

ผลของสารสกัด *Pueraria mirifica* *Pueraria lobata* *Butea superba*
และ *Mucuna collettii* ในการต่อต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7
และเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa

นางสาววราภรณ์ ชีวโคภิชฐ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสัตววิทยา ภาควิชาชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-17-0771-1

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ANTIPROLIFERATIVE EFFECTS OF *Pueraria mirifica*,
Puraria lobata, *Buteauberba* AND *Mucuna collettii* ON
HUMAN MAMMARY CARCINOMA MCF-7
AND CERVICAL CARCINOMA HeLa

Miss Warakorn Cheewasopit

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Zoology

Department of Biology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2001

ISBN 974-17-0771-1

Thesis Title Antiproliferative effects of *Pueraria mirifica*, *Pueraria lobata*,
Butea superba and *Mucuna collettii* on human mammary
carcinoma MCF-7 and cervical carcinoma HeLa


By Miss Warakorn Cheewasopit

Field of Study Zoology


Thesis Advisor Associate Professor Wichai Cherdshewasart D.Sc.

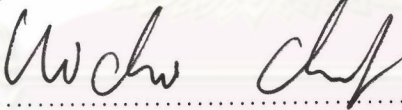
Thesis Co-advisor Porntipa Picha Ph.D.

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

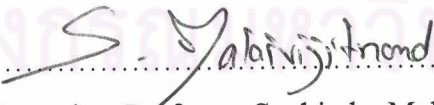
..... Deputy Dean for Administrative Affairs
(Associate Professor Pipat Karntiang, Ph.D.) Acting Dean, Faculty of Science

THESIS COMMITTEE

..... Chairman.
(Professor Siriwat Wongsiri, Ph.D.)

..... Thesis Advisor
(Associate Professor Wichai Cherdshewasart, D.Sc.)

..... Thesis Co-advisor
(Porntipa Picha, Ph.D.)

..... Member
(Associate Professor Suchinda Malaivijitnond, Ph.D.)

วารสารชีวโคภิชฐ: ผลของสารสกัด *Pueraria mirifica* *Pueraria lobata*
Butea superba และ *Mucuna collettii* ในการต่อต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม
MCF-7 และเซลล์มะเร็งปากมดลูกHeLa (ANTIPROLIFERATIVE EFFECTS OF
Pueraria mirifica, *Pueraria lobata*, *Butea superba* AND *Mucuna collettii* ON
HUMAN MAMMARY CARCINOMA MCF-7 AND CERVICAL CARCINOMA HeLa)
อ. ที่ปรึกษา: รศ. ดร. วิชัย เชิดชูศาสตร์, อ.ที่ปรึกษาร่วม: ดร. พรทิพา พิชา จำนวนหน้า
89 หน้า ISBN 974-17-0771-1

การศึกษามผลของสารสกัดกวาวเครือขาว (*Pueraria mirifica*) Kudzu (*Pueraria lobata*)
กวาวเครือแดง (*Butea superba*) และ กวาวเครือดำ (*Mucuna collettii*) หลังจากการบ่มเซลล์มะเร็งเต้านม
(MCF-7) และ เซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งมีสารสกัดของพืชทั้ง 4 ชนิดที่ความเข้มข้น
0, 0.1, 1, 10, 100 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 4 วัน นำมาวัดโปรตีนเพื่อหาค่าร้อยละของความ
อยู่รอดของเซลล์เปรียบเทียบกับชุดควบคุม กวาวเครือขาวที่ความเข้มข้นต่ำ (1 $\mu\text{g/ml}$) สามารถกระตุ้นการ
เจริญ ในขณะที่ความเข้มข้นสูง (1000 $\mu\text{g/ml}$) ($p < 0.05$) มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์
MCF-7 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa พบว่าสารสกัดกวาวเครือขาวที่
ความเข้มข้น 1000 $\mu\text{g/ml}$ มีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) Kudzu ยับยั้ง
การเจริญของเซลล์ทั้งสองชนิดได้ที่ความเข้มข้น 1000 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.05$) กวาวเครือแดงที่ความเข้มข้นสูง (10,
100 และ 1000 $\mu\text{g/ml}$ สำหรับ MCF-7 และ 1000 $\mu\text{g/ml}$ สำหรับ HeLa) จะมีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์
มะเร็งทั้งสองชนิดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) และกวาวเครือดำที่ความเข้มข้นสูง (100 และ 1000 $\mu\text{g/ml}$
สำหรับ MCF-7 และ 1000 $\mu\text{g/ml}$ สำหรับ HeLa) สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิดได้
อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อนำสารสกัดที่มีความเข้มข้นต่ำ (1 $\mu\text{g/ml}$ สำหรับ *P. mirifica* และ
P. lobata, 10 $\mu\text{g/ml}$ สำหรับ *B. superba* และ *M. collettii*) มาบ่มร่วมกับฮอร์โมนอีสโตรเจน (อีสตราไดออล
 10^{-11} โมลาร์) ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของการเจริญของเซลล์ทั้งสองชนิด เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์
ที่ได้รับฮอร์โมนอีสโตรเจนเพียงอย่างเดียว เมื่อให้สารสกัดที่ความเข้มข้นสูง (1000 $\mu\text{g/ml}$) มาบ่มร่วมกับฮอร์โมน
อีสโตรเจน พบว่าสารสกัดจากพืชทั้ง 4 ชนิด สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ทั้งสองชนิดได้อย่างมีนัยสำคัญ
ทางสถิติ ($p < 0.05$)

