

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดของพืชไทยที่มีฤทธิ์ส่งเสริมการออก
ของเส้นผมในเซลล์ผมของมนุษย์

นางสาวรุจี เจน

3419810284



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีสารสนเทศ ภาควิชาวิทยาการสารสนเทศและเกษตรศาสตร์
คณะเกษตรศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2556
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

IDENTIFICATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM THAI PLANT EXTRACTS WITH
HAIR GROWTH PROMOTING ACTIVITY ON HUMAN HAIR DERMAL PAPILLA CELLS

Miss Ruchy Jain



ห้องสมุดคณะเภสัชศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Pharmaceutical Technology
Department of Pharmaceutics and Industrial Pharmacy
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2013
Copyright of Chulalongkorn University



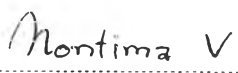

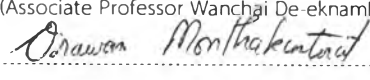
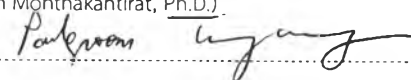
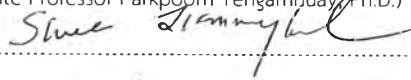
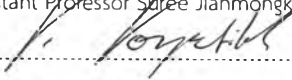
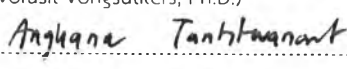
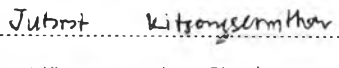
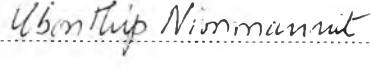
5 3 7 7 1 0 4 0 3 3

Thesis Title IDENTIFICATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM THAI PLANT
EXTRACTS WITH HAIR GROWTH PROMOTING ACTIVITY ON HUMAN
HAIR DERMAL PAPILLA CELLS
By Miss Ruchy Jain
Field of Study Pharmaceutical Technology
Thesis Advisor Associate Professor Wanchai De-eknamkul, Ph.D.
Thesis Co-Advisor Orawan Monthakantirat, Ph.D.
Associate Professor Parkpoom Tengamnuay, Ph.D.

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


..... Dean of the Faculty of Pharmaceutical Sciences
(Assistant Professor Rungpetch Sakulbumrungsil, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE


..... Chairman
(Assistant Professor Montima Vardhanabhuti, Ph.D.)

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

..... Thesis Co-Advisor
(Orawan Monthakantirat, Ph.D.)

..... Thesis Co-Advisor
(Associate Professor Parkpoom Tengamnuay, Ph.D.)

..... Examiner
(Assistant Professor Sree Jianmongkol, Ph.D.)

..... Examiner
(Vorasit Vongsutilers, Ph.D.)

..... Examiner
(Assistant Professor Angkana Tantituvanont, Ph.D.)

..... Examiner
(Jutarat Kitsongsermthorn, Ph.D.)

..... External Examiner
(Associate Professor Ubonthip Nimmannit, Ph.D.)



รูชี เจน : การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดของพืชไทยที่มีฤทธิ์ส่งเสริมการงอกของเส้นผมในเซลล์ผมของมนุษย์. (IDENTIFICATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM THAI PLANT EXTRACTS WITH HAIR GROWTH PROMOTING ACTIVITY ON HUMAN HAIR DERMAL PAPILLA CELLS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร. วันชัย ดีเอกนามกุล, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ดร. อรวรรณ มณฑานติรัตน์, รศ. ดร. ภาคภูมิ เต็งอำนาจ, 96 หน้า.

แอนโดรจีนิก อโลพีเซีย (Androgenic alopecia, AGA) เป็นโรคที่ทำให้เกิดอาการผมร่วง ซึ่งมีสาเหตุมาจากการผลิตที่มากเกินไปของ 5-แอลฟา-ไดไฮโดรเทสโตสเตอโรน (5 alpha-dihydrotestosterone, 5 alpha-DHT) ซึ่งเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ 5-แอลฟา-รีดักเทส (5 alpha-reductase, 5 alpha-R) ที่ใช้เทสโตสเตอโรน (testosterone, T) เป็นสารตั้งต้น การศึกษาในครั้งนี้มุ่งที่จะพิสูจน์หาสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติชนิดใหม่ที่สามารถยับยั้งการทำงานของ 5 alpha-R เพื่อเป็นแนวทางในการใช้รักษาโรค AGA ต่อไป การศึกษาเริ่มต้น การพัฒนาวิธีตรวจวัดที่มีความน่าเชื่อถือโดยใช้เซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเส้นผมของมนุษย์ที่ชื่อว่า human hair dermal papilla cells (HHDPCs) มาใช้เป็นแบบในการตรวจวัด ควบคู่กับการใช้เทคนิค รงคเลขผิวบาง (thin layer chromatography) แบบไม่ใช้สารกัมมันตภาพรังสี เพื่อใช้ในการคัดกรองสารสกัดจากพืชไทยที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 5 alpha-R ชนิด 1 (5 alpha-R1) ซึ่งเป็นชนิดที่แสดงออกในเซลล์ของ HHDPCs ผลการคัดกรองจากสารสกัดพืชไทย 41 ชนิด พบว่ามีเพียงสารสกัดจากแก่นไม้ของ Avicennia marina (AM) เพียงชนิดเดียวเท่านั้นที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 5 alpha-R1 ได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่า IC50 = 9.21 µg/ml ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัด AM ยังสามารถส่งผลต่อการต้านฤทธิ์แอนโดรเจน (anti-androgenic) โดยทำให้เกิดการเพิ่มการสร้างสาร vascular endothelial growth factor (VEGF) ในเซลล์ของ HHDPCs สาร VEGF นี้เป็นสารที่ช่วยกระตุ้นให้เกิดการแบ่งตัวและพัฒนาเปลี่ยนแปลงเซลล์เส้นผมในระยะการเจริญเติบโต (anagen/growth phase) ของวงจรการสร้างเส้นผม (hair cycle) ซึ่งทำให้เกิดการงอกของเส้นผม เมื่อทำการศึกษาหาสารออกฤทธิ์ในสารสกัด AM โดยใช้วิธีแยกสารควบคู่กับการติดตามฤทธิ์ (activity-guided fractionation) พบว่าสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ 5 alpha-R1 นั้น เป็นสารที่อยู่ในกลุ่มฟูราโน-แนปโทควิโนน (furano-naphthoquinone) ที่มีชื่อว่า อวิชีควิโนน ซี (Avicquinone C) ที่มีค่า IC50 = 9.94 µg/ml หรือ 38.8 µM อย่างไรก็ดี เมื่อนำสารดังกล่าวในรูปของสารบริสุทธิ์เชิงเดียวไปทดสอบฤทธิ์ต้านแอนโดรเจน พบว่าไม่สามารถทำให้เกิดการสร้างสาร VEGF ได้อย่างมีนัยสำคัญ แต่หากมีการผสมสาร Avicquinone C ด้วยสาร Avicenol C และอีก 1 ชนิดซึ่งยังไม่ทราบโครงสร้างทางเคมีที่อยู่ในส่วน fraction 4 ก็จะทำให้พบว่าการสร้าง VEGF ได้ ดังนั้นผลการศึกษาทำให้สรุปได้ว่าฤทธิ์ anti-androgenic activity ของ AM เป็นผลมาจากการทำงานที่เสริมกันของสาร 3 ชนิดที่มีอยู่ในสารสกัดแอลกอฮอล์ของแก่นไม้ Avicennia marina

ภาควิชา วิทยาการเภสัชกรรมและเภสัช
อุตสาหกรรม

สาขาวิชา เทคโนโลยีเภสัชกรรม

ปีการศึกษา 2556

ลายมือชื่อนิสิต Puchy Jain

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก [Signature]

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม [Signature]

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม [Signature]



5377104033 : MAJOR PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY

KEYWORDS: ANDROGENIC ALOPECIA / 5 ALPHA-REDUCTASE / 5 ALPHA-DIHYDROTESTOSTERONE / HUMAN HAIR DERMAL PAPILLA CELLS / NON-RADIOACTIVE THIN LAYER CHROMATOGRAPHY / AVICENNA MARINA / AVICEQUINONE C / ANTI-ANDROGENIC ACTIVITY

RUCHY JAIN: IDENTIFICATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM THAI PLANT EXTRACTS WITH HAIR GROWTH PROMOTING ACTIVITY ON HUMAN HAIR DERMAL PAPILLA CELLS. ADVISOR: ASSOC. PROF. WANCHAI DE-EKNAMKUL, Ph.D., ORAWAN MONTHAKANTIRAT, Ph.D., ASSOC. PROF. PARKPOOM TENGAMNUAY, Ph.D., 96 pp.

Androgenic alopecia (AGA) is the major type of scalp hair loss caused by the over-production of 5 alpha-dihydrotestosterone (5 alpha-DHT) which is formed by the enzyme 5 alpha-reductase (5 alpha-R) using testosterone (T) as the substrate. In this study, the main focus was on identifying new natural 5 alpha-R inhibitors specifically for treating AGA. In order to do so, an AGA relevant cell-based assay using human hair dermal papilla cells (HHDPCs) combined with non-radioactive thin layer chromatography (TLC) detection was developed and used for screening Thai medicinal plant extracts possessing inhibitory activities of 5 alpha-reductase type 1 (5 alpha-R1), the isoform of the enzyme found to be expressed by HHDPCs. Among forty-one extracts screened, the methanolic heartwood extract of *Avicennia marina* (AM) was found to be the only sample that exhibited significant 5 alpha-R1 inhibitory activity with the IC50 value of 9.21 µg/ml. In addition, the AM extract also exhibited anti-androgenic activity through a significant up-regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) in androgens treated HHDPCs. This growth factor is known to induce the proliferation and differentiation of hair matrix cells during the anagen/growth phase of the hair cycle, leading to hair growth. Further identification of the active compound(s) in the AM extract by activity-guided fractionation revealed that the active 5 alpha-R1 inhibitor was actually a furano-naphthoquinone compound, namely Avicequinone C (IC50 of 9.94 µg/ml or 38.8 µM). However, the significant up-regulation of VEGF was not clearly observed by Avicequinone C alone but rather when it was combined with Avicenol C and an unidentified compound in fraction '4' obtained from the crude extract of AM. These results suggested that anti-androgenic activity of AM was due to a synergistic effect of a few compounds present in its methanolic extracts.

Department: Pharmaceutics and Industrial
Pharmacy

Field of Study: Pharmaceutical Technology

Academic Year: 2013

Student's Signature

Ruchy Jain

Advisor's Signature

W. De-Eknamkul

Co-Advisor's Signature

O. Monthakantirat

Co-Advisor's Signature

Parkpoom Tengamnuay



ACKNOWLEDGEMENTS

I am delighted to express my appreciation to my advisor, Associate Professor Dr. Wanchai De-Eknamkul, and my co-advisor, Associate Professor Dr. Parkpoom Tengamnuay, for their counseling, encouragements, guidance and support throughout this thesis. Without their kindness and understanding this work could not be accomplished.

I would like to express my thankfulness to my co-advisor from Khon Kaen University, Dr. Orawan Monthakantirat, for her support, guidance and help in the completion of this work.

In addition, I would also like to thank Assistant Prof. Nontima Vardhanabhuti, Assistant Prof. Suree Jianmongkol, Assistant Prof. Angkana Tantituvanont, Dr. Vorasit Vongsutilers, Dr. Jutarat Kitsongsermthon and Associate Prof. Ubonthip Nimmannit, serving as the members for my thesis examination committee and for their suggestions and valuable comments.

Eventually, I would like to express my extreme gratitude to my parents and brother for their love, understanding, help, support and encouragement which has enable me to successfully complete my thesis.

This research work has been financially supported by ICS-UNIDO and Chulalongkorn University.



CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT	iv
ENGLISH ABSTRACT	v
ACKNOWLEDGEMENTS	vi
CONTENTS	vii
List of Tables	xi
List of Figures.....	xii
List of Abbreviations	xiv
Chapter I Introduction	1
1.1 Background information.....	2
1.2 Objectives	4
1.3 Hypothesis	4
1.4 Scope of study.....	4
1.5 Conceptual framework	5
1.6 Benefits	5
1.7 Thesis organization.....	6
Chapter II Literature Review.....	7
2.1 Introduction	8
2.2 The biology of hair.....	8
2.2.1 The structure of hair follicle.....	8
2.2.2 The hair cycle.....	9
2.2.3 The mechanism of hair cycle	10
2.3 Hair loss	11
2.3.1 Alopecia and the types of alopecia.....	11
2.3.2 Androgenic alopecia	11
2.3.3 Androgens	13
2.3.4 Mechanism of androgens action.....	14
2.3.5 Current treatments for androgenic alopecia	15



9419810284

	Page
2.4 Potential targets for the discovery of new hair-growth promoters in treating androgenic alopecia	15
2.4.1 5 α -reductase enzyme	16
2.4.1.1 Types	16
2.4.1.2 Organ distribution	16
2.4.1.3 Biochemical properties.....	16
2.4.1.4 Differences of 5 α -reductase from different sources.....	16
2.4.2 Growth factors.....	18
2.5 Bioassays.....	18
2.5.1 5 α -reductase based bioassays	18
2.5.1.1 Cell-free assay system.....	18
2.5.1.2 Cell-based assay system.....	18
2.5.2 Transcriptional activity assay system.....	19
2.6 Bioactive compounds.....	19
2.6.1 5 α -reductase inhibitory compounds	19
2.6.1.1 Steroidal inhibitors.....	19
2.6.1.2 Non-steroidal inhibitors	20
2.6.2 Growth factors inducing compounds	30
2.6.3 Compounds with dual activities	31
Chapter III Materials and Methods.....	32
3.1 Equipment	33
3.2 Chemicals.....	34
3.3 Enzymes, reagents and kits.....	34
3.4 Plant materials and extraction	35
3.5 Culturing of human hair dermal papilla cells.....	37
3.6 Checking for the presence of androgen receptor and enzymes involved in the steroidogenesis pathway in human hair dermal papilla cells	37
3.7 Development of human hair dermal papilla cell-based assay system ..	38



	Page
3.7.1 Cytotoxicity of testosterone on human hair dermal papilla cells	38
3.7.2 Optimization of the incubation time and testosterone concentration	39
3.7.3 Optimizing the concentration of methanolic plant extracts	39
3.8 Screening of methanolic plant extracts for 5 α -reductase inhibitory activity using the optimized assay system	40
3.9 Studies on the cytotoxicity of 5 α -dihydrotestosterone on human hair dermal papilla cells.....	40
3.10 Determination of the anti-androgenic activity of the 5 α -reductase inhibitory plant extract.....	40
3.11 Effectiveness of androgens and 5 α -reductase inhibitory plant extract on human hair dermal papilla cell's morphology	42
3.12 Thin layer chromatography profile of the 5 α -reductase inhibitory plant extract	42
3.13 Isolation and structural analysis of the active compound(s) from the 5 α -reductase inhibitory plant extract	42
3.14 Statistical analysis.....	43
Chapter IV Results and Discussion.....	44
4.1 Expression of enzymes and androgen receptor in human hair dermal papilla cells	45
4.2 Human hair dermal papilla cell-based assay system.....	47
4.2.1 Cytotoxicity of testosterone on human hair dermal papilla cells	47
4.2.2 Optimization of the assay system.....	50
4.2.3 Inhibitory activity of dutasteride on human hair dermal papilla cells	51
4.3 Cytotoxicity of methanolic plant extracts on human hair dermal papilla cells	53
4.4 Identification of plant extracts possessing 5 α -R1 inhibitory activity using human hair dermal papilla cell-based assay system	56
4.5 Cytotoxicity of 5 α -dihydrotestosterone on human hair dermal papilla cells	61



4.6	Anti-androgenic activity of <i>Avicennia marina</i> and dutasteride on human hair dermal papilla cells.....	61
4.7	Effect of androgens and <i>Avicennia marina</i> on the human hair dermal papilla cell's morphology.....	65
4.8	Thin layer chromatographic profile of <i>Avicennia marina</i>	68
4.9	Activity-guided fractionation of <i>Avicennia marina</i>	69
4.10	Anti-androgenic activity of the 5 α -reductase inhibitory compound(s)....	74
4.11	Structure elucidation of G1.....	77
4.12	Structure elucidation of B2.....	82
	Conclusions.....	88
	REFERENCES.....	90
	VITA.....	96



List of Tables

Table		Page
1.	General properties of the two isoenzymes from two different sources	17
2.	Percent amino acid sequence similarities between the two isoenzymes from different sources.....	17
3.	Steroidal inhibitors.....	20
4.	Natural non-steroidal 5 α -R inhibitors.....	21
5.	List of Thai medicinal plants used in this study.....	35
6.	Forward and reverse primers and the expected sizes of androgen receptor, enzymes and β -actin.....	38
7.	Forward and reverse primers and the expected sizes of growth factors.....	41
8.	Relative 5 α -DHT produced by HHDPs after treating with the final non-toxic concentrations of methanolic plant extracts.....	59
9.	NMR spectral datas of G1 and Avicquinone C in CDCl ₃	82
10.	NMR spectral datas of B2 and Avicenol C in CDCl ₃	87



List of Figures

Figure	Page
1. Hair follicle embryogenesis.....	8
2. The hair cycle.....	9
3. Characteristic of AGA.....	12
4. Steroidogenesis pathway.....	13
5. Mechanism of androgens action within the dermal papilla cell.....	14
6. Structures of natural 5 α -R inhibitors.....	26
7. RT-PCR showing the expression of 5 α -Rs, AR, HSD17 β 2 and aromatase in HHDPs.....	46
8. Cytotoxicity of T on HHDPs.....	48
9. Standard curve of 5 α -DHT, quantitated using (A) TLC scanner at 366 nm (B) image analyzing program, Quantity One. (C) Average standard curve of 5 α -DHT quantitated using image analyzer.....	49
10. Results from the enzymatic reaction using HHDP-based assay after (A) 48 hours and (B) 24 hours of treatment with the final five concentration of T.....	51
11. (A) Cytotoxicity of dutasteride at 20, 10, 5 and 2.5 μ g/ml. (B) Inhibitory activity of dutasteride at 0.001, 0.01, and 10 μ g/ml on HHDPs. (C) IC ₅₀ curve of dutasteride	52
12. Results on the cytotoxicity of methanolic plant extracts exhibiting (A) highest (greater than 2.5 ad 5 μ g/ml), (B) moderate (greater than 10 μ g/ml) and (C-F) no (20 μ g/ml) toxicity.....	54
13. 5 α -R1 inhibitory activity of the methanolic plant extracts at their highest final non-toxic concentrations in HHDP-based assay using a non-radioactive TLC detection technique.....	57
14. (A) TLC plate showing 5 α -R1 inhibitory activity of AM at 10, 9, 8, 7, 6 and 5 μ g/ml. (B) IC ₅₀ curve of AM.....	60
15. Cytotoxicity of 5 α -DHT on HHDPs.....	61
16. (A) RT-PCR and (B) relative levels of the mRNA expression of growth factors from androgens, AM and dutasteride treated and un-treated HHPDs.....	63
17. Results on the HHDPs' morphology at 10X using phase contrast mode (left-hand side), Hoechst 33342 staining (middle) and	



	Propidium iodide (right-hand side) staining.....	66
18.	TLC profile of the methanolic heartwood extract of AM visualized at (A) 254 and (B) 366 nm.....	68
19.	TLC plate visualized at 366 and 254 nm showing the isolated bands/fractions.....	69
20.	Results on the 5 α -R1 inhibitory activity of the bands/fractions numbered 1-8 and AM in HHDPDC-based assay system using non-radioactive TLC detection technique.....	70
21.	(A) TLC plate showing 5 α -R1 inhibitory activity of fraction '4' at 10, 5, 2.5 and 1.25 μ g/ml. (B) IC ₅₀ curve of fraction '4'.....	70
22.	Isolated B1, B2 and G1 from fraction '4' through double developing the TLC plate in toluene: acetonitrile in the ratio of 8:2.....	72
23.	Results on the 5 α -R1 inhibitory activity of (A) B1, B2, G1, B1B2G1, B1B2, B1G1, B2G1 and AM at 10 μ g/ml (B) Dutasteride, AM, fraction '4' and G1 at the indicated final concentrations in μ g/ml.....	72
24.	(A) TLC plate showing 5 α -R1 inhibitory activity of G1 at 10, 5, 2.5 and 1.25 μ g/ml. (B) IC ₅₀ curve of G1.....	73
25.	(A) RT-PCR and (B) relative levels of the mRNA expression of growth factors from androgens and G1 treated and un-treated HHPDCs.....	74
26.	(A) RT-PCR and (B) relative levels of the mRNA expression of growth factors from androgens and fraction '4' treated and un-treated HHPDCs.....	76
27.	(A) Analytical and (B) Semi-preparative HPLC chromatogram of G1.....	78
28.	TLC plate developed in toluene: acetonitrile in the ratio of 8:2 and visualized at 366nm showing AM, fraction '4', G1.3, G1.5 and G1.7.....	79
29.	(A) ¹ H-NMR and (B-C) ¹³ C-NMR spectra of G1.....	79
30.	Structure of Avicequinone C.....	81
31.	Analytical HPLC chromatogram of B2.....	83
32.	(A-B) ¹ H-NMR and (C-D) ¹³ C-NMR spectra of B2.....	84
33.	HRESIMS spectrum of B2.....	86
34.	Structure of Avicenol C.....	86
35.	β -orientation of Avicenol C based on the NOESY data.....	86



List of Abbreviations

%	percentage
μg	microgram
μl	microliter
μM	micrometer
$^{13}\text{C-NMR}$	carbon nuclear magnetic resonance
$^1\text{H-NMR}$	proton nuclear magnetic resonance
$5\alpha\text{-DHT}$	5α -Dihydrotestosterone
$5\alpha\text{-R}$	5α -reductase
$5\alpha\text{-R1}$	5α -reductase type 1
$5\alpha\text{-R2}$	5α -reductase type 2
AGA	androgenic alopecia
AR	androgen receptor
bp	base pair
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP mix	dinucleotide triphosphate mixture
DP	dermal papilla
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
et. al.,	Et Alii (latin), and others
FGF-7	fibroblast growth factor-7
HGF	hepatocytes growth factor
HHDPc(s)	human hair dermal papilla cell(s)
HPLC	high performance liquid chromatography
HSD17 β 2	17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2
i.e.,	that is



IC ₅₀	50% inhibitory concentration
IGF-1	insulin like growth factor-1
kb	kilo-base
kDa	kilo Dalton
K _m	Michaelis constant
M	molar
mg	milligram
MgCl ₂	magnesium chloride
min	minutes
ml	milliliter
mm	millimeter
mRNA	messenger ribonucleic acid
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
nm	nanometer
nM	nano-molar
NMR	nuclear magnetic resonance
°C	degrees Celsius
-OH	hydroxyl group
PCR	polymerase chain reaction
pH	negative log of hydronium ion
pI	isoelectric pH
PI	propidium iodide
PLC	preparative thin layer chromatography
R ²	correlation coefficient
RNA	ribonucleic acid
RT-PCR	reverse-transcriptase polymerase chain reaction
T	testosterone



TAE	tris-acetate-EDTA
TLC	thin layer chromatography
UV	ultra-violet
V	volts
VEGF	vascular endothelial growth factor
α	alpha
β	beta
$\Delta^{4,5}$	delta 4,5, double bond between C4- C5

List of abbreviation for the plant extract is shown in Table 5, Page 35

