

ผลของกวาวเครือขาว (*Pueraria mirifica*) ต่อการทำงานของหลอดเลือดแดงใหญ่
ที่แยกออกจากกายของหนูขาวที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง
และกระต่ายที่ผ่าตัดเอารังไข่ออก

นางสาววัชรพร อัดตพงษ์ไพบูลย์



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชวิทยา สหสาขาวิชาเภสัชวิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-3211-2

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**EFFECTS OF *PUERARIA MIRIFICA* ON ISOLATED AORTA IN HIGH
CHOLESTEROL-FED RATS AND OVARIECTOMIZED RABBITS**

Miss Watcharaporn Auttapongpaiboon

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacology
Inter-Department Programs in Pharmacology
Graduated School
Chulalongkorn University
Academic Year 2002
ISBN 974-17-3211-2**

วัชรพร อัดตพงษ์ไพบูลย์ : ผลของกวาวเครือขาว (*Pueraria mirifica*) ต่อการทำงานของหลอดเลือดแดงใหญ่ที่แยกออกจากกายของหนูขาวที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง และกระต่ายที่ผ่าตัดเอารังไข่ออก (EFFECTS OF *PUERARIA MIRIFICA* ON ISOLATED AORTA IN HIGH CHOLESTEROL-FED RATS AND OVARECTOMIZED RABBITS) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร. สุพิศรา ศรีไชยรัตน์, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ดร. ลัดดาวัลย์ ผิวทองงาม, รศ.ดร. สุมลยา กาญจนะพังคะ, 126 หน้า. ISBN 974-17-3211-2.

กวาวเครือขาว (*Pueraria mirifica*) เป็นสมุนไพรพื้นบ้านของประเทศไทย ที่สามารถแสดงฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนได้ ในการศึกษาที่มุ่งศึกษาผลของกวาวเครือขาวต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับไขมัน และผลต่อการทำงานของหลอดเลือดแดงใหญ่ โดยกลไกการคลายตัวที่ต้องอาศัยการทำงานของเซลล์บุผนังหลอดเลือดในหนูขาวที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลสูงและกระต่ายที่ได้รับการผ่าตัดเอารังไข่ออก โดยส่วนที่ 1 ทำการศึกษาในหนูขาวเพศผู้ 30 ตัว ทำการสุ่มจัดเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว ดังนี้ กลุ่มที่ 1 จัดให้ได้รับอาหารปกติเป็นกลุ่ม Control กลุ่มที่ 2 ให้อาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูงเป็นกลุ่ม Cholesterol และกลุ่มที่ 3 ให้อาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง และกวาวเครือขาวขนาด 100 mg/kg/day หลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 90 วัน ทำการเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อวิเคราะห์หาระดับคอเลสเตอรอล, ไตรกลีเซอไรด์, high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) และ low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) ส่วนหลอดเลือดนำไปศึกษาผลการหดและคลายตัว ผลการทดลองพบว่า กลุ่มที่ได้รับกวาวเครือขาวมีระดับคอเลสเตอรอล, ไตรกลีเซอไรด์, HDL-C และ LDL-C ลดลงแตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้กลุ่มที่ได้รับกวาวเครือขาวยังมีอัตราส่วนของ HDL-C/LDL-C ดีขึ้น ผลการทำงานของหลอดเลือดพบว่าไม่มีความแตกต่างในการหดตัวเมื่อทดสอบด้วย noradrenaline (NA) และการคลายตัวแบบที่ไม่ต้องอาศัยการทำงานของเซลล์บุผนังหลอดเลือด เมื่อทดสอบด้วย sodium nitroprusside (SNP) แต่พบว่าการคลายตัวของหลอดเลือดแบบที่ต้องอาศัยการทำงานของเซลล์บุผนังหลอดเลือดของกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลลดลง ขณะที่กลุ่มที่ได้รับกวาวเครือขาวร่วมด้วยมีการทำงานของหลอดเลือดดีขึ้นเมื่อทดสอบด้วย acetylcholine (ACh) ในส่วนที่ 2 ทำการศึกษาในกระต่ายที่ถูกผ่าตัดเอารังไข่ออก โดยกลุ่มที่ 1 ทำการทดลองในกระต่ายปกติเพศเมียจัดเป็นกลุ่มควบคุม กลุ่มอื่น ๆ ทำการศึกษาในกระต่ายที่ถูกผ่าตัดเอารังไข่ออก บริหารยาโดยวิธีรับประทาน ซึ่งกลุ่มที่ 2 ให้น้ำกลั่นเป็นกลุ่ม ovariectomized กลุ่มที่ 3 ให้ 17 β -estradiol ขนาด 4 mg/kg/day เป็นกลุ่ม OVX+Estrogen และกลุ่มที่ 4 ให้กวาวเครือขาวขนาด 100mg/kg/day เป็นกลุ่ม OVX+*P. mirifica* ทำการเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อวิเคราะห์หาระดับไขมันต่าง ๆ เช่นกัน ทุก ๆ 4 สัปดาห์ หลังจาก 90 วัน ทำการศึกษาผลการทำงานของหลอดเลือดและลักษณะทางกายภาพของเซลล์บุผนังหลอดเลือด ผลการทดลองพบว่าระดับคอเลสเตอรอล, ไตรกลีเซอไรด์, HDL-C และ LDL-C ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ผลการหดตัวของหลอดเลือดเมื่อทดสอบด้วย NA และผลการคลายตัวของหลอดเลือด เมื่อทดสอบด้วย SNP ไม่มีความแตกต่างทางสถิติเช่นกัน ขณะที่ผลการคลายตัวในแบบที่ต้องอาศัยการทำงานของเซลล์บุผนังหลอดเลือดกลุ่ม OVX+Estrogen และ OVX+*P. mirifica* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มที่ไม่ได้รับยา นอกจากนี้กลุ่ม OVX+Estrogen และ OVX+*P. mirifica* มีโครงสร้างของเซลล์บุผนังหลอดเลือดสมบูรณ์ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ในขณะที่กระต่ายในกลุ่มที่ถูกผ่าตัดเอารังไข่ออกและไม่ได้รับยามิ่จำนวนเซลล์บุผนังหลอดเลือดลดลง และมีการสะสมของเม็ดเลือดขาวปรากฏขึ้น ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า กวาวเครือขาวมีผลดีต่อระบบหลอดเลือดและหัวใจ ในสัตว์ทดลองที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง โดยลดระดับคอเลสเตอรอล, ไตรกลีเซอไรด์ และปกป้องการทำงานของหลอดเลือดในกระต่ายที่ถูกผ่าตัดเอารังไข่ออกได้.

สหสาขาวิชา เกษตรวิทยา

สาขาวิชา เกษตรวิทยา

ปีการศึกษา 2545

ลายมือชื่อนิสิต วัชรพร อัดตพงษ์ไพบูลย์

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา Dr. S. S.

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม Dr. S. S.

Dr. S. S.

4389096420 : MAJOR : PHARMACOLOGY

KEYWORDS : *PUERARIA MIRIFICA*/ ENDOTHELIUM/ HYPERCHOLESTEROLEMIA

WATCHARAPORN AUTTAPONGPAIBOON : EFFECTS OF *PUERARIA MIRIFICA* ON ISOLATED AORTA IN HIGH CHOLESTEROL-FED RATS AND OVARIECTOMIZED RABBITS. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. DR. SUPATRA SRICHAIRAT, THESIS COADVISOR : ASST. PROF. DR. LADDAWAL PHIVTHONG-NGAM, ASSOC. PROF. DR. SUMONLYA KANCHANAPANGKA, 126 pp. ISBN 974-17-3211-2.

Pueraria mirifica (White Kwao Keur) is an indigenous herb of Thailand which possess estrogenic-like activity. Experiments were designed to study the effects of *P.mirifica* on lipid profile and endothelium-dependent vascular response in hypercholesterolemic rats and ovariectomized rabbits. Part 1: 30 male Wistar rats were randomly assigned to three groups. The rats were fed normal diet serve as control group. The other 2 groups, rats were fed diet containing 1% cholesterol (cholesterol group) and 1% cholesterol supplemented with *P. mirifica* 100 mg/kg/day (cholesterol+*P.mirifica* group). After 90 days, blood samples were obtained for the evaluation of total cholesterol, triglyceride, HDL-C and LDL-C. The aortas were removed, cut into ring and measured for isometric tension. Total cholesterol, LDL-C, HDL-C and triglyceride were significantly decreased in the cholesterol+*P.mirifica* group compared with cholesterol group ($p<0.05$). In addition, supplementation with 100 mg/kg/day *P.mirifica* significantly improved HDL/LDL ratio. There was no significant different in the contraction response to noradrenaline (10^{-9} to 10^{-4} M) in all experimental groups. The endothelium-dependent relaxation to acetylcholine (10^{-9} to 10^{-4} M) was impaired in the cholesterol group and restored in cholesterol+*P.mirifica* group, whereas, endothelium-independent relaxation to sodium nitroprusside (10^{-9} to 10^{-4} M) was not significantly different between all experimental groups. Part 2 : 20 ovariectomized (OVX) rabbits were randomly assigned to four groups. The normal rabbits were orally administered with double distilled water. The other 3 groups, OVX rabbits were orally administered with double distilled water (ovariectomized group), 17 β -estradiol 4 mg/kg/day (OVX+Estrogen group) and *P. mirifica* 100 mg/kg/day (OVX+*P.mirifica* group). Blood sample were obtained every 4 week for analysis of blood biochemistry and serum lipid parameters. After 90 days, the aortas were measured for vascular function and pathologic examination of endothelial cell. Total cholesterol, LDL-C, HDL-C and triglyceride were not significantly different between all group. There was no significant different in the contraction response to NA and the endothelium-independent relaxation to SNP, whereas, endothelium-dependent relaxation to Ach was impaired in ovariectomized group and improved in OVX+Estrogen and OVX+*P. mirifica* group. Maintained pathologic of endothelial in OVX+Estrogen group and OVX+*P. mirifica* group as control. In contrast, vessel from cholesterol group demonstrated a loss of endothelial cell. Adherent of a large number of WBC are clustered on the surface of the endothelium. These results indicated that *P. mirifica* had beneficial effects on cardiovascular system in cholesterol-fed rats by cholesterol lowering effect and maintained endothelial cell and vascular function in OVX rabbits.

Inter-Department Pharmacology

Field of study Pharmacology

Academic year 2002

Student's signature W. et al.

Advisor's signature S. Srichairat

Co-advisor's signature L. Phivthong-Ngam

Sumonlya Kanchanapangka



Acknowledgements

I wish to express my sincere gratitude to my advisor, Associated Professor Dr. Supatra Srichairat, my thesis co-advisor, Assistant Professor Dr. Laddawal Phivthong-ngam, Associate Professor Dr. Sumonlya Kanchanapangka for their valuable advise, guidance, comments and encouragement during my research study. Thanks are also extended to the committee members : Associate professor Sophit Thummaarree and Associate Professor Dr. Prasan Dhumma-upakorn for their useful comments.

This work was supported partly by Grant from the Ministry of University Affairs and the Graduate School thesis grant, Chulalongkorn University.

I wish to thank Dr. Amphawan Apisariyakul, Dr. Yupin Savarindta and Dr. Chaiyo Chaichanpitayud for providing *Pueraria mirifica* for this study. Thanks are also extended to Dr. Mongkul Tachakumpu for providing ovariectomized rabbits for the study and Dr. Suriyaphongse Kulkeratiyut as well as Professional Laboratory, Bangkok. I also thanks Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University for the animal housing facility.

I also would like to thank all the staff member of the Department of Pharmacology, Faculty of Verinary, Chulalongkorn University and the Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University for their helps.

Finally, I would like to thank my family and my friends for helps and encouragement.

Watcharaporn Auttapongpaiboon

Contents

	Page
Abstract (Thai).....	iv
Abstract (English).....	v
Acknowledgement.....	vi
Contents.....	vii
List of Tables.....	viii
List of Figures.....	ix
List of Abbreviations.....	x
Chapter	
I Introduction.....	1
II Literature reviews.....	5
<i>Pueraria mirifica</i>	5
Phytoestrogens.....	17
Changes of endothelium in atherosclerotic blood vessels.....	22
III Material and Methods.....	27
Animals.....	27
Chemicals.....	28
Instruments.....	31
Methods.....	32
IV Results.....	40
V Discussion and conclusion.....	63
References.....	71
Appendix.....	80
Vitae.....	126

List of Tables

Table	Page
2.1 Natural compounds found in tuberous roots of <i>P.mirifica</i>	8
2.2 Chemical structure of natural compounds found in tuberous root of <i>P.mirifica</i>	9
2.3 The ranking of estrogenic potency of phytoestrogens for estrogen receptor subtypes	20
4.1 Changes in the body weight in each group of rats during the experimental dietary period of 12 weeks.....	41
4.2 Serum total cholesterol, triglyceride, HDL-C, LDL-C levels and HDL/LDL ratio in high cholesterol-fed rats.....	42
4.3 % Maximum and Median effective dose (ED ₅₀) of NE in isolated rat aortas.....	48
4.4 % Maximum and Median effective dose (ED ₅₀) of Ach and SNP in isolated rat aortas.....	49
4.5 Changes in the body weight in each group of rabbits during the experimental dietary period of 12 weeks.....	51
4.6 Serum lipid parameter of rabbit.....	52
4.7 Blood biochemistry of rabbit.....	53
4.8 % Maximum and Median effective dose (ED ₅₀) of NE in isolated rabbit aortas	59
4.9 % Maximum and Median effective dose (ED ₅₀) of Ach and SNP in isolated rabbit aortas.....	60

List of Figures

Figures	Page
2.1 Diagrams of various parts of <i>Pueraria mirifica</i>	6
2.2 Chemical structure of 17 β -estradiol compared with deoxymiriestrol.....	7
2.3 Schematic illustration of pathophysiology of atherosclerosis	25
3.1 Diagram of the isolated aorta from the male rat.....	35
3.2 Schematic illustration of the experimental preparation used for the measurement of vascular function	37
4.1 Concentration response curve to noradrenaline (NA) of isolated rat aortas from control, cholesterol and cholesterol+ <i>P. mirifica</i> group.....	45
4.2 Concentration response curve to acetylcholine (Ach) of isolated rat aortas from control, cholesterol and cholesterol+ <i>P. mirifica</i> group.....	46
4.3 Concentration response curve to sodium nitroprusside (SNP) of isolated rat aortas from control, cholesterol and cholesterol+ <i>P. mirifica</i> group.....	47
4.4 Concentration response curve to noradrenaline (NA) of isolated rabbit aortas from Intact control, OVX, OVX+Estrogen and OVX+ <i>P.mirifica</i> group.....	56
4.5 Concentration response curve to acetlycholine (Ach) of isolated rabbit aortas from Intact control, OVX, OVX+Estrogen and OVX+ <i>P.mirifica</i> group.....	57
4.6 Concentration response curve to sodium nitroprusside (SNP) of isolated rabbit aortas from Intact control, OVX, OVX+Estrogen and OVX+ <i>P.mirifica</i> group.....	58
4.7 Representative scanning electron microgrape of aortic endothelium from Intact control, OVX, OVX+Estrogen and OVX+ <i>P.mirifica</i> group.....	62

List of Abbreviations

β	= beta
$^{\circ}\text{C}$	= degree celsius
μl	= microlitre
α	= alpha
Ach	= acetylcholine
ALP	= alkaline phosphatase
ALT	= alanine aminotransferase
AST	= aspartate aminotransferase
CHD	= coronary heart disease
ED ₅₀	= median effective dose
EDRF	= endothelium derived relaxing factor
EDTA	= ethylenediaminetetraacetic acid
<i>et al.</i>	= et alii (and other)
g	= gram
HDL-C	= high density lipoprotein cholesterol
HRT	= hormone replacement therapy
i.p.	= intraperitonium
kg	= kilogram
LDL-C	= low density lipoprotein cholesterol
M	= molar
mg	= milligram
mg/kg	= milligram per kilogram body weight
mM	= millomolar
NA	= noradrenaline
NOS	= nitric oxide synthase
OVX	= ovariectomized
PDGF	= platelet-derived growth factor
RBC	= red blood cell
SEM	= standard error of mean

List of Abbreviations (Continue)

S.E.M.	= scanning electron microscope
SNP	= sodium nitroprusside
WBC	= white blood cell