

ผลของกาวเครือขาว *Pueraria mirifica* Airy Shaw & Suvatabandhu

ต่อการสูญเสียมวลกระดูกในหนูขาวที่ถูกตัดต่อมบ่งเพศออก

นายนทกรณ์ อรุโสภา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**EFFECTS OF WHITE KWAO KRUA *Pueraria mirifica*  
Airy Shaw & Suvatabandhu ON BONE LOSS IN  
GONAECTOMIZED RATS**

**Mr. Nontakorn Urasopon**

**A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Biological Science**

**Faculty of Science**

**Chulalongkorn University**

**Academic Year 2007**

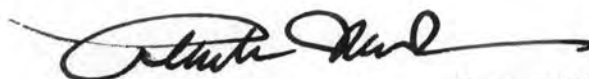
**Copyright of Chulalongkorn University**

501725

**Thesis Title** EFFECTS OF WHITE KWAO KRUA *Pueraria mirifica* Airy Shaw & Suvatabandhu ON BONE LOSS IN GONADECTOMIZED RATS  
**By** Nontakorn Urasopon  
**Field of Study** Biological Science  
**Thesis Advisor** Associate Professor Suchinda Malaivijitnond, Ph.D.  
**Thesis Co-advisor** Associate Professor Yuzuru Hamada, D.Sc.

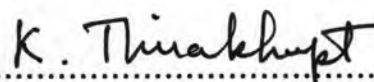
---

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctoral Degree

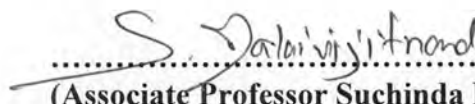


.....Dean of the Faculty of Science  
(Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.)

#### THESIS COMMITTEE



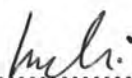
.....Chairman  
(Assistant Professor Kumthorn Thirakhupt, Ph.D.)



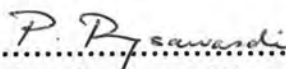
.....Thesis Advisor  
(Associate Professor Suchinda Malaivijitnond, Ph.D.)



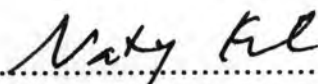
.....Thesis Co-advisor  
(Associate Professor Yuzuru Hamada, D.Sc.)



.....Member  
(Associate Professor Wichai Cherdshewasart, D.Sc.)



.....Member  
(Associate Professor Piamsook Pongsawasdi, Ph.D.)



.....Member  
(Professor Nateetip Krishnamra, Ph.D.)

นันทกรณ ฐโรโสภณ: ผลของกวาวเครือขาว *Pueraria mirifica* Airy Shaw & Suvatibandhu ต่อการสูญเสียมวลกระดูกในหนูขาวที่ถูกตัดต่อมบ่งเพศออก (EFFECTS OF WHITE KWAO KRUA *Pueraria mirifica* Airy Shaw & Suvatibandhu ON BONE LOSS IN GONADECTOMIZED RATS) อ.ที่ปรึกษา: รศ.ดร. สุจินดา มาลัยวิจิตรนนท์, อ.ที่ปรึกษาร่วม: Assoc. Prof. Dr. Yuzuru Hamada, 146 หน้า


การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการให้กวาวเครือขาว ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรไทยที่มีสารไฟโตเอสโตรเจนความเข้มข้นสูงต่อการป้องกันการสูญเสียความหนาแน่น และมวลกระดูกในหนูขาวเพศเมียและเพศผู้วัยกลางตอนปลาย (อายุ 7 เดือน) ที่ตัดต่อมบ่งเพศออก

การทดลองได้ทำการตัดรังไข่ในหนูเพศเมียและตัดอัณฑะในหนูเพศผู้เพื่อเหนี่ยวนำให้หนูอยู่ในภาวะขาดฮอร์โมนเพศและเกิดภาวะกระดูกพรุน ทำการป้อนกวาวเครือขาวในขนาด 0, 10, 100 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัวต่อวัน หรือให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนสังเคราะห์ทดแทนขนาด 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัวต่อวัน (กลุ่มควบคุมเชิงบวก) เป็นเวลา 3 เดือน ทำการวัดความหนาแน่นกระดูกและมวลกระดูกโดยใช้เครื่อง **peripheral quantitative computerized tomography (pQCT)** และศึกษาโครงสร้างระดับจุลพยาธิวิทยาของกระดูกภายใต้กล้องจุลทรรศน์

พบว่า การตัดต่อมบ่งเพศออกในหนูสามารถชักนำให้เกิดภาวะการสูญเสียความหนาแน่นและมวลกระดูกได้ และเมื่อให้กวาวเครือขาวสามารถป้องกันการสูญเสียความหนาแน่นและมวลกระดูกได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยขึ้นอยู่กับขนาดของกวาวเครือขาวที่ให้ในหนูทั้งสองเพศ นอกจากนี้ยังพบว่า การให้กวาวเครือขาวในหนูเพศเมียสามารถป้องกันการลดลงของน้ำหนักกระดูกที่เกิดจากการตัดรังไข่ได้ โดยขึ้นกับขนาดของกวาวเครือขาวที่ให้ ส่วนในหนูเพศผู้ การตัดอัณฑะออกทำให้น้ำหนักของเซมินัลเวสซิเคิล (**seminal vesicles**) และต่อมลูกหมากส่วนล่าง (**ventral prostate glands**) ลดลง แต่เมื่อให้กวาวเครือขาวพบว่า ไม่มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักของอวัยวะเหล่านี้


ผลการทดลองครั้งนี้สรุปได้ว่าอาจใช้กวาวเครือขาวเป็นยาในการป้องกันหรือรักษาโรคกระดูกพรุนได้ทั้งในเพศหญิงและเพศชายวัยสูงอายุที่อยู่ในภาวะพร่องฮอร์โมนเพศได้ แต่อย่างไรก็ตามควรจะต้องมีการศึกษาถึงผลข้างเคียงของการใช้ต่อการเกิดมะเร็ง เช่น มะเร็งเยื่อบุกระดูกหรือมะเร็งเต้านมในเพศหญิง และมะเร็งต่อมลูกหมากในเพศชายเสียก่อน

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

ลายมือชื่อนิติ..... 

ปีการศึกษา 2550

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... 

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... 

## 4573862223 : Major Biological Science

**KEY WORDS : Bone Gonadectomy Phytoestrogens *Pueraria mirifica* Rat.**

**NONTAKORN URASOPON: EFFECTS OF WHITE KWAO KRUA *Pueraria mirifica* Airy Shaw & Suvatabandhu ON BONE LOSS IN GONADECTOMIZED RATS. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. SUCHINDA MALAIVIJITNOND, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. YUZURU HAMADA, Ph.D., 146 pp.**

This study aimed to investigate the effects of three month administration of crude of *Pueraria mirifica*, a Thai phytoestrogen containing plant, on bone loss and reproductive organs in the late middle age (7 months old) ovariectomized (OVX) and orchidectomized (ORX) rats.

*P. mirifica* at a dose of 0, 10, 100 or 1000 mg/kg BW/day or 0.1 mg/kg BW/day of 17  $\alpha$ -ethinylestradiol (EE; a positive control) in 1 ml distilled water was gavaged to OVX and ORX rats for three months. After three months, rats were sacrificed and the bone mineral density (BMD) and bone mineral content (BMC) at the tibia, femur and the 4<sup>th</sup> lumbar vertebral body were measured with a peripheral quantitative computerized tomography (pQCT) densitometry and the bone microarchitecture was determined by histological technique.

Bone loss in trabecular and cortical compartments at the various sites in axial bone (fourth lumbar vertebral body) and long bones (tibia and femur) induced by OVX in female rats or ORX in male rats was dose-dependently prevented by *P. mirifica*. The effects of 100 mg/kg BW/day of *P. mirifica* treatment on prevention of bone loss were equivalent to those of 0.1 mg/kg BW/day of EE. In female rats, the reduction of uterine weight induced by OVX was significantly recovered by *P. mirifica* treatment in a dose dependent manner. In male rats, the weights of seminal vesicles and ventral prostate glands, which were significantly decreased after three months of ORX, were not altered by *P. mirifica* treatment.

These results suggest that *P. mirifica* has a therapeutic potential as a drug for treatment or prevention of osteoporosis in elderly women and elderly men with hypogonadism. However, the negative side effects on cancer induction, such as endometrial or breast cancer in females and prostate cancer in males should be further investigated.

Field of study Biological Science

Student's signature.....

Academic year 2007

Advisor's signature.....

Co-advisor's signature.....

## ACKNOWLEDGEMENTS

I wish to express my deepest gratitude and appreciation to my advisor, Associate Professor Dr. Suchinda Malaivijitnond, for her excellent instruction, guidance, encouragement and support throughout my study. I am greatly indebted to Associate Professor Dr. Yuzuru Hamada, my co-advisor, for his full support in my bone densitometry study and his kindness throughout my stay in his laboratory at the Section of Morphology, Primate Research Institute, Kyoto University, Japan.

I sincerely thank to the chairman, Assistant Professor Dr. Kumthorn Thirakhupt and the other members of my thesis committee, Associate Professor Dr. Wichai Cherdshewasart, Associate Professor Dr. Piamsook Pongsawasdi and Professor Dr. Nateetip Krishnamra for their valuable comments, suggestions and corrections of this thesis.

My great appreciation would extend to Associate Professor Dr. Kazuo Asaoka from the Section of Molecular Biology, Primate Research Institute, Kyoto University, Japan for his helpful training on HPLC technique.

My sincere thanks also go to Associate Professor Dr. Wichai Cherdshewasart from the Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University for providing the *Pueraria mirifica* powder.

I would like to thank the dean of Faculty of Agriculture, Ubon Rajathanee University for facilitating the histological laboratory.

I would like to thank staffs of the Primate Research Institute, Kyoto University and the Primate Research Unit, Chulalongkorn University for their supports, and Professor Dr. Laura Newell-Morris, University of Washington for her invaluable comments.

Funding for this research was provided by the Thailand Research Fund (TRF) for the Royal Golden Jubilee Ph.D. Program (RGJ), contract No. PHD/0006/2547), the Japanese Society for the Promotion of Sciences (fund No. 14204083), and the grant for Primate Research Unit from Chulalongkorn University, Thailand.



# TABLE OF CONTENTS

	<b>PAGE</b>
ABSTRACT (THAI).....	iv
ABSTRACT (ENGLISH).....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
TABLE OF CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	ix
LIST OF FIGURES.....	x
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xii
CHAPTER I INTRODUCTION.....	1
CHAPTER II LITERRATURE REVIEW.....	6
- Bone.....	6
- Phytoestrogens.....	22
CHAPTER III MATERIALS AND METHODS.....	39
- Animals.....	39
- Experimental design.....	40
- Vaginal smear checks.....	43
- Uterine, seminal vesicle and ventral prostate gland wet weight.....	43
- Bone measurement.....	44
- Bone histology.....	49
- Hormonal analysis.....	49
- Phytoestrogen analysis.....	50
- Statistical analysis.....	51

	<b>PAGE</b>
CHAPTER IV RESULTS.....	54
- Effects of <i>P. mirifica</i> on bone loss in ovariectomized rats.....	54
- Effects of <i>P. mirifica</i> on bone loss in orchidectomized rats.....	68
- The effect of <i>P. mirifica</i> on TbBMD reduction comparing between OVX and ORX rats.....	82
- Isoflavone contents in rodent diets and <i>P. mirifica</i> .....	83
CHAPTER V DISCUSSION.....	88
- Effects of <i>P. mirifica</i> on bone loss in ovariectomized rats.....	90
- Effects of <i>P. mirifica</i> on bone loss in orchidectomized rats.....	94
- The effect of <i>P. mirifica</i> on TbBMD reduction comparing between OVX and ORX rats.....	98
- Isoflavone contents in rodent diets and <i>P. mirifica</i> .....	98
CHAPTER VI CONCLUSION.....	102
REFERENCES.....	104
APPENDICES.....	122
BIOGRAPHY.....	146



## LIST OF TABLES

TABLE	PAGE
2.1	A partial list of shared important risk factors for osteoporosis found in men as well as in women..... 14
2.2	Phytoestrogen contents in <i>P. mirifica</i> ..... 34
3.1	Composition of the standard rodent diet and soybean-free diet..... 40
4.1	Changes of body weights, absolute and relative uterine weights and serum estradiol levels of sham control (SH) rats and ovariectomized (OVX) rats..... 55
4.2	Body weights and absolute and relative weights of seminal vesicles and prostate glands of SH rats and ORX rats..... 69
4.3	Changes in serum estradiol and testosterone levels in SH rats and ORX rats..... 71
4.4	Comparison of the percentages of prevention on the TbBMD reduction after treated with <i>P. mirifica</i> between OVX and ORX rats..... 82
4.5	Isoflavone contents (mg/100 g sample) in standard and soybean-free rodent diets and in <i>P. mirifica</i> determined by the high performance liquid chromatography (HPLC) technique..... 87

## LIST OF FIGURES

FIGURE	PAGE
2.1 Bone structure.....	9
2.2 Cortical and trabecular bone areas in the cross-sectionally metaphyseal part of the rat distal femur taken by peripheral Quantitative Computed Tomography (pQCT).....	9
2.3 The bone remodeling sequence is initiated by osteoclasts responded for bone resorption process.....	10
2.4 Trabecular bone density and structure in second lumbar vertebra (L2).....	12
2.5 Comparing between human and rat bones at lumbar vertebra, femur and tibia.....	21
2.6 Chemical structures of major isoflavone phytoestrogens .....	23
2.7 The <i>Pueraria mirifica</i> : woody climbers, flowers and tuberous roots...	36
3.1 Peripheral Quantitative Computed Tomography (pQCT).....	46
3.2 The longitudinal preview of bone scanning.....	47
3.3 A cross-sectionally scanned at the 2.0, 2.5 and 3.0 mm far from epiphyseal plate of proximal tibia.....	48
3.4 The HPLC fingerprint of isoflavone contents in standard rodent diet.....	53
4.1 Absolute uterine weights in sham control (SH) and ovariectomized (OVX) rats.....	57
4.2 Trabecular bone mineral densities (TbBMDs) in IC, SH and OVX rats .....	60
4.3 Cortical bone mineral densities (CtBMDs) in IC, SH and OVX rats ...	61
4.4 Trabecular bone mineral contents (TbBMCs) in IC, SH and OVX rats .....	64

<b>FIGURE</b>	<b>PAGE</b>
4.5 Cortical bone mineral contents (CtBMCs) in IC, SH and OVX rats ....	65
4.6 Histological section [stained with H & E (50x)] in longitudinal and medio-lateral plane of the proximal tibia at the epiphyseal growth plate and metaphyseal area of SH rats (A) and OVX rats.....	67
4.7 Trabecular bone mineral densities (TbBMDs) in IC, SH and Orchidectomized (ORX) rats .....	74
4.8 Cortical bone mineral densities (CtBMDs) in IC, SH and ORX rats ...	75
4.9 Trabecular bone mineral contents (TbBMCs) in IC, SH and ORX rats .....	78
4.10 Cortical bone mineral contents (CtBMCs) in IC, SH and ORX rats.....	79
4.11 Histological section [stained with H & E (50x)] in longitudinal and medio-lateral plane of the proximal tibia at the epiphyseal growth plate and metaphyseal area of SH rats (A) and ORX rats.....	81
4.12 Calibration lines for the five standard isoflavones studied, determined by HPLC technique.....	85
4.13 The concentration of three consecutive extractions of isoflavones in <i>P. mirifica</i> by HPLC technique .....	86

## LIST OF ABBREVIATIONS

AR	=	Androgen receptor
BMC	=	Bone mineral content
BMD	=	Bone mineral density
BW	=	Body weight
cm <sup>3</sup>	=	Cubic centimeter
CtBMC	=	Cortical bone mineral content
CtBMD	=	Cortical bone mineral density
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
EE	=	17 $\alpha$ -ethinylestradiol
E <sub>2</sub>	=	17 $\beta$ -estradiol
ER	=	Estrogen receptor
ER $\alpha$	=	Estrogen receptor alpha
ER $\beta$	=	Estrogen receptor beta
ERT	=	Estrogen replacement therapy
FD	=	Femoral diaphysis
FM	=	Distal femoral metaphysis
FSH	=	Follicle stimulating hormone
g	=	Gram
H&E	=	Hematoxylin and Eosin
HPLC	=	High performance liquid chromatography
LH	=	Luteinizing hormone
L4	=	Fourth lumbar vertebra
mA	=	Milliam
mg	=	Milligram
ml	=	Milliliter
mm	=	Millimeter
ORX	=	Orchidectomy, orchidectomized
OVX	=	Ovariectomy, ovariectomized
pQCT	=	peripheral Quantitative Computed Tomography
RIA	=	Radioimmunoassay

TbBMC	=	Trabecular bone mineral content
TbBMD	=	Trabecular bone mineral density
TD	=	Tibial diaphysis
TM	=	Proximal tibial metaphysis
μg	=	Microgram