การประเมินแอกติวิตีเชิงเอสโตรเจนของสารสกัดจากกวาวเครือขาว *Pueraria mirifica* กวาวเครือแดง *Butea superba* และ กวาวเครือดำ *Mucuna collettii* ในประเทศไทย โดยใช้เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7

นางสาววิราสินี ไตรทรัพย์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-4722-5

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EVALUATION OF THE ESTROGENIC ACTIVITY OF CHEMICAL EXTRACTS FROM THAI'S WHITE KWAO KRUA *Pueraria mirifica,* RED KWAO KRUA *Butea suberba* and BLACK KWAO KRUA *Mucuna collettii* ON BREAST CANCER CELL LINE MCF-7

Miss Virasinee Traisup

ศูนย์วิทยทรัพยากร

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biotechnology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2003

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ISBN 974-17-4722-5

Thesis Title	Evaluation of the estrogenic activity of chemical extracts from Thai's white kwao krua *Pueraria mirifica*, red kwao *krua Butea superba* and black kwao krua *Mucuna collettii* on breast cancer cell line MCF-7
By	Miss Virasinee Traisup
Field of Study	Biotechnology
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 the Master's Degree

..... Dean of Faculty of Science

(Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman.

(Professor Siriwat Wongsiri, Ph.D.)

..... Thesis Advisor

(Associate Professor Wichai Cherdshewasart, D.Sc.)

..... Thesis Co-advisor

(Porntipa Picha, Ph.D.)

..... Member

(Assistant Professor Nattaya Ngamrojanavanich, Ph.D.)

..... Member

(Assistant Professor Polkit Sangvanich, Ph.D.)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิราสินี ไตรทรัพย์: การประเมินแอกติวิตีเชิงเอสโตรเจนของสารสกัดจากกวาวเครือขาว *Pueraria mirifica* กวาวเครือแดง *Butea superba* และ กวาวเครือดำ *Mucuna collettii* ในประเทศไทยโดยใช้เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 (EVALUATION OF THE ESTROGENIC ACTIVITY OF CHEMICAL EXTRACTS FROM THAI'S WHITE KWAOKRUA *Pueraria mirifica* RED KWAO KRUA *Butea superba* AND BLACK KWAO KRUA *Mucuna collettii* ON BREAST CANCER CELL LINE MCF-7) อ. ที่ปรึกษา: รศ. ดร. วิชัย เชิดชีวศาสตร์, อ.ที่ปรึกษาร่วม: ดร. พรทิพา พิชา จำนวนหน้า 85 หน้า ISBN 974-17-4722-5

การศึกษาผลของสารสกัดกวาวเครือขาว (*Pueraria mirifica*) กวาวเครือแดง (*Butea superba*) และ กวาวเครือดำ (*Mucuna collettii*) หลังจากการบ่มเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งมีสารสกัดของพืชทั้ง 3 ชนิดที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 1, 10, 100 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 3 วัน นำมาวัดปริมาณเซลล์ด้วยสารเอ็มทีทีเพื่อหาค่าร้อยละของความอยู่รอดของเซลล์เปรียบเทียบกับชุดควบคุม กวาวเครือขาวที่ความเข้มข้นต่ำ (1 μg/ml) สามารถกระตุ้นการเจริญ สารสกัดจากกวาวเครือขาวจากจังหวัดพิษณุโลกมีฤทธิ์ในการกระตุ้นการเจริญของเซลล์ MCF-7มากที่สุด (145.70±8.93%) และสารสกัดกวาวเครือขาวจากจังหวัดสระบุรีมีฤทธิ์ในการกระตุ้นการเจริญของเซลล์ MCF-7น้อยที่สุด (105.40±4.07%) ในขณะที่ความเข้มข้นสูง (1,000 μg/ml) มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ MCF-7 ได้เล็กน้อย โดยมีค่า IC_{50} มากกว่า 1,000 μg/ml สารสกัดจากกวาวเครือแดงที่ความเข้มข้นสูง (1000 μg/ml) ยับยั้งการเจริญของเซลล์ MCF-7 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) สารสกัดจากจังหวัดกาญจนบุรีมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้สูงสุด (IC_{50} 76.65 μg/ml). และสารสกัดจากกวาวเครือดำที่ความเข้มข้นสูง (1,000 μg/ml) ยับยั้งการเจริญของเซลล์ MCF-7 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) สารสกัดกวาวเครือดำจากจังหวัดกาญจนบุรีมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ MCF-7ได้สูงสุด (IC_{50} 114.90 μg/ml) ผลการศึกษาปัจจัยทางพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อมต่อการออกฤทธิ์ของกวาวเครือขาว พบว่า กวาวเครือขาวสายพันธุ์ไซยปราการที่เก็บต่างฤดู มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในการยับยั้งเซลล์ MCF-7

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หลักสูตร เทคโนโนยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....วิราสินี ไตรทรัพย์.....

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2546 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

4472521023: MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS: *Pueraria mirifica/Butea superba/Mucuna collettii/* MCF-7/CANCER

VIRASINEE TRAISUP: EVALUATION OF THE ESTROGENIC ACTIVITY OF CHEMICAL EXTRACTS FROM THAI'S WHITE KWAO KRUA *Pueraria mirifica* RED KWAO KRUA *Butea superba* AND BLACK KWAO KRUA *Mucuna collettii* ON BREAST CANCER CELL LINE MCF-7.

THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. WICHAI CHERDSHEWASART, D.Sc.,

THESIS CO-ADVISOR: PORNTIPA PICHA, Ph.D. 85 pp. ISBN 974-17-4722-5

The effects *of Pueraria mirifica, Butea superba* and *Mucuna collettii* extracts were performed by incubating the MCF-7 (mammary carcinoma) with the extracts at 0, 0.1, 1, 100, 1000 μg/ml for 3 days. The MTT assay of the cell culture was determined and calculated for the growth percentage compared with the control group. *P. mirifica* extract at low concentration (1 μg/ml) showed significant proliferative effect ($p < 0.05$). *P. mirifica* extracts from Phitsanulok exhibited maximum proliferative effect on MCF-7 cells (145.70±8.93 %) with the minimum of *P. mirifica* collected from Saraburi (105.40±4.07 %). The plants showed slightly anti-proliferative effects on MCF-7 cells at high concentrations (1,000 μg/ml) with IC_{50} greater than 1,000 μg/ml. *B. superba* showed significant antiproliferative effect on MCF-7 cells at high concentrations (1,000 μg/ml, $p < 0.05$). The extract collected from Kanchanaburi showed maximum anti-proliferative effect on MCF-7 cells (IC_{50} 76.65 μg/ml). *M. collettii* extracts showed significant anti-proliferative effect on MCF-7 cells ($p < 0.05$) at high concentrations (1,000 μg/ml). The extract collected from Kanchanaburi show maximum anti-proliferative effect (IC_{50} 114.90 μg/ml). The study of influence of genetics and environment revealed that the Chaiprakan clone of *P. mirifica* collected in different season showed varied antiproliferative effect.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Program of Biotechnology Student's signature Virasinee Traisup

Filed of study Biotechnology Advisor's signature

Academic year 2003 Co-advisor's signature Porntipa 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 and Assistant Professor Dr. Nattaya Ngamrojanavanich and Assistant Professor Dr. Polkit Sangvanich for kindly helpful and valuable guidance.

I would like to thank Assistant Professor Orawan Sattayalai Assistant Professor Dr. Patchanee Singha-asa for her kind permission to use inverted microscope and other necessary instruments for cell culture lab.

My acknowledgement is also express to Research Division, National Cancer Institute (Thailand), Department of Biology and Department of Microbiology, 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, Mrs. Subongkoj Subtang, Miss Warakorn Cheewasopit, Miss Sutijit Sriwacharakul and Miss Nipaporn Chokchaikasemsuk, 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 and finally, the deepest appreciation is expressed to my family for their love, support and understanding.

CONTENTS

	Page
ABSTRACT THAI	iv
ABSTRACT ENGLISH	v
ACKNOWLEDGEMENTS	vi
CONTENTS	vii
LIST OF TABLES	ix
LIST OF FIGURES	xi
ABBREVIATIONS	xii
CHAPTER I INTRODUCTION	1
CHAPTER II LITERATURE REVIEW	3
I Botanical background and chemical constituents	4
1.1 *Pueria mirifica*	4
1.2 *Butea superba*	6
1.3 *Mucuna collettii*	7
II Phytoestrogens	7
2.1 Sources of phytoestrogens	8
2.2 Effects of phytoestrogens on cancer	8
III The interaction between phytoestrogens and estrogen receptor.	16
3.1 Estrogen receptor	16
3.1.1 The distribution of estrogen receptor	16
3.1.2 Functional region of estrogen receptor	17
3.1.3 Estrogen action on estrogen receptor	18
3.2 Phytoestrogens action on estrogen receptor	18
3.3 Selective estrogen receptor modulator	19
IV MTT assay	20
CHAPTER III MATERIALS AND METHODS	22
1 The plant extraction	22
1.1 Plant powder preparation	22
1.2 Crude Extraction	22
2 Cell and cell culture	26
2.1 Subculture	26

CONTENTS
(Continued)

	Page
2.2 Cell suspension preparation for assay.....	26
2.2.1 Cell digestion	26
2.2.2 Cell count and dilution.....	27
3. Puerarin test.....	28
4.Cytotoxicity test.....	29
4.1 Effects of the plant extracts on MCF-7 cell line (Range finding test).....	29
4.2 Inhibition concentration (IC_{50}) at D_3 analysis for the plant extracts.....	29
5 MTT assay.....	29
5.1 The calculation of cell growth.....	30
6 Statistical analysis.....	30
CHAPTER IV RESULTS	31
1. The plant extraction.....	31
2. Proliferative effect of puerarin test.....	32
3. Cytotoxicity test.....	33
3.1 *Puerarin mirifica*	33
3.2 *Butea superba*	33
3.3 *Mucuna collettii*	34
3.4 Correlation of isoflavone content in *P. mirifica* collected from 28 provinces with proliferative effect	34
CHAPTER V DISCUSSION.....	69
CHAPTER VI CONCLUSION.....	72
REFERENCES.....	74
APPENDICES.....	81
BIOGRAPHY.....	85

LIST OF TABLES

		Page
Table 1	Common name of *P. mirifica, B. superba, M collettii* in various part of Thailand.	3
Table 2	Summarize of the chemical constituents of *P. mirifica.*	5
Table 3	Summarize of the chemical constituents of *B. superba..*	6
Table 4	Summarize of the study of the effects of phytoestrogens on breast cancer cell lines.	9
Table 5	Weight of crude extracts of *P. mirifica, B superba* and *M. colettii*	31
Table 6	The characteristic of the plant extract.	32
Table 7	The percentage growth of Puerarin and Estradiol on MCF-7 cells.	32
Table 8	The percentage growth of MCF-7 of the first 5 highest proliferation effect in correlation with isoflavone content (%)	35
Table 9	The isoflavone content (%) of 23 *P. mirifica* samples with lower proliferation effect than the first 5 highest proliferation effect	36
Table 10	Mean of isoflavone content (%) in first 5 highest proliferation effect compared with 22 *P. mirifica* samples.	37
Table 11	Isoflavone glycoside and aglycoside content (%) of the first 5 highest proliferation effect of *P. mirifica*	37
Table 12	Isoflavone glycoside and aglycoside content (%) in 23 *P. mirifica* samples with lower proliferation effect than the first 5 highest proliferation effect	38
Table 13	Mean of isoflavone content (%) in first 5 highest proliferation effect compared with 23 *P. mirifica* samples	39
Table 14	The ranked *P. mirifica* samples according to the amunt of isoflavone; puerarin, daidzin, genistin, daidzein and genistein contents	39

Table 15	Isoflavone content in mg/100g powder of filed grown *P. mirifica* clone Doi Tao cultivated in different season	40
Table 16	Isoflavone content in mg/100g powder of field grown *P. mirifica* clone Chaiprakarn cultivated in different season	40
Table 17	The growth response percentage of *P. mirifica* extract on MCF-7 cell culture compare mean of population	41
Table 18	The growth response percentage of *P. mirifica* extract on MCF-7 cell culture compare with control.	43
Table 19	The growth response percentage of MCF-7 cell culture to *P. mirifica* extract different season ($p<0.05$)	54
Table 20	The growth response percentage of *B. superba* extract on MCF-7 cell culture compare with mean of population.	57
Table 21	The growth response percentage of *B. superba* extract on MCF-7 cell culture compare with control	58
Table 22	The growth response percentage of *M. collettii* extract on MCF-7 cell culture.	66

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

		Page
Figure 1	Schematic structural of ER (A-F region).	17
Figure 2	Convertion of Tetrazolium bromide (MTT) to Formazan crystals	22
Figure 3	Sources of plant materials; *Pueraria mirifica* in the experiments.	23
Figure 4	Sources of plant materials; *Butea superba* in the experiments.	24
Figure 5	Sources of plant materials; *Mucuna collettii* in the experiments.	25
Figure 6	Corner square (enlargement). Cells were counted on top and left touching middle line and not counted touching middle line at bottom and right.	28
Figure 7	Effect of *P. mirifica* extract on the growth of MCF-7 cell culture.	45
Figure 8	Effect of *P. mirifica* extract (Chaiprakarn) on the growth of MCF-7 cell culture of differential season.	55
Figure 9	Effect of *P. mirifica* extract (Doi Tao) on the growth of MCF-7 cell culture of differential season.	56
Figure 10	Effect of *B. superba* extract on the growth of MCF-7 cell culture.	59
Figure 11	Effect of *M. collettii* on the growth of MCF-7 cell culture.	67

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATIONS

AF	Activation Function
DBD	DBA Binding Domain
E_2	17β-Estradiol
ER	Estrogen Receptor
ER+	Estrogen Receptor positive
ER-	Estrogen Receptor negative
ERα	Estrogen Receptor Alpha
ERβ	Estrogen Receptor Beta
ERE	Estrogen Responsive Element
g	Gram
ED_{50}	Median Effective Dose
HRT	Hormone Replacement Therapy
IC_{50}	Median Inhibitory Concentration
L	liter
LBD	Ligand Binding Domain
ICAM1	Intercellular Adhesion Molecule-1
μg	Microgram
μl	Microliter
μM	Micromolar
ml	Milliliter
MCF-7	Michigan Cancer Foundation 7 cell line
Mm	Millimeter
M	Molar
PTK	Protein Tyrosine Kinase
ppm	Part Per Million
SBG	Steroid binding Globulin
SERMs	Selective Estrogen Receptor Modulators

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย