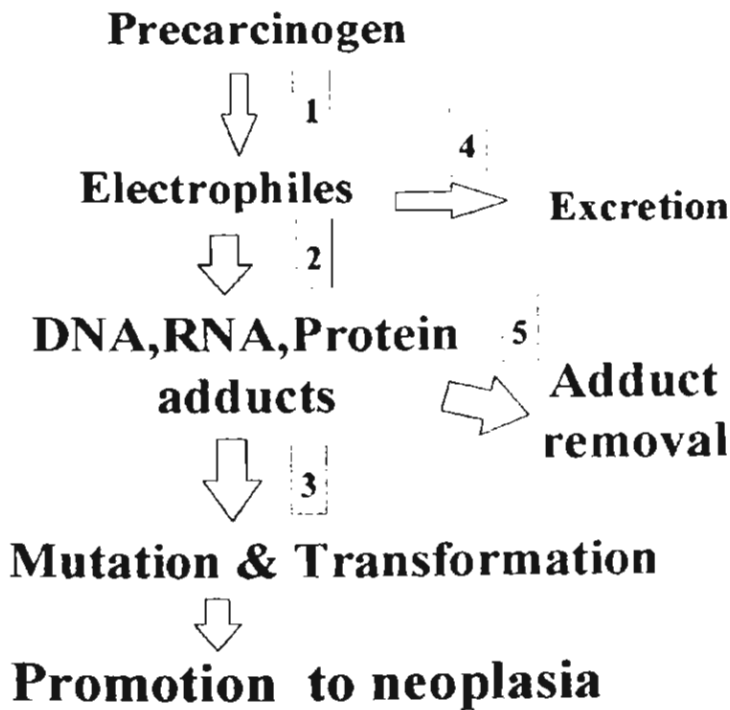
รูปที่ 33 กลไกการป้องกันมะเร็ง

ผลงานวิจัยครั้งนี้ ทำให้ได้ข้อมูลสนับสนุนคุณสมบัติป้องกันขบวนการเกิดมะเร็งของสมุนไพรตะไคร้และหญ้าปากกิ้ง โดยจะเห็นว่าคุณสมบัติการเป็น antimutagens ของสารสกัดจากสมุนไพรทั้งสองเคยมีรายงานมาแล้ว โดยคณะผู้วิจัยนี้ (13,14,15,16) นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับตะไคร้โดยนักวิทยาศาสตร์อื่น ๆ (17,60) และมีรายงานคุณสมบัติการเป็น antioxidant ของสารสกัดทั้งสอง (49,50) คุณสมบัติด้านการเปลี่ยนแปลงเอนไซม์ที่ใช้ในการกำจัดสารพิษ พบจากผลการวิจัยนี้และกลุ่มอื่น ๆ (61) นอกจากนี้ได้มีรายงานเกี่ยวกับสารสำคัญในตะไคร้ที่ยังแสดงคุณสมบัติด้านมะเร็ง ได้แก่ β -myrcene ซึ่งเป็นสารสำคัญชนิดหนึ่งในตะไคร้ พบว่า β -myrcene ไม่ทำให้เกิดการแตกหักของโครโมโซมและไม่ก่อให้เกิด sister chromatid exchange (62) นอกจากนี้ยังไม่เพิ่ม mutation frequencies ที่ hprt-locus ใน V-79 cell ที่เหนี่ยวนำด้วย cyclophosphamide แต่ไม่สามารถลดการเกิด sister chromatid exchange ถ้าใช้ EMS หรือ Benzo (a) pyrene เป็นตัวเหนี่ยวนำ (63) Geranial สารสำคัญในตะไคร้ยับยั้งการเกิด EBV virus ใน Hela-cell ที่เหนี่ยวนำด้วยสาร tumor promotor คือ teleocidin (64) และ Citral สารเคมีซึ่งมีมากที่สุดในตะไคร้ประมาณ 80 % ในตะไคร้สามารถป้องกันการเกิด ACF ได้ในหนูขาวที่ได้รับเอโซซีมีเทน (65)

ประเภทของสารป้องกันหรือลดการเกิดมะเร็ง สามารถแบ่งได้เป็น

1. สารยับยั้งการเกิดสารก่อมะเร็ง เช่น สารที่ทำหน้าที่ป้องกันการเกิด nitrosamines จากการที่ secondary amines ทำปฏิกิริยากับ nitrite ในสถานะเป็นกรดในกระเพาะอาหาร ได้แก่ วิตามินซี สารพวก phenol เช่น caffeic acid และ ferulic acid สามารถยับยั้งการเกิด nitrosamine โดยสามารถทำปฏิกิริยากับ nitrite เพื่อ form เป็น non-mutagen nitrosamines
2. Blocking agent คือสารที่ยับยั้งการเกิดมะเร็งในขั้นเริ่มแรก ตัวอย่างเช่น benzylisothio cyanate, และ sulforaphane โดยกลไกที่เป็นไปได้คือสามารถเหนี่ยวนำเอนไซม์ glutathione-S-transferase ซึ่งเป็นเอนไซม์ ที่ใช้ในการกำจัดสารพิษ
3. Suppressing agents คือสารที่ยับยั้งการเกิดมะเร็งในขั้นส่งเสริมและขั้นก้าวหน้า ตัวอย่างเช่น epigallocatechin gallate (EGCG) ซึ่งเป็นส่วนประกอบในชาเขียว

ทฤษฎีการเกิดมะเร็งจากสารเคมี



รูปที่ 34 การเกิดมะเร็งจากสารเคมี

การเกิดโรคมะเร็งจากสารเคมีอธิบายได้โดยทฤษฎีหลายขั้นตอน (multistep process) ซึ่งประกอบด้วย

ขั้นเริ่มแรก (initiation stage) เริ่มจากสารก่อมะเร็งถูกกระตุ้นด้วยเอนไซม์ในระบบเมแทบอลิซึมจนเกิดสารว่องไวที่มีคุณสมบัติเป็น electrophile ไปก่อให้เกิดความผิดปกติในโครงสร้างของจีน เช่น ทำให้เกิด DNA-adduct ซึ่งส่งผลทำให้เซลล์ปกติกลายเป็นเซลล์ผิดปกติ (initiated cell)

ขั้นส่งเสริม (promotion stage) เกิดมีการเพิ่มจำนวนเซลล์ผิดปกติจนเปลี่ยนแปลง

ไปเป็นเซลล์มะเร็งและขั้นก้าวหน้า (progression) เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงทางด้าน genetic และ biological ร่วมกับการเกิดเป็นมะเร็งที่มีการแพร่กระจายของโรค

จากกลไกการเกิดมะเร็งจากสารเคมีที่แสดงจะเห็นว่าสมุนไพรรักษาโรคมะเร็งหรือเห็ดพิษอาจออกฤทธิ์ได้ตามขั้นตอนต่าง ๆ ดังแสดง เช่น

1. อาจเกี่ยวกับเอนไซม์ที่ใช้กระตุ้นหรือลดความเป็นพิษของสารที่ตับ ซึ่งเมื่อพิจารณาจะเห็นว่าตับเป็นเสมือนศูนย์กลางที่จะเปลี่ยนแปลงสารพิษต่าง ๆ ผลการทดลองที่ได้จึงสามารถบอกคุณประโยชน์ของตะไคร้และเห็ดพิษต่อการการทำงานของเอนไซม์ที่ตับอย่างไรก็ดี ควรจะต้องมีการทดลองเพิ่มเติมเกี่ยวกับผลต่อการทำงานของเอนไซม์เหล่านี้ที่เซลล์ลำไส้ด้วย เพราะเมแทบอลิซึมของสารพิษที่ลำไส้ก็เป็นอีกขั้นตอนหนึ่งที่จะกำหนดความเป็นพิษทั้งหมดของสารพิษต่อร่างกายเช่นกัน
2. ยับยั้งหรือเปลี่ยนแปลงความสามารถที่จะไปรวมกับสารชีวโมเลกุล ซึ่งผลการทดลองครั้งนี้วัดในรูปการรวมตัวกับอัลบูมิน สำหรับกลไกการยับยั้งขั้นตอนอื่น ๆ ยังไม่สามารถสรุปจากการศึกษาครั้งนี้...☸

เอกสารอ้างอิง

1. IARC Technical Report No. 16, Cancer in Thailand 1988-1991
2. Essigmann JM, Croy RG, Nodzan AM, Busby WF, Jr, Reinhold VN, Buchi G and Wogan GN (1977) Structural identification of the major DNA adduct formed by aflatoxin B-1 in vitro. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 74, 1870-1874
3. Skipper PL., and Tannenbaum SR (1990) Protein adduct in the molecular dosimetry of chemical carcinogens. Carcinogenesis, 11, 507-518.
4. Groopman JD, Sabbioni G and Wild CP (1991) Molecular dosimetry of aflatoxin exposures of human cancer: Epidemiological, Analytical and Social Consideration (JD Groopman and P H skipper, Eds), CRC Press, Boca Raton, FL, p302-324
5. Groopman JD., and Kensler TW. (1993) Molecular biomarkers for human chemical carcinogen exposure. Chem.Res. Tpxicol. 6, 764-770.
6. Sabbioni G, Skipper P, Buchi G and Tannenbaum SR (1987) Isolation and characterization of the major serum albumin adduct formed by aflatoxin B₁ in vivo in rats. Carcinogenesis, 8, 819-824
7. Wild CP, Jiang YZ, Sabbioni G, Chapot B and Montesano R (1990) Evaluation of methods for quantitation of aflatoxin-albumin adducts and their application to human exposure assessment. Cancer. Res. 50, 245-251

8. Choy WN. (1993) A review of the dose-response induction of DNA adducts by aflatoxin B1 and its implication to quantitative cancer-risk assessment. *Muta.Res.* 296, 181-198
9. Wild CP., Shrestha SM., Anwar WA and Montesano R (1992) Field studies of aflatoxin exposure, metabolism and induction of genetic alterations in relation to HBV infection and hepatocellular carcinoma in The Gambia and Thailand. *Toxicol. Lett.* 64/65, 455 – 461
10. Boone, CW., Kellof GJ., and Malone WE (1990) Identification of candidate cancer chemopreventive agents and their evaluation in animal models and human clinical trials: a review. *Cancer. Res.*, 50, 2 – 9
11. Groopman J D., Wild C P., et al, (1993) Molecular epidemiology of aflatoxin exposures: Validation of aflatoxin-N7-guanine levels in urine as a biomarker in experimental rat models and humans. *Environ. Hlt. Perspect.* 99, 107 - 113
12. Wild C.P, R.C. Garner, R. Montesano, F. Tursi (1986) Aflatoxin B1 binding to plasma albumin and liver DNA upon chronic administration to rats. *Carcinogenesis.* 7, 853-858
13. Vinitketkumnuen U., R. Puatanachokchai, P. Kongtawelert, N. Lertprasertsuke, T. Matsushima. Antimutagenicity of lemon grass (*Cymbopogon citratus* Stapf) to various known mutagens in Salmonella mutation assay, *Mutat Res.* 341 (1994) 71-75.
14. Vinitketkumnuen U., W. Charoenkunathum, P. Kongtawelert, N. Lertprasertsuke, P. Picha, T. Matsushima, DT-diaphorase inducer activity of antimutagenic Thai medicinal plant, *Murdannia loriformis*, *J.Herbs & Spices and Medicinal Plants.* 4:1(1996), 45-52.
15. น.ส.นัฏกา ลอมศรี (1993) Partial Purification of Antimutagenic Substances from Lemon grass (*Cymbopogon citratus* Stapf) and Their Possible Mechanism of Inhibition. Master Thesis, Faculty of Medicine, Chiang Mai University.
16. อุษณีย์ วจินเขตตานวน, ชีอาทิ ขามาภูชิ, ชีเอะ พุริฮาดะและไทจิโร มัตสึชิม่า (2534) สารยับยั้งสารก่อมะเร็งจากตะไคร้ การประชุมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 17 มหาวิทยาลัยขอนแก่น หน้า 620 - 621
17. Mevatee, U., S., Boontim, Keereeta, O., Vinitke.kumnuen, U., and Nabhaporn (1993) Antimutagenicity of lemon grass. in S Boot-in (Ed) *Man and environment.* Chiang Mai Press, p 436
18. กนกกาญจน์ ปิ่นแสง (2536) การต้านการเกิดไมโครนิวเคลียสในหนูของสารสกัดจากตะไคร้ วิทยานิพนธ์ปริญญาโท คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

19. น.ส.รวีวรรณ พัวฒนาโชคชัย (2536) Antimutagenicity, Cytotoxicity and Antitumor Activity from Lemon Grass (*Cymbopogon citratus*) งานวิทยานิพนธ์เพื่อปริญญาโท ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
20. นางวิริยา เจริญคุณธรรม (2537) Antimutagenicity and Induction of DT-Diaphorase by Hassk (*Murdannia loriiformis*) Extract งานวิทยานิพนธ์เพื่อปริญญาโทภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
21. อุษณีย์ วินิจเขตคำนวน (2539) การแยกและคุณลักษณะของสารยับยั้งการกลายจากตะไคร้ รายงานฉบับสมบูรณ์เสนอสภาวิจัยแห่งชาติ
22. นิจศิริ เรืองรังษี (2534) ตะไคร้ เครื่องเทศ โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หน้า 39 – 40
23. โครงการศึกษาวิจัยสมุนไพร ตะไคร้ สมุนไพรอันดับที่ 02 พิมพ์ครั้งที่ 1 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หน้า 57 - 59, 2532
24. ศูนย์ข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ตะไคร้ ก้าวไปกับสมุนไพร เล่ม 1 ธรรมการพิมพ์ หน้า 127 - 130, 2532
25. Medicinal Plants in Siriruckhachati Garden, Faculty of Pharmacology, Mahidol University 2532 – 2534
26. Chapot B and Wild CP (1991) ELISA for quantification of aflatoxin-albumin adducts and their application to human exposure assessment. In. Techniques in Diagnostic Pathology. Vol. 2 (M.Van Warhol, D.Velzen, and GR Bullock, Eds) Academic Press, New York, p 139-155
27. Bird Rp. (1987) Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen : preliminary finding. Cancer. Lett, 37, 147-151.
28. Beranek D T, *et al* (1980) A comprehensive quantitative analysis of methylated and ethylated DNA using high pressure liquid chromatography. Carcinogenesis 1: 595-606
29. Omura, T., and Sato, R. (1964) The carbonmonoxide-binding pigment of liver microsomes solubilization, purification, and properties J. Biol. Chem 239, 2379-2385
30. Nash T (1953) The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. Biochem.J. 55, 416-421
31. Habig, W.H., Pabst, M. J., and Takoby, W.B. (1974) Glutathione-S-transferase, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. J. Biol. Chem. 249, 7130-7139
32. Ernster, L. (1967) DT-diaphorase. method in enzymology 10, 309-317
33. Burchell, B., and Weatherill, P. (1981) Rat liver glucuronyltransferase. Methods in enzymology 77; 169-170

34. Wild CP, Hasegawa R, Barraud L, Chutimataewin S, Chapot B, Ito N, and Montesano R. (1996) Aflatoxin-albumin adducts: A basis for comparative carcinogenesis between animals and humans. *Cancer. Epi.Biomarker & Prev.* 5, 179-189
35. P.A.Egner, S.J. Gange, M.P. Dolan, J.D. Groopman, A. Munoz, T.W. Kensler (1995) Levels of aflatoxin-albumin adduct biomarkers in rat plasma are modulated by both long-term and transient interventions with oltipraz, *Carcinogenesis* 16,1769 - 1773
36. Aguilar F, Pervez Hussain S, and Cerutti P (1993) Aflatoxin B1 induces the transversion of G → T in codon 249 of the p53 tumor suppressor gene in human hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 8586-8580.
37. M.U.K. Mgbodile, M. Holscher, R.N. Neal (1975) A possible protective role for reduced glutathione in aflatoxin B1 toxicity : Effect of pretreatment of rats with phenobarbital and 3-methylcholanthrene on aflatoxin toxicity, *Toxico.Applied. Pharma.* 34, 128-142
38. T.W. Kensler, J.D. Groopman, D.L. Eaton, T.J. Curphey, B.D. Roebuck (1992) Potent inhibition of aflatoxin-induced hepatic tumorigenesis by the monofunctional enzyme inducer 1,2-dithiole-3-thione, *Carcinogenesis.* 13:1, 95-100
39. Egner PA., Primiano TP., Dolan PM., Kensler TW., and Roebuck BD. (1995) Effect of dose scheduling of oltipraz on enzyme induction and inhibition of aflatoxin-induced tumorigenesis in rat liver. *Proc.Am.Assoc.Cancer.Res.* 36, 585
40. Sohn OS, *et al* (1991)Metabolism of azoxymethane, methylaoxymethanol and nitroso dimethylamine by cytochrome P450 IIE1. *Carcinogenesis.* 12(1), 127-131
41. Beaker RA., Barrows LR., and Shank RC. (1981) Methylation of liver DNA guanine in hydrazine hepatotoxicity : dose-response and kinetic characteristic of N⁷-methylguanine and O⁶-methylguanine formation and persistence in rats. *Carcinogenesis.* 2(11), 1181
42. Fiala E S. (1977) Investigations into metabolism and mode of action of the colon carcinogens 1,2-demethylhydrazine and azoxymethane. *Cancer.* 40 : 2436-2445
43. Carderni G., Giannini A., Lancioni L., Luce.i C., Bigeri A., and Dolara A (1995) Characterization of aberrant crypts foci in carcinogen-treated rats : association with intestinal carcinogenesis. *Br.J. Cancer.* 71, 763-769.
44. Rao,C.V., *et al* (1993) Chemopreventive effect of oltipraz during different stages on experimental colon carcinogenesis induced by azoxymethane in male F344 rats. *Cancer. Res.* 53: 2502-2506

45. Mcleelan EA., and Bird RP. (1991) Effect of disulfiram on 1,2-dimethylhydrazine and azoxymethane-induced aberrant crypts foci. *Carcinogenesis*. 12, 967-972.
46. Zhang XM (1992) Promotion of aberrant crypts foci and cancer of the rat colon by thermolysed protein. *JNCI*. 84, 1026-1050
47. McLellan E A, and Bird R P. (1988) Specificity study to evaluate induction of aberrant crypts in murine colons. *Cancer. Res.* 48 : 6183-6186
48. Pereira M A, *et al* (1994) Use of Azoxymethane-induced foci of aberrant crypts in rat colon to identified potential cancer chemopreventive agents. *Carcinogenesis* 15(5) : 1049-1054
49. R. Suaeyun, T. Kinouchi, T. Arimochi, U. Vinitketkumnuen, Y.Ohnishi, Inhibitory effects of lemon grass on formation of azoxymethane-induced DNA adducts and aberrant crypt foci in the rat colon, *Carcinogenesis* 18:5 (1997), 949-955.
50. Y. Intiyot, Effects of *Murdannia loriformis* Extract on Azoxymethane- induced DNA-Adducts and Aberrant Crypt Foci in Rat Colons. Master Thesis, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand. 1998
51. Kore AM., Jeffery EH., and Wallig MA. (1993) Effects of 1-isothiocyanato-3-(methylsulfinyl)-propane on xenobiotic metabolizing enzymes in rats. *Fd.Chem.Toxi.* 31(10), 723-729
52. Wilce , C J, and Parker MW (1994) Structure and function of glutathione-S-transferase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1205,1-18
53. Margaret, M., et al (1997) Mechanism of action of dietary chemoprotective agents in rat liver : induction of phase I and phase II drug metabolizing enzymes and aflatoxin B1 metabolism. *Carcinogenesis* 18: 1729-1738
54. Yang CH, Smith TJ and Hong JY (1994) Cytochrome P450 enzymes as targets for chemoprevention against chemical carcinogens and toxicity : Opportunities and limitation. *Cancer.Res.* (Suppl) 54: 1982s-1986s
55. Forrester LM, Neal GE, Judah FJ, Glancey MJ and Wolf CR (1990) Evidence for involvement of multiple forms of cytochrome P450 in aflatoxin B1 metabolism in human liver. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA.* 87, 8306-8310
56. Guengerich FP. (1992) Characterization of human cytochrome P450 enzymes. *The FASEB J*, 6: 754
57. Ramsdell HS and Eaton DL (1990) Species susceptibility to aflatoxin B1 carcinogenesis: Comparative kinetics of microsomal biotransformation. *Cancer.Res.* 50, 615-620

58. Raney KD, Meyer DJ, Ketterer B, Harris TM and Guengerich FP (1992) Glutathione conjugation of aflatoxin B1 exo-and endo-epoxides by rat and human glutathione-S-Transferase. *Chem.Res.Toxic.* 5, 470-478
59. Ramel, C, Alekprrov, UK, Ames, BN, Kada, T and Wattenberg, LW (1986) Inhibitor of mutagenesis and their relevance to carcinogenesis. *Mutation Res.*, 168: 47-65
60. Lym Sylinco CY, Jocano AP and Lim CM (1988) Antimutagenicity of twenty Phillipine plants using the micronucleus test in mice. *Phillipine Journal Science*, 117(3), 231-235
61. Luke, K.T and Boling, Z (1991) Effects of essential oils on glutathione-S-transferase activity in mice. *J Agric Food Chem*, 39, 660-662
62. Lorenzetti, BB, Souza, GEP, Saiti, SJ, Filho, DS and Ferreira, SM (1991) Myrcene mimics the peripheral analgesic activity of lemongrass tea. *J. of Ethnopharmacology.* 34: 43-48
63. Kauderer B, Zamith H, Paumgarten FJR and Sprit G (1991) Evaluation of the mutagenicity of myrcene in mammalian cells in vitro. *Environ. Mol. Mutagenesis*, 18: 28-34
64. Murakami A, *et al.* (1993) Possible anti-tumor promoting properties of edible plants from Thailand and identification of an active constituents, cardamonin of *Boesenbergia pandurata*. *Biosci Biotech Biochem.* 57(11), 1971-1973
65. Ohnishi Y, Kataoka K, Kinouchi T, Arimochi H, Yoshida R, Kuwahara T, Suaeyun R, Chewonarin T, Intiyot Y, and Vinitketkumnuen V (1998) Inhibitory effects of medicinal plants and their components on bacterial mutagenesis and the initiation stage of colon carcinogenesis. *Proceeding of the 17th International Cancer Congress, Rio de Janerio, Brazil.* P275-279

บทที่ 5

Output ที่ได้

Publications:

1. U. Vinitketkumnuen, T. Chewonarin, N. Lertprasertsuk, P. Dhumtanom and C P. Wild (1999) Aflatoxin-Albumin Adduct formation in Aflatoxin B1-Exposed Rats are Modulated by Thai Medicinal Plants. (Accepted by Mutation Research)
2. U. Vinitketkumnuen, R. Suaeyun, Y. Intiyot, T. Kataoka and Y. Ohnishi (1999) Possible inhibitory mechanisms of Thai medicinal plants to protect experimental colon carcinogenesis (in preparation for The International Proceeding of the first Thai-Japan Cancer Research Symposium)
3. R. Suaeyun, T. Kinouchi, T. Arimochi, U. Vinitketkumnuen, Y. Ohnishi, (1997) Inhibitory effects of lemon grass on formation of azoxymethane-induced DNA adducts and aberrant crypt foci in the rat colon, Carcinogenesis 18:5, 949-955
4. ชีระ ชีวรินทร์, อุษณีย์ วณิชเขตค่านวน และ Christopher P Wild (2541) ผลของสารสกัดจากตะไคร้และหญ้าปักกิ่งต่อระดับอะฟลาทอกซิน-อัลบูมินแอคคัลส์ในหนูขาวที่ได้รับอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง เชียงใหม่เวชสาร 32 (1-2), 11-17
5. อุษณีย์ วณิชเขตค่านวน (2541) สมุนไพรไทยกับการป้องกันมะเร็ง ใน คู่มือความรู้เรื่องโรคมะเร็งและการป้องกัน โครงการเผยแพร่ความรู้ด้านสุขภาพแก่ประชาชน ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ หน้า 45-50
6. อุษณีย์ วณิชเขตค่านวน (2540) เคมีป้องกันมะเร็งในอาหาร ในหนังสือพิษวิทยา'39 ความปลอดภัยของอาหารกับสุขภาพ สมาคมพิษวิทยาแห่งประเทศไทย หน้า 60-68
7. อุษณีย์ วณิชเขตค่านวน (2540) ความเป็นไปได้ในการนำตะไคร้ไปป้องกันโรคมะเร็ง จุลสารชมรมพันธุพิษแห่งประเทศไทย ฉบับที่ 6 หน้า 6 - 8. ISSN 0859-1032
8. อุษณีย์ วณิชเขตค่านวน (2538) ฤทธิ์ด้านการกลายและฤทธิ์ด้านการเกิดมะเร็งในสมุนไพร ใน หนังสือพิษวิทยา'38 สารพิษในยุคโลกาภิวัตน์ สมาคมพิษวิทยาแห่งประเทศไทย หน้า 66-72

Presentation & Abstracts

1. Vinitketkumnuen U, Chewonarin T, Lerprasertsuk N and Wild C P. Aflatoxin-albumin adduct formation in aflatoxin B₁ exposure rats are modulated by thai medicinal plants. The 3rd Internatinal Conference on Environmental Mutagens in Human Populations, Bangkok-Khao Yai, Thailand, 29 Nov- 4 Dec, 1998. p 83 (oral presentation)
2. U. Vinitketkumnuen, R. Suaeyun, Y. Intiyot, T. Kataoka and Y. Ohnishi. Possible inhibitory mechanisms of Thai medicinal plants to protect experimental colon carcinogenesis. Symposium in "Colon Cancer" the 1st Thai Japan Cancer Research Symposium, Chiang Mai University, 5-6 Nov, 1998
3. Intiyot Y, Vinitketkumnuen U, Kinouchi T and Ohnishi Y (1998) Effect of *Murdannia loriformis* Extract on Xenobiotic Metabolizing Enzyme Induction and AOM-induced Colon Cancer in Rat. The Annual Health Sciences Meeting. Research Institute for Health Sciences. Chiang Mai University. Thailand. p 84 (poster presentation)
4. U Vinitketkumnuen, R Suaeyun, R Puatanachokchai, and N Lertprasertsuk . Effects of lemongrass extract on cytochrome P450 content and phase II enzymes in liver of Wistar rats. the 5th International Conference on Mechanism of Antimutagenesis and Anticarcinogenesis, Dec 2-6, 1996, Okayama, Japan. P53 (Oral presentation)
5. เขาวเรศ อินทียศ, Takemi Kinouchi, อุษณีย์ วณิชเขตค่านวน, Yoshinari Ohnishi. ผลของสารสกัดหญ้าปักกิ่งต่อการเกิด DNA adduct และ aberrant crypt foci ในลำไส้ใหญ่ของหนูขาว เชียงใหม่ เวชสาร (ฉบับที่ 3, เสริม) บทคัดย่อการประชุมวิชาการมหิดล ครั้งที่ 21, 21 กันยายน 2540 หน้า 3
6. อุษณีย์ วณิชเขตค่านวน, นิรัชร์ เลิศประเสริฐสุข, รัชดา เสือยงค์, ชีระ ชีโวรินทร์, เขาวเรศ อินทียศ, Takemi Kinouchi และ Yoshinari Ohnishi. กลไกในการป้องกันการเกิดมะเร็งจากสารเคมีของสมุนไพรไทย การประชุมวิชาการโรคมะเร็งแห่งชาติ ครั้งที่ 4, 11-13 พฤศจิกายน 2540, กรุงเทพฯ หน้า O-3

วิทยานิพนธ์ปริญญาโท (ใช้ผลการทดลองที่ได้จากโครงการวิจัย เป็นสมมติฐานของงานวิทยานิพนธ์) สมสกุล ธรรมวิจิตร (2542) ผลของสารสกัดจากตะไคร้และสารสำคัญต่อเอนไซม์ที่ใช้เมแทบอลิซึมสารพิษจากตับและลำไส้ของหนูขาว

จิตา ดันติวัฒน์ (2542) Effects of exposure to partial purified fraction from lemongrass on glutathione – S-transferase polymorphism and glutathione levels in rats liver and intestine

Aflatoxin-albumin adduct formation in aflatoxin B₁-exposed rats are modulated by Thai medicinal plants

Usanee Vinitketkumnuen^a, Teera Chewonarin^a, Pongsathorn Dhumthanorn^a, Nirush Lertprasertsuk^b, and Christopher P. Wild^c

^aDepartment of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, ^bDepartment of Pathology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand.

^cMolecular Epidemiology Unit, Research School of Medicine, Algernon Firth Building, University of Leeds, LS2 9JT, U.K.

Key Words: aflatoxin exposure, AF-albumin adduct, *Murdannia loriformis*

Abbreviation: AFB₁ = Aflatoxin B₁, AF-albumin = aflatoxin B₁-albumin

Correspondence to Usanee Vinitketkumnuen, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand.

Fax : 66-053-217144, **e-mail :** uvinitke@sd01.med.cmu.ac.th

Acknowledgment : This work was supported by the Thailand Research Fund, BR03/2538

Abstract

The objective of this study was to conduct an assessment of the ability of two Thai medicinal plants, *Cymbopogon citratus* Stapf and *Murdannia loriformis*, to modulate levels of a validated biomarker of aflatoxin exposure by determining levels of aflatoxin-albumin (AF-albumin) adducts in sera. The influence of two plant extracts on AF-albumin adduct formation after a single exposure to aflatoxin B1 (AFB1) was measured over a 48 hr period after Wistar rats were exposed to AFB1 at 250 µg/kg.body weight. Rats received *Murdannia* extract at 3 g/kg. body weight one week before the administration of AFB1. This continued over a 48 hr period and resulted in an acceleration of AF-albumin adduct formation. Maximum levels of the adducts in rats received *Murdannia loriformis* extract were observed at 4 hr, while the maximum levels of adducts in the group that received vehicle controls, instead of the plant extract, appeared at 12 hr after AFB1-exposure. Daily treatment of rats with AFB1 at 250 µg/kg. body weight for 3 weeks caused AF-albumin adduct levels in rat sera to rise and reach levels that were 4.4 fold higher than observed after the first dose of AFB1. This occurred only 2 weeks after the first administration. When treatment with *Murdannia* extract began one week before AFB1 exposure, and continued throughout the period of AFB1 exposure, a decrease in the adduct levels was observed in the first two weeks of the intervention. After that, however, the diminuation in adduct levels was not significant. By contrast, a statistically significant decrease in the biomarker levels was not seen with the *Cymbopogon citratus* extract treatments.

1. Introduction

Cymbopogon citratus Stapf and *Murdannia loriformis* (Hassk.) Rolla Rao et Kammathy, are medicinal plants commonly used in traditional drugs and in cooking by Thai people [1]. An extract of these plants has been shown to have antimutagenic and anticarcinogenic properties and was capable of increasing DT-diaphorase, an anticarcinogenic enzyme, in the hepatoma cell line [2,3]. Talalay [4] reported that an elevation of the anticarcinogenic enzyme involved in the detoxification of carcinogens could be used as a predictor of the cancer chemopreventive activity of a test compound. Initial confirmation that *Cymbopogon citratus* and *Murdannia loriformis* exert chemopreventive effects, came from evidence that the plants reduced aberrant crypt foci and DNA-adduct formations in rat exposed to azoxymethane [5,6]. Studies on the effect of these plant extracts on AFB1-induced

liver tumorigenesis in an animal model are now on going.

The primary objective of this study was to conduct a preliminary assessment of ability of an 80% alcoholic extract of *Cymbopogon citratus* or *Murdannia loriformis* to modulate the formation of AF-albumin adducts in rat sera after the rats were exposed to AFB1 in either single or multiple doses. Alterations in metabolic activity may be responsible for the associated decrease in the carcinogenicity of chemicals. Albumin is the predominant blood protein that is alkylated after AFB1 exposure [7,8]. It is now well established that using AF-albumin adduct as a biomarker for a biologically effective dose of AFB1 exposure can be used to assess the efficacy of any promising chemopreventive agents.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

AFB1-ovalbumin, AFB1-lysine adduct, anti-AFB1 antibody and goat anti-rabbit IgG peroxidase-labelled antibody were used as described previously [9], and were obtained from the Unit of Environmental Carcinogenesis, IARC, Lyon, France. Proteinase K, glucose-6-phosphate, AFB1 (A6636, Lot 38F4061) and ovalbumin were purchased from Sigma Chemical, St. Louis, USA. Sep-pak C18 cartridges were from Waters, Milford, USA. *Cymbopogon citratus* Stapf was purchased from a local market in Chiang Mai, and *Murdannia loriformis* (Hassk.) was obtained from an in-house garden in Chiang Mai, Thailand. All other chemicals and reagents were of the highest quality that could be obtained commercially.

2.2. Preparation of plant extracts

Whole fresh plants were washed with tap water, sliced into small pieces, freeze-dried and blended to a fine powder. One hundred grams of the plant powder was extracted for 24 hr by stirring in 1 liter of 80% ethanol at room temperature. The extract was filtered by suction and the filtrate was evaporated to dryness in a rotatory evaporator (45 °C). The residue was dissolved in 25 % dimethylsulfoxide.

2.3. *Animals and Treatment.*

Male Wistar rats with an average body weight of 70 g were obtained from the National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Bangkok, Thailand. The rats were housed at a controlled temperature of 26 °C (± 1) and a 12 hr light : 12 hr dark photoperiod. The rats were housed in groups of three in stainless-steel cages with wire-screen bottom and front. Animals were acclimated to a standard laboratory chow diet (Charoen-pokphand Animal Feed, Co, Ltd., Bangkok, Thailand) for 1 week before beginning the experiment. Diet and water were available *ad libitum*.

2.4. *Effect of Thai medicinal plants extract on AF-albumin adduct formation after single dose of AFB1*

The experimental designs to evaluate the modulating effects of the plants on levels of AF-albumin adducts after a single dose of AFB1 exposure were as follows. Male Wistar rats were divided into seven groups. The first, the fourth, and the seventh groups of rats received 25% Dimethylsulfoxide (25%DMSO), the second and the third groups received *Murdannia loriformis* extract at 3 g / kg/bw, the fifth and the sixth groups received *Cymbopogon citratus* extract at 5 g/kg.bw. Rats were fed test materials by gavage in the morning. After 1 week, all rats were gavaged with 250 μ g/ kg.bw of AFB1. The first, the third and the sixth groups continued to receive 25% DMSO, the second and the fourth groups continued to receive the *Murdannia loriformis* extract and the fifth and the seventh groups continued to receive the *Cymbopogon citratus* extract. All treatments were continued for 48 hr. Three rats from each group were sacrificed at 4, 12, 24 and 48 hrs after AFB1 treatment. Rat sera were obtained and AF-albumin adduct levels were analyzed.

2.5. *Effect of Murdannia loriformis on AF-albumin adduct formation after multiple doses of AFB1*

After 1 wk of eating the laboratory chow diet, rats were randomly divided into three groups. The first group received 25% DMSO, the second and the third groups received *Murdannia loriformis* extract at 3 g/kg.bw. Rats were fed every morning over a 4-week

period. After the first week, all rats in the first and the second groups were gavaged 2 hrs after receiving DMSO, or the plant extract with 250 µg/kg.bw of AFB₁ in DMSO. This occurred for 5 days a week for the next three weeks (Day 1-5, 8-12, and 15-19). The third group received the plant extract for a total of 4 consecutive weeks. Each day three rats from each group were sacrificed 4 hr after AFB₁ feeding. Blood was drawn from a portal vein, and rat serum was obtained. The sera were kept at -80 °C until analysis for AF-albumin adduct levels.

2.6. Analysis of AF-albumin adduct formation in rat sera.

The levels of AF-albumin adducts were determined in sera albumin after extraction and hydrolysis with proteinase K. The *AF-albumin* adduct was measured in the form of AFB₁-lysine by competitive ELISA as described previously [9]. Maxisorp plates (Nunc. Immunoplate) were coated with 2.5 ng of AFB₁-ovalbumin conjugate in PBS by drying overnight at 37 °C. The coated plate was washed 6 times by PBS-Tween 20. One hundred microlitre of 0.1% ovalbumin was added to each well and the plate was incubated at room temperature for 60 min in the dark. 25 µl of sample was added to each well and quantitated relative to a standard AFB₁-lysine inhibition curve, along with controls (0% inhibition) and blanks. Diluted anti-AFB₁ antibody 25 µl was added to each well and the plates were incubated at room temperature in the dark for 90 min on an ELISA plate shaker. The plates were washed six times with PBS-Tween 20. After washing, 50 µl of goat anti-rabbit IgG enzyme conjugate was added to each well. The plates were incubated at room temperature in the dark for 90 min. Plates were then washed six times with PBS-Tween 20, followed by one wash with demineralized water and dried. TMB peroxidase substrate (3,3',5,5'-tetramethyl benzidine) solution 50 µl was added into each well. The reaction was terminated by the addition of 50 µl 1M HCl and the absorbance was read at 450 nm. The percentage of inhibition for the samples was calculated and compared with a standard inhibition curve for AFB₁-lysine adduct expressed as ng/mg albumin. Each sample was assayed in quadruplicate.

2.7. Smoothing of raw data.

Because the variability of the measurement appeared to be associated with the mean

level, we have used a polynomial fit to smooth the data to capture the general trends that are exhibited by the raw data. A natural logarithmic transformation was used on AF-albumin adduct levels. Curves were fitted to the logs of the adduct levels as smooth regression functions of the time by the formula,

$$\log(\text{AF-albumin-adduct}) = \beta t + \gamma t^{1/2} + \alpha$$

Where β and γ are linear regression coefficients on the times of observation (t) in days and α is a constant.

3. Results

Aflatoxin-albumin adducts were found in peripheral blood samples after AFB1 exposure. Significant levels of AF-albumin adducts were observed within 1 hr following a 250 $\mu\text{g/kg}$ body weight (p.o) dosing with an average of 2.02 ng/mg albumin and reached maximum levels at 12 hr. It then dropped to the same 1 hr level within 24 hr of dosing and persisted at this amount for 48 hr (Data not shown). Administration of *Murdannia loriformis* extract before AFB1 exposure (group 2 and 3) resulted in more rapid of adduct formation. Maximum levels of the adduct were observed at 4 hr after AFB1 treatment in groups of rats that received *Murdannia loriformis* extracts (Table 1). The maximal levels of AF-albumin adduct was significantly higher in rats that received *Murdannia loriformis* extracts before AFB1 exposure ($p < 0.05$). Twelve hours after AFB1 exposure, the levels of adducts in rats that received the plant extracts were lower than rats that received AFB1 alone ($p < 0.05$). There was no significant alteration in the AF-albumin adducts formation in the groups of rats that received *Cymbopogon citratus* extract.

Daily treatment of rats with AFB1 at 250 $\mu\text{g/kg}$.body weight for 3 weeks caused AF-albumin adducts level in sera to rise and reached levels that were 4.4 fold higher than observed after the first dose of AFB1 exposure. 4-5 days after AFB1 exposure was discontinued, the levels of the adducts in sera dropped rapidly and approached the same amount as observed after the first dosing. The results from fitting the raw data over time with a smoothing function are shown in Figure 1. Development of these smooth curves allows an observation of the modulation of AF-albumin adducts formation by *Murdannia loriformis*. After multiple dosing of 250 $\mu\text{g/kg}$.body weight AFB1, a reduction of AF-albumin adduct formation was observed only during the first two weeks (Figure 1a). Treatment with *Murdannia loriformis* extract 1

week before AFB1 exposure and continued treatment throughout the AFB1 exposure period had a tendency to decrease the adducts level during the first two week. Chronic administration of AFB1, however, lead to a decline in the protective efficacy of *Murdannia loriformis*. A statistically significant decrease in AF-albumin adduct levels was not seen in the *Cymbopogon citratus* treated rats (Figure 1b).

4. Discussion

The validation of aflatoxin-albumin adducts as biomarker for monitoring AFB1 exposure allows assessment of whether or not levels of this biomarker can be modulated in experimental models. From this perspective, the modulating effect of Thai medicinal plant extract on the formation of aflatoxin-albumin adducts has been evaluated in rats either exposed one time or chronically to AFB1.

The results presented here indicated that continued intake of *Murdannia loriformis* modulated the rates of AF-albumin adduct formation after a single exposure to AFB1. With a single exposure of AFB1, the maximum adduct level appeared to occur more rapidly with *Murdannia loriformis* treatment than without treatment. *Murdannia loriformis* may be able to produce an alteration in aflatoxin-albumin adduct formation. Upon repetitive exposures to AFB1, *Murdannia loriformis* extract treatment produced a significant reduction in levels of AF-albumin biomarker for the first week only. There were no consistent changes in the biomarker levels after an additional 2 weeks of AFB1 administration.

Both toxicity of AFB1 and macromolecular binding of its metabolites have been reported to be inversely correlated with hepatic glutathione level [10]. Induction of glutathione-S-transferase activity and lower glutathione level in hepatic with greater AF-adduct formation was reported [11,12]. Administration of *Murdannia loriformis* for 1 week leads to sustained increase in the hepatic activities of detoxification enzymes such as glutathione-S-transferase, but chronic administration of the plant extract for 30 days markedly reduced the activities of glutathione-S-transferase and UDP-glucuronyl transferase [6]. Such an outcome is consistent with our observations indicating that the protective effect of *Murdannia loriformis* was observed only in the first two weeks. There is no apparent decrease in the AF-albumin adduct formation with chronic administration of the plant. Our findings suggest that perhaps even relatively short-term treatment with the plant extract could have a

positive impact on aflatoxin metabolism as judged by diminished levels of the AF-albumin adduct biomarkers.

References

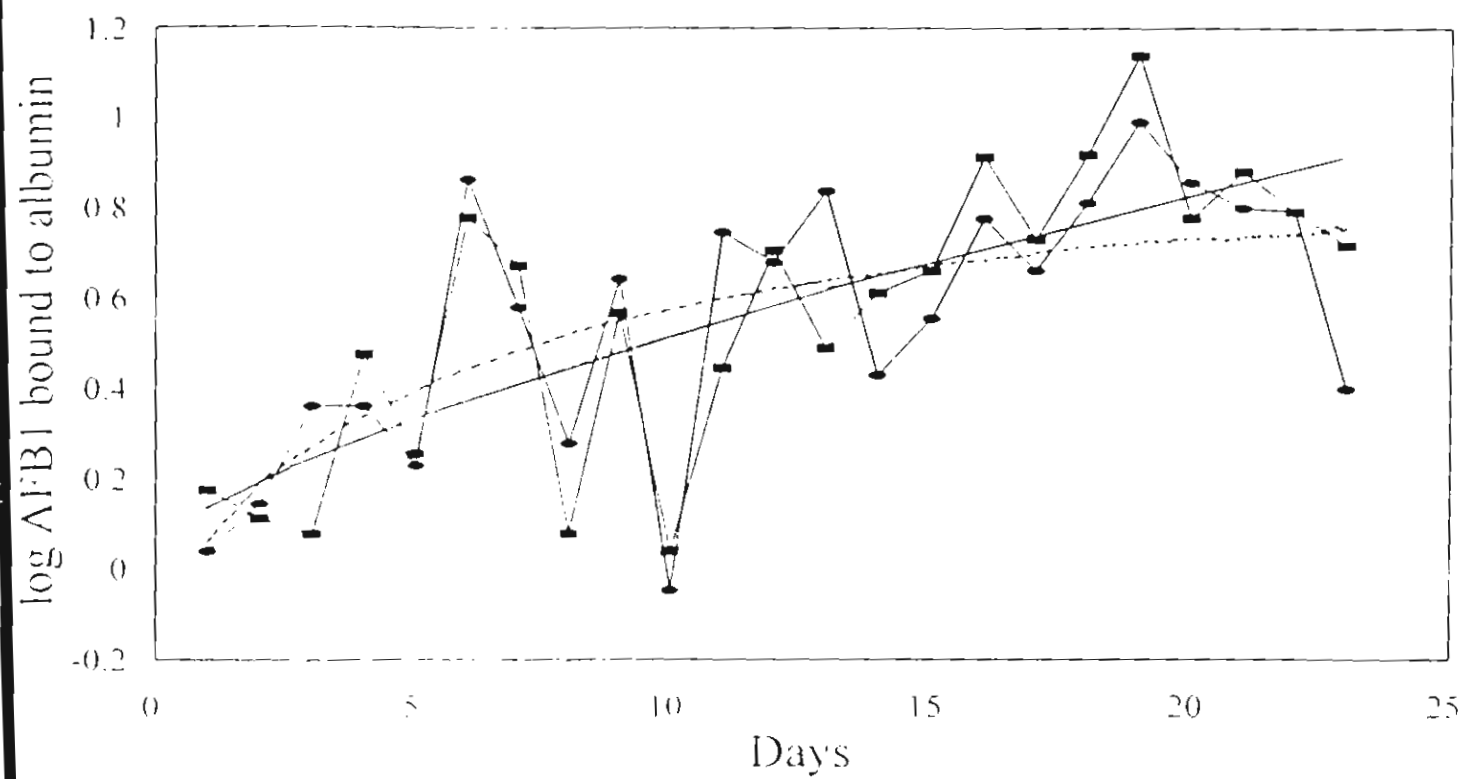
- [1]. Medicinal Plants in Sirirukhachat, 1992. Mahidol University, Thailand.
- [2]. U. Vinitketkumnuen, R. Puatanachokchai, P. Kongtawelert, N. Lertprasertsuke, T. Matsushima, Antimutagenicity of lemon grass (*Cymbopogon citratus* Stapf) to various known mutagens in Salmonella mutation assay, *Mutat Res.* 341 (1994) 71-75.
- [3]. U. Vinitketkumnuen, W. Charoenkunathum, P. Kongtawelert, N. Lertprasertsuke, P. Picha, T. Matsushima, DT-diaphorase inducer activity of antimutagenic Thai medicinal plant, *Murdannia loriformis*, *J. Herbs & Spices and Medicinal Plants.* 4:1 (1996), 45-52.
- [4]. P. Talalay, Mechanisms of induction of enzymes that protect against chemical carcinogenesis, *Adv. enzyme. Regul.* 28 (1989), 149-59.
- [5]. R. Suaeyun, T. Kinouchi, T. Arimochi, U. Vinitketkumnuen, Y. Ohnishi, Inhibitory effects of lemon grass on formation of azoxymethane-induced DNA adducts and aberrant crypt foci in the rat colon, *Carcinogenesis* 18:5 (1997), 949-955.
- [6]. Y. Intiyot, Effects of *Murdannia loriformis* Extract on Azoxymethane- induced DNA-Adducts and Aberrant Crypt Foci in Rat Colons. Master Thesis, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand. 1998
- [7]. G. Sabbioni, P. Skipper, G. Buchi, S..R. Tannenbaum, Isolation and characterization of the major serum albumin adduct formed by Aflatoxin B₁ in vivo in rats, *Carcinogenesis* 8(1987), 819-824.
- [8]. C.P. Wild, R.C. Garner, R. Montesano, F. Tursi, Aflatoxin B₁ binding to plasma albumin and liver DNA upon chronic administration to rats, *Carcinogenesis.* 7 (1986), 853-858.
- [9]. B. Chapot, C..P. Wild, ELISA for quantification of aflatoxin-albumin adducts and their application to human exposure assessment. In : M.V. Warhol, D. Velzen, and G.R. Bullock (Eds.), *Techniques in Diagnostic Pathology*, vol. 2. New York: Academic Press, 1991, pp. 139-155.
- [10]. M.U.K. Mgbodile, M. Holscher, R.N. Neal, A possible protective role for reduced glutathione in aflatoxin B₁ toxicity : Effect of pretreatment of rats with phenobarbital and 3-methylcholanthrene on aflatoxin toxicity, *Toxico. Appl. Pharma*, 34(1975)m 128-142.
- [11]. P.A. Egner, S.J. Gange, M.P. Dolan, J.D. Groopman, A. Munoz, T.W. Kensler,

Table 1 Time trends of aflatoxin-albumin adducts levels after single dose of AFB1 in rats sera receiving or not receiving Thai medicinal plants.

Group/Experiment	Levels of AF-albumin adduct (ng./mg. Albumin)				
	Formation over time in hour				
Murdannia loriformis	0	4	12	24	48
1. DMSO + AFB1 + DMSO	0.0 $\pm$ 0.0	2.21 $\pm$ 0.7	4.29 $\pm$ 1.3	2.95 $\pm$ 0.5	1.07 $\pm$ 0.6
2. Plant + AFB1 + Plant	0.0 $\pm$ 0.0	4.65 $\pm$ 0.4*	2.63 $\pm$ 0.5	3.23 $\pm$ 0.5	1.72 $\pm$ 0.6
3. Plant + AFB1 + DMSO	0.0 $\pm$ 0.0	5.09 $\pm$ 0.6*	3.73 $\pm$ 1.3	2.65 $\pm$ 0.7	1.89 $\pm$ 1.1
4. DMSO + AFB1 + Plant	0.0 $\pm$ 0.0	4.63 $\pm$ 2.3	2.75 $\pm$ 0.7	2.67 $\pm$ 0.3	2.17 $\pm$ 1.0
Cymbopogon citratus					
5. Plant + AFB1 + Plant	0.0 $\pm$ 0.0	1.88 $\pm$ 0.4	4.66 $\pm$ 1.6	2.29 $\pm$ 1.0	1.16 $\pm$ 0.2
6. Plant + AFB1 + DMSO	0.0 $\pm$ 0.0	2.86 $\pm$ 0.9	4.55 $\pm$ 1.1	2.53 $\pm$ 1.3	1.37 $\pm$ 0.4
7. DMSO + AFB1 + Plant	0.0 $\pm$ 0.0	3.24 $\pm$ 0.4	4.29 $\pm$ 2.0	2.47 $\pm$ 0.4	1.34 $\pm$ 0.8

Value 0 = amount of adduct was below detectable level of the ELISA method.

* = significant difference from group 1, P < 0.05 (Mann Whitney-U test)

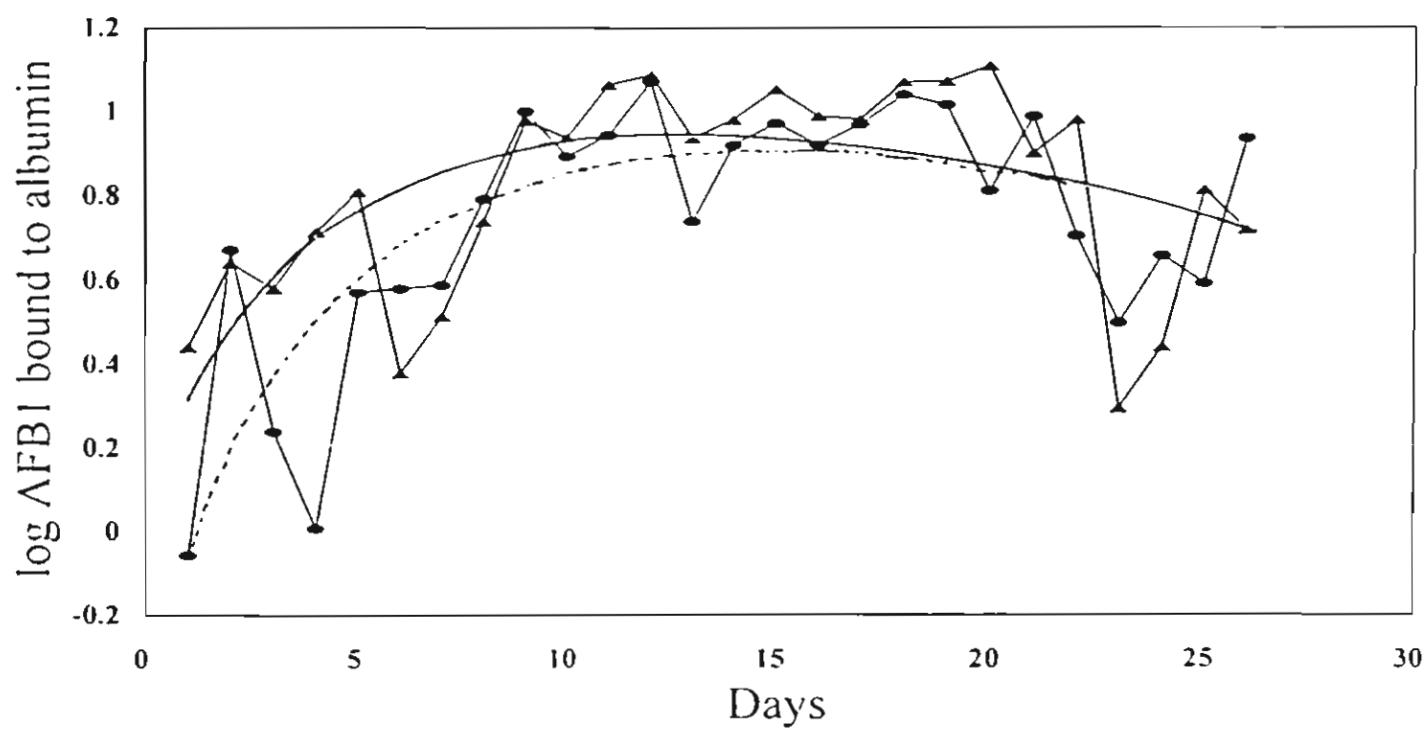


■ AFB1 alone

● Lemnongrass + AFB1

— AFB1, smooth value

- - - Lemnongrass + AFB1, smooth value



—●— AFB1 alone — AFB1, smooth value
 —▲— Murdannia + AFB1 --- Murdannia + AFB1, smooth value

The University of Texas Medical Branch at Galveston



William W. Au, Ph.D.
Department of Preventive Medicine and Community Health
The University of Texas Medical Branch
Galveston, TX 77555-1110, USA
409-772-1545 or 409-772-1803
409-772-9108 (telefax)
william.au@utmb.edu
December , 1998.

Dear Dr. Visith Hemmanan,

On behalf of the Editorial Board and the peer-review panel, I would like to thank you for submitting your manuscript for publication in the monograph for the Third International Conference on Environmental Mutagens in Human Populations. Your manuscript entitled "*Environmental Mutagens in Human Populations*" has been reviewed and the decision is that it requires revision before it can be acceptable for publication in the monograph. When you revise the manuscript, please respond to the comments of the reviewers. I would like to have your revised manuscript within two months. Please send me a computer disc containing the file of your manuscript, three copies of your manuscript, and a letter indicating your response to the reviewer.

For your information, the editorial board intends to publish the monograph within a few months after the conclusion of the conference. Therefore, any major delay may prevent your manuscript from inclusion into the monograph.

Sincerely yours,

A handwritten signature in dark ink, appearing to be "W. Au", written in a cursive style.

William W. Au, Ph.D.

Professor and Editor-in-Chief of the monograph

Inhibitory effects of lemon grass (*Cymbopogon citratus* Stapf) on formation of azoxymethane-induced DNA adducts and aberrant crypt foci in the rat colon

Shada Suaeyun^{1,2}, Takemi Kinouchi¹,
Ki Arimochi¹, Usanee Vinitketkumnuen² and
Binari Ohnishi^{1,3}

¹Department of Bacteriology, School of Medicine, The University of
Yama, Kuramoto-cho, Tokushima 770, Japan and ²Department of
Chemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University,
Chiang Mai 50002, Thailand

Correspondence should be addressed

80%-ethanol extract of lemon grass (*Cymbopogon citratus* Stapf), a medicinal plant in Thailand, has been tested to be antimutagenic against various known mutagens in the *Salmonella* mutation assay. To investigate the preventive effect of the lemon grass extract on the formation of azoxymethane (AOM)-induced DNA adducts and aberrant crypt foci (ACF) in the rat colon, we conducted the following study. Rats were divided into two groups. One group received two s.c. injections of 15 mg of AOM per kg body weight at 1 week apart. For DNA adduct analysis of the colon and liver, the rats were killed 12 h after the second AOM injection. The DNA from the liver and colon was used for *O*⁶-methylguanine and *N*⁷-methylguanine analysis. For ACF analysis in the initiation stage, AOM-treated rats were continuously treated with lemon grass extract and were killed 3 weeks after the second AOM injection. For analysis in the promotion stage the treatment with the lemon grass extract (0.5 g/kg) started 2 weeks after the second AOM injection and continued for 10 weeks until the animals were killed. Lemon grass extract significantly inhibited DNA adduct formation in the colonic mucosa and the muscular layer but not in the liver. In addition, lemon grass extract treatment significantly inhibited ACF formation in both the initiation and the promotion stage. Especially in the promotion stage, lemon grass treatment inhibited the formation of ACF (with four or more crypts per focus), which is predictive of tumor incidence. Furthermore, lemon grass extract inhibited fecal β -glucuronidase competitively and had antioxidant activity. These results suggest that the lemon grass extract inhibits the release of activated aglycon, azoxymethanol, from a glucuronide conjugate in the rat colon.

Introduction

Epidemiological and experimental studies suggest a relationship between colon cancer risk and dietary factors

Abbreviations: ACF, aberrant crypt foci; AOM, azoxymethane; t-BOOH, tert-butyl hydroperoxide; C/F, crypts/focus; DMSO, dimethyl sulfoxide; MAM, methylazoxymethanol; MDA, malondialdehyde; 7-meG, *N*⁷-methylguanine; *O*⁶-meG, *O*⁶-methylguanine; PBS, phosphate buffered saline; RBC, red blood cells; TA, thiobarbituric acid

(1,2). Strategies for cancer prevention involving reduction or elimination of human exposure to these environmental factors may not always be possible. However, as an alternate approach, compounds that abolish the effect of carcinogens have been identified (3-6). Although azoxymethane (AOM)-induced colon cancer in rats has been used to identify chemical agents that prevent colon cancer (7,8), carcinogenicity experiments in animals are relatively expensive and require a long time. Bird (9) proposed a short-term assay for quantitation of aberrant crypt foci (ACF). These foci are putative pre-cancerous lesions that indicate at least the initiation of the carcinogenesis process (10,11).

The process of AOM-induced carcinogenesis is initiated by methylation of DNA after metabolism of AOM to methylazoxymethanol (MAM) by cytochrome P450 IIE1 in the liver (12) and transport to the colon via the blood stream (13). In another metabolic pathway, MAM is conjugated with glucuronic acid immediately in the liver and excreted into the intestine via bile (14). The glucuronide conjugates are then hydrolyzed by bacterial β -glucuronidase, and the released MAM is taken up by mucosal cells and further metabolized to a reactive compound, methyl carbonium ion, to make methylated DNA (15). MAM was activated by co-oxidation with prostaglandin synthase and a lipoxygenase system (16). Two major DNA adducts, *N*⁷-methylguanine (7-meG) and *O*⁶-methylguanine (*O*⁶-meG), have been identified in DNA of rats treated with dimethylhydrazine (17). DNA adducts can result directly in mutational events, potentially leading to cancer. These mutations in the genes that are implicated in the control of cell growth, lead to the formation of a small benign tumor (adenoma), which may grow and may result in a malignant tumor (carcinoma) (18). Recently, Pfohl-Leschowicz *et al.* (19) have reported that high levels of DNA adducts in the human colon are associated with colorectal cancer.

In Thailand, the mortality from cancer in the digestive tract is low when compared with that in Japan (20). This may result from the short lifespan of Thai people and to differences in race and lifestyle, particularly customs of food consumption. Lemon grass (*Cymbopogon citratus* Stapf), a Thai medicinal plant, is commonly used in the diet and in medicine for stomach-ache. Previous studies have shown that the lemon grass extract inhibits mutagenesis of many kinds of mutagens in *Salmonella typhimurium* (21), chromosomal aberration in human lymphocytes exposed to mitomycin C (22), and micronucleus formation in rats exposed to cyclophosphamide (23), and that it is responsible for retardation of tumor growth and lessening the degree of tumor metastasis in rats into which fibrosarcoma was transplanted (24). In addition, the lemon grass extract enhances glutathione S-transferase activity in the mouse intestine (25). In this study, we investigated the inhibitory effects of the lemon grass extract on formation of AOM-induced DNA adducts and ACF in the rat colon.

Materials and methods

Chemicals

AOM, *p*-nitrophenyl β -D-glucuronide, *p*-nitrophenol, tert-butyl hydroperoxide (t-BOOH), proteinase K, and 7-meG were purchased from Sigma Chemical

Table I. Inhibitory effect of lemon grass on formation of AOM-induced DNA adducts in the colons and livers of F344 rats

Group	AOM	Treatment	n	Colon				Liver
				Mucosa		Muscular layer		
				7-meG ($\mu\text{mol/mol G}$)	<i>O</i> ⁶ -meG ($\mu\text{mol/mol G}$)	7-meG ($\mu\text{mol/mol G}$)	<i>O</i> ⁶ -meG ($\mu\text{mol/mol G}$)	<i>O</i> ⁶ -meG ($\mu\text{mol/mol G}$)
+		Vehicle	6	1400 $\pm$ 330	22.2 $\pm$ 8.3	735 $\pm$ 339	27.7 $\pm$ 10.7	56.5 $\pm$ 10.4
+		Lemon grass (5 g/kg)	6	893 $\pm$ 477	4.72 $\pm$ 2.3***	176 $\pm$ 110**	13.4 $\pm$ 5.0*	59.8 $\pm$ 20.8
+		Lemon grass (0.5 g/kg)	5	725 $\pm$ 481*	13.2 $\pm$ 5.3*	413 $\pm$ 191*	23.0 $\pm$ 4.7	96.0 $\pm$ 22.5*
-		Lemon grass (5 g/kg)	4	<121 $\pm$ 11.0***	<1.63 $\pm$ 1.9***	<11 $\pm$ 0.94***	<3.5 $\pm$ 4.1***	<4.5 $\pm$ 7.9***

*Significantly different from the AOM-treated control group (group 1) by analysis of variance.

*** $P < 0.0001$; ** $P < 0.005$; * $P < 0.05$. Mol G, mole of guanine.

Table II. Inhibitory effect of lemon grass on AOM-induced ACF in the colons and rectums of F344 rats in the initiation stage

Group	AOM	Treatment	n	Colon		Rectum		Total	
				ACF (%)	AC/ACF (%)	ACF (%)	AC/ACF (%)	ACF (%)	AC/ACF (%)
+	+	Vehicle	6	107.0 $\pm$ 19.5 (100)	2.37 $\pm$ 0.26 (100)	20.5 $\pm$ 9.6 (100)	2.2 $\pm$ 0.40 (100)	127.5 $\pm$ 27.5 (100)	2.3 $\pm$ 0.25 (100)
+	+	Lemon grass (5 g/kg)	8	64.8 $\pm$ 18.1 (60.6)***	2.52 $\pm$ 0.26 (106)	11.0 $\pm$ 3.0 (53.7)*	2.0 $\pm$ 0.26 (90.9)	75.8 $\pm$ 15.2 (59.5)***	2.4 $\pm$ 0.17 (104)
+	+	Lemon grass (0.5 g/kg)	7	72.8 $\pm$ 16.0 (68.0)**	2.44 $\pm$ 0.16 (103)	14.7 $\pm$ 7.2 (71.7)	2.1 $\pm$ 0.14 (95.5)	87.5 $\pm$ 19.5 (68.6)**	2.3 $\pm$ 0.16 (100)
+	+	Lemon grass (5 g/kg) (10 days before AOM)	8	84.5 $\pm$ 13.2 (79.0)*	2.39 $\pm$ 0.23 (101)	10.8 $\pm$ 7.2 (52.7)*	2.1 $\pm$ 0.37 (95.5)	95.3 $\pm$ 14.2 (74.7)*	2.3 $\pm$ 0.23 (100)
-	-	Vehicle	8	0 $\pm$ 0.0 (0)***	0 $\pm$ 0.0 (0)***	0 $\pm$ 0.0 (0)***	0 $\pm$ 0.0 (0)***	0 $\pm$ 0.0 (0)***	0 $\pm$ 0.0 (0)***
-	-	Lemon grass (5 g/kg)	8	0 $\pm$ 0.0 (0)***	0 $\pm$ 0.0 (0)***	0 $\pm$ 0.0 (0)***	0 $\pm$ 0.0 (0)***	0 $\pm$ 0.0 (0)***	0 $\pm$ 0.0 (0)***
-	-	Water	8	0 $\pm$ 0.0 (0)***	0 $\pm$ 0.0 (0)***	0 $\pm$ 0.0 (0)***	0 $\pm$ 0.0 (0)***	0 $\pm$ 0.0 (0)***	0 $\pm$ 0.0 (0)***
+	+	Water	8	90.0 $\pm$ 29.4 (84.1)	2.15 $\pm$ 0.23 (90.7)	23.1 $\pm$ 6.4 (113)	1.8 $\pm$ 0.23 (81.8)	113.0 $\pm$ 28.5 (88.6)	2.0 $\pm$ 0.10 (87.0)

*Significantly different from the AOM-treated control group (group 1) of the experiment by analysis of variance.

*** $P < 0.0005$; ** $P < 0.005$; * $P < 0.05$.

mucosa and muscular layer of rats treated with AOM (Table I). Lemon grass at concentrations of 0.5 and 5 g/kg inhibited 7-meG formation in the colonic mucosa by ~40 and 78%, respectively, but in the colonic muscular layer 51% inhibition was caused only by a concentration of 5 g/kg. Moreover, lemon grass inhibited 7-meG formation in the colonic muscular layer more than in the colonic mucosa. The lemon grass extract did not inhibit the AOM-induced *O*⁶-meG in the liver.

Inhibitory effect of lemon grass extract on AOM-induced ACF formation

Body weights of the rats were not significantly different between the control and treatment groups at either the initiation or the promotion stage, during the experiments (data not shown). The effect of the lemon grass extract on AOM-induced ACF at the initiation stage is shown in Table II. No ACF was observed in vehicle-treated groups (groups 5, 6 and 7). AOM treatment greatly increased the incidence of ACF, 100 aberrant crypts/colon, while lemon grass reduced the number of ACF to 60.6 and 68.0% at doses of 5 g and 0.5 g/kg, respectively. When the rats received the lemon grass extract only 10 days before the first AOM treatment (group 4) the

number of ACF was also reduced, but the treatment was less effective than in the rats treated with the extract throughout the experimental period. In the rectum, a high dose of the lemon grass extract (5 g/kg) inhibited ACF formation by ~50%. However, a low dose of lemon grass (0.5 g/kg) had no significant effect.

Table III shows that lemon grass at a dose of 0.5 g/kg inhibited ACF formation by ~35% in the promotion stage in both the colon and rectum ($P < 0.05$) without any effect on the number of aberrant crypts/focus. In addition, lemon grass treatment in the promotion stage significantly decreased the number of ACF that had four or more crypts/focus (≥ 4 C/F).

Effects of lemon grass on β -glucuronidase activity and oxidative damage

To elucidate the inhibitory mechanism of the lemon grass extract in the formation of DNA adducts and ACF, we studied the effects of the lemon grass extract on β -glucuronidase activity and oxidative damage induced by *t*-BOOH *in vitro*. The lemon grass extract at a concentration of 250 $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ inhibited fecal β -glucuronidase activity by ~75% (Figure 2a). Various concentrations of the lemon grass extract were used

Table III. Inhibitory effect of lemon grass on AOM-induced ACF in the colons and rectums of F344 rats in the promotion stage

Group	AOM	Treatment	n	Colon			Rectum			Total		
				ACF (%)	AC/ACF (%)	≥4 C/F (%)	ACF (%)	AC/ACF (%)	≥4 C/F (%)	ACF (%)	AC/ACF (%)	≥4 C/F (%)
9	+	Vehicle	6	162.0 ± 34.7 (100)	3.9 ± 0.19 (100)	81.0 ± 15.9 (100)	31 ± 4.6 (100)	3.9 ± 0.42 (100)	20 ± 5.2 (100)	193.0 ± 37.7 (100)	3.9 ± 0.15 (100)	99.0 ± 1.0 (100)
10	+	Lemon grass (0.5 g/kg)	6	104.0 ± 25.8 (64.2)*	3.7 ± 0.52 (94.9)	49.0 ± 19.6 (60.5)*	20 ± 7.1 (64.5)*	3.5 ± 0.37 (89.7)	10 ± 5 (50.0)**	111.0 ± 28.6 (57.5)***	3.8 ± 0.45 (97.4)	58.0 ± 1.0 (58.6)*
11	-	Lemon grass (0.5 g/kg)	6	0.0 ± 0.0 (0)***	0.0 ± 0.0 (0)***	0.0 ± 0.0 (0)***	0.0 ± 0.0 (0)***	0.0 ± 0.0 (0)***	0.0 ± 0.0 (0)***	0.0 ± 0.0 (0)***	0.0 ± 0.0 (0)***	0.0 ± 0.0 (0)***

Significantly different from the AOM-treated control group (group 9) of the experiment by analysis of variance.

*** $P < 0.005$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$. C/F, crypts/focus

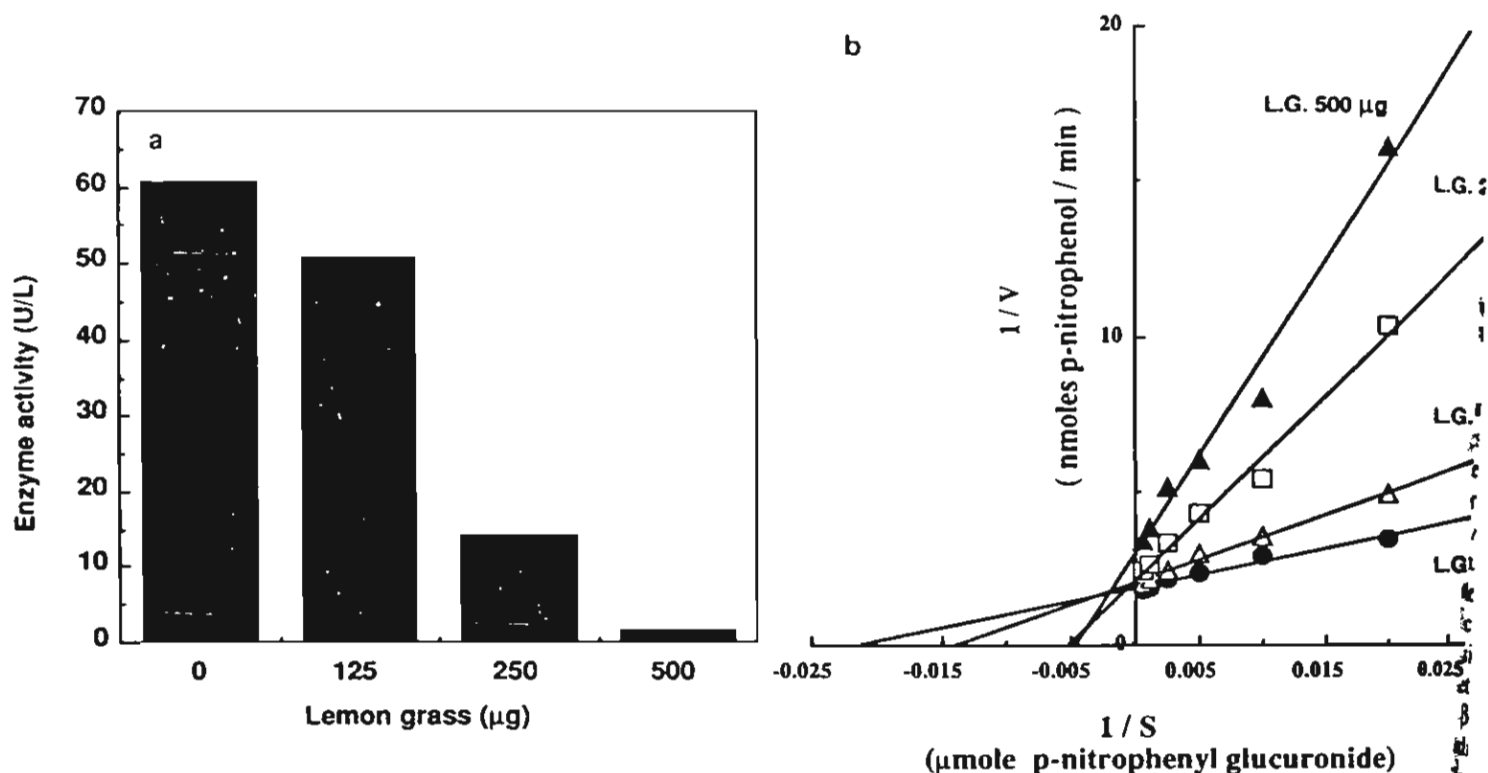


Fig. 2. Effect of lemon grass extract on fecal β -glucuronidase. The extract inhibited the enzyme activity dose-dependently (a) and competitively (b). The concentrations of lemon grass are shown as weights in 200 μ l of the reaction mixture.

as an inhibitor to determine the mechanism by a Lineweaver-Burk plot (Figure 2b). We found that the lemon grass extract was a competitive inhibitor against fecal β -glucuronidase.

The antioxidant activity of lemon grass against MDA formation induced by *t*-BOOH and hemin in the RBC was examined. Figure 3a shows antioxidant activity of lemon grass against the pro-oxidant action of *t*-BOOH and hemin after incubation for 120 min. In Figure 3b, 50 μ g of the lemon grass extract shows ~50% inhibition of *t*-BOOH and hemin-induced MDA formation.

Discussion

Formation of DNA adducts is recognized as one of the common properties of most potent carcinogens and is the basis of several current strategies in molecular epidemiology and biomonitoring (31). The main DNA adducts in the AOM-treated animals are 7-meG and *O*⁶-meG. 7-MeG is quantitatively the major alkylation product in the DNA of animals treated with methylating carcinogens. However, the significance of this base in

tumor initiation has been questioned repeatedly (17). *O*⁶-MeG in the target tissue is more closely correlated with carcinogenicity than the more frequently occurring 7-meG (18). During DNA replication, *O*⁶-meG mispairs with thymine, resulting in a G to A point mutation, and this mutation has been implicated in activation of oncogenes and inactivation of tumor suppressor genes by methylating agents (32). Our results demonstrated that orally administered lemon grass extract inhibited the DNA methylation in the colon. The magnitude of the decrease in *O*⁶-meG was more than 50% for 7-meG in the colonic mucosa (Table I).

In addition, the present studies show that the lemon grass extract significantly inhibited ACF formation in both initiation and promotion stages (Tables II and III). The magnitude of the decrease in DNA-binding parameters was in parallel with the decrease in ACF formation. AOM-induced ACF in the colon are putative pre-cancerous lesions that have been proposed as biomarkers for the short-term screening of potential carcinogens and chemopreventive agents.

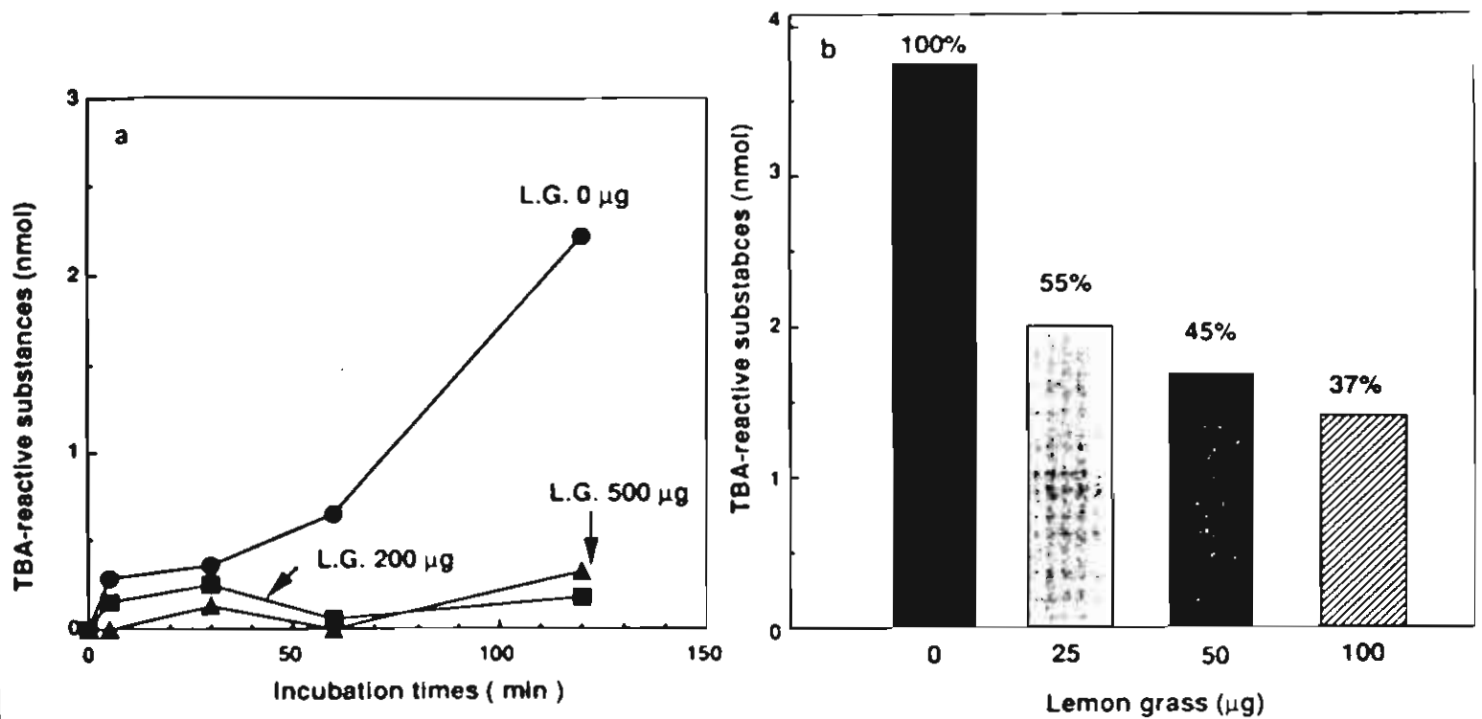


Fig. 3. Effect of lemon grass on oxidative damage. The extract inhibited oxidative damage in the red blood cells time dependently (a) and dose-dependently (b).

cancer. Since the DNA-methylation is considered to be the first step in carcinogenesis by AOM, the decrease in DNA-methylation, which is accompanied by a decrease in ACF formation, would influence the outcome of the disease.

AOM is metabolized to MAM and conjugated in the liver. Glucuronide conjugates of MAM are then excreted into the bile and changed to MAM again by β -glucuronidase-mediated deconjugation in the intestine. The released MAM may be easily taken up by mucosal cells and further activated to methylating species.

β -Glucuronidase is believed to be largely responsible for hydrolysis of glucuronide conjugates in the colon and thus to play an important role in generation of toxic and carcinogenic substances (36). Several studies have shown that an increase in bacterial β -glucuronidase activity is associated with a higher number of colon tumors (37) and that a β -glucuronidase inhibitor inhibits AOM-induced colonic carcinogenesis in rats (38). In fact, the lemon grass extract showed an inhibitory effect on fecal β -glucuronidase activity (Figure 2). Some compounds in the lemon grass extract may compete with glucuronide conjugates of MAM as substrates for β -glucuronidase in the colon, resulting in reduction of MAM concentration in the colon and a decrease in DNA adducts in the mucosa.

This medicinal plant showed antioxidant activity (Figure 3). Although it is not clear whether AOM-induced carcinogenesis is concerned with oxidative stress or not, many chemopreventive agents such as butylated hydroxyanisole (39) and oltipraz possess antioxidant properties and have been found to inhibit AOM-induced colon cancer in the animal model. Slaga has proposed the possible chemopreventive mechanisms of antioxidants as follows: (i) antioxidants interact directly with carcinogens or one of the metabolites; (ii) they decrease the activity or alter enzyme pathways responsible for carcinogenic activation; and (iii) they increase the activities of enzyme pathways responsible for detoxifying carcinogens. The probable inhibitory mechanism of lemon grass is to

decrease AOM activating enzymes such as cytochrome P450 IIE1, lipoxygenase, cyclo-oxygenase, or increase detoxification enzyme activity caused by antioxidant compound(s) in the lemon grass extract. It has been reported that lemon grass extract elevates glutathione S-transferase activity in the intestinal mucosa of mice (25).

The lemon grass extract preferentially inhibited formation of ACF that had four or more crypts/focus (Table III). The developed ACF are well correlated with tumor incidence (30). Therefore the lemon grass extract will be useful as one of the chemopreventive agents against colon carcinogenesis. The inhibitory effect of the lemon grass extract on ACF formation in the promotion stage may be dependent on the antioxidant activity. Benzoyl peroxide and other free radical-generating compounds are effective skin-tumor promoters (42), suggesting that free radicals are important in tumor promotion. Several antioxidants inhibit all stages of carcinogenesis whereas other inhibitors are effective in only one stage, initiation, promotion or progression: phenolic and polyphenolic antioxidants, usually found in plants, are potent inhibitors of the tumor promotion in carcinogenesis (41). The main constituent of green tea polyphenolic antioxidants, epigallocatechin gallate, has been found to be a very potent anti-promoter in mouse skin tumorigenesis (43). Therefore it is possible that the inhibitory effect of the lemon grass extract on AOM-induced ACF formation at the promotion stage is dependent on phenolic compounds in this medicinal plant.

A number of compounds have been identified in lemon grass oil, including citral, geraniol, methyl heptenone and β -myrcene (44). Citral and geraniol have inhibitory effects on tumor promotion in the mouse skin (45) and on transplanted tumor growth (46), respectively. β -Myrcene effectively inhibits sister-chromatid exchanges induced by cyclophosphamide and aflatoxin B1, but it has no effect on sister-chromatid exchange induction by benzo[a]pyrene and 9,10-dimethyl-1,2-benz[a]-anthracene *in vitro* (47). We have just started experiments to

investigate the effects of citral, geraniol, methyl heptenone and β -myrcene on the formation of AOM-induced DNA adducts and ACF and on β -glucuronidase activity in rats.

In conclusion, the results of this study demonstrate that the lemon grass extract inhibited the formation of AOM-induced DNA adducts and ACF in the rat colon. Although the exact mechanisms involved in the protective effects against ACF formation are not clearly understood at present, the results suggest that the inhibitory effects of the lemon grass extract depend partially on competitive inhibition of fecal β -glucuronidase and antioxidant activity of this plant.

Acknowledgements

Part of this work was supported by the Thailand Research Fund, grant No. BR03/2538. We thank Drs K. Ishizaki and M. Ikenaga, Kyoto University, for supplying the standard material, O^6 -meG.

References

- Boone, C.W., Kelloff, G.J. and Malone, W.E. (1990) Identification of candidate cancer chemopreventive agents and their evaluation in animal models and human clinical trials: a review. *Cancer Res.*, **50**, 2-9.
- Bertram, J.S., Kolonel, L.N. and Meyskens, F.L. Jr (1987) Rationale and strategies for chemoprevention of cancer in humans. *Cancer Res.*, **47**, 3012-3031.
- Wattenberg, L.W. (1992) Inhibition of carcinogenesis by minor dietary constituents. *Cancer Res.*, **52**, 2085s-2091s.
- Reddy, B.S., Rao, C.V., Rivenson, A. and Kelloff, G. (1993) Chemoprevention of colon carcinogenesis by organosulfur compounds. *Cancer Res.*, **53**, 3493-3498.
- Fiala, E.S., Reddy, B.S. and Weisburger, J.H. (1985) Naturally occurring anticarcinogenic substances in foodstuffs. *Ann. Rev. Nutr.*, **5**, 295-321.
- Wattenberg, L.W. (1992) Chemoprevention of cancer by naturally occurring and synthetic compounds. In Wattenberg, L.W., Lipkin, M., Boone, C.W. and Kelloff, G.J. (eds) *Cancer Chemoprevention*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 95-112.
- Pereira, M.A., Barnes, L.H., Rassman, V.L., Kelloff, G.V. and Steele, V.E. (1994) Use of azoxymethane-induced foci of aberrant crypts in rat colon to identify potential cancer chemopreventive agents. *Carcinogenesis*, **15**, 1049-1054.
- Rao, C.V., Tokomo, K., Kelloff, G. and Reddy, B.S. (1990) Inhibition by dietary oltipraz of experimental intestinal carcinogenesis induced by azoxymethane in male F344 rats. *Carcinogenesis*, **12**, 1051-1055.
- Bird, R.P. (1987) Observation and quantitation of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: Preliminary findings. *Cancer Lett.*, **37**, 147-151.
- Wargovich, M.J., Harris, C., Chen, C., Palmer, C., Steele, V.E. and Kelloff, G.J. (1992) Growth kinetics and chemoprevention of aberrant crypts in the rat colon. *J. Cell. Biochem.*, **16G**(Suppl.), 51-54.
- Pereira, M.A. and Khoury, M.D. (1991) Prevention by chemopreventive agents of azoxymethane-induced foci of aberrant crypts in rat colon. *Cancer Lett.*, **61**, 27-33.
- Sohn, O.S., Ishizaki, H., Yang, C.S. and Fiala, E.S. (1991) Metabolism of azoxymethane, methylazoxymethanol and *N*-nitrosodimethylamine by cytochrome P45011E1. *Carcinogenesis*, **12**, 127-131.
- Fiala, E.S., Joseph, C., Sohn, O.S., El-Bayoumy, K. and Reddy, B.S. (1991) Mechanism of benzylselenocyanate inhibition of azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats. *Cancer Res.*, **51**, 2826-2830.
- Weisburger, J.H. (1971) Colon carcinogens: their metabolism and mode of action. *Cancer*, **28**, 60-70.
- Fiala, E.S. (1983) Investigations into the metabolism and mode of action of the colon carcinogens 1,2-dimethylhydrazine and azoxymethane. *Cancer*, **40**, 2436-2445.
- Craven, P.A., Neidig, M. and DeRubertis, F.R. (1985) Fatty acid-stimulated oxidation of methylazoxymethanol by rat colonic mucosa. *Cancer Res.*, **45**, 1115-1121.
- Herron, D.C. and Shank, R.C. (1981) *In vivo* kinetics of O^6 -methylguanine and 7-methylguanine formation and persistence in DNA of rats treated with symmetrical dimethylhydrazine. *Cancer Res.*, **41**, 2368-2372.
- Fearon, E.R. and Jones, P.A. (1992) Progressing toward a molecular description of colorectal cancer development. *FASEB J.*, **6**, 2783-2790.
- Pfohl-Leschkowicz, A., Grosse, Y., Carrière, V., Cugnenc, P.-H., Berger, A., Carnot, F., Beaune, P. and de Waziers, I. (1995) High levels of DNA adducts in human colon are associated with colorectal cancer. *Cancer Res.*, **55**, 5611-5616.
- Division of Health Statistics, Office of the Permanent Secretary, Ministry of Public Health (1989) *Public Health Statistics 1989*, Thailand.
- Vinitketkumnuen, U., Puatanachokchai, R., Kongtawelert, P., Lertprasertsuke, N. and Matsushima, T. (1994) Antimutagenicity of lemon grass (*Cymbopogon citratus* Stapf) to various known mutagens in *Salmonella* mutation assay. *Mutat. Res.*, **341**, 71-75.
- Meevaite, U., Boontim, S., Keereeta, O., Vinitketkumnuen, U. and O-ariyakul, N. (1993) Antimutagenic activity of lemon grass. In Boot-in, S. (ed.) *Man and Environment*. Chiang Mai, Chiang Mai University Press, p. 346.
- Pinsae, K. (1993) Anti-micronucleus formation of lemon grass extract. Master's thesis, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand.
- Puatanachokchai, R. (1994) Antimutagenicity, cytotoxicity and antitumor activity from lemon grass (*Cymbopogon citratus* Stapf) extract. Master's thesis, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand.
- Lam, L.K.T. and Zhang, B. (1991) Effects of essential oils on glutathione *S*-transferase activity in mice. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 660-662.
- Gupta, R.C. (1984) Nonrandom binding of the carcinogen *N*-hydroxy-2-acetylaminofluorene to repetitive sequences of rat liver DNA *in vivo*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **81**, 6943-6947.
- Becker, R.A., Barrows, L.R. and Shank, R.C. (1981) Methylation of liver DNA guanine in hydrazine hepatotoxicity: dose-response and kinetic characteristics of 7-methylguanine and O^6 -methylguanine formation and persistence in rats. *Carcinogenesis*, **2**, 1181-1188.
- Kinouchi, T., Kataoka, K., Miyazaki, K., Akimoto, S. and Ohnishi, Y. (1993) Biological activities of the intestinal microflora in mice treated with antibiotics or untreated and the effects of the microflora on absorption and metabolic activation of orally administered glutathione conjugates of *K*-region epoxides of 1-nitropyrene. *Carcinogenesis*, **14**, 869-874.
- Draper, H.H. and Hadley, M. (1990) Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*, **186**, 421-431.
- Pretlow, T.P., O'Riordan, M.A., Somich, G.A., Amini, S.B. and Pretlow, T.G. (1992) Aberrant crypts correlate with tumor incidence in F344 rats treated with azoxymethane and phytate. *Carcinogenesis*, **13**, 1509-1512.
- Dipple, A. (1995) DNA adducts of chemical carcinogens. *Carcinogenesis*, **16**, 437-441.
- Loveless, A. (1969) Possible relevance of *O*-6 alkylation of deoxyguanosine to the mutagenicity and carcinogenicity of nitrosamines and nitrosamides. *Nature*, **223**, 206-207.
- Bonatti, S., Aprile, A., Arena, G., Cavalieri, Z., Pellerano, P., Rocco, M., Sailer, K., Viaggi, S. and Abbondandolo, A. (1995) Induction of kinetochore-containing micronuclei by exogenous O^6 -methylguanine requires conversion of the methylated base to a nucleotide. *Environ. Mol. Mutagen.*, **26**, 226-233.
- Saffhill, R., Margison, G.P. and O'Connor, P.J. (1985) Mechanisms of carcinogenesis induced by alkylating agent. *Biochim. Biophys. Acta*, **823**, 111-145.
- Bull, A.W., Burd, A.D. and Nigro, N.D. (1981) Effect of inhibitors of tumorigenesis on the formation of O^6 -methylguanine in the colon of 1,2-dimethylhydrazine-treated rats. *Cancer Res.*, **41**, 4938-4941.
- Kulkarni, N. and Reddy, B.S. (1994) Inhibitory effect of *Bifidobacterium longum* cultures on the azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation and fecal bacterial β -glucuronidase. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **207**, 278-283.
- Reddy, B.S., Weisburger, J.H., Narisawa, T. and Wynder, E.L. (1974) Colon carcinogenesis in germ-free rats with 1,2-dimethylhydrazine and *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine. *Cancer Res.*, **34**, 2368-2372.
- Takada, H., Hirooka, T., Hiramatsu, Y. and Yamamoto, M. (1982) Effect of β -glucuronidase inhibitor on azoxymethane-induced colonic carcinogenesis in rats. *Cancer Res.*, **42**, 331-334.
- Reddy, B.S. and Maehara, Y. (1984) Dose-response studies of the effect of dietary butylated hydroxyanisole on colon carcinogenesis induced by methylazoxymethanol acetate in female CF1 mice. *J. Natl Cancer Inst.*, **72**, 1181-1187.
- Rao, C.V., Nayini, J. and Reddy, B.S. (1991) Effect of oltipraz [5-(2-pyrazinyl)-4-methyl-1,2-dithiol-3-thione] on azoxymethane-induced biochemical changes related to early colon carcinogenesis in male F344 rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **197**, 77-83.
- Slaga, T.J. (1995) Inhibition of the induction of cancer by antioxidant. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **369**, 167-173.
- DiGiovanni, J., Walker, S.C., Beltran, L., Naito, M. and Eastin, W.C. Jr (1999) Evidence for a common genetic pathway controlling susceptibility mouse skin tumor promotion by diverse classes of promoting agent. *Cancer Res.*, **51**, 1398-1405.

- ang, C.S., Wang, Z.Y. and Hang, J.Y. (1994) Inhibition of tumorigenesis by chemicals from garlic and tea. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **354**, 113–121.
- uriyone, T. (1986) *Pharmacognosy*, 3rd edn. Hirokawa Publishing Co., Tokyo (in Japanese).
- nnor, M.J. (1991) Modulation of tumor promotion in mouse skin by the food additive citral (3,7-dimethyl-2,6-octadienal). *Cancer Lett.*, **56**, 25–28.
- S.G., Hildebrandt, L.A. and Elson, C.E. (1995) Geraniol, an inhibitor of mevalonate biosynthesis, suppresses the growth of hepatomas and melanomas transplanted to rats and mice. *J. Nutr.*, **125**, 2763–2767.
- scheisen, C., Zamith, H., Paumgarten, F.J.R. and Speit, G. (1991) Influence of β -myrcene on sister-chromatid exchanges induced by mutagens in V79 and HTC cells. *Mutat. Res.*, **264**, 43–49.

Received on October 29, 1996; revised on January 27, 1997; accepted on February 7, 1997

investigate the effects of citral, geraniol, methyl heptenone and β -myrcene on the formation of AOM-induced DNA adducts and ACF and on β -glucuronidase activity in rats.

In conclusion, the results of this study demonstrate that the lemon grass extract inhibited the formation of AOM-induced DNA adducts and ACF in the rat colon. Although the exact mechanisms involved in the protective effects against ACF formation are not clearly understood at present, the results suggest that the inhibitory effects of the lemon grass extract depend partially on competitive inhibition of fecal β -glucuronidase and antioxidant activity of this plant.

Acknowledgements

Part of this work was supported by the Thailand Research Fund, grant No. BRA13/2538. We thank Drs K. Ishizaki and M. Ikenaga, Kyoto University, for supplying the standard material, *O*⁶-methylguanine.

References

- Boone, C.W., Kelloff, G.J. and Malone, W.E. (1990) Identification of candidate cancer chemopreventive agents and their evaluation in animal models and human clinical trials: a review. *Cancer Res.*, **50**, 2-9.
- Bertram, J.S., Kolonel, L.N. and Meyskens, F.L. Jr. (1987) Rationale and strategies for chemoprevention of cancer in humans. *Cancer Res.*, **47**, 3012-3031.
- Wattenberg, L.W. (1992) Inhibition of carcinogenesis by minor dietary constituents. *Cancer Res.*, **52**, 2085S-2091S.
- Reddy, B.S., Rao, C.V., Rivenson, A. and Kelloff, G. (1993) Chemoprevention of colon carcinogenesis by organosulfur compounds. *Cancer Res.*, **53**, 3493-3498.
- Fiala, E.S., Reddy, B.S. and Weisburger, J.H. (1985) Naturally occurring anticarcinogenic substances in foodstuffs. *Ann. Rev. Nutr.*, **5**, 295-321.
- Wattenberg, L.W. (1992) Chemoprevention of cancer by naturally occurring and synthetic compounds. In Wattenberg, L.W., Lipkin, M., Boone, C.W. and Kelloff, G.J. (eds) *Cancer Chemoprevention*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 95-112.
- Pereira, M.A., Barnes, L.H., Rassman, V.L., Kelloff, G.V. and Steele, V.E. (1994) Use of azoxymethane-induced foci of aberrant crypts in rat colon to identify potential cancer chemopreventive agents. *Carcinogenesis*, **15**, 1049-1054.
- Rao, C.V., Tokomo, K., Kelloff, G. and Reddy, B.S. (1990) Inhibition by dietary oltipraz of experimental intestinal carcinogenesis induced by azoxymethane in male F344 rats. *Carcinogenesis*, **12**, 1051-1055.
- Bird, R.P. (1987) Observation and quantitation of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: Preliminary findings. *Cancer Lett.*, **37**, 147-151.
- Wargovich, M.J., Harns, C., Chen, C., Palmer, C., Steele, V.E. and Kelloff, G.J. (1992) Growth kinetics and chemoprevention of aberrant crypts in the rat colon. *J. Cell. Biochem.*, **16G**(Suppl.), 51-54.
- Pereira, M.A. and Khoury, M.D. (1991) Prevention by chemopreventive agents of azoxymethane-induced foci of aberrant crypts in rat colon. *Cancer Lett.*, **61**, 27-33.
- Sohn, O.S., Ishizaki, H., Yang, C.S. and Fiala, E.S. (1991) Metabolism of azoxymethane, methylazoxymethanol and *N*-nitrosodimethylamine by cytochrome P4501IE1. *Carcinogenesis*, **12**, 127-131.
- Fiala, E.S., Joseph, C., Sohn, O.S., El-Bayoumy, K. and Reddy, B.S. (1991) Mechanism of benzylselenocyanate inhibition of azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats. *Cancer Res.*, **51**, 2826-2830.
- Weisburger, J.H. (1971) Colon carcinogens: their metabolism and mode of action. *Cancer*, **28**, 60-70.
- Fiala, E.S. (1983) Investigations into the metabolism and mode of action of the colon carcinogens 1,2-dimethylhydrazine and azoxymethane. *Cancer*, **40**, 2436-2445.
- Craven, P.A., Neidig, M. and DeRubeis, F.R. (1985) Fatty acid-stimulated oxidation of methylazoxymethanol by rat colonic mucosa. *Cancer Res.*, **45**, 1115-1121.
- Herron, D.C. and Shank, R.C. (1981) *In vivo* kinetics of *O*⁶-methylguanine and 7-methylguanine formation and persistence in DNA of rats treated with symmetrical dimethylhydrazine. *Cancer Res.*, **41**, 2368-2372.
- Fearon, E.R. and Jones, P.A. (1992) Progressing toward a molecular description of colorectal cancer development. *FASEB J.*, **6**, 2783-2790.
- Pfohl-Leschowicz, A., Grosse, Y., Camère, V., Cugnenc, P.-H., Berger, A., Carnot, F., Beaune, P. and de Waziers, I. (1995) High levels of DNA adducts in human colon are associated with colorectal cancer. *Cancer Res.*, **55**, 5611-5616.
- Division of Health Statistics, Office of the Permanent Secretary, Ministry of Public Health (1980) *Public Health Statistics 1980*, Thailand.
- Vinitketkumnuen, U., Puatanachokchai, R., Kongtawelert, P., Lertpratsertsaek, N. and Matsushima, T. (1994) Antimutagenicity of lemon grass (*Cymbopogon citratus* Stapf) to various known mutagens in *Salmonella* mutation assay. *Mutat. Res.*, **341**, 71-75.
- Meewate, U., Boontum, S., Keereeta, O., Vinitketkumnuen, U. and Chanyakul, N. (1993) Antimutagenic activity of lemon grass. In Boon-in, S. (ed) *Man and Environment*. Chiang Mai, Chiang Mai University Press, p. 346.
- Pinsang, K. (1993) Anti-micronucleus formation of lemon grass extract. Master's thesis, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand.
- Puatanachokchai, R. (1994) Antimutagenicity, cytotoxicity and antitumor activity from lemon grass (*Cymbopogon citratus* Stapf) extract. Master's thesis, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand.
- Lam, L.K.T. and Zhang, B. (1991) Effects of essential oils on glutathione *S*-transferase activity in mice. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 660-662.
- Gupta, R.C. (1984) Nonrandom binding of the carcinogen *N*-hydroxy-2-acetylaminofluorene to repetitive sequences of rat liver DNA *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 6943-6947.
- Becker, R.A., Barrows, L.R. and Shank, R.C. (1981) Methylation of liver DNA guanine in hydrazine hepatotoxicity: dose-response and kinetic characteristics of 7-methylguanine and *O*⁶-methylguanine formation and persistence in rats. *Carcinogenesis*, **2**, 1181-1188.
- Kinouchi, T., Kataoka, K., Miyazaki, K., Akimono, S. and Ohnishi, Y. (1993) Biological activities of the intestinal microflora in mice treated with antibiotics or untreated and the effects of the microflora on absorption and metabolic activation of orally administered glutathione conjugates of *K*-region epoxides of 1-nitropyrene. *Carcinogenesis*, **14**, 869-874.
- Draper, H.H. and Hadley, M. (1990) Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*, **186**, 421-431.
- Pretlow, T.P., O'Riordan, M.A., Somich, G.A., Amini, S.B. and Pretlow, T.G. (1992) Aberrant crypts correlate with tumor incidence in F344 rats treated with azoxymethane and phytate. *Carcinogenesis*, **13**, 1509-1512.
- Dipple, A. (1995) DNA adducts of chemical carcinogens. *Carcinogenesis*, **16**, 437-441.
- Loveless, A. (1969) Possible relevance of *O*-6 alkylation of deoxyguanosine to the mutagenicity and carcinogenicity of nitrosamines and nitrosamides. *Nature*, **223**, 206-207.
- Bonatti, S., Aprile, A., Arena, G., Cavaleri, Z., Pellerano, P., Rocco, M., Sailer, K., Viaggi, S. and Abbondandolo, A. (1995) Induction of kinetochore-containing micronuclei by exogenous *O*⁶-methylguanine requires conversion of the methylated base to a nucleotide. *Environ. Mol. Mutagen.*, **26**, 226-233.
- Saffhill, R., Margison, G.P. and O'Connor, P.J. (1985) Mechanisms of carcinogenesis induced by alkylating agent. *Biochim. Biophys. Acta*, **823**, 111-145.
- Bull, A.W., Burd, A.D. and Nigro, N.D. (1981) Effect of inhibitors of tumorigenesis on the formation of *O*⁶-methylguanine in the colon of 1,2-dimethylhydrazine-treated rats. *Cancer Res.*, **41**, 4938-4941.
- Kulkarni, N. and Reddy, B.S. (1994) Inhibitory effect of *Bifidobacterium longum* cultures on the azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation and fecal bacterial β -glucuronidase. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **207**, 278-283.
- Reddy, B.S., Weisburger, J.H., Narisawa, T. and Wynder, E.L. (1974) Colon carcinogenesis in germ-free rats with 1,2-dimethylhydrazine and *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine. *Cancer Res.*, **34**, 2368-2372.
- Takada, H., Hirooka, T., Hiramatsu, Y. and Yamamoto, M. (1982) Effect of β -glucuronidase inhibitor on azoxymethane-induced colonic carcinogenesis in rats. *Cancer Res.*, **42**, 331-334.
- Reddy, B.S. and Maehara, Y. (1984) Dose-response studies of the effect of dietary butylated hydroxyanisole on colon carcinogenesis induced by methylazoxymethanol acetate in female CF1 mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, **72**, 1181-1187.
- Rao, C.V., Nayini, J. and Reddy, B.S. (1991) Effect of oltipraz [5-(2-pyrazinyl)-4-methyl-1,2-dithiol-3-thione] on azoxymethane-induced biochemical changes related to early colon carcinogenesis in male F344 rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **197**, 77-83.
- Slaga, T.J. (1995) Inhibition of the induction of cancer by antioxidants. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **369**, 167-173.
- DiGiovanni, J., Walker, S.C., Beltran, L., Naito, M. and Easton, W.C. Jr. (1999) Evidence for a common genetic pathway controlling susceptibility to mouse skin tumor promotion by diverse classes of promoting agents. *Cancer Res.*, **51**, 1398-1405.

นิพนธ์ค้นฉบับ

ผลของสารสกัดจากตะไคร้และหญ้าปักกิ่งต่อระดับอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง-อัลบูมินแอดดักส์ ในหนูขาวที่ได้รับอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง

ธีระ ชีวรินทร์, วท.ม.,¹ อุษณีย์ วีนิจเขตคำนวน, Ph.D.,¹ Christopher P Wild, Ph.D.²

¹ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, ²Molecular Epidemiology Unit, The University of Leeds, Leeds, U.K.

บทคัดย่อ ได้ศึกษาผลของสารสกัดจากตะไคร้ (*Cymbopogon citratus* Stapf) และหญ้าปักกิ่ง (*Murdannia loriformis*) ต่อการเกิดอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง-อัลบูมินแอดดักส์ในหนูขาวที่ได้รับอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง เมื่อให้หนูขาวได้รับอะฟลาทอกซินบีหนึ่งในปริมาณ 250 ไมโครกรัม (มก.) / กิโลกรัม (กก.) น้ำหนักตัว หลังจากนั้นวัดระดับของอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง-อัลบูมินแอดดักส์ในซีรัมโดยวิธีอิมมูโนโลยีที่เวลาต่าง ๆ ในช่วง 48 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าสามารถเริ่มตรวจหาระดับอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง-อัลบูมินแอดดักส์ได้ภายใน 1 ชั่วโมงหลังจากได้รับอะฟลาทอกซินบีหนึ่งโดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.02 นก./มก. (นก.) / มิลลิกรัม (มก.) อัลบูมิน บุกระดับเพิ่มสูงขึ้นตามเวลาโดยมีค่าสูงสุดที่ 12 ชั่วโมง (ค่าเฉลี่ย 4.85 นก./มก. อัลบูมิน) จากนั้นระดับจะลดลงจนถึง 1.48 นก./มก. อัลบูมิน ที่ 24 ชั่วโมงและอยู่ในระดับคงที่ไปจนถึง 48 ชั่วโมง เมื่อทดลองให้สารสกัดจากตะไคร้หรือหญ้าปักกิ่งแก่หนูเป็นเวลา 10 วันก่อนที่จะได้รับอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง พบว่าการได้รับสารสกัดตะไคร้ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงระดับอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง-อัลบูมินแอดดักส์ในซีรัมของหนูขาว โดยระดับอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง-อัลบูมินแอดดักส์ ยังมีค่าสูงที่สุดที่ 12 ชั่วโมง (ค่าเฉลี่ย 4.66 นก./มก. อัลบูมิน) แต่พบว่าระดับอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง-อัลบูมินแอดดักส์ในหนูขาวที่ได้รับสารสกัดจากหญ้าปักกิ่งจะมีค่าสูงสุดอยู่ที่เวลา 4 ชั่วโมงหลังจากได้รับอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง โดยมีค่าระหว่าง 4.65-5.09 นก./มก. อัลบูมิน ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอะฟลาทอกซินบีหนึ่งอย่างเดียวยุ่ที่เวลาเดียวกัน ที่เวลา 12 ชั่วโมงระดับอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง-อัลบูมินแอดดักส์ในกลุ่มที่ได้รับหญ้าปักกิ่งจะต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับอะฟลาทอกซินบีหนึ่งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เชียงใหม่เวชสาร 2541; 37(1-2): 11-19.

อะฟลาทอกซินบีหนึ่ง (AFB₁) เป็นสารพิษจากเชื้อราในตระกูล *Aspergillus* sp. มีรายงานพบปนเปื้อนได้ในอาหารทั่วไปในประเทศไทย

ติดต่อขอสำเนาบทความที่: ธีระ ชีวรินทร์, วท.ม.,
ภาควิชาชีวเคมี, คณะแพทยศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
e-mail: tchewona@suandok01.medicine.cmu.ac.th

และในเอเชีย การได้รับอะฟลาทอกซินบีหนึ่งมีความสัมพันธ์กับอุบัติการณ์มะเร็งตับในคนและในสัตว์ทดลอง⁽¹⁻³⁾ เมื่ออะฟลาทอกซินบีหนึ่งเข้าสู่ร่างกายจะถูกเอนไซม์ที่อาศัยไซโตโครมพี 450 ในตับ (cytochrome P450 dependent) เปลี่ยนให้เป็นสารตัวกลางที่

สามารถรวมกับสารชีวโมเลกุลในระดับ เช่น ดีเอ็นเอ เป็นอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง-ดีเอ็นเอแอดดักส์⁽⁴⁾ หรือสามารถจับกับโปรตีนในเลือด เช่น อัลบูมิน เป็นอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง-อัลบูมิน-แอดดักส์⁽⁵⁾ ระดับของอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง-อัลบูมินแอดดักส์ใน ซีรัมของหนูขาวมีความสัมพันธ์กับระดับของอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง-ดีเอ็นเอแอดดักส์ในระดับหนู⁽⁶⁾ การตรวจระดับอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง-อัลบูมินแอดดักส์ใน ซีรัมสามารถทำได้ง่ายและรวดเร็ว จึงนิยมใช้เป็นตัวกำหนดทางชีวภาพ (biomarker) ในการบ่งบอกถึงการได้รับอะฟลาทอกซินบีหนึ่งจากอาหารและสามารถใช้บอกถึงปริมาณของอะฟลาทอกซินบีหนึ่งที่อาจไปทำให้เกิดเอ็นเอผิดปกติด้วย

จากการศึกษาพบว่าสารสกัดจากตะไคร้ (*Cymbopogon citratus*) และหญ้าปักกิ่ง (*Murdannia loriformis*) มีฤทธิ์ในการต้านการกลายพันธุ์ที่เหนี่ยวนำโดยสารก่อมะเร็งหลายชนิด โดยเฉพาะอะฟลาทอกซินบีหนึ่งและมีฤทธิ์ต้านการก่อมะเร็งในสัตว์ทดลอง⁽⁷⁻¹⁰⁾ แต่ยังไม่เคยมีรายงานเกี่ยวกับผลของสมุนไพรทั้งสองต่อการได้รับอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง งานวิจัยนี้จึงทำขึ้นเพื่อที่จะศึกษาผลของสมุนไพรทั้งสองชนิดนี้ต่อเมแทบอลิซึมของอะฟลาทอกซินบีหนึ่งในระดับของหนูที่ได้รับอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง โดยจะศึกษาผลของการได้รับสารสกัดเป็นเวลา 10 วันก่อนที่จะได้รับอะฟลาทอกซินบีหนึ่งต่อระดับของอะฟลาทอกซิน-อัลบูมินแอดดักส์ในซีรัมของหนูที่เวลาต่าง ๆ กันในช่วงเวลา 48 ชั่วโมงหลังจากได้รับอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง

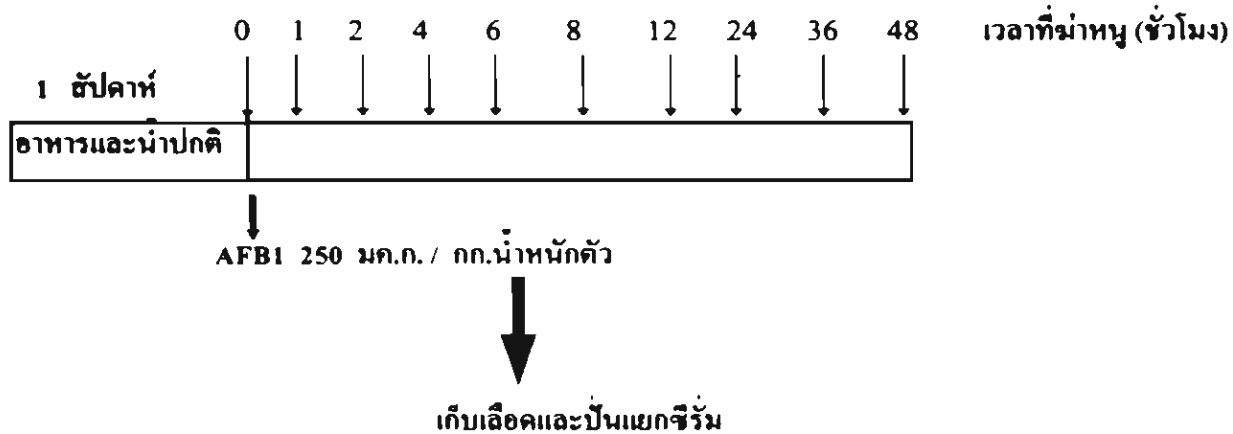
วัสดุและวิธีการ

สารเคมี AFB1-ovalbumin conjugate, Antibody ต่อ AFB1-lysine adducts, AFB1-lysine standard, Goat anti-rabbit IgG peroxidase conjugate และ Fetal calf serum, ได้รับคำแนะนำจาก Professor Christopher P Wild, Molecular Epidemiology Unit, The University of Leeds, U.K.

การเตรียมสารสกัด นำตะไคร้และหญ้าปักกิ่งมาล้างให้สะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 °C นำส่วนที่แห้งมาบดให้เป็นผงแล้วนำผงแห้งที่ได้สกัดด้วยเอทานอล 80% ด้วยอัตราส่วน 100 กรัม ต่อ เอทานอล 1 ลิตร โดยการกวน 4 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง หลังจากการกรอง นำส่วนกากกลับไปสกัดอีกครั้ง นำส่วนที่กรองได้ทั้งหมดมารวมกันและนำไประเหยเอทานอลโดยเครื่อง vacuum rotatory evaporator จากนั้นทำให้แห้งด้วยเครื่อง lyophilizer เอาผงสกัดแห้งที่ได้ละลายใน 25% DMSO ให้ได้ความเข้มข้นของสารตามต้องการ

การหาระดับของอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง-อัลบูมินแอดดักส์ในซีรัมที่เวลาต่าง ๆ กันในช่วง 48 ชั่วโมงหลังจากได้รับอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง

ใช้หนูขาวสายพันธุ์ Wistar เพศผู้ อายุประมาณ 2 อาทิตย์ น้ำหนัก 70-80 กรัม เลี้ยงในกรง ๆ ละ 3 ตัว ให้น้ำและอาหารอย่างเพียงพอเป็นเวลา 1 อาทิตย์ก่อนเริ่มทดลอง หลังจากนั้นให้อะฟลาทอกซินบีหนึ่ง ปริมาณ 250 ไมโครกรัม (มก.ก)/กก. น้ำหนักตัว โดยการ



แผนการทดลองที่ 1. แสดงเวลาของการให้อะฟลาทอกซินบีหนึ่งและการหาระดับอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง-อัลบูมินแอคติกส์ หลังจากได้รับอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง

ป้อนทางปาก เริ่มนำหนูครั้งละ 3 ตัว ที่เวลา 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36, และ 48 ชั่วโมงตามลำดับหลังจากได้รับอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง ดังแสดงในแผนการทดลองที่ 1 เก็บเลือดและแยกซีรัมโดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2000 รอบต่อนาทีนาน 10 นาที แบ่งซีรัมใส่หลอดเก็บไว้ที่ -20°C เพื่อนำไปหาปริมาณ อะฟลาทอกซินบีหนึ่ง-อัลบูมินแอคติกส์ต่อไป

การศึกษาผลของสารสกัดจากสมุนไพรต่อระดับอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง-อัลบูมิน แอคติกส์

หลังจากเลี้ยงหนูขาวเป็นเวลา 1 อาทิตย์ แบ่งหนูขาวเป็น 7 กลุ่ม ๆ ละ 3 ตัวให้สารสกัดและอะฟลาทอกซินบีหนึ่งดังแสดงในแผนการทดลองที่ 2 หนู 3 ตัวจากแต่ละกลุ่มถูกฆ่าที่เวลา 0, 4, 12, 24, และ 48 ชั่วโมงหลังได้รับอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง เก็บเลือดและแยกซีรัมเพื่อนำไปหาปริมาณอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง-อัลบูมิน แอคติกส์เช่นเดียวกัน

การหาปริมาณอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง-อัลบูมินแอคติกส์ โดยวิธี ELISA

นำซีรัม 0.5 มล. มาแยกอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง-อัลบูมินแอคติกส์ และทำให้บริสุทธิ์เพื่อนำไปหาปริมาณ อะฟลาทอกซินบีหนึ่ง-อัลบูมินแอคติกส์โดยวิธี ELISA ที่ได้รายงานไว้โดย Wild และคณะ⁽¹⁾ ปริมาณจะแสดงในรูปของอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง-อัลบูมินแอคติกส์ ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ นำ plate ที่เคลือบ aflatoxin-ovalbumin (AFB1-OVA) มาล้างด้วย PBS-Tween เคลือบส่วนของ plastic ที่ไม่จับกับ AFB1-OVA ด้วย 0.1% ovalbumin ล้าง plate ด้วย PBS-Tween เติมน้ำ PBS (positive control), AFB1-lysine มาตรฐาน (standard) หรือสารที่จะทดสอบ อย่างละ 25 มก.ล. ต่อหลุม เติมน้ำ antibody ต่ออะฟลาทอกซินบีหนึ่ง-อัลบูมินแอคติกส์ หลุมละ 25 มก.ล. เขย่า plate ที่อุณหภูมิห้อง 90 นาที เมื่อครบเวลาล้าง plate ด้วย PBS-Tween เติมน้ำ goat anti-rabbit IgG peroxidase

conjugate ที่เจือจาง 1:5000 ใน PBS หลุมละ 50 มก.ล. บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 นาที หลังจากล้าง plate นำไปเติม TMB เพื่อทำให้เกิดสี ทิ้งไว้ 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 1M HCl ปริมาตร 50 มก.ล. นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงของ blank (OD_B), positive control (OD_C) และ standard หรือ sample (OD_S) ไปคำนวณหา % inhibition จากสูตร

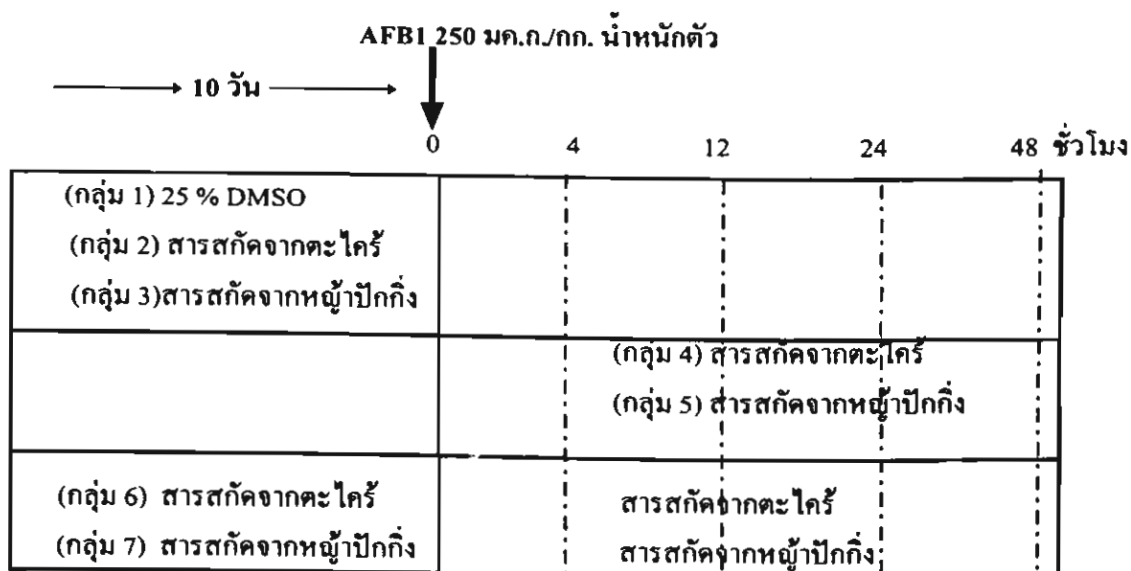
$$\% \text{ inhibition} = \left[1 - \left(\frac{OD_S - OD_B}{OD_C - OD_B} \right) \right] \times 100$$

นำไปวาดกราฟมาตรฐานระหว่าง % inhibition กับปริมาณอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง-ลิซซินแอคติกส์ จากนั้นหาค่า % inhibition จากหลุมที่ใส่

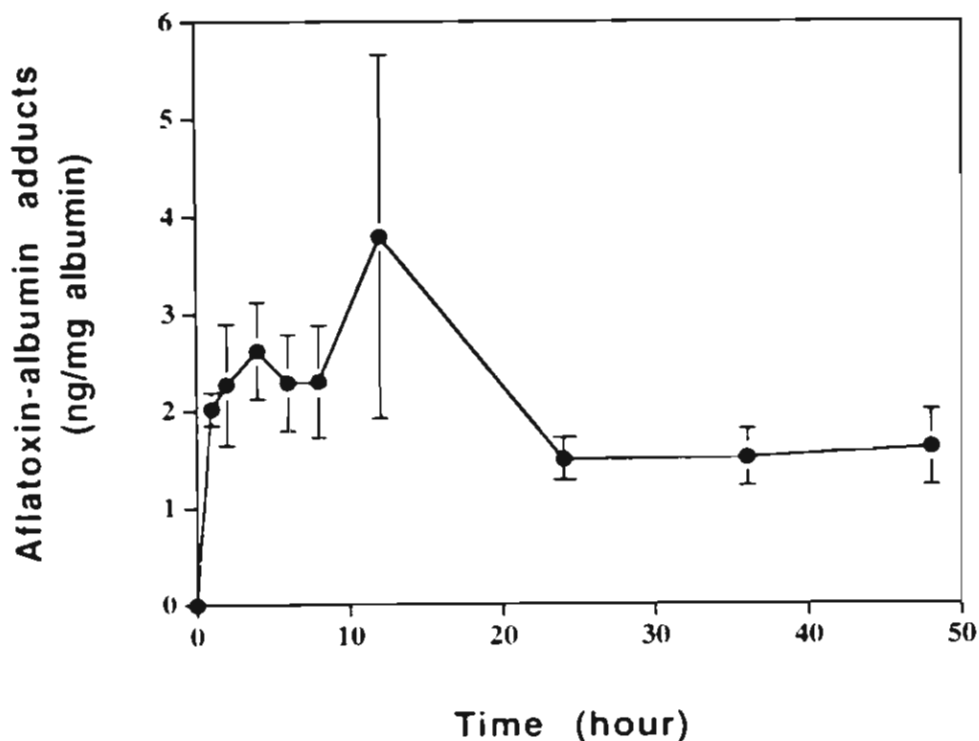
สารทดสอบนำไปหาค่าอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง-ลิซซินแอคติกส์ จากกราฟมาตรฐาน

ผลการทดลอง

ในกลุ่มควบคุมเริ่มตรวจพบระดับอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง-อัลบูมินแอคติกส์ ได้ที่ 1 ชั่วโมง หลังจากได้รับอะฟลาทอกซินบีหนึ่งโดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.02 ± 0.17 นาโนกรัม (นก.)/มก. อัลบูมิน (รูปที่ 1) ระดับอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง-อัลบูมินแอคติกส์จะเพิ่มขึ้นจนมีค่าสูงสุดที่ 12 ชั่วโมงหลังจากได้รับอะฟลาทอกซินบีหนึ่งโดยมีค่าเฉลี่ย 4.85 ± 0.69 นก./มก. อัลบูมิน จากนั้นระดับจะมีค่าลดลงจนถึง 1.48 ± 0.13 นก./มก. อัลบูมิน ที่ 24 ชั่วโมงและคงที่ไปตลอด 48 ชั่วโมงที่ทำการวัด



แผนการทดลองที่ 2. การศึกษาผลของสารสกัดตะไคร้และหญ้าปักกิ่งต่อระดับอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง-อัลบูมินแอคติกส์ ที่เวลาต่างๆ หลังจากได้รับอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง (↓แสดงเวลาให้อะฟลาทอกซินบีหนึ่ง) (--- แสดงเวลาที่เก็บซีรัม ที่ 4, 12, 24, และ 48 ชั่วโมงหลังจากได้รับอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง)



รูปที่ 1. ระดับอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง-อัลบูมินแอคติกส์ที่เวลาต่างๆ ในช่วง 48 ชั่วโมงหลังจากได้รับอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง

การได้รับสารสกัดจากตะไคร้ 10 วันก่อนที่
จะได้รับอะฟลาทอกซินบีหนึ่งแล้วหยุดได้รับ
(กลุ่มที่ 2) หรือ ได้รับต่อไป (กลุ่มที่ 6) ระดับ
อะฟลาทอกซินบีหนึ่ง-อัลบูมินแอคติกส์ ที่ 4
ชั่วโมงและค่าสูงที่สุดที่ 12 ชั่วโมงหลังจากได้
รับอะฟลาทอกซินบีหนึ่งไม่มีค่าที่แตกต่างไป
จากกลุ่มที่ได้รับอะฟลาทอกซินบีหนึ่งอย่าง
เดียว โดยมีค่าเฉลี่ย 4.66 ± 1.56 และ $4.55 \pm$
 1.08 นก./มก. อัลบูมินตามลำดับ กลุ่มที่ได้รับ
สารสกัดตะไคร้หลังการได้รับอะฟลาทอกซิน
บีหนึ่ง (กลุ่มที่ 4) มีค่าอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง-
อัลบูมินแอคติกส์ ที่เวลา 4 ชั่วโมงค่อนข้างสูง
กว่ากลุ่มที่ได้รับเฉพาะอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง
อย่างเดียวนำ แต่ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ
(ตารางที่ 1)

การได้รับสารสกัดจากเห็ดฟ้าปิ้งกึ่งเป็นเวลา
10 วันก่อนได้รับอะฟลาทอกซินบีหนึ่งแล้ว
หยุดได้รับ (กลุ่มที่ 3) หรือได้รับต่อไป (กลุ่มที่
7) ระดับอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง-อัลบูมินแอค-
ติกส์ ที่ 4 ชั่วโมงจะมีค่าสูงที่สุดและมีค่าที่แตก
ต่างไปจากกลุ่มที่ได้รับอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง
อย่างเดียวยังมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)
โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 4.65 ± 0.44 และ 5.09
 ± 0.57 นก./มก. อัลบูมินตามลำดับ กลุ่มที่ได้รับ
สารสกัดจากเห็ดฟ้าปิ้งกึ่งหลังการได้รับอะฟลา
ทอกซินบีหนึ่ง (กลุ่มที่ 5) มีค่าอะฟลาทอกซิน
บีหนึ่ง-อัลบูมินแอคติกส์ ที่เวลา 4 ชั่วโมง ไม่มี
ความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่2) การได้รับ
สารสกัดจากเห็ดฟ้าปิ้งกึ่งก่อน, หลังหรือทั้งก่อน
และหลังจากได้รับอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง ระดับ

ตารางที่ 1. ผลของสารสกัดตะไคร้ต่อการเกิดอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง-อัลบูมิน แอคติกส์ในหนูขาว

การทดลอง	อะฟลาทอกซินบีหนึ่ง- อัลบูมิน แอคติกส์ (นก./มก. อัลบูมิน) ^a			
	เวลา (ชั่วโมง)			
	4	12	24	48
กลุ่ม 1	2.21±0.71	4.29±1.28	2.95±0.50	1.07±0.56
กลุ่ม 2	1.88±0.37	4.66±1.56	2.29±0.95	1.16±0.23
กลุ่ม 6	2.86±0.94	4.55±1.08	2.53±1.27	1.37±0.43
กลุ่ม 4	3.24±0.36	4.29±1.96	2.47±0.38	1.34±0.82

a, เฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางที่ 2. ผลของสารสกัดหญ้าปักกิ่งต่อการเกิดอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง-อัลบูมิน แอคติกส์ในหนูขาว

การทดลอง	อะฟลาทอกซินบีหนึ่ง- อัลบูมิน แอคติกส์ (นก./มก. อัลบูมิน) ^a			
	เวลา (ชั่วโมง)			
	4	12	24	48
กลุ่ม 1	2.21±0.72	4.29±1.27	2.95±0.50	1.07±0.60
กลุ่ม 3	4.65±0.44 ^b	2.63±0.51 ^c	3.23±0.45	1.72±0.63
กลุ่ม 7	5.09±0.5 ^b	3.73±1.30 ^c	2.65±0.70	1.89±1.06
กลุ่ม 5	4.63±2.30	2.75±0.66 ^c	2.67±0.33	2.17±0.95

a, ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, bc ; แตกต่างจากกลุ่มควบคุม $p < 0.05$

อะฟลาทอกซินบีหนึ่ง-อัลบูมินแอคติกส์ที่ 12 ชั่วโมงจะต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับอะฟลาทอกซินบีหนึ่งอย่างเดียวย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

วิจารณ์

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าหลังจากที่หนูขาวได้รับอะฟลาทอกซินบีหนึ่งเข้าไปจะสามารถตรวจวัดระดับของ อะฟลาทอกซินบีหนึ่ง-อัลบูมินแอคติกส์ในซีรัมได้ในเวลา 1 ชั่วโมงหลังจากการได้รับอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง และระดับจะเพิ่มมากขึ้นจนถึงระดับสูงสุดที่ 12 ชั่วโมง จากนั้นระดับจะลดลงมาจนถึงตั้งแต่ 24, 36 จนถึง 48 ชั่วโมง โดยระดับที่คงที่นี้อาจเป็นปริมาณที่สามารถสะสมได้ในรูปที่รวม

กับอัลบูมินหลังจากได้รับอะฟลาทอกซินเพียง 1 ครั้ง อะฟลาทอกซินบีหนึ่ง-อัลบูมินแอคติกส์จึงสามารถใช้เป็นตัวกำหนดทางชีวภาพที่บอกถึงภาวะของการได้รับ อะฟลาทอกซินบีหนึ่งเข้าสู่ร่างกายได้และตัวกำหนดทางชีวภาพ นี้มีความเสถียรอยู่ในซีรัมได้เป็นเวลานาน (48 ชั่วโมง) ทั้งนี้เคยมีรายงานว่าผู้ที่ได้รับอะฟลาทอกซินบีหนึ่งอย่างสม่ำเสมอจะสามารถเกิดการสะสมอะฟลาทอกซินบีหนึ่งได้มากถึง 30 เท่า เมื่อเทียบกับที่ได้รับอะฟลาทอกซินบีหนึ่งเพียงครั้งเดียว⁽⁵⁾

จากการทดลองแสดงว่าสารสกัดจากตะไคร้ 80% ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงการเกิดอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง-อัลบูมินแอคติกส์แต่อย่างใด ไม่ว่าจะเป็นกลุ่มที่ได้รับก่อน, หลังหรือทั้งก่อน

และหลังจากการได้รับอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง

แต่การศึกษาครั้งนี้แสดงว่าสารสกัดจากเห็ดปอกกิ่งอาจเร่งให้การรวมตัวกันระหว่างเมตาบอไลต์ของอะฟลาทอกซินบีหนึ่งกับอัลบูมินเกิดเร็วขึ้น เพราะสามารถตรวจพบระดับของอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง-อัลบูมินแอดดักส์สูงสุดที่ 4 ชั่วโมงหลังจากได้รับอะฟลาทอกซินบีหนึ่งซึ่งเร็วกว่ากลุ่มควบคุมซึ่งได้รับเพียงอะฟลาทอกซินบีหนึ่งที่แสดงค่าสูงสุดที่ 12 ชั่วโมง และระดับของอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง-อัลบูมินแอดดักส์ที่สูงสุดที่เวลานี้สูงกว่ากลุ่มที่ได้รับเพียงอะฟลาทอกซินบีหนึ่งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้เห็ดปอกกิ่งอาจจะมีผลเร่งขบวนการเกิดอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง-อัลบูมินแอดดักส์ซึ่งอาจเป็นการเร่งปฏิกิริยาการรวมตัวกัน (rate of adduct formation) เพื่อนำไปขับออก เนื่องจากการรวมตัวกันระหว่างเมตาบอไลต์ของอะฟลาทอกซินบีหนึ่งกับอัลบูมินนั้นอาจเป็นขบวนการลดปริมาณของ aflatoxin-8,9-epoxide ซึ่งเป็นสารตัวกลางที่เกิดจากเมแทบอลิซึมของอะฟลาทอกซินบีหนึ่งในตับที่สามารถไปจับโมเลกุลของดีเอ็นเอ⁽¹²⁾ การที่สารสกัดเห็ดปอกกิ่งเร่งการเกิดอะฟลาทอกซินอัลบูมินแอดดักส์นั้นอาจจะเป็นการเร่งขบวนการกำจัดพิษของอะฟลาทอกซินบีหนึ่งได้อีกทางหนึ่ง จากรายงาน⁽¹³⁻¹⁵⁾ พบว่าการได้รับอะฟลาทอกซินบีหนึ่งในปริมาณ 20 มก.ก./กก. น้ำหนักตัวเพียงครั้งเดียวจะสามารถตรวจพบอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง-ดีเอ็นเอแอดดักส์ในตับได้และทำให้เกิดความผิดปกติของเซลล์ตับตามมา เนื่องจากในการทดลองครั้งนี้ยังไม่ได้มีการวัดระดับอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง-ดีเอ็นเอแอดดักส์ที่เกิดขึ้นด้วย ดังนั้นจึงยังไม่สามารถ

ระบุลงไปได้ว่าระดับอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง-อัลบูมินแอดดักส์ที่พบในการทดลองนี้จะมีความสัมพันธ์กับระดับอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง-ดีเอ็นเอแอดดักส์อย่างไร หรือการที่เห็ดปอกกิ่งเร่งให้เกิด อะฟลาทอกซินบีหนึ่ง-อัลบูมินแอดดักส์เร็วขึ้นนั้นจะมีบทบาทเร่งการเกิดอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง-ดีเอ็นเอแอดดักส์หรือไม่ ซึ่งการวิเคราะห์ระดับดีเอ็นเอแอดดักส์ดังกล่าวด้วยนั้นอาจจะทำให้มีข้อมูลที่สามารถนำไปอธิบายบทบาทของสารสกัดจากเห็ดปอกกิ่งต่อการป้องกันความเป็นพิษที่อาจเกิดจากการได้รับอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง อนึ่งงานวิจัยนี้เป็นเพียงรายงานเบื้องต้น ดังนั้นผลที่ได้เพียงชี้แจงแนวโน้มของการใช้สารสกัดนี้ในการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคตต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย 03/2538

เอกสารอ้างอิง

1. Busby WF, Wogan GN. Aflatoxins. In : Scarle CE, editor. Chemical carcinogens, 2nd ed. Washington D.C.: American Society, 1984: 945-1136.
2. Shank RC, Wogan GN, Gibson JB. Dietary aflatoxins and human liver cancer I. Toxigenic moulds in foods and foodstuffs of Tropical South-East Asia. Food Cosmet Toxicol 1972; 10: 51-60.
3. Shank RC, Nondasuta A. Dietary aflatoxins and human liver cancer II. Aflatoxins in market foods and foodstuffs of Thailand and Hong Kong. Food Cosmet Toxicol 1972; 10: 61-9.
4. Sabbioni G, Skipper P, Buchi G, Tannenbaum SR. Isolation and characterization of the major serum albumin adduct formed by aflatoxin B1 in vivo in rats. Carcinogenesis 1987; 8: 819-24.
5. Wild CP, Garner RC, Montesano R, Tursi F. Aflatoxin B1 binding to plasma albumin and liver DNA upon chronic administration to rats. Carcinogenesis 1986; 7: 853-58.

6. Groopman JD, DeMatos P, Egner PA, Love-Hunt A, Kensler TW. Molecular dosimetry of urinary aflatoxin-N7-guanine and serum aflatoxin-albumin adducts predicts chemoprotection by 1,2-dithiole-3-thione in rat. *Carcinogenesis* 1992; 13: 101-6.
7. Vinitketkumnuan U, Puatanachokechai R, Kongtaweelert P, Lertprasertsuke N, Matsushima T. Antimutagenicity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf) to various known mutagens in salmonella mutation assay. *Mutat Res* 1994; 341: 71-5.
8. Sukbantoeng J. Effect of lemongrass extract on aflatoxin B1 mutagenesis activated by liver microsomal enzyme [dissertation]. Chiang Mai: Chiang Mai University, 1996.
9. Charoenkunnatham W. Antimutagenicity and DT-diaphorase inducing activity of *Murdannia loriformis* [dissertation]. Chiang Mai: Chiang Mai University, 1995.
10. Vinitketkumnuan U, Charoenkunnatham W, Kongtaweelert P, Lertprasertsuk N, Picha P, Matsushima T. Antimutagenic and DT-diaphorase induce activity of Thai medicinal plant *Murdannia loriformis*. *J Herbs, Spices & Medicinal plants* 1996; 4: 45-52.
11. Wild CP, Jiang YZ, Chapot B, Montesano R. Evaluation of methods of quantification of aflatoxin albumin adducts and their application to human exposure assessment. *Cancer Res* 1990; 50: 241-51.
12. Eaton DL, Ramsdell HS, Neal GE. Biotransformation of aflatoxins. In: Eaton DL, Groopman JD, eds. *The toxicology of aflatoxins*. San Diego: Academic press, 1994.
13. Skipper PL, Tannenbaum SR. Protein adducts in the molecular dosimetry of chemicalcarcinogens. *Carcinogenesis* 1990; 11: 507-18.
14. Appleton BS, Goetchius MP, Campbell TC. Linear dose-response curve for the hepatic macromolecule binding of aflatoxin B1 in rats at very low exposure. *Cancer Res* 1982; 42: 3659-62.
15. Groopman JD, Donahue PR, Zhu J, Chen JS, Wogan GN. Aflatoxin metabolism in humans : detection of metabolites and nucleic acid adducts in urine by affinity chromatography. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 6492-7.

