

Thesis title Effect of Curcuminoids on Activity and Expression of Matrix Metalloproteinase-3 (MMP-3) in Human Invasive Breast Carcinoma Cells

Author Miss Mathanaporn Boonrao

M.S. Biochemistry

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Pornngarm Limtrakul

Chairperson

Dr. Suwiwek Lipigorngoson

Member

ABSTRACT

As metastatic disease is the principal cause of death in cancer patients, a greater understanding of the process of tumor invasion and metastasis is essential and should lead to the identification of new therapeutic targets. MMPs are capable of degradation of most compounds of the basement membrane and extracellular matrix which play important role in this process. MMP-3 is a biomarker for breast cancer, have been a subject of most extensive research. Curcuminoids is a major yellow pigment that has been isolated from the grown rhizome of turmeric. Three major curcuminoids namely curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin occur naturally in this *Curcuma* species. They have a wide range of biological and pharmacological activities, including anti-oxidant, anti-mutagenic activity, and anti-carcinogenic effects. Then, this study focuses on the effect of curcuminoids and it derivatives on the modulation of MMP-3 activity and secretion in breast cancer cells. In the first part of this study, curcuminoid mixture, curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin, and tetrahydrocurcumin were tested for their ability to modulate the activity of MMP-3 by using casein zymography. The result showed that MMP-3 band did not change after incubation of gel (strips) with various concentrations (0, 10, 30, and 60 μ M) of curcuminoids for 18 h, suggested that curcuminoids did not effect on MMP-3 activity. Next, we examine whether each form of curcuminoids affects the viability of cells, MDA-MB-231 cells were exposed to various

concentrations of curcuminoids for 24 h and 48 h and cytotoxicity was determined by MTT assay. Dose- and time- response cytotoxicity profiles for curcuminoids were established for MDA-MB-231 cells. The IC₂₀ values of curcuminoid mixture, curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin, and tetrahydrocurcumin for 24 h were 15.7 ± 3.5 , 20.3 ± 3.1 , 27.7 ± 8.7 , 37.0 ± 1.7 and > 60.0 μM , respectively. In addition, the effect of curcuminoids were studied for their ability to modulate the secretion of MMP-3 using casein zymography, ELISA, and Western blot analysis. The result from casein zymography revealed that treating the cells with non-toxic doses of curcuminoids were reduced secretion of MMP-3 from MDA-MB-231 cells, and at 15 μM , demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin were the most effective to inhibit the secretion of MMP-3 whereas curcumin did not effect. The effect of curcuminoids was confirmed by ELISA assay. The result showed that low concentrations of curcuminoid mixture, curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin could inhibit the secretion of MMP-3 from MDA-MB-231 cells in a dose-dependent manner, whereas tetrahydrocurcumin could not inhibit secretion of MMP-3 were analyzed by ELISA assay. Using western blot analysis, curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin have been shown inhibitory effect on MMP-3 secretion from MDA-MB-231 in a dose-dependent manner. In conclusion, curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin, and tetrahydrocurcumin could not affect on MMP-3 activity but at low concentrations of all compounds except tetrahydrocurcumin showed significantly inhibit MMP-3 secretion or expression in invasive breast carcinoma cells, which demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin were the most strongest inhibitors.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ผลของเคอร์คิวมินอยด์ต่อการทำงานและการแสดงออกของเอนไซม์เมทริก เมทาลโลโปรทีเนส-3 ในเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดรุกรานของมนุษย์

ผู้เขียน นางสาวมณฑพร บุญเรา

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.พรงาม ลีมตระกูล ประธานกรรมการ
ดร.สุวิเวก ลิปิกรโกศล กรรมการ

บทคัดย่อ

การรุกรานและแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง นับเป็นสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิตของผู้ป่วยมะเร็งส่วนใหญ่ โดยในขบวนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งนั้น พบว่า เอนไซม์เมทริก เมทาลโลโปรทีเนส-3 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในเมมเบรนที่กั้นระหว่างชั้นของเซลล์และเมทริก ภายนอกเซลล์สำหรับโรคมะเร็งเต้านมนั้น พบว่ามีเอนไซม์เมทริก เมทาลโลโปรทีเนส-3 ช่วยในการรุกรานของเซลล์มะเร็ง เคอร์คิวมินอยด์ เป็นสารสกัดสีเหลืองจากเหง้าขมิ้นชัน โดยสารประกอบหลักที่พบในพืชตระกูล Curcuma นั้นประกอบด้วยสารประกอบหลัก 3 ตัว ได้แก่ เคอร์คิวมิน ดีเมททอกซีเคอร์คิวมิน และบิสดีเมททอกซีเคอร์คิวมิน เคอร์คิวมินอยด์มีคุณสมบัติต่าง ๆ มากมาย ได้แก่ ฤทธิ์ในการต้านการเกิดสารอนุมูลอิสระ ต้านการเกิดการกลายพันธุ์ และฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้ จึงเป็นการศึกษาผลของเคอร์คิวมินอยด์ต่อการทำงานและการแสดงออกของเอนไซม์เมทริก เมทาลโลโปรทีเนส-3 ในเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดรุกราน ในการทดลองส่วนแรก เป็นการศึกษาฤทธิ์ของเคอร์คิวมินอยด์ต่อการทำงานของเอนไซม์เมทริก เมทาลโลโปรทีเนส-3 จากผลการทดลองพบว่า เมื่อบ่มเซลล์กับเคอร์คิวมินอยด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 0, 10, 30, และ 60 μM เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ขนาดของ band ของเอนไซม์เมทริก เมทาลโลโปรทีเนส-3 ไม่เปลี่ยนแปลง แสดงว่าเคอร์คิวมินอยด์ไม่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เมทริก เมทาลโลโปรทีเนส-3 ได้ การศึกษาลำดับถัดมา เป็นการทดสอบความเป็นพิษของเคอร์คิวมินอยด์ต่อเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดรุกราน โดยวิธี MTT assay เพื่อนำความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ไปใช้ในการทดลองต่อไป จากการทดลองนี้พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นและเวลาในการบ่มเซลล์กับสารเคอร์คิวมินอยด์มากขึ้น อัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลง แปรผันตามความเข้มข้นและเวลา โดยมีค่า IC_{20} ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ของเคอร์คิวมินอยด์รูปผสม เคอร์คิวมิน ดีเมททอกซีเคอร์คิวมิน บิสดีเมททอกซีเคอร์คิวมิน และ เตตระไฮโดรเคอร์คิวมินเป็น

15.7 ± 3.5, 20.3 ± 3.1, 27.7 ± 8.7, 37.0 ± 1.7 และ > 60.0 µM ตามลำดับ การศึกษาในส่วนต่อมาเป็นการทดสอบผลของเคอร์คิวมินออกฤทธิ์ต่อการแสดงออกของเอนไซม์เมทริก เมทาลโลโปรทีเนส-3 ซึ่งวิธีที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ มี 3 วิธี โดยวิธีแรก คือ casein zymography และวิธีที่สอง คือ ELISA และ วิธีที่สาม คือ Western blot analysis สำหรับวิธีแรก พบว่า เคอร์คิวมินออกฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของเคอร์คิวมิน บิสดีเมททอกซีเคอร์คิวมิน และ เตตระไฮโดรเคอร์คิวมิน สามารถลดการหลั่งของเอนไซม์เมทริก เมทาลโลโปรทีเนส-3 ได้ โดยพบว่าดีเมททอกซีเคอร์คิวมิน และ บิสดีเมททอกซีเคอร์คิวมิน ที่ความเข้มข้น 15 µM สามารถยับยั้งการหลั่งของเอนไซม์เมทริก เมทาลโลโปรทีเนส-3 ได้ดีที่สุด ในขณะที่เคอร์คิวมินไม่สามารถลดการหลั่งของเอนไซม์นี้ได้ จากนั้นยืนยันผลของเคอร์คิวมินออกฤทธิ์ต่อการหลั่งของเอนไซม์เมทริก เมทาลโลโปรทีเนส-3 โดยวิธี ELISA พบว่า เคอร์คิวมินออกฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของเคอร์คิวมิน บิสดีเมททอกซีเคอร์คิวมิน และบิสดีเมททอกซีเคอร์คิวมินที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ สามารถลดการหลั่งของเอนไซม์เมทริก เมทาลโลโปรทีเนส-3 ได้เป็นแบบแปรผันตามความเข้มข้น โดยพบว่าดีเมททอกซีเคอร์คิวมิน และ บิสดีเมททอกซีเคอร์คิวมิน ที่ความเข้มข้น 15 µM สามารถยับยั้งการหลั่งของเอนไซม์เมทริก เมทาลโลโปรทีเนส-3 ได้ดีที่สุด ในขณะที่ เตตระไฮโดรเคอร์คิวมิน ไม่สามารถลดการหลั่งของเอนไซม์นี้ได้ และสำหรับวิธี Western blot analysis พบว่า เคอร์คิวมิน บิสดีเมททอกซีเคอร์คิวมิน และ บิสดีเมททอกซีเคอร์คิวมิน สามารถยับยั้งการหลั่งของเอนไซม์เมทริก เมทาลโลโปรทีเนส-3 ได้ แบบแปรผันตามความเข้มข้น จากการศึกษาทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่า ถึงแม้ว่าเคอร์คิวมินออกฤทธิ์แต่ละรูปแบบไม่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เมทริก เมทาลโลโปรทีเนส-3 แต่เคอร์คิวมินออกฤทธิ์ทุกตัว ยกเว้น เตตระไฮโดรเคอร์คิวมิน ที่ความเข้มข้นต่ำ สามารถไปลดการแสดงออกของเอนไซม์เมทริก เมทาลโลโปรทีเนส-3 ได้ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยที่ ดีเมททอกซีเคอร์คิวมิน และ บิสดีเมททอกซีเคอร์คิวมิน สามารถยับยั้งการหลั่งของเอนไซม์เมทริก เมทาลโลโปรทีเนส-3 ได้ดีที่สุด