

ผลของเคอร์คูมินต่อการเกิดหลอดเลือดใหม่ในหนูชนิดไมซ์
ที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งเรื้อรัง (HepG2)

นางสาว พรพรหม ย่อยสูงเนิน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาสรีรวิทยา (สหสาขาวิชา)

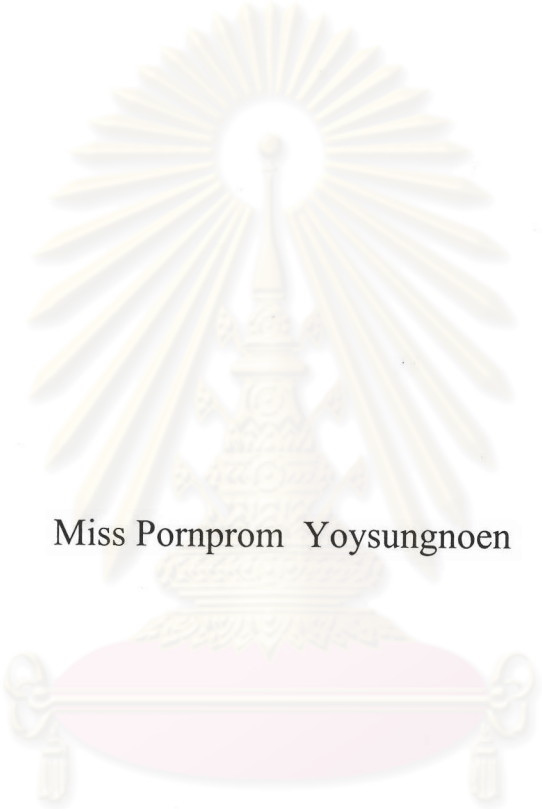
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-17-7042-1

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF CURCUMIN ON ANGIOGENESIS OF
HEPATOCELLULAR CARCINOMA CELLS (HepG2)
IMPLANTED IN NUDE MICE



Miss Pornprom Yoysungnoen

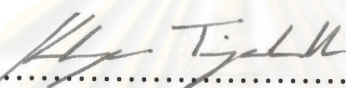
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy in Physiology (Inter-department)
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 2004
ISBN 974-17-7042-1

Thesis Title EFFECTS OF CURCUMIN ON ANGIOGENESIS
 OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA CELLS
 (HepG2) IMPLANTED IN NUDE MICE


By Miss Pornprom Yoysungnoen
Field of Study Physiology
Thesis Advisor Associate Professor Suthiluk Patumraj, Ph.D.
Thesis Co-advisor Associate Professor Parvapan Bhattarakosol, Ph.D.
Thesis Co-advisor Ponthip Wirachawong, Ph.D.


Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in
Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctor's Degree



.....Dean of the Graduate School
(Assistant Professor M.R. Kalaya Tingsabadh, Ph.D.)


THESIS COMMITTEE

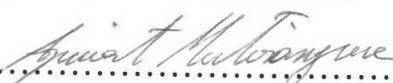

.....Chairman
(Associate Professor Prasong Siriviriyakul, M.D.)

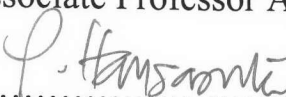

.....Thesis Advisor
(Associate Professor Suthiluk Patumraj, Ph.D.)


.....Thesis Co-advisor
(Associate Professor Parvapan Bhattarakosol, Ph.D.)


.....Thesis Co-advisor
(Ponthip Wirachawong, Ph.D.)


.....Member
(Hideyuki Niimi, Ph.D.)


.....Member
(Associate Professor Apiwat Mutirangura, M.D., Ph.D.)


.....Member
(Pokrath Hansasuta, M.D., D.Phil. (Oxon))

พรพรม ย้อยสูงเนิน : ผลของเคอร์คูมินต่อการเกิดหลอดเลือดใหม่ในหนูหนูดไมซ์ที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) (Effects of Curcumin on Angiogenesis of Hepatocellular Carcinoma Cells (HepG2) Implanted in Nude Mice) อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ.ดร. สุทธิลักษณ์ ปทุมราช, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร. ภาวพันธ์ ภัทร โกศล และ ดร. พรทิพย์ วิรัชวงศ์ ; 159 หน้า ISBN 974-17-7042-1.

วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เพื่อศึกษาผลของเคอร์คูมินต่อการเกิดหลอดเลือดใหม่ในหนูหนูดไมซ์ที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) และเพื่อศึกษาผลของเคอร์คูมินต่อ angiogenic biomarkers คือ ระดับ COX-2 และ VEGF

ใช้หนูหนูดไมซ์พันธุ์ BALB/C น้ำหนัก 20-25 กรัมในการทดลอง ภายหลังจากการใส่ dorsal skin-fold chamber แล้ว กลุ่ม HepG2 ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) (2×10^6 เซลล์ใน 30 ไมโครลิตร) บน dorsal skin-fold chamber ส่วนกลุ่มควบคุมได้รับ normal saline แทน (Con) 1 วันภายหลังจากการปลูกถ่ายเซลล์ HepG2 สัตว์ทดลองกลุ่ม (Con และ HepG2) และ (Con-cur และ HepG2-cur) ถูกป้อนด้วย 0.1% dimethyl sulfoxide (DMSO) และเคอร์คูมินขนาด 300 และ 3,000 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัมตามลำดับ วันที่ 3, 7 และ 14 หลังการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งการมองภาพหลอดเลือดขนาดเล็กบริเวณการปลูกเซลล์มะเร็งทำภายใต้กล้อง Intravital fluorescent videomicroscopy ด้วยการใช้ 0.1 มิลลิลิตรของ 0.5% rhodamine B isothiocyanate-labeled dextran (RITC-dextran) เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ซิรั้ม VEGF และ COX-2 โปรตีนในเนื้อเยื่อถูกวัดโดยใช้ชุดตรวจ VEGF ELISA และ Western blot analysis ตามลำดับ นอกจากนี้ชิ้นเนื้อภายใน dorsal skin-fold chamber ถูกเก็บเพื่อตรวจทางกล้องจุลทรรศน์ขนาดเล็กโดยใช้เทคนิค Hematoxylin&Eosin (H&E)

ผลการทดลองจากภาพวิดีโอแสดงการขยายตัวของหลอดเลือด การคดงอ การยอมให้สารผ่านออกทางหลอดเลือดเพิ่มขึ้นในหลอดเลือดขนาดเล็ก 3 วันภายหลังจากการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง HepG2 7 วันภายหลังจากการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง HepG2 พบการเกิดหลอดเลือดใหม่จากการแสดงลักษณะการงอกออกของเซลล์เอนโดทีเลียลจากหลอดเลือดดั้งเดิม การวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Image software แสดงให้เห็นถึงความหนาแน่นของหลอดเลือดขนาดเล็กและเส้นผ่านศูนย์กลางของหลอดเลือดขนาดเล็กในกลุ่ม HepG2 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในวันที่ 7 และ 14 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่อายุเท่ากัน ($p < 0.001$, $p < 0.05$) การเพิ่มความหนาแน่นและเส้นผ่านศูนย์กลางของหลอดเลือดขนาดเล็กในกลุ่ม HepG2 มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มปริมาณของการกำซาบเลือดในเนื้อเยื่อซึ่งวัดโดยใช้ Laser Doppler Flowmeter 7 วันหลังการรักษาเคอร์คูมินระดับความเข้มข้นสูงทำให้ค่าการเพิ่มขึ้นของความหนาแน่น เส้นผ่านศูนย์กลางของหลอดเลือดขนาดเล็ก และปริมาณการกำซาบเลือดในเนื้อเยื่อลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนการให้เคอร์คูมินระดับความเข้มข้นต่ำ ค่าตัวแปรเหล่านั้นลดลงภายใน 14 วันหลังการรักษา ทั้งนี้สนับสนุนด้วยผลทางกล้องจุลทรรศน์ขนาดเล็กพบว่าเนื้อเยื่อภายใน dorsal skin-fold chamber ที่รักษาด้วยเคอร์คูมินระดับสูงมีการฝังตัวของเซลล์มะเร็งลดลงอย่างชัดเจน กลุ่มควบคุมและกลุ่มควบคุมที่ได้รับการรักษาด้วยเคอร์คูมินที่ไม่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง พบว่าการรักษาด้วยเคอร์คูมินไม่มีผลใดๆ ต่อตัวแปรด้านหลอดเลือดขนาดเล็กตลอดระยะเวลาการรักษา

การวิเคราะห์ด้วย Western blot analysis พบว่าการแสดงของ COX-2 มากตั้งแต่ 3 วันหลังการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง HepG2 ยิ่งไปกว่านั้นการศึกษาค้นคว้านี้แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ COX-2 และความหนาแน่นของหลอดเลือดขนาดเล็ก ในกลุ่ม HepG2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($r^2 = 0.9607$, $p < 0.01$). ซิรั้ม VEGF เพิ่มขึ้นในกลุ่ม 7 และ 14 วัน HepG2 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม 3 วัน HepG2 และกลุ่มควบคุมที่อายุเท่ากันอย่างชัดเจน ($p < 0.001$) การแสดงออกของ COX-2 ถูกยับยั้งด้วยการรักษาด้วยเคอร์คูมินทั้งระดับต่ำและสูงภายหลังจาก 3 วันของการรักษาเท่านั้น การเพิ่มขึ้นของซิรั้ม VEGF ในกลุ่ม HepG2 แสดงการลดลงด้วยการรักษาด้วยเคอร์คูมินที่ขนาด 300 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัมหลังจาก 7 วันของการรักษา ความสัมพันธ์ระหว่างการเพิ่มขึ้นของซิรั้ม VEGF และความหนาแน่นของหลอดเลือดขนาดเล็ก ต่ำกว่าความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ COX-2 และความหนาแน่นของหลอดเลือดขนาดเล็ก ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ COX-2 และซิรั้ม VEGF อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

โดยสรุปการศึกษาค้นคว้านี้แสดงให้เห็นว่า COX-2 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับการเกิดหลอดเลือดใหม่ในโมเดลการปลูกถ่ายเซลล์ HepG2 ในหนูหนูดไมซ์ COX-2 และ VEGF อาจมีส่วนร่วมในการเกิดหลอดเลือดใหม่ด้วยกลไกที่ต่างกัน เคอร์คูมินมีคุณสมบัติยับยั้งการเกิดหลอดเลือดใหม่ ซึ่งผลของเคอร์คูมินในการยับยั้งการเกิดหลอดเลือดใหม่นั้นอาจผ่านทางกลไกการสร้าง angiogenic stimulator หรือ biomarkers ดังนั้นในอนาคตเคอร์คูมินสามารถเป็นยาที่ไม่มีพิษสำหรับรักษาภาวะนี้ได้

หลักสูตร..... สหสาขาวิชา.....ลายมือชื่อนิติ..... พรพรม ย้อยสูงเนิน
สาขาวิชา..... สรีรวิทยา.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... สุทธิลักษณ์ ปทุมราช
ปีการศึกษา..... 2547.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... ภาวพันธ์ ภัทรโกศล
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... พรทิพย์ วิรัชวงศ์

4389678720 : MAJOR PHYSIOLOGY

KEYWORD: CURCUMIN/TUMOR ANGIOGENESIS/NUDE MICE/HepG2/COX-2/VEGF

PORNPROM YOYSUNGNOEN: EFFECTS OF CURCUMIN ON ANGIOGENESIS OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA CELLS (HepG2) IMPLANTED IN NUDE MICE.

THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. SUTHILUK PATUMRAJ, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. PARVAPAN BHATTARAKOSOL, Ph.D., AND PONTHIP WIRACHAWONG, Ph.D. 159 pp. ISBN 974-17-7042-1.

The objective of this study was to determine the effects of curcumin on angiogenesis in HepG2-implanted nude mice and to study the effects of curcumin on HepG2 angiogenic biomarkers, COX-2 and VEGF levels. Male BALB/c nude mice weighing 20-25 g were used. After the implantation of a dorsal skin-fold chamber, the Hepatocellular carcinoma cells (HepG2) ($30 \mu\text{l}$ 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%) and curcumin solution (300 or 3,000 mg/kgBW) were fed oral daily to both groups (Con and HepG2) and (Con-cur and HepG2-cur groups), respectively. On days 3, 7, and 14 post-inoculation, the tumor microvasculature was visualized by injecting 0.1 ml of 0.5% rhodamine B isothiocyanate-labeled dextran (RITC-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 Western blot analysis, respectively. Moreover, the specimen from the tissue within dorsal skin chamber was collected for further histological examination using Hematoxylin&Eosin technique (H&E).

The experimental results revealed that the videoimage demonstrated dilatation, tortuosity, hypermeability of host microvessels after 3 days of HepG2 inoculation. The tumor angiogenesis was observed with endothelial cells sprouting in the mother vessel on day 7 after the inoculation of HepG2. 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 and diameters were significantly increased on day 7, and day 14, compared to the aged-matched control-group ($p < 0.001$, $p < 0.05$). This increment of neocapillary densities and diameters in HepG2 groups appeared to be correlated with increase in the tissue blood perfusion measured using a Laser Doppler Flowmeter. High dose treatment of curcumin significantly attenuated the increase of tumor neocapillary density, diameter and tissue blood perfusion after 7 days of the treatment. Low dose treatment of curcumin, these parameters were significantly decreased after 14 days of curcumin treatment. It is strongly supported by histological examination, the section of tissue within dorsal skin fold chamber of HepG2-cur3,000 show remarkable decreased in tumor cells deposit. In both Con and Con-cur groups without tumor, the curcumin treatment did not any affect on the microcirculatory parameters during any periods.

Western blot analysis data demonstrated overexpression of COX-2 since 3 days after the inoculation of HepG2. Moreover, the present study demonstrated the significantly relationship between COX-2 expression and neocapillary density in HepG2 groups ($r^2 = 0.9607$, $p < 0.01$). Sera VEGF were markedly increased in 7 and 14 days HepG2 groups as compared to 3 days HepG2 group and aged-matched control groups ($p < 0.001$). The tumor-induced overexpression of COX-2 was inhibited by both low and high dose of curcumin only after 3 days of the treatment. Elevations of serum VEGF in HepG2 groups were reduced by curcumin treatment at the dose of 300 mg/kgBW after 7 days of the treatment. A correlation between elevation of serum VEGF and NCD was lower than that between COX-2 and NCD ($r^2 = 0.7681$, $p < 0.32$). No significant correlation was found between COX-2 expression and VEGF production ($r^2 = 0.5829$, $p < 0.447$).

In conclusion, the present study indicates that COX-2 is closely related to tumor angiogenesis in the HepG2-implanted nude mice model. COX-2 and VEGF may co-modulate angiogenesis in different pathway. Curcumin has anti-angiogenic activity *in vivo*. The activity of curcumin in inhibiting angiogenesis may be mediated in part through reduction of angiogenic stimulator or biomarkers production. Therefore, curcumin should be considered as a possible safe and non-toxic drug for treatment against cancer in the future.

Field of study:.....Physiology.....Student's signature..... Pornprom Y.

Academic year:.....2004.....Advisor's signature..... Suthiluk Patumraj

Co-advisor's signature..... Parvapan Bhattarakosol

Co-advisor's signature..... Ponthip Wirachawong

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest and sincere gratitude and appreciation to Assoc. Prof. Dr. Suthiluk Patumraj, my advisor, for her valuable guidance, supervision, encouragement, and kindness which have enabled me to carry out my study successfully. I am greatly indebted to Assoc. Prof. Dr. Parvapan Bhattarakosol and Dr. Ponthip Wirachawong, my co-advisors, for their valuable suggestions, helpful criticism, and kindness throughout my stay in their laboratory at Department of Microbiology, Chulalongkorn University and The Government Pharmaceutical Organization, respectively.

My sincere appreciation and gratitude are also contributed to Dr. Hideyuki Niimi, Assoc. Prof. Dr. Apiwat Mutirangura, and Dr. Pokrath Hansasuta, the members of the thesis committee for their magnificent comments and the correction of this thesis.

I am also very grateful to Graduate School, Chulalongkorn University and the Ministry of University, and the Thai Asahi Glass Foundation for the financial support.

I would like to extend my appreciation to the staff and my friends of the Physiology Department, and Microbiology Department for their help and friendship. In addition, I would like to thank Miss Pattarin Sridulyakul for her excellent assistance.

Finally, I am extremely grateful to my parents for their love, understanding, and encouragement throughout my study period.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

TABLE OF CONTENTS

	PAGE
ABSTRACT (THAI).....	iv
ABSTRACT (ENGLISH).....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
TABLE OF CONTENTS.....	vii
LISTS OF TABLES.....	viii
LISTS OF FIGURES.....	x
LISTS OF ABBREVIATIONS.....	xiv
CHAPTER	
I INTRODUCTION.....	1
II REVIEW LITERATURE.....	4
III MATERIALS AND METHODS.....	37
IV RESULTS.....	70
V DISCUSSION.....	105
VI CONCLUSION.....	119
REFERENCES.....	122
APPENDICES.....	142
BIOGRAPHY.....	158

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LISTS OF TABLES

TABLES	PAGE
2.1. Positive and negative regulators of angiogenesis.....	10
3.1. The optical density of serial VEGF standard concentrations.....	48
3.2. Standard curve preparation.....	51
4.1. Values of mean body weight (g) for each group at different time point with and without treatment of curcumin (mean \pm SEM).....	78
4.2. Changes in tissue perfusion of HepG2, and HepG2-cur groups during any periods as compared to aged-matched control, manifested as per cents of the control values.....	79
4.3. Capillary density (%) of the tumor tissue in the dorsal skin-fold chamber on 3, 7 and 14 days after the implantation of HepG2 with and without curcumin treatment (mean \pm SEM).....	87
4.4. Capillary diameter (μ m) of the tumor tissue in the dorsal skin-fold chamber on 3, 7 and 14 days after the implantation of HepG2 with and without curcumin treatment (mean \pm SEM)....	90
4.5A. COX-2 protein levels by using image analysis measurement in 3 days HepG2 group with and without curcumin treatment (mean \pm SEM).....	93
4.5B. COX-2 protein levels by using image analysis (Global LabII software measurement in 7 days HepG2 group with and without curcumin treatment (mean \pm SEM).....	94
4.5C. COX-2 protein levels by using image analysis measurement in 14 days HepG2 group with and without curcumin treatment (mean \pm SEM).....	95
4.6. Comparisons of COX-2 protein levels by using image analysis (Global LabII software) measurement in 3, 7, and 14 days HepG2 group with and without curcumin treatment (mean \pm SEM).....	96

LISTS OF TABLES

TABLES	PAGE
4.7. Serum VEGF (ng/ml) of control and HepG2 groups after 3, 7 and 14 days with and without curcumin treatment (mean \pm SEM).....	99
4.8. Relationship between capillary density (mean \pm SEM) and COX-2 protein levels of HepG2 groups (mean \pm SEM) during any periods.....	102
4.9. Relationship between caillary density (mean \pm SEM) and serum VEGF levels of HepG2 groups (mean \pm SEM) during any periods.....	103
4.10. Relationship between COX-2 protein levels (μ g) (mean \pm SEM) and serum VEGF levels of HepG2 groups (mean \pm SEM) during any periods.....	104


 ศูนย์วิทยทรัพยากร
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LISTS OF FIGURES

FIGURES	PAGE
2.1. The VEGFs and their receptors	18
2.2. Mechanisms of action of VEGF in angiogenesis.....	20
2.3. The triggering mechanism in tumor angiogenesis: inactivated tumor suppressor genes/activated oncogenes versus hypoxia.....	22
2.4. Bifunctional role of the COX enzyme (prostaglandin H synthase) in the biosynthesis of prostaglandins and thromboxanes, and physiological and pathophysiological effects of the COX isoenzymes.....	24
2.5. Signal transduction pathways influencing COX-2 expression.....	27
2.6. Chemical structure of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin.....	31
2.7. Pathways of metabolism of curcumin.....	35
3.1. The animal with dorsal skin fold chamber.....	38
3.2. The animal with dorsal skin fold chamber and area of HepG2 inoculation.....	39
3.3. Microphotographs of an area of tissue in the dorsal skin-fold chamber.....	40
3.4. Schematic of a setup for intravital fluorescent microscopy of the dorsal skin fold chamber microvasculature in the mice.....	41
3.5. An example of videoimage containing clear neocapillaries Network for determination of NCD.....	42
3.6. Method for measurement of capillary diameter.....	43
3.7. Measurement of tissue perfusion by using a Doppler flowmetry of an area of tissue within the dorsal skin-fold chamber.....	44
3.8. Serial dilution of VEGF Standard.....	46
3.9. The standard curve for VEGF level.....	49
3.10. A calibration curve for molecular weight estimation by SDS-PAGE.....	56

LISTS OF FIGURES

FIGURES	PAGE
3.11. The image file of Western blotting outcome of COX-2 standard was analyzed by Global Lab II software	60
3.12. The image file of Western blotting outcome of COX-2 standard was inactivated through ROI tool menu.....	61
3.13. The newly activated ROI turns red.....	61
3.14. “Histogram Tool” was used for further analysis.....	62
3.15. “Histogram” for analyzing digital image of COX-2 band.....	62
3.16. “Histogram” can perform the analysis.....	63
3.17. “Histogram” statistic calculation.....	63
3.18. Demonstration of the created rectangles for every bands of COX-2 standards.....	63
3.19. Edge Finder Tool.....	64
3.20. Edge Finder tool was used to analyze for each activated rectangle.....	65
3.21. The image file of Western blotting outcome of COX-2 standard was used and analyzed by Tool Edge that within all rectangles ROI.....	65
3.22. The activated Western blotting of COX-2 band after defining the edge.....	65
3.23. Histogram was created using the first Edge ROI from image COX-2 standard.....	66
3.24. The histogram functional tool (Transfer), which was used for transfer histogram data (curve data and statistics data) to the Excel spreadsheet	66
3.25. The serial concentration (0.0625, 0.125, 0.25,0.5,1 µg/10µl) of COX-2 from one gel.....	67
3.26. Standard curve for optimized condition COX-2 protein level.....	68
4.1. The photograph of the growth of tumor cells could be observed within the chamber on day 14.....	77

LISTS OF FIGURES

FIGURES	PAGE
4.2. Changes in tissue perfusion of HepG2, and HepG2-cur groups during any periods as compared to aged-matched control, manifested as per cents of the control values.....	80
4.3. At the early stage of tumor angiogenesis onset, 3 days period, the results of tumor chemotaxis caused the native configurationally changed, which were characterized by tortuosity, dilatation, and hyperpermeability.....	81
4.4. At the early stage of tumor angiogenesis onset, 7 days period.....	82
4.5. Fluorescence videoimages of neocapillaries 14 days after the inoculation of tumor cells.....	83
4.6. Fluorescence videoimages of neocapillaries (contrast-enhanced by RITC-extran) induced in the dorsal skin-fold chamber on day 0 (Control), 3, 7 and 14 after the implantation of tumor cells.....	84
4.7. Fluorescence videoimages of neocapillaries on 7 and 14 days after the implantation of tumor cells without and with treatment of curcumin (3,000 mg/kgBW) for HepG2 (A, B) and HepG2-cur3,000 groups (C, D).....	85
4.8. Confocal laser image of an area of tissue in the dorsal skin-fold chamber (stained with hematoxylin-eosin) in 7 and 14 days HepG2 groups with and without treatment of curcumin.....	86
4.9. Capillary density (%) of the tumor tissue in the dorsal skin-fold chamber on 3, 7 and 14 days after the implantation of HepG2 with and without curcumin treatment.....	88
4.10. Relationship between capillary density and time courses of vehicle or curcumin treatment in HepG2, HepG2-cur300, and HepG2-cur3,000 groups.....	89

LISTS OF FIGURES

FIGURES	PAGE
4.11. Capillary diameter (μm) of the tumor tissue in the dorsal skin-fold chamber on 3, 7 and 14 days after the implantation of HepG2 with and without curcumin treatment	91
4.12. Western blot analysis of COX-2 protein.....	92
4.13. Comparisons of COX-2 protein levels by using image analysis (Global LabII software) measurement in 3, 7, and 14 days HepG2 group with and without curcumin treatment.....	97
4.14. Relationship between COX-2 protein levels and time courses of vehicle or curcumin treatment in HepG2, HepG2-cur300, and HepG2-cur3,000 groups.....	98
4.15. Serum VEGF (ng/ml) of control and HepG2 groups after 3, 7 and 14 days with and without curcumin treatment....	100
4.16. Relationship between serum VEGF and time courses of vehicle or curcumin treatment in HepG2, HepG2-cur300, and HepG2-cur3,000 groups.....	101
4.17. Relationship between capillary density and COX-2 protein levels of HepG2 groups during any periods.....	102
4.18. Relationship between capillary density and serum VEGF levels of HepG2 groups during any periods.....	103
4.19. Relationship between COX-2 protein levels and serum VEGF levels during any periods.....	104
5.1. Purposed mechanisms for effects of curcumin as an anti-angiogenic agent.....	118

LISTS OF ABBREVIATIONS

Ang-1	=	Angiopoietin-1
APCA	=	adenomatous Polyposis Coli
AP-1	=	Activator Protein-1
AT-2	=	Angiotensin II
BSA	=	Bovine Serum Albumin
BW	=	Body Weight
CD	=	Chenodeoxycholate
COX	=	Cyclooxygenase
CRE	=	cAMP Response Element
DMSO	=	Dimethyl Sulfoxide
ECs	=	Endothelial Cells
ECM	=	Extracellular Matrix
EGF	=	Epidermal Growth Factor
ERK	=	Extracellular Signal-Regulated Kinase
FAP	=	Familial Adenomatous Polyposis
FCS	=	Fetal Calf Serum
FGFs	=	Fibroblast Growth Factors
FGF-2	=	Fibroblast Growth Factor-2
aFGF	=	Acidic Fibroblast Growth Factor
bFGF	=	basic Fibroblast Growth Factor
Flk-1	=	Fetal Liver Kinase-1
GM-CSF	=	Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor
Grb2/m-sos-1	=	A nucleotide exchange factor for Ras
GTP	=	Guanidine Triphosphate
HETE	=	Hydroxyeicosatetraenoic acids
HGF	=	Hepatocyte Growth Factor
HIF-1a	=	Hypoxia-Inducible Factor-1alpha
HPLC	=	High Performance Liquid Chromatography
HUVECs	=	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
i.g.	=	Intragastric
i.p.	=	Intraperitoneal
IC ₅₀	=	50% Inhibitory Concentration

LISTS OF ABBREVIATIONS

IGF-1	=	Insulin-like Growth Factor-1
IP ₃	=	Inositol 1,4,5-triphosphate
JNK	=	c-Jun N-Terminal Kinase
KDR	=	Kinase Insert Domain-Containing Receptor
LPS	=	Lipopolysaccharide
LT	=	Leukotrienes
LTB ₄	=	Leukotrienes B ₄
LTC ₄	=	Leukotrienes C ₄
LTD ₄	=	Leukotrienes D ₄
MAP	=	Mitogen Activated Protein
MAPK	=	Mitogen activated protein kinase
MMPs	=	Matrix metalloproteinases
NCD	=	Neocapillary Density
NSAIDs	=	Nonsteriodal Anti-inflammatory Drugs
NF-IL-6	=	Nuclear Factor for Interleukin-6
NF-κB	=	Nuclear Factor-Kappa B
NOS	=	Nitric Oxide Synthase
eNOS	=	endothelial Nitric Oxide Synthase
iNOS	=	inducible Nitric Oxide Synthase
ODC	=	Ornithine Decarboxilase
PAs	=	Plasminogen Activators
tPA	=	Tissue-Type Plasminogen Activators
uPA	=	Urokinase Plasminogen Activators
PAIs	=	Plasminogen Activator Inhibitors
PAI-1	=	Plasminogen Activator Inhibitors-1
PDGF-BB	=	Platelet-Derived Growth Factor-BB
PG	=	Prostaglandin
PGE ₂	=	Prostaglandin E ₂
PGI ₂	=	Prostacyclin
PGF	=	Placenta Growth Factor
PKC	=	Protein Kinase C

LISTS OF ABBREVIATIONS

PIGF	=	Placental Growth Factor
PMA	=	Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
RGD	=	Arg-Gly-Asp
RTKs	=	Receptor tyrosine kinases
SDS-PAGE	=	Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel
SH-2	=	Src-homology-2
STATs	=	Signal transducers and activators of transcriptions
TGF- α	=	Transforming Growth Factor-alpha
TIMPs	=	Inhibitors of matrix-degrading proteolytic enzymes
TPA	=	12-O-Tetradeca-noylphorbol-13-Acetate
TNF	=	Tumor Necrosis Factor
TGF	=	Transforming Growth Factor
TGF- β	=	Transforming Growth factor-beta
TSP-1	=	Thrombospondin
TX	=	Thromboxanes
TXA ₂	=	Thromboxanes A ₂
VEGF	=	Vascular Endothelial Growth Factor
VPF	=	Vascular Permeability Factor
vWF	=	von Willebrand Factor

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย