Thesis Title Effect of Curcuminoids and Their Structure Related Compounds on Matrix Metalloproteinase-2 and –9 Gelatinolytic Activities

Author Mr. Wittaya Chaiwangyen

M.S. Biochemistry

Examining committee

Assoc. Prof. Dr. Porn-ngarm Limtrakul	Chairman
Assoc. Prof. Dr. Mathurose Ponglikitmongkol	Member
Dr. Chadarat Duangrat	Member
Assoc. Prof. Dr. Viboon Rattanapanone	Member

ABSTRACT

Tumor metastasis is the leading cause of death in cancer patients. Invasion into surrounding tissues is a characteristic feature of malignant tumors and invasiveness is also required for tumor cells to form metastasis colonies. An essential pattern of this process includes degradation of the extracellular matrix (ECM) and basement membrane (BM). Many proteolytic enzymes produced by tumor cells have been reported to degrade components of the ECM and BM. The Matrix metalloproteinases (MMPs) are the members of the unique family of proteolytic enzymes, which contain a zinc ion at their active site and can degrade the ECM components. Therefore MMP-2 and MMP-9 are believed to play a role in the invasion of the ECM and BM by tumor cell.

Natural products from some plant continue to be used in pharmaceutical preparations either as pure compounds or as extracts. Understanding the molecular mechanism by which natural products interacts with inhibition of these enzymatic activities or down-regulation of MMPs expression, is therefore important in exploiting natural product properties for cancer treatment. Curcuminoids mixtures, phenolic moieties containing molecules, are found in the rhizome of *Curcuma longa*,

and are endowed with wide biological properties, including anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-mutagenic are interested for this study. Additional, the structurally related compounds such as tetrahydrocurcumin, ferulic acid, caffeic acid and chlorogenic acid are used in this experiment. The aims of this study were to investigate the effect of curcuminoids, curcumin, bisdemethoxycurcumin, demethoxycurcumin, tetrahydrocurcumin, caffeic acid, ferulic acid and chlorogenic acid on MMP-2 and –9 activities and the secretion of MMP-2 and –9 in conditioned media of HT-1080 cells.

The effect of curcuminoids and their structure related compounds on MMP-2 and-9 activities was detected by fluorometric assay and confirmed by gelatin zymography. Demethoxycurcumin could inhibit the MMP-2 activity by 52.4% inhibition, followed by curcuminoids, curcumin, bisdemethoxycurcumin and caffeic acid has similar effects of inhibition with bisdemethoxycurcumin. While, the strongest inhibition of MMP-9 activity (55% inhibition) was curcuminoids followed by curcumin, which has similar effect with demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin and caffeic acid. Using gelatin zymography, curcuminoids caused the strongest inhibition of MMP-2 activities by 46.3%, followed by demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin, curcumin and caffeic acid, respectively. The inhibition on MMP-9 activity, curcuminoids, demethoxycurcumin and curcumin had the same degree of inhibition in the range of 34.5- 46.3% ($p < 0.05$) and more than bisdemethoxycurcumin, followed by caffeic acid. Tetrahydrocurcumin, chlorogenic acid and ferulic acid did not affect on MMP-2 and –9 activities that determined by the two methods of detection. This result indicated that phenolic hydroxy groups, phenolic methoxy groups, diketone moiety and double bonds might play roles in regulation of MMP-2 and –9 activities.

The effect of curcuminoids and their chemical structure related compounds on the secretion of MMP-2 and –9 in conditioned media of HT-1080 cells. The cells were treated with each compound in serum-free medium without phenol red for 48 h, then the conditioned media was harvested and analyzed by gelatin zymography. The result showed that only bisdemethoxycurcumin decreased in the secreted MMP-2 and –9 in dose-dependent manner.

These findings provide evidence that curcuminoids and some of structurally related compounds inhibited the MMP-2 and –9 activities and the secretion of MMP-2 and –9 showed significantly decrease by bisdemethoxycurcumin.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ผลของเคอร์คิวมินอยด์และสารประกอบที่มีโครงสร้างสัมพันธ์กันต่อกัมมันตภาพของเอนไซม์ เมทริกซ์ เมทาลโลโปรทีเนส-2 และ –9 ในการสลาย เจละติน

ชื่อผู้เขียน นายวิทยา ชัยวังเย็น

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. พรงาม ลิ้มตระกูล	ประธานกรรมการ
รศ. ดร. มธุรส พงษ์ลิขิตมงคล	กรรมการ
ดร. ชฎารัตน์ ดวงรัตน์	กรรมการ
รศ. ดร. วิบูลย์ รัตนาปนนท์	กรรมการ

บทคัดย่อ

การแพร่กระจายตัวของเซลล์มะเร็งไปยังส่วนต่าง ๆ ของร่างกายพบว่าเป็นสาเหตุสำคัญในการเสียชีวิตของผู้ป่วยโรคมะเร็ง การรุกรานของเซลล์มะเร็งไปยังเนื้อเยื่อข้างเคียงจะเป็นลักษณะเฉพาะของมะเร็งชนิด malignant และการรุกรานของเซลล์มะเร็งจะจำเป็นต่อการรวมตัวเป็นกลุ่มก้อนของเซลล์มะเร็งในบริเวณใหม่ ในการรุกรานและแพร่กระจายตัวของเซลล์มะเร็งนั้น เซลล์มะเร็งต้องสลายเนื้อเยื่อภายนอก และเมมเบรนที่กั้นระหว่างชั้นของเซลล์ โดยเซลล์มะเร็งสามารถสร้างเอนไซม์ในการย่อยสลายได้หลายชนิดด้วยกัน พบว่ามีเอนไซม์เมทริกซ์ เมทาลโลโปรทีเนส โดยเอนไซม์นี้จัดอยู่ในกลุ่มเฉพาะที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลาย ซึ่งเอนไซม์นี้มีไอออนของสังกะสีอยู่ในบริเวณทำงานด้วย ทำให้เอนไซม์นี้มีคุณสมบัติในการย่อยสลายเนื้อเยื่อภายนอกและเมมเบรนที่กั้นระหว่างชั้นของเซลล์ จากการวิจัยต่างๆ พบว่า เอนไซม์เมทริกซ์ เมทาลโลโปรทีเนส-2 และ –9 มีบทบาทสำคัญในการสลายเนื้อเยื่อภายนอกและเมมเบรนที่กั้นระหว่างชั้นของเซลล์ ทำให้เกิดการรุกรานและการแพร่กระจายตัวของเซลล์มะเร็ง

ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากพืชบางชนิดยังสามารถใช้ในทางเภสัชกรรมได้จนถึงทุกวันนี้ โดยใช้ทั้งในรูปสารบริสุทธิ์และสารสกัด การศึกษาถึงผลิตภัณฑ์ธรรมชาติซึ่งมีผลต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ เมทริกซ์ เมทาลโลโปรทีเนส หรือไปยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ เมทริกซ์ เมทาลโลโปรทีเนสเหล่านี้ จะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการรักษาโรคมะเร็งได้ เคอร์คิวมินอยด์

เป็นสารออกฤทธิ์จำพวกฟีนอลิก พบในขมิ้นชัน และพบว่า เคอร์คิวมินอยด์ มีคุณสมบัติเป็นตัวต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่น ต้านการอักเสบ ต้านการกลายพันธุ์ ดังนั้นจึงสนใจเคอร์คิวมินอยด์ มาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ นอกจากนี้ยังใช้ สารประกอบที่มีโครงสร้างสัมพันธ์กันได้แก่ เตตระไฮโดรเคอร์คิวมิน กรดเฟอรูลิค กรดแคฟเฟอิค และกรดคลอโรจีนิค ในการศึกษาครั้งนี้ด้วย วัตถุประสงค์ในการศึกษาเพื่อศึกษาผลของ เคอร์คิวมินอยด์ เคอร์คิวมิน บิสดีเมททอกซีเคอร์คิวมิน ดีเมททอกซีเคอร์คิวมิน เตตระไฮโดรเคอร์คิวมิน กรดแคฟเฟอิค กรดเฟอรูริค และกรดคลอโรจีนิค ต่อการทำงานของเอนไซม์ เมทริกซ์ เมทาลโลโปรทีเนส–2 และ –9 และผลต่อการหลั่งเอนไซม์ เมทริกซ์ เมทาลโลเปรทีเนส –2 และ –9 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด HT-1080

เพื่อศึกษาผลของเคอร์คิวมินอยด์และสารประกอบที่มีโครงสร้างสัมพันธ์ต่อการทำงานของเอนไซม์ เมทริกซ์ เมทาลโลเปรทีเนส–2 และ –9 โดยใช้วิธี fluorometry และวิธี gelatin zymography เพื่อเป็นการยืนยัน จากการทดลองโดยวิธี fluorometry พบว่า ดีเมททอกซีเคอร์คิวมิน สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ เมทริกซ์ เมทาลโลเปรทีเนส –2 ได้มากที่สุด โดยยับยั้งการทำงานประมาณ 52.4 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ เคอร์คิวมินอยด์ เคอร์คิวมิน บิสดีเมททอกซีเคอร์คิวมิน และ กรดแคฟเฟอิค ซึ่งให้ผลเหมือนกับบิสดีเมททอกซีเคอร์คิวมิน ในขณะที่สารที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ เมทริกซ์ เมทาลโลเปรทีเนส–9 ได้มากที่สุด คือ เคอร์คิวมินอยด์ ยับยั้งได้ 55 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ เคอร์คิวมิน ซึ่งให้ผลในการยับยั้งใกล้เคียงกับ ดีเมททอกซีเคอร์คิวมิน บิสดีเมททอกซีเคอร์คิวมิน และกรดแคฟเฟอิค สำหรับการทดลองโดยวิธี gelatin zymography พบว่าเคอร์คิวมินอยด์ มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ เมทริกซ์ เมทาลโลโปรทีเนส–2 ได้มากที่สุดประมาณ 46.3 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ดีเมททอกซีเคอร์คิวมิน บิสดีเมททอกซีเคอร์คิวมิน เคอร์คิวมิน และกรดแคฟเฟอิค ตามลำดับ การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ เมทริกซ์ เมทาลโลโปรทีเนส –9 พบว่าเคอร์คิวมินอยด์ ดีเมททอกซีเคอร์คิวมิน และเคอร์คิวมิน จะให้ผลใกล้เคียงกันประมาณ 34.5-46.3 เปอร์เซ็นต์ ($p< 0.05$) ซึ่งให้ผลยับยั้งมากกว่าบิสดีเมททอกซีเคอร์คิวมิน และ ถัดมาคือ กรดแคฟเฟอิค ส่วน เตตระไฮโดรเคอร์คิวมิน กรดคลอโรจีนิค และกรดเฟอรูริค ไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ เมทริกซ์ เมทาลโลโปรทีเนส–2 และ –9 โดยการทดสอบทั้ง 2 วิธี จากผลการทดลองนี้แสดงว่ากลุ่ม phenolic hydroxy, phenolic methoxy, diketone moiety และ พันธะคู่ อาจจะมีผลต่อการควบคุมการทำงานของเอนไซม์ เมทริกซ์ เมทาลโลโปรทีเนส –2 และ –9

ผลของเคอร์คิวมินอยด์ และสารประกอบที่มีโครงสร้างสัมพันธ์ต่อการหลั่งของเอนไซม์ แมทริกซ์ เมทาลโลโปรทีเนส–2 และ –9 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด HT-1080 โดยบ่มเซลล์

HT-1080 ด้วยสารประกอบชนิดต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรั่ม และไม่มี ฟีนอล-เรดเป็นเวลา 48 ชั่วโมงหลังจากนั้นแยกอาหารเลี้ยงเซลล์ออกมาเพื่อทดสอบโดยวิธี gelatin zymography จากผลการทดลองพบว่า บิสดีเมททอกซี่เคอร์คิวมิน เพียงสารเดียวเท่านั้นที่สามารถลดการหลั่งของเอนไซม์ เมทริกซ์ เมทาลโลเปรทีเนส–2 และ –9 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ได้

จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า เคอร์คิวมินอยด์และสารประกอบที่มีโครงสร้างสัมพันธ์บางตัวสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ เมทริกซ์ เมทาลโลเปรทีเนส–2 และ –9 และบิสดีเมททอกซีเคอร์คิวมิน ที่สามารถลดการหลั่งของเอนไซม์ เมทริกซ์ เมทาลโลเปรทีเนส–2 และ –9 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University