เอกสารอ้างอิง

Alatalo S, Penq Z, Janckila A, aija H, Vihko P, Halleen J. 2003. A novel immunoassay for the eterination of tartrate resistant acid phosphatase 5b from rat serum. *J Bone Mine Res*. 18: 134 – 139.

Arjmandi BH, Birnbaum R, Goyal NV, Getlinger MJ, Juma S, Alekel L, et al. 1998. Bone-sparing effect of soy protein in ovarian hormone-deficient rats is related to its isoflavone content. *Am J Clin Nutr*. 68 (suppl):1364s-8s.

Arjmandi BH. 2001.The role of phytoestrogens in the prevention and treatment of osteoporosis in ovarian hormone deficiency. *J Am Coll Nutr*. 20:398S-402S.

Bland R. 2000. Steroid hormone receptors expression and action in bone. *Biochem Soc Med Res Soc*. 98: 217 – 204.

Bloomfield SA, Allen MR, Hogan HA, Delp MD. 2007. Site- and compartment-specific changes in bone with hindlimb unloading in mature adult rats. *Bone* 31:149-57.

Brynin R. 2002. Soy and its isoflavones: a review of their effects on bone density. *Altern Med Rev*. 7:317-27.

Brzoska MM, Moniuszko-Jakoniuk J. 2005. Effect of low-level lifetime exposure to cadmium on calciotropic hormones in aged female rats. *Arch Toxicol* 79: 636-646.

Canavan T P, Doshi NR. 1999. Endometrial cancer. *American Family Physician*. 59: 3069 – 3077.

Chansakaow S, Ishikawa T, Sekine K, Okada M, Higuchi Y, kudo M, Chaichantipyuth C. 2000. Isoflavonoids from *Pueraria mirifica* and their estrogenic activity. *Planta Medica*. 66: 572 – 575.

Chen X, Anderson JB. 2002. Isoflavones and bone: Animal and human evidence of efficacy. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interaction*. 2: 352 – 359.

Cherdshewasart W. 2003. Toxicity tests of a phytoestrogen-rich herb; Pueraria mirifica. *J Sci Res Chula Univ*. 28: 1-12.

Cherdshewasart W, Cheewasopit W, Picha P. 2004. The differential anti-proliferation effect of white (*Pueraria mirifica*), red (*Butea superba*) and black (*Mucuna collettii*) Kwao Krua plants on the growth of MCF-7 cells. *J Ethnopharmaco*. 93: 255 – 260.

Cherdshewasart W, Cheewasopit W, Picha P. 2004. Anti-protiferation effects of the white (*Pueraria mirifica*), red (*Butea superba*), and black (*Mucuna collettii*) Kwao Krua plants on the growth of HeLa cells. *J Sci Res Chul Univ*. 29:27-32.

Cherdchewasart W, Sriwatcharakul S. 2007. Major isoflavonoid content of the 1-ye phytoestrogen –rich herb, *Pueraria mirifica*. *Biosci Biotecnol Biochem*. 7: 2527- 2533

Cherdshewasart W, Kitisama Y, Malaivijitnond S. 2007a. Evaluation of the estrogenic activi *Pueraria mirifica* by vaginal cornification assay. *J Reprod Dev*. 53: 385-393.

Cherdshewasart W, Panriansaen R, Picha P. 2007b. Pretreatment with phytoestrogen-rich p decreases breast tumor incidence and exhibits lower profile of mammary ERalpha and *Maturitas*. 58:174-81.

Cherdshewasart W, Sutijit W. 2008. Correlation of antioxidant activity and major isoflavonoi the phytoestrogen - rich Pueraria mirifica and Pueraria lobata tubers. *Phytomedicine*

Cherdshewasart W, Traisup V, Picha P. 2008a Determination of the estrogenic activity of wi phytoestrogen-rich *Pueraria mirifica* by MCF-7 proliferation assay. *J Reprod Dev* . 54:6

Cherdshewasart W, Sriwatcharakul S, Malaivijitnond S. 2008b. Variance of estrogenic activi phytoestrogen-rich plant. *Maturitas*. 61:350-7.

Choi EM, Suh KS, Kim YS, Choue RW, Koo SJ. 2001. Soybean ethanol extract increases the osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Phytochemistry*. 56:733-9.

Compson JE. 1990. Osteoporosis. *Clin Endocrinol*. 33: 653 – 682.

Compson JE. 2001. Sex steroid and bone. *Physiol Rev*. 81: 419 – 447.

Cui L, Wu T, Liu Y, Deng Y, Ai C and Chen H. 2004. Tanshinone prevents cancellous bone by ovariectomy in rats. *Acta Pharmacologica Sinica*. 25: 678 – 684.

Deal C. 2009. Potential new drug targets for osteoporosis. *Rheumatology*. 5: 21–27.

Delmas P. 2000. Markers of bone turnover for monitoring treatment of osteoporosis with a drugs. *Osteoporosis International*. 6: 66 – 76.

Devareddy L, Khalil DA, Smith B J, Lucas EA, Soung DY, Marlow DD et al. 2006. So improves microstructural properties without affecting bone mass in an ovariectomiz of osteoporosis. *Bone*. 38: 686 – 693.

Erben RG, Eberle J, Stahr K, Goldberg M. 2000. Androgen deficiency indduce h osteopenia in aged male rat: A sequential histomorphometric study. *J Bone Miner R* – 98.

Fanti P, Monier-Faugere MC, Geng Z, Schmidt J, Morris PE, Cohen D, et al. 1998. The phyt genistein reduces bone loss in short-term ovariectomized rats. *Osteoporos Inst*. 8:274-

Filipović B, Sosić-Jurjević B, Ajdzanović V, Brkić D, Manojlović-Stojanoski M, Milosević V, et al. 2009.Daidzein administration positively affects thyroid C cells and bone structure in orchidectomized middle-aged rats. *Osteoporos Int.* Doi 10.1007/s00198-009-1092-x.

Fontanges E, Fontana A, Delma P. 2004. Osteoporosis and breast cancer. *Joint Bone Spine.* 71: 102–110.

Gao H Y, Yamaguchi M. 1999. Anabolic effect of daidzein on cortical bone tissue culture: Comparison with genistein effect. *Mol Cel Biochem.* 194: 93-98.

Gustafsson JA. 1999. Review: estrogen recptor-β a new dimension in estrogen mechanism of action. *J Endocrinol.* 163:379-83.

Hill PA and Orth M. 1998. Bone remodeling. *Journal of Orthodontics.* 25: 101 – 107.

Huges DE and Boyce BF. 1997. Apoptosis in bone physiology and disease. *J Clin Patho.* 50: 132 – 137.

Ingham JL, Tahara S and Pope GS. 2002. Chemical Components and Pharmacology of rejuvenating plant *Pueraria mirifica*. In: *Pueraria*: The genus *Pueraria*. Keung W. M. first edition. Newyork. Taylor and Francis. 290.

Ishimi Y, Arai N, Wang X, Wu J, Umegaki K, Miyaura C, et al. 2000. Difference in effective dosage of genistein on bone and uterus in ovariectomized mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 274:697-701.

Jimi E, Ikebe T, Takahashi N, Herata M, Suda T, Koga T. 1996. Inter leukin 1 alpha activates all NF - kappa B - like factor in osteoclast - like cells. *J Biol Chem.* 271: 4605 – 4608.

Kang HG, Jeong SH, Cho JH, Kim DG, Park JM, Cho MH. 2005. Evaluation of estrogenic and androgenic activity of butylated hydroxyanisole in immature female and castrated rats. *Toxicology.* 213: 147-156.

Kanis JA, Melton LJ, Christian JC, Khaltaeu N. 1994. The diagnosis of osteoporosis. *Osteoporosis International.* 9: 1137 – 1147.

Kanno S, Hirano S, Kayama F. 2004. Effects of phytoestrogens and environmental estrogens on osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells. *Toxicology.* 196:137-45.

Ke HZ, Qi H, Crawfond DT, Pirie CM, Simmons HA, Thompson DD. 1996. Longitudinal and cross-sectional characterization of long-term skeletal effects of aging and orchidectomy in the male rat. *Bone.* 19 Suppl:129S-69S.

Khali DA, Lucas EA, Smith BJ, Soung DY, Devareddy L, Juma S, Akhter MP, Rexker R, Arjm 2005. Soy insoflavones may protect against orchidectomy-induced bone loss in aged r Calcif Tissue Int. 76: 56-62.

Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, et al. 1998. Inte estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β. *Endocrinology*. 13

Lee Y-B, Lee HJ, Kim KS, Lee J-Y, Nam S-Y, Cheon S-H, et al. 2004. Evaluation of the preve of isoflavone extract on bone loss in ovariectomized rats. *Biosci Biotechnol Biochem*. 6

Li B, Yu S. 2003. Genistein prevents bone resorption diseased by inhibiting bone resorption stimulating bone formation. *Biol Pharm Bull*. 26:780-6.

Lissin LW, Cooke JP. 2000. Phytoestrogen and cardiovascular health. *J Ame Col Cardio* 1410.

Malaivijitnond S, Kiatthaipipat P, Cherdshewasart W, Watanabe G, Taya K. 2004. Different e *Pueraria mirifica*, an herb containing phytoestrogens, on LH and FSH secretion in gona female and male rats. *J Pharmacol Sci*. 96:428-35.

Malaivijitnond S, Chansri K, Kijkuokul P, Urasopon N, Cherdshewasart W. 2006. Using vagi to assess the estrogenic activity of phytoestrogen-rich herb. *J Ethnopharmacol*. 107:35

Malaivijitnond S, Tungmunnithum D, Gittarasanee S, Kawin K, Limjunyawong N. 2010a. Pue exhibits weak estrogenic activity in female rats. *Fitoterapia*. 81:569-576.

Malaivijitnond S, Ketsuwan A, Watanabe G, Taya K, Cherdshewasart W. 2010b. Luteinizi reduction by the male potency herb, *Butea superba* Roxb. *Brazilian Journal of I Biological Research*. 43(9):843-852.

Manosroi A, Saowakon S, Manosroi J. 2004. Pre,iminary chronic toxicity study of herbal containing red Kwao Krua (*Butea superba* Roxb.) or white Khao Krua (*Pueraria mirifi* and Suvatabandhu) in Wistar rats. SWU J Pharm Sci. 9: 1-12. (in Thai)

Muangman V, Cherdshewasart W. 2001. Clinical trial of the phytoestrogen rich herb, *Pue* as a crude drug in the treatment of symptoms in menopausal woman. *Siriraj Hos Ga* 309.

Murkies AL, Wilcox G, Davis SR. 1998. Phytoestrogens. *J Clin Endocr Met* . 83: 297 – 303.

Nakamura H. 2007. Morphology, function and differentiation of bone cells. *J Hard Tiss Biol.*

Ng KW. 2009. Future developments in osteoporosis therapy. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 9:371-84.

Nishino T, Wedel T, Schmitt O, Schonfelder M, Hirtreiter C, Schulz T, et al. 2006. The xenoestrogen bisphenol A in the Hershberger assay: androgen receptor regulation and morphometrical reactions indicate no major effects. *J Steroid Biochem Mol Biol* . 98: 155-163.

Ohta H, Makita K, Komukai S, Nozawa S. 2002. Bone resorption versus estrogen loss following oophrectomy and menopause. *Maturitas*. 43: 27 – 33.

Onoe Y, Miyaura C, Ohta H, Nozawa S, Suda T. 1997. Expression of estrogen receptor β in rat bone. *Endocrinology*.138:4509-12.

Owens W, Zeiger E, Walker M, Ashby J, Onyon L, Gray LE Jr. 2006. The OECD program to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for *in vivo* androgen and antiandrogen responses. Phase 1: use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol.*Environ Health Perspect* 114: 1259-1265.

Papapoulos S. 2008. Bisphosphonates: how do they work. *Best Practice & Research*. 22: 831 – 847.

Picherit C, Bennetau-Pelissero C, Chanteranne B, Lebecque P, Davicco MJ, Barlet JP, et al. 2001. Soybean isoflavones dose-dependently reduce bone turnover but do not reverse established osteopenia in adult ovariectomized rats. *J Nutr*. 131:723-8.

Pongchaiyakul C, Apinyanurak C, Soontrapa S et al. 2006. Prevalence of osteoporosis in Thai men. *J Med Assoc Thai*. 89: 160-169.

Pongchaiyakul C, Apinyanurak C, Soontrapa S et al. 2006. Prevalence of osteoporosis in Thai men. *J Med Assoc Thai*. 89: 160-169.

Ren P, Ji H, Shao Q, Chen X, Han J, Sun Y. 2007. Protective effects of sodium daidzein sulfonate on trabecular bone in ovariectomized rats. *Pharmacology* .79:129-36.

Riggs BL. 1982. Changes in bone mineral density of proximal femur and spine with aging: Differences between the postmenopausal and senile osteoporosis syndrome. *J Clin Invest*. 70: 716 – 733.

Riggs BL, Khosla S, Melton J. 2002. Sex steroid and the construction and conservation of adult skeleton. *Endocrine Rev*. 23: 279 – 302.

Shirke SS, Jadhav SR, Jagtap AG. 2009. Osteoprotective effect of *Phaseolus vulgaris* L in ovariectomy-induced osteopenia in rats. *Menopause*.16:589-96.

Smith EP, Boyd J, Frank GR, Takahashi H, Cohen RM, Specker B, Williams TC, Lubahn DB, 1994. Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a r *J Med.* 331: 1056-1061.

Smith MR. 2006. Treatment-related osteoporosis in men with prostate cancer. *Clin Canc* 6315s-6319s.

Soung Y, Devareddy L, Khalil DA, Hooshmand S, Patade A, Lucas EA, Arjmandi BH. 2006. S trabecular microarchitecture and favorably alters select bone-specific gene expression rat model of osteoporosis. Calcif Tissue Int. 78:385-391

Sugimoto E, Yamaguchi M. 2000. Stimulating effect of daidzein in osteoblast MC3T3 *Biochem Pharm.* 59: 471 – 475.

Sulak PJ. 1997. Endometrial cancer and hormone replacement therapy: Appropriate use of oppose endogenous and exogenous. *Endoc Met Clin North America.* 26: 399 – 412.

Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM, Ke HZ. 1995. FDA guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone.*17 Suppl:125S-33S.

Tongerson D, Bell S. 2001. Hormone replacement therapy reduces the risk of nonvertebra postmenopausal woman. *JAMA.* 285: 2891 – 2891.

Trisomboon H, Malaivijitnond S, Suzuki J, Hamada Y, Watanabe G, Taya K. 2004. Long-ter effects of *Pueraria mirifica* phytoestrogens on parathyroid hormone and calcium lev menopausal cynomolgus monkeys. *J Reprod Dev.* 50: 639-645.

Trisomboon H, Malaivijitnond S, Watanabe G, Cherdshewasart W, Taya K. 2006. The Estro of *Pueraria mirifica* on gonadotrophin levels in aged monkeys. *Endocrine.* 29:129-134.

Trisomboon H, Malaivijitnond S, Watanabe G, Taya K. 2005. Ovulation block by *Pueraria min* study of its endocrinological effect in female monkeys. *Endocrine.* 26:33-9.

Urasopon N, Hamada Y, Asaoka K, Cherdshewasart W, Malaivijitnond S. 2007. *Pueraria miri* phytoestrogen-rich herb, prevents bone loss in orchidectomized rats. *Maturitas.* 56:322-

Urasopon N, Hamada Y, Cherdshewasart W, Malaivijitnond S. 2008a. *Pueraria mirifica*, a ph – rich herb, prevent bone loss in ovariectomized rats. *Maturitas.* 59: 137-48.

Urasopon N, Hamada Y, Asaoka K, Poungmali U, Malaivijitnond S. 2008b. Isoflavone conten diets and its estrogenic effect on vaginal cornification in *Pueraria mirifica*-treated rats. S 34:371-6.

Wang X, Wu J, Chiba H, Umegaki K, Yamada K, Ishimi Y. 2003. *Puerariae radix* prevents bone loss in ovariectomized mice. *J Bone Miner Metab*. 21:268-75.

Yamaguchi M, Gao YH. 1998. Inhibiting effect of genistein on bone resorption in tissue culture. *Biochemical Pharmacology*. 55: 71 – 76.

Zang Y, Li X-L, Lai W-P, Chen B, Chow H-K, Wu C-F, et al. 2007. Anti-osteoporotic effect of *Erythrina variegate* L. in ovariectomized rats. *J Ethnopharmacol*. 109:165-9.

Zhang Y, Zeng X, Zhang L, Zheng X. 2007. Stimulatory effect of puerarin on bone formation through activation of PI3K/AKT pathway in rat calvaria osteoblast. *Planta medicine*. 73: 341 – 347.

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ส่วนผนวก

ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์

1. บทความในวารสารวิชาการนานาชาติ

-Harnmanop S, Urasopon N, Hamada Y, **Malaivijitnond S.** 2010. Therapeutic effects of a pl rich herb *Pueraria mirifica* on ovariectomy-induced osteoporotic rats. In preparation.

2. บทความในวารสารวิชาการระดับชาติ

-ทารีณี โลนุชิต, **สุจินดา มาลัยวิจิตรนนท์**. 2554. วิธีการตรวจสอบตัวอย่างกวาวเครือขาวในห้องป วารสารวิทยาศาสตร์.

3. การนำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการนานาชาติ

3.1. วิทยากรรับเชิญ (Keynote speaker)

-**Malaivijitnond S.** 2009. Phytoestrogens from a Thai herb promise major advances to wome Biological Science Graduate Congress. 10-12 December 2009. Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.

3.2. วิทยากรรับเชิญ (Invited speaker)

-**Malaivijitnond S**, Urasopon N, Harnmanop S, Chimsakul U, Jaroenporn S, Chershewasart Watanabe G, Taya K.2009. Effect of Dietary Phytoestrogens on Rodent, Monkey and Physiology. The 3rd International Congress on the Future of Animal Research "Biome Field Research with Non-human Primates", 19-22 November 2009, Rose Garden Riv Nakhon Pathom, Thailand

-**Malaivijitnond S.** 2010. Phytoestrogens from a Thai herb promise major advances to wom Seminar of the Veterinary Physiology Laboratory, Tokyoto Unviersity of Agriculture an Technology, Japan. 22 September 2010.

3.3. นำเสนอผลงานแบบปากเปล่า

- **Malaivijitnond S**, Urasopon N, Harnmanop S, Chimsakul U, Tiyasatkulkovit W, Jaroenporn Preventive and therapeutic effects of *Pueraria mirifica* herb-containing phytoestroger loss. The 6th Intercongress Symposium of the Asia and Oceania Society for Compara Endocrinology (AOSCE), Palmerston North, New Zealand, January 19-22, 2010. pp.

3.4. นำเสนอผลงานแบบโปสเตอร์

-Hanmanop S, **Malaivijitnond S.** 2010. The therapeutic effects of white Kwao Krua *Pueraria* Shaw & Suvatabanhdu on ovariectomy-induced osteoporotic rats. The 6th Intercongr

Symposium of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology (AOSCE), Palmerston North, New Zealand, January 19-22, 2010. pp. 86.

4. การนำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการในประเทศ

4.1. วิทยากรรับเชิญ (Invited speaker)

-**Malaivijitnond S.** 2010. Reproductive endocrine research: A case study of *Pueraria mirifica*. อบรมวิชาการสรีรวิทยา-พยาธิสรีรวิทยา ครั้งที่ 28 ประจำปี 2553. ณ อาคารแพทยพัฒน์ ห้อง 230/1 คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. หน้า 17-21.

เอกสารแนบ (ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์)

Artwork Quality Results
"Therapeutic effects of the phytoestrogen-rich herb, Pueraria mirifica, on ovariectomy-induced osteoporotic rats"

If your uploaded Item has a Fail link, this indicates that the Item does not meet the journal's production standards. You can click the Fail link to obtain more information about how to correct the Item. In order to replace an Item, click 'Edit Submission' on the prior page.
If you choose not to act upon these recommendations you can continue the submission process. However after acceptance you may be asked to supply improved artwork files. This can possibly delay the production process.

Close

Submission Files

Item Type	Item Description	File Name	Size	Artwork Quality Results
PDF	PDF			View
Cover Letter	Cover Letter	CoverLetter_Harnmanop_27Sept10.doc	59.5 KB	N/A
Graphical Abstract	*Graphical Abstract	Graphical abstract_Harnmanop_27Sept10.doc	22.4 MB	N/A
Manuscript	*Manuscript	MS_Harnmanop_27Sept10.doc	132.5 KB	N/A
Figure	Figure	Figure_Harnmanop_27Sept10.pdf	365.2 KB	Pass [View]

Close

Therapeutic effects of the phytoestrogen-rich herb, *Pueraria mirifica*, on ovariectomy-induced osteoporotic rats

Somrudee Harnmanop[a,b], Nontakorn Urasopon[c], Yuzuru Hamada[d], Suchinda Malaivijitnond[b,*]

[a]*Interdepartment of Physiology Program, Graduate School, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand*

[b]*Primate Research Unit, Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand*

[c]*Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, 34190, Thailand*

[d]*Evolutionary Morphology Section, Primate Research Institute, Kyoto University, Japan*

***Correspondence and reprint requests:**

Dr. Suchinda Malaivijitnond

Primate Research Unit, Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand.

E-mail: Suchinda.m@chula.ac.th

Tel: 66-2-2185275

Fax: 66-2-2185256

1. Introduction

Pueraria mirifica Airy Shaw and Suvatabandhu is an indigenous Tha tuberous roots contain at least 17 phytoestrogen compounds, mainly isoflavones estrogenic activity of *P. mirifica* has been evaluated on various organ systems, in reproductive organs [3-5] and breast cancer [6]. Based on its estrogenic activity, has become a major focal point for modern research on postmenopausal symptoms [7-10], including osteoporosis.

Osteoporosis is a skeletal disorder characterized by a low bone mineral d microarchitectural deterioration of bone tissue, which predisposes the indivic increased risk of fractures of the hip, spine and other skeletal sites [11]. Bone fra lead to disability, as well as a decreased quality of life, and increased morbidity an [12]. It has been estimated that the annual number of worldwide cases of osteopor hip fractures will increase from 1.66 million to 6.25 million by the year 2050 [13] 26% of all hip fractures in 1990 occurred in Asia, and this rate could rise to 37% a the year 2025 and 2050, respectively [14]. The higher prevalence of osteoporosis ha recently in the world, especially in countries where the human life-span has been Thus, in women aged 40 – 44 years (a premenopausal age), the prevalence of oste only 0.9%, but this increases to over 30% and 87% at 70 and over 79 yea respectively [15].

In women, estrogen deficiency has been recognized as a key factor for os development. Estrogen plays an important role in maintaining bone mass in adult exerting a tonic suppression of bone remodeling and maintaining the balance betv formation and bone resorption. Thus, entering the menopause, which is accompani sudden loss of estrogen, could result in a decrease of bone mineral density and bon content [16]. Therefore, estrogen replacement therapy is proposed to prevent bo

2. Materials and methods

2.1. Animals

Adult female Sprague-Dawley rats, aged 60 days and weighing 200 - 250 g, were obtained from the National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Nakhon Pathom, Thailand. They were housed in stainless steel cages with sawdust bedding at five animals/cage in a room with controlled lighting (lights on 0600 – 2000 h) and temperature (25 ± 1 °C) at the Primate Research Unit, Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University. The animals were fed with a standard rat chow diet (C. P. 082, Lot No. 17, S.W.T. Co., Ltd, Thailand) for 3.5 months (when they were 5.5 months old). Two weeks in advance and during the experimental period, rats were fed a soy-bean free rat diet (C.P. 082/SBF, Lot No. 080101, S. W. T. Co., Ltd, Thailand) to minimize the phytoestrogen content in the diet, as reported previously [25]. To minimize the increase in body weight caused by ovariectomy, the food consumption of ovariectomized rats was adjusted weekly to the level of sham-operated rat consumption. Water was supplied *ad libitum*. The experimental protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Faculty of Science, Chulalongkorn University (Protocol Review no. 0823003).

2.2. Experimental procedure

At 6 months of age, blood samples were collected from the rats by cardiac puncture and this day was designed as D_0. Seventy rats were divided into two main groups: sham control (15 rats) and ovariectomy (55 rats). In the ovariectomy group (OVX group), rats were bilaterally ovariectomized from a dorsal approach. In the sham control group, ovaries were exteriorized but replaced intact. The rats were then kept for 90 days after the surgery to induce bone loss [22,23], before being submitted to the study, and blood samples were consecutively collected every 30 days, which were designed as D_{30}, D_{60} and D_{90}, respectively.

2.4. The extraction of P. mirifica *and isoflavone analysis*

The isoflavone content of *P. mirifica* was analyzed by a high perfo chromatography (HPLC) technique. Before being submitted for the isofla analysis, the *P. mirifica* powder was first extracted. In the extraction step, 5(*mirifica* powder was mixed with 150 ml of 95% ethanol and incubated in an inc at 250 rpm, 50 °C for 24 hours. The ethanol extract was filtered by filter pap No.4) and the solution was kept at -20 °C. The precipitation was again extracted of 95% ethanol in the same way as mentioned above. The solutions collected fi extractions were pooled together and solvents were removed under a vacuum evaporator. Then, the extraction was dried by incubated in the water bath at 60 °C extract was stored at -20 °C until HPLC analysis.

To identify isoflavone contents, 3 mg of a dried extract was re-dissolved v of absolute ethanol and diluted with 1.5 ml of solution A (100: 0.1% v/v of deioni phosphoric acid). Then a 10-µl injection volume of extracted solution was analyz isoflavones using a HPLC according to the previously described method [25] wi modification. The HPLC system (Water 1525 binary HPLC pump, Waters 717 sampler, and Water 2487 UV absorbance Dual λ detector (Waters, Milford, U performed in a 250 mm x 4.6 mm column (ODS, Japan) at 25 °C. The mobile phase of solution A (100: 0.1% v/v of deionized water : phosphoric acid) and solution B (1 acetonitrile : phosphoric acid) with gradient elution, flow rate at 1 ml/min and wavelength was set at 255 nm. The isoflavone content in the sample was anal comparing the retention time and quantifying the amount using standard curves of p of the five isoflavone standards. Puerarin (>99 purity, LKT Laboratories, Inc., MN daidzin (>95 purity, Sigma-Aldrich, MO, USA), genistin (>95 purity, Sigma-Aldric USA), daidzein (>98 purity, Sigma-Aldrich, MO, USA) and genistein (>99% pur

to a small size and then decalcified in EDTA-G solution (EDTA disodium salt 14.50 g, NaOH 1.25 g, glycerol 15 ml and distilled water 100 ml) for 4 weeks by changing the EDTA-G solution every week. After four weeks, the decalcified bones were dehydrated through a series of increasing ethanol concentrations to absolute ethanol and then cleared in xylene. After embedded in paraffin, they were cut into 5 μm thick sections, and stained with hematoxylin and eosin. The slides were analyzed under an Olympus light microscope and digitized with a camera (Sony, DSC-S85).

The Digital Image Processing Software Image Pro (Plus Software Media Cybernatics, Inc., USA) was used for quantitative bone histomorphometric measurements. The studied region of próximal tibia metaphysis was trabecular bone between 2 and 4 mm distal to the growth plate-epiphyseal junction. In each section, four non-overlapped windows of 1 x 1 mm were determined, and five sections in each rat were randomly selected for the study. The percent of trabecular bone area (%BA) was calculated by the trabecular bone area/total area x 100.

2.8. Statistical analysis

The data are expressed as the mean ± 1 SEM. Differences in body weights, relative organ weights, %BA and serum alkaline phosphatase levels between each time point in each group, and between each group in each time point, were analyzed by one way analysis of variance (ANOVA) with post-hoc test by LSD test. In all cases significance was set at $p < 0.05$. As the body weights in all groups of rats significantly changed throughout the study period, the relative organ weights (organ weight/body weight) were used.

3.3. Bone histology and bone area

After OVX for 90 days, the trabecular bone area was dramatically reduced bone marrow cavity was concomitantly increased (Figure 3). This confirms the su induction of bone loss by OVX in this study. The trabecular bone area in OVX ra days was reduced further than that after 90 days, whilst in contrast treatment of th with different doses of *P. mirifica* or with EE restored the trabecular bone area.

Comparison between the SH and OVX groups after OVX for 90 and revealed that the % trabecular bone area (%BA) in OVX groups were ma significantly lower (65.40% and 72.72%, respectively) than those of the SH groups 1.34 vs. 7.88 ± 0.99 for SH_{90} and OVX_{90} ($p < 0.001$), and 17.71 ± 1.42 vs. 4.83 SH_{180} and OVX_{180} ($p < 0.001$), respectively, as shown in Figure 4. As the age of SH rats increased from 9 months (SH_{90} group) to 12 months (SH_{180} group) old showed a decrease in the %BA by 22.29% ($p = 0.004$), whilst that for the OVX rat significant 38.7% decrease in the %BA ($p = 0.01$).

Treatment of the OVX rats with *P. mirifica* could prevent the progressive of %BA from that of the OVX_{90} group (%BA = 7.88 ± 0.99 for the OVX_{90} group), at the higher doses (%BA = 4.83 ± 0.42, 6.73 ± 0.92, 7.45 ± 0.93 and 8.01 ± 1.27 PM10, PM100 and PM1000, respectively), as shown in Figure 3, whilst the %l PM1000 group was nearly the same as that of the EE group (%BA = 8.67 ± 0.96). the %BA in the PM1000 and EE groups were significantly higher than the P ($p<0.05$), by 65.80% and 79.50%, respectively, and slightly higher than that of t group, by 1.64% and 10.90%, respectively. Thus, feeding of PM1000 and EE t seems to rescue the %BA. However, restoration of the %BA was not complete

rats, where ovariectomy increased the body weight [23,25,31]. This was also the case in the present study, where the body weights of rats were increased after OVX and dose-dependently decreased after *P. mirifica* treatment, confirming that the rats were in an endogenous estrogen deficiency stage after the OVX, and that *P. mirifica* could reverse the estrogenic activity, as also observed in the EE group.

Since the body weights of rats were altered after *P. mirifica* and EE treatment, the weights of the organs are presented as the relative organ weights (organ weight/body weight). The OVX showed a very mild effect on the relative weights of the metabolic organs. However, the relative uterus weights were highly decreased after OVX treatment but recovered after the administration of *P. mirifica* or EE, as has been reported previously [4,5,32].

Phytoestrogens exhibit estrogenic activity by binding at both estrogen receptors (ERs), ERα and ERβ, with a higher binding affinity [33] and expression of mRNA at ERβ [34]. ERα dominates in a few specific tissues, and is mainly involved in the reproductive system, whereas ERβ is expressed in many tissues including the bone, especially the lumbar vertebra and trabecular bone [34,35]. Intensive investigation is currently underway to identify selective estrogen receptor modulators (SERMs), which display the desirable estrogenic effects but lack or have a greatly reduced level of undesirable side effects. Thus, phytoestrogens are considered to be SERMs activity. There is a marked difference between phytoestrogen dosages that protect against bone loss and those that induce uterine hypertrophy. Thus treatment of the OVX mice with genistein at 0.5 - 0.7 mg/day could prevent trabecular bone loss without inducing the hypertrophic effects on the uterus [36,37]. The OVX rats fed with soy protein containing the isoflavone content (which include genistin, genistein, daidzin and daidzein), at 1,462.0, 25.1, 590.0 and 11.3 mg/kg soy protein isolate, increased the bone femoral density, but induced no significant effect on the uterine weight [38]. The OVX mice fed with *P. lobata*, another phytoestrogen containing herb, showed an amelioration of bone

prevent the bone loss (anti-osteoporosis effect), but they also restored the
osteoporosis (anabolic effect) in female rats, as seen by the fact that the %BAs i
and EE groups were higher than the OVX_{90} group by 1.64% and 10.9%, re
although it was not significant. This was also reported in seven-month old rats w
induced to osteoporosis by ovariectomy and kept for 80 days (OVX_{80}) with
subsequent treatment with 20 – 80 mg/kg BW of soybean isoflavone for 84
Although the BMD and bone area at D_{164} were not significantly different from th
OVX_{80} rats, the numerical values tended to be higher, especially for the trabecular
[46].

Alkaline phosphatase has been clinically available for several years as a
bone metabolism. Serum alkaline phosphatase consists of several dimeric isof
originate from various tissues, such as the liver, bone, intestine, spleen, kidney and
In adults with a normal liver function, approximately 50% of the total alkaline ph
activity arises from the liver and 50% arises from the bone. Thus, we assume that th
in the serum alkaline phosphatase levels in the present study are due to the chan
bone isoform, because *P. mirifica* had no effect on the liver weights, although of c
awaits formal confirmation. In agreement with the previous published reports indic
ovariectomy increased serum alkaline phosphatase levels [32,47,48], our OVX rats s
increase in serum alkaline phosphatase levels starting from D_{30}, whereas the levels w
in the SH rats throughout the study period. Serum alkaline phosphatase is an indire
of bone formation, osteoblast cell proliferation, differentiation and synthesis of coll
It suggests then that the OVX rats have increased bone formation. Concomitantl
hydroxyproline and serum tartrate-resistant acid phosphatase activity, which are
bone resorption markers, were also elevated in OVX rats [38,50]. Thus, bone form
bone resorption were greater in the OVX rats. Controversial results of the effect o

hormone [54]. However, parathyroid hormone has undesirable side effects, including nausea, vomiting, headache, leg cramps and dizziness, and, most importantly, it is very expensive. Thus, parathyroid hormone treatment is reserved for patients with severe osteoporosis who are unable to take other medications or for whom other medications are not effective [54]. Regarding the results presented here, *P. mirifica* might be a candidate of choice, because *P. mirifica* also confers beneficial effects in terms of the reduction of tumorigenesis and tumor growth [6]. Thus, the use of *P. mirifica* could promise major advances to bone health in postmenopausal women.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Robert Butcher, Faculty of Science, Chulalongkorn University for proofreading of the manuscript. This study was supported in part by the Inter-Department of Physiology, the Graduate School; the Thai Government Stimulus Package 2 (TKK2555), under the Project for Establishment of Comprehensive Center for Innovative Food, Health Products and Agriculture; Ratchadaphisek Somphot Endowment Fund (Grant no. AG001B).

References

[1] Chansakaow S, Ishikawa T, Seki H, Sekine (nee Yoshikawa) K, Okada M, Chaichantipyuth C. Identification of deoxymiroestrol as the actual rejuvenating principle of "Kwao Keur", *Pueraria mirifica*. The known miroestrol may be an artifact. J Nat Prod 2000;63:173-5.

[2] Cherdshewasart W, Sriwatcharakul S. Major isoflavonoid contents of the 1-year-cultivated phytoestrogen-rich herb, P*ueraria mirifica*. Biosci Biotechnol Biochem 2007;71:2527-33.

[12] Ray NF, Chan GM, Thamer M, Melton LJ 3rd. Medical expenditures for th
osteoporotic fratures in the United States in 1995: Report from the National
Foundation. J Bone Miner Res 1997;12:24-35.
[13] Cooper C, Campion G, Melton LJ 3rd. Hip fractures in the elderly: A world
projection. Osteoporos Int 1992;2:285-9.
[14] Gullberg B, Johnell O, Kanis JA. World-wide projections for hip fracture. C
1997;7:407-13.
[15] Henry MJ, Pasco JA, Nicholson GC, Seeman E, Kotowicz MA. Prevalence
osteoporosis in Australian women: Geelong osteoporosis study. J Clin Densit
2000;3:261-8.
[16] Ohta H, Makita K, Komukai S, Nozawa S. Bone resorption versus estrogen l
oophorectomy and menopause. Maturitas 2002;43:27-33.
[17] Turner RT, Riggs BL, Spelsberg TC. Skeletal effects of estrogen. Endocr Rev
1994;15:275-300.
[18] Kenemans P, Bosman A. Breast cancer and post-menopausal hormone therapy
Pract Res Cl En 2003;17:123-37.
[19] Fontanges E, Fontana A, Delmas P. Osteoporosis and breast cancer. Joint Bon
2004;71:102-10.
[20] Sulak PJ. Endometrial cancer and hormone replacement therapy: Appropiate u
progestins to oppose endogenous and exogenous. Endocrinol Metab Clin North
1997;26:399-412.
[21] Canavan TP, Doshi NR. Endometrial cancer. Am Fam Physician 1999;59: 306
[22] Urasopon N, Hamada Y, Asaoka K, Cherdshewasart W, Malaivijitnond S. *Puer*
mirifica, a phytoestrogen-rich herb, prevents bone loss in orchidectomized rats. M
2007;56:322-31.

[31] Malaivijitnond S, Tungmunnithum D, Gittarasanee S, Kawin K, Limjunyawong N. Puerarin exhibits weak estrogenic activity in female rats. Fitoterapia 2010;Doi: 10.1016/j.fitote.2010.01.019.

[32] Shirke SS, Jadhav SR, Jagtap AG. Osteoprotective effect of *Phaseolus vulgaris* L in ovariectomy-induced osteopenia in rats. Menopause 2009;16:589-96.

[33] Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, et al. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β. Endocrinology 1998;139:4252-63.

[34] Onoe Y, Miyaura C, Ohta H, Nozawa S, Suda T. Expression of estrogen receptor β in rat bone. Endocrinology 1997;138:4509-12.

[35] Gustafsson JA. Review: estrogen recptor-β a new dimension in estrogen mechanism of action. J Endocrinol 1999;163:379-83.

[36] Fanti P, Monier-Faugere MC, Geng Z, Schmidt J, Morris PE, Cohen D, et al. The phytoestrogen genistein reduces bone loss in short-term ovariectomized rats. Osteoporos Inst 1998;8:274-81.

[37] Ishimi Y, Arai N, Wang X, Wu J, Umegaki K, Miyaura C, et al. Difference in effective dosage of genistein on bone and uterus in ovariectomized mice. Biochem Biophys Res Commun 2000;274:697-701.

[38] Arjmandi BH, Birnbaum R, Goyal NV, Getlinger MJ, Juma S, Alekel L, et al. Bone-sparing effect of soy protein in ovarian hormone-deficient rats is related to its isoflavone content. Am J Clin Nutr 1998;68 (suppl):1364s-8s.

[39] Wang X, Wu J, Chiba H, Umegaki K, Yamada K, Ishimi Y. *Puerariae radix* prevents bone loss in ovariectomized mice. J Bone Miner Metab 2003;21:268-75.

[40] Ren P, Ji H, Shao Q, Chen X, Han J, Sun Y. Protective effects of sodium daidzein sulfonate on trabecular bone in ovariectomized rats. Pharmacology 2007;79:129-36.

[51] Kanno S, Hirano S, Kayama F. Effects of phytoestrogens and environmental est
osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells. Toxicology 2004;196:137-45.
[52] Sugimoto E, Yamaguchi M. Stimulatory effect of daidzein in osteoblastic MC3T
cells. Biochem Pharmacol 2000;59:471-5.
[53] Brynin R. Soy and its isoflavones: a review of their effects on bone density. Alte
Rev 2002;7:317-27.
[54] Ng KW. Future developments in osteoporosis therapy. Endocr Metab Immune D
Drug Targets 2009;9:371-84.

100 and 1000 mg/kg BW/day (OVX, PM10, PM100 and PM1000, respectively) for 90 days (B). Except for the SH and OVX groups, the data are expressed as only the mean (derived from 10 replicates) because the SE values overlapped making the plot unclear. * and ** = $p < 0.05$ and 0.01, respectively, compared to the SH group.

วารสารวิทยาศาสตร์
สมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย
ในพระบรมราชูปถัมภ์
scithaimag@gmail.com

๒๔ มีนาคม ๒๕๕๔

เรื่อง การรับบทความวิจัยวิทยาศาสตร์เพื่อการตีพิมพ์ในวารสารวิทยาศาสตร์

เรียน คุณทาริณี โลนุชิต และ รองศาสตราจารย์ ดร. สุจินดา มาลัยวิจิตรนนท์
หน่วยวิจัยไพรเมท ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สิ่งที่ได้รับ

๑. บทความวิจัยเรื่อง วิธีการตรวจสอบกวาวเครือขาวในห้องปฏิบัติการ จำนวน ๑๖ หน้า ๒ ชุด
๒. แผ่น ซีดี ๑ แผ่น

กองบรรณาธิการวารสารวิทยาศาสตร์ สมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์ ได้รับบทความที่ท่านส่งมาเพื่อการตีพิมพ์ลงในวารสารวิทยาศาสตร์เป็นที่เรียบร้อยแล้ว และขณะนี้บทความของท่านได้รับการจัดลำดับรอการตีพิมพ์ลงในวารสารวิทยาศาสตร์ ฉบับเดือนพฤษภาคม-มิถุนายน พ.ศ. ๒๕๕๔ เป็นที่เรียบร้อยแล้ว

ทางกองบรรณาธิการขอขอบคุณท่านที่ให้ความสนใจและส่งบทความมาเพื่อลงตีพิมพ์ในวารสารวิทยาศาสตร์ ซึ่งเรายินดีที่จะเป็นสื่อกลางเพื่อเผยแพร่ผลงานของท่านสู่สาธารณชนต่อไป

จึงเรียนมาเพื่อทราบ

ขอแสดงความนับถือ

(นายฉัตรชัย เครือเสนา)
รองบรรณาธิการวารสารวิทยาศาสตร์

สำนักงานจัดทำวารสารวิทยาศาสตร์
๕๒/๑๑-๑๒ อาคาร ลอท ทเวนตี้ไนน์ ซอยอินทามระ ๒๙ ถนนสุทธิสารวินิจฉัย เขตพญาไท กรุงเทพมหานคร ๑๐๔๐๐ โทรศัพท์ ๐๒ ๒๗๙๘๘๗๑-๒ โทรสาร ๐๒ ๒๗๙๘๘๗๒
52/11-12 Lot Twenty-nine Building, Soi Inthamara 29, Suttisarn Road, Phayathai, Bangkok 10400 Tel. 02 2798871-2 Fax. 02 2798872

วิธีการตรวจสอบตัวอย่างกวาวเครือขาวในห้องปฏิบัติการ

ทาริณี โลนุชิต และ รศ. ดร.สุจินดา มาลัยวิจิตรนนท์*

หน่วยวิจัยไพรเมท ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร

โทรศัพท์/โทรสาร 02-218-5275

อีเมล suchinda.m@chula.ac.th

Corresponding author: รศ. ดร. สุจินดา มาลัยวิจิตรนนท์

บทคัดย่อ

กวาวเครือขาวเป็นพืชสมุนไพรไทยที่มีสารไฟโตเอสโตรเจนหลายชนิดและมีอยู่ในป
ก่อให้เกิดกระแสความนิยมทั้งในการนำไปใช้ในคนเพื่อสรรพคุณทางยาและเครื่องสำอาง
ศึกษาวิจัยในสัตว์ทดลองหลายชนิด อย่างไรก็ตามตัวอย่างกวาวเครือขาวที่ได้มาอาจจะไม่สาม
ชนิดได้โดยง่ายหรืออย่างมั่นใจ ทั้งนี้มีพืชสมุนไพรไทยหลายชนิดที่มีลักษณะคล้ายกวาวเครื
การศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งหวังที่จะหาคุณสมบัติบางประการที่สามารถใช้ในการจำแนกกวาวเครือขา
จำแนกแบ่งเป็น 3 ระดับคือ 1. จำแนกจากใบ กิ่ง และ หัว ของตัวอย่างพืช 2. จำแนกจากลัก
บดละเอียดและ 3. จำแนกจากฤทธิ์ทางเอสโตรเจนของกวาวเครือขาวด้วยวิธี Vaginal cytology
แรทเพศเมียที่ตัดรังไข่ออกทั้งสองข้าง ผลการศึกษาพบว่ากวาวเครือขาวมีหัวใต้ดินที่ค่อนข้างกล
ย่อย รูปไข่ ด้านบนใบเกลี้ยง ด้านล่างมีขนสั้น ๆ ประปราย และก้านใบมีขนสั้น ๆ เนื้อด้านในหัว
ใยมาก ไม่มีเส้นรอบวง เมื่อนำเนื้อส่วนหัวไปหั่น ตากแห้ง และบดเป็นผง และส่องดูใต้ก
ส่วนประกอบหลักสองอย่างคือ เม็ดแป้งขนาดเล็ก ประมาณ 3.63 – 4.27 ไมครอน ที่มีสีเหลืองอ่
ใยจำนวนมาก และเมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ทางเอสโตรเจน พบว่ากวาวเครือขาวสามารถ
Cornified cell เพิ่มสูงขึ้น โดยขึ้นกับสายพันธุ์ของกวาวเครือที่นำมาทดสอบ

บทนำ

ด้วยปัจจุบันกระแสในการดูแลสุขภาพด้วยสมุนไพรแทนการใช้อาหารเสริมหรือยาซึ่งเป็นสารเคมีสังเคราะห์เป็นที่นิยมกันอย่างมากและกว้างขวาง และสมุนไพรที่ได้รับความนิยมมากชนิดหนึ่งก็คือกวาวเครือขาว *Pueraria mirifica* กวาวเครือขาวเป็นไม้เถาว์ ที่มีรากเป็นหัว ซึ่งนิยมนำมาใช้เป็นยาสมุนไพรโดยเฉพาะอย่างยิ่งทางด้านการรักษาสุขภาพและความงามของผู้หญิง เนื่องจากมีสารที่มีลักษณะโครงสร้างและฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเพศเอสโตรเจนที่เรียกว่าสารไฟโตเอสโตรเจน (phytoestrogens) ในปริมาณสูงและมีสารไฟโตเอสโตรเจนหลากหลายชนิด (Chansakaow et al., 2000; Cherdshewasart et al., 2007a; 2007b; Cherdshewasart and Sriwatcharakul, 2007; Jaroenporn et al., 2006; Malaivijitnond et al., 2004; 2006; Trisomboon et al., 2004; 2005; 2006) จึงนิยมนำมารับประทานเป็นยาบำรุงโดยเฉพาะในผู้หญิงวัยหมดประจำเดือนกวาวเครือขาวถูกใช้เป็นยาสมุนไพรเพื่อทดแทนการพร่องของฮอร์โมนเพศเอสโตรเจน (Muangmand and Cherdshewasart, 2001) ทั้งยังเป็นสมุนไพรที่ได้รับการนิยมในการนำมาวิจัยในสัตว์ฟันแทะ โดยมุ่งหวังประโยชน์การนำไปประยุกต์ใช้ทางยา ในการรักษาโรคในผู้ป่วยสูงวัย เช่น โรคกระดูกพรุน (Urasopon et al., 2007; 2008a) โรคมะเร็ง (Cherdshewasart et al., 2009) และโรคความจำเสื่อม (Chindewa et al., 2008) เป็นต้น รวมทั้งการนำไปศึกษาวิจัยในสัตว์เศรษฐกิจหลากหลายชนิดเช่น ปลาดุก (ปุญมณี กาญจนวรกุลและคณะ, 2549) ไก่ (สมโภชน์ ทับเจริญและคณะ, 2550) และสุกร (สมโภชน์ ทับเจริญ, 2551) ทั้งเพื่อประโยชน์ในการเร่งอัตราการเติบโตและเพิ่มอัตราการแลกเนื้อของสัตว์ (รุ่งกานต์ กล้าหาญ และคณะ, 2546 และ สมโภชน์ ทับเจริญ และคณะ, 2546)

ด้วยเหตุนี้กวาวเครือขาวจึงได้รับความสนใจในการนำมาศึกษาวิจัยเพื่อหาขนาดและวิธีใช้ ที่เหมาะสมในทางห้องปฏิบัติการหรือนำไปใช้บริโภคในคนหนุ่มสาว หรือผู้สูงวัย แต่อย่างไรก็ตามกวาวเครือขาวที่ขายอยู่ทั่วไปตามท้องตลาดนั้นมักไม่อยู่ในรูปของหัวสดที่มีใบและดอกที่สามารถนำมาใช้ประกอบการจำแนกชนิดได้ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธาน โดยส่วนมากกวาวเครือขาวที่ได้มามักอยู่ในรูปของหัวกวาวเครือขาวสด ที่ไม่มีใบและดอกประกอบ หรือแผ่นกวาวเครือขาวตากแห้ง หรือ ผงบดละเอียดของกวาวเครือขาว ที่บรรจุอยู่ในถุงพลาสติกหรือแคปซูล อีกทั้งยังมีพืชสมุนไพรหลายชนิดที่พบในประเทศไทยที่มีรากเป็นหัวและมีลักษณะคล้ายกับกวาวเครือขาว ซึ่งถ้าหากไม่ใช่ผู้เชี่ยวชาญทางด้านพฤกษศาสตร์อาจจะทำให้เกิดความสับสนในการจัดจำแนก และทำให้นำไปใช้ผิดประเภทได้

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ จึงดำเนินการเพื่อหาวิธีการในการจำแนกชนิดของกวาวเครือขาวในรูปแบบต่างๆที่ได้รับมาและมีขายทั่วไปตามท้องตลาด โดยในการศึกษาครั้งนี้จะทำการเปรียบเทียบลักษณะของตัวอย่างกวาวเครือขาวในรูปแบบหัวกวาวเครือขาวสด แผ่นกวาวเครือขาวอบแห้ง และผงกวาวเครือขาวบดละเอียด การทดสอบฤทธิ์ทางเอสโตรเจนของสารไฟโตเอสโตรเจนซึ่งเป็นสารสำคัญในกวาวเครือขาวด้วยวิธี Vaginal cytology assay (Malaivijitnond et al., 2006; Cherdshewasart et al., 2007b) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจสอบฤทธิ์ทางเอสโตรเจนในสารประกอบต่าง ๆ โดยมุ่งหวังว่างานวิจัยชิ้นนี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่ช่วยให้ผู้ใช้โดยทั่วไป หรือนักวิจัยต่าง ๆ ที่ไม่จำเป็นต้องมีพื้นฐานด้านความรู้ทาง

พฤกษศาสตร์ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกกวาวเครือขาวมาใช้ได้อย่างถูกต้องและไ
สูงสุดตามที่มุ่งหวัง

วัสดุและวิธีการทดลอง

ในการทดลองครั้งนี้จะใช้ตัวอย่างพืชซึ่งได้รับคำยืนยันจากคนในแต่ละพื้นที่ว่าเป็นกว
ประกอบด้วย ส่วนหัว ใบ และกิ่ง ที่ได้รับมาจากศูนย์ศึกษาและพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเ
พระราชดำริ อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ (SMP-1) และจากอำเภอสิรินธร จังหวัดอุ
(SMP-2) ผงกวาวเครือขาวบดละเอียด (SMP-3) ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากอาจารย์ สมโภช
ศูนย์วิจัยและฝึกอบรมการเลี้ยงสุกรแห่งชาติสถาบันสุวรรณวาจกกสิกิจเพื่อการค้นคว้าและพัฒ
และผลิตภัณฑ์สัตว์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม และผงกว
สายพันธุ์วิชัย-3 (Wichai-3) ซึ่ งได้รับความอนุเคราะห์จากรองศาสตราจารย์ ดร.วิชัย เชิดชีวศาส
ชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งเป็นสายพันธุ์มาตรฐานที่ใช้ในห้องปฏิ
หน่วยวิจัยไพรเมท ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในการศึกษาครั้งนี้จะทำการเปรียบเทียบลักษณะโดยแบ่งออกเป็น 3 ระดับ ดังนี้ การ
ของพืชด้วยหลักอนุกรมวิธาน การจำแนกลักษณะผงของกวาวเครือขาวภายใต้กล้องจุลทร
การศึกษาฤทธิ์ของสารไฟโตเอสโตรเจนในตัวอย่างพืช

ระดับที่ 1 การจำแนกชนิดของตัวอย่างพืชด้วยหลักอนุกรมวิธาน

โดยอาศัยการเปรียบเทียบลักษณะทางสันฐานของตัวอย่างได้แก่ ใบ กิ่งและหัว ของต
ได้รับมากับลักษณะของตัวอย่างกวาวเครือ *P. mirifica* หมายเลข BCU007952 และ BCU(
พิพิธภัณฑ์พืช ศาสตราจารย์กสิน สุวะตะพันธุ์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ ค
มหาวิทยาลัย โดยในการศึกษาในระดับนี้จะทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างใบ
ลักษณะเนื้อด้านในของตัวอย่างพืชที่ได้รับการยืนยันว่าเป็นกวาวเครือขาวที่ได้รับมาจาก จังห
(SMP-1) และอุบลราชธานี (SMP-2) ตามลำดับ

ระดับที่ 2 การจำแนกลักษณะผงบดละเอียดของกวาวเครือขาวภายใต้กล้องจุลทรรศน์

หลังจากทำการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานแล้ว ส่วนหัวของ SMP-1 และ S
นำมาแปรรูปเป็นผงบดละเอียด โดยการนำส่วนหัวมาปลอกเปลือกออก หั่นเป็นแผ่นบาง แล้วน
ตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาสเซลเซียสเป็นเวลานาน 36 ชั่วโมง นำแผ่นที่อบแห้งแล้วมาบ
บด และกรองผงบดละเอียดที่ได้ให้มีขนาด 149 ไมครอน (100 mesh) จากนั้นนำตัวอย่างผงบดล
ชนิดไปผสมน้ำกลั่นในอัตราส่วนผงบดละเอียด 1 กรัมต่อน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร และนำสารแขวน
ศึกษาลักษณะและส่วนประกอบเปรียบเทียบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงเชิงประกอ
Optical Co., Ltd., Japan) ด้วยกำลังขยาย 200 และ 400 เท่า และทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์ก

แป้งถ้าหากเม็ดแป้งมีรูปร่างกลม หรือวัดส่วนที่กว้างที่สุดถ้าหากเม็ดแป้งมีรูปร่างชนิดอื่นด้วย Ocular micrometer จำนวน 30 เม็ดแป้งต่อหนึ่งตัวอย่าง และนับจำนวนของเม็ดแป้งในกรอบขนาด 0.16 ตารางมิลลิเมตรต่อสไลด์หนึ่งแผ่น โดยทำการสุ่มนับทั้งหมด 10 กรอบต่อหนึ่งตัวอย่าง โดยแต่ละตัวอย่างที่ศึกษาจะทำซ้ำจำนวน 3 ครั้งต่อตัวอย่าง โดยการศึกษาในระดับนี้จะทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่าง SMP-1 และ SMP-2 กับตัวอย่างกวาวเครือขาว SMP-3 และWichai-3

ระดับ 3 การทดสอบฤทธิ์ของทางเอสโตรเจนในตัวอย่างพืช

ศึกษาฤทธิ์ทางเอสโตรเจนของไฟโตเอสโตรเจนในตัวอย่างพืชโดยใช้วิธี Vaginal cytology assay (Malaivijitnond et al., 2006; 2010; Cherdshewasart et al., 2007b) ซึ่งเป็นวิธีที่อาศัยหลักการที่ว่าฮอร์โมนเอสโตรเจนสามารถกระตุ้นให้เกิดการเจริญและการแบ่งเซลล์ (proliferation) ของเซลล์เยื่อบุผนังช่องคลอดได้ และเซลล์ที่ได้เมื่อนำมาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะมีลักษณะแบนบาง ไม่มีนิวเคลียสที่เรียกว่า Cornified cell ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้การออกฤทธิ์ของฮอร์โมนเอสโตรเจนหรือสารที่ออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน เช่น สารไฟโตเอสโตรเจนได้

ทำการทดลองในหนูแรท เพศเมีย สายพันธุ์วิสตาร์ (Wistar) อายุ 8 สัปดาห์ที่มีวงสืบพันธุ์ปกติ 4 ถึง 5 วันต่อรอบวงสืบพันธุ์ จำนวน 25 ตัว โดยสั่งซื้อหนูมาจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล และนำมาเลี้ยงไว้ที่เรือนเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่มีการควบคุมสภาพแวดล้อมให้อุณหภูมิเท่ากับ 25±1 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่าง 12 ชั่วโมง (06.00-18.00) และมืด 12 ชั่วโมง (18.00-06.00) โดยเลี้ยงหนูไว้ในกรงสเตนเลสที่ปูด้วยขี้เลื่อยอบฆ่าเชื้อที่อุณภูมิ 80 องศาเซลเซียสอย่างน้อย 3 ชั่วโมง จำนวน 5 ตัวต่อกรง ในระหว่างการทดลองหนูจะได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปที่ไม่มีถั่วเหลืองเป็นส่วนประกอบ (soybean-free diet; CP.082/SBF, S.W.T., Co., Ltd, สมุทรปราการ, ประเทศไทย) (Urasopon et al., 2008b) และน้ำตลอดเวลา เลี้ยงหนูไว้ในเรือนเลี้ยงนาน 1 สัปดาห์ก่อนการทดลอง เพื่อให้ปรับตัว

นำหนูแรทมาตัดรังไข่ออกทั้ง 2 ข้าง และแบ่งหนูออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว คือ กลุ่มควบคุม (DW) และกลุ่มที่ ให้สารกวาวเครือขาว ที่แบ่งออกเป็น 4 กลุ่มย่อย คือ กลุ่ม SMP-1, SMP-2, SMP-3 และ Wichai-3 ตามลำดับ

ในการทดลองแบ่งออกเป็น 3 ระยะๆ ละ 14 วันได้แก่ ระยะก่อนให้สาร ระยะให้สาร และระยะหลังให้สาร ในระยะก่อนให้สารและระยะหลังให้สาร หนูไม่ได้รับสารใด ๆ ในขณะที่ระยะให้สารหนูได้รับผงบดละเอียดของกวาวเครือขาวที่ผสมน้ำกลั่นในขนาด 100 มก./กก. น้ำหนักตัว ในน้ำกลั่น 0.7 มล./วัน (กลุ่ม SMP-1, SMP-2, SMP-3 และWichai-3) หรือน้ำกลั่นปริมาตร 0.7 มล./วัน (กลุ่ม DW) โดยให้สารทางปากในเวลา 08.00-09.00 ทุกวัน ติดตามผลการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบุช่องคลอดด้วยการทำ Vaginal smear ในเวลา 08.00-09.00 น.ทุกวัน จนสิ้นสุดการทดลอง ในการตรวจเซลล์เยื่อบุช่องคลอดจะทำภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงเชิงประกอบ (Olympus Optical Co., Ltd., Japan) โดยจะจำแนกเซลล์เป็น 3 ชนิด คือ

Leukocyte (L), Nucleated cell (O) และ Cornified cell (Co) นับจำนวนเซลล์ที่พบ จากนั้นทำก
ร้อยละของเซลล์ Co ที่พบจากสูตร $\%Co = \frac{Co}{(L+O+Co)} \times 100$

ในการศึกษาครั้งนี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติโครงการจากคณะกรรมการการควบคุมดูแ
และการใช้สัตว์ทดลองเพื่องานทางวิทยาศาสตร์ ของคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Review Number 0823013)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

แสดงผลการทดลองในรูปของค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และวิเคราะห์ความแต
สถิติของค่าเฉลี่ยที่ได้รับระหว่างกลุ่มการทดลองต่างๆโดยใช้ One-way ANOVA และทำ post-ho
LSD test โดยกำหนดให้มีการยอมรับค่าความแตกต่างทางสถิติที่ $p<0.05$ เป็นต้นไป โดยใช้โปรแ
เวอร์ชั่น 17.0

ผลการทดลอง

ระดับที่ 1 การจำแนกชนิดของตัวอย่างพืชด้วยหลักอนุกรมวิธาน

จากการเปรียบเทียบลักษณะใบ กิ่ง และ หัวของ SMP-1 และ SMP-2 กับตัวอย่างกวาวเ
mirifica หมายเลข BCU007952 และ BCU010250 (ภาพที่ 1) พบว่า SMP-1 มีลักษณะของใบและ
ลักษณะของ BCU007952 และ BCU010250 ที่เป็นพืชเถาว์ไม้เลื้อยผลัดใบ ใบเป็นใบประกอบ มี
ก้านใบมีขนสั้น ๆ ใบย่อยใบกลางรูปไข่ กว้างประมาณ 9-15 ซม. ยาวประมาณ 15-30 ซม. ใบย่อยคู่
ใกล้เคียงกับใบกลาง ปลายใบมนหรือเรียวแหลม โคนใบสอบหรือมน ด้านบนใบเกลี้ยง ด้านล่า
ประปราย (ภาพที่ 1 ก และ ข) หัวใต้ดินมีลักษณะค่อนข้างกลม เนื้อด้านในสีขาว (ภาพที่ 1 ค แ
SMP-2 ไม่ตรงกับตัวอย่างใด ดังนั้นจึงได้ทำการเปรียบเทียบกับตัวอย่างพืชอื่นๆที่เก็บอยู่ในพิพิ
ศาสตราจารย์ กสิน สุวะตะพันธุ์ พบว่าเป็นสมุนไพรที่มีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Stephania*
ภาษาไทยว่าสบู่เลือด หรือว่านสบู่เลือด โดยลักษณะที่ใช้ประกอบการจำแนกชนิดจากใบและหัว ค
ออกแบบสลับ ใบรูปไข่ ขอบใบเว้าคล้ายรูปสามเหลี่ยม ใบกว้างประมาณ 7-12 ซม. ยาว 6-11 ซม.
ตัดหรือเว้า ปลายใบตัดหรือมีติ่ง หน้าใบมีขนและมัน เส้นใบชัด ก้านใบยาวประมาณ 5-15 ซม
ขนาดใหญ่ กลม เปลือกหัวสีน้ำตาล เปลือกขรุขระหรือเรียบ เนื้อในสีขาวดังแสดงในภาพที่ 1 (ง แ

เนื่องจากหัวกวาวเครือขาว (SMP-1) และสบู่เลือด (SMP-2) มีสีขาวคล้ายกันจึงวิเคราะห์ล
ด้านในหัวโดยละเอียดยิ่งขึ้น พบว่า SMP-2 มีเนื้อสีขาวที่มีเส้นใยและมีรอยเส้นรอบวงสีน้ำตาล
ส่วน SMP-1 นั้นมีเนื้อสีขาวและเส้นใยมากแต่ไม่ปรากฏเส้นรอบวงดังแสดงในภาพที่ 1 (จ และ ฉ

ระดับที่ 2 การจำแนกลักษณะผงบดละเอียดของกวาวเครือขาวภายใต้กล้องจุลทรรศน์

จากการจำแนกลักษณะทางสัณฐานทำให้ทราบว่าตัวอย่าง SMP-2 คือสบู่เลือดไม่ใช่กวาวเครือขาว แต่ดังที่ได้กล่าวไว้ข้างต้นว่า ในบางครั้งตัวอย่างพืชสมุนไพรที่ได้รับมา อาจจะไม่ได้มีลักษณะเป็นหัว หรือเป็นหัว แต่ไม่มีใบเป็นส่วนประกอบ ทำให้การวิเคราะห์ในระดับที่ 1 ไม่สามารถทำได้และโดยส่วนใหญ่กวาวเครือขาวที่มีขายกันอยู่ทั่วไปในท้องตลาดหรือในร้านขายยาแพทย์แผนโบราณมักจะอยู่ในรูปของผงบดละเอียด ดังนั้นการศึกษาในระดับนี้จึงเป็นการเปรียบเทียบลักษณะของผงบดละเอียดของกวาวเครือขาว 3 สายพันธุ์คือ SMP-1 SMP-3 และ Wichai-3 กับสบู่เลือด (SMP-2) จากการศึกษาผงบดละเอียขนาด 149 ไมครอน (100 mesh) ของตัวอย่างทั้ง 4 ชนิด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 400 เท่า พบว่า SMP-1 SMP-3 และ Wichai-3 มีลักษณะคล้ายคลึงกันคือในผงบดละเอียดนั้นประกอบด้วยส่วนที่เป็นเส้นใยที่ถูกตัดออกเป็นท่อนสั้นๆ จากกระบวนการบด และส่วนที่เป็นเม็ดแป้งรูปร่างค่อนข้างกลมสีเหลืองอ่อน (ภาพที่ 2 ก ข และ ค) ขนาดเล็ก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยตั้งแต่ 3.63 ± 0.28 ไมครอน ถึง 4.27 ± 0.30 ไมครอน (ดังตารางที่ 1) ซึ่งเล็กกว่าผงบดละเอียดของ SMP-2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.13 ± 0.60 ไมครอน (ตารางที่ 1) ที่มีรูปร่างค่อนข้างกลมเช่นเดียวกับของกวาวเครือขาว แต่มีสีเขียวอมเหลือง (ภาพที่ 2 ง) ได้ทำการทดลองยืนยันส่วนของเม็ดแป้งโดยการนำไปย้อมด้วยสารละลายไอโอดีนอิ่มตัวได้เม็ดแป้งติดสีน้ำเงินเข้ม นอกจากนั้นตัวอย่างผงบดละเอียดของสบู่เลือด SMP-2 ยังพบส่วนของเส้นใยน้อยมากเมื่อเทียบกับตัวอย่างผงบดละเอียดของกวาวเครือทั้ง 3 กลุ่ม จากการสุ่มนับจำนวนเม็ดแป้ง พบว่าจำนวนเม็ดแป้งที่พบในหนึ่งกรอบการนับตัวอย่างจะแปรผกผันกับขนาดของเม็ดแป้ง นั่นคือเม็ดแป้งที่มีขนาดใหญ่ (เช่น SMP-2) จะมีจำนวนน้อยในหนึ่งกรอบที่นับ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อทำการทดสอบทางสถิติ พบวความแตกต่าง ($p<0.05$) ระหว่าง SMP-2 กับ SMP-1 และ SMP-3 เท่านั้นในขณะที่สายพันธุ์ Wichai-3 มีจำนวนเม็ดแป้งน้อยกว่า SMP-2 แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.301$) ดังแสดงผลในตารางที่ 2 และภาพที่ 2

ระดับ 3 การทดสอบฤทธิ์ทางเอสโตรเจนในตัวอย่างพืช

ภายหลังจากตัดรังไข่หนูแรทเพศเมียออกทั้ง 2 ข้าง และตรวจดูเซลล์เยื่อบุช่องคลอดโดยวิธี Vaginal cytology assay (Malaivijitnond et al., 2010) พบว่าเซลล์เยื่อบุช่องคลอดชนิด Cornified cell (Co) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้การออกฤทธิ์ของฮอร์โมนเอสโตรเจนและสารที่ออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน ลดจำนวนลงอย่างรวดเร็วในช่วง 14 วันแรกของระยะก่อนให้สาร (ภาพที่ 3) โดยมีค่าร้อยละของเซลล์ชนิด Co อยู่ระหว่างร้อยละ 4.27-30 เซลล์เยื่อบุช่องคลอดที่พบส่วนใหญ่ในระยะนี้เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาว (Leukocyte; L) และหลังจากการให้สารแขวนลอยของผงบดละเอียดของกวาวเครือขาวและสบู่เลือดในน้ำกลั่นทางปากไปเพียงสามวัน พบว่าเซลล์เยื่อบุช่องคลอดของหนูทุกกลุ่มที่ได้รับกวาวเครือขาว (Wichai-3 SMP-1 และ SMP-3) มีจำนวนเซลล์ชนิด Co เพิ่มขึ้นและค่าร้อยละของเซลล์ชนิด Co มีค่าเพิ่มสูงขึ้น เป็น 50.00±22.80, 53.60±7.40 และ 50.60±40.47 ตามลำดับ ต่างจากกลุ่ม SMP-2 ที่ได้รับสารแขวนลอยของผงบดละเอียดของสบู่เลือด และกลุ่มที่ได้รับน้ำกลั่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และนอกจากนี้ยังพบว่าค่าร้อยละของเซลล์ชนิด Co ของ

หนูกลุ่มที่ได้รับสบู่เลือด (SMP-2) และน้ำกลั่น (DW) ไม่มีการปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำ
($p>0.05$) ตลอดการทดลองทั้ง 3 ระยะ ค่าร้อยละของเซลล์ชนิด Co มีค่าแกว่งไกวอยู่ในช่วงร้อ
ในหนูทั้งสองกลุ่ม ในขณะที่ค่าร้อยละของเซลล์ชนิด Co ของกลุ่มที่ได้รับกวาวเครือขาว SMP-
และ SMP-1 มีค่าสูงสุดในวันที่ 4, 8 และ 13 ของการให้สารตามลำดับ และเมื่อหยุดให้สารพบ
ของเซลล์ชนิด Co ลดลงและไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) จากระยะก่อ
วันที่ 4, 3 และ 2 ของการหยุดให้สารตามลำดับ

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนกกวาวเครือขาวออกจาก
อื่นๆ ที่ไม่ต้องการเครื่องมือใดๆ ประกอบการจำแนกเลย คือ การสังเกตุลักษณะของหัว ใบ แล
เปล่า โดยต้องดูลักษณะทั้ง 3 อย่างประกอบกัน แต่ในบางครั้งที่ได้รับพืชสมุนไพรมาอาจจะมีเฉ
เท่านั้น ก็สามารถผ่าส่วนหัวและสังเกตลักษณะเนื้อด้านในหัว เช่น สี ลักษณะเส้นใยและเส้นรอ
แต่อย่างไรก็ตามเพื่อให้เกิดความมั่นใจยิ่งขึ้นในการนำไปใช้เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดตามวัต
มุ่งหวัง และถ้ามีเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ คือ กล้องจุลทรรศน์ประกอบการศึกษา ควรที่จะทำ
ในระดับผงบดละเอียดต่อไป โดยนำผงบดละเอียดมากรองให้ได้เฉพาะขนาด 149 ไมครอน หรื
จะทำให้สามารถใช้สีและขนาดของเม็ดแป้งช่วยในการจำแนกชนิดได้ โดยเม็ดแป้งของกวาวเคร
เหลืองอ่อนเมื่อดูใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของเม็ดแป้งมีค่า 3
ไมครอน แต่มีบางครั้งที่ได้รับกวาวเครือขาวมาในรูปยาบรรจุในแคปซูล ซึ่งไม่สามารถจำ
ลักษณะผงเพียงอย่างเดียว และผงบรรจุในแคปซูลนั้นมีกวาวเครือขาวบรรจุปนอยู่กับพืชสมุนไพ
แม้แต่ในบางครั้งยาที่มีบรรจุในแคปซูลนั้นเป็นกวาวเครือขาวจริง แต่เนื่องจากกวาวเครือขาวที่เก็
แหล่ง (Cherdshewasart et al., 2007a; 2007b) หรือคนละฤดูกาล (Cherdshewasart and Sriwatcha
หรือแม้แต่ต้นเดียวกันแต่คนละหัว (Urasopon et al., 2008b) ก็มีฤทธิ์ทางเอสโตรเจนต่างกัน ด
กวาวเครือขาวไปใช้ต่อไปโดยเฉพาะอย่างยิ่งในการศึกษาวิจัยในสัตว์ทดลองและคน ที่มุ่งหวังที่
ทดลองที่ได้ไปตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติหรือนำไปใช้ทางยา จึงควรจะมีการพ
ทางเอสโตรเจนเสียก่อน

ดังเช่นในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดลองโดยใช้วิธี Vaginal cytology assay ซึ่งเป็นวิ
ถูก มีความไวสูง ไม่ต้องฆ่าสัตว์ทดลอง และเป็นที่นิยมกันมากในปัจจุบัน (Malaivijitnond et
2010; Cherdshewasart et al., 2007b; 2008; Urasopon et al., 2008b) จากผลการทดลองจะเห็นได้
ว่าสบู่เลือดไม่ทำให้ค่าร้อยละของเซลล์ Co เพิ่มสูงขึ้นหรือไม่มีผลทางฮอร์โมนเอสโตรเจนนั่นเอ
เช่นเดียวกันกับการให้น้ำกลั่น (DW) แก่หนูทดลอง ทั้งนี้จากรายงานการทดลองที่มีมาก่อน
สบู่เลือดมีสารที่ออกฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อมาเลเรีย (Likhitwitayawuid et al., 1999) และรักษาโร

(Ingkaninan et al., 2003) ซึ่งไม่เกี่ยวกับฤทธิ์ทางเอสโตรเจน และการทดลองครั้งนี้เป็นครั้งแรกที่รายงาน ผลทางฮอร์โมนเอสโตรเจนของสบู่เลือด

เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ทางเอสโตรเจนของกวาวเครือขาวที่ทำการทดลองในครั้งนี้ทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ Wichai-3และSMP-3 ที่มีการศึกษาวิจัยกันมาแล้วอย่างกว้างขวางและ สายพันธุ์ SMP-1 ที่มีการค้นพบใหม่และยังไม่มีการรายงานมาก่อน พบว่ากวาวเครือขาวสายพันธุ์ SMP-3 ออกฤทธิ์ได้เร็วที่สุด และแรงที่สุด ในขณะที่กวาวเครือขาวสายพันธุ์ Wichai-3 และ SMP-1 ออกฤทธิ์ได้ใกล้เคียงกัน เพียงแต่กวาวเครือขาวสายพันธุ์ SMP-1 จะคงฤทธิ์ไว้ได้นานที่สุดถึง 3 วัน หลังจากการหยุดให้สาร หรือนาน 3 ใน 4 เท่าของความยาวรอบประจำเดือนของหนูแรทเพศเมีย ซึ่งถ้าหากเปรียบเทียบกับผู้หญิงวัยเจริญพันธุ์จะกินระยะเวลานาน 21 วัน (เมื่อกำหนดให้รอบประจำเดือนปกติในผู้หญิงวัยเจริญพันธุ์กินระยะเวลานาน 28 วัน; Johnson, 2010)

ดังนั้นจะเห็นได้ว่ากวาวเครือขาวที่เก็บมาจากคนละแหล่งกันหรือคนละสายพันธุ์กัน มีฤทธิ์ทางเอสโตรเจนต่างกัน ดังนั้นก่อนที่จะนำกวาวเครือขาวไปใช้ในการศึกษาวิจัยใดๆ หรือนำไปใช้ทางยา จึงควรที่จะมีการตรวจสอบคุณภาพ (Quality control) ก่อนนำไปใช้ทุกครั้ง ซึ่งจากผลการศึกษาในครั้งนี้จะเห็นได้ว่าในการจำแนกกวาวเครือเพื่อให้ได้ผลที่แน่นอนและแม่นยำ จะมีการตรวจสอบเป็นลำดับขั้น ตั้งแต่อย่างง่ายจนถึงระดับที่ต้องใช้เครื่องทางวิทยาศาสตร์และใช้ผู้ที่มีความรู้ความชำนาญทางสรีรวิทยาการสืบพันธุ์ประกอบด้วย แต่อย่างไรก็ตามนักวิจัยคาดหวังว่าผลการทดลองที่ได้จากงานวิจัยชิ้นนี้จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในทางปฏิบัติได้อย่างกว้างขวางและเป็นประโยชน์ต่อผู้สนใจโดยทั่วไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณหน่วยวิจัยไพรเมท ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดเชียงใหม่ และทุนสนับสนุนการวิจัยจากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 แสดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดแป้งในตัวอย่างผงกวาวเครือขาวสายพันธุ์ต่างๆ (
SMP-1 และ SMP-3) และสบู่เลือด (SMP-2)

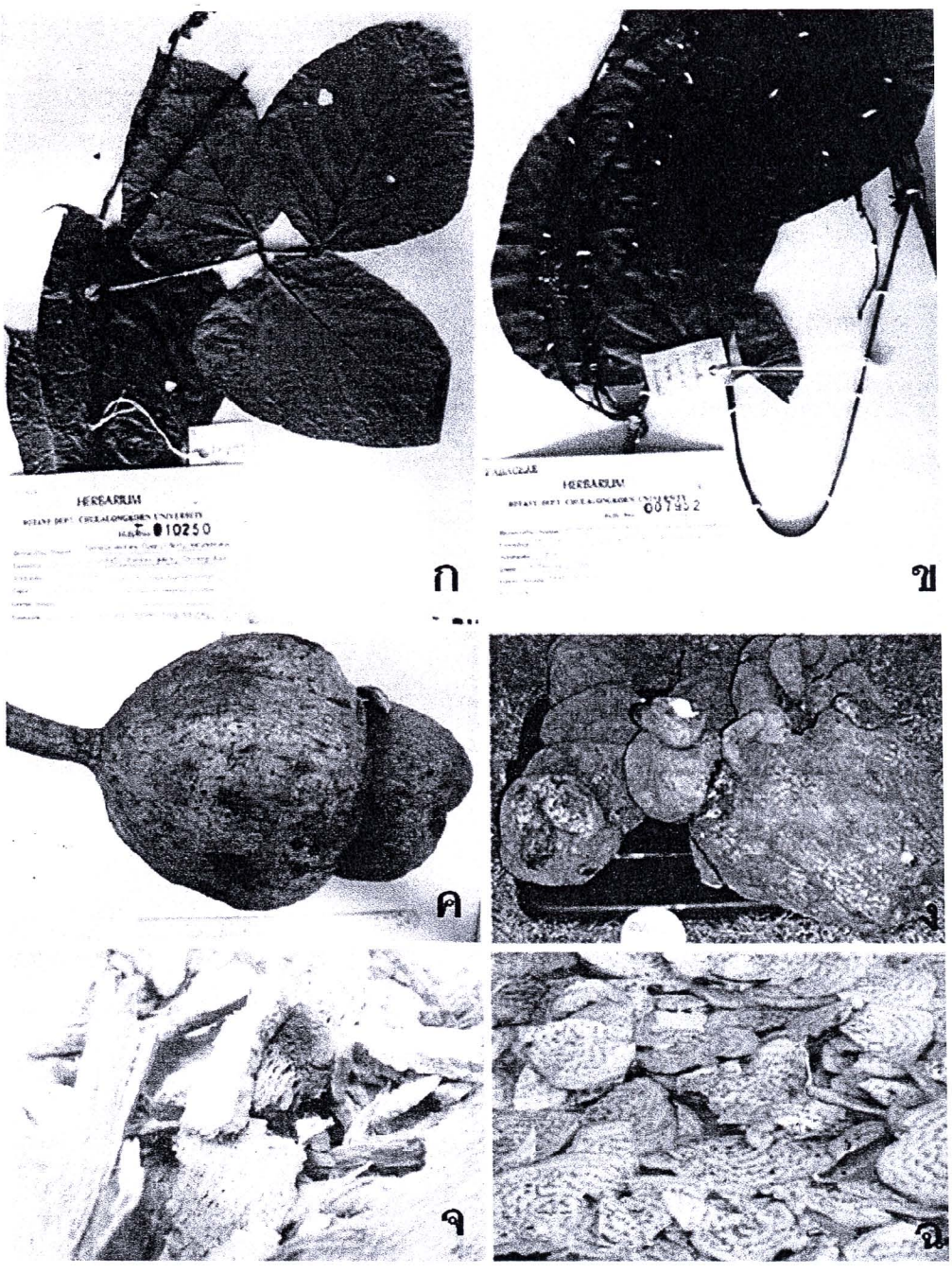
ตัวอย่างพืช	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดแป้ง (ไมครอน)
Wichai-3	3.63 ± 0.28**
SMP-1	4.27 ± 0.30**
SMP-3	3.73 ± 0.31**
SMP-2	6.13 ± 0.60

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SMP-2

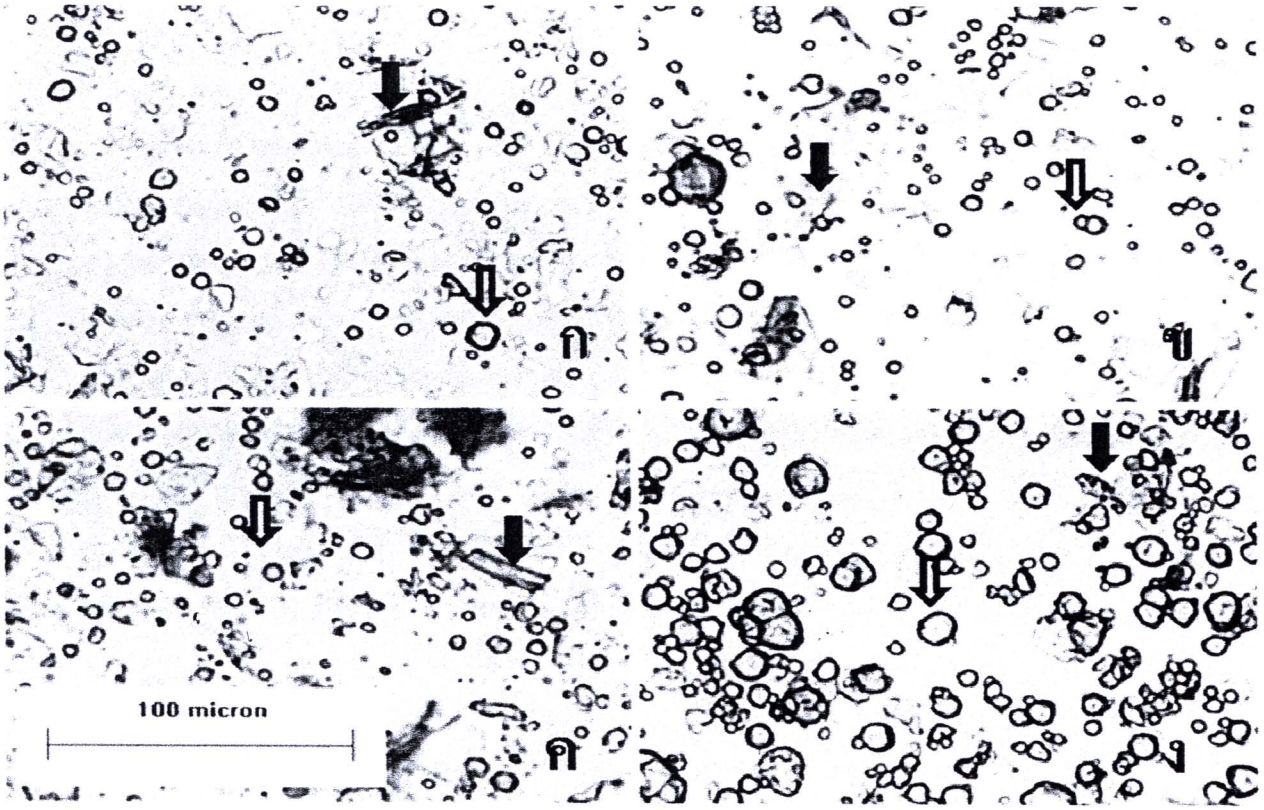
ตารางที่ 2 แสดงจำนวนของเม็ดแป้งในตัวอย่างผงกวาวเครือขาวสายพันธุ์ต่างๆ (Wichai-3, SMP-1 และ SMP-3) และสบู่เลือด (SMP-2)

ตัวอย่างพืช	จำนวนเม็ดแป้งในครอบพื้นที่ขนาด 0.16 มม.^{2}
Wichai-3	36.60 ± 0.88
SMP-1	38.70 ± 1.01*
SMP-3	40.70 ± 0.63*
SMP-2	35.20 ± 1.16

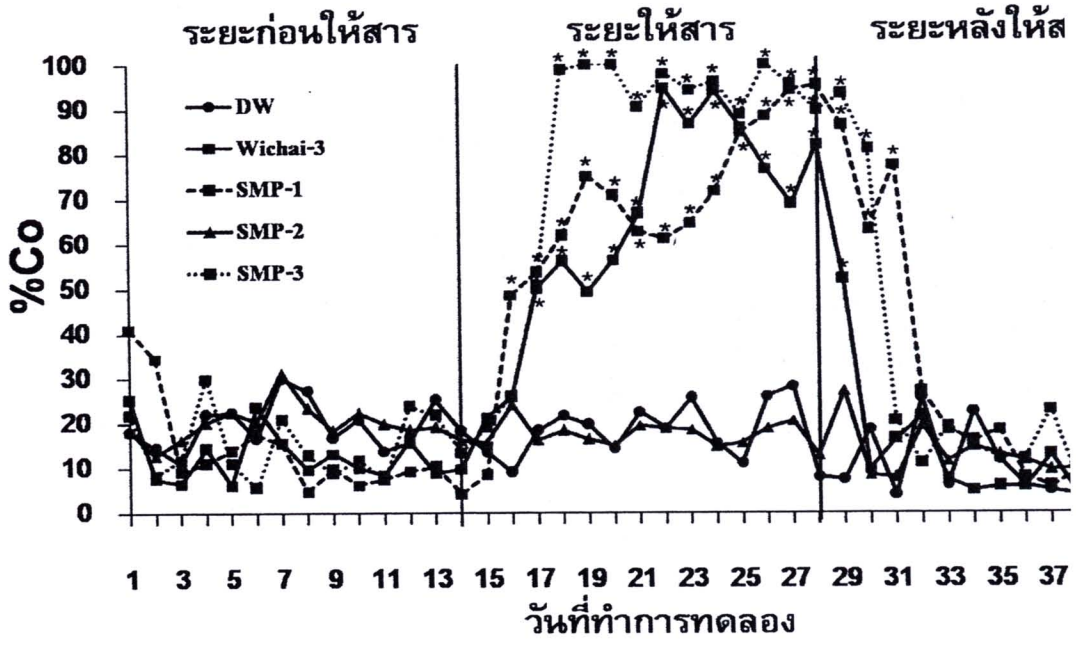
* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SMP-2



ภาพที่ 1 ก และ ข แสดงภาพตัวอย่างของใบและกิ่งของกวาวเครือขาว หมายเลข BCU00
BCU010250 จากพิพิธภัณฑ์พืช ศาสตราจารย์กสิน สุวะตะพันธุ์ ภาควิชาพฤกษศ
วิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ค และ จ แสดงภาพหัวและเนื้อในหัวของตัวอย่างพืชที่ได้จากจังหวัดเชียงใหม่ (SMP
การตรวจสอบใบ กิ่ง หัว และเนื้อในหัว พบว่าเป็นกวาวเครือขาว
ง และ ฉ แสดงภาพหัวและเนื้อในหัวของตัวอย่างพืชที่ได้จากจังหวัดอุบลราชธานี (S
จากการตรวจสอบใบ กิ่ง หัว และเนื้อในหัว พบว่าเป็นสบู่เลือด



ภาพที่ 2 แสดงภาพผงบดละเอียดของกวาวเครือขาว Wichai-3 (ก) SMP-1 (ข) SMP-3 (ค) และผงบดละเอียดของสบู่เลือด SMP-2 (ง) โดยปลายลูกศรชี้เม็ดแป้ง (⇓) และเส้นใย (↓) ที่ถูกบดเป็นท่อนสั้นๆ



