Thesis Title Effect of *cis*-3-(2',4',5'-Trimethoxyphenyl)-4-{(E)-2''',4''',5'''-Trimethoxylstyryl}-Cyclohex-1-ene on LPS-Induced Hyaluronan Synthase Gene Expression and Hyaluronan Synthesis in a Human Synovial Fibroblast SW982 Cell Line

Author Miss Siriprapa Khuajan

Degree Master of Science (Biochemistry)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Siriwan Ong-chai	Chairperson
Assoc. Prof. Dr. Prachya Kongtawelert	Member

ABSTRACT

Hyaluronan (HA), a major molecule in joint fluid, plays a crucial role in joint motion and maintains joint homeostasis. An increase in HA synthesis has been found in rheumatoid arthritis (RA), a chronic inflammatory disease of synovial joint, leads to a progressive articular destruction consequence with severe morbidity and disability. One of the most active compounds isolated from *Zingiber cassumunar* Roxb., a herbal plant which has long been used to relieve joint and muscle pain, is *cis*-3-(2',4',5'-Trimethoxyphenyl)-4-{(E)- 2''', 4''', 5'''-Trimethoxylstyryl}-Cyclohex-1-ene (compound C).

This study aims to investigate the effect of compound C on HA synthase gene expression and HA synthesis in SW982 cell lines induced by lipopolysaccharide (LPS).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

The SW982 cell line was treated with 0.1 μg/ml LPS in presence or absence of compound C (0, 1, 10 and 100 μM) for 9 hrs. Dexamethasone, an anti-rheumatic drug, was used as positive control. The mRNA level of HAS2 and HAS3 genes including TLR-4, IL-1β, ICE were determined by RT-PCR. The level of HA in culture medium was analyzed by ELISA technique. Cytotoxicity of compound C was determined by MTT assay.

It was found that LPS induced HAS2 and HAS3 gene expression in SW982 cell line similar to primary human synovial fluid, which appeared consistently in elevation of HA level in culture medium. These effects were significantly suppressed by compound C from 10 μM, resulted in the reduction of mRNA level of HAS2 and HAS3 genes including level of HA in culture medium in comparison with LPS treated control. In addition, genes which involved in LPS-induced inflammatory cytokine pathway such as TLR-4, IL-1β and ICE were found to be significantly suppressed by compound C ($p < 0.05$).

These results suggested that inhibitory effects of compound C on LPS-induced HAS gene expression in SW982 cell line may involve in TLR-4 signaling pathways which caused induction of pro-inflammatory cytokine synthesis such as IL-1β, the key cytokine which plays important role in elevation of HA level in inflammatory joint disease.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ผลของสาร *cis*-3-(2',4',5'-Trimethoxyphenyl)-4-{(E)-2''',4''',5'''-Trimethoxylstyryl}-Cyclohex-1-ene ต่อการแสดงออกของยีนไฮยาลูโรแนนซินเทสและการสังเคราะห์ไฮยาลูโรแนนที่ชักนำโดยไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ในเซลล์สายพันธุ์ของเซลล์สร้างเส้นใยในไขข้อของมนุษย์

ผู้เขียน นางสาวสิริประภา เครือจันทร์

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ร	ศ.ดร. ศิริวรรณ องค์ไชย	ประธานกรรมการ
	รศ.ดร. ปรัชญา คงทวีเลิศ	กรรมการ

บทคัดย่อ

ไฮยาลูโรแนน (Hyaluronan; HA) เป็นสารชีวโมเลกุลหลักที่พบในน้ำเลี้ยงไขข้อ มีบทบาทสำคัญต่อการเคลื่อนไหวของข้อต่อและรักษาสมดุลของข้อต่อ การเพิ่มขึ้นของการสังเคราะห์ไฮยาลูโรแนนถูกพบในสภาวะของการเกิดโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ ซึ่งเป็นโรคที่มีการอักเสบเรื้อรังของข้อต่อ นำไปสู่การทำลายเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนของข้อต่อ เกิดการเคลื่อนไหวลำบาก จนอาจทำให้เกิดความพิการ ไพล *(Zingiber cassumunar* Roxb.) เป็นสมุนไพรที่ถูกนำมาใช้บรรเทาความเจ็บปวดของข้อและกล้ามเนื้อ สารสกัดจากไพลชนิดหนึ่งที่สำคัญ คือ *cis*-3-(2',4',5'-Trimethoxyphenyl)-4-{(E)- 2''', 4''', 5'''-Trimethoxylstyryl}-Cyclohex-1-ene (compound C)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การศึกษานี้ มีจุดประสงค์เพื่อสำรวจ ผลของ compound C ต่อการแสดงออกของยีนไฮยาลูโรแนนซินเทส (HASs) และการสังเคราะห์ไฮยาลูโรแนนในเซลล์เชื้อสายของเซลล์สร้างเส้นใยในไขข้อที่ถูกเหนี่ยวนำจากไลโปพอลิแซ็กคาไรด์

เซลล์ SW982 ถูกทดสอบกับ 0.1 μg/ml LPS ในสภาวะที่มีสาร compound C (1, 10 และ 100 μM) หรือไม่มีเป็นเวลา 9 ชั่วโมง เทียบกับ Dexamethasone ซึ่งเป็นยารักษาโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ จากนั้นนำเซลล์มาตรวจวัดปริมาณ HAS2 และ HAS3 mRNA รวมถึง TLR-4, IL-1β และ ICE mRNA โดยวิธี RT-PCR และน้ำเลี้ยงเซลล์ถูกนำมาตรวจวัดการสังเคราะห์ HA โดยวิธี ELISA รวมทั้งวัดความเป็นพิษต่อเซลล์ของสาร compound C ด้วยวิธี MTT assay

พบว่า LPS เหนี่ยวนำการแสดงออกของยีน HAS2 และ HAS3 ในเซลล์ SW982 เหมือนกับเซลล์สร้างเส้นใยในไขข้อของมนุษย์ เช่นเดียว กับการเพิ่มขึ้นของปริมาณ HA ในน้ำเลี้ยงเซลล์ ซึ่งฤทธิ์นี้ถูกยับยั้งอย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้นจาก 10 μM compound C ส่งผลต่อการลดการแสดงออกของยีน HAS2 และ HAS3 รวมถึงระดับของ HA ในน้ำเลี้ยงเซลล์ เมื่อเปรียบเทียบกับการทดสอบจากกลุ่มควบคุม LPS นอกจากนี้ยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการอักเสบที่ถูกเหนี่ยวนำจาก LPS เช่น TLR-4, IL-1β และ ICE พบว่าถูกยับยั้งอย่างมีนัยสำคัญโดย compound C ($p<0.05$)

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าผลการยับยั้งของ compound C ต่อ LPS ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีน HASs ในเซลล์ SW982 อาจเกี่ยวข้องกับวิถีการส่งสัญญาณ TLR-4 ซึ่งเป็นสาเหตุในการเหนี่ยวนำการสังเคราะห์ pro-inflammatory cytokines เช่น IL-1β จัดเป็นไซโตไคน์หลักที่แสดงบทบาทสำคัญต่อการเพิ่มขึ้นของระดับ HA ในโรคข้ออักเสบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved