

Khả năng làm lành vết thương ngoài da của cây cỏ tai hùm (*Conyza canadensis* (L.) Cronquist)

- Lê Đình Tố
- Hoàng Thị Nga
- Nguyễn Thị Thanh Nhân
- Trần Linh Thuộc
- Đặng Thị Phương Thảo

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 12 tháng 12 năm 2016, nhận đăng ngày 28 tháng 11 năm 2017)

TÓM TẮT

Cỏ tai hùm là cây thuốc đang được sử dụng để trị vết thương ngoài da trong cộng đồng người Cơ Ho tại vườn quốc gia Bidoup Núi Bà, Lâm Đồng, Việt Nam. Tuy nhiên, hiện nay cây cỏ tai hùm đang được sử dụng theo kinh nghiệm dân gian và còn thiếu các bằng chứng khoa học về hoạt tính trị bệnh. Nghiên cứu này nhằm đánh giá khả năng làm lành vết thương của cây cỏ tai hùm (*Conyza canadensis* (L.) Cronquist). Cây thuốc sau khi thu nhận được tách chiết cao tổng và các cao phân đoạn ether dầu hòa, ethyl acetate và nước. Khả năng làm lành vết thương của cây thuốc được đánh giá thông qua khả năng kháng các chủng vi khuẩn gây viêm da, khả năng kích thích tăng sinh tế bào nguyên bào sợi và tế bào keratin. Chúng tôi sử dụng phương pháp khuếch tán đĩa thạch để đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của cây thuốc. Kết quả thực nghiệm cho thấy cây thuốc có

khả năng kháng 02 chủng vi khuẩn gây viêm da (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*) và 02 chủng vi khuẩn cơ hội trên da (*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*). Bên cạnh đó, cây cỏ tai hùm còn thể hiện khả năng kích thích tăng sinh tế bào nguyên bào sợi và tế bào keratin. Cao tổng và cao phân đoạn ethyl acetate đều thể hiện khả năng kích thích tăng sinh tế bào nguyên bào sợi, trong đó cao tổng có khả năng kích thích tăng sinh 1,6 lần ở nồng độ 31,25 µg/mL so với đối chứng. Hơn nữa, cao phân đoạn ethyl acetate và nước còn cho thấy hiệu quả kích thích tăng sinh tế bào keratin, trong đó ở nồng độ 10 µg/mL cao phân đoạn ethyl acetate có khả năng kích thích tăng sinh cao nhất, 1,7 lần so với đối chứng. Như vậy, các kết quả thực nghiệm của chúng tôi đã cung cấp những thông tin khoa học hoàn toàn mới về khả năng làm lành vết thương của cây cỏ tai hùm.

Từ khóa: kháng khuẩn; lành vết thương; nguyên bào sợi; keratin; *Conyza canadensis* (L.) Cronquist

MỞ ĐẦU

Cỏ tai hùm có tên khoa học là *Conyza Canadensis* (L.) Cronquist, thuộc họ Cúc (Asteraceae), là một loài thảo dược bản địa ở Bắc Mỹ, nhưng hiện nay đã được tìm thấy ở hầu hết mọi nơi trên thế giới. Đây là loại cây có chiều cao có thể lên đến 1,5 m, có thân thẳng, phân nhánh ở phần trên, hoa mọc thành cụm dày đặc, có màu trắng hoặc tím nhạt. Trong y học truyền thống ở một số nước châu

Á, cỏ tai hùm được sử dụng để điều trị nhiều bệnh gây ra bởi vi khuẩn, nấm, virus. Ở Trung Quốc, cỏ tai hùm được dùng như một phương thuốc cổ truyền để điều trị vết thương và viêm khớp. Hoạt tính sinh học của cây thuốc cỏ tai hùm được nghiên cứu ở nhiều nơi trên thế giới, nhiều tác dụng sinh học đã được phát hiện từ loài này như kháng khuẩn, kháng nấm [4, 7, 9], kháng viêm [6], kháng virus [3], chống oxy hóa, chống ung thư [1, 2, 4].... Thành phần hóa học

của cây cỏ tai hùm bao gồm các hợp chất như saponin, terpenoid, tannin, anthraquinone, steroid, và flavonoid [11]. Tuy nhiên, đến nay vẫn chưa có những nghiên cứu về hoạt tính điều trị vết thương của cây cỏ tai hùm. Vì vậy, nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu đánh giá khả năng làm lành vết thương của cây thuốc này.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Cây thuốc

Cây cỏ tai hùm được thu hái tại vườn quốc gia Bidoup Núi bà, tỉnh Lâm Đồng, Việt Nam. Cây thuốc được định danh tại Khoa Sinh học-Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM. Sau đó mẫu được phơi khô, xay nhuyễn, tách chiết cao tổng với ethanol 70 % và các cao phân đoạn ether dầu hỏa, ethyl axetate, nước. Tiếp theo cao chiết được cô quay, đông khô và bảo quản ở 4 °C.

Chủng vi sinh vật

Hai chủng gây viêm da là *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) và *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) và 2 chủng gây bệnh cơ hội trên da là *Escherichia coli* (ATCC 25922) và *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) được cung cấp bởi Bộ môn Công nghệ sinh học Phân tử và Môi trường, Trường Đại học Khoa học Tự Nhiên, ĐHQG-HCM. Các chủng vi khuẩn được môi cấy lỏng trong môi trường Tryptic soy broth (TSB) (Himedia, Ấn Độ) ở 37 °C, 24 giờ và được cấy chuyển 3 giờ trước khi khảo sát để vi khuẩn đi vào pha tăng trưởng.

Dòng tế bào động vật

Tế bào nguyên bào sợi chuột: NIH3T3 (ATCCR CRL - 1658TM) và tế bào keratin người: HaCaT (ATCC No.: HB - 8065) được cung cấp bởi Bộ môn Công nghệ Sinh học Phân tử và Môi trường, Khoa Sinh học – Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM.

Phương pháp nghiên cứu

Khảo sát khả năng kháng khuẩn

Cao chiết được pha loãng trong dung dịch dimethyl sulfoxide (DMSO) 20 %. Sử dụng phương pháp khuếch tán đĩa thạch: đĩa nền có 15 mL môi trường Trypticase soy agar (TSA) rắn (2 % agar, Himedia, Ấn Độ) được phủ bằng một lớp TSA mềm (0,8 % agar) 5 mL được trộn đều với 100 µL dịch vi khuẩn (OD=0,1), đục lỗ đường kính 8 mm, mỗi lỗ thạch được thêm 100 µL cao chiết. Đối chứng dương là ampicillin 0,1 mg/mL, riêng *Pseudomonas aeruginosa* sử dụng tetracycline 0,3 mg/mL, đối chứng âm là DMSO 20 %. Khả năng kháng khuẩn của cao chiết được đo bằng hiệu số đường kính vòng vô khuẩn và đường kính lỗ thạch.

Khảo sát khả năng kích thích tăng sinh trên dòng tế bào nguyên bào sợi chuột NIH3T3 và dòng tế bào keratin HaCaT

Tế bào được nuôi trong Dulbecco's Modified Eagle Medium – Nutrient Mixture F-12 (DMEM-F12), 7,5% Fetal Bovine Serum (FBS) đến khi độ bao phủ đạt 70–80% diện tích đĩa nuôi cấy, sau đó được nuôi trong đĩa 96 giếng có chứa 100 µl DMEM-F12, 7,5% FBS, mật độ 10^4 tế bào/giếng. Ủ 24 giờ, thay môi trường DMEM-F12, 7,5% FBS bằng DMEM-F12, 2% FBS đối với tế bào NIH3T3 hoặc 1% đối với tế bào HaCaT, bổ sung cao chiết với nồng độ thích hợp. Ủ 48 giờ, sau đó xác định mật độ tế bào theo phương pháp MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Bổ sung 10 µL MTT/giếng. Đĩa được ủ 3 giờ, hút bỏ dịch và thêm vào 100 µL hỗn hợp isopropanol-HCl 0,1N. Lắc 10 phút và đo OD ở bước sóng 550nm. Trong các thí nghiệm tế bào được ủ ở 37°C, CO₂ 5%.

Bố trí thí nghiệm và xử lý số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại ba lần và xử lý ANOVA bằng Tukey test.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khả năng kháng khuẩn

Sự hiện diện của vi khuẩn gây viêm loét và vi khuẩn cơ hội thường kéo dài thời gian lành vết thương [5, 10]. Trong thử nghiệm của chúng tôi, cao tổng và các cao phân đoạn của cây cỏ tai hùm đều

cho thấy khả năng kháng cả 4 chủng vi khuẩn khảo sát (Bảng 1). Cao tổng ở nồng độ 400 mg/mL có khả năng kháng khuẩn đối với các chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* với đường kính vòng vô khuẩn lần lượt là 8 ; 3,3 ; 7 và 3 mm. Ngoài ra, cao chiết phân đoạn ethyl axetate và phân đoạn ether dầu hòa cũng thể hiện hoạt tính kháng khuẩn. Cụ thể, phân đoạn ethyl axetate từ cây cỏ tai hùm cho hiệu quả kháng tốt nhất trên 2 chủng *Staphylococcus aureus* và *Enterococcus faecalis* với đường kính vòng vô khuẩn tương ứng đạt 7,7 mm và 4,2 mm. Điều này chứng tỏ các hợp chất có khả năng kháng khuẩn trong thử nghiệm của chúng tôi là các hợp chất có độ phân cực trung bình và yếu. Kết quả về khả năng kháng khuẩn của cây cỏ tai hùm trong nghiên cứu này mạnh hơn công bố của Dilek Oskay

Bảng 1. Khả năng kháng khuẩn của cao chiết cây cỏ tai hùm trên các chủng vi khuẩn gây viêm da và gây bệnh cơ hội trên da

	Nồng độ (mg/mL)	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Escherichia coli</i>
Cao tổng	400	8,0 ± 0,0	3,3 ± 0,5	7,0 ± 0,0	3,0 ± 0,0
	200	7,0 ± 0,0	2,3 ± 0,5	4,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0
	100	3,7 ± 0,5	1,3 ± 0,5	2,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0
	50	0,7 ± 0,5	0	0	0
Nước	300	0	0	0	0
Ethyl axetate	100	7,7 ± 0,5	2,7 ± 0,5	4,2 ± 0,2	2,0 ± 0,0
Ether dầu hòa	50	3,7 ± 0,5	0	0	0

Khả năng kích thích tăng sinh nguyên bào sợi chuột NIH3T3 và tế bào keratin HaCaT

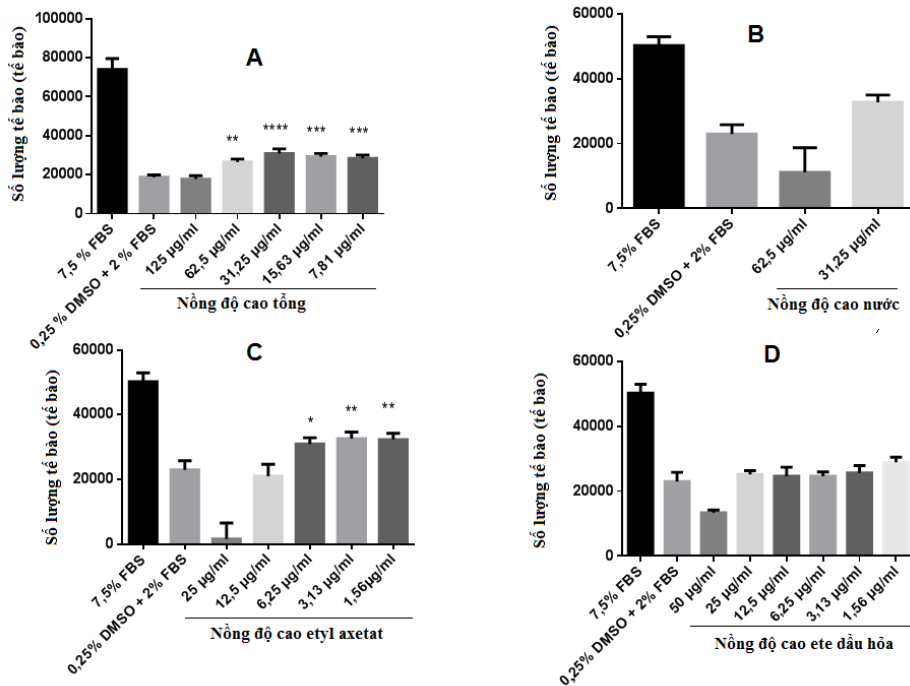
Sự tăng sinh và di chuyển của tế bào keratin và nguyên bào sợi đóng vai trò quan trọng trong quá trình làm lành vết thương. Tế bào nguyên bào sợi bị thu hút bởi các nhân tố tăng trưởng được tiết ra bởi tiểu cầu, bạch cầu đơn nhân để di chuyển đến vị trí vết thương và tăng sinh giúp vết thương nhanh chóng liền miệng. Bên cạnh đó, nguyên bào sợi còn tiết các nhân tố tăng trưởng và cytokine khác nhau, có tác động trực tiếp đến sự tăng sinh của biểu bì, đây là các yếu tố quan trọng trong quá trình làm lành vết thương [12]. Cùng với nguyên bào sợi, sự di chuyển, tăng sinh và biệt hóa của tế bào keratin có vai trò trong

và cộng sự (2009), đường kính vòng vô khuẩn trong công bố của tác giả trên các chủng *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, và *Staphylococcus aureus* lần lượt là 2 ; 6 ; 4 mm. Ngoài ra, khi so sánh với công bố của Edziri Hayet và cộng sự (2009), kết quả thực nghiệm của nhóm chúng tôi cho kết quả kháng khuẩn yếu hơn, đường kính vòng kháng khuẩn của cây thuốc trong nghiên cứu của tác giả ở phân đoạn methanol đối với các chủng vi khuẩn *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* và *Enterococcus faecalis* lần lượt là 16 ; 9 ; 13 ; 20 mm [4, 7]. Điều này có thể gợi ý về sự khác biệt của hàm lượng và thành phần các chất tích lũy trong cây theo vị trí địa lý, môi trường sống và thời điểm thu hái mẫu cây thuốc. Ngoài ra, sự khác biệt còn có thể do phương pháp tách chiết khác nhau ở mỗi nghiên cứu.

quan trọng trong sự khôi phục lại chức năng của biểu mô, tế bào keratin còn sản xuất một lượng lớn các cytokine và các interleukin - 1 (IL - 1) đóng vai trò thiết yếu trong quá trình làm lành vết thương [8].

Trong thử nghiệm của chúng tôi, cao tổng và cao phân đoạn etyl axetat của cây cỏ tai hùm cho kết quả tăng sinh trên dòng nguyên bào sợi NIH3T3. Cao tổng ở nồng độ 31,25 µg/mL cho hiệu quả tăng sinh gấp 1,6 lần so với đối chứng, phân đoạn cao ethyl axetate cũng thể hiện khả năng kích thích tăng sinh nguyên bào sợi ở một số nồng độ 6,25 µg/mL, 3,13 µg/mL và 1,56 µg/mL, với hiệu quả kích thích khoảng 1,4 lần so với đối chứng (Hình 1). Như vậy, khả năng kích thích tăng sinh dòng tế bào nguyên bào

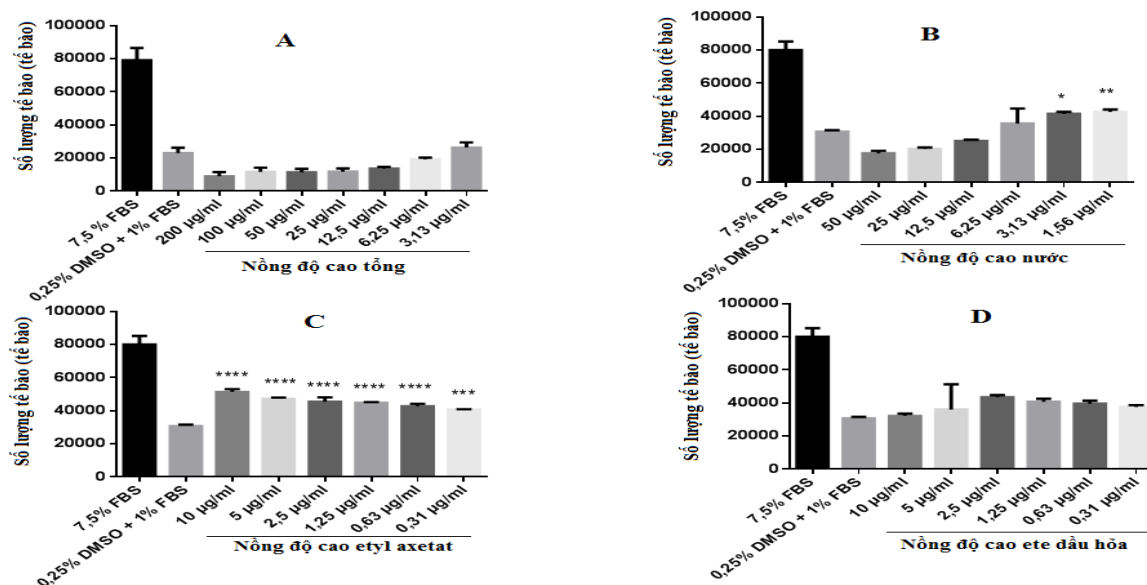
sợi được dự đoán là do những hợp chất có độ phân cực trung bình có trong cây thuốc.



Hình 1. Khả năng kích thích tăng sinh tế bào nguyên bào sợi NIH3T3 của cao chiết cây cỏ tai hùm
A: Cao tổng, B: Cao chiết phân đoạn nước, C: Cao chiết phân đoạn ethyl axetat, D: Cao chiết phân đoạn ether dầu hòa

Bên cạnh đó, cao chiết của cây cỏ tai hùm cũng thể hiện khả năng kích thích tăng sinh tế bào keratin. Kết quả thực nghiệm cho thấy, mặc dù cao tổng không thể hiện hoạt tính kích thích tăng sinh tế bào keratin, cao phân đoạn ethyl axetat và phân đoạn nước thể hiện khả năng kích thích tăng sinh trên dòng tế bào này. Trong đó, ở phân đoạn cao ethyl axetat, các nồng độ khảo sát đều kích thích tăng sinh tế bào keratin, đạt cao nhất 1,7 lần ở nồng độ 10 µg/mL (Hình 2). Các kết quả này chứng minh rằng các hợp chất cho hoạt tính làm lành vết thương của cây cỏ tai

hùm là hợp chất có tính phân cực trung bình, có thể ly trích được trong phân đoạn ethyl axetat. Một số nghiên cứu gần đây đã chứng minh cây thuốc cỏ tai hùm có hiệu quả kháng khuẩn, kháng nấm, kháng oxy hóa, kháng viêm, và kháng phân bào [1, 2, 4, 6, 7, 9]. Tuy nhiên, khả năng kích thích tăng sinh tế bào nguyên bào sợi và tế bào keratin chưa được tập trung nghiên cứu. Những kết quả này giúp đưa ra những bằng chứng khoa học cho việc sử dụng cây thuốc cỏ tai hùm trong điều trị vết thương của đồng bào dân tộc thiểu số.



Hình 2. Khả năng kích thích tăng sinh tế bào keratin HaCaT của cao chiết cây cỏ tai hùm
A: Cao tổng, B: Cao chiết phần đoạn nước, C: Cao chiết phần đoạn ethyl axetat, D: Cao chiết phần đoạn ether dầu hỏa.

KẾT LUẬN

Cây cỏ tai hùm có khả năng kháng 4 chủng vi khuẩn gây bệnh trên da (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*). Cây thuốc còn thể hiện khả năng kích thích tăng sinh tế bào nguyên bào sợi và tế bào keratin.

Lời cảm ơn: Công trình này được thực hiện với kinh phí từ đề tài mã số B2014-18-04 được cấp bởi Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh và sự hỗ trợ của Vườn Quốc Gia Bidoup - Núi Bà, Lâm Đồng, Việt Nam.

Wound healing activity of *Conyza canadensis* (L.) Cronquist

- Le Dinh To
- Hoang Thi Nga
- Nguyen Thi Thanh Nhan
- Tran Linh Thuoc
- Dang Thi Phuong Thao

University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT

Conyza canadensis (L.) Cronquist (CCL) has been used by K'Ho minority in Bidoup Nui Ba national park, Lam Dong province, Vietnam as one of

wound healing remedies. However, the scientific proof of treatment is still unclear. This study aimed to evaluate this wound healing potential of CCL. The

CCL power was extracted by ethanol and then partitioned consecutively with petroleum ether, ethyl acetate and water. Wound healing potential was evaluated by antibacterial activity, stimulation of fibroblast and keratinocyte proliferation. Agar-well diffusion was used in the antibacterial tests and the results showed that CCL had antibacterial activity against 02 dermatitis bacteria (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*) and 02 opportunistic infection bacteria (*Escherichia coli*,

Enterococcus faecalis). Moreover, our results illustrated that CCL stimulated the fibroblast and keratinocyte proliferation compared to the control. Particularly, the fibroblast division increased 1.6 times at 31.25 µg/mL when treated by ethanolic extract, while ethyl acetate fraction showed 1.7 times increase at 10 µg/mL in keratinocyte proliferation compared to the control. Taken together, our study contributed scientific base of CCL in the wound healing.

Keywords: anti-bacteria, wound healing, fibroblast, keratin, *Conyza canadensis* (L.) Cronquist

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. B. Csupor-Löffler, Z. Hajdú, I. Zupkó, J. Molnár, P. Forgo, A. Vasas, Z. Kele, J. Hohmann, Antiproliferative constituents of the roots of *Conyza canadensis*. *Planta Medica*, 77, 11, 1183–1188 (2011).
- [2]. B. Csupor-Löffler. Activity-guided investigation of antiproliferative secondary metabolites of Asteraceae species, *University of Szeged* (2012).
- [3]. H. Edzir, G. Laurent, A. Mahjoub, M. Mastouri, Antiviral activity of *Conyza canadensis* (L.) Cronquist extracts grown in Tunisia. *African Journal of Biotechnology*, 10, 45, 9097–9100 (2011).
- [4]. E. Hayet, M. Maha, A. Samia, M.M. Ali, B. Souhir, K. Abderaouf, Z. Mighri, A. Mahjoub, Antibacterial, antioxidant and cytotoxic activities of extracts of *Conyza canadensis* (L.) Cronquist growing in Tunisia. *Medicinal Chemistry research*, 18, 6, 447–454 (2009).
- [5]. H. Hollinworth, The management of infected wounds. *Professional nurse (London, England)*, 12, 12 Suppl, S8 (1997).
- [6]. J. Lenfeld, O. Motl, A. Trka, Anti-inflammatory activity of extracts from *Conyza canadensis*. *Die Pharmazie*, 41, 4, 268–269 (1986).
- [7]. M. Oskay, D. Oskay, F. Kalyoncu, Activity of some plant extracts against multi-drug resistant human pathogens. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 293–300 (2010).
- [8]. I. Pastar, O. Stojadinovic, M. Tomic-Canic, Role of keratinocytes in healing of chronic wounds. *Surgical Technology International*, 17, 105–112 (2007).
- [9]. N. Phuong, N. Lien, N. Hoai. Antifungal activity of *Conyza canadensis* ((L.) Cronquist) collected in Northern Viet Nam. *5th International Conference on Biomedical Engineering in Vietnam: Springer*, 359–361 (2015).
- [10]. R.M. Rico, R. Ripamonti, A.L. Burns, R.L. Gamelli, L.A. Dipietro, The effect of sepsis on wound healing, *Journal of Surgical Research*, 102, 2, 193–197 (2002).
- [11]. N.Z. Shah, A. Mir, N. Muhammad, S. Azeem, Antimicrobial and phytotoxic study of *Conyza canadensis*. *Middle-East Journal of Medicinal Plants Research*, 1, 3, 63–67 (2012).
- [12]. T. Velnar, T. Bailey, V. Smrkolj, The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms, *Journal of International Medical Research*, 37, 5, 1528–1542 (2009).