

Khảo sát hoạt tính sinh học của các cao chiết từ cây Bạch hoa xà thiệt thảo (*Hedyotis diffusa* Willd., Rubiaceae)

Nguyễn Thị Thu Hiền

Khoa Dược, Đại học Nguyễn Tất Thành
ntthuhien@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Nghiên cứu tiến hành nhằm sơ bộ thành phần hóa học thực vật, chiết xuất, phân tách các cao phân đoạn từ cây Bạch hoa xà thiệt thảo, khảo sát hoạt tính sinh học của các cao chiết bao gồm chống oxy hóa bằng phương pháp DPPH, kháng viêm *in vitro*, gây độc tế bào trên dòng tế bào ung thư người. Từ 3 kg Bạch hoa xà thiệt thảo khô được ngâm kiệt với cồn 70 %, cô giảm áp thu được 60 g cao toàn phần. Lắc phân bố cao lỏng thu được 30,1 g cao petroleum ether, 38,6 g cao chloroform, 20,4 g cao ethyl acetat. Các mẫu cao đều có khả năng chống oxy hóa và yếu hơn so với mẫu đối chứng dương acid ascorbic, trong đó cao E có hoạt tính mạnh nhất với giá trị IC_{50} là 30,52 $\mu\text{g/mL}$. Cao toàn phần có khả năng ức chế NO trên tế bào RAW264.7 tốt nhất ($IC_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$). Tuy nhiên các mẫu cao đều gây độc tế bào RAW264.7 mạnh. Thử nghiệm trên tế bào ung thư gan – HepG2 và ung thư phổi – A549 cho thấy cao chloroform có hoạt tính gây độc tế bào tốt nhất với giá trị IC_{50} lần lượt là (81,16 và 92,72) $\mu\text{g/mL}$. Kết quả chỉ ra các hoạt chất trong cây Bạch hoa xà thiệt thảo có tác dụng chống oxy hóa, kháng viêm, gây độc tế bào và là loại dược liệu có tiềm năng.

Nhận 11/05/2022
Được duyệt 27/10/2022
Công bố 02/11/2022

Từ khóa

cây Bạch hoa xà thiệt thảo, *Hedyotis diffusa*, kháng viêm, chống oxy hóa, MTT

© 2022 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Đặt vấn đề

Việt Nam nằm trong vùng khí hậu nhiệt đới gió mùa nên có hệ thực vật phong phú và đa dạng, trong đó nhiều dược liệu đã được dân gian sử dụng từ lâu để phòng và/hoặc chữa bệnh. Một trong những dược liệu được quan tâm nghiên cứu gần đây là Bạch hoa xà thiệt thảo (*Hedyotis diffusa* Willd.) thuộc họ Cà phê (Rubiaceae). Trong những năm gần đây, trên thế giới đã có những nghiên cứu cho thấy tác dụng dược lí nổi trội từ dịch chiết của cây Bạch hoa xà thiệt thảo (BHXTT) như tác dụng kháng viêm trong viêm đường hô hấp mãn tính, viêm tuyến tiền liệt, ..., tác dụng chống ung thư gan [1], ung thư đại trực tràng [2], ung thư bạch cầu [3], ung thư cổ tử cung và tuyến tiền liệt [4], ... Ngoài ra, dịch chiết của BHXTT còn được chứng minh tác dụng chống oxy hóa, ngăn ngừa hoặc điều trị tổn thương gan liên quan đến stress, oxi

hóa, ...[4]. Theo Đông y, BHXTT có vị ngọt, nhạt, hơi đắng, tính mát, không độc. Loại cỏ này thường được dùng trong việc điều trị các bệnh về gan, viêm loét dạ dày, bệnh lậu, ung thư, sốt, u hạch nhưng chưa được nghiên cứu chứng minh. Vì vậy, nghiên cứu thực hiện với mục tiêu khảo sát sơ bộ thành phần hóa học thực vật, hoạt tính chống oxy hóa, kháng viêm, gây độc tế bào của cao chiết cây BHXTT để làm cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo về thành phần hóa học và tác dụng dược lí của dược liệu này.

2 Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1 Nguyên liệu

Toàn cây BHXTT được thu hái vào tháng 6, năm 2021 tại Đồng Nai. Dược liệu thu về được so sánh hình thái với tài liệu mô tả thực vật [5], sau đó được làm sạch và phơi khô trong bóng râm.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

* Sơ bộ thành phần hóa thực vật

Dùng các phản ứng hóa học đặc trưng để xác định sự có mặt của các hợp chất có trong dược liệu ở các phân đoạn khác nhau, có độ phân cực tăng dần. Khảo sát dựa trên phương pháp Ciulei đã được cải tiến bởi Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh [6].

* Chiết xuất và phân tách các phân đoạn

Từ 3 kg BHXTT khô được ngâm kiệt với cồn 70 % (5 lít × 6 lần), cô giảm áp thu được 60 g cao toàn phần (Cao T). Lắc phân bố cao lỏng thu được với petroleum ether (3 lít × 5 lần), lớp petroleum ether được cô giảm áp thu được 30,1 g cao petroleum ether (cao P). Lớp dịch nước được lắc phân bố tiếp với CHCl₃ (3 lít × 5 lần), cô giảm áp thu được 38,6 g cao chloroform (cao C). Lớp dịch nước còn lại sẽ tiếp tục được lắc phân bố với EtOAc (3 lít × 7 lần), cô giảm áp thu được 20,4 g cao ethyl acetat (cao E).

* Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa bằng phương pháp DPPH

Thử nghiệm được thực hiện theo mô tả của Kulisic et al. (2004), được bổ sung bởi Obeid et al. (2005) [7].

Mẫu thử được pha trong DMSO. DPPH pha loãng trong MeOH với nồng độ 0,08 mM. 10 µL mẫu thử được ủ với 190 µL dung dịch DPPH, ủ ở nhiệt độ 37 °C trong 20 phút và đo trên máy ELISA ở bước sóng 517 nm. Chất đối chứng acid ascorbic được dùng để kiểm soát độ ổn định và đánh giá hoạt tính ức chế tương đương. Các phép thử được lặp lại 3 lần.

Kết quả được tính theo công thức sau:

$$\text{Ức chế (\%)} = \frac{OD_{\text{chứng}} - OD_{\text{thử}}}{OD_{\text{chứng}} - OD_{\text{trắng}}} \times 100$$

(OD: mật độ quang trung bình)

* Khảo sát hoạt tính kháng viêm

Khả năng kháng viêm được đánh giá thông qua phương pháp xác định hoạt tính ức chế sản sinh nitric oxit (NO) trên tế bào RAW264.7

Tế bào RAW264.7 được nuôi cấy 48 giờ trong môi trường DMEM ở 37 °C, 5 % CO₂ với 10 % FBS, penicillin và streptomycin sulphate. Sau đó được nuôi cấy trong giếng phiên 96 với mật độ (2,5 × 10⁵) tế bào/giếng. Tế bào được kích thích với 2 µL LPS (0,1 mg/mL) trong 24 giờ với sự có mặt của các hợp chất thử ở nhiều nồng độ khác nhau, được pha sẵn trong DMSO.

Dịch nổi của tế bào phản ứng với thuốc thử Griess. NaNO₂ ở các nồng độ khác nhau được sử dụng để xây dựng đường chuẩn. Độ hấp thụ được đo ở 570 nm. Cardamonin được sử dụng làm mẫu đối chứng.

Phần tế bào còn lại sau khi đã sử dụng để đánh giá các hoạt tính *in vitro* được bổ sung dung dịch MTT (0,5 mg/mL pha trong PBS), ủ 4 giờ ở nhiệt độ 37 °C, 5 % CO₂. Sau đó hút bỏ hết môi trường trên bề mặt, kết tủa formazan được hòa tan trong isopropanol. Độ hấp thụ được đo ở 570 nm.

* Khảo sát hoạt tính gây độc tế bào trên dòng tế bào ung thư người

Phương pháp nghiên cứu được tiến hành theo phương pháp MTT của Denizot và Rita Lang (1986) [8].

Tế bào được nuôi cấy trong môi trường RPMI với 10 % (v/v) FBS và 1 % (v/v) penicillin streptomycin. Sau đó, 200 µL tế bào được gieo vào đĩa tế bào nuôi cấy 96 giếng với mật độ 25 000 tế bào/giếng. Tế bào được ủ trong (20-24) giờ trong tủ ấm CO₂ ở 37 °C. Sau đó, môi trường được loại bỏ và thay thế bằng môi trường tương tự có chứa các nồng độ khác nhau của cao chiết/chất sạch. Cao chiết và các hợp chất được hòa tan trước trong DMSO, nồng độ cuối cùng không cao hơn 1 %. Thuốc chuẩn – camptothecin (CPT) được sử dụng làm chứng dương Sau khi xử lí 48 giờ với tế bào ung thư, dùng phương pháp xét nghiệm MTT để xác định khả năng sống của tế bào bằng cách thêm 20 µL MTT (0,5 mg/mL) vào mỗi giếng và bọc đĩa bằng giấy bạc sau đó ủ trong tủ ấm CO₂ trong (3-4) giờ. Sau đó, môi trường được loại bỏ và 200 µL DMSO được thêm vào. Đĩa được đặt trên máy lắc trong 10 phút để hòa tan các tinh thể formazan. Độ hấp thụ được đo ở bước sóng 570 nm bằng máy quang phổ (xMark, Bio-Rad).

Khả năng sống sót của tế bào được tính bằng công thức:

$$\text{Khả năng tồn tại của tế bào (\%)} = \frac{A_S}{A_C} \times 100$$

$$\text{Khả năng ức chế (\%)} = 100 (\%) - \text{khả năng tồn tại của tế bào (\%)}$$

A_S: độ hấp thụ của mẫu

A_C: độ hấp thụ của đối chứng âm

3 Kết quả và bàn luận

3.1 Sơ bộ thành phần hóa thực vật



Bảng 1 Kết quả khảo sát thành phần hóa thực vật của cây BHXTT

Nhóm hợp chất	Dịch chiết ether	Dịch chiết cồn	Dịch chiết nước
Chất béo	++		
Triterpenoid tự do	+++		
Alkaloid	-	+	-
Coumarin	-	+	
Anthraquinon	+		
Flavonoid	-	+++	++
Proanthocyanin		±	-
Tannin		++	+++
Saponin		+	++
Acid hữu cơ		+	+
Chất khử		+	+
Ghi chú:	(+) : có ít	(+++): có nhiều	
	(++) : có	(++++): có rất nhiều	

Kết quả sơ bộ thành phần hóa học (Bảng 1) cho thấy dược liệu chứa nhiều triterpenoid tự do, flavonoid, tannin và một số hợp chất khác như anthraquinon, chất béo, alkaloid, coumarin, saponin, acid hữu cơ và hợp chất khử. Kết quả thành phần hóa học tạo định hướng cho các nghiên cứu tiếp theo về chiết xuất, phân lập các nhóm hoạt chất của dược liệu này ở Việt Nam.

3.2 Kết quả khảo sát hoạt tính chống oxi hóa bằng phương pháp DPPH

Kết quả thử nghiệm đánh giá hoạt tính chống oxi hóa bằng phương pháp DPPH (Bảng 2) cho thấy các mẫu khảo sát đều có khả năng chống oxi hóa và yếu hơn so với mẫu đối chứng dương acid ascorbic, trong đó cao E có hoạt tính mạnh nhất với giá trị IC₅₀ là 30,52 µg/mL và cao P có hoạt tính thấp nhất với giá trị IC₅₀ là 1 689 µg/mL. Kết quả này gợi ý các hoạt chất có hoạt tính chống oxi hóa trong cây BHXTT có thể tập trung chủ yếu trong phân đoạn ethyl acetat.

Bảng 2 Kết quả thử nghiệm hoạt tính chống oxi hóa

Tên mẫu	Nồng độ (µg/mL)	Tỷ lệ ức chế (%)
Cao T	250	58,28
	125	52,96
	62,5	42,67
	31,25	30,09
	15,6	16,36
Cao P	1 500	50,61
	1 000	37,89
	500	34,48

Cao C	250	25,06
	125	18,83
	62,5	10,49
	500	56,72
	250	39,72
Cao E	125	30,39
	62,5	22,27
	31,25	19,72
	62,5	60,63
Acid ascorbic	31,25	49,67
	15,6	41,30
	7,8	31,68
	3,9	23,22
Acid ascorbic	10	0,04
	5	0,45
	2,5	1,08
	1,25	2,33
	0,625	1,56
	0,312	1,46

Bảng 3 Giá trị IC₅₀ của các mẫu thử trong mô hình DPPH

Tên mẫu	IC ₅₀ (µg/mL)
Cao T	119
Cao P	1 689
Cao C	380
Cao E	30,52
Acid ascorbic	5,09

3.3 Kết quả khảo sát hoạt tính kháng viêm

Bảng 4 Kết quả sàng lọc hoạt tính ức chế sản sinh NO của các cao chiết

Tên mẫu	Nồng độ (µg/mL)	Tỷ lệ ức chế (%)	Tỷ lệ tế bào sống (%)
Cao T	30	90,16	77,09
	100	99,08	3,01
Cao P	30	35,63	91,18
	100	49,32	7,10
Cao C	30	62,67	47,42
	100	69,25	6,09
Cao E	30	16,84	88,12
	100	68,32	53,13
Cardamonin	(µM)		
	0,3	16,19	85,08
	1	84,13	87,61

Kết quả thử nghiệm cho thấy cao T có khả năng ức chế NO tốt nhất với giá trị lần lượt là (99,06 và 99,08) % ở

nồng độ (30 và 100) $\mu\text{g/mL}$. Cao C có khả năng ức chế tốt với giá trị lần lượt là (62,67 và 69,25) % ở nồng độ (30 và 100) $\mu\text{g/mL}$, cao E ở nồng độ 100 $\mu\text{g/mL}$ có khả năng ức chế NO là 68,32 %, trong khi cao P có hoạt tính yếu nhất với giá trị IC_{50} nằm ngoài khoảng khảo sát (lớn hơn 100 $\mu\text{g/mL}$). Tuy nhiên các mẫu cao đều gây độc tế bào mạnh, vì vậy các mẫu được tiếp tục tiến hành thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào.

3.4 Khảo sát hoạt tính gây độc tế bào trên dòng tế bào ung thư người

Bảng 5 Kết quả tác động gây độc tế bào HepG2 và A549 của các cao chiết

Tên mẫu	Nồng độ ($\mu\text{g/mL}$)	Tỉ lệ tế bào sống (%)	
		HepG2	A549
Cao T	30	73,13	68,15
	100	51,44	54,42
Cao P	30	74,30	72,16
	100	57,77	55,20
Cao C	30	81,64	53,11
	100	48,02	43,64
Cao E	30	91,55	89,37
	100	88,65	91,23
	(μM)		
Camptothecine	0,3	61,71	57,65
	1	35,60	46,30

Bảng 6. Giá trị IC_{50} của cao C trong thử nghiệm độc tế bào A549

Mẫu	Nồng độ ($\mu\text{g/mL}$)	Tỉ lệ tế bào sống (%)	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Cao C	150	4,97	92,72
	100	46,10	
	75	69,08	
	50	92,20	
	25	109,24	

Bảng 7. Giá trị IC_{50} của cao C trong thử nghiệm độc tế bào HepG2

Mẫu	Nồng độ ($\mu\text{g/mL}$)	Tỉ lệ tế bào sống (%)	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Cao C	12,5	107,47	81,16
	25	98,79	
	50	86,37	
	100	36,30	

Kết quả thử nghiệm trên tế bào ung thư gan – HepG2, ung thư phổi – A549 cho thấy cao C có hoạt tính gây độc tốt nhất với IC_{50} lần lượt là (81,16 và 92,72) $\mu\text{g/mL}$, trong khi cao T, cao P và cao E có hoạt tính gây độc yếu hơn với giá trị IC_{50} nằm ngoài khoảng khảo sát (lớn hơn 100 $\mu\text{g/mL}$). Cao C có thành phần chủ yếu là các iridoid là hoạt chất chính trong cây có tác dụng chống ung thư. Từ đó, mở ra hướng nghiên cứu tiếp theo về phân lập và thử tác dụng dược lí của hoạt chất có trong cao C.

4 Kết luận

Sau khi sơ bộ hóa thực vật cây BHXTT đã xác định được một số nhóm hợp chất có trong cây: triterpenoid tự do, flavonoid, tannin và một số hợp chất khác: chất béo, alkaloid, coumarin, saponin, acid hữu cơ và hợp chất khur. Cao chiết của cây có tác dụng sinh học như chống oxy hóa, chống viêm *in vitro*, gây độc tế bào gan và phổi. Cao ethyl acetat có hoạt tính chống oxy hóa mạnh nhất với giá trị IC_{50} là 30,52 $\mu\text{g/mL}$, cao chloroform có hoạt tính ức chế NO cao nhất trong các cao phân đoạn với $\text{IC}_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$, tuy nhiên gây độc tế bào mạnh với tỉ lệ tế bào sống $< 50 \%$, cao chloroform có hoạt tính gây độc trên tế bào ung thư gan – HepG2, ung thư phổi – A549 mạnh nhất. Kết quả này chỉ ra tiềm năng của các hoạt chất trong cây có tác dụng chống oxy hóa, kháng viêm, gây độc tế bào, mở ra hướng nghiên cứu ứng dụng của cây BHXTT trong ngành Dược.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được tài trợ bởi Quỹ phát triển Khoa học và Công nghệ – Đại học Nguyễn Tất Thành, mã đề tài 2021.01.91/HĐ-KHCN.

Tài liệu tham khảo

1. Lin C., Kuo.C., Lee M., Hsu S., Huang A., et al. (2011). "Extract of *Hedyotis diffusa* Willd influences murine leukemia WEHI-3 cells in vivo as well as promoting T-and B-cell proliferation in leukemic mice", 25(4), p. 633-640,
2. Li C., Zhao Y., Guo Z., Zhang X., Xue X., et al. (2014). "Effective 2D-RPLC/RPLC enrichment and separation of micro-components from *Hedyotis diffusa* Willd. and characterization by using ultra-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 99(1), p.35-44.
3. Lee G., Lee J., Son C., Lee N. (2020). "Combating Drug Resistance in Colorectal Cancer Using Herbal Medicines", *Chinese Journal of Integrative Medicine*, p. 1-10
4. Wazir J., Ullah R., Khongorzul P., Hossain M., Khan M., et al. (2020). "The effectiveness of *Hedyotis diffusa* Willd extract in a mouse model of experimental autoimmune prostatitis", *Andrologia*, p. 1-9
5. Võ Văn Chi (2012), Từ điển cây thuốc Việt Nam II, Nhà xuất bản Y học Hà Nội, tr. 511-512.
6. Trần Hùng, Nguyễn Việt Kinh và cộng sự (2015). *Phương pháp nghiên cứu dược liệu*, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh, tr. 2-126
7. Obied H. K., Allen M. S., Bedgood R. D., Stockmann R. and Robards K.(2005). "Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(4), pp. 823-837.
8. Denizot F., Lang R. (1986). "Rapid colorimetric assay for cell growth and survival", *Journal of Immunological Methods*, 89(2), pp. 271-277.

Study on biological activities of extracts from *Hedyotis diffusa* Willd., Rubiaceae

Nguyen Thi Thu Hien

Faculty of Pharmacy, Nguyen Tat Thanh University

ntthuhien@ntt.edu.vn

Abstract This research aims at understanding the chemical composition, extracting, and isolating fragmented gels from *Hedyotis diffusa*, then surveying on the gels' antioxidizing effects using DPPH analysis, on their anti-inflammatory effects *in vitro*, and on their cytotoxic effects on human cancer cells. From 3kg of dried *Hedyotis diffusa*, after soaking with 70⁰ alcohol and then concentrating a total of 60 g gross extracts (cao T) was collected. After distribution shaking process of the liquid, 30.1 g petroleum ether extract (cao P), 38.6 g chloroform extract (cao C), and 20.4 g ethyl acetate extract (cao E) were collected. All had antioxidizing effects, though weaker than the compared ascorbic acid. Of the three, cao E had the highest effects with IC₅₀ value at 30.52 µg/mL. Cao T has the best NO inhibition on RA264.7 cell (IC₅₀ < 30 µg/mL). However, all test gels had strong cytotoxic effects on RAW 264.7. The results on liver cancer cells – HepG2 – and lung cancer cells – A549 – showed that cao C had the best cytotoxic effects with IC₅₀ values being 81.16 and 92.72 µg/mL respectively. The results proved the potentials of the antioxidizing, anti-inflammatory and cytotoxic effects of the extracts, prompting the applications of *Hedyotis diffusa* in Medicine.

Keywords *Hedyotis diffusa*, antioxidants, DPPH, anti-inflammatory, cytotoxic, MTT