

Nghiên cứu một số hoạt tính sinh học của cao chiết ethanol từ lá cây Sói Nhật (*Chloranthus japonicus* Sieb.)

Investigating some biological activities of ethanolic extract from *Chloranthus japonicus* Sieb. leaves

Nguyễn Minh Cần¹, Nguyễn Thị Mỹ Trinh^{2,3*}

¹Trường Đại Học Phạm Văn Đồng, Quảng Ngãi, Việt Nam

²Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

³Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

*Tác giả liên hệ, Email: ntmtrinh@hcmus.edu.vn

THÔNG TIN

DOI:10.46223/HCMCOUJS.
tech.vi.19.2.3320.2024

Ngày nhận: 22/03/2024

Ngày nhận lại: 20/05/2024

Duyệt đăng: 29/05/2024

Từ khóa:

kháng khuẩn; kháng oxy hoá;
kháng viêm; làm lành vết
thương; Sói Nhật

Keywords:

antimicrobial activity;
antioxidant activity; anti-
inflammatory effect; wound
healing; *Chloranthus japonicus*
Sieb

TÓM TẮT

Sói Nhật (*Chloranthus japonicus* Sieb.) là cây thân thảo được tìm thấy ở các tỉnh vùng núi phía bắc và một số vùng ở phía nam như Lâm Đồng, Kon Tum và Gia Lai. Theo khảo sát của chúng tôi, lá cây được người K'Ho tại Vườn Quốc gia Bidoup - Núi Bà sử dụng để chữa vết lở do côn trùng đốt và bỏng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi chứng minh cao chiết từ lá Sói Nhật chứa 59.93 ± 9.66 mgGAE/gE (poly)phenol và 457.39 ± 7.93 mgQE/gE flavonoid; và có khả năng kháng oxy hoá cao với IC₅₀ đạt 14.87 ± 0.31 µg/ml. Kết quả cũng chỉ ra cao chiết chỉ có tác dụng kích thích sự tăng sinh nguyên bào sợi chuột ở nồng độ thấp ($7.8125 - 31.25$ µg/ml). Tuy nhiên, ở nồng độ này, cao chiết lại chưa cho thấy khả năng kháng 04 loại vi khuẩn thường hiện diện trên vết thương là *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, và *E. coli*, và khả năng kháng viêm trên mô hình đại thực bào Raw 246.7. Các kết quả này cung cấp những bằng chứng ban đầu cho thấy cao chiết lá Sói nhật có khả năng hỗ trợ làm lành vết thương ở nồng độ thấp, và tác dụng này đến từ một số đặc tính của cao chiết bao gồm hàm lượng (poly)phenol và flavonoid cao, khả năng chống oxy hoá cao và kích thích sự tăng sinh nguyên bào sợi hơn là khả năng kháng viêm và kháng khuẩn.

ABSTRACT

Chloranthus japonicus Sieb. is a perennial herb which can be found in northern Vietnam mountains and also in some southern areas such as Lam Dong, Kon Tum, and Gia Lai. According to our surveys, *C. japonicus* Sieb. leaves were traditionally used by K'Ho people in Bidoup - Nui Ba National Park for the treatment of insect bites and skin burns. In this study, we found that the 70% ethanol extract of *C. japonicus* leaves contained 59.93 ± 9.66 mgGAE/gE (poly)phenol and 457.39 ± 7.93 mgQE/gE flavonoid; and exhibited a strong antioxidant activity with the IC₅₀ value of 14.87 ± 0.31 µg/ml. We also

demonstrated that this extract at low concentrations (7.8125 - 31.25 $\mu\text{g/ml}$) could improve the proliferation of the mouse fibroblast NIH-3T3 cell line. However, at these concentrations, the extract did not show any inhibitory effect on the growth of some opportunistic pathogens, including *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, and *E. coli*; and *in vitro* immunomodulatory effect on LPS-stimulated Raw 264.7 model. These findings suggested that the *C. japonicus* leaf extract might have a positive effect on wound healing at low concentrations, but this potential effect seems to come from its high (poly)phenol and flavonoid contents, high antioxidant activity rather than the antimicrobial and anti-inflammatory capacities.

1. Giới thiệu

Các tổn thương da mạn tính là một vấn đề phổ biến trong đời sống, ảnh hưởng đến hơn 40 triệu người trên toàn thế giới (Heras, Igartua, Santos-Vizcaino, & Hernandez, 2020). Đặc biệt, vết thương ở những người bị béo phì, tiểu đường, nhiễm HIV hoặc nghiện rượu, thuốc lá dễ có nhiều biến chứng phức tạp và khó lành, làm tăng chi phí chữa trị. Theo thống kê của Facts and Factors Research (2023), chi phí chữa trị các ca bị thương trên da tiêu tốn khoảng 9.37 tỉ USD vào năm 2022 và dự tính sẽ tăng lên đến 14.2 tỉ USD vào năm 2030, với mức tăng trưởng kép trung bình hàng năm đạt 5.61%. Các chế phẩm chữa trị vết thương hiện nay hầu hết dựa trên các sản phẩm tổng hợp hóa học với nhiều tác dụng phụ hoặc các sản phẩm công nghệ cao như các loại gel có chứa các cytokine ở người với giá thành cao. Bên cạnh các loại thuốc hoá học, cây thuốc dân gian được xem là các chế phẩm có nguồn gốc tự nhiên, có lịch sử sử dụng hàng nghìn năm nên thường được xem là an toàn, thân thiện, ít tác dụng phụ. Nhiều cây thuốc truyền thống đã và đang được sử dụng điều trị vết thương một cách hiệu quả trong y học cổ truyền của nhiều dân tộc trên thế giới.

Sói Nhật (*Chloranthus japonicus* Sieb.) là cây thân thảo thuộc họ Hoa sói (Chloranthaceae). Trên thế giới, cây được tìm thấy phổ biến ở Trung Quốc, Nhật Bản, và Hàn Quốc (An & ctg., 2020). Ở Việt Nam, Sói Nhật phân bố chủ yếu ở các tỉnh vùng núi phía bắc, ở phía nam chỉ mới gặp ở Lâm Đồng, Ngọc Linh (Kon Tum) và Mang Yang (Gia Lai) (Do, Pham, Nguyen, & Pham, 2015). Theo khảo sát của chúng tôi, người K'Ho tại Vườn Quốc gia Bidoup - Núi Bà sử dụng lá cây được nướng và vò để chữa vết lở do côn trùng đốt. Bên cạnh đó, trong dân gian lá tươi còn dùng để trị bỏng. Tuy nhiên, cơ sở khoa học ban đầu của việc sử dụng Sói Nhật trong điều trị vết thương chưa được nghiên cứu nhiều. Cao chiết Sói Nhật phần trên mặt đất thu hái ở Đà Lạt được phát hiện có tác dụng chống viêm cấp tính và mạn tính trên chuột (Do & ctg., 2015). Một số hợp chất kháng oxy hóa (scopoletin), kháng vi sinh vật (furanodienone và scopoletin), kháng viêm (furanodienone và scopoletin) đã được phát hiện có trong phần lá Sói Nhật (Joshi & Mathela, 2012; Kayser & Kolodziej, 1997; Kim & ctg., 2004; Makabe, Maru, Kuwabara, Kamo, & Hirota, 2006; Mogana, Teng-Jin, & Wiart, 2013).

Tuy nhiên, nhiều tính chất quan trọng có liên quan đến tác dụng làm lành vết thương của Sói Nhật chưa được chứng minh. Do đó, trong nghiên cứu này, chúng tôi khảo sát một số hoạt tính *in vitro* của lá cây Sói Nhật như khả năng kháng oxy hóa, kháng vi khuẩn nhiễm trùng vết thương và khả năng kích thích tăng sinh các tế bào biểu mô da để góp phần làm rõ công dụng dân gian trong điều trị vết thương của loài cây này.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Thông tin về mẫu thực vật

Lá cây Sói Nhật (*Chloranthus japonicus* Sieb.) được thu hái tại vườn quốc gia Bidoup - Núi Bà, Tỉnh Lâm Đồng. Mẫu cây được định danh và lưu trữ tại phòng thí nghiệm Thực vật, khoa Sinh học - Công nghệ sinh học, trường Đại học Khoa học Tự nhiên Thành phố Hồ Chí Minh (Mã số: PHH0004912).

2.2. Phương pháp chiết cao

Lá cây được phơi khô đến độ ẩm < 10% ở nhiệt độ dưới 40°C và tránh ánh sáng trực tiếp, sau đó được xay thành bột mịn và bảo quản ở nhiệt độ phòng. Mẫu sau khi xử lý được chiết với ethanol (EtOH) 70% trong 48 giờ với tỷ lệ mẫu và dung môi là 1:10 (w:v). Dịch chiết sau đó được thu nhận, lọc, và đuổi dung môi bằng máy cô quay (Hahn vapor, Hàn Quốc). Sau đó, mẫu cao được loại nước hoàn toàn bằng hệ thống đông khô (Benchtop K Virtis, Mỹ). Cuối cùng, bột cao chiết được hoà tan trong 99.9% DMSO (Merck, Đức) và bảo quản ở -30°C. Trước khi sử dụng, cao chiết được pha loãng trong dung dịch PBS và lọc qua màng lọc 0.22µm (Sartorius, Đức).

2.3. Phương pháp xác định hàm lượng phenol tổng và flavonoid tổng

Hàm lượng phenol tổng (Total Phenolic Content, TPC) được xác định theo TCVN 9745-1:2013 (Tiêu chuẩn Việt Nam, 2013) và theo Do và cộng sự (2014) có cải tiến. Mẫu được pha loãng đến nồng độ phù hợp, sau đó hút 80µl dịch chiết cho vào ống nghiệm có chứa sẵn 80µl thuốc thử Foline-Ciocalteu và 720µl nước cất. Bổ sung 800µl Na₂CO₃ (7.5%) trộn đều, sau đó bổ sung nước cất đủ 2ml. Ủ tối ống nghiệm 30 phút, sau đó đo mật độ quang ở bước sóng 760nm (OD₇₆₀). Acid gallic được dùng làm chất chuẩn, lượng phenol tổng số sẽ được xác định dựa trên đường chuẩn của acid gallic (25 - 400 µg/ml) và được thể hiện dưới dạng miligram acid gallic trên gram cao chiết (mgGAE/gE) hoặc trên gram mẫu lá khô (mgGAE/gdw).

Hàm lượng flavonoid tổng (Total Flavonoid Content, TFC) được xác định theo phương pháp của Do và cộng sự (2014). Theo đó, mẫu được pha loãng đến nồng độ phù hợp bằng EtOH 70%. Cho 200µl mẫu vào ống nghiệm có chứa 120µl dung dịch NaNO₂ 5%, vortex trong 10 giây và để yên ở nhiệt độ phòng 05 phút, sau đó bổ sung 120µl dung dịch AlCl₃ 10%, thêm 800µl NaOH 1M và bổ sung nước cất đủ 2ml, vortex trong 10 giây và đo phổ hấp thụ ở bước sóng 415nm (OD₄₁₅). Quercetin được dùng làm chất chuẩn, lượng phenol tổng số sẽ được xác định dựa trên đường chuẩn của quercetin (31.25 - 1,000 µg/ml) và được thể hiện dưới dạng miligram quercetin trên gram cao chiết (mgQ/gE) hoặc trên gram mẫu lá khô (mgQE/gdw).

2.4. Đánh giá hoạt tính kháng oxy hoá bằng khả năng bắt gốc tự do DPPH

Hỗn hợp phản ứng có thể tích 2,500µL, gồm 500µL mẫu khảo sát ở các nồng độ trong khoảng từ 12.5 - 200 µg/ml và 2,000µL dung dịch DPPH nồng độ 100µM được chuẩn bị. Các hỗn hợp phản ứng được lắc trong 01 phút và ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút, sau đó tiến hành đo mật độ quang ở bước sóng 517nm (OD₅₁₇).

Khả năng kháng oxy hóa (Radical Scavenging Activity (%RSA)) của mẫu được tính theo công thức: %RSA = (A₀-A_j)/A₀*100%, trong đó A₀ là giá trị OD₅₁₇ của thử không (thực hiện tương tự mẫu cần đo nhưng thay 500µl mẫu cao chiết bằng 500µl dung dịch ethanol 70%) và A_j là giá trị OD₅₁₇ của mẫu cần đo (Yakaew & ctg., 2016). Acid gallic được dùng làm chất chuẩn, hoạt tính kháng oxy hoá của cao chiết sẽ được xác định dựa trên giá trị IC₅₀ của cao chiết và của acid gallic, và được thể hiện dưới dạng miligram acid gallic trên gram cao chiết (mgGAEAC/gE)

hoặc trên gram mẫu lá khô (mgGAEAC/gdw). Giá trị IC₅₀ của cao chiết và của acid gallic được nội suy từ đường cong đáp ứng giữa %RSA và nồng độ cao chiết hoặc nồng độ acid gallic.

2.5. Đánh giá khả năng kháng khuẩn

Khả năng kháng khuẩn được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch theo mô tả của Agyare và cộng sự (2013) có cải tiến. Theo đó, 100µl dịch vi khuẩn mục tiêu đã pha loãng đến OD₆₀₀ = 0.1 được trộn với 5ml môi trường TSB mềm (0.8% agar) và được đổ lên mặt đĩa chứa môi trường TSB agar (2% agar). Sau khi môi trường đã đông hoàn toàn, các giếng có đường kính 8-mm được tạo ra trên mặt thạch và 100µl cao chiết ở các nồng độ pha loãng khác nhau từ 50 - 400 µg/ml được thêm vào mỗi giếng. Đĩa sau đó được ủ ở 37°C trong 16 giờ. Kết quả được tính bằng hiệu đường kính vòng vô khuẩn với đường kính lỗ thạch. Các chủng vi khuẩn *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, và *E. coli* được chúng tôi tự phân lập và đã được định danh phân tử dựa trên trình tự gene mã hoá 16S rRNA.

2.6. Đánh giá khả năng kháng viêm in vitro của cao chiết

Tế bào RAW 264.7 (ATCC-TIB-71) được nuôi ổn định trong đĩa 96 giếng với mật độ 10⁴ tế bào/giếng trong 100µl môi trường DMEM-F12 có bổ sung 10% FBS. Đĩa được ủ ở 37°C, 5% CO₂ trong 24 giờ. Sau đó, thay môi trường bằng 100µl môi trường DMEM-F12 mới có bổ sung 1% FBS. Sau khi ủ ở 37°C, 5% CO₂ trong 06 giờ, tiến hành thay thế môi trường cũ thành môi trường DMEM-F12 mới chứa 10% FBS, 0.1% DMSO có bổ sung 1% lypopolysaccharide (LPS) và cao chiết ở các nồng độ khác nhau. Đĩa được ủ ở 37°C, 5% CO₂ trong 24 giờ. Cuối cùng, 50µl môi trường được rút ra và 50µl thuốc thử Gress được thêm vào giếng. Đĩa được ủ ở 10 phút và tiến hành đo bước sóng 550nm (OD₅₅₀). Mức độ kháng viêm của cao chiết được đánh giá qua tỷ lệ ức chế lượng NO sinh ra (%) theo phương trình 1 bên dưới (Heo & ctg., 2010):

$$\text{Tỷ lệ ức chế NO} = \frac{OD_{LPS} - OD_{LPS + \text{Cao chiết}}}{OD_{LPS} - OD_{\text{Không xử lý LPS}}} \times 100 (\%) \quad (1)$$

Trong đó, OD_{LPS}, OD_{LPS + cao chiết}, và OD_{Không xử lý LPS} lần lượt là giá trị OD₅₅₀ của nghiệm thức xử lý LPS nhưng không có cao chiết, nghiệm thức xử lý LPS và bổ sung cao chiết; và nghiệm thức không xử lý LPS. Dexamethasone 50µM (Sigma) được sử dụng làm đối chứng dương.

2.7. Đánh giá khả năng kích thích tăng sinh nguyên bào sợi chuột NIH-3T3

Tế bào NIH-3T3 (ATCC CRL-1658) được bổ sung vào đĩa 96 giếng với mật độ 10⁴ tế bào/giếng trong 100µl môi trường DMEM-F12 có bổ sung 10% FBS. Đĩa được ủ ở 37°C, 5% CO₂ trong 24 giờ. Sau đó, môi trường được thay bằng 100µl môi trường DMEM-F12 được bổ sung 2% FBS và cao chiết với các nồng độ khác nhau. Đĩa được tiếp tục ủ ở 37°C, 5% CO₂ trong 48 giờ. Thực hiện đồng thời với đối chứng âm là môi trường như trên không có cao thuốc và đối chứng dương là DMEM-F12 có DMSO 0.1% và FBS 7.5%. Mật độ tế bào được xác định bằng phương pháp MTT theo quy trình của Nguyen, Truong, Nguyen, Tran, và Dang (2020).

2.8. Xử lý thống kê

Trong nghiên cứu này, tất cả các thí nghiệm được thực hiện tối thiểu 03 lần và kết quả được phân tích thống kê sử dụng ANOVA 1 chiều bằng phần mềm Graphpad Prism 7.0.

3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

3.1. Hàm lượng phenol tổng và flavonoid tổng trong cao chiết lá Sói Nhặt

Ethanol là một trong những dung môi dùng để chiết cao phổ biến nhất do tính an toàn và hiệu quả cao. Do vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng ethanol 70° làm dung môi để chuẩn bị cao chiết từ lá cây Sói Nhặt. Với dung môi này, hiệu suất thu nhận cao là 23.4%.

Hàm lượng TPC và TFC trong cao chiết ethanol từ lá Sói Nhật được xác định lần lượt là 259.93 ± 9.66 mgGAE/gE (60.87 ± 0.16 mgGAE/gdw) và 457.39 ± 7.93 mgQE/gE (107.12 ± 0.07 mgQE/gdw) (Bảng 1). Theo chúng tôi tìm hiểu, đây là nghiên cứu đầu tiên công bố về hàm lượng phenol và flavonoid tổng của lá Sói Nhật. Tuy nhiên, một số nghiên cứu trước đây đã công bố về hàm lượng các hợp chất này trong các cây cùng chi *Chloranthus*. Cụ thể, nghiên cứu của Zemry và cộng sự (2023) cho thấy hàm lượng TPC trong lá cây Sói Đứng (*Chloranthus erectus*) đạt 9.64 ± 0.5 mgGAE/gdw. Xu và cộng sự (2020) đã công bố hàm lượng TPC và TFC của loài *Chloranthus henryi* đạt khoảng 4.36 - 19.64 mgGAE/gdw. Bên cạnh đó, khi nghiên cứu trên 13 cây được liệu và gia vị phổ biến, Muzolf-Panek và Stuper-Szablewska (2021) cho thấy TPC và TFC của các loài này nằm trong khoảng 0.89 - 167 mgGAE/gdw và 0.47 - 31.58 mgQE/gdw. Như vậy, khi so sánh với các nghiên cứu này, chúng tôi nhận thấy hàm lượng phenol và flavonoid tổng của lá Sói Nhật cao hơn hẳn những cây cùng chi *Chloranthus* và cao hơn mặt bằng chung của các cây thuốc. Nhiều nghiên cứu trước đây cho thấy các hợp chất (poly)phenol và flavonoid có vai trò quan trọng trong việc thúc đẩy quá trình làm lành vết thương của các cây thuốc dân gian (Budovsky, Yarmolinsky, & Ben-Shabat, 2015; Fraga, Martino, Ferraro, Coussio, & Boveris, 1987; Ghosh & Gaba, 2013; Sharma Ali, Ali, Sahni, & Baboota, 2013). Do vậy, việc phát hiện hàm lượng (poly) phenol và flavonoid cao trong cây Sói Nhật cung cấp những dữ liệu đầu tiên cho hoạt tính làm lành vết thương của loài cây này.

Bảng 1

Thành phần hóa học cao chiết ethanol từ lá Sói Nhật

Chỉ tiêu	Hàm lượng
Hàm lượng (poly)phenol (mgGAE/gE)	259.93 ± 9.66
Hàm lượng (poly)phenol (mgGAE/gdw)	60.87 ± 0.16
Hàm lượng flavonoid (mgQE/gE)	457.39 ± 7.93
Hàm lượng flavonoid (mgQE/gdw)	107.12 ± 0.07

3.2. Khả năng kháng oxy hóa của cao chiết ethanol từ lá Sói Nhật

Khả năng kháng oxy hóa thông qua bắt cơ chế bắt gốc tự do DPPH của cao chiết từ lá Sói Nhật được thể hiện ở Bảng 2. Kết quả cho thấy cao chiết Sói Nhật thể hiện khả năng kháng oxy hóa với IC_{50} là 14.87 μ g/ml với hàm lượng chất kháng oxy hóa trong bột cây thuốc khô quy đổi tương đương với hàm lượng gallic acid đạt 45.67 mgGAEAC/gdw. Tương tự TPC và TFC, đây cũng là nghiên cứu đầu tiên công bố về khả năng kháng oxy hoá của lá cây Sói Nhật.

Theo Phongpaichit và cộng sự (2007), một cao chiết được đánh giá là có khả năng kháng oxy hoá cao khi có IC_{50} trong khoảng 10 - 50 μ g/ml, vừa khi IC_{50} đạt 50 - 100 μ g/ml, và yếu khi $IC_{50} > 100$ μ g/ml. Khi đối chiếu với cách phân chia này, cao chiết từ lá cây Sói Nhật có khả năng kháng oxy hoá cao. Một số công bố cho thấy có mối tương quan chặt chẽ giữa hàm lượng TPC, TFC và khả năng kháng oxy hóa của các cây thuốc dân gian (Chaubey & ctg., 2017; Wojdyło, Oszmiański, & Czemerys, 2007). Do đó, khả năng kháng oxy hóa rất mạnh của cao chiết Sói Nhật có thể do các hợp chất phenol và flavonoid trong cây mang lại. Chất chống oxy hoá đã được chứng minh rộng rãi là có vai trò quan trọng trong việc điều hoà quá trình viêm và ngăn cản sự hoạt động quá mức của các tế bào miễn dịch tại vết thương, do đó góp phần đẩy nhanh quá trình làm lành vết thương (Comino-Sanz, López-Franco, Castro, & Pancorbo-Hidalgo, 2021; Fitzmaurice, Sivamani, & Isseroff, 2011). Như vậy, cùng với dữ liệu về hàm lượng TPC, TFC, dữ liệu về khả năng kháng oxy hóa của Sói Nhật góp phần giải thích công dụng dân gian trong điều trị vết thương của cây thuốc này.

Bảng 2

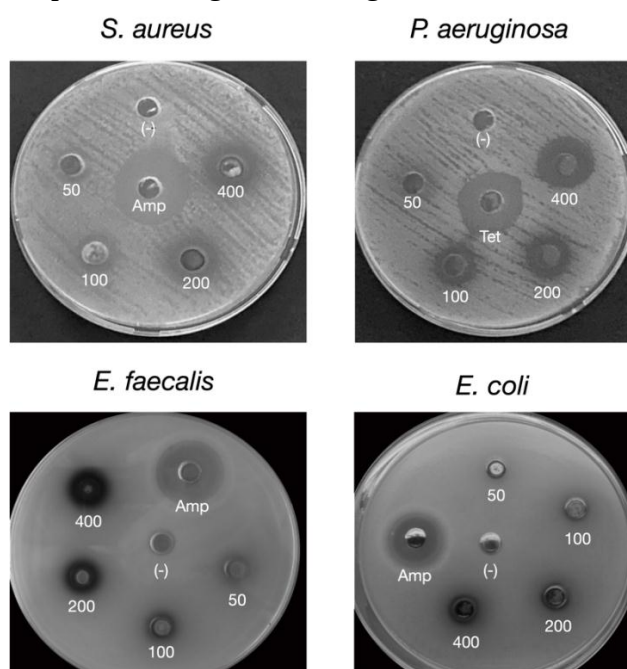
Khả năng kháng oxy hoá của cao chiết lá Sói Nhặt

Đơn vị	Hoạt tính	
	Cao chiết	Gallic acid
IC ₅₀ (µg/ml)	14.87 ± 0.31	2.90 ± 0.05
mgGAEAC/gE	195.02 ± 4.07	-
mgGAEAC/gdw	45.67 ± 0.95	-

3.3. Khả năng kháng khuẩn của cao chiết lá Sói Nhặt

Kết quả khảo sát khả năng kháng khuẩn của cao chiết và các cao phân đoạn của Sói Nhặt trên các dòng vi khuẩn gây viêm và nhiễm trùng vết thương cho thấy cao chiết có khả năng ức chế cả 04 chủng vi khuẩn khảo sát là *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, và *E. coli* ở các nồng độ 400 mg/ml và 200 mg/ml (Bảng 3, Hình 1). Khả năng ức chế mạnh nhất là đối với *S. aureus* và yếu nhất đối với *E. coli*, khả năng kháng trên 02 dòng Gram dương tốt hơn so với 02 dòng Gram âm. Cao chiết vẫn còn giữ được hoạt tính ức chế *S. aureus* ở nồng độ 50 mg/ml, trong khi nồng độ thấp nhất còn thể hiện hoạt tính trên *E. coli* là 200 mg/ml.

S. aureus là tác nhân gây nhiễm trùng da phổ biến nhất, gây ra mụn nhọt, lở loét, tổn thương mô sâu, thậm chí có thể dẫn tới sốc nhiễm khuẩn và tử vong (Del Giudice, 2020). *P. aeruginosa* là vi khuẩn cơ hội được tìm thấy phổ biến trong các vết thương mạn tính và vết bỏng. Sự hiện diện của *P. aeruginosa* thường làm vết thương trở nên nghiêm trọng hơn, lâu lành, và làm tăng tỷ lệ thất bại của phương pháp cấy ghép da cho người bị bỏng (Raizman, Little, & Smith, 2021). Bên cạnh đó, các nghiên cứu khác cho thấy *E. faecalis* và *E. coli* thường được tìm thấy trên bề mặt vết thương hở và sự hiện diện của chúng làm chậm quá trình lành vết thương (Alharbi & ctg., 2019; Chong & ctg., 2017). Do vậy, khả năng ức chế các loài vi khuẩn này của cao chiết Sói Nhặt phần nào ủng hộ tác dụng làm lành vết thương của loài cây này.



Hình 1. Kết quả khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết lá cây Sói Nhặt ở các nồng độ từ 50 - 400 mg/ml trên 04 dòng vi khuẩn cơ hội trên da *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, và *E. coli* bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch

Bảng 3

Khả năng kháng khuẩn của cao chiết lá Sói Nhật

Nồng độ (mg/ml)	Đường kính vòng vô khuẩn			
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>
400	7.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0	7.0 ± 0.0	3.3 ± 0.5
200	5.0 ± 0.0	4.0 ± 0.0	4.3 ± 0.5	2.0 ± 0.0
100	3.0 ± 0.0	3.0 ± 0.0	2.0 ± 0.0	NA
50	2.0 ± 0.0	NA	NA	NA
Đối chứng dương *	13 ± 0.5	8.7 ± 0.6	14.7 ± 0.6	5.2 ± 0.8
Đối chứng âm (DMSO 10%)	-	-	-	-

Ghi chú: (*) Đối chứng dương: ampiciline 100 µg/ml, riêng với *P. aeruginosa* dùng tetracycline 300 µg/ml**3.4. Khả năng kháng viêm in vitro của cao chiết lá Sói Nhật**

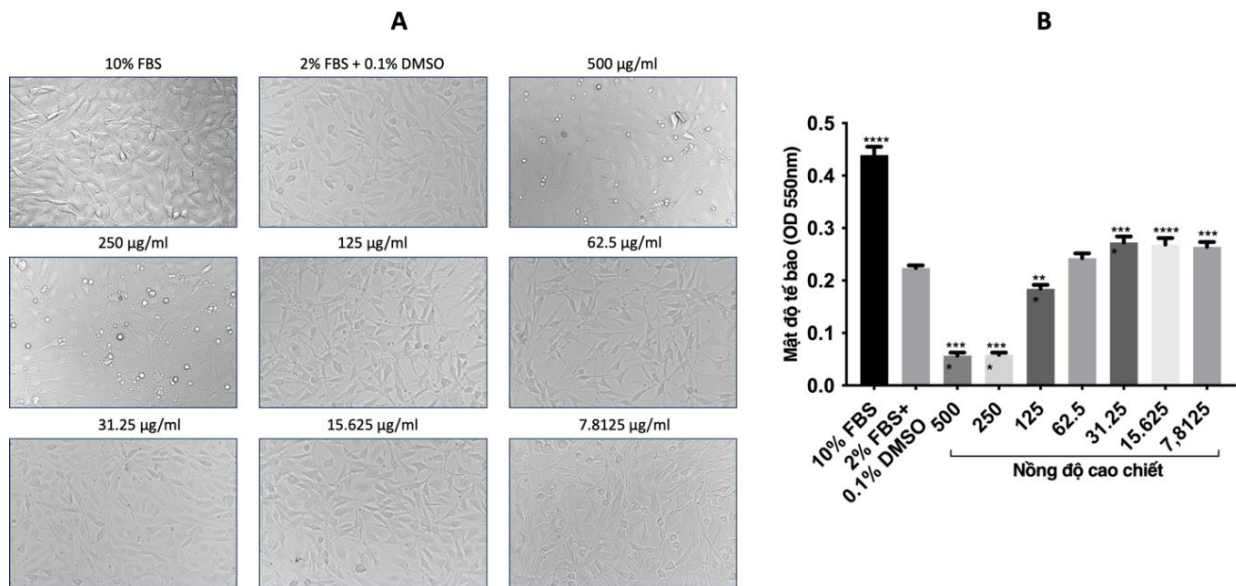
Phản ứng viêm có vai trò thiết yếu trong quá trình làm lành vết thương, giúp kháng nhiễm trùng và sản xuất một số yếu tố tăng trưởng cho các pha sau của quá trình lành vết thương. Tuy nhiên, phản ứng viêm quá mức sẽ dẫn đến vết thương khó lành, thậm chí chuyển sang vết thương mạn tính (Rohl, Zaharia, Rudolph, & Murray, 2015; Turabelidze & Dipietro, 2012). Do đó, khả năng kháng viêm được xem là một trong những tính chất quan trọng của các tác nhân điều trị vết thương, nhất là ở giai đoạn sau của quá trình lành vết thương cũng như trên các vết thương ở bệnh nhân lớn tuổi, bệnh nhân đái tháo đường (Hadagali & Chua, 2014; Hajhashemi, Ghannadi, & Heidari, 2012; Shah & Amini-Nik, 2017; Yip, Poh, & Chia, 2016).

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy cao chiết lá Sói Nhật ở nồng độ thử nghiệm cao nhất (100 µg/ml) vẫn không thể ức chế sự hình thành NO của đại thực bào Raw 264.7 trong khi chứng dương Dexamethasone ở nồng độ 50 µg/ml có khả năng ức chế sự sản sinh NO với tỷ lệ ức chế đạt $113.6 \pm 10.7\%$, gợi ý rằng cao chiết lá cây Sói Nhật không có khả năng kháng viêm in vitro. Kết quả này có khác biệt so với nghiên cứu trước đó của Do và cộng sự (2015), trong đó các tác giả cho thấy cao chiết Sói Nhật phần trên mặt đất thu hái ở Đà Lạt được phát hiện có tác dụng chống viêm cấp tính và mạn tính trên chuột (Do & ctg., 2015). Sự khác biệt từ sự khác nhau của bộ phận dùng cây để chiết cao, bộ phận chúng tôi dùng là lá trong khi nghiên cứu của Do và cộng sự (2015) sử dụng bộ phận trên mặt đất của cây, có thể là nguyên nhân dẫn tới sự khác biệt trong hoạt tính kháng viêm trong 02 nghiên cứu này.

3.5. Tác động của cao chiết lá SN lên khả năng tăng sinh của nguyên bào sợi in vitro

Nguyên Bào Sợi (NBS) đóng vai trò quan trọng trong quá trình làm lành vết thương, sản sinh tiền chất hình thành collagen giúp co kéo vết thương và hình thành lớp mô hạt che phủ bề mặt vết thương. Sự tăng sinh NBS là một trong các điều kiện quan trọng giúp quá trình lành vết thương diễn ra nhanh hơn (Bainbridge, 2013; Darby, Laverdet, Bonté, & Desmoulière, 2014; Joyce & Basil, 2013). Nhiều tác nhân làm lành vết thương cũng cho thấy khả năng kích thích tăng sinh và di chuyển đối với NBS (Fronza, Heinzmann, Hamburger, Laufer, & Merfort, 2009; Lee & ctg., 2016; Pierce & ctg., 1992; Wessels, Pretorius, Smith, & Nel, 2014).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi nhận thấy cao chiết lá Sói Nhật có khả năng hỗ trợ làm lành vết thương nhưng tác dụng này phụ thuộc vào nồng độ sử dụng. Cụ thể là ở nồng độ thấp (7.8125 - 31.25 $\mu\text{g/ml}$), cao chiết thể hiện rõ tác dụng hỗ trợ làm lành vết thương *in vitro* thông qua việc kích thích tăng sinh đối với dòng NBS chuột NIH-3T3 (Hình 2). Đặc biệt, cao chiết ở nồng độ 31.25 $\mu\text{g/ml}$ có khả năng kích thích tăng sinh hơn 1.6 lần so với đối chứng âm (DMSO 0.25% + 2% FBS). Tuy nhiên, ở nồng độ dưới 50 $\mu\text{g/ml}$, cao chiết không thể hiện khả năng kháng khuẩn và ở nồng độ dưới 100 $\mu\text{g/ml}$, cao chiết cũng không thể hiện hoạt tính kháng viêm như đã đề cập ở các thí nghiệm trên. Do vậy, tác dụng hỗ trợ làm lành vết thương của cao chiết ở nồng độ thấp có vẻ như chỉ đến từ tác dụng kích thích sự tăng sinh của nguyên bào sợi. Ngược lại, khi được xử lý với cao chiết ở nồng độ cao (> 125 $\mu\text{g/ml}$), tế bào có hiện tượng vỡ nát và bong tróc khỏi bề mặt đĩa (Hình 2A) và mật độ giảm so với mẫu đối chứng không xử lý cao chiết (mẫu 2% FBS + 0.1% DMSO) (Hình 2B), cho thấy tác dụng gây độc mạnh lên sự tăng sinh của dòng tế bào NIH-3T3. Kết quả này gợi ý rằng nên cân nhắc kỹ khi sử dụng cao chiết lá cây Sói Nhật ở nồng độ cao hoặc cần có những thí nghiệm *in vivo* để đánh giá tác dụng làm lành vết thương của cao chiết ở các nồng độ này.



Hình 2. Hình ảnh hiển vi (A) và mật độ tế bào (B) được phân tích bằng phương pháp MTT của nguyên bào sợi NIH-3T3 sau khi được xử lý với cao chiết lá cây Sói nhật. Tế bào NIH-3T3 được nuôi trong môi trường chứa 2% FBS và được xử lý với cao chiết ở các nồng độ khác nhau.

Chứng âm là mẫu tế bào được nuôi trong môi trường chứa 2% FBS và 0.1% DMSO. Chứng dương là mẫu tế bào được nuôi trong môi trường chứa 10% FBS. Các dấu * chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với mẫu chứng âm: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$

4. Kết luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi chứng minh được cao chiết từ lá cây Sói Nhật có hàm lượng (poly)phenol và flavonoid cao (tương đương 59.93 ± 9.66 mgGAE/gE và 457.39 ± 7.93 mgQE/gE) và khả năng kháng oxy hoá cao (IC_{50} đạt 14.87 ± 0.31 $\mu\text{g/ml}$). Kết quả cũng cho thấy cao chiết chỉ có tác dụng kích thích sự tăng sinh nguyên bào sợi chuột ở nồng độ thấp (7.8125 - 31.25 $\mu\text{g/ml}$), trong khi ở nồng độ cao (> 125 $\mu\text{g/ml}$) cao chiết lại cho thấy tác động gây độc trên dòng nguyên bào sợi này. Tuy nhiên, ở nồng độ thấp, cao chiết lại chưa cho thấy khả năng kháng khuẩn trên 04 loại vi khuẩn thường được tìm thấy trên vết thương là *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, và *E. coli*. Như vậy, các kết quả này bước đầu cho thấy cao chiết lá cây

Sói nhật có khả năng hỗ trợ làm lành vết thương ở nồng độ thấp, và tác dụng này đến từ một số đặc tính của cao chiết bao gồm hàm lượng TPC và TFC cao, khả năng chống oxy hoá cao, khả năng kích thích sự tăng sinh nguyên bào sợi hơn là khả năng kháng khuẩn của cao chiết. Trong bước tiếp theo, các nghiên cứu *in vivo* trên mô hình chuột cần được tiến hành để có những bằng chứng vững chắc hơn về tác dụng làm lành vết thương của loại dược liệu này.

Tài liệu tham khảo

- Agyare, C., Bempah, S. B., Boakye, Y. D., Ayande, P. G., Adarkwa-Yiadom, M., & Mensah, K. B. (2013). Evaluation of antimicrobial and wound healing potential of *Justicia flava* and *Lannea welwitschii*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013(632927), 1-10. doi:10.1155/2013/632927
- Alharbi, N. S., Khaled, J. M., Kadaikunnan, S., Alobaidi, A. S., Sharafaddin, A. H., Alyahya, S. A., ... Shehu, M. R. (2019). Prevalence of *Escherichia coli* strains resistance to antibiotics in wound infections and raw milk. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(7), 1557-1562.
- An, C., Ma, S., Shi, X., Xue, W., Liu, C., & Ding, H. (2020). Diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from *Chloranthus japonicus* Sieb in Qinling Mountains, China. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), 1-15.
- Bainbridge, P. (2013). Wound healing and the role of fibroblasts. *Journal of Wound Care*, 22(8), 407-412. doi:10.12968/jowc.2013.22.8.407
- Budovsky, A., Yarmolinsky, L., & Ben-Shabat, S. (2015). Effect of medicinal plants on wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 23(2), 171-183.
- Chaubey, P., Archana, Prakash, O., Rai, K., Kumar, R., & Pant, A. (2017). *in vitro* antioxidant activity and total phenolic content of rhizome extracts from *Acorus calamus* Linn. *Asian Journal of Chemistry*, 29(11), 2357-2360. doi:10.14233/ajchem.2017.20657
- Chong, K. K. L., Tay, W. H., Janela, B., Yong, A. M. H., Liew, T. H., Madden, L., ... Becker, D. L. (2017). *Enterococcus faecalis* modulates immune activation and slows healing during wound infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 216(12), 1644-1654.
- Comino-Sanz, I. M., López-Franco, M. D., Castro, B., & Pancorbo-Hidalgo, P. L. (2021). The role of antioxidants on wound healing: A review of the current evidence. *Journal of Clinical Medicine*, 10(16), 1-22.
- Darby, I. A., Laverdet, B., Bonté, F., & Desmoulière, A. (2014). Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 2014(7), 301-311. doi:10.2147/ccid.s50046
- Del Giudice, P. (2020). Skin infections caused by *Staphylococcus aureus*. *Acta Dermato-Venereologica*, 100(9), 208-215.
- Do, B. H., Dang, C. Q., Bui, C. X., Nguyen, D. T., Do, D. T., Pham, H. V., ... Tran, T. (2006). *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam - Tập 2 [Medical herbs and animals - Vol 2]*. Hà Nội, Việt Nam: Science and Technics Publishing House.
- Do, D. Q., Angkawijaya, A. E., Nguyen, L. P. T., Huynh, H. L., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S., & Ju, Y.-H. (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22(3), 296-302. doi:10.1016/j.jfda.2013.11.001

- Do, O. T., Pham, K. T., Nguyen, T. T., & Pham, A. T. V. (2015). Nghiên cứu tác dụng chống viêm cấp và mạn tính của sỏi Nhật trên thực nghiệm [Evaluating the inhibitory effects of *Chloranthus japonicus* Sieb. on accute and chronic inflammation]. *Tạp chí Dược học*, 55(1), 32-35.
- Facts and Factors Research. (2023). *Active wound care market size* (Share global analysis report 2023 - 2030). Truy cập ngày 10/10/2023 tại <https://www.fnfresearch.com/active-wound-care-market>
- Fitzmaurice, S., Sivamani, R., & Isseroff, R. (2011). Antioxidant therapies for wound healing: A clinical guide to currently commercially available products. *Skin Pharmacology and Physiology*, 24(3), 113-126.
- Fraga, C. G., Martino, V. S., Ferraro, G. E., Coussio, J. D., & Boveris, A. (1987). Flavonoids as antioxidants evaluated by in vitro and in situ liver chemiluminescence. *Biochemical Pharmacology*, 36(5), 717-720.
- Fronza, M., Heinzmann, B., Hamburger, M., Laufer, S., & Merfort, I. (2009). Determination of the wound healing effect of Calendula extracts using the scratch assay with 3T3 fibroblasts. *Journal of Ethnopharmacology*, 126(3), 463-467. doi:10.1016/j.jep.2009.09.014
- Ghosh, P. K., & Gaba, A. (2013). Phyto-extracts in wound healing. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 16(5), 760-820.
- Hadagali, M. D., & Chua, L. S. (2014). The anti-inflammatory and wound healing properties of honey. *European Food Research and Technology*, 239(6), 1003-1014. doi:10.1007/s00217-014-2297-6
- Hajhashemi, V., Ghannadi, A., & Heidari, A. H. (2012). Anti-inflammatory and wound healing activities of *Aloe littoralis* in rats. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 7(2), 73-78.
- Heo, S.-J., Yoon, W.-J., Kim, K.-N., Ahn, G.-N., Kang, S.-M., Kang, D.-H., ... Jeon, Y.-J. (2010). Evaluation of anti-inflammatory effect of fucoxanthin isolated from brown algae in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Food and Chemical Toxicology*, 48(8/9), 2045-2051.
- Heras, K. L., Igartua, M., Santos-Vizcaino, E., & Hernandez, R. M. (2020). Chronic wounds: Current status, available strategies and emerging therapeutic solutions. *Journal of Controlled Release*, 328, 532-550.
- Joshi, S. C., & Mathela, C. S. (2012). Antioxidant and antibacterial activities of the leaf essential oil and its constituents furanodienone and curzerenone from *Lindera pulcherrima* (Nees.) Benth. ex hook. f. *Pharmacognosy Research*, 4(2), 80-84. doi:10.4103/0974-8490.94721
- Joyce, K. H., & Basil, M. H. (2013). The principles of wound healing. *Expert Review of Dermatology*, 8(6), 639-658.
- Kayser, O., & Kolodziej, H. (1997). Antibacterial activity of extracts and constituents of *Pelargonium sidoides* and *Pelargonium reniforme*. *Planta Medica*, 63(6), 508-510.
- Kim, H.-J., Jang, S. I., Kim, Y.-J., Chung, H.-T., Yun, Y.-G., Kang, T.-H., ... Kim, Y.-C. (2004). Scopoletin suppresses pro-inflammatory cytokines and PGE2 from LPS-stimulated cell line, RAW 264.7 cells. *Fitoterapia*, 75(3), 261-266. doi:10.1016/j.fitote.2003.12.021
- Lee, G.-Y., Park, K.-G., Namgoong, S., Han, S.-K., Jeong, S.-H., Dhong, E.-S., & Kim, W.-K. (2016). Effects of *Panax ginseng* extract on human dermal fibroblast proliferation and collagen synthesis. *International Wound Journal*, 13(S1), 42-46. doi:10.1111/iwj.12530

- Makabe, H., Maru, N., Kuwabara, A., Kamo, T., & Hirota, M. (2006). Anti-inflammatory sesquiterpenes from *Curcuma zedoaria*. *Natural Product Research*, 20(7), 680-685. doi:10.1080/14786410500462900
- Mogana, R., Teng-Jin, K., & Wiart, C. (2013). Anti-inflammatory, anticholinesterase, and antioxidant potential of scopoletin isolated from *Canarium patentinervium* Miq.(Burseraceae Kunth). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013(734824), 1-7. doi:10.1155/2013/734824
- Muzolf-Panek, M., & Stuper-Szablewska, K. (2021). Comprehensive study on the antioxidant capacity and phenolic profiles of black seed and other spices and herbs: Effect of solvent and time of extraction. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(5), 4561-4574.
- Nguyen, N. T. H., Truong, N. T. B., Nguyen, T. T. M., Tran, T. L., & Dang, T. T. P. (2020). Optimization and application of MTT assay in determining density of suspension cells. *Analytical Biochemistry*, 610, 1-11. doi:10.1016/j.ab.2020.113937
- Phongpaichit, S., Nikom, J., Rungjindamai, N., Sakayaroj, J., Hutadilok-Towatana, N., Rukachaisirikul, V., & Kirtikara, K. (2007). Biological activities of extracts from endophytic fungi isolated from *Garcinia* plants. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 51(3), 517-525.
- Pierce, G. F., Tarpley, J. E., Yanagihara, D., Mustoe, T. A., Fox, G. M., & Thomason, A. (1992). Platelet-derived growth factor (BB homodimer), transforming growth factor-beta 1, and basic fibroblast growth factor in dermal wound healing. Neovessel and matrix formation and cessation of repair. *American Journal of Pathology*, 140(6), 1375-1388.
- Raizman, R., Little, W., & Smith, A. C. (2021). Rapid diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa* in wounds with point-of-care fluorescence imaging. *Diagnostics*, 11(2), 1-13.
- Rohl, J., Zaharia, A., Rudolph, M., & Murray, R. (2015). The role of inflammation in cutaneous repair. *Wound Practice & Research*, 23(1), 8-15.
- Shah, A., & Amini-Nik, S. (2017). The role of phytochemicals in the inflammatory phase of wound healing. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(5), 1-17.
- Sharma, S., Ali, A., Ali, J., Sahni, J. K., & Baboota, S. (2013). Rutin: therapeutic potential and recent advances in drug delivery. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 22(8), 1063-1079.
- Tiêu chuẩn Việt Nam. (2013). *TCVN 9745-1:2013 về Chè - Xác định các chất đặc trưng của chè xanh và chè đen - phần 1: Hàm lượng polyphenol tổng số trong chè - Phương pháp đo màu dùng thuốc thử folin-ciocalteu* [TCVN 9745-1:2013 about Determination of substances characteristic of green and black tea - Part 1: content of total polyphenols in tea - Colorimetric method using Folin-Ciocalteu reagent]. Truy cập ngày 10/10/2023 tại <https://caselaw.vn/van-ban-phap-luat/250853-tieu-chuan-quoc-gia-tcvn-9745-1-2013-iso-14502-1-2005-dinh-chinh-ky-thuat-1-2006-ve-che-xac-dinh-cac-chat-dac-trung-cua-che-xanh-va-che-den-phan-1-ham-luong-polyphenol-tong-so-trong-che-phuong-phap-do-mau-dung-thuoc-thu-folin-ciocalteu-nam-2013>
- Turabelidze, A., & Dipietro, L. A. (2012). Inflammation and wound healing. *Endodontic Topics*, 24(1), 26-38. doi:10.1111/etp.12012

- Wessels, Q., Pretorius, E., Smith, C. M., & Nel, H. (2014). The potential of a niacinamide dominated cosmeceutical formulation on fibroblast activity and wound healing in vitro. *International Wound Journal*, 11(2), 152-158. doi:10.1111/j.1742-481X.2012.01052.x
- Wojdyło, A., Oszmiański, J., & Czemerys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 105(3), 940-949. doi:10.1016/j.foodchem.2007.04.038
- Xu, H.-T., Liao, H.-Z., Zou, M.-J., Zhao, Y.-Z., Lei, F.-H., Huang, Q., ... Fan, J. (2020). Bioactive compounds: Antioxidant, antibacterial and antiproliferative activities in *Chloranthus henryi*. *Science of Advanced Materials*, 12(1), 144-151.
- Yakaew, S., Itsarasook, K., Ngoenkam, J., Jessadayannamaetha, A., Viyoch, J., & Ungsurungsie, M. (2016). Ethanol extract of *Terminalia chebula* fruit protects against UVB-induced skin damage. *Pharmaceutical Biology*, 54(11), 2701-2707.
- Yip, H. Y., Poh, M. S. W., & Chia, Y. Y. (2016). The effects of glycyrrhizic acid and glabridin in the regulation of CXCL5 inflammation gene on acceleration of wound healing. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(2), 108-113. doi:10.1016/j.apjtb.2015.10.009
- Zemry, I. H., Hasan, N. A., Hasbullah, N. I., Nawahwi, M. Z., Azzeme, A. M., Siti Noor, D. A., & Ariffin, S. (2023). Antioxidant potential of *Chloranthus erectus* (Chloranthaceae) from various solvents extract. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 11(1), 75-80. doi:10.18006/2023.11(1).75.80

