Thesis Title Effect of Curcumin and Its Derivatives on Extracellular Matrix and Adhesive Proteins in Cancer Cells Invasion

Author Mr. Supachai Yodkeeree

Degree Doctor of Philosophy (Biochemistry)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr.Pron-ngarm Dejkriengkraikul	Chairperson
Asst. Prof. Dr.Songyot Anuchapreeda	Member
Dr. Suwiwek Lipigorngoson	Member

ABSTRACT

Metastasis is a characteristic of highly malignant cancers with poor clinical outcome. Tumor cell metastasis is a complex cascade of events, including cells adhesion, invasion, and angiogenesis. Degradation of extracellular matrix (ECM) by proteolytic enzymes is a crucial step in tumor metastasis. The key proteases that are involved in the degradation of the ECM are the urokinase plasminogen activator (uPA) and matrix metalloproteinases (MMPs). Therefore, to regulate the expression and activity of ECM degradation enzymes are considered as target for therapeutic intervention. Curcumin (Cur), a component of turmeric (*Curcuma longa* Linn), has been reported to exhibit antimetastatic activity, but the mechanisms remain unclear. Other curcuminoid present in turmeric, demethoxycurcumin (DMC), bisdemethoxycurcumin (BDMC) and major Cur metabolite, tetrahydrocurcumin (THC) have not been investigated whether they exhibit antimetastic activity to the same extent as Cur. In the first set of study, the influence of Cur, DMC and BDMC on the expression of uPA, MMP-2, MMP-9, membrane Type 1 MMP (MT1-MMP), tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2), and *in vitro* invasiveness of HT1080 human fibrosarcoma were investigated. The results from the Boyden chamber assay indicated that the differential potency for inhibition of HT1080 cells invasion was

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

BDMC≥DMC>Cur, whereas the cell migration was not affected. The result from cell adhesion assay showed that Cur, DMC and BDMC reduced HT1080 cells adhesive to Matrigel and laminin with difference potency which was DMC>BDMC>Cur. Moreover, DMC and BDMC at 20 μM reduced the cells adhesion to collagen type IV but not Cur. Zymography analysis exhibited that Cur, DMC and BDMC significantly decreased uPA, active-MMP-2, and MMP-9 but not pro-MMP-2 secretion from HT1080 cells in a dose-dependent manner, in which BDMC and DMC show higher potency than Cur. Moreover, Cur, DMC, and BDMC also reduced the expression level of MT1-MMP in HT1080 cells, with DMC and BDMC show higher potency than Cur. Importantly, Cur, DMC, and BDMC at 10 μM decreased the balance ratio of MT1-MMP and TIMP-2 which correlated with the result of Cur, DMC, and BDMC prevented pro-MMP-2 activation. In addition, three forms of curcuminoid significantly inhibited collagenase, MMP-2, and MMP-9 but not uPA and MT1-MMP activity. The kinetic of collagenase demonstrated that Cur, DMC and BDMC reduced collagenase activity by non-competitive inhibition. As THC is commonly know as a major active metabolite from of Cur in human and rodent. Next investigate, the effect of THC on HT1080 cells invasion was determined. Treatment with THC at the concentrations rang of 50-100 μM reduced HT1080 cells invasion and migration in a dose-dependent manner. THC also decreased the cell adhesion to Matrigel and laminin. Analysis by Zymography demonstrated that treatment with THC at the concentrations range of 50-100 μM reduced the secretion levels of MMP-2, MMP-9, and uPA in culture supernatant of HT1080 cells. Whereas, the expression levels of MT1-MMP and TIMP-2 proteins were inhibited with THC. On the other hand THC did not effect on collagenase, MMP-2, MMP-9, MT1-MMP, and uPA activity. It has been note that the archived dose of THC was higher than Cur. Moreover, the inhibitory effect of Cur, DMC, BDMC, and THC on the invasion of MDA-MB-231 human breast cancer cells was investigated, and the most potency compound was selected to further explore the molecular mechanism on antiinvasion affects. The result from Boyden chamber and Wound healing assay show that Cur, DMC, BDMC, and THC retarded MDA-MB-231 cells invasion and migration with order being,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

DMC>BDMC>Cur>THC. Therefore, DMC was selected to further explore molecular mechanism of antiinvasion properties. MDA-MB-231 cells were treated with DMC showed the decreasing the expression level of ECM degradation- associated proteins including MMP-3, MMP-9, MT1-MMP, uPA, and uPA receptor (uPAR), while uPA inhibitor (PAI-1) expression was upregulated. Moreover, DMC suppressed the expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and chemokine receptor 4, (CXCR4), which is involved in breast cancer cells metastasis. The phosphorylation of PI3K and Akt signaling proteins were inhibited with DMC, whereas it did not affect the phosphorylation of ERK1/2 and JNK MAPK pathway. Further, treating with specific inhibitors for PI3K (wortmanin or LY294002) to MDA-MB-231 cells could reduce the uPA expression. In addition, DMC significantly decreased the nuclear level of nuclear factor kappa B (NF-κB) and the DNA binding ability of NF-κB, which is known to mediate the expression of MMPs, uPA, uPAR, ICAM-1, and CXCR4. These results suggested that DMC inhibited MDA-MB-231 cells invasion by reduction the expression levels of ECM degradation enzymes involving suppression of PI3K/Akt/NF-*κ*B signaling pathway. In summary, Cur, DMC, BDMC, and THC suppressed cancer cells invasion with DMC and BDMC show higher potency than Cur and THC. The inhibition of cancer cell invasion associated with the downregulation of ECM degradation enzymes and the inhibition of cells adhesion to ECM proteins. These finding would encourage many ongoing clinical trails of curcuminoid treatment as a natural adjuvant therapy in cancer treatment.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ผลของเคอร์คิวมินและอนุพันธ์ต่อเมทริกซ์ภายนอกเซลล์และโปรตีนยึดเกาะในกระบวนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง

ผู้เขียน นายศุภชัย ยอดคีรี

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ.ดร.พรงาม	เดชเกรียงไกรกุล	ประธานกรรมการ
ผศ.ดร.ทรงยศ	อนุชปรีดา	กรรมการ
ดร.สุวิเวก	ลิปิกรโกศล	กรรมการ

บทคัดย่อ

การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเป็นลักษณะที่เกิดขึ้นในมะเร็งที่มีความก้าวร้าวเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งจะทำให้อัตราความอยู่รอดของผู้ป่วยลดลง กระบวนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเป็นกระบวนการที่ซับซ้อนซึ่งประกอบไปด้วย การยึดเกาะของเซลล์มะเร็งกับเมทริกซ์ภายนอกเซลล์, การเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็ง และการสร้างหลอดเลือดใหม่ ทั้งนี้พบว่ากระบวนการย่อยสลายเมทริกซ์ภายนอกเซลล์โดยเอนไซม์เมทริกซ์เมทาโลโปรตีนเนส (MMPs) และยูโรไคเนสพาสมิโนเจน-เอกส์ติเวเตอร์ (uPA) เป็นขั้นตอนที่สำคัญของกระบวนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ดังนั้นการควบคุมการแสดงออกและการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวจึงเป็นอีกแนวทางที่ใช้ในการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง เคอร์คิวมินเป็นสารสำคัญที่สามารถสกัดได้จากเหง้าของขมิ้นชัน *(Curcuma longa* Linn) ซึ่งได้มีการรายงานว่าเคอร์คิวมินสามารถยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งได้ แต่อย่างไรก็ตามสารเคอร์คิวมินนอยด์ชนิดอื่นที่พบได้ในขมิ้นชันด้วยเช่น ดีเมทอก-ซีสเคอร์คิวมินและบีสดีเมทอกซีสเคอร์คิวมิน รวมทั้งเตตระไฮโดรเคอร์คิวมินซึ่งเป็นสารเมทา-โบไลท์ของเคอร์คิวมินนั้นยังไม่ได้รับการศึกษาฤทธิ์ต่อการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ในการทดลองขั้นต้นนี้ได้ศึกษาเปรียบเทียบผลของเคอร์คิวมิน ดีเมทอกซีสเคอร์คิวมิน และบีสดี-เมทอกซีสเคอร์คิวมินต่อการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งชนิด HT1080 และศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ MMP-2, MMP-9, MT1-MMP, uPA และโปรตีนยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เมทริกซ์เมทาโลโปรตีนเนสชนิดที่ 2 (TIMP-2) ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง โดยผลการศึกษาการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งด้วยวิธี Boyden

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

chamber assay พบว่า เคอร์คิวมิน ดีเมทอกซีสเคอร์คิวมินและบีสดีเมทอกซีสเคอร์คิวมินสามารถยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์ HT1080 ได้โดยที่ดีเมทอกซีสเคอร์คิวมินและบีสดีเมทอกซีสเคอร์-คิวมินจะมีประสิทธิภาพสูงกว่าเคอร์คิวมิน ในขณะที่เคอร์คิวมินนอยด์ทั้งสามชนิดไม่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งชนิด HT1080 อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อศึกษาการยึดเกาะของเซลล์มะเร็งกับเมทริกซ์ภายนอกเซลล์พบว่าเคอร์คิวมิน ดีเมทอกซีสเคอร์คิวมินและบีสดีเมทอกซีสเคอร์คิวมินสามารถลดการจับกันระหว่างเซลล์ HT1080 กับเมทริกซ์ภายนอกเซลล์ชนิดรวม (Matrigel) และโปรตีนเมทริกซ์ภายนอกเซลล์ชนิด laminin โดยที่ ดีเมทอกซีสเคอร์คิวมินจะมีประสิทธิภาพสูงสุดตามมาด้วย บีสดีเมทอกซีสเคอร์คิวมินและเคอร์คิวมิน นอกจากนี้ยังพบว่า ดีเมทอกซีสเคอร์คิวมินและบีสดีเมทอกซีสเคอร์คิวมิน สามารถยับยั้งการจับกันระหว่างโปรตีนเมทริกซ์ภายนอกเซลล์ชนิดคลอลาเจนชนิดที่ 4 กับเซลล์ HT1080 โดยที่ เคอร์คิวมินไม่มีผลต่อการจับดังกล่าวและเมื่อศึกษาการหลั่งของเอนไซม์ uPA, MMP-2 และ MMP-9 ออกจากเซลล์ HT1080 ด้วยวิธี Zymography ก็พบว่าเคอร์คิวมิน ดีเมทอกซีสเคอร์คิวมินและบีสดีเมทอกซีสเคอร์คิวมิน สามารถยับยั้งการหลั่งของเอนไซม์ uPA, MMP-9 และ active MMP-2 แต่ไม่มีผลต่อระดับของ Pro-MMP-2 โดยที่ ดีเมทอก-ซีสเคอร์คิวมิน และบีสดีเมทอกซีสเคอร์คิวมิน จะมีประสิทธิภาพสูงกว่า เคอร์คิวมิน นอกจากนั้นยังพบว่าผลการลดลงของ active MMP-2 เกิดเนื่องจากการลดลงของอัตราส่วนการแสดงออกระหว่าง MT1-MMP และ TIMP-2 ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนรูปของเอนไซม์ MMP-2 โดยจากผลของ Western blot พบว่า ดีเมทอกซีสเคอร์คิวมินและบีสดีเมทอกซีสเคอร์คิวมิน ที่ความเข้มข้น 10 μM สามารถลดการสร้าง MT1-MMP และ TIMP-2 ได้ ในขณะที่ เคอร์คิวมิน สามารถลดการสร้าง MT1-MMP แต่ไม่มีผลต่อการสร้าง TIMP-2 นอกจากนี้ยังพบว่าเคอร์คิวมิน ดีเมทอกซีสเคอร์-คิวมินและบีสดีเมทอกซีสเคอร์คิวมิน ยังสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ คลอลาจีเนส, MMP-2 และ MMP-9 แต่ไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ MT1-MMP และ uPA และเมื่อศึกษาถึงชนิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ คลอลาจีเนส ก็พบว่า เคอร์คิวมิน ดีเมทอกซีสเคอร์คิวมินและบีส-ดีเมทอกซีสเคอร์คิวมิน สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ คลอลาจีเนสแบบ non-competitive ในขณะเดียวกันเมื่อศึกษาผลของเตตระไฮโดรเคอร์คิวมินซึ่งเป็นสารเมทาโบไลท์ที่สำคัญของเคอร์-คิวมินที่พบได้ในคนและหนูต่อการเคลื่อนที่และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งก็พบว่าเตตระ-ไฮโดรเคอร์คิวมินที่ช่วงความเข้มข้น 50-100 ไมโครโมลาร์ สามารถลดการเคลื่อนที่และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งชนิด HT1080 ได้ นอกจากนี้เตตระไฮโดรเคอร์คิวมินยังลดการยึดเกาะกันระหว่างเซลล์กับเมทริกซ์ภายนอกเซลล์ชนิดรวมและองค์ประกอบภายนอกเซลล์ชนิด laminin

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณการหลั่งของเอนไซม์ MMP-2, MMP-9 และ uPA ด้วยวิธี Zymography ก็พบว่า เตตระไฮโดรเคอร์คิวมินที่ช่วงความเข้มข้น 50-100ไมโคโลลาร์ สามารถยับยั้งการหลั่งของเอนไซม์ดังกล่าวได้ นอกจากนี้เตตระไฮโดรเคอร์คิวมินยังสามารถลดการแสดงออกของ MT1-MMP และ TIMP-2 ในเซลล์ HT1080 ได้อีกด้วย แต่อย่างไรก็ตามเตตระไฮโดรเคอร์คิวมินไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ คลอลาจีเนส, MMP-2, MMP-9, MT1-MMP และ uPA อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสนใจว่าความเข้มข้นที่ เตตระไฮโดรเคอร์คิวมิน สามารถยับยั้งการแพร่กระจายและการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องนั้น จะมีความเข้มข้นที่สูงกว่าเคอร์คิวมิน นอกจากนี้ยังศึกษาผลของเคอร์-คิวมิน ดีเมทอกซีสเคอร์คิวมิน บีสดีเมทอกซีสเคอร์คิวมิน และ เตตระไฮโดรเคอร์คิวมิน ต่อการยับยั้งการแพร่กระจายในเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 แล้วเลือกเอาสารที่มีประสิทธิภาพสูงสุดมาทำการศึกษาถึงกลไกการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์ MDA-MB-231 จากผลของ Boyden chamber assay และ Wound healing assay ซึ่งใช้ศึกษาการแพร่กระจายและการเคลื่อนที่ของเซลล์ MDA-MB-231 พบว่า เคอร์คิวมิน ดีเมทอกซีสเคอร์คิวมิน บีสดีเมทอกซีสเคอร์คิวมิน และเตตระไฮโดรเคอร์คิวมิน สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่และการแพร่กระจายของเซลล์ MDA-MB-231 ได้โดยที่ ดีเมทอกซีสเคอร์คิวมิน จะมีประสิทธิภาพสูงสุดตามมาด้วยบีสดีเมทอกซีสเคอร์คิวมิน และเคอร์คิวมินตามลำดับส่วนเตตระไฮโดรเคอร์คิวมินจะมีประสิทธิภาพน้อยสุด ดังนั้น ดีเมทอก-ซีสเคอร์คิวมินจึงถูกเลือกไปทำการทดลองหากลไกการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์ MDA-MB-231 ต่อไป โดยพบว่าดีเมทอกซีสเคอร์คิวมินสามารถลดการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเมทริกซ์ภายนอกเซลล์ คือ MMP-9, MT1-MMP, uPA, ยูโรไคเนสพาสมิโนเจนเอกส์-ติเวเตอร์รีเซบเตอร์ (uPAR) และเพิ่มการแสดงออกของโปรตีนยับยั้งการทำงานของพาสมิโนเจน-เอกส์ติเวเตอร์ชนิดที่ 1 (PAI-1) นอกจากนั้น ดีเมทอกซีสเคอร์คิวมินยังสามารถลดการแสดงออกของโปรตีนยึดเกาะชนิด ICAM-1 และโปรตีนซีเอกซ์ซีอาห์ 4 (CXCR-4) ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเต้านม ทั้งนี้ยังพบอีกว่า ดีเมทอกซีสเคอร์คิวมิน สามารถลดการเกิด ฟอสโฟลิเลชั่น ของ PI3K/Akt signaling pathway แต่ไม่มีผลต่อการเกิดฟอสโฟลิเลชั่นของ ERK1/2 และ JNK MAPK แต่เมื่อทดสอบปริมาณของ NF-KB ทรานสคลิปชันแฟกเตอร์ในนิว-เคียสและไซโทพลาซัมก็พบว่าดีเมทอกซีสเคอร์คิวมิน สามารถลดปริมาณ NF-KB ในนิวเคียสแต่ไม่มีผลในไซโทพลาซัม นอกจากนี้เมื่อวัดการจับกันระหว่าง NF-KB กับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสนิว-คลีโอไทด์ซึ่งจำเพาะกับ NF-KB ด้วยวิธี EMSA ก็พบว่าดีเมทอกซีสเคอร์คิวมิน สามารถลดการจับกันระหว่าง NF-KB กับ ดีเอ็นเอที่จำเพาะได้ โดยที่ NF-KB ทรานสคิปชันแฟกเตอร์จะทำหน้าที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ควบคุมการแสดงออกของโปรตีนหลายชนิดซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง เช่น MMP-9, MT1-MMP, uPA, uPAR, ICAM-1 และ CXCR-4 เป็นต้น ดังนั้นจากผลการทดลองข้างต้นทำให้สามารถกล่าวได้ว่า ดีเมทอกซีสเคอร์คิวมินสามารถยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์ MDA-MB-231 ได้โดยลดการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเมทริกซ์ภายนอกเซลล์ผ่านการควบคุมทางสัญญาณ PI3K/Akt/NF-ΚB เมื่อรวมเอาผลการทดลองทั้งหมดเข้าด้วยกัน ทำให้สามารถสรุปได้ว่า เคอร์คิวมิน ดีเมทอกซีสเคอร์คิวมิน บีสดีเมทอกซีสเคอร์คิวมิน และ เตตระไฮโดรเคอร์คิวมิน สามารถยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งได้โดยที่ ดีเมทอกซีสเคอร์คิวมิน และบีสดีเมทอกซีสเคอร์คิวมิน จะมีประสิทธิภาพสูงกว่า เคอร์คิวมิน และเตตระไฮโดรเคอร์คิวมินจะมีประสิทธิภาพต่ำสุด โดยที่กลไกการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งจะทำได้ผ่านการลดการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเมทริกซ์ภายนอกเซลล์รวมทั้งลดการยึดเกาะกันระหว่างเซลล์มะเร็งกับองค์ประกอบภายนอกเซลล์ ดังนั้นในการค้นพบครั้งนี้จึงเป็นอีกหนึ่งข้อมูลที่จะนำเอาเคอร์คิวมินนอยด์ไปใช้ในศึกษาวิจัยทางคลินิกต่อ เพื่อเป้าหมายในการนำเอาสารสกัดจากธรรมชาติไปใช้ในการรักษายับยั้งการแพร่กระจายของมะเร็ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved