

# HOẠT TÍNH CHỐNG OXY HÓA, KHÁNG KHUẨN VÀ KHÁNG VIÊM CỦA CAO CHIẾT CÂY XƯƠNG KHÍ (*Clinacanthus nutans* L.)

Huỳnh Như Ý<sup>1</sup>, Đỗ Thị Thảo<sup>3</sup>, Nguyễn Trọng Nghĩa<sup>1</sup>, Phan Hoàng Duy<sup>2</sup>, Chế Thị Cẩm Hà<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Khoa học-Đại học Huế

<sup>2</sup>Bệnh viện Trung ương Huế

<sup>3</sup>Viện Công nghệ ADN và Phân tích di truyền, Hà Nội

## TÓM TẮT

Nghiên cứu hoạt tính chống oxy hóa, chống viêm và kháng khuẩn của cao chiết cây Xương khí (*Clinacanthus nutans* (Burm.f.)) Lindau thu tại tỉnh Quảng Ngãi. Chúng tôi nhận thấy chiết xuất từ *C. nutans* chứa các hợp chất (stigmaterol, lupeol, vitexin, isovitexin, orientin, schaftoside) có hoạt tính chống viêm và điều hòa miễn dịch. Cao chiết có khả năng kháng chủng *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Salmonella typhi* (ATCC 6539), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), khả năng chống oxy hóa tốt DPPH với IC<sub>50</sub> 40,02 ± 1,13 µg /mL và ABTS với IC<sub>50</sub> 39,58 ± 1,03 µg/mL. Dòng tế bào RAW264.7 đã được lựa chọn để nghiên cứu độc tính miễn dịch của cao chiết *Clinacanthus nutans*. Kết quả cho thấy, khi nồng độ cao chiết *C. nutans* tăng, khả năng sống của tế bào RAW264.7 có xu hướng giảm dần từ nồng độ 100 µg/mL đến 1000 µg/mL. Cao chiết *C. nutans* ức chế NO hiệu quả, hiệu quả nhất là nồng độ 100 µg/mL, có giá trị IC<sub>50</sub> 12,85 ± 3,41 µg/mL.

**Từ khóa:** *Clinacanthus nutans*, đại thực bào RAW264.7, chống oxy hóa, kháng khuẩn, kháng viêm.

## MỞ ĐẦU

Tình trạng kháng kháng sinh tại Việt Nam ngày càng gia tăng, là mối lo ngại đáng báo động của nhiều loại bệnh khác nhau vì làm ảnh hưởng đến hiệu quả điều trị. Việc sử dụng các loại thuốc kháng viêm, kháng sinh trong thời gian dài làm giảm sự đề kháng, rối loạn tiêu hóa, nguy cơ suy thận, biến chứng tim mạch và có thể gây ra tình trạng kháng kháng sinh (Harirforoosh, 2014; Currie, 2013). Cây Xương khí (*Clinacanthus nutans* (Burm.f.)) Lindau là cây thuốc nổi tiếng trong y học cổ truyền ở Đông Nam Á, là thuốc điều hoà miễn dịch, chữa bỏng, tiểu đường,... (Kho, 2018) do chứa một loạt các hợp chất có hoạt tính sinh học như stigmaterol, lupeol, *b*-sitosterol, belutin, myricyl, vitexin, isovitexin, orientin, schaftoside, isoorientincerebrosid (Ho, 2013). Các hợp chất này được chứng minh giúp ức chế các cytokine viêm, điều trị các bệnh liên quan đến stress oxy hóa ở cấp độ phân tử và tế bào để mô tả sự kích hoạt hoặc ức chế đối với các con đường truyền tín hiệu phụ thuộc vào hoạt tính chống oxy hóa (Borgh, 2013).

Việt Nam đã công bố về đánh giá hoạt tính sinh học của *C. nutans* ở tỉnh An Giang và Ninh Thuận (Dan, 2014). Tuy nhiên chưa có những công bố liên quan của loài cây này ở tỉnh Quảng Ngãi, nhằm đánh giá các hoạt tính kháng viêm, kháng khuẩn của cây *C. nutans* ở Quảng Ngãi đồng thời tìm kiếm những bằng chứng khoa học đáng tin cậy rõ ràng hơn về tác dụng của cây *C. nutans*. tại Việt Nam.

## NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Nguyên liệu

Bộ phận trên mặt đất của cây Xương khí (*Clinacanthus nutans*) tại huyện Mộ Đức, tỉnh Quảng Ngãi được thu hái từ tháng 5-7/2023. Mẫu đã được ThS. Nguyễn Việt Thắng định danh và lưu tại Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế.

Các chủng vi khuẩn kiểm định có nguồn gốc từ Bệnh viện TW Huế: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Salmonella typhi* (ATCC 6539), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853),

Dòng tế bào RAW264.7 nuôi cấy trong DMEM, 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES, 1,0 mM sodium pyruvate, 10% FBS (Gibco). Sau 3-5 ngày, cấy chuyển với tỉ lệ (1:3) và nuôi 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

Dòng tế bào RAW264.7 được cung cấp bởi hãng InvivoGen, Toulouse, France.



Hình 1. Thân lá cây Xương khí (*Clinacanthus nutans*)

**Phương pháp**

*Tạo cao chiết:* phần thân lá cây được rửa sạch và tráng với nước cất. Để ráo và sấy ở 37°C từ 2-3 ngày đến khi độ ẩm đạt 6-7%, nghiền nhỏ bằng máy nghiền IKA, tốc độ máy 34.000 vòng/phút, cho đến kích thước mắt lưới 0,25 mm. Sau đó, cho một lượng mẫu đã được nghiền ủ với dung môi ethanol 70% theo tỉ lệ 1:10 vào chai thủy tinh có nắp kín, ủ 3 ngày ở nhiệt độ phòng. Quá trình này lặp lại 3 lần để tách được hoàn toàn có trong mẫu thử. Lọc mẫu bằng giấy Whatman No.1; dịch lọc được cô cạn bằng thiết bị cô quay chân không ở 60°C cho đến khi cặn chiết màu nâu đen (độ ẩm 4,7%). Bảo quản mẫu cao chiết ở 4°C.

*Khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa bằng thử nghiệm DPPH và ABTS*

Đánh giá khả năng bắt gốc DPPH: Hoạt tính chống oxy hóa thể hiện qua khả năng làm giảm màu của DPPH, được xác định bằng cách đo quang ở bước sóng 517 nm. Pha DPPH nồng độ 100 µM trong methanol. Hỗn hợp phản ứng có thể tích 3 mL, gồm 1,5 mL mẫu khảo sát ở các nồng độ 100 µg/mL, 75 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 5 µg/mL và dung dịch DPPH nồng độ 100 µM. Các hỗn hợp phản ứng được lắc trong 1 phút và ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút, đo quang ở bước sóng 517 nm. Mẫu trắng được tiến hành tương tự mẫu thử nhưng thay 1,5 mL DPPH bằng 1,5 mL methanol. Tác dụng bắt gốc tự do DPPH được đánh giá qua giá trị IC<sub>50</sub> (TCVN 11939:2017).

Đánh giá khả năng bắt gốc ABTS: Gốc ABTS được tạo ra bằng phản ứng giữa ABTS (7 mM) với K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (2,45 mM) trong bóng tối ở nhiệt độ phòng trong 16 giờ. Lấy 0,1 mL dung dịch mẫu với các nồng độ khác nhau (từ 5 đến 100 µg/mL) trộn với 3,9 mL dung dịch gốc ABTS tạo ra ở trên. Ủ 7 phút hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng. Độ hấp thụ quang của dung dịch sau phản ứng được đo ở bước sóng 734 nm. Ascorbic acid làm chất đối chứng dương (Re, 1999).

Tính toán: Hoạt tính kháng oxi hóa (HTKO) được xác định bởi công thức HTKO (%) = [(ODm – ODt)/ODm] × 100 (trong đó ODm, ODt lần lượt là mật độ quang mẫu trắng và mẫu thử). Xây dựng đường biểu diễn sự tương quan giữa HTKO (%) và nồng độ mẫu thử, từ đó suy ra giá trị IC<sub>50</sub> là nồng độ ức chế 50% gốc tự do DPPH/ABTS.

*Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng khuẩn:* Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường Luria Bertani broth đến khi đạt được mật độ tế bào khoảng 1-5×10<sup>6</sup> CFU/mL. Lấy 0,1 mL dịch vi khuẩn và trải đều trên đĩa petri có chứa môi trường Tryptic Soy Agar. Các đĩa giấy thấm vô trùng (đường kính 6mm) chứa 20µL cao chiết đã pha loãng bằng DMSO 5% ở các nồng độ 100 mg/mL, 75 mg/mL, 50 mg/mL và 25 mg/mL được đặt lên bề mặt đĩa đã dàn đều vi khuẩn. Sau đó, các đĩa Petri đặt ở 4°C trong 6 giờ cho cao chiết thấm vào môi trường thạch và nuôi ở 35°C trong 24 giờ. Đĩa giấy kháng sinh Ampicilin được sử dụng làm đối chứng dương và đối chứng âm là DMSO 5%. Khả năng kháng khuẩn của cao chiết đối với các chủng vi khuẩn được đo bằng đường kính vòng vô khuẩn sau 24 giờ nuôi (Celikel, 2008).

*Phương pháp xác định khả năng gây độc tế bào:* Dòng tế bào RAW264.7 lưu giữ trong nitơ lỏng được hoạt hóa và duy trì trong môi trường DMEM (Invitrogen) và 10% FBS cùng các thành phần thiết yếu khác, nuôi sơ cấp tế bào trong chai nuôi T75 cm<sup>2</sup>, 2 ngày thay môi trường/lần, nuôi ở 5% CO<sub>2</sub>, độ ẩm 98%, 37°C. Tế bào phát triển ở pha log đạt hợp dòng 70-80% sử dụng thử nghiệm độc tính. Khảo sát khả năng gây độc tế bào RAW 264.7 của cao chiết thông qua khả năng sống sót của tế bào RAW 264,7 trong điều kiện nuôi có bổ sung cao chiết ở 3 nồng độ thử nghiệm: 100 µg/mL, 500 µg/mL, 1000 µg/mL và đối chứng âm là DMSO 5%. Tiến hành nuôi và đánh giá với mật độ 2 × 10<sup>5</sup> tế bào/cm<sup>2</sup> trên đĩa 96 giếng, lặp lại 3 lần. Những giếng không ủ mẫu cao chiết *C. nutans* được xem là đối chứng. Sau 24 giờ tiến hành thay môi trường có bổ sung 3 nồng độ cao chiết 100 µg/mL, 500 µg/mL, 1000 µg/mL, khả năng sống của tế bào được đếm sau khi nhuộm trypan blue sau 72h.

*Phương pháp xác định khả năng ức chế sản sinh NO của dòng tế bào đại thực bào RAW 264.7:* dòng tế bào RAW 264.7 nuôi ở đĩa 96 giếng với 2 × 10<sup>5</sup> tb/giếng, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> trong 24h. Sau 24h, môi trường nuôi được loại bỏ, thay bằng DMEM (Invitrogen) không có FBS trong 3h. Tế bào sau đó được ủ cao chiết *C. nutans* ở các nồng độ khác nhau trong 2h trước khi được kích thích sản sinh yếu tố NO bằng LPS (10 µg/mL) trong 24h. Đối chứng âm là những giếng không ủ mẫu cao chiết *C. nutans* và chỉ sử dụng dung dịch pha mẫu. Đối chứng dương là Dexanethasone (Sigma) ở các nồng độ 100; 50; 25; 12.5; 6.25; 3.125 µM. Nitrite (NO<sup>2-</sup>) là chỉ thị cho việc tạo NO, được xác định nhờ bộ kit Griess Reagent System (Promega Cooperation, WI, USA). 100 µL môi trường nuôi tế bào (ủ mẫu) được chuyển sang đĩa 96 mới và thêm 100 µL Griess reagent: 50 µL of 1% (w/v) sulfanilamide trong 5% (v/v) phosphoric acid và 50 µL 0,1% (w/v) N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride pha trong nước. Hỗn hợp này được ủ tiếp ở nhiệt độ phòng trong 10 phút và hàm lượng nitrite được đo bằng microplate reader, bước sóng 540 nm. Môi trường DMEM không FBS được sử dụng như giếng trắng (blank). Hàm lượng nitrite của từng mẫu thí nghiệm được xác định nhờ vào đường cong hàm lượng chuẩn NaNO<sub>2</sub> và được so sánh % với mẫu chứng âm (LPS). Đĩa nuôi tế bào thử nghiệm sự biểu hiện NO, sau khi thu dịch nổi xác định hàm lượng NO sẽ được thêm vào mỗi giếng 90 µL môi trường nuôi tế bào và 10 µL MTT (nồng độ cuối cùng là 5 mg/mL). Sau 4h, loại bỏ môi trường, tinh thể formazan được hòa tan bằng 50 µL DMSO 100%. Khả năng ức chế sản sinh NO tương ứng của mẫu được xác định nhờ công thức :

$$\% \text{ ức chế} = 100\% - [\text{hàm lượng NO}_{\text{sample}} / \text{hàm lượng NOLPS}] * 100$$

Các phân tích được thực hiện ba lần lặp lại, kết quả là giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn. Tất cả các số liệu được xử lý bằng chương trình MS. Excel 2016 (Đặng Văn Giáp, 2000).

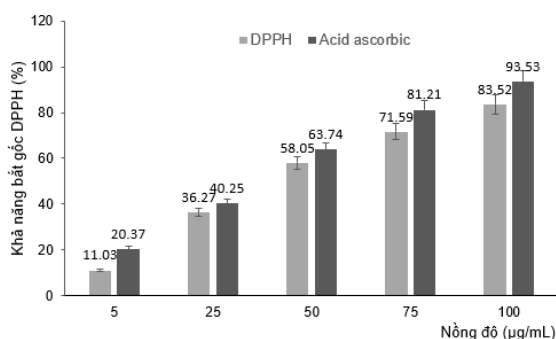
## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Hoạt tính chống oxy hóa của cao chiết Xương khỉ trên thử nghiệm DPPH và ABTS

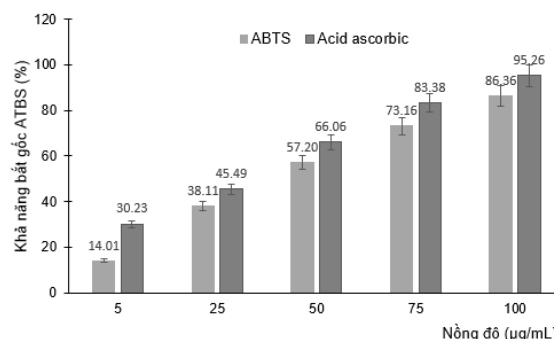
Việc thu dọn các gốc tự do là một trong các cơ chế ức chế quá trình oxy hóa lipid, thường được sử dụng để đánh giá hoạt tính chống oxy hóa của mẫu nghiên cứu. Các chất kháng oxy hóa có khả năng trung hòa gốc DPPH tự do tạo thành sản phẩm khử DPPH-H, dung dịch phản ứng sẽ chuyển từ màu tím sang màu vàng cam. Trong khi đó, Cation ABTS<sup>++</sup> là một chất phát quang màu xanh, khi cho chất chống oxy hóa vào dung dịch chứa ABTS<sup>++</sup>, các chất chống oxy hóa sẽ khử ion này thành ABTS làm đổi màu. Như vậy, khả năng thu dọn gốc ABTS và gốc tự do DPPH là các phương pháp hữu hiệu để xác định hoạt tính chống oxy hóa của các chất trong mẫu nghiên cứu theo khả năng cho nguyên tử hydro hoặc cho electron, dựa trên sự giảm màu của gốc ABTS và DPPH. Khả năng thu dọn gốc tự do DPPH và ABTS của cao chiết giảm dần theo nồng độ từ 100 µg/mL đến 5 µg/mL được trình bày trong (Hình 1) và (Hình 2). Kết quả, được phân tích bởi phần mềm TableCurve 2Dv4 để đưa ra tác động thu nhận các gốc tự do của cao chiết đối với các gốc DPPH và ABTS thông qua giá trị nồng độ ức chế nửa tối đa (IC<sub>50</sub>).

**Bảng 1. Giá trị IC<sub>50</sub> về khả năng bắt gốc DPPH và ABTS của cao chiết**

| Thí nghiệm                     | Khả năng bắt gốc DPPH (IC <sub>50</sub> µg/mL) |              | Khả năng bắt gốc ABTS (IC <sub>50</sub> µg/mL) |              |
|--------------------------------|--|--------------|--|--------------|
|                                | Cao chiết                                      | Ascorbic     | Cao chiết                                      | Ascorbic     |
| 1                              | 39,17  | 38,43        | 37,42  | 26,04        |
| 2                              | 41,78  | 32,06        | 40,06  | 30,45        |
| 3                              | 39,65  | 31,15        | 41,26  | 29,67        |
| IC <sub>50</sub> ± SEM (µg/mL) | 40,2 ± 1,13                                    | 33,88 ± 3,24 | 39,58 ± 1,60                                   | 28,72 ± 1,92 |



**Hình 1. Khả năng thu dọn gốc tự do DPPH của cao chiết so với acid Ascorbic**



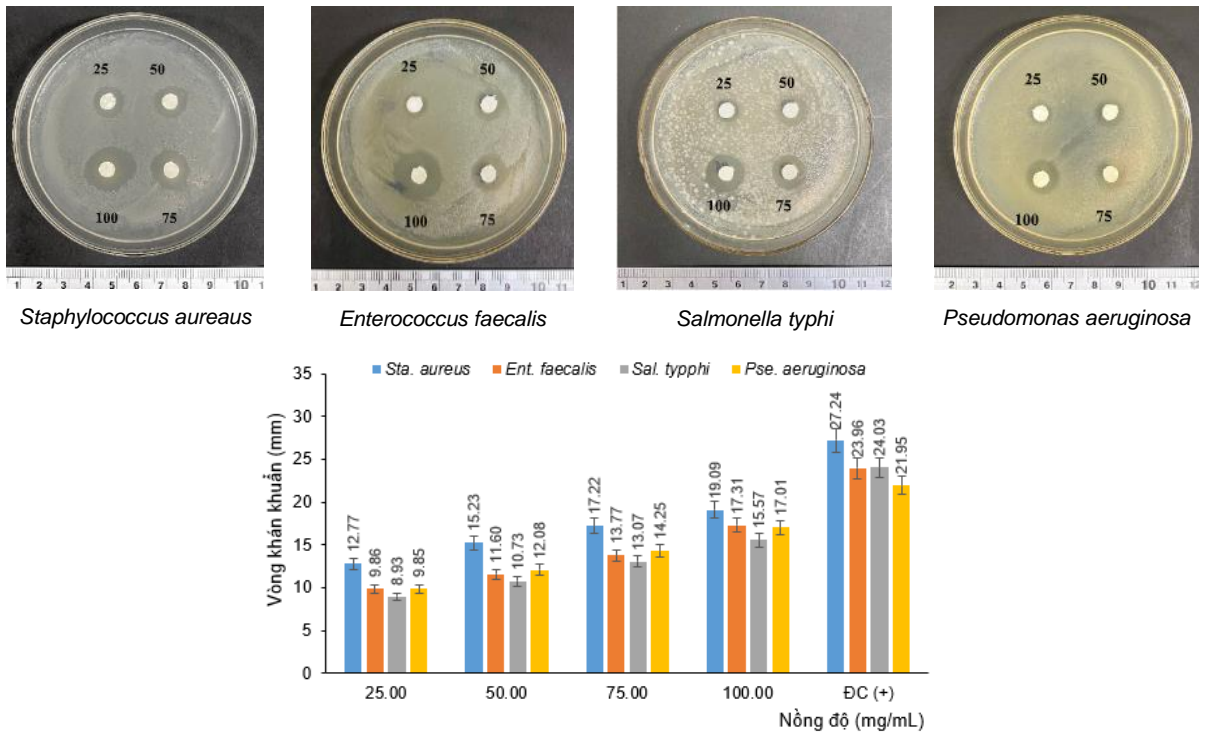
**Hình 2. Khả năng thu dọn gốc tự do ABTS của cao chiết so với acid Ascorbic.**

Kết quả cho thấy khả năng chống oxy hóa của mẫu nghiên cứu cao hơn so với đối chứng dương thông qua các giá trị IC<sub>50</sub> thấp. Đối với khả năng thu dọn gốc DPPH giá trị IC<sub>50</sub> của cao chiết là 40,02 ± 1,13 µg/mL. Tương tự, giá trị IC<sub>50</sub> của cao chiết đối với khả năng thu dọn gốc ABTS lần lượt là 39,58 ± 1,03 µg/mL. Ở nồng độ 100 µg/mL, khả năng thu dọn gốc DPPH và ABTS của mẫu nghiên cứu đạt trên 80%, tuy nhiên hoạt tính của cao chiết đều thấp hơn so với chất đối chứng dương ở cùng nồng độ (acid Ascorbic)

Theo nghiên cứu của Tran Dinh Dieu Tinh (2014), chiết xuất methanol của cây *C.nutans* ở dãy nồng độ 0 đến 100 µg/mL có khả năng thu dọn gốc tự do DPPH với giá trị IC<sub>50</sub> là 114,50 µg/mL. Theo kết quả nghiên cứu của Pannangpetch (2007), chiết xuất ethanol của cây *C.nutans* cho thấy hiệu quả thu dọn gốc tự do DPPH cao nhất khoảng 68% (khoảng 0,08 lần so với hoạt động của acid ascorbic) với giá trị IC<sub>50</sub> = 110 µg/mL (Pannangpetch *et al.*, 2007). Với giá trị IC<sub>50</sub> thấp hơn, kết quả cho thấy hoạt động thu dọn gốc tự do DPPH trong nghiên cứu này tốt hơn so với nghiên cứu trước đây của Pannangpetch và đồng tác giả (2007) và Tran Dinh Dieu Tinh (2014). Điều này chứng minh rằng cao chiết từ cây Xương khỉ được thu hái ở Quảng Ngãi có khả năng chống oxy hóa tốt.

### Hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết

Khả năng kháng khuẩn của cao chiết ở 4 nồng độ 100 mg/mL, 75 mg/mL, 50 mg/mL và 25 mg/mL trên 4 chủng *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* đều cho thấy khả năng kháng khuẩn của cao chiết. Chứng dương ampicillin ở nồng độ 50 µg/ml có đường kính vòng kháng khuẩn từ 21,95-27,24 mm, chứng âm (DMSO 5%) không có tác dụng kháng khuẩn. Hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết đối với các chủng vi khuẩn được thể hiện ở (Hình 3).



**Hình 3. Đường kính vòng kháng khuẩn của cao chiết so với đối chứng**

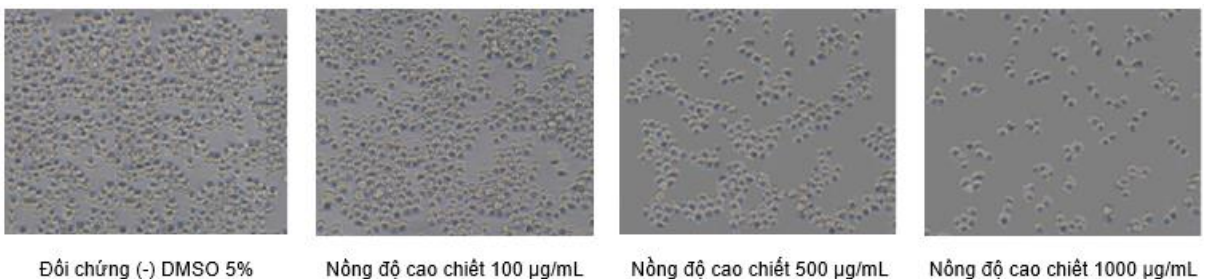
Cao chiết ở các nồng độ đều cho thấy khả năng kháng khuẩn, mạnh nhất đối với chủng *S. aureus* và yếu nhất đối với chủng *S. typhi*. Hoạt tính kháng khuẩn mạnh nhất ở nồng độ 100 mg/ml, đường kính vòng kháng khuẩn từ 15,55-19,09 mm. Ở nồng độ 25mg/mL cho thấy khả năng kháng khuẩn tương đối yếu với đường kính từ 8,93-12,77 mm và thấp hơn đối chứng dương.

Kết quả nghiên cứu về khả năng kháng khuẩn của chúng tôi là tương đồng với nghiên cứu của Sekar và đồng tác giả (2016) về hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết methanol *C. nutans* ở các nồng độ 25; 50 và 100 mg/mL đối với chủng *P. aeruginosa* có đường kính vòng kháng khuẩn trung bình từ  $9,33 \pm 2,08$  đến  $13,00 \pm 1,00$  mm, đối với chủng *S. aureus* có đường kính vòng kháng khuẩn trung bình từ  $23,00 \pm 2,65$  đến  $26,67 \pm 3,51$  mm.

**Đánh giá khả năng gây độc tế bào RAW 264.7 của cao chiết**

Theo dõi tế bào RAW 264.7 liên tục trong 72 giờ cho thấy dòng tế bào này phát triển theo xu hướng tồn tại dạng tế bào bám dính và một số ít tồn tại dạng tế bào không bám dính. Tính chất đa hình và khả năng thích ứng của điều kiện nuôi *in vitro* cho thấy tế bào RAW 264.7 thuận lợi cho việc thử nghiệm gây độc tế bào dưới tác động của cao chiết *C. nutans* ở các nồng độ pha loãng khác nhau lên khả năng sống sót của tế bào. Từ kết quả này, chúng tôi tiến hành thí nghiệm gây độc dòng tế bào RAW 264.7 ở 3 nồng độ 100 µg/mL, 500 µg/mL, 1000 µg/mL tương ứng với mật độ  $2 \times 10^5$  tế bào/cm<sup>2</sup>.

Kết quả nghiên cứu khả năng gây độc tế bào của cao chiết *C. nutans* thể hiện ở hình 5 cho thấy ở nồng độ 500 - 1000 µg/mL cao chiết *C. nutans* gây ra độc tính miễn dịch lên dòng tế bào RAW264.7 thông qua việc giảm khả năng sống sót của tế bào sau 72h thí nghiệm. Trong khi đó, ở nồng độ 100 µg/mL, không cho thấy khả năng gây độc tế bào so với đối chứng âm (DMSO 5%).



**Hình 5. Khả năng gây độc dòng tế bào RAW 264.7 của cao chiết *C. nutans*. (x40)**

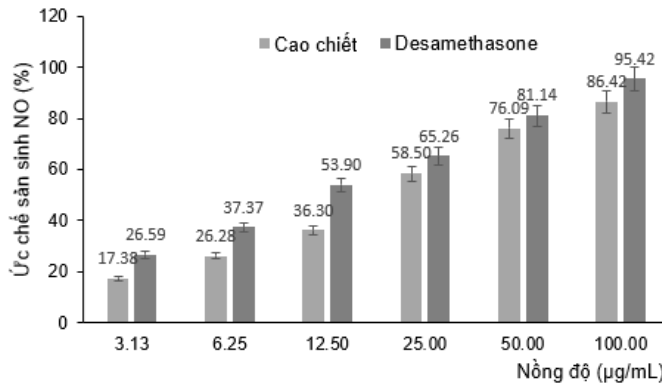
Khi so sánh với các nghiên cứu trước đây về tác động gây độc tế bào của *C.nutans*, các nghiên cứu chủ yếu được tiến hành trên các dòng tế bào ung thư và các dòng tế bào khác. Năm 2019, tác giả Esmaili và đồng tác giả đã có công bố tương tự về tác động gây độc trên dòng tế bào HCT-116 và CCd-18Co của chiết xuất *C. nutans*. Nồng độ chiết xuất nhỏ hơn 200 µg/mL không cho thấy độc tính tế bào đáng kể trên các dòng tế bào được thử nghiệm. Phân đoạn chiết xuất methanol (CN-M) cho thấy độc tính tế bào đáng kể đối với các tế bào HCT-116 ở nồng độ 200 µg/mL. Từ kết quả này chứng minh khả năng gây độc tế bào của cao chiết *C.nutans* phụ thuộc vào nồng độ sử dụng (Esmaili *et al.*, 2019).

Sự đánh giá độc tính của tế bào đóng một vai trò quan trọng trong việc đánh giá khả năng duy trì cân bằng nội môi của tế bào dưới sự thay đổi nồng độ *C.nutans* khi được bổ sung vào môi trường nuôi. Kết quả cho thấy *C. nutans* tác động như một cơ chế hoạt động chính của nhiều tác nhân gây độc tế bào. Dựa vào kết quả đánh giá về hoạt tính gây độc tế bào theo cách phụ thuộc vào nồng độ là cơ sở cho việc đánh giá hoạt tính kháng viêm với nồng độ *C. nutans* được chia nhỏ hơn.

**Đánh giá hoạt tính kháng viêm của cao chiết thông qua hoạt tính ức chế nitric oxide (NO)**

Đánh giá khả năng ức chế của cao chiết *C.nutans* đến quá trình viêm gây ra bởi kích thích LPS, thông qua tác động kích thích của LPS, tế bào đáp ứng lại kích thích này bằng cách điều hòa miễn dịch và sản sinh NO, phóng thích các gốc tự do (Ruhee *et al.*, 2019). NO là một phân tử gốc tự do có nhiều chức năng khác nhau bao gồm biến đổi protein, truyền tín hiệu tế bào và là một tín hiệu giữ vai trò quan trọng trong đáp ứng viêm của hệ miễn dịch (Sharma *et al.*, 2007). Cao chiết *C.nutans* ức chế quá trình sản xuất NO qua trung gian lipopolysacarit (LPS) trong tế bào RAW 264,7 được khảo sát ở dãy nồng độ từ 3.125 đến 100 µg/mL. Kết quả được thể hiện ở (Hình 6)

Sự khác biệt giữa các nồng độ cao chiết có ý nghĩa thống kê (\*p < 0.05) so với đối chứng dương Desamethasone được được xác định bằng T-test. Kết quả thể hiện giá trị TB ± SD từ ba thí nghiệm độc lập. Kết quả cho thấy, khi tăng dần nồng độ cao chiết đã ức chế đáng kể sự sản sinh các sản phẩm NO bởi kích thích LPS. Khả năng ức chế sản sinh các sản phẩm NO khá tốt thông qua các giá trị IC<sub>50</sub> thấp (IC<sub>50</sub>: 12,85 ± 3,41 µg/mL).



**Hình 6. Khả năng ức chế sản sinh NO do LPS gây ra của cao chiết so với đối chứng dương Desamethasone**

Ở nồng độ 100 µg/mL cao chiết đã ức chế lần lượt 86,42% các sản phẩm NO, thấp hơn so với đối chứng dương dexamethasone (95,42%). Mai và đồng tác giả (2016) cũng đã chứng minh cao chiết *C. nutans* ở dãy nồng độ 1,53 µg/mL đến 100 µg/mL có khả năng ức chế sản sinh các sản phẩm NO do kích thích LPS gây ra. Tất cả bốn cao chiết cụ thể là chiết xuất lá sử dụng dung môi phân cực (LP), chiết xuất lá sử dụng dung môi không phân cực (LN), chiết xuất thân sử dụng dung môi phân cực (SP) và chiết xuất thân sử dụng dung môi không phân cực (SN) với 4 dung môi khác nhau đều ức chế LPS gây ra sự sản xuất NO theo cách phụ thuộc vào nồng độ. Trong đó chiết xuất lá sử dụng dung môi phân cực (LP) là mạnh nhất (IC<sub>50</sub> NO = 18,9 ± 3,6 µg/mL). So với kết quả nghiên cứu này, cho thấy khả năng ức chế sự sản xuất NO do LPS gây ra trong nghiên cứu chúng tôi tốt hơn với giá trị IC<sub>50</sub> thấp hơn.

Dòng tế bào RAW 264.7 đóng vai trò là mô hình *in vitro* do tính ổn định về chức năng và khả năng thuộc tính cả thực bào và ẩm bào, nên tế bào RAW 264.7 rất cần thiết cho việc nghiên cứu sự tương tác giữa vật chủ và mầm bệnh trong nghiên cứu miễn dịch học (Taciak *et al.*, 2018). Như vậy, kết quả trên đã bước đầu đánh giá tổng quan khả năng kháng viêm của cao chiết *C. nutans* thông qua sự ức chế trực tiếp NO sản sinh trong quá trình viêm. NO có thể phá vỡ trạng thái cân bằng oxy hóa khử, do đó dẫn đến tổn thương protein, DNA và màng, thúc đẩy quá trình chết tế bào. Kết quả nghiên cứu này cho thấy cao chiết *C. nutans* có khả năng kháng viêm tốt so với kết quả nghiên cứu của Mai và đồng tác giả (2016) khi đối chiếu các giá trị IC<sub>50</sub>: 12,85 ± 3,41 µg/mL.

Với kết quả thu được cho thấy tác dụng điều hòa miễn dịch và kích thích miễn dịch của cao chiết *C. nutans* và các hợp chất chính của nó đối với chức năng miễn dịch lên tế bào RAW 264.7. Có thể kết luận các hợp chất của cao chiết *C. nutans* thu mẫu tại Quảng Ngãi ở nồng độ từ 50 đến 100 µg/mL có khả năng chống oxy hóa tốt và

tham gia vào quá trình ức chế sản xuất NO thông qua enzyme tổng hợp oxit nitric cảm ứng trong tế bào RAW 264.7. Tuy nhiên nồng độ lớn hơn 500  $\mu\text{L}$  cao chiết *C. nutans* cho thấy khả năng gây ra độc tính lên tế bào RAW 264.7. Kết quả nghiên cứu chứng minh cao chiết *C. nutans* có khả năng điều hòa miễn dịch và gây độc tế bào tùy thuộc vào nồng độ sử dụng

## KẾT LUẬN

Cao chiết *C. nutans* tại Quảng Ngãi có khả năng thu dọn gốc tự do DPPH với giá trị  $\text{IC}_{50}$  là  $40,02 \pm 1,13 \mu\text{g/mL}$ . Khả năng thu dọn gốc ABTS là  $39,58 \pm 1,03 \mu\text{g/mL}$ . Ở nồng độ 100  $\mu\text{g/mL}$ , khả năng thu dọn gốc DPPH và ABTS của mẫu nghiên cứu có hiệu quả trên 80%. Cao chiết *C. nutans* thể hiện hoạt tính kim hãm mạnh nhất đối với chủng *S. aureus* có đường kính vòng kháng khuẩn (15,55-19,09 mm) và yếu nhất đối với chủng *S. typhi* (8,93-12,77 mm). Cao chiết *C. nutans* ở nồng độ từ 50 đến 100  $\mu\text{g/mL}$  có khả năng chống oxy hóa cao với giá trị  $\text{IC}_{50}$  thấp so với đối chứng dương. Ở nồng độ 500-1000  $\mu\text{g/mL}$  cao chiết *C. nutans* làm giảm khả năng sống sót của tế bào RAW264.7 *in vitro*. Cao chiết *C. nutans* có khả năng kháng viêm đối với dòng tế bào RAW 264.7 với giá trị  $\text{IC}_{50}$ :  $12,85 \pm 3,41$ . Ở nồng độ 500  $\mu\text{g/mL}$  cao chiết *C. nutans* gây độc tính lên tế bào RAW 264.7.

**Lời cảm ơn:** Công trình được tài trợ bởi Tập đoàn Vingroup và hỗ trợ bởi chương trình học bổng đào tạo thạc sĩ, tiến sĩ trong nước của Quỹ Đổi mới sáng tạo Vingroup (VINIF), Viện Nghiên cứu Dữ liệu lớn (VinBigdata), mã số VINIF.2022.ThS.100 và mã số VINIF.2023.ThS.150

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Hariforoosh S, Asghar W, Jamali F (2013). Adverse effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs: an update of gastrointestinal, cardiovascular and renal complications. *J Pharm Pharm Sci*. 16(5): 821-847. doi: 10.18433/j3vw2f.
- Currie J, Lin W, Zhang W (2011). Patient knowledge and antibiotic abuse: Evidence from an audit study in China. *J Health Econ*. 30(5): 933-949. doi: 10.1016/j.jhealeco.2011.05.009.
- Khooh LW, Mediani A, Zolkeflee NKZ, Leong SW, Ismail IS, Khatib A, Shaari K, Abas F (2015). Phytochemical diversity of *Clinacanthus nutans* extracts and their bioactivity correlations elucidated by NMR based metabolomics. *Phytochem Let*, 14: 123-133.
- Yang HS, Peng TW, Madhavan P, Shukkoor MSA, Akowuah GA (2013) Phytochemical analysis and antibacterial activity of methanolic extract of *Clinacanthus nutans* leaf. *Int J Drug Dev Res*, 5(3): 349-355.
- Pham Nguyen Minh Dan (2014). *Evaluation of biological activities of clinacanthus nutans* (Burm. F.) Lindau. 2014. PhD Thesis. International University, Vietnam.
- TCVN 11939:2017. Xác định hoạt độ chống oxy hóa bằng phản ứng với 2,2-Diphenyl- 1-Picrylhydrazyl (DPPH). Bộ Khoa học và Công nghệ.
- Re, Roberta, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 1999, 26.9-10: 1231-1237.
- Celikel, Nazan, and Gökhan Kavas. "Antimicrobial properties of some essential oils against some pathogenic microorganisms." *Czech journal of food sciences* 26.3 (2008): 174.
- Đặng Văn Giáp (2000). Phân tích dữ liệu khoa học bằng Microsoft Excel. Nxb Giáo dục Hà Nội.
- Tran Dinh Dieu Tinh (2014). *Biological activities of clinacanthus nutans* (Burm. F) Lindau extracts. PhD Thesis. International University HCMC, Vietnam.
- Pannangpetch P, Laupattarakasem P, Kukongviriyapan V, Kukongviriyapan U, Kongyingyoes B, Aromdee C (2007). Antioxidant activity and protective effect against oxidative hemolysis of *Clinacanthus nutans* (Burm. F) Lindau. *Songklanakarin J Sci Technol*. 29: 1-9.
- Sekar M, Nurashikin AR (2016). Formulation, evaluation and antibacterial properties of herbal ointment containing methanolic extract of *Clinacanthus nutans* leaves. *Int J Pharma Clin Res* 8(8): 1170-1174.
- Mai CW, Yap KS, Kho MT, Ismail NH, Yusoff K, Shaari K, Chin SY, Lim ES (2016) Mechanisms underlying the anti-inflammatory effects of *Clinacanthus nutans* Lindau extracts: inhibition of cytokine production and toll-like receptor-4 activation. *Front Pharmacol* 7: 7.
- Ruhee RT, Ma S, Suzuki K (2019). Sulforaphane protects cells against lipopolysaccharide-stimulated inflammation in murine macrophages. *Antioxidants* 8(12): 577.
- Sharma JN, Al-Omran A, Parvathy SS (2007). Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology* 15: 252-259.
- Taciak B, Białasek M, Braniewska A, Sas Z, Sawicka P, Kiraga Ł, Rygiel T, Król M (2018). Evaluation of phenotypic and functional stability of RAW 264.7 cell line through serial passages." *PLoS one* 13(6): e0198943.
- Esmaili K, Shafaei A, Aisha AF, Al-Suede FS, Majid AM, Ismail Z (2019). Evaluation of *in vitro* cytotoxicity effect of *Clinacanthus nutans* (Brum. f.) Lindau standardized leaf extracts. *Trop J Pharma Res* 18: 2341-2348.
- Esmaili K, Alsuede F, Abdalrahim A, Shafaei A, Ismail Z (2013). Preliminary phytochemical analysis and cytotoxicity studies of *Clinacanthus nutans* (Sabah snake grass). *Open Conf Proc J* 4(1): 187.

## ANTIOXIDANT, ANTIBACTERIAL, ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITIES OF *Clinacanthus nutans* EXTRACT

Huynh Nhu Y<sup>1</sup>, Đò Thi Thao<sup>3</sup>, Nguyễn Trọng Nghĩa<sup>1</sup>, Phạm Thị Ngọc Phương<sup>2</sup>, Phan Hoàng Duy<sup>2</sup>, Che Thi Cam Hà<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>University of Science, Hue University

<sup>2</sup>Hue Central Hospital

<sup>3</sup>Institute of Technology DNA GENLAB Hanoi

### SUMMARY

This study regarding the antioxidant, anti-inflammatory and antibacterial activities of *C. nutans* extract in Quang Ngai province. We discovered that *C. nutans* extracts (stigmasterol, lupeol, vitexin, isovitexin, orientin, schaftoside) have the phytochemicals that exhibit anti-inflammatory and immunoregulatory activities. The extract has the ability to inhibiting bacterial growth *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Salmonella typhi* (ATCC 6539), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), antioxidant against DPPH value  $IC_{50} 40,02 \pm 1,13 \mu\text{g/mL}$ , the ABTS Radical Scavenging Assay value  $39,58 \pm 1,03 \mu\text{g/mL}$ . Cell line RAW264.7 were chosen to investigate the immunotoxicity of *Clinacanthus nutans* extract. The results showed that, with an increase in *Clinacanthus nutans* extract concentration, the proliferation viability of RAW264.7 cells presented a trend of decreasing with increasing concentration from  $100\mu\text{g/mL}$ - $1000\mu\text{g/mL}$ . *C. nutans* extract, effectively inhibited NO, with the most effective being  $100\mu\text{g/mL}$  concentration, with an  $IC_{50}$  value  $12.85 \pm 3.41 \mu\text{g/mL}$ .

**Keywords:** *Clinacanthus nutans* (*Burm. f.*), RAW264.7 cells, antioxidant, antibacterial, anti-inflammatory.

---

\* Author for correspondence: Tel: 0362596712; Email: chethicamha@husc.edu.vn