

# Khảo sát tác động của cao chiết sài đất (*Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr., Asteraceae) trên sự tiết interleukin-1 $\beta$

Nguyễn Thị Bảo Anh<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Minh Thuận<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Bộ môn Dược Lâm sàng, Khoa Y, Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh

<sup>2</sup>Bộ môn Hóa Sinh, Khoa Dược, Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh

## Summary

*Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr., Asteraceae is often used directly or in combination with other medicinal plants in the form of extracts to treat many diseases. The aim of this study is to evaluate *in vitro* effects of *Wedelia chinensis* extracts on interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ) secretion from human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Whole *Wedelia chinensis* plant (except roots) was extracted with solvents to obtain crude ethanol extracts and chloroform, ethyl acetate and *n*-butanol fractions. PBMCs were extracted from the whole blood of healthy volunteers. The effects of fractions on IL-1 $\beta$  secretion from PBMCs were evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The results showed that after 48 hours of PBMC culture *in vitro* in the presence of *Wedelia chinensis* extracts, all crude ethanol extracts and fractionated extracts inhibit IL-1 $\beta$  secretion from PBMCs, but the chloroform and *n*-butanol extracts have the strongest inhibitory effects. In conclusion, *Wedelia chinensis* have *in vitro* inhibitory capacity on IL-1 $\beta$  secretion from PBMCs.

**Keywords:** *Wedelia chinensis*, peripheral blood mononuclear cells, IL-1 $\beta$  secretion.

## Đặt vấn đề

Trong dân gian, đã có rất nhiều bài thuốc sử dụng các nguồn dược liệu từ tự nhiên được dùng để điều trị những bệnh lý liên quan đến rối loạn hệ miễn dịch. Khi so sánh với thuốc tân dược, các bài thuốc có nguồn gốc dược liệu mang lại hiệu quả điều trị tốt và hạn chế đáng kể các tác dụng phụ. Vì vậy, việc nghiên cứu thành phần hóa học và các tác dụng dược lý của các dược liệu là một hướng nghiên cứu đầy tiềm năng cho nền y học hiện đại [1]. Sài đất (*Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr., Asteraceae) được sử dụng rộng rãi trong Y học cổ truyền với các công dụng bảo vệ gan, trị ho, tiêu chảy, vàng da và trị một số bệnh ngoài da. Các nghiên cứu trong những năm gần đây cho thấy sài đất có tính chống oxy hóa, kháng viêm, kháng khuẩn, ức chế tế bào ung thư và điều hòa miễn dịch [2-5]. Tuy nhiên, những nghiên cứu về tác động của sài đất trên hệ miễn dịch và các tế bào

miễn dịch vẫn còn khá hạn chế. Nhiều nghiên cứu trước đây đã tìm thấy trong cao sài đất có sự hiện diện của acid phenolic, một số flavonoid và saponin là những chất gây độc tế bào [2,3]. Sài đất cũng được chứng minh gây ức chế sự tăng sinh tế bào đơn nhân (TBĐN) trong máu ngoại vi, là phân đoạn giàu các tế bào lympho rất quan trọng trong vấn đề bảo vệ cơ thể chống lại các yếu tố môi trường như vi khuẩn, virus [6].

Cytokine interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) là chất trung gian chính của phản ứng viêm, cần thiết cho khả năng chống lại mầm bệnh. Tuy nhiên, IL-1 $\beta$  cũng làm trầm trọng thêm tổn thương khi mắc bệnh mạn tính và tổn thương mô cấp tính [7]. IL-1 được tiết ra từ các TBĐN, có vai trò kích thích tế bào lympho B sản xuất kháng thể, hoạt hóa tế bào lympho T [8]. Vì vậy, tác động ức chế tăng sinh của sài đất trên TBĐN cũng có thể ảnh hưởng đến sự sản xuất interleukin của các tế bào này. Mục tiêu của đề tài này là nghiên cứu tác động của các cao chiết sài đất (*Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr., Asteraceae) trên sự sản xuất IL-1 $\beta$  từ TBĐN trong máu ngoại vi người nhằm góp phần làm hiểu rõ hơn tác động miễn dịch của sài đất.

