Thesis Title Effect of (E)-1-(3',4'-Dimethoxyphenyl) Butadiene on LPS-Induced Matrix Metalloproteinases in a Human Synovial Fibroblast Cell Line; SW982

Author Miss Phorani Boonsing

Degree Master of Science (Biochemistry)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Siriwan Ongchai Chairperson

Assoc. Prof. Dr. Prachya Kongtawelert Member

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory disease of the synovium. The disease is able to be induced by lipopolysacharide (LPS), which up-regulated the expressions of matrix metalloproteinases (MMPs), resulted in cartilage and bone destruction. Treatments made from medicinal plants, *Zingiber cassumunar* Roxb. (Plai), have long been alternatively used in RA. The aim of this study was to investigate the inhibitory effects of active compound isolated from Plai, (E)-1-(3',4'-Dimethoxyphenyl) Butadiene (DMPBD), on MMPs expression which stimulated by LPS.

SW982 cell line were co-treated with 0.3 μg/ml LPS in absence or presence of various concentrations of DMPBD (1-100 μM) and dexamethasone was used as a positive control. Following 24 hours of incubation, cultured medium was collected to analyze MMP activities by gelatin or casein zymography. Total RNA was extracted to

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

analyze MMP expressions and related genes such as Toll-like receptor-4 (TLR-4), Interleukin-1beta (IL-1ß), and Interleukin-1beta converting enzyme (ICE) by reverse transcriptase-polymerase chain reaction technique (RT-PCR). Cytotoxicity was determined by MTT assay.

It was found that 0.3 µg/ml LPS dramatically increased mRNA expressions and enzymatic activities of MMP-1, -2, -3, and -13. These effects of LPS were inhibited when cells were co-treated with LPS and DMPBD. The results showed that 100 µM of DMPBD was significantly inhibited MMP-1, -2, -3, and -13 mRNA expressions ($p<0.05$) at 37.2, 14.2, 29.2, and 23.4%, when compared with LPS-treated cells, respectively. These agreed with the reductions of gelatinolytic activity of MMP -2 and caseinolytic activities indicated groups of MMP-1, -3, and -13 in cultured medium at 24.6 and 13.8%, respectively, similar with dexamethasone, an anti-rheumatic agent. Regarding TLR-4, IL-1ß, and ICE expressions, co-treated cells with LPS and dose of DMPBD at 100 µM significantly reduced the expressions of these genes ($p<0.05$). These results suggested that DMPBD contained anti-arthritic activity by decrease in genes expression of MMP enzymes, which caused cartilage degradation in RA. This may involve in down regulation of LPS receptor (TLR-4) and ICE expressions, resulted in reduction of IL-1ß protein in both pro-form and active form which plays an important role in up-regulation of MMPs.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ผลของสาร (E)-1-(3',4'-Dimethoxyphenyl) Butadiene ต่อการแสดงออกของเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส ที่ถูกเหนี่ยวนำโดยไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ในเซลล์สายพันธุ์ของเซลล์สร้างเส้นใยในไขข้อมนุษย์

ผู้เขียน นางสาวภรณี บุญสิงห์

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ.ดร. ศิริวรรณ องค์ไชย ประธานกรรมการ

รศ.ดร. ปรัชญา คงทวีเลิศ กรรมการ

บทคัดย่อ

รูมาตอยด์ เป็นโรคที่มีการอักเสบเรื้อรังของเยื่อบุหุ้มข้อ โรคชนิดนี้สามารถถูกกระตุ้นด้วยไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ (LPS) ทำให้เกิดการสังเคราะห์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีเนส (MMPs) ต่าง ๆ มากผิดปกติ ส่งผลให้กระดูกอ่อนและกระดูกถูกทำลาย การรักษาด้วยพืชสมุนไพรที่มีใช้กันมานาน เช่น *Zingiber cassumunar* Roxb. (ไพล) เป็นทางเลือกหนึ่งในการบรรเทาอาการของโรค การศึกษาครั้งนี้ ต้องการทดสอบผลการยับยั้งของสารออกฤทธิ์ที่แยกได้จากไพลคือ (E)-1-(3',4'-Dimethoxy phenyl) Butadiene (DMPBD) ต่อการแสดงออกของ MMPs ซึ่งถูกกระตุ้นด้วย LPS

เซลล์สายพันธุ์ของเซลล์สร้างเส้นใยในไขข้อ (SW982) ถูกเลี้ยงในน้ำเลี้ยงที่มี LPS ที่ระดับความเข้มข้น 0.3 μg/ml ภายใต้ภาวะที่ไม่มีหรือมีสาร DMPBD ที่ระดับความเข้มข้น 1-100 μM และใช้ยา dexamethasone เป็นกลุ่มควบคุมมาตรฐาน (positive control) หลังจาก 24 ชั่วโมง เก็บน้ำเลี้ยงเซลล์มาวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ MMPs โดยวิธีเจลาตินไซโมกราฟฟี่ หรือเคซีนไซโมกราฟฟี่ พร้อมทั้งเก็บเซลล์มาสกัดอาร์เอนเอ เพื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีน MMPs และยีนอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ TLR-4, IL-1ß, และ ICE ด้วยวิธี reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) รวมทั้งวัดความเป็นพิษต่อเซลล์ของสาร DMPBD ด้วยวิธี MTT assay

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

พบว่า LPS ที่ระดับความเข้มข้น 0.3 μg/ml เพิ่มการแสดงออกของยีนและการทำงานของเอนไซม์ MMP-1, -2, -3 และ -13 ได้อย่างชัดเจน แต่ผลนี้จะถูกยับยั้งเมื่อเซลล์ถูกเลี้ยงในภาวะที่กระตุ้นด้วย LPS ร่วมกับสาร DMPBD โดยพบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของสาร DMPBD เป็น 100 μM ลดการแสดงออกของยีน MMP-1, -2, -3 และ -13 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) คิดเป็นร้อยละ 37.2, 14.2, 29.2 และ 23.4% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่กระตุ้น LPS เพียงอย่างเดียว ซึ่งสอดคล้องกับการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 โดยวิธีเจลาตินไซโมกราฟฟี่ และการทำงานของกลุ่มเอนไซม์ MMP-1, -3 และ -13 โดยวิธีเคซีนไซโมกราฟฟี่ ในน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ลดลงร้อยละ 24.6 และ 13.8% ตามลำดับ คล้ายกับยา dexamethasone ที่มีประสิทธิภาพในการรักษาโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ นอกจากนี้ยังพบว่า ภาวะกระตุ้นด้วย LPS ร่วมกับสาร DMPBD ที่ระดับความเข้มข้น 100 μM ลดการแสดงออกของยีน TLR-4, IL-1ß, และ ICE ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) จากผลการทดลอง ชี้ให้เห็นว่า สาร DMPBD มีคุณสมบัติต้านการอักเสบของข้อ โดยลดการแสดงออกของยีน MMPs กลุ่มต่าง ๆ ที่ก่อให้เกิดการทำลายกระดูกอ่อนในโรคข้อเสื่อมอักเสบรูมาตอยด์ กลไกนี้อาจเกี่ยวข้องกับการลดการแสดงออกของ TLR-4 และ ICE ส่งผลให้ลดระดับโปรตีน IL-1ß ทั้งในรูปที่ยังไม่พร้อมทำงาน (pro-form) และรูปที่ทำงานได้ (active form) ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการเพิ่มการแสดงออกของ MMPs

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved