

ผลของกวาวเครือขาว (*Pueraria mirifica*) ต่อความสามารถในการสืบพันธุ์ของหนูถีบจักร  
เพศเมียและเพศผู้โตเต็มวัย



นางสาว สุกัญญา เจริญพร

ศูนย์วิทยทรัพยากร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาสารีรวิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-4038-7

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECT OF WHITE KWAO KRUA (*Pueraria mirifica*) ON FERTILITY  
IN ADULT FEMALE AND MALE MICE

Miss Sukanya Jaroenporn



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

For the Degree of Master of Science in Physiology

Inter-Department of Physiology

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2003

ISBN 974-17-4038-7

Copyright of Chulalongkorn University

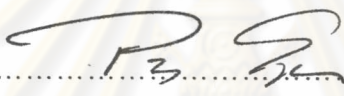
Thesis Title                      Effect of White Kwao Krua (*Pueraria mirifica*) on Fertility in  
Adult Female and Male Mice  
By                                      Miss Sukanya Jaroenporn  
Field of study                      Physiology  
Thesis Advisor                      Associate Professor Suchinda Malaivijitnond, Ph.D.  
Thesis Co-advisor                      Associate Professor Kingkaew Wattanasirmkit, Ph.D.

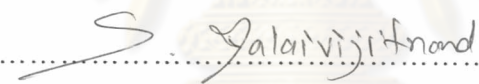
---


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


.....Dean of Graduate School  
(Professor Suchada Kiranandana, Ph.D.)


THESIS COMMITTEE

.....Chairman  
(Associate Professor Prasong Siriviriyakul, M.D.)

..... Thesis Advisor  
(Associate Professor Suchinda Malaivijitnond, Ph.D.)

..... Thesis Co-advisor  
(Associate Professor Kingkaew Wattanasirmkit, Ph.D.)

.....Member  
(Associate Professor Vithaya Yodyingyuad, Ph.D.)

.....Member  
(Associate Professor Sukumal Chongthammakun, Ph.D.)

ศุภัญญา เจริญพร : ผลของกวาวเครือขาว (*Pueraria mirifica*) ต่อความสามารถในการสืบพันธุ์ของหนู  
 ถิ่นจักรเพศเมียและเพศผู้โตเต็มวัย. (EFFECT OF WHITE KWAO KRUA (*Pueraria mirifica*) ON  
 FERTILITY IN ADULT FEMALE AND MALE MICE) อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. สุจินดา มาลัยวิจิตร  
 นนท์, อ. ที่ปรึกษาร่วม : รศ. ดร. กิ่งแก้ว วัฒนเสริมกิจ จำนวน 124 หน้า. ISBN 974-17-4038-7

จากการศึกษาผลของกวาวเครือขาวต่อความสามารถในการสืบพันธุ์ในหนูไม่ซ์เพศผู้และเพศเมีย โดย  
 แบ่งหนูออกเป็น 4 กลุ่ม (กลุ่มละ 10 ตัว ในเพศผู้ และกลุ่มละ 36 ตัว ในเพศเมีย) โดยในกลุ่มที่ 1-3 ให้  
 กวาวเครือขาวทางปากขนาด 0, 10 และ 100 มก./กก. นน. ตัว/วัน ในน้ำกลั่น 0.2 มล. ตามลำดับ กลุ่มที่ 4 ให้สาร  
 สังเคราะห์ฮอร์โมน (diethylstilbestol; DES) ทางใต้ผิวหนัง ขนาด 200 ไมโครกรัม/กก. นน. ตัว/วัน แบ่ง  
 การทดลองออกเป็น 2 ระยะ คือ ระยะทดลองและระยะหลังทดลอง ระยะละ 8 สัปดาห์ พบว่าในหนูเพศเมีย  
 กวาวเครือขาวในขนาด 10 มก./กก. นน. ตัว/วัน สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการผสมพันธุ์และการตั้งท้องได้  
 ถึง **33.33** และ **66.66%** ตามลำดับ แต่เมื่อให้กวาวเครือขาวในขนาด 100 มก./กก. นน. ตัว/วัน และ DES กลับมีผล  
 ไปลดประสิทธิภาพในการผสมพันธุ์และการตั้งท้อง เมื่อวัดน้ำหนักและน้ำหนักสัมพัทธ์ของมดลูกและรังไข่ใน  
 หนูที่ได้รับกวาวเครือขาวทั้ง 2 กลุ่มและ DES เทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำกลั่นพบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมี  
 นัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อตรวจทางจุลกายวิภาคพบว่า ชั้น endometrium ของมดลูกในหนูกลุ่มที่ได้รับ  
 กวาวเครือขาวในขนาด 100 มก./กก. นน. ตัว/วัน และ DES มีการหนาตัวขึ้น รังไข่มีการลดลงของ growing  
 follicle อย่างสอดคล้องกันกับปริมาณฮอร์โมน LH และ FSH ที่ลดลง ในขณะที่ปริมาณฮอร์โมน  $E_2$  ลดลง  
 เฉพาะในหนูที่ได้รับ DES เท่านั้น ในหนูเพศผู้พบว่ากวาวเครือขาวขนาดต่าง ๆ ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพในการ  
 ผสมพันธุ์ การตั้งท้องของหนูเพศเมีย น้ำหนักของอวัยวะ จำนวนสเปิร์ม ปริมาณฮอร์โมน LH FSH และ T แต่  
 พบว่าการเคลื่อนที่และการอยู่รอดของสเปิร์ม ของหนูที่ได้รับกวาวเครือขาวในขนาด 100 มก./กก. นน. ตัว/วัน มี  
 จำนวนลดลง ซึ่งต่างจากหนูกลุ่มที่ได้รับ DES ที่มีผลไปลดทั้ง ประสิทธิภาพในการผสมพันธุ์ การตั้งท้องของ  
 หนูเพศเมีย น้ำหนักของอวัยวะ จำนวน การเคลื่อนที่และการอยู่รอดของสเปิร์ม และปริมาณฮอร์โมน LH และ  
 FSH แต่อย่างไรก็ตามถ้าพ่อหรือแม่หนูที่ได้รับกวาวเครือขาวหรือสารสังเคราะห์ฮอร์โมนสามารถให้กำเนิด  
 ลูกได้ ลูกที่เกิดมาไม่แสดงลักษณะรูปวิกลเลย

จากการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่ากวาวเครือขาวในขนาด 10 มก./กก. นน. ตัว/วัน น่าจะเป็นขนาดที่  
 เหมาะสมในการแนะนำให้ใช้ในคน และกวาวเครือขาวในขนาดที่เท่ากันจะมีผลต่อประสิทธิภาพในการผสม  
 พันธุ์ในเพศเมีย ได้แรงกว่าในเพศผู้ และการฟื้นตัวร่างกายหลังจากหยุดให้สารไฟโตรเอสโตรเจนจะเร็วกว่าการ  
 ได้รับสารสังเคราะห์ฮอร์โมน

หลักสูตร.....สาขาวิชาสตรีวิทยา..... ลายมือชื่อนิติศ.....  
 สาขาวิชา..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....  
 ปีการศึกษา.....2546..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

# #4389107720 : MAJOR PHYSIOLOGY

KEY WORD: *Pueraria mirifica*/PHYTOESTROGENS/FERTILITY /MALFORMATION /MICE  
SUKANYA JAROENPORN : EFFECT OF WHITE KWAO KRUA (*Pueraria mirifica*)  
ON FERTILITY IN ADULT FEMALE AND MALE MICE. THESIS ADVISOR :  
ASSOC. PROF. SUCHINDA MALAIVIJITNOND, PH.D., THESIS COADVISOR :  
ASSOC. PROF. KINGKAEW WATTANASIRMKIT, PH.D., 124 pp. ISBN 974-17-  
4038-7.

This study aimed to investigate the effect of *Pueraria mirifica* (PM) on fertility in male and female mice. Mice were divided into 4 groups (10 mice/group in males and 36 mice/group in females). Groups 1-3 were administered by gastric gavages of PM at doses of 0, 10 and 100 mg/kg. BW/day in 0.2 ml distilled water, respectively, and group 4 was subcutaneously injected with a synthetic estrogen (diethylstilbestol; DES) at 200 µg/kg.BW/day. The treatment schedule was separated into 2 periods: treatment and post-treatment. The duration in each period was 8 weeks. In female mice, PM at 10 mg/kg.BW/day increased the mating efficiency and pregnancy rate for 33.33 and 66.66%, respectively. But the higher dose of PM (100 mg/kg. BW/day) and the DES treatment decreased those parameters. The weights and relative weights of the uterus and ovary in both PM and DES groups were not different from the DW group. When the histological examinations of uterus and ovary have been done, it, however, found that the endometrium thickness in uterus and number of growing follicles in ovary of mice treated with 100 mg/kg. BW/day of PM and DES were increased and decreased, respectively. Changes of those uterus and ovary histology were related to the reduction of LH and FSH levels. However, the decrease of E<sub>2</sub> levels was found only in DES group. In male mice, both doses of PM had no effects on mating efficiency, pregnancy rate in mated females, testis weight, sperm number, and levels of LH, FSH and T, but 100 mg/kg. BW/day of PM reduced the sperm motility and viability. DES injection could reduce all those parameters. However, if PM or DES treated father or mother mice could produce offspring, no malformation was found.

From this study, it can recommend that 10-PM should be applicable to human use, and at the same dose of PM, the females show a greater degree of response on fertility than males. The recovery of mice on fertility after receiving the phytoestrogens is faster than after receiving the synthetic estrogen.

Inter-Department.....Student's signature.....*S. Jaroenpan*  
Field of study.....physiology..... Advisor's signature.....*S. Malaivijitnond*  
Academic year .....2003..... Co-advisor's signature.....*K. Wattanasirmit*

## ACKNOWLEDGEMENTS

First of all, I would like to express my grateful thanks to my advisor, Associate Professor Dr. Suchinda Malaivijitnond, for her valuable suggestions, guidance, kindness and helps throughout this study.

Secondly, I would like to express my deepest gratitude to my co-advisor Associate Professor Dr. Kingkaew Wattanasirmit for her guidance, suggestions and encouragement throughout this thesis.

I also would like to express my sincere to the chairman, Associate Professor Prasong Siriviriyakul and the thesis committee, Associate Professor Vithaya Yodyingyud and Associate Professor Sukumal Chongthammakun.

I would like to express my sincere thanks to The Ministry of University Affairs and Graduate School and Interdepartment of Physiology of Chulalongkorn University for their financial supports. The thanks are also expressed to Primate Laboratory and Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University for provision facilities and to Professor Dr.Kazuyoshi Taya, Laboratory of Veterinary Science, Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, Japan and Associate Professor Dr.Kei-ichiro Maeda, Laboratory of Animal Reproduction, Nagoya University, Japan for provision of chemical reagents for measurements of serum Luteinizing Hormone and Follicle Stimulating Hormone. The sincere thanks are also express to Associate Professor Dr. Orawan Sattayalai for her kindly permission to use phase contrast microscope and Associate Professor Dr. Wichai Cherdshewasart for his suggestion and supports White Kwao Krua.

Thankfulness would be given to all members in Primate Research Unit and all my friends for their support and understanding.

I am also indebted to all experimental mice for their sacrifice, which bring me to succeed in my study.

Finally, The deepest appreciation is expressed to my family for their love, support and understanding.

## TABLE OF CONTENTS

	PAGE
ABSTRACT (THAI).....	IV
ABSTRACT(ENGLISH).....	V
ACKNOWLEDGEMENTS.....	VI
TABLE OF CONTENTS.....	VII
LIST OF TABLES.....	VIII
LIST OF FIGURES.....	X
LIST OF ABBREVIATIONS.....	XIII
CHAPTER	
I INTRODUCTION.....	1
II THEORY AND LITERATURE REVIEW.....	5
III MATERIALS AND METHODS.....	24
IV RESULTS.....	41
V DISCUSSION AND CONCLUSION.....	93
REFERENCES.....	100
APPENDICES.....	107
BIOGRAPHY.....	124

## LIST OF TABLES

	PAGE
<b>Table 1.</b> Summary of the chemical constituents of <i>P. mirifica</i> .....	7
<b>Table 2</b> Schematic outlines of changes in the reproductive organs of the mice during the estrous cycle.....	12
<b>Table 3.</b> Composition of phosphate buffer saline (PBS) pH 7.2 - 7.4.....	34
<b>Table 4.</b> Weights of testes, epididymes, and seminal vesicle of male mice treated with distilled water, <i>P. mirifica</i> and diethylstilbestrol.....	49
<b>Table 5.</b> Relative weights of testes, epididymis, and seminal vesicle of male mice treated with distilled water, <i>P. mirifica</i> and diethylstilbestrol.....	51
<b>Table 6.</b> Sperm concentration, viability and motility of male mice treated with distilled water, <i>P. mirifica</i> and diethylstilbestrol. ....	53
<b>Table 7.</b> Sperm plug and pregnancy found in normal female mice after mating with male mouse treated with distilled water, <i>P. mirifica</i> and diethylstilbestrol.....	60
<b>Table 8.</b> Average number of litter born from the untreated-female mice mated with treated-male mouse.....	61
<b>Table 9.</b> Weights of uterus and ovary of female mice treated with distilled water, <i>P. mirifica</i> and diethylstilbestrol.....	70
<b>Table 10.</b> Relative weights of uterus and ovaries of female mice treated with distilled water, <i>P. mirifica</i> and diethylstilbestrol.....	72



## LIST OF TABLES

(continued)

	PAGE
<b>Table 11.</b> Sperm plug and pregnancy found in female mice treated with distilled water, <i>P. mirifica</i> and diethylstilbestrol after mating with fertile male mouse.....	87
<b>Table 12.</b> Average numbers of litter born from the treated-female mice mated with untreated-male mouse were treated with distilled water, <i>P. mirifica</i> and diethylstilbestrol.....	88
<b>Table 13.</b> Relative weights of ovary and uterus in females, and testis, epididymis and seminal vesicles in males of the litters born from the untreated-female mice mated with treated-male mouse were treated with distilled water, <i>P. mirifica</i> and diethylstilbestrol.....	89
<b>Table 14.</b> Relative weights of ovary and uterus in females, and testis, epididymis and seminal vesicles in males of the litters borne from the treated-female mice mated with untreated-male mouse were treated with distilled water, <i>P. mirifica</i> and diethylstilbestrol.....	91

## LIST OF FIGURES

	PAGE
<b>Figure 1.</b> Characteristics of <i>P. mirifica</i> .....	6
<b>Figure 2.</b> Types of cells in the different stages of estrous cycle by vaginal smear..	11
<b>Figure 3.</b> Comparison of molecular structures of phytoestrogens and natural or synthetic estrogens.....	19
<b>Figure 4.</b> Chamber markings on an improved Neubauer Haemocytometer .....	35
<b>Figure 5.</b> Assembly of the system of multiple exposure photography .....	38
<b>Figure 6.</b> Percent change of serum LH levels in male mice treated with distilled water, <i>P. mirifica</i> and diethylstilbestrol.....	42
<b>Figure 7.</b> Serum FSH levels in male mice treated with distilled water, <i>P. mirifica</i> and diethylstilbestrol.....	44
<b>Figure 8.</b> Percent change of serum testosterone levels in male mice treated with distilled water, <i>P. mirifica</i> and diethylstilbestrol.....	46
<b>Figure 9.</b> Body weights of male mice treated with distilled water, <i>P. mirifica</i> and diethylstilbestrol.....	47
<b>Figure 10.</b> Testicular morphology in DW group .....	55
<b>Figure 11.</b> Testicular morphology in mice treated with 10 mg/kg BW/day of <i>P. mirifica</i> .....	56
<b>Figure 12.</b> Testicular morphology in mice treated with 100 mg/kg BW/day of <i>P. mirifica</i> .....	57

## LIST OF FIGURES

(continued)

	PAGE
<b>Figure 13.</b> Testicular morphology in mice treated with diethylstilbestrol.....	58
<b>Figure 14.</b> Serum LH concentration of female mice treated with distilled water, <i>P. mirifica</i> and diethylstilbestrol.....	63
<b>Figure 15.</b> Serum FSH concentration of female mice treated with distilled water, <i>P. mirifica</i> and diethylstilbestrol.....	65
<b>Figure 16.</b> Percent change of serum estradiol concentration of female mice treated with distilled water, <i>P. mirifica</i> and diethylstilbestrol.....	67
<b>Figure 17.</b> Body weights of female mice treated with distilled water, <i>P. mirifica</i> and diethylstilbestrol.....	69
<b>Figure 18.</b> Daily monitoring of vaginal cytology from female mice treated with distilled water during treatment period (A1) and post-treatment period (A2).....	73
<b>Figure 19.</b> Daily monitoring of vaginal cytology from female mice treated with 10 mg/kg BW/day of <i>P. mirifica</i> during treatment period (B1) and post-treatment period (B2).....	74
<b>Figure 20.</b> Daily monitoring of vaginal cytology from female mice treated with 100 mg/kg BW/day of <i>P. mirifica</i> during treatment period (C1) and post-treatment period (C2).....	75

## LIST OF FIGURES

(continued)

	PAGE
<b>Figure 21.</b> Daily monitoring of vaginal cytology from female mice treated with diethylstilbestrol during treatment period (D1) and post-treatment period (D2).....	76
<b>Figure 22.</b> Uterus morphology in DW group.....	78
<b>Figure 23.</b> Uterus morphology in mice treated with 10 mg/kg BW/day of <i>P. mirifica</i> .....	79
<b>Figure 24.</b> Uterus morphology in mice treated with 100 mg/kg BW/day of <i>P. mirifica</i> .....	80
<b>Figure 25.</b> Uterus morphology in mice treated with diethylstilbestrol.....	81
<b>Figure 26.</b> Ovarian morphology in DW group.....	82
<b>Figure 27.</b> Ovarian morphology in mice treated with 10 mg/kg BW/day of <i>P. mirifica</i> .....	83
<b>Figure 28.</b> Ovarian morphology in mice treated with 100 mg/kg BW/day of <i>P. mirifica</i> .....	84
<b>Figure 29.</b> Ovarian morphology in mice treated with diethylstilbestrol.....	85
<b>Figure 30.</b> Post-partum growth rate of litters born from the untreated-female mice mated with treated-male mouse.....	90
<b>Figure 31.</b> Post-partum growth rate of litters born from the treated-female mice mated with untreated-male mouse.....	92

## ABBREVIATIONS

DES	= Diethylstilbestrol
$\mu$ l	= Microgram
$\mu$ l	= Microliter
$\mu$ m	= Micrometer
E <sub>2</sub>	= 17 $\beta$ -Estradiol
ER	= Estrogen Receptor
ER $\beta$	= Estrogen Receptor Beta
ER $\alpha$	= Estrogen Receptor Alpha
FSH	= Follicle Stimulating Hormone
g	= Gram
K	= Treatment period
L	= liter
LD <sub>50</sub>	= Lethal dose 50%
LH	= Luteinizing Hormone
mg	= Miligram
ml	= Mililiter
P	= Post-treatment period
<i>P. mirifica</i>	= <i>Pueraria mirifica</i>
RIA	= Radioimmunoassay
T	= Testosterone