

**PROTECTION OF HT-22 NEURONAL CELLS AGAINST
GLUTAMATE TOXICITY MEDIATED BY ANTIOXIDATIVE
ACTIVITY OF *PUERARIA CANDOLLEI* VAR. *MIRIFICA*
EXTRACT**

Miss Apirada Suontphunt

**A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Pharmaceutical Technology
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2007
Copyright of Chulalongkorn University**

การป้องกันเซลล์ประสาท HT-22 จากพิษของกลูตาเมต
โดยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกวาวเครือขาว

นางสาว อภिरดา สุคนธ์พันธุ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis Title PROTECTION OF HT-22 NEURONAL CELLS AGAINST
 GLUTAMATE TOXICITY MEDIATED BY ANTIOXIDATIVE
 ACTIVITY OF *PUERARIA CANDOLLEI* VAR *MIRIFICA*
 EXTRACT

By Miss Apirada Suontphunt

Field of Study Pharmaceutical Technology

Thesis Advisor Associate Professor Wanchai De-Eknamkul, Ph.D.

Thesis Co-advisor Associate Professor Ubonthip Nimmannit, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University in
Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctor's Degree

..... *Pornpen Pramyothin* Dean of the Faculty of
Pharmaceutical Sciences
(Associate Professor Pornpen Pramyothin, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

..... *Papavadee Klongpityapong* Chairman
(Associate Professor Papavadee Klongpityapong)

..... *Wanchai De-Eknamkul* Thesis Advisor
(Associate Professor Wanchai De-Eknamkul, Ph.D.)

..... *Ubonthip Nimmannit* Thesis Co-advisor
(Associate Professor Ubonthip Nimmannit, Ph.D.)

..... *Nongnit Teerawatanasuk* Member
(Associate Professor Nongnit Teerawatanasuk, Ph.D.)

..... *Warangkana Warisnoicharoen* Member
(Assistant Professor Warangkana Warisnoicharoen, Ph.D.)

..... *Pornchai Rojsitthisak* Member
(Assistant Professor Pornchai Rojsitthisak, Ph.D.)

อภิรดา สุคนธ์พันธุ์: การป้องกันเซลล์ประสาท HT-22 จากพิษของกลูตาเมต โดยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกวาวเครือขาว (PROTECTION OF HT-22 NEURONAL CELLS AGAINST GLUTAMATE TOXICITY MEDIATED BY ANTIOXIDATIVE ACTIVITY OF *PUERARIA CANDOLLEI* VAR. *MIRIFICA* EXTRACT) อ.ที่ปรึกษา: รศ. ดร. วันชัย ตีเอกนามกุล, อ. ที่ปรึกษา ร่วม: รศ. ดร. อุบลทิพย์ นิมมานนิตย์ 93 หน้า.

กวาวเครือขาว (*Pueraria candollei* var. *mirifica*) เป็นสมุนไพรไทยที่มีการใช้เพื่อเป็นยาอายุวัฒนะและเพื่อเพิ่มความอ่อนเยาว์มาตั้งแต่สมัยโบราณ สารสกัดจากหัวกวาวเครือขาวมีรายงานว่า มีองค์ประกอบของสารที่ออกฤทธิ์เหมือนฮอร์โมนเพศหญิงซึ่งเป็นสารกลุ่ม isoflavonoid และสารซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดได้ถูกสันนิษฐานว่าน่าจะก่อให้เกิดฤทธิ์ในการเป็นยาอายุวัฒนะหรือเพิ่มความอ่อนเยาว์ของสารสกัดกวาวเครือขาว การศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้ใช้สารสกัดที่เตรียมจากผงกวาวเครือขาวโดยใช้สารละลายหลายชนิด เช่น เฮกเซน เอทิลอะซิเตท เอทิลอะซิเตทตามด้วยเมทานอล และ เอทิลอะซิเตทตามด้วยเมทานอลและน้ำ จากนั้นทำการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในการต้านอนุมูลไดฟีนิลพิคริลไฮดราซิด (DPPH) พบว่าสารสกัดด้วยเมทานอล หรือ PMM และ สารสกัดด้วยน้ำ หรือ PMW แสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลไดฟีนิลพิคริลไฮดราซิดได้ดี สารสกัดทั้งสองได้ถูกทำการทดสอบฤทธิ์ในการป้องกันเซลล์ประสาทจากพิษของกลูตาเมตในเซลล์ประสาท HT-22 และพบว่า PMM ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถป้องกันเซลล์ประสาทจากการทำลายโดยพิษของกลูตาเมตได้อย่างสมบูรณ์ เช่นเดียวกับโทรลอกซ์ที่ความเข้มข้น 264 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ PMW ไม่มีฤทธิ์ในการป้องกันเซลล์ประสาทจากพิษกลูตาเมต

การศึกษากลไกในการดักจับอนุมูลของ PMM ได้ทำการศึกษาโดยวิธี ORAC สำหรับอนุมูลเปอร์ออกไซด์ และ โดยการใช้ไดคลอโรฟลูออเรสเซิน ไดอะซิเตทสำหรับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ พบว่าฤทธิ์ในการต้านอนุมูลเปอร์ออกไซด์ของ PMM มีค่าค่อนข้างต่ำ ในขณะที่ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในเซลล์ HT-22 มีค่าสูง ดังนั้นจึงเสนอว่ากลไกในการป้องกันเซลล์ประสาทของ PMM น่าจะมาจากฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ หรือ อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แต่ไม่ใช่อนุมูลเปอร์ออกไซด์ จากผลการทดลองดังกล่าวทำให้สรุปได้ว่า PMM ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถป้องกันเซลล์ประสาทจากพิษกลูตาเมตได้อย่างมีนัยสำคัญโดยการทำงานร่วมกันของสารประกอบหลายชนิดในสารสกัด PMM รวมถึง daidzein และ genistein โดยที่กลไกของการป้องกันมาจากกลไกในการต้านไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ หรือ อนุมูลที่เกิดขึ้นจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

สาขาวิชา เทคโนโลยีเภสัชกรรม

ปีการศึกษา.....2550.....

ลายมือชื่อนิสิต.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

อภิรดา สุคนธ์พันธุ์

วันชัย ตีเอกนามกุล

อุบลทิพย์ นิมมานนิตย์

#4476852433: MAJOR PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY

KEY WORD: PUERARIA MIRIFICA / ANTIOXIDANT / NEUROPROTECTION / PHYTOESTROGEN

APIRADA SUCONTPHUNT : PROTECTION OF HT-22 NEURONAL CELLS AGAINST GLUTAMATE TOXICITY MEDIATED BY ANTIOXIDATIVE ACTIVITY OF *PUERARIA CANDOLLEI* VAR. *MIRIFICA* EXTRACT. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. WANCHAI DE-EKNAMKUL, Ph.D., THESIS COADVISOR : ASSOC. PROF. UBONTHIP NIMMANNIT, Ph.D., 93 pp.

Pueraria candollei var. *mirifica* (*P. mirifica*) known locally as Kwao Kruae Kao, has long been used in Thai folk medicine as a rejuvenating drug. Extracts of *P. mirifica* roots have been shown to contain many estrogenic-like isoflavonoids and presumably antioxidative compounds which may play a part in the anti-aging effects of this plant. In this research, various extracts of *P. mirifica* root powder prepared from different solvents, including hexane (PMH), ethyl acetate (PME), methanol (PMM) and water (PMW) were screened for their antioxidative activities by using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay. The extracts of PMM and PMW exhibited good antioxidative activities and were further investigated for their neuroprotective activities against glutamate-induced toxicity in HT-22 cells. PMM at the concentrations of 50 and 100 µg/ml completely inhibited glutamate toxicity similar to Trolox at the concentration of 264 µg/ml. PMW, on the other hand, exhibited no protection against glutamate toxicity.

Further investigation on the radical scavenging property of PMM in HT-22 cells was performed by using the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) assay for peroxy radical and the dichlorofluorescein diacetate assay for hydrogen peroxide. It was found that the antioxidative activity of PMM against peroxy radical was relatively low, whereas the radical scavenging property of PMM against hydrogen peroxide was very high. Therefore, the neuroprotective mechanism of PMM was proposed to be mediated through the antioxidative activity against hydrogen peroxide or the radical formed by hydrogen peroxide not peroxy radical. Based on these results, it was concluded that PMM at the concentrations of 50 and 100 µg/ml exhibits significant neuronal cell protection against glutamate toxicity which could be the result of synergistic mechanism of many substances in the PMM extract including daidzein and genistein. The protection mechanism of PMM appears to be mediated via its antioxidative mechanism against hydrogen peroxide or the radical formed by hydrogen peroxide.

Field of study Pharmaceutical Technology

Academic year.....2007.....

Student's signature.....

Advisor's signature.....

Co-advisor's signature.....

Apirada Sucontp hunt
Wanchai De Eknamkul
Ubonthip Nimmannit

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere gratitude to all of my advisors and my thesis committees for their support in the completion of this thesis. I wish to express my deepest gratitude to my advisor, Associate Professor Wanchai De-Eknamkul and my co-advisor, Associate Professor Ubonthip Nimmannit for their invaluable advice, supervision and encouragement throughout this study.

I am greatly indebted to Professor Robert W. Gracy and Professor Dan Dimitrijevič for providing the facilities for my work at the University of North Texas Health Science Center, Fort Worth, Texas, U.S.A and for their kindly devoting a valuable time to advice and support me in both educational and general aspects. Furthermore, I completely owe my thanks to Peggy Gracy and Professor Gracy's family members who welcome me as one of their family.

I am grateful to Jwalitha Shankardas and Christina Malakowsky for their help and encouragement while I was conducting my research in U.S.A

I would like to thank to Jacklyn Crisp, Kelly Kam, Christina Malakowsky and her fiancé for providing me vivid and entertaining experiences.

My warmest thanks go to my friends in the Pharmaceutical Technology (International) Program and other people, whose names have not been mentioned, for helping me in anyway during the time of my study. My thanks go to lovely secretary in my Program, Ms. Nantawan for providing the conveniences and facilities to prepare this thesis.

Finally, my deep gratitude goes to my family for their love, support and tremendous encouragement throughout my life.

The present work was partly supported by the Royal Golden Jubilee Program, Thailand Research Fund 5.Q.CU.46/C.1

CONTENTS

	PAGE
ABSTRACT (THAI).....	iv
ABSTRACT (ENGLISH).....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	x
LIST OF FIGURES.....	xiii
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xvi
CHAPTER	
I INTRODUCTION.....	1
II LITERATURE REVIEW.....	3
1. Biologically relevant reactive oxygen species (ROS).....	3
2. Antioxidant.....	4
3. Antioxidant assays.....	6
4. Apoptosis.....	11
5. Oxidative stress.....	12
6. Oxidative stress and neurodegeneration.....	13
7. Glutamate and neurodegeneration.....	16
8. Glutamate and HT-22.....	17
9. Polyphenol and flavonoid and their antioxidant activities...	18
10. Phytoestrogen and neuroprotection.....	19
11. <i>Pueraria candollei</i> var. <i>mirifica</i>	22

	PAGE
III MATERIALS AND METHODS.....	24
Materials.....	24
Methods.....	27
1. Preparation of <i>P. mirifica</i> extracts.....	27
2. Scavenging of diphenyl-picrylhydrazyl (DPPH) radicals...	29
3. Characterization of <i>P. mirifica</i> extracts.....	29
4. Cell culture.....	30
5. Cell proliferation experiments.....	31
6. Determination of glutamate toxicity to HT-22 cells.....	31
7. Neuroprotective activity of PMM and PMW.....	32
8. ORAC assay.....	32
9. 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-dA) assay.....	33
10. Neutral red (NR) assay.....	34
11. Sulfrhodamine B (SRB) assay.....	34
12. DAPI staining.....	34
13. Statistical analyses.....	35
IV RESULTS AND DISCUSSION.....	36
1. Preliminary screening for the antioxidative activities of various <i>P. mirifica</i> crude extracts.....	36
2. Characterization of <i>P. mirifica</i> extracts.....	38
3. Cell proliferation experiments.....	42
4. Glutamate toxicity to HT-22 cells.....	44

	PAGE
5. Neuroprotection of <i>P. mirifica</i> extracts against glutamate induced toxicity.....	47
6. Antioxidant activity determined by ORAC assay and DCFH-dA assay.....	54
V CONCLUSION.....	59
REFERENCES.....	61
APPENDICES.....	75
APPENDIX A.....	76
APPENDIX B.....	81
APPENDIX C.....	84
APPENDIX D.....	90
VITA.....	93

LIST OF TABLES

TABLE	PAGE
1. Molecular structures of flavone nucleus and some phytoestrogens found in <i>P. mirifica</i> extract.....	23
2. EC ₅₀ of Trolox, PMM, PMW, genistein and daidzein from DPPH assay	38
3. Calculation for the ORAC value, linear equation, slope, intercept, and R ² of PMM and PMW compared with Trolox from ORAC assay.....	55
4. Percent DPPH remaining of Trolox, PMM, PMW, PMH, PME, genistein and daidzein from the DPPH assay.....	77
5. Net AUC of different concentrations of Trolox, genistein, daidzein and PMM by ORAC assay.....	78
6. Fluorescent intensity from DCFH-dA assay of HT-22 cells treated with hydrogen peroxide and various concentrations of PMM.....	78
7. Fluorescent intensity from DCFH-dA assay of HT-22 cells treated with hydrogen peroxide and various concentrations of Trolox.....	79
8. Fluorescent intensity from DCFH-dA assay of HT-22 cells treated with hydrogen peroxide and various concentrations of daidzein.....	79
9. Fluorescent intensity from DCFH-dA assay of HT-22 cells treated with hydrogen peroxide and various concentrations of genistein.....	80
10. Fluorescent intensity from DCFH-dA assay of HT-22 cells treated with and without hydrogen peroxide	80

TABLE	PAGE
11. Calculation for accuracy of various concentration of genistein and daidzein from HPLC analysis.....	82
12. Calculation for percent recovery of various concentrations of daidzein from HPLC analysis.....	82
13. Calculation for percent recovery of various concentrations of genistein from HPLC analysis.....	82
14. Within run precision data of daidzein and genistein by HPLC analysis ..	83
15. Between run precision data of daidzein and genistein by HPLC analysis	83
16. Absorbance of SRB dye from cells treated with 1% and without ethanol in the presence of various concentrations of glutamate	85
17. Number of cells treated with different concentrations of glutamate for 24 h compared to the control cells by SRB assay	85
18. Cell number of HT-22 cells treated with various concentrations of Trolox for 24 h compared to the controls by SRB assay....	86
19. Cell number of HT-22 cells treated with various concentrations of PMM for 24 h compared to the control cells by SRB assay	86
20. Cell number of HT-22 cells treated with various concentrations of PMW for 24 h compared to the control cells by SRB assay.....	87
21. Percent cell number of HT-22 cells treated with various concentrations of PMM against glutamate toxicity compared to the control cells by SRB assay	87

TABLE	PAGE
22. Percent cell number of HT-22 cells treated with various concentrations of Trolox against glutamate toxicity compared to the control cells by SRB assay	88
23. Percent cell number of HT-22 cells treated with various concentrations of PMW against glutamate toxicity compared to the control cells by SRB assay	88
24. Percent cell number of HT-22 cells treated with various concentrations of daidzein and genistein against glutamate toxicity compared to the control cells by SRB assay	89

LIST OF FIGURES

FIGURE	PAGE
1. ORAC antioxidant activity of tested sample expressed as the net area under the curve (AUC).....	8
2. Schematic diagram of <i>P. mirifica</i> root powder extraction procedure.....	28
3. Schematic diagram of methodology process.....	28
4. Preliminary screening for the antioxidative activities of various <i>P. mirifica</i> extracts. Spots of Trolox (T), PMH, PME, PMM and PMW at 10, 20, 30 and 50 μg	37
5. Standard curve of daidzein by HPLC analysis	39
6. Standard curve of genistein by HPLC analysis.....	39
7. HPLC chromatograms of <i>P. mirifica</i> extracts of PMM (A), PMW (B) and the solution of mixed standards of daidzein and genistein (C).....	41
8. TLC chromatograms of PMW (1: 30 μg , 2: 50 μg), PMM (3: 10 μg , 4: 30 μg , 5: 50 μg , 6: 100 μg), daidzein (7: 0.1 μg) and genistein (8: 0.1 μg) at 254 nm (A), 366 nm (B) and after the DPPH spray (C).....	43
9. Cell number of HT-22 cells treated with various concentrations of PMM and PMW by SRB assay	44
10. Absorbance of SRB between cells treated without (bar with stripes) and with (bar with dots) ethanol.....	46
11. Percent cell number (in log scale) of HT-22 cells treated with different concentrations of glutamate for 24 h compared to the control cells.....	46

FIGURE	PAGE
12. Morphology of HT-22 cells: control cells (A), cells treated with 3.5 mM of glutamate (B), cells treated with 3.5 mM of glutamate in the presence of PMM at 1 µg/ml (C), 10 µg/ml (D), 50 µg/ml (E) and 100 µg/ml (F), Trolox at 26.4 µg/ml (G), 132 µg/ml (H) and 264 µg/ml (I), 10 µg/ml of PMW (J), 2.54 ng/ml of daidzeine (K) and 2.7 ng/ml of genistein (L). Cells were examined by phase contrast microscopy (10x magnification).....	48
13. Nucleus of cells stained with DAPI: control cells (A), cells treated with 3.5 mM of glutamate (B), cell treated with 100 µg/ml (C), 50 µg/ml (D) of PMM and 264 µg/ml of Trolox (E) against 3.5 mM glutamate. Cell were examined by fluorescent microscopy (20X magnifications).....	50
14. Neutral red dye uptake of cells: control cells (A), cells treated with 3.5 mM of glutamate (B), cells treated with 100 µg/ml (C), 50 µg/ml (D) and 10 µg/ml (E) of PMM against 3.5 mM of glutamate and cells treated with 264 µg/ml of Trolox (F) against 3.5 mM of glutamate. Cells were examined by microscope (40X magnification).....	51
15. Cell number of HT-22 cells treated with different concentrations of Trolox and PMM with (bar) and without (triangle) 3.5 mM of glutamate, p value < 0.05 : compared to control cells with glutamate (#) and without glutamate (*).....	53

FIGURE

PAGE

16. Average fluorescent intensity of cells treated with hydrogen peroxide in the presence of various concentrations of Trolox and PMM compared to negative control (NG cont) treated with hydrogen peroxide alone (*) , p value < 0.05)..... 57

LIST OF ABBREVIATIONS

1. AAPH: 2,2'-Azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride
2. AD: Alzheimer's disease
3. AUC: area under the curve
4. CV: coefficient of variation
5. DCF: dichlorofluorescin
6. DCFH-dA: 2',7'-dichlorofluorescin diacetate
7. DMEM: Dulbecco's modified eagle medium
8. DPPH: 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
9. FCR: Folin-Ciocalteu reagent
10. GAE: gallic acid equivalent
11. HAT: hydrogen atom transfer
12. HPLC: high pressure liquid chromatography
13. MBH: medial basal hypothalamus
14. MCI: mild cognitive impairment
15. NR: neutral red
16. ORAC: Oxygen radical absorbance capacity
17. PBS: phosphate buffer saline
18. PD: Parkinson's disease
19. PMH: the hexane extract of *Pueraria mirifica*;
20. PMM: the ethyl acetate:methanol extract of *Pueraria mirifica*
21. PMW: the ethyl acetate:methanol:water extract of *Pueraria mirifica*;
22. PUFA: polyunsaturated fatty acids

23. ROS: reactive oxygen species
24. SD: standard deviation
25. SEM: standard error of mean
26. SET: single electron transfer
27. SOD: superoxide dismutase
28. SRB: Sulfrhodamine B
29. TLC: thin layer chromatography