



## ẢNH HƯỞNG CỦA CHIẾT XUẤT ỔI (*Psidium guajava*) VÀ DIỆP HẠ CHÂU (*Phyllanthus amarus*) LÊN ĐÁP ỨNG MIỄN DỊCH CỦA TẾ BÀO BẠCH CẦU CÁ TRA (*Pangasianodon hypophthalmus*)

Trương Quỳnh Như\*, Nguyễn Thanh Phương và Bùi Thị Bích Hằng

Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

\*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Trương Quỳnh Như (email: tqnhu@ctu.edu.vn)

### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 17/05/2018

Ngày nhận bài sửa: 04/07/2018

Ngày duyệt đăng: 30/07/2018

### Title:

Effect of *Psidium guajava* and *Phyllanthus amarus* extracts on immune responses of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) leukocytes

### Từ khóa:

Cá tra, diệp hạ châu, miễn dịch, ổi, tế bào bạch cầu

### Keywords:

*Psidium guajava*, *Phyllanthus amarus*, leukocytes, immune response, striped catfish

### ABSTRACT

*Psidium guajava* and *Phyllanthus amarus* are well-known as herbs that have been widely used in Vietnamese traditional medicines. However, studies on the effects of these plants in improving immune system of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) have received less attention. Therefore, this study aimed to investigate the effect of ethanolic leaf extracts from *P. guajava*, *P. amarus*, and their mixtures (1: 1, v/v) on leukocytes of striped catfish (*P. hypophthalmus*). Leukocytes ( $5 \times 10^6$  cells/mL) collected from peripheral blood and head kidney were treated with *P. guajava*, *P. amarus* and their extracts combination at 2 different concentrations (10 and 100  $\mu\text{g/mL}$ ) for 24 hrs. The results showed that *P. guajava*, *P. amarus* and their extracts combination could stimulate positively to increased immune parameters. Specifically, lysozyme activity and total cellular Ig in treatments treated with extracts increased remarkably compared to the control ( $p < 0.05$ ). However, the reactive oxygen species activity statistically increased only in the treatment stimulated with 100  $\mu\text{g/mL}$  of *P. amarus* and treatment supplemented 10  $\mu\text{g/mL}$  of their combination in head kidney leukocytes. Similarly, the nitric oxide synthases activity of head kidney leukocytes only enhanced remarkably after stimulation with 100  $\mu\text{g/mL}$  of *P. guajava* extract. Besides, the mixture of *P. guajava* and *P. amarus* at the high dose (100  $\mu\text{g/mL}$ ) also stimulated complement activity compare to the control ( $p < 0.05$ ).

### TÓM TẮT

Ổi (*Psidium guajava*) và diệp hạ châu (*Phyllanthus amarus*) là những loại dược liệu truyền thống nổi tiếng được sử dụng rộng rãi trong y học cổ truyền Việt Nam. Tuy nhiên, các nghiên cứu về sự ảnh hưởng của những dược liệu này lên việc cải thiện hệ miễn dịch của cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) ít được quan tâm. Do đó, nghiên cứu này nhằm tìm hiểu sự ảnh hưởng của chiết xuất ethanol từ lá ổi, diệp hạ châu và hỗn hợp chiết xuất giữa chúng (1:1) lên tế bào bạch cầu cá tra. Các tế bào bạch cầu ( $5 \times 10^6$  tế bào/mL) thu từ máu ngoại vi và thận của cá tra được bổ sung chiết xuất riêng lẻ từ lá ổi, diệp hạ châu và hỗn hợp chiết xuất lá ổi: diệp hạ châu tại 2 nồng độ khác nhau (10 và 100  $\mu\text{g/mL}$ ) trong 24 giờ nuôi cấy. Kết quả cho thấy chiết xuất từ lá ổi, diệp hạ châu và hỗn hợp chiết xuất có tác động tích cực đến các chỉ tiêu miễn dịch được khảo sát. Cụ thể, hoạt tính lysozyme và tổng kháng thể của các nghiệm thức có bổ sung chất chiết xuất tăng đáng kể so với nghiệm thức đối chứng ( $p < 0,05$ ). Tuy nhiên, hoạt tính reactive oxygen species (ROS) chỉ tăng khác biệt có ý nghĩa thống kê ở nghiệm thức có bổ sung chiết xuất lá diệp hạ châu (100  $\mu\text{g/mL}$ ) và nghiệm thức có bổ sung hỗn hợp chiết xuất lá ổi: diệp hạ châu (10  $\mu\text{g/mL}$ ) đối với tế bào bạch cầu thận. Tương tự, hoạt tính nitric oxide synthases (NOS) của tế bào bạch cầu thu từ thận tăng đáng kể sau khi được bổ sung 100  $\mu\text{g/mL}$  chất chiết xuất lá ổi. Ngoài ra, hỗn hợp chiết xuất lá ổi: diệp hạ châu tại liều cao (100  $\mu\text{g/mL}$ ) cũng có tác dụng làm tăng có ý nghĩa thống kê hoạt tính bổ thể của tế bào bạch cầu thu từ máu ngoại vi và thận cá tra so với nghiệm thức đối chứng ( $p < 0,05$ ).

Trích dẫn: Trương Quỳnh Như, Nguyễn Thanh Phương và Bùi Thị Bích Hằng, 2018. Ảnh hưởng của chiết xuất ổi (*Psidium guajava*) và diệp hạ châu (*Phyllanthus amarus*) lên đáp ứng miễn dịch của tế bào bạch cầu cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 54(Số chuyên đề: Thủy sản)(2): 135-142.

## 1 GIỚI THIỆU

Cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) là một trong những đối tượng thủy sản chủ lực được nuôi phổ biến ở các tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL). Song song với việc mở rộng diện tích nuôi, đa dạng hoá và thâm canh hoá của nghề nuôi cá tra, dịch bệnh trên cá tra xuất hiện ngày càng cao và gây tổn thất nghiêm trọng cho người nuôi (Crumlish *et al.*, 2002; Dung *et al.*, 2008). Vi khuẩn, nấm và ký sinh trùng là các tác nhân gây bệnh phổ biến thường gặp và gây tổn thất nặng nề trên cá tra (Crumlish *et al.*, 2002; Phan *et al.*, 2009). Hiện nay, một trong những phương pháp kiểm soát dịch bệnh đầy hứa hẹn là tăng cường hệ miễn dịch cá (Raa *et al.*, 1992). Nhóm tác giả Sirimanapong *et al.* (2014) đã thử nghiệm cảm nhiễm chủng vi khuẩn nhược độc *Aeromonas hydrophila* bằng cách tiêm vào gốc vây ngực cá tra nhằm kích thích tăng cường hoạt tính miễn dịch như: hoạt tính thực bào, respiratory burst, bổ thể, lysozyme, peroxidase, tổng kháng thể Ig và kháng thể đặc hiệu IgM. Ngoài ra, việc bổ sung một số chất kích thích miễn dịch vào chế độ cho ăn cá tra như: *Escherichia coli* lipopolysaccharide, levamisole và  $\beta$ -glucan hoặc bổ sung probiotic (*Bacillus amyloliquefaciens* 54A và *Bacillus pumilus* 47B) cũng làm tăng cường đáng kể hoạt tính respiratory burst, lysozyme, bổ thể, anti-proteas, hiệu giá kháng thể và tổng protein. Đồng thời, các chất kích thích miễn dịch này còn có khả năng giúp cá chống lại nhiễm khuẩn do *Edwardsiella ictaluri*, một trong những vi khuẩn gây thiệt hại đáng kể cho ngành nuôi cá tra (Hang *et al.*, 2013; 2014; Sirimanapong *et al.*, 2015a; 2015b; Thy *et al.*, 2017)

Hiện nay, việc tìm ra phương pháp hạn chế dịch bệnh thân thiện môi trường là nhu cầu cấp thiết để thúc đẩy nuôi trồng thủy sản bền vững. Gần đây, một số nghiên cứu được thực hiện để đánh giá tính khả thi của việc sử dụng chiết xuất từ thảo dược trong quản lý dịch bệnh cá khi được bổ sung vào chế độ cho ăn hàng ngày, nhằm thúc đẩy tăng cường hệ miễn dịch không đặc hiệu của chúng (Harikrishnan and Balasundaram, 2008; Ravikumar *et al.*, 2010; Harikrishnan *et al.*, 2012). Thông thường, những chất chiết xuất thảo dược này chứa nhiều thành phần khác nhau (alkaloids, steroid, phenolics, tannin, terpenoids, saponin và flavonoid) và thể hiện hoạt tính sinh học khác nhau (Awaad and Al-Jaber, 2010; Chakraborty and Hancz, 2011; Awad and Awaad, 2017). Talpur *et al.* (2013) đã bổ sung chiết xuất từ gừng (*Zingiber officinale*) vào chế độ ăn của cá chêm (*Lates calcarifer*) làm tăng hoạt tính phagocytic, lysozyme, respiratory burst, hoạt tính kháng khuẩn cũng như cải thiện tỷ lệ sống của cá sau khi cảm nhiễm vi khuẩn *Vibrio harveyi*. Trong khi đó, Pratheepa and Sukumaran (2011) phát hiện

sự gia tăng hoạt động thực bào ở nhóm cá chép (*Cyprinus carpio*) được bổ sung chiết xuất từ cỏ sữa (*Euphorbia hirta*). Gobi *et al.* (2016) cũng chứng minh rằng chiết xuất từ lá ôi (*P. guajava*) làm gia tăng sự tăng trưởng, enzyme chống oxy hoá và hệ thống miễn dịch của cá rô phi đen (*Oreochromis mossambicus*). Tuy nhiên, cho đến nay, hầu hết các nghiên cứu trên chỉ tìm hiểu ảnh hưởng của chiết xuất thảo dược trong chế độ ăn đối với một số chỉ tiêu miễn dịch ở các loài cá khác nhau, có rất ít thông tin về cơ chế hoạt động của các chất chiết xuất từ thực vật đối với các tác dụng kháng viêm hoặc kích thích miễn dịch trong các tế bào cá. Ngoại trừ nghiên cứu của Sen *et al.* (2015) về chất flavonoid chiết xuất từ lá cây ôi (*P. guajava*) làm suy giảm ảnh hưởng của LPS lên mức độ biểu hiện mRNA của *tnf- $\alpha$* , *il-1 $\beta$* , *Inos* và *cox2* trong đại thực bào thu từ cá trôi Ấn Độ (*Labeo rohita*). Do đó, bài báo này trình bày kết quả ảnh hưởng của chất chiết xuất từ lá ôi (*P. guajava*) và điệp hạ châu (*P. amarum*) lên đáp ứng miễn dịch của tế bào bạch cầu cá tra nhằm đưa ra giả thuyết về hiệu quả ban đầu của chất chiết xuất từ thảo dược trên tế bào bạch cầu cá tra trước khi ứng dụng chúng trong thí nghiệm *in vivo*. Hơn nữa, thí nghiệm trên tế bào còn làm giảm đáng kể thời gian và số lượng động vật thí nghiệm giúp giảm chi phí khi chọn lọc chất chiết xuất cho ứng dụng ngoài thực tế.

## 2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Vật liệu nghiên cứu

Nguồn cá thí nghiệm: Cá tra (50-100 gram/con) được chuyển về phòng thí nghiệm từ trại giống ở Vĩnh Long. Cá khi đem về trại thực nghiệm được trữ trong bể composite có sục khí liên tục, cho ăn bằng thức ăn công nghiệp theo nhu cầu của cá và thuần hóa 2 tuần trước khi tiến hành thí nghiệm. Trước khi bố trí thí nghiệm, cá được kiểm tra ngẫu nhiên về hình dạng, kí sinh trùng, vi khuẩn (5 cá).

Nguồn thảo dược: ôi và điệp hạ châu thu từ các tỉnh ĐBSCL. Chiết xuất ethanol từ ôi và điệp hạ châu được thực hiện bởi Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ. Nguyên liệu thu hái về từ lá để khô ráo tự nhiên (hoặc sấy 50 °C), xay nhuyễn thành bột. Cho bột nguyên liệu vào các túi vải, buộc kín miệng túi và ngâm trong bình thủy tinh có nắp đậy với lượng vừa đủ ethanol sao cho dung môi ngập các túi vải. Sau mỗi lần khoảng 24 giờ/mỗi lần ngâm, thu lấy dịch chiết, lọc qua giấy lọc và đem cô quay thu hồi dung môi, thu sản phẩm. Chiết xuất sau khi thu được hoà tan hoàn toàn trong DMSO 100% để sử dụng cho thí nghiệm.

### 2.2 Bố trí thí nghiệm

Tế bào bạch cầu ( $5 \times 10^6$  tế bào/mL) thu từ thận và máu ngoại vi dựa theo phương pháp của Boyum

(1968) và Pierrard *et al.* (2012). Ficoll Paque PLUS (1,077 g/mL, GE Healthcare, Uppsala, Sweden) được sử dụng để phân lập tế bào bạch cầu. Tế bào được nuôi trong môi trường L-15 (pH7,4, Sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA) có bổ sung 5% huyết thanh thai bò (fetal bovine serum-FBS, Invitrogen), 1% HEPES 20 mM và 1% kháng sinh streptomycin 10 000 g/mL + penicillin 10 000 UI (Invitrogen) và nuôi ở 28°C.

Thí nghiệm bao gồm 12 nghiệm thức được bổ sung chất chiết xuất (tế bào bạch cầu thu từ thận và tế bào bạch cầu thu từ máu ngoại vi được bổ sung 3 loại chất chiết xuất trên tại 2 nồng độ 10 và 100 µg/ml) và 2 nghiệm thức đối chứng (tế bào bạch cầu thu từ thận và tế bào bạch cầu thu từ máu ngoại vi được bổ sung 1% DMSO), mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần. Sau 24 giờ bổ sung chất chiết xuất, tế bào của các nghiệm thức được phá vỡ bằng 50 µl hỗn hợp dung dịch (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Triton x 100 0,1%, PMSF 0,1 µg/mL), ly tâm 2.000 g trong 10 phút. Phần dịch nổi phía trên được thu để phân tích các chỉ tiêu miễn dịch.

### 2.3 Phân tích các chỉ tiêu miễn dịch

Dịch tế bào được dùng để phân tích các chỉ tiêu miễn dịch sau: (i) Xác định hoạt tính lysozyme theo Ellis (1990). Vi khuẩn *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma) được pha loãng trong dung dịch phosphate, pH 6,2. 30 µl dung dịch tế bào và 120 µl dung dịch vi khuẩn *M. lysodeikticus* được cho vào đĩa 96 giếng, hoạt tính lysozyme được đo tại bước sóng 450 nm từ 0 đến 10 phút; (ii) Xác định hoạt tính bổ thể theo Sunyer and Tort (1995). Ba phần trăm máu thô được pha loãng trong dung dịch venoral và trộn với các độ pha loãng khác nhau của dung dịch tế bào. Mẫu được ủ ở 28°C trong 120 phút, sau đó đo ở bước sóng 405 nm để tính hoạt tính bổ thể; (iii) Xác định chỉ số tổng kháng thể Ig theo qui trình của Siwicki and Anderson (1993); (iv) Hoạt tính reactive oxygen species (ROS) được xác định theo qui trình của Rook *et al.* (1985). Dung dịch tế bào bạch cầu được ủ với 5 mg/mL dung dịch nitroblue tetrazolium (NBT) trong điều kiện tối ở 28°C. Sau 1 giờ, phản ứng trên được kết thúc bằng cách cho thêm vào 100% methanol, loại bỏ ethanol và phơi khô khoảng 10 phút. Tiếp tục cho thêm KOH 2M và N-dimethylformamide và đo mẫu ở bước sóng 540nm; (v) Sản xuất nitric oxide synthases (NOS) được đo bởi phản ứng Griess (Devi *et al.*, 2012). Dung dịch tế bào được ủ với dung dịch vi khuẩn *E. ictaluri* (10<sup>7</sup> CFU/mL) trong 1 giờ ở 28°C. Dung dịch Griess (100

µL) được cho vào hỗn hợp dung dịch trên và ủ thêm 15 phút. Mẫu được đo ở bước sóng 540 nm.

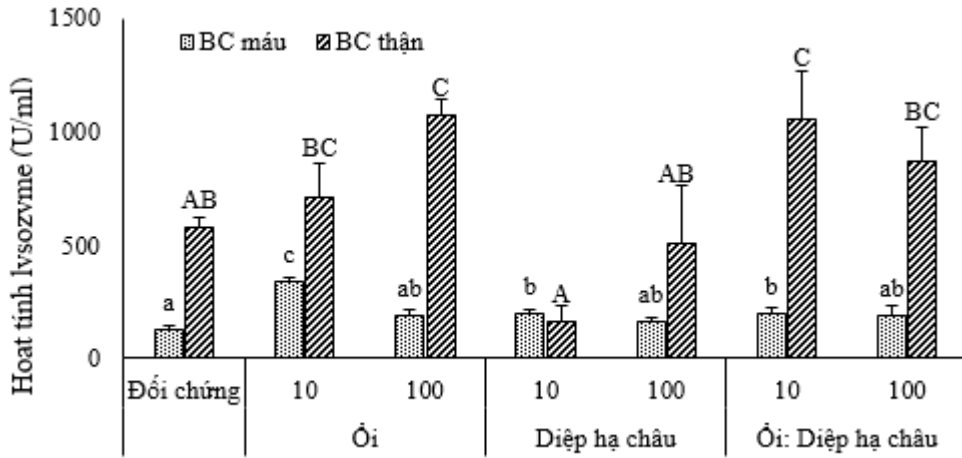
### 2.4 Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu được nhập dữ liệu và xử lý bằng phần mềm Excel. Chương trình SPSS 20.0 được sử dụng phân tích ANOVA 2 nhân tố ở mức ý nghĩa p < 0,05. SD - độ lệch chuẩn trên mỗi hình chỉ ra rằng các nghiệm thức khác biệt có ý nghĩa thống kê (p < 0,05)

## 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1 Kết quả hoạt tính lysozyme

Sau 24 giờ bổ sung chất chiết xuất, hoạt tính lysozyme ở các nghiệm thức dao động từ 125-340 U/mL đối với bạch cầu thu từ máu và 505- 1072 U/mL đối với bạch cầu thu từ thận cá tra, có sự gia tăng hoạt tính lysozyme ở các nghiệm thức có bổ sung chiết xuất thực vật so với đối chứng (Hình 1). Trong đó, tăng cao nhất ở nghiệm thức bổ sung 100 µg/mL chiết xuất ôi và 10 µg/mL hỗn hợp chiết xuất lá ôi:diệp hạ châu đối với bạch cầu thận; và 10 µg/mL mỗi loại chất chiết xuất đối với bạch cầu máu (P < 0,05). Nhìn chung, bạch cầu thận có hoạt tính lysozyme cao hơn bạch cầu thu từ máu giữa các nghiệm thức. Ngoài ra, hỗn hợp chiết xuất lá ôi:diệp hạ châu cũng làm tăng đáng kể hoạt tính lysozyme tại nồng độ thấp (10 µg/mL) trên cả hai loại bạch cầu máu và thận (P < 0,05). Như vậy, chiết xuất từ lá ôi và diệp hạ châu có ảnh hưởng tích cực đến hoạt tính lysozyme của tế bào bạch cầu cá tra. Nghiên cứu gần đây của Giri *et al.* (2015) cũng chỉ ra rằng, hoạt tính lysozyme của cá trôi Ấn Độ (*Labeo rohita*) cũng tăng đáng kể ở nghiệm thức được bổ sung 0,5 % chất chiết xuất ôi vào khẩu phần ăn trong 60 ngày. Kết quả tương tự cũng được tìm thấy ở cá rô phi đen (*O. mossambicus*) sau khi cho ăn thức ăn có bổ sung chất chiết xuất ôi trong 30 ngày (Gobi *et al.*, 2016). Chiết xuất ethanol từ diệp hạ châu có chứa alkaloid, flavonoid, polyphenol, terpenes và terol (Amonkan *et al.*, 2013), những hợp chất này có xu hướng ức chế hoạt tính phân huỷ trong cơ thể (Rohn *et al.*, 2002). Trong khi đó, alkaloid, tannin, flavonoid, phenolic flavonoid, axit ascorbic là những thành phần chủ yếu có trong chiết xuất ethanol ôi (Anbuselviand Rebecca, 2017). Đặc biệt là phenolic flavonoid, flavonoid và tannin trong ôi có khả năng kháng khuẩn và chống oxi hoá (Saravanakumar *et al.*, 2009). Điều này giải thích hoạt tính lysozyme ở nghiệm thức có bổ sung chất chiết xuất ôi cao hơn nghiệm thức có bổ sung chất chiết xuất diệp hạ châu.

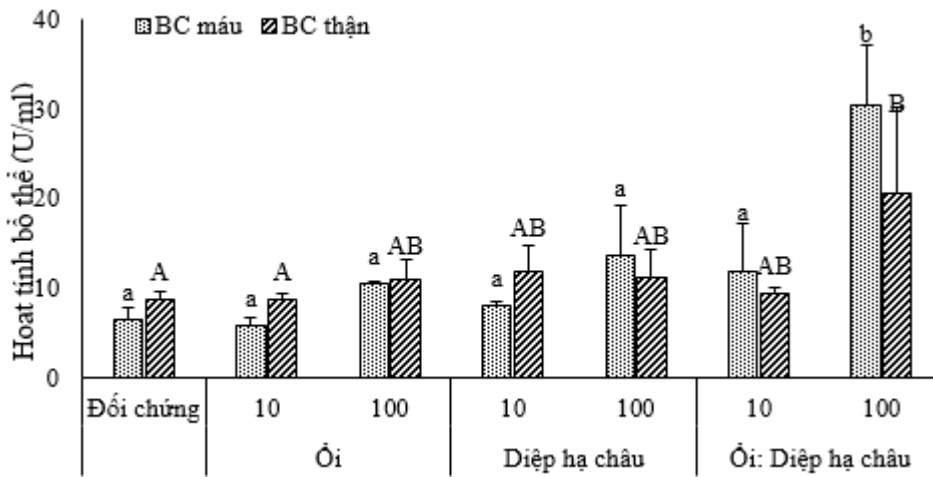


**Hình 1: Hoạt tính lysozyme (U/mL) của tế bào bạch cầu thu từ máu và thận cá tra sau 24 giờ bổ sung chiết xuất ôi, diệp hạ châu và hỗn hợp chất chiết xuất tại 2 nồng độ 10 và 100 µg/mL**

**3.2 Kết quả hoạt tính bổ thể**

Sau 24 giờ bổ sung chất chiết xuất thảo dược, hoạt tính bổ thể ở hầu hết các nghiệm thức không khác biệt có ý nghĩa thống kê (Hình 2). Ngoại trừ nghiệm thức có bổ sung 100 µg/mL của hỗn hợp chất chiết xuất ôi và diệp hạ châu cho cả hai loại tế bào bạch cầu máu và thận so với đối chứng

( $P < 0,05$ ). Mặc dù hoạt tính lysozyme gia tăng làm kích hoạt tăng hoạt tính bổ thể thông qua quá trình opsonin hoá (Ogundele, 1998), tế bào bạch cầu cũng không cho kết quả tăng đáng kể hoạt tính bổ thể sau khi bổ sung chất chiết xuất lá ôi. Kết quả này cũng tương tự với kết quả nghiên cứu *in vivo* từ chiết xuất ôi cũng giúp cải thiện hoạt tính bổ thể (Giri *et al.*, 2015; Gobi *et al.*, 2016)



**Hình 2: Hoạt tính bổ thể (U/mL) của tế bào bạch cầu thu từ máu và thận cá tra sau 24 giờ bổ sung chiết xuất ôi, diệp hạ châu và hỗn hợp chất chiết xuất tại 2 nồng độ 10 và 100 µg/mL**

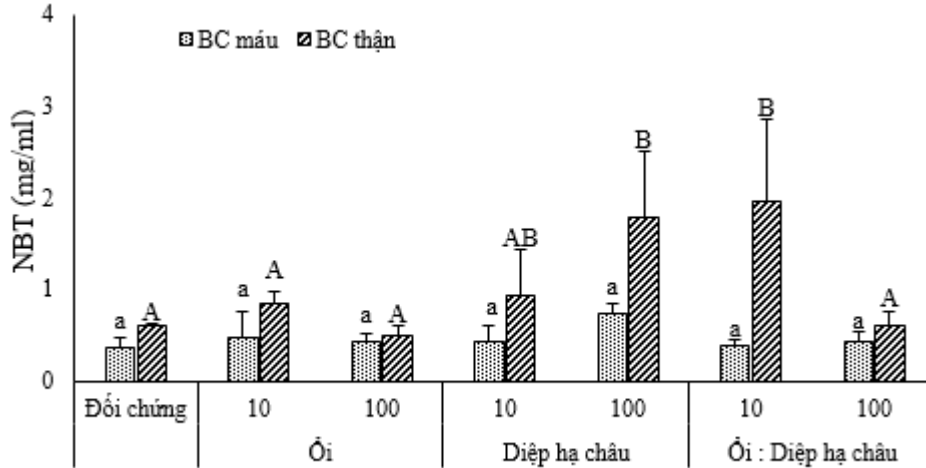
**3.3 Hoạt tính ROS**

Kết quả phân tích sau 24 giờ nuôi cấy cho thấy rằng, chỉ có nghiệm thức được bổ sung 100 µg/mL chiết xuất lá diệp hạ châu và 10 µg/mL hỗn hợp chất chiết xuất lá ôi:diệp hạ châu có ảnh hưởng tích cực đến hoạt tính ROS trên tế bào bạch cầu thận ( $P < 0,05$ ) (Hình 3). Hoạt tính phagocytic và khả năng tiêu diệt mầm bệnh là những cơ chế quan trọng của cá trong việc chống lại sự xâm nhập của tác nhân

gây bệnh (Neumann *et al.*, 2001, Rao *et al.*, 2006). Thông qua cơ chế này, cơ thể cá sẽ sản xuất superoxide  $O_2^-$  và tiêu thụ oxy được gọi là quá trình respiratory burst (Secombes., 1996). Trong nghiên cứu này, hoạt tính ROS được định lượng thông qua thử nghiệm NBT để đo khả năng giải phóng gốc tự do  $O_2^-$ . Kết quả của thí nghiệm này cũng tương đồng với nghiên cứu của Gobi *et al.* (2016), cá rô

phi đen (*O. mossambicus*) được cho ăn chế độ ăn có bổ sung chiết xuất ôi cũng làm tăng có ý nghĩa thống kê hoạt tính ROS sau 30 ngày. Một nghiên cứu khác của Fawole *et al.* (2016) cũng chứng minh rằng hoạt tính ROS cũng tăng đáng kể ở các nhóm cá trôi Ấn Độ (*L. rohita*) được cho ăn thức ăn bổ sung chiết

xuất ôi sau 35 ngày thử nghiệm. Như vậy, chất chiết xuất lá ôi và điệp hạ châu có khả năng giúp cải thiện hoạt tính ROS nhằm chống lại sự xâm nhập của mầm bệnh, đồng thời cũng hỗ trợ làm tăng cường hệ miễn dịch không đặc hiệu trong tế bào bạch cầu cá tra.

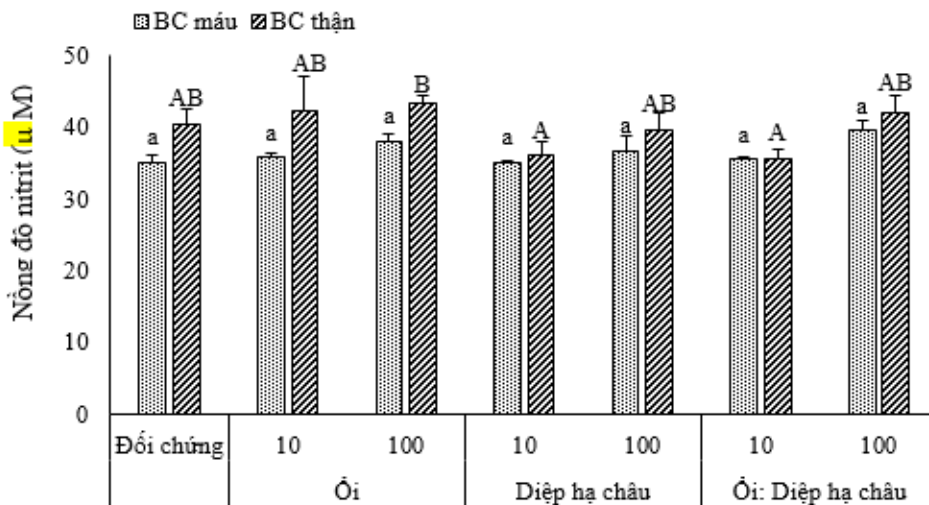


**Hình 3: Hoạt tính ROS (mg NBT/mL) của tế bào bạch cầu thu từ máu và thận cá tra sau 24 giờ bổ sung chiết xuất ôi, điệp hạ châu và hỗn hợp chất chiết xuất tại 2 nồng độ 10 và 100 µg/mL**

### 3.4 Hoạt tính NOS

Hoạt tính NOS chỉ tăng có ý nghĩa thống kê ở nghiệm thức tế bào bạch cầu thận bổ sung 100 µg/mL chiết xuất lá ôi sau 24 giờ nuôi (P<0,05) (Hình 4). Tương tự ROS, NOS cũng có vai trò quan trọng trong việc điều chỉnh các chức năng miễn dịch và trực tiếp chống lại tác nhân gây bệnh (Olivier *et al.*, 1985). Một nghiên cứu gần đây của nhóm tác giả

Ilangkovan *et al.* (2016) cũng chứng minh rằng tế bào đại thực bào người cũng tăng hoạt tính NOS sau khi bổ sung chiết xuất điệp hạ châu. Ngoài ra, huyết tương tôm sú (*Penaeus monodon*) cũng tăng hoạt tính NOS sau khi cho ăn thức ăn có bổ sung 0.2% chiết xuất ôi (Yin *et al.*, 2014). Tuy nhiên, khẩu phần ăn được bổ sung chiết xuất ôi làm ức chế hoạt tính NOS trong thận của cá trôi Ấn Độ (Giri *et al.*, 2015).

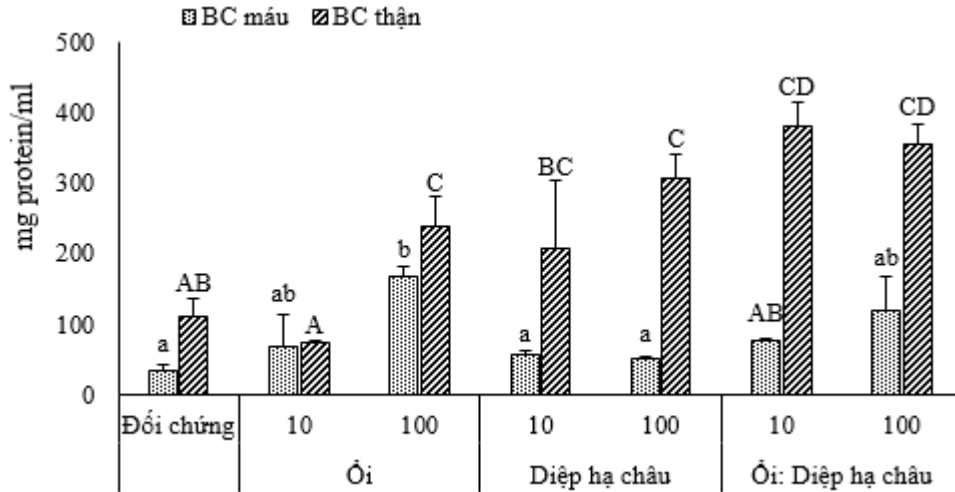


**Hình 4: Hoạt tính NOS (µM Nitrit) của tế bào bạch cầu thu từ máu và thận cá tra sau 24 giờ bổ sung chiết xuất ôi, điệp hạ châu và hỗn hợp chất chiết xuất tại 2 nồng độ 10 và 100 µg/mL**

### 3.5 Tổng kháng thể Ig

Chiết xuất lá ổi, điệp hạ châu và hỗn hợp chiết xuất có tác dụng kích thích làm tăng hoạt tính tổng kháng thể sau 24 giờ ở cả 2 loại bạch cầu (Hình 5). Tuy nhiên, tổng kháng thể của tế bào bạch cầu thu từ thận cao hơn bạch cầu thu từ máu. Đối với tế bào

bạch cầu thận, tổng kháng thể tăng đáng kể ở hầu hết các nghiệm thức có bổ sung chiết xuất thảo dược so với đối chứng ( $P < 0,05$ ). Một số nghiên cứu gần đây cũng chứng minh rằng hàm lượng tổng kháng thể tăng mạnh sau khi bổ sung chất chiết xuất vào thức ăn của cá (Mo *et al.*, 2016; Safari *et al.*, 2017; Hoseinifar *et al.*, 2018; Jahanjoo *et al.*, 2018).



Hình 5: Tổng kháng thể Ig (mg protein/mL) của tế bào bạch cầu thu từ máu và thận cá tra sau 24 giờ bổ sung chiết xuất ổi, điệp hạ châu và hỗn hợp chất chiết xuất tại 2 nồng độ 10 và 100 µg/mL

### 4 KẾT LUẬN

Chất chiết xuất thảo dược có tác dụng kích thích hoạt tính miễn dịch tế bào (ROS, NOS), miễn dịch không đặc hiệu (lysozyme, bổ thể) và đặc hiệu tế bào (tổng kháng thể) tế bào bạch cầu máu và thận cá tra sau 24 giờ. Tuy nhiên, mức độ gia tăng của các hoạt tính miễn dịch này tùy thuộc vào chất chiết xuất, nồng độ bổ sung và loại tế bào nuôi cấy (tế bào bạch cầu phân lập từ máu hoặc thận). Cụ thể, chiết xuất lá ổi và hỗn hợp chất chiết xuất (10 µg/ml) giúp làm tăng hoạt tính lysozyme tế bào bạch cầu thận và máu. Hỗn hợp chất chiết xuất (10 µg/ml) kích thích sự gia tăng của hoạt tính lysozyme, ROS và tổng kháng thể của tế bào bạch cầu thu từ thận cá tra. Tại nồng độ cao (100 µg/mL), chiết xuất lá ổi, điệp hạ châu và hỗn hợp chiết xuất cũng làm tăng hàm lượng tổng kháng thể Ig của tế bào bạch cầu thận. Ngoài ra, hoạt tính lysozyme, ROS, NOS và tổng kháng thể từ tế bào thu từ thận cá tra cho kết quả cao hơn tế bào BC thu từ máu ngoài vi.

Nghiên cứu này chỉ tập trung vào tìm hiểu đáp ứng miễn dịch của tế bào bạch cầu cá tra sau khi bổ sung chất chiết xuất. Do vậy, cần tiếp tục nghiên cứu ảnh hưởng bổ sung chất chiết xuất lá ổi và điệp hạ châu vào khẩu phần ăn lên đáp ứng miễn dịch và khả năng kháng bệnh của cá tra.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Amonkan, A.K., Kamagaté, M., Yao, A.N., et al., 2013. Comparative effects of two fractions of *Phyllanthus amarus* (Euphorbiaceae) on the blood pressure in rabbit. *Greener Journal of Medical Sciences*. 3(4): 129-134.
- Anbuselvi, S., and Rebecca, J., 2017. Phytochemical biochemical and antimicrobial activity of *Psidium guajava* leaf extract. *Journal of Pharmaceutical Sciences & Research*. 9(12): 2431-2433.
- Awaad, A.S., and Al-Jaber, N.A., 2010. Antioxidant natural plant. *RPMP Ethnomedicine: Source & Mechanism* 27: 1-35.
- Awad, E., and Awaad, A., 2017. Role of medicinal plants on growth performance and immune status in fish. *Fish & Shellfish Immunology* 67: 40-54.
- Hang, B.T.B., Milla, S., Gillardin, V., Phuong, N.T., and Kestemont, P., 2013. In vivo effects of *Escherichia coli* lipopolysaccharide on regulation of immune response and protein expression in striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Fish & Shellfish Immunology*. 34(1): 339-347.
- Hang, B.T.B., Phuong, N.T., and Kestemont, P., 2014. Can immunostimulants efficiently replace antibiotic in striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) against bacterial infection by *Edwardsiella ictaluri*? *Fish & Shellfish Immunology*. 40(2): 556-562.

- Boyum, A., 1968. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. Supplementum. 21: 77.
- Chakraborty, S.B., and Hancz, C., 2011. Application of phytochemicals as immunostimulant, antipathogenic and antistress agents in finfish culture. *Reviews in Aquaculture*. 3(3): 103-119.
- Crumlish, M., Dung, T.T., Turnbull, J.F., Ngoc, N.T.N., and Ferguson, H.W., 2002. Identification of *Edwardsiella ictaluri* from diseased freshwater catfish, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage), cultured in the Mekong Delta, Vietnam. *Journal of Fish Diseases*. 25(12):733-736.
- Devi, T.B., Kamilya, D., and Abraham, T.J., 2012. Dynamic changes in immune-effector activities of Indian major carp, catla (*Catla catla*) infected with *Edwardsiella tarda*. *Aquaculture*. 366: 62-66.
- Dung, T.T., Haesebrouck, F., Tuan, N.A., Sorgeloos, P., Baele, M. and Decostere, A., 2008. Antimicrobial susceptibility pattern of *Edwardsiella ictaluri* isolates from natural outbreaks of Bacillary Necrosis of *Pangasianodon hypophthalmus* in Vietnam. *Microbial drug resistance*. 14(4): 311-316.
- Ellis, A.E., 1990. Lysozyme activity. In: Stolen, T.C., Fletcher, P.D., Anderson, B.S., Roberson, B.S., and van Muiswinkel, W.B., (Eds.) *Technique in fish immunology-1*. New York: SOS Publications, pp. 101-103.
- Fawole, F.J., Sahu, N.P., Pal, A.K., and Ravindran, A., 2016. Haemato-immunological response of *Labeo rohita* (Hamilton) fingerlings fed leaf extracts and challenged by *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Research*. 47(12): 3788-3799.
- Giri, S.S., Sen, S.S., Chi, C., et al., 2015. Effects of intracellular products of *Bacillus subtilis* VSG1 and *Lactobacillus plantarum* VSG3 on cytokine responses in the head kidney macrophages of *Labeo rohita*. *Fish & Shellfish Immunology*. 47(2): 954-961.
- Gobi, N., Ramya, C., Vaseeharan, B., et al., 2016. *Oreochromis mossambicus* diet supplementation with *Psidium guajava* leaf extracts enhance growth, immune, antioxidant response and resistance to *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology*. 58: 572-583.
- Harikrishnan, R., and Balasundaram, C., 2008. In vitro and in vivo studies of the use of some medicinal herbs against the pathogen *Aeromonas hydrophila* in goldfish. *Journal of Aquatic Animal Health*. 20(3): 165-176.
- Harikrishnan, R., Balasundaram, C., Jawahar, S., and Heo, M.S., 2012. Immunomodulatory effect of *Withania somnifera* supplementation diet in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) against *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology*. 32(1): 94-100.
- Hoseinifar, S.H., Zou H.K., Van Doan H., Kolangi Miandare H., and Hoseini S.M., 2018. Evaluation of some intestinal cytokines genes expression and serum innate immune parameters in common carp (*Cyprinus carpio*) fed dietary loquat (*Eriobotrya japonica*) leaf extract. *Aquaculture Research*. 49(1):120-127.
- Ilangkovan, M., Jantan, I., Mesaik, M. A., and Bukhari, S. N., 2016. Inhibitory effects of the standardized extract of *Phyllanthus amarus* on cellular and humoral immune responses in Balb/C mice. *Phytotherapy Research*. 30(8): 1330-338.
- Jahanjoo, V., M. Yahyavi, R. Akrami, and A. H. Bahri., 2018. Influence of adding garlic (*Allium sativum*), ginger (*Zingiber officinale*), thyme (*Thymus vulgaris*) and their combination on the growth performance, haemato-immunological parameters and disease resistance to *Photobacterium damsela* in sobaity sea bream (*Sparidentex hasta*) fry. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 18(4): 633-645.
- Mo, W. Y., C. Lun H.I., Choi W.M., Man Y.B., and Wong M.H., 2016. Enhancing growth and non-specific immunity of grass carp and Nile tilapia by incorporating Chinese herbs (*Astragalus membranaceus* and *Lycium barbarum*) into food waste based pellets. *Environmental Pollution*. 219: 475-482.
- Neumann, N.F., Stafford, J.L., Barreda, D., Ainsworth, A.J., and Belosevic, M., 2001. Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. *Developmental & Comparative Immunology*. 25(8-9): 807-825.
- Olivier, G., Evelyn, T.P.T., and Lallier, R., 1985. Immunity to *aeromonas salmonicida* in coho salmon (*oncorhynchus kisutch*) induced by modified freund's complete adjuvant: Its non-specific nature and the probable role of macrophages in the phenomenon. *Developmental & Comparative Immunology*. 9(3): 419-432.
- Ogundele, M. O., 1998. A novel anti-inflammatory activity of lysozyme: modulation of serum complement activation. *Mediators of Inflammation*. 7(5): 363-365.
- Phan, L.T., Bui T.M., and Nguyen T.T.T., et al., 2009. Current status of farming practices of striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* in the Mekong Delta, Vietnam. *Aquaculture*. 296(3-4): 227-236.
- Pierrard, M.A., Roland, K., Kestemont, P., Dieu, M., Raes, M., and Silvestre, F., 2012. Fish peripheral blood mononuclear cells preparation for future monitoring applications. *Analytical Biochemistry*. 426(2): 153-165.
- Pratheepa, V., and Sukumaran, N., 2011. Specific and nonspecific immunostimulation study of *Euphorbia hirta* on *Pseudomonas fluorescens*-infected *Cyprinus carpio*. *Pharmaceutical biology* 49(5): 484-491.

- Raa, J., Roerstad G., Engstad R., and Robertsen B., 1992. The use of immunostimulants to increase resistance of aquatic organisms to microbial infections. *Diseases of Asian Aquaculture*. 10: 39-50.
- Rao, Y.V., Das, B.K., Jyotirmayee, P., and Chakrabarti, R., 2006. Effect of *Achyranthes aspera* on the immunity and survival of *Labeo rohita* infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology*. 20(3): 263-273.
- Ravikumar, S., Selvan, G.P., and Gracelin, A.A., 2010. Antimicrobial activity of medicinal plants along Kanyakumari coast, Tamil Nadu, India. *African Journal of Basic & Applied Sciences*. 2(5-6): 153-157.
- Rohn, S., Rawel, H.M., and Kroll, J., 2002. Inhibitory effects of plant phenols on the activity of selected enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(12): 3566-3571.
- Rook, G.A.W., Steele, J., Umar, S., and Dockrell, H.M., 1985. A Simple method for the solubilisation of reduced NBT, and its use as a colorimetric assay for activation of human macrophages by  $\gamma$ -interferon. *Journal of Immunological Methods*. 82(1): 161-167.
- Safari, R., Hoseinifar S.H., Van-Doan H., and Dadar M., 2017. The effects of dietary Myrtle (*Myrtus communis*) on skin mucus immune parameters and mRNA levels of growth, antioxidant and immune related genes in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish & Shellfish Immunology*. 66: 264-269.
- Saravanakumar, A., Venkateshwaran, K., Vanitha, J., Ganesh, M., Vasudevan, M., and Sivakumar, T., 2009. Evaluation of antibacterial activity, phenol and flavonoid contents of *Thespesia populnea* flower extracts. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Science*. 22(3).
- Secombes, C.J., 1996. The nonspecific immune system: cellular defenses. In: Kaattari, S.L., Piganelli, D., Iwama, G., and Nakanishi, T. (Eds.). *The fish immune system: organism, pathogen and environment*. Academic press 15. Pp. 63-103.
- Sen, S.S., Sukumaran, V., Giri, S.S., and Park, S.C., 2015. Flavonoid fraction of guava leaf extract attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory response via blocking of NF- $\kappa$ B signalling pathway in *Labeo rohita* macrophages. *Fish & Shellfish Immunology*. 47(1): 85-92.
- Sirimanapong, W., Thompson, K.D., Kledmanee, K., Thaijongrak, P., Collet, B., Ooi, E.L., and Adams, A., 2014. Optimisation and standardisation of functional immune assays for striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) to compare their immune response to live and heat killed *Aeromonas hydrophila* as models of infection and vaccination. *Fish & Shellfish Immunology*. 40(2): 374-383.
- Sirimanapong, W., Adams, A., Ooi, E.L., et al., 2015a. The effects of feeding immunostimulant  $\beta$ -glucan on the immune response of *Pangasianodon hypophthalmus*. *Fish & Shellfish Immunology*. 45(2): 357-366.
- Sirimanapong, W., Thompson, K.D., Ooi, et al., 2015b. The effects of feeding  $\beta$ -glucan to *Pangasianodon hypophthalmus* on immune gene expression and resistance to *Edwardsiella ictaluri*. *Fish & Shellfish Immunology*. 47(1): 595-605.
- Siwicki, A., and Anderson, D., 1993. An easy spectrophotometric assay for determining total protein and immunoglobulin levels in fish sera: correlation to fish health. *Techniques in Fish Immunology*. 3: 23-30.
- Sunyer, J.O., and Tort, L., 1995. Natural hemolytic and bactericidal activities of sea bream *Sparus aurata* serum are effected by the alternative complement pathway. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 45(3-4): 333-345.
- Talpur, A.D., Ikhwanuddin, M., and Bolong, A.M.A., 2013. Nutritional effects of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) on immune response of Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch) and disease resistance against *Vibrio harveyi*. *Aquaculture*. 400: 46-52.
- Thy, H.T.T., Tri, N.N., Quy, O.M., et al., 2017. Effects of the dietary supplementation of mixed probiotic spores of *Bacillus amyloliquefaciens* 54A, and *Bacillus pumilus* 47B on growth, innate immunity and stress responses of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Fish & Shellfish Immunology*. 60: 391-399.
- Yin, X.L., Li, Z.J., Yang, K., Lin, H.Z., and Guo, Z.X., 2014. Effect of guava leaves on growth and the non-specific immune response of *Penaeus monodon*. *Fish & Shellfish Immunology*. 40(1): 190-196.