



HOẠT TÍNH KHÁNG VIÊM TỪ CAO CHIẾT LÁ CÂY VÚ BÒ (*FICUS HIRTA* VAHL) THU HÁI TẠI HUYỆN YÊN SON, TỈNH TUYÊN QUANG

Trần Thị Giáng Hương^{a*}, Trần Đức Đại^a, Chu Quỳnh Mai^a

^aTrường Đại học Tân Trào

*Email: tranthi gianghuongtytq@gmail.com

Thông tin bài viết

Ngày nhận bài:

19/6/2020

Ngày duyệt đăng:

12/8/2020

Từ khóa:

Ficus hirta, Moraceae, điều trị, kháng viêm, IC₅₀.

Tóm tắt

Cây vú bò (*Ficus hirta* Vahl.) là một loại cây nhiệt đới được sử dụng rộng rãi trong y học cổ truyền Việt Nam và Trung Quốc có tác dụng hỗ trợ và điều trị nhiều bệnh lý như bệnh: Viêm thận, viêm gan, viêm vú, thấp khớp, ho Mục đích của nghiên cứu này là để chứng minh một cách khoa học khả năng chống viêm của các cao chiết lá cây vú bò. Hoạt tính kháng viêm của các cao chiết cây vú bò được đánh giá thông qua khả năng ức chế sản xuất NO trong tế bào RAW 264,7. Kết quả cho thấy cao chiết *n*-hexan; ethyl acetat, *n*-butanol có giá trị IC₅₀ lần lượt là: 10,46; 13,16; 98,57 mg/ml. Do đó cây vú bò có tiềm năng lớn trong việc điều trị, hỗ trợ điều trị các bệnh viêm.

I. MỞ ĐẦU

Chi Sung (*Ficus* L.) là một chi lớn thuộc họ Dâu tằm (Moraceae), gồm khoảng 1000 loài phân bố chủ yếu ở các vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới [1]. Theo Phạm Hoàng Hộ có hơn 100 loài và thứ thuộc chi này có ở Việt Nam [2]. *Ficus hirta* Vahl., tên thường gọi là cây vú bò, vú chó hay óc chó, được dùng trong dân gian để làm thuốc bổ và chữa bệnh. Rễ cây vú bò được sử dụng để tăng cường sức khỏe và trị các chứng bệnh như viêm gan, viêm vú, ho, thấp khớp và để tăng cường tiết sữa sau khi sinh. Lá và thân được dùng dưới dạng thuốc sắc để chữa viêm thận, chữa vết thương bầm tím [3, 4]. Trên thế giới, đã có một số nghiên cứu về thành phần hóa học của rễ [5-8] và quả [9] loài này được công bố. Nhiều hợp chất phenolic như flavonoid, prenylcoumarin, phenylpropanoid, coumarin cùng các alkaloid, triterpenoid ... đã được phân lập và xác định từ loài này.

II. THỰC NGHIỆM

1. Nguyên liệu

Mẫu thực vật dùng nghiên cứu là lá cây vú bò. Mẫu tươi lá cây vú bò được thu hái vào tháng 12/2019 tại Huyện Yên Sơn - Tuyên Quang. Mẫu cây được TS. Nguyễn Thị Hải, Khoa Y - Dược, Trường Đại học Tân Trào xác định tên khoa học là (*Ficus hirta* Vahl.) thuộc họ Dâu tằm (Moraceae).

Mẫu cây vú bò mã số (FH-12/2019) được lưu tại phòng Thực hành Dược, Trường Đại học Tân Trào.

Mẫu thực vật được thái nhỏ, sấy khô ở nhiệt độ 45 °C trong tủ sấy, để nguội, xay nhỏ và chiết xuất với dung môi thích hợp.

2. Dung môi, hóa chất, thiết bị

Các dung môi, hóa chất dùng để chiết xuất, phân lập các chất: methanol, *n*-hexane, ethylacetate, dichloromethane, *n*-butanol đều đạt tiêu chuẩn phòng thí nghiệm.

Lipopolysaccharides (LPS) từ *Escherichia - coli* của Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS) được cung cấp từ Life Technologies, Inc, (Gaithersburg, MD, USA).

Sodium nitrite, sulfanilamide, N-1-naphthylethylenediaminedihydrochloride and dimethyl sulfanilamide (DMSO) của Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Các hóa chất cần thiết khác của hãng Sigma, GibCO, Invitrogen, Promega.

Dòng tế bào: RAW 264.7 do GS.TS. J.M.Pzzoto, Trường Đại học Hawaii và GS. Jeanette Maier, Trường Đại học Milan, Italia cung cấp.

3. Phương pháp nghiên cứu

3.1. Phương pháp chiết mẫu thực vật, tạo cao chiết.

Lá cây vú bò sau khi thu hái được tiến hành loại bỏ tạp bẩn, phơi khô trong bóng râm và xay nhỏ thành bột. Bột khô (4 kg) thu được được tiến hành chiết tạo cao tổng bằng ethanol - H₂O (EtOH:H₂O = 95:5) từ 3 đến 4 lần ở nhiệt độ phòng theo phương pháp chiết ngâm hoặc chiết trên thiết bị chiết siêu âm ở nhiệt độ 40-50 °C. Các dịch chiết thu được được tiến hành lọc bằng giấy lọc, gộp lại và loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm trên thiết bị cô quay chân không thu được cặn chiết EtOH 300 g cao tổng (Ký hiệu FL 300). Cao tổng sau đó được chiết lần lượt giữa *n*-hexane, ethyl acetate và *n*-butanol. Làm bay hơi các dung môi hữu cơ thu được các cặn chiết tương ứng là FHLH 40 g, FHLE 50 g, FHLBu 100 g còn lại dịch nước.

3.2. Phương pháp nuôi cấy tế bào in vitro

Dòng tế bào RAW 264,7 được nuôi cấy trong môi trường DMEM với thành phần kèm theo gồm 2 mM HEPES và 1,0 mM sodiumpyruvate, ngoài ra bổ sung 10% fetal bovine serum - FBS (GIBCO).

Tế bào được cấy chuyển sau 3-5 ngày với tỉ lệ (1:3) và nuôi trong tủ ấm CO₂ ở điều kiện 37°C, 5 % CO₂ [10].

3.3. Phương pháp xác định khả năng ức chế sản sinh NO của tế bào macrophage RAW 264,7

Tế bào RAW 264,7 được đưa vào 96 giếng ở nồng độ 1 x 10⁴ tb/giếng và nuôi trong tủ ấm ở 37 °C và 5 % CO₂ trong 24 giờ.

Tiếp theo, môi trường nuôi cấy được loại bỏ, thay bằng môi trường DMEM không có FBS trong 3 giờ.

Tế bào sau đó được ủ mẫu nghiên cứu ở các nồng độ khác nhau trong 2 giờ trước khi được kích thích sản sinh yếu tố NO bằng LPS (1 µg/mL) trong 24 giờ.

Một số giếng không được ủ mẫu mà chỉ sử dụng dung dịch pha mẫu được coi là đối chứng âm. Trong

khi đối chứng dương được sử dụng là N^G - Methyl-L-arginine acetate (L-NMMA) (Sigma).

Nitrite (NO₂⁻), được xem là chỉ thị cho việc tạo NO, sẽ được xác định nhờ bộ Griess Reagent System (Promega Cooperation, WI, USA). Cụ thể là, 100 µl môi trường nuôi tế bào (ủ mẫu) được chuyển sang đĩa 96 mới và được thêm vào 100 µl Griess Reagent System (Promega Cooperation, WI, USA). Cụ thể là. 100 µl môi trường nuôi tế bào (ủ mẫu) được chuyển sang đĩa 96 mới và được thêm vào 100 µl Griess reagent: 50 µl của 1 % (W/v) sulfanilamide trong 5 % (v/v) phosphoric acid và 50 µl 0,1 % (w/v) N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride ph trong nước.

Hỗn hợp này được ủ tiếp ở nhiệt độ phòng trong 10 phút và hàm lượng nitrite sẽ được đo bằng máy microplate reader ở bước sóng 540 nm. Môi trường DMEM không FBS được sử dụng như giếng trắng (blank).

Hàm lượng nitrite của từng mẫu thí nghiệm được xác định nhờ vào đường cong hàm lượng chuẩn NaNO₂ và được so sánh % với mẫu chứng âm (LPS).

Khả năng ức chế sản sinh NO của mẫu được xác định nhờ công thức:

$$\% \text{Ức chế} = 100 \% - [\text{hàm lượng NO}_{\text{sample}} / \text{hàm lượng NO}_{\text{LPS}}] * 100$$

Phép thử được lặp lại 3 lần để đảm bảo tính chính xác. Giá trị IC₅₀ (nồng độ ức chế 50 % sự hình thành NO) sẽ được xác định nhờ vào phần mềm máy tính TableCurve 2Dv4 [11-14].

3.4. Phép thử sinh học xác định khả năng gây độc tế bào bằng MTT

Chất thử (20 µl) được đưa vào các giếng của khay 96 giếng để có nồng độ tương tự nồng độ của thí nghiệm NO.

Sau khi điều chỉnh để có mật độ tế bào phù hợp, hút 180 µl tế bào vào các giếng của khay 96 giếng đã có chất thử. Trên cùng một đĩa thử, bố trí một số giếng để làm đối chứng không có mẫu thử chỉ có dung môi pha mẫu là DMSO 10 %.

Đĩa nuôi cấy vào trong tủ ấm CO₂ ở điều kiện 37 °C, 5 % CO₂, nuôi trong 72 giờ.

Sau 72 giờ, 10 µl MTT (nồng độ cuối cùng là 5 mg/ml) được cho vào mỗi giếng.

Sau 4 giờ, loại bỏ môi trường, tinh thể formaran được hòa tan bằng 50 μ l (DMSO) 100 %.

Giá trị OD đo ở bước sóng 540 nm bằng máy quang phổ.

Lượng tế bào sống sót sẽ được tính theo công thức:

$$\% \text{ ức chế} = 100 \% - [(OD_{\text{(chất thử)}} - OD_{\text{(chất đối chứng)}}) / OD_{\text{(DMSO)}} - OD_{\text{(chất đối chứng)}}]$$

III. Kết quả nghiên cứu

Kết quả Bảng 1 cho thấy: ở nồng độ 100 μ g/ml, các mẫu FHLH, FHLE và FHLBu ức chế mạnh và gây chết tế bào nên giá trị ức chế NO ở nồng độ sẽ bị loại bỏ và giá trị IC₅₀ của các mẫu này được tính từ nồng độ 20 μ g/ml.

Bảng 1. Khả năng ức chế sản sinh NO của các mẫu nghiên cứu

Nồng độ (μ g/ml)	% ức chế sản sinh NO			
	FHLBu	FHLE	FHLH	L-NMMA
100	50,24	74,65	65,26	102,54
20	31,32	59,54	60,67	70,08
4	23,42	31,51	35,65	35,91
0,8	20,79	19,47	25,68	14,02
IC ₅₀	98,57 \pm 3,56	13,16 \pm 0,54	10,46 \pm 0,72	7,81 \pm 0,74

Bảng 2. Tác động của các mẫu nghiên cứu đến khả năng ức chế sự phát triển của tế bào RAW 264,7

Nồng độ (μ g/ml)	% tế bào sống sót			
	FHLBu	FHLE	FHLH	L-NMMA
100	98,69	27,49	8,58	95,45
20	99,96	92,29	95,12	96,65
4	94,42	100,33	97,86	98,43

Kết quả trong phép thử ức chế NO các mẫu cho thấy FHLE, FHLH thể hiện hoạt tính tốt nhất với giá trị IC₅₀ lần lượt là 10,46 \pm 0,72 và 13,16 \pm 0,54 μ g/ml. Mẫu FHLBu cho thấy có hoạt tính với giá trị IC₅₀ 98,57 \pm 3,56 μ g/ml. Chất đối chứng dương L-NMMA hoạt động ổn định trong thí nghiệm.

KẾT LUẬN

Từ lá loài *Ficus hirta* thu hái tại huyện Yên Sơn, tỉnh Tuyên Quang đã chiết xuất được 4 cao chiết *n*-hexane 40 g (FHLH), ethylacetat 50 g (FHLE), *n*-butanol 100 g (FHLBu), cao nước (FHLN).

Thử hoạt tính kháng viêm của 3 cao chiết FHLE, FHLH, FHLBu và kết quả là: Mẫu cao chiết ethylacetat (FHLE), *n*-hexane (FHLH) thể hiện hoạt tính tốt với giá trị IC₅₀ lần lượt là 10,46 \pm 0,72 và 13,16 \pm 0,54 μ g/ml.

Mẫu cao chiết *n*-butanol (FHLBu) có hoạt tính với giá trị IC₅₀ 98,57 \pm 3,56 μ g/ml.

Lời cảm ơn:

Các kết quả nghiên cứu này được hỗ trợ kinh phí từ nguồn Quỹ khoa học công nghệ trường Đại học Tân Trào; Cảm ơn phòng Nghiên cứu các hợp chất Thiên nhiên, TS. Nguyễn Thanh Tâm và các cộng sự cho phép sử dụng trang thiết bị, dụng cụ, hóa chất và tư vấn kỹ thuật; Cảm ơn TS. Nguyễn Thị Hải, Khoa Y - Dược, Trường Đại học Tân Trào đã xác định tên khoa học loài vú bò (*F. hirta*).

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. Tai-Ming Shao, Cai-Juan Zheng, Chang-Ri Han, Guang-Ying Chen, Chun-Yan Dai, Xiao-Ping Song, Jin-Chao Zhang, Wen-Hao Chen. (2014). *Lactones from Ficus auriculata and their effects on the proliferation function of primary mouse osteoblasts in vitro*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 24, 3952-3955.
2. Pham Hoang Ho, (2000), Vietnamese plants. Publisher: Young - Ho Chi Minh City, Vol. 2, p. 551-581.

3. Do Tat Loi, (2004), Vietnamese medicinal plants and medicinal herbs. Publisher: Medical, p. 915.
4. Do Si Hien, Do Thi Xuyen (2011), the flora species of the Muong ethnic group in the Hang Kia-Pa Co nature reserve, used as medicine to treat kidney disease. National Scientific Conference on Ecology and Biological Resources 4th, p. 1121 to 1123.
5. Ya J, Zhang XQ, Wang Y, Zhang QW, Chen JX, Ye WC, (2010), *Two new phenolic compounds from the roots of Ficus hirta*. Nat Prod Res. 24,621-625.
6. Zheng RR, Wang WJ, Yang HB, Zhang QW, Zhang XQ, Ye WC, (2013), *Chemical studies on roots of Ficus hirta*. China Journal of Chinese Materia Medica. 38, 3696-3701.
7. Cheng J, Yi X, Wang Y, Huang X, He X, (2017), *Phenolics from the roots of hairy fig (Ficus hirta Vahl.) exert prominent anti-inflammatory activity*, Journal of Functional Foods. 31, 79-88.
8. Cheng J, Yi X, Chen H, Wang Y, He X. (2017), *Anti-inflammatory phenylpropanoids and phenolics from Ficus hirta Vahl*, Fitoterapia 121, 229-234.
9. Wan C, Chen C, Li M, Yang Y, Chen M, Chen J. (2017), *Chemical constituents and antifungal activity of Ficus hirta Vahl*. Fruits. Plants. 6, 44-52.
10. Lio H, Banbury L, Liang H, Wang X, Lu X, Hu L, Wu J (2014), *Effect of Honghua (Flos Carthami) on nitric oxide production in RAW 264.7 cells and α -glucosidase activity*. Journal of Traditional Chinese Medicine 34(3): 362 - 368.
11. S Combet, J L Balligand, N Lameire, E Goffin, O Devuyst (2000), *A Specific Method for Measurement of Nitric Oxide Synthase Enzymatic Activity in Peritoneal Biopsies*. Kidney International 57(1): 332 - 8.
12. Po-Jung Tsai, Tzung-Hsun Tsai, Chun-Hsien Yu, Su-Chen Ho (2007), *Comparison of NO-scavenging and NO-suppressing activities of different herbal teas with those of green tea*. Food Chemistry, 103(1), 181-187.
13. Natalia R. Bernardes, Marlon Heggdorne-Araújo, Isabela F. J. C. Borges, Fabricio M. Almeida, Eduardo P. Amaral, Elena B. Lasunskaja, Michelle F. Muzitano, Daniela B. Oliveira (2014), *Nitric oxide production, inhibitory, antioxidant and antimycobacterial activities of the fruits extract and flavonoid content of Schinus terebinthifolius*. Revista Brasileira de Farmacognosia. 24 (6), 644 - 650.
14. Sarot Cheenpracha, Eun-Jung Park, Bahman Rostama, John M Pezzuto, Leng Chee Chang (2010), *Inhibition of Nitric Oxide (NO) Production in Lipopolysaccharide (LPS)-activated Murine macrophage RAW 264.7 Cells by the Norsesiterpene Peroxide, Epimuqubilin A*. Mar Drugs. 8(3): 429 - 437.

Anti-inflammatory action from the leaf glue of vu bo (ficus hirta vahl.)

Collected in Yen Son District, Tuyen Quang Province

Tran Thi Giang Huong, Tran Duc Dai, Chu Quynh Mai

Article info

Received:
19/6/2020
Accepted:
12/8/2020

Keywords:
Ficus hirta, Moraceae,
treatment, anti-
inflammatory, IC₅₀.

Abstract

Ficus hirta Vahl is a tropical plant widely used in traditional Vietnamese and Chinese medicine to relieve and treat many pathologies. It is used to treat treatment of nephritis, hepatitis, mastitis, rheumatism, coughThe purpose of this research is to scientifically demonstrate the anti-inflammatory of the leaf glue of *Ficus hirta* Vahl. The anti-inflammatory action of leaf glue was evaluated by inhibition NO production in RAW cells 264.7. Results showed that leaf glue of n-hexane; ethyl acetate, n-butanol with IC₅₀ values respectively: 10.46; 13,16; 98.57 mg / ml. Therefore, *Ficus hirta* Vahl has great potential in treating and supporting the treatment of inflammatory diseases.
