EFFECTS OF ETHANOL-EXTRACTED *PUERARIA MIRIFICA* ROOT ON THE PROLIFERATION OF NORMAL PORCINE ENDOMETRIAL CELLS AND RL-95 ENDOMETRIAL CANCER CELLS

Miss Ranida Tuanudom

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Physiology
(Inter-disciplinary Program)
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic year 2006
Copyright of Chulalongkorn University

ผลของสารสกัดเอทานอลจากกวาวเครือขาวต่อการเจริญของเซลล์เยื่อบุมดลูกปกติของสุกร และเซลล์มะเร็งมดลูก RL-95

นางสาว รนิดา ต่วนอุดม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาสรีรวิทยา (สหสาขาวิชา)
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

492249

Thesis Title	Effects of ethanol-extracted *Pueraria mirifica* root on the proliferation of normal porcine endometrial cells and RL-95 endometrial cancer cells.
By	Miss Ranida Tuanudom
Field of study	Physiology
Thesis Advisor	Assistant Professor Sutthasinee Poonyachoti
Thesis Co-advisor	Assistant Professor Sarinee Kalandakanond-Thongsong

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirement for the Master's Degree

.....Dean of the Graduate School

(Assistant Professor M.R.Kalaya Tingsabadh, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman

(Associate Professor Juraiporn Somboonwong, M.D.)

.....Thesis Advisor

(Assistant Professor Sutthasinee Poonyachoti, Ph.D.)

.....Thesis Co-Advisor

(Assistant Professor Sarinee Kalandakanond-Thongsong, Ph.D.)

.....Member

(Associate Professor Suchinda Malaivijitnond, Ph.D.)

.....Member

(Associate Professor Chatsri Deachapunya, Ph.D.)

รนิดา ต่วนอุดม : ผลของสารสกัดกวาวเครือขาวจากเอทานอลต่อการเจริญของเซลล์เยื่อบุมดลูกหมูปกติและเซลล์มะเร็งมดลูก RL-95 (EFFECTS OF ETHANOL-EXTRACTED *PUERARIA MIRIFICA* ROOT ON THE PROLIFERATION OF NORMAL PORCINE ENDOMETRIAL CELLS AND RL-95 ENDOMETRIAL CANCER CELLS.) อ. ที่ปรึกษา : ผศ.สพญ.ดร.สุทธาสินี ปุญญโชติ, อ. ที่ปรึกษาร่วม: ผศ.สพญ.ดร.สฤณี กลันทกานนท์ ทองทรง, 76 หน้า.

วัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้ เพื่อศึกษาผลของสารสกัดเอทานอลจากกวาวเครือขาวต่อการเจริญของเซลล์เยื่อบุมดลูกปกติและเซลล์มะเร็งมดลูก RL-95 และผลการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของโปรตีนตัวรับเอสโตรเจนทั้งชนิดแอลฟ่าและชนิดเบต้า เปรียบเทียบกับ ไดเอดีซีน เจนีสทีอีน และ เอสตราไดออล โดยเซลล์ปกติแยกจากเยื่อบุมดลูกบริเวณปีกมดลูกของหมูวัยแรกรุ่น และ เซลล์มะเร็ง คือ เซลล์มะเร็งมดลูก RL-95 โดยเซลล์เพาะเลี้ยงทั้งสองชนิดได้รับสารสกัดกวาวเครือขาว ไดเอดีซีน เจนีสทีอีน หรือ เอสตราไดออลที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกันตั้งแต่ 10^{-11} ถึง 10^{-4} M และทำการวัดการเจริญของเซลล์ภายหลังจากที่เซลล์ได้รับสาร 24, 48 และ 72 ชั่วโมงด้วยวิธี MTT และวัดการเปลี่ยนแปลงระดับของโปรตีนตัวรับเอสโตรเจนภายหลังจากที่เซลล์ได้รับสาร 72 ชั่วโมงโดยวิธี semi-quantitaive Western blot analysis

