

Nghiên cứu hoạt tính làm lành vết thương và kháng viêm của Lan Gấm (*Anoectochilus formosanus* Hayata) nuôi cấy mô

Nguyễn Thị Khoa¹, Nguyễn Thị Phương¹, Phan Ngọc Hân¹, Ngô Hoàng Long¹, Đỗ Đức Thăng², Đỗ Đăng Giáp²

¹Viện Kỹ thuật Công nghệ cao, Đại học Nguyễn Tất Thành

²Viện Sinh học Nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
ntkhoa105@gmail.com, khoant@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Lan Gấm (*Anoectochilus formosanus* Hayata) đã được chứng minh là loại dược liệu quý, có tác dụng kích thích hệ miễn dịch, chống tăng đường huyết và bảo vệ gan. Rất nhiều nghiên cứu đã sử dụng các cao chiết khác nhau để đánh giá hoạt tính sinh học của Lan Gấm. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá *in vitro* hoạt tính làm lành vết thương của cao chiết chứa polysaccharide (AWE) và hoạt tính kháng viêm của cao chiết ethanol (AEE) từ Lan Gấm nuôi cấy mô tại Việt Nam. Kết quả cho thấy AWE ở nồng độ 100 µg/mL thể hiện hoạt tính làm lành vết thương sau 16 giờ xử lý trên mô hình nguyên bào sợi (fibroblast). Trong khi đó, AEE thể hiện khả năng kháng viêm trong thử nghiệm sản sinh NO trên tế bào RAW 264.7. Những hoạt tính *in vitro* của Lan Gấm thu được trong nghiên cứu sẽ tạo tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo trên mô hình *in vivo*.

Nhận 07.08.2021
Được duyệt 28.10.2021
Công bố 06.04.2022

Từ khóa

Anoectochilus formosanus, kháng viêm, Lan Gấm, làm lành vết thương

© 2022 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Đặt vấn đề

Polysaccharide hiện nay đã trở thành một phần quan trọng trong nghiên cứu phát triển các loại thuốc tự nhiên và sản phẩm chăm sóc sức khỏe [1-7]. Cho đến nay, các polysaccharide tách chiết từ thực vật đã được chứng minh có các hoạt tính sinh học đáng chú ý như làm lành vết thương [8,9], tăng cường miễn dịch và kháng viêm cao như beta glucans [10], pectin [11] và galactomannan [12]. Bên cạnh đó, polysaccharide từ thực vật cũng thể hiện hoạt tính kháng ung thư bằng cách thúc đẩy quá trình trưởng thành, biệt hóa và sinh sản của ba loại tế bào miễn dịch (tế bào lympho, đại thực bào và tế bào giết tự nhiên). Polysaccharide còn kích hoạt bổ thể và hệ thống nội mô trên lưới nội chất, thúc đẩy tạo ra nhiều loại cytokine miễn dịch [13]. Nhờ đó, hệ thống miễn dịch được tăng cường để chống lại tế bào ung thư [14].

Thành phần polysaccharide từ Lan Gấm hay Lan Kim Tuyên *A. formosanus*, cây "Quốc bảo" tại Đài Loan, có tác dụng kích thích sự tăng trưởng của các vi sinh vật có lợi (prebiotics) [4] và chống đái tháo đường [2]. Ngoài polysaccharide, loài dược liệu quý này còn có những hoạt chất khác có khả năng bảo vệ gan, giảm lượng đường trong máu [15] và khả năng kháng oxy hóa [3]. Các hoạt chất trong cao chiết và cao phân đoạn từ *A. formosanus* đã được xác định trong nghiên cứu của Wang và cộng sự (2002) [3].

Hoạt tính làm lành vết thương của polysaccharide tách chiết từ thực vật đã được báo cáo trong các nghiên cứu trước đây [7]. Trong đó, phân đoạn polysaccharide tách chiết từ *Periplaneta americana* được đưa lên vật liệu sinh học làm thúc đẩy quá trình đóng miệng vết thương, hình thành mạch máu trên mô hình chuột tiểu đường [16]. Trong một nghiên cứu của



Zhang và cộng sự, polysaccharides được thu nhận từ *Bletilla striata*, hỗ trợ quá trình tăng sinh và di chuyển của các tế bào L929 trong quá trình chữa lành vết thương [17]. Ngoài ra, polysaccharide tách chiết từ một họ hàng gần của *A. formosanus* là *A. roxburghii* (Wall.) Lindl đã thể hiện hoạt tính bảo vệ mạch máu trên mô hình chuột bị tiểu đường bằng cách ức chế các chất oxy hóa và các phân tử gây viêm điều chỉnh cân bằng MMPs/TIMPs để duy trì cân bằng nội môi của cấu trúc mạch máu [18]. Các quá trình này đã được chứng minh giúp đẩy nhanh quá trình phục hồi tổn thương [19]. Vì vậy, tiềm năng làm lành vết thương của polysaccharide tách chiết từ Lan Gấm cần được đánh giá.

Tác dụng kháng viêm của Lan Gấm đã được báo cáo từ sớm trong các nghiên cứu trước đây. Tuy nhiên các nghiên cứu này tập trung vào việc chứng minh vai trò kháng viêm của kinsenoside, một hợp chất quan trọng trong họ Lan Gấm [1,6,7,20, 21]. Ngoài ra, các nghiên cứu này được thực hiện trên đối tượng Lan Gấm thu nhận từ tự nhiên. Trong khi đó, tác dụng kháng viêm đã được báo cáo nhờ nhiều hợp chất tách chiết từ tự nhiên như polyphenols, flavonoid, terpenoid [22-24]. Vì vậy, chúng tôi đánh giá tác động kháng viêm tổng hợp của các hợp chất có hoạt tính sinh học có trong cao chiết cồn của Lan Gấm nuôi cấy mô.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi xác định hoạt tính làm lành vết thương trên nguyên bào sợi (fibroblast) của cao chiết chứa polysaccharide và hoạt tính kháng viêm trên tế bào RAW 264.7 của cao chiết ethanol từ *A. formosanus* Hayata nuôi cấy mô tại Việt Nam. Kết quả của nghiên cứu sẽ giúp đánh giá hoạt tính sinh học của Lan Gấm nuôi cấy mô tại Việt Nam, đồng thời mở đầu cho các nghiên cứu sâu hơn trên mô hình *in vivo* về cơ chế làm lành vết thương của polysaccharide ở Lan Gấm.

2 Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1 Vật liệu nghiên cứu

Lan Gấm *Anoectochilus formosanus* Hayata nuôi cấy mô được cung cấp bởi Viện Sinh học Nhiệt đới - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Nguyên bào sợi người (fibroblast) và tế bào RAW 264.7 được cung cấp bởi phòng thí nghiệm Kỹ nghệ mô và Vật liệu Y sinh, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – Đại học Quốc gia Tp. HCM.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Tách chiết AEE và AWE từ bột cây Lan Gấm

Mẫu cây Lan Gấm sau khi thu nhận từ quá trình nuôi cấy mô được rửa sạch, làm ráo nước và trữ ở nhiệt độ -80°C trong 24 giờ. Lan Gấm sau đó được sấy khô ở 50°C (tủ sấy Memmert) trong 48 giờ và xay thành bột. Bột Lan Gấm được ngâm, lắc với ethanol tuyệt đối trong 48 giờ để thu nhận phân đoạn tan trong ethanol. Phần tan trong ethanol được cô quay tạo cao chiết ethanol từ *A. formosanus* (AEE). AEE sau đó được định tính thành phần hóa học thuộc nhóm hợp chất polyphenol [25], flavonoid [26] và terpenoid [27].

Phần không tan trong ethanol được thu nhận và làm khô tự nhiên. Phân đoạn giàu polysaccharide được tách chiết bằng cách ngâm phần bột không tan trong nước ở 50°C trong 6 giờ (lặp lại bước này 2 lần). Phần dung dịch được ly tâm ở 6 000 vòng/phút trong 15 phút để thu nhận phần tan. Dịch chiết được loại bỏ bớt nước bằng phương pháp cô quay cho đến khi được phần cao đặc sánh. Cao chiết được rửa bằng ethanol (nồng độ cuối cùng là 85 %) ở 4°C trong 3 giờ và li tâm ở 6 000 vòng/phút trong 15 phút và thu nhận phần kết tủa. Phần kết tủa được rửa bằng ethanol tuyệt đối và acetone, sau đó được làm khô tự nhiên. Phần kết tủa khô được hòa tan trong nước và loại bỏ protein bằng CaCl_2 (nồng độ cuối cùng là 5 % khối lượng/thể tích). Sau khi ly tâm loại bỏ protein, các bước rửa polysaccharide bằng ethanol, ly tâm thu phần kết tủa, rửa kết tủa bằng ethanol tuyệt đối và acetone, làm khô tự nhiên phần kết tủa được lặp lại như trên. Phần kết tủa thu được gọi là cao chiết chứa polysaccharide từ *A. formosanus* (AWE). AWE sau đó được hòa tan trong nước để đạt nồng độ 10 mg/mL.

2.2.2 Xác định thành phần đường đơn của AWE

Thành phần đường của AWE được xác định bằng phương pháp sắc kí trao đổi anion hiệu năng cao với đầu dò PAD (HPAEC-PAD). Polysaccharide trong dịch chiết từ Lan Gấm được thủy phân trong dung môi trifluoroacetic acid (TFA, Sigma Aldrich, Mỹ) nồng độ 4 M ở 70°C trong 40 giờ và trung hòa phản ứng bằng NaOH 4 M. Hỗn hợp sau phản ứng được pha loãng trong nước cất loại bỏ ion (dung dịch H_2O) và li tâm ở 16 000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C . Phần huyền phù tiếp theo được hòa tan trong nước và phân tích bằng hệ HPAEC-PAD Dionex™ ICS 3000 được trang bị điện cực vàng dùng một lần, cột sắc kí (3,0 × 150)

mm CarboPac PA 20 (Dionex), kèm theo cột bảo vệ (3,0 × 30) mm CarboPac PA20 (Dionex). Dữ liệu được ghi và xử lý bằng phần mềm Chromeleon ver 6.8.

Các pha động bao gồm: H₂O (A) và NaOH (B) (Sigma Aldrich, Mỹ) nồng độ 0,25 M. NaOH dùng trong phân tích có độ tinh khiết điện hóa và được hòa tan trong nước khử ion (độ dẫn điện 18,2 MOhm/cm). Các chất chuẩn đường đơn bao gồm glucose, sorbitol, arabinose, galactose, xylose, fructose và rhamnose sử dụng trong thí nghiệm được mua từ hãng Sigma Aldrich. Thể tích mẫu nạp cột là 25 µL. Mẫu được phân tích tại nhiệt độ 30 °C, đẳng dòng với tốc độ 0,4 mL/min theo chương trình sắc kí bao gồm các bước: bước 1: isocratic, 96 % A và 4 % B trong 30 phút; bước 2: isocratic, 100 % B trong 10 phút; bước 3: isocratic, 96 % A và 4 % B trong 10 phút.

2.2.3 Hoạt tính kháng viêm

2.2.3.1 Khả năng gây độc tế bào RAW 264.7 của AEE
Khả năng gây độc tế bào RAW 264.7 của AEE được thực hiện tương tự như thử nghiệm MTT ở nghiên cứu trước [28] với một số thay đổi. Cụ thể, AEE ban đầu được pha trong DMSO đến nồng độ 20 mg/mL và trữ ở -20 °C cho đến khi sử dụng. Nồng độ sử dụng trong thí nghiệm của mẫu thử nghiệm AEE và đối chứng dương doxorubibin (DOX, Kabi, Ấn Độ) là (0; 3,125; 6,25; 12,5; 25 và 50) µg/mL. Thời gian xử lý tế bào với chất thử nghiệm là 48 giờ.

2.2.3.2 Thử nghiệm NO

Hoạt tính kháng viêm được xác định dựa trên khả năng của các chất chiết xuất chống lại sự sản sinh nitric oxide (NO). Tế bào RAW 264.7 (5×10^4 tế bào) được cấy vào từng giếng của đĩa 96 giếng, ủ ở 37 °C và 5 % CO₂ trong 24 giờ. Sau đó, các tế bào được xử lý với 1 µg/mL lipopolysaccharide (LPS) và AEE ở nồng độ 12,5 µg/mL hoặc 25 µg/mL trong 24 giờ. Đối chứng là mẫu tế bào được xử lý với 1 µg/mL lipopolysaccharide (LPS) và DMSO với thể tích tương đương với thể tích AEE bổ sung trong 24 giờ (mẫu không được xử lý với AEE). 50 µL phần dịch nổi trong mỗi giếng được hút sang đĩa 96 giếng khác. Tiếp đó, 50 µL thuốc thử Griess Reagent (Sigma Aldrich) được thêm vào mỗi giếng và ủ trong 15 phút. Hàm lượng NO tạo ra được xác định ở bước sóng A_{540nm} với NaNO₂ làm chất chuẩn.

2.2.4 Hoạt tính làm lành vết thương *in vitro*

Nuôi cấy tế bào. Nguyên bào sợi (Fibroblast) được nuôi trong môi trường Dulbecco's Modified

Eagle *Medium* (DMEM) có bổ sung 10 % huyết thanh thai bò (FBS), 100 µg/mL kháng sinh penicillin/streptomycin, ủ ở 37 °C với 5 % CO₂. Fibroblast sau khi đạt mật độ bám trải đến 80 % thì được tách ra khỏi bề mặt nuôi cấy bằng dung dịch 0,25 % trypsin- EDTA. Pha loãng fibroblast sau khi tách đến mật độ 5×10^5 tế bào/mL trong môi trường nuôi cấy.

Tạo và làm lành vết thương. Nguyên bào sợi (fibroblast) được nuôi trong đĩa 24 giếng tại mật độ ban đầu là 5×10^5 tế bào/mL ở 37 °C và 5 % CO₂. Sau 24 giờ, môi trường cũ được thay bằng môi trường chỉ chứa 1 % FBS trong 6 giờ. Tổn thương được tạo ra bằng tip 10 µL (Eppendorf, Mỹ) với các đường cắt dài, giúp loại bỏ các tế bào bám theo diện tích bề mặt của đầu tip 10 µL. Môi trường cũ sau đó được thay thế bằng môi trường chứa 1% FBS và 100 µg/mL AWE. Đối chứng là mẫu có tế bào trong môi trường nuôi chứa 1% FBS và nước với thể tích tương đương với thể tích AWE bổ sung (mẫu không xử lý với AWE). Hình ảnh vết thương được ghi nhận sau (0, 8, và 16) giờ. Diện tích vết thương được tính toán bằng phần mềm ImageJ. Tỷ lệ làm lành vết thương sau 8 giờ và 16 giờ được tính theo công thức: tỷ lệ làm lành vết thương (%) = $100 \% \times (S_0 - S_t) / S_0$, trong đó S_t là diện tích vết thương tại 8 giờ hoặc 16 giờ, S₀ là diện tích vết thương tại 0 giờ.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Định tính thành phần hóa học của AEE

Kết quả định tính thành phần hóa học của AEE bằng các phản ứng màu cho thấy AEE chứa các hợp chất thuộc nhóm polyphenol, flavonoid và terpenoid. Các nhóm hóa học này đều có thể mang hoạt tính sinh học quan trọng ở thực vật như gây độc tế bào [28-30], kháng vi sinh [31-33], kháng viêm [22-24] và chống đái tháo đường [34,35]. Kết quả này tương tự như kết quả đã được báo cáo trong nghiên cứu trước đó về thành phần hóa học của *Lan Gấm A. formosanus* [36]. Trong nghiên cứu của Nguyễn và cộng sự [36], *Lan Gấm A. formosanus* được chứng minh là đều chứa các thành phần hóa học thuộc nhóm flavonoid và terpenoid dù được nuôi trồng ở môi trường khác nhau. Vì các hợp chất có hoạt tính sinh học được phát hiện trong AEE, chúng tôi mong đợi AEE sẽ thể hiện khả năng kháng viêm.



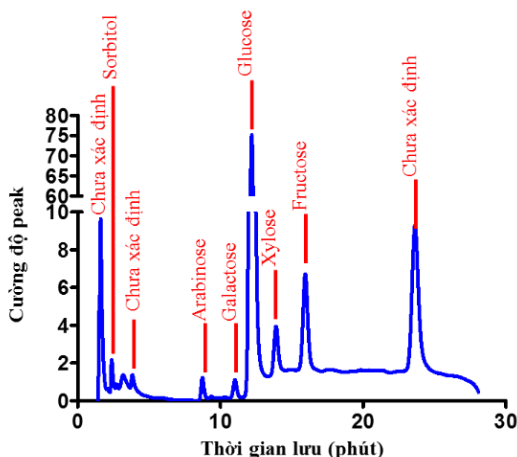
Bảng 1 Thành phần hóa học của AEE

Nhóm hợp chất	Phản ứng	Định tính
Polyphenol	Muối FeCl ₃	+
Flavonoid	Kim loại kẽm và dung dịch HCl	+
Terpenoid	Salkowski	+

3.2 Thành phần đường đơn của AWE

Kết quả phân tích đường đơn bằng phương pháp HPAEC-PAD cho thấy AWE chứa ít nhất 6 loại đường đơn là glucose, xylose, fructose, arabinose, sorbitol và galactose. Ngoài ra, còn có 3 loại đường chưa được xác định trong AWE (Hình 1). Dựa vào diện tích của các peak sắc ký, trong số các đường đơn đã được xác định, glucose chiếm tỉ lệ lớn nhất còn arabinose và galactose chiếm tỉ lệ nhỏ nhất.

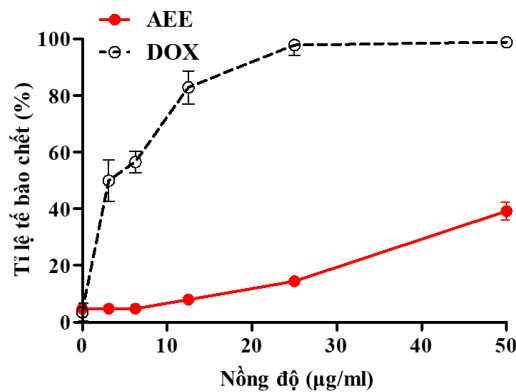
Polysaccharide tách chiết từ *A. formosanus* có thành phần đường đơn gần giống với polysaccharide tách chiết từ loài lân cận *Anectochilus roxburghii* [37]. Trong thành phần polysaccharide của cả hai loài, glucose là loại đường đơn chiếm ưu thế. Tương tự như polysaccharide của *A. formosanus*, polysaccharide của *A. roxburghii* cũng thể hiện nhiều hoạt tính sinh học đáng lưu ý như hoạt tính kháng oxy hóa [38], bảo vệ gan [37], chống tiểu đường type 2 [2,39] và chống viêm khớp [40]. Điều này cho thấy tiềm năng ứng dụng rất lớn của polysaccharide tách chiết từ hai loài lan này trong các liệu pháp điều trị bệnh gan, tiểu đường và viêm khớp.



Hình 1 Thành phần các loại đường trong AWE của Lan Gấm *A. formosanus* được xác định bằng phân tích HPAEC-PAD. Đường được định danh dựa vào việc so sánh thời gian lưu của peak so với peak đường chuẩn. Đường được định lượng dựa trên diện tích peak. Sắc ký đồ HPAEC-PAD được thực hiện trên phần mềm GraphPad Prism v6.0.

3.3 Hoạt tính kháng viêm của AEE

Để xác định hoạt tính kháng viêm của AEE trên dòng tế bào RAW 264.7, trước hết chúng tôi xác định nồng độ AEE có thể sử dụng mà không ảnh hưởng tới sức sống của tế bào này. Kết quả phân tích cho thấy AEE gây độc 40 % tế bào RAW 264.7 ở nồng độ 50 µg/mL (Hình 2). Từ nồng độ 25 µg/mL trở xuống, khả năng gây độc tế bào RAW 264.7 của AEE rất thấp, trong đó tỉ lệ tế bào chết là 13 % ở nồng độ 25 µg/mL AEE. Dựa vào kết quả phân tích, chúng tôi sử dụng AEE ở nồng độ 25 µg/mL và 12,5 µg/mL để thực hiện phản ứng kháng viêm trên dòng tế bào RAW 264.7.

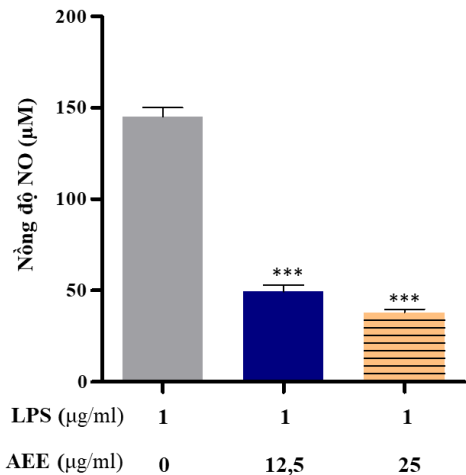


Hình 2 Ảnh hưởng gây độc tế bào RAW 264.7 của AEE. Doxorubicin (DOX) là đối chứng dương được sử dụng trong thí nghiệm. Số liệu được biểu diễn là trung bình cộng của 3 lần lặp lại và độ lệch chuẩn (SD).

Khả năng kháng viêm của AEE được phân tích dựa trên sự ức chế lượng NO sinh ra do tế bào RAW 264.7 bị viêm khi được xử lí bằng lipopolysaccharide (LPS). Tại nồng độ AEE 12,5 µg/mL, nồng độ NO tạo ra giảm đáng kể so với đối chứng không sử dụng AEE. Tương tự, ở nồng độ 25 µg/mL, AEE cũng thể hiện hoạt tính kháng viêm khi làm giảm mức độ NO tạo ra so với đối chứng (Hình 3). Kết quả này cho thấy AEE có khả năng kháng viêm trên mô hình *in vitro*. Trong nghiên cứu này, chúng tôi không đề cập đến hiệu quả của AEE trên biểu hiện của các gene liên quan đến quá trình viêm, tuy nhiên, nghiên cứu của Hsiao và cộng sự (2011) [7] chỉ rõ kinsenoside tách chiết từ Lan Gấm tác động lên quá trình gây viêm thông qua việc làm giảm biểu hiện các gene điều hòa quá trình kháng viêm như nitric oxide (NO), tumor necrosis factor α (TNF-α), interleukin-1β (IL-1β), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) và nhân tố ức chế di chuyển đại thực bào (macrophage migration inhibitory factor - MIF), đồng thời làm tăng

biểu hiện của các gene kháng viêm như IL-10 và các yếu tố phiên mã.

Tương tự như tác động của kinsenoside, các hợp chất thuộc nhóm terpenoid và polyphenols cũng có tác dụng kháng viêm thông qua quá trình làm giảm biểu hiện của các gene điều hòa quá trình kháng viêm và tăng biểu hiện một số gene kháng viêm [23,41].



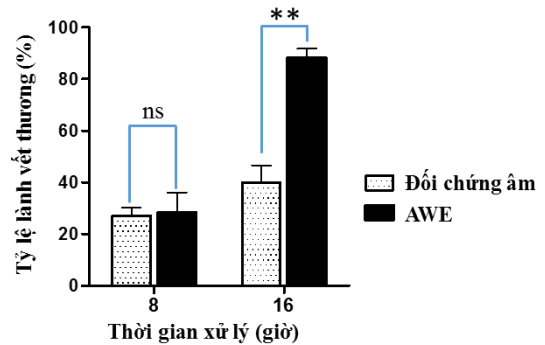
Hình 3 Hoạt tính kháng viêm của AEE trên mô hình tế bào RAW 264.7. Kiểm định t-test so sánh mẫu được xử lý với AEE ở nồng độ 12,5 µg/mL và 25 µg/mL với mẫu không được xử lý với AEE (mẫu đối chứng). ***: khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,005$).

3.4. Hoạt tính làm lành vết thương của AWE

Để nghiên cứu khả năng làm lành vết thương của AWE, chúng tôi thực hiện mô hình tổn thương *in vitro* trên fibroblast ở người. Kết quả so sánh cho thấy vùng vết thương sau 8 giờ ở mẫu được xử lý với AWE ở nồng độ 100 µg/mL không khác biệt đáng kể so với mẫu không được xử lý với AWE (mẫu đối chứng). Tuy nhiên, vùng vết thương được cải thiện mạnh trên mẫu được xử lý với AWE sau 16 giờ. AWE có khả năng phục hồi vết thương cao hơn đối chứng khoảng 2,24 lần sau 16 giờ (Hình 4).

Tác dụng làm lành vết thương của AWE có thể do hoạt tính của các polysaccharide trong Lan Gấm giúp tăng sinh và di chuyển của tế bào, đồng thời tăng

cường quá trình kháng viêm, dẫn đến đẩy nhanh quá trình phục hồi tổn thương [17,19]. Kết quả này sẽ tạo tiền đề cho các nghiên cứu sâu hơn về cơ chế của polysaccharide từ Lan Gấm *A. formosanus* trong hoạt động làm lành vết thương.



Hình 4 Khả năng làm lành vết thương của AWE trên mô hình fibroblast sau 8 giờ và 16 giờ. Kiểm định t-test so sánh mẫu được xử lý với AWE ở nồng độ 100 µg/mL với mẫu không được xử lý với AWE (mẫu đối chứng). ns: khác biệt không có ý nghĩa thống kê (not significance), **: khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,005$).

4. Kết luận và kiến nghị

Chúng tôi đã tách chiết thành công cao chiết ethanol (AEE) và cao chiết chứa polysaccharide (AWE) từ Lan Gấm *A. formosanus* Hayata nuôi cấy mô tại Việt Nam. AEE chứa các nhóm chức hóa học mang hoạt tính sinh học như polyphenol, flavonoid và terpenoid. AWE có ít nhất 6 loại đường đơn bao gồm glucose, xylose, fructose, sorbitol, arabinose và galactose. AEE thể hiện các hoạt tính sinh học *in vitro* đáng lưu ý như khả năng kháng viêm trên tế bào RAW 264.7 và AWE có khả năng làm lành vết thương trên fibroblast. Khả năng làm lành vết thương là hoạt tính sinh học hoàn toàn mới của Lan Gấm và được coi là tiền đề cho các nghiên cứu làm lành vết thương trên mô hình *in vivo* sau này.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được tài trợ bởi Quỹ phát triển Khoa học và Công nghệ - Đại học Nguyễn Tất Thành, mã đề tài 2021.01.36/HĐ-KHCN.

Tài liệu tham khảo

- 1.Hsiao, H.-B., et al., (2011). *Kinsenoside isolated from Anoectochilus formosanus suppresses LPS-stimulated inflammatory reactions in macrophages and endotoxin shock in mice*. Shock. 35(2): p. 184-190.
- 2.Tang, T., et al., (2018) *Antidiabetic activities of polysaccharides from Anoectochilus roxburghii and Anoectochilus formosanus in STZ-induced diabetic mice*. International Journal of Biological Macromolecules. 112: p. 882-888.
- 3.Wang, S.-Y., et al., (2002). *Profiling and characterization antioxidant activities in Anoectochilus formosanus Hayata*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50(7): p. 1859-1865.
- 4.Yang, L.-C., W.-C. Lin, and T.-J. Lu, (2012). *Characterization and prebiotic activity of aqueous extract and indigestible polysaccharide from Anoectochilus formosanus*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 60(35): p. 8590-8599.
- 5.Yang, L.C., T.J. Lu, and W.C. Lin (2013). *A type II arabinogalactan from Anoectochilus formosanus for G-CSF production in macrophages and leukopenia improvement in CT26-bearing mice treated with 5-fluorouracil*. Evid Based Complement Alternat Med. 2013: p. 1-13.
- 6.Qi, C.-x., et al., (2018). *Kinsenoside: a promising bioactive compound from Anoectochilus species*. Current Medical Science. 38(1): p. 11-18.
- 7.Cherng, J.-H. (2018). *The strategies of natural polysaccharide in wound healing, in Wound Healing-Current Perspectives*. IntechOpen Burlington, MA, USA.
- 8.Dourado, F., et al., (2004). *Purification, structure and immunobiological activity of an arabinan-rich pectic polysaccharide from the cell walls of Prunus dulcis seeds*. Carbohydrate Research. 339(15): p. 2555-2566.
- 9.Chan, Y., et al., (2007). *Immunomodulatory effects of Agaricus blazei Murill in Balb/cByJ mice*. Journal of Microbiology Immunology and Infection. 40(3): p. 201.
10. Vetvicka, V., et al., (2008). *Immunological effects of yeast-and mushroom-derived β -glucans*. Journal of Medicinal Food. 11(4): p. 615-622.
11. Lim, B.O., et al., (2003). *Effect of dietary pectin on the production of immunoglobulins and cytokines by mesenteric lymph node lymphocytes in mouse colitis induced with dextran sulfate sodium*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 67(8): p. 1706-1712.
12. Santander, S., et al., (2011). *Galactomannan from Caesalpinia spinosa induces phenotypic and functional maturation of human dendritic cells*. International Immunopharmacology. 11(6): p. 652-660.
13. Kanekiyo, K., et al., (2007). *Anti-herpes simplex virus target of an acidic polysaccharide, nostoflan, from the edible blue-green alga Nostoc flagelliforme*. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 30(8): p. 1573-1575.
14. Rout, D., et al., (2005). *Chemical analysis of a new (1 \rightarrow 3)-, (1 \rightarrow 6)-branched glucan from an edible mushroom, Pleurotus florida*. Carbohydrate Research. 340(16): p. 2533-2539.
15. Zjawiony, J.K., (2004). *Biologically active compounds from Aphyllophorales (polypore) fungi*. Journal of Natural Products. 67(2): p. 300-310.
16. Wang, T., et al., (2020). *A composite hydrogel loading natural polysaccharides derived from Periplaneta americana herbal residue for diabetic wound healing*. International Journal of Biological Macromolecules. 164: p. 3846-3857.
17. Zhang, C., et al., (2019). *Effect of polysaccharides from Bletilla striata on the healing of dermal wounds in mice*. Evid Based Complement Alternat Med. 2019: p. 1-10.
18. Liu, Z.-l., et al., (2017). *The vascular protective effects of Anoectochilus roxburghii polysaccharose under high glucose conditions*. Journal of Ethnopharmacology. 202: p. 192-199.
19. Rohini, J., E.M. Wan, and M. Rabeta, (2021). *Polysaccharides as wound healing agent: a mini review*. Food Research. 5(2): p. 31-37.
20. Lin, C.-C., P.-C. Huang, and J.-M. Lin, (2000). *Antioxidant and hepatoprotective effects of Anoectochilus formosanus and Gynostemma pentaphyllum*. The American Journal of Chinese Medicine. 28(01): p. 87-96.

21. Hsiao, H.-B., et al., (2016). *Kinsenoside inhibits the inflammatory mediator release in a type-II collagen induced arthritis mouse model by regulating the T cells responses*. BMC Complementary and Alternative Medicine. 16(1): p. 1-12.
22. Hussain, T., et al., (2016). *Oxidative stress and inflammation: what polyphenols can do for us?* Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2016.
23. Yahfoufi, N., et al., (2018). *The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols*. Nutrients. 10(11): p. 1618.
24. Gallily, R., Z. Yekhtin, and L.O. Hanuš, (2018). *The anti-inflammatory properties of terpenoids from cannabis*. Cannabis and Cannabinoid Research. 3(1): p. 282-290.
25. Wesp, E.F. and W.R. Brode, (1934). *The absorption spectra of ferric compounds. I. The ferric chloride—phenol reaction*. Journal of the American Chemical Society. 56(5): p. 1037-1042.
26. Chittasupho, C. and S. Athikomkulchai, (2018). *Nanoparticles of Combretum quadrangulare leaf extract induce cytotoxicity, apoptosis, cell cycle arrest and anti-migration in lung cancer cells*. Journal of Drug Delivery Science and Technology. 45(1): p. 378-387.
27. Das, B., et al., (2014). *Phytochemical screening and evaluation of analgesic activity of Oroxylum indicum*. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences. 76(6): p. 571.
28. Nguyen, H.H., et al., (2021). *Two new cycloartanes from the leaves of Combretum quadrangulare growing in Vietnam and their biological activities*. Arabian Journal of Chemistry. 14(7): p. 103189.
29. Mignet, N., et al., (2010). *Development of a liposomal formulation of the natural flavonoid fisetin*. International Journal of Pharmaceutics. 423(1): p. 69-76.
30. Jaiswal, J.V., P.A. Wadegaonkar, and S.W. Hajare, (2012). *The bioflavonoid galangin suppresses the growth of ehrlich ascites carcinoma in Swiss Albino mice: a molecular insight*. Applied Biochemistry and Biotechnology. 167(5): p. 1325-1339.
31. Othman, L., A. Sleiman, and R.M. Abdel-Massih, (20019). *Antimicrobial activity of polyphenols and alkaloids in middle eastern plants*. Frontiers in Microbiology. 10: p. 911.
32. Xie, Y., et al., (20015). *Antibacterial activities of flavonoids: structure-activity relationship and mechanism*. Current Medicinal Chemistry. 22(1): p. 132-149.
33. Yuan, G., et al., (2021). *Antibacterial activity and mechanism of plant flavonoids to gram-positive bacteria predicted from their lipophilicities*. Scientific reports. 11(1): p. 1-15.
34. Putta, S., et al., (2016). *Therapeutic potentials of triterpenes in diabetes and its associated complications*. Current Topics in Medicinal Chemistry. 16(23): p. 2532-2542.
35. Panigrahy, S.K., R. Bhatt, and A. Kumar, (2021). *Targeting type II diabetes with plant terpenes: the new and promising antidiabetic therapeutics*. Biologia. 76(1): p. 241-254.
36. Nguyen, H.C., et al., (2018). *Evaluation of changes in the growth and chemical constituents of Anoectochilus formosanus Hayata grown under hydroponic conditions*. BioTechnology. Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology. 99(4).
37. Yu, X., et al., (2021). *Hepatoprotective Effects of Polysaccharide from Anoectochilus roxburghii (Wall.) Lindl. on Rat Liver Injury Induced by CCl4*. Drug Design, Development and Therapy. 15: p. 2885.
38. Zeng, B., et al., (2016). *Antioxidant and hepatoprotective activities of polysaccharides from Anoectochilus roxburghii*. Carbohydrate Polymers. 153: p. 391-398.
39. Gao, H., et al., (2021). *Characterization of Anoectochilus roxburghii polysaccharide and its therapeutic effect on type 2 diabetic mice*. International Journal of Biological Macromolecules. 179: p. 259-269.
40. Guo, Y., et al., (2019). *Therapeutic effects of polysaccharides from Anoectochilus roxburghii on type II collagen-induced arthritis in rats*. International Journal of Biological Macromolecules. 122: p. 882-892.
41. Kim, T., et al., (2020). *Therapeutic potential of volatile terpenes and terpenoids from forests for inflammatory diseases*. International Journal of Molecular Sciences. 21(6): p. 2187.

Wound-healing and anti-inflammatory activities of *Anoectochilus formosanus* Hayata

Khoa Thi Nguyen¹, Thi-Phuong Nguyen¹, Han N. Phan¹, Thang Duc Do², Giap Dang Do², Long Hoang Ngo¹

¹ Hi-tech Institute, Nguyen Tat Thanh University,

² Institute of Tropical Biology, Vietnam Academy of Science and Technology (VAST),
ntkhoa105@gmail.com

Abstract *Anoectochilus formosanus* Hayata is proved to have remarkable pharmacological values such as immune enhancement, liver protection, anti-hyperglycemic and anti-inflammatory activities. A number of studies used various extracts to gain insights into the bioactivities of *A. formosanus*. Here, we evaluated the *in vitro* wound-healing activity of the polysaccharide-containing extract (AWE) and anti-inflammatory effect of the ethanol extract (AEE) of cultured *A. formosanus*. The AWE at the concentration of 100 µg/mL promoted wound recovery in human fibroblasts after 16 hours of treatment. Meanwhile, the AEE showed anti-inflammatory activity using RAW 264.7 cells model based on NO production assay. These results will be a premise for further *in vivo* studies.

Keywords *Anoectochilus formosanus*, anti-inflammatory, RAW 264.7, wound healing