

**QUANTITATIVE ANALYSIS OF ISOFLAVONOIDS
AND ESTROGENIC ACTIVITY ON HUMAN BREAST CANCER CELLS (MCF-7)
OF CULTIVATED WHITE KWAO KRUA *Pueraria mirifica***

Miss Matchima Nimpao

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology**

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2006

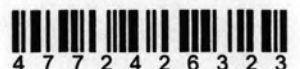
Copyright of Chulalongkorn University

492266

การวิเคราะห์เชิงปริมาณไอโซฟลาโวนอยด์และฤทธิ์เอสโตรเจนิกต่อเซลล์มะเร็งเต้านม
MCF-7 ของกวาวเครือขาว *Pueraria mirifica* จากแปลงปลูก

นางสาวมัชฌิมา นิมเป้า

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



Thesis Title QUANTITATIVE ANALYSIS OF ISOFLAVONOIDS AND
ESTROGENIC ACTIVITY ON HUMAN BREAST CANCER CELLS
(MCF-7) OF CULTIVATED WHITE KWAO KRUA

Pueraria mirifica

By Miss Matchima Nimpao

Field of Study Biotechnology

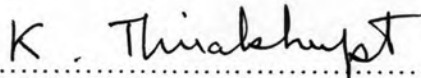
Thesis Advisor Associate Professor Wichai Cherdshewasart, D.Sc.

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial
Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree



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

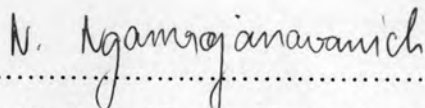
THESIS COMMITTEE



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



.....Thesis Advisor
(Associate Professor Wichai Cherdshewasart, D.Sc.)



.....Member
(Associate Professor Nattaya Ngamrojanavanich, Ph.D.)



.....Member
(Assistant Professor Chanpen Chanchao, Ph.D.)

มัชฌิมา นิมเป้า: การวิเคราะห์เชิงปริมาณไอโซฟลาโวนอยด์และฤทธิ์เอสโตรเจนิกต่อ
เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ของกวาวเครือขาว *Pueraria mirifica* จากแปลงปลูก

(ISOFLAVONOIDS AND ESTROGENIC ACTIVITY ON HUMAN BREAST
CANCER CELLS (MCF-7) OF CULTIVATED WHITE KWAO KRUA

Pueraria mirifica อ. ที่ปรึกษา: รศ.ดร. วิชัย เชิดชูชีวิต 135 หน้า

การวิเคราะห์ปริมาณสารไอโซฟลาโวนอยด์ทุกช่วงเวลา 1 เดือนของหัวกวาวเครือขาว 2 สายพันธุ์ จากแปลงปลูกที่ จ.ราชบุรี ในระยะเวลา 1 ปี ด้วยเทคนิคเอชพีแอลซี พบว่า สารไอโซฟลาโวนอยด์ 5 ชนิด ได้แก่ ฟิราริน ไดด์ซิน จินิสติน ไดด์เซอิน และจินิสเตอิน ในหัวกวาวเครือขาวที่เก็บในเดือนต่างๆมีปริมาณต่างกัน โดยพบว่า ปริมาณสารฟิราริน ไดด์ซิน และ จินิสติน ของสายพันธุ์ PM-III สูงสุดในเดือนกรกฎาคม กุมภาพันธ์ ธันวาคม ตามลำดับ ส่วน ไดด์เซอิน และจินิสเตอิน สูงสุดในเดือนมีนาคม ในขณะที่ปริมาณไอโซฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงสุดในเดือนกรกฎาคม ส่วนในสายพันธุ์ PM-IV พบว่า มีปริมาณฟิราริน จินิสติน ไดด์เซอิน และปริมาณ ไอโซฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงสุดในเดือนมีนาคม ไดด์ซินสูงสุดในเดือนกุมภาพันธ์ และจินิสเตอิน สูงสุดในเดือนตุลาคม และอัตราส่วนระหว่างอะไกลโคไซด์และไกลโคไซด์ของทั้งสองสายพันธุ์ สูงสุดในเดือนมีนาคมโดยสายพันธุ์ PM-III มีค่ามากกว่า PM-IV 3.43 เท่า ในการศึกษาความสัมพันธ์ ของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิและปริมาณน้ำฝนต่อปริมาณสารไอโซฟลาโวนอยด์ใน หัวกวาวเครือขาวพบว่า ปริมาณไดด์ซิน ไดด์เซอิน จินิสเตอิน และไอโซฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมี ความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่ระดับความน่าเชื่อถือ (R^2) 0.622, 0.755, 0.599 และ 0.902 ตามลำดับ ปริมาณฟิราริน และสัดส่วนของจินิสตินกับฟิรารินในสายพันธุ์ PM-III มี ความสัมพันธ์กับปริมาณน้ำฝนที่ R^2 เท่ากับ 0.713 และ -0.732 ตามลำดับ นอกจากนี้ปริมาณไดด์เซอิน และไอโซฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสายพันธุ์ PM-IV มีความสัมพันธ์กับปริมาณน้ำฝนที่ R^2 เท่ากับ 0.944 และ 0.636 ตามลำดับ จากความสัมพันธ์ดังกล่าวสรุปได้ว่าอุณหภูมิและปริมาณน้ำฝนมีผลต่อ การสะสมของอะไกลโคไซด์และไกลโคไซด์ในหัวกวาวเครือขาว กวาวเครือขาวทั้งสองพันธุ์มีฤทธิ์ กระตุ้นและยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมต่างกัน โดย PM-III มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญมากกว่า PM-IV และ PM-IV มีฤทธิ์กระตุ้นการเจริญมากกว่า PM-III การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิมีผลต่อฤทธิ์ เอสโตรเจนิกของ PM-III ส่วนปริมาณน้ำฝนมีผลต่อฤทธิ์เอสโตรเจนิกของ PM-IV เอนไซม์ S9 มีผล เพิ่มฤทธิ์กระตุ้นการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ของ PM-III และ PM-IV สูงถึง 8.65 และ 9.18 เท่า ตามลำดับ

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ.....ลายมือชื่อนิสิต:.....

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

4772426323: MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORD: *Pueraria mirifica*/ ISOFLAVONOIDS/ PHYTOESTROGENS/
MCF-7 CELLS/ ESTROGENIC ACTIVITY/ PROLIFERATIVE
EFFECT/ ANTIPROLIFERATIVE EFFECT

MATCHIMA NIMPAO: QUANTITATIVE ANALYSIS OF
ISOFLAVONOIDS AND ESTROGENIC ACTIVITY ON HUMAN
BREAST CANCER CELLS (MCF-7) OF CULTIVATED WHITE
KWAO KRUA *Pueraria mirifica*. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF.
WICHAI CHERDSHEWASART, D.Sc.135 pp.

HPLC isoflavonoid analysis of monthly collected tubers of 2 clones of *Pueraria mirifica* in a field trial at Ratchaburi province revealed that the 5 isoflavonoids namely puerarin, daidzin, genistin, daidzein and genistein were varied. There was the highest content of puerarin, daidzin, genistin and total isoflavonoid in PM-III in July, February, December and July, respectively. Daidzein and genistein was found most in March. There was the highest content of puerarin, daidzin and genistin in PM-IV in March. Daidzein and genistein was found most in February and October, respectively. The highest ratio of aglycoside/glycoside in PM-III and PM-IV was found in March with 3.43 times higher in PM-III than PM-IV. In the correlation analysis of temperature change and amount of rainfall with tuberous isoflavonoid contents, daidzin, daidzein, genistein and total isoflavonoid content was correlated with temperature change at correlation coefficient (R^2) of 0.622, 0.755, 0.599 and 0.902, respectively. Puerarin content and the ratio of genistin/puerarin in PM-III were correlated with the amount of rainfall at R^2 of 0.713 and -0.732, respectively. Besides, daidzein and total isoflavonoid content in PM-IV was correlated with the amount of rainfall at R^2 of 0.944 and 0.636, respectively. We can conclude that the rainfall amount and temperature had influence on aglycoside and glycoside accumulation in *P. mirifica* tubers. The 2 plants exhibited difference in proliferation and antiproliferation with more antiproliferation in PM-III and more proliferation in PM-IV. PM-III was influenced by the changing temperature while PM-IV was influenced by the rainfall amount. MCF-7 proliferation assay was much influenced by the presence of S9 mixture which could increase the proliferation response up to 8.65 folds in PM-III and 9.18 folds in PM-IV.

Field of study Biotechnology.....Student's signature.....
Academic year 2006.....Advisor's signature.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest appreciation and grateful thanks to my advisor, Associate Professor Dr. Wichai Cherdshewasart for his helpful guidance, suggestions, continual encouragement and keen interest throughout this study. Especially I would like to really thank Dr. Pornthipa Picha for breast cancer cells, MCF-7

Special thanks for Department of Biology for laboratory facilities, Program of Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University for access to use the necessary instruments for my thesis.

I am indebted to Institute of Biotechnology and Genetic Engineering, Chulalongkorn University for the training in cell culture. Sincere thanks for the members of Kwao Krua Laboratory for their generous help.

This research was supported by the Graduate School, Chulalongkorn University and Biotechnology Program, Faculty of Science, Chulalongkorn University.

I really express my whole-heartedly appreciation to my parents, my family members and all of my friends.

CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	ix
LIST OF FIGURES.....	xii
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xv
CHAPTER I INTRODUCTION.....	1
CHAPTER II LITERATURE REVIEW.....	3
2.1 Kwao Krua plants	3
2.2 Phytoestrogens.....	9
2.3. HPLC analysis of isoflavonoids.....	19
2.4 Estrogenic assays.....	19
CHAPTER III MATERIALS AND METHODS.....	20
3.1. Plant material.....	20
3.2. Tuber harvest.....	20
3.3. Tuberous size and weight.....	20
3.4. Leaf morphometry.....	21
3.5. Pod morphometry.....	22
3.6. Plant crude extraction.....	22
3.7. Analysis of isoflavonoid contents.....	22
3.8. Study of estrogenic activity of the plant extract (MCF-7 test).....	23
3.9. Statistical analysis.....	28
3.10. Correlation analysis of isoflavonoid content and estrogenic activity.....	28
CHAPTER IV RESULTS.....	29
4.1. Tuberous size.....	29
4.2. Tuberous weight.....	30
4.3. Leaf morphometry.....	31
4.4. Pod morphometry.....	31
4.5. The plant crude extract weight.....	32
4.6. Physical factors.....	33

	Page
4.7. HPLC isoflavonoid analysis of monthly collected <i>P. mirifica</i>	35
4.8. Correlation analysis of isoflavonoid content with air temperature and amount of rainfall of the field trial site.....	46
4.9. Proliferation effect of standard isoflavonoids (puerarin, daidzin, genistin, daidzein and genistein).....	50
4.10. Proliferation/antiproliferation assay.....	54
4.11. Correlation analysis of estrogenic activity with isoflavonoid contents, rainfall amount, and temperature.....	70
CHAPTER V DISCUSSIONS AND CONCLUSIONS.....	76
CHAPTER VI PERSPECTIVES.....	82
REFERENCES.....	83
APPENDICES.....	93
BIOGRAPHY.....	135

LIST OF TABLES

	Page
Table 2.1 Summary of the chemical constituents of <i>P. mirifica</i>	5
Table 2.2 The structure and bioactivity effects of chemical constituents in <i>P. mirifica</i>	6
Table 2.3 Classification and sources of phytoestrogens	10
Table 2.4 Summary of the study of the effects of phytoestrogens on breast cancer cell lines.....	14
Table 4.1 The annual average tuberous size of PM-III and PM-IV with parameters of circumference, height and width recorded of the largest size tuber.....	29
Table 4.2 The annual tuberous wet weight, dry weight, and percentage of water content in tuber	30
Table 4.3 Leaf morphometry of PM-III and PM-IV	31
Table 4.4 Pod morphometry of PM-III and PM-IV.....	31
Table 4.5 The plant crude extract weights (g) of monthly collected <i>P. mirifica</i> since March 2005 to February 2006 derived from ethanolic extraction of 50 g powder.....	32
Table 4.6 The monthly climate record including, maximum, minimum and mean temperature and amount of rainfall of Ratchaburi province since March 2005 to February 2006.....	33
Table 4.7 Isoflavonoid contents in mg/100 g powder of monthly collected PM-III from Ratchaburi since March 2005 to February 2006.....	35
Table 4.8 Isoflavonoid contents in mg/100 g powder of monthly collected PM-IV from Ratchaburi since March 2005 to February 2006.....	37
Table 4.9 The isoflavonoid contents of PM-III compared with PM-IV in the same month of the collection.....	39
Table 4.10 Isoflavonoid contents in glycoside form (daidzin and genistin) and aglycoside form (daidzein and genistein) in mg/100 g powder of monthly collected <i>P. mirifica</i> tubers from Ratchaburi since March 2005 to February 2006.....	40

	Page
Table 4.11 The ratio of daidzein vs. daidzin and genistein vs. genistin in PM-III tubers monthly collected from Ratchaburi since March 2005 to February 2006.....	42
Table 4.12 The ratio of individual isoflavonoid vs. puerarin in PM-III tubers monthly collected from Ratchaburi since March 2005 to February 2006..	44
Table 4.13 Correlations coefficient of isoflavonoid contents in tubers of PM-III with temperature and amount of rainfall.....	46
Table 4.14 The growth response of MCF-7 to 17 β -estradiol, puerarin, daidzin, genistin, daidzein and genistein.....	50
Table 4.15 The growth response of MCF-7 to 17 β -estradiol, puerarin, daidzein and genistein in the presence of S9 mixture in comparison with mean of population	52
Table 4.16 The ratio of growth response of MCF-7 to standard isoflavonoids in the presence and absence of S9 mixture.....	54
Table 4.17 The growth response of MCF-7 to PM-III in comparison with DMSO and mean of plant population.....	55
Table 4.18 The growth response of MCF-7 to PM-IV in comparison with mean of the plant population	57
Table 4.19 The percentage growth of PM-III compared with PM-IV in the same concentration	59
Table 4.20 The growth response percentage of PM-III extract in the presence of S9 mixture on MCF-7 cell culture in comparison with DMSO and mean of the plant population	61
Table 4.21 The growth response percentage of PM-IV extract in the presence of S9 mixture on MCF-7 cell culture in comparison with DMSO and mean of the plant population	63
Table 4.22 The ratio of growth response of PM-III and PM-IV to MCF-7 cells in the presence vs. the absence of S9 mixture.....	65
Table 4.23 The analyzed parameters of PM-III collected in April 2005.....	69
Table 4.24 Correlation coefficient (R^2) of proliferation/antiproliferation to MCF-7 cells of the 5 major isoflavonoids in PM-III and PM-IV.....	70

	Page
Table 4.25 Correlation coefficient (R^2) of proliferation/antiproliferation to MCF-7 cells of physical factors, including temperature and rainfall in PM-III and PM-IV	74
Table 4.26 Percentage growths of MCF-7 were treated with PM-III extracts in correlation with PM-IV extracts.....	75

LIST OF FIGURES

	Page
Figure 2.1 (a) Leaves, (b) flowers, (c) tuberous roots and (d) pods of <i>P. mirifica</i> from Chiang Mai Province, photos courtesy by W. Cherdshewasart.....	4
Figure 2.2 Metabolism of daidzein and genistein in mammals.....	11
Figure 2.3 The reaction of tetrazolium bromide (MTT).....	19
Figure 3.1 The tuber of PM-III and PM-IV	20
Figure 3.2 The leaf of PM-III and PM-IV.....	21
Figure 3.3 Morphometry parameters of <i>P. mirifica</i> leaf	21
Figure 3.4 Pods of PM-III and PM-IV	22
Figure 3.5 Haematocytometer.....	26
Figure 4.1 The mean temperature, and amount of rainfall in Ratchaburi province since March 2005 to February 2006 recorded by the Meteorological Department, Ministry of Information and Communication Technology, Thailand.....	34
Figure 4.2 Puerarin, daidzin, genistin, daidzein, genistein and total isoflavonoid contents (mg/100g powder) in the monthly collected tubers of <i>P. mirifica</i> (PM-III) from Ratchaburi since March 2005 to February 2006.....	36
Figure 4.3 Puerarin, daidzin, genistin, daidzein, genistein and total isoflavonoid contents (mg/100g powder) in the tubers of monthly collected <i>P. mirifica</i> (PM-IV) from Ratchaburi since March 2005 to February 2006.....	38
Figure 4.4 Aglycoside and glycoside contents, and ratio of aglycoside/glycoside in the monthly collected <i>P. mirifica</i> from Ratchaburi since March 2005 to February 2006.....	41
Figure 4.5 The ratio of daidzein vs. daidzin and genistein vs. genistin in monthly collected PM-III and PM-IV from Ratchaburi since March 2005 to February 2006.....	43
Figure 4.6 The ratio of individual iso flavonoid against puerarin in monthly collected PM-III and PM-IV from Ratchaburi since March 2005 to February 2006.....	45

	Page
Figure 4.7 Puerarin content of PM-III in correlation with amount of rainfall during March 2005 to February 2006.....	47
Figure 4.8 genistin/puerarin of PM-III in reverse correlation with amount of rainfall during March 2005 to February 2006.....	47
Figure 4.9 Daidzin content of PM-IV in correlation with temperature during March 2005 to February 2006.....	48
Figure 4.10 Daidzein of PM-IV in correlation with temperature during March 2005 to February 2006.....	48
Figure 4.11 Genistein of PM-IV in correlation with temperature during March 2005 to February 2006.....	49
Figure 4.12 Total isoflavonoid of PM-IV in correlation with temperature during March 2005 to February 2006.....	49
Figure 4.13 The growth response of MCF-7 to 17 β -estradiol, puerarin, daidzein and genistein in comparison with DMSO.....	51
Figure 4.14 The growth response of MCF-7 to 17 β -estradiol, puerarin, daidzein and genistein in the presence of S9 mixture, in comparison with DMSO.....	53
Figure 4.15 The growth response of MCF-7 to PM-III in comparison with DMSO.....	56
Figure 4.16 The growth response of MCF-7 to PM-IV in comparison with DMSO	58
Figure 4.17 The growth response percentage of PM-III extract in the presence of S9 mixture on MCF-7 cell culture compare mean of population...	62
Figure 4.18 The growth response percentage of PM-IV extract in the presence of S9 mixture on MCF-7 cell culture in comparison with mean of the plant population	64
Figure 4.19 Comparison of growth response of PM-III to MCF-7 cells in the presence and absence of S9 mixture	66
Figure 4.20 Comparison of growth response of PM-IV to MCF-7 cells in the presence and absence of S9 mixture	67
Figure 4.21 Correlation profile of percentage cell growth of MCF-7 in the absence of S9 mixture and isoflavonoid contents in PM-III.....	71

	Page
Figure 4.22 Correlation profile of percentage cell growth of MCF-7 in the absence of S9 mixture and isoflavonoid contents in PM-IV	72
Figure 4.23 Correlation profile of percentage cell growth of MCF-7 in the presence of S9 mixture and isoflavonoid contents in PM-III.....	72
Figure 4.24 Correlation profile of percentage cell growth of MCF-7 in the presence of S9 mixture and isoflavonoid contents in PM-IV.....	73
Figure 4.25 Correlation profile of percentage cell growth of MCF-7 and temperature of Ratchaburi Province during March 2005 to February 2006 in PM-III in the absence of S9 mixture.....	74
Figure 4.26 Correlation profile of percentage cell growth of MCF-7 and temperature of Ratchaburi Province during March 2005 to February 2006 in PM-III in the absence of S9 mixture.....	75

LIST OF ABBREVIATIONS

°C	Degree Celsius
E ₂	17β-Estradiol
ER	Estrogen Receptor
ER α	Estrogen Receptor Alpha
ER β	Estrogen Receptor Beta
g	Gram
IC ₅₀	The half maximal inhibitory concentration
L	Litter
h	Hour
μg	Microgram
μg	Microliter
μM	Micromolar
ml	Mililiter
mg	Miligram
M	Molar
S.E.M.	Standard Error of Mean