

Thesis Title	Effect of Kojic Acid and Methyleugenol on Induction of Hepatocarcinogenesis by Medium-term Bioassay in Rat	
Author	Mrs. Yaowares Chusiri	
Degree	Doctor of Philosophy (Biochemistry)	
Thesis Advisory Committee		
	Prof. Dr. Usanee Vinitketkumnuan	Advisor
	Prof. Dr. Shoji Fukushima	Co-advisor
	Asst. Prof. Dr. Rawiwan Wongpoomchai	Co-advisor

ABSTRACT

Kojic acid and methyleugenol were used as food additive and natural contaminant in food. Kojic acid has long been studied its mutagenicity and carcinogenicity by many groups which presented conceal toxicological results. The previous study reported methyleugenol is a natural carcinogen contamination in food and the use of methyleugenol was toxicological concern because this compound has been suggested to be a genotoxic carcinogen in rodents. The present study has concerned the safety of kojic acid and methyleugenol which are abundant in daily food as food additives and also are natural contaminants in food.

To prove effect of kojic acid on the initiation stage of hepatocarcinogenesis in rats, the modified Tsuda's model was used in this study. Four groups of 15 rats each were fed a diet containing 0, 0.1%, 0.5% or 2% kojic acid for 4 weeks. Following an additional 2 weeks on a basal diet, rats were then fed a diet containing 0.01% 2-AAF for 2 weeks coupled with two-thirds partial hepatectomy during 2-AAF administration and continuation for an additional week's basal diet. Because kojic acid may have weak carcinogenicity, the extension of kojic acid treatment and two-third partially hepatectomy in rats were performed to increase its initiation efficiency. Rat's appetite became normal after cessation of kojic acid feeding. Data on the effect of various concentrations of kojic acid on formation of GST-P positive foci in the liver found that 2% kojic acid slightly increased number and area of GST-P positive foci compared with non-treated groups. Furthermore, there were no remarkable differences between kojic acid-treated and non-treated groups in 8-OHdG formation levels in rat liver DNA. PCNA positive index and apoptotic index did not change among groups. On the other hand, the body weight of low concentrations of kojic acid treated rats significantly increased. This may be partly due to the influence of kojic acid on thyroid hormones which regulate rat basal metabolism. Therefore, this study suggested that kojic acid does not have any initiation activity on rat hepatocarcinogenesis.

Furthermore, we also found short-term exposure to kojic acid influences hepatic cytochrome P450 protein expression in male rats. The 14 day treatment with the high

dose of kojic acid presented both general toxicity to male F344 rats, as observed by weight loss, and organ-specific toxicity, as observed by increased liver and thyroid gland size. The high dose of kojic acid decreased serum T4 level. These results suggest that kojic acid may act as a goitogens in rodents. In addition, rats fed the high dose of kojic acid increased synthesis of CYP2B1, but displayed reduced levels of CYP2E1 and CYP2C11 expression. Kojic acid at a high dosage might affect on cytochrome P450 protein expression by disruption of thyroid hormone homeostasis, leading to hepatotoxicity in rats.

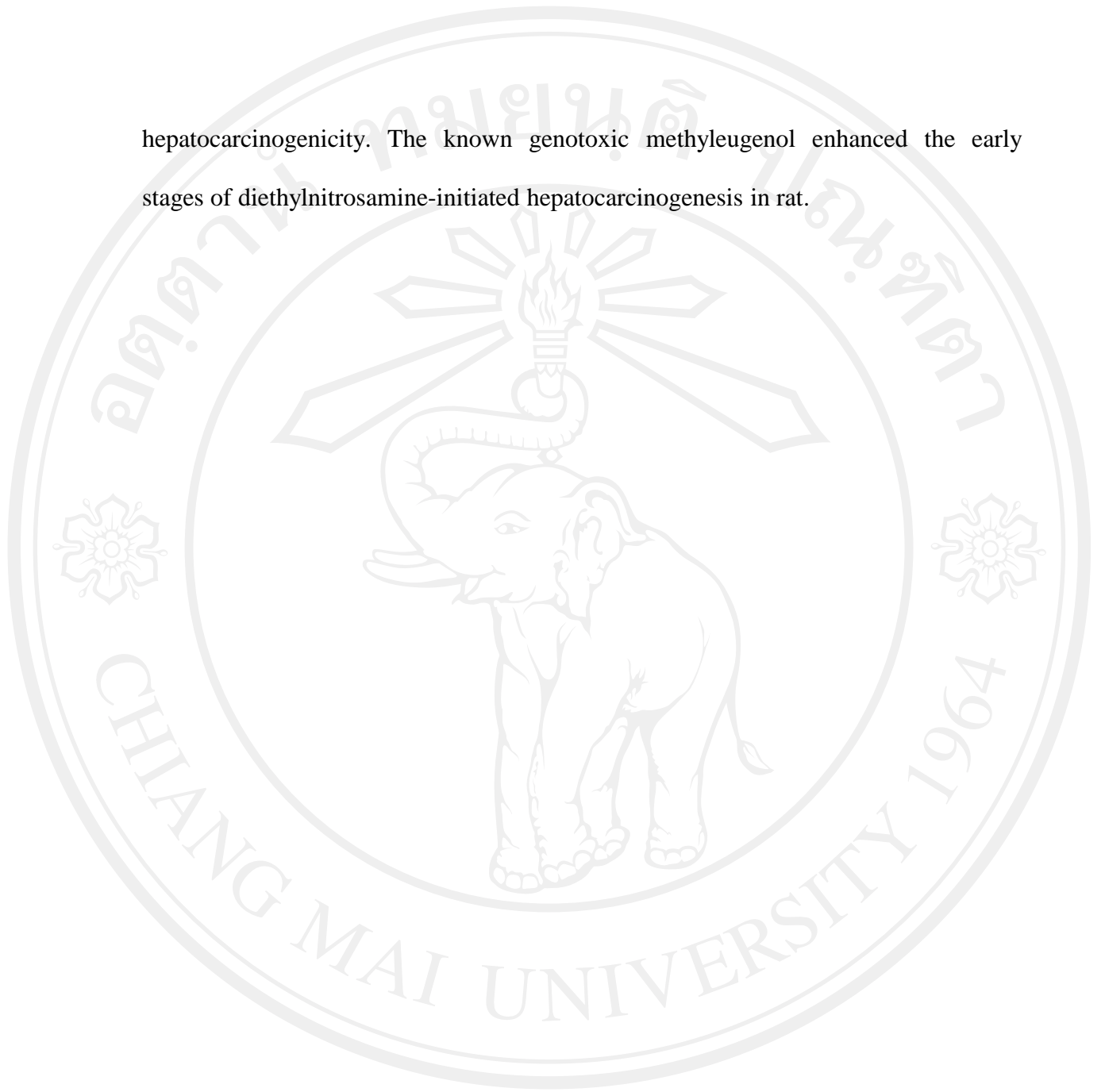
To investigate the promoting activity of kojic acid on rat hepatocarcinogenesis, Ito model was evaluated in this study. Diethylnitrosamine was used as an initiator following administering to rats of various concentrations of kojic acid contained the diet, and in parallel with partial hepatectomy. The data showed that only high concentration (2%) of kojic acid significantly induced the number and area of GST-P positive foci formation. Moreover, the experiment showed no effect on GST-P positive foci formation at low and medium concentrations (0.01 – 0.5 %). 8-OHdG formation levels significantly increased with kojic acid at concentrations of 0.5% and 2%, and cell proliferation was significantly increased at a concentration of 2%. Thus, kojic acid increasing GST-P formation with a high concentration of kojic acid might be involved with oxidative stress induction and increased cell proliferation, while there were no effects on apoptotic pathways. These findings may indicate that kojic acid exerts a promoting activity of rat hepatocarcinogenesis at high

concentration, but not at low, showing the existence of a threshold in kojic acid carcinogenicity. Kojic acid carcinogenicity in rat livers has a nongenotoxic mode of action; we observed no initiation activity but did find positive promotion activity.

Since methyleugenol is a natural carcinogen contaminant in food, the present study was designed to evaluate effect of methyleugenol on diethylnitrosamine and phenobarbital induced hepatocarcinogenesis in rat using Ito model. The administration of methyleugenol after diethylnitrosamine initiation reduced body weight of rat indicating the toxicity of this food additive at high dosage. Because of its genotoxicity in the liver, it increased liver size, the formation of GST-P positive foci and cell proliferating nuclear antigen index. Furthermore, it enhanced various isozymes of cytochrome P450 proteins including CYP2B1, CYP2C11 and CYP3A2. The administration of methyleugenol concentrations ranged from 0.15-150 mg/kg bw did not affect on preneoplastic lesions, cell proliferation and oxidative DNA damage in the liver of rats co-administrated with diethylnitrosamine and phenobarbital. However, the highest dose of methyleugenol moderated the expression of CYP2B1 and CYP3A2 in the combined diethylnitrosamine and phenobarbital induced rats.

In conclusion, the kojic acid and methyleugenol, which are carcinogenic contaminants in food, have different modes in rat carcinogenicity. Kojic acid has no initiation activity on rat hepatocarcinogenesis, while high concentrations exert promotion activity, showing the possible existence of a threshold for rat

hepatocarcinogenicity. The known genotoxic methyleugenol enhanced the early stages of diethylnitrosamine-initiated hepatocarcinogenesis in rat.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	ผลของกรด โคจิกและเมทิลยูจีนอลต่อการเหนี่ยวนำการเกิดมะเร็งตับโดย การทดสอบทางชีวภาพระยะกลางในหนู	
ผู้เขียน	นางเยาวเรศ ชูศิริ	
ปริญญา	วิทยาศาสตร์คุษฎีบัณฑิต (ชีวเคมี)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ศ. ดร. อุษณีย์ วนิจเขตคำนวน	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	ศ. ดร. โชจิ ฟูกูชิม่า	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	ผศ. ดร. รวีวรรณ วงศ์ภูมิชัย	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

กรดโคจิกและเมทิลยูจีนอลถูกใช้เป็นส่วนปรุงแต่งและพบเจือปนในอาหาร มีการศึกษาถึงฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์และฤทธิ์ก่อมะเร็งของกรดโคจิกอย่างกว้างขวางแต่พบว่าให้ผลความเป็นพิษที่ขัดแย้งกัน ส่วนเมทิลยูจีนอลจัดเป็นส่วนประกอบจากธรรมชาติที่ปนเปื้อนในอาหารและควรใช้อย่างระมัดระวังเพราะสารประกอบตัวนี้มีการรายงานว่าเป็นสารก่อมะเร็งในสัตว์ฟันแทะ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจศึกษาถึงความปลอดภัยของกรดโคจิกและเมทิลยูจีนอลซึ่งเป็นสารปรุงแต่งและพบเจือปนในอาหาร

การศึกษาผลของกรดโคจิกต่อระยะเริ่มต้นของการเกิดมะเร็งตับในหนู โดยใช้โมเดลที่ดัดแปลงมาจากโมเดลของ Tsuda แบ่งหนูออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 15 ตัว โดยแต่ละกลุ่มได้รับอาหารผสมกรดโคจิก 0, 0.1%, 0.5% หรือ 2% เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ตามด้วยการให้อาหารปกติ 2 สัปดาห์ จากนั้นให้อาหารผสม 2-AAF 0.01% ต่อ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ร่วมกับการผ่าตัดตับออกบางส่วน แล้วให้อาหารปกติต่อ เนื่องจากกรดโคจิกถูกคาดว่าเป็นสารที่มีฤทธิ์ก่อมะเร็งอย่างอ่อนจึงทำให้เมื่อขยายเวลาการให้กรดโคจิกร่วมกับการตัดตับออกบางส่วนมีผลไปเพิ่มประสิทธิภาพฤทธิ์การกระตุ้นของกรดโคจิก ส่วนการกินอาหารของหนูกลับสู่ภาวะปกติหลังจากการหยุดให้กรดโคจิก จากผลการทดลองในส่วนของการเพิ่มขึ้นของกรดโคจิกต่อการเกิด GST-P positive foci พบว่า กรดโคจิก 2% มีแนวโน้มเพิ่มจำนวนและพื้นที่ของ GST-P positive foci มากขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมบวก นอกจากนี้พบว่าการเกิด 8-OHdG ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างการให้กรดโคจิกกับกลุ่มควบคุมบวก เช่นเดียวกับผลในส่วนของการวัด PCNA positive index และ apoptosis

index แต่พบว่ากรดโคจิกที่ความเข้มข้นต่ำนั้นจะไปเพิ่มน้ำหนักตัวของหนูทดลอง ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับ การที่กรดโคจิกมีผลเหนี่ยวนำไทรอยด์ฮอร์โมน และมีบทบาทในการควบคุมระบบเมตาบอลิซึมพื้นฐานของหนู ดังนั้นการศึกษาในส่วนนี้คาดว่ากรดโคจิกไม่มีฤทธิ์ในการกระตุ้นกระบวนการเกิดมะเร็งครับ

นอกจากนี้พบว่า การได้รับกรดโคจิกในระยะเวลาสั้นมีผลในการเหนี่ยวนำการแสดงออกของเอนไซม์ cytochrome P450 ในหนูเพศผู้ การให้กรดโคจิกที่ความเข้มข้นสูงเป็นเวลา 14 วัน พบความเป็นพิษต่อหนู F344 เพศผู้ ซึ่งสังเกตได้จากน้ำหนักตัวที่ลดลง ความเป็นพิษต่ออวัยวะภายใน โดยตรวจพบตับและต่อมไทรอยด์มีขนาดใหญ่ขึ้น อีกทั้งยังมีผลต่อการลดระดับ T4 ในซีรัมลง จากผลการทดลองนี้คาดว่ากรดโคจิกเป็นสารที่ยับยั้งการทำงานของต่อมไทรอยด์ในสัตว์ฟันแทะ อีกทั้งในหนูที่ได้รับกรดโคจิกความเข้มข้นสูงพบว่าการแสดงออกของ CYP2B1 เพิ่มขึ้นแต่มีผลไปลดการแสดงออกของ CYP2E1 และ CYP2C11 ลง จากการทดลองนี้คาดว่ากรดโคจิกที่ความเข้มข้นสูงมีผลต่อการแสดงออกของโปรตีน Cytochrome P450 โดยไปรบกวนสมดุลฮอร์โมนไทรอยด์นำไปสู่ความเป็นพิษต่อตับในหนู

การศึกษาฤทธิ์ส่งเสริมของกรดโคจิกต่อการเกิดมะเร็งระดับโดยใช้โมเดลของ Ito นั้น ไคเอทิลไนโตรซามีนถูกใช้เป็นตัวกระตุ้น หนูแต่ละกลุ่มได้รับอาหารผสมกรดโคจิกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับการตัดตับออกบางส่วน ผลการทดลองพบว่า การได้รับกรดโคจิกที่ความเข้มข้นสูงเหนี่ยวนำจำนวนและพื้นที่ของ GST-P positive foci สูงขึ้น แม้ว่าการได้รับกรดโคจิกที่ความเข้มข้นกลางและต่ำไม่มีผลต่อการเกิด GST-P positive foci กรดโคจิกที่ความเข้มข้น 0.5 และ 2% มีผลทำให้ปริมาณของ 8-OHdG เพิ่มขึ้น ส่วนการเพิ่มจำนวนของเซลล์เพิ่มสูงขึ้นในกลุ่มที่ได้รับกรดโคจิกที่ความเข้มข้นสูงเท่านั้น ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของ GST-P positive foci ที่เกิดในหนูกลุ่มที่ได้รับกรดโคจิกความเข้มข้นสูงนั้นน่าจะเกี่ยวข้องกับการเหนี่ยวนำภาวะเครียดออกซิเดชันและการเพิ่มขึ้นของการแบ่งเซลล์ ในขณะที่ไม่มีผลกับการตายแบบ apoptosis จากการศึกษาส่วนนี้ชี้ให้เห็นว่ากรดโคจิกแสดงฤทธิ์ส่งเสริมที่ความเข้มข้นสูงแต่ที่ความเข้มข้นต่ำจะแสดงฤทธิ์การเกิดมะเร็งในระดับที่จำกัด ฤทธิ์การเกิดมะเร็งของกรดโคจิกในดับหนูนี้นั้นจะแสดงการออกฤทธิ์แบบ nongenotoxic ซึ่งจากการศึกษาผลของกรดโคจิกพบว่ากรดโคจิกไม่มีฤทธิ์กระตุ้นการเกิดมะเร็งแต่กลับมีฤทธิ์ส่งเสริมการเกิดมะเร็ง

เมทิลยูจีนอลจัดเป็นสารก่อมะเร็งจากธรรมชาติที่ปนเปื้อนในอาหาร โดยการศึกษาส่วนนี้ออกแบบมาเพื่อศึกษาผลของเมทิลยูจีนอลต่อการเกิดมะเร็งตับที่ถูกเหนี่ยวนำจากไดเอทิลไนโตรซามีนและฟีโนบาร์บิทอลในหนูโดยใช้โมเดลของ Ito การให้เมทิลยูจีนอลหลังจากฉีดไดเอทิลไนโตรซามีน พบว่ามีผลทำให้น้ำหนักตัวของหนูลดลงชี้ให้เห็นถึงความเป็นพิษของเมทิลยูจีนอลที่ความเข้มข้นสูง เนื่องจากความเป็นพิษต่อยีนในระดับสูงส่งผลทำให้ขนาดตับ, จำนวนของ GST-P positive foci และ cell proliferating nuclear antigen index เพิ่มขึ้น อีกทั้งยังไปเพิ่มการแสดงออกของ cytochrome P450 เช่น CYP2B1, CYP2C1 และ CYP3A2 การให้เมทิลยูจีนอลในช่วงความเข้มข้น 0.15-150 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวไม่มีผลต่อรอยโรคก่อนการเกิดมะเร็ง, การแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและการถูกทำลายของดีเอ็นเอจากภาวะเครียดออกซิเดชัน ในตับหนูที่ได้รับไดเอทิลไนโตรซามีนร่วมกับฟีโนบาร์บิทอล แม้ว่าการได้รับเมทิลยูจีนอลที่ความเข้มข้นสูงจะมีผลต่อการแสดงออกของโปรตีน CYP2B1 และ CYP3A2 ในหนูที่ได้รับไดเอทิลไนโตรซามีนร่วมกับฟีโนบาร์บิทอล

จากการศึกษาทั้งหมดนี้สรุปได้ว่ากรดโคจิกและเมทิลยูจีนอลซึ่งเป็นสารปนเปื้อนในอาหารที่มีฤทธิ์ก่อมะเร็งนั้นมีการออกฤทธิ์ในการเกิดมะเร็งที่แตกต่างกัน โดยกรดโคจิกไม่มีฤทธิ์กระตุ้นในการเกิดมะเร็งตับในหนู ในขณะที่กรดโคจิกที่ความเข้มข้นสูงนั้นมีฤทธิ์ส่งเสริมแสดงให้เห็นถึงความเข้มข้นต่ำของกรดโคจิกจะแสดงฤทธิ์การเกิดมะเร็งในระดับที่จำกัด เมทิลยูจีนอลซึ่งเป็นสารก่อกลายพันธุ์มีผลต่อระยะเริ่มแรกของการเกิดมะเร็งตับที่ถูกเหนี่ยวนำโดยไดเอทิลไนโตรซามีนและส่งเสริมโดยฟีโนบาร์บิทอลในหนู