ภาควิชาชีววิทยา..... ลายมือชื่อนิสิต *กรกมล ศรีโสภณ*.....
สาขาวิชาสัตววิทยา..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา *ดร. ณ*.....
ปีการศึกษา2544..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม *ดร. ณ*.....

4272388723: MAJOR ZOOLOGY

KEYWORD: *Pueraria mirifica*/*Puraria lobata*/*Butea superba*/*Mucuna collettii*/
MCF-7/HeLa/CANCER/CYTOTOXICITY

WARAKORN CHEEWASOPIT: ANTIPROLIFERATIVE EFFECTS OF
Pueraria mirifica, *Pueraria lobata*, *Butea superba* AND *Mucuna collettii* ON
HUMAN MAMMARY CARCINOMA MCF-7 AND CERVICAL
CARCINOMA HeLa. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. WICHAI
CHERDSHEWASART, D.Sc., THESIS CO-ADVISOR: PORNTIPA PICHA,
Ph.D. 89 pp. ISBN 974-17-0771-1

The effects of *Pueraria mirifica*, *Pueraria lobata*, *Butea superba* and *Mucuna collettii* extracts were performed by incubating the MCF-7 (mammary carcinoma) and HeLa (cervical carcinoma) with the extracts at 0, 0.1, 1, 100, 1000 $\mu\text{g/ml}$ for 4 days. The protein content of the cell culture was determined and calculated for the growth percentage compared with the control group. *P. mirifica* extract at low concentration (1 $\mu\text{g/ml}$) showed significant proliferative effect ($p < 0.05$) and significant antiproliferative effects at high concentrations (1000 $\mu\text{g/ml}$) ($p < 0.01$) on MCF-7 cells. In case of HeLa cells, *P. mirifica* showed significant antiproliferative effect (100 and 1000 $\mu\text{g/ml}$) ($p < 0.05$) whereas *P. lobata* showed no effect. *B. superba* showed no proliferative effect but significant antiproliferative effect at high concentrations (10, 100 and 1000 $\mu\text{g/ml}$ for MCF-7 and 1000 $\mu\text{g/ml}$ for HeLa) ($p < 0.01$). *M. collettii* showed significant antiproliferative effect ($p < 0.01$) at high concentrations (1000 $\mu\text{g/ml}$) on both cell lines.

The synergistic analysis were performed by incubating the extracts at the low concentration (1 $\mu\text{g/ml}$ for *P. mirifica* and *P. lobata*; 10 $\mu\text{g/ml}$ for *B. superba* and *M. collettii*) with 10^{-11} M estradiol, all of the extracts did not show the different effect on the growth of both cell lines compared with the cells treated with estradiol alone. The treatment of the extracts at the high concentration (1000 $\mu\text{g/ml}$) with 10^{-11} M estradiol, all of the extracts showed significant synergistic antiproliferative effect on both cell lines compared with the cells treated with the estradiol alone.

Department.....**Biology**..... Student's signature..... *W. Cheewasopit*
Field of study.....**Zoology**..... Advisor's signature..... *Wichai Cherdshewasart*
Academic year.....**2001**..... Co-advisor's signature..... *Pornnipa Picha*

ACKNOWLEDGEMENTS

First of all, I would like to express my grateful thanks to my advisor, Associate Professor Dr. Wichai Cherdshewasart, for his valuable suggestions, guidance, kindness and helps throughout this study.

Secondly, I would like to express my deepest gratitude to my co-advisor Dr. Porntipa Picha for her guidance, suggestions, supports and encouragement throughout this thesis.

My sincere appreciation is also extended to Professor Dr. Siriwat Wongsiri, the head of the department of Biology for his kind helpful and valuable guidance and Associate Professor Dr. Suchinda Malaiwjitnond for her thoughtful suggestions and comments.

I would like to thank Assistant Professor Orawan Sattayalai for her kindly permission to use phase contrast microscope and fluorescence microscope. Assistant Professor Dr. Patchanee Singha-asa for her useful suggestion on cell culture technique. Associate Professor Dr. Kingkeaw Wattanasermkit for her kindly and useful suggestions.

My acknowledgement is also express to Research Division, National Cancer Institute (Thailand), Department of Biology and Department of Chemistry, Faculty of Science Chulalongkorn University for access to use the necessary instruments for my thesis.

Thankfulness would be given to all members in Kwao Krua Laboratory Miss Rattana Panreinsan, Miss Siriporn Chumruslertluk, Mrs. Subongkoj Subtang, and Miss Wilasinee Trisub, all members in Section of experimental Oncotherapy, Research Division, National Cancer Institute, Bangkok especially Miss Suchanuch Ondee and Miss Jaranya Ngarmkum for their help and suggestions.

Sincere thanks to all my friends: Miss Nopparat Wanitsuksombut, Miss Pacharane Fagtongpan, Miss Patwadee Pairor, Mr. Sakchai Siripittayakosol and Miss Tipawan Sabpasat.

Finally, the deepest appreciation is expressed to my family for their love, support and understanding.

Contents

	Page
THAI ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	x
LIST OF FIGURES.....	xii
ABBREVIATIONS.....	xiv
CHAPTER I INTRODUCTION.....	1
CHAPTER II LITERATURE REVIEW.....	3
I Botanical background and chemical constituents.....	4
1.1 <i>Pueria mirifica</i>	4
1.2 <i>Pueraria lobata</i>	6
1.3 <i>Butea superba</i>	7
1.4 <i>Mucuna collettii</i>	8
II Phytoestrogens.....	9
2.1 Sources of phytoestrogens.....	9
2.2 Effects of phytoestrogens on cancer.....	10
III The interaction between phytoestrogens and estrogen receptor.....	23
3.1 Estrogen receptor.....	23
3.1.1 The distribution of estrogen receptor.....	23
3.1.2 Functional region of estrogen receptor.....	24
3.1.3 Estrogen action on estrogen receptor.....	26
3.1.3.1 Signal transduction of estrogen receptor...	26
3.2 Phytoestrogens action on estrogen receptor.....	27
3.3 Selective estrogen receptor modulator.....	28
CHAPTER III MATERIALS AND METHODS.....	30
1 Plant extraction.....	30
1.1 Powder preparation.....	30
1.2 Extraction.....	30
2 Cell and cell culture.....	31
2.1 Subculture.....	31

Contents

(continued)

	Page
2.2 Cell suspension preparation for assay.....	31
2.2.1 Cell digestion	31
2.2.2 Cell count and dilution.....	32
3. Cytotoxicity test.....	34
3.1 Effects of the plant extracts on MCF-7 and HeLa cell line (Range finding test).....	34
3.2 ED ₅₀ at D ₄ analysis for the plant extracts.....	34
3.3 Effect of the plant extracts in the presence of estradiol...	35
4 Protein determination.....	35
4.1 Washing of the cell culture.....	35
4.2 Solution of cell in alkaline copper tartate.....	36
4.3 Color development.....	36
4.4 The calculation of cell growth.....	36
6 Statistical analysis.....	36
CHAPTER IV RESULTS.....	37
1 The plant extracts.....	37
2 Cytotoxicity test.....	37
2.1 MCF-7.....	37
2.1.1 Estradiol	37
2.1.2 <i>P. mirifica</i>	38
2.1.3 <i>P. lobata</i>	38
2.1.4 <i>B. superba</i>	38
2.1.5 <i>M. collettii</i>	38
2.1.6 Comparison of the effects of <i>P. mirifica</i> extract on MCF-7 cell with the others at same concentration.....	39
2.2 HeLa.....	46
2.2.1 Estradiol	46
2.2.2 <i>P. mirifica</i>	46
2.2.3 <i>P. lobata</i>	46

Contents

(continued)

	Page
2.2.4 <i>B. superba</i>	46
2.2.5 <i>M. collettii</i>	46
2.2.6 Comparison of the effects of <i>P. mirifica</i> extract on HeLa cells with the others at same concentration	47
2.3 The effect of plant extracts on MCF-7 and HeLa cells...	54
3 The effects of the plant extracts in the presence of estradiol.	58
3.1 MCF-7	58
3.1.1 <i>P. mirifica</i>	58
3.1.2 <i>P. lobata</i>	58
3.1.3 <i>B. superba</i>	58
3.1.4 <i>M. collettii</i>	59
CHAPTER V DISCUSSION	69
CHAPTER VI SUMMARY AND CONCLUSION	74
REFERENCES	76
APPENDICES	85
BIOGRAPHY	89



 ศูนย์วิทยทรัพยากร
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

		Page
Table 1	Common name of <i>P.mirifica</i> , <i>B. superba</i> , <i>M collettii</i> and <i>P. lobata</i> in various part of Thailand.....	3
Table 2	Summarize of the chemical constituents of <i>P. mirifica</i>	5
Table 3	Summarize of the chemical constituents of <i>B. superba</i>	8
Table 4	Summarize of the study of the effects of phytoestrogen on breast cancer cell lines.....	11
Table 5	Sources of plant materials in the experiments.....	30
Table 6	The characteristic of the plant extract.....	37
Table 7	The growth response percentage of MCF-7 cell culture to <i>P. mirifica</i> extract.....	40
Table 8	The growth response percentage of MCF-7 cell culture to <i>P. lobata</i> extract.....	41
Table 9	The growth response percentage of MCF-7 cell culture to <i>B. superba</i> extract.....	42
Table 10	The growth response percentage of MCF-7 cell culture to <i>M. collettii</i> extract.....	43
Table 11	The growth response percentage of MCF-7 cell culture to Estradiol.....	44
Table 12	Comparative dose response of <i>P. mirifica</i> , with <i>P. lobata</i> , <i>B. superba</i> and <i>M. collettii</i> extracts to MCF-7 at D ₄ of experiment.....	45
Table 13	The growth response percentage of HeLa cell culture to <i>P. mirifica</i> extract.....	48
Table 14	The growth response percentage of HeLa cell culture to <i>P. lobata</i> extract.....	49
Table 15	The growth response percentage of HeLa cell culture to <i>B. superba</i> extract.....	50
Table 16	The growth response percentage of HeLa cell culture to <i>M. collettii</i> extract.....	51
Table 17	The growth response percentage of HeLa cell to Estradiol.	52

LIST OF TABLES

(continued)

	Page
Table 18 Comparative dose response of <i>P. mirifica</i> , with <i>P. lobata</i> , <i>B. superba</i> and <i>M. collettii</i> extracts to HeLa cell culture at D ₄ of experiment.....	53
Table 19 The growth response percentage of MCF-7 cell culture on <i>P. mirifica</i> extract and 10 ⁻¹¹ M Estradiol.....	60
Table 20 The growth response percentage of MCF-7 cell culture on <i>P. lobata</i> extract and 10 ⁻¹¹ M Estradiol.....	61
Table 21 The growth response percentage of MCF-7 cell culture on <i>B. superba</i> extract and 10 ⁻¹¹ M Estradiol.....	62
Table 22 The growth response percentage of MCF-7 cell culture on <i>M. collettii</i> extract and 10 ⁻¹¹ M Estradiol.....	63
Table 23 The comparison of the effect of the plant extracts and the plant extracts in the presence of estradiol.....	64

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

		Page
Figure 1	Schematic structural of ER (A-F region).....	24
Figure 2	Comparison of the primary structures of human estrogen receptor (hER α and hER β respectively. The numbers within the ER β represent the degree of homology (%) between respective domains in the two receptor subtypes.....	26
Figure 3	Corner square (enlargement). Cells were counted on top and left touching middle line and not counted touching middle line at bottom and right.....	33
Figure 4	Effect of Estradiol extract on the growth of MCF-7 cell culture.....	40
Figure 5	Effect of <i>P. mirifica</i> extract on the growth of MCF-7 cell culture.....	41
Figure 6	Effect of <i>P. lobata</i> extract on the growth of MCF-7 cell culture.....	42
Figure 7	Effect of <i>B. superba</i> extract on the growth of MCF-7 cell culture.....	43
Figure 8	Effect of <i>M. collettii</i> on the growth of MCF-7 cell culture.....	44
Figure 9	Comparative dose response of <i>P. mirifica</i> (PM), <i>P. lobata</i> (PL), <i>B. superba</i> (BS) and <i>M. collettii</i> (MC) extract on the growth of MCF-7 cell culture.....	45
Figure 10	Effect of Estradiol extract on the growth of HeLa cell culture.....	48
Figure 11	Effect of <i>P. mirifica</i> extract on the growth of HeLa cell culture.....	49
Figure 12	Effect of <i>P. lobata</i> extract on the growth of HeLa cell culture.....	50
Figure 13	Effect of <i>B. superba</i> extract on the growth of HeLa cell culture.....	51

LIST OF FIGURES

(continued)

		Page
Figure 14	Effect of <i>M. collettii</i> on the growth of HeLa cell line.....	52
Figure 15	Comparative dose response of <i>P. mirifica</i> (PM), <i>P. lobata</i> (PL), <i>B. superba</i> (BS) and <i>M. collettii</i> (MC) extract on the growth of HeLa cell culture.....	53
Figure 16	The effect of <i>P. mirifica</i> extract on the growth of MCF-7 and HeLa cells.....	54
Figure 17	The effect of <i>P. lobata</i> extract on the growth of MCF-7 and HeLa cells.....	55
Figure 18	The effect of <i>B. superba</i> extract on the growth of MCF-7 and HeLa cells.....	56
Figure 19	The effect of <i>M. collettii</i> extract on the growth of MCF-7 and HeLa cells.....	57
Figure 20	The effect of <i>P. mirifica</i> extract on the growth of MCF-7 cell culture in the presence of Estradiol.....	60
Figure 21	The effect of <i>P. lobata</i> extract on the growth of MCF-7 cell culture in the presence of Estradiol.....	61
Figure 22	The effect of <i>B. superba</i> extract on the growth of MCF-7 cell culture in the presence of Estradiol.....	62
Figure 23	The effect of <i>M. collettii</i> extract on the growth of MCF-7 cell culture in the presence of Estradiol.....	63
Figure 24	Morphology of the culture of MCF-7 cell line treated with <i>P.mirifica</i> and Estradiol at D ₄	65
Figure 25	Morphology of the culture of MCF-7 cell line treated with <i>P.lobata</i> and Estradiol at D ₄	66
Figure 26	Morphology of the culture of MCF-7 cell line treated with <i>B. superba</i> and Estradiol at D ₄	67
Figure 27	Morphology of the culture of MCF-7 cell line treated with <i>M. collettii</i> and Estradiol at D ₄	68

ABBREVIATIONS

AF	=Activation Function
DBD	= DNA Binding Domain
E ₂	=17β-Estradiol
ER	= Estrogen Receptor
ER ⁺	= Estrogen Receptor positive
ER ⁻	= Estrogen Receptor negative
ER α	= Estrogen Receptor Alpha
ER β	= Estrogen Receptor Beta
ERE	= Estrogen Responsive Element
g	= Gram
ED ₅₀	= Median Effective Dose
HBD	= Hormone Binding Domain
HRT	=Hormone Replacement Therapy
IC ₅₀	= Median Inhibitory Concentration
L	= liter
ICAM1	= Intercellular Adhesion Molecule-1
μg	= Microgram
μl	= Microliter
μM	=Micromolar
ml	= Mililiter
Mm	= Milimeter
M	= Molar
PTK	= Protein Tyrosine Kinase
ppm	= Part Per Million
SBG	= Steroid Binding Globulin
SERM	= Selective Estrogen Receptor Modulator