



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของยาสมุนไพรฟ้าทะลายโจรต่อการแสดงออกของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450

โดย รองศาสตราจารย์ ดร.กนกวรรณ จารุกัจฉา

ธันวาคม 2552

สัญญาเลขที่ RMU5080017

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของยาสมุนไพรฟ้าทะลายโจรต่อการแสดงออกของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450

รองศาสตราจารย์ ดร.กนกวรรณ จารุกัจฉ
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
และสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

คำนำ

โครงการผลของยาสมุนไพรฟ้าทะลายโจรต่อการแสดงออกของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 เป็นการศึกษาผลของแอนโดรกราโฟไลด์ ซึ่งเป็นสารสำคัญในสมุนไพรฟ้าทะลายโจรต่อการแสดงออกของไซโตโครม พี 450 แฟมิลี 1 ในเซลล์ตับปฐมภูมิและตับของหนูไมซ์สายพันธุ์ C57BL/6 ตลอดจนปัจจัยเสริมต่างๆ ที่มีผลต่อการแสดงศักยภาพของแอนโดรกราโฟไลด์ต่อระบบการควบคุมการแสดงออกของไซโตโครม พี 450 การศึกษานี้ นับเป็นรายงานแรก que แสดงถึงศักยภาพของฟ้าทะลายโจรและแอนโดรกราโฟไลด์ ที่มีประโยชน์ใช้ในแง่เป็นสารเพื่อศึกษาประเมินกลไกการควบคุมวิถีการเหนี่ยวนำของ CYP1A1 และให้ข้อมูลยืนยันการสนับสนุนให้มีข้อควรระวังของการใช้ฟ้าทะลายโจรในการแพทย์ทางเลือกหรือการใช้เพื่อเสริมสุขภาพอย่างสมเหตุสมผล เนื่องจากศักยภาพของแอนโดรกราโฟไลด์ต่อยีน CYP1A ซึ่งเป็นยีนหลักที่รับผิดชอบต่อการเปลี่ยนแปลง procarcinogen ให้เป็นสารก่อมะเร็ง อันอาจเป็นการเพิ่มความเสี่ยงของการเป็นมะเร็งในกรณีที่ร่างกายไม่สามารถกำจัดสารก่อมะเร็งเหล่านี้ได้ด้วยกลไกทดแทนอย่างเหมาะสม

รองศาสตราจารย์ ดร.กนกวรรณ จารุกัจฉา

26 มีนาคม 2553

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: RMU5080017

ชื่อโครงการ: ผลของยาสมุนไพรฟ้าทะลายโจรต่อการแสดงออกของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450

ชื่อนักวิจัย: รองศาสตราจารย์ ดร.กนกวรรณ จารุกัจฉา

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

E-mail Address: kanok_ja@kku.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 1 ธันวาคม 2549 ถึง 30 พฤศจิกายน 2552

ผลของแอนโดรกราโฟไลด์ซึ่งเป็นสารสำคัญหลักกลุ่ม diterpenoid ในสมุนไพรฟ้าทะลายโจรต่อการแสดงออกของไซโตโครม พี 450 แฟมิลี 1 ได้แก่ CYP1A1, CYP1A2 และ CYP1B1 ตลอดจน aryl hydrocarbon receptor (AhR) ถูกประเมินเปรียบเทียบกับสารกระตุ้นต้นแบบของ CYP1A ได้แก่ benz[a]anthracene, β -naphthoflavone และ 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin ในเซลล์ตับปฏุมภูมิและตับของหนูไมซ์สายพันธุ์ C57BL/6 เพศผู้ พบว่าแอนโดรกราโฟไลด์สามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของ CYP1A1 และ CYP1A2 ในลักษณะที่แปรผันตรงกับความเข้มข้น โดยไม่เปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ CYP1B1 และ AhR นอกจากนี้ยังพบว่าแอนโดรกราโฟไลด์มีศักยภาพในการเสริมฤทธิ์การเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีน CYP1A1 ในทุกระดับการแสดงออกตั้งแต่การถอดรหัส การแปลรหัส และสมรรถนะของเอนไซม์ และการเสริมฤทธิ์นี้สามารถถูกยับยั้งได้ด้วย resveratrol ซึ่งเป็นสารต้าน AhR และฮอร์โมนเพศชาย testosterone นับเป็นปัจจัยสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการแสดงศักยภาพนี้ ผลการศึกษานี้จึงนับเป็นรายงานแรกที่แสดงถึงศักยภาพของฟ้าทะลายโจรและแอนโดรกราโฟไลด์ที่มีประโยชน์ ในแง่เป็นสารที่ใช้เพื่อศึกษาประเมินกลไกการควบคุมวิถีการเหนี่ยวนำของ CYP1A1 นอกจากนี้ เทคนิค microarray ยังยืนยันศักยภาพดังกล่าวของแอนโดรกราโฟไลด์ ตลอดจนให้ข้อมูลของยีนในหนูไมซ์ที่ถูกเหนี่ยวนำหรือยับยั้งได้โดยแอนโดรกราโฟไลด์อีกด้วย จากผลการศึกษานี้ สนับสนุนให้มีข้อควรระวังของการใช้ฟ้าทะลายโจรในการแพทย์ทางเลือกหรือการใช้เพื่อเสริมสุขภาพอย่างสมเหตุสมผล เนื่องจากศักยภาพของแอนโดรกราโฟไลด์ซึ่งเป็นสารหลักในสมุนไพรนี้ ที่สามารถเหนี่ยวนำและเสริมฤทธิ์การเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีน CYP1A1 ที่ถูกกระตุ้นโดยสารกระตุ้นต้นแบบของ CYP1A ซึ่งยีน CYP1A1 เป็นยีนหลักที่รับผิดชอบต่อการเปลี่ยนแปลง procarcinogen ให้เป็นสารก่อมะเร็ง ดังนั้น จึงอาจเป็นการเพิ่มปริมาณสารก่อมะเร็งในร่างกายให้เพิ่มมากขึ้นจนร่างกายไม่สามารถกำจัดได้ด้วยกลไกทดแทนอย่างเหมาะสม

คำหลัก: ฟ้าทะลายโจร, แอนโดรกราโฟไลด์, เอนไซม์ไซโตโครม พี 450, CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, 3-methylcholanthrene, β -naphthoflavone, testosterone, microarray, orchiectomy

Abstract

Project Code: RMU5080017

Project Title: Influence of Herbal Medicine "*Andrographis paniculata*" on Expression of Cytochrome P450 Enzymes

Investigator: Associate Professor Dr.Kanokwan Jarukamjorn
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University

E-mail Address: kanok_ja@kku.ac.th

Project Period: 1 December 2006 to 30 November 2009

Effects of andrographolide, the major diterpenoids constituent of *Andrographis paniculata*, on the expression of cytochrome P450 family1 members, including CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1, as well as on aryl hydrocarbon receptor (AhR) expression in primary hepatocyte cultures and liver of male C57BL/6 mouse were investigated in comparison with the effects of typical CYP1A inducers, including benz[a]anthracene, β -naphthoflavone (β -NF), and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. Andrographolide significantly induced the expression of CYP1A1 and CYP1A2 mRNAs in a concentration-dependent manner, but did not induce that of CYP1B1 or AhR. Interestingly, andrographolide plus the typical CYP1A inducers synergistically induced CYP1A1 expression, and the synergism was blocked by an AhR antagonist, resveratrol, or deficiency of male sex hormone, testosterone. The CYP1A1 protein expression and enzyme activity showed a similar pattern of induction. This is the first report that shows that andrographolide has a potency to induce CYP1A1 enzyme and indicates that andrographolide could be a very useful compound for investigating the regulatory mechanism of the CYP1A1 induction pathway. The microarray assay was employed to analyze genes whose expression was modified by andrographolide and to confirm andrographolide-synergistic induction of β -NF-induced CYP1A1 expression. In addition, our findings suggest preparing advice for rational administration and elucidating drug interaction and risk assessment with the use of *A. paniculata*, according to its ability to induce CYP1A1.

Keywords: *Andrographis paniculata*, andrographolide, cytochrome P450, CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, 3-methylcholanthrene, β -naphthoflavone, testosterone, microarray, orchietomy

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและสำนักงานคณะกรรมการ
อุดมศึกษา ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยโครงการผลของยาสมุนไพรฟ้าทะลายโจรต่อการแสดงออกของ
เอนไซม์ไซโตโครม พี 450 อันเป็นการเปิดโอกาสให้นักวิจัยได้ทำการศึกษาด้วยกระบวนการทาง
วิทยาศาสตร์อย่างเป็นระบบในเชิงลึก และได้ผลการศึกษาที่เป็นประโยชน์ มีผลกระทบสูงต่อนักวิจัย
นักวิชาการ และประชาชนทั่วไป ให้ตระหนักในการเลือกใช้ฟ้าทะลายโจรหรือผลิตภัณฑ์ที่มีฟ้า
ทะลายโจรเป็นส่วนประกอบในการแพทย์ทางเลือก หรือเพื่อเสริมสุขภาพอย่างสมเหตุสมผลต่อไป

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ Prof. Nobuo Nemoto, University of Toyama ประเทศญี่ปุ่น ที่ให้การ
สนับสนุนการวิจัย โดยการแลกเปลี่ยนและถ่ายทอดเทคโนโลยีที่ทันสมัย การอนุเคราะห์สารสำคัญ
ในการวิจัยที่ไม่มีจำหน่าย ตลอดจนร่วมวิเคราะห์และอภิปรายผลที่เกี่ยวข้องอย่างต่อเนื่อง

ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์ และคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่สนับสนุน
เครื่องมือและอำนวยความสะดวกสถานที่ในการทำวิจัยครั้งนี้

ท้ายที่สุด ผู้วิจัยขอขอบคุณเจ้าหน้าที่สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและคณะเภสัชศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกอย่างต่อเนื่อง

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	ก
บทคัดย่อ	ข
Abstract	ค
กิตติกรรมประกาศ	ง
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	2
วัสดุ สารเคมีและวิธีทดลอง	2
สารเคมีหลัก	2
วัสดุ อุปกรณ์หลัก	3
การเตรียมเซลล์ตับปฐุมภูมิ	3
การเตรียมสัตัวทดลอง	3
Real-time RT-PCR	4
การทำ SDS-PAGE และ Western blotting	5
การประเมินปริมาณรวม total P450 และสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450	5
การศึกษา transient transfection และ luciferase assay	5
Microarray analysis	5
ผลการทดลอง	6
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	16
ข้อเสนอแนะ	18
เอกสารอ้างอิง	18
ผลงานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ	21
นิพนธ์ปริทรรศน์	22
การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ: ระดับนานาชาติ	23
การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ: ระดับชาติ	25
รางวัลผลงานวิจัย	26
การเชื่อมโยงทางวิชาการกับนักวิชาการอื่นๆ ทั้งในและต่างประเทศ	27
ภาคผนวก	29
ภาคผนวก 1	30
ภาคผนวก 2	31
ภาคผนวก 2.1	32
ภาคผนวก 2.2	39
ภาคผนวก 2.3	45

	หน้า
ภาคผนวก 3	53
ภาคผนวก 3.1	54
ภาคผนวก 3.2	63
ภาคผนวก 3.3	75
ภาคผนวก 4	88
ภาคผนวก 4.1	89
ภาคผนวก 4.2	96
ภาคผนวก 4.3	99
ภาคผนวก 4.4	106
ภาคผนวก 4.5	109
ภาคผนวก 4.6	121
ภาคผนวก 4.7	124
ภาคผนวก 5	126
ภาคผนวก 5.1	127
ภาคผนวก 5.2	131
ภาคผนวก 5.3	133
ภาคผนวก 5.4	137
ภาคผนวก 5.5	139
ภาคผนวก 5.6	141
ภาคผนวก 6	142

บทนำ

ฟ้าทะลายโจร หรือ *Andrographis paniculata* เป็นพืชสมุนไพรเก่าแก่ ประเทศจีนใช้รักษาแผล ผื่น หนอง แก้อักเสบ และรักษาโรคบิด (1) สำหรับประเทศไทย ฟ้าทะลายโจรเป็นพืชสมุนไพรที่กระทรวงสาธารณสุขตามแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 6 (พ.ศ. 2530-2534) ส่งเสริมให้ใช้ในสาธารณสุขมูลฐานเป็นยาสมุนไพรแผนโบราณสำหรับทดแทนการใช้ยาแผนปัจจุบัน เพื่อให้ประชาชนสามารถดูแลสุขภาพตนเองได้ในเบื้องต้น และเป็นการลดการใช้ยาแผนปัจจุบันซึ่งอาจมีการนำเข้าวัตถุดิบบางอย่างจากต่างประเทศ อันเป็นการลดการขาดดุลการค้าระหว่างประเทศทางหนึ่ง ฟ้าทะลายโจรถูกใช้อย่างแพร่หลายจนถึงปัจจุบัน เพื่อรักษาอาการเจ็บคอ แก้ท้องเสีย ในรูปของยาต้ม ยาลูกกลอน ยาตะกั่วเล้า (2) จากการศึกษาส่วนประกอบทางเคมีของฟ้าทะลายโจรพบว่าส่วนเหนือดินจะประกอบด้วยสารพวก diterpene lactones หลายชนิด ที่มีฤทธิ์ลดไข้ (antipyretic) และฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammation) โดยมีแอนโดรกราโฟไลด์ (andrographolide) (3) เป็นสารออกฤทธิ์ที่มีความแรงสูงสุด จากรายงานการศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรฟ้าทะลายโจร พบว่าสารสกัดหยาบในตัวทำละลายและความแรงต่างๆ มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลากหลาย อาทิ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (4) ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ (5, 6) ฤทธิ์ฆ่าพยาธิ (7) ฤทธิ์ต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด (8) ฤทธิ์ต่อระบบทางเดินอาหาร (9, 10) ฤทธิ์ลดปวด ลดไข้ (11) ฤทธิ์ป้องกันการถูกทำลายของตับ (12-14) และ ฤทธิ์ต้านมาลาเรีย (15) เป็นต้น ขณะที่รายงานผลการศึกษาทางคลินิกและพิษวิทยาของสมุนไพรฟ้าทะลายโจร มีการศึกษาทั้งในลักษณะของผงฟ้าทะลายโจร สารสกัดหยาบ และ แอนโดรกราโฟไลด์ (2, 16-19) พบว่ารายงานการศึกษาทางด้านพิษวิทยายังมีอยู่น้อยมาก (2, 19) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษาในระดับเซลล์และชีวโมเลกุลเพื่อศึกษาผลในเชิงลึก เป็นเหตุให้ขาดข้อมูลทางด้านการแพทย์และเภสัชกรรม ที่จะสนับสนุนการนำสมุนไพรและยาในตำรับยาแผนโบราณมาใช้ประโยชน์ทางคลินิก จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องข้อมูลที่ชัดเจนและเชื่อถือได้ การวิจัยและพัฒนาโดยใช้กระบวนการทางวิทยาศาสตร์จะเป็นการยืนยันผลจากภูมิปัญญาดั้งเดิม เพื่อที่ประเทศไทยจะได้พัฒนาคุณภาพและมาตรฐานของตำรับยาสมุนไพรไทยให้เป็นส่วนหนึ่งของเอกลักษณ์ไทย เพื่อตลาดทั้งในและต่างประเทศ และยังเป็นการช่วยลดการขาดดุลการค้าระหว่างประเทศอีกทางหนึ่ง

เอนไซม์ไซโตโครม พี 450 (20-22) เป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่พบมากในเซลล์ตับ ชนิดของเอนไซม์ที่เป็นเอนไซม์หลักจะแตกต่างกันไปในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ทำหน้าที่หลักในการเปลี่ยนแปลงยา (drugs) และสารต่างๆ (xenobiotics) ที่ร่างกายได้รับ ให้อยู่ในสภาพหรือรูปแบบที่ร่างกายสามารถกำจัดออกได้โดยง่าย และมีความเป็นพิษต่อร่างกายลดลง เนื่องจากเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 จะมีอยู่ในปริมาณที่จำกัดในอวัยวะหนึ่งๆ สำหรับสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่ง การได้รับยา หรือสารใดๆ เข้าสู่ร่างกายร่วมกัน จึงมีผลต่อการถูกกำจัดของยา หรือสารต่างๆ เหล่านั้นออกจากร่างกายโดยเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ในเชิงสัมพัทธ์ ทั้งในแง่ของปริมาณและอัตราเร็วในการกำจัดผลิตภัณฑ์ที่มีความจำเป็นต้องบริโภคอย่างต่อเนื่อง ทั้งผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ยา และเครื่องดื่มต่างๆ ต้องได้รับการตรวจสอบให้ชัดเจนว่าไม่ก่อให้เกิดผลลัพธ์ต่อร่างกายในเชิงลบ การศึกษาผล

ของยาสมุนไพรต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 เป็นการศึกษาทางด้านพิษวิทยาในระดับเซลล์และชีวโมเลกุลแขนงหนึ่งที่ยังไม่มีการรายงานอย่างชัดเจน และการศึกษายังไม่แพร่หลายเท่าที่ควรเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาในยาแผนปัจจุบัน ดังนั้น เพื่อสามารถให้ข้อมูลเชิงวิทยาศาสตร์ของความปลอดภัย ตลอดจนผลการปฏิสัมพันธ์กันของยาตำรับสมุนไพรด้วยกันเอง หรือต่อยาแผนปัจจุบันตำรับอื่นๆ ที่อาจได้รับร่วมด้วย และเพื่อเป็นแนวทางในการกำหนดขนาดรับประทานที่ให้ผลการรักษาที่มีประสิทธิภาพ และปลอดภัยของตำรับยาต่างๆ ที่ให้ร่วมกัน จึงจำเป็นต้องศึกษาผลของตำรับยาสมุนไพรไทยต่อปริมาณเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ในเซลล์ตับ เพื่อมุ่งหวังให้เกิดผลลัพธ์ที่สอดคล้องกับนโยบายสาธารณสุขมูลฐานของประเทศไทย ในการส่งเสริมการใช้สมุนไพรไทยทดแทนการใช้ยาแผนปัจจุบัน เพื่อลดการสูญเสียเงินตราของประเทศ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อตรวจวัดระดับการแสดงออกของ mRNA ของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ที่ถูกเหนี่ยวนำ/หรือยับยั้ง โดยฟ้าทะลายโจรและ/หรือแอนโดรกราโฟไลด์เปรียบเทียบกับสารกระตุ้นต้นแบบที่เฉพาะเจาะจงในเซลล์ตับปฐมภูมิของหนูไมซ์ (primary mouse hepatocyte cultures) และในตับหนูไมซ์ (mouse liver) โดยเทคนิค real-time RT-PCR
2. เพื่อตรวจวัดระดับการแสดงออกของ mRNA ของ nuclear receptor ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับกลไกการควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ที่ศึกษาที่ถูกเหนี่ยวนำ/หรือยับยั้ง โดยฟ้าทะลายโจรและ/หรือแอนโดรกราโฟไลด์เปรียบเทียบกับสารกระตุ้นต้นแบบที่เฉพาะเจาะจงในเซลล์ตับปฐมภูมิของหนูไมซ์ (primary mouse hepatocyte cultures) และในตับหนูไมซ์ (mouse liver) โดยเทคนิค real-time RT-PCR
3. เพื่อตรวจวัดระดับการแสดงออกของโปรตีนของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ที่ถูกเหนี่ยวนำ/หรือยับยั้ง โดยฟ้าทะลายโจรและ/หรือแอนโดรกราโฟไลด์แอนโดรกราโฟไลด์เปรียบเทียบกับสารกระตุ้นต้นแบบที่เฉพาะเจาะจงในเซลล์ตับปฐมภูมิของหนูไมซ์ (primary mouse hepatocyte cultures) และในตับหนูไมซ์ (mouse liver) โดยเทคนิค western blotting/immunoblotting
4. เพื่อสร้างแบบจำลองทางพิษวิทยาและเภสัชวิทยาระดับชีวโมเลกุลเชิงลึก จากข้อมูลที่รวบรวมและวิเคราะห์ได้ สำหรับประยุกต์ใช้ในการศึกษาผลของตำรับยาสมุนไพรอื่นๆ ต่อการแสดงออกของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ในเซลล์ตับสัตว์ทดลอง

วัสดุ สารเคมีและวิธีทดลอง

สารเคมีหลัก

สารเคมีสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ตับปฐมภูมิ จาก Gibco® Invitrogen Cell Culture (Carlsbad, CA), BioWhittaker™ Cambrex Bio-Sciences (Walkerville, MD) และ Wako Pure Chemical (Osaka, Japan). Percoll และ collagenase (Type I) เป็นผลิตภัณฑ์ของ GE Healthcare Bio-

Sciences AB (Uppsala) และ the Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) ตามลำดับ Andrographolide, resveratrol และ ชุดตรวจ LDH-cytotoxic test จาก Wako Pure Chemical ในขณะที่ benz(a)anthracene, β -naphthoflavone, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), ethoxyresorufin, และ resorufin เป็นผลิตภัณฑ์ของ Sigma Chemical Co ส่วน 3-methylcholanthrene และ Testosterone propionate ของ Eastman Kodak Co. (Rochester, NY, USA) และ Kasei TCI (Tokyo, Japan) ตามลำดับ ชุดทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบเวลาจริง ทั้ง TaKaRa RT-PCR kit (Perfect Real Time) และ SYBR® Green Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time) และ ชุดสกัดอาร์เอ็นเอบริสุทธิ์ FastPure™ RNA kit จาก TaKaRa Biomedicals Inc. (Shiga, Japan) และ TaqMan® Gene Expression Assays จาก Applied Biosystems (Branchburg, NJ) แอนติบอดี CYP1A1 โดยความอนุเคราะห์ของ Dr. Y. Funae, Osaka City University เมืองโอซากา ประเทศญี่ปุ่น Dual-Luciferase Reporter Assay System เป็นผลิตภัณฑ์ของ Promega® (Madison, WI)

วัสดุ อุปกรณ์หลัก

Hybond-C membranes เป็นผลิตภัณฑ์ของ The Amersham Pharmacia Biotech Co.

การเตรียมเซลล์ตับปฐมภูมิ

หนูไมซ์ เพศผู้ สายพันธุ์ ddY หรือ C57BL/6 อายุ 8 สัปดาห์ ถูก perfuse สารละลายผสมคอลลาจีเนสผ่านเส้นเลือดใหญ่ที่ไปเลี้ยงตับ portal vein จากนั้นจะทำการคัดแยกเซลล์ตับที่มีชีวิต (viable hepatocytes) ด้วยหลักการ isodensity โดยใช้สารละลาย percoll (23) เซลล์ตับจะถูกกระจายในอาหารเหลว Waymouth MB752/1 ที่ประกอบด้วย bovine serum albumin (2 กรัมต่อลิตร), insulin (0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร), transferrin (0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) และ selenium (0.5 ไมโครกรัมต่อลิตร) และเพาะเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงชนิดเคลือบคอลลาเจน ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.5-mm ที่ความหนาแน่น 5×10^3 เซลล์ต่อลิตร ภายใต้อุณหภูมิ 37°C ในตู้บ่ม CO₂-humidified incubator เซลล์จะเกาะติดผิวด้านในของจานเพาะเลี้ยงภายในเวลา 3 ชม. และแสดงลักษณะการแผ่แบบชั้นเดียว (monolayer) การเติมสารตัวอย่างที่ต้องการศึกษา ได้แก่ andrographolide และ/หรือ สารกระตุ้นต้นแบบต่างๆ จะกระทำภายหลังการบ่มเพาะเป็นเวลา 24 ชม. โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลายในปริมาณไม่เกิน 0.1% (Nemoto and Sakurai, 1992) และทำการเก็บเกี่ยวเซลล์หลังการเติมสาร 6-24 ชม. (แล้วแต่กรณี) เพื่อเตรียม total RNA หรือโปรตีนไมโครโซม ตามลำดับ (24) ก่อนการศึกษาขั้นต่อไปอาหารเพาะเลี้ยงในแต่ละจานจะถูกนำมาวิเคราะห์เพื่อประเมินระดับความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) ของสารตัวอย่างในแต่ละความเข้มข้นด้วย LDH-cytotoxic test รวมถึงการพิจารณา ระดับการแสดงออกของ GAPDH mRNA ร่วมด้วย

การเตรียมสัตว์ทดลอง

หนูไมซ์ ทั้งเพศผู้และเพศเมีย สายพันธุ์ C57BL/6 and DBA/2 อายุ 7 สัปดาห์ ถูกเลี้ยงในกรงสเตนเลสที่รองด้วยขี้เลื่อย ให้มีน้ำและอาหารในปริมาณเพียงพอตลอดเวลาความหนาแน่นกรงละ 4-5 ตัว ภายในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองควบคุมอุณหภูมิด้วยระบบปรับอากาศที่ 20–23°C และแสงสว่าง/มืด 12/12 ชม. ซึ่งเป็นไปตามสภาวะมาตรฐานการเลี้ยงสัตว์ทดลอง และการกำกับดูแลของคณะกรรมการด้านจรรยาบรรณ และมาตรฐานในการใช้สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ. ขอนแก่น ประเทศไทย (ภาคผนวก 1) หรือ University's Institutional Animal Care and Use Committee, University of Toyama, Toyama ประเทศญี่ปุ่น กรณี Orchiectomy หรือ ovariectomy หนูไมซ์จะถูกทำการผ่าตัดขณะมีอายุ 5 สัปดาห์ และเริ่มทำการ treatment ที่อายุ 7 สัปดาห์ การ treatment สัตว์ทดลอง ขึ้นอยู่กับสารที่ต้องการทดสอบดังนี้ andrographolide ทำการฉีดเข้าชั้นใต้ผิวหนัง (s.c.) ขนาด 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน วันละครั้ง ทุกวัน นาน 4-5 วัน ในขณะที่ 3-methylcholanthrene ขนาด 20 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน หรือ phenobarbital ขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน ทำการฉีดเข้าช่องท้อง (i.p.) วันละครั้ง ทุกวัน นาน 3 วัน และ testosterone จะฉีดเข้าชั้นใต้ผิวหนัง (s.c.) ขนาด 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน วันละครั้ง ทุกวัน นาน 1 สัปดาห์ ส่วนกลุ่มควบคุมจะได้รับ corn oil ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลาย โดยการฉีดเข้าชั้นใต้ผิวหนัง (s.c.) 0.2 มิลลิลิตร วันละครั้ง ทุกวัน นาน 1 สัปดาห์ จากนั้น 24 ชม. ภายหลังครบกำหนดการ treatment สัตว์ทดลองจะถูกสลับด้วยยาสลบเกินขนาดเพื่อแยกตับออกมาเตรียม total RNA และไมโครโซม (24) ต่อไป

Real-time RT-PCR

การแสดงออกของ mouse P450 ต่างๆ และ GAPDH mRNA จะถูกวิเคราะห์ปริมาณโดยเทคนิค real-time RT-PCR ของ ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Branchburg, NJ, USA) และโปรแกรม ABI Prism 7000 SDS software โดยการเปลี่ยน total RNA เป็น cDNA ด้วยปฏิกิริยา reverse-transcription จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณ cDNA โดยปฏิกิริยา TaqMan Gene Expression Assays (Inventoried) ที่เฉพาะเจาะจงต่อ *Cyp1a2* (Mm00487224_m1), *Cyp1b1* (Mm00487229_m1), *Cyp2b9* (Mm00657910_m1), *Cyp2b10* (Mm00456591_m1), *Cyp3a11* (Mm00731567_m1) และ *Ugt1a6* (Mm01967851_s1) และ TaqMan Gene Expression Detection kit ที่เฉพาะเจาะจงต่อ *Cyp1a1* ร่วมกับ forward และ reverse primers และ probe ที่มีลำดับเบสตามลำดับ ดังนี้: 5'-GAC ATT TGA GAA GGG CCA CAT C-3', 5'-CCA AAG AGG TCC AAA ACA ATC G-3' และ 5'-FAM-CGA GAA TGC CAA TGT CCA GCT GTC A-TAMRA-3' และ TaqMan Gene Expression Detection kit ที่เฉพาะเจาะจงต่อ *Cyp3a41* ร่วมกับ forward และ reverse primers และ probe ที่มีลำดับเบสตามลำดับ ดังนี้: 5'-GCC AAA GGG ATT TTA AGA GTT GTT GAC T-3', 5'-GGT GTC AGG AAT GGA AAA AGTA CA-3' และ 5'-FAM-ATC CTT TGG TCT TCT CAG-MGB-3' และ SYBR Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time) สำหรับ GAPDH โดยมี forward และ reverse primers ที่มีลำดับเบสตามลำดับ ดังนี้: 5'-TCC ACT CAC GGC AAA TTC

AAC G-3' and 5'-TAG ACT CCA CGA CAT ACT CAG C-3' และ สำหรับ *Cyp2a4* โดยมี forward และ reverse primers ที่มีลำดับเบสตามลำดับ ดังนี้ 5'-GGG CAG GTC TAT GAG ATG TTT TCT TC-3' และ 5'-AAA GTC CTC CAG GCC TTG CA-3'

การทำ SDS-PAGE และ Western blotting

ไมโครโซมจากตับหนูไมซ์ (26) ปริมาณ 5-20 ไมโครกรัมโปรตีน ถูกแยกด้วย 10% SDS-PAGE ภายใต้กระแสไฟฟ้า จากนั้นแถบโปรตีนจะถูกเคลื่อนย้ายไปไว้บนแผ่นเมมเบรน Hybond-C เพื่อทำปฏิกิริยาภูมิคุ้มกันปฐมภูมิที่จำเพาะต่อ CYP1A1 ที่ทำปฏิกิริยาข้ามกับ CYP1A2 ได้ด้วย ตามด้วยการทำปฏิกิริยาทุติยภูมิกับ horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody และปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดสีน้ำตาลด้วย 3,3'-diaminobenzidine and hydrogen peroxide (27)

การประเมินปริมาณรวม total P450 และสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450

ปริมาณรวม P450 ในไมโครโซมตรวจวัดโดยเทคนิค carbon monoxide difference spectrophotometry (28) ส่วนสมรรถนะของ ethoxyresorufin O-deethylation (EROD) ทำการวิเคราะห์สารละลายผสมของ 10mM Tris-HCl (pH 7.8), 200 μ M NADPH, 0.5mg of hepatic microsomes และ 50 μ M ethoxyresorufin หลังจาก incubate ที่ 37 °C นาน 3 นาที โดยเทคนิค spectrofluorometry ที่ excitation wavelength 530 นาโนเมตร และ emission wavelength 585 นาโนเมตร (Sakuma et al., 1999)

การศึกษา transient transfection และ luciferase assay

1 วันหลังการเพาะเลี้ยงเซลล์ตับปฐมภูมิจะถูก transfect ด้วย pGL3-promotor vector ที่มี reporter construct ที่บรรจุ Dioxin Responsive Element (DRE) (29) 3 ซ้ำ และใช้ pRL-SV40 vector เป็น internal standard โดยใช้ Trans Pass D1 Transfection Reagent (New England Biolabs, Ipswich, MA) ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ภายหลังการ transfection 3 ชม. ก่อนเริ่ม treatment ด้วย andrographolide และ/หรือ TCDD ภายหลัง incubate ครบ 24 ชม. ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์เพื่อวิเคราะห์สมรรถนะของ Luciferase activity

Microarray analysis

ตัวอย่าง Total RNA ถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดอาร์เอ็นเอ FastPureTM RNA kit จากนั้นวิเคราะห์คุณภาพและปริมาณของอาร์เอ็นเอ ก่อนส่งไปยัง Bio Matrix Research, Inc. (Chiba, Japan) เพื่อวิเคราะห์ด้วย GeneChip Mouse Exon 1.0 ST array (Affymetrix Technologies, Tokyo, Japan) และทำการแปลผลด้วยโปรแกรม GeneSpringGX10 software (Agilent Technologies)

ผลการทดลอง

การศึกษาผลของแอนโดรกราโฟไลด์ต่อการแสดงออกของสับแฟมิลี CYP1A และทรานสคริปชันแฟกเตอร์ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงปฐมภูมิ พบว่าแอนโดรกราโฟไลด์เหนี่ยวนำการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอของ CYP1A1 และ CYP1A2 ในลักษณะที่แปรผันกับความเข้มข้น (รูปที่ 1A) โดยพบการเหนี่ยวนำของ CYP1A1 สูงสุด 1 วันภายหลังจากที่ได้รับแอนโดรกราโฟไลด์ ในขณะที่ CYP1A2 จะพบการเหนี่ยวนำได้ช้ากว่า ส่วน B[a]A สามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของทั้ง CYP1A1 และ CYP1A2 (รูปที่ 1B) สอดคล้องกับที่เคยมีรายงานมาก่อน (Guengerich and Shimada, 1998) การ treatment ร่วมระหว่างแอนโดรกราโฟไลด์และ B[a]A สามารถเสริมฤทธิ์การเหนี่ยวนำการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอของ CYP1A1 แต่ไม่พบลักษณะการเสริมฤทธิ์ดังกล่าวนี้ในเอ็มอาร์เอ็นเอของ CYP1A2 นอกจากนี้พบว่าแอนโดรกราโฟไลด์ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของ AhR หรือการแสดงออกของ CYP1B1 ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย B[a]A จากการค้นพบนี้แสดงให้เห็นเป็นครั้งแรกว่า แอนโดรกราโฟไลด์ซึ่งเป็นสารหลักจากสารสกัดของฟ้าทะลายโจรมีสักยภาพในการเหนี่ยวนำสับแฟมิลี CYP1A ได้

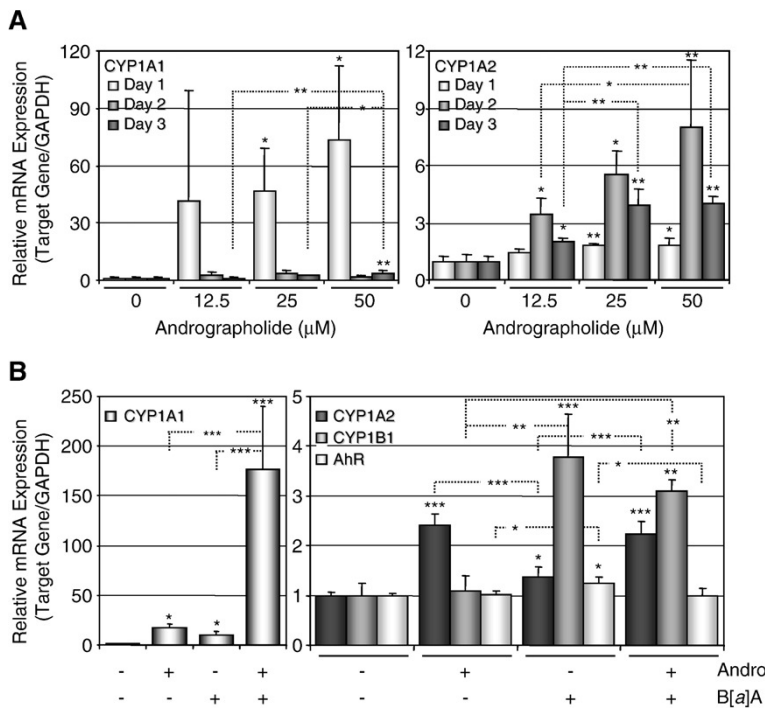


Fig. 1. Modulation of B[a]A-inducible expression of CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, and AhR mRNAs by andrographolide in monolayer-cultured hepatocytes. Hepatocytes at day 1 of cultivation were incubated with andrographolide (Andro) and/or B[a]A. Each column represents the mean±SD (n=6). Significance was examined using ANOVA and the Student–Newman–Keuls method (Sigmastat®); * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$. Panel A shows the expression profile of CYP1A1 and CYP1A2 mRNA by andrographolide. Andrographolide, at 12.5, 25, or 50 μM, was immediately added to hepatocytes after the medium was changed consecutively on the

indicated days. Panel B shows the modified expression of B[a]A-induced CYP1 and AhR mRNAs by andrographolide. Concentrations of the added compounds were 50 μM for andrographolide and 13 μM for B[a]A.

Resveratrol ซึ่งเป็น AhR antagonist ถูกนำมา treat เพื่อศึกษาอิทธิพลของ AhR ต่อการควบคุมการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอของ CYP1A1 ที่ถูกเหนี่ยวนำโดยแอนโดรกราโฟไลด์ ภายใต้สภาวะเดียวกันกับที่พบการเสริมฤทธิ์การเหนี่ยวนำของแอนโดรกราโฟไลด์ต่อการแสดงออก

ของ CYP1A1 ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย B[a]A ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น ligand ของ AhR จากการศึกษาพบว่า resveratrol สามารถกีดขวางการเสริมฤทธิ์ของการ treatment ร่วมระหว่างแอนโดรกราโฟไลด์และ B[a]A ได้ โดยไม่มีผลต่อการเหนี่ยวนำของแอนโดรกราโฟไลด์หรือ B[a]A เดี่ยวๆ (รูปที่ 2) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า AhR มีความเกี่ยวข้องกับการเสริมฤทธิ์การเหนี่ยวนำการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอของ CYP1A1 จากการ treatment ร่วมระหว่างแอนโดรกราโฟไลด์และ B[a]A นั้นเอง

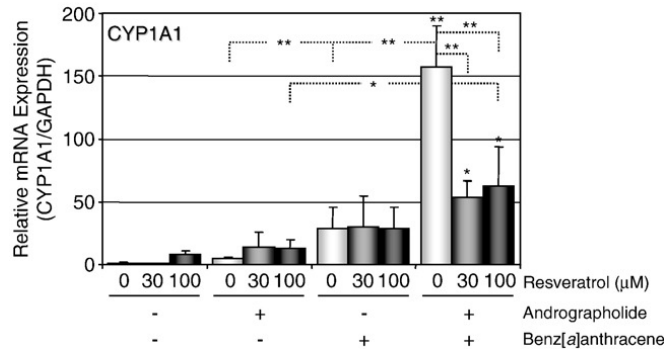


Fig. 2. Effect of resveratrol on the synergistic modification of B[a]A-inducible expression of CYP1A1 mRNA by andrographolide. Hepatocytes at day 1 of cultivation were incubated with 25 μ M andrographolide, 13 μ M B[a]A, and/or resveratrol (at the indicated concentrations). Each column represents the mean $\pm$ SD (n=6). Significance was examined using ANOVA and the Student–Newman–Keuls method (Sigmastat[®]); * p <0.05; ** p <0.01.

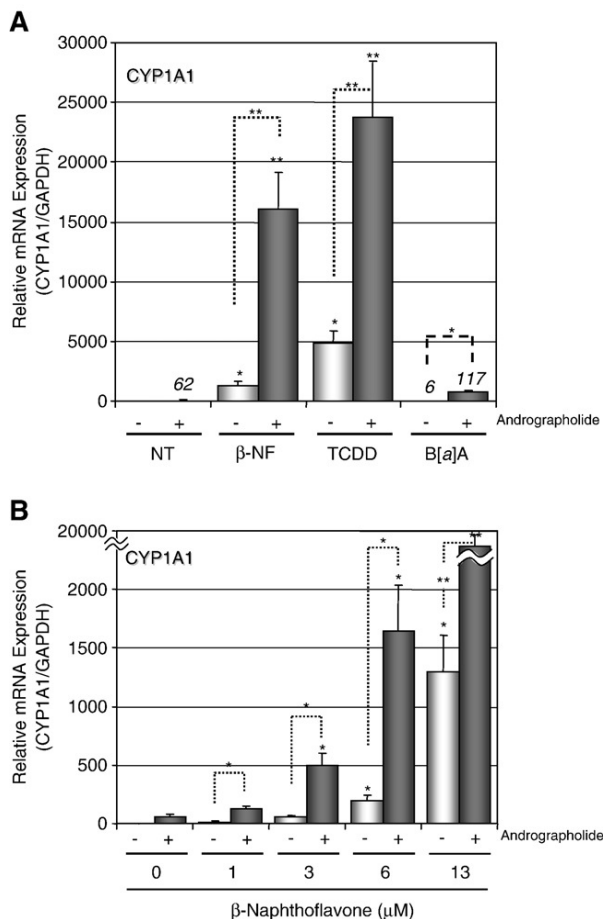


Fig. 3. Induction of CYP1A1 mRNA expression by andrographolide and typical CYP1A1 inducers. Hepatocytes at day 1 of cultivation were incubated with 25 μ M andrographolide, and/or typical CYP1A1 inducers. Each column represents the mean $\pm$ SD (n=6). Significance was examined using ANOVA and the Student–Newman–Keuls method (Sigmastat[®]); * p <0.05; ** p <0.01. Panel A shows synergistic induction of CYP1A1 expression by co-treatment of typical inducers and andrographolide. Numbers in the figure indicate expression compared with that of the control group (=1), unless otherwise indicated. Concentrations of typical CYP1A1 inducers were 13 μ M for β -NF and B[a]A, and 30 nM for TCDD. NT, non-treatment. Panel B shows the concentration-dependent induction of β -NF-induced CYP1A1 expression by andrographolide. The concentrations of β -NF were 1, 3, 6, or 13 μ M.

นอกจากนี้ ยังได้ทำการประเมินผลของแอนโดรกราโฟไลด์ต่อการเหนี่ยวนำการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอของ CYP1A1 โดยสารกระตุ้นต้นแบบ CYP1A ชนิดต่างๆ และพบว่าแอนโดรกราโฟไลด์สามารถเสริมฤทธิ์การเหนี่ยวนำดังกล่าวของทุกสารได้ (รูปที่ 3A) นอกจากนี้ยังพบลักษณะการเสริมฤทธิ์การเหนี่ยวนำในลักษณะที่แปรผันตรงกับความเข้มข้นของสารกระตุ้นต้นแบบอีกด้วย (รูปที่ 3B) และยังพบการแสดงออกของโปรตีน CYP1A1 (รูปที่ 4) และสมรรถนะของเอนไซม์ CYP1A1 (รูปที่ 5) ในลักษณะที่สอดคล้องกันนี้ด้วย

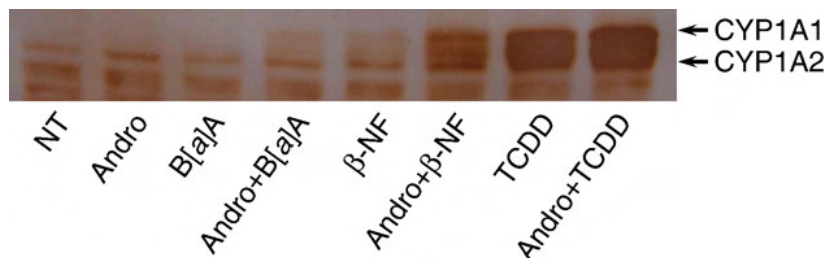


Fig. 4. Induction of CYP1A1 protein expression by andrographolide and typical CYP1A1 inducers. Hepatocytes at day 1 of cultivation were incubated with 25 μ M andrographolide (Andro), and/or typical CYP1A inducers. The concentrations of the typical CYP1A inducers were 13 μ M for B[a]A and β -NF, and 30 nM for TCDD.

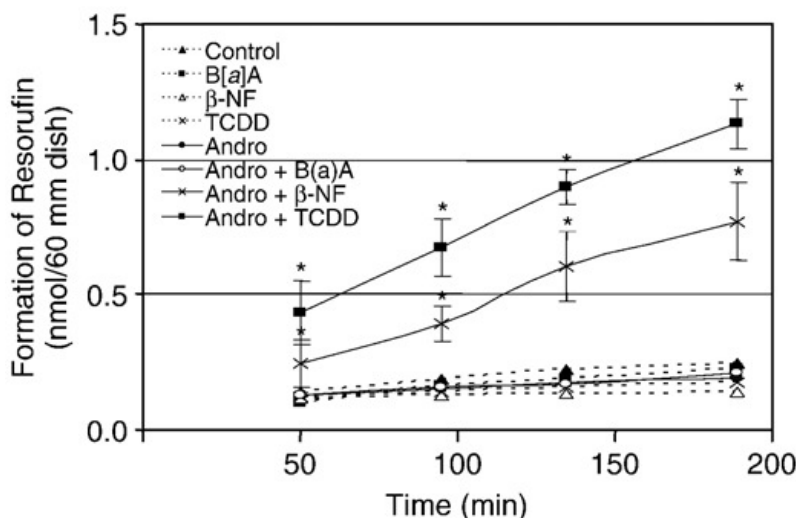


Fig. 5. Modulation of ethoxyresorufin O-deethylase activity profile by cotreatment with andrographolide and typical CYP1A inducers. Hepatocytes at day 1 of cultivation were incubated with 25 μ M andrographolide (Andro), and/or typical CYP1A inducers. Ethoxyresorufin (10 μ M) was added 24 h later, and an aliquot of the medium was sampled (at specified times) and subsequently subjected to spectrofluorometric measurement. Each point represents the mean $\pm$ SD (n=6–8). Significance was examined using ANOVA and the Student–Newman–Keuls method (Sigmatat[®]); * p <0.001. The concentrations of the typical CYP1A inducers were 13 μ M for B[a]A and β -NF, and 30 nM for TCDD.

การประเมินความน่าจะเป็นของกลไกที่แอนโดรกราโฟไลด์เข้าเหนี่ยวนำ CYP1A1 ภายหลังการเกิดการกระตุ้นของ AhR ตรวจสอบโดยการวิเคราะห์ผลของแอนโดรกราโฟไลด์ต่อสมรรถนะของ DRE-mediated transcriptional activity ด้วยเทคนิค luciferase reporter assay พบว่าหลังจากให้ TCDD ซึ่งเป็นสารกระตุ้นต้นแบบของ CYP1A1 ที่มีความแรงสูง สมรรถนะของ luciferase เพิ่มขึ้นจริงในเซลล์ที่บรรจุพาหะที่มี DRE เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์บรรจุพาหะเปล่า แต่การ treatment ร่วมระหว่างแอนโดรกราโฟไลด์และ TCDD ไม่พบการเปลี่ยนแปลงใดๆ (รูปที่ 6)

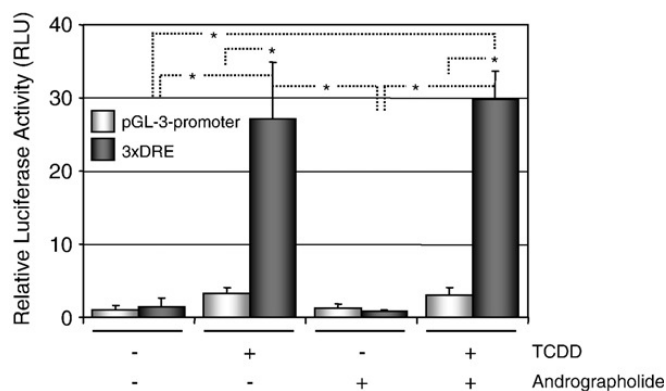


Fig. 6. Expression of DRE-mediated transcriptional activity by TCDD and andrographolide in primary culture hepatocytes. Hepatocytes at day 1 of cultivation were transfected with the reporter construct containing 3 tandem repeats of Dioxin Responsive Element (DRE) in pGL3-promoter vector or pGL3-promoter (empty promoter) and the cells were treated with 30 nM TCDD and/or 25 μ M andrographolide (Andro). Luciferase activity was measured

after incubation for 24 h. Significance was examined using ANOVA and the Student–Newman–Keuls method (Sigmastat[®]); * p <0.01. The figure represents the results from 5 independent experiments.

จากการพบการเหนี่ยวนำการแสดงออกของ CYP1A1 โดยแอนโดรกราโฟไลด์และพบการเสริมฤทธิ์การเหนี่ยวนำการแสดงออกของ CYP1A1 โดยการ treatment ร่วมระหว่างแอนโดรกราโฟไลด์และสารกระตุ้นต้นแบบของ CYP1A1 แล้ว จึงได้นำเทคนิค microarray มาใช้เพื่อวิเคราะห์ผลของแอนโดรกราโฟไลด์และผลการ treatment ร่วมระหว่างแอนโดรกราโฟไลด์และสารกระตุ้นต้นแบบของ CYP1A1 ต่อการแสดงออกของยีนอื่นๆ ในหนูไม่ซ้ พบว่าแอนโดรกราโฟไลด์สามารถเหนี่ยวนำ 18 ยีนและยับยั้ง 5 ยีน จากทั้งหมด 28,853 ยีน เมื่อประเมินจากผลการเปลี่ยนแปลงที่เท่ากับหรือมากกว่า 2 เท่า (รูปที่ 7A) โดยยีนที่ถูกเหนี่ยวนำส่วนมากจะเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับ metabolism/oxidation/reduction อาทิ เช่น *Cyp1a1*, *Cyp2a4*, *Gstm3*, *Gstm4*, *Ugt2b35* และ *Nqo1* เป็นต้น ในขณะที่ยีนที่ถูกยับยั้งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับ protein binding หรือ calcium ion binding ได้แก่ *Thbs1*, *Cdh17* และ *Sbp1* β -NF สามารถเหนี่ยวนำได้ 4 ยีนคือ *Cyp1a1*, *Cyp1a2*, *Nqo1* และ *Olf1029* (รูปที่ 7B) ในขณะที่การ treatment ร่วมระหว่างแอนโดรกราโฟไลด์และ β -NF สามารถแสดงผลในระดับที่สูงกว่า (รูปที่ 7C) โดยพบว่าสามารถเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนมากถึง 118 ยีน แบ่งเป็นยีนที่ถูกเหนี่ยวนำ 78 ยีน และถูกยับยั้ง 40 ยีน นอกจากนี้แล้ว ยีนที่ถูกเหนี่ยวนำเกือบทั้งหมดจะเกี่ยวข้องกับ metabolism/oxidation/reduction อาทิ *Cyps*, *Gstm*, *Ddc*, *Cbr*, *Aox3*, *Ugt* และ *Akr* ในขณะที่ยีนที่ถูกยับยั้งจะมีความหลากหลาย ตั้งแต่ ยีนที่เกี่ยวข้องกับ oxidation/reduction/ion binding เช่น *Plscr1*, *Steap4*, *Bhmt*, *Vil1*, *Pdzrn3*, *Ngb* และ *Cyp17a1*

ยีนที่เกี่ยวข้องกับ protein binding เช่น *Vim*, *Cish*, *Hp*, *Ctgf*, *Cdh17* และ *Vcam1* และยีนที่เกี่ยวข้องกับ chemokine/cytokine เช่น *Cxcl13*, *Ccl2* และ *Spp1* เป็นต้น

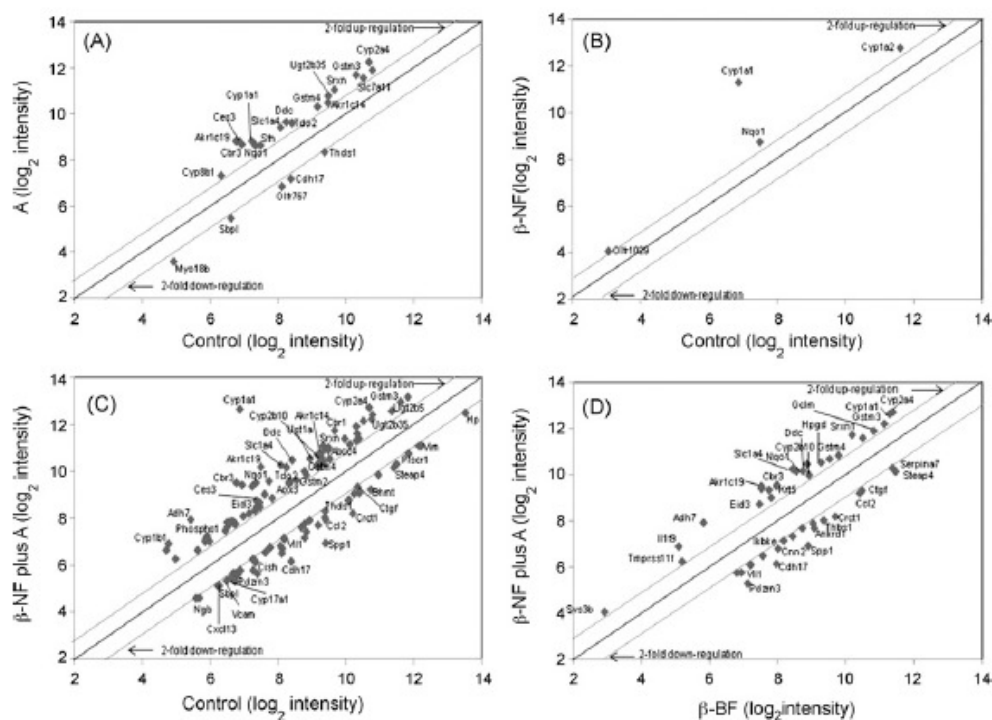


Fig. 7. Effect of β -NF and/or andrographolide on expression of genes in mouse hepatocytes in primary culture after treatment with 0.2% DMSO (control), 10 μ M β NF, and 25 μ M andrographolide (A), and co-treatment (β -NF plus A). The lines indicate a change in gene expression compared to the control of higher or lower than 2-fold. Abbreviations in the figure: Cyp, cytochrome P450; Gstm, Glutathione S-transferase (GST) μ class; Ugt, UDP glucuronyltransferase; Nqo1, NAD(P)H dehydrogenase quinone; Olfr1029, olfactory receptor 1029; Cbr3, carbonyl reductase 3; Adh7, alcohol dehydrogenase 7; Sbp1, spermine binding protein-like; Ddc, dopa decarboxylase; Ccl, chemokine (C-C motif) ligand; Cxcl, chemokine (C-X-C motif) ligand; Eid3, EP300 interacting inhibitor of differentiation 3; Aox3, aldehyde oxidase 3; Akr, aldoketo reductase; Vim, vimentin; Thbs1, thrombospondin 1; Vcam1, vascular cell adhesion molecule 1; Cdh17, cadherin 17; Ngb, neuroglobin; Steap4, STEAP family member 4; Spp1, secreted phosphoprotein 1; Pdzrn3, PDZ domain containing RING finger 3; Hp, haptoglobin; Vil1, villin 1; Ctgf, connective tissue growth factor; Cish, cytokine inducible SH2-containing protein; Bhmt, betaine-homocysteine methyltransferase; Plscr1, phospholipid scramblase 1.

เมื่อเปรียบเทียบการเหนี่ยวนำสัมพัทธ์ระหว่างยีนที่ถูกเปลี่ยนแปลงโดยการ treatment ร่วมและแอนโดรกราโฟไลด์หรือ β -NF เดี่ยวๆ (รูปที่ 7D) พบว่ามี 27 ยีนที่ถูกเหนี่ยวนำและ 18 ยีนที่ถูกยับยั้งและในทำนองเดียวกัน ยีนที่ถูกเหนี่ยวนำจะเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับ metabolism และ oxidation-reduction นั้นเอง อาทิ เช่น *Cyp1a1*, *Cyp2a4*, *Adh7*, *Ddc*, *Gstm* และ *Eid3* ในขณะที่ยีนที่ถูกยับยั้งจะคล้ายคลึงกับยีนที่ถูกยับยั้งโดยการ treatment ร่วมเมื่อเปรียบเทียบกับกรณีที่ไม่ได้รับ treatment ใดๆ

ตารางที่ 1 สรุปยีนที่เกี่ยวข้องกับการเมตาบอลิซึมที่มีการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกเท่ากับหรือมากกว่า 2 เท่าหลังการ treatment ในลักษณะต่างๆ ซึ่งจะเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการเมตาบอลิซึมยา 14 ยีน เกี่ยวกับ oxidoreductase 13 ยีน โดย *Cyp1a1* เป็นยีนที่ถูกเหนี่ยวนำได้สูงที่สุดในกลุ่มไซโตโครม พี 450 ทั้งหมดที่ถูกเหนี่ยวนำ ซึ่งได้แก่ *Cyp1a2*, *Cyp1b1*, *Cyp2a4/Cyp2a5*, *Cyp2b9*, *Cyp2b10* และ *Cyp8b1* นอกจากนี้ พบว่ายีนในกลุ่ม UDP glucuronyltransferase ได้แก่ *Ugt1a*, *Ugt2b5* และ *Ugt2b35* และยีน Glutathione S-transferase (GST) μ class, *Gstm2*, *Gstm3* และ *Gstm4* สามารถถูกเหนี่ยวนำด้วยเช่นกัน และระดับการเหนี่ยวนำโดยการ treatment รวมจะสูงกว่าการเหนี่ยวนำโดยสารเดี่ยว

Table 1. Effect of β -NF and/or andrographolide on metabolizing enzymes.

Accession No.	Gene	Gene symbol	Fold up-regulation*		
			β-NF	A	β-NF + A
Drug metabolism					
U03283	Cytochrome P450, family 1, subfamily b, polypeptide 1	<i>Cyp1b1</i>	1.92	1.07	3.80
BC044927	Glutathione S-transferase, mu 3	<i>Gstm3</i>	1.44	2.65	3.05
J04696	Glutathione S-transferase, mu 2	<i>Gstm2</i>	1.24	1.88	2.21
BC030444	Glutathione S-transferase, mu 4	<i>Gstm4</i>	1.29	2.25	2.89
BC003240	P450 (cytochrome) oxidoreductase	<i>Por</i>	1.35	1.23	2.01
BC011233	Cytochrome P450, family 2, subfamily a, polypeptide 4, 5	<i>Cyp2a4/Cyp2a5</i>	1.63	3.01	4.11
BC028262	UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B5	<i>Ugt2b5</i>	1.13	1.87	2.01
BC113789	UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B35	<i>Ugt2b35</i>	1.44	2.50	2.87
BC026561	UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A	<i>Ugt1a</i>	1.67	1.35	2.06
M21855	Cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 9	<i>Cyp2b9</i>	1.13	1.45	2.00
BC060973	Cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 10	<i>Cyp2b10</i>	1.11	1.68	2.33
Y00071	Cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 1	<i>Cyp1a1</i>	21.52	3.90	54.59
BC018298	Cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 2	<i>Cyp1a2</i>	2.25	1.22	2.54
BC010973	Cytochrome P450, family 8, subfamily b, polypeptide 1	<i>Cyp8b1</i>	1.25	2.02	1.61
Oxidoreductase					
AF172276	Aldehyde oxidase 3	<i>Aox3</i>	1.29	1.77	2.09
BC013482	Aldo-keto reductase family 1, member C14	<i>Akr1c14</i>	1.35	2.05	2.70
U31966	Carbonyl reductase 1	<i>Cbr1</i>	1.26	1.78	2.05
BC028763	Carbonyl reductase 3	<i>Cbr3</i>	1.69	4.21	6.71
BC049957	Sulfiredoxin 1 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	<i>Srxn1</i>	1.45	2.64	4.22
U95053	Glutamate-cysteine ligase, modifier subunit	<i>Gclm</i>	1.14	1.68	2.43
AF331802	Alcohol dehydrogenase 7 (class IV), mu or sigma	<i>Adh7</i>	1.32	1.50	5.71
BC018390	Tryptophan 2,3-dioxygenase	<i>Tdo2</i>	1.24	2.68	3.79
BC067055	N-terminal EF-hand calcium binding protein 1	<i>Necab1</i>	1.24	1.86	2.25
BC014865	Leukotriene B4 12-hydroxydehydrogenase	<i>Ltb4dh</i>	1.40	1.92	2.91
BC006617	Biliverdin reductase B (flavin reductase (NADPH))	<i>Blvrb</i>	1.24	1.74	2.21
BC021157	Hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15 (NAD)	<i>Hpgd</i>	1.27	1.57	3.05
BC004579	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	<i>Nqo1</i>	2.39	2.24	6.46

* Hepatocytes were treated with either 10 μ M β -NF (β -NF), 25 μ M andrographolide (A), or co-treatment (β -NF + A) for 24 h. Expression of the respective genes was shown as fold up-regulation, compared with that of 0.2% DMSO treated.

ดังนั้น เพื่อเป็นการยืนยันการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของไซโตโครม พี 450 แพมิลี 1, 2 และ 3 และ UGT1A6 จึงทำการวิเคราะห์การแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอของยีนดังกล่าวโดยเทคนิค real-time RT-PCR (รูปที่ 8)

เนื่องจากพื้ทะเลลายโจรเป็นสมุนไพรที่มีการใช้ในการแพทย์ทางเลือก ในตำรับยาแผนโบราณตลอดจนใช้เพื่อการเสริมสุขภาพอย่างแพร่หลาย จึงได้ทำการประเมินและสรุปผลของแอนโดรกราโฟไลด์ต่อยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย หรือยีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านออกซิเดชั่น ที่มีการเปลี่ยนแปลงมากกว่า 20% (ตารางที่ 2) โดยพบว่ามีเพียงยีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านออกซิเดชั่น 6 ยีนที่ถูกเหนี่ยวนำได้เล็กน้อย ในขณะที่ยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันทุกยีนที่ศึกษานั้นถูกกดโดยแอนโดรกราโฟไลด์

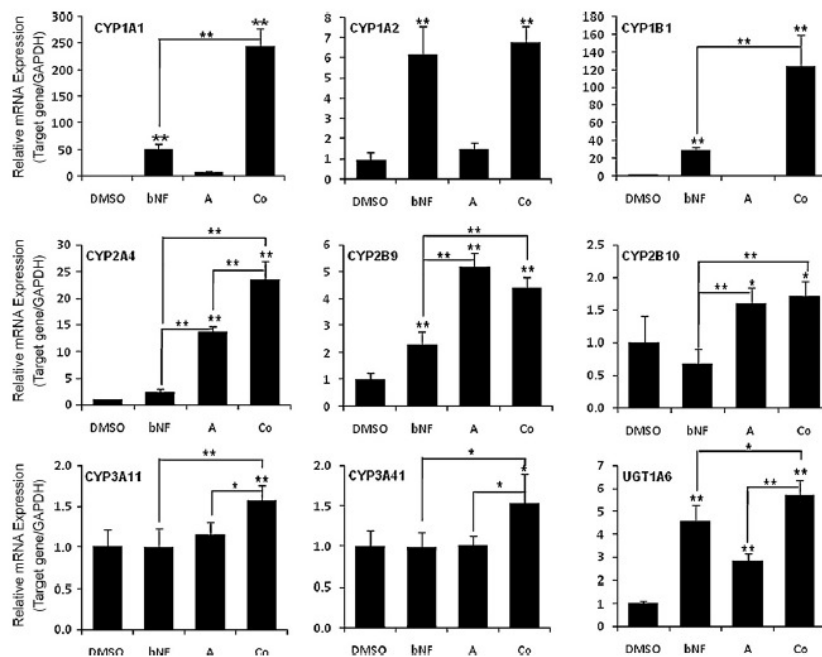


Fig. 8. Effect of β -NF and/or andrographolide on mRNA expression assessed by real-time RT-PCR. All target genes were normalized to GAPDH. Columns represent the mean $\pm$ SD (n = 4). DMSO, control; β -NF, 10 μ M β -NF; A, 25 μ M andrographolide; Co, combined treatment with β -NF and A. *, ** represent significant differences from the DMSO group at p<0.05 or 0.001, respectively (One-way ANOVA, Tukey post hoc test).

Table 2. Effect of andrographolide on anti-oxidation and immune response genes.

Accession No.	Gene	Gene symbol	Fold change*
Anti-oxidation			
AB042745	NADPH oxidase 4	<i>Nox4</i>	0.80
D16142	Peroxioredoxin 1	<i>Prdx1</i>	1.20
AF093852	Peroxioredoxin 6	<i>Prdx6</i>	1.45
BC013447	Catalase	<i>Cat</i>	1.33
BC010823	Glutathione peroxidase 2	<i>Gpx2</i>	1.34
AY279096	Glutathione S-transferase kappa 1	<i>Gstk1</i>	1.23
BC057325	Glutathione reductase	<i>Gsr</i>	1.25
Immune responsive system			
BC055070	Chemokine (C-C motif) ligand 2	<i>Ccl2</i>	0.70
BC085259	T-cell specific GTPase	<i>Tgtp</i>	0.72
BC019961	Chemokine (C-X-C motif) ligand 16	<i>Cxcl16</i>	0.72
M23447	Chemokine (C-C motif) ligand 3	<i>Ccl3</i>	0.73
BC012965	Chemokine (C-X-C motif) ligand 13	<i>Cxcl13</i>	0.21
BC002113	Secreted phosphoprotein 1	<i>Spp1</i>	0.02
BC030067	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	<i>Cxcl10</i>	0.23
BC013738	Transforming growth factor, beta 1	<i>Tgfb1</i>	0.57

* Hepatocytes were treated with 25 μ M andrographolide for 24 h. Expression of the respective genes was shown as fold change, compared with that of 0.2% DMSO treated.

จากการศึกษาผลของแอนโดรกราโฟไลด์ต่อการแสดงออกของไซโตโครม พี 450 ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงปฐมภูมิ และการยืนยันผลด้วยเทคนิค microarray พบว่า แอนโดรกราโฟไลด์มีผลเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนในสับแฟมิลี 1 และพบว่าแอนโดรกราโฟไลด์มีศักยภาพในการเสริมฤทธิ์การเหนี่ยวนำ CYP1A1 โดยสารกระตุ้นต้นแบบ CYP1A ได้ จึงทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อทำ

การประเมินผลและปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเสริมฤทธิ์ดังกล่าวในตับหนูไม่ช้ โดยปัจจัยที่มีความเกี่ยวข้องลำดับต้นๆ ที่น่าสนใจศึกษา ได้แก่ สายพันธุ์ และเพศ

การศึกษาผลของแอนโดรกราโฟไลด์และ 3-methylcholanthrene (3-MC) ต่อการแสดงออกของยีนแฟมิลี CYP1 ในตับหนูไม่ช้สองสายพันธุ์ ได้แก่ C57BL/6 (B6) และ DBA/2 (D2) พบว่า 3-MC สามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของ CYP1A1, CYP1A2 และ CYP1B1 (รูปที่ 9A และ 9B) และการ treatment ร่วมระหว่างแอนโดรกราโฟไลด์และ 3-MC แสดงการเสริมฤทธิ์การเหนี่ยวนำการแสดงออกของ CYP1A1 และ CYP1A2 ในตับหนู B6 เพศผู้ ในขณะที่ทั้งแอนโดรกราโฟไลด์และ 3-MC ไม่สามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของเออาร์เอ็นเอของยีนดังกล่าวในตับหนู D2 เพศผู้ จากผลที่ได้สนับสนุนแนวคิดที่ว่า ผลของการเสริมฤทธิ์การเหนี่ยวนำการแสดงออกของเออาร์เอ็นเอของ CYP1A1 โดยแอนโดรกราโฟไลด์และ 3-MC เกิดขึ้นได้ทั้งในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงปฐุมภูมิและในตับหนู B6 เพศผู้

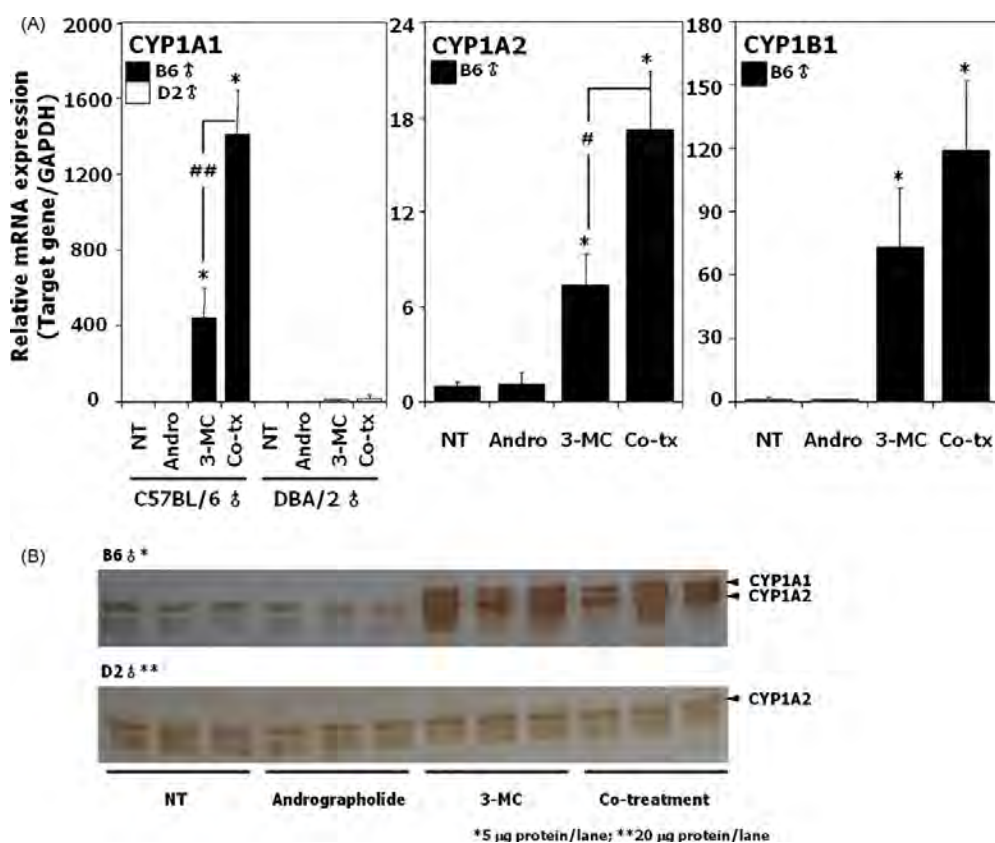


Fig. 9. Hepatic CYP1 expression induced by andrographolide and/or 3-methylcholanthrene in male C57BL/6 or DBA/2 mice. (A) Expression of CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1 mRNA. Male B6 or D2 mice were subcutaneously injected with andrographolide (5 mg/kg/day) daily for 5 days and/or intraperitoneally with 3-MC (20 mg/kg/day) for 3 days. Each column represents the mean±SD (n = 5–6). Significance was examined using a one-way ANOVA, the Tukey post hoc test and the Student–Newman–Keuls method (Sigmastat®); *p<0.001 (vs. NT); #p<0.01, ##p<0.001 (vs. 3-MC treated). (B) Expression profile of CYP1A1 and CYP1A2 protein. NT, non-treatment; Andro, andrographolide; 3-MC, 3-methylcholanthrene; Co-tx, co-treatment with 3-MC plus andrographolide.

ดังนั้น เพื่อเป็นการยืนยันความสัมพันธ์ระหว่างวิถีของ AhR และกลไกการควบคุมการเสริมฤทธิ์การเหนี่ยวนำการแสดงออกของ CYP1 โดยการ treatment ร่วมระหว่างแอนโดรกราโฟไลด์ และ 3-MC ในหนู B6 เพศผู้ จึงใช้ Phenobarbital (PB) ในการ treatment แทนการใช้ 3-MC ซึ่งพบว่า PB สามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกเอ็มอาร์เอ็นเอของ CYP1A1, CYP2B9 และ CYP2B10 ในขณะที่แอนโดรกราโฟไลด์สามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของ CYP2B ได้ด้วย (รูปที่ 10)

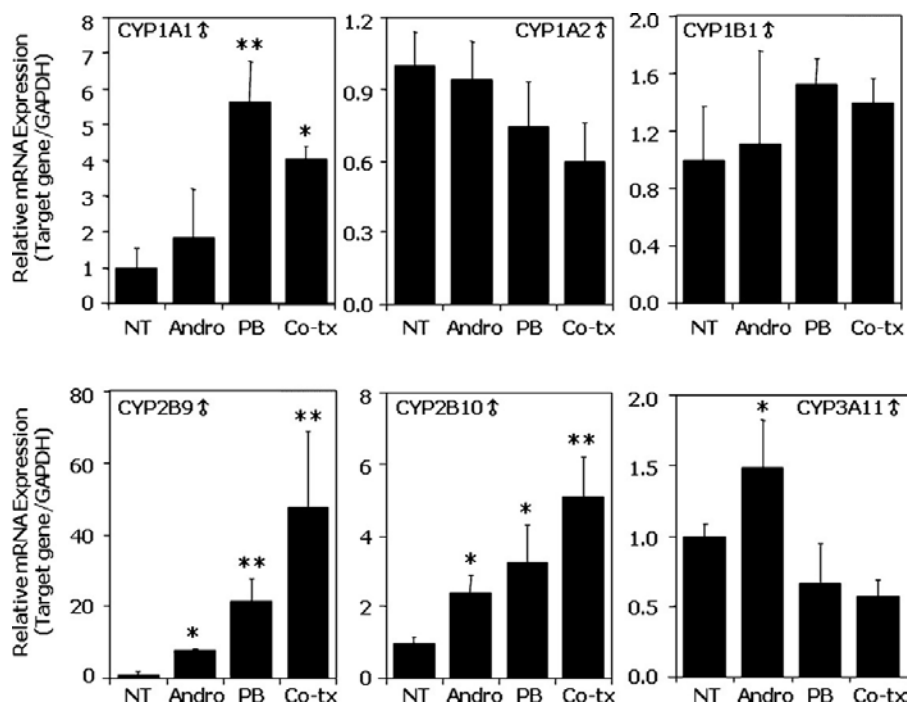


Fig. 10. Expression of hepatic P450 mRNA by phenobarbital in the presence of andrographolide. Male B6 mice were subcutaneously injected with andrographolide (5 mg/kg/day) daily for 5 days and/or intraperitoneally with PB (100 mg/kg/day) for 3 days. Each column represents the mean $\pm$ SD (n = 5–6). Significance was examined using a one-way ANOVA, the Tukey post hoc test and the Student–Newman–Keuls method (Sigmastat[®]); *p<0.01, **p<0.001 (vs. NT). NT, non-treatment; Andro, andrographolide; PB, phenobarbital; Co-tx, co-treatment with PB plus andrographolide.

นอกจากนี้ ผลจากการวิเคราะห์ปริมาณ P450 รวม (Total P450 content) และสมรรถนะของ เอนไซม์ ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) ก็แสดงผลในทำนองเดียวกัน (รูปที่ 11)

จากนั้น จึงทำการศึกษาผลอันเนื่องมาจากปัจจัยอื่นๆ ต่อไปในหนู B6 ทั้งสองเพศ พบว่า การเหนี่ยวนำการแสดงออกของ CYP1A1, CYP1A2 และ CYP1B1 โดย 3-MC ในหนูเพศผู้จะค่อยๆ ลดลงภายหลังหยุดการ treatment ในขณะที่ในเพศเมียเกิดในลักษณะที่ตรงข้ามกันคือเพิ่มขึ้น (รูปที่ 12) และที่น่าสนใจคือ การ treatment ร่วมระหว่างแอนโดรกราโฟไลด์และ 3-MC จะเสริมฤทธิ์การเหนี่ยวนำการแสดงออกของ CYP1 ในหนู B6 เพศผู้ ในขณะที่ในเพศเมียไม่พบปรากฏการณ์ในลักษณะเดียวกันนี้ หากแต่พบการลดลงของการเหนี่ยวนำการแสดงออกของ CYP1A1 ดังนั้นจึงอาจอนุมานได้ว่าแอนโดรกราโฟไลด์ป้องกันการทำลายอาร์เอ็นเอของแฟมิลี

CYP1 ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย 3-MC และเพศเป็นปัจจัยสำคัญหนึ่งที่กำหนดการเสริมฤทธิ์การเหนี่ยวนำอันเนื่องมาจากการ treatment ร่วมระหว่างแอนโดรกราโฟไลด์และ 3-MC

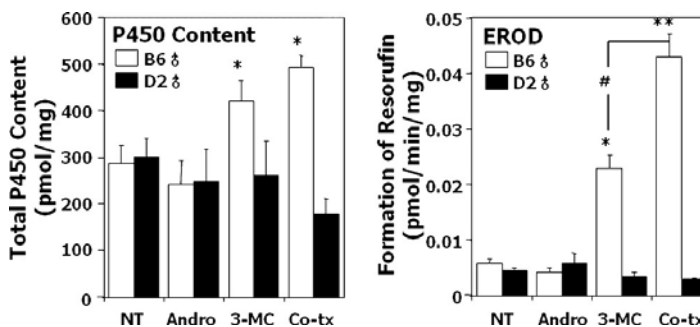


Fig. 11. Modulation of total P450 content and ethoxyresorufin O-deethylase activity by co-treatment with andrographolide and 3-methylcholanthrene in male C57BL/6 or DBA/2 mice. Male B6 or D2 mice were subcutaneously injected with andrographolide (5 mg/kg/day) daily for 5 days and/or intraperitoneally with 3-

MC (20 mg/kg/day) for 3 days. Total P450 content as well as EROD activity was assessed in hepatic microsomes. The open columns show the results for microsomes from B6 mice and the closed columns, those for microsomes from D2 mice. Each column represents the mean±SD (n = 5–6). Significance was examined using a one-way ANOVA, the Tukey post hoc test and the Student–Newman–Keuls method (Sigmastat®); *p<0.01, **p<0.001 (vs. NT); #p<0.001 (vs. 3-MC treated). NT, non-treatment; Andro, andrographolide; 3-MC, 3-methylcholanthrene; Co-tx, co-treatment with 3-MC plus andrographolide.

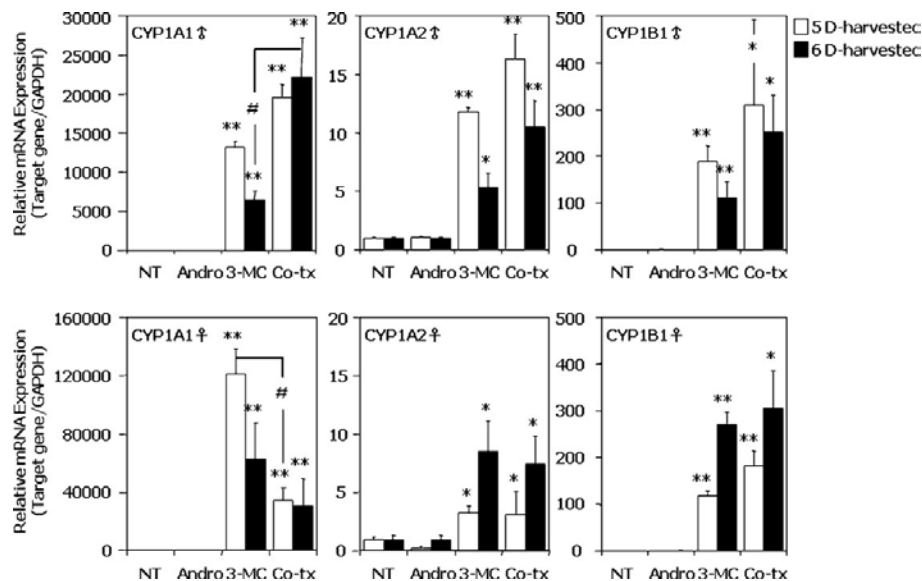


Fig. 12. Sex-dependency of hepatic CYP1 expression induced by andrographolide and/or 3-methylcholanthrene in C57BL/6 mice. B6 mice of both sexes were subcutaneously injected daily with 5mg/kg/day of andrographolide for 4 or 5 days and/or intraperitoneally given 20 mg/kg/day of 3-MC for 3 days. The treatment with andrographolide was continued for a further 1 or 2 days. The mice were sacrificed on the 5th or 6th day after the start of 3-MC treatment. The open and closed columns show mRNA expression of B6 mice sacrificed on the 5th or 6th day, respectively. Each column represents the mean±SD (n = 5–6). Significance was examined using a one-way ANOVA, the Tukey post hoc test and the Student–Newman–Keuls method (Sigmastat®); *p<0.01, **p<0.001 (vs. NT); #p<0.001 (vs. 3-MC treated). NT, non-treatment; Andro, andrographolide; 3-MC, 3-methylcholanthrene; Co-tx, co-treatment with 3-MC plus andrographolide; 5 D-harvested, total RNA prepared on the 5th day, 6 D-harvested, total RNA prepared on the 6th day.

และไม่พบปรากฏการณ์เช่นนี้ในไอโซฟอร์มอื่นๆ ทั้ง CYP2B9, CYP2B10 และ CYP3A11 (รูปที่ 13)

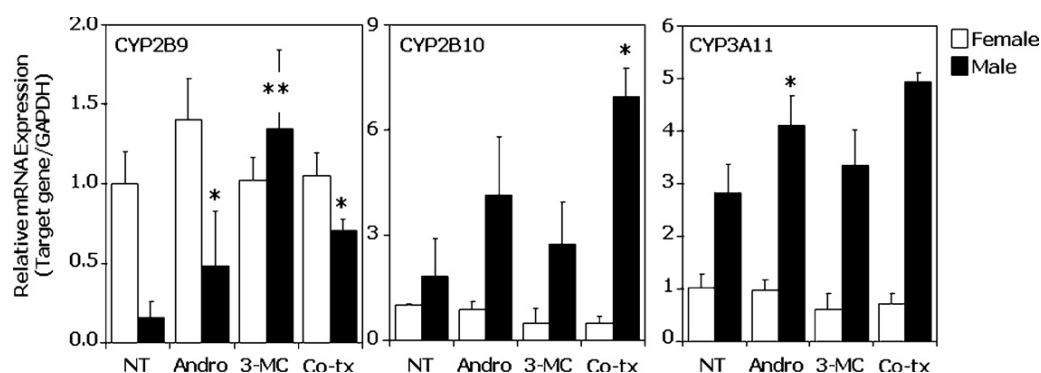


Fig. 13. Expression of CYP2B9, CYP2B10, and CYP3A11 mRNA induced by andrographolide and/or 3-methylcholanthrene in C57BL/6 mice. B6 mice of both sexes were subcutaneously injected with andrographolide (5 mg/kg/day) daily for 5 days and/or intraperitoneally with 3-MC (20 mg/kg/day) for 3 days. The open columns show mRNA expression in female mice and closed columns, that in male mice. Each column represents the mean $\pm$ SD (n = 5–6). Significance was examined using a one-way ANOVA, the Tukey post hoc test and the Student–Newman–Keuls method (Sigmastat[®]); *p<0.01, **p<0.001 (vs. NT). NT, non-treatment; Andro, andrographolide; 3-MC, 3-methylcholanthrene; Co-tx, co-treatment with 3-MC plus andrographolide.

เนื่องจากการเสริมฤทธิ์การเหนี่ยวนำการแสดงออกของ CYP1A1 โดยการ treatment ร่วมระหว่างแอนโดรกราโฟไลด์และ 3-MC ขึ้นกับเพศ จึงทำการศึกษาลดดังกล่าวในหนู B6 ทั้งสองเพศที่ถูกผ่าตัดแยกอัณฑะหรือรังไข่ออกแล้ว (gonadectomy) โดยทำการ treatment ในลักษณะเดิมทุกประการร่วมกับการให้ testosterone เสริม ซึ่งพบผลที่สอดคล้องกับการคาดการณ์ กล่าวคือ การผ่าตัดแยกอัณฑะออกจากหนู B6 เพศผู้ทำให้การเสริมฤทธิ์การเหนี่ยวนำการแสดงออกของ CYP1A1 โดยการ treatment ร่วมดังกล่าวหายไป (รูปที่ 14A) และการได้รับ testosterone เสริมในหนูที่ถูกผ่าตัดแยกอัณฑะสามารถทำให้ปรากฏการณ์การเสริมฤทธิ์ดังกล่าวกลับคืนมาได้ (รูปที่ 14B)

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาลดของฟ้าทะลายโจรต่อการแสดงออกของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ในหนูไมซ์นี้ทำการประเมินผลทั้งในเซลล์ตับปฐมภูมิของหนูไมซ์ (primary hepatocyte cultures) สายพันธุ์ C57BL/6 และในตับหนูไมซ์ (*in vivo*) สองสายพันธุ์ ได้แก่ C57BL/6 และ DBA/2 นอกจากนี้ยังได้นำเทคนิค microarray analysis มาใช้เพื่อวิเคราะห์ยืนยันผลการเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนไซโตโครม พี 450 ที่เฉพาะเจาะจงและเพื่อค้นหายีนอื่นๆ ที่อาจได้รับผลกระทบเพิ่มเติม

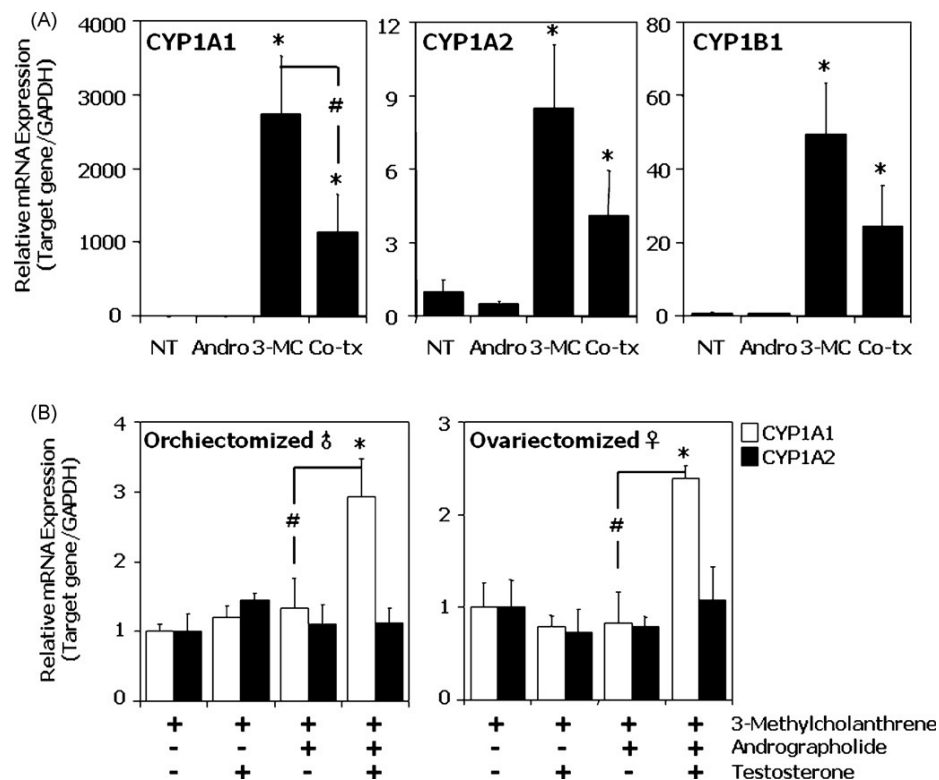


Fig. 14. Impact of testosterone supplementation on the expression of CYP1A mRNA in orchietomized and ovariectomized C57BL/6 mice. (A) Expression of CYP1 mRNA in orchietomized mice. Male B6 mice were orchietomized at 5 weeks of age. Two weeks later, all mice were treated with andrographolide and/or 3-MC under the same regimen in which the robust induction of CYP1A1 mRNA expression was noted. (B) Expression of CYP1A1 and CYP1A2 mRNA in orchietomized and ovariectomized mice after testosterone supplementation. Male and female B6 mice were orchietomized and ovariectomized, respectively, at 5 weeks of age. The orchietomized male and ovariectomized female B6 mice were subcutaneously injected with testosterone (5 mg/kg/day) daily for 7 days simultaneously with 3-MC plus andrographolide. The hormone treatment was started 2 days before that of 3-MC and andrographolide. The open columns show mRNA expression of CYP1A1 and the closed columns, that of CYP1A2. Each column represents the mean $\pm$ SD (n = 5–6). Significance was examined using a one-way ANOVA, the Tukey post hoc test and the Student–Newman–Keuls method (Sigmastat[®]); *p<0.001 (vs. NT); #p<0.001 (vs. 3-MC treated or andrographolide plus 3-MC treated). NT, non-treatment; Andro, andrographolide; 3-MC, 3-methylcholanthrene; Co-tx, co-treatment with 3-MC plus andrographolide.

ผลการศึกษาพบว่า แอนโดรกราโฟไลด์มีศักยภาพสูงในการเสริมฤทธิ์การเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีน CYP1A1 ในเซลล์ตับปฐมภูมิของหนู B6 เพศผู้ที่ถูกกระตุ้นโดยสารกระตุ้นต้นแบบ CYP1A ในลักษณะแปรผันตรงตามความเข้มข้นของสารกระตุ้นต้นแบบ ซึ่งปรากฏการณ์นี้เป็นลักษณะพิเศษที่พบเฉพาะในไอโซฟอร์มนี้เท่านั้น ศักยภาพในการเสริมฤทธิ์นี้ยังแสดงผลมาถึงตับของหนู B6 เพศผู้ได้ แต่ไม่สามารถตรวจวัดการเหนี่ยวนำการแสดงออกดังกล่าวในตับของหนู D2 เพศผู้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า AhR เป็น receptor ที่สำคัญหนึ่งที่มีความเกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกดังกล่าวนี้ด้วย นอกจากนี้การเหนี่ยวนำการแสดงออกดังกล่าวนี้ยังไม่สามารถตรวจพบในตับของหนู B6 เพศเมียได้อีกด้วย ซึ่งแสดงให้เห็นอีกว่าปรากฏการณ์นี้มีลักษณะพิเศษที่ขึ้นอยู่กับ

เพศอีกด้วย และผลจากการศึกษาการแสดงออกดังกล่าวในหนูที่ถูกผ่าตัดแยกอวัยวะหรือรังไข่ รวมทั้งการให้ฮอร์โมน testosterone เสริม ยังสามารถยืนยันได้อย่างชัดเจนว่าศักยภาพของแอนโดรกราโฟไลด์ในการเสริมฤทธิ์การเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีน CYP1A1 เป็นคุณลักษณะเฉพาะที่ถูกควบคุมโดยปัจจัยของ AhR รวมถึงสายพันธุ์และเพศอีกด้วย

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากฟ้าทะลายโจรมีสารอื่นๆ นอกเหนือจากแอนโดรกราโฟไลด์ เป็นส่วนประกอบรองๆ ลงมาด้วย อาทิ neoandrographolide และ dideoxyandrographolide ดังนั้น จึงควรทำการศึกษาผลของสารรองในฟ้าทะลายโจรต่อการควบคุมการแสดงออกของไซโตโครม พี 450 เพิ่มเติมอีก เพื่อให้ได้ข้อมูลความปลอดภัย ตลอดจนแนวโน้มการเกิดอันตรกิริยาระหว่างฟ้าทะลายโจรและยาหรือสารอื่นๆ ได้อย่างมีนัยสำคัญในทางคลินิกต่อไป นอกจากนี้ เนื่องจากการศึกษานี้ทำการศึกษาโดยใช้แบบจำลองสัตว์ทดลอง ซึ่งแม้จะคัดเลือกชนิดสัตว์ทดลองที่มีการแสดงออกของยีนที่ศึกษาที่มีความคล้ายคลึงกับมนุษย์มากที่สุดแล้วก็ตาม ก็ไม่อาจสรุปได้อย่างสมบูรณ์ว่าจะไม่มีความแตกต่างของการตอบสนองในยีนเหล่านี้ในมนุษย์ ดังนั้น จึงควรทำการศึกษายืนยันในแบบจำลองมนุษย์ ได้แก่ เซลล์ต้นประมุขของมนุษย์ หรือ chimeric mouse with humanized liver เพิ่มเติมต่อไปด้วย

เอกสารอ้างอิง

1. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. ยาสมุนไพรสำหรับงานสาธารณสุขมูลฐาน. กรุงเทพมหานคร: องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก, 2537.
2. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. สมุนไพรในงานสาธารณสุขมูลฐานสำหรับบุคลากรสาธารณสุข, 2530, 118.
3. สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. มาตรฐานสมุนไพรไทย เล่ม 1: ฟ้าทะลายโจร *Andrographis paniculata* (Burm. F.) Nees. กรุงเทพมหานคร: องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก, 2542.
4. เสาวภา ลิ้มพานิชกุล. การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสมุนไพรฟ้าทะลายโจรในหนูขาว [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต]. กรุงเทพมหานคร: บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2538.
5. ธีรรัตน์ ปลื้มใจ. ฟ้าทะลายโจรต้านจุลินทรีย์. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 34 (1): 12-24.
6. จริยา สินเดิมสุข. ฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดบริสุทธิ์จากสมุนไพรฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*) ต่อเชื้อโรคท้องร่วงที่พบมากในไทย. วารสารกรมการแพทย์ กรุงเทพมหานคร: 2536, 18 (8): 394-400.
7. ศูนย์ข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. ก้าวไปกับสมุนไพร เล่ม 1. กรุงเทพมหานคร: กรมการแพทย์, 2529.

8. Kameswaran L, Nazimudeen SK and Ramaswamy S. Effect of *Andrographis paniculata* on snake venom induced death and its mechanism. *Indian J. Pharm. Sci.* 1987, 40: 132-133.
9. วณิดา แสงอลังการ, ประสาน ธรรมอุปกรณ, อูมา กิติยานี และ ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ. ผลของ andrographolide, neoandrographolide และ 14-,11,12-didehydrographolide ต่อการหดเกร็งของกล้ามเนื้อกระเพาะอาหารหนูขาวนอกร่างกาย. *ไทยเภสัชสาร.* 2533, 15 (1): 5-17.
10. ศิริมา พรสุขวัฒนา, ประสาน ธรรมอุปกรณ, อูมา กิติยานี. การทดสอบฤทธิ์การป้องกันและรักษาแผลกระเพาะอาหารของสมุนไพรรพไฟทะลายโจรและเปิ้ล้าน้อย. *ไทยเภสัชสาร.* 2532, 14 (1): 35-45.
11. Madav S, Mishra SK, Tandan and Tripathi HC. Analgesic, antipyretic and antiulcerogenic effects of andrographolide. *Indian J. Pharm. Sci.* 1995, 57 (3): 121-125.
12. Visen PKS, Binduja S, Patnaik GK and Dhawan BN. Andrographolide protect rate hepatocytes against paracetamol induced damage. *J. Ethnopharmacol.* 1993, 40: 131-136.
13. Binduja S, Visen PKS, Patnaik GK and Dhawan BN. Choloretic effect of andrographolide in rats and guinea pig. *Planta Med.* 1992, 58: 146-149.
14. Subramoniam A and Pushpangadan P. Development of phytomedicines for liver diseases. *Indian J. Pharmacol.* 1999, 31: 166-175.
15. Misra P, Pal NL and Guru PY. Antimalarial activity of *Andrographis paniculata* (Kalmegh) against *Plasmodium berghei* NK 65 in *Mastomys natalensis*. *Int. J. Pharmacog.* 1992, 30 (4): 263-274.
16. ปัญจรงค์ ธนิงกุล และ ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ. การศึกษาทางคลินิกของสมุนไพรรพไฟทะลายโจรในโรคอุจจาระร่วงและบิดแบคทีเรีย. *รามาริบัติเวชสาร.* 2538, 8 (2): 57-61.
17. Calabreae C, Berman SH and Babish JG. A phase I trial of andrographolide in HIV positive patients and normal volunteers. *Phytother. Res.* 2000, 14: 333-338.
18. Puri A, Saxena R, Saxena RP and Saxena KC. Immunostimulant agents from *Andrographis paniculata*. *J. Nat. Prod.* 1993, 56 (7): 995-999.
19. Burgos RA, Caballero EE and Sanchez NS. Testicular toxicity assessment of *Andrographis paniculata* dried extract in rat. *J. Ethnopharmacol.* 1997, 58: 219-224.
20. Gonzalez FJ and Gelboin HV. Role of human cytochrome P-450 in the metabolic activation of chemical carcinogen and toxins. *Drug Metab. Rev.* 1994, 26: 165.
21. Poulos T. Cytochrome P450. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 1995, 5: 767.
22. Woof, TF. Handbook of drug metabolism. New York: Marcel Dekker, Inc., 1999.
23. Nemoto N and Sakurai J. Glucocorticoid and sex hormones as activating or modulating factors for expression of Cyp2b-9 and Cyp2b-10 in the mouse liver and hepatocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 1995, 319: 286-292.

24. Jarukamjorn K, Sakuma T, Miyaura J and Nemoto N. Different regulation of the expression of mouse hepatic cytochrome P450 2B enzymes by glucocorticoid and phenobarbital. *Arch. Biochem. Biophys.* 1999, 369: 89–99.
25. Jaruchotikamol A, Jarukamjorn K, Sirisangtrakul W, Sakuma T, Kawasaki Y, Nemoto N. Strong synergistic induction of CYP1A1 expression by andrographolide plus typical CYP1A inducers in mouse hepatocytes. *Toxicol. App. Pharmacol.* 2007, 224: 156–162.
26. Nemoto N. and Sakurai J. Differences in regulation of gene expression between Cyp1a-1 and Cyp1a-2 in adult mouse hepatocytes in primary culture. *Carcinogenesis.* 1992,13: 2249–2254
27. Sakuma T, Ohtake M, Katsurayama Y, Jarukamjorn K and Nemoto N. Induction of CYP1A2 by phenobarbital in the livers of aryl hydrocarbonresponsive and -nonresponsive mice. *Drug Metab. Dispos.* 1999, 27: 379–384.
28. Omura T. and Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsome. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.* 1964, 239: 2370–2378.
29. Yao EF. and Denison MS. DNA sequence determinants for binding of transformed Ah receptor to a dioxin-responsive enhancer. *Biochemistry.* 1992, 31: 5060–5067.

ผลงานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ภาคผนวก 2)

1. Jaruchotikamol, A., **Jarukamjorn, K.***, Sirisangtrakul, W., Sakuma, T., Kawasaki, Y., and Nemoto, N.* Strong synergistic induction of CYP1A1 expression by andrographolide plus typical CYP1A inducers in mouse hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 224: 156-162, 2007. (*Corresponding authors, Impact Factor 4.722)
2. Chatuphonpresert, W., **Jarukamjorn, K.**, Kondo, S., and Nemoto, N.* Synergistic increases of metabolism and oxidation-reduction genes on their expression after combined treatment with a CYP1A induce and andrographolide. *Chem-Biol. Interac.* 182: 233-238, 2009. (Impact Factor 3.090)
3. **Jarukamjorn, K.***, Kondo, S., Chatuphonpresert, W., Sakuma, T., Kawasaki, Y., and Nemoto, N.* Gender-associated modulation of inducible CYP1A1 expression by andrographolide in mouse liver. *Eur. J. Pharm. Sci.* 39: 394-401, 2010. (*Corresponding authors, Impact Factor 3.127)

นิพนธ์ปริทรรศน์ (ภาคผนวก 3)

1. การได้รับเชิญให้เป็นผู้เขียนนิพนธ์ปริทรรศน์ในหนังสือ “*Natural Product and Drug Interactions*” ฉบับพิเศษ ซึ่งเป็นสิ่งพิมพ์ทางวิทยาศาสตร์ที่มีกำหนดออกปีละ 2 ครั้ง จัดพิมพ์โดย Latin American and Caribbean Bulletin of Medicinal and Aromatic Plants (BLACPMA) [Website: <http://www.blacpma.cl>]
Jarukamjorn, K.* *Andrographis paniculata*: a review of aspects of regulatory mechanisms of hepatic CYP1A enzymes. *BLACPMA* 7:108-115, 2008. (*Corresponding author)
2. การได้รับเชิญจากกองบรรณาธิการให้เป็นผู้เขียนนิพนธ์ปริทรรศน์ในวารสาร Journal of Health Sciences ของ The Pharmaceutical Society of Japan ซึ่งเป็นสิ่งพิมพ์ทางวิทยาศาสตร์ที่มีกำหนดออกทุก 2 เดือน [Website: http://www.pharm.or.jp/index_e.html]
Jarukamjorn, K.* and Nemoto, N. Pharmacological aspects of *Andrographis paniculata* on health and its major diterpenoid constituent andrographolide. *J. Health Sci.* 54: 370-381, 2008. (*Corresponding author, Impact Factor 0.643)
3. การได้รับเชิญจาก Corresponding author ให้เป็นผู้เขียนนิพนธ์ปริทรรศน์ร่วมในวารสาร Journal of Health Sciences ของ The Pharmaceutical Society of Japan ซึ่งเป็นสิ่งพิมพ์ทางวิทยาศาสตร์ที่มีกำหนดออกทุก 2 เดือน
[Website: http://www.pharm.or.jp/index_e.html]
Sakuma, T., Kawasaki, Y., **Jarukamjorn, K.**, and Nemoto, N. Sex differences of drug-metabolizing enzyme: female predominant expression of human and mouse cytochrome P450 3A isoforms. *J. Health Sci.* 55: 325-337, 2009. (Co-author, Impact Factor 0.643)

การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ: ระดับนานาชาติ (ภาคผนวก 4)

1. การเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ในการประชุมระดับนานาชาติ The 1st Sino-Thai International Conference on Traditional Medicine and Natural Health Products (STCTMNH), November 12-19, 2006, Nanning, Guangxi, P.R.China. เรื่อง Andrographolide: A Novel Inducer of Cytochrome P450 Enzymes. โดย **Jarukamjorn, K.**, Itoh, S., Sakuma, T., Nemoto, N. (*Corresponding author)
2. การเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ในการประชุมระดับนานาชาติ The 7th JSPS/NRCT Joint Seminar on “Recent Advances in Natural Product Research and Its Application”, December 1-4, 2006, Toyama Kenmin Kaikan, Toyama, Japan. เรื่อง CYP1A: A Responsive Cytochrome P450 Enzymes for *Andrographis paniculata* in Mouse Liver. โดย **Jarukamjorn, K.**, Hu, Y., Sripanidkulchai, B., Laha, T. (*Corresponding author)
3. การเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ในการประชุมระดับนานาชาติ The 2nd Sino-Thai International Conference on Traditional Medicine and Natural Products, December 2-6, 2007, Kosa Hotel, Khon Kaen, Thailand. เรื่อง Induction of Cytochrome P450 1A2 Enzyme by Andrographolide โดย Hu Ying, Waranya Chatuphonprasert, and **Kanokwan Jarukamjorn*** (*Corresponding author)
4. การเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ในการประชุมระดับนานาชาติ The 8th Joint Seminar “INNOVATIVE RESEARCH IN NATURAL PRODUCTS FOR SUSTAINABLE DEVELOPMENT” โดย NRCT-JSPS Core University Program on Natural Medicine in Pharmaceutical Sciences, December 3-4, 2008, ณ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ ประเทศไทย เรื่อง Testosterone-dependent regulation of CYP1A1 activation by andrographolide plus 3-methylcholanthrene in male mouse liver โดย Waranya Chatuphonprasert, **Kanokwan Jarukamjorn***, and Nobuo Nemoto (*Corresponding author)
5. การนำเสนอผลงานวิจัยแบบปากเปล่าในงานประชุมวิชาการนานาชาติ “2008 Shanghai International Symposium on Pharmacy”, December 19-20, 2008, Shanghai, P.R.China. เรื่อง Impact of testosterone on activation of CYP1A1 by andrographolide plus 3-methylcholanthrene in mouse liver
6. การเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ในการประชุมระดับนานาชาติ The 19th International Congress of Nutrition (ICN2009): Nutrition security for all, October, 4-9 2009, Bitec Bangna, Bangkok, Thailand. เรื่อง Impact of testosterone on activation of CYP1A1 by andrographolide plus 3-methylcholanthrene in male mouse liver โดย **Kanokwan Jarukamjorn*** (*Corresponding author)

7. การเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ในการประชุมระดับนานาชาติ The Pure Applied Chemistry International Conference 2010 (PACCON2010), January 21-23, 2010, Sunee Grand Hotel and Convention Center, Ubon Rachathani Thailand เรื่อง Sexually Differential Modification of CYP1A1 Activation by Andrographolide plus 3-Methylcholanthrene in Mouse Liver โดย **Kanokwan Jarukamjorn***, Waranya Chatuphonpresert, and Nobuo Nemoto. (*Corresponding author)

การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ: ระดับชาติ (ภาคผนวก 5)

1. การเสนอผลงานแบบปากเปล่าในการประชุมเสนอผลงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์ประจำปี 2550 (ครั้งที่ 24) เรื่อง Strong synergistic induction of CYP1A1 expression by andrographolide plus typical CYP1A inducers in mouse hepatocytes วันที่ 12 ธันวาคม 2550 ณ ห้องประชุม 502 อาคาร 80 ปีเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ
2. การเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ในการประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่...พบ...เมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 7 เรื่อง Elevated Induction of 3-Methylcholanthrene-Induced Cytochrome P450 1A2 by Andrographolide in Mouse Liver วันที่ 11-13 ตุลาคม 2550 ณ โรงแรมแอมบาสซาเดอร์ ซิตี้ จอมเทียน จังหวัดชลบุรี
3. การเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ในการประชุมนำเสนอผลงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์ประจำปี 2551 (ครั้งที่ 25) เรื่อง. Testosterone-dependent regulation of CYP1A1 activation by andrographolide plus 3-methylcholanthrene in male mouse liver. โดย Waranya Chatuphonprasert and **Kanokwan Jarukamjorn*** วันที่ 2 ธันวาคม 2551 ณ ห้องประชุม 502 อาคาร 80 ปีเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ (*Corresponding author)
4. การเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ในการประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่...พบ...เมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 8 เรื่อง Sexually differential modification of CYP1A1 activation by andrographolide plus 3-methylcholanthrene in mouse liver วันที่ 16-18 ตุลาคม 2551 ณ โรงแรมฮอลิเดย์ อินน์ รีสอร์ท รีเจนท์ บีช ชะอำ จังหวัดเพชรบุรี
5. การเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ในการประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่...พบ...เมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 9 เรื่อง A Gender-Associated Modification of CYP1A1 Expression by Andrographolide Plus 3-Methylcholanthrene in Mouse Liver วันที่ 15-17 ตุลาคม 2551 ณ โรงแรมฮอลิเดย์ อินน์ รีสอร์ท รีเจนท์ บีช ชะอำ จังหวัดเพชรบุรี
6. การเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ในการประชุมวิชาการสรีรวิทยาสมาคมแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 39 ประจำปี 2553 “การวิจัยเพื่อการประยุกต์ใช้: จากสัตว์ทดลองสู่มนุษย์ชาติ” เรื่อง Testosterone Dependent on Regulation of Synergistic CYP1A1 Induction by Andrographolide Plus Typical CYP1A Inducer in Mouse โดย Waranya Chatuphonprasert, **Kanokwan Jarukamjorn***, and Nobuo Nemoto วันที่ 5-8 พฤษภาคม 2553 ณ โรงแรมอมาริโอกิตส์รีสอร์ทแอนด์ทาวเวอร์พทยา จ.ชลบุรี (*Corresponding author)

รางวัลผลงานวิจัย (ภาคผนวก 6)

1. รางวัลผลงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์ สาขาเภสัชศาสตร์ ประจำปี 2550 (Nagai Award Thailand 2007) ของ Nagai Foundation Tokyo ประเทศญี่ปุ่น จากผลงานวิจัยเรื่อง Jaruchotikamol, A., **Jarukamjorn, K.***, Sirisangtrakul, W., Sakuma, T., Kawasaki, Y., and Nemoto, N.* Strong synergistic induction of CYP1A1 expression by andrographolide plus typical CYP1A inducers in mouse hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 224: 156-162, 2007. วันที่ 12 ธันวาคม 2550 ณ ห้องประชุม 502 อาคาร 80 ปี เภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเชื่อมโยงทางวิชาการกับนักวิชาการอื่นๆ ทั้งในและต่างประเทศ
ต่างประเทศ

นักวิจัยผู้เชี่ยวชาญในสาขา	สถานที่ทำงาน	ความร่วมมือ
Prof. Dr. Nobuo NEMOTO	Department of Toxicology, Graduate School of Medical and Pharmaceutical Sciences, University of Toyama, 2630 Sugitani, Toyama 930-0194 Japan	- ความร่วมมือทางการวิจัย โดยการแลกเปลี่ยนและถ่ายทอดเทคโนโลยีที่ทันสมัย การอนุเคราะห์สารสำคัญในการวิจัยวิจัย (กรณีไม่มีจำหน่าย) ตลอดจนร่วมวิเคราะห์ และอภิปรายผลการทดลองที่เกี่ยวข้องอย่างต่อเนื่อง - ความร่วมมือทางการศึกษา โดยการรับนักศึกษาปริญญาเอก (ในความรับผิดชอบ) ปฏิบัติการวิจัยในห้องปฏิบัติการ ณ ประเทศญี่ปุ่น เป็นเวลา 1 ปี
Prof. Dr. Masahiko NEGISHI	Laboratory of Reproductive and Developmental Toxicology, National Institute of Environmental Health Sciences, NIH, Research Triangle Park, North Carolina, USA	- ความร่วมมือทางการวิจัย โดยการอนุเคราะห์สารสำคัญในการวิจัย (กรณีไม่มีจำหน่าย) ให้คำแนะนำ และอภิปรายผลการทดลองที่เกี่ยวข้อง
Prof. Dr. Tsuyoshi YOKOI	Drug Metabolism and Toxicology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kanazawa University, Kakuma-machi, Kanazawa 920-1192 Japan	- ความร่วมมือทางการวิจัย โดยการแลกเปลี่ยนและถ่ายทอดเทคโนโลยีที่ทันสมัย ตลอดจนร่วมวิเคราะห์ และอภิปรายผลการทดลองที่เกี่ยวข้อง - มีแผนการรับนักศึกษาบัณฑิตศึกษา ฝึกปฏิบัติการวิจัยแลกเปลี่ยนเทคโนโลยีในห้องปฏิบัติการ ณ ประเทศญี่ปุ่น เป็นเวลา 6 เดือน
Ao. Univ. Prof. Dr. Walter JAEGER	Department of Clinical Pharmacy and Diagnostics, Faculty of Life Science, University of Vienna, Althanstrasse 14, A-1090 Vienna, Austria	- ความร่วมมือทางการวิจัย โดยการแลกเปลี่ยนและถ่ายทอดเทคโนโลยีที่ทันสมัย การอนุเคราะห์สารสำคัญในการวิจัย ตลอดจนร่วมวิเคราะห์ และอภิปรายผลการทดลองที่เกี่ยวข้องอย่างต่อเนื่อง - มีแผนการรับนักศึกษาบัณฑิตศึกษา ฝึกปฏิบัติการวิจัยแลกเปลี่ยนเทคโนโลยีในห้องปฏิบัติการ ณ ประเทศออสเตรีย เป็นเวลา 6 เดือน

ในประเทศ

นักวิจัยผู้เชี่ยวชาญในสาขา	สถานที่ทำงาน	ความร่วมมือ
ผศ.วราภรณ์ ศุกลพงศ์	หน่วยจุลชีววิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น	- ความร่วมมือทางการวิจัย โดยให้คำแนะนำ ในการดูแลและเก็บตัวอย่างเลือดจาก กระต่ายในการผลิตแอนติบอดี
รศ.ดร.สมทรง ลาวัณย์ประเสริฐ	หัวหน้าภาควิชาเภสัชวิทยาและสรีรวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ	- ความร่วมมือทางการวิจัย โดยให้คำแนะนำ และอภิปรายผลการทดลองที่เกี่ยวข้อง
รศ.น.สพ.ปรีณัน จิตตะสมบัติ	หน่วยศัลยกรรม ภาควิชาศัลยศาสตร์และ วิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น	- ความร่วมมือทางการวิจัย โดยอำนวยความสะดวก ในฉีดแอนติเจนและเก็บตัวอย่างเลือด จากกระต่ายในการผลิตแอนติบอดี
ดร.วิไลลักษณ์ ปรัชญาวารากร	ห้องปฏิบัติการผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ หน่วย วิจัยเคมี สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ กรุงเทพฯ	- ความร่วมมือทางการวิจัย โดยให้คำแนะนำ และอภิปรายผลการทดลองที่เกี่ยวข้องกับ การสกัดและการพิสูจน์เอกลักษณ์สารสำคัญ
ดร.เทวัญ เริ่มสูงเนิน	ภาควิชาคณิตศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น	- ความร่วมมือทางการวิจัย โดยการ แลกเปลี่ยนและถ่ายทอดเทคโนโลยี molecular modeling and docking
รศ.ดร.ไชยณรงค์ นาวานุเคราะห์	ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น	- ความร่วมมือทางการวิจัย โดยให้คำแนะนำ และอภิปรายผลการทดลองที่เกี่ยวข้อง
รศ.ดร.เทวราช หล้าหา	ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น	- ความร่วมมือทางการวิจัย โดยให้คำแนะนำ และอภิปรายผลการทดลองที่เกี่ยวข้อง

ภาคผนวก



มหาวิทยาลัยขอนแก่น
หนังสือฉบับนี้ให้ไว้เพื่อแสดงว่า

โครงการวิจัยเรื่อง : ผลของยาสมุนไพรฟ้าทะลายโจรต่อการแสดงออกของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450
Influence of Herbal Medicine "Andrographis paniculata" on Expression
of Cytochrome P 450 Enzymes

ผู้วิจัย : ผศ.กนกวรรณ จารุกัจฉา

หน่วยงานที่สังกัด : ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ได้ผ่านการพิจารณาของคณะกรรมการด้านจรรยาบรรณและมาตรฐานในการใช้สัตว์ทดลอง
มหาวิทยาลัยขอนแก่น แล้ว โดยยึดหลักเกณฑ์จรรยาบรรณการใช้สัตว์ สำนักงานคณะกรรมการวิจัย
แห่งชาติ

ให้ไว้ ณ วันที่ 19 มกราคม พ.ศ. 2550

(รองศาสตราจารย์พิศาล ศิริธร)

ประธานคณะกรรมการด้านจรรยาบรรณและมาตรฐานในการใช้สัตว์ทดลอง
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ลำดับที่ : จส.มข. 01/2550

เลขที่ : ศธ 0514.1.33/ 049

ฝ่ายวิจัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น

123 ถนนมิตรภาพ อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40002

โทร. 0-4320-2011 โทรสาร 0-4320-2015



Strong synergistic induction of CYP1A1 expression by andrographolide plus typical CYP1A inducers in mouse hepatocytes

Atika Jaruchotikamol^a, Kanokwan Jarukamjorn^{b,*}, Wanna Sirisangtrakul^{a,b},
Tsutomu Sakuma^a, Yuki Kawasaki^a, Nobuo Nemoto^{a,*}

^a Department of Toxicology, Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences, University of Toyama, 2630 Sugitani, Toyama 930-0194, Japan

^b Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

Received 22 May 2007; revised 24 June 2007; accepted 11 July 2007

Available online 28 July 2007

Abstract

The effects of andrographolide, the major diterpenoid constituent of *Andrographis paniculata*, on the expression of cytochrome P450 superfamily 1 members, including CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1, as well as on aryl hydrocarbon receptor (AhR) expression in primary cultures of mouse hepatocytes were investigated in comparison with the effects of typical CYP1A inducers, including benz[*a*]anthracene, β -naphthoflavone, and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. Andrographolide significantly induced the expression of CYP1A1 and CYP1A2 mRNAs in a concentration-dependent manner, as did the typical CYP1A inducers, but did not induce that of CYP1B1 or AhR. Interestingly, andrographolide plus the typical CYP1A inducers synergistically induced CYP1A1 expression, and the synergism was blocked by an AhR antagonist, resveratrol. The CYP1A1 enzyme activity showed a similar pattern of induction. This is the first report that shows that andrographolide has a potency to induce CYP1A1 enzyme and indicates that andrographolide could be a very useful compound for investigating the regulatory mechanism of the CYP1A1 induction pathway. In addition, our findings suggest preparing advice for rational administration of *A. paniculata*, according to its ability to induce CYP1A1 expression.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Andrographolide; CYP1A1; CYP1A2; CYP1B1; AhR; Mouse hepatocyte

Introduction

Cytochrome P450s (P450) constitute a superfamily of heme-proteins that play an important role in the metabolism of xenobiotics, including drugs, toxins, and chemical carcinogens (Guengerich, 2000; Guengerich and Shimada, 1998). Of these, P450s, CYP1A1 and CYP1A2 have been shown to be the major

Abbreviations: AhR, aryl hydrocarbon receptor; ARNT, AhR nuclear translocator; B[a]A, benz[*a*]anthracene; β -NF, β -naphthoflavone; DMSO, dimethylsulfoxide; DRE, Dioxin Responsive Element; EROD, ethoxyresorufin *O*-deethylase; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; iNOS, inducible nitric oxide synthase; Mac, membrane-activated complex; P450, cytochrome P450; ROS, reactive oxygen species; TCDD, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin.

* Corresponding authors. K. Jarukamjorn is to be contacted at fax: +66 43 202 379.

E-mail addresses: kanok-ja@kku.ac.th (K. Jarukamjorn),
nnemoto@pha.u-toyama.ac.jp (N. Nemoto).

enzymes in the metabolism of potential procarcinogens such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), nitro-PAHs, and aryl and heterocyclic arylamines. In addition to being substrates, PAHs are also inducers of CYP1A1 and CYP1A2 genes. The mechanisms of transcriptional regulation of the two genes are not the same. CYP1A1 is expressed constitutively in several extrahepatic tissues, but not in the liver. However, while CYP1A1 expression has been demonstrated in the liver after inducer treatment, CYP1A2 is constitutively and inducibly expressed only in the liver (Kimura et al., 1986; Iwanari et al., 2002). Aryl hydrocarbon receptor (AhR) has been shown to play central roles in the regulation and induction of CYP1A1 and CYP1A2 by a prototype inducer, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD; Whitlock, 1999). In addition to the two members of the CYP1A subfamily, CYP1B1, a relatively new member of the superfamily 1 (Brake et al., 1999; Ryu and Hodgson, 1999; Savas et al., 1994), has been postulated to be involved in the metabolism of PAHs such as TCDD through

AhR and the AhR nuclear translocator (ARNT)-mediated pathway (Ryu and Hodgson, 1999; Savas et al., 1994). Constitutive expression of CYP1B1 was detected in steroidogenic tissues such as adrenal glands, ovaries, and testes, but it was not detected in xenobiotic-metabolizing organs such as liver, kidney, and lung (Iwanari et al., 2002; Savas et al., 1994). Since CYP1 is responsible for activating carcinogenic aromatic amines and heterocyclic amines, to which we are exposed to every day via smoking, diet, and the environment, its regulation is of clear interest.

Andrographolide (3-[2-[decahydro-6-hydroxy-5-(hydroxymethyl)-5,8a-dimethyl-2-methylene-1-naphthalenyl]ethylidene]dihydro-4-hydroxy-2(3H)-furanone) is the major diterpenoid constituent of the plant *Andrographis paniculata* Nees (Family Acanthaceae), which has been traditionally employed for centuries in Asia and Europe as a folk remedy for a wide spectrum of ailments or a herbal supplement for health promotion, and is nowadays incorporated in a number of herbal medicinal preparations. It is found in the *Indian Pharmacopoeias* and is a prominent component in at least 26 Ayurvedic formulas (Madav et al., 1995). In traditional Chinese medicine, it is an important “cold property” herb used to rid the body of heat, as in fevers, and to dispel toxins from the body (Deng, 1978). In Scandinavian countries, it is commonly used to prevent and treat the common cold (Caceres et al., 1997). *A. paniculata* is one of the top 10 herbal medicines which the Thai FDA has promoted as an alternative medicinal therapy for fever and inflammation. Extensive research has revealed that the whole-plant extract is useful for anti-inflammatory (Shen et al., 2002), antiviral (Calabrese et al., 2000), anticancer (Kumar et al., 2004), and immunostimulatory (Puri et al., 1993; Iruretagoneya et al., 2005) treatments. On the other hand, male reproductive toxicity (Akbarsha and Murugaian, 2000) and cytotoxicity (Nanduri et al., 2004) of this plant have been reported as well. Andrographolide has been reported to show hepatoprotective activity in mice against carbon tetrachloride and paracetamol intoxication (Handa and Sharma, 1990a; Handa and Sharma, 1990b), and to possess several pharmacological activities, including inhibition of iNOS expression (Chiou et al., 2000, 1998), Mac-1 expression, and ROS production (Shen et al., 2002, 2000), and a protective effect against cytotoxicity (Kapil et al., 1993). This compound has recently been shown to work as an anti-inflammatory agent by reducing the generation of ROS in human neutrophils (Shen et al., 2002), as well as preventing microglia activation (Wang et al., 2004) and interfering with T cell activation (Iruretagoneya et al., 2005). Recently, we reported that a crude extract of *A. paniculata* might induce mouse hepatic cytochrome P450 isoforms CYP1A1 and CYP2B via significant increases in ethoxyresorufin *O*-dealkylase (EROD) and pentoxyresorufin *O*-dealkylase activities (Jarukamjorn et al., 2006). However, there have been no studies on the impact of andrographolide on the expression of hepatic P450 enzymes. Therefore, it was of interest to examine how andrographolide influences the expression of hepatic P450s. The results of such an inquiry might provide invaluable guidelines for the rational administration and precautions for the use of the herbal plant.

In the present study, the ability of andrographolide to elevate the hepatic expression of CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, and AhR was examined in mouse hepatocytes and compared with that of typical CYP1A inducers, including benz[*a*]anthracene (B[*a*]A), β -naphthoflavone (β -NF), and TCDD. Subsequently, the synergistic effects of concomitant treatment with andrographolide and the typical CYP1A inducers on the induction of CYP1A1 mRNA, protein, and enzyme activity were examined. The findings revealed that andrographolide has a potency to induce CYP1A1 enzyme.

Materials and methods

Materials. Materials for culturing hepatocytes were purchased from Gibco® Invitrogen Cell Culture (Carlsbad, CA), BioWhittaker™ Cambrex Bio-Sciences (Walkerville, MD), and Wako Pure Chemical (Osaka, Japan). Percoll and collagenase (Type I) were products of GE Healthcare Bio-Sciences AB (Uppsala) and the Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO), respectively. Andrographolide, resveratrol, and the LDH-cytotoxic test were supplied by Wako Pure Chemical. B[*a*]A, β -NF, TCDD, ethoxyresorufin, and resorufin were obtained from Sigma Chemical Co. The TaKaRa RT-PCR kit (Perfect Real Time) and SYBR® Green Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time) were products of TaKaRa Biomedicals Inc. (Shiga, Japan). The TaqMan® Gene Expression Assays were products of Applied Biosystems (Branchburg, NJ). The antibody against rat CYP1A1 was a generous gift from Dr. Y. Funae (Osaka City University, Osaka, Japan). The Amersham Pharmacia Biotech Co. supplied Hybond-C membranes for blotting. The Dual-Luciferase Reporter Assay System was a product of Promega® (Madison, WI). All other laboratory chemicals were of the highest available purity from commercial suppliers.

Preparation of primary hepatocyte cultures. The liver of a ddY male mouse (Sankyo Laboratories, Shizuoka, Japan) at 8 weeks of age was perfused with collagenase, and viable hepatocytes were isolated by means of Percoll isodensity centrifugation as described (Nemoto and Sakurai, 1995). Standard culture conditions were used as follows: the cells were dispersed in Waymouth MB 752/1 medium containing bovine serum albumin (2 g/l), insulin (0.5 mg/l), transferrin (0.5 mg/l), and selenium (0.5 μ g/l), and seeded in dishes at a density of 5×10^6 cells/10 ml/100-mm collagen-coated dish. The Waymouth medium did not contain phenol red, a pH indicator, to exclude the possibility of estrogen-like action. Depending on the presence of cell attachment factors, the hepatocytes anchor to the dishes within 3 h and subsequently form a monolayer. The culture dishes were maintained at 37 °C in a CO₂-humidified incubator. The medium was renewed 3 h after plating and then, after 24 h, the treatment with andrographolide and/or typical CYP1A inducers was performed immediately following the medium change, unless otherwise indicated. The inducers were dissolved in DMSO, which itself had no influence on enzyme activity at the routinely employed maximum concentration of 0.1% (Nemoto and Sakurai, 1992). The cells were harvested after another 24 h to prepare total RNA or microsomal proteins as described elsewhere (Jarukamjorn et al., 1999). These culture conditions were convenient for maintaining CYP1A1 and CYP1A2 expression (Nemoto and Sakurai, 1992) and the concentrations of added compounds were proved to be non-cytotoxic by the methods of the LDH-cytotoxic test and the normalized level of GAPDH.

Real-time RT-PCR. Mouse CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, AhR, and GAPDH mRNAs were quantified by real-time RT-PCR. Hepatic total RNA was reverse-transcribed and cDNA was amplified under the conditions recommended by the supplier (TaKaRa Biomedicals Inc., Shiga, Japan) of the TaKaRa® RT-PCR kit (Perfect Real Time) using specific TaqMan® Gene Expression Assays (Inventory) for *Cyp1a1* (assay ID, Mm00487218_m1), *Cyp1a2* (Mm00487224_m1), *Cyp1b1* (Mm00487229_m1), and AhR (Mm00478932_m1), as well as the SYBR® Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time) for GAPDH, in which the forward and reverse primers were 5'-TCC ACT CAC GGC AAA TTC AAC G-3' and 5'-TAG ACT CCA CGA CAT ACT CAG C-3', respectively. The specificity of amplification of GAPDH cDNA was confirmed by both polyacrylamide gel electrophoresis and the dissociation curve of the product. Real-time PCR was

performed using the ABI Prism® 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Branchburg, NJ) with ABI Prism® 7000 SDS software. The conditions of each PCR cycle were as follows: denaturation at 95 °C for 5 s, and annealing and extension at 60 °C for 1 min. The amplified products of CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, and AhR cDNAs were detected directly by monitoring the fluorescence of the reporter dye (FAM), for which an increase in fluorescence signal was detected only if the target sequence was complementary to the probe and amplified by the PCR. The amplified PCR products of GAPDH were monitored directly by measuring the increase in the signal of SYBR® Green that was bound to double-stranded DNA amplified by PCR.

Western blotting of microsomal proteins. The microsomal fraction was prepared by ultracentrifugation of the 10,000×g supernatant of monolayer-cultured hepatocytes at 104,000×g for 60 min at 4 °C (Nemoto et al., 1989). The microsomal protein concentration was determined as described using bovine serum albumin as a standard (Nemoto and Sakurai, 1992). Sixty micrograms of microsomal protein was resolved by 10% SDS-PAGE and then transferred to a Hybond-C membrane. The P450 species were detected using a rabbit polyclonal antibody against rat CYP1A1 protein that cross-reacted with CYP1A2, followed by a biotinylated goat anti-rabbit IgG and biotinylated horseradish H-avidin complex, and then visualized with 3,3'-diaminobenzidine and hydrogen peroxide.

Assessment of enzyme activity. EROD activity was determined by the method of Sakuma et al. (1999) with some modifications. Briefly, monolayer-cultured hepatocytes that have been cultivated for 2 days in a 60-mm collagen-coated dish were incubated with 10 µM ethoxresorufin, and then a 0.4-ml aliquot of the medium was sampled at specified times. Subsequently, the formation of resorufin was immediately analyzed by spectrofluorometry with excitation wavelength of 530 nm and emission wavelength of 585 nm.

Transient transfection and luciferase assay. One day before transfection, hepatocytes were isolated for plating in 35-mm collagen-coated dish at the same density as mentioned above. The hepatocytes were transfected with 1.8 µg of the reporter construct containing 3 tandem repeats of Dioxin Responsive Element (DRE) (Yao and Denison, 1992) in pGL3-promotor vector and 0.2 µg of pRL-SV40 vector (as an internal control for transfection) by using Trans Pass D1 Transfection Reagent (New England Biolabs, Ipswich, MA). Three hours after the transfection, the medium was renewed and the treatment with andrographolide and/or TCDD was started. The cells were harvested after incubation for further 24 h. Luciferase activity was measured by the supplier's recommendation.

Results

Different effects on expression of CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, and AhR mRNAs by andrographolide

The effects of andrographolide on the expression of CYP1A subfamily members and the mediating transcription factor were examined in monolayer-cultured hepatocytes. Andrographolide markedly induced the expression of CYP1A1 and CYP1A2 mRNAs in a concentration-dependent manner (Fig. 1A). Maximal induction of CYP1A1 expression was observed 1 day after the treatment, while that of CYP1A2 was observed later. B[a]A significantly increased the expression of CYP1A1,

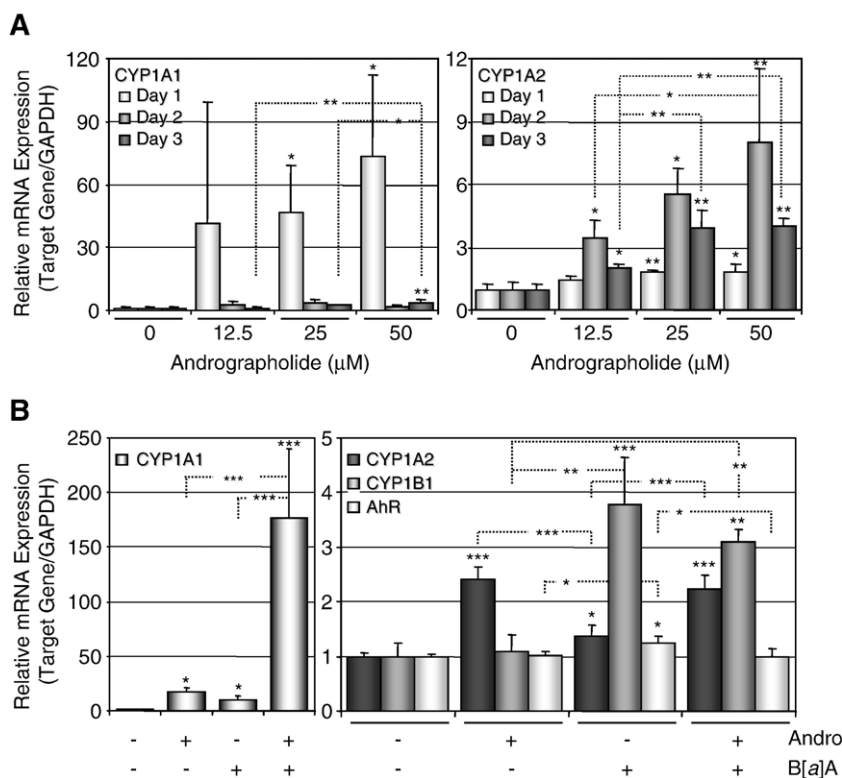


Fig. 1. Modulation of B[a]A-inducible expression of CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, and AhR mRNAs by andrographolide in monolayer-cultured hepatocytes. Hepatocytes at day 1 of cultivation were incubated with andrographolide (Andro) and/or B[a]A. Total RNA was prepared 24 h after the last treatment as described in Materials and methods. The mRNA expression of target genes was analyzed by real-time RT-PCR and the mRNA levels of the target gene were normalized to that of GAPDH. Each column represents the mean $\pm$ SD ($n=6$). Significance was examined using ANOVA and the Student–Newman–Keuls method (Sigmastat®); * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$. Panel A shows the expression profile of CYP1A1 and CYP1A2 mRNA by andrographolide. Andrographolide, at 12.5, 25, or 50 µM, was immediately added to hepatocytes after the medium was changed consecutively on the indicated days. Panel B shows the modified expression of B[a]A-induced CYP1 and AhR mRNAs by andrographolide. Concentrations of the added compounds were 50 µM for andrographolide and 13 µM for B[a]A.

CYP1A2, and CYP1B1 mRNAs (Fig. 1B), in accord with previous reports (Guengerich and Shimada, 1998; Iwanari et al., 2002; Whitlock, 1999). Interestingly, co-treatment with andrographolide and B[a]A synergistically enhanced the expression of CYP1A1 mRNA, while no such synergistic effect was observed on the expression of CYP1A2. On the other hand, andrographolide could not modify the expression levels of AhR or B[a]A-induced CYP1B1 mRNAs. These observations suggest for the first time that andrographolide, a major diterpenoid lactone in the extract of *A. paniculata*, has a potency to induce CYP1A subfamily.

Impact of resveratrol on the synergistic modification of B[a]A-inducible expression of CYP1A1 mRNA by andrographolide

To examine whether AhR influences the regulation of andrographolide-inducible CYP1A1 mRNA expression, resveratrol, an AhR antagonist (Chun et al., 1999), was employed under the same condition in which andrographolide enhanced the induction of CYP1A1 mRNA expression by an AhR ligand, B[a]A. Resveratrol blocked the synergistic action of the combined treatment of andrographolide and B[a]A, whereas the effect of single treatment with either andrographolide or B[a]A was not affected (Fig. 2). These results revealed that AhR participates in the synergistic effect of concomitant treatment with andrographolide and B[a]A on CYP1A1 mRNA expression, at least in part.

Activation of CYP1A1 mRNA and protein expression by andrographolide and typical CYP1A inducers

To evaluate the effects of andrographolide on the induction of CYP1A1 mRNA expression by typical CYP1A inducers, the relative mRNA expression of CYP1A1 compared to GAPDH in monolayer-cultured hepatocytes incubated with andrographolide and/or typical CYP1A inducers, including β -NF, TCDD, and B[a]A, was analyzed. Andrographolide significantly

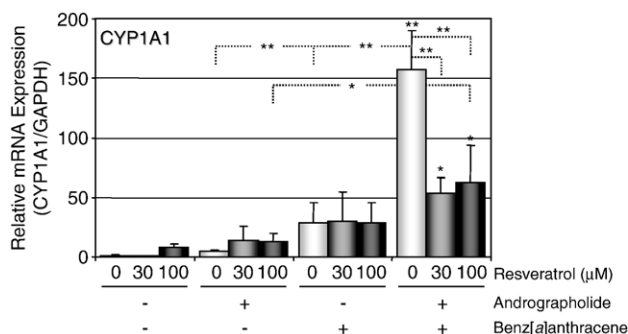


Fig. 2. Effect of resveratrol on the synergistic modification of B[a]A-inducible expression of CYP1A1 mRNA by andrographolide. Hepatocytes at day 1 of cultivation were incubated with 25 μ M andrographolide, 13 μ M B[a]A, and/or resveratrol (at the indicated concentrations). Total RNA was prepared 24 h later as described in Materials and methods. The mRNA expression of target genes was analyzed by real-time RT-PCR and the mRNA levels of the target gene were normalized to that of GAPDH. Each column represents the mean $\pm$ SD ($n=6$). Significance was examined using ANOVA and the Student–Newman–Keuls method (Sigmastat®); * $p<0.05$; ** $p<0.01$.

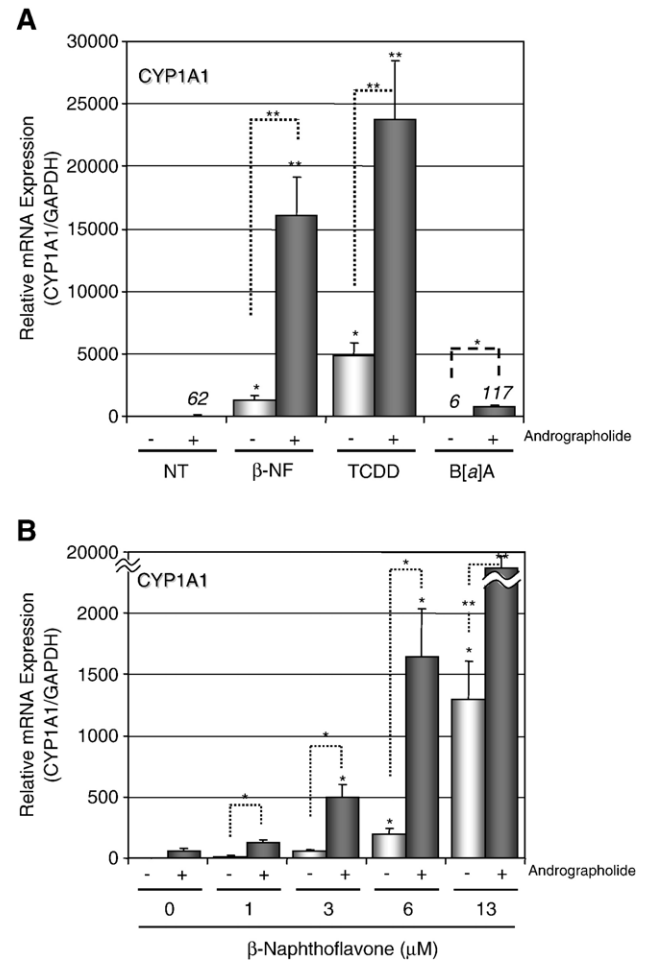


Fig. 3. Induction of CYP1A1 mRNA expression by andrographolide and typical CYP1A1 inducers. Hepatocytes at day 1 of cultivation were incubated with 25 μ M andrographolide, and/or typical CYP1A inducers. Total RNA was prepared 24 h later as described in Materials and methods. The mRNA expression of target genes was analyzed by real-time RT-PCR and the mRNA levels of the target gene were normalized to that of GAPDH. Each column represents the mean $\pm$ SD ($n=6$). Significance was examined using ANOVA and the Student–Newman–Keuls method (Sigmastat®); * $p<0.05$; ** $p<0.001$. Panel A shows synergistic induction of CYP1A1 expression by co-treatment of typical inducers and andrographolide. Numbers in the figure indicate expression compared with that of the control group (=1), unless otherwise indicated. Concentrations of typical CYP1A inducers were 13 μ M for β -NF and B[a]A, and 30 nM for TCDD. NT, non-treatment. Panel B shows the concentration-dependent induction of β -NF-induced CYP1A1 expression by andrographolide. The concentrations of β -NF were 1, 3, 6, or 13 μ M.

induced the expression of CYP1A1 mRNA (62-fold), although the level of induction was relatively low compared to that obtained using typical CYP1A inducers (Fig. 3A). Interestingly, the strong induction of CYP1A1 mRNA expression by β -NF, TCDD, and B[a]A was synergistically enhanced by concomitant addition of andrographolide. In addition, the induction of CYP1A1 mRNA expression showed a concentration-dependent pattern with either β -NF itself or co-treatment with β -NF plus andrographolide (Fig. 3B).

As shown in Fig. 4, robust induction of CYP1A1 proteins was observed in microsomes from hepatocytes treated with either andrographolide plus β -NF, TCDD, or andrographolide

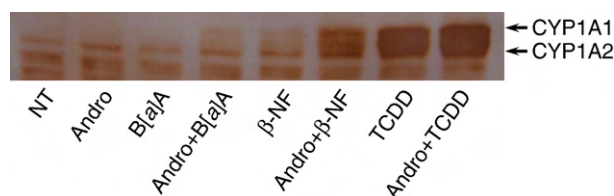


Fig. 4. Induction of CYP1A1 protein expression by andrographolide and typical CYP1A1 inducers. Hepatocytes at day 1 of cultivation were incubated with 25 μ M andrographolide (Andro), and/or typical CYP1A inducers. Microsomal protein was prepared 24 h later, and the expression of CYP1A1 and CYP1A2 proteins was analyzed as described in Materials and methods. In addition to CYP1A1 and CYP1A2, unidentified non-specific proteins beneath CYP1A were present in the preparations. The concentrations of the typical CYP1A inducers were 13 μ M for B[a]A and β -NF, and 30 nM for TCDD.

plus TCDD. Under the conditions used, it was hardly possible to detect the bands of CYP1A1 protein in extracts from cells treated with either andrographolide or andrographolide plus B[a]A in the figure. The induction and synergism of the induction of CYP1A1 protein expression by different treatments were in accord with the effects on CYP1A1 mRNA expression (Fig. 3A) when the analyses were performed using the optimal conditions for detection of these expression levels.

The activity of EROD, which was reported to be selective for the CYP1A1 enzyme in the liver of mice (Burke et al., 1994), was assessed to confirm the synergistic regulation of the expression of the CYP1A1 enzyme by andrographolide. In accord with the expression of CYP1A1 mRNA and protein, the EROD activity in the cells co-treated β -NF or TCDD plus andrographolide was significantly higher than that in the cells with single treatment with andrographolide, while that in the cells treated concomitantly with B[a]A and andrographolide was almost the same as that in cells treated with either agent alone (Fig. 5).

To examine the possibility of whether andrographolide induced CYP1A1 after AhR activation, the effect of andrographolide on DRE-mediated transcriptional activity was investi-

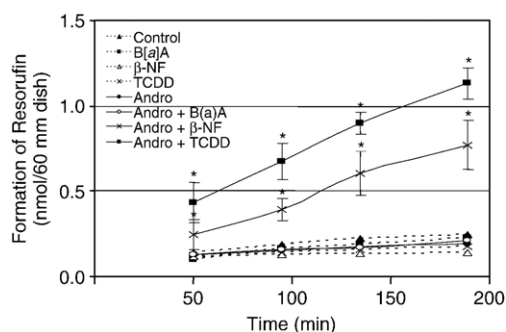


Fig. 5. Modulation of ethoxyresorufin *O*-deethylase activity profile by cotreatment with andrographolide and typical CYP1A inducers. Hepatocytes at day 1 of cultivation were incubated with 25 μ M andrographolide (Andro), and/or typical CYP1A inducers. Ethoxyresorufin (10 μ M) was added 24 h later, and an aliquot of the medium was sampled (at specified times) and subsequently subjected to spectrofluorometric measurement as described in Materials and methods. Each point represents the mean $\pm$ SD ($n=6-8$). Significance was examined using ANOVA and the Student–Newman–Keuls method (Sigma-stat[®]); * $p<0.001$. The concentrations of the typical CYP1A inducers were 13 μ M for B[a]A and β -NF, and 30 nM for TCDD.

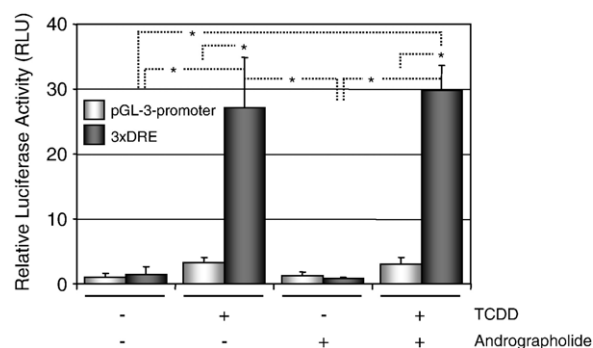


Fig. 6. Expression of DRE-mediated transcriptional activity by TCDD and andrographolide in primary culture hepatocytes. Hepatocytes at day 1 of cultivation were transfected with the reporter construct containing 3 tandem repeats of Dioxin Responsive Element (DRE) in pGL3-promoter vector or pGL3-promoter (empty promoter) and the cells were treated with 30 nM TCDD and/or 25 μ M andrographolide (Andro). Luciferase activity was measured after incubation for 24 h. Significance was examined using ANOVA and the Student–Newman–Keuls method (Sigma-stat[®]); * $p<0.01$. The figure represents the results from 5 independent experiments.

gated by a luciferase reporter assay. When TCDD was exposed to the cells transfected with the reporter construct containing the 3 $\times$ (DRE), the luciferase activity was elevated to a level of 9-fold higher than that of control cells transfected with empty vector, and was not enhanced by co-treatment with andrographolide (Fig. 6).

Discussion

The present investigations employing primary mouse hepatocytes as monolayer cultures revealed that andrographolide has a novel potency to induce the CYP1A subfamily. In addition, a robust increased expression of UGT1A6 mRNA, which belongs to a battery of AhR-mediated genes, by andrographolide was noted (our unpublished observations). Furthermore, a strong synergistic expression of CYP1A1 mRNA was observed in the presence of andrographolide after treatment with typical CYP1A1 inducers.

The observations that the synergistic induction of CYP1A1 expression by andrographolide was blocked by resveratrol suggests a possibility that AhR-mediated transcription activation pathway could be involved in the mechanism of induction of CYP1A1 mRNA by andrographolide. Furthermore, the increase of luciferase activity seen in TCDD-treated cells transfected with the 3 $\times$ (DRE), with no enhancement by co-treatment with andrographolide, supported this possibility. Therefore, andrographolide might influence the expression mechanism of CYP1A1 by enhanced efficiency of mRNA processing or inhibition of mRNA turnover.

However, resveratrol has several pharmacological actions, which suggests that the target point of the compound is involved in various signal pathways (Chun et al., 1999; Park et al., 2007; Le Corre et al., 2006); further investigations not restricted to the AhR pathway to reveal the mechanism of the synergism might be required. Furthermore, the mechanisms of transcriptional regulation of CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1 are not the same (Guengerich and Shimada, 1998; Iwanari et al., 2002),

which may have led to our observations that the andrographolide-inducibility of the expression of those isoenzymes differed: andrographolide extensively induced CYP1A1 expression, while it induced CYP1A2 less markedly, and did not induce CYP1B1 expression (Fig. 1).

The metabolism of a drug can be altered by another drug or a foreign chemical, and such interactions can often be clinically significant. P450 enzymes are involved in the metabolism of a plethora of xenobiotics and have been shown to be involved in numerous interactions between drugs and food, herbs, or other drugs (Delgoda and Westlake, 2004). Phytochemical-mediated modulation of P450 activities has been widely studied. For example, some kind of P450 species was reported to be altered by treatment with St. John's wort and a constituent that influenced the expression of the respective P450 isoforms was identified (Moore et al., 2000; Wentworth et al., 2000), but so far no constituent in St. John's wort has been shown to possess an inductive potency like that shown here for andrographolide. Compared with the typical CYP1A inducers, andrographolide, a single substance extracted from *A. paniculata*, interestingly demonstrated a marked synergistic modification of the induction of CYP1A1 mRNA expression. This is the first report on the potency of andrographolide to specifically induce CYP1A1 gene and a potentially useful compound for investigating new inductive pathways of CYP1A expression.

The expression of CYP1A1 markedly influences the activation of human-related chemical carcinogens (Kimura et al., 1986; Iwanari et al., 2002; Nemoto and Sakurai, 1992; Nemoto et al., 1989). We showed here that andrographolide significantly up-regulated the expression level of CYP1A1 mRNA, protein, and enzyme. The concentrations of andrographolide presently used (12.5–50 μ M) were roughly equivalent to those achieved in individuals ingesting *A. paniculata* (Panossian et al., 2000; Calabrese et al., 2000). The relevance of andrographolide utilized, compared to the andrographolide concentrations expected in subjects using *A. paniculata* as a medicinal herb was evident. Therefore, some risks associated with the use of this compound might be of interest and further evaluation of andrographolide analogs should be performed. Our findings suggest some possible advice for the rational administration and precautions for using the herbal medicine *A. paniculata*.

Acknowledgments

This work was partly supported by the JSPS-NRCT Core University Program on Natural Medicine in Pharmaceutical Sciences, Grants-in-Aid from the Japanese Ministry of Education, Culture, Sport, and Science, the Smoking Research Foundation, the Tokyo Biochemical Research Foundation (TBRF), Japan, as well as the Thai Research Fund (TRF), Thailand.

References

Akbarsha, M.A., Murugaian, P., 2000. Aspects of the male reproductive toxicity/ male antifertility property of andrographolide in albino rats: effect on the testis and the cauda epididymidal spermatozoa. *Phytother. Res.* 14, 432–435.

Brake, P.B., Arai, M., As-Sanie, S., Jefcoate, C.R., Widmaier, E.P., 1999. Development expression and regulation of adrenocortical cytochrome P4501B1 in the rat. *Endocrinology* 140, 1672–1680.

Burke, M.D., Thompson, S., Weaver, R.J., Wolf, C.R., Mayer, R.T., 1994. Cytochrome P450 specificities of alkoxyresorufin *O*-dealkylation in human and rat liver. *Biochem. Pharmacol.* 30, 923–936.

Caceres, D.D., Hancke, J.L., Burgos, R.A., Wikman, G.K., 1997. Prevention of common colds with *Andrographis paniculata* dried extract: a pilot double-blind trial. *Phytomedicine* 4, 101–104.

Calabrese, C., Merman, S.H., Babish, J.G., Ma, X., Shinto, L., Dorr, M., Wells, K., Wenner, C.A., Standish, L.J., 2000. A phase I trial of andrographolide in HIV positive patients and normal volunteers. *Phytother. Res.* 14, 333–338.

Chiou, W., Lin, J., Chen, C., 1998. Andrographolide suppressed the expression of inducible nitric oxide synthase in macrophages and restored the vasoconstriction in rat aorta treated with lipopolysaccharide. *Br. J. Pharmacol.* 125, 327–334.

Chiou, W., Chen, C., Lin, J., 2000. Mechanism of suppression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in RAW264.7 cells by andrographolide. *Br. J. Pharmacol.* 129, 1553–1560.

Chun, Y.J., Kim, M.Y., Guengerich, F.P., 1999. Resveratrol is a selective human cytochrome P450 1A1 inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 262, 20–24.

Delgoda, R., Westlake, A.C., 2004. Herbal interactions involving cytochrome P450 enzymes: a mini review. *Toxicol. Rev.* 23, 239–249.

Deng, W.L., 1978. Outline of current clinical and pharmacological research on *Andrographis paniculata* in China. *News. Chin. Herbal Med.* 10, 27–31.

Guengerich, F.P., 2000. Metabolism of chemical carcinogens. *Carcinogenesis* 21, 345–351.

Guengerich, F.P., Shimada, T., 1998. Activation of procarcinogens by human cytochrome P450 enzymes. *Mutat. Res.* 400, 201–213.

Handa, S.S., Sharma, A., 1990a. Hepatoprotective activity of andrographolide from *Andrographis paniculata* against carbon tetrachloride. *Indian J. Med. Res., Sect. B Biomed. Res. Other than Infect. Dis.* 92, 276–283.

Handa, S.S., Sharma, A., 1990b. Hepatoprotective activity of andrographolide against galactosamine and paracetamol intoxication in rats. *Indian J. Med. Res., Sect. B Biomed. Res. Other than Infect. Dis.* 92, 284–292.

Iruretagoneya, M.I., Tobar, J.A., Gonzalez, P.A., Sepulveda, S.E., Figueroa, C.A., Burgos, R.A., Hancke, J.L., Kalergis, A.M., 2005. Andrographolide interferes with T cell activation and reduces experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 312, 366–372.

Iwanari, M., Nakajima, M., Kizu, R., Hayakawa, K., Yokoi, T., 2002. Induction of CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1 mRNAs by nitropolycyclic aromatic hydrocarbons in various human tissue-derived cells: chemical-, cytochrome P450 isoforms-, and cell-specific differences. *Arch. Toxicol.* 76, 287–298.

Jarukamjorn, K., Sakuma, T., Miyaura, J., Nemoto, N., 1999. Different regulation of the expression of mouse hepatic cytochrome P450 2B enzymes by glucocorticoid and phenobarbital. *Arch. Biochem. Biophys.* 369, 89–99.

Jarukamjorn, K., Don-in, K., Makejaruskul, C., Laha, T., Daodee, S., Pearaksa, P., Sripanidkulchai, B., 2006. Impact of *Andrographis paniculata* crude extract on mouse hepatic cytochrome P450 enzymes. *J. Ethnopharmacol.* 105, 464–467.

Kapil, A., Koul, I.B., Banerjee, S.K., Gupta, D., 1993. Antihepatotoxic effects of major constituents of *Andrographis paniculata*. *Biochem. Pharmacol.* 46, 182–185.

Kimura, S., Gonzalez, F.J., Nebert, D.W., 1986. Tissue-specific expression of the mouse dioxin-inducible P₁450 and P₃450 genes: differential transcriptional activation and mRNA stability in liver and extrahepatic tissues. *Mol. Cell. Biol.* 6, 1471–1477.

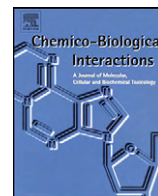
Kumar, R.A., Sridevi, K., Kumar, N.V., Nanduri, S., Rajagopal, S., 2004. Anticancer and immunostimulatory compounds from *Andrographis paniculata*. *J. Ethnopharmacol.* 92, 291–295.

Le Corre, L., Chalabi, N., Delort, L., Bignon, Y.J., Bernard-Gallon, D.J., 2006. Differential expression of genes induced by resveratrol in human breast cancer cell lines. *Nutr. Cancer* 56, 193–203.

Madav, H.C., Tripathi, T., Mishra, S.K., 1995. Analgesic, antipyretic, and antiulcerogenic effects of andrographolide. *Indian J. Pharm. Sci.* 57, 121–125.

Moore, L.B., Goodwin, B., Jones, S.A., Wisely, G.B., Serabjit-Singh, C.J., Wilson, T.M., Collins, J.L., Kliever, S.A., 2000. St. John's wort induced

- hepatic drug metabolism through activation of pregnane X receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 7500–7502.
- Nanduri, A., Nyavanandi, V.K., Thynuguntla, S.S.R., Kasu, A., Pallerla, M.K., Ram, P.S., Rajagopal, S., Kumar, R.A., Ramanujam, R., Babu, J.M., Vyas, K., Devi, A.S., Reddy, G.O., Akella, V., 2004. Synthesis and structure-activity relationships of andrographolide analogues as novel cytotoxic agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14, 4711–4717.
- Nemoto, N., Sakurai, J., 1992. Differences in regulation of gene expression between Cyp1a-1 and Cyp1a-2 in adult mouse hepatocytes in primary culture. *Carcinogenesis* 13, 2249–2254.
- Nemoto, N., 1995. Glucocorticoid and sex hormones as activating or modulating factors for expression of Cyp2b-9 and Cyp2b-10 in the mouse liver and hepatocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 319, 286–292.
- Nemoto, N., Sakurai, J., Tazawa, A., Ishikawa, T., 1989. Proline-dependent expression of aryl hydrocarbon hydroxylase in C57BL/6 mouse hepatocytes in primary culture. *Cancer Res.* 49, 5863–5869.
- Panossian, A., Hovhannisyann, A., Mamikonyan, G., Abrahamian, H., Hambardzumyan, E., Gabrielian, E., Goukasova, G., Wikman, G., Wagner, H., 2000. Pharmacokinetic and oral bioavailability of andrographolide from *Andrographis paniculata* fixed combination Kan Jang in rats and human. *Phytomedicine* 7, 351–364.
- Park, C.E., Kim, M.J., Lee, J.H., Min, B.I., Bae, H., Choe, W., Kim, S.S., Ha, J., 2007. Resveratrol stimulates glucose transport in C2C12 myotubes by activating AMP-activated protein kinase. *Exp. Mol. Med.* 39, 222–229.
- Puri, A., Saxena, R., Saxena, R.P., Saxena, K.C., Srivastava, V., Tandon, J.S., 1993. Immunostimulant agents from *Andrographis paniculata*. *J. Nat. Prod.* 56, 995–999.
- Ryu, D.Y., Hodgson, E., 1999. Constitutive expression and induction of CYP1B1 mRNA in the mouse. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 13, 249–251.
- Sakuma, T., Ohtake, M., Katsurayama, Y., Jarukamjorn, K., Nemoto, N., 1999. Induction of CYP1A2 by phenobarbital in the livers of aryl hydrocarbon-responsive and -nonresponsive mice. *Drug Metab. Dispos.* 27, 379–384.
- Savas, U., Bhattacharyya, K.K., Christou, M., Alexander, D.L., Jecoate, C.R., 1994. Mouse cytochrome P-450EF, representative of a new 1B subfamily of cytochrome P450s; cloning, sequence determination and tissue expression. *J. Biol. Chem.* 269, 14905–14911.
- Shen, Y.C., Chen, C.F., Chiou, W.F., 2000. Suppression of rat neutrophil reactive oxygen species production and adhesion by the diterpenoid lactone andrographolide. *Planta Med.* 66, 314–317.
- Shen, Y.C., Chen, C.F., Chiou, W.F., 2002. Andrographolide prevents oxygen radical production by human neutrophils: possible mechanism(s) involved in its anti-inflammatory effect. *Br. J. Pharmacol.* 135, 399–406.
- Wang, T., Liu, B., Zhang, W., Wilson, B., Hong, J.S., 2004. Andrographolide reduces inflammation-mediated dopaminergic neurodegeneration in mesencephalic neuronglia cultures by inhibiting microglial activation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 308, 975–983.
- Wentworth, J.M., Agostini, M., Love, J., Schwabe, J.W., Chatterjee, V.K., 2000. St. John's wort, a herbal antidepressant, activates the steroid receptor. *J. Endocrinol.* 166, R11–R16.
- Whitlock, J.P., 1999. Induction of cytochrome P4501A1. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 103–125.
- Yao, E.F., Denison, M.S., 1992. DNA sequence determinants for binding of transformed Ah receptor to a dioxin-responsive enhancer. *Biochemistry* 31, 5060–5067.



Synergistic increases of metabolism and oxidation–reduction genes on their expression after combined treatment with a CYP1A inducer and andrographolide

Waranya Chatuphonprasert^{a,b}, Kanokwan Jarukamjorn^b, Sachiko Kondo^a, Nobuo Nemoto^{a,*}

^a Department of Toxicology, Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences, University of Toyama, 2630 Sugitani, Toyama 930-0194, Japan

^b Academic Office for Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 July 2009

Received in revised form 1 September 2009

Accepted 1 September 2009

Available online 6 September 2009

Keywords:

Andrographolide
β-Naphthoflavone
CYP1A1
CYP1B1
Microarray

ABSTRACT

We previously reported that andrographolide greatly enhanced the expression of CYP1A1. Since andrographolide is a major constituent of *Andrographis paniculata*, which has been employed for centuries in Asia and Europe as a folk remedy, we further analyzed genes whose expression was modified by andrographolide using primary-cultured mouse hepatocytes in a microarray assay. With the threshold for modification set at 2-fold, andrographolide up-regulated 18 genes among 28,853 genes, most of them related to metabolism/oxidation/reduction. Meanwhile, 5 genes, related to protein binding or calcium ion binding, were down-regulated. A combination of β-naphthoflavone (β-NF), a CYP1A inducer, and andrographolide modified the expression of 45 genes (27 up-regulated and 18 down-regulated), although β-NF single treatment up-regulated 4 genes. The affected genes were again mostly related to metabolism and oxidation–reduction. Among P450 isoforms, andrographolide by itself induced CYP1A1, CYP2A4, CYP2B9, and CYP2B10 expression. Synergistic expression of CYP1A1 and CYP1B1 mRNA was confirmed by quantitative RT-PCR. These observations suggest that drug interaction and risk assessment with the use of andrographolide or *A. paniculata* should be elucidated.

© 2009 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Andrographolide (3-[2-[decahydro-6-hydroxy-5-(hydroxymethyl)-5, 8α-dimethyl-2-methylene-1-naphthalenyl]ethylidene] dihydro-4-hydroxy-2(3H)-furanone) is a major diterpenoid constituent of the plant *Andrographis paniculata* Nees (Family Acanthaceae), which has been used for centuries in Asia and Europe to treat a wide spectrum of ailments or as a health supplement. Andrographolide has been reported to show hepatoprotective activity in mice against carbon tetrachloride and paracetamol intoxication [1], and to have several pharmacological effects, including inhibition of iNOS expression [2], Mac-1 expression, and ROS production [3], anticancer activity [4], and a protective effect against cytotoxicity [5]. Presently, andrographolide has been tested in phase I clinical trials for HIV [6]. As a negative effect, *A. paniculata* extract or andrographolide showed toxicity in reproductive tissue by arresting spermatogenesis [7]. This compound is readily available in several health supplements. Therefore, it is necessary to carefully evaluate its effects.

Previously, we reported that a crude extract of *A. paniculata* might induce mouse hepatic cytochrome P450 isoforms CYP1A1 and CYP2B via significant increases in ethoxyresorufin O-dealkylase- and pentoxyresorufin O-dealkylase activities [8]. Moreover, andrographolide significantly induced the expression of CYP1A1 mRNA in a concentration-dependent manner in mouse hepatocytes in primary culture, as did typical CYP1A inducers. Interestingly, andrographolide plus a typical CYP1A inducer synergistically induced CYP1A1 expression, and the synergism was blocked by an arylhydrocarbon receptor (AhR)-antagonist, resveratrol [9]. Very recently, Pekthong et al. [10] reported the effect of *A. paniculata* extract or andrographolide on the expression of a limited number of cytochrome P450s *in vivo* in rat liver and *in vitro* in human and rat hepatocyte cultures, indicating that the effect was diverse. For example, the treatment decreased expression of human CYP2C9 and CYP3A4 or rat CYP2C11 and CYP3A1, while CYP1A2 expression was enhanced in rats, but suppressed in humans. Therefore, it is of interest to determine how andrographolide influences the expression of analogous or other genes in mouse hepatocytes, especially the genes of metabolizing enzymes. The results of such an inquiry might provide invaluable guidelines for administration and precautions for use of this compound or herbal plant.

To better understand the effect of andrographolide on gene expression including that of CYPs, we conducted a microarray analysis to screen the effects of andrographolide and/or β-naphthoflavone (β-NF) on the transcription of mouse genes. The

Abbreviations: β-NF, β-naphthoflavone; AhR, arylhydrocarbon receptor; CYP, cytochrome P450.

* Corresponding author. Tel.: +81 76 434 7520; fax: +81 76 434 7520.

E-mail address: nnemoto@pha.u-toyama.ac.jp (N. Nemoto).

Table 1
TaqMan® Gene Expression Assays, TaqMan® MGB or TAMRA Gene Expression Detection Kits, and SYBR® Green PCR Primers.

Genes	TaqMan® Gene Expression Assays (Inventoried)	TaqMan® MGB or TAMRA Gene Expression Detection Kit			SYBR® Green PCR Primers	
		Forward primer	Reverse primer	probe	Forward primer	Reverse primer
<i>Cyp1a2</i>	Mm00487224.m1					
<i>Cyp1b1</i>	Mm00487229.m1					
<i>Cyp2b10</i>	Mm00456591.m1					
<i>Cyp3a11</i>	Mm00731567.m1					
<i>Ugt1a6</i>	Mm01967851.s1					
<i>Cyp1a1</i>		5'-GAC ATT TGA GAA GGG CCA CAT C-3'	5'-CCA AAG AGG TCC AAA ACA ATC G-3'	5'-FAM-CGA GAA TGC CAA TGT CCA GCT GTC A-TAMRA-3'		
<i>Cyp2b9</i>		5'-CAC AGA TGA CCA GTT CCT TCA TCT-3'	5'-GTT CCT GCT GTT TTT TGA CAA TTT-3'	5'-FAM-CTC TGG TCA GAT GTT TGA G-MGB -3'		
<i>Cyp3a41</i>		5'-GCC AAA GGG ATT TTA AGA GTT GTT GAC T-3'	5'-GGT GTC AGG AAT GGA AAA AGTA CA-3'	5'-FAM-ATC CTT TGG TCT TCT CAG-MGB-3'		
<i>Cyp2a4</i>					5'-GGG CAG GTC TAT GAG ATG TTT TCT TC-3'	5'-AAA GTC CTC CAG GCC TTG CA-3'
<i>GAPDH</i>					5'-TCC ACT CAC GGC AAA TTC AAC G-3'	5'-TAG ACT CCA CGA CAT ACT CAG C-3'

results indicate that andrographolide induces the expression of several isoforms of CYP and has a synergistic effect on CYP1B1 as well as CYP1A1 in combination with β -NF.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Materials for culturing hepatocytes were purchased from Gibco® Invitrogen Cell Culture (Carlsbad, CA), BioWhittaker™ Cambrex Bio-Sciences (Walkerville, MD), and Wako Pure Chemical (Osaka, Japan). Percoll and collagenase (Type I) were products of GE Healthcare Bio-Sciences AB (Uppsala) and Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO), respectively. Andrographolide was supplied by Wako Pure Chemical (Tokyo, Japan). β -NF was obtained from Sigma Chemical Co. ReverTraAce was a product of Toyobo Co., Ltd. (Osaka, Japan). SYBR® Green I and G-Taq Labo Pass™ were products of Cambrex Bio Science Rockland, Inc. (ME, USA) and Hokkaido System Science Co., Ltd. (Hokkaido, Japan), respectively. The TaqMan® Gene Expression Assays were products of Applied Biosystems (Branchburg, NJ). All other laboratory chemicals were of the highest available purity from commercial suppliers.

2.2. Preparation of primary cultures of mouse hepatocytes and treatment

The liver of C57BL/6 male mice (Sankyo Laboratories, Shizuoka, Japan) at 7 weeks of age was perfused with collagenase, and viable hepatocytes were isolated by Percoll isodensity centrifugation as described [11]. Standard culture conditions were as follows: the cells were dispersed in Waymouth MB752/1 medium containing bovine serum albumin (2 g/l), insulin (0.5 mg/l), transferrin (0.5 mg/l), and selenium (0.5 μ g/l), and seeded at a density of 5×10^5 cells/1.5 ml/35 mm collagen-coated dish. The Waymouth medium did not contain phenol red, a pH indicator, to exclude the possibility of estrogen-like action. Depending on the presence of cell attachment factors, the hepatocytes anchored to the dishes within 3 h and subsequently formed a monolayer. The culture dishes were maintained at 37 °C in a CO₂-humidified incubator. The medium was renewed 3 h after plating and then, 24 h later, 25 μ M andrographolide and/or 10 μ M β -NF was added after a change of medium. Measurements of lactate dehydrogenase activity in medium indicated it to be non toxic at these concentrations. Total RNA was prepared from the cells 24 h later as described [12].

2.3. Microarray analysis

Total RNA was re-purified using a FastPure™ RNA kit (TaKaRa, Shiga, Japan), and its concentration and quality were examined using a NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, DE, USA) and Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, CA, USA). RNA samples were submitted to Bio Matrix Research, Inc. (Chiba, Japan) for analysis using a GeneChip® Mouse Exon 1.0 ST array (Affymetrix Technologies, Tokyo, Japan) according to the standard protocol. The microarray data was analyzed using GeneSpring GX10 software (Agilent Technologies).

2.4. Quantitative real time RT-PCR

The expression of mouse CYPs and GAPDH mRNAs was quantified by real-time RT-PCR. cDNAs were synthesized by ReverTraAce and G-Taq Labo Pass™ under the conditions recommended by the suppliers (Applied Biosystems, Branchburg, NJ) using specific TaqMan® Gene Expression Assays (Inventoried) for *Cyp1a2*, *Cyp1b1*, *Cyp2b10*, *Cyp3a11*, *Ugt1a6*, and specific TaqMan® MGB or TAMRA Gene Expression Detection kits for *Cyp1a1*, *Cyp2b9*, and *Cyp3a41*, or SYBR® Green I for *Cyp2a4* and GAPDH (Table 1). Real-time PCR was performed using the ABI Prism® 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) with ABI Prism® 7000 SDS software. The PCR conditions were as follows: denaturation at 95 °C for 15 s, and annealing and extension at 60 °C for 1 min. The amplified products of CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2B9, CYP2B10, CYP3A11, CYP3A41, and UGT1A6 were detected directly by monitoring the fluorescence of the reporter dye (FAM), for which an increase in fluorescence signal was detected only if the target sequence was complementary to the probe and amplified by the PCR. The amplified PCR products of CYP2A4 and GAPDH were monitored directly by measuring the increase in SYBR® Green that was bound to double-stranded DNA amplified by PCR.

3. Results

3.1. Analysis of gene expression by andrographolide and/or β -NF

The present microarray system was useful for the analysis of 28,853 genes. Treatment with andrographolide up-regulated 18 genes, while it down-regulated 5 genes, if the change in expression was taken as more than two-fold (Fig. 1A). Almost all the up-

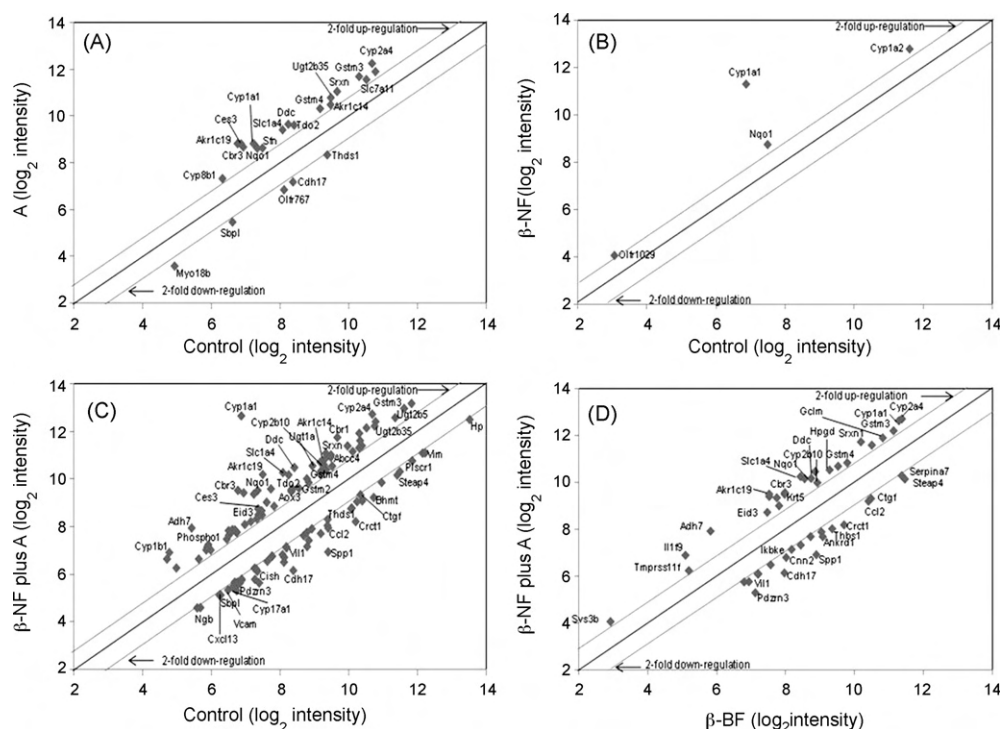


Fig. 1. Effect of β -NF and/or andrographolide on expression of genes in mouse hepatocytes in primary culture after treatment with 0.2% DMSO (control), 10 μ M β -NF, and 25 μ M andrographolide (A), and co-treatment (β -NF plus A). The lines indicate a change in gene expression compared to the control of higher or lower than 2-fold. Abbreviations in the figure: Cyp, cytochrome P450; Gstm, Glutathione S-transferase (GST) μ class; Ugt, UDP glucuronyltransferase; Nqo1, NAD(P)H dehydrogenase quinone; Olfr1029, olfactory receptor 1029; Cbr3, carbonyl reductase 3; Adh7, alcohol dehydrogenase 7; Sbp1, spermine binding protein-like; Ddc, dopa decarboxylase; Ccl, chemokine (C-C motif) ligand; Cxcl, chemokine (C-X-C motif) ligand; Eid3, EP300 interacting inhibitor of differentiation 3; Aox3, aldehyde oxidase 3; Akr, aldo-keto reductase; Vim, vimentin; Thbs1, thrombospondin 1; Vcam1, vascular cell adhesion molecule 1; Cdh17, cadherin 17; Ngb, neuroglobin; Steap4, STEAP family member 4; Spp1, secreted phosphoprotein 1; Pdzrn3, PDZ domain containing RING finger 3; Hp, haptoglobin; Vill1, villin 1; Ctgf, connective tissue growth factor; Cish, cytokine inducible SH2-containing protein; Bhmt, betaine-homocysteine methyltransferase; Plscr1, phospholipid scramblase 1.

regulated genes were related to metabolism/oxidation/reduction such as *Cyp1a1*, *Cyp2a4*, *Gstm3*, *Gstm4*, *Ugt2b35*, and *Nqo1*. The down-regulated genes were protein binding or calcium ion binding-related genes (*Thbs1*, *Cdh17*, and *Sbp1*). β -NF up-regulated 4 genes, *Cyp1a1*, *Cyp1a2*, *Nqo1*, and *Olfr1029* (Fig. 1B). Interestingly, the combination of β -NF and andrographolide had a greater impact (Fig. 1C). The number of modified genes was 118, with 78 up-regulated and 40 down-regulated. Correspondingly, most of the up-regulated genes were involved in metabolism/oxidation/reduction such as *Cyps*, *Gstm*, *Ddc*, *Cbr*, *Aox3*, *Ugt*, and *Akr*, while the down-regulated genes belonged to several groups including oxidation/reduction/ion binding-related genes, i.e., *Plscr1*, *Steap4*, *Bhmt*, *Vill1*, *Pdzrn3*, *Ngb*, and *Cyp17a1*, protein binding-related genes, i.e., *Vim*, *Cish*, *Hp*, *Ctgf*, *Cdh17*, and *Vcam1*, and chemokine/cytokine-related genes, i.e., *Cxcl13*, *Ccl2*, and *Spp1*. Comparisons of gene expression between the combined treatment with β -NF and andrographolide and the single treatment with β -NF (Fig. 1D), related that 27 genes were up-regulated whereas 18 genes were down-regulated by the combined treatment. Again, most genes up-regulated by the combined treatment were involved in metabolism and oxidation–reduction, such as *Cyp1a1*, *Cyp2a4*, *Adh7*, *Ddc*, *Gstm*, and *Eid3*, while the down-regulated genes were similar to those down-regulated by the combined treatment in comparison with the control.

Table 2 summarizes the metabolizing enzyme-related genes, the expression of which increased at least two-fold after either treatment. The number of modified genes was 14 for the drug metabolism group and 13 for the oxidoreductase group. *Cyp1a1* was the highest up-regulated gene among increased cytochrome P450s, like *Cyp1a2*, *Cyp1b1*, *Cyp2a4/Cyp2a5*, *Cyp2b9*, *Cyp2b10*, and *Cyp8b1*. In addition, *Ugt1a*, *Ugt2b5*, and *Ugt2b35*, members of UDP glu-

curonyltransferase, were up-regulated. Glutathione S-transferase (GST) μ class, *Gstm2*, *Gstm3*, and *Gstm4*, were up-regulated. For these genes, the combined treatment with β -NF and andrographolide had more of an effect than the single treatments. Among oxidoreductase genes, *Adh7*, *Cbr3*, and *Nqo1* were highly induced by the combined treatment.

3.2. Quantitative real-time RT-PCR analysis

To confirm the expression of the cytochrome P450 family 1, 2, and 3, and UGT1A6, quantitative real-time RT-PCR was carried out (Fig. 2). Changing ratios of the expression were generally higher among the results of RT-PCR than those of microarray. Significant difference ($p < 0.05$) between the combined and single treatments was clear in the expression of CYP1A1, CYP1B1, CYP2A4, CYP3A11, CYP3A41, and UGT1A6 mRNAs. In the case of CYP1A1 and CYP1B1, the combined treatment had a synergistic effect, whereas the expression of CYP3A11 and CYP3A41 was higher on combined treatment but not single treatment. CYP2A4, CYP2B9, and CYP2B10 were significantly induced by andrographolide, but the combined treatment with β -NF further increased the expression of CYP2A4.

3.3. Effects of andrographolide on anti-oxidation and immune-responsive genes

A. paniculata extract has long been employed as a folk remedy or health supplement. The genes involved in responsible immune-responses or anti-oxidation, which were up-regulated or down-regulated more than 20% by andrographolide treatment, are listed in Table 3. The expression of 6 anti-oxidation-related genes was found to be slightly increased, whereas all the immune

Table 2
Effect of β -NF and/or andrographolide on metabolizing enzymes.

Accession No.	Gene	Gene symbol	Fold up-regulation*		
			β-NF	A	β-NF + A
Drug metabolism					
U03283	Cytochrome P450, family 1, subfamily b, polypeptide 1	<i>Cyp1b1</i>	1.92	1.07	3.80
BC044927	Glutathione S-transferase, mu 3	<i>Gstm3</i>	1.44	2.65	3.05
J04696	Glutathione S-transferase, mu 2	<i>Gstm2</i>	1.24	1.88	2.21
BC030444	Glutathione S-transferase, mu 4	<i>Gstm4</i>	1.29	2.25	2.89
BC003240	P450 (cytochrome) oxidoreductase	<i>Por</i>	1.35	1.23	2.01
BC011233	Cytochrome P450, family 2, subfamily a, polypeptide 4, 5	<i>Cyp2a4/Cyp2a5</i>	1.63	3.01	4.11
BC028262	UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B5	<i>Ugt2b5</i>	1.13	1.87	2.01
BC113789	UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B35	<i>Ugt2b35</i>	1.44	2.50	2.87
BC026561	UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A	<i>Ugt1a</i>	1.67	1.35	2.06
M21855	Cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 9	<i>Cyp2b9</i>	1.13	1.45	2.00
BC060973	Cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 10	<i>Cyp2b10</i>	1.11	1.68	2.33
Y00071	Cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 1	<i>Cyp1a1</i>	21.52	3.90	54.59
BC018298	Cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 2	<i>Cyp1a2</i>	2.25	1.22	2.54
BC010973	Cytochrome P450, family 8, subfamily b, polypeptide 1	<i>Cyp8b1</i>	1.25	2.02	1.61
Oxidoreductase					
AF172276	Aldehyde oxidase 3	<i>Aox3</i>	1.29	1.77	2.09
BC013482	Aldo-keto reductase family 1, member C14	<i>Akr1c14</i>	1.35	2.05	2.70
U31966	Carbonyl reductase 1	<i>Cbr1</i>	1.26	1.78	2.05
BC028763	Carbonyl reductase 3	<i>Cbr3</i>	1.69	4.21	6.71
BC049957	Sulfiredoxin 1 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	<i>Srxn1</i>	1.45	2.64	4.22
U95053	Glutamate-cysteine ligase, modifier subunit	<i>Gclm</i>	1.14	1.68	2.43
AF331802	Alcohol dehydrogenase 7 (class IV), mu or sigma	<i>Adh7</i>	1.32	1.50	5.71
BC018390	Tryptophan 2,3-dioxygenase	<i>Tdo2</i>	1.24	2.68	3.79
BC067055	N-terminal EF-hand calcium binding protein 1	<i>Necab1</i>	1.24	1.86	2.25
BC014865	Leukotriene B4 12-hydroxydehydrogenase	<i>Ltb4dh</i>	1.40	1.92	2.91
BC006617	Biliverdin reductase B (flavin reductase (NADPH))	<i>Blvrb</i>	1.24	1.74	2.21
BC021157	Hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15 (NAD)	<i>Hpgd</i>	1.27	1.57	3.05
BC004579	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	<i>Nqo1</i>	2.39	2.24	6.46

* Hepatocytes were treated with either 10 μ M β -NF (β -NF), 25 μ M andrographolide (A), or co-treatment (β -NF + A) for 24 h. Expression of the respective genes was shown as fold up-regulation, compared with that of 0.2% DMSO treated.

responsive genes listed were suppressed by andrographolide treatment.

4. Discussion

The present study revealed that andrographolide has the potential to increase the expression of several genes involved in drug metabolism and oxidation in mouse hepatocytes in primary culture. Furthermore, in combination with a typical CYP1A inducer, β -NF, it had a synergistic effect on CYP1A1 and CYP1B1 expression.

We previously reported that the expression of CYP1A1 and CYP2B mRNA was enhanced by andrographolide or a crude extract of *A. paniculata* in mouse liver or hepatocytes in primary culture and the enhancement reflected the responsible marker enzyme activity [8,9]. The present study confirmed this and suggested that andrographolide influenced the expression of many genes. Singh et al. [13] reported that high dose of *A. paniculata* extract significantly increased the expression of catalase, glutathione reductase, and glutathione peroxidase in mouse liver. Moreover, an aqueous extract of *A. paniculata* significantly elevated catalase and glutathione S-transferase levels in mice [14]. In the present study, we observed a tendency for the expression of catalase, glutathione reductase, glutathione peroxidase 2, and glutathione S-transferase to be increased by andrographolide, suggesting its anti-oxidation activity. One reason for the slight increase might be that the RNA samples were prepared 24 h after the addition of andrographolide.

Although Puri et al. [15] reported that *A. paniculata* extract stimulated the immune system, we did not observe elevated levels of immune-responsive genes in the present investigation. However, we cannot conclude that andrographolide did not activate the immune system, since we analyzed their expression in mouse hepatocytes, not in immune-responsive tissue.

Although single treatment with either β -NF or andrographolide changed the expression of small numbers of genes, combined treatment affected many genes. Most of the up-regulated genes were involved in oxidation or reduction related to the phase I and II enzymes of drug metabolism. Although andrographolide by itself influenced the expression of these genes, synergism with β -NF was found only in limited number of genes, namely, confirmative experiments with real-time RT-PCR revealed that the synergistic expression of CYP1B1 as well as CYP1A1 mRNA was remarkable. These two CYP isoforms do not constitutively but inducibly express in the liver. The induction of both is mediated by the AhR pathway, suggesting that andrographolide might act on this pathway. However, although AhR-mediated activation is also involved in CYP1A2 and UGT1A6 mRNA expression, andrographolide did not enhance the expression. Therefore, the synergistic expression of CYP1A1 and CYP1B1 was preferentially influenced by andrographolide. A proposed mechanism of the synergism may be related to the anti-oxidation activity of andrographolide, because down-regulated expression of CYP1A1 by oxidative stress has been reported [16–18]. Although expression of anti-oxidation-related genes was not so much affected by andrographolide in the present microarray observation, the activity was strongly suggested *in vivo* and *in vitro* experiments [19,20]. Further evidence that the genes related to anti-oxidation would be clearly up-regulated in the present culture condition will require detailed investigation by measuring them at several time points after addition of andrographolide, since the present protocol observed the expression only at 24 h.

The potency of *A. paniculata* extract or andrographolide for expression of CYPs *in vivo* and *in vitro* were investigated recently by Pekthong et al. [10], with both suppressive and promotive effects demonstrated, depending on the CYPs isoform, even in a hepatocyte culture system. It is impossible to compare our

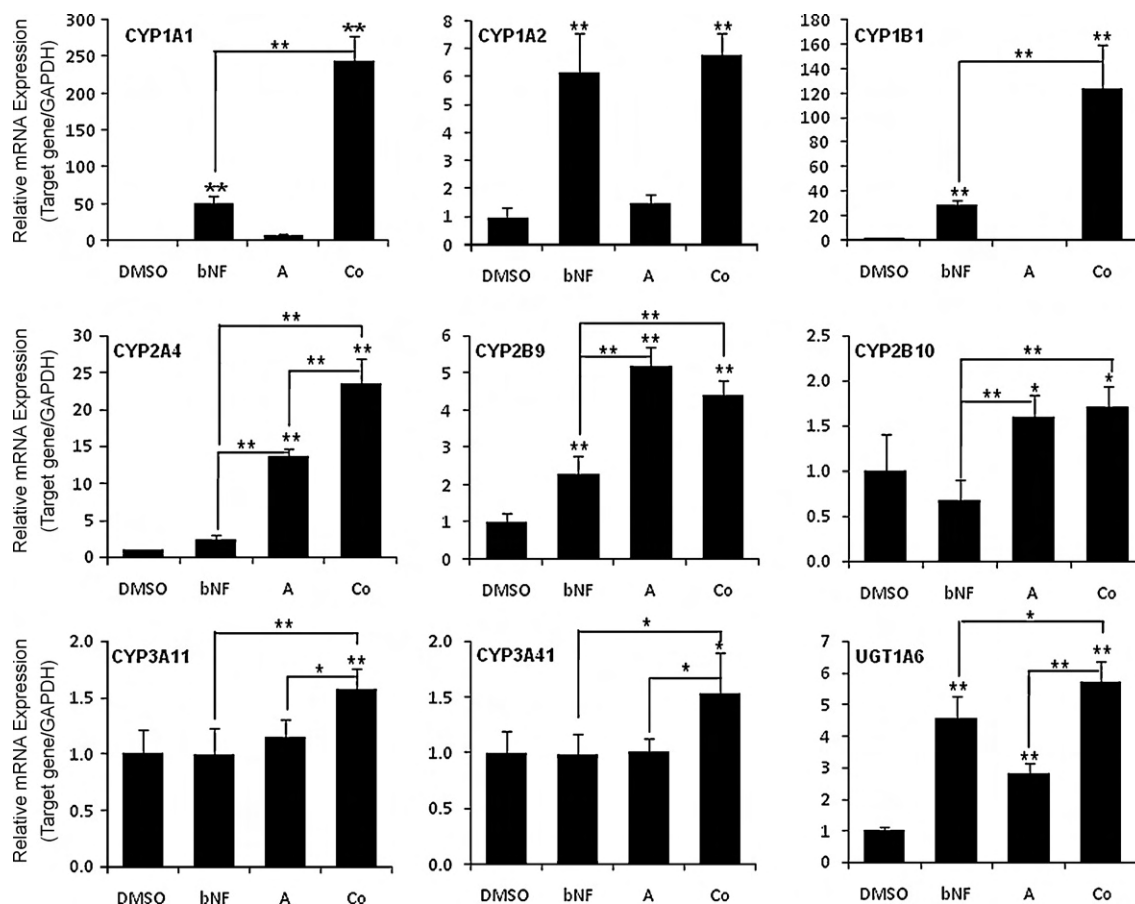


Fig. 2. Effect of β-NF and/or andrographolide on mRNA expression assessed by real-time RT-PCR. All target genes were normalized to GAPDH. Columns represent the mean ± SD ($n=4$). DMSO, control; β-NF, 10 μM β-NF; A, 25 μM andrographolide; Co, combined treatment with β-NF and A. *, ** represent significant differences from the DMSO group at $p \leq 0.05$ or 0.001, respectively (One-way ANOVA, Tukey post hoc test).

results with their observations, since the experimental protocol was not the same. In general, there is a time-dependent expression of mRNA for all major CYPs isoforms e.g. CYP1A2, CYP2C9, CYP2E1 and CYP3A4 in human hepatocytes [21,22] and culture conditions also affect the expression of cytochrome P450s [23]. Therefore, it is necessary to establish a procedure

for the risk assessment of *A. paniculata* extract or andrographolide.

In conclusion, the present results revealed that andrographolide is a potent inducer of CYP2A4, and CYP2B9. Interestingly, andrographolide had a markedly synergistic effect on CYP1A1 and CYP1B1 in combination with a typical CYP1A inducer, β-NF. A risk assessment of andrographolide or *A. paniculata* should be conducted, since the expression of genes, especially drug metabolism-related genes, might be affected.

Table 3

Effect of andrographolide on anti-oxidation and immune response genes.

Accession No.	Gene	Gene symbol	Fold change*
Anti-oxidation			
AB042745	NADPH oxidase 4	Nox4	0.80
D16142	Peroxiredoxin 1	Prdx1	1.20
AF093852	Peroxiredoxin 6	Prdx6	1.45
BC013447	Catalase	Cat	1.33
BC010823	Glutathione peroxidase 2	Gpx2	1.34
AY279096	Glutathione S-transferase kappa 1	Gstk1	1.23
BC057325	Glutathione reductase	Gsr	1.25
Immune responsive system			
BC055070	Chemokine (C-C motif) ligand 2	Ccl2	0.70
BC085259	T-cell specific GTPase	Tgtp	0.72
BC019961	Chemokine (C-X-C motif) ligand 16	Cxcl16	0.72
M23447	Chemokine (C-C motif) ligand 3	Ccl3	0.73
BC012965	Chemokine (C-X-C motif) ligand 13	Cxcl13	0.21
BC002113	Secreted phosphoprotein 1	Spp1	0.02
BC030067	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	Cxcl10	0.23
BC013738	Transforming growth factor, beta 1	Tgfb1	0.57

* Hepatocytes were treated with 25 μM andrographolide for 24 h. Expression of the respective genes was shown as fold change, compared with that of 0.2% DMSO treated.

Acknowledgements

This work was partly supported by Grants-in-Aid from the Japanese Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology and the Smoking Research Foundation. W.C. sincerely thanks the Office of the Higher Education Commission, Thailand for funding under the program Strategic Scholarships for Frontier Research Network for the Ph.D. Program Thai Doctoral degree.

References

- [1] S.S. Handa, A. Sharma, Hepatoprotective activity of andrographolide from *Andrographis paniculata* against carbon tetrachloride, Indian J. Med. Res. 92 (1990) 276–283.
- [2] W. Chiou, J. Lin, C. Chen, Andrographolide suppressed the expression of inducible nitric oxide synthase in macrophages and restored the vasoconstriction in rat aorta treated with lipopolysaccharide, Br. J. Pharmacol. 125 (1998) 327–334.
- [3] Y.C. Shen, C.F. Chen, W.F. Chiou, Suppression of rat neutrophil reactive oxygen species production and adhesion by the diterpenoid lactone andrographolide, Planta Med. 66 (2000) 314–317.

- [4] S. Rajagopal, R.A. Kumar, D.S. Deevi, C. Satyanarayana, R. Rajagopalan, Andrographolide, a potential cancer therapeutic agent isolated from *Andrographis paniculata*, J. Exp. Ther. Oncol. 3 (2003) 147–158.
- [5] A. Kapil, I.B. Koul, S.K. Banerjee, D. Gupta, Antihepatotoxic effects of major constituents of *Andrographis paniculata*, Biochem. Pharmacol. 46 (1993) 182–185.
- [6] C. Calabrese, S.H. Merman, J.G. Babish, X. Ma, L. Shinto, M. Dorr, K. Wells, C.A. Wenner, L.J. Standish, A phase I trial of andrographolide in HIV positive patients and normal volunteers, Phytother. Res. 14 (2000) 333–338.
- [7] M.A. Akbarsha, B. Manivannan, Biochemical changes in the testis and male accessory organs of albino rats on treatment with *Andrographis paniculata* Nees, Comp. Anim. Physiol. 28 (1993) 421–426.
- [8] K. Jarukamjorn, K. Don-in, C. Makejaruskul, T. Laha, S. Daodee, P. Pearaksa, B. Sripanidkulchai, Impact of *Andrographis paniculata* crude extract on mouse hepatic cytochrome P450 enzymes, J. Ethnopharmacol. 105 (2006) 464–467.
- [9] A. Jaruchotikamol, K. Jarukamjorn, W. Sirisangtrakul, T. Sakuma, Y. Kawasaki, N. Nemoto, Strong synergistic induction of CYP1A1 expression by andrographolide plus typical CYP1A inducers in mouse hepatocytes, Toxicol. Appl. Pharmacol. 224 (2007) 156–162.
- [10] D. Pekthong, N. Blanchard, C. Abadie, A. Bonet, B. Heyd, G. Mantion, A. Berthelot, L. Richert, H. Martin, Effect of *Andrographis paniculata* extract and andrographolide on hepatic cytochrome P450 mRNA expression and monooxygenase activities after in vivo administration to rats and in vivo in rat and human hepatocyte culture, Chem. Biol. Interact. 179 (2009) 247–255.
- [11] N. Nemoto, J. Sakurai, Glucocorticoid and sex hormones as activating or modulating factors for expression of Cyp2b-9 and Cyp2b-10 in the mouse liver and hepatocytes, Arch. Biochem. Biophys. 319 (1995) 286–292.
- [12] K. Jarukamjorn, T. Sakuma, J. Miyaura, N. Nemoto, Different regulation of the expression of mouse hepatic cytochrome P450 2B enzymes by glucocorticoid and Phenobarbital, Arch. Biochem. Biophys. 369 (1999) 89–99.
- [13] R.P. Singh, S. Banerjee, A.R. Rao, Modulatory influence of *Andrographis paniculata* on mouse hepatic and extrahepatic carcinogen metabolizing enzymes and antioxidation status, Phyto. Res. 15 (2001) 382–390.
- [14] N. Verma, M. Vinayak, Antioxidant action of *Andrographis paniculata* on lymphoma, Mol. Biol. Rep. 35 (2008) 535–540.
- [15] A. Puri, R. Axena, R.P. Saxena, K.C. Saxena, V. Srivastava, J.S. Tandon, Immunostimulant agents from *Andrographis paniculata*, J. Nat. Prod. 56 (1993) 995–999.
- [16] Y. Morel, R. Barouki, Down-regulation of cytochrome P450 1A1 gene promoter by oxidative stress, J. Biol. Chem. 273 (1998) 26969–26976.
- [17] R. Barouki, Y. Morel, Repression of cytochrome P450 1A1 gene expression by oxidative stress: mechanisms and biological implications, Biochem. Pharmacol. 61 (2001) 511–516.
- [18] C.W. Barker, J.B. Fagan, D.S. Pasco, Down-regulation of P4501A1 and P4501A2 mRNA expression in isolated hepatocytes by oxidative stress, J. Biol. Chem. 269 (1994) 3985–3990.
- [19] G.A. Akowuah, I. Zhari, A. Mariam, M.F. Yam, Absorption of andrographolides from *Andrographis paniculata* and its effect on CCl₄-induced oxidative stress in rats, Food Chem. Toxicol. 47 (2009) 2321–2326.
- [20] K. Jarukamjorn, N. Nemoto, Pharmacological aspects of *Andrographis paniculata* on health and its major diterpenoid constituent andrographolide, J. Health Sci. 54 (2008) 370–381.
- [21] J. George, B. Goodwin, C. Liddle, M. Tapner, G.C. Farrell, Time-dependent expression of cytochrome P450 genes in primary cultures of well-differentiated human hepatocytes, J. Lab. Clin. Med. 129 (1997) 638–648.
- [22] C. Liddle, B.J. Goodwin, J. George, M. Tapner, G.C. Farrell, Separate and interactive regulation of cytochrome P450 3A4 by triiodothyronine, dexamethasone, and growth hormone in cultured hepatocytes, J. Clin. Endocrinol. Metab. 83 (1998) 2411–2416.
- [23] E.L. LeCluyse, A. Madan, G. Hamilton, K. Carroll, R. DeHaan, A. Parkinson, Expression and regulation of cytochrome P450 enzymes in primary cultures of human hepatocytes, J. Biochem. Mol. Toxicol. 14 (2000) 177–188.



Gender-associated modulation of inducible CYP1A1 expression by andrographolide in mouse liver

Kanokwan Jarukamjorn^{a,**}, Sachiko Kondo^b, Waranya Chatuphonprasert^a,
Tsutomu Sakuma^b, Yuki Kawasaki^b, Nobuo Nemoto^{b,*}

^a Academic Office for Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Mitrapaab Road, Khon Kaen 40002, Thailand

^b Department of Toxicology, Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences, University of Toyama, 2630 Sugitani, Toyama 930-0194, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 September 2009

Received in revised form 9 November 2009

Accepted 20 January 2010

Available online 1 February 2010

Keywords:

Andrographolide

CYP1A1

AhR

Orchiectomy

Testosterone

ABSTRACT

We previously observed a strong synergistic effect on polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-induced CYP1A1 expression by andrographolide, a major constituent of an herbal medicine derived from the plant *Andrographis paniculata*, in mouse hepatocytes in primary culture. The present paper describes confirmation of an enhancing effect of andrographolide on the CYP1 family *in vivo* in the PAH-responsive C57BL/6 mouse. Andrographolide did not alter CYP1 expression in the PAH-nonresponsive DBA/2 mouse. The enhanced expression induced by andrographolide was observed in male C57BL/6 mice, but not in intact or ovariectomized females, or in orchiectomized male mice. However, treatment with testosterone restored the effect in both orchiectomized males and ovariectomized females. These observations indicate a male hormone-related system to be a crucial mediator of the modulation of CYP1 expression by andrographolide. Precautions should be taken regarding the use of *A. paniculata* as an alternative medication or health promotion, according to its distinctive characterization on sexually dimorphic modulation of CYP1A1 expression.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Cytochrome P450s (P450[#]) play a key role in the metabolism of drugs and xenobiotics, including chemical carcinogens (Guengerich and Shimada, 1998; Guengerich, 2000). Of these P450s, CYP1A1 and CYP1A2 are the major enzymes involved in the metabolic activation of potential procarcinogens, such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), nitro-PAHs, and aryl and heterocyclic amines. CYP1A1 is constitutively expressed in several extrahepatic tissues, but not in the liver (Kimura et al., 1986). However, while CYP1A1 expression has been demonstrated in the liver after inducer treatment, CYP1A2 expression is constitutive and inducible in the liver (Kimura et al., 1986; Iwanari et al., 2002). The regulation of CYP1A1 and CYP1A2 expression by a

prototype inducer, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), is activated through an aryl hydrocarbon receptor (AhR) (Whitlock, 1999). Besides CYP1A1 and CYP1A2, CYP1B1 is a relatively new member of family 1 (Savas et al., 1994; Brake et al., 1999; Ryu and Hodgson, 1999) which has been reported to be involved in the metabolism of PAHs, and is also inducible by CYP1A1 inducers through AhR and the AhR nuclear translocator (ARNT)-mediated pathway (Savas et al., 1994; Ryu and Hodgson, 1999). CYP1B1 is constitutively expressed in steroidogenic tissues, but is not detected in xenobiotic-metabolizing organs such as liver, kidney, and lung (Savas et al., 1994; Iwanari et al., 2002). The CYP1 family is responsible for activating carcinogenic aromatic amines and heterocyclic amines, to which we are exposed every day via smoking, our diet, and the environment; hence its regulation is of clear interest.

Andrographolide (3-[2-[decahydro-6-hydroxy-5-(hydroxymethyl)-5,8a-dimethyl-2-methylene-1-naphthalenyl]ethylidene]dihydro-4-hydroxy-2(3H)-furanone) is the major diterpenoid constituent of *Andrographis paniculata* Nees (Family Acanthaceae), a plant traditionally employed in folk remedies for a wide spectrum of ailments (Jarukamjorn and Nemoto, 2008) as an important “cold property” herb used to rid the body of heat, as in fevers, and toxins (Deng, 1978), including to prevent and treat the common cold (Caceres et al., 1997), or as a herbal supplement (Mishra

Abbreviations: AhR, aryl hydrocarbon receptor; ARNT, AhR nuclear translocator; B6, C57BL/6; D2, DBA/2; EROD, ethoxyresorufin *O*-deethylase; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; 3-MC, 3-methylcholanthrene; P450, cytochrome P450; PAH, polycyclic aromatic hydrocarbon; PB, phenobarbital; TCDD, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin; TE, testosterone.

* Corresponding author. Tel.: +81 76 434 7520.

** Corresponding author. Tel.: +66 43 202 378; fax: +66 43 202 379.

E-mail addresses: kanok.ja@kku.ac.th (K. Jarukamjorn), nnemoto@pha.u-toyama.ac.jp (N. Nemoto).

et al., 2007), and nowadays incorporated in a number of herbal medicinal preparations. A crude extract of *A. paniculata* was recently found to induce hepatic CYP1A1 and CYP2B expression, based on observations of significant increases in ethoxyresorufin *O*-dealkylase (EROD) activity and pentoxyresorufin *O*-dealkylase activities (Jarukamjorn et al., 2006). Interestingly, andrographolide plus typical CYP1A inducers, including β -naphthoflavone, TCDD, and benz[a]anthracene, synergistically induced CYP1A1 expression in mouse hepatocytes in primary culture, and the synergism was blocked by an AhR antagonist, resveratrol (Jaruchotikamol et al., 2007). The findings supported the involvement of an AhR-mediated pathway of transcriptional activation in the synergistic effect of andrographolide and the AhR ligands on CYP1A1 in mouse hepatocytes. Therefore, it was of interest to study whether the synergistic effect on CYP1A1 induction of andrographolide plus a typical CYP1A inducer in cultured mouse hepatocytes occurs *in vivo*, and if so, whether there are factor(s) influencing it.

In the present study, the synergistic effect on CYP1 expression by andrographolide plus 3-methylcholanthrene (3-MC) and the involvement of AhR were examined in PAH-responsive, C57BL/6 (B6), and -nonresponsive, DBA/2 (D2), mouse strains. Subsequently, the gender-dependent synergism of CYP1's activation by andrographolide plus 3-MC was assessed in B6 mice. The observations suggest that, besides AhR, a sex hormone-associated regulatory system plays a role in the modulation of 3-MC-induced CYP1 expression by andrographolide.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Andrographolide and phenobarbital sodium (PB) were supplied by Wako Pure Chemical Ind. (Osaka, Japan). Ethoxyresorufin and resorufin were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). 3-MC was a product of Eastman Kodak Co. (Rochester, NY, USA). Testosterone propionate was purchased from Kasei TCI (Tokyo, Japan). ReverTra Ace[®] and LaboPass[™] G-Taq[®] for reverse transcription and polymerase chain reaction were purchased from Toyobo Co., Ltd. (Osaka, Japan) and Hokkaido System Science Co., Ltd. (Sapporo, Japan), respectively. SYBR[®] Green Premix Ex Taq[™] (Perfect Real Time) was a product of TaKaRa Biomedicals Inc. (Shiga, Japan). TaqMan[®] Gene Expression Assays and TaqMan[®] Gene Expression Detection kit were products of Applied Biosystems (Branchburg, NJ, USA). The antibody against rat CYP1A1 was a gift from Dr. Y. Funae (Osaka City University, Osaka, Japan). The Amersham Pharmacia Biotech Co. supplied Hybond-C membranes for blotting. All other laboratory chemicals were of the highest available purity from commercial suppliers.

2.2. Animals

Male and female C57BL/6 and DBA/2 mice were supplied by Sankyo Experimental Animals, Tokyo, Japan. All mice were housed in the University of Toyama's Animal Center facility under the supervision of certified laboratory veterinarians and were treated according to a research protocol approved by the University's Institutional Animal Care and Use Committee. At all times, the mice were housed on paper chip bedding in plastic cages, with water and a commercial mouse diet supplied *ad libitum*. The quarters were air conditioned (20–23 °C) and had a 12-h light/dark cycle. Orchiectomy or ovariectomy was carried out at 5 weeks of age. Seven-week-old mice of both sexes were subcutaneously injected daily with 5 mg/kg/day of andrographolide, and/or intraperitoneally given 20 mg/kg/day of 3-MC or 100 mg/kg

of phenobarbital sodium (PB) for 3 days. The treatment with andrographolide was continued for a further 1 or 2 days. In some cases, testosterone propionate at 5 mg/kg/day was subcutaneously injected daily for 7 days, starting 2 days before the administration of 3-MC or PB. These compounds were dissolved in corn oil and the final volume of administration was 0.1 ml/25 g body weight. The control group was subcutaneously given corn oil daily for 7 days to assure a non-significant change of CYP1 expression. The mice were sacrificed on the 5th or 6th day after the start of 3-MC or PB treatment and the liver was excised immediately for the preparation of total RNA and microsomes (Jarukamjorn et al., 1999).

2.3. Real-time RT-PCR

Mouse P450 and GAPDH mRNA expression was quantified by real-time RT-PCR. Hepatic total RNA was reverse-transcribed and cDNA was amplified as described previously with some modifications (Jaruchotikamol et al., 2007) using specific TaqMan[®] Gene Expression Assays (Inventoried) for *Cyp1a2* (Mm00487224.m1), *Cyp1b1* (Mm00487229.m1), *Cyp2b9* (Mm00657910.m1), *Cyp2b10* (Mm00456591.m1), and *Cyp3a11* (Mm00731567.m1), and a specific TaqMan[®] Gene Expression Detection kit for *Cyp1a1*, in which the forward and reverse primers and the probe were: 5'-GAC ATT TGA GAA GGG CCA CAT C-3', 5'-CCA AAG AGG TCC AAA ACA ATC G-3', and 5'-FAM-CGA GAA TGC CAA TGT CCA GCT GTC A-TAMRA-3', respectively, as well as the SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (Perfect Real Time) for GAPDH, in which the forward and reverse primers were: 5'-TCC ACT CAC GGC AAA TTC AAC G-3' and 5'-TAG ACT CCA CGA CAT ACT CAG C-3', respectively. The specificity of GAPDH cDNA amplification was confirmed by both polyacrylamide gel electrophoresis and the dissociation curve of the product. Real-time PCR was performed using the ABI Prism[®] 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Branchburg, NJ, USA) with ABI Prism[®] 7000 SDS software. The conditions for each PCR cycle were as follows: denaturation at 95 °C for 15 s, and annealing and extension at 60 °C for 1 min. The amplified products of P450 cDNAs were detected directly by monitoring the fluorescence of the reporter dye (FAM), for which an increase in the fluorescence signal was detected only if the target sequence was complementary to the probe and amplified by the PCR. The amplified PCR products of GAPDH were monitored directly by measuring the increase in signal of SYBR[®] Green that was bound to double-stranded DNA amplified by the PCR.

2.4. Western blotting of microsomal proteins

Livers were rapidly excised and cut into small pieces before homogenization with ice-cold 1.15% KCl. Microsomal fractions were prepared after ultracentrifugation of the 10,000 $\times$ g supernatant at 104,000 $\times$ g for 60 min at 4 °C. The microsomal protein concentration was determined as described previously (Nemoto and Sakurai, 1992) using bovine serum albumin as a standard. Five or twenty micrograms of microsomal protein was resolved by 10% SDS-PAGE and then transferred to a Hybond-C membrane. The P450 species localized were detected using a rabbit polyclonal antibody against rat CYP1A1 protein, which cross-reacted with CYP1A2, followed by a horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody, and then visualized with 3,3'-diaminobenzidine and hydrogen peroxide (Sakuma et al., 1999).

2.5. Assessment of total P450 content and enzymatic activities

The total P450 content of the hepatic microsomes was determined by carbon monoxide difference spectrophotometry (Omura and Sato, 1964). EROD activity was determined by the method

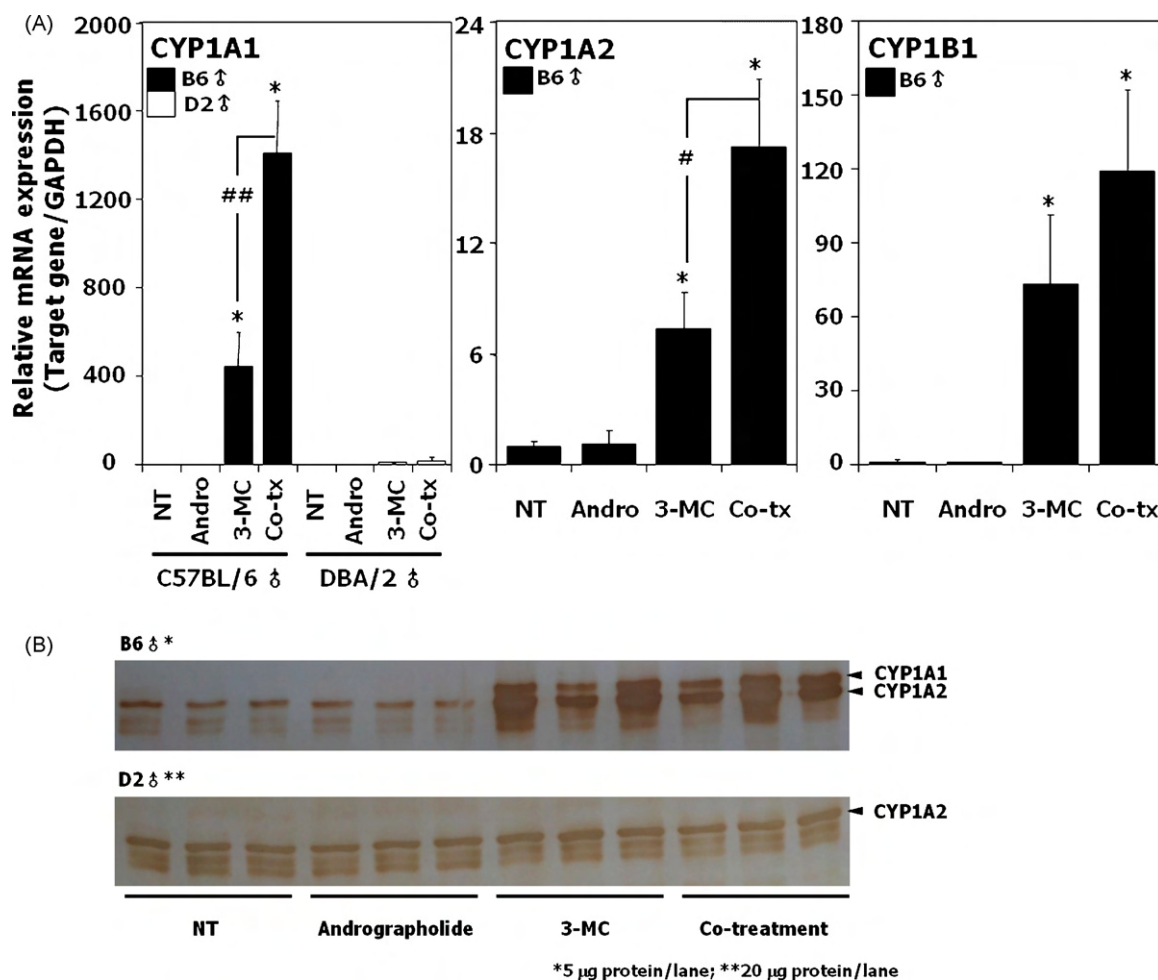


Fig. 1. Hepatic CYP1 expression induced by andrographolide and/or 3-methylcholanthrene in male C57BL/6 or DBA/2 mice. (A) Expression of CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1 mRNA. Male B6 or D2 mice were subcutaneously injected with andrographolide (5 mg/kg/day) daily for 5 days and/or intraperitoneally with 3-MC (20 mg/kg/day) for 3 days. Total RNA and a microsomal fraction were prepared from the liver 1 day after the last treatment. Hepatic total RNA was reverse-transcribed and cDNA was amplified using a specific TaqMan® Gene Expression Assay or TaqMan® Gene Expression Detection Kit. Expression of the respective mRNA was normalized to that of GAPDH. Each column represents the mean $\pm$ SD ($n=5-6$). Significance was examined using a one-way ANOVA, the Tukey post hoc test and the Student–Newman–Keuls method (Sigmastat®); * $p<0.001$ (vs. NT); # $p<0.01$, ## $p<0.001$ (vs. 3-MC treated). (B) Expression profile of CYP1A1 and CYP1A2 protein. Hepatic microsomal protein was resolved using 10% SDS-PAGE and the expression of CYP1A1 and CYP1A2 proteins was detected using a rabbit polyclonal antibody against the rat CYP1A1 protein, which cross-reacted with CYP1A2. Besides CYP1A1 and CYP1A2, unidentified non-specific proteins beneath CYP1A were present in the preparations. NT, non-treatment; Andro, andrographolide; 3-MC, 3-methylcholanthrene; Co-tx, co-treatment with 3-MC plus andrographolide.

of Sakuma et al. (1999) with some modifications. Briefly, a reaction mixture containing 10 mM Tris–HCl (pH 7.8), 200 μ M NADPH, 0.5 mg of hepatic microsomes, and 50 μ M ethoxyresorufin in a final volume of 3.5 ml was incubated at 37 °C for 3 min. Subsequently, the formation of resorufin was measured by spectrofluorometry with an excitation wavelength of 530 nm and emission wavelength of 585 nm.

3. Results

3.1. Hepatic CYP1 expression induced by andrographolide and/or 3-methylcholanthrene in C57BL/6 or DBA/2 male mice

The effects of andrographolide and/or 3-MC on the expression of Cyp1 gene family members were examined in livers of B6 and D2 mice, which were PAH-responsive and -nonresponsive mouse strains, respectively. 3-MC significantly induced the expression of hepatic CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1 in male B6 mice (Fig. 1A). Although andrographolide did not induce the expression of hepatic CYP1A1, CYP1A2, or CYP1B1 mRNA, andrographolide plus 3-MC

synergistically enhanced the expression of CYP1A1 and CYP1A2 mRNAs in the livers of B6 males. Neither single treatment with 3-MC or andrographolide nor co-treatment significantly modified the expression of CYP1A1 mRNA in male D2 mice. Correspondingly, the levels of CYP1A1 and CYP1A2 protein in hepatic microsomes were markedly increased on treatment with 3-MC or with andrographolide plus 3-MC in B6 mice, but were unchanged in D2 mice (Fig. 1B). These observations support the idea that the synergistic effect of andrographolide plus 3-MC on the expression of CYP1A1 mRNA occurred in male B6 mice *in vivo* as well as in primary cultured mouse hepatocytes.

3.2. Expression of hepatic P450 mRNAs by phenobarbital after co-treatment with andrographolide

To further investigate whether the AhR-mediated pathway had an effect on the regulatory mechanism for the synergistic enhancement of CYP1 mRNA expression by andrographolide plus 3-MC in B6 males, 3-MC was replaced with PB. PB significantly induced the expression of CYP1A1 mRNA as well as CYP2B9 and CYP2B10

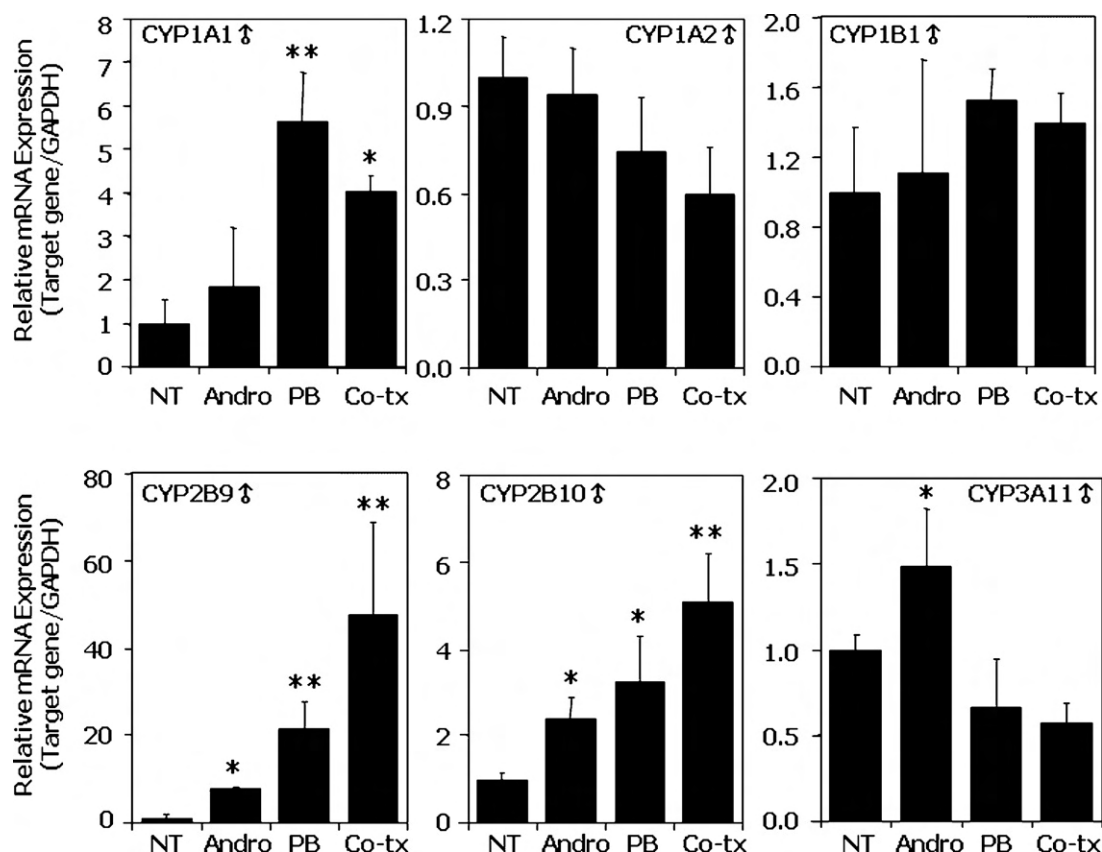


Fig. 2. Expression of hepatic P450 mRNA by phenobarbital in the presence of andrographolide. Male B6 mice were subcutaneously injected with andrographolide (5 mg/kg/day) daily for 5 days and/or intraperitoneally with PB (100 mg/kg/day) for 3 days. Hepatic total RNA was reverse-transcribed and cDNA was amplified using a specific TaqMan® Gene Expression Assay or TaqMan® Gene Expression Detection Kit. Expression of the respective mRNA was normalized to that of GAPDH. Each column represents the mean $\pm$ SD ($n = 5-6$). Significance was examined using a one-way ANOVA, the Tukey post hoc test and the Student–Newman–Keuls method (Sigmastat®); * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ (vs. NT). NT, non-treatment; Andro, andrographolide; PB, phenobarbital; Co-tx, co-treatment with PB plus andrographolide.

mRNA, while andrographolide by itself increased CYP2B expression (Fig. 2). The expression of none of the P450 mRNA tested was increased by the co-treatment with andrographolide and PB.

3.3. Modulation of total P450 content and ethoxyresorufin O-deethylase activity by co-treatment with andrographolide and 3-methylcholanthrene in male C57BL/6 or DBA/2 mice

The total P450 content as well as EROD activity, reported to be a selective marker of the CYP1A1 enzyme in mouse liver (Burke et al., 1994), were assessed to confirm the robust induction of the expression of CYP1A in male B6 mice. The values were significantly increased by treatment with 3-MC or andrographolide plus 3-MC in male B6 mice, while they were unaffected by single treatment with 3-MC or andrographolide, or by co-treatment with these compounds in D2 mice (Fig. 3). Consistent with the expression of CYP1A1 mRNA and protein (Fig. 1A and B), levels of EROD activity were significantly higher in 3-MC-treated B6 mice than D2.

3.4. Gender-related modulation of CYP1 mRNA expression by 3-methylcholanthrene after treatment with andrographolide

The expression of CYP1 family members induced by 3-MC after treatment with andrographolide was examined further to clarify whether other factors were involved. B6 mice of both sexes were administered 3-MC and andrographolide for 3 days, and treatment with the latter compound was continued for a further 1 or 2 days. Total hepatic RNA was prepared 1 day after the last treatment.

Namely, the expression of CYP1 family members including CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1 was determined on the 5th and 6th days in both sexes of B6 mice (Fig. 4). On treatment with 3-MC, expression of the three isoforms in males declined with time, while levels of CYP1A2 and CYP1B1 in females increased. Interestingly, the 3-MC-induced expression of CYP1 mRNAs in male mice was notably increased by the co-treatment with andrographolide. Although andrographolide did not increase the 3-MC-induced mRNA expression of these CYP1 isoforms in female mice, the expression of CYP1A1 mRNA decreased significantly in females. These observations suggest that andrographolide protects against a decrease in transcribed CYP1 family members after 3-MC treatment, and that the enhanced CYP1 expression on co-treatment with andrographolide and 3-MC was dependent on gender.

The expression after co-treatment with andrographolide and 3-MC of CYP2B9, CYP2B10, and CYP3A11 isoforms was examined for a sex-dependent component. No such effect was observed (Fig. 5). These observations suggest a unique phenomenon whereby the synergistic or additive effect on CYP1 mRNA expression by andrographolide plus 3-MC is regulated male-specifically.

3.5. Impact of testosterone on the expression of CYP1A mRNA in orchiectomized and ovariectomized C57BL/6 mice

Since the synergistic enhancement of CYP1 expression through co-treatment with andrographolide and 3-MC was found to be sex-dependent, the expression of CYP1 mRNAs was examined in orchiectomized B6 mice under the same conditions. As expected,

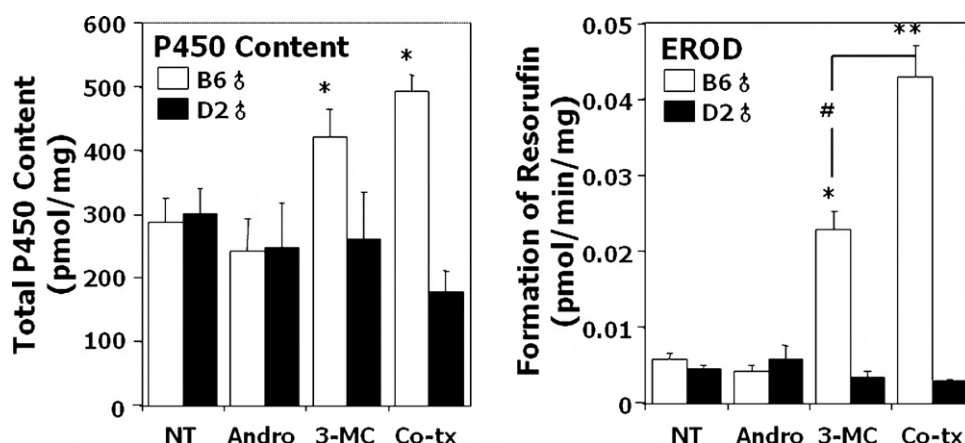


Fig. 3. Modulation of total P450 content and ethoxyresorufin *O*-deethylase activity by co-treatment with andrographolide and 3-methylcholanthrene in male C57BL/6 or DBA/2 mice. Male B6 or D2 mice were subcutaneously injected with andrographolide (5 mg/kg/day) daily for 5 days and/or intraperitoneally with 3-MC (20 mg/kg/day) for 3 days. Total P450 content as well as EROD activity was assessed in hepatic microsomes. The open columns show the results for microsomes from B6 mice and the closed columns, those for microsomes from D2 mice. Each column represents the mean $\pm$ SD ($n = 5-6$). Significance was examined using a one-way ANOVA, the Tukey post hoc test and the Student–Newman–Keuls method (Sigmastat®); * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ (vs. NT); # $p < 0.001$ (vs. 3-MC treated). NT, non-treatment; Andro, andrographolide; 3-MC, 3-methylcholanthrene; Co-tx, co-treatment with 3-MC plus andrographolide.

orchiectomy clearly diminished the synergistic effect on CYP1A1 expression as well as the robust induction of CYP1A2 and CYP1B1 expression in male B6 mice (Fig. 6A). These observations suggest that a male hormone or a male specific system is a crucial mediator of the synergistic effect on CYP1A1 activation of co-treatment with andrographolide and 3-MC.

To further investigate whether a male sex hormone, testosterone, was an important factor in the synergistic promotion of CYP1A1 expression on treatment with andrographolide plus 3-

MC in male mice, male and female B6 mice were orchietomized and ovariectomized, respectively, before being treated with the regimen described above as well as testosterone. Testosterone clearly restored the synergism of CYP1A1 mRNA to nearly the same level observed in B6 males in a total of two independent experiments (Fig. 6B). Correspondingly, testosterone restored the expression of CYP1A1 mRNA in ovariectomized B6 females to a level comparable to that in orchietomized B6 males, while the expression of CYP1A2 mRNA was not changed by 3-MC in

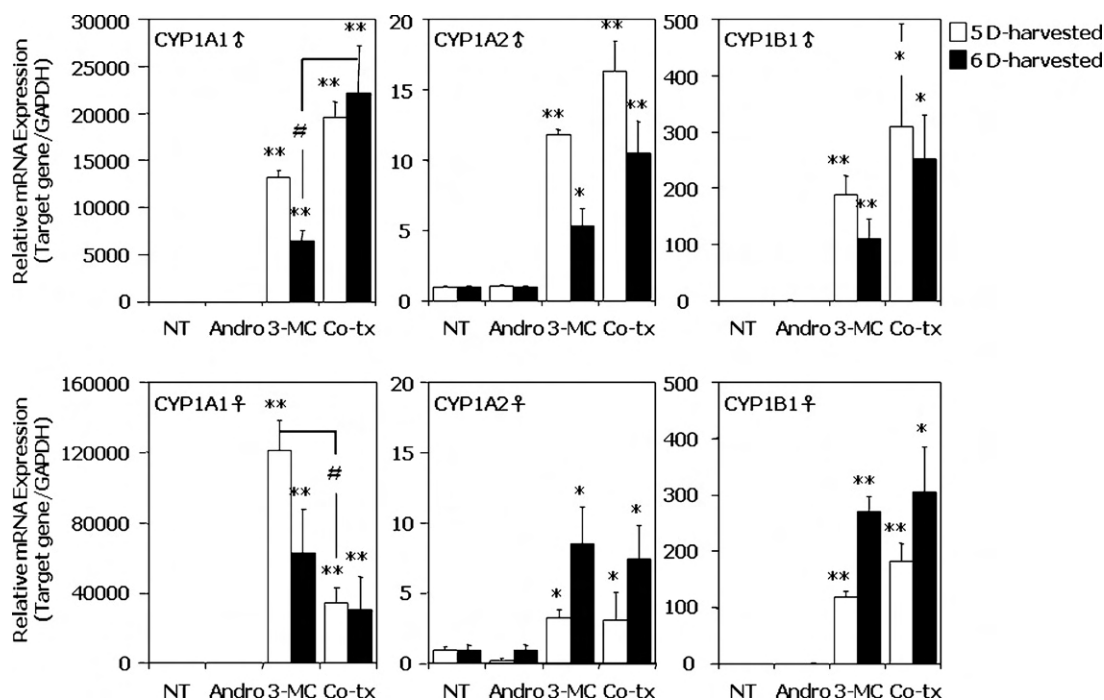


Fig. 4. Sex-dependency of hepatic CYP1 expression induced by andrographolide and/or 3-methylcholanthrene in C57BL/6 mice. B6 mice of both sexes were subcutaneously injected daily with 5 mg/kg/day of andrographolide for 4 or 5 days and/or intraperitoneally given 20 mg/kg/day of 3-MC for 3 days. The treatment with andrographolide was continued for a further 1 or 2 days. The mice were sacrificed on the 5th or 6th day after the start of 3-MC treatment. Hepatic total RNA was reverse-transcribed and cDNA was amplified using a specific TaqMan® Gene Expression Assay or TaqMan® Gene Expression Detection Kit. The open and closed columns show mRNA expression of B6 mice sacrificed on the 5th or 6th day, respectively. Expression of the respective mRNA was normalized to that of GAPDH. Each column represents the mean $\pm$ SD ($n = 5-6$). Significance was examined using a one-way ANOVA, the Tukey post hoc test and the Student–Newman–Keuls method (Sigmastat®); * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ (vs. NT); # $p < 0.001$ (vs. 3-MC treated). NT, non-treatment; Andro, andrographolide; 3-MC, 3-methylcholanthrene; Co-tx, co-treatment with 3-MC plus andrographolide; 5 D-harvested, total RNA prepared on the 5th day, 6 D-harvested, total RNA prepared on the 6th day.

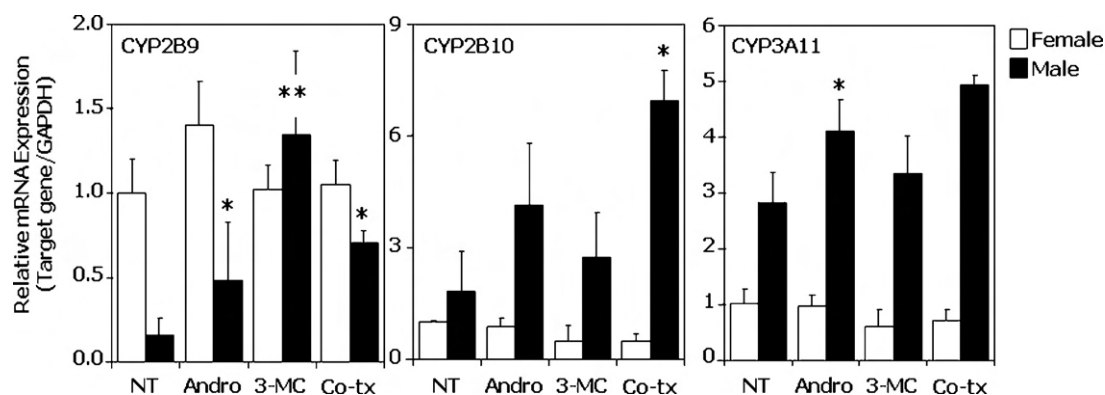


Fig. 5. Expression of CYP2B9, CYP2B10, and CYP3A11 mRNA induced by andrographolide and/or 3-methylcholanthrene in C57BL/6 mice. B6 mice of both sexes were subcutaneously injected with andrographolide (5 mg/kg/day) daily for 5 days and/or intraperitoneally with 3-MC (20 mg/kg/day) for 3 days. Hepatic total RNA was reverse-transcribed and cDNA was amplified using a specific TaqMan® Gene Expression Assay or TaqMan® Gene Expression Detection Kit. The open columns show mRNA expression in female mice and closed columns, that in male mice. Expression of the respective mRNA was normalized to that of GAPDH. Each column represents the mean $\pm$ SD ($n=5-6$). Significance was examined using a one-way ANOVA, the Tukey post hoc test and the Student–Newman–Keuls method (Sigmapstat®); * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ (vs. NT). NT, non-treatment; Andro, andrographolide; 3-MC, 3-methylcholanthrene; Co-tx, co-treatment with 3-MC plus andrographolide.

these ovariectomized B6 females. These findings suggest that an unknown crucial sex-related factor is involved in the synergistic effect on CYP1A1 by andrographolide plus 3-MC in male B6 mice.

4. Discussion

The present study revealed that andrographolide, a major constituent of herbal medicine derived from *A. paniculata*, syner-

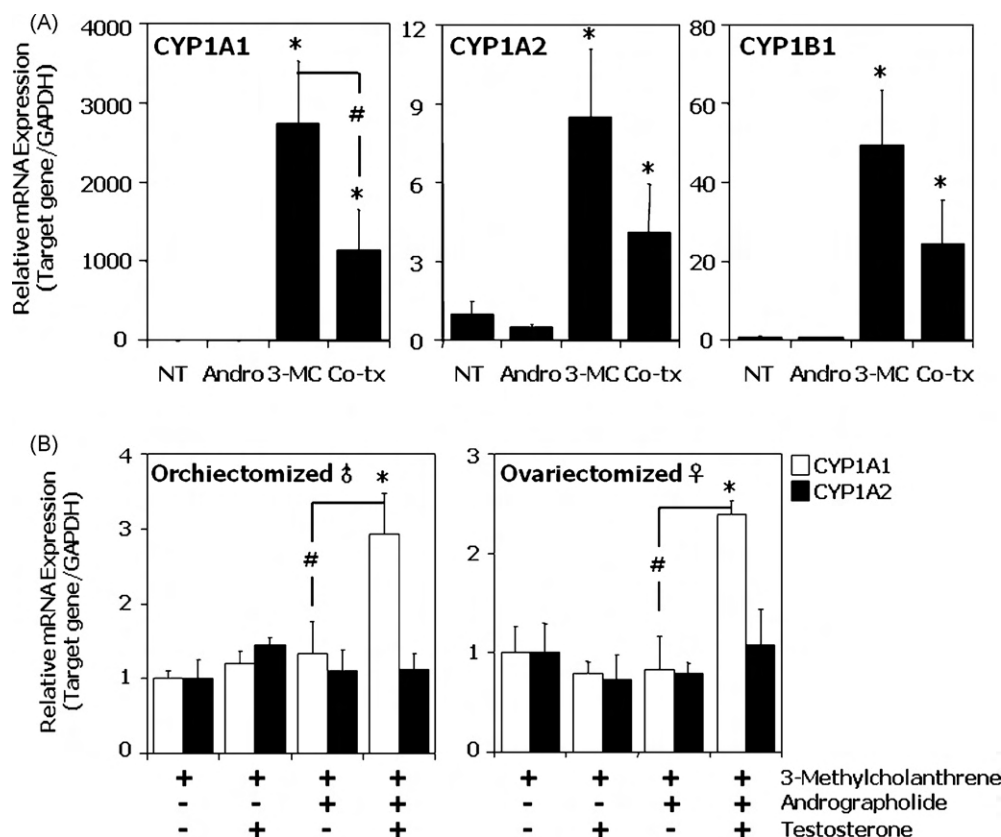


Fig. 6. Impact of testosterone supplementation on the expression of CYP1A mRNA in orchiectomized and ovariectomized C57BL/6 mice. (A) Expression of CYP1 mRNA in orchiectomized mice. Male B6 mice were orchiectomized at 5 weeks of age. Two weeks later, all mice were treated with andrographolide and/or 3-MC under the same regimen in which the robust induction of CYP1A1 mRNA expression was noted. (B) Expression of CYP1A1 and CYP1A2 mRNA in orchiectomized and ovariectomized mice after testosterone supplementation. Male and female B6 mice were orchiectomized and ovariectomized, respectively, at 5 weeks of age. The orchiectomized male and ovariectomized female B6 mice were subcutaneously injected with testosterone (5 mg/kg/day) daily for 7 days simultaneously with 3-MC plus andrographolide. The hormone treatment was started 2 days before that of 3-MC and andrographolide. The open columns show mRNA expression of CYP1A1 and the closed columns, that of CYP1A2. Hepatic total RNA was reverse-transcribed and cDNA was amplified using a specific TaqMan® Gene Expression Assay or TaqMan® Gene Expression Detection Kit. Expression of the respective mRNAs was normalized to that of GAPDH. Each column represents the mean $\pm$ SD ($n=5-6$). Significance was examined using a one-way ANOVA, the Tukey post hoc test and the Student–Newman–Keuls method (Sigmapstat®); * $p < 0.001$ (vs. NT); # $p < 0.001$ (vs. 3-MC treated or andrographolide plus 3-MC treated). NT, non-treatment; Andro, andrographolide; 3-MC, 3-methylcholanthrene; Co-tx, co-treatment with 3-MC plus andrographolide.

gistically enhanced the expression of *CYP1* family genes after 3-MC treatment *in vivo*. Interestingly, this synergism was observed only in the male mice. After mice were orchietomized, the synergistic effect was eliminated, and testosterone supplementation restored *CYP1A1* expression.

Recently, andrographolide has been reported to influence the expression of *CYP1A1* mRNA in primary cultured mouse hepatocytes (Jaruchotikamol et al., 2007). Although andrographolide did not show marked inducing activity, it had a strong synergistic effect on *CYP1A1* expression evoked by a typical *CYP1A1* inducer. The present study demonstrated a synergistic effect on *CYP1A1* expression by andrographolide plus 3-MC *in vivo*. In addition, the involvement of an AhR-mediated pathway of transcription in regulating the synergistic effect was clearly affirmed that enhancement of *CYP1A1* expression was found only in the liver of PAH-responsive B6 mice, and not in nonresponsive D2 mice. Furthermore, no evidence of synergism after co-treatment with PB and andrographolide was obtained, though PB weakly induced *CYP1A1* mRNA expression under the present experimental conditions, suggesting andrographolide to partially modify the activation pathway for *CYP1A1* via AhR, since PB is not known to activate AhR.

The synergistic effect on *CYP1A1* mRNA expression was noted in male, but not female mice (Fig. 4). Enhanced expression was also noted for *CYP1A2* in male mice. However, andrographolide did not enhance, but rather reduced, 3-MC-induced *CYP1* mRNA expression in orchietomized mice (Fig. 6A). The expression profile of *CYP1A1* mRNA in orchietomized males was almost the same as that in intact female mice. These observations suggest that the male hormone restores the synergistic effect on *CYP1A1* by andrographolide. To confirm this possibility, orchietomized male and ovariectomized female B6 mice underwent testosterone supplementation simultaneously with the co-administration of 3-MC and andrographolide (Fig. 6B). The observations clearly demonstrated that the administration of testosterone to both orchietomized and ovariectomized B6 mice restored the synergistic expression of *CYP1A1* to nearly the same level as that in intact B6 male mice. The results suggested a male hormone-associated system to have a positive role in the synergistic effect on 3-MC-induced *CYP1A1* expression by andrographolide along with AhR-mediated pathway.

The association between the regulatory pathway of *CYP1A1* expression and female hormone condition has been widely researched (Angus et al., 1999; Ricci et al., 1999) in relation to the inhibitory effect of estradiol on *CYP1A1* (Eugster et al., 1993; Lai et al., 2004). A role for estrogen receptor- α (ER α)-mediated transrepression of AhR-dependent regulation of *CYP1A1* via direct interaction between AhR/ARNT and ER α has been mentioned (Beischlag and Perdew, 2005). AhR and ER α might both be present in the *CYP1A1* enhancer region during transrepression. The estrogen-mediated suppression and the synthesis of protein factors were speculated to be due to blockage of the formation of the activated TCDD/AhR complex by estradiol and subsequent binding to DRE (Safe and Wormke, 2003; Lai et al., 2004). The evidence that short hairpin RNA-mediated knockdown of ER α expression significantly decreased *CYP1A1* expression suggested ER α as a promoter-specific modulator of AhR-dependent transcription, and demonstrated the complexity of the cross-talk between these two receptor pathways (Matthews and Gustafsson, 2006). ER α 's modulation of AhR activity represents a new mechanism of ER α signaling (Matthews and Gustafsson, 2006); leading to the notion that this process represents a feedback regulation in estrogen signaling (Lee et al., 2003). In the other words, dioxins can mimic the effects of estrogen through a mechanism that involves the activation of estrogen receptors by a transcriptionally active AhR-ARNT complex (Brosens and Parker, 2003; Ohtake et al., 2003). Therefore, enhanced expression of *CYP1A1* might be expected after

ovariectomy, but there was no evidence of this. One of the reasons might be that, even in ovariectomized female mice, estrogen can be synthesized in several tissues and this estrogen might influence *CYP1A1* expression. Treatment of these females with testosterone might compete with the estrogen effect resulting in synergism. Likewise, the synergistic effect on *CYP1A1* expression significantly subsided after estradiol was used (unpublished observations). These findings suggest that another crucial determinant, estrogen, is involved in regulating the synergistic effect of *CYP1A1* expression by andrographolide plus 3-MC.

The level of *CYP1A1* mRNA after 3-MC treatment decreased with time. The synergistic effect in male mice was more prominent for mRNA prepared on the 6th day than 5th day (Fig. 4), since levels were maintained on the 6th day. Andrographolide clearly prolonged the expression of *CYP1A1* after the termination of 3-MC treatment, suggesting that it maintained levels of transcribed mRNA after the treatment. Andrographolide might influence the efficiency of mRNA processing or inhibition of mRNA turnover, as suggested by previous experiments performed with primary cultured mouse hepatocytes (Jaruchotikamol et al., 2007). Another possibility is that, if andrographolide inhibited the metabolism of 3-MC, the inducing effect might continue. An inhibitory effect of andrographolide on hepatic microsomal P450-dependent activity was observed in rat microsomes as well as in rat and human primary cultures (Pekthong et al., 2009). These possibilities could be resolved easier in cultured cells than in intact animals. Fortunately, since the synergistic effect of andrographolide was observed in both *in vivo* and *in vitro* systems, we could conduct a risk assessment of andrographolide use for the activation of ingested chemical carcinogens in a cultured cell system.

CYP1A1 expression markedly influences the activation of chemical carcinogens (Kimura et al., 1986; Nemoto et al., 1989; Jarukamjorn et al., 1999; Iwanari et al., 2002). The concentration of andrographolide presently employed (5 mg/kg/day for 4–5 days) was equivalent to that achieved in individuals ingesting *A. paniculata* (Calabrese et al., 2000; Panossian et al., 2000). The relevance of andrographolide and *A. paniculata* as a medicinal herb would be made evident by employing an assay system using cultured cells. Therefore, some risks associated with the use of this compound might be of interest, and further evaluation of andrographolide analogs or other major constituents of *A. paniculata* should be performed. Our findings strongly suggest the importance of advice regarding the use of *A. paniculata* as an alternative medicine.

Acknowledgements

This work was supported by the Thai Research Fund (RMU5080017), the University Mobility in Asia and the Pacific 2007, and the Strategic Scholarships Fellowship Frontier Research Networks 2008 of the Commission on Higher Education, Thailand, as well as the Smoking Research Foundation and the Grants-in-Aid from the Japanese Ministry of Education, Culture, Sport, and Science, Japan.

References

- Angus, W.G.R., Larsen, M.C., Jefcoate, C.R., 1999. Expression of *CYP1A1* and *CYP1B1* depends on cell-specific factors in human breast cancer cell lines: role of estrogen receptor status. *Carcinogenesis* 20, 947–955.
- Beischlag, T.V., Perdew, G.H., 2005. ER α -AHR-ARNT protein-protein interactions mediate estradiol dependent transrepression of dioxin-inducible gene transcription. *J. Biol. Chem.* 280, 21607–21611.
- Brake, P.B., Arai, M., As-Sanie, S., Jefcoate, C.R., Widmaier, E.P., 1999. Developmental expression and regulation of adrenocortical cytochrome P4501B1 in the rat. *Endocrinology* 140, 1672–1680.
- Brosens, J.J., Parker, M.G., 2003. Oestrogen receptor hijacked. *Nature* 423, 487–488.

- Burke, M.D., Thompson, S., Weaver, R.J., Wolf, C.R., Mayer, R.T., 1994. Cytochrome P450 specificities of alkoxyresorufin O-dealkylation in human and rat liver. *Biochem. Pharmacol.* 30, 923–936.
- Caceres, D.D., Hancke, J.L., Burgos, R.A., Wikman, G.K., 1997. Prevention of common colds with *Andrographis paniculata* dried extract: a pilot double-blind trial. *Phytomedicine* 4, 101–104.
- Calabrese, C., Berman, S.H., Babish, J.G., Ma, X., Shinto, L., Dorr, M., 2000. A phase I trial of andrographolide in HIV positive patients and normal volunteers. *Phytother. Res.* 14, 333–338.
- Deng, W.L., 1978. Preliminary studies on the pharmacology of the andrographis product dihydroandrographolide sodium succinate. *Newslett. Chin. Herbal Med.* 8, 26–28.
- Eugster, H.P., Probst, M., Wurgler, F.E., Sengstay, C., 1993. Caffeine, estradiol, and progesterone interact with human CYP1A1 and CYP1A2. Evidence from cDNA-directed expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Drug Metab. Dispos.* 21, 43–49.
- Guengerich, F.P., 2000. Metabolism of chemical carcinogens. *Carcinogenesis* 21, 345–351.
- Guengerich, F.P., Shimada, T., 1998. Activation of procarcinogens by human cytochrome P450 enzymes. *Mutat. Res.* 400, 201–213.
- Iwanari, M., Nakajima, M., Kizu, R., Hayakawa, K., Yokoi, T., 2002. Induction of CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1 mRNAs by nitropolycyclic aromatic hydrocarbons in various human tissue-derived cells: chemical-, cytochrome P450 isoforms-, and cell-specific differences. *Arch. Toxicol.* 76, 287–298.
- Jaruchotikamol, A., Jarukamjorn, K., Sirisangtrakul, W., Sakuma, T., Kawasaki, Y., Nemoto, N., 2007. Strong synergistic induction of CYP1A1 expression by andrographolide plus typical CYP1A inducers in mouse hepatocytes. *Toxicol. App. Pharmacol.* 224, 156–162.
- Jarukamjorn, K., Sakuma, T., Miyaura, J., Nemoto, N., 1999. Different regulation of the expression of mouse hepatic cytochrome P450 2B enzymes by glucocorticoid and phenobarbital. *Arch. Biochem. Biophys.* 369, 89–99.
- Jarukamjorn, K., Don-in, K., Makejaruskul, C., Laha, T., Daodee, S., Pearaksa, P., Sripanidkulchai, B., 2006. Impact of *Andrographis paniculata* crude extract on mouse hepatic cytochrome P450 enzymes. *J. Ethnopharmacol.* 105, 464–467.
- Jarukamjorn, K., Nemoto, N., 2008. Pharmacological aspects of *Andrographis paniculata* on health and its major diterpenoid constituent andrographolide. *J. Health Sci.* 54, 370–381.
- Kimura, S., Gonzalez, F.J., Nebert, D.W., 1986. Tissue-specific expression of the mouse dioxin-inducible P₁450 and P₂450 genes: differential transcriptional activation and mRNA stability in liver and extrahepatic tissues. *Mol. Cell Biol.* 6, 1471–1477.
- Lai, K.P., Wong, M.H., Wong, C.K.C., 2004. Modulation of AhR-mediated CYP1A1 mRNA and EROD activities by 17 β -estradiol and dexamethasone in TCDD-induced H411E cells. *Toxicol. Sci.* 78, 41–49.
- Lee, A.J., Cai, M.X., Thomas, P.E., Conney, A.H., Zhu, B.T., 2003. Characterization of the oxidative metabolites of 17 β -estradiol and estrone formed by 15 selectively expressed human cytochrome p450 isoforms. *Endocrinology* 144, 3382–3398.
- Matthews, J., Gustafsson, J., 2006. Estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor signaling pathways. *Nucl. Recept. Signal.* 4, e016.
- Mishra, S.K., Sangwan, N.S., Sangwan, R.S., 2007. *Andrographis paniculata* (Kalmegh): a review. *Pharmacog. Rev.* 1, 283–298.
- Nemoto, N., Sakurai, J., Tazawa, A., Ishikawa, T., 1989. Proline-dependent expression of aryl hydrocarbon hydroxylase in C57BL/6 mouse hepatocytes in primary culture. *Cancer Res.* 49, 5863–5869.
- Nemoto, N., Sakurai, J., 1992. Differences in regulation of gene expression between Cyp1a-1 and Cyp1a-2 in adult mouse hepatocytes in primary culture. *Carcinogenesis* 13, 2249–2254.
- Ohtake, F., Takeyama, K.I., Matsumoto, T., Kitagawa, H., Yamamoto, Y., Nohara, K., Tohyama, C., Krust, A., Mimura, J., Chambon, P., Yanagisawa, J., Fujii-Kuriyama, Y., Kato, S., 2003. Modulation of oestrogen receptor signaling by association with the activated dioxin receptor. *Nature* 423, 545–550.
- Omura, T., Sato, R., 1964. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.* 239, 2370–2378.
- Panossian, A., Hovhannisyan, A., Mamikonyan, G., Abrahamian, H., Hambardzumyan, E., Gabrielian, E., Goukasova, G., Wikman, G., Wagner, H., 2000. Pharmacokinetic and bioavailability of andrographolide from *Andrographis paniculata* fixed combination Kan Jang in rats and human. *Phytomedicine* 7, 351–364.
- Pekthong, D., Blanchard, N., Abadie, C., Bonet, A., Heyd, B., Manton, G., Berthelot, A., Richert, L., Martin, H., 2009. Effects of *Andrographis paniculata* extract and andrographolide on hepatic cytochrome P450 mRNA expression and monooxygenase activities after *in vivo* administration to rats and *in vitro* in rat and human hepatocyte cultures. *Chem.-Biol. Int.* 179, 247–255.
- Ricci, M.S., Toscano, D.G., Mattingly, C.J., Toscano, W.A., 1999. Estrogen receptor reduces CYP1A1 induction in cultured human endometrial cells. *J. Biol. Chem.* 274, 3430–3438.
- Ryu, D.Y., Hodgson, E., 1999. Constitutive expression and induction of CYP1B1 mRNA in the mouse. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 13, 249–251.
- Safe, S., Wormke, M., 2003. Inhibitory aryl hydrocarbon receptor–estrogen receptor α cross-talk and mechanisms of action. *Chem. Res. Toxicol.* 16, 807–816.
- Sakuma, T., Ohtake, M., Katsurayama, Y., Jarukamjorn, K., Nemoto, N., 1999. Induction of CYP1A2 by phenobarbital in the livers of aryl hydrocarbon-responsive and -nonresponsive mice. *Drug Metab. Dispos.* 27, 379–384.
- Savas, U., Bhattacharyya, K.K., Christou, M., Alexander, D.L., Jecoate, C.R., 1994. Mouse cytochrome P-450EF, representative of a new 1B subfamily of cytochrome P450s; cloning, sequence determination and tissue expression. *J. Biol. Chem.* 269, 14905–14911.
- Whitlock, J.P., 1999. Induction of cytochrome P4501A1. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 103–125.



***Andrographis paniculata*: a review of aspects of regulatory mechanisms of hepatic CYP1A enzymes**

[*Andrographis paniculata*: una revisión de los aspectos de los mecanismos reguladores de las enzimas hepáticas CYP1A]

Kanokwan JARUKAMJORN*[#]

*Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002 Thailand.

[#]Department of Toxicology, Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences, University of Toyama, Toyama 930-0194 Japan.

*Contact: E-mail: kanok_ja@kku.ac.th; kjarukam@hotmail.com

Submitted February 13, 2008; Accepted February 29, 2008

Abstract

Cytochrome P450 (CYP) enzymes are involved in the biotransformation of a plethora of structurally diverse compounds of both endogenous and exogenous as well as numerous interactions between drugs and food, herbs and other drugs. CYP1A participates in the metabolic activation of chemical mutagens from daily exposure to tobacco smoke, cooked food, automobile exhaust, and industrial processes, in which its mechanism of transcriptional regulation has been postulated through an arylhydrocarbon receptor (AhR) and the AhR nuclear translocator. The activity of CYP1A is thus suspected to be not only a critical aspect for risk assessment when determining carcinogenicity, but also a considerable safety criterion for drug development testing. *Andrographis paniculata*, a folklore remedy employed as an herbal supplement for an alternative medicinal therapy or for health promotion including its major diterpenoid constituent andrographolide has been reported to possess several pharmacological activities. Besides the potentials for the treatment of ailments, the crude extract of *Andrographis paniculata* has exhibited capability to increase hepatic CYP1A enzymes including ethoxresorufin and methoxresorufin activities, in accord with the inductive effects conveyed by andrographolide. Strong synergistic induction of CYP1A1 by co-treatment with andrographolide and a typical CYP1A inducer as well as a robust increase of CYP1A1 by andrographolide in which the induction was blocked by an AhR antagonist resveratrol, affirmed participation of AhR-mediated transcription activation on andrographolide-induced CYP1A1 expression. Therefore, some advice and precautions for rational use of *Andrographis paniculata* and/or andrographolide including some associated risks are of clear concern. Moreover, investigations not restricted to the AhR-mediated pathway revealing the synergistic mechanism of andrographolide on CYP1A1 induction as well as influences of other confounding substances in this herb and andrographolide analogues, which may contribute modulatory effects on regulation of P450s machinery, are needed and are yet to be elucidated.

Keywords: *Andrographis paniculata*, andrographolide, AhR, CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, EROD, MROD, PROD, P450, UGT1A6.

Resumen

Las enzimas del citocromo P450 (CYP) están involucradas en la biotransformación de una plétora de compuestos, tanto endógenos como exógenos, de estructuras diversas así como numerosas interacciones entre fármacos y alimentos, hierbas y otros fármacos. El CYP1A participa en la activación metabólica de mutágenos químicos de exposición diaria como el humo de tabaco, los alimentos cocidos, la descarga automovilística y los procesos industriales en los cuales el mecanismo de acción de regulación transcripcional ha sido postulado a través de un receptor aril-hidrocarbónico (AhR) y el translocador AhR nuclear. Se sospecha que la actividad de CYP1A no es solamente un aspecto crítico para la evaluación de riesgo cuando se determina carcinogenicidad, también es un criterio considerable de seguridad para evaluar el desarrollo de un fármaco. *Andrographis paniculata*, un remedio del folklore empleado como un suplemento herbario para una terapia medicinal alternativa o para la promoción de salud incluye su mayor constituyente el diterpenoide andrografolide el que posee varias actividades farmacológicas. Además de las potencialidades para el tratamiento de dolencias, el extracto crudo de *Andrographis paniculata* ha demostrado la capacidad de aumentar las enzimas CYP1A hepáticas incluidas las actividades etoxiresorufina y metoxiresorufina, de acuerdo con los efectos inductores llevados a cabo por andrografolide. La fuerte inducción sinérgica de CYP1A1 por co-tratamiento con andrografolide y un típico inductor de CYP1A, así como un gran incremento de CYP1A1 por andrografolide en el cual la inducción fue bloqueada por un antagonista AhR, resveratrol, afirmó la participación de la activación transcripcional mediada por AhR sobre la expresión de CYP1A inducida por andrografolide. Por consiguiente, son de preocupación clara algunos consejos y precauciones para el uso racional de *Andrographis paniculata* y/o andrografolide que incluyan algunos riesgos asociados. Además, necesitan ser elucidadas las investigaciones no restringidas a la vía mediada por AhR que revela el mecanismo sinérgico de andrografolide sobre la inducción de CYP1A1 así como las influencias de otras sustancias presentes en esta hierba y análogos de andrografolide, los cuales pueden contribuir a los efectos moduladores sobre la regulación de la maquinaria de CYPs.

Palabras clave: *Andrographis paniculata*, andrografolide, AhR, CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, EROD, MROD, PROD, P450, UGT1A6.

Abbreviation list:

AhR- aryl hydrocarbon receptor;	ARNT- AhR nuclear translocator;	B[a]A- benz[a]anthracene;
β-NF- β-naphthoflavone;	DRE- dioxin responsive element;	EROD- ethoxyresorufin O-deethylase;
HAA- heterocyclic arylamines;	iNOS- inducible nitric oxide synthase;	Mac- membrane-activated complex;
MROD- methoxyresorufin O-deethylase;	PAH- polycyclic aromatic hydrocarbons;	CYP- cytochrome P450;
ROS- reactive oxygen species;	TCDD- 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin;	UGT- UDP-glucuronosyltransferase.

INTRODUCTION

Mammals are equipped with a variety of enzymes that catalyze the transformation of xenobiotics to form, in general, more polar metabolites that are more readily excreted. The concept of phase I and phase II biotransformations, which captures the general view of metabolism of foreign compounds as a detoxification process, was introduced in the 1970s (Williams, 1971). Briefly, phase I proceeds by oxidative, reductive, and hydrolytic pathways, and lead to the introduction of a functional group (OH, SH, NH₂, or COOH) and to a modest increase of hydrophilicity, while phase II modifies the newly introduced functional group to form O- and N-glucuronides, sulfate esters, various α-carboxyamides, and glutathionyl adducts, all with increased polarity relative to the unconjugated molecules (Parkinson, 1996). Although most biotransformations that xenobiotics undergo lead to polar, less toxic metabolites, a consideration of the structural features and toxic effects of certain compounds suggested that these same biotransformation pathways may also generate chemically reactive species that mediate the toxic effects of the parent compounds. Thus catalytic pathways that usually protect mammals against the toxicity of lipophilic organic compounds can, when the structural features of the substrate molecules contain latent chemical reactivity, lead to exerting toxicity (Mabic et al., 1999). This process is referred to as metabolic activation, bioactivation, or toxification (Miller and Guengerich, 1982; Caldwell and Jakoby, 1983; Ander, 1985; Vermeulen et al., 1992; Vermeulen, 1996). Metabolism in the body apparently plays a dual role in the handling of and protection against exogenous compounds. In most cases, toxic (chemically reactive) intermediates will be detoxified or bioinactivated at their site of formation, but under circumstances of inefficient detoxification, via primary reaction with cellular constituents, however, they can induce biochemical and physiological changes, which may lead to toxic effects such as cell damage, cell death, or tumor genesis (Caldwell and Jakoby, 1983; Ander, 1985).

The toxic manifestations of xenobiotics are a consequence of induction of phase I and II enzymes, especially when induction above the basal level of phase I enzymes is not followed by an increase in phase II conjugating activity. Organisms have amplified various existing metabolic mechanisms to counteract and eliminate the toxicity and carcinogenicity of xenobiotics such as drugs and environmental contaminants.

The cytochrome P450 1 family

A central mechanism of detoxification is oxidative metabolism by cytochrome P450s (CYP), members of the hemethiolate monooxygenase gene superfamily (Honkakoski and Negishi, 1997). Induction of hepatic CYPs rationalizes the activation of innocuous and/or hazardous chemicals to serve as a substrate for the action of phase II bio-transformation (Gibson and Skett, 2001). Humans are exposed to harmful foreign chemicals and materials from dietary, therapeutic, environmental, and occupational sources. Defense mechanisms have evolved to protect against toxic insults *per se*. The CYP superfamily is the most important enzyme system in terms of phase I-catalyzed oxidative biotransformations that result in the formation of biologically reactive metabolites (Gonzalez and Gelboin, 1994). There are multiple CYP enzymes that catalyze activation of a number of environmental pro-carcinogens to ultimate carcinogenic metabolites (Guengerich and Shimada, 1998; Guengerich, 2000). CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1 have been shown to be the major enzymes in the metabolism of potential pro-carcinogens such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), nitro-PAHs, and aryl and heterocyclic arylamines (HAA) (Gelboin, 1980; Petry et al., 1996; Shimada et al., 1996; Sjogren et al., 1996; Shimada et al., 2002). Oxygenation of carcinogenic PAH and HAA (pro-carcinogens) gives rise to arene oxides, diol epoxides, and other electrophilic reactive species (ultimate carcinogens) that form DNA and protein adducts, leading to tumor formation and toxicity (Gelboin, 1980; Miller and Miller, 1981; Conney, 1982; Jerina, 1983). The levels of CYP enzymes in individuals

have been reported to be one of the key determinants in understanding different susceptibilities of humans to chemical carcinogenesis (Pelkonen and Nebert, 1982; Guengerich, 1988; Hecht, 1999; Shimada, 2000; Guengerich, 2000). In addition to being substrates, PAHs are also inducers of *CYP1A1* and *CYP1A2* genes. The mechanisms of transcriptional regulation of these two genes are not the same. *CYP1A1* is expressed constitutively in several extrahepatic tissues, but not in the liver. However, while *CYP1A1* expression has been demonstrated in the liver after inducer treatment, *CYP1A2* is constitutively and inducibly expressed only in the liver (Kimura et al., 1986; Iwanari et al., 2002). Aryl hydrocarbon receptor (AhR) has been shown to play central roles in the regulation and induction of *CYP1A1* and *CYP1A2* by a prototype inducer, 2,3,7,8-tetra-chlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD; Whitlock, 1999). In addition to the two members of the *CYP1A* subfamily, *CYP1B1*, a relatively new member of the superfamily 1 (Savas et al., 1994; Brake, 1999; Ryu and Hodgson, 1999), has been postulated to be involved in the metabolism of PAHs such as TCDD through AhR and the AhR nuclear translocator (ARNT)-mediated pathway (Savas et al., 1994; Ryu and Hodgson, 1999). Constitutive expression of *CYP1B1* was detected in steroidogenic tissues such as adrenal glands, ovaries, and testes, but it was not detected in xenobiotic-metabolizing organs such as liver, kidney, and lung (Iwanari et al., 2002; Savas et al., 1994). Since CYP1 is responsible for activating carcinogenic aromatic amines and heterocyclic amines, to which we are exposed to every day via tobacco smoke, cooked food, automobile exhaust, and industrial processes where such exposures have been causatively linked to an increased incidence of cancers in certain population (Procter, 2001), the metabolic activation of CYP1 is a critical step for risk assessment of cancer, and its regulation is also of clear interest.

Phytomedicine: *Andrographis paniculata*

An herb is a plant or plant part used for its scent, flavor, or therapeutic properties. Herbal medicinal products are dietary supplements that are taken to improve health. Many herbs have been used for a long time for claimed health benefits. Herbs are eaten in combinations, in relatively large, unmeasured quantities under highly socialized conditions. The real challenge lies not in proving whether herbs have health benefits, but in defining what these benefits

are and developing the methods to expose them by scientific means (Tapsell et al., 2006).

The metabolism of a drug can be altered by another drug or foreign chemical and such interactions can often be clinically significant. The observed induction and inhibition of CYP enzymes by natural products in the presence of a prescribed drug has (among other reasons) led to the general acceptance that natural therapies can have adverse effects, contrary to the popular beliefs. Herbal medicines such as St. John's wort (*Hypericum perforatum*), garlic (*Allium sativum*), ginseng (*Panax ginseng*), echinacea (*Echinacea angustifolia*, *E. purpurea*, *E. pallida*), saw palmetto (*Serenoa repens*), and ginkgo (*Ginkgo biloba*) have given rise to serious clinical interactions when co-administered with prescription medicines (Obach, 2000; Izzo and Ernst, 2001; Delgoda and Westlake, 2004; Strandell et al., 2004). Such adversities have spurred various pre-clinical and *in vitro* investigations on a series of other herbal remedies, with their clinical relevance remaining to be established. Although the presence of numerous active ingredients in herbal medicines complicates experimentation, the observable interactions with CYP enzymes warrant systematic studies. Hence metabolism-based interactions can be predicted and potential adverse drug reactions avoided more readily.

Andrographis paniculata Nees. (Family Acanthaceae), traditionally employed for centuries in Asia and Europe as a folklore remedy for a wide spectrum of ailments, or an herbal supplement for health promotion, is nowadays incorporated into a number of herbal medicinal preparations. It is found in the *Indian Pharmacopoeias* and is a prominent component in at least 26 Ayurvedic formulas (Madav et al., 1995). In traditional Chinese medicine, it is an important "cold property" herb used to rid the body of heat, as in fevers, and to dispel toxins from the body (Deng, 1978). In Scandinavian countries, it is commonly used to prevent and treat the common cold (Caceres et al., 1997). *Andrographis paniculata* is one of the top 10 herbal medicines, which the Thai FDA has promoted as an alternative medicinal therapy for fever and inflammation.

Andrographolide is the most medicinally active phytochemical found in the plant, including other constituents such as deoxyandrographolide, 19 β -D-glucoside, neo-andrographolide, 14-deoxy-11,12-dihydroandrographolide, homoandrographolide, andrographan, andrographosterin, and stigmasterol (Cava et al., 1965; Chem and Liang, 1982; Shama et

al., 1992; Siripong et al., 1992). Extensive research has revealed that the whole-plant extract possesses many useful bioactivities, such as anti-inflammatory (Shen et al., 2002), antiviral (Calabrese et al., 2000), anticancer (Kumar et al., 2004), and immunostimulatory (Puri et al., 1993; Iruretagoneya et al., 2005) activities. On the other hand, male reproductive toxicity (Akbarsha and Murugaian, 2000) and cytotoxicity (Nanduri et al., 2004) of this plant have been reported as well. Pharmacokinetic studies showed that andrographolide is quickly absorbed and extensively metabolized in rats and humans (Panossian et al., 2000). Andrographolide metabolites are mainly identified as sulfonic acid adducts and sulfate compounds (He et al., 2003a, b, c), as well as glucuronide conjugations (Cui et al., 2005). One of the metabolites, 14-deoxy-12(R)-sulfoandrographolide, was reported to be identical to the anti-inflammatory drug, Lianbizhi, which being clinically used in China (Meng, 1981). To gain additional insight into metabolic pathway of *Andrographis paniculata*, study of its components within the chemical pool of the plant affecting regulatory pathway of CYPs expression is of current interest.

Potential of *Andrographis paniculata* on CYPs induction

Besides attempts to determine the regulatory mechanism of CYPs expression by chemicals or endogenous factors, herbal medicines and/or their active constituents, as well as chemical-herbal medicine interactions are worth investigating to discover their influences on the regulatory pathway of CYPs expression. Understanding such regulation may ascertain how restoration of health or recovery from disease can be accomplished by consuming herbal medicines.

Phytochemicals present in herbal medicines have been reported to possess many pharmacological activities. Extensive studies have been performed to explore their potential for treatment or prevention of ailments. The aerial parts of *Andrographis paniculata* have been traditionally used as a hepatoprotective and hepatostimulative agent in Southeast Asian folklore remedy to treat a broad range of disorders including liver disorders and jaundice (Kapil et al., 1993; Trivedi and Rawal, 2000). The extract of *Andrographis paniculata* including andrographolide, a major diterpenoid component and its analogues have been reported to exhibit a marked effect on hepatic bio-transformation enzymes, i.e., aniline hydroxylase, *N*- and *O*-demethylase (Choudhary and

Poddar, 1984), alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase (Trivedi and Rawal, 2000), including phase II enzymes, i.e., glutathione *S*-transferase and DT-diaphorase (Singh et al., 2001). Modulatory influence of *Andrographis paniculata* extract on a responsive isoform of hepatic CYPs was recently reported in mouse hepatic microsomes compared to typical CYP-inducers (3-MC for CYP1A and PB for CYP2B), in terms of total CYP content and related alkoxyresorufin *O*-dealkylase activities (Jarukamjorn et al., 2006). In mice administered with either the aqueous or alcoholic extract of *Andrographis paniculata* including 3-MC treated mice, the CYP content was comparable to the untreated mice, whereas for those PB treated, the CYP content was markedly increased. The purified 3-MC-induced CYP1A1 and CYP1A2 showed substrate-selectivity for ethoxyresorufin and methoxyresorufin, respectively (Burke et al., 1994), while that of pentoxyresorufin was selectively measured CYP2B10 in PB-induced microsome (Sakuma et al., 1999; Jarukamjorn et al., 1999). 3-MC significantly increased EROD and MROD, whereas PROD was markedly elevated by PB. With respect to treatment-duration, the increase of EROD and PROD activities by the extract of *Andrographis paniculata* show a time-dependent pattern (Jarukamjorn et al., 2006). These results conveyed CYP1A1 and CYP2B10 as responsive CYP isoforms for *Andrographis paniculata*.

How the components within the chemical pool of the crude extract of *Andrographis paniculata* affect the hepatic CYP pathway is not well understood; to date evaluation of the individual chemical components present in the plant extract on the aspect of specific CYP isoforms has not been carried out. The impact of andrographolide, a major diterpenoid isolated from this plant, on hepatic CYP enzymes, especially CYP1 family, is further crucial step in the field of bio-transformation and drug interaction. The results of such an inquiry might provide valuable guidelines for the rational administration and precautions for the use of the herbal plant. Moreover, since several confounding substances in the crude extract contribute effectively in a synergistic or antagonistic pattern to the expression of bioactivation and detoxification machinery as well as the hepatic microsomal CYP-associated activity's profile, their inserted pathways cannot be precluded.

Impact of andrographolide on CYP1 family

Andrographolide (3-[2-[decahydro-6-hydroxy-5-(hydroxylmethyl)-5,8a-dimethyl-2-methylene-1-naphthalenyl]ethylidene] dihydro-4-hydroxy-2(3H)-furanone) is the major diterpenoid constituent of the plant *Andrographis paniculata*, and has been reported to show hepatoprotective activity in mice against carbon tetrachloride and paracetamol intoxication (Handa and Sharma, 1990a; Handa and Sharma, 1990b), and to possess pharmacological activity, including inhibition of iNOS expression (Chiou et al., 1998; Chiou et al., 2000), Mac-1 expression, and ROS production (Shen et al., 2000; Shen et al., 2002), and a protective effect against cytotoxicity (Kapil et al., 1993). This compound has recently been shown to work as an anti-inflammatory agent by reducing the generation of ROS in human neutrophils (Shen et al., 2002), as well as preventing microglia activation (Wang et al., 2004) and interfering with T cell activation (Iruretagoneya et al., 2005).

The different mechanisms of transcriptional regulation among CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1 (Guengerich and Shimada, 1998; Iwanari et al., 2002), explained the observations that andrographolide-inducibility of the expression of those isoenzymes differed: andrographolide extensively induced CYP1A1 expression, while it induced CYP1A2 less markedly, and did not induce CYP1B1 expression (Jaruchotikamol et al., 2007). Andrographolide significantly up-regulated the expression level of CYP1A1 mRNA, protein, and enzyme in a concentration-dependent manner in monolayer-cultured hepatocytes. In addition, a robust increased expression of UGT1A6 mRNA, which belongs to a battery of AhR-mediated genes by andrographolide was noted (our unpublished observations). Co-treatment with andrographolide and B[a]A synergistically enhanced the expression of CYP1A1 mRNA, in which the expression was blocked by resveratrol, an AhR antagonist (Jaruchotikamol et al., 2007). These observations hint at the possibility that an AhR-mediated transcription activation pathway participates in the synergistic effect of concomitant treatment with andrographolide and B[a]A on CYP1A1 mRNA expression. The increase of luciferase activity seen in TCDD-treated cells transfected with the 3×(DRE), with no enhancement by co-treatment with andrographolide, supported a possibility of andrographolide induced *CYP1A1* after AhR activation. Therefore, andrographolide might influence the expression mechanism of *CYP1A1* by enhanced

efficiency of mRNA processing or inhibition of mRNA turnover.

CONCLUSION AND PERSPECTIVES

As alteration of CYP activities lead in some cases to severe clinical events, an approach to investigating the effects of herbal medicines on the regulation of CYP enzymes and determining critical potential CYPs interaction with pharmaceuticals are of clear necessity. For example, reduction of an HIV-1 protease inhibitor indinavir by St John's wort could lead to the development of drug resistance and treatment failure (Izzo and Ernst, 2001).

Compared with the typical CYP1A inducers, andrographolide, a single substance extracted from *Andrographis paniculata*, interestingly demonstrated a marked synergistic modification of the induction of CYP1A1 mRNA expression (Jaruchotikamol et al., 2007). The expression of CYP1A1 markedly influences the activation of human-related chemical carcinogens (Kimura et al., 1986; Nemoto et al., 1989; Nemoto and Sakurai, 1992; Iwanari et al., 2002). Some possible advice for the rational administration and precautions for using the herbal medicine *Andrographis paniculata*, therefore, is considerably recommended. Moreover some risks associated with the use of *Andrographis paniculata* or andrographolide might be of clear interest, and further evaluation of andrographolide analogs and/or their metabolites seems worthwhile. However, since resveratrol possesses several pharmacological actions, which suggests involvements of several signaling pathways (Chun et al., 1999; Le Corre et al., 2006; Park et al., 2007), further investigations not restricted to the AhR-mediated pathway to reveal the synergistic mechanism might be of value and awaits elucidation.

A couple of recent publications concerning CYP1A induction and drug development testing stated that a candidate drug, which exhibited CYP1A inducibility might be generally discontinued for fear of possible toxic or carcinogenic effects (Nebert et al., 2004; Uno et al., 2004). However, although potential induction of drug-drug interactions and bioactivation of toxic or carcinogenic compounds due to the induction of CYP1A1/CYP1A2 have been a concern for safety in drug development, induction of CYP1A has rarely been the deciding factor to determine whether a compound should be dropped for further testing because of its inducibility of CYP1A (Valles et al., 1995; Gastel, 2001). In the

field of drug development, a drug candidate is dropped only if it has very serious safety issues or clinically relevant drug-drug interactions (Farrell and Murray, 1990). According to these controversies, some advice for the rational administration, risks, and precautions for using the herbal medicine *Andrographis paniculata* and/or andrographolide should be heeded.

REFERENCES

- Akbarsha MA, Murugaian P. 2000. Aspects of the male reproductive toxicity/male antifertility property of andrographolide in albino rats: Effect on the testis and the cauda epididymidal spermatozoa. *Phytother Res* 14:432-435.
- Ander MW. 1985. Bioactivation of Foreign Compounds. New York: Academic Press.
- Brake PB, Arai M, As-Sanie S, Jefcoate CR. 1999. Widmaier EP. Development expression and regulation of adrenocortical cytochrome P4501B1 in the rat. *Endocrinology* 140:1672-1680.
- Burke MD, Thompson S, Weaver RJ, Wolf CR, Mayer RT. 1994. Cytochrome P450 specificities of alkoxyresorufin O-dealkylation in human and rat liver. *Biochem Pharmacol* 30:923-936.
- Caceres DD, Hancke JL, Burgos RA, Wikman GK. 1997. Prevention of common colds with *Andrographis paniculata* dried extract: A pilot double-blind trial. *Phytomedicine* 4:101-104.
- Calabrese C, Merman SH, Babish JG, Ma X, Shinto L, Dorr M, Wells K, Wenner CA, Standish LJ. 2000. A phase I trial of andrographolide in HIV positive patients and normal volunteers. *Phytother Res* 14:333-338.
- Caldwell J, Jakoby WB. 1983. Biological Basis for Detoxification. New York: Academic Press.
- Cava MP, Chan WR, Stein RP, Willist CR. 1965. Andrographolide. *Tetrahedron* 21:2617-2632.
- Chem W, Liang X. 1982. Deoxyandrographolide 19 β -D-glucoside from the leaves of *Andrographis paniculata*. *Planta Med* 15:245-246.
- Chiou W, Chen C, Lin J. 2000. Mechanism of suppression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in RAW264.7 cells by andrographolide. *Br J Pharmacol* 129:1553-1560.
- Chiou W, Lin J, Chen C. 1998. Andrographolide suppressed the expression of inducible nitric oxide synthase in macrophages and restored the vasoconstriction in rat aorta treated with lipopolysaccharide. *Br J Pharmacol* 125:327-334.
- Choudhary BR, Poddar MK. 1984. Andrographolide and kalmegh (*Andrographis paniculata*) extract *in vivo* and *in vitro* effect on lipid peroxidation. *Meth Find Exp Clin Pharmacol* 6:481-485.
- Chun YJ, Kim MY, Guengerich FP. 1999. Resveratrol is a selective human cytochrome P450 1A1 inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 262:20-24.
- Conney AH. 1982. Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons: G.H.A. Clowes Memorial Lecture. *Cancer Res* 42:4875-4917.
- Cui L, Qiu F, Yao X. 2005. Isolation and identification of seven glucuronide conjugates of andrographolide in human urine. *Drug Metab Dispos* 33:555-562.
- Delgoda R, Westlake ACG. 2004. Herbal interactions involving cytochrome P450 enzymes: a mini review. *Toxicol Rev* 23:239-249.
- Deng WL. 1978. Outline of current clinical and pharmacological research on *Andrographis paniculata* in China. *News Chinese Herbal Med* 10:27-31.
- Farrell GC, Murray M. 1990. Human cytochrome P450 isoforms. Their genetic heterogeneity and induction by omeprazole. *Gastroenterology* 99:885-889.
- Gastel JA. 2001. Early indicators of response in biologically based risk assessment for nongenotoxic carcinogens. *Regul Toxicol Pharmacol* 33:393-398.
- Gelboin HV. 1980. Benzo[a]pyrene metabolism, activation, and carcinogenesis: role and regulation of mixed-function oxidases and related enzymes. *Physiol Rev* 60:1107-1166.
- Gibson GG, Skett P. 2001. Introduction to Drug Metabolism. New York: Nelson Thornes Ltd.
- Gonzalez FJ, Gelboin HV. 1994. Role of human cytochromes P450 in the metabolic activation of chemical carcinogens and toxins. *Drug Metab Rev* 26:165-183.
- Guengerich FP, Shimada T. 1998. Activation of procarcinogens by human cytochrome P450 enzymes. *Mutat Res* 400:201-213.
- Guengerich FP. 1988. Role of cytochrome P-450 enzymes in chemical carcinogenesis and cancer chemotherapy. *Cancer Res* 48:2946-2954.
- Guengerich FP. 2000. Metabolism of chemical carcinogens. *Carcinogenesis* 21:345-351.
- Handa SS, Sharma A. 1990a. Hepatoprotective activity of andrographolide from *Andrographis paniculata* against carbon tetrachloride. *Indian J Med Res (B)* 92:276-283.
- Handa SS, Sharma A. 1990b. Hepatoprotective activity of andrographolide against galactosamine and paracetamol intoxication in rats. *Indian J Med Res (B)* 92:284-292.
- He X, Li JK, Gao H, Qiu F, Hu K, Cui XM, Yao XS. 2003a. Four new andrographolide metabolites in rats. *Tetrahedron* 59:6603-6607.
- He X, Li JK, Gao H, Qiu F, Hu K, Cui XM, Yao XS. 2003b. Six new andrographolide metabolites in rats. *Chem Pharm Bull* 51:586-589.
- He X, Li JK, Gao H, Qiu F, Hu K, Cui XM, Yao XS. 2003c. Identification of a rare sulfonic acid metabolite

- of andrographolide in rats. *Drug Metab Dispos* 31:983-985.
- Hecht SS. 1999. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 91:1194-1210.
- Honkakoski P, Negishi M. 1997. Regulatory DNA elements of phenobarbital-responsive cytochrome P450 CYP2B genes. *J Biochem Mol Toxicol* 12:3-9.
- Iruetagonya MI, Tobar JA, Gonzalez PA, Sepulveda SE, Figueroa CA, Burgos RA, Hancke JL, Kalergis AM. 2005. Andrographolide interferes with T cell activation and reduces experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse. *J Pharmacol Exp Ther* 312:366-372.
- Iwanari M, Nakajima M, Kizu R, Hayakawa K, Yokoi T. 2002. Induction of CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1 mRNAs by nitropolycyclic aromatic hydrocarbons in various human tissue-derived cells: chemical-, cytochrome P450 isoforms-, and cell-specific differences. *Arch Toxicol* 76:287-298.
- Izzo AA, Ernst E. 2001. Interactions between herbal medicines and prescribed drugs: a systematic review. *Drugs* 61:2163-2175.
- Jaruchotikamol A, Jarukamjorn K, Sirisangtrakul W, Sakuma T, Kawasaki Y, Nemoto N. 2007. Strong synergistic induction of CYP1A1 expression by andrographolide plus typical CYP1A inducers in mouse hepatocytes. *Toxicol Appl Pharm* 224:156-162.
- Jarukamjorn K, Don-in K, Makejaruskul C, Laha T, Daodee S, Pearaksa P, Sripanidkulchai B. 2006. Impact of *Andrographis paniculata* crude extract on mouse hepatic cytochrome P450 enzymes. *J Ethnopharmacol* 105:464-467.
- Jarukamjorn K, Sakuma T, Miyaura J, Nemoto N. 1999. Different regulation of the expression of mouse hepatic cytochrome P450 2B enzymes by glucocorticoid and phenobarbital. *Arch Biochem Biophys* 369:89-99.
- Jerina DM. 1983. The 1982 Bernard B. Brodie Award Lecture. Metabolism of aromatic hydrocarbons by the cytochrome P-450 system and epoxide hydrolase. *Drug Metab Dispos* 11:1-4.
- Kapil A, Koul IB, Banerjee SK, Gupta D. 1993. Antihepatotoxic effects of major constituents of *Andrographis paniculata*. *Biochem Pharmacol* 46:182-185.
- Kimura S, Gonzalez FJ, Nebert DW. 1986. Tissue-specific expression of the mouse dioxin-inducible P₁450 and P₃450 genes: differential transcriptional activation and mRNA stability in liver and extrahepatic tissues. *Mol Cell Biol* 6:1471-1477.
- Kumar RA, Sridevi K, Kumar NV, Nanduri S, Rajagopal S. 2004. Anticancer and immunostimulatory compounds from *Andrographis paniculata*. *J Ethnopharmacol* 92:291-295.
- Le Corre L, Chalabi N, Delort L, Bignon YJ, Bernard-Gallon DJ. 2006. Differential expression of genes induced by resveratrol in human breast cancer cell lines. *Nutr Cancer* 56:193-203.
- Mabic S, Castagnoli K, Castagnoli N. 1999. Oxidative metabolic bioactivation of xenobiotics. In: Woolf TF, editor. *Handbook of Drug Metabolism*, New York: Marcel Dekker, Inc. pp. 49-79.
- Madav HC, Tripathi T, Mishra SK. 1995. Analgesic, antipyretic, and antiulcerogenic effects of andrographolide. *Indian J Pharm Sci* 57:121-125.
- Meng ZM. 1981. Studies on the structure of the adduct of andrographolide with sodium hydrogen sulfite. *Acta Pharmacol Sin* 16:571-575.
- Miller EC, Miller JA. 1981. Mechanisms of chemical carcinogenesis. *Cancer* 47:1055-1064.
- Miller RE, Guengerich FP. 1982. Oxidation of trichloroethylene by liver microsomal cytochrome P450: evidence for chlorine migration in a transition state not involving trichloroethylene oxide. *Biochemistry* 21:1090-1097.
- Nanduri A, Nyavanandi VK, Thynuguntla SSR, Kasu A, Pallerla MK, Ram PS, Rajagopal S, Kumar RA, Ramanujam R, Babu JM, Vyas K, Devi AS, Reddy GO, Akella V. 2004. Synthesis and structure-activity relationships of andrographolide analogues as novel cytotoxic agents. *Bioorg Med Chem Lett* 14:4711-4717.
- Nebert DW, Dalton TP, Okey AB, Gonzalez FJ. 2004. Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. *J Biol Chem* 279:23847-23850.
- Nemoto N, Sakurai J. 1992. Differences in regulation of gene expression between *Cyp1a-1* and *Cyp1a-2* in adult mouse hepatocytes in primary culture. *Carcinogenesis* 13:2249-2254.
- Nemoto N, Sakurai J, Tazawa A, Ishikawa T. 1989. Proline-dependent expression of aryl hydrocarbon hydroxylase in C57BL/6 mouse hepatocytes in primary culture. *Cancer Res* 49:5863-5869.
- Obach RS. 2000. Inhibition of human cytochrome P450 enzymes by constituents of St. John's Wort, an herbal preparation used in the treatment of depression. *J Pharmacol Exp Ther* 294:88-95.
- Panossain A, Hovhannisyan A, Mamikonyan G, Abrahamian H, Hambardzumyan E, Gabrielian E, Goukasova G, Wikman G, Wagner H. 2000. Pharmacokinetic and oral bioavailability of andrographolide from *Andrographis paniculata* fixed combination Kan Jang in rats and human. *Phytomedicine* 7:351-364.
- Park CE, Kim MJ, Lee JH, Min BI, Bae H, Choe W, Kim SS, Ha J. 2007. Resveratrol stimulates glucose transport in C2C12 myotubes by activating AMP-activated protein kinase. *Exp Mol Med* 39:222-229.
- Parkinson A. 1996. Biotransformation of xenobiotics. In: Klaassen CD, editor. *Toxicology the Basic Science of Poisons*, New York: McGraw-Hill. p. 113.

- Pelkonen O, Nebert DW. 1982. Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: etiologic role in carcinogenesis. *Pharmacol Rev* 34:189-222.
- Petry T, Schmid P, Achlatter C. 1996. The use of toxic equivalency factors in assessing occupational and environmental health risk associated with exposure to airborne mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Chemosphere* 32:639-648.
- Procter RN. 2001. Tobacco and the global lung cancer epidemic. *Nat Rev Cancer* 1:82-86.
- Puri A, Saxena R, Saxena RP, Saxena KC, Srivastava V, Tandon JS. 1993. Immunostimulant agents from *Andrographis paniculata*. *J Nat Prod* 56:995-999.
- Ryu DY, Hodgson E. 1999. Constitutive expression and induction of CYP1B1 mRNA in the mouse. *J Biochem Mol Toxicol* 13:249-251.
- Sakuma T, Ohtake M, Katsurayama Y, Jarukamjorn K, Nemoto N. 1999. Induction of CYP1A2 by phenobarbital in the livers of aryl hydrocarbon-responsive and -nonresponsive mice. *Drug Metab Dispos* 27:379-384.
- Savas U, Bhattacharyya KK, Christou M, Alexander DL, Jecoate CR. 1994. Mouse cytochrome P-450EF, representative of a new 1B subfamily of cytochrome P450s; cloning, sequence determination and tissue expression. *J Biol Chem* 269:14905-14911.
- Shama A, Lal K, Handa SS. 1992. Standardization of Indian crude drug Kalmegh by high pressure liquid chromatographic determination of andrographolide. *Phytochem Anal* 3:129.
- Shen YC, Chen CF, Chiou WF. 2002. Andrographolide prevents oxygen radical production by human neutrophils: Possible mechanism(s) involved in its anti-inflammatory effect. *Br J Pharmacol* 135:399-406.
- Shen YC, Chen CF, Chiou WF. 2000. Suppression of rat neutrophil reactive oxygen species production and adhesion by the diterpenoid lactone andrographolide. *Planta Med* 66:314-317.
- Shimada T, Hayes CL, Yamazaki H, Amin S, Hecht SS, Guengerich FP, Sutter TR. 1996. Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P450 1B1. *Cancer Res* 56:2979-2984.
- Shimada T. 2000. Human cytochrome P450 1B1 and chemical carcinogenesis. *Rev Toxicol* 39:103-125.
- Shimada T, Inoue K, Suzuki Y, Kawai T, Azuma E, Nakajima T, Shindo M, Kurose K, Sugie A, Yamagishi Y, Fujii-Kuriyama Y, Hashimoto M. 2002. Arylhydrocarbon receptor-dependent induction of liver and lung cytochromes P450 1A1, 1A2, and 1B1 by polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in genetically engineered C57BL/6J mice. *Carcinogenesis* 23:1199-1207.
- Singh RP, Banerjee S, Rao AR. 2001. Modulatory influence of *Andrographis paniculata* on mouse hepatic and extrahepatic carcinogen metabolizing enzymes and antioxidant status. *Phytother Res* 15:382-290.
- Siripong P, Kongkatip B, Prechanukool K, Picha P, Tansuwan K, Taylor WC. 1992. Cytotoxic diterpenoid constituents from *Andrographis paniculata* Nees leaves. 18:187-194.
- Sjogren M, Ehrenberg L, Rannug U. 1996. Relevance of different biological assays in assessing initiating and promoting properties of polycyclic aromatic hydrocarbons with respect to carcinogenic potency. *Mutat Res* 358:97-112.
- Strandell J, Neil A, Carlin G. 2004. An approach to the in vitro evaluation of potential for cytochrome P450 enzyme inhibition from herbals and other natural remedies. *Phytomedicine* 11:98-104.
- Tapsell LC, Hemphill I, Cobiack L, Patch CS, Sullivan DR, Fenech M, Roodenrys S, Keogh JB, Clifton PM, Williams PG, Fazio VA, Inge KE. 2006. Health benefits of herbs and spices: the past, the present, the future. *Med J Aust* 21:S4-24.
- Trivedi N, Rawal UM. 2000. Hepatoprotective and toxicological evaluation of *Andrographis paniculata* on severe liver damage. *Indian J Pharmacol* 32:288-293.
- Uno S, Dalton TP, Derkenne S, Curran CP, Miller ML, Shertzer HG, Nebert DW. 2004. Oral exposure to benzo[a]pyrene in the mouse: detoxication by inducible cytochrome P450 is more important than metabolic activation. *Mol Pharmacol* 65:1225-1237.
- Valles B, Schiler CD, Coassolo P, De Sousa G, Wyss R, Jaek D, Viger-Chougnat A, Rahmani R. 1995. Metabolism of mofarotene in hepatocytes and liver microsomes from different species. Comparison with in vivo data and evaluation of the cytochrome P450 isoenzymes involved in human biotransformation. *Drug Metab Dispos* 23:1051-1057.
- Vermeulen NPE, Donné-Op den Kelder G, Commandeur JNH. 1992. Formation of and protection against toxic reactive intermediates. In: Vermeulen, editor. *Perspectives in Medicinal Chemistry*, Basel: Helvetical Chimica Acta. p. 253.
- Vermeulen NPE. 1996. Role in metabolism in chemical toxicity. In: Ioannides C, editor. *Cytochrome P450 Metabolic and Toxicological Aspects*, New York: CRC Press. pp. 29-53.
- Wang T, Liu B, Zhang W, Wilson B, Hong JS. 2004. Andrographolide reduces inflammation-mediated dopaminergic neurodegeneration in mesencephalic neuroglia cultures by inhibiting microglial activation. *J Pharmacol Exp Ther* 308:975-983.
- Whitlock JP. 1999. Induction of cytochrome P4501A1. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 39:103-125.
- Williams RT. 1971. *Detoxification Mechanisms*. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons.



THE NAGAI FOUNDATION TOKYO
(Founded 1986)
HIGHLY HONORED TO PRESENT

DECEMBER 2, 2008
BANGKOK, THAILAND

THE NAGAI FOUNDATION TOKYO
THE NAGAI AWARD THAILAND FOR SCIENCE RESEARCH 2008

DR. KANOKWAN JARUKAMJORN
THAILAND

THIS AWARD IS PRESENTED IN HONOR OF YOUR EXCELENT
RESEARCH WORK AND IN EXPECTATION OF YOUR MUCH GREATER
ACHIEVEMENT IN PHARMACY AND PHARMACEUTICAL SCIENCES

Tsuneji Nagai

PROF. TSUNEJI NAGAI
PRESIDENT OF THE FOUNDATION