



ผลของเอพิแกลโลคาเทชิน แกลเลต ในการยับยั้ง การกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ที่เหนี่ยวนำโดยสารละลายคอลลาเจนในเซลล์ไลน์ ของมะเร็งชนิดสแควร์มัสเซลล์ที่ได้จากช่องปาก

นันทา สารขวนะกิจ¹ ท.บ., วท.ด.

อมรรัตน์ สุวรรณชัย²

อรณัตถ์ บุญเกียรติ³

อาทิตย์พันธ์ พิมพ์ขาวขำ² ท.บ., Ph.D

ประสิทธิ์ ภวสันต์¹ ท.บ., Ph.D

¹ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

² ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

³ นิสิตคณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาผลของเอพิแกลโลคาเทชิน แกลเลต (Epigallocatechin gallate; EGCG) ซึ่งเป็นสารสกัดจากใบชาในกลุ่มโพลีฟีนอล ในการยับยั้งการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ในเซลล์ไลน์จากมะเร็งชนิดสแควร์มัสเซลล์ที่พบในช่องปาก

วัสดุและวิธีการ ทำการศึกษาในห้องปฏิบัติการ โดยใช้ HSC-3 และ HSC-7 ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์ของมะเร็งชนิดสแควร์มัสเซลล์ และ HFF ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เซลล์ไลน์ทั้งสามถูกเลี้ยงในสภาวะที่เติมสารละลายคอลลาเจน 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อเหนี่ยวนำการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 จากนั้นเติม EGCG ที่ความเข้มข้น 0, 1, 10 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ระดับของ แอคทิฟ MMP-2 ถูกตรวจวัดจากอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วยเทคนิคเอลลาดินไซโมกราฟี

ผลการศึกษา พบว่า EGCG ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ลดระดับการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ใน HSC-3 และ HFF และยับยั้งการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ใน HSC-7

สรุป ผลการศึกษาแสดงให้เห็นความสามารถของ EGCG ในการลดการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ซึ่งมีบทบาทสำคัญในกระบวนการแพร่กระจายของมะเร็งโดยทั่วไปรวมทั้งมะเร็งชนิดสแควร์มัสเซลล์ ซึ่งเป็นคุณสมบัติอีกด้านหนึ่งของ EGCG นอกเหนือจากการเป็นสารแอนติออกซิแดนท์ด้านการเกิดมะเร็งดังที่เคยมีรายงานในมะเร็งหลายชนิด

(ว.ทันต. จุฬฯ 2546;26:1-14)

บทนำ

มะเร็งชนิดสแควร์เซลล์เป็นมะเร็งในช่องปากที่พบเป็นอันดับที่ 1 ในประชากรไทย และมีอัตราการเสียชีวิตที่สูง โดยไม่พบมีความแตกต่างระหว่างอุบัติการณ์ของการเกิดโรคในเพศชายและหญิง การพยากรณ์โรคมักไม่ดี ทั้งนี้เนื่องจากความร้ายแรงของเซลล์มะเร็งเองที่มีความสามารถในการแทรกตัวเฉพาะที่ และมีอุบัติการณ์ของการเกิดการแพร่กระจายไปสู่ต่อมน้ำเหลืองและอวัยวะที่อยู่ห่างไกลออกไปสูง¹

ในกระบวนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งโดยทั่วไปนั้น เริ่มจากการที่เซลล์มะเร็งจะย่อยทำลายและเคลื่อนตัวผ่านเบสเมมเบรน (basement membrane) ของมันเอง แล้วจึงเคลื่อนตัวไปสู่ต่อมน้ำเหลืองและอวัยวะที่อยู่ห่างออกไป โดยการแทรกผ่านเบสเมมเบรนของหลอดเลือดเข้าสู่กระแสเลือด และกระจายไปได้ทั่วร่างกาย และเมื่อเซลล์จะออกจากกระแสเลือดและกลับเข้าสู่เนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่อยู่ห่างออกไป เซลล์มะเร็งก็จะเคลื่อนตัวผ่านเซลล์บุหลอดเลือด (endothelial cells) และเบสเมมเบรนของหลอดเลือดอีกครั้งหนึ่ง นอกจากนี้เซลล์มะเร็งยังสามารถย่อยสลายเมทริกซ์นอกเซลล์ (Extracellular matrix (ECM)) ในระหว่างการเคลื่อนไปด้วย ดังนั้นจะเห็นได้ว่าความสามารถในการย่อยสลาย ECM โดยเฉพาะ เบสเมมเบรนนั้นเป็นปัจจัยหนึ่งที่ใช้บ่งชี้ความรุนแรงของเซลล์มะเร็งได้^{2,3}

เมทริกซ์ เมทาลโลโปรตีนเอส (Matrix metalloproteinases (MMPs)) เป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย ECM ได้ครอบคลุมทุกชนิด รวมทั้งคอลลาเจนซึ่งเป็นองค์ประกอบมากกว่าร้อยละ 80 ของโปรตีนใน ECM ของร่างกาย และจากการที่คอลลาเจนนั้นไม่สามารถถูกย่อยสลายได้ด้วยโปรตีนเอส (proteinases) ในกลุ่มอื่นๆ ดังนั้น MMPs จึงเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการแพร่กระจายของมะเร็ง²⁻⁴ จนถึงปัจจุบันพบมีเอนไซม์อยู่ในกลุ่มนี้กว่า 26 ตัว โดยเอนไซม์ในกลุ่มนี้ จะถูกสร้างขึ้นในลักษณะที่ยังไม่พร้อมทำงาน หรือเรียกว่ารูปละออง (latent form) ในสภาวะปกติ และต้องการการกระตุ้นโดยการตัดโดเมน (domain) ส่วนโปรเปปไทด์ (pro-peptide) ออก รวมทั้งต้องการอะตอมของสังกะสี (zinc atom) ที่ตำแหน่งแคทาลิติก โดเมน (catalytic domain) เกิดเป็น รูปละอองที่ฟ (active form) จึงจะสามารถทำงานได้ และในกระบวนการกระตุ้นการทำงานนี้

อาจจะพบเอนไซม์ในรูป อินเตอร์มีเดียต (intermediate form) ซึ่งมีการตัดโปรเปปไทด์ไปแล้วบางส่วน²⁻⁵

เอนไซม์ MMP ในกลุ่มเจลาติเนส (Gelatinases) ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ MMP-2 (Gelatinase A) และ เอนไซม์ MMP-9 (Gelatinase B) เป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะในการย่อยสลายคอลลาเจนชนิดที่ IV และคอลลาเจนที่เสียสภาพธรรมชาติ (denatured collagen หรือ gelatin) มีรายงานพบมีการเพิ่มการสร้างและระดับการทำงานที่สูงขึ้นในรอยโรคมะเร็งหลาย ๆ ชนิดรวมทั้งในมะเร็งชนิดสแควร์เซลล์ด้วย ทั้งนี้พบว่าระดับของเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 ที่สูงขึ้นนี้มีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของรอยโรคในด้านความสามารถในการแพร่กระจาย⁵⁻⁷ ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากจากการที่เบสเมมเบรน มีคอลลาเจนชนิดที่ IV เป็นองค์ประกอบหลัก และการย่อยทำลายเบสเมมเบรน เบสเมมเบรนเป็นขั้นตอนแรกสุดในกระบวนการแพร่กระจายดังที่กล่าวไว้ข้างต้นนั่นเอง^{2,5}

ชาเป็นพืชที่ถูกนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์อย่างกว้างขวางมานาน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศญี่ปุ่นและจีน⁸ โดยมีรายงานว่าใบชามีผลในการต้านทานการเปลี่ยนแปลงรหัสพันธุกรรมที่จะส่งผลให้เกิดโรคมะเร็งหลายชนิดได้^{8,9} สารในใบชาในกลุ่มหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสูงในการป้องกันมะเร็ง คือ เอพิคาเทชิน (epicatechin) ซึ่งเป็นสารในกลุ่มโพลีฟีนอล ซึ่งประกอบด้วย epicatechin (EC), epigallocatechin (EGC), epicatechin-3-gallate (ECG) และ epigallocatechin-3-gallate (EGCG) โดยเฉพาะ EGCG จะพบเป็นองค์ประกอบหลักเกือบร้อยละ 50 ของน้ำหนักแห้งของใบชา¹⁰ และเป็นสารที่มีประสิทธิภาพสูงในการป้องกันโรคมะเร็ง^{8, 11-15}

ประสิทธิภาพของสารในกลุ่มเอพิคาเทชินในการป้องกันโรคมะเร็ง ส่วนหนึ่งเกิดจากคุณสมบัติของการเป็นแอนติออกซิแดนท์ ที่ช่วยกำจัดอนุมูลอิสระที่อาจเหนี่ยวนำให้เกิดโรคมะเร็ง^{8,16} นอกจากนี้ ยังมีรายงานที่แสดงว่า EGCG ยังมีคุณสมบัติในการลดระดับของเอนไซม์ MMP ในเซลล์ไลน์ของมะเร็งบางชนิด เช่น glioblastoma ได้ และผลของการลดระดับเอนไซม์ MMP นี้ จะลดอัตราการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งชนิดนี้ด้วย¹⁷ อย่างไรก็ตาม บทบาทของ EGCG ที่มีต่อระดับหรือต่อการทำงานของเอนไซม์ MMP ยังมีการศึกษาไม่มากนัก ซึ่งความเข้าใจในส่วนนี้ จะเป็นประโยชน์ต่อการนำไป

ให้พัฒนาวิธีป้องกันโรค หรือป้องกันการลุกลามของโรคมะเร็งต่อไป

การวิจัยนี้ต้องการศึกษาความสามารถของสารสกัดบริสุทธิ์ EGCG จากใบชา ที่มีต่อเอนไซม์ MMP-2 โดยเฉพาะผลในการยับยั้งการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ในเซลล์ไลน์ของมะเร็งชนิดสแควร์มัสเซลล์ที่เพาะเลี้ยงขึ้นจากเซลล์มะเร็งที่ได้จากมะเร็งของลันในมนุษย์

วัสดุและวิธีการ

การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์

เซลล์ไลน์ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ทั้งหมด เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, GibcoBRL, NY, USA) ที่ประกอบด้วยซีรัมร้อยละ 10 (10% fetal bovine serum) กลูตามีน 2 มิลลิโมลาร์ (2 mM glutamine) เพนนิซิลลิน 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (100 IU/ml penicillin) สเตรปโตมัยซินซัลเฟต 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (100 µg/ml streptomycin sulfate) และแอมโฟเทอริซินบี 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (0.25 µg/ml amphotericin B) โดยอาหารเลี้ยงเซลล์และสารประกอบทั้งหมดจะได้จาก GibcoBRL (NY, USA)

เซลล์จะถูกเลี้ยงในตู้บัพที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีระดับคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 การขยายจำนวนเซลล์จะทำได้โดยการถ่ายเซลล์ (subculture) ที่เจริญเต็มจานเลี้ยงลงสู่จานเลี้ยงเซลล์ใหม่ในอัตราส่วน 1:5 โดยใช้เอนไซม์ทริปซิน-อีดีทีเอ (Trypsin-EDTA) เซลล์จะถูกถ่ายสัปดาห์ละ 1 ครั้ง

การตรวจหาระดับความสามารถของเซลล์มะเร็งชนิดสแควร์มัสเซลล์ในการสร้างและกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2

เซลล์ Human foreskin fibroblasts (HFF), Human squamous cell carcinoma-3 (HSC-3) และ Human squamous cell carcinoma-7 (HSC-7) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก Professor Teruo Amagasa, Tokyo Medical and Dental University (TMDU), Tokyo, Japan ถูกถ่ายลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุมที่มีความหนาแน่น 50,000 เซลล์ต่อหลุม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์แบบไม่มีซีรัมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์อยู่ในสภาวะนิ่ง (quiescence) จากนั้นอาหารเลี้ยงเซลล์แบบไม่มีซีรัม

ถูกเปลี่ยนให้กับเซลล์อีกครั้งและเซลล์ถูกเลี้ยงต่อไปอีกเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเก็บ และนำมาวิเคราะห์ระดับความสามารถในการสร้างเอนไซม์ MMP-2 ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Gelatin Zymography)

การเตรียมแหล่งของ เลเทนท์ MMP-2 จากภายนอกให้กับเซลล์มะเร็งชนิดสแควร์มัสเซลล์

เนื่องจากเซลล์มะเร็ง HSC-7 มีระดับของการสร้างเอนไซม์ MMP-2 ค่อนข้างต่ำ ดังนั้นการศึกษาศักยภาพของเซลล์ ในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 จึงจำเป็นต้องเติมเอนไซม์ MMP-2 จากภายนอกลงไป แหล่งของเอนไซม์ MMP-2 ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ จะได้จากเซลล์ U2OS ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์จากมะเร็งชนิดออสติโอซาร์โคมาของมนุษย์ (human osteosarcoma cell line) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก Professor Dr. Kazuhiro Eto และ Associate Professor Dr. Masa-Aki Ikeda, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

วิธีการเตรียมแหล่งของเอนไซม์ MMP-2 จากภายนอกจะทำได้ดังนี้ คือ เซลล์ U2OS จะถูกถ่ายลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 60 มิลลิเมตร จำนวน 10 จานที่มีความหนาแน่น 10,000 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนเป็นชนิดที่ไม่มีซีรัมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัมอีกครั้งหนึ่งในปริมาตร 3 มิลลิลิตรต่อจาน และเลี้ยงต่อไปอีก 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์จากแต่ละจานเลี้ยงเซลล์รวมกันแล้วนำไปแยกส่วนของเศษเซลล์ที่อาจปะปนมาออกด้วยเครื่องปั่นแยกความเร็วสูง แยกส่วนใสออกไปเก็บที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้ และจะเรียกส่วนนี้ว่า U2OS conditioned medium

ปริมาณของเลเทนท์ MMP-2 ใน U2OS conditioned medium จะถูกตรวจทดสอบโดยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสและสัดส่วนของ U2OS conditioned medium ที่นำไปเติมเพื่อเป็นแหล่งภายนอกของ MMP-2 สำหรับเซลล์มะเร็งชนิดสแควร์มัสเซลล์ คือ อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัมปกติ 1 ส่วนต่อ U2OS conditioned medium 1 ส่วน และจะเรียกส่วนผสมนี้ว่า อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัมแบบผสม (serum free medium + U2OS-conditioned medium)

การเหนี่ยวนำการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 โดยสารละลายคอลลาเจน

เซลล์ HSC-3 และ HSC-7 ถูกถ่ายลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุมที่มีความหนาแน่น 50,000 เซลล์ต่อหลุม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นชนิดที่ไม่มีซีรัมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนเริ่มการทดลอง ในการทดลองเซลล์จะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัมแบบผสม โดยแบ่งออกเป็นสองกลุ่ม คือกลุ่มที่ได้รับสารละลายคอลลาเจน {(Vitrogen) Cohesion, CA, USA} ที่ทำให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ด้วยกรดอะซิติกร้อยละ 0.025 และกลุ่มที่ไม่ได้รับสารละลายคอลลาเจน

เซลล์ HFF ถูกใช้ในกลุ่มควบคุมสำหรับการตรวจสอบผลของสารละลายคอลลาเจนในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 เนื่องจากมีรายงานว่า สารละลายคอลลาเจนสามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ได้¹⁸ เซลล์ HFF จะถูกถ่ายและเลี้ยงเช่นเดียวกับ HSC-3 และ HSC-7 ที่กล่าวแล้วข้างต้น ยกเว้นในการทดลอง HFF จะถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัม โดยไม่ได้ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัมแบบผสม

การวิเคราะห์หาความเข้มข้นที่เป็นพิษของ EGCG ต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT

ระดับความเป็นพิษของ EGCG จะวิเคราะห์ด้วยวิธี MTT¹⁹ ดังขั้นตอนโดยย่อดังนี้ เซลล์ HFF, HSC-3 และ HSC-7 ถูกถ่ายลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุมเช่นเดียวกับข้างต้น และกระตุ้นด้วย EGCG (Epigallocatechin gallate, Sigma, MO, USA) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ที่เตรียมขึ้นโดยมีการดื่มน้ำ ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 เป็นตัวทำลายกระตุ้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยอาหารเลี้ยงเซลล์ในแต่ละหลุมจะถูกดูดออกแล้วล้างด้วยฟอสเฟสบัฟเฟอร์เซลล์ 2 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลาย MTT (Thiazolyl blue, Sigma, MO, USA) ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัมและฟีนอลเรด ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ใน 4 ชั่วโมงสุดท้ายของการกระตุ้น เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมง ทำการดูดสารละลาย MTT ออก แล้วทำละลายผลึกสีม่วงเข้มของ formazan ด้วยสารละลายผสมระหว่างไกลซีนบัฟเฟอร์และ DMSO (Dimethylsulfoxide, Merck, Darmstadt,

Germany) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 9 ในปริมาตร 1 มิลลิตร จะได้สารละลายสีส้มม่วง แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับจำนวนเซลล์จากกราฟมาตรฐาน

กราฟมาตรฐานทำขึ้นจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ทราบจำนวนลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบเดียวกับข้างต้นเป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วตรวจวัดจำนวนเซลล์โดยวิธีข้างต้น ค่าที่ได้จะนำมาใช้เปรียบเทียบกับจำนวนเซลล์ที่ทราบเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์กับค่าการดูดกลืนแสง

การทดสอบผลของ EGCG ต่อระดับการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2

เซลล์ HFF, HSC-3 และ HSC-7 ถูกถ่ายลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุมและกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ด้วยสารละลายคอลลาเจนโดยวิธีการดังที่กล่าวไว้ข้างต้น ในสถานะที่มีหรือไม่มี EGCG ในกลุ่มควบคุมจะเติมกรดอะซิติก ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ที่ใช้เป็นตัวทำลายของ EGCG ความเข้มข้นสุดท้ายของ EGCG ที่ใช้ในกลุ่มทดลองคือ 1 และ 10 ไมโครโมลาร์

การวิเคราะห์เอนไซม์ MMP-2 ด้วยเทคนิคเจลลาดินไซโมกราฟี

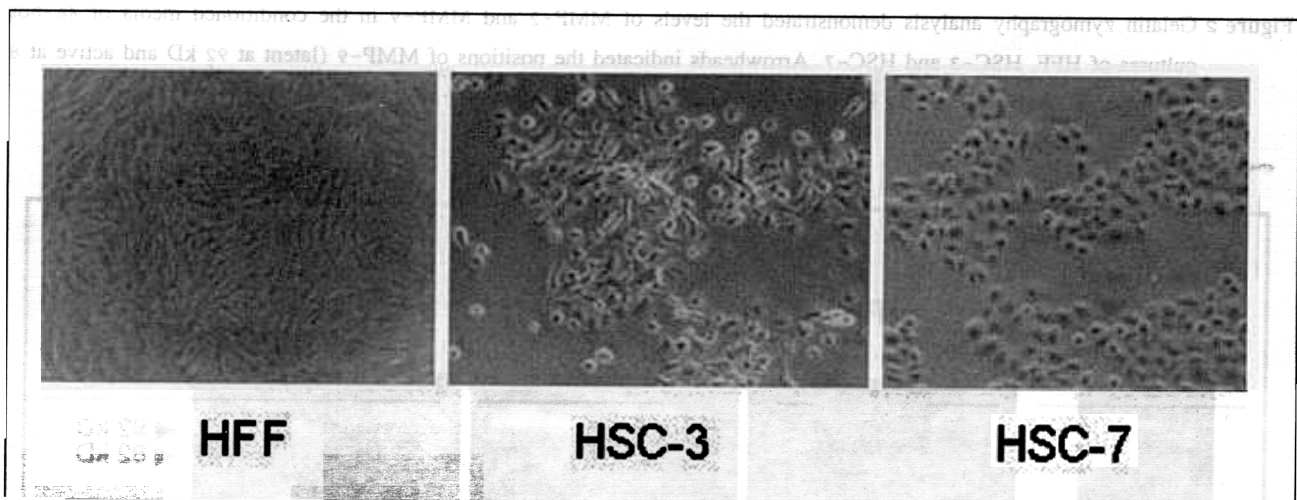
อาหารเลี้ยงเซลล์ในแต่ละการทดลองจะถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเจลลาดินไซโมกราฟี¹⁸ ซึ่งมีวิธีการโดยย่อคือ อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกแยกด้วยกระแสไฟฟ้า (gel electrophoresis) ในเจลที่มีความเข้มข้นของอคริลามายด์ (acrylamide) ร้อยละ 10 และเจลลาดิน (gelatin) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยเจลลาดินจะเป็นซับสเตรต (substrate) สำหรับเอนไซม์ MMP-2 เมื่อทำการแยกโปรตีนด้วยไฟฟ้าเรียบร้อยแล้ว เจลจะถูกล้างด้วยสารละลาย TritonX-100 ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 สามรอบ รอบละ 10 นาที ก่อนนำไปบ่มในสารละลาย developing buffer (0.15 M NaCl, 10 mM CaCl₂, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1% Brij35) เป็นเวลา 1 คืน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงย้อมเจลด้วยสารละลาย Coomassie Brilliant Blue R250 (Sigma, MO, USA) ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ในสารละลายผสมของเมทิลแอลกอฮอล์และกรดอะซิติก (ความเข้มข้นร้อยละ 40 และร้อยละ 10 ตามลำดับ) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างสีส่วนเกินออกด้วยสารละลายผสมของเมทิล

แอลกอฮอล์และกรดอะซิติก (ความเข้มข้นร้อยละ 5 และร้อยละ 7.5 ตามลำดับ) บริเวณที่มีเอนไซม์ MMP-2 จะปรากฏเป็นแถบสีบนเจลสีน้ำเงิน ตำแหน่งของเอนไซม์ MMP-2 บนเจลจะตรวจสอบกับระดับของเอนไซม์ MMP-2 ที่หลังจากเซลล์ไลน์ HT-1080 ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์จากมะเร็งของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดไฟโบรซาร์โคมาของมนุษย์ (human fibrosarcoma cell line) ที่ใช้เป็นตัวควบคุมแบบบวก (positive control) สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเจลลาดินไซโมกราฟี เซลล์ไลน์นี้ได้รับความอนุเคราะห์จาก Associate Professor Erik W. Thompson, St. Vincent's Institute of Medical Research, Melbourne, Australia

ผลการศึกษา

ลักษณะรูปร่างเซลล์

HFF เป็นเซลล์ไลน์ที่ได้มาจากเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน มีรูปร่างรียาวคล้ายกระสวย ในขณะที่ HSC-3 และ HSC-7 ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์ที่เตรียมได้จากชิ้นเนื้อมะเร็งจากลิ้นในมนุษย์ และเป็นเซลล์ที่มีต้นกำเนิดจากเซลล์เยื่อบุผิว จะมีรูปร่างแตกต่างออกไปดังปรากฏในรูปที่ 1 เซลล์ HSC-7 จะมีรูปร่างกลม และเห็นนิวเคลียสกลมชัดเจน ลักษณะการเรียงตัวของเซลล์จะอยู่กันเป็นกลุ่มๆ โดยแต่ละเซลล์จะสัมผัสกัน ส่วนเซลล์ HSC-3 จะมีรูปร่างต่างออกไป โดยจะพบเซลล์ที่มีลักษณะที่ค่อนข้างกลมปนกับเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายกระสวย และจะมีการเรียงตัวไม่เป็นระเบียบนัก โดยไม่พบการจัดตัวเป็นกลุ่มที่สัมผัสกันเหมือนใน HSC-7



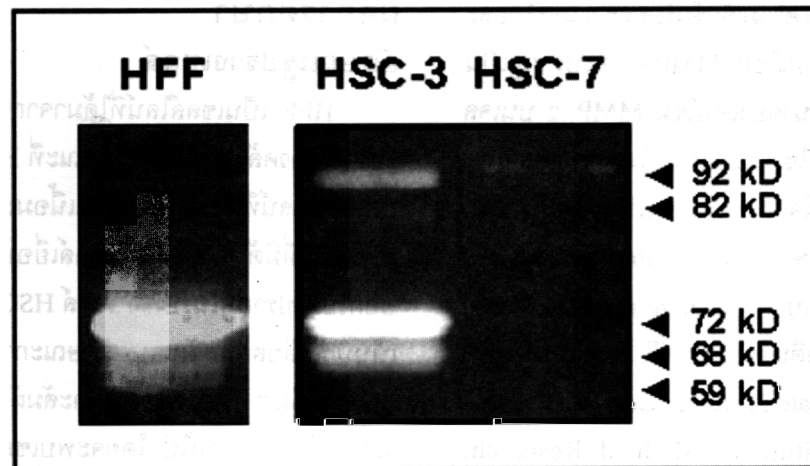
รูปที่ 1 รูปถ่ายภายใต้กล้องเฟสคอนทราสต์ที่กำลังขยาย 20 เท่า แสดงรูปร่างของเซลล์ HFF, HSC-3 และ HSC-7 ที่ความหนาแน่นร้อยละ 70 ของพื้นที่

Figure 1 Cell morphology images of HFF, HSC-3 and HSC-7 at 70% confluency were captured from a phase contrast microscope at 20x magnification.

ความสามารถของเซลล์ที่แตกต่างกันในการสร้างเอนไซม์ MMP-2 และ เอนไซม์ MMP-9 ในจานเลี้ยงเซลล์

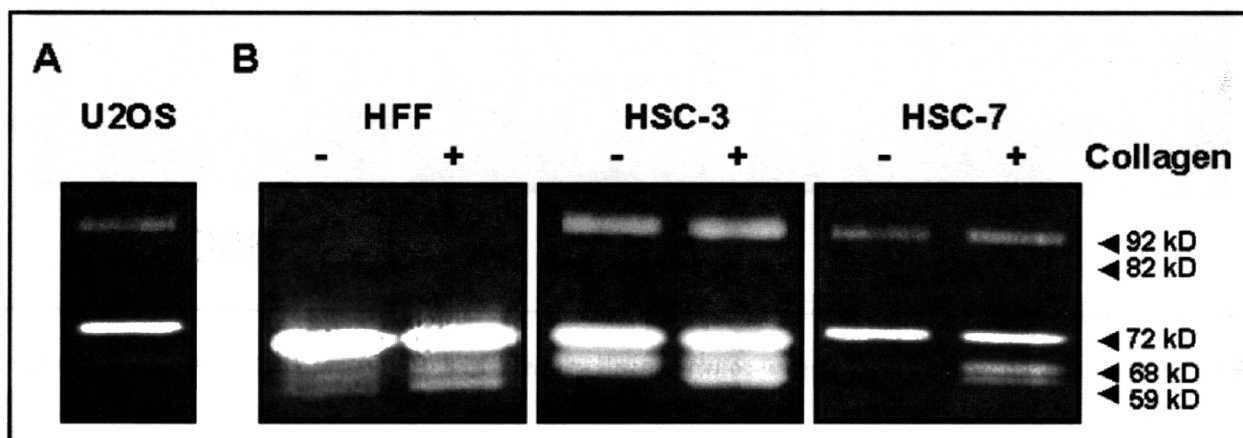
ปริมาณและสถานะของเอนไซม์ MMP-2 ในเซลล์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้น ถูกนำมาวิเคราะห์โดยเทคนิคเจลลาดินไซโมกราฟีดังปรากฏในรูปที่ 2 โดยวิเคราะห์จากอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เวลา 48 ชั่วโมงในสถานะที่ไม่มีซีรัม พบว่าในสถานะปกติของเซลล์ในจานเลี้ยงเซลล์ มีการสร้างเฉพาะเอนไซม์ MMP-2 ใน HFF โดยพบมีการสร้าง เลแทนท์ MMP-2 (72 kD) ใน

ระดับที่ชัดเจน ในขณะที่พบ อินเตอร์มีเดียต MMP-2 (68 kD) และแอคทีฟ MMP-2 (59 kD) ในระดับที่ต่ำมากเมื่อเทียบกับสำหรับ HSC-3 พบมีการสร้างทั้งเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 โดยเอนไซม์ MMP-2 จะพบเฉพาะในรูปแบบของ เลแทนท์ และ อินเตอร์มีเดียต เท่านั้นอย่างชัดเจน สำหรับเอนไซม์ MMP-9 พบในรูปของ เลแทนท์ (92 kD) เป็นส่วนใหญ่และพบ แอคทีฟ MMP-9 (82 kD) ในระดับที่ต่ำมาก ในทางกลับกัน HSC-7 ไม่พบมีการสร้าง MMP-2 แต่อย่างใด และมีการสร้าง เลแทนท์ MMP-9 ในปริมาณที่ต่ำมาก



รูปที่ 2 เจลาตินไซโมกราฟฟีแสดงระดับเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 ที่ตรวจพบในอาหารเลี้ยงเซลล์จาก HFF, HSC-3 และ HSC-7 ที่เวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะปกติที่ไม่มีการกระตุ้น หัวลูกศรแสดงตำแหน่งของ MMP-9 ที่ 92 kD (เลเท็นท์) และ 82 kD (แอคทีฟ), และ MMP-2 ที่ 72 kD (เลเท็นท์), 68 kD (อินเตอร์มีเดียต) และ 59 kD (แอคทีฟ)

Figure 2 Gelatin zymography analysis demonstrated the levels of MMP-2 and MMP-9 in the conditioned media of 48-hour cultures of HFF, HSC-3 and HSC-7. Arrowheads indicated the positions of MMP-9 (latent at 92 kD and active at 82 kD), and MMP-2 (latent at 72 kD, intermediate at 68 kD and active at 59 kD).



รูปที่ 3 เจลาตินไซโมกราฟฟีแสดงระดับของเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 (A) แสดงระดับของเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 ในอาหารเลี้ยงเซลล์แบบผสมที่ใช้เลี้ยงเซลล์ HSC-3 และ -7 เมื่อบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่ไม่มีเซลล์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (B) แสดงผลการเหนี่ยวนำการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ในเซลล์ HFF, HSC-3 และ HSC-7 โดยการเติมสารละลายคอลลาเจน ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (แถวขวา) และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับคอลลาเจน (แถวซ้าย) หัวลูกศรแสดงตำแหน่งของ MMP-9 ที่ 92 kD (เลเท็นท์) และ 82 kD (แอคทีฟ), และ MMP-2 ที่ 72 kD (เลเท็นท์), 68 kD (อินเตอร์มีเดียต) และ 59 kD (แอคทีฟ)

Figure 3 Gelatin zymography analysis demonstrated the levels of MMP-2 and MMP-9. (A) The levels of MMP-2 and MMP-9 presented in the SFM+U2OS conditioned medium (source of latent MMP-2 in the culture of HSC-3 and -7) after 48-hour incubation without any cell. (B) The activation of MMP-2 in the 48-hour cultures of HFF, HSC-3 and HSC-7 in the presence (right lane) and absence (left lane) of 200 μ g/ml soluble collagen. Only HSC-3 and HSC-7 were cultured using SFM+U2OS conditioned medium. Arrowheads indicated the positions of MMP-9 (latent at 92 kD and active at 82 kD), and MMP-2 (latent at 72 kD, intermediate at 68 kD and active at 59 kD).

คอลลาเจนสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ใน HFF, HSC-3 และ HSC-7 เมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะที่มีเอนไซม์ MMP-2

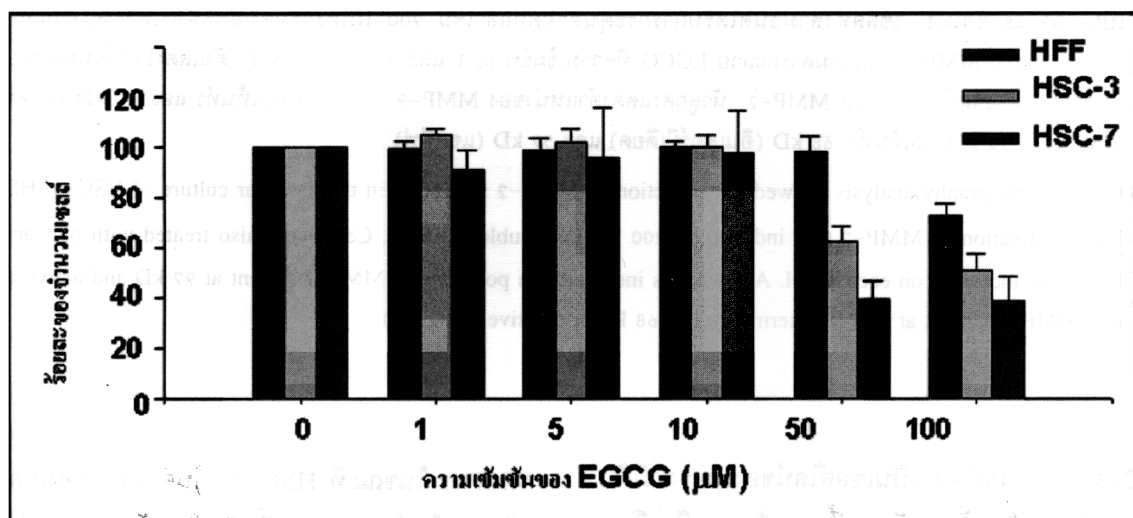
อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัมแบบผสมดังที่กล่าวไว้ข้างต้นถูกใช้เป็นแหล่งของ เอนไซม์ MMP-2 ที่เติมให้กับเซลล์ HSC-3 และ HSC-7 ซึ่งมีระดับของเอนไซม์ MMP-2 และ 9 ที่ตรวจวัดโดยอาศัยเทคนิคเจลดิโนโซโมกราฟีดังปรากฏในรูปที่ 3A ภายหลังจากทำการบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่ไม่มีเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อแสดงระดับของเอนไซม์ทั้งสองที่เซลล์ได้รับในช่วง 48 ชั่วโมงของการทดลอง

ใน รูปที่ 3B แสดงระดับเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ผสมดังกล่าวก่อนที่นำมาใช้เลี้ยงเซลล์ HSC-3 และ HSC-7 ส่วน HFF ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัมแบบปกติ ทำการเลี้ยงต่อไปอีกเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมงในสภาวะที่มีและไม่มีการเติมสารละลายคอลลาเจนให้กับเซลล์ ผลจากเจลดิโนโซโมกราฟีพบว่าคอลลาเจนสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ได้ในทุกเซลล์ไลน์ แต่ไม่มีผลต่อการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-9 โดยพบมีแถบสว่างของ แอคทีฟ MMP-2 ที่ 59 kD

เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากเซลล์ HSC-3 และ HSC-7 ในขณะที่เซลล์ HFF ซึ่งพบมี แอคทีฟ MMP-2 อยู่ก่อนแล้วก็มีปริมาณสูงขึ้นอย่างชัดเจนโดยดูจากความเข้มของแถบสว่างที่เพิ่มขึ้น

EGCG ยับยั้งการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ใน HFF, HSC-3 และ HSC-7

สารละลาย EGCG ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ 1, 5, 10, 50, 100 ไมโครโมลาร์ ถูกนำมาทดสอบหาความเข้มข้นที่เป็นพิษกับเซลล์ HFF, HSC-3 และ HSC-7 โดยสารละลายควบคุมคือ กรดอะซิติก ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ซึ่งเป็นตัวทำลายของ EGCG โดยในรูปที่ 4 เป็นกราฟที่แสดงระหว่างความเข้มข้นของ EGCG กับจำนวนเซลล์ที่คิดเป็นร้อยละ พบว่าระดับความเข้มข้นที่เป็นพิษพิจารณาจากความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตายซึ่งทำให้จำนวนเซลล์ลดลงอย่างชัดเจนดังปรากฏในกราฟ คือ EGCG ตั้งแต่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ขึ้นไปเป็นพิษต่อ HSC-3 และ HSC-7 ในขณะที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 100 ไมโครโมลาร์ขึ้นไปเป็นพิษต่อ HFF



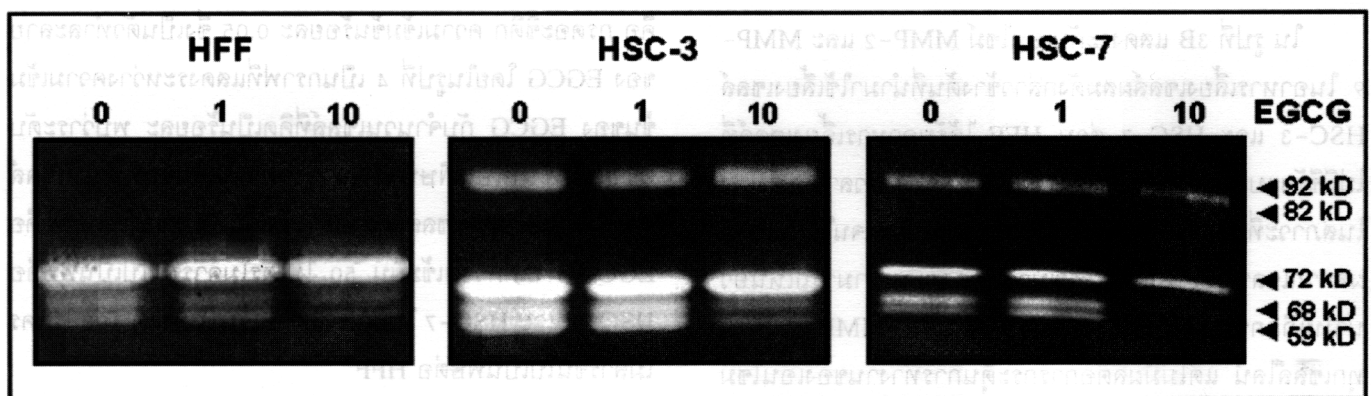
รูปที่ 4 กราฟแสดงค่าความเข้มข้นที่เป็นพิษของ EGCG ในเซลล์ HFF, HSC-3 และ HSC-7 ภายหลังจากกระตุ้นที่ 24 ชั่วโมง และวัดค่าความเป็นพิษด้วยวิธีการวิเคราะห์แบบ MTT คำนวณหาจำนวนเซลล์โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน จำนวนร้อยละของเซลล์ได้จากค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ครั้ง โดยให้คิดค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ในกลุ่มควบคุม (EGCG ที่ 0 ไมโครโมลาร์) เป็นร้อยละ 100

Figure 4 Graph showed the toxic concentration of EGCG in the 24-hour cultures of HFF, HSC-3 and HSC-7 using MTT assay. The cell number was calculated from the standard curve. Experiments were done in triplicate and cell number in the control group (EGCG= 0 μM) was normalized to 100 percent.

ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษของ EGCG ที่ 0, 1 และ 10 ไมโครโมลาร์ ถูกนำมาใช้ศึกษาความสามารถของ EGCG ที่ใช้ลดระดับการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ในเซลล์ HFF, HSC-3 และ HSC-7 ดังแสดงในรูปที่ 5 พบว่าที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ระดับของ อินเตอร์มีเดียด และ แอคทิฟ MMP-2 ใน HSC-3 และ HFF ลดลง และหายไปใน HSC-7 ในขณะที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของระดับ MMP-9

วิจารณ์

การศึกษาค้นคว้านี้แสดงให้เห็นถึงผลของ EGCG หนึ่งในสารสกัดบริสุทธิ์ในกลุ่มโพลีฟีนอลที่ได้จากใบชา ในการยับยั้งการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ในเซลล์ไลน์ของมะเร็งชนิดสแควร์เซลล์ที่เพาะเลี้ยงขึ้นมาจากมะเร็งของลิ้น ซึ่ง MMP-2 นี้เป็นเอนไซม์ที่มีรายงานมากมายแสดงบทบาทสำคัญของเอนไซม์นี้ในกระบวนการเจริญและกระบวนการแพร่กระจายในเซลล์มะเร็งหลายชนิด²⁰⁻²³



รูปที่ 5 เจลาตินไซโมกราฟฟีแสดงการลดการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ในเซลล์ HSC-3, HSC-7 และ HFF เมื่อได้รับ EGCG เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เซลล์ทั้งสามชนิดได้รับการกระตุ้นด้วยคอลลาเจน 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเพื่อเหนี่ยวนำการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 และเติมสารละลาย EGCG ที่ความเข้มข้น 0, 1 และ 10 ไมโครโมลาร์ ดังแสดงไว้ที่ตอนบนของภาพ และนำอาหารเลี้ยงเซลล์มาวิเคราะห์ MMP-2 หัวลูกศรแสดงตำแหน่งของ MMP-9 ที่ 92 kD (เลเทนท์) และ 82 kD (แอคทิฟ), และ MMP-2 ที่ 72 kD (เลเทนท์), 68 kD (อินเตอร์มีเดียด) และ 59 kD (แอคทิฟ)

Figure 5 Gelatin zymography analysis showed the reduction of MMP-2 activation in the 48-hour culture of HSC-3, HSC-7 and HFF. Activation of MMP-2 was induced by 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ soluble collagen. Cells were also treated with 0, 1 and 10 μM EGCG as indicated on each panel. Arrowheads indicated the positions of MMP-9 (latent at 92 kD and active at 82 kD) and MMP-2 (latent at 72 kD, intermediate at 68 kD and active at 59 kD).

HSC-3 และ HSC-7 เป็นเซลล์ไลน์ของมะเร็งที่มีต้นกำเนิดเป็นเซลล์เยื่อบุผิวแล้วถูกพัฒนาขึ้นมาเป็นเซลล์ไลน์โดยห้องปฏิบัติการของ Professor Teruo Amagasa, TMDU โดย HSC-3 นั้นได้เคยถูกนำมาใช้ในการศึกษาวิจัยในคุณสมบัติด้านความสามารถในการเคลื่อนที่ในขั้นตอนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง²⁴ ในขณะที่ HSC-7 ยังไม่เคยถูกนำมาใช้ในการวิจัยแต่อย่างใด ในการศึกษาครั้งนี้ HSC-3 ถูกเลือกให้เป็นตัวอย่างของเซลล์มะเร็งที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์

MMP-2 ในขณะที่ HSC-7 เป็นตัวอย่างของเซลล์มะเร็งที่ไม่สร้างเอนไซม์ MMP-2 ซึ่งเป็นที่น่าสังเกตว่า รูปร่างของเซลล์ทั้งสองนี้ จะมีความแตกต่างกันด้วย โดยเซลล์ HSC-3 จะมีลักษณะบางส่วนคล้ายเซลล์มีเซนไคม์ (mesenchyme) ส่วน HFF เป็นเซลล์ที่ใช้เพื่อเป็นตัวแทนของเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันปกติ²⁵ ที่มีต้นกำเนิดที่ต่างออกไปคืออยู่ในกลุ่มของมีเซนไคม์ โดยทั่วไปแล้วเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันจะมีรูปร่างเป็นกระสวยและมักมีส่วนของไซโตพลาสซึมยื่นยาวออกจากตัวเซลล์ ในขณะที่

ที่เซลล์เยื่อเมือกปกติจะมีรูปร่างได้หลายแบบแต่มีทิศทาง (polarity) และไม่มีการยื่นส่วนของไซโตพลาสซึมออกไปรอบๆ เซลล์สำหรับเซลล์มะเร็งที่มีต้นกำเนิดเป็นเซลล์เยื่อเมือกพบมีรายงานว่ารูปร่างของเซลล์มักเปลี่ยนไปจากปกติโดยมีความคล้ายไปทางเซลล์มีเซนไคม์มากขึ้น โดยพบมีความสัมพันธ์ระหว่างรูปร่างที่เปลี่ยนไปกับระดับความรุนแรงหรือความสามารถในการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งนั้นๆ โดยพบว่ารูปร่างที่คล้ายไปทางมีเซนไคม์ จะส่งเสริมให้เซลล์มีแนวโน้มที่จะเคลื่อนที่มากขึ้น²⁶ ในการศึกษาที่พบว่ารูปร่างลักษณะของ HSC-3 ที่คล้ายมีเซนไคม์มากกว่า HSC-7 สัมพันธ์กับระดับความสามารถในการสร้างเอนไซม์ที่ใช้เป็นหนึ่งในตัวบ่งชี้ความรุนแรงของเซลล์มะเร็งได้คือ MMP-2 นอกจากนี้โดยธรรมชาติของเซลล์ปกติที่มีต้นกำเนิดเป็นเซลล์เยื่อเมือกนั้นมักจะไม่สร้างเอนไซม์ MMP-2 ซึ่งตรงข้ามกับเซลล์ที่มีต้นกำเนิดเป็นมีเซนไคม์²⁷ ดังเช่นที่พบมีแต่การสร้างเอนไซม์ MMP-2 อย่างชัดเจนในเซลล์ HFF

อย่างไรก็ดี เซลล์ที่มีต้นกำเนิดเป็นเซลล์เยื่อเมือกนั้น จะมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ MMP-9²⁷ ซึ่งตรงกันกับผลที่แสดงไว้ในรูปที่ 2 โดยพบว่าเซลล์ HSC-3 และ 7 สามารถสร้างและหลั่งเอนไซม์ MMP-9 ได้ทั้งคู่ แต่ในระดับที่ไม่เท่ากัน โดย HSC-7 จะสร้างและหลั่งเอนไซม์ MMP-9 ในระดับที่ต่ำมากเมื่อเทียบกับ HSC-3 ความสามารถนี้ สะท้อนว่าเซลล์ทั้งสองนี้มีต้นกำเนิดจากเซลล์เยื่อเมือก เนื่องจากไม่พบเอนไซม์ MMP-9 ในเซลล์ HFF เลย อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า ระดับของเอนไซม์ MMP-9 ยังสัมพันธ์กับความสามารถในการแพร่กระจายของ HSC ด้วย²⁸⁻³⁰ อย่างไรก็ดี การแสดงออกของเอนไซม์ MMP-9 ในเซลล์ทั้งสองชนิดนี้ พบเฉพาะ เลเทนท์ MMP โดยไม่พบ แอคทีฟ MMP ซึ่งสะท้อนว่าเอนไซม์ที่หลั่งออกมา ไม่อยู่ในรูปที่ทำงานได้เช่นเดียวกับเอนไซม์ MMP-2 และการเติมสารละลายคอลลาเจนจะมีผลต่อการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-9 น้อยมาก หรือแทบไม่มีเลย (รูปที่ 3) ซึ่งตรงกันกับรายงานที่แสดงว่า การกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 นั้น เกิดโดยใช้กลไกที่แตกต่างกัน⁵

เป็นที่ยอมรับกันทั่วไปแล้วว่า การกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 เป็นกลไกที่ซับซ้อน โดยต้องการเอนไซม์ MMP บนผิวเซลล์ หรือ Membrane type MMP (MT-MMP)

กระบวนการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ซึ่งเป็นที่ยอมรับกันอย่างกว้างขวางจนถึงปัจจุบันนั้น ถูกเสนอโดย Strongin และคณะในปี 1995 โดยพบว่า เลเทนท์ MMP-2 (72 kD) จะยึดกับเซลล์โดยยึดเกาะผ่านไปกับ MT-MMP ที่อยู่บนผิวเซลล์ และมีโมเลกุลของ TIMP-2 ซึ่งปกติทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งการทำงานของ MMP-2 ร่วมเกาะอยู่ด้วย โดยเลเทนท์ MMP-2 จะยึดกับส่วนของโมเลกุล TIMP-2 เกิดเป็น tri-molecular complex จากนั้น บางส่วนของโปรเปปไทโดไมนของเลเทนท์ MMP-2 จะถูกตัดออกโดย MT-MMP อีกตัวหนึ่งที่อยู่ใกล้เคียงบนผิวเซลล์ เกิดเป็น อินเตอร์มีเดียต MMP-2 (68 kD) และส่วนของโปรเปปไทโดไมนที่เหลืออยู่ในอินเตอร์มีเดียต MMP-2 จะหลุดออกไปทั้งหมดโดยอัตโนมัติ ได้เป็น แอคทีฟ MMP-2 (59 kD) ซึ่งเอนไซม์ในรูปที่พร้อมจะทำงาน แอคทีฟ MMP-2 นี้เท่านั้นที่สามารถทำการย่อยสลายสารตั้งต้นต่างๆ ของเอนไซม์เองได้ โดยที่เอนไซม์ในรูป อินเตอร์มีเดียต ไม่มีความสามารถนี้³¹

ส่วนการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-9 นั้น จะเกิดโดยกลไกที่เหมือนกับการกระตุ้นการทำงานของ MMP ตัวอื่นๆ คืออาศัยเอนไซม์กลุ่มที่ชื่อว่า ซีรีน โปรตีนเอส (serine protease) เพื่อตัดโปรเปปไทโดไมนออก เพื่อกลายเป็น แอคทีฟ MMP^{2,5}

การที่สารละลายคอลลาเจนสามารถกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 นั้นได้เคยมีรายงานไว้แล้ว^{18, 32} โดยพบว่าสารละลายคอลลาเจนสามารถรวบรวม MT-MMP ที่กระจุกกระจายอยู่บนผิวเซลล์เข้าด้วยกัน เป็นการเพิ่มความสามารถในการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2³³ รวมทั้งมีรายงานว่าคอลลาเจนสามารถเพิ่มระดับการแสดงออกของ MT-MMP ด้วย³⁴ โดยที่คอลลาเจนเป็นสารที่สามารถพบได้ทั่วไปในร่างกาย ดังนั้น ความสัมพันธ์ระหว่างการเติมสารละลายคอลลาเจนกับการเพิ่มขึ้นของ แอคทีฟ MMP-2 จึงน่าจะเป็นกลไกสำคัญส่วนหนึ่งในการทำลายของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน รวมทั้งสัมพันธ์กับความสามารถในการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง

อย่างไรก็ดี เนื่องจาก HSC-7 ไม่สามารถสร้าง เลเทนท์ MMP-2 ได้เอง คณะผู้วิจัยจึงได้ทดลองเติมเอนไซม์ MMP-2 ให้กับเซลล์ โดยใช้ เลเทนท์เอนไซม์ที่ได้จากเซลล์ U2OS ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์จากมะเร็งออสติโอซาร์โคมาของมนุษย์ โดยสาเหตุที่เลือกเอนไซม์จากเซลล์นี้ เนื่องจากเซลล์ชนิดนี้ หลัง

เอนไซม์ในรูป เลเทนท์ โดยไม่พบระดับของ แอคทิฟ เลย แสดงว่าภายใต้สภาวะปกติ เซลล์ชนิดนี้ขาดกลไกในการ กระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ดังนั้น จึงเหมาะสำหรับการนำไปศึกษากลไกการกระตุ้นการทำงานในเซลล์อีกชนิดหนึ่ง ผลการทดลองพบว่า แม้ HSC-7 จะไม่สามารถสร้างเอนไซม์ MMP-2 ได้เอง แต่กลับมีความสามารถในการเหนี่ยวนำ เลเทนท์ MMP-2 ที่ได้รับจากภายนอกให้เปลี่ยนเป็น แอคทิฟ MMP-2 ได้เมื่อได้รับสารละลายคอลลาเจน ผลการทดลองนี้เป็นตัวอย่างที่แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าความรุนแรงของ เซลล์มะเร็งนั้นไม่ได้ขึ้นอยู่กับความสามารถในการสร้าง เอนไซม์เท่านั้นแต่ที่สำคัญมากกว่าคือความสามารถในการ ทำให้เกิด แอคทิฟ MMP-2 ได้อีกด้วย ทั้งนี้เนื่องจากใน ร่างกายของเรานั้น เซลล์มะเร็งนั้นไม่ได้อยู่โดยลำพัง หากแต่ถูก แวดล้อมหรือปะปนอยู่กับเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันปกติ ซึ่งเป็น เซลล์ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ MMP-2 อยู่แล้ว ดังนั้นการเติม เลเทนท์ MMP-2 ให้กับเซลล์ที่ไม่สร้างเอนไซม์ MMP-2 นี้ก็อาจเป็นการเลียนแบบสภาวะนี้ในธรรมชาติ

นอกจากนี้ การเติมเอนไซม์ MMP-2 ในรูปที่ไม่พร้อม จะทำงานให้กับ HSC-3 ซึ่งสามารถสร้างเอนไซม์ MMP-2 ได้ เองอยู่แล้ว ก็มีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างสภาวะให้เหมือนกับใน HSC-7 นอกจากนี้ ในสภาวะที่เติมเฉพาะเลเทนท์ MMP ลงในเซลล์ทั้งสองชนิด โดยไม่ได้เติมสารละลายคอลลาเจนนั้น พบว่า ไม่มีผลต่อการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 เลย ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันว่า สารหลังจาก U2OS ที่ปะปน มาในอาหารเลี้ยงเซลล์ร่วมกับเลเทนท์ MMP นั้น ไม่มี อิทธิพลต่อการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 โดยจะพบ แอคทิฟ MMP-2 เฉพาะในสภาวะที่เติมสารละลายคอล-ลาเจนเท่านั้น

EGCG เป็นสารในกลุ่มโพลีฟีนอลที่มีการศึกษากัน อย่างกว้างขวางในคุณสมบัติที่เป็นแอนติออกซิเดนท์ ซึ่งส่งผล ในการยับยั้งการเกิดมะเร็งหลายชนิด^{8,16,35-37} ในการทดลองนี้ EGCG ถูกทดสอบหาความเข้มข้นที่เป็นพิษด้วยเทคนิค MTT ซึ่งหลักการของเทคนิคนี้คือการตรวจวัดจำนวนเซลล์โดยดูจาก ความมีชีวิตของเซลล์ ซึ่งเอนไซม์ไมโทคอนเดรียลดไฮโดรเจน เนสที่เกี่ยวข้อกับกระบวนการหายใจในระดับเซลล์และถูก สร้างขึ้นเฉพาะในขณะที่เซลล์มีชีวิตอยู่จะไปเปลี่ยนสารตั้งต้น MTT ให้กลายเป็นผลึก ฟอร์มาแซน (formazan) ที่ไม่ละลาย

น้ำ สีม่วง ซึ่งจะถูกทำลายภายหลังและนำไปวัดค่าการดูด กลืนแสงซึ่งจะสัมพันธ์กับจำนวนเซลล์ ดังนั้นความเข้มข้นของ EGCG ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลงอย่างมีนัยสำคัญย่อม หมายถึงการตายของเซลล์อย่างชัดเจน MTT เป็นเทคนิคที่ แม่นยำและเป็นที่ยอมรับอย่างกว้างขวางเพราะเป็นการตรวจ วัดที่การทำงานของเซลล์นั่นเอง¹⁹

จากผลการทดลองพบว่า EGCG ที่ความเข้มข้นที่ไม่ เป็นพิษที่ 10 ไมโครโมลาร์ สามารถยับยั้งการกระตุ้นการ ทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ใน HSC-7 ในขณะที่ ผลของ EGCG ต่อ HSC-3 และ HFF นั้นไม่ชัดเจนเท่า HSC-7 โดย พบว่าในกรณีของ HSC-3 นั้น แม้ EGCG จะไม่สามารถ ยับยั้งการกระตุ้นการทำงานของ MMP-2 ได้อย่างสมบูรณ์ แต่ ก็สามารถลดระดับการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ได้ค่อนข้างชัดเจน สำหรับใน HFF ก็จะพบการลดระดับการ กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 เช่นกันแม้จะไม่ ชัดเจนเท่ากับในเซลล์ไลน์ของมะเร็งชนิดสแควร์เซลล์ที่ใช้ ทดสอบ

ผลการทดลองนี้ สนับสนุนบทบาทของ EGCG ที่มีต่อ เอนไซม์ MMP-2 แม้ว่าจะมีความแตกต่างกันในระดับการ ตอบสนองของเซลล์แต่ละชนิด แต่ก็เป็นไปได้ที่ทิศทางเดียวกัน ความแตกต่างที่เกิดขึ้นนี้ อาจขึ้นกับหลายปัจจัย เช่น ชนิดของ เซลล์ ระดับดีฟเฟอเรนเชียลของเซลล์ รวมทั้งความสามารถ ในการตอบสนอง หรือการรับรู้ของเซลล์ที่มีต่อ EGCG เช่น ระดับของ รีเซปเตอร์ (receptor) บนผิวเซลล์ที่แตกต่างกัน เป็นต้น ซึ่งเซลล์ทั้งสามชนิดที่ใช้ในการทดลองเปรียบเทียบกัน ครั้งนี้ อาจจะมีการมีความแตกต่างกันในประการใดประการหนึ่ง ที่ กล่าวถึงข้างต้น ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้ระดับของการตอบสนอง มีความแตกต่างกัน โดยในกรณีนี้ จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่ม เติมต่อไป อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองครั้งนี้ เพียงพอที่จะชี้ว่า EGCG น่าที่จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการลดระดับของ แอคทิฟ MMP-2 ในบริเวณรอยโรคมะเร็ง และอาจรวมถึง ระดับของ แอคทิฟ MMP-2 ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่อยู่โดยรอบด้วย

นอกจากกลไกการรับรู้ของเซลล์ต่อ EGCG แล้ว ยังเป็น ที่น่าสนใจที่จะทำการศึกษาต่อไปถึงกลไกของ EGCG ในการ ยับยั้งการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ด้วย ซึ่ง หากพิจารณาจากกระบวนการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ที่ถูกเสนอโดย Strongin และคณะในปี 1995³¹

ดังที่กล่าวถึงข้างต้น จะเห็นว่า ในกระบวนการดังกล่าว ระดับของ MT-MMP และ TIMP-2 บนผิวเซลล์เป็นปัจจัยที่สำคัญที่ทำให้กระบวนการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 เกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์ จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษาต่อไปว่า EGCG นั้นมีผลในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ที่ขั้นตอนใดและมีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของระดับ MT-MMP และ หรือ TIMP-2 หรือไม่ อย่างไร

ผลการศึกษาครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นถึงบทบาทของ EGCG ที่มีต่อเอนไซม์ MMP นอกเหนือจากการยับยั้งการเกิดมะเร็ง ซึ่งมีทั้งรายงานการศึกษาทางระบาดวิทยาในมนุษย์^{8,16} รวมทั้งการศึกษาอีกมากมายในสัตว์ทดลองและในห้องปฏิบัติการ และเป็นที่น่าสังเกตว่า กลไกของ EGCG ในการยับยั้งการเกิดมะเร็งที่มีรายงานถึงนั้น ก็ยังมีความหลากหลายของกลไกการทำงานของ EGCG เช่น สามารถยับยั้งการเหนี่ยวนำการเกิดมะเร็งโดยสารก่อมะเร็ง¹² การเหนี่ยวนำให้เซลล์เข้าสู่ G1 ของ cell cycle^{38,39} การเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis^{40,41} การยับยั้งการเหนี่ยวนำโดย growth factor ให้เกิดการแบ่งตัวของเซลล์^{13,14,42} การยับยั้ง telomerase activity¹¹ เป็นต้น ซึ่งสะท้อนว่าผลของ EGCG นั้น จะขึ้นกับปัจจัยหลายประการด้วยกัน คล้ายกับที่พบในการทดลองครั้งนี้

ในกรณีของเอนไซม์ MMP แม้จะมีรายงานว่า EGCG สามารถลดระดับการสร้างเอนไซม์ MMP-2 และ MT1-MMP ในเซลล์ glioblastoma¹⁷ เซลล์เพาะเลี้ยงของกล้ามเนื้อเรียบ⁴³ รวมทั้งความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MT1-MMP ซึ่งส่งผลต่อการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 โดยอ้อม⁴⁴ อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาผลของ EGCG ต่อระดับของเอนไซม์โปรตีโอไลติก (proteolytic enzyme) ในมะเร็งชนิดสแควร์เซลล์แต่อย่างใด การศึกษาในครั้งนี้แสดงผลของ EGCG ในการลดการเกิด แอคทีฟ MMP-2 ในเซลล์ HSC-3 และ HSC-7 ของมะเร็งชนิดสแควร์เซลล์ และในเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน HFF ด้วย กลไกที่น่าจะเป็นอีกกลไกหนึ่งของ EGCG ที่จะส่งผลยับยั้งในขั้นตอนการเจริญ และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งชนิดสแควร์เซลล์รวมทั้งอาจเกิดขึ้นในมะเร็งชนิดอื่น ๆ ด้วย อย่างไรก็ตามมีการศึกษาสารสกัดจากใบชาในแง่มุมต่าง ๆ มากมาย จึงเป็นที่น่าสนใจว่า EGCG อาจถูกพัฒนาต่อไปเพื่อใช้ในการรักษาโรคมะเร็งชนิดสแควร์เซลล์ซึ่งเป็นมะเร็งชนิดที่พบมากในช่องปากต่อไป

สรุป

งานวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า EGCG ซึ่งเป็นสารสกัดจากใบชาที่อยู่ในกลุ่มโพลีฟีนอล สามารถลดระดับการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 ที่เกิดในเซลล์ไลน์ที่ได้จากมะเร็งชนิดสแควร์เซลล์ HSC-3 และ HSC-7 รวมทั้งเซลล์ไลน์จากเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน HFF ได้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณอาจารย์และบุคลากรภาควิชากายวิภาคศาสตร์ที่ให้ความสะดวกในการใช้สถานที่สำหรับการทำวิจัยในครั้งนี้ งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากกองทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภชสำหรับสนับสนุนอาจารย์นักวิจัยใหม่ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปี 2545

เอกสารอ้างอิง

1. Slootweg PJ, Hordijk GJ, Koole R. Autopsy findings in patients with head and neck squamous cell cancer and their therapeutic relevance. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1996;32B(6):413-5.
2. Curran S, Murray GI. Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. *Eur J Cancer* 2000;36(13 Spec No):1621-30.
3. Timar J, Csuka O, Orosz Z, Jeney A, Kopper L. Molecular pathology of tumor metastasis. I. Predictive pathology. *Pathol Oncol Res* 2001;7(3):217-30.
4. John A, Tuszynski G. The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis. *Pathol Oncol Res* 2001;7(1):14-23.
5. Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* 2000;18(5):1135-49.
6. Tokumaru Y, Fujii M, Otani Y, Kameyama K, Imanishi Y, Igarashi N, et al. Activation of matrix metalloproteinase-2 in head and neck squamous cell carcinoma: studies of clinical samples and in vitro cell lines co-cultured with fibroblasts. *Cancer Lett* 2000;150(1):15-21.
7. Katori H, Baba Y, Imagawa Y, Nishimura G, Kagesato Y, Takagi E, et al. Reduction of in vivo tumor growth by MMI-166, a selective matrix metalloproteinase inhibitor, through inhibition of tumor angiogenesis in squamous cell carcinoma cell lines of head and neck. *Cancer Lett* 2002;178(2):151-9.
8. Dufresne CJ, Farnworth ER. A review of latest research findings on the health promotion properties of tea. *J Nutr Biochem* 2001;12(7):404-21.
9. Khan SG, Katiyar SK, Agarwal R, Mukhtar H. Enhancement of anti-oxidant and phase II enzymes by oral feeding of green tea polyphenols in drinking water to SKH-1 hairless mice: possible role in cancer chemoprevention. *Cancer Res* 1992;52(14):4050-2.
10. Hara Y. Influence of tea catechins on the digestive tract. *J Cell Biochem Suppl* 1997;27:52-8.
11. Naasani I, Seimiya H, Tsuruo T. Telomerase inhibition, telomere shortening, and senescence of cancer cells by tea catechins. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;249(2):391-6.

12. Muto S, Yokoi T, Gondo Y, Katsuki M, Shioyama Y, Fujita K, et al. Inhibition of benzo[a]pyrene-induced mutagenesis by (-)-epigallocatechin gallate in the lung of rpsL transgenic mice. *Carcinogenesis* 1999;20(3):421-4.
13. Ahn HY, Hadizadeh KR, Seul C, Yun YP, Vetter H, Sachinidis A. Epigallocatechin-3 gallate selectively inhibits the PDGF-BB-induced intracellular signaling transduction pathway in vascular smooth muscle cells and inhibits transformation of sis-transfected NIH 3T3 fibroblasts and human glioblastoma cells (A172). *Mol Biol Cell* 1999;10(4):1093-104.
14. Sachinidis A, Seul C, Seewald S, Ahn H, Ko Y, Vetter H. Green tea compounds inhibit tyrosine phosphorylation of PDGF beta-receptor and transformation of A172 human glioblastoma. *FEBS Lett* 2000;471(1):51-5.
15. Yang F, Oz HS, Barve S, de Villiers WJ, McClain CJ, Varilek GW. The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate blocks nuclear factor-kappa B activation by inhibiting I kappa B kinase activity in the intestinal epithelial cell line IEC-6. *Mol Pharmacol* 2001;60(3):528-33.
16. Yang CS, Chung JY, Yang G, Chhabra SK, Lee MJ. Tea and tea polyphenols in cancer prevention. *J Nutr* 2000;130(2S Suppl):472S-8S.
17. Annabi B, Lachambre MP, Bousquet-Gagnon N, Page M, Gingras D, Beliveau R. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin 3-gallate inhibits MMP-2 secretion and MT1-MMP-driven migration in glioblastoma cells. *Biochim Biophys Acta* 2002;1542(1-3):209-20.
18. Ruangpanit N, Chan D, Holmbeck K, Birkedal-Hansen H, Polarek J, Yang C, et al. Gelatinase A (MMP-2) activation by skin fibroblasts: dependence on MT1-MMP expression and fibrillar collagen form. *Matrix Biol* 2001;20(3):193-203.
19. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65(1-2):55-63.
20. Azzam HS, Arand G, Lippman ME, Thompson EW. Association of MMP-2 activation potential with metastatic progression in human breast cancer cell lines independent of MMP-2 production. *J Natl Cancer Inst* 1993;85(21):1758-64.
21. Koshiba T, Hosotani R, Wada M, Miyamoto Y, Fujimoto K, Lee JU, et al. Involvement of matrix metalloproteinase-2 activity in invasion and metastasis of pancreatic carcinoma. *Cancer* 1998;82(4):642-50.
22. Boyd RS, Balkwill FR. MMP-2 release and activation in ovarian carcinoma: the role of fibroblasts. *Br J Cancer* 1999;80(3-4):315-21.
23. Ellenrieder V, Alber B, Lacher U, Hendler SF, Menke A, Boeck W, et al. Role of MT-MMPs and MMP-2 in pancreatic cancer progression. *Int J Cancer* 2000;85(1):14-20.
24. Niinaka Y, Haga A, Negishi A, Yoshimasu H, Raz A, Amagasa T. Regulation of cell motility via high and low affinity autocrine motility factor (AMF) receptor in human oral squamous carcinoma cells. *Oral Oncol* 2002;38(1):49-55.
25. Myers SA, Wolowacz RG. Tetracycline-based MMP inhibitors can prevent fibroblast-mediated collagen gel contraction in vitro. *Adv Dent Res* 1998;12(2):86-93.
26. Sommers CL, Thompson EW, Torri JA, Kemler R, Gelmann EP, Byers SW. Cell adhesion molecule uvomorulin expression in human breast cancer cell lines: relationship to morphology and invasive capacities. *Cell Growth Differ* 1991;2(8):365-72.
27. Schutz A, Schneidenbach D, Aust G, Tannapfel A, Steinert M, Wittekind C. Differential expression and activity status of MMP-1, MMP-2 and MMP-9 in tumor and stromal cells of squamous cell carcinomas of the lung. *Tumour Biol* 2002;23(3):179-84.
28. Ikebe T, Shinohara M, Takeuchi H, Beppu M, Kurahara S, Nakamura S, et al. Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinase in tumor tissues correlates with the invasiveness of oral cancer. *Clin Exp Metastasis* 1999;17(4):315-23.
29. O-Chaoenrat P, Rhys-Evans P, Modjtahedi H, Court W, Box G, Eccles S. Overexpression of epidermal growth factor receptor in human head and neck squamous carcinoma cell lines correlates with matrix metalloproteinase-9 expression and in vitro invasion. *Int J Cancer* 2000;86(3):307-17.
30. Hong SD, Hong SP, Lee JI, Lim CY. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in oral squamous cell carcinomas with regard to the metastatic potential. *Oral Oncol* 2000;36(2):207-13.
31. Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI. Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem* 1995;270(10):5331-8.
32. Azzam HS, Thompson EW. Collagen-induced activation of the M(r) 72,000 type IV collagenase in normal and malignant human fibroblastoid cells. *Cancer Res* 1992;52(16):4540-4.
33. Ellerbroek SM, Fishman DA, Kearns AS, Bafetti LM, Stack MS. Ovarian carcinoma regulation of matrix metalloproteinase-2 and membrane type 1 matrix metalloproteinase through beta1 integrin. *Cancer Res* 1999;59(7):1635-41.
34. Ruangpanit N, Price JT, Holmbeck K, Birkedal-Hansen H, Guenzler V, Huang X, et al. MT1-MMP-dependent and -independent regulation of gelatinase A activation in long-term, ascorbate-treated fibroblast cultures: regulation by fibrillar collagen. *Exp Cell Res* 2002;272(2):109-18.
35. Lee IP, Kim YH, Kang MH, Roberts C, Shim JS, Roh JK. Chemopreventive effect of green tea (*Camellia sinensis*) against cigarette smoke-induced mutations (SCE) in humans. *J Cell Biochem Suppl* 1997;27:68-75.
36. Suganuma M, Okabe S, Sueoka N, Sueoka E, Matsuyama S, Imai K, et al. Green tea and cancer chemoprevention. *Mutat Res* 1999;428(1-2):339-44.
37. Yang CS, Chung JY, Yang GY, Li C, Meng X, Lee MJ. Mechanisms of inhibition of carcinogenesis by tea. *Biofactors* 2000;13(1-4):73-9.
38. Liang YC, Lin-Shiau SY, Chen CF, Lin JK. Inhibition of cyclin-dependent kinases 2 and 4 activities as well as induction of Cdk inhibitors p21 and p27 during growth arrest of human breast carcinoma cells by (-)-epigallocatechin-3-gallate. *J Cell Biochem* 1999;75(1):1-12.
39. Masuda M, Suzui M, Weinstein IB. Effects of epigallocatechin-3-gallate on growth, epidermal growth factor receptor signaling pathways, gene expression, and chemosensitivity in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Clin Cancer Res* 2001;7(12):4220-9.
40. Paschka AG, Butler R, Young CY. Induction of apoptosis in prostate cancer cell lines by the green tea component, (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Lett* 1998;130(1-2):1-7.
41. Islam S, Islam N, Kermod T, Johnstone B, Mukhtar H, Moskowitz RW, et al. Involvement of caspase-3 in epigallocatechin-3-gallate-mediated apoptosis of human chondrosarcoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;270(3):793-7.

42. Liberto M, Cobrinik D. Growth factor-dependent induction of p21(CIP1) by the green tea polyphenol, epigallocatechin gallate. *Cancer Lett* 2000;154(2):151-61.
43. Maeda K, Kuzuya M, Cheng XW, Asai T, Kanda S, Tamaya-Mori N, et al. Green tea catechins inhibit the cultured smooth muscle cell invasion through the basement barrier. *Atherosclerosis* 2003;166(1):23-30.
44. Dell'Aica I, Dona M, Sartor L, Pezzato E, Garbisa S. (-)Epigallocatechin-3-gallate directly inhibits MT1-MMP activity, leading to accumulation of nonactivated MMP-2 at the cell surface. *Lab Invest* 2002;82(12):1685-93.

Inhibitory effect of EGCG on collagen induced MMP-2 activation in oral squamous carcinoma cell lines

Neeracha Sanchavanakit¹ D.D.S., Ph.D

Amornrat Suwanchai³

Orachatr Boonyakiati³

Artiphan Pimkhaokham² D.D.S., Ph.D

Prasit Pavasant¹ D.D.S., Ph.D

¹ Department of Anatomy, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University

² Department of Oral Surgery, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University

³ Undergraduate student, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University

Abstract

Objective The purpose of this study was to investigate the effect of epigallocatechin gallate (EGCG), the major polyphenol compound of the tea extract on the inhibition of matrix metalloproteinase (MMP) -2 activation in oral squamous carcinoma cell lines.

Materials and methods The study was performed in the cultures of human squamous carcinoma (HSC) -3 and 7 and human foreskin fibroblast (HFF). EGCG at 0, 1 and 10 μ M was added to the 200 μ g/ml collagen induced MMP-2 activation in these cell lines for 48 hours. Conditioned media were collected and MMP-2 activation was analysed by gelatin zymography.

Result Ten μ M EGCG reduced the activation of MMP-2 in HSC-3 and HFF, whereas inhibited that of MMP-2 in HSC-7.

Conclusion The result suggested another role of EGCG in the reduction of MMP-2 activation, which was implicated in cancer metastatic process, apart from an antioxidant effect on carcinogenesis that has been reported in various types of cancer.

(CU Dent J 2003;26;1-14)

Key words: EGCG; HSC; MMP-2 activation
