

ĐÁNH GIÁ TÁC DỤNG KHÁNG SÂU RĂNG CỦA NƯỚC SÚC MIỆNG CHỨA α -MANGOSTIN

HOÀNG ĐỨC HẬU ⁽¹⁾, VÕ VIỆT CƯỜNG ⁽¹⁾,
NGUYỄN VŨ ANH ⁽²⁾, NGUYỄN THỊ MAI PHƯƠNG ⁽³⁾

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sâu răng là một trong những bệnh răng miệng phổ biến nhất hiện nay và đang có xu hướng ngày một tăng lên ở các nước đang phát triển [2]. Theo số liệu của Hội Răng Hàm Mặt có tới hơn 90% dân số Việt Nam đang có các vấn đề về răng miệng, trong đó phổ biến nhất là sâu răng dẫn đến mất răng. Ngay cả ở Hoa Kỳ, tỷ lệ sâu răng hiện nay vẫn còn tới 84% ở lứa tuổi thanh niên [2, 3].

Trong số các vi khuẩn xoang miệng, *Streptococcus mutans* được xem là đối tượng nghiên cứu điển hình vì nó là tác nhân gây sâu răng chủ yếu ở người. Vi khuẩn này tồn tại trên mảng bám răng với 2 đặc tính gây bệnh quan trọng là: i) khả năng sinh axit cao; ii) khả năng sinh biofilm mạnh do nó có khả năng sản xuất các exopolysaccharide (EPS), bộ khung chính của biofilm [4, 6, 7]. Trong đó, khả năng sinh EPS của *S. mutans* gần đây được xem là nhân tố gây bệnh quan trọng nhất, cần được quan tâm nghiên cứu. Kiểm soát các đặc tính gây bệnh của *S. mutans* là biện pháp quan trọng ngăn ngừa sâu răng.

Sử dụng chất kháng khuẩn trong các sản phẩm vệ sinh răng miệng là một trong những biện pháp phòng chống sâu răng có hiệu quả nhất hiện nay. Tuy nhiên, việc xuất hiện hiện tượng bệnh nhiễm fluor (fluorosis) do sử dụng lâu dài các sản phẩm vệ sinh răng miệng có chứa fluor đã khiến cho các nhà nghiên cứu và các công ty sản xuất các sản phẩm vệ sinh răng miệng phải tìm kiếm thêm những hợp chất mới để có thể thay thế fluor hay kết hợp với fluor, nhưng ở nồng độ thấp hơn mà vