Thesis Title Effects of Pinocembrin on the Expression of Matrix Metalloproteinases and Involved Signaling Pathway in Synovial Fibroblasts

Author Ms. Nawarat Viriyakhasem

Degree Master of Science (Biochemistry)

Thesis Advisory Committee

Asst. Prof. Dr. Siriwan Ongchai Chairperson

Assoc. Prof. Dr. Prachya Kongtawelert Member

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is an inflammatory disease characterized by a chronic inflammation of synovial joints that leads to a progressive destruction of articular structure, causing severe morbidity and disability. Pinocembrin, the flavonoid that extracted from *Boesenbergia pandurata* Roxb., possesses *in vitro* chondroprotective activities. Aim of this study was to investigate the effect of pinocembrin on lipopolysaccharide (LPS)-induced cartilage matrix metalloproteinases (MMPs) expression and involved signaling pathway in human synovial fibroblasts.

Primary human synovial fibroblasts (SF) were cultured in serum free-DMEM. The cells were treated with an inflammatory stimulator named lipopolysaccharide (LPS), a component of cell walls of gram-negative bacteria, or inflammatory cytokine (interleukin-1β; IL-1β) with or without of pinocembrin 12.5-100 μM for 24 hours. The culture medium was collected to analyzed gelatinolytic and caseinolytic activity by zymographic technique. The total RNA were

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

extracted from cells, then expression of interesting genes were measured by reverse transcriptase-polymerase chain reaction technique (RT-PCR). Cytotoxicity was also determined using MTT assay.

LPS (25-400 ng/ml) and IL-1β (1-10 ng/ml) dramatically increased the expression of MMP-1, MMP-3, MMP-13, IL-1β and interleukin-1 converting enzyme (ICE) genes. Co-incubation of LPS or IL-1β with pinocembrin (12.5-100 μM) decreased ICE and MMPs mRNA levels, which were consistent with the reduction of enzyme activities in the culture medium. LPS was found to up-regulate the mRNA expression of only Toll-like receptor 4, but not MyD88. Pinocembrin, in co-incubation with LPS, was not able to decrease Toll-like receptor 4 mRNA. Regarding to cytotoxicity test, pinocembrin, in range 12.5-100 μM, was not toxic to SF.

These results indicated that LPS stimulated IL-1β expression via Myd88-independent pathway, resulted in up-regulation of MMPs expression. Pinocembrin has ability to decrease the effect of both LPS and IL-1β on expression of MMPs, which may not involved in Toll-like receptor 4 and MyD88 pathway. Hypothetically, pinocembrin may reduce MMPs expression *via* reduction of ICE expression, resulted in the decrease in activity of IL-1β-induced MMPs expression. Therefore, pinocembrin has high potential to be developed for therapeutic purpose in management of osteoarthritis and inflammatory joint diseases.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ผลของสารพิโนเซมบรินต่อการแสดงออกของเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส และวิถีการส่งสัญญาณที่เกี่ยวข้องในเซลล์สร้างเส้นใยในไขข้อ

ผู้เขียน นางสาว นวรัตน์ วิริยะเขษม

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผศ.ดร. ศิริวรรณ องค์ไชย **ประธานกรรมการ**

รศ.ดร. ปรัชญา คงทวีเลิศ **กรรมการ**

บทคัดย่อ

ข้ออักเสบรูมาตอยด์ เป็นโรคที่มีภาวะการอักเสบเรื้อรังของข้อซึ่งนำไปสู่การทำลายเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนข้อต่อต่างๆในร่างกาย ส่งผลให้เคลื่อนไหวลำบาก จนอาจทำให้เกิดความพิการ พิโนเซมบริม (pinocembrin) เป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์สกัดได้จากกระชาย ซึ่งมีรายงานว่ามีฤทธิ์ต้านการสลายกระดูกอ่อนในหลอดทดลอง จุดประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้เพื่อศึกษาผลของสารพิโนเซมบรินต่อเซลล์สร้างเส้นใยในไขข้อของมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide; LPS) ในการแสดงออกของยีนเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสลายกระดูกอ่อน (matrix metalloproteinases; MMPs) รวมทั้งวิถีการส่งสัญญาณที่เกี่ยวข้อง

เซลล์สร้างเส้นใยในไขข้อของมนุษย์ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ serum-free DMEM ในภาวะที่มีสารกระตุ้นการอักเสบ LPS ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบหรือสารก่ออักเสบอินเตอลิวคิน-1เบต้า (IL-1β) ในภาวะที่มีและไม่มีสารพิโนเซมบรินที่ความเข้มข้น 12.5-100 μM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บน้ำเลี้ยงเซลล์มาวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ เมทริกซ์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เมทัลโลโปรตีเนส (MMPs) กลุ่มที่สลายเจลาติน (gelatinolytic activity) และกลุ่มที่สลายเคซีน (caseinolytic activity) โดยเทคนิคไซโมกราฟฟิค (zymographic technique) เซลล์ถูกนำมาสกัดอาร์เอนเอ (RNA) เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนที่สนใจด้วยวิธี reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) และทดสอบความเป็นพิษของสารพิโนเซมบรินต่อเซลล์สร้างเส้นใยในไขข้อด้วยวิธี MTT assay

เมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย LPS ที่ความเข้มข้น 25-400 ng/ml หรือ IL-1β ที่ความเข้มข้น 1-10 ng/ml เพิ่มการแสดงออกของยีน MMP-1, MMP-3, MMP-13 รวมทั้ง IL-1β และ interleukin-1 converting enzyme (ICE) แต่เมื่อบ่มเซลล์ที่มี LPS หรือ IL-1β ร่วมกับสารพิโนเซมบรินที่ความเข้มข้น 12.5-100 μM พบว่าระดับเอ็มอาร์เอนเอของ ICE และ MMPs ลดลงสอดคล้องกับการทำงานที่ลดลงของเอนไซม์ในน้ำเลี้ยงเซลล์ พบว่า LPS เพิ่มปริมาณเอ็มอาร์เอนเอของ Toll-like receptor 4 แต่ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณเอ็มอาร์เอนเอของ MyD88 และแม้จะบ่ม LPS ร่วมกับสารพิโนเซมบรินก็ไม่ลดปริมาณเอ็มอาร์เอนเอของ Toll-like receptor 4 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารพิโนเซมบรินที่ความเข้มข้น 12.5-100 μM ไม่พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างเส้นใยในไขข้อของมนุษย์

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า LPS กระตุ้นการแสดงออกของ IL-1β โดยไม่ผ่านวิถีของ MyD88 ส่งผลให้มีการแสดงออกของ MMPs เพิ่มขึ้น สารพิโนเซมบรินสามารถลดฤทธิ์ของทั้ง LPS และ IL-1β ในการเหนี่ยวนำการแสดงออกของ MMPs โดยมีข้อสมมุติฐานว่าไม่น่าจะเกี่ยวข้องกับ Toll-like receptor และ MyD88 แต่น่าจะผ่านวิถีที่เกี่ยวข้องกับการลดการแสดงออกของ ICE ส่งผลให้การทำงานของ IL-1β ลดลง จึงทำให้การแสดงออกของ MMPs ลดลงในที่สุด สารพิโนเซมบรินจึงมีศักยภาพที่จะพัฒนาเป็นยารักษาโรคข้อเสื่อมหรือข้ออักเสบได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved