

ผลของสารสกัดกวาวเครือขาว (*PUERARIA MIRIFICA*) ต่อการทำงานและการเกิดพยาธิสภาพ  
ของหลอดเลือดแดงใหญ่และกระดูกในหนูขาวที่ผ่าตัดเอารังไข่ออก



นาย เจนภพ สว่างเมฆ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาเภสัชวิทยาทางสัตวแพทยศาสตร์ ภาควิชาเภสัชวิทยา  
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2549  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF *PUERARIA MIRIFICA* EXTRACT ON FUNCTIONS AND  
PATHOGENICITIES OF THORACIC AORTA AND BONE IN  
OVARIECTOMIZED RATS

Mr. Chenphop      Sawangmake

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

Department of Veterinary Pharmacology

Faculty of Veterinary Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

**491019**

Thesis Title            EFFECTS OF *PUERARIA MIRIFICA* EXTRACT ON FUNCTIONS  
AND PATHOGENICITIES OF THORACIC AORTA AND BONE  
IN OVARIECTOMIZED RATS

By                            Mr. Chenphop Sawangmake

Field of study            Veterinary Pharmacology

Thesis Advisor           Associate Professor Supatra Srichairat, Ph.D.

Thesis Co-advisor      Assistant Professor Somlak Pongshompoo, D.V.M.

---

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

.....*Annop Kunavongkrit*.....Dean of Faculty of Veterinary Science  
(Professor Annop Kunavongkrit, D.V.M., Ph.D.)

#### THESIS COMMITTEE

.....*S. Yibchok-anan*..... Chairman  
(Associate Professor Sirintorn Yibchok-anan, D.V.M., Ph.D.)

.....*S. Srichairat*..... Thesis Advisor  
(Associate Professor Supatra Srichairat, Ph.D.)

.....*Somlak Pongshompoo*..... Thesis Co-advisor  
(Assistant Professor Somlak Pongshompoo, D.V.M.)

.....*Somjai Nakornchai*..... Member  
(Associate Professor Somjai Nakornchai)

.....*Sutthasinee Poonyachoti*..... Member  
(Assistant Professor Sutthasinee Poonyachoti, D.V.M., Ph.D.)

เจนภพ สว่างเมฆ : ผลของสารสกัดกวาวเครือขาว (*Pueraria mirifica*) ต่อการทำงานและการเกิดพยาธิสภาพของหลอดเลือดแดงใหญ่และกระดูกในหนูขาวที่ผ่าตัดเอารังไข่ออก (EFFECTS OF PUERARIA MIRIFICA EXTRACT ON FUNCTIONS AND PATHOGENICITIES OF THORACIC AORTA AND BONE IN OVARECTOMIZED RATS) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร. สุภัตรา ศรีไชยรัตน์, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.สพ.ญ. สมลักษณ์ พวงชมพู, 99 หน้า.

งานวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของยาเม็ดสารสกัดกวาวเครือขาว (*Pueraria mirifica* Airy Shaw and Suvatabandhu) ซึ่งเป็นพืชที่มีสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนในการแสดงผลปกป้องการทำงานของหลอดเลือดแดงใหญ่ที่แยกจากกายหนูขาว รวมถึงผลป้องกันการสลายตัวของกระดูกในหนูขาวที่ผ่าตัดเอารังไข่ออก การทดลองนี้ใช้หนูขาวสายพันธุ์ Wistar จำนวน 32 ตัว แบ่งออกเป็น 4 กลุ่มๆละ 8 ตัว กลุ่มที่ 1, 2 และ 3 ได้รับการผ่าตัดเอารังไข่ออกทั้ง 2 ข้าง และได้รับสารทดสอบดังนี้ กลุ่มที่ 1 ได้รับการป้อนสารสกัดกวาวเครือขาว ขนาด 100 มก./กก./วัน (OVX+P. *mirifica*) กลุ่มที่ 2 ได้รับการฉีดเอสตราไดออล วาเลเรตเข้าใต้ผิวหนังที่ขนาด 300 มก./กก./สัปดาห์ (OVX+Estrogen) กลุ่มที่ 3 ได้รับการป้อนน้ำกลั่น 0.2 มล./ตัว/วัน (OVX) ส่วนกลุ่มที่ 4 เป็นหนูขาวที่ไม่ได้รับการผ่าตัดรังไข่และได้รับการป้อนน้ำกลั่น 0.2 มล./ตัว/วัน (Sham) หลังจากได้รับสารทดสอบเป็นเวลา 42 วันติดต่อกัน ทำการเก็บตัวอย่างเลือดจากหัวใจเพื่อตรวจวัดระดับไขมัน ระดับไนตริก ออกไซด์ และระดับอัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส ในพลาสมา ทำการแยกหลอดเลือดแดงใหญ่ส่วนช่องอกเพื่อนำมาทดสอบการทำงานของหลอดเลือดและศึกษาพยาธิสภาพ ทำการแยกกระดูกต้นขาขวาเพื่อวัดปริมาณแคลเซียมในกระดูก และวัดน้ำหนักกระดูกแห้ง น้ำหนักเนื้อกระดูก เปรียบเทียบกับน้ำหนักตัว ทำการศึกษาพยาธิสภาพของกระดูกต้นขาซ้าย จากผลการศึกษาพบว่าความสามารถในการสลายตัวของหลอดเลือดแบบอาศัยเยื่อหลอดเลือดเมื่อกระตุ้นด้วยอะเซทิล โคลีนสูญเสียไปในกลุ่มหนูที่ไม่มีรังไข่เมื่อเปรียบเทียบกับหลอดเลือดปกติ ( $p < 0.05$ ) แต่กลับคืนมาได้ในระดับหนึ่งในกลุ่มหนูที่ไม่มีรังไข่และได้รับยาเตรียมที่มีสารสกัดกวาวเครือขาวหรือได้รับเอสโตรเจนทดแทน ผลจากการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาพบว่า ความเสียหายของหลอดเลือดที่บริเวณกล้ามเนื้อเรียบและเยื่อหลอดเลือด ของหนูที่ผ่าตัดรังไข่ออกและได้รับสารสกัดกวาวเครือขาวหรือเอสโตรเจน มีน้อยกว่ากลุ่มผ่าตัดรังไข่ที่ไม่ได้รับยา กลุ่มที่ได้รับสารสกัดกวาวเครือขาวมีระดับไนตริก ออกไซด์ในพลาสมาสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับยาอย่างเด่นชัด นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดกวาวเครือขาวมีผลทำให้น้ำหนักกระดูกและน้ำหนักเนื้อกระดูกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ผลการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาแสดงให้เห็นว่าการสลายตัวของกระดูกตลอดจนระดับอัลคาไลน์ ฟอสฟาเตสในพลาสมาลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับยา จากผลการศึกษาระบุได้ว่า ยาเตรียมที่มีสารสกัดกวาวเครือขาวมีผลช่วยปกป้องหลอดเลือดทั้งในส่วนการทำงานและการเกิดพยาธิสภาพของเยื่อหลอดเลือด รวมถึงมีผลในการป้องกันภาวะกระดูกพรุนในหนูขาวที่ผ่าตัดเอารังไข่ออก

ภาควิชา...เภสัชวิทยา.....ลายมือชื่อนิสิต.....เจนภพ สว่างเมฆ.....  
 สาขาวิชา...เภสัชวิทยาทางสัตวแพทยศาสตร์...ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....  
 ปีการศึกษา.....2549.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

## 4875551731 : MAJOR VETERINARY PHARMACOLOGY

KEY WORDS : *PUERARIA MIRIFICA* / THORACIC AORTA / BONE / OVARIECTOMIZED RAT  
 CHENPHOP SAWANGMAKE : EFFECTS OF *PUERARIA MIRIFICA* EXTRACT ON  
 FUNCTIONS AND PATHOGENICITIES OF THORACIC AORTA AND BONE IN  
 OVARIECTOMIZED RATS. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SUPATRA  
 SRICHAIRAT, Ph.D., THESIS COADVISOR : ASST. PROF. SOMLAK  
 POUNGSHOMPOO, D.V.M., 99 pp.

This experiment was designed to determine whether a preparation of *Pueraria mirifica* Airy Shaw and Suvatabandhu, a phytoestrogens containing herb, can protect vascular functions and bone turnover in ovariectomized rats. Thirty two female Wistar albino rats were randomly assigned into 4 groups. Group 1, 2 and 3 were undergone bilateral ovariectomy and orally administered with *P. mirifica* 100 mg/kg/day (OVX+*P. mirifica*), subcutaneously injected of estradiol valerate 300 µg/kg/week (OVX+Estrogen) and distilled water fed (OVX), respectively. Group 4 was sham operated and treated with distilled water (Sham). All of them were treated for 42 consecutive days. At the end of treatments, blood sample were obtained by cardiac puncture for determination of lipid parameters (total cholesterol, HDL-C, LDL-C and triglyceride), nitric oxide (NO) and alkaline phosphatase (ALP). Descending thoracic aortas were isolated for vascular function measurements and histopathological study. The right femurs were collected and assayed for dry weights, ash weights and calcium contents. The left femurs were prepared for histopathological study. Acetylcholine-mediated endothelium-dependent relaxation was significantly impaired in OVX group ( $p < 0.05$  vs. normal vessel), but restored in the OVX+*P. mirifica* and OVX+Estrogen groups. Microscopic examinations of thoracic aortas in the OVX+*P. mirifica* and the OVX+estrogen groups showed the lesser degree of medial smooth muscle and endothelial cell degenerations. Compared to the OVX group, treatment with *P. mirifica* resulted in significantly increased in NO production. The *P. mirifica* and estrogen treatment groups significantly increased in relative dry weight, ash weight of right femurs. Bone degenerative found in microscopic examinations and ALP level were also decreased comparing with the OVX group. These results indicate that treatment with the *P. mirifica* preparation preserves endothelial vasodilator function and bone structures in ovariectomized rats.

Department.....Veterinary Pharmacology....Student's signature.....*Chenphop Sawangmake*  
 Field of study.....Veterinary Pharmacology...Advisor's signature.....*S. Srichairat*  
 Academic year.....2006.....Co-advisor's signature.....*Somlak Pongshompo*



## Acknowledgements

For the success of this thesis, I wish to express my sincere gratitude and appreciation to my thesis advisor, Associate Professor Supatra Srichairat (Ph.D.), my thesis co-advisor, Assistant Professor Somlak Pongshompoo (D.V.M.) for their invaluable and meaningful advice, guidance, comments and encouragement during my research study.

I would like to acknowledge the chairman of thesis committee, Associate Professor Sirintorn Yibchok-anan (D.V.M., Ph.D.), members of thesis committee, Associate Professor Somjai Nakornchai and Assistant Professor Suthasinee Poonyachoti (D.V.M., Ph.D.) for their useful advice and comments.

I wish to convey my cordially thanks to graduate students and staffs of the Department of Veterinary Pharmacology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University for their helps, supports and friendships.

I would like to thanks scientists and staffs of the Department of Pathology, and the Department of Animal Husbandry, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University for their helps and supports.

This thesis was financially supported by the Graduate School, Chulalongkorn University.

Finally, I would like to express my deepest gratitude to my father, mother, brother and grandmother for their endless love, supports, understanding and encouragement.

## Contents

	Page
Abstract (Thai).....	iv
Abstract (English).....	v
Acknowledgement.....	vi
Contents.....	vii
List of Tables.....	ix
List of Figures.....	x
List of abbreviations.....	xi
Chapter	
I Introduction.....	1
II Literature reviews.....	4
<i>Pueraria mirifica</i> .....	4
Pharmacological effects of <i>Pueraria mirifica</i> .....	11
Toxicity profiles of <i>Pueraria mirifica</i> .....	13
Phytoestrogens.....	14
Pharmacological effects of phytoestrogens.....	15
Phytoestrogens supplement and their benefits.....	17
Phytoestrogens and cardiovascular diseases.....	17
Phytoestrogens and osteoporosis prevention.....	19
III Materials and Methods.....	23
Materials.....	23
Animals.....	23
Chemicals.....	24
Instruments.....	25
Methods.....	26
Animal treatments.....	27

	Methods (cont.)	
	Experimental protocols.....	27
	Statistics.....	33
IV	Results.....	34
	Physiological and biochemical measurements	
	Body weight.....	34
	Blood biochemistry parameters.....	35
	Nitric oxide (NO).....	35
	Alkaline phosphatase (ALP).....	37
	Lipid parameters.....	38
	Vascular functions and pathogenicities of thoracic aortas	
	Vascular functions measurements.....	40
	Vascular contraction.....	40
	Endothelium-dependent relaxation.....	42
	Endothelium-independent relaxation.....	43
	Pathogenicities of thoracic aortas.....	45
	Bone mass and pathogenicities of femoral bones	
	Relative bone weight and relative ash weight.....	48
	Bone calcium.....	49
	Pathogenicities of femoral bones.....	51
V	Discussion and Conclusion.....	54
	References.....	63
	Appendices.....	77
	Biography.....	99



## List of Tables

Table		Page
2.1	Chemical structures of natural compounds found in tuberous root of <i>P. mirifica</i> .....	5
2.2	The estrogenic activity based on growth promoting effects on MCF-7 human breast cancer cells of natural compounds found in tuberous root of <i>P. mirifica</i> .....	10
2.3	The ranking of estrogenic potency of phytoestrogens for estrogen receptor subtypes (ER- $\alpha$ and ER- $\beta$ ).....	16
4.1	The percentage increase of body weight compared with body weight at the beginning of the experiment (week 0) in study rats .....	34
4.2	Plasma nitric oxide (NO) production of each group in the experiments.....	36
4.3	Plasma alkaline phosphatase (ALP) level of each group in the experiments.....	37
4.4	Plasma level of total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol and triglyceride of each group in the experiments.....	38
4.5	Atherogenic index, (total cholesterol - HDL-C) / HDL-C ratio, of each group in the experiments.....	39
4.6	The percentages of aortic contraction induced by noradrenaline (NA) in isolated rat thoracic aorta .....	41
4.7	The percentages of endothelium-dependent relaxation induced by Ach in the NA-precontracted isolated rat thoracic aortas .....	42
4.8	The percentages of endothelium-independent relaxation induced by SNP in the NA-precontracted isolated rat thoracic aortas .....	44
4.9	The relative bone weight and relative ash weight of each group in the experiments.....	48
4.10	The bone calcium levels of each group in the experiments.....	50

## List of Figures

Figures	Page
4.1 The percentage increase of body weight compared with body weight at the beginning of the experiment (week 0) in study rats .....	35
4.2 Plasma nitric oxide (NO) production of study rats .....	36
4.3 Plasma alkaline phosphatase (ALP) level of each group in the experiments.....	37
4.4 Plasma level of total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol and triglyceride of each group in the experiments.....	39
4.5 Atherogenic index, (total cholesterol - HDL-C) / HDL-C ratio, of each group in the experiments .....	40
4.6 Concentration response curves to noradrenaline (NA) of isolated rat thoracic aortas from non-OVX control, OVX, OVX+Estrogen and OVX+ <i>P. mirifica</i> groups .....	41
4.7 Concentration response curve to acetylcholine (Ach) in noradrenaline-precontracted isolated rat thoracic aortas.....	43
4.8 Concentration response curve to sodium nitroprusside (SNP) in noradrenaline-precontracted isolated rat thoracic aortas.....	44
4.9 Histopathological figures of descending thoracic aortas of each group in the experiments (H&E, X 400).....	46
4.10 The relative bone weight and relative ash weight of each group in the experiments.....	49
4.11 The bone calcium levels of the experimental rats.....	50
4.12 Histopathological figures of femoral bones (H&E, X 400).....	53

## List of Abbreviations

$\alpha$	= Alpha
$\beta$	= Beta
$\mu\text{g}$	= Microgram
$\mu\text{l}$	= Microliter
Ach	= Acetylcholine
ALP	= Alkaline phosphatase
ALT	= Alanine aminotransferase
ANOVA	= Analysis of variances
B-ALP	= Bone isoform-alkaline phosphatase
BBI	= Bowman-Birk protease inhibitor
BMP	= Bone morphogenic protein
$^{\circ}\text{C}$	= Degree of Celsius, centigrade
CADs	= Coronary artery diseases
C-ALP	= Corticosteroid-induced or stress-induced alkaline phosphatase
CCE	= Conjugated equine estrogen
cd	= Cadmium
cGMP	= Cyclic Guanosine monophosphate
cNOS	= Constitutive nitric oxide synthase
$\text{CO}_2$	= Carbon dioxide
COX	= Cyclooxygenase
CP	= Constrictor prostanoid
CVDs	= Cardiovascular diseases
CYP	= Cytochrome P450
DAG	= Diacylglycerol
DNA	= Deoxyribonucleic acid

EDRFs	= Endothelial-derived relaxing factors
eNOS	= Endothelial nitric oxide synthase
ER	= Estrogen receptor
ERT	= Estrogen replacement therapy
et al.	= et alii (and other)
etc.	= et cetera (and so on)
FI-AAS	= Flame ionization-atomic absorption spectrophotometer
g	= Gram
GMP	= Good manufacturing practice
GPCR	= G-protein coupled receptor
HCl	= Hydrochloric acid
HDL-C	= High density lipoprotein cholesterol
H&E	= Hematoxylin-Eosin
HRT	= Hormone replacement therapy
ICAM	= Intercellular adhesion molecule
IGF	= Insulin-like growth factor
IL	= Interleukin
iNOS	= Inducible nitric oxide synthase
ip.	= intraperitoneum
IP <sub>3</sub>	= Inositol-1,4,5,-trisphosphate
kg	= Kilogram
KHS	= Krebs-Henseleit solution
L-ALP	= Liver isoform-alkaline phosphatase
LD <sub>50</sub>	= Median lethal dose
LDL-C	= Low density lipoprotein cholesterol
M	= Molar
mg	= Milligram

mg/kg	= Milligram per kilogram body weight
ml	= Milliliter
mm	= Millimeter
N	= Normal
NA	= Noradrenaline
NLAC	= National laboratory animal center
nm	= Nanometer
NNED	= [N-(1-Naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride]
nNOS	= Neuronal nitric oxide synthase
NO	= Nitric oxide
NOS	= Nitric oxide synthase
O <sub>2</sub>	= Oxygen
O-DMA	= O-desmethylangolensin
OPG	= Osteopontin
OVX	= Ovariectomy, ovariectomized
oxLDL-C	= Oxidized low density lipoprotein cholesterol
PGF <sub>2α</sub>	= Prostaglandin F <sub>2α</sub>
PGHS	= Prostaglandin H synthase
ppm	= part per million
RBC	= Red blood cell
S.E.M.	= Standard error of mean
sGC	= Soluble guanylate cyclase
SNP	= Sodium nitroprusside
TGF	= Transforming growth factor
TNF	= Tumor necrotic factor
TXA <sub>2</sub>	= Thromboxane A <sub>2</sub>
TR	= Thromboxane receptor
TxS	= Thromboxane synthase



VCAM	= Vascular cell adhesion molecule
VLDL-C	= Very low density lipoprotein cholesterol
WBC	= White blood cell