ภาพที่ 3 แสดงร้อยละของ Cornified cell (%Co) ในหนูแรทเพศเมียที่ตัดรังไข่ และให้สารแท
กวาวเครือขาว (Wichai-3, SMP-1 และ SMP-3) สบู่เลือด (SMP-2) และน้ำกลั่น (DW)
วัน นาน 14 วัน
* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับระยะก่อนให้สาร

เอกสารอ้างอิง

ปุญมณี กาญจนวรกุล, ประทักษ์ ตาบทิพย์วรรณ, อรพินท์ จินตสถาพร, ส่งศรี มหาสวัสดิ์ (2549) ผลของกวาวเครือขาวต่อการเจริญเติบโตและการใช้ประโยชน์อาหารในปลาดุกลูกผสม การประชุมทางวิชาการครั้งที่ 44 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (สาขาประมง), มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร, 535-544

รุ่งกานต์ กล้าหาญ, อรพินท์ จินตสถาพร, ประทักษ์ ตาบทิพย์วรรณ, ส่งศรี มหาสวัสดิ์, ศรีน้อย ชุ่มคำ (2546) ประสิทธิภาพของกวาวเครือขาวต่อการเจริญเติบโตและระบบสืบพันธุ์ในปลานิล การประชุมวิชาการครั้งที่ 41 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร, 111-118

สมโภชน์ ทับเจริญ, วาณี ชันวัฒนสิน, เกรียงศักดิ์ สอาดรักษ์, หนูจันทร์ มาตา (2546) ระดับที่เหมาะสมของการใช้กวาวเครือขาวในสูตรอาหารกระต่ายระยะรุ่น-ขุน, การประชุมวิชาการครั้งที่ 41 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาสัตว์และสาขาสัตวแพทยศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร, 284-290

สมโภชน์ ทับเจริญ (2551) การใช้กวาวเครือขาวช่วยในการคัดเลือกสุกรสาวทดแทน วารสารปศุสัตว์เกษตรศาสตร์, 35 (138) 18-24

สมโภชน์ ทับเจริญ, เกรียงศักดิ์ สอาดรักษ์, อรทัย ไตรวุฒานนท์, สุชาติ สงวนพันธุ์, อรประพันธ์ ส่งเสริม, อรรถวุฒิ พลายบุญ, มณฑาทิพย์ ยุ่นฉลาด, ประนอม เดชวิสิฐสกุล, ธีรวุท ปิ่นทอง, วุฒิชัย นุตกุล, ดาราวรรณ ปิ่นทอง **(2550)** ผลการใช้กวาวเครือขาวในไก่ลูกผสมพื้นเมืองและไก่กระทง วารสารสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วิทยาศาสตร์), 39 (1) 39-64

Chansakaow, S., Ishikawa, T., Seki, H., Sekine, K., Okada, M., Chaichantipyuth, C. (2000). Identification of deoxymiroestrol as the actual rejuvenating principle of "Kwao Keur", *Pueraria mirifica*. The known miroestrol may be an artifact. J Nat Prod, 63 (2) 173-175

Cherdshewasart, W., Kitsamai, Y., Malaivijitnond, S. (2007a). Evaluation of the estrogenic activity of the wild *Pueraria mirifica* by vaginal cornification assay. J Reprod Dev, 53 (2) 385-393

Cherdshewasart, W., Sriwatcharakul, S., Malaivijitnond, S. (2008). Variance of estrogenic activity of the phytoestrogen-rich plant. Maturitas, 61 (4) 350-357

Cherdshewasart, W., Subtang, S., Dahlan, W. (2007b). Major isoflavonoid contents of the phytoestrogen rich- herb *Pueraria mirifica* in comparison with *Pueraria lobata*. J Pharm Biomed Anal, 43 (2) 428-434

Cherdshewasart, W., Sutjit, W., Pulcharoen, K., Chulasiri, M. (2009). The mutagenic and antimutageniceffects of the trad itional phytoestrogen-rich herbs, *Pueraria mirifica* and *P lobata*. Braz J Med Bioi Res, 42 (9) 816-823

Chindewa, R., Lapanantasin, S., Sanvarinda, Y., Chongthammakun, S. (2008). *Pueraria mirifica* phytoestrogen-induced change in synaptophys in expression via estrogen receptor in rat hippocampal neuron. J Med Assoc Thai, 91 (2) 208-14

Ingkaninan, K., Temkitthawon, P., Chuenchom, K., Yuyaem, T., Thongnoi, W. (2003). Screenin acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. J Ethnopharmacol, 89 (2-3) 261-264

Jaroenporn, S., Malaivijitnond, S., Wattanasirmkit, K., Trisomboon, H., Watanabe, G., Taya, K. Cherdshewasart, W. (2006). Effects of *Pueraria mirifica*, an herb containing phytoestroge reproductive organs and fertility of adult male mice. Endocrine, 30 (1) 93-101

Jonhson, MH. (2010) Essential reproduction. 6th edition. Blackwell Publishing, Oxford, UK, 95

Likhitwitayawuid, K., Dej –adisai, S., Jongbunprasert, V., Krungkrai, J. (1999). Antimalarials fr *Stephania venosa*, *Prismatomeris sessiliflora*, *Diospyros montana* and *Murraya siamensi* Med, 65 (8) 754-756

Malaivijitnond, S., Chansri, K., Kijkuokul, P., Urasopon, N., Cherdshewasart, W. (2006). Usi cytology to assess the estrogenic activity of phytoestrogen-rich herbs. J Ethnopharmac 354-360

Malaivijitnond, S., Kiatthaipipat, P., Cherdshewasart, W., Watanabe, G., Taya K. (2004). Differ of *Pueraria mirifica*, an herb containing phytoestrogens, on LH and FSH secretion in gonadectomized female and ma le rats. J Pharmacol Sci, 96 (4) 428- 435

Malaivijitnond, S., Tungmunnithum, D., Gittarasanee, S., Kawin K., Limjunyawong, N. (2010). exhibits weak estrogenic activity in female rats. Filoterapia, 81 569-576

Muangman, V., Cherdshewasart, W. (2001). Clinicaltrial of the phytoestrogenrich herb, *Puerari* as a crude drug in the treatment of symptoms in menopausal women. Siriraj Hosp Gaz, 5

Trisomboon, H., Malaivijitnond, S., Watanabe, G., Taya, K. (2004). Estrogenic effects of *Puera mirifica* on the menstrual cycle and hormones- related ovarian functions in cyclic female cynomolgus monkeys. J Pharmacol Sci, 94 (1) 51-59

Trisomboon, H., Malaivijitnond, S., Watanabe, G., Taya, K. (2005). Ovulation block by *Puerari mirifica*: a study of its endocrinological effect in female monkeys. Endocrine, 26 (1) 33-3

Trisomboon, H., Malaivijitnond, S., Watanabe, G., Cherdshewasart, W., Taya, K. (2006). The estrogenic effect of *Pueraria mirifica* on gonadotrophin levels in aged monkeys. Endocrine, 29 129-134

Urasopon, N., Hamada, Y., Asaoka, K., Cherdshewasart, W., Malaivijitnond S. (2007). *Pueraria mirifica*, a phytoestrogen-rich herb, prevents bone loss in orchidectomized rats. Maturitas, 56 (3) 322- 331

Urasopon, N., Hamada, Y., Asaoka, K., Poungmali, U., Malaivijitnond, S. (2008a). Isoflavone contents in rodent diets and its estrogenic effect on vaginal cornification in *Pueraria mirifica*-treated rats. Science Asia, 34 (4) 371-376

Urasopon, N., Hamada, Y., Cherdshewasart, W., Malaivijitnond, S. (2008b). Preventive effects of *Pueraria mirifica* on bone loss in ovariectomized rats. Maturitas, 59 (2) 137-148

PL-05

Phytoestrogen from a Thai herb promise major advances to women health

Suchinda Malaivijitnond

Primate Research Unit, Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand **E-mail: Suchinda.M@chula.ac.th**

Osteoporosis, breast cancer and reproductive function abnormalities are the major health problems and the big concerns for women in the world. The main factors causing those symptoms are the disorder or the deficiency of sex steroid hormone, estrogens. Therefore, many synthetic estrogens (analogue, agonist or antagonist of estrogens) are being sought to cure the symptoms. By using those synthetic estrogens, however, it is not only because it has a high cost but because it also has undesirable side effects, it therefore does not appropriate to use by Thai women. *Pueraria mirifica* (PM) is an endemic Thai herb which commonly found throughout Thailand, especially in the North. It contained at least 17 phytoestrogens, mainly isoflavones. The first identified phytoestrogen was miroestrol in the year 1960. Phytoestrogens found in PM are structurally and functionally similar to 17β-estradiol, but it binds mainly to the estrogen receptor beta (ERβ). PM's roots have been used in Thai traditional medicine to rejuvenate and remedy the postmenopausal symptoms for more than 60 years; ordinary dose of PM consumed in native Thai people is 200 mg/day (or 4 mg/kg). Thus, the PM should be considered for an alternative choice of estrogen replacement therapy in women. We here assessed estrogenic activities of PM on stimulating reproductive organs, preventing and curing osteoporosis and suppressing breast cancers in mice, rats, monkeys and humans. PM induced increase of uterus weights and vaginal cornification, suppressed serum LH and FSH levels and decreased body weight gain in ovariectomized mice and rats. In adult female monkeys, PM increased the length of menstrual cycles or induced cessation of menstruation via suppression of folliculogenesis and ovulation. Changes of LH, FSH, E_2 and P_4 levels were congruent with changes in menstrual cycle lengths. In aged female monkeys, serum FSH, LH and E_2 levels were dose-dependently decreased after PM treatment and showed a rebounded increase after the cessation. In perimenopausal women, the PM intake could alleviate the climacteric symptoms, such as hot flushes, frustration, sleep disorder, skin dryness, high blood cholesterol, oligomenorrhea and amenorrhea. PM dose-dependently reduced the tumoriogensis and tumor growth in NMU-induced rats. Feedings of PM in female rats significantly prevented bone loss induced by ovariectomy and could slow the progress of the occurred osteoporosis. Based on these results, the use of PM should promise major advances to women's health. It can be used as a contraceptive drug in premenopausal women and as an estrogen replacement therapy for osteoporosis and alleviation of climacteric symptoms in postmenopausal women, with a great benefit on no undesirable side effect on breast cancer stimulation.

Abstract of the 14th Biological Sciences Graduate Congress

10th -12th December, 2009, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

3.1. วิทยากรรับเชิญ (Keynote speaker)

-Malaivijitnond S. 2009. Phytoestrogens from a Thai herb promise major advances to women's health. Biological Science Graduate Congress. 10-12 December 2009. Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.

EFFECT OF DIETARY PHYTOESTROGENS ON RODENT MONKEY AND HUMAN PHYSIOLOGY

Suchinda Malaivijitnond[1*], *Nontakorn Urasopon*[2], *Somrudee Harnmanop*
Ubon Chimsakul[1], *Sukanya Jaroenporn*[1], *Wichai Cherdshewasart*[1],
Gen Watanabe[3], *Kazuyoshi Taya*[3]

[1]Primate Research Unit, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand
[2]Faculty of Agriculture, Ubon Rajathanee University, Thailand
[3]Tokyo University of Agriculture and Technology, Tokyo, Japan
E-mail: suchinda.m@chula.ac.th

Osteoporosis, breast cancer and reproductive function abnormalities a
major health problems and the big concerns for women in the world. The
factors causing those symptoms are the disorder or the deficiency of sex st
hormone, estrogens. By using the synthetic estrogens, however, it is not
because it has a high cost but because it also has undesirable side ef
Pueraria mirifica (PM) is an endemic Thai herb which commonly
throughout Thailand. It contained at least 17 phytoestrogens. Phytoestr
found in PM are structurally and functionally similar to 17β-estradiol,
binds mainly to the estrogen receptor-β. PM's roots have been used in
traditional medicine to rejuvenate and remedy the postmenopausal sym
for more than 60 year. Thus, we here assessed estrogenic activities of P
stimulating reproductive organs, preventing and curing osteoporosis
suppressing breast cancers in mice, rats, monkeys and humans. PM in
increase of uterus weights and vaginal cornification, increased the leng
reproductive cycles via suppression of folliculogenesis and ovulation in
rats and monkeys. In perimenopausal women, the PM intake could allevia
climacteric symptoms, such as hot flushes, frustration, sleep disorder,
dryness, high blood cholesterol, oligomenorrhea and amenorrhea. PM
dependently reduced the tumoriogensis and tumor growth in NMU-induce
Feedings of PM in female rats significantly prevented bone loss induc
gonadectomy. Additionally, high dose of PM treatment also exhibite
therapeutic effect on bone loss in female rats. Based on these results, the
PM should promise major advances to women's health. It can be used
contraceptive drug in premenopausal women and as an estrogen replac
therapy for osteoporosis and alleviation of climacteric symptoms in menop
women, with a great benefit on no undesirable side effect on breast c
stimulation.

Key Words: *Pueraria mirifica*, phytoestrogens, osteoporosis, breast cance
monkeys

3.2. วิทยากรรับเชิญ (Invited speaker)

-Malaivijitnond S, Urasopon N, Harnmanop S, Chimsakul U, Jaroenporn S, Chershewasart W, V
Taya K.2009. Effect of Dietary Phytoestrogens on Rodent, Monkey and Human Physiolog
International Congress on the Future of Animal Research "Biomedical and Field Researcl
human Primates", 19-22 November 2009, Rose Garden Riverside, Nakhon Pathom, Thail

O32

Preventive and therapeutic effects of Pueraria mirifica herb-containing phytoestrogens on bone loss

S. Malaivijitnond[1], N. Urasopon[2], S. Hammanop[1], U. Chimsakul[1], W. Tiyasatkulkovit[1] and S. Jaroenporn[1]

[1]Primate Research Unit, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, [2]Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ubon Rajathanee University, Thailand.
suchinda.m@chula.ac.th

Osteoporosis is a major public health problem in aging population. Though estrogen is effective in reducing bone loss, it associates with a high risk of breast and endometrium cancers. The alternative drugs for bone loss therapy with less undesirable side effects need to be sought. The present study determined preventive and therapeutic effects of Pueraria mirifica Thai herb, which contains a high amount of phytoestrogens, on bone loss in fully mature female and male rats. For the preventive effect study, 6 months old female and male rats were gonadectomized and subsequently fed with suspensions of P. mirifica at the concentration of 0, 10, 100 or 1000 mg/kg BW/day (PM-0, PM-10, PM-100 and PM-1000, respectively) or 0.1 mg/kg BW/day of 17α-ethinylestradiol (EE) for 3 months. For the therapeutic effect study, rats were gonadectomized and kept for 3 months, for bone loss induction, and then were fed with the suspensions as described above for 3 months. Changes of bone mineral density, bone mineral content, bone histomorphometry, serum bone markers, and sex organ weights were determined. Bone loss was significantly induced by gonadectomy and it was dose-dependently prevented by P. mirifica treatment for 3 months in female as well as in male rats. At PM-100 and PM-1000, bone loss was completely prevented, as expected, comparable to those in the EE group. Surprisingly, PM-1000 also exhibited the therapeutic effect on bone loss in both sexes of rats as in the EE group: Though weights of seminal vesicle and ventral prostrate gland in orchidectomized rats were not altered by P. mirifica, the uterus weights were dose-dependently increased in ovariectomized rats. The results suggest that P. mirifica may be applicable for prevention and therapeutics on osteoporosis in andropausal men and menopausal women; however, an undesirable side effect on stimulating female reproductive organs should be concerned.

3.3. นำเสนอผลงานแบบปากเปล่า

- Malaivijitnond S, Urasopon N, Hammanop S, Chimsakul U, Tiyasatkulkovit W, Jaroenporn S. 2010. Preventive and therapeutic effects of *Pueraria mirifica* herb-containing phytoestrogens on bone loss. The 6th Intercongress Symposium of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology (AOSCE), Palmerston North, New Zealand, January 19-22, 2010. pp. 64.

P19

The therapeutic effects of White Kwao Krua Pueraria mirifica Airy Suvatabandhu on ovariectomy – induced osteoporotic rat

S. Hanmanop[1] and S. Malaivijitnond[2]

[1]Physiology M.Sc. Program, Graduated School, [2]Primate Research Unit, of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330
Hanmanop@hotmail.com

Pueraria mirifica Airy Shaw & Suvatabundhu (PM) is a Thai indigenou tuberous roots contain several isoflavonoid compounds which could pr loss in gonadectomized rats. In the present study, the therapeutic effect bone loss in osteoporotic rats have been investigated. Six months old were ovariectomized (OVX) or sham operated (SH) on day 0 and were days to induce bone loss. On day 90, five rats in each group (OVX_9 groups) were randomly selected, euthanized and left tibia were cc histomorphometry study and kept as a base-line value. The remainir (SH_{180}) were gavaged daily with distilled water for 90 days. The OVX wer divided into five groups, PM0, PM10, PM100, PM1000 and EE groups v gavaged daily with 0, 10, 100 and 1,000 mg/ kg BW/ day of PM and 0.1 n day of 17-α ethinylestradiol, respectively, for 90 days, and were sacrific 180. The left tibia was removed for bone histomorphometry study. Ninety ovariectomy the trabecular bone area in OVX_{90} group was lower than the S by 65.42%, indicating that bone loss was successfully induced by ovariect 90 days of PM or EE treatment, the trabecular bone area in PM1000 and was significantly higher than the PM0 group by 65.80% and 79.46% ($p<0$ rather higher than that of OVX_{90} group by 1.64% and 10.91%. Hov increase in trabecular bone area in PM1000 and EE groups was still lower SH_{180} group by -54.77% and -51.04%. These results indicate that PM co could significantly prevent bone loss and tend to reverse the established bc osteoporotic rats.

4. นำเสนอผลงานแบบโปสเตอร์

-Hanmanop S, Malaivijitnond S. 2010. The therapeutic effects of white Kwao Krua *Pueraria mi* Shaw & Suvatabanhdu on ovariectomy-induced osteoporotic rats. The 6th Intercongress of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology (AOSCE), Palmerston N Zealand, January 19-22, 2010. pp. 86.

Reproductive Endocrine Research on *Pueraria Mirifica* Herb and Its Estrogenic Efficacy

รศ.ดร.สุจินดา มาลัยวิจิตรนนท์

Reproductive function abnormalities are the major health problems and the big concerns for women in the world. The main factors causing those symptoms are the disorder or the deficiency of sex steroid hormone, estrogens. Therefore, many synthetic estrogens (analogue, agonist or antagonist of estrogens) are being sought to cure the symptoms. By using those synthetic estrogens, however, it is not only because it has a high cost but because it also has undesirable side effects, it therefore does not appropriate to use by Thai women. Thus *Pueraria mirifica* herb, known in Thai as white Kwao Krua, containing at least 17 phytoestrogens (Cherdshewasart et al., 2007a; Urasopon et al., 2008a) should be considered as an alternative choice of estrogen replacement therapy in women. Phytoestrogens found in *P. mirifica* are structurally and functionally similar to 17β-estradiol, but it binds mainly to the estrogen receptor beta (ERβ) (Kuiper et al., 1997; 1998). *P. mirifica's* roots have been used in Thai traditional medicine to rejuvenate and remedy the postmenopausal symptoms for more than 60 years; ordinary dose of *P. mirifica* consumed in native Thai people is 200 mg/day (or 4 mg/kg) (Muangman and Cherdshewasart, 2001). We here assessed estrogenic activities of *P. mirifica* on reproductive organs and fertility in both sexes of mice and rats and in female monkeys.

4. การนำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการในประเทศ

4.1. วิทยากรรับเชิญ (Invited speaker)

-Malaivijitnond S. 2010. Reproductive endocrine research: A case study of *Pueraria mirifica*. อบรมวิชาการสรีรวิทยาชพยาธิสรีรวิทยา ครั้งที่ 28 ประจำปี 2553. ณ อาคารแพทยพัฒน์ ห้อง 230/1 คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. หน้า 17-21.

The isoflavone contents in *P. mirifica* tuberous roots vary widely b tween locations (Cherdshewasart et al., 2007b), between seasor (Cherdshewasart and Sriwatcharakul, 2007), and even between roots of th same plant (Urasopon et al., 2008a). The estrogenic activity of wild *P. mirifica* tuberous roots collected from 28 out of 76 provinces of Thailand was teste by MCF-7 proliferation assay (Cherdshewasart et al., 2008), vaginal cornifica tion assay (Cherdshewasart et al., 2007b) and uterotropic assay (Malaivijitnon et al., 2006). The tuberous root of *P. mirifica* collected from Chiang Ma province which had an optimal tuber size and growth rate and showing high estrogenic activity was chosen for the study, and hereafter name *P. mirifica* cultivar Wichai-III. A voucher specimen of *P. mirifica* (No. BC 11405) is deposited at the herbarium of the Department of Botany, Faculty c Science, Chulalongkorn University (Cherdshewasart et al., 2007b).

An oral administration of 1,000 mg/kg BW/day of *P. mirifica* suspen sion decreased the serum luteinizing hormone (LH) levels in both orchidectomized and ovariectomized rats and decreased the serum follicle stimulating hormone (FSH) levels only in ovariectomized rats (Malaivijitnon et al., 2004). The reductions of serum LH and FSH levels in female rats were greater than those of male rats. *P. mirifica* induced increase in uterus weight and vaginal proliferation, and decreased body weight gain in ovariectomized rats. In adult female monkeys, *P. mirifica* increased the length of menstrual cycles or induced cessation of menstruation via suppression of folliculogenesis and ovulation (Trisomboon et al., 2004; 2005; 2007a). Changes of LH, FSH estradiol (E2) and progesterone (P4) levels were congruent with changes in menstrual cycle lengths (Trisomboon et al., 2004; 2005; 2007a). In aged female monkeys, serum FSH, LH and E2 levels were dose-dependently decreased after *P. mirifica* treatment and showed a rebounded increase after the cessation (Trisomboon et al., 2006a; 2007b). Moreover, *P. mirifica* could exhibit the estrogenic effect on sex skin of aged female monkeys (Trisomboon

et al., 2006b). An oral administration of 100 mg/kg BW/day of *P. mirifica* for 8 weeks decreased the mating efficiency in female mice (Jaroenporn et al, 2007), though it did not affect fertility in male mice (Jaroenporn et al., 2006). Based on these results, the use of *P. mirifica* should promise major advances to incur a reproductive function in women. It might be used as a contraceptive drug in premenopausal women and as an estrogen replacement therapy, viz. for alleviation of climacteric symptoms, in postmenopausal women. Regarding to the recent results showing that *P. mirifica* dose-dependently reduced the tumoriogenesis and tumor growth in NMU or DMBA-induced rats (Chedshewasart et al., 2007c; Wannaprasert et al., 2007), use of *P. mirifica* to incur a reproductive function in women should have a great benefit on no undesirable side effect on breast cancer stimulation. As we also discovered that *P. mirifica* could prevent bone loss induced by gonadectomy in female and male rats (Urasopon et al., 2007; 2008b) and could slow the progress of the occurred osteoporosis (Malaivijitnond et al., 2010), *P. mirifica* should also be one of the alternative choices for osteoporosis treatment in humans.

Key words: ***Pueraria mirifica*, phytoestrogens, reproduction, mice, rats, monkeys**

References

1. Cherdshewasart W, Sriwatcharakul S. Major isoflavonoid contents of the 1-year-cultivated phytoestrogen-rich herb, *Pueraria mirifica*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry 2007; 71: 2527-33.
2. Cherdshewasart W, Subtang S, Dahlan W. Major isoflavonoid content of the phytoestrogen rich-herb *Pueraria mirifica* in comparison with *Pueraria lobata*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2007; 43: 428-34.
3. Cherdshewasart W, Kitsamai Y, Malaivijitnond S. Evaluation of the estrogenic activity of the wild *Pueraria mirifica* by vaginal cornification assay. Journal of Reproduction and Development 2007; 53: 385-93.
4. Cherdshewasart W, Panriansaen R, Picha P. Pretreatment with phytoestrogen-rich

plant decreases breast tumor incidence and exhibits lower profile of mammary ERα and ERβ. Maturitas 2007; 58:174-81.

5. Cherdshewasart W, Trisup V, Picha P. Determination of the estrogenic activity of wild phytoestrogen-rich *Pueraria mirifica* by MCF-7 proliferation assay. Journal of Reproduction and Development 2008; 54 :63-7.
6. Jaroenporn S, Malaivijitnond S, Wattanasirmkit K, Trisomboon H, Watanabe G, Taya K, Cherdshewasart W. Effects of *Pueraria mirifica*, an herb containing phytoestrogens, on reproductive organs and fertility of adult male mice. Endocrine 2006; 30: 93-101.
7. Jaroenporn S, Malaivijitnond S, Wattanasirmkit K, Watanabe G, Taya K, Cherdshewasart W. Assessment of fertility and reproductive toxicity in adult female mice after long-term exposure to *Pueraria mirifica*. Journal of Reproduction and Development 2007; 53 :995-1005.
8. Kuiper GGJM, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA. Endocrinology 1997; 138: 863-70.
9. Kuiper GGJM, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA. Endocrinology 1998; 139: 4252-63.
10. Malaivijitnond S, Kiatthaipipat P, Cherdshewasart W, Watanabe G, Taya K. Differential effects of *Pueraria mirifica*, a herb containing phytoestrogens, on LH and FSH secretion in gonadectomized female and male rats. Journal of Pharmacological Sciences 2004; 96: 428-35.
11. Malaivijitnond S, Chansri K, Kijkuokul P, Urasopon N, Cherdshewasart W. Using vaginal cytology to assess the estrogenic activity of phytoestrogen-rich herb. Journal of Ethnopharmacology 2006; 107 :354-60.
12. Malaivijitnond S, Urasopon N, Hamnmanop S, Chimsakul U, Tiyasatkulkovit W, Jaroenporn S. Preventive and therapeutic effects of *Pueraria mirifica* herb-containing phytoestrogens on bone loss. *The 6th Intercongress Symposium of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology (AOSCE)*, Palmerston North, New Zealand 2010; 19-22.
13. Muangman V, Cherdshewasart W. Clinical trial of the phytoestrogen-rich herb, Pueraria mirifica as a crude drug in the treatment of symptoms in menopausal women. Siriraj Hosp Graz 2001; 3: 300-8.
14. Trisomboon H, Malaivijitnond S, Watanabe G, Taya K. Estrogenic effects of *Pueraria*

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

mirifica on the menstrual cycle and hormones-related ovarian functions in cyclic female cynomolgus monkeys. Journal of Pharmacological Sciences 2004;94: 51-9.

15. Trisomboon H, Malaivijitnond S, Watanabe G, Taya K. Ovulation block by *Pueraria mirifica*: a study of its endocrinological effect in female monkeys. Endocrine 2005; 26: 33-9.
16. Trisomboon H, Malaivijitnond S, Watanabe G, Cherdshewasart W, Taya K. The Estrogenic effect of *Pueraria mirifica* on gonadotrophin levels in aged monkeys. Endocrine 2006; 29:129-34.
17. Trisomboon H, Malaivijitnond S, Cherdshewasart W, Watanabe G, Taya K. Effect of *Pueraria mirifica* on the sexual skin coloration of aged menopausal cynomolgus monkeys. Journal of Reproduction and Development 2006; 52:537-42
18. Trisomboon H, Malaivijitnond S, Cherdshewasart W, Watanabe G, Taya K. Assessment of urinary gonadotropin and steroid hormone profiles of female cynomolgus monkeys after treatment with *Pueraria mirifica*. Journal of Reproduction and Development 2007; 53: 395-403.
19. Trisomboon H, Malaivijitnond S, Cherdshewasart W, Watanabe G, Taya K. The influence of *Pueraria mirifica* herb containing phytoestrogens on the urinary gonadotropin and estradiol levels in aged menopausal monkeys. Animal Science Journal 2007; 78: 378-86.
20. Urasopon N, Hamada Y, Asaoka K, Cherdshewasart W, Malaivijitnond S. *Pueraria mirifica*, a phytoestrogen-rich herb, prevents bone loss in orchidectomized rats. Maturitas 2007; 56: 322-31.
21. Urasopon N, Hamada Y, Asaoka K, Ubon Poungmali, Malaivijitnond S. Isoflavone contents in rodent diets and its estrogenic effect on vaginal comification in *Pueraria mirifica*-treated rats. Science Asia 2008; 34: 371-6.
22. Urasopon N, Hamada Y, Cherdshewasart W, Malaivijitnond S. Preventive effects of *Pueraria mirifica* on bone loss in ovariectomized rats. Maturitas 2008; 59:137-48.
23. Wannaprasert T, Malaivijitnond S, Poungmali U, Cherdshewasart W. Effects of *Pueraria mirifica* on mammary tumorigenesis in N-nitroso-N-methyl-induced rats. *The 9th National Cancer Conference in Celebrations on the Auspicious Occasion of His Majecty the King's 80th Birthday Anniversary*, 5th 2007; 180: 12-4.