ผลการทดลองพบว่า สารสกัดกวาวเครือขาวไม่มีผลเพิ่มการเจริญของเซลล์เยื่อบุมดลูกปกติ แต่มีผลลดการเจริญของเซลล์เมื่อได้รับสารที่ความเข้มข้น 10^{-5} และ 10^{-4} M ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง และสารไฟโตเอสโตรเจนอื่นคือ ไดเอดีซีน 10^{-4} M มีผลลดการเจริญของเซลล์ ที่ 72 ชั่วโมง ส่วนเจนิสทีอีน 10^{-4} M มีผลลดการเจริญของเซลล์ ที่ 48 และ 72 ชั่วโมง และเอสตราไดออลที่ความเข้มข้นสูง 10^{-4} M มีผลลดการเจริญของเซลล์เยื่อบุมดลูกหมูปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดย ที่เอสตราไดออลที่ระดับความเข้มข้น 10^{-8}และ 10^{-7} M มีผลลดการเจริญของเซลล์ที่ 48 ชั่วโมง สำหรับเซลล์มะเร็ง (RL-95) พบว่าสารสกัดกวาวเครือขาวที่ระดับความเข้มข้น 10^{-6}, 10^{-5} และ 10^{-4} M มีผลลดการเจริญของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ส่วนไดเอดีซีน และ เจนีสทีอีน ที่ความเข้มข้นสูง (10^{-4} M) มีผลลดการเจริญของเซลล์ ที่ 48 และ 72 ชั่วโมง แต่อย่างไรก็ตาม ไดเอดีซีน 10^{-6} M ก็มีผลลดการเจริญของเซลล์ ที่ 48 ชั่วโมงเช่นกัน ส่วนการได้รับเอสตราไดออลนั้นพบว่าที่ระดับความเข้มข้น 10^{-4} M เท่านั้นที่มีผลลดการเจริญของเซลล์ ทั้งที่ 48 และ 72 ชั่วโมง

ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีนของตัวรับเอสโตรเจน พบว่าเซลล์มดลูกปกติและเซลล์มะเร็งมดลูกมีปริมาณของตัวรับเอสโตรเจนแตกต่างกัน โดยเซลล์มะเร็งมีปริมาณของตัวรับชนิดเบต้ามากกว่าชนิดแอลฟ่า ในขณะที่เซลล์ปกติมีตัวรับชนิดแอลฟ่ามากกว่า นอกจากนั้นยังพบว่าอัตราส่วนของตัวรับชนิดเบต้าต่อแอลฟ่ามีค่าประมาณ 16 เท่า ในเซลล์มะเร็ง และประมาณ 0.31 เท่า ในเซลล์ปกติ เมื่อได้รับสารสกัดกวาวเครือขาวเข้มข้น 10^{-9}M ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของตัวรับในเซลล์ปกติหรือในเซลล์มะเร็ง ซึ่งความเข้มข้นนี้ไม่มีผลต่อจำนวนของเซลล์ ในขณะที่ความเข้มข้นขนาด 10^{-6} M ทำให้อัตราส่วนของตัวรับเอสโตรเจนมีค่าใกล้เคียงกันระหว่างเซลล์ปกติและเซลล์มดลูก (1.32 และ 1.26 ในเซลล์ปกติและเซลล์มดลูก ตามลำดับ) ทั้งนี้เกิดจากสารสกัดกวาวเครือขาวไปมีผลเพิ่มตัวรับชนิดแอลฟ่า เป็นที่น่าสังเกตว่าที่ความเข้มข้นนี้ในเซลล์มะเร็งสามารถลดจำนวนเซลล์มะเร็งลงได้ เป็นไปได้ว่าสารสกัดกวาวเครือขาวสามารถมีผลเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจน และส่งผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง สำหรับการศึกษาเปรียบเทียบกับสารไฟโตเอสโตรเจน เช่น เจนิสทีอีนและไดเอดีซีน รวมทั้งเอสตราไดออลนั้น ไม่สามารถกระทำได้ เนื่องจากพบว่าสารที่ใช้ทำละลาย ได้แก่ DMSO และ เอทานอล ไปมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงตัวรับเอสโตรเจน จึงไม่สามารถนำผลการศึกษาดังกล่าวไปสัมพันธ์กับฤทธิ์ในการลดจำนวนของเซลล์ได้

การศึกษาครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่า เซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติ มีความแตกต่างกันในปริมาณตัวรับเอสโตรเจน และอัตราส่วนของตัวรับเอสโตรเจน โดยสารสกัดกวาวเครือขาว สามารถลดการเจริญของเซลล์มะเร็งและเกิดร่วมกับการเพิ่มขึ้นของตัวรับชนิดแอลฟ่าทำให้มีการลดลงของอัตราส่วนตัวรับเบต้าต่อแอลฟ่า ซึ่งการเพิ่มขึ้นของตัวรับชนิดแอลฟ่าดังกล่าวอาจเป็นกลไกสำคัญในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งมดลูก โดยความเข้มข้นที่มีผลต่อเซลล์มะเร็งไม่มีผลต่อการเจริญของเซลล์ปกติ ดังนั้นผลที่ได้ อาจเป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้ในการรักษาหรือพัฒนายาในกลุ่มนี้ เพื่อการใช้ในการรักษาโรคมะเร็งชนิดพึ่งพาตัวรับเอสโตรเจนได้

สาขาวิชา.....สรีรวิทยา(สหสาขาวิชา).....ลายมือชื่อนิสิต.....

ปีการศึกษา.....2549.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4789124720 : MAJOR PHYSIOLOGY
KEY WORD : ENDOMETRIAL CANCER CELL / ESTROGEN RECEPTOR / ETHANOL-EXTRACTED *PUERARIA MIRIFICA* / NORMAL ENDOMETRIAL CELL / PROLIFERATION

RANIDA TUANUDOM: EFFECTS OF ETHANOL-EXTRACTED *PUERARIA MIRIFICA* ROOT ON THE PROLIFERATION OF NORMAL PORCINE ENDOMETRIAL CELLS AND RL-95 ENDOMETRIAL CANCER CELLS. THESIS ADVISOR: ASSIST. PROF. SUTTHASINEE POONYACHOTI, D.V.M., M.S., Ph.D. THESIS CO-ADVISOR: ASSIST. PROF. SARINEE KALANDAKANOND-THONGSONG, D.V.M., Ph.D. 76 pp.

The aim of this study was to assess the proliferative/anti-proliferative effect of ethanol-extracted *Pueraria mirifica* (PM) root in normal porcine endometrial cells and RL-95, the human endometrial cancer cells in comparison to daidzein, genistein and estradiol. The endometrial epithelial gland was isolated from immature pig uterus (PE-I) and the cancer cell was RL-95. All cells were treated with PM, daidzein (Di), genistein (Ge) and 17β-estradiol (E_2) at various concentration from 10^{-11} to 10^{-4} M. The proliferation was measured by MTT assay at 24, 48 and 72 hours after treated. Level of estrogen receptor protein expression was performed in cells treated with drugs for 72 hours by semiquantitative Western blot analysis.

The results showed that PM had no proliferative effect but had anti-proliferative effect at concentrations of 10^{-5} and 10^{-4} M at 24, 48 and 72 hrs in PE-I. Other phytoestrogens, Di (10^{-4}M) significantly decreased cell numbers of PE-I at 72 hrs. Ge (10^{-4}M) can significantly decrease cell proliferation of PE-I at 48 and 72 hrs. E_2 (10^{-4}M) can significantly decrease PE-I cell proliferation at 24, 48 and 72 hrs. Moreover, E_2 (10^{-8} and 10^{-7} M) can significantly decrease PE-I cell proliferation at 48 hrs. For the RL-95, PM (10^{-6}, 10^{-5} and 10^{-4} M) can significantly decrease cell proliferation at 24, 48 and 72 hrs, while Di and Ge (10^{-4} M) significantly decreased cell numbers at 48 and 72 hrs. E_2 at concentration of 10^{-4} M can inhibit cell proliferation at 48 and 72 hrs. The effect of PM on inhibition of RL-95 cell proliferation was in a dose-dependent manner (10^{-6}, 10^{-5} and 10^{-4} M).

Based on the semi-quantitative Western blot analysis, the levels of estrogen receptor type were different between normal endometrial cells and cancer cells. RL-95 had higher level of ERβ expression than ERα; whereas, PE-I had higher level of ERα than ERβ. Therefore, the ratio of ERβ to ERα was about 16 in RL-95 and about 0.31 in PE-I. Exposed to PM at 10^{-9} M for 72 hr, the ER ratio was not affected in both cell types, and this concentration had no effect on cell proliferation. Interestingly, the 10^{-6} M PM can alter ER ratio of both cells to 1.32 and 1.26 (PE-I and RL-95, respectively), this was caused by that the PM can increase ERα level. It should be noted that this concentration contained anti-proliferative effect in RL-95 but no effect on PE-I. It is possible that PM can modulate the expression of ER and therefore inhibit cell proliferation in cancer cell. Unfortunately, we cannot compare this effect to other phytoestrogens or estradiol because the vehicle used to dissolve phytoestrogens and estradiol (DMSO and ethanol, respectively) can alter the ER expression. Thus, the relationship between anti-proliferative effect and ER expression could not be evaluated.

In conclusion, the current study revealed that normal and cancer cells are differed in term of ERs and ratio of ER. The PM can reduce cancer cells proliferation and this is in accordance to the increase in ERα expression and the decrease in ERβ to ERα ratio. These findings can be used as further information for using *Pueraria mirifica* (PM) as an estrogen supplement or cancer treatment. Moreover, the effects of PM on the modulation of ER protein expression level in cancer cells may be beneficial for developing the potent cancer therapy.

Field of study...Physiology (Inter-department).. Student's signature.....Ranida Tuanudom.....

Academic year.....2006.....Advisor's signature.....

Co-advisor's signature.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I wish to express my gratitude and appreciation to my advisor, Assistant Professor Dr. Sutthasinee Poonyachoti, and my co-advisor, Assistant Professor Dr. Sarinee Kalandakanond-Thongsong for their excellent instruction, guidance, encouragement, kindness and support during the working process, which enable me to accomplish this study. It will be forever remembered.

I would like to express my sincere thanks to the chairman, Associate Professor Juraiporn Somboonwong and my thesis committee, Associate Professor Dr. Suchinda Malaivijitnond, and Associate Professor Dr. Chatsri Deachapunya, for their valuable comments, suggestions and corrections of this thesis.

Thankfulness would be given to all staffs at the Department of Physiology, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University for their helps and kindness during the time that I did my experiment.

I wish to express my sincere thanks to all my teachers at the Inter-department of Physiology, Graduate School, Chulalongkorn University for all their love and helps during the time that I was studying.

My appreciations are also devoted to my dear family and all of my friends for their love, kindness and support to my mind throughout this study.

CONTENTS

PAGE

ABSTRACT (THAI).....iv
ABSTRACT (ENGLISH).....v
ACKNOWLEDGEMENTS.....vi
CONTENTS.....vii
LIST OF TABLES..... ix
LIST OF FIGURES.....x
LIST OF ABBREVIATIONS.....xi
CHAPTER
I. INTRODUCTION.....1
II. LITERATURE REVIEWS.....4
A. *Pueraria mirifica*.....4
B. Phytoestrogen.....7
C. Estrogen.....10
D. Endometrial cell.....14
III. MATERIALS AND METHODS.....17
A. Endometrial Cells.....17
B. Chemicals.....18
C. Experimental protocols.....19
D. Methods.....22
IV. RESULTS.....26
1. The effects of ethanol-extracted *Pueraria mirifica* root, daidzein, genistein and 17β-estradiol on the proliferation of normal porcine endometrial cells.....27
2. The effects of ethanol-extracted *Pueraria mirifica* root, daidzein, genistein and 17β-estradiol on the proliferation of RL-95 endometrial cancer cells.....38
3. To quantitate estrogen receptor protein expression in normal endometrial cells and endometrial cancer cells treated with ethanol-extracted *Pueraria mirifica* root daidzein, genistein and 17β-estradiol 47

PAGE

V. DISCUSSION.....62
REFERENCES.....67
BIOGRAPHY.....84

LIST OF TABLES

PAGE

Table 4-1 Percent changes of numbers from control of normal porcine endometrial cells treated with various concentration of *Pueraria mirifica* (PM) for 24, 48, 72 hrs....28

Table 4-2 Percent changes of numbers from control of normal porcine endometrial cells treated with various concentration of daidzein for 24, 48, 72 hrs....30

Table 4-3 Percent changes of numbers from control of normal porcine endometrial cells treated with various concentration of genistein for 24, 48, 72 hrs....33

Table 4-4 Percent changes of numbers from control of normal porcine endometrial cells treated with various concentration of 17β-estradiol for 24, 48, 72 hrs....36

Table 4-5 Percent changes of numbers from control of human endometrial cancer cells (RL-95) treated with various concentration of *Pueraria mirifica* (PM) for 24, 48, 72 hrs....39

Table 4-6 Percent changes of numbers from control of human endometrial cancer cells (RL-95) treated with various concentration of daidzein for 24, 48, 72 hrs....41

Table 4-7 Percent changes of numbers from control of human endometrial cancer cells (RL-95) treated with various concentration of genistein for 24, 48, 72 hrs....43

Table 4-8 Percent changes of numbers from control of human endometrial cancer cells (RL-95) treated with various concentration of 17β-estradiol for 24, 48, 72 hrs....45

Table 4-9 Ratio of ER alpha and ER beta of normal endometrial cells....51

Table 4-10 Ratio of ER alpha and ER beta of human endometrial cancer cells (RL-95)....57

LIST OF FIGURES

PAGE

Figure 2-1 Comparison of the chemical structures of 17β-estradiol, miroestrol and deoxymiroestrol, genistein, daidzein and kwakhurin.....6

Figure 2-2 Classification of various groups of phytoestrogens and theirs members.....9

Figure 2-3 The biosynthetic pathway of the estrogens.....11

Figure 2-4 Structures and functions of estrogen receptors.....13

Figure 3-1 Diagram of the experimental protocol 1.....19

Figure 3-2 Diagram of the experimental protocol 2.....20

Figure 3-3 Diagram of the experimental protocol 3.....21

Figure 3-4 Graph relationship between absorbance and cell numbers.....26

Figure 4-1 Effect of ethanol extracted *Pueraria mirifica* on the proliferation of normal porcine endometrial cells.....29

Figure 4-2 Effect of daidzein on the proliferation of normal porcine endometrial cells.....31

Figure 4-3 Effect of genistein on the proliferation of normal porcine endometrial cells.....34

Figure 4-4 Effect of 17β-estradiol on the proliferation of normal porcine endometrial cells.....37

Figure 4-5 Effect of ethanol extracted *Pueraria mirifica* on the proliferation of RL-95, endometrial cancer cells.....40

Figure 4-6 Effect of daidzein on the proliferation of RL-95, endometrial cancer cells.....42

Figure 4-7 Effect of genistein on the proliferation of RL-95, endometrial cancer cells.....44

Figure 4-8 Effect of 17β-estradiol on the proliferation of RL-95, endometrial cancer cells.....46

Figure 4-9 Histograms and western blot photograph of estrogen receptor protein of normal porcine endometrial cells and endometrial cancer cells 49

Figure 4-10 Histograms of estrogen receptor protein levels of normal porcine endometrial cells treated with *Pueraria mirifica*.....52

PAGE

Figure 4-11 Histograms of estrogen receptor protein levels of normal porcine endometrial cells treated with daidzein.....53
Figure 4-12 Histograms of estrogen receptor protein levels of normal porcine endometrial cells treated with genistein.....54
Figure 4-13 Histograms of estrogen receptor protein levels of normal porcine endometrial cells treated with 17β-estradiol.....55
Figure 4-14 Histograms of estrogen receptor protein levels of human endometrial cancer cells (RL-95) treated with *Pueraria mirifica*.....58
Figure 4-15 Histograms of estrogen receptor protein levels of human endometrial cancer cells (RL-95) treated with daidzein.....59
Figure 4-16 Histograms of estrogen receptor protein levels of human endometrial cancer cells (RL-95) treated with genistein.....60
Figure 4-17 Histograms of estrogen receptor protein levels of human endometrial cancer cells (RL-95) treated with 17β-estradiol.....61

LIST OF ABBREVIATIONS

Abx	Antibiotic
AP-1	Activating protein 1
AR	Androgen receptor
BCA	Biocinchoninic acid
BSA	Bovine serum albumin
Con	Control
CO_2	Carbon dioxide
Da	Dalton
Di	Daidzein
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
E_2	17β-estradiol
ER	Estrogen receptor
EREs	Estrogen response elements
ER-α	Estrogen receptor alpha
ER-β	Estrogen receptor beta
EtOH	Ethanol
FBS	Fetal bovine serum
Ge	Genistein
hr	Hour
hrs	Hours
kD	Kilo dalton
LBD	Ligand binding domain
μg	Microgram
M	Molar
mg	Milligram
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm^2	Square millimeter

mRNA	Messenger ribonucleic acid
MTT	3-(4,5-dimethythiazol-2-yl)-2 5-diphenyltetrazolium bromide
MW	Molecular weight
NaCl	Sodium chloride
NaOH	Sodium hydroxide
nm	Nanometer
P	Progesterone
PBS	Phosphate- buffered Saline
PE-I	Primary porcine endometrium
PM	*Pueraria mirifica*
PR	Progesterone receptor
S.E.M.	Standard error of mean
SERM	Selective estrogen receptor modulator
USA	United State of America
VEGF	Vascular endothelial growth factor