TIỀM NĂNG CHỐNG VIÊM KHỚP DẠNG THẤP CỦA CHIẾT XUẤT ETHANOL TỪ QUẢ SƠN CHI (*Gardenia jasminoides* J.Ellis) TRÊN MÔ HÌNH CHUỘT NHẮT TRẮNG (*Mus musculus*)

TRẦN THỊ PHƯƠNG NHUNG*, NGUYỄN THỊ TÂM NHƯ, TRẦN THỊ NGỌC YẾN, NGUYỄN THỊ NGỌC DUYÊN, NGUYỄN NGỌC THẢO UYÊN, DƯƠNG THỊ NGỌC TRÂN, ĐẶNG THỊ KIỀU PHƯƠNG, ĐỖ THỊ THU THỦY, BÙI NHẬT TRƯỜNG, TRẦN MỘNG THƠ, VŨ ĐỨC THÀNH, NGUYỄN HOÀN VI, NGUYỄN KHÁNH VĂN, TRẦN THỊ ÁI VI, HUỲNH VĂN PHƯỚC, ĐOÀN MINH TÂM

Viện Công nghệ sinh học và thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp thành phố Hồ Chí Minh

tranthiphuongnhung@iuh.edu.vn

DOIs: https://doi.org/10.46242/jstiuh.v65i05.4965

Tóm tắt : Cây sơn chi (*Gardenia jasminoides* Ellis) thể hiện tiềm năng chống oxy hóa, kháng khuẩn và chống viêm. Quả *G. jasminoides* được ghi nhận như là một vị thuốc dân gian để điều trị các bệnh khác nhau như giải độc, lợi tiểu, bệnh đường tiêu hóa, lở loét và sưng khớp,v..v... Tuy nhiên, tác dụng chữa bệnh của chiết xuất ethanol từ quả sơn chi (EtGJ) về viêm khớp dạng thấp (rheumatoid arthritis-RA), chứng rối loạn viêm tự miễn vẫn chưa được làm sáng tỏ. Trong nghiên cứu này, tác dụng chống viêm khớp của EtGJ đối với bệnh viêm khớp do thuốc bổ trợ hoàn toàn của Freund (Complete Freund's Adjuvant-CFA) gây ra ở chuột lần đầu được ghi nhận. Cao chiết quả sơn chi được chiết xuất bằng dung môi ethanol và sàng lọc hóa học thực vật bằng phương pháp định tính. CFA được tiêm trong da để gây viêm khớp dạng thấp ở chuột Swiss albino. Đánh giá mức độ nghiêm trọng của viêm khớp lâm sàng được đo bằng phương pháp chấm điểm viêm khớp. Đánh giá mức độ nghiêm trọng mô học của viêm khớp được đo bằng phương pháp đánh giá mô bệnh khớp. Đường kính và chu vi khớp được đo bằng thước cặp Vernier kỹ thuật số. Điều trị bằng EtGJ qua đường uống (liều dùng 100, 200 và 300 mg/kg) đã cải thiện tình trạng RA của chuột bằng cách giảm lượng bạch cầu, yếu tố thấp khớp và phản ứng protein C, giảm đường kính và chu vi khớp cũng như giảm điểm số viêm khớp. EtGJ cũng ức chế sự hình thành mảng pannus, giảm sự xâm nhập và tăng sinh của các tế bào viêm, phục hồi sụn khớp trong các mô bệnh khớp. Điều trị bằng đường uống với EtGJ đã cải thiện tình trạng RA của chuột thông qua các hoạt động chống viêm. Kết quả nghiên cứu hiện tại cho thấy chiết xuất ethanol từ quả sơn chi có tiềm năng trong điều trị bệnh viêm khớp dạng thấp.

Từ khóa: CFA, *Gardenia jasminoides* Ellis, viêm khớp dạng thấp

1. GIỚI THIỆU

Viêm khớp dạng thấp là một bệnh tự miễn dịch, nó được đặc trưng bởi viêm màng hoạt dịch kèm theo sự xâm nhập của các tế bào miễn dịch bao gồm tế bào T, tế bào B, tế bào đuôi gai, bạch cầu trung tính và đại thực bào gây tổn thương sụn và tiêu xương ở khớp [1]. RA ảnh hưởng đến khoảng 1% dân số toàn cầu [2]. RA có liên quan đến bệnh cột sống cổ, hội chứng cổ tay, bệnh phổi kẽ, bệnh tim mạch, trầm cảm và rối loạn giấc ngủ [1]. Bên cạnh đó, RA có thể gây ra các vấn đề cá nhân và cảm xúc, đồng thời tạo ra gánh nặng kinh tế xã hội đáng kể [3]. Điều trị y tế của RA bao gồm thuốc chống thấp khớp sinh học, thuốc chống thấp khớp thông thường và thuốc giảm đau. Tuy nhiên, những phương pháp điều trị sẵn có này không thể điều trị bệnh hoàn toàn và có thể gây nhiều tác dụng phụ như đầy bụng, tiêu chảy hoặc táo bón, xuất huyết hoặc loét dạ dày, tăng huyết áp, suy tim, đột quy, nhồi máu cơ tim, v..v... Do đó, việc phát triển các phương pháp điều trị mới cho RA là cần thiết [4].

Cây sơn chi (*Gardenia jasminoides* Ellis) thuộc họ thuộc họ cà phê (Rubiaceae), có nguồn gốc từ châu Á. Trong dân gian các cây thuộc chi Gardenia được dùng làm thuốc chữa bệnh nhờ sự hiện diện của các chất chuyển hóa thứ cấp. Quả *G. latifolia* được dùng làm thuốc dân gian để điều trị các bệnh như xuất huyết, bệnh ngoài da, sâu răng, đau dạ dày, v.v... dịch chiết từ quả này còn được dùng làm thuốc nhuộm và phụ gia thực phẩm do chứa nhiều sắc tố màu vàng [5]. Cây *G. augusta* a được chứng minh là trong thành phần có chứa các hợp chất hóa học như crocetin, crocin, geniposide và genipin, có khả năng điều trị vàng da, nhức đầu, phù nề, sốt, rối loạn gan, tăng huyết áp và chống viêm [6]. *G. jasminoides* sở hữu nhiều hoạt động dược lý như tác động tích cực đến hệ thống tim mạch và tiêu hóa, chống trầm cảm, chống viêm và

© 2023 Trường Đại học Công nghiệp thành phố Hồ Chí Minh

bảo vệ hệ thần kinh [7]. *G. gummifera* có đặc tính làm se, tống hơi được sử dụng trong việc kiểm soát chứng khó tiêu và bệnh trĩ, nó cũng hữu ích trong điều trị đầy hơi để làm sạch vết loét và vết thương hôi, thuốc chống co giật [8]. Gần đây đã có báo cáo về chiết xuất quả dành dành có khả năng kháng viêm *in vitro* và hoạt tính chống viêm khớp mạn tính do carrageenan gây ra trên chuột [9, 10]. Tuy nhiên, tác dụng dược lý của chiết xuất ethanol từ quả sơn chi đối với RA, một chứng rối loạn viêm tự miễn vẫn chưa được làm sáng tỏ. Nghiên cứu này thực hiện nhằm điều tra tác dụng chống viêm khớp của EtGJ ở chuột bị viêm khớp dạng thấp gây ra bởi CFA và đánh giá giá trị của nó trong điều trị RA.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên liệu

Quả sơn chi (*G. jasminoides*) tươi được thu thập tại huyện Châu Thành, tỉnh Long An vào tháng 3 năm 2022 (Hình 1A). Quả được rửa sạch bằng nước máy sau đó rửa lại bằng nước cất, được sấy khô ở 60ºC và nghiền nhỏ (Hình 1B và 1C). Vật liệu quả sơn chi nghiền nhỏ được đóng gói chân không và bảo quản ở nhiệt độ phòng để dùng cho các thí nghiệm tiếp theo (Hình 1C).

Chiết xuất ethanol quả sơn chi (*G. jasminoides*): Vật liệu nghiền của quả sơn chi được trộn với ethanol theo tỷ lệ 1:10 (W/V) và được ngâm ở nhiệt độ phòng trong 72 giờ trong điều kiện được khuấy đảo liên tục. Dịch lọc được lọc qua giấy lọc Whatmann No.4. Ethanol được loại bỏ khỏi hỗn hợp bằng cách lọc và làm bay hơi bằng thiết bị cô quay (Thụy Sĩ). Chiết xuất ethanol quả sơn chi đã được thu nhận (đặt tên là EtGJ) và được bảo quản ở nhiệt độ 4°C để phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo (Hình 1D) [11].

Hình 1. Chiết xuất ethanol từ quả sơn chi (*G. jasminoides*). A. Quả sơn chi tươi; B. Quả sơn chi phơi khô; C. Quả sơn chi khô đã được nghiền nhỏ; D. Chiết xuất ethanol quả sơn chi (EtGJ)

2.2. Sàng lọc hóa chất thực vật của EtGJ

Sàng lọc định tính cacbonhydrat: Nhỏ 1 mL thuốc thử Molisch (dung dịch α-naphthol trong ethanol) vào 2 mL dịch chiết và nhỏ từ từ vài giọt H_2SO_4 đặc và lắc cẩn thận dung dịch thu được. Sự xuất hiện của một vòng màu tím ở bề mặt phân cách của hai chất lỏng cho thấy sự có mặt của cacbohydrat trong dịch chiết [12]. Sàng lọc định tính tannin: 1 mL dung dịch chiết được thêm vào 2 mL $FeCl_2$ 5%, kết quả xuất hiện màu xanh đậm hoặc xanh đen [13]. Sàng lọc định tính saponin: 2 mL dịch chiết nước và 2 mL nước cất được lắc trong 15 phút trong ống đong chia độ. Lớp bọt 1 cm nổi lên là biểu hiện cho sự có mặt của saponin [12]. Sàng lọc định tính flavonoit: trộn 2 mL dịch chiết và 1 mL NaOH 2 N. Màu vàng cho thấy sự hiện diện của flavonoit [12]. Sàng lọc định tính phenolic: 1 mL dịch chiết được trộn với 2 mL dung dịch $Pb(C_2H_3O_2)_2$ 10% và kết tủa màu nâu cho thấy phản ứng dương tính [12]. Sàng lọc định tính ancaloit: 1 mL dịch chiết trong nước, 2 mL HCl đậm đặc được thêm vào, sau đó nhỏ vài giọt thuốc thử Mayer (dung dịch HgCl2 và KI trong nước), màu xanh lục hoặc kết tủa trắng cho thấy sự có mặt của ancaloit [12]. Sàng lọc định tính protein: 1 mL dịch chiết phản ứng với 5–6 giọt thuốc thử Millon (hỗn hợp của $Hg(NO_3)_2$, HNO_3 đậm đặc và nước cất) và tạo thành kết tủa trắng đổi màu thành đỏ khi đun nóng [12]. Sàng lọc định tính steroit: 1 mL dịch chiết trong nước, thêm 10 mL chloroform, nhỏ từ từ 10 mL H_2SO_4. Lớp trên chuyển sang màu đỏ và lớp dưới chuyển sang màu vàng xanh [12]. Sàng lọc định tính tecpenoit: 1 mL dịch chiết nước phản ứng với 2 mL cloroform và sau đó nhỏ từ từ vài giọt H_2SO_4 đậm đặc. Một giao diện có màu nâu đỏ xuất hiện [12]. Sàng lọc định tính glycosit: 5 mL dịch chiết nước, 2 mL CH_3COOH, một giọt dung dịch $FeCl_3$ và 1 mL H_2SO_4 đậm đặc tạo thành một vòng màu nâu và một vòng màu tím bên dưới [12].

2.3. Động vật thí nghiệm

Chuột Swiss albino 6 - 7 tuần tuổi được mua từ Viện Pasteur, TP. HCM. Tất cả các động vật đều nhận được thức ăn viên tiêu chuẩn dành cho loài gặm nhấm và nước đã được lọc bằng hệ thống lọc RO [14]. Chuột được nuôi trong lồng kính có kích thước dài × rộng × cao = 60 × 30 × 30 cm (54 cm^3) (5 chuột/lồng), trong

điều kiện phòng thí nghiệm tiêu chuẩn ở nhiệt độ môi trường là 30°C ± 2°C, với độ ẩm 50 - 60%, theo lịch sáng/tối = 12 giờ/12 giờ hàng ngày. Sau khi được thu mua về chuột được nuôi thích nghi với điều kiện mới trong 7 ngày trước khi bắt đầu thí nghiệm. Vật liệu dăm gỗ dùng để lót chuồng đã được phun Effective Microorganismas khử trùng, xử lý mùi hôi và được thay đổi thường xuyên 3 ngày/lần. Việc điều trị động vật được thực hiện theo hướng dẫn của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) [15]. Quy trình kiểm tra được thực hiện theo đúng Tuyên bố của Helsinki (2014) [16]. Tất cả động vật được con người chăm sóc theo quy định Pháp luật Việt Nam về sử dụng và chăm sóc động vật thí nghiệm và theo Bộ Y tế Việt Nam Hướng dẫn về đạo đức trong nghiên cứu y sinh [17].

2.4. Thử nghiệm độc tính cấp tính của EtGJ

Nghiên cứu độc tính cấp tính qua đường miệng của chiết xuất ethanol quả sơ chi (*G. jasminoides*) được thực hiện bằng phương pháp thử nghiệm 'Lên và Xuống' cho phép ước tính LD_{50} với khoảng tin cậy và một chất được phân loại về độc tính cấp tính theo hệ thống phân loại và ghi nhãn hóa chất hài hòa toàn cầu trên chuột nhắt trắng. Mô hình thử nghiệm được thiết kế với 3 nhóm thử nghiệm nhóm $EtGJ_{1000}$, $EtGJ_{3000}$ và $EtGJ_{5000}$, chuột được sử dụng EtGJ với liều đơn 1000, 3000 và 5000 mg/kg, tương ứng và một nhóm đối chứng (chuột được uống nước muối sinh lí 5 mg/kg) (6 chuột/nhóm). Nghiên cứu được thực hiện theo Hướng dẫn của Tổ chức Hợp tác và Phát triển Kinh tế (OECD) số 425 [18]. Mỗi con vật được chọn tại một thời điểm, cân và định lượng với thể tích chiết xuất tương đương. Chiết xuất được dùng qua đường uống bằng cách sử dụng gavage. Mỗi con vật được quan sát liên tục sau khi dùng thuốc trong 5 phút đầu tiên. Sau đó, tiếp tục quan sát 15 phút một lần trong 4 giờ đầu tiên sau khi dùng EtGJ, tiếp theo cứ sau 30 phút quan sát một lần trong 6 giờ và hàng ngày trong 48 giờ. Các dấu hiệu nhiễm độc như thay đổi ở da, lông, mắt, niêm mạc, hô hấp, tuần hoàn, hoạt động tự chủ và thần kinh trung ương, hoạt động vận động, co giật, run, tiết nước bọt, tiêu chảy, ngủ, v..v… được theo dõi và ghi nhận đầy đủ. Các con vật được theo dõi trong 14 ngày để xác định kết quả gây chết trong thời gian dài. Khối lượng cơ thể của từng con vật được đo vào các ngày 1, 7 và 14.

2.5. Gây cảm ứng viêm khớp

Viêm khớp phụ trợ được gây ra vào ngày 0 của quá trình thí nghiệm bằng cách tiêm dưới da một lần 0,1 mL CFA [chứa 5,0 mg *Mycobacterium tuberculosis* khô, bị giết bằng nhiệt (chủng H37Ra), Sigma-Aldrich, USA] vào bề mặt gan bàn chân sau bên phải của chuột [19]. Mô hình viêm khớp này, được gọi là chuột bị viêm khớp dạng thấp do CFA gây ra (RA), đã được sử dụng rộng rãi như một mô hình RA [19]. Thời gian 7 ngày được đề xuất để bệnh viêm khớp phát triển, tất cả các con chuột đều thể hiện các dấu hiệu của bệnh viêm khớp như sưng, tấy đỏ và hạn chế cử động trong giai đoạn này [20]. Các dấu hiệu lâm sàng của chuột RA được theo dõi và ghi lại. Vào ngày thứ 8, máu được thu thập bằng cách chọc ngược quỹ đạo (chèn pipet Pasteur có thành mịn vào tĩnh mạch của hốc mắt bên dưới nhãn cầu, máu chảy vào pipet) để xét nghiệm sinh hóa và bắt đầu điều trị. Quá trình điều trị kết thúc vào ngày 28. Khối lượng cơ thể, đường kính, chu vi, điểm viêm khớp của chuột được đo 7 ngày một lần từ ngày '0' đến ngày '28'. Vào ngày 28, thu nhận máu để xét nghiệm sinh hóa. Những con chuột được gây mê bằng tiêm thuốc an thần Diazepam [21, 22] và được giải phẫu, thu nhận khớp sử dụng cho nghiên cứu mô bệnh khớp.

2.6. Thiết kế thử nghiệm

Các nhóm thí nghiệm được thiết kế theo mô tả của Aloke và cộng sự (2019) [23]. 30 con chuột (30 - 35 g) được chia thành sáu nhóm (5 chuột/nhóm). Nhóm bình thường: Đối chứng bình thường, chuột khỏe mạnh, nhận nước muối sinh lí 5 mg/kg. Nhóm RA: Đối chứng tiêu cực, chuột RA không được điều trị, nhận 5 mg/kg nước muối sinh lí mỗi ngày. Nhóm RA+Mobic: Đối chứng tích cực, chuột RA được điều trị bằng thuốc chuẩn Mobic (0,2 mg/kg) (Boehringer Ingelheim, Việt Nam) mỗi ngày [24]. Nhóm $RA+EtGJ_{100}$, Nhóm nhóm $RA+EtGJ_{200}$, Nhóm $RA+EtGJ_{300}$: Chuột RA nhận được 100, 200 và 300 mg EtGJ/kg [25] tương ứng mỗi ngày.

2.7. Khối lượng cơ thể và khối lượng cơ quan tương đối

Khối lượng cơ thể của chuột được đo 7 ngày một lần. Vào ngày thứ 28, những con chuột được gây mê bằng tiêm thuốc an thần Diazepam [21, 22] và được phẫu thuật, lá lách và tuyến ức được thu thập. Sử dụng cân điện tử Sartorius Entris 3202i-1S (Đức) để đo khối lượng của cơ thể và các cơ quan. Phần trăm tăng khối lượng cơ thể (WG) được tính theo công thức:

$$\text{WG (\%)} = \frac{\text{Khối lượng cơ thể vào cuối mỗi tuần (g)}}{\text{Khối lượng cơ thể ban đầu (g)}} \text{ x } 100 \quad [26]$$

Khối lượng tương đối của cơ quan nội tạng được tính theo công thức:

$$\text{Khối lượng cơ quan tương đối (\%)} = \frac{\text{Khối lượng nội tạng tuyệt đối (g)}}{\text{Khối lượng cơ thể vào ngày phẫu thuật (g)}} \text{ x } 100 \quad [27]$$

2.8. Chỉ số lá lách

Chỉ số lá lách được tính toán thông qua phép đo chiều dài, chiều rộng và chiều cao của lá lách như mô tả của Jannat và cộng sự (2019) [28] để đánh giá mức độ lách to trong tình trạng bệnh viêm khớp dạng thấp do CFA gây ra và sau khi được điều trị bởi EtGJ.

2.9. Đường kính và chu vi khớp

Đường kính và chu vi khớp là chỉ số để đánh giá mức độ sưng và phù nề của khớp. Sử dụng thước cặp Vernier kỹ thuật số (Mitutoyo, Nhật Bản) để đo đường kính khớp. Các phép đo được thực hiện hàng tuần từ ngày '0' đến ngày '28'. Sự thay đổi về đường kính khớp được tính bằng hiệu giữa đường kính khớp cuối cùng và ban đầu [29]. Chu vi khớp được xác định bằng cách đo hai đường kính vuông góc của khớp: đường kính ổ sau và đường kính trước - sau. Chu vi bàn chân được tính theo công thức: $\text{Chu vi (cm)} = 2\pi\sqrt{(a^2 + b^2)/2}$. Trong đó: a - đường kính bên, b - đường kính trước - sau [30].

2.10. Điểm viêm khớp

Chuột được kiểm tra 7 ngày một lần để biết các thông số lâm sàng. Tỷ lệ mắc bệnh viêm khớp được đánh giá vĩ mô. Mỗi khớp được kiểm tra mức độ sưng và đỏ. Mức độ nghiêm trọng của bệnh viêm khớp được phân loại theo thang điểm từ 0-3 cho mỗi bàn chân về mức độ đỏ và sưng. Điểm 0: khớp bình thường, điểm 1: sưng khớp nhẹ và đỏ bàn chân, điểm 2: sưng khớp vừa phải và bàn chân sưng phù nề, điểm 3: sưng khớp nghiêm trọng và sưng nhiều khớp. Điểm viêm khớp được tính cho bốn chi, tổng điểm viêm khớp tối đa là 12 trên mỗi con chuột [31].

2.11. Huyết học và sinh hóa

Máu được thu nhận bằng phương pháp chọc quỹ đạo ngược bằng pipet Pasteur thông qua tĩnh mạch của hốc mắt [32] và được đựng trong ống tráng K_2EDTA hoặc ống không chứa chất chống đông máu, được bảo quản lạnh ở 4^{o}C. Các thông số huyết học như hồng cầu (red blood cells - RBC), bạch cầu (white blood cells - WBC), bạch cầu lympho (lymphocytes - LYM), bạch cầu mono (monocytes - MONO), bạch cầu hạt (granulocytes - GRA) được phân tích bằng máy phân tích huyết học tự động (Mindray BC-3000 PLUS, Trung Quốc). Tốc độ lắng hồng cầu (Erythrocyte Sedimentation Rate - ESR) được thực hiện theo phương pháp Westergren có sửa đổi. Các thông số sinh hóa như protein phản ứng C (C-reactive protein - CRP), yếu tố dạng thấp (Rheumatoid factors - RF) được phân tích bằng máy phân tích sinh hóa tự động (Chemwell T, Mỹ).

2.12. Mô bệnh khớp

Vào cuối thí nghiệm, khớp gối của chân sau bên phải đã được thu nhận và được cố định trong dung dịch formalin 10%. Các khớp sau đó được nhúng trong parafin và được cắt lát mỏng 4 µm bởi một microtome. Các phần cắt của khớp được cố định trên phiến kính và được nhuộm bằng hematoxylin và eosin. Tổn thương mô học được quan sát và chụp ảnh qua kính hiển vi và được đánh giá sự phá hủy sụn, xương, sự hình thành pannus, sự thâm nhiễm tế bào đơn nhân và mạch máu trong các mô hoạt dịch theo mô tả của Omoto và cộng sự (2005) [33].

2.13. Phân tích thống kê

Các giá trị được biểu thị bằng giá trị trung bình ± SD. Phân tích thống kê được thực hiện bằng ANOVA một chiều. Sau đó, thử nghiệm khác biệt nhỏ nhất có ý nghĩa (LSD) được sử dụng để so sánh các nhóm liều và nhóm đối chứng. Sự khác biệt với $p < 0,05$ được coi là có ý nghĩa thống kê.

3. KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN

3.1. Sàng lọc hóa chất thực vật của EtGJ

Bảng 1. Phân tích hóa học thực vật của chiết xuất ethanol quả sơn chi (*G. jasminoides*)

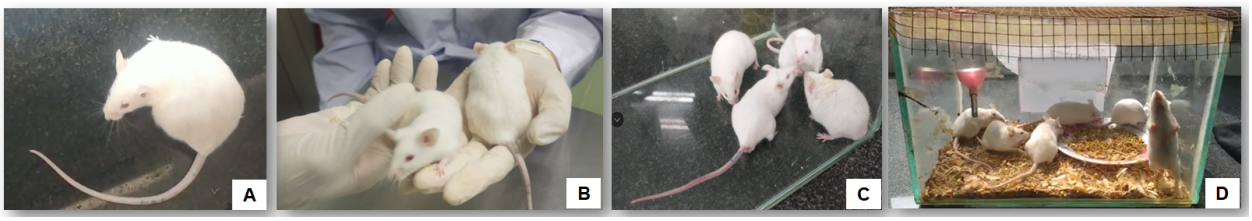
Chất hóa học thực vật	Hiện diện trong EtGJ	Chất hóa học thực vật	Hiện diện trong EtGJ
Ancaloit	+	Saponin	+
Tannin	+	Flavonoit	++
Cacbonhydrat	+	Phenolic	+++
Steroit	-	Glycosit	+++
Tecpenoit	++	Protein	-

Sự hiện diện của hóa chất thực vật trong EtGJ: − không có, + có yếu, ++ có vừa phải, +++ có nhiều

Chất chiết xuất ethanol quả sơn chi (*G. jasminoides*) đã được kiểm tra sự hiện diện của các chất hóa học thực vật trước khi sử dụng chúng để điều trị cho mô hình chuột RA. Rất nhiều chất hóa học thực vật bao gồm cacbonhydrat, tannin, saponin, flavonoit, phenolic, ancaloit, tecpenoit, glycosit, v.v. đã được xác định trong chiết xuất (Bảng 1). Những hoạt chất này cũng hiện diện trong chiết xuất quả *Gardenia latifolia* do Aiton mà Sundar và cộng sự (2018) công bố [34]

3.2. Thử nghiệm độc tính cấp tính của EtGJ

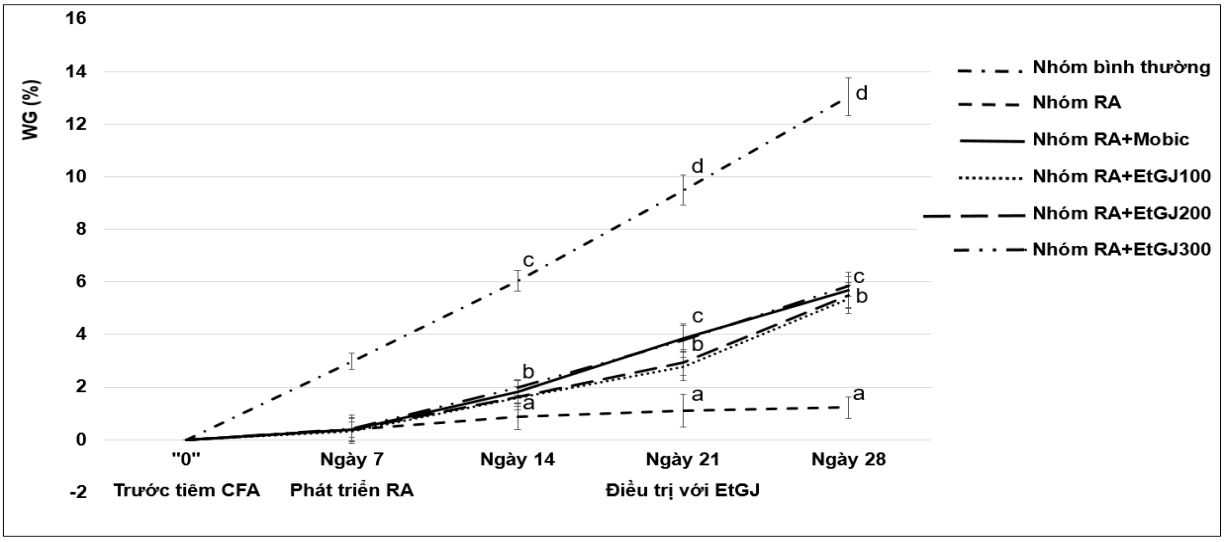
Thử nghiệm độc tính cấp tính bằng phương pháp "Lên và Xuống" ở liều giới hạn đường uống là 1000, 3000 và 5000 mg/kg EtGJ không tạo ra bất kỳ tác dụng phụ nào, không gây tử vong ở chuột. Không có tác dụng gây chết nào được ghi nhận trong suốt thời gian quan sát ngắn hạn và dài hạn. Không có dấu hiệu độc tính nào được quan sát thấy ở động vật trong suốt thời gian nghiên cứu 14 ngày (Hình 2). Do đó, chiết xuất ethanol quả sơn chi (*G. jasminoides*) an toàn ở những liều lượng đã thử nghiệm và LD_{50} đường uống được coi là lớn hơn 5000 mg/kg ở chuột. Theo các tiêu chí của OECD trong Hệ thống hài hòa toàn cầu (Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals - GHS) về phân loại và ghi nhãn hóa chất đối với các chất và hỗn hợp hóa học [35], các chất có LD_{50} > 2000 - 5000 mg/kg được xếp vào nhóm 5 và các chất có giá trị LD_{50} qua đường miệng > 5000 mg/kg được coi là an toàn sau khi phơi nhiễm cấp tính. Các kết quả phù hợp với kết luận của các nghiên cứu trước đây về thử độc tính cấp tính của bột sơn chi vàng được chiết xuất từ quả *Gardenia jasminoides* Ellis trên chuột [36].



Hình 2. Thử nghiệm độc tính cấp tính của EtGJ. A. Chuột nhóm đối chứng; B. Những con chuột nhóm $EtGJ_{1000}$; C. Những con chuột nhóm $EtGJ_{3000}$; D. Những con chuột nhóm $EtGJ_{5000}$

3.3. Khối lượng cơ thể

Những thay đổi về lượng thức ăn, nước uống và mức tăng khối lượng cơ thể đã được sử dụng như một chỉ báo về tình trạng sức khỏe chung của động vật thí nghiệm. Tiêu thụ thức ăn được điều chỉnh thông qua một số cơ chế sinh học phức tạp nhằm đảm bảo khối lượng cơ thể ổn định trong thời gian dài. Sự thèm ăn điều chỉnh ham muốn của cơ thể đối với thực phẩm và đóng vai trò quan trọng trong việc điều chỉnh cân nặng [37]. Như thể hiện trong hình 3, khối lượng cơ thể của chuột ở nhóm bình thường tăng đều qua thời gian thí nghiệm. Tuy nhiên, tốc độ tăng trưởng khối lượng cơ thể chậm hơn đã được quan sát thấy ở những con chuột được tiêm CFA.



Hình 3. Hiệu quả điều trị của EtGJ đối với mức tăng khối lượng cơ thể của chuột RA. Các giá trị được biểu thị bằng Mean ± SD (n = 5), các chữ cái a, b, c, d biểu thị sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm.

Việc mức tăng khối lượng cơ thể chậm qua trong thời gian cảm ứng viêm khớp dạng thấp do CFA gây ra ở chuột có thể là do chán ăn và rối loạn chuyển hóa carbohydrate, protein hoặc chất béo, hoặc có thể do tác động của vi khuẩn gây ra tình trạng viêm nhiễm, rối loạn trao đổi chất, dẫn đến giảm cảm giác thèm ăn [38]. Sau khi được điều trị bằng chiết xuất EtGJ, nhu cầu ăn, uống của chuột đã tăng lên, kéo theo sự tăng lên về khối lượng cơ thể. Đến ngày thứ 28 của quá trình thí nghiệm, sự khác biệt về mức tăng khối lượng cơ thể giữa các nhóm thí nghiệm rất rõ rệt. WG (%) của chuột ở nhóm RA hầu như thay đổi không đáng kể. Trong khi đó ở các nhóm RA+EtGJ$_{100}$, RA+EtGJ$_{200}$ và RA+EtGJ$_{300}$ chỉ số WG% đã tăng lên rõ rệt và gần tương đương với nhóm RA+Mobic ($p<0,05$). Abizi và cộng sự (2021) cũng đã chứng minh kết quả tương tự với nghiên cứu của chúng tôi về sự tăng khối lượng cơ thể của chuột bị viêm khớp sau khi được xử lý bởi chiết xuất *Mitracarpus scaber* (Rubiaceae) [39].

3.4. Khối lượng cơ quan tương đối và chỉ số lá lách

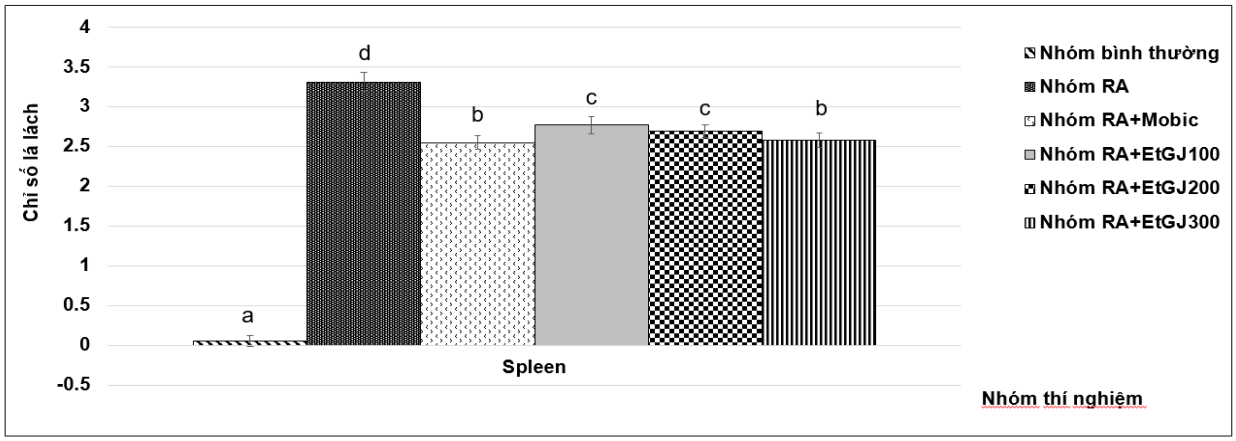
Bảng 2. Hiệu quả điều trị của EtGJ đối với khối lượng tuyến ức và lá lách tương đối và chỉ số lá lách của chuột bị viêm khớp do CFA

Chỉ tiêu	Nhóm bình thường	Nhóm RA	Nhóm RA+Mobic	Nhóm RA+EtGJ$_{100}$	Nhóm RA+EtGJ$_{200}$	Nhóm RA+EtGJ$_{300}$
Tuyến ức (%)	$6,76 \pm 0,14^{a}$	$9,42 \pm 0,23^{d}$	$7,15 \pm 0,31^{b}$	$7,86 \pm 0,43^{c}$	$7,62 \pm 0,34^{c}$	$7,21 \pm 0,29^{b}$
Lá lách (%)	$4,16 \pm 0,37^{a}$	$6,55 \pm 0,38^{d}$	$4,48 \pm 0,43^{b}$	$5,65 \pm 0,27^{c}$	$5,28 \pm 0,28^{c}$	$4,52 \pm 0,24^{b}$

Các giá trị được biểu thị bằng Mean ± SD (n = 5), các chữ cái a, b, c, d biểu thị sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm

Khối lượng tương đối của lá lách và tuyến ức (Relative organ weight - ROW) được tính tương ứng bằng khối lượng tuyệt đối của cơ quan chia cho khối lượng cơ thể. Theo kết quả phân tích thống kê ở bảng 2, khối lượng tương đối của các cơ quan này tăng mạnh ở chuột bị viêm khớp (nhóm RA), khác biệt đáng kể so với nhóm bình thường và các nhóm được điều trị bởi EtGJ ($p<0,05$). Khối lượng tương đối của lá lách và tuyến ức giảm mạnh ở các nhóm được điều trị bởi EtGJ so với nhóm RA ($p<0,05$). Giảm mạnh nhất là ở nhóm RA+EtGJ$_{300}$ gần tương đương với nhóm RA+Mobic ($p<0,05$).

Kết quả ở Hình 4 cho thấy chỉ số lách tăng cao, lách sưng to nghiêm trọng ở chuột bị viêm khớp (nhóm RA). Tuy nhiên, sau khi điều trị bởi EtGJ, chỉ số lách đã giảm mạnh. Có sự khác biệt đáng kể về chỉ số lách ở các nhóm điều trị với EtGJ so với nhóm đối chứng ($p<0,05$). Đặc biệt chỉ số lách ở nhóm RA+EtGJ$_{300}$ gần tương đương với nhóm RA+Mobic.



Hình 4. Hiệu quả điều trị của EtGJ đối với chỉ số lá lách của chuột bị viêm khớp do CFA. Các giá trị được biểu thị bằng Mean ± SD (n = 5), các chữ cái a, b, c, d biểu thị sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm.

Tuyến ức và lá lách là hai cơ quan miễn dịch quan trọng, chúng phản ánh một cách có hệ thống tình trạng chức năng miễn dịch của cơ thể. Lá lách sản xuất tế bào lympho, có vai trò quan trọng trong miễn dịch dịch thể. Tuyến ức tạo điều kiện cho sự trưởng thành của tế bào T, một phần quan trọng của hệ thống miễn dịch qua trung gian tế bào. Báo cáo của Si và cộng sự (2021) cho rằng tuyến ức và lá lách có thể phát triển phì đại hoặc tăng sản rõ rệt trong RA [40]. Với sự hiện diện của flavonoit trong chiết xuất sẽ có tác dụng ức chế miễn dịch, chống viêm, chống oxy hóa, làm giảm các triệu chứng của RA bằng cách ngăn chặn việc tạo ra NO, TNF-α, PGE2 và kích hoạt NF-kB. Từ đó có thể ức chế các hoạt động miễn dịch của tuyến ức và lá lách ở chuột RA [41]. Kết quả về ROW của lá lách và tuyến ức và chỉ số lách cho thấy EtGJ có tác dụng đáng kể đến các cơ quan miễn dịch ở chuột RA. Điều này ngụ ý nói lên rằng chiết xuất EtGJ có tiềm năng trong điều trị RA và là phương pháp điều trị viêm khớp dạng thấp khá hiệu quả.

3.5. Đường kính và chu vi khớp

Bảng 5. Hiệu quả điều trị của EtGJ đối với đường kính và chu vi khớp của chuột bị viêm khớp do CFA

Chỉ tiêu	Nhóm thí nghiệm	Trước tiêm CFA	Khởi phát RA	Điều trị RA với EeCU		
		Ngày 0	Ngày 7	Ngày 14	Ngày 21	Ngày 28
Chu vi khớp (mm)	Bình thường	20,45 ± 0,28^{a}	20,51 ± 0,33^{a}	20,55 ± 0,39^{a}	20,68 ± 0,27^{a}	20,72 ± 0,33^{a}
	RA	20,39 ± 0,21^{a}	28,36 ± 0,28^{d}	29,64 ± 0,33^{d}	30,76 ± 0,27^{d}	31,85 ± 0,33^{d}
	RA+Mobic	20,51 ± 0,27^{a}	28,41 ± 0,34^{b}	24,46 ± 0,45^{b}	23,66 ± 0,24^{bc}	22,85 ± 0,41^{b}
	RA+EtGJ$_{100}$	20,43 ± 0,32^{a}	28,43 ± 0,27^{b}	25,73 ± 0,34^{c}	24,69 ± 0,36^{bc}	23,78 ± 0,36^{c}
	RA+EtGJ$_{200}$	20,27 ± 0,25^{a}	28,55 ± 0,19^{c}	25,85 ± 0,26^{c}	24,55 ± 0,39^{b}	23,56 ± 0,27^{c}
	RA+EtGJ$_{300}$	20,34 ± 0,36^{a}	28,34 ± 0,22^{b}	24,77 ± 0,22^{c}	23,82 ± 0,27^{c}	22,94 ± 0,29^{b}
Đường kính khớp (mm)	Bình thường	0,62 ± 0,19^{a}	0,59 ± 0,23^{a}	0,69 ± 0,28^{a}	0,74 ± 0,31^{a}	0,77 ± 0,25^{a}
	RA	0,59 ± 0,22^{a}	3,46 ± 0,24^{d}	4,03 ± 0,25^{d}	4,24 ± 0,19^{d}	4,37 ± 0,23^{d}
	RA+Mobic	0,61 ± 0,19^{a}	3,26 ± 0,34^{b}	2,79 ± 0,26^{b}	2,46 ± 0,27^{b}	2,11 ± 0,38^{b}
	RA+EtGJ$_{100}$	0,65 ± 0,24^{a}	3,33 ± 0,22^{c}	3,09 ± 0,33^{c}	2,95 ± 0,33^{c}	2,77 ± 0,44^{c}
	RA+EtGJ$_{200}$	0,57 ± 0,33^{a}	3,41 ± 0,35^{c}	2,91 ± 0,24^{c}	2,88 ± 0,29^{c}	2,55 ± 0,32^{c}
	RA+EtGJ$_{300}$	0,63 ± 0,25^{a}	3,29 ± 0,37^{bc}	2,85 ± 0,31^{b}	2,48 ± 0,34^{b}	2,19 ± 0,25^{b}

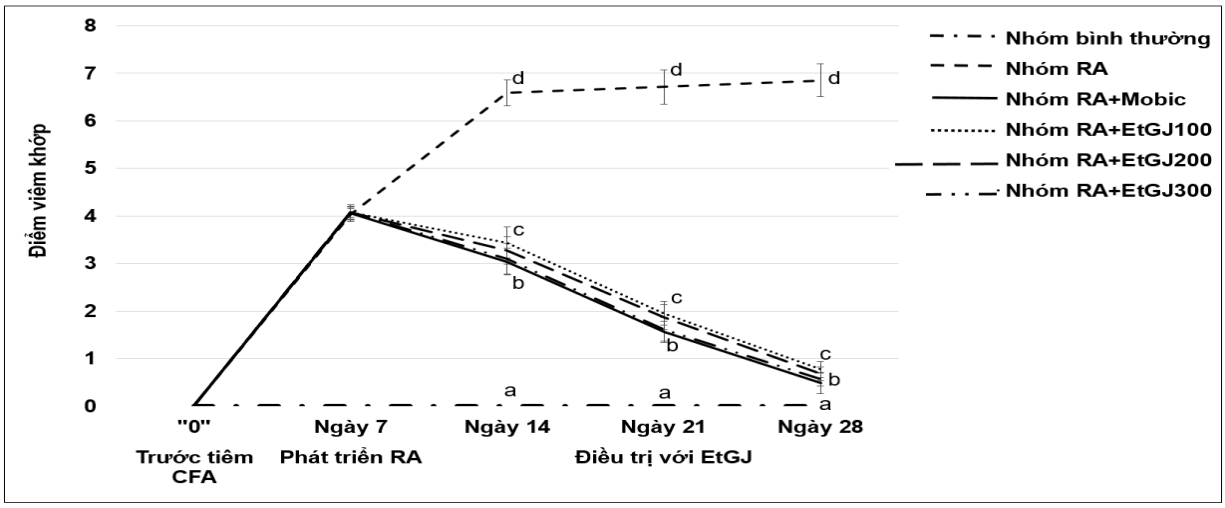
Các giá trị được biểu thị bằng Mean ± SD (n = 5), các chữ cái a, b, c, d biểu thị sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm.

Đường kính và chu vi khớp của chuột tăng đáng kể ($p<0,05$) ở tất cả chuột trong nhóm được tiêm CFA. Chiết xuất ethanol quả sơn chi đã làm giảm đáng kể ($p<0,05$) đường kính và chu vi khớp từ ngày thứ 14 cho đến khi kết thúc điều trị ở ngày thứ 28 so với nhóm kiểm soát viêm khớp (nhóm RA) (Bảng 5). Trong nghiên cứu hiện tại, điều trị RA bằng EtGJ đã cho thấy tiềm năng chống viêm khớp của EtGJ. Nó làm giảm đáng kể tình trạng viêm ở động vật được điều trị bằng cách giảm đường kính và chu vi khớp. Sự sụt giảm

về đường kính và chu vi khớp được quan sát thấy trên động vật trong nhóm viêm khớp sau khi sử dụng EtGJ đã cho thấy tác dụng của chiết xuất có hiệu quả đáng kể trong điều trị RA.

3.5. Điểm viêm khớp

Các biểu hiện viêm khớp của chuột bị viêm khớp do CFA gây ra vào những ngày khác nhau và được đánh giá bằng điểm viêm khớp tùy theo mức độ của tình trạng viêm. Như đã trình bày trong hình 5, sự gia tăng điểm viêm khớp đã được quan sát thấy ở những con chuột sau khi tiêm bằng CFA. Từ ngày thứ 7 đến ngày thứ 28, tổng điểm viêm khớp của chuột ở nhóm RA liên tục tăng. Mức tăng này bị đảo ngược sau khi chuột RA sử dụng EtGJ. Điều trị bằng EtGJ đã làm giảm điểm viêm khớp hiệu quả từ ngày thứ 14 đến ngày thứ 28 ($p < 0,05$). Có sự khác biệt đáng kể về điểm viêm khớp giữa các nhóm RA được điều trị bởi EtGJ so với nhóm đối chứng bình thường và nhóm RA ($p < 0,05$).



Hình 5. Hiệu quả điều trị của EtGJ đối với điểm viêm khớp của chuột bị viêm khớp do CFA. Các giá trị được biểu thị bằng Mean ± SD (n = 5), các chữ cái a, b, c, d biểu thị sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm.

Mô hình RA do CFA gây ra được sử dụng để ước tính dược lý và kiểm soát sinh lý bệnh của các quá trình viêm, cũng như xem xét kỹ về tác dụng chống viêm khớp của EtGJ. RA do CFA gây ra tình trạng viêm cấp tính trong 2-4 ngày đầu sau khi tiêm và sau đó gây ra tình trạng viêm mãn tính kéo dài trong vài tuần tiếp theo [42]. Chuột RA do CFA gây ra cho thấy sự tăng điểm viêm khớp từ ngày thứ 7 và vẫn tăng cho đến ngày 28. Trong khi đó ở các nhóm được điều trị bởi EtGJ điểm viêm khớp đã giảm dần và giảm mạnh vào ngày thứ 28. Kết quả trên đã gợi ý về hiệu quả điều trị RA của chiết xuất EtGJ. Những thay đổi về khối lượng tương đối tuyến ức và lá lách, chỉ số lách, đường kính và chu vi khớp, điểm viêm khớp cho thấy sự ức chế EtGJ phù hợp với các nghiên cứu đã công bố trước đây [43].

3.6. Các thông số viêm

Bảng 6 thể hiện hiệu quả tác động của chiết xuất ethanol quả sơn chi đối với bệnh RA thông qua sự thay đổi các thông số huyết học. Kết quả của bảng này cho thấy, động vật thuộc nhóm không được điều trị (nhóm RA) có mức WBC tăng đáng kể ($p < 0,05$) trong khi mức RBC giảm đáng kể so với động vật thuộc nhóm khỏe mạnh ($p < 0,05$). Sau khi được điều trị bằng EtGJ, hàm lượng WBC đã dần giảm xuống, trong khi đó mức RBC đã tăng lên đáng kể ở các nhóm RA+EtGJ ($p < 0,05$). Kết quả phân tích sinh hóa ở bảng 6 cũng cho thấy một lần tiêm CFA vào bề mặt chân của chuột đã phát triển chứng viêm khớp rõ rệt ở chân sau bên phải, tỷ lệ mắc bệnh là 100%. Trong mô hình RA này, mức ESR và CRP tăng đáng kể ở nhóm chuột RA so với nhóm bình thường ($p < 0,05$). Giá trị cao của CRP trong huyết thanh được sử dụng như một dấu ấn sinh học hữu ích để đánh giá tình trạng viêm đang hoạt động ở động vật bị bệnh viêm khớp. Đồng thời, ESR được đo lâm sàng để hỗ trợ thiết lập sự hiện diện của RA [31]. Nghiên cứu hiện tại cho thấy sự gia tăng đáng kể về các thống số RF, CRP và ESR được coi là một dấu hiệu chẩn đoán khả thi đối với RA. Nồng độ RF, ESR và CRP đã giảm đáng kể ở chuột RA được điều trị bằng EtGJ. Có sự khác biệt đáng kể về các thống số này ở chuột bình thường, chuột RA và chuột bị bệnh được điều trị bằng EtGJ ($p < 0,05$).

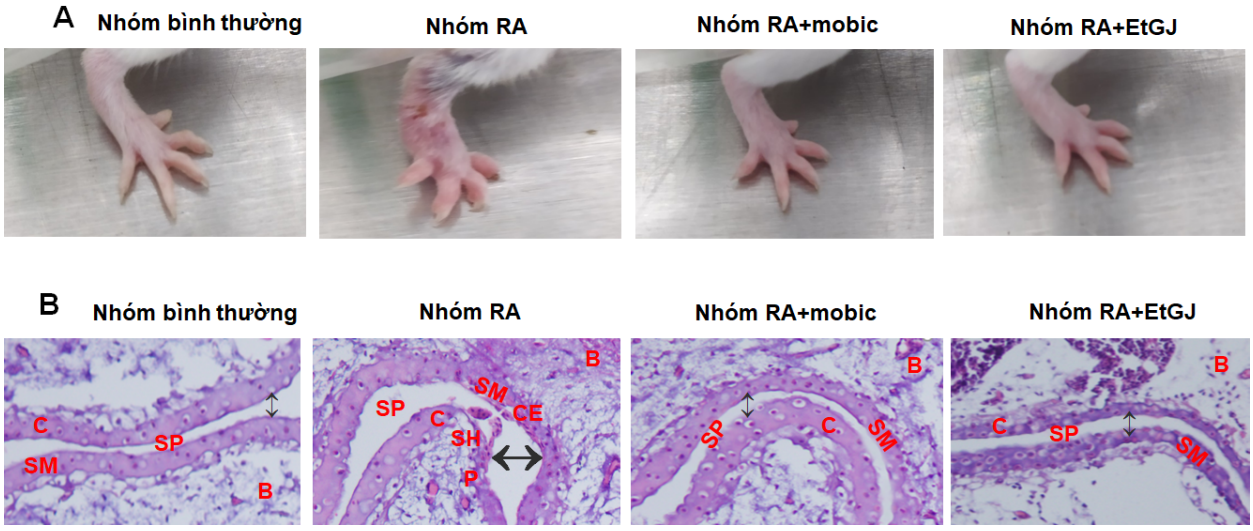
Bảng 6. Hiệu quả điều trị của EtGJ đối với các thông số huyết học và sinh hóa của chuột bị viêm khớp do CFA

Chỉ tiêu	Nhóm bình thường	Nhóm RA	Nhóm RA+Mobic	Nhóm RA+EtGJ$_{100}$	Nhóm RA+EtGJ$_{200}$	Nhóm RA+EtGJ$_{300}$
RBC ($\times 10^6$tb/mm^3)	7,69 ± 0,24^d	4,54 ± 0,33^a	7,14 ± 0,21^c	6,24 ± 0,22^b	6,41 ± 0,31^b	7,27 ± 0,19^c
WBC (x10^{3}tb/mm^3)	5,42 ± 0,21^a	9,77 ± 0,25^d	6,31 ± 0,33^b	7,84 ± 0,29^c	7,72 ± 0,27^c	6,81 ± 0,34^{bc}
Lymphocytes (x10^{3}tb/mm^3)	3,41 ± 0,28^a	5,76 ± 0,34^d	3,79 ± 0,27^{ab}	4,82 ± 0,32	4,64 ± 0,26^c	4,16 ± 0,33^b
Monocytes (x10^{3}tb/mm^3)	1,38 ± 0,24^a	2,39 ± 0,21^d	1,57 ± 0,19^b	1,78 ± 0,23^c	1,92 ± 0,18^{cd}	1,76 ± 0,17^c
Granulocytes (x10^{3}tb/mm^3)	0,33 ± 0,15^a	1,42 ± 0,17^{cd}	0,83 ± 0,26^b	1,24 ± 0,19^c	1,32 ± 0,22^c	1,65 ± 0,13^d
CRP (mg/L)	0,15 ± 0,11^a	8,33 ± 1,09^d	2,13 ± 0,41^b	3,51 ± 0,32^c	3,49 ± 0,27^c	2,22 ± 0,25^b
RF (mg/L)	0,24 ± 0,14^a	9,37 ± 1,25^d	2,53 ± 0,29^b	3,78 ± 0,35^c	3,74 ± 0,19^c	2,66 ± 0,28^b
ESR (mm/hr)	4,29 ± 0,17^a	7,34 ± 0,32^d	4,55 ± 0,28^{ab}	5,71 ± 0,29^{bc}	6,23 ± 0,26^c	4,85 ± 0,34^b

Các giá trị được biểu thị bằng Mean ± SD (n = 5) và các chữ cái a, b, c, d, e liên tiếp biểu thị sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm.

Kết quả này được giải thích là do sự hiện diện của flavonoit trong EtGJ. Một số cơ chế giải thích hoạt động chống viêm của flavonoit đã được mô tả, bao gồm (a) hoạt động thu gom gốc tự do và chống oxy hóa, (b) điều hòa hoạt động tế bào của các tế bào liên quan đến viêm, (c) điều hòa hoạt động của các enzym chuyển hóa axit arachidonic (phospholipase A_2, cyclooxygenase lipoxygenase) và nitric oxit synthase, (d) điều hòa quá trình sản xuất các phân tử tiền viêm khác, (e) điều hòa biểu hiện gen tiền viêm [31]. Với các cơ chế hoạt động của flavonoit như trên, EtGJ đã làm giảm ESR, CRP và RF trong huyết thanh, giảm các triệu chứng viêm khớp trên chuột RA. Sự thay đổi các thông số viêm cũng được chứng minh tương tự trong các công bố trước đây [39].

3.7. Hình thái chân và mô bệnh khớp



Hình 6. Hiệu quả điều trị của EtGJ và Mobic đối với chuột RA thể hiện qua hình thái chân và mô bệnh học của khớp (nhuộm hematoxylin và eosin, độ phóng đại 400); A. Hình ảnh đại diện của bàn chân chuột từ mỗi nhóm; B. Đặc điểm mô bệnh khớp của chuột từ mỗi nhóm. Ký hiệu: B - Xương; C – Sụn; CE - Xói mòn sụn; SP - Không gian hoạt dịch; SM: Màng hoạt dịch; SH: Tăng sản hoạt dịch; P: Pannus; ↔ Không gian chung; → thâm nhiễm tế bào.

Hình 6A cho thấy chân chuột ở nhóm RA có biểu hiện sưng, nóng, đỏ, ảnh hưởng đến toàn bộ khớp làm hạn chế vận động, gây đau đớn cho chuột khi vận động. Những con chuột RA được điều trị bằng EtGJ bàn chân đã giảm sưng, chuột di chuyển dễ dàng hơn. Trong hình 6B những thay đổi bệnh lý của mô khớp chuột RA (nhóm RA) bao gồm viêm màng hoạt dịch, tăng sản hoạt dịch, tăng tế bào và mạch máu của mô liên kết hoạt dịch, khoang khớp bị thu hẹp. Một pannus ăn mòn bao gồm các mô liên kết dạng sợi và các tế

bào viêm đơn nhân, đa nhân xâm nhập vào sụn khớp. Việc sử dụng liệu pháp EtGJ đã ức chế đáng kể quá trình tăng sản synovium, hạn chế việc phá hủy sụn khớp và thay đổi khoang khớp góp phần ức chế chứng sưng chân thứ phát ở chuột RA (Nhóm RA+EtGJ). Yue và cộng sự (2004) cho rằng các tế bào hoạt dịch là những tế bào hoạt động hiệu quả dẫn đến sự thay đổi bệnh lý trong quá trình phát sinh và phát triển RA [44]. Hơn nữa, Tag và cộng sự (2014) tuyên bố rằng các tế bào hoạt dịch được kích hoạt tăng sinh và biểu hiện quá mức các cytokine như IL-1 và TNF-α, rất quan trọng trong cơ chế bệnh sinh của RA [31]. Kết quả hiện tại gợi ý rằng tác dụng ức chế của chiết xuất EtGJ có hiệu quả đối với sự hình thành phù nề. Kết quả này cũng tương tự với báo cáo của Hu và cộng sự (2019) [43].

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu hiện tại chỉ ra rằng EtGJ đã kiểm soát hiệu quả sự phát triển của bệnh viêm khớp. Điểm viêm khớp, chu vi và đường kính khớp, các thông số như WBC, RF, CRP, khối lượng tương đối tuyến ức và lá lách, chỉ số lá lách đã giảm đáng kể ở chuột RA được điều trị bằng EtGJ. Phân tích mô bệnh khớp cũng chứng minh rằng EtGJ ngăn ngừa tối đa thoái hóa sụn khớp, giảm sự xâm nhập của các tế bào viêm trong khoang khớp, giảm tăng sản hoạt dịch và hình thành pannus ở chuột bị viêm khớp. Các kết quả hiện tại cho thấy EtGJ có thể cung cấp khả năng bảo vệ khớp, chống viêm và giảm tổn thương xương, sụn trong RA. Do đó chiết xuất ethanol quả sơn chi (*G. jasminoides*) là thảo dược tiềm năng, là ứng cử viên mới có giá trị trong điều trị viêm khớp.

LỜI CẢM ƠN

Các tác giả xin cảm ơn các đồng nghiệp và cộng sự từ Khoa Huyết học và Sinh hóa, Khoa Giải phẫu bệnh Bệnh viện Quân Y 175 Tp.HCM và Viện Pasteur Tp.HCM, Phòng Thí nghiệm Công nghệ Động vật, Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp Tp. HCM đã hỗ trợ chúng tôi trong dự án này. Tác giả cũng gửi lời cảm ơn đến anh Tô Minh Quân, anh Trần Hoài Ninh, chị Quảng Trần Phương Tuyên đã tham gia, hỗ trợ giúp dự án thành công.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. C. Chih-Chao, L. Yi-Rong, L. Kuei-Hung, C. Wei-Jen, L. Shih-Chao, W. Yi-Hsuan, C. Po-Jen, Sien- Y. Hung, L. Chi-Chien, H. Tsong-Long, "Aqueous extract of kan-lu-hsiao-tu-tan ameliorates collagen-induced arthritis in mice by inhibiting oxidative stress and inflammatory responses", *Life (Basel)*, 10(12), 313, 2020. DOI: 10.3390/life10120313
2. Diane van der Woude, Annette H.M. van der Helm-van Mil, "Update on the epidemiology, risk factors, and disease outcomes of rheumatoid arthritis", *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 32(2), 2018, 174-187. https://doi.org/10.1016/j.berh.2018.10.005.
3. A. F. Syed, K. Mohammad., N. E Shamima, A. Fahmida , Z. Nowshin, B. T Mohammad, A. Md Ghulam, "A clinical update and global economic burden of rheumatoid arthritis*", Endocr Metab Immune Disord Drug Targets,* 18(2), 98-109, 2018. DOI: 10.2174/1871530317666171114122417
4. Y. I. Yayikci, and A. J. T. E. Karadag, "Effects of conventional and biological drugs used for the treatment of rheumatoid arthritis on the quality of life and depression*", Eurasian J Med,* 51(1), 12, 2019. DOI: 10.5152/eurasianjmed.2018.18018
5. Y. M. Reddy, S. P. Jeevan Kumar, K. V. Saritha, P. Gopal, T. R. Madhusudana, J. Simal-Gandara , "Phytochemical profiling of methanolic fruit extract of Gardenia latifolia Ait. by LC-MS/MS analysis and evaluation of its antioxidant and antimicrobial activity*", Plants (Basel)*, 10(3), 545, 2021. DOI: 10.3390/plants10030545
6. A. Kusnandar, A. I Ketut, S. Dewi, R. FSiti, H. Tomi, "Ethanol Extract of Gardenia augusta (L.) Merr. Flowers Produces Sleep Improvement in Rat Model*", Pharmacognosy Journal,* 11(6s), 1449-1454, 2019. DOI:10.5530/pj.2019.11.224
7. C. Liping, L. Maoxing, Y. Zhiqiang, T. Wendi, W. Peng, T. Xiuyu, L. Xiaolin, W. Weigang, "Gardenia jasminoides Ellis: Ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacological and industrial applications of an important traditional Chinese medicine*". J Ethnopharmacol,* 257, 112829, 2020. doi: 10.1016/j.jep.2020.112829..
8. N. M. Vinaykumar, R. Mahmood, V. Krishna, B. Ravishankara, S. L. Shastri, "Antioxidant and in vivo hepatoprotective effects of Gardenia gummifera Lf fruit methanol extract"*, Clinical Phytoscience*, 2020; 6(47), 1-14.
9. P.T.N.Trinh, T.T.Danh, H.N.Anh, L.T. Dũng, "Thành phần hóa học và tác dụng kháng viêm của quả dành dành (Gardenia jasminoides Ellis)*"*, *Natural Sciences*, 6(1), 1819-1826, 2022.
10. P.T.N. Trinh, T.T. Danh, V.A.Tỷ, N.T.H.Trang, L.T.N.Thư, H.N.Anh, L.T.Dũng, "Hoạt tính kháng viêm của cao chiết quả dành dành (Gardenia jasminoides Ellis)", *Tạp chí công thương*, 3, 268-27, 2022.

11. R. Muthubalaji, R. Samiraj, E. Ramaraj, P. Subban, "Acute toxicity on the ethanolic fruit extracts of Morinda sp. in Wistar albino rats", *Int. J. Res. Pharm. Sci.*, 6(1), 44-52, 2015.
12. S. Ana-Alexandra, N. Alexandrina, I. Rodica-Mariana, I. Lorena, "Qualitative analysis of phytochemicals from sea buckthorn and gooseberry", *Phytochemicals*, 2018, 161-177, 2018. DOI:10.5772/intechopen.77365
13. A. Al Loman, L. K. J. E. Ju, "Enzyme-based processing of soybean carbohydrate: Recent developments and future prospects", *Enzyme and Microbial Technology*, 106, 35-47, 2017. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.06.013
14. El-Tedawy, D.M., et al., "Systemic bee venom exerts anti-arthritic and anti-inflammatory properties in a rat model of arthritis", *Biomed Rep.,*13(4), 1-1, 2020.
15. W.H. Organization, , "General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine", *World Health Organization*, 2000.
16. Hurst, S.A.J.J., "Declaration of Helsinki and protection for vulnerable research participants", *Jama*, 311(12, 1252-1252, 2014.
17. M.O.H. Vietnam, "National guideline on ethics in biomedical research", *Hà Nội*, 2013: 173, 2013.
18. Co-operation, O.f.E. and Development, "Test No. 425: acute oral toxicity: up-and-down procedure", 2008: OECD publishing, 2008.
19. C. Yong, W. Qi-wen, Z. Jian, C. Jian-wei, L. Xiang, "Anti-arthritic activity of ethanol extract of Claoxylon indicum on Freund's complete adjuvant-induced arthritis in mice", *BMC Complement Altern Med*, 17(1), 1-7, 2017.
20. Newbould, B.J.B.j.o.p. and chemotherapy, "Chemotherapy of arthritis induced in rats by mycobacterial adjuvant", *Br J Pharmacol Chemother*, 21(1), 127-136, 1963.
21. S. H. Nirah, K. H. Allen-Worthington, D. L. Hickman, M. Jonnalagadda, N. T. Joseph, S. R. Andrea, V. Helen, A. M. Williams, W. Michele, "Review of rodent euthanasia methods", *J Am Assoc Lab Anim Sci.*,59(3), 242-253, 2020. doi: 10.30802/AALAS-JAALAS-19-000084.
22. M. Pádua-Reis, D. A. Nôga, A. B. L. Tort, M. Blunder, "Diazepam causes sedative rather than anxiolytic effects in C57BL/6J mice", *Scientific Reports*, 11(1), 1-12, 2021.
23. Aloke, C., et al., "Anti-arthritic potential of ethanol and aqueous extracts of stem bark of Cleistopholis patens on complete Freund's adjuvant-induced rheumatoid arthritis in rats", *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*,12(1), 28-34, 2021. https://doi.org/10.1016/j.jaim.2018.12.009
24. N. Noriaki, O. Fumihiko, O. Hiroko, K. Naohito, "Oral administration system based on meloxicam nanocrystals: decreased dose due to high bioavailability attenuates risk of gastrointestinal side effects". *Pharmaceutics*, 12(4), 313, 202. DOI: 10.3390/pharmaceutics12040313
25. K. Hye-Jin, L. Kyung-Hwa, J. Hyun-Joo, P. Eun-Hee, "Anti-inflammatory evaluation of gardenia extract, geniposide and genipin", *Journal of ethnopharmacology*, 103(3), 496-500, 2006. DOI: 10.1016/j.jep.2005.08.011
26. N. A. Al-Afifi, A. M. Alabsi, M. M. Bakri, A. Ramanathan, "Acute and sub-acute oral toxicity of Dracaena cinnabari resin methanol extract in rats", *BMC Complement Altern Med*, 18(1), 1-14, 2018. DOI: 10.1186/s12906-018-2110-3
27. A. O. Stanley, F. C. Nwinyi, D. D. Akumka, G. A. Ajoku, S. Dzarma, K. S. Izebe, M. Ditse, P. E. C. Nwaneri, C. Wambebe, K. Gamaniel, "Toxicity studies in rats fed nature cure bitters", *African Journal of Biotechnology*, 4(1), 72-78, 2005.
28. A. Jannat, P. John, A. Bhatti, M. Q. Hayat, "Tomorou attenuates progression of rheumatoid arthritis through alteration in ULK-1 independent autophagy pathway in collagen induced arthritis mice model", *Cell Death Discovery*, 5(1), 1-13, 2019.
29. B. V. Gopal, S. R. Rojatkar, S. L. Bodhankarc, "Anti-arthritic activity of methanol extract of Cyathocline purpurea (whole plant) in Freund's complete adjuvant-induced arthritis in rats". *Biomedicine & Aging Pathology,* 4(3), 197-206, 2014. https://doi.org/10.1016/j.biomag.2014.04.007
30. M. S. Elsheemy, A. H Hasanin, A. Mansour, S. I. Mehrez, M. Abdel-Bary, "Etanercept improved anemia and decreased hepcidin gene expression in a rat model of rheumatoid arthritis", *Biomed Pharmacother,* 112: 108740, 2019. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.108740
31. T H. M. Tag, O. E. Kelany, H. M. Tantawy, A. A. Fahmy, "Potential anti-inflammatory effect of lemon and hot pepper extracts on adjuvant-induced arthritis in mice", *The Journal of Basic & Applied Zoology,* 67(5), 149-157, 2014. https://doi.org/10.1016/j.jobaz.2014.01.003
32. Viện kiểm định Quốc gia vacxin và sản phẩm y tế, "Một số kỹ thuật lấy máu ở động vật thí nghiệm nhỏ", Bộ Y tế, 2019.
33. A. Omoto, Y. Kawahito, I. Prudovsky, Y. Tubouchi, M. Kimura, H. Ishino, M. Wada, M. Yoshida, M. Kohno, R. Yoshimura, T. Yoshikawa, H. Sano, "Copper chelation with tetrathiomolybdate suppresses adjuvant-induced arthritis and inflammation-associated cachexia in rats", *Arthritis Res Ther.,* 7(6), 1-9, 2005. DOI: 10.1186/ar1801
34. R.A. Sundar , R.C. Habibur, "Pharmacognostic, phytochemical and antioxidant studies of Gardenia latifolia Aiton: An ethnomedicinal tree plant", *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*,. 10(5), 216-228, 2018.

35. P. A. Botham, "Acute systemic toxicity—prospects for tiered testing strategies", *Toxicol In Vitro ,* 18(2), 227-230, 2004. DOI: 10.1016/s0887-2333(03)00143-7
36. X. Tang, Y. Wang, W. Yang, Y. Zheng, C. Liu, M. Qu, H. Xu, L. Zhang, J. Liang, B. Fan, "Acute and subchronic oral toxicity study of Gardenia Yellow E500 in sprague-dawley rats", *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(2), 531, 2020. DOI: 10.3390/ijerph17020531
37. C. J. Ugwah-Oguejiofor, C. O. Okoli, M. O. Ugwah, M. L. Umaru, C. S. Ogbulie, H. E. Mshelia, M. Umar, A. A. Njan, "Acute and sub-acute toxicity of aqueous extract of aerial parts of Caralluma dalzielii NE Brown in mice and rats",*Heliyon ,* 5(1), e01179, 2019. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01179
38. T. Alelign, D. Chalchisa, N. Fekadu, D. Solomon, T. Sisay, A. Debella, B. Petros, "Evaluation of acute and sub-acute toxicity of selected traditional antiurolithiatic medicinal plant extracts in Wistar albino rats"*, *Toxicol Rep*., 7: 1356-1365, 2020. DOI: 10.1016/j.toxrep.2020.10.001
39. G. Abizi, F. S. Ouattara-Soro, E. Z. N'guessan, K. K. John, E. B. Kouassi, S. Koffi, K. K. Jean-Jacques, A. Koné, "Anti-arthritic Activity of the Aqueous Extract of the Aerial Parts of Mitracarpus scaber (Rubiaceae) Zucc in Rats Wistar", *Journal of Diseases and Medicinal Plants*, 7(1), 22-29, 2021. DOI:10.11648/J.JDMP.20210701.14
40. M. Si, Z. Ma, J. Zhang, X. Li, R. Li, C. Wang, H. Jia, S. Luo, "Qingluoyin granules protect against adjuvant-induced arthritis in rats via downregulating the CXCL12/CXCR4-NF-κB signalling pathway", *Pharmaceutical Biology*, 59(1), 1439-1449, 2021. DOI: 10.1080/13880209.2021.1991386
41. M. Maria, S. Uzma, S. H. A. Muhammad, Q. Muhammad, H. Muhammad, R. Zohaib, A. Bashir, "Antiarthritic potential of comprehensively standardized extract of alternanthera bettzickiana: in vitro and in vivo studies", *ACS omega*, 5(31), 19478-19496, 2020. doi: 10.1021/acsomega.0c01670
42. Y. Li, , R. Kakkar, J. J. F. Wang, "In vivo and in vitro approach to anti-arthritic and anti-inflammatory effect of crocetin by alteration of nuclear factor-E2-related factor 2/hem oxygenase (HO)-1 and NF-κB expression", *Front Pharmacol*, 9, 1341, 2018. DOI: 10.3389/fphar.2018.01341
43. H. Yaya, L. Xin, X. Qiang, Y. Tianpeng, B. Chuan, W. Ze, D. Lianfeng, L. Xiaobo, W. Wenjun, S. Lin, L. Yinhua, Z. Hao, D. Liang, C. Yang, "Comparative anti-arthritic investigation of iridoid glycosides and crocetin derivatives from Gardenia jasminoides Ellis in Freund's complete adjuvant-induced arthritis in rats", *Phytomedicine*,. 53, 223-233, 2019. DOI: 10.1016/j.phymed.2018.07.005
44. Y. Li, W. Hua, L. Li-Hua, S. Yu-Xian, W. Wei, "Anti-adjuvant arthritis of recombinant human endostatin in rats via inhibition of angiogenesis and proinflammatory factors", *Acta Pharmacol Sin*, 25(9), 1182-5, 2004.

POTENTIAL ANTI- RHEUMATOID ARTHRITIS EFFECTS OF ETHANOL EXTRACT FROM GARDENIA FRUITS (*Gardenia jasminoides* Ellis) IN ALBINO MICE MODEL (*Mus musculus*)

PHUONG-NHUNG TRAN THI *, TAM-NHU NGUYEN THI, NGOC-YEN TRAN THI, NGOC-DUYEN NGUYEN THI, THAO-UYEN NGUYEN NGOC, NGOC-TRAN DUONG THI, KIEU-PHUONG ĐANG THI, THU-THUY ĐO THI, NHAT-TRUONG BUI, MONG-THO TRAN, ĐUC-THANH VU, HOAN-VI NGUYEN, KHANH-VAN NGUYEN, AI-VI TRAN THI, VAN-PHUOC HUYNH, MINH-TAM ĐOAN
Institute of Food and Biotechnology, Industrial University of Ho Chi Minh City
tranthiphuongnhung@iuh.edu.vn

Abstract: The gardenia (*Gardenia jasminoides* Ellis) possesses the potential of antioxidants, antimicrobial, and anti-inflammatory activities. *G. jasminoides* fruits are reported to be used as a folk medicine for treating various ailments such as detoxification, diuretic, gastrointestinal disease, sores, and swollen joints, etc. However, the therapeutic effects of ethanol extraction from the gardenia fruits (EtGJ) on rheumatoid arthritis (RA), another significant autoimmune inflammatory disorder, have not been elucidated. Herein, we explored the anti-arthritic effects of EtGJ on Complete Freund's Adjuvant-induced arthritis (CFA) in mice. The ethanol extract of the gardenia fruits was obitained from the ethanol solvent and phytochemically screened by the qualitative method. CFA was intradermally injected to induce RA in Swiss albino mice. Assessment of clinical arthritis severity was measured using the arthritis scoring method. Assessment of histological arthritis severity was measured using the method to assess joint disease tissue. Hematology and biochemical parameters were measured by automatic hematology and biochemistry analyzer. Joint diameter and circumference were measured with a digital Vernier caliper. Oral EtGJ treatment (100, 200, and 300 mg/kg) ameliorated mouse RA by decreasing the levels of white blood cells, rheumatoid factors, and C-

reactive protein, decreasing the joint diameter and circumference as well as reducing arthritis scores. EtGJ also suppressed pannus array formation, infiltration, and proliferation of inflammatory cells, restoring joint cartilage in joint disease tissues. So, the therapeutic effects of EtGJ in RA mice were through anti-inflammatory activity. The results of current research suggest that ethanol extract from gardenia fruits has the potential to treat rheumatoid arthritis.
Keywords: CFA, *Gardenia jasminoides* Ellis, rheumatoid arthritis

Ngày nhận bài: 04/01/2023

Ngày chấp nhận đăng: 17/04/2023