

KHẢ NĂNG KHÁNG OXI HOÁ VÀ ỨC CHẾ TẾ BÀO UNG THƯ BIỂU MÔ GAN HEPG2 VÀ HCC-J5 CỦA CAO CHIẾT METHANOL TỪ LÁ CÂY XUYÊN TÂM LIÊN THU HÁI TẠI AN GIANG

Hoàng Thành Chí⁽¹⁾, Bùi Thị Kim Lý⁽¹⁾

(1) Trường Đại học Thủ Dầu Một

Ngày nhận bài 28/4/2024; Chấp nhận đăng 29/5/2024

Liên hệ email: lybtk@tdmu.edu.vn

<https://doi.org/10.37550/tdmu.VJS/2024.03.566>

Tóm tắt

Xuyên tâm liên (*Andrographis paniculata*) là loại dược liệu nổi tiếng được sử dụng trong nhiều bài thuốc dân gian chữa trị bệnh ở người. Trong những năm gần đây, các bằng chứng khoa học đã cho thấy nhiều hoạt tính nổi trội của cây thuốc này như hoạt tính kháng oxi hoá, kháng viêm, kháng khuẩn, ức chế tăng sinh tế bào ung thư, và đặc biệt là các nghiên cứu cho thấy tính hiệu quả trong điều trị COVID-19. Tuy vậy, hiệu quả của Xuyên tâm liên trong điều trị các bệnh ở gan vẫn còn chưa được công bố phổ biến. Bằng phương pháp thử nghiệm DPPH và khảo sát độc tính tế bào bằng thuốc nhuộm MTT, hoạt tính kháng oxi hoá và khả năng kháng ung thư biểu mô gan của cao chiết tổng số từ lá cây Xuyên tâm liên thu hái tại An Giang được ghi nhận. Kết quả cho thấy cao chiết có hoạt tính kháng oxi hoá yếu và hoạt tính ức chế mạnh lên sự phát triển của tế bào ung thư biểu mô gan HCC-J5 và HepG2 với nồng độ ức chế một nửa lần lượt là $46,80 \pm 3,03 \mu\text{g/mL}$ và $34,24 \pm 4,67 \mu\text{g/mL}$.

Từ khóa: *A. paniculata*, HCC-J5, ung thư gan, xuyên tâm liên

Abstract

ANTIOXIDANT AND INHIBITIVE CAPACITY IN HEPG2 AND HCC-J5 LIVER CANCER CELLS OF METHANOL EXTRACT FROM ANDROGRAPHIS PANICULATA (BURM. F.) LEAVES COLLECTED IN AN GIANG

Andrographis paniculata is a popular medicinal herb in several traditional remedies to treat human illnesses. Scientific research in recent years has provided solid evidence of the remarkable properties of this medicinal plant, including its antioxidant, anti-inflammatory, and antibacterial effects, its ability to suppress the development of cancer cells, and, notably, its effectiveness in treating COVID-19. Nevertheless, the efficacy of *A. paniculata* in the treatment of liver-related disease has not been well documented. The antioxidant activity and anti-hepatocarcinoma capacity of the crude extract from *Androg zaphis paniculata* leaves collected in An Giang were measured using the DPPH testing method and cytotoxicity assessment with MTT dye. The findings indicated that the extract exhibited low antioxidant activity and potent inhibitory action against the growth of HCC-J5 and HepG2 liver cancer cells, with IC50 values of $46.80 \pm 3.03 \mu\text{g/mL}$ and $34.24 \pm 4.67 \mu\text{g/mL}$, respectively.

1. Đặt vấn đề

Xuyên tâm liên có tên danh pháp hai phần là *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees, được mô tả lần đầu năm 1832 bởi Nathaniel Wallich trong quyển "Descriptions and Figures of a select number of unpublished East Indian plants" tập III (Wallich, 1832). Đây là loài thảo dược có thân nhỏ, mọc thẳng đứng, cao không quá 1 mét, phân thành các đốt và phân nhánh mạnh (Lợi, 2004). Lá cây mọc đối xứng, lá có hình trứng thuôn dài, có độ dài khoảng 3 đến 12cm, rộng 1 đến 3cm (Lợi, 2004).

Hoa có màu trắng điểm hồng, mọc thành chùm (Lợi, 2004). Đây là loài thảo được phân bố chủ yếu ở khu vực châu Á, đặc biệt là tại Ấn Độ, Trung Quốc, Malaysia, Thái Lan và Việt Nam (Akbar, 2011). Đây là loại dược liệu được sử dụng thường xuyên trong các bài thuốc y học dân tộc. Việc giúp ngăn chặn bệnh cúm năm 1919 tại Ấn Độ giúp độ nổi tiếng của loài thảo được này được tăng lên (Sudhakaran, 2012). Cho tới thời điểm hiện tại, xuyên tâm liên vẫn đang được sử dụng phổ biến trong các bài thuốc y học chữa trị các bệnh ở người như ho, cảm cúm, cảm sốt, kiết lỵ, viêm họng, viêm phổi, viêm âm đạo, huyết áp cao, đau nhức cơ thể, tê thấp, mụn nhọt, giải độc tố trong cơ thể, chán ăn, giã đắp lên ghẻ lở, mụn nhọt (Okhwarobo và nnk., 2014). Trong y học hiện đại, các chứng minh khoa học cho thấy cao chiết tổng số của xuyên tâm liên giúp chống hạ đường huyết cũng như bảo vệ gan và thận khỏi những tổn thương xảy ra trong khi nhiễm sốt rét, và đặc biệt là hỗ trợ điều trị COVID-19 (Mussard và nnk., 2020; Nguyen và nnk., 2023; Tundis và nnk., 2023). Xuyên tâm liên chứa nhiều thành phần hoạt chất có tác dụng sinh học đa dạng như andrographolide, 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide, neoandrographolide và 14-deoxyandrographolide (Suriyo và nnk., 2014). Chiết xuất xuyên tâm liên và các hoạt chất chính andrographolide đã được chứng minh là có nhiều đặc tính dược lý bao gồm chống viêm, chống ung thư, chống béo phì, chống tiểu đường (Dai và nnk., 2019), ngăn chặn đáng kể sự phát triển của tế bào ung thư, gây ra sự ngừng chu kỳ tế bào và quá trình tự hủy của các tế bào ung thư khác nhau (Dai và cộng sự., 2019). Hoạt tính chống ung thư in vivo của andrographolide được đánh giá bằng mô hình khối u xenograft/syngenic. Andrographolide đã cho thấy có khả năng ức chế tốc độ tăng trưởng của khối u ác tính B16 ở chuột C57BL/6 có khả năng miễn dịch và khối u ung thư biểu mô tuyến HT-29 ở chuột mà không làm giảm trọng lượng cơ thể và các triệu chứng lâm sàng về độc tính (Rajagopal và nnk., 2003). Ngoài ra, andrographolide khi kết hợp với capecitabine đã giúp làm tăng hiệu quả điều trị trên bệnh nhân ung thư đại trực tràng (Soo và nnk., 2019) và làm tăng hiệu quả điều trị của thuốc hóa trị ung thư 5-Fluorouracil trong tế bào HepG2 ung thư biểu mô tế bào gan ở người (Tawit Suriyo và nnk., 2021). Bên cạnh đó, hiệu quả của các andrographolide, andrographoside và neoandrographolide cũng đã được nghiên cứu về khả năng kháng oxy hóa tế bào gan và peroxid hóa lipid ở chuột được xử lý với CCl₄ (Trivedi và nnk., 2001). Mục tiêu của bài nghiên cứu này là nhằm đánh giá khả năng kháng oxy hóa và khả năng ức chế tăng sinh tế bào ung thư biểu mô gan khảo sát trên mô hình tế bào HepG2 và HCC-J5 của cao chiết từ lá cây xuyên tâm liên thu hái tại vùng Bảy Núi, tỉnh An Giang.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Phương pháp tách chiết cao chiết thực vật

Lá của cây xuyên tâm liên được thu hái vào tháng 3 tại khu vực Bảy Núi thuộc huyện Tịnh Biên, tỉnh An Giang. Lá cây sau khi thu hái được rửa sạch với nước cất hai lần và để ráo nước. Mẫu lá tiếp tục được sấy khô hoàn toàn trong tủ sấy dược liệu ở 40°C trước khi được xay nhuyễn thành bột dược liệu. 30 gram mẫu bột dược liệu được bổ sung 100mL methanol và tiến hành ngâm lắc liên tục trong 24 giờ. Sau đó dịch chiết được thu nhận bằng cách lọc hỗn hợp qua giấy lọc Whattman. Quá trình tách chiết được lặp lại thêm 4 lần nữa. Các dịch chiết được gom lại với nhau và đuổi dung môi bằng máy cô quay chân không ở 40°C. Cao chiết thô được xác định khối lượng và hoà tan với DMSO để thu được dịch chiết nồng độ 200mg/mL, viết tắt là APE. Các dịch chiết được lưu trữ ở -20°C cho đến khi thực hiện các thí nghiệm.

2.2. Thí nghiệm bắt giữ gốc tự do DPPH

Dãy nồng độ từ 62,5 đến 1000µg/mL của cao chiết APE được sử dụng cho thí nghiệm. DMSO được sử dụng làm đối chứng âm, Vitamin C được chọn làm đối chứng dương. Hoá chất 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma-Aldrich, Hoà Kỳ) được cho phản ứng với dịch chiết với tỷ lệ phản ứng là 1:1 (theo thể tích). Phản ứng được tiến hành trong 30 phút ở 37°C và sau đó được đo độ hấp thụ quang phổ bằng quang phổ kế ở 517nm. Tỷ lệ thu nhận gốc tự do DPPH được tính bằng tỷ lệ phần trăm độ hấp thụ quang phổ của mẫu thử chia cho mẫu đối chứng âm. Phân tích hồi quy phi tuyến tính được thực hiện để xác định nồng độ hiệu quả tối đa một nửa (EC₅₀).

2.3. Dòng tế bào và điều kiện nuôi cấy

Tế bào HCC-J5 (từ Trung tâm tế Bào nuôi cấy, Đại học Quốc gia Đài Loan), tế bào HepG2 (từ ATCC, Hoa Kỳ) được nuôi cấy bằng môi trường Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI, Thermo Scientific, Hoa Kỳ) có bổ sung 1% kháng sinh – kháng nấm (Thermo Scientific, Hoa Kỳ) và 10% huyết thanh thai bò (FBS, Thermo Scientific, USA). Các tế bào được cấy chuyển sau mỗi 72 giờ hoặc bám khoảng 80% bề mặt đĩa nuôi cấy. Enzyme trypsin tái tổ hợp (TriPLE, Thermo Scientific, Hoa Kỳ) được dùng trong việc bóc tách tế bào ra khỏi bề mặt nuôi cấy. Mật độ tế bào được xác định bằng phương pháp đếm tế bào trên buồng đếm hồng cầu với thuốc nhuộm Trypan blue.

2.4. Thử nghiệm độc tính tế bào

Tế bào có mật độ 10^5 tế bào/mL được cấy vào đĩa 96 giếng và ủ 24 giờ trong tủ nuôi cấy để tế bào bám vào bề mặt đĩa. Cao chiết ở các nồng độ khác nhau được bổ sung vào các giếng tế bào. DMSO được dùng làm đối chứng âm. Sau 72 giờ ủ mẫu, môi trường nuôi cấy được thay thế bằng môi trường RPMI chứa 10% hoá chất 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT, Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ). Sau 4 giờ ủ mẫu, môi trường chứa MTT được hút bỏ và thay thế bằng 100µL DMSO. Độ hấp thụ quang phổ được đo tại bước sóng 490nm. Tỷ lệ sống của tế bào được tính bằng công thức:

$$\text{Tỷ lệ sống của tế bào} = (OD_{\text{mẫu}} - \text{mẫu trắng}) / (OD_{\text{chứng âm}} - \text{mẫu trắng}) \times 100\%.$$

Phân tích hồi quy phi tuyến tính được tiến hành để xác định nồng độ ức chế tối đa một nửa (IC50).

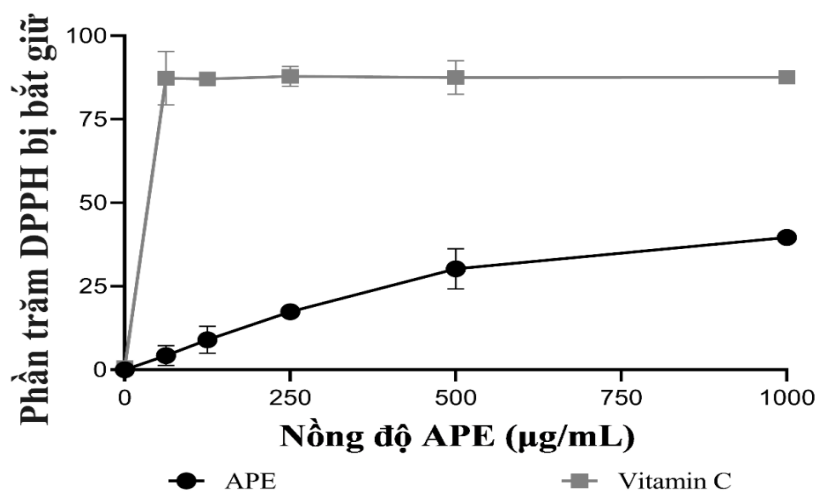
2.5. Phương pháp phân tích số liệu

Các thí nghiệm được tiến hành ít nhất ba lần lặp lại độc lập. Dữ liệu thu thập được lưu trữ và phân tích trong phần mềm Microsoft office và GraphPad Prism phiên bản 9.0.0. Các kết quả mang tính so sánh được tiến hành thực hiện bằng kiểm nghiệm Student T-test và ANOVA một chiều với mức ý nghĩa alpha là 0,05.

3. Kết quả

3.1. Khả năng kháng oxy hoá của cao chiết Xuyên tâm liên

Trong nghiên cứu này hiệu suất tách chiết mẫu lá xuyên tâm liên được ghi nhận là $4,18 \pm 0,52\%$. Kết quả ghi nhận thấy có sự tăng tỷ lệ gốc tự do bị trung hoà khi gia tăng nồng độ cao chiết, thể hiện trong hình 1. Tuy nhiên cao chiết APE cho thấy hiệu quả thu nhận DPPH kém hơn nhiều so với chứng dương Vitamin C, p-value < 0,0001. Ở nồng độ 1000µg/mL, đường biểu diễn của dịch chiết APE vẫn duy trì dưới mức 50% DPPH bị bắt giữ, do đó nồng độ EC50 của cao chiết không được xác định. Trong khi đó, giá trị EC50 của vitamin C là $13,01 \pm 1,08\mu\text{g/mL}$.

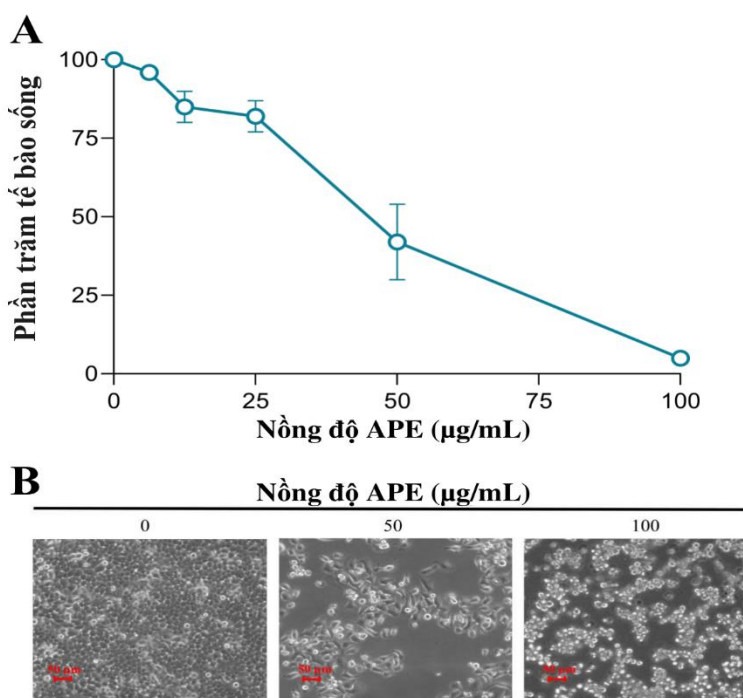


Hình 1. Kết quả khả năng thu nhận gốc tự do của cao chiết xuyên tâm liên

Xuyên tâm liên là một loại thảo dược nổi tiếng được sử dụng nhiều trong các bài thuốc y học dân tộc. Cho đến nay, nhiều nghiên cứu đã được triển khai và cung cấp các bằng chứng khoa học cho khả năng kháng virus, kháng khuẩn, kháng oxi hoá và ức chế tăng sinh tế bào ung thư của loài thảo dược này (Bosco và nnk., 2023; Singha và nnk., 2003; Vetvicka và nnk., 2021). Trong bài nghiên cứu này, hoạt tính kháng oxi hoá của cao chiết được phản ánh thông qua khả năng trung hoà gốc tự do DPPH, theo đó kết quả cho thấy khả năng thu giữ DPPH của cao chiết APE là không cao và được xác định có giá trị $EC_{50} > 1000\mu\text{g/mL}$ (Xiao và nnk., 2020). Kết quả này cho thấy sự khác biệt so với nghiên cứu trước đó trên mẫu xuyên tâm liên thu hái tại miền trung châu Phi với giá trị EC_{50} trên DPPH là $536,04 \pm 1,11\mu\text{g/mL}$ (Adaramola và nnk., 2018). Thành phần các hợp chất mang hoạt tính sinh học đóng vai trò quan trọng trong việc hình thành hoạt tính kháng oxi hoá của cao chiết thực vật và có sự thay đổi linh hoạt tùy thuộc vào điều kiện khí hậu thà thổ dưỡng (Chaves và nnk., 2020). Trong báo cáo trước trên tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ, cao chiết xuyên tâm liên được cho thấy là có thành phần hoạt tính và khả năng kháng oxi hoá khác nhau khi so sánh ba mẫu thu hái tại ba khu vực địa lý khác nhau (Nguyễn và nnk., 2023).

3.2. Khả năng gây độc tế bào HCC-J5

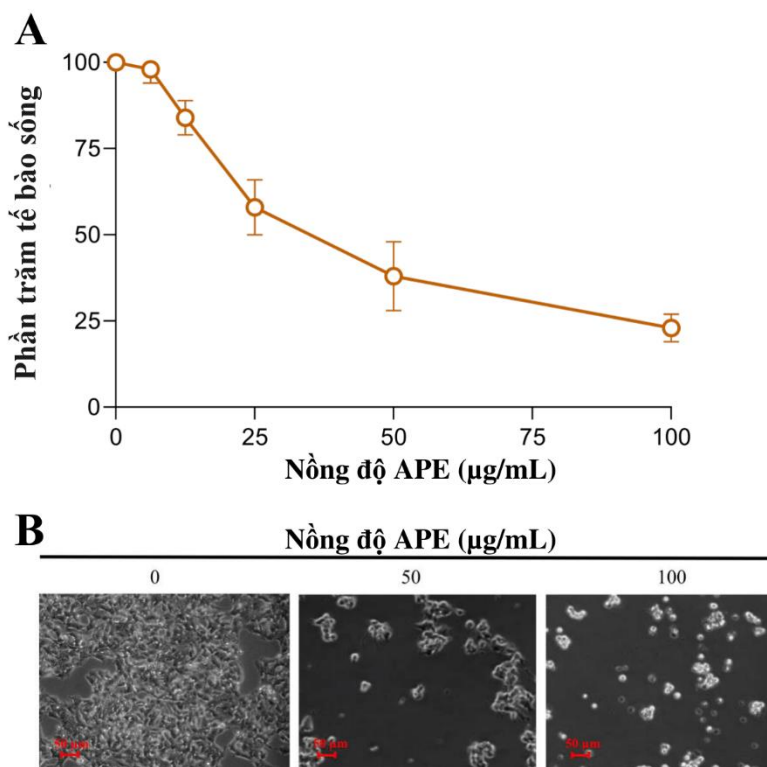
Khả năng ức chế tăng sinh tế bào HCC-J5 được ghi nhận là phụ thuộc vào nồng độ tác động, mô tả chi tiết trong hình 2A. tại nồng độ cao chiết APE $100\mu\text{g/mL}$, hầu như không còn tế bào sống sót được ghi nhận. Giá trị IC_{50} được hồi quy là $46,80 \pm 3,03 (\mu\text{g/mL})$. Ở mức nồng độ $50\mu\text{g/mL}$, quan sát thấy hiện tượng bóc tách tế bào ra khỏi bề mặt nuôi cấy và mất đi hình dạng tế bào biểu mô điển hình (hình 2B).



Hình 2. Kết quả khả năng gây chết tế bào ung thư biểu mô gan HCC-J5.
Đường biểu diễn tỷ lệ sống (A) và Sự thay đổi trong hình thái tế bào (B)

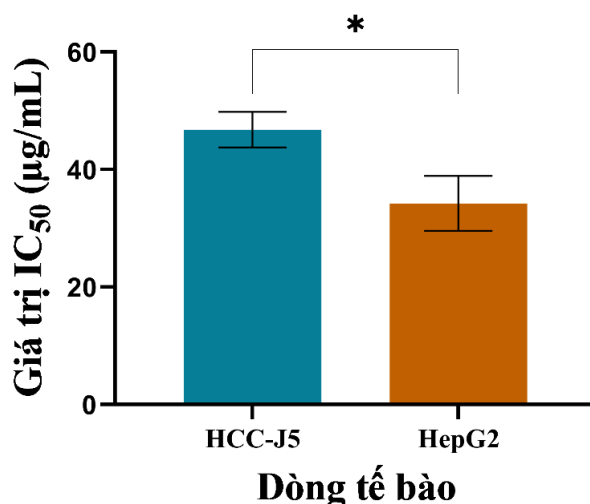
3.3. Khả năng gây độc tế bào HepG2

Tác động gây độc tương tự được ghi nhận trên dòng tế bào HepG2. Tác động được xem xét là phụ thuộc vào nồng độ cao chiết thử nghiệm, mô tả chi tiết ở hình 3A. Đường biểu diễn tỷ lệ sống sót của tế bào giảm nhanh chóng hơn khi so sánh với thí nghiệm trên HCC-J5. Tuy nhiên ở nồng độ thử nghiệm cao nhất, $100\mu\text{g/mL}$, khoảng 20% tế bào sống được duy trì (hình 3A). Trong hình 3B, tế bào nhanh chóng co cụm thành từng mảng nhỏ và bong tróc khỏi bề mặt nuôi cấy khi tiếp xúc với cao chiết nồng độ APE $50\mu\text{g/mL}$. Ở nồng độ $100\mu\text{g/mL}$ APE, các tế bào hầu như biến dạng thành hình cầu.



Hình 3. Kết quả khả năng gây chết tế bào ung thư biểu mô gan HepG2.
Đường biểu diễn tỷ lệ sống (A) và Sự thay đổi trong hình thái tế bào (B)

Phân tích hồi quy phi tuyến tính xác định giá trị IC_{50} của APE trên tế bào HepG2 là $34,24 \pm 4,67$ (μg/ml). Trong hình 4, dựa trên giá trị IC_{50} cho thấy khả năng gây ức chế tăng sinh của APE lên tế bào HepG2 là mạnh mẽ hơn so với tác động trên tế bào HCC-J5, $p\text{-value} = 0,0174$. Như đã đề cập, ngoài hoạt tính kháng oxy hóa, thảo dược này cũng đã được nghiên cứu đến các hoạt tính khác bao gồm cả ức chế tế bào ung thư. Cao chiết xuyên tâm liên đã cho thấy hiệu quả khi thử nghiệm trên các dòng tế bào ung thư máu, ung thư phổi, ung thư vú, và một số loại khác, trong đó một số con đường tác động đã được tìm ra bao gồm gây ức chế enzyme tyrosine, kích hoạt apoptosis, bắt giữ chu kỳ tế bào (Malik và nnk, 2021; Tundis và nnk, 2023). Đây là lần đầu tiên khả năng gây ức chế ung thư biểu mô gan trên tế bào HCC-J5 được báo cáo. Dựa trên giá trị IC_{50} trên hai dòng tế bào thử nghiệm, cao chiết APE được phân loại là cao chiết có hoạt tính ức chế tế bào ung thư mạnh với IC_{50} ghi nhận nhỏ hơn 50 μg/mL và cần được phát triển các nghiên cứu bổ sung (Indrayanto và nnk, 2021).



Hình 4. Giá trị hồi quy nồng độ IC_{50} của cao chiết Xuyên tâm liên trên tế bào HCC-J5 và HepG2

4. Kết luận

Bài nghiên cứu cho thấy mẫu cao chiết từ lá cây xuyên tâm liên thu hái vào tháng 3 tại khu vực Bẫy núi, An Giang có hoạt tính kháng oxi hoá yếu, tuy nhiên thể hiện khả năng kháng ung thư biểu mô gan hiệu quả với giá trị ức chế 50% ($\mu\text{g/mL}$) lần lượt là $34,24 \pm 4,67$ và $46,80 \pm 3,03$ trên tế bào HepG2 và tế bào HCC-J5.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Adaramola, F., Benjamin, G., Oluchi, O., & Fapohunda, S. (2018). Antimicrobial and antioxidant activities of crude methanol extract and fractions of *Andrographis paniculata* leaf (Family: Acanthaceae) (Burm. f.) wall. Ex Nees. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 11, 23-30.
- [2] Akbar, S. (2011). *Andrographis paniculata*: a review of pharmacological activities and clinical effects. *Altern Med Rev*, 16(1), 66-77.
- [3] Bosco, F., Ruga, S., Citraro, R., Leo, A., Guarnieri, L., Maiuolo, J., . . . Mollace, V. (2023). The Effects of *Andrographis paniculata* (Burm.F.) Wall. Ex Nees and Andrographolide on Neuroinflammation in the Treatment of Neurodegenerative Diseases. 15(15), 3428.
- [4] Chaves, N., Santiago, A., & Alías, J. C. (2020). Quantification of the Antioxidant Activity of Plant Extracts: Analysis of Sensitivity and Hierarchization Based on the Method Used. *Antioxidants (Basel)*, 9(1).
- [5] Dai, Y., Chen, S. R., Chai, L., Zhao, J., Wang, Y., & Wang, Y. (2019). Overview of pharmacological activities of *Andrographis paniculata* and its major compound andrographolide. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 59(S17-S29).
- [6] Indrayanto, G., Putra, G. S., & Suhud, F. (2021). Validation of in-vitro bioassay methods: Application in herbal drug research. *Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol*, 46, 273-307.
- [7] Lợi, Đ. T. (2004). *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam* (Vol. I): NXB Y Học.
- [8] Malik, Z., Parveen, R., Parveen, B., Zahiruddin, S., Aasif Khan, M., Khan, A., . . . Husain, S. A. (2021). Anticancer potential of andrographolide from *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees and its mechanisms of action. *J Ethnopharmacol*, 272, 113936.
- [9] Mussard, E., Jousselin, S., Cesaro, A., Legrain, B., Lespessailles, E., Esteve, E., . . . Toumi, H. (2020). *Andrographis paniculata* and Its Bioactive Diterpenoids Against Inflammation and Oxidative Stress in Keratinocytes. *Antioxidants (Basel)*, 9(6).
- [10] Nguyen, H. T., Do, V. M., Phan, T. T., & Nguyen Huynh, D. T. (2023). The Potential of Ameliorating COVID-19 and Sequelae From *Andrographis paniculata* via Bioinformatics. *Bioinform Biol Insights*, 17, 11779322221149622.
- [11] Nguyễn, T., Võ, T., Huỳnh, T., Đinh, C., Nguyễn, T., Thành Đạt, P., . . . Nguyen, P. (2023). Thành phần hóa học, khả năng kháng khuẩn và kháng oxi hóa của Xuyên tâm liên *Andrographis paniculata* (Burm.f.) nees phân bố ở Cần Thơ, Sóc Trăng và An Giang. *Can Tho University Journal of Science*, 59, 57-63.
- [12] Okhwarobo, A., Ehizogie Falodun, J., Erharuyi, O., Imieje, V., Falodun, A., & Langer, P. (2014). Harnessing the medicinal properties of *Andrographis paniculata* for diseases and beyond: a review of its phytochemistry and pharmacology. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4(3), 213-222.
- [13] Rajagopal, S., Kumar Ra Fau - Deevi, D. S., Deevi Ds Fau - Satyanarayana, C., Satyanarayana C Fau - Rajagopalan, R., & Rajagopalan, R. (2003). Andrographolide, a potential cancer therapeutic agent isolated from *Andrographis paniculata*. *J Exp Ther Oncol*, 3(3), 147-158.
- [14] Singha, P. K., Roy, S., & Dey, S. (2003). Antimicrobial activity of *Andrographis paniculata*. *Fitoterapia*, 74(7), 692-694.
- [15] Soo, H. L., Quah, S. Y., Sulaiman, I., Sagineedu, S. R., Lim, J. C. W., & Stanslas, J. (2019). Advances and challenges in developing andrographolide and its analogues as cancer therapeutic agents. *Drug Discovery Today*, 24(9), 1890-1898.

- [16] Sudhakaran, M. V. (2012). Botanical pharmacognosy of *Andrographis paniculata* (Burm. F.) Wall. Ex. Nees. *Pharmacognosy Journal*, 4(32), 1-10.
- [17] Suriyo, T., Chotirat, S., Rangkadilok, N., Pholphana, N., & Satayavivad, J. (2021). Interactive effects of *Andrographis paniculata* extracts and cancer chemotherapeutic 5-Fluorouracil on cytochrome P450s expression in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Journal of Herbal Medicine*, 26, 100421.
- [18] Suriyo, T., Pholphana, N., Rangkadilok, N., Thiantanawat, A., Watcharasit, P., & Satayavivad, J. (2014). *Andrographis paniculata* extracts and major constituent diterpenoids inhibit growth of intrahepatic cholangiocarcinoma cells by inducing cell cycle arrest and apoptosis. *Planta Med*, 80(7), 533-543.
- [19] Trivedi, N. P., & Rawal, U. M. (2001). Hepatoprotective and antioxidant property of *Andrographis paniculata* (Nees) in BHC induced liver damage in mice. *Indian J Exp Biol*, 39(1), 41-46.
- [20] Tundis, R., Patra, J. K., Bonesi, M., Das, S., Nath, R., Das Talukdar, A., . . . Loizzo, M. R. (2023). Anti-Cancer Agent: The Labdane Diterpenoid-*Andrographolide*. *Plants*, 12(10). doi:10.3390/plants12101969
- [21] Vetvicka, V., & Vannucci, L. J. A. o. T. M. (2021). Biological properties of *andrographolide*, an active ingredient of *Andrographis Paniculata* : a narrative review, 9(14), 1186.
- [22] Wallich, N. (1832). *Descriptions and Figures of a select number of unpublished East Indian plants* (Vol. Vol III): University of London.
- [23] Xiao, F., Xu, T., Lu, B., & Liu, R. (2020). Guidelines for antioxidant assays for food components. 1(1), 60-69.