EFFECTS OF LEMONGRASS (*Cymbopogon Citratus* STAPF) AND *Murdannia Loriformis* EXTRACTS ON AFLATOXIN-ALBUMIN ADDUCTS LEVELS IN RATS EXPOSED TO AFLATOXIN B₁

Teera Chewonarin, B.Sc.,¹ Usanee Vinitketkumnuen, Ph.D.,¹ Christopher P Wild, Ph.D.,²

¹Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand, ²Molecular Epidemiology Unit, The University of Leeds, Leeds, UK

Abstract The modulating effects on aflatoxin-albumin adducts formation in sera of rats exposed to aflatoxin B₁ (AFB₁) by the 80% ethanol extract of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf) and *Murdannia loriformis* were investigated. Level of aflatoxin-albumin adducts in rats sera was examined by ELISA at different time after single dosing of AFB₁ 250 µg/Kg body weight over a 48 hours period after dosing. The results showed that levels of aflatoxin-albumin adducts were detected at 1 hour after AFB₁ dosing with a mean of 2.02 ng/mg albumin. The levels were sequentially increased to the maximum level at 12 hours after dosing (with a mean of 4.85 ng/mg albumin). After that the levels of adducts declined to the steady state level at 1.48 ng/mg albumin at 24 hours, until 48 hours after AFB₁ administration. Administration of lemongrass extract to the rats for 10 days before AFB₁ dosing produced no change in aflatoxin-albumin adduct levels. Whereas, rats received *Murdannia loriformis* extract for 10 days before AFB₁ dosing the adducts formation seem to occur more rapidly. The time course for reaching the maximal level was observed at 4 hour with a range of 4.65 - 5.09 ng/mg albumin. These levels was significantly higher than rats who were given AFB₁ only ($p < 0.05$). At 12 hours after AFB₁ dosing, levels of aflatoxin-albumin adducts in rats receiving *Murdannia loriformis* were significant lower than AFB₁-treated group ($p < 0.05$). **Chiang Mai Med Bull 1998; 37(1-2): 11-19.**

ภาคผนวก

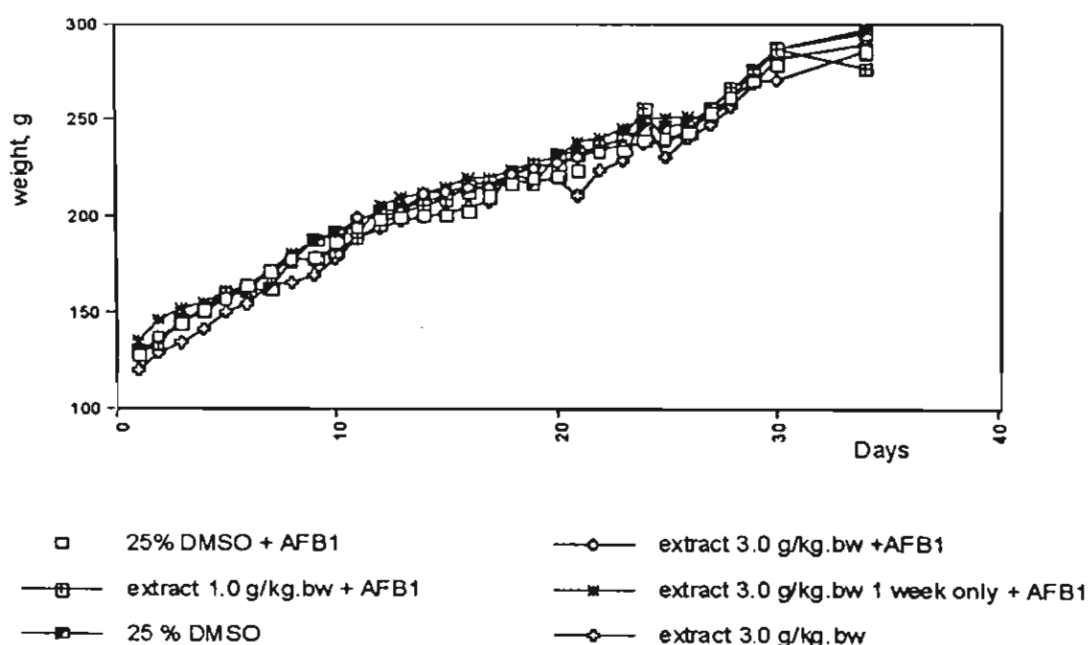
1. วิธีหาปริมาณโปรตีนโดย Bradford assay

เตรียมสารละลายโปรตีน (bovine serum albumin) มาตรฐานความเข้มข้น (500 $\mu\text{g/ml}$) และนำไปเตรียม standard curve ดังนี้

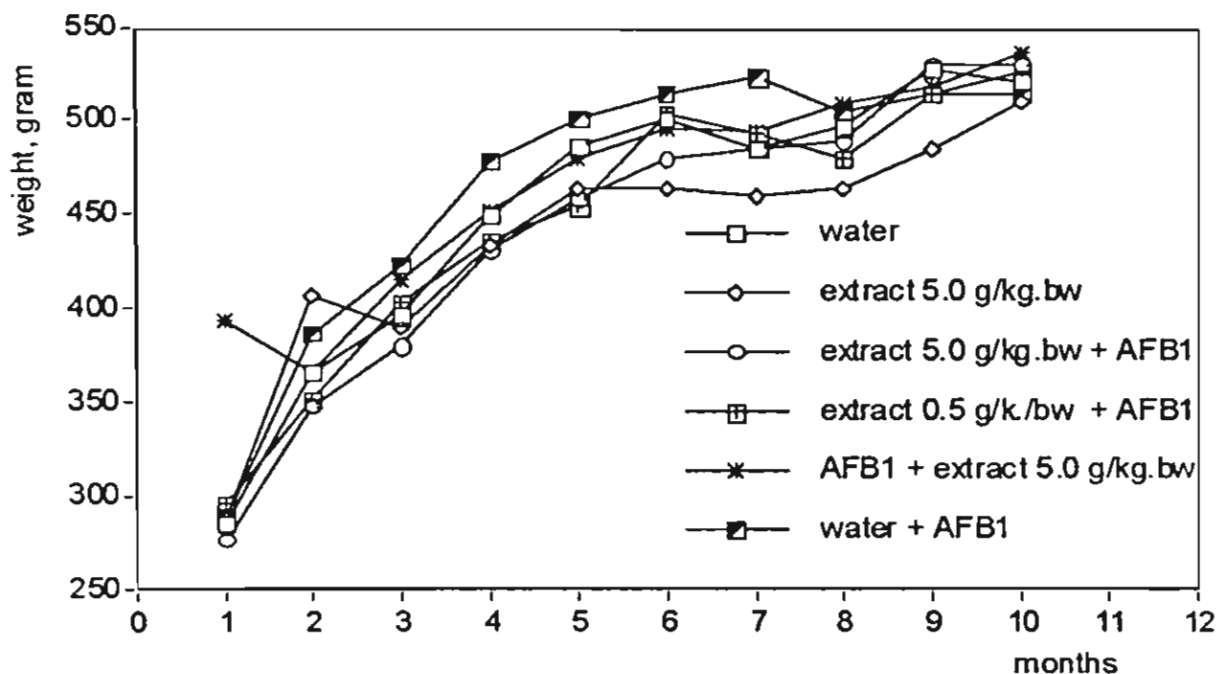
1. ใช้สารละลายตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร
2. เติม Coomassie reagent (Coomassie Brilliant Blue G250 100 mg + 95% ethanol 50 ml + 85% phosphoric acid 100 ml + distilled water to 1000 ml) 5 มล.
3. นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 595 nanometer
4. หาปริมาณโปรตีนจาก standard curve ที่เตรียม

2. กราฟแสดงน้ำหนักโดยเฉลี่ยของหนูขาวที่ได้รับสารสกัดจากสมุนไพรและอะฟลาทอกซิน บี หนึ่ง ตลอดระยะเวลา 10 เดือนที่ทดสอบ

การได้รับสารสกัดจากตะไคร้หรือหญ้าปักกิ่งเป็นเวลา 1 เดือน ไม่ทำให้น้ำหนักตัวของหนูขาวเปลี่ยนแปลงไปจากกลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัด และการให้อะฟลาทอกซินบีหนึ่งร่วมกับ น้ำหนักตัวหนู ไม่มีความแตกต่างกันในแต่ละกลุ่มทดลอง

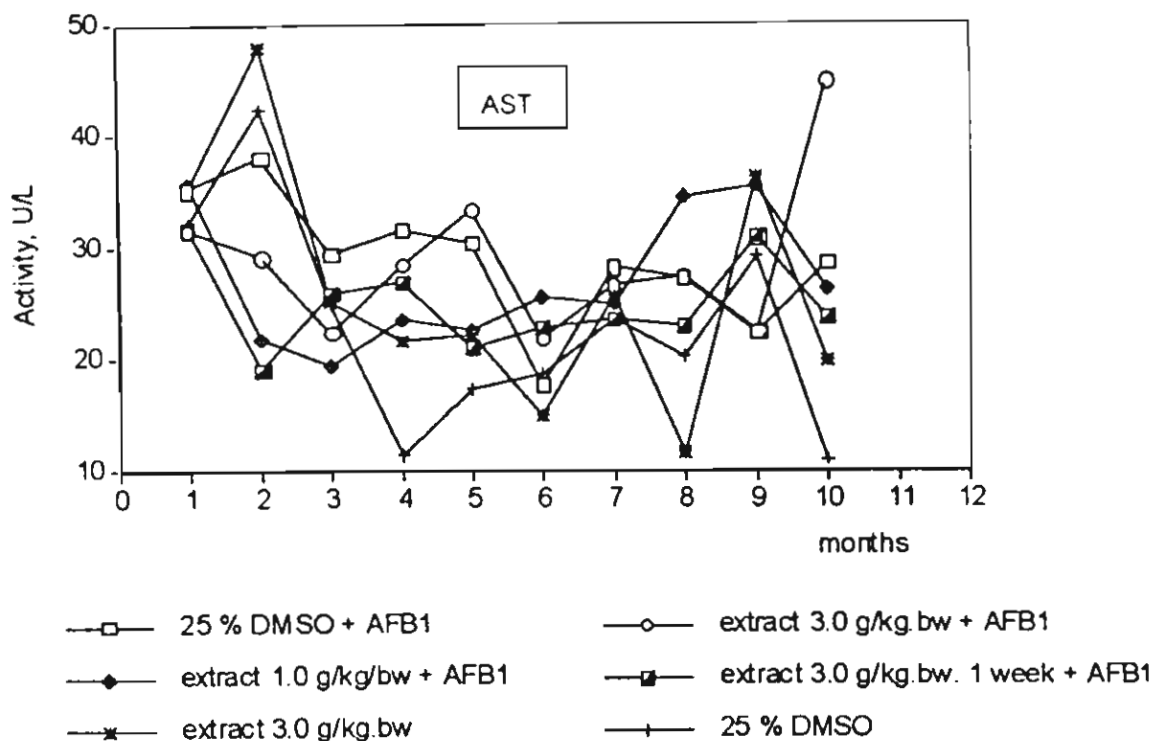
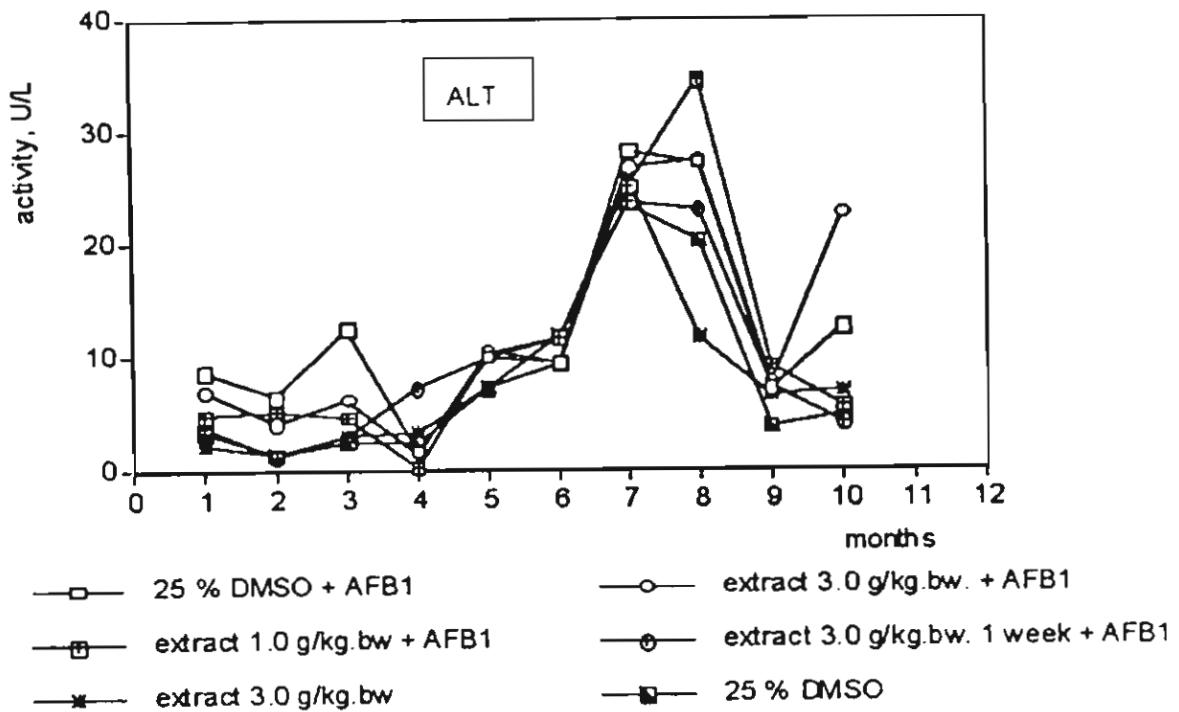


รูปแสดงน้ำหนักตัวโดยเฉลี่ย (หนู 10 ตัว/กลุ่ม) ในเวลา 1 เดือนหลังจากการได้รับ 25% DMSO หรือ สารสกัดจากหญ้าปักกิ่งที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และได้รับหรือไม่ได้รับอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง ขนาด 250 ไมโครกรัม/กก. น้ำหนักตัว 5 วันต่ออาทิตย์เป็นเวลา 3 อาทิตย์

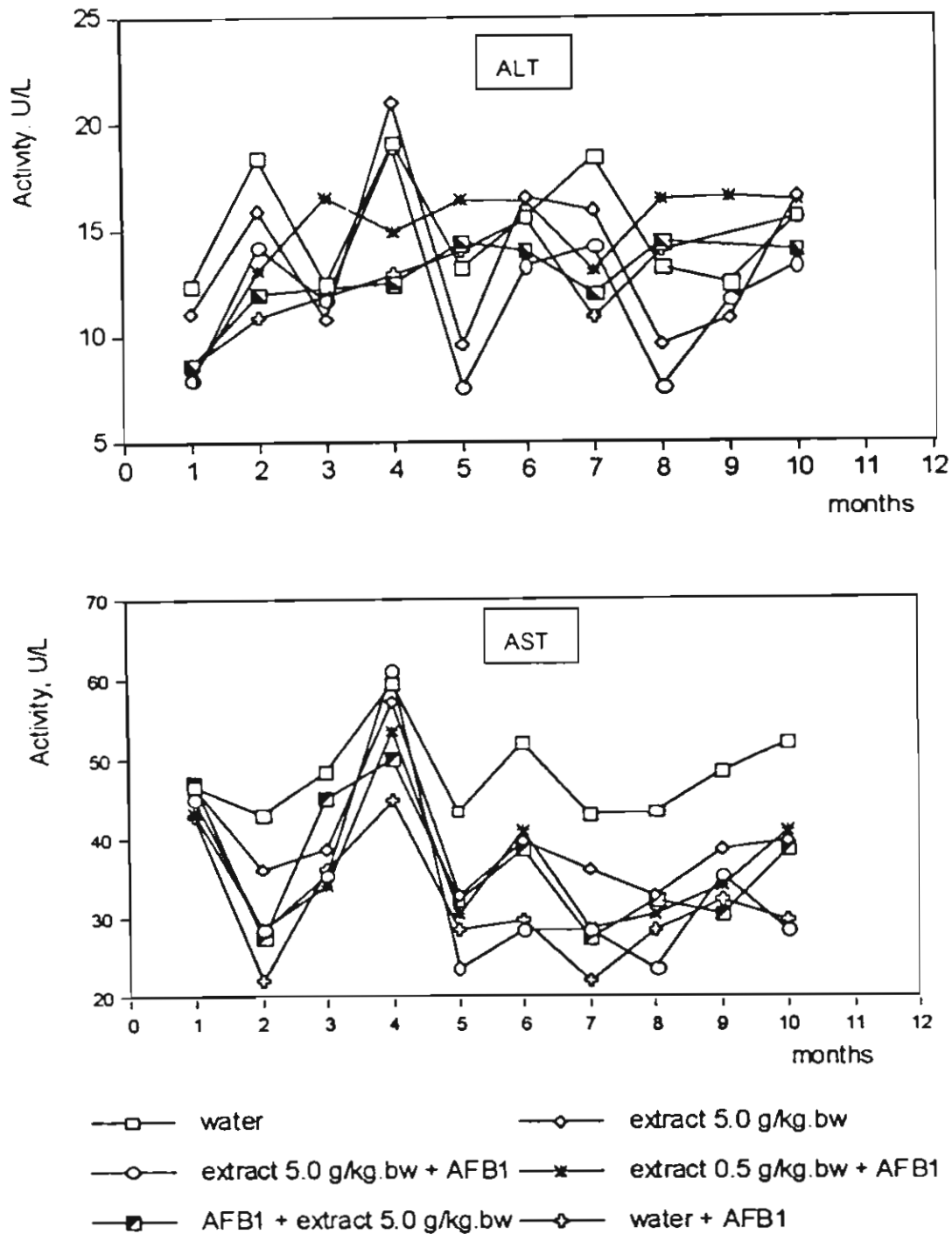


รูปแสดงน้ำหนักตัวโดยเฉลี่ย (หนู 10 ตัว/กลุ่ม) ในเวลา 10 เดือนหลังจากการได้รับ 25% DMSO หรือ สารสกัดจากตะไคร้ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และได้รับหรือไม่ได้รับอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง ขนาด 250 ไมโครกรัม/กก. น้ำหนักตัว 5 วันต่ออาทิตย์เป็นเวลา 3 อาทิตย์

การให้อะฟลาทอกซินบีหนึ่งแก่หนูทดลองเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งตับในช่วงระยะเวลา 10 เดือน พบว่าไม่สามารถทำให้เกิดมะเร็งตับได้ตามวัตถุประสงค์ ทั้งนี้จากการติดตามวัดระดับเอนไซม์สำคัญ 2 ตัว คือ ALT และ AST ซึ่งใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงความเสียหายของเซลล์ตับ ไม่พบว่ามีความผิดปกติของตับเกิดขึ้น ระดับเอนไซม์ในกลุ่มที่ได้รับหรือไม่ได้รับอะฟลาทอกซินบีหนึ่งไม่มีความแตกต่างจากค่าปกติ



รูปแสดงระดับเฉลี่ยจากหนู 10 ตัว/กลุ่ม ของเอนไซม์ (บน) ALT (alanine aminotransferase) และ (ล่าง) AST (aspartate aminotransferase) ในเวลา 10 เดือนหลังจากการได้รับ 25% DMSO หรือ สารสกัดจากหญ้าปักกิ่งที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และได้รับหรือไม่ได้รับอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง ขนาด 250 ไมโครกรัม/กก. น้ำหนักตัว 5 วันต่ออาทิตย์เป็นเวลา 3 อาทิตย์



รูปแสดงระดับเฉลี่ยจากหนู 10 ตัว/กลุ่ม ของเอนไซม์ (บน) ALT (alanine aminotransferase) และ (ล่าง) AST (aspartate aminotransferase) ในเวลา 10 เดือนหลังจากการได้รับ 25% DMSO หรือ สารสกัดจากตะไคร้ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และได้รับหรือไม่ได้รับอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง ขนาด 250 ไมโครกรัม/กก.น้ำหนักตัว 5 วันต่ออาทิตย์เป็นเวลา 3 อาทิตย์

การเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งตับโดยให้หนูขาวได้รับอะฟลาทอกซินบีหนึ่งขนาด 250 ไมโครกรัม/กก. น้ำหนักตัว เป็นเวลา 5 วันต่ออาทิตย์และได้รับ 3 อาทิตย์ต่อเนื่องกัน เมื่อครบ 10 เดือน ไม่สามารถตรวจพบความผิดปกติทางพยาธิวิทยาใดๆ ในเซลล์ตับ และระดับเอนไซม์ glutathione-S-transferase ในตับของหนูแต่ละกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันแต่อย่างใด

ตารางแสดงระดับเอนไซม์ glutathione-S-transferase ในตับของหนูที่เวลา 10 เดือนหลังจากที่ได้รับสมุนไพรรและอะฟลาทอกซิน 1 เดือน

กลุ่มทดลอง	ระดับเอนไซม์ GST ($\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg.protein}$)
1. 25 % DMSO + AFB1	404.1 ± 29.9
2. หญ้าปักกิ่ง 3 ก/กก. น้ำหนักตัว + AFB1	411.5 ± 45.5
3. หญ้าปักกิ่ง 1 ก/กก. น้ำหนักตัว + AFB1	371.3 ± 31.4
4. หญ้าปักกิ่ง 3 ก/กก. น้ำหนักตัว 1 อาทิตย์+ AFB1	433.9 ± 17.2
5. 25 % DMSO	392.3 ± 31.7
6. หญ้าปักกิ่ง 3 ก/กก. น้ำหนักตัว	418.0 ± 18.1

กลุ่มทดลอง	ระดับเอนไซม์ GST ($\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg.protein}$)
1. น้ำ	403.7 ± 135.7
2. ตะไคร้ 5 ก/กก. น้ำหนักตัว	405.1 ± 122.3
3. ตะไคร้ 5 ก/กก น้ำหนักตัว + AFB1	345.7 ± 96.8
4. ตะไคร้ 0.5 ก/กก. น้ำหนักตัว + AFB1	400.9 ± 79.8
5. AFB1 + ตะไคร้ 5 ก/กก. น้ำหนักตัว	374.3 ± 80.5
6. น้ำ + AFB1	390.7 ± 77.7

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ SD) จากหนู 10 ตัวต่อกลุ่ม