

วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้านี้เพื่อเปรียบเทียบผลของ curcumin กับ tetrahydrocurcumin ต่อการเกิดหลอดเลือดใหม่ในหนูชนิดเมาส์ที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งระดับชนิด HepG2 และเพื่อศึกษากลไกการทำงานของ curcumin และ tetrahydrocurcumin ต่อการเกิดหลอดเลือดใหม่ในหนูชนิดเมาส์ที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งระดับชนิด HepG2

วิธีการทดลองประกอบด้วยส่วนของ *In vitro* และ *In vivo* study สำหรับ *In vitro* study ทำการทดสอบ anti-proliferation effect ต่อ HepG2 cell line ของเคอร์คูมินและ tetrahydrocurcumin ด้วย MTT method ส่วนใน *In vivo* study ทำการทดลองในหนู BALB/C นูตไมซ์พันธุ์ น้ำหนัก 20-25 กรัม โดยกลุ่ม HepG2 ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งระดับ (HepG2) (2×10^6 เซลล์ใน 30 ไมโครลิตร) บน dorsal skin-fold chamber ส่วนกลุ่มควบคุมได้รับ normal saline แทน (Con) 1 วันภายหลังการปลูกถ่ายเซลล์ HepG2 สัตว์ทดลองกลุ่ม (Con และ HepG2) และ (HepG2-CUR และ HepG2-THC) ถูกป้อนด้วย 0.1% dimethyl sulfoxide (DMSO) และ CUR และ THC ขนาด 150, 300 และ 3,000 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัมตามลำดับ วันที่ 7, 14 และ 21 หลังได้รับการรักษา ทำการบันทึกภาพหลอดเลือดขนาดเล็กบริเวณการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งภายใต้กล้อง Intravital fluorescent videomicroscopy ด้วยการฉีด 0.1 มิลลิลิตรของ 5% fluorescein isothiocyanate-labeled dextran (FITC-dextran) เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ซึ่มี VEGF และ COX-2 โปรตีนในเนื้อเยื่อถูกวัดโดยใช้ชุดตรวจ VEGF ELISA และ Immunohistochemistry ตามลำดับ นอกจากนี้ยังศึกษาระดับ transcription factor คือ NF- κ B ด้วยชุดตรวจ NF- κ B ELISA ด้วย

ผล anti-proliferation พบว่า IC_{50} ของ CUR และ THC มีค่าเท่ากับ 85.98 และ 233.12 μ M ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงให้เห็น cytotoxic effect ของ THC ต่ำกว่า CUR ส่วนผลการศึกษาการเกิดหลอดเลือดใหม่ ซึ่งบันทึกด้วยวิดีโอถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Image software เพื่อหาค่า % capillary density พบว่าความหนาแน่นของหลอดเลือดใหม่ ในกลุ่ม HepG2 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในวันที่ 7 (52.43%), 14 (69.17%) และ 21 (74.08%), เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่อายุเท่ากัน (33.04%) ($p < 0.001$)

14 วันหลังการรักษาด้วย CUR และ THC ขนาด 300 mg/kgBW พบว่า % capillary density ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (56.96%, $p < 0.05$ และ 52.82%, $p < 0.001$ ตามลำดับ) การเพิ่มขนาดของการรักษาด้วย CUR และ THC ขนาด 3,000 mg/kgBW มีผลลด % capillary density มากขึ้น (48.86% และ 41.37% ตามลำดับ, $p < 0.001$)

21 วันหลังการรักษาด้วย CUR และ THC ขนาด 300 mg/kgBW พบว่า % capillary density ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (68.13%, $p < 0.001$ และ 58.88%, $p < 0.001$ ตามลำดับ) การเพิ่มขนาดของการรักษาด้วย CUR และ THC ขนาด 3,000 mg/kgBW มีผลลด % capillary density มากขึ้น (52.86% และ 44.96% ตามลำดับ, $p < 0.001$) เช่นกัน ฤทธิ์การต้านการเกิดหลอดเลือดใหม่ของ THC มีมากกว่า CUR อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) นอกจากนี้การรักษาด้วย CUR และ THC ยังทำให้หลอดเลือดใหม่ที่มีลักษณะ dilatation, tortuosity และ hyper-permeability ลดลงอีกด้วย

ผลการศึกษาพบว่า การแสดงออกของ COX-2 expression เพิ่มขึ้นตั้งแต่ 7 วันหลังการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง HepG2 ยิ่งไปกว่านั้น COX-2 expression ยังมากขึ้นตามระยะเวลาของการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งด้วย คือมีการแสดงออกของ COX-2 expression ในวันที่ 7 < 14 < 21 วันตามลำดับ การศึกษาค้นคว้านี้แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ COX-2 และความหนาแน่นของหลอดเลือดขนาดเล็ก ในกลุ่ม HepG2

ด้วย การแสดงออกของ COX-2 ถูกยับยั้งด้วยการรักษาด้วย CUR และ THC ที่ขนาด 3,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

ผลซีรัม VEGF เพิ่มขึ้นในกลุ่ม 7,14 และ 21 วัน HepG2 (133.43, 152, 153.94 pg/ml ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม ควบคุมที่อายุเท่ากันอย่างชัดเจน (63.85, $p < 0.001$) การเพิ่มขึ้นของซีรัม VEGF ในกลุ่ม HepG2 แสดงการลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ด้วยการรักษาด้วย CUR (84.02, 102.33, 122.07 pg/ml, ตามลำดับ) และ THC (109.91, 82.56, 101.41 pg/ml, ตามลำดับ) ที่ขนาด 3,000 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัมหลังจาก 7, 14 และ 21 วันของการรักษา โดย THC มีแนวโน้มที่จะลดระดับซีรัม VEGF ได้ดีกว่า CUR

สำหรับผลของ CUR และ THC ต่อระดับ NF-kB พบว่า การรักษาด้วย CUR และ THC ทุกขนาด ความเข้มข้นคือตั้งแต่ 10, 25 และ 50 μM มีผลลดระดับของ NF-kB อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) และการลดระดับของ NF-kB จะลดลงตามขนาดความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นด้วย และเมื่อเปรียบเทียบผลของการรักษาระหว่าง CUR และ THC พบว่าที่ขนาดความเข้มข้นเท่ากัน CUR มีผลลดระดับของ NF-kB ได้ดีกว่า THC อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$)

ผลการทดลองสรุปว่า CUR และ THC มีฤทธิ์ต้านการเกิดหลอดเลือดใหม่ซึ่งสัมพันธ์กับขนาดของความเข้มข้น THC มีแนวโน้มในการยับยั้งการเกิดหลอดเลือดใหม่ที่ดีกว่า curcumin แม้จะมีฤทธิ์ cytotoxic ที่ต่ำกว่า CUR นอกจากนี้ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่า COX-2 และ VEGF มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับการเกิดหลอดเลือดใหม่ในโมเดลการปลูกถ่ายเซลล์ HepG2 ในหนูหนูไม่ช้ โดย THC มีแนวโน้มที่จะลด COX-2 expression และ ซีรัม VEGF ได้ดีกว่า CUR อย่างไรก็ตาม CUR มีผลลดระดับ NF-kB ได้ดีกว่า THC ดังนั้น THC อาจทำงานในการลด angiogenic biomarkers คือ COX-2 และ VEGF ผ่าน transcription factor ตัวอื่นนอกเหนือจาก NF-kB ได้ดีกว่า CUR ซึ่งกลไกระดับเซลล์ของ THC ต่อการทำงานของ angiogenic biomarkers ทั้งสองชนิดจะได้ทำการศึกษาต่อไป

The objectives of this study are to determine the effects of curcumin (CUR) and tetrahydrocurcumin (THC) on anti-angiogenic and anti-cancer activities in hepatocellular carcinoma cells (HepG2) implanted nude mice and to investigate the mechanisms by which CUR and THC exhibit anti-angiogenesis and anti-cancer activities in hepatocellular carcinoma cells (HepG2) implanted nude mice.

Experiments will be conducted both *in vitro* and *in vivo* study. For the *in vitro* study, the antiproliferation effects of CUR and THC on HepG2 cell line were tested by MTT assay. *In vivo* study was performed in male BALB/c nude mice weighing 20-25g. After the implantation of a dorsal skin-fold chamber, the Hepatocellular carcinoma cells (HepG2) (30 μ l of 2×10^6 cells) were then inoculated onto the upper layer of the skin within the chamber (HepG2). The control group (Con.) was received the normal saline instead. One day after the inoculation of HepG2, dimethyl sulfoxide solution (0.1%), CUR and THC (300 or 3,000 mg/kgBW) were fed oral daily to both groups (Con and HepG2) and (HepG2-CUR and HepG2-THC groups), respectively.. On days 7, 14, and 21 post-treatment, the tumor microvasculature was visualized by injecting 0.1 ml of 5% fluorescein isothiocyanate-labeled dextran (FITC-dextran) intravenously, and observed under an intravital fluorescence videomicroscope. At the end of each experiment, serum VEGF and tissue COX-2 protein were determined by using VEGF ELISA kit and immunohistochemistry, respectively. Moreover, level of NF- κ B, transcription factor was also determined by NF- κ B BLISA kit.

The experimental results revealed that The IC_{50} of CUR and THC were 85.98 and 233.12 μ M, respectively. This suggest that THC has less cytotoxic than CUR. Based on the recorded videoimage, the tumor neocapillary density, diameters, and microvasculature were evaluated using a digital image analysis and correlated with tumor area. The image software analysis demonstrated that in the HepG2-group the neocapillary densities were significantly increased on day 7, 14 and day 21 (56.96%, $p < 0.05$ and 52.82%, respectively), compared to the aged-matched control-group ($p < 0.001$). On day 14 post treatment with CUR and THC at the dose of 300 mg/kg significantly attenuated the increase of tumor neocapillary density (58.96%, $p < 0.05$ and 52.82%, $p < 0.001$, respectively). High dose treatment of CUR and THC 3,000 mg/kg significantly attenuated the increase of tumor neocapillary density (48.86% and 41.37%, respectively, $p < 0.001$).

On day 21 post treatment with CUR and THC at the dose of 300 mg/kg significantly attenuated the increase of tumor neocapillary density (68.13%, $p < 0.001$ and 58.88%, $p < 0.001$, respectively). High dose treatment of CUR and THC 3,000 mg/kg significantly attenuated the increase of tumor neocapillary density (52.96% and 44.96%, respectively, $p < 0.001$). The beneficial effect of (3,000-mg/kg) THC treatment than CUR was observed, in particular, from the 21-day CD (44.96% and 52.86%, $p < 0.05$). CUR and THC could also attenuate pathologic features, microvascular dilatation, tortuosity, and hyper-permeability.

Overexpression of COX-2 was demonstrated since 7 days after the inoculation of HepG2. Overexpressions of COX-2 were markedly increased in 21 and 14 days HepG2 groups as compared to 7 days HepG2 group and aged-matched control groups. Moreover, the present study demonstrated

the significantly relationship between COX-2 expression and neocapillary density in HepG2 groups. Overexpressions of COX-2 were attenuated by high dose treatment of both CUR and THC.

Sera VEGF were markedly increased in 7, 14 and 21 days HepG2 groups (133.43, 152, 153.94 pg/ml) as compared to aged-matched control groups (63.85, $p < 0.001$). Elevations of serum VEGF in HepG2 groups were reduced by CUR (84.02, 102.33, 122.07 pg/ml, respectively) and THC (109.91, 82.56, 101.41 pg/ml, respectively) treatment at the dose of 3,000 mg/kgBW after 7, 14 and 21 days of the treatment. THC treatment have shown trend to decrease in sera VEGF level than CUR.

The effect of CUR and THC on NF- κ B level demonstrated that all doses treatment (10, 25, and 50 μ M) of CUR and THC significantly attenuated NF- κ B level ($p < 0.001$). The effects of CUR and THC on suppression of NF- κ B level were dose-dependent manner. However, the beneficial effects of all doses CUR treatments on suppression of NF- κ B level than THC were observed.

Finally, it was concluded that both CUR and THC have shown to produce both anti-proliferation and anti-angiogenesis at different manner. More potent tumor anti-angiogenesis was observed for THC. COX-2 and VEGF are closely related to tumor angiogenesis in the HepG2-implanted nude mice model. THC treatment have shown trend to decrease in sera VEGF level and COX-2 expression than CUR. However, the beneficial effects of all doses CUR treatments on suppression of NF- κ B level than THC were observed. Therefore, the activity of THC in inhibiting angiogenesis may be mediated in part through reduction of angiogenic biomarkers production by other mechanisms. The cellular mechanisms by which THC attenuated angiogenic biomarkers production need to be further study.