Chịu trách nhiệm: Nguyễn Thị Minh Thuận

Email: ntmthuan@ump.edu.vn

Ngày nhận: 08/5/2021

Ngày phản biện: 22/5/2021

Ngày duyệt bài: 26/7/2021

## **Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu**

### **Đối tượng nghiên cứu**

Các mẫu máu toàn phần được thu thập từ 10 người tình nguyện khỏe mạnh, cho vào ống vô khuẩn chứa chất chống đông EDTA.

Sài đất được sử dụng trong nghiên cứu là phân cây trên mặt đất ở trạng thái khô, do Công ty Dược liệu Việt Thảo cung cấp vào tháng 06/2020. Mẫu được định danh thực vật tại Bộ môn Thực vật, Khoa Y, Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh trước khi tiến hành nghiên cứu. Phần khảo sát thực vật học của sài đất, khảo sát độ ẩm, độ tro của dược liệu và khảo sát sơ bộ thành phần hóa học của dược liệu đã được thực hiện trong các nghiên cứu trước<sup>[9]</sup>. Dược liệu được xử lý sơ bộ như sau: Mẫu dược liệu được rửa sạch nhằm loại bỏ bụi, tạp cơ học, để ráo, sấy khô ở 50 °C trong 4 ngày liên tiếp, sau đó được xay mịn và sàng qua rây 2 mm, bảo quản trong chai thủy tinh tránh ánh sáng.

### **Nguyên vật liệu**

Buồng đếm hemocytometer - Neubauer (Quijing, Trung Quốc); kính hiển vi quang học 2 thị kính (Olympus, Nhật Bản); môi trường nuôi cấy RPMI-1640 và phytohaemagglutinin (PHA) (Gibco®, Thermo Fisher); huyết thanh thai bò (Fetal Bovine Serum - FBS); kháng sinh (penicillin, streptomycin), trypan blue (Sigma); dung dịch ficoll (Hyclone®, Gelifesciences); kit định lượng IL-1 $\beta$  (Invitrogen).

### **Phương pháp nghiên cứu**

#### **Điều chế cao toàn phần ethanol và các cao phân đoạn**

Dựa theo kết quả của nghiên cứu trước đây<sup>[8]</sup>, dược liệu khô được nghiền và rây qua rây có đường kính 2 mm. Sau đó, bột dược liệu được ngâm trong ethanol 50 % với tỉ lệ 1:10 (kg/L) trong 72 giờ. Dịch chiết được thu hồi và cô bằng máy cô quay áp suất giảm ở nhiệt độ 50 °C, sau đó để trên bếp cách thủy ở 60 °C cho đến khi thu được cao đặc (cao TP) đạt độ ẩm và hiệu suất chiết lần lượt là 9,97% và 24,08%. Sau đó cao TP tiếp tục được lacer phân bố lần lượt với các dung môi có độ phân cực tăng dần: n-hexan (Hex), cloroform (CF), ethyl acetat (EA), n-butanol (Bu) với tỉ lệ nước - dung môi là 1:1 (v/v). Với mỗi phân đoạn dịch chiết thu được, cô quay áp suất giảm ở 50 °C để loại bỏ dung môi. Phần dung môi còn lại được bốc hơi trong tủ hút cho tới khối lượng không đổi, thu được các cao đặc Hex, CF, EA và Bu có độ ẩm lần lượt là 11,01%; 9,35%; 9,54%; 12,9% và đạt hiệu suất chiết lần lượt là 0,83%; 5,81%; 4,23% và 3,01%.

### **Phân lập TBĐN từ máu người toàn phần**

Thiết kế quy trình nghiên cứu đã được xem xét và chấp thuận bởi Hội đồng đạo đức của Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh theo Quyết định số 325/HĐĐĐ-ĐHYD, ngày 12 tháng 05 năm 2020. Mẫu máu toàn phần chống đông bằng EDTA (acid ethylenediaminetetraacetic) được thu thập từ 10 người tình nguyện khỏe mạnh. Toàn bộ quá trình phân lập TBĐN từ máu toàn phần được thực hiện trong điều kiện vô trùng trong vòng 4 giờ kể từ thời điểm lấy máu. Quy trình phân lập TBĐN được tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất dung dịch ficoll Hyclone®. Máu toàn phần được pha loãng với đệm PBS 1X theo tỉ lệ 1:2 (v/v). Thêm dung dịch ficoll vào máu pha loãng theo tỉ lệ 1,5:2 (v/v). Ly tâm với tốc độ 400 xg trong 30 phút ở 20 °C. Hút lớp TBĐN và đem rửa hai lần với 6 mL đệm PBS 1X. Ly tâm với tốc độ 80 xg trong 10 phút ở 20°C. Cắn TBĐN được phân tán vào môi trường nuôi cấy hoàn chỉnh (MTNCHC) gồm môi trường RPMI 1640 chứa hỗn hợp kháng sinh penicillin/streptomycin 1% và FBS 10% (v/v). Tỷ lệ tế bào sống được xác định bằng phương pháp nhuộm trypan blue và đếm tế bào bằng buồng đếm Hemocytometer.

#### **Đánh giá tác động ức chế sự tiết IL-1 $\beta$ từ các TBĐN bởi cao toàn phần và cao phân đoạn sài đất**

Do phân đoạn cao Hex rất kém tan trong MTNCHC nên không được chọn để khảo sát tác động ức chế sự tiết IL-1 $\beta$ . Các nồng độ cao toàn phần và cao phân đoạn CF, EA và Bu của sài đất được chuẩn bị bằng cách pha loãng dung dịch cao gốc 40 mg/mL vào MNTCHC để thu được các dung dịch cao có nồng độ 0,1; 1; 10; 100 ppm, sau đó lọc qua màng lọc diệt khuẩn 0,22  $\mu$ m trước khi cho vào môi trường thử nghiệm. Quy trình đánh giá tác động ức chế sự tiết IL-1 $\beta$  từ các TBĐN bởi cao toàn phần và cao phân đoạn sài đất được thực hiện trên đĩa nuôi cấy tế bào 96 giếng đáy bằng vô khuẩn có nắp. Mẫu thử gồm 50  $\mu$ L huyền dịch  $1 \times 10^6$  tế bào/mL và 50  $\mu$ L dịch chiết cao. Mẫu chứng âm gồm 50  $\mu$ L huyền dịch  $1 \times 10^6$  tế bào/mL và 50  $\mu$ L MTNCHC. Mẫu trắng thử gồm 50  $\mu$ L dịch chiết cao toàn phần hoặc các cao phân đoạn ở các nồng độ khác nhau và 50  $\mu$ L MTNCHC. Mẫu trắng chứng âm là 100  $\mu$ L MTNCHC. Ủ các đĩa 96 giếng trong tủ ấm ở nhiệt độ 37 °C, độ ẩm  $95 \pm 5\%$  với 5% CO<sub>2</sub>. Sau 48 giờ ủ, thu toàn bộ dịch nuôi cấy ở mỗi giếng, ly tâm ở 1500 vòng/phút trong 5 phút và lấy phần dịch ly tâm để định lượng nồng độ IL-1 $\beta$ . Quy trình

định lượng IL-1 $\beta$  được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất bộ kit định lượng IL-1 $\beta$  bằng phương pháp ELISA (Invitrogen®): pha loãng dung dịch IL-1 $\beta$  chuẩn gốc 2500 pg/ml với dung dịch đệm pha loãng chuẩn để có các dung dịch IL-1 $\beta$  theo dãy nồng độ 250; 125; 62,5; 31,2; 15,6; 7,8; 3,9 pg/ml. Nồng độ IL-1 $\beta$  trong môi trường nuôi cấy được xác định dựa vào phương trình tuyến tính giữa nồng độ chuẩn IL-1 $\beta$  và độ hấp thụ. Độ hấp thụ của mẫu thử được đo ở bước sóng 450 nm. Tiến hành thí nghiệm 3 lần và lấy kết quả trung bình.

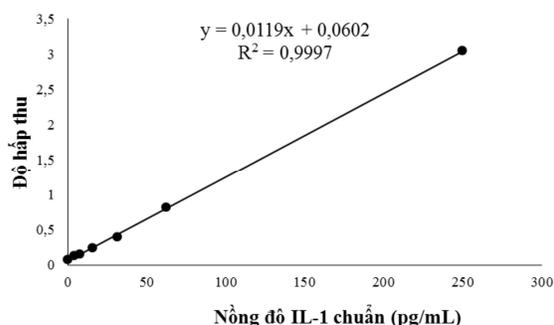
#### Xử lý thống kê

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2013. Kết quả được biểu diễn dưới dạng trung bình (mean)  $\pm$  độ lệch chuẩn (SD – standard deviation). Sự khác biệt giữa các giá trị trung bình được đánh giá bằng phép kiểm t-test. Dùng F-test để kiểm tra ý nghĩa phương trình hồi quy. Sự khác biệt được coi là có ý nghĩa thống kê nếu giá trị  $p < 0,05$ .

#### Kết quả nghiên cứu

##### Xây dựng đường tuyến tính nồng độ chuẩn IL-1 $\beta$

Vì nồng độ IL-1 $\beta$  của người thường rất thấp nên khoảng tuyến tính của IL-1 $\beta$  được xác định trong nghiên cứu này là 3,9 - 250 pg/mL. Dùng F-test để kiểm tra ý nghĩa phương trình hồi quy (dạng  $Y = aX + b$ ) thấy hệ số  $a$  có ý nghĩa và hệ số  $b$  có ý nghĩa. Do đó, phương trình hồi quy của IL-1 $\beta$  là  $Y = 0,0119X + 0,0602$  ( $R^2 = 0,9997$ ) (hình 1).



Hình 1. Đường tuyến tính của IL-1 $\beta$  chuẩn

##### Kết quả đánh giá tác động ức chế sự tiết IL-1 $\beta$ từ TBĐN bởi cao toàn phần và cao phân đoạn sài đất

Sau 48 giờ, nồng độ IL-1 $\beta$  đo được ở các mẫu tế bào tiếp xúc với các cao chiết ở các nồng độ khảo sát giảm so với mẫu chứng. Điều này chứng tỏ cao toàn phần và các cao phân đoạn có ức chế sự tiết IL-1 $\beta$  từ TBĐN. Ở các mẫu cao toàn phần, nồng độ IL-1 $\beta$  trong mẫu cao 1 ppm giảm 1,81 lần so với mẫu chứng có ý nghĩa thống kê ( $p = 0,039 < 0,05$ ), trong khi sự giảm ở các nồng độ khác là không đáng kể ( $p > 0,05$ ). Các mẫu cao EA cũng được ghi nhận có ức chế sự sản xuất IL-1 $\beta$  bởi TBĐN nhưng không theo dãy nồng độ. Ở các mẫu cao CL và cao Bu, không xác định được lượng IL-1 $\beta$  ở tất cả các nồng độ khảo sát từ 0,1-100 ppm, chứng tỏ các phân đoạn này đã ức chế mạnh sự sản xuất IL-1 $\beta$  của TBĐN (bảng 1).

Bảng 1. Kết quả định lượng IL-1 $\beta$  của các mẫu tế bào nuôi cấy sau 48 giờ

Loại cao chiết	Nồng độ cao (ppm)	Nồng độ IL-1 $\beta$ (pg/ml)	Tỉ lệ IL-1 $\beta$ trong mẫu thử giảm so với chứng (%)	Giá trị p
Cao TP	0,1	4,63 $\pm$ 1,07	35,51	0,072
	1	4,97 $\pm$ 0,93	30,77	0,097
	10	4,27 $\pm$ 1,02	40,52	0,050
	100	3,96 $\pm$ 0,78 <sup>a</sup>	44,84	0,039
CF	0,1	-	100	
	1	-	100	
	10	-	100	
	100	-	100	
EA	0,1	7,08 $\pm$ 0,18	1,39	0,912
	1	7,06 $\pm$ 0,24	1,67	0,767
	10	5,89 $\pm$ 1,15	17,96	0,291
	100	4,91 $\pm$ 0,91	31,61	0,091
Bu	0,1	-	100	
	1	-	100	
	10	-	100	
	100	-	100	
<b>Chứng</b>		7,18 $\pm$ 1,42		

a: khác biệt có ý nghĩa thống kê so với mẫu chứng ( $p < 0,05$ ); (-): không xác định được nồng độ IL-1 $\beta$

## Bàn luận

Nghiên cứu này chọn dung môi chiết cao toàn phần sài đất là ethanol 50% dựa trên kết quả khảo sát của một nghiên cứu trước [9]. Kết quả định tính sơ bộ thành phần hóa học trong các nghiên cứu trước cho thấy cao toàn phần sài đất có chứa nhiều thành phần, gồm các hợp chất phenolic, coumarin, flavonoid, saponin, tannin, đường khử, triterpenoid [9,10]. Phân đoạn chloroform có chứa các hợp chất kém phân cực thuộc nhóm triterpenoid, coumarin và chứa ít hợp chất phenolic, là những nhóm hợp chất đã được ghi nhận có tác động kháng viêm và điều hòa miễn dịch [11-14]. Điều này phù hợp với các nghiên cứu trước đây cho thấy sài đất có tác dụng kháng viêm, điều hòa miễn dịch [15,16].

IL-1 $\beta$  là một cytokin tiền viêm đóng vai trò quan trọng trong hệ miễn dịch. IL-1 $\beta$  kích thích tế bào lympho B biệt hóa, sản xuất kháng thể và kích thích tế bào Th tiết IL-2, là cytokin có vai trò kích thích hầu hết các tế bào miễn dịch tăng sinh và phát triển [17]. Do đó, sự giảm sản xuất IL-1 $\beta$  sẽ gây ảnh hưởng nghiêm trọng tới chức năng của các tế bào miễn dịch trong đó có lympho T và lympho B. Trong nghiên cứu này, tất cả các cao chiết sài đất ở các nồng độ khảo sát đều làm giảm sự sản xuất IL-1 $\beta$  của tế bào TBĐN sau 48 giờ tác động cho thấy tế bào đã bị suy giảm về số lượng hoặc chức năng dưới tác động của các cao chiết sài đất. Nghiên cứu của Maji cho thấy cao chiết sài đất có tác động làm giảm sự tiết IL-1 $\beta$  từ các tế bào TBĐN chuột, tác dụng này có thể do wedelolacton (WL) và demethyl wedelolacton (DWL) [16]. Các phân đoạn cao CF và Bu ức chế mạnh nhất sự sản xuất IL-1 $\beta$  của các tế bào TBĐN, có thể liên quan đến sự hiện diện của nhóm hợp chất triterpen và saponin triterpen trong cao chiết. Các hợp chất triterpen được ghi nhận có tính ức chế sự tăng sinh của lympho T và ức chế sự sản xuất cytokin của các tế bào TBĐN [11]. Ngoài ra, saponin cũng được ghi nhận có tính điều hòa miễn dịch thông qua tác động làm giảm sản xuất các cytokin của các TBĐN bao gồm IL-1 $\beta$ , IL-6 và TNF- $\alpha$  [18]. Nồng độ IL-1 $\beta$  giảm dẫn đến sự giảm kích thích các tế bào lympho B và tế bào Th tăng sinh và biệt hóa. Điều này phù hợp với kết quả của một nghiên cứu trước đó ghi nhận phân đoạn CF từ sài đất làm giảm nồng độ IL-2,

một cytokin miễn dịch do các tế bào Th sản xuất, sau 48 giờ nuôi cấy [10]. IL-2 có vai trò kích thích hầu hết các tế bào miễn dịch tăng sinh và phát triển do đó khi nồng độ IL-2 giảm, sự tăng sinh và phát triển của các tế bào miễn dịch cũng bị ức chế [17].

Nghiên cứu này mới chỉ đánh giá tác động ức chế của các cao chiết sài đất lên sự tiết IL-1 $\beta$  từ TBĐN so với các mẫu đối chứng âm (mẫu không có chứa cao chiết) mà chưa so sánh với mẫu đối chứng dương. Đây là phần hạn chế của đề tài, vì vậy cần thêm các nghiên cứu tiếp theo xác định được mức độ ức chế của cao chiết sài đất trên IL-1 $\beta$  với mẫu đối chứng dương thích hợp.

## Kết luận

Nghiên cứu này chứng minh cao phân đoạn CF và Bu của sài đất có khả năng ức chế mạnh nhất sự tiết IL-1 $\beta$  từ TBĐN. Kết quả nghiên cứu này có thể được sử dụng cho các thử nghiệm tác dụng được lý liên quan.

## Tài liệu tham khảo

1. Nguyễn Thanh Thy, Nguyễn Thị Bảo Anh, Nguyễn Thị Minh Thuận (2018), "Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy in vitro tế bào đơn nhân được chiết từ máu ngoại vi người", *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*, 55 (1), tr. 71-78.
2. Lin F. M., Chen L. R., Lin E. H. et al. (2007), "Compounds from *Wedelia chinensis* synergistically suppress androgen activity and growth in prostate cancer cells", *Carcinogenesis*, 28 (12), pp. 2521-2529.
3. Manjamalai A., Jiflin G. J., Grace V. B. (2012), "Study on the effect of essential oil of *Wedelia chinensis* (Osbeck) against microbes and inflammation", *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 5 (2), pp. 155-164
4. Nomani I., Mazumder A., Chakraborty G. S. (2013), "*Wedelia chinensis* (Asteraceae)-an overview of a potent medicinal herb", *International Journal of PharmTech Research*, 5 (3), pp. 957-964.
5. Tsai C. H., Tzeng S. H., Hsieh S. C. et al. (2017), "A standardized herbal extract mitigates tumor inflammation and augments chemotherapy effect of docetaxel in prostate cancer", *Sci. Rep.*, 7 (1), pp. 15624.

6. Nguyễn Thị Minh Thuận, Lê Thị Thảo Nguyên (2020), “Đánh giá tác động gây độc và chết theo chương trình của cao phân đoạn chiết từ *Wedlilia chinensis* (Osbeck) Merr. trên tế bào đơn nhân máu ngoại vi người”, *Nghiên cứu Dược & Thông tin thuốc*, 11 (4), tr. 18-23.
7. De Koning H. D., Schalkwijk J., Stoffels M. et al. (2004), “The role of interleukin-1 beta in the pathophysiology of Schnitzler’s syndrome”, *Arthritis Research and Therapy*, 17 (1), pp. 187.
8. Zhao S., Li Q., Lui L. et al. (2004), “Simvastatin reduces interleukin-1 beta secretion by peripheral blood mononuclear cells in patients with essential hypertension”, *Clinica Chimica Acta*, 344 (1-2), pp. 195-200.
9. Nguyễn Thị Minh Thuận, Lê Hoàng Hạnh Đan, Nguyễn Thị Bảo Anh (2020), “Đánh giá tác động trên sự tăng sinh in vitro tế bào đơn nhân máu ngoại vi người và hoạt tính chống oxy hóa của các cao chiết *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr., Asteraceae”, *Tạp chí Y học Thành phố Hồ Chí Minh*, 24 (2), tr. 106-113.
10. Tuan Thi Minh Nguyen, Nguyen Thi Thao Le (2021), “Inhibitory effect of medicinal plants on in vitro human peripheral blood mononuclear cell proliferation, interleukin-2 secretion and antioxidant activity”, *Med. Pharm. Res.*, 5 (1), pp. 23–29.
11. Harun N. H., Septama A. W., Ahmad W. A. N. W. et al. (2020), “Immunomodulatory effects and structure-activity relationship of botanical pentacyclic triterpenes: A review”, *Chinese Herbal Medicines*, 12 (2), pp. 118-124.
12. Kumar S. V., Kumar S. P., Rupesh D. et al. (2011), “Immunomodulatory effects of some traditional medicinal plants”, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 3 (1), pp. 675-684.
13. Top H., Sarikahya N. B., Nalbantsoy A. et al. (2017), “Immunomodulatory, hemolytic properties and cytotoxic activity potent of triterpenoid saponins from *Cephalaria balansae*”, *Phytochemistry*, 137, pp. 139-147.
14. Yang L. L., Wang M. C., Chen L. G. et al. (2003), “Cytotoxic activity of coumarins from the fruits of *Cnidium monnieri* on leukemia cell lines”, *Planta Medica*, 69 (12), pp. 1091-1095.
15. Huang Y. T., Wen C. C., Chen Y. H. et al. (2013), “Dietary uptake of *Wedelia chinensis* extract attenuates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice”, *PLoS One*, 8 (5), e64152.
16. Maji A. K., Mahapatra S., Banerji P. et al. (2015), “Immunomodulatory effect of *Wedelia chinensis* and demethylwedelolactone by interfering with various inflammatory mediators”, *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 15 (1), pp. 23-31.
17. Đại học Y Hà Nội (2014), *Miễn dịch học*, NXB Đại học Y Hà Nội, tr. 1-200.
18. Lee D. C., Lau A. S. (2011), “Effects of Panax ginseng on tumor necrosis factor-alpha-mediated inflammation: a mini-review”, *Molecules*, 16 (4), pp. 2802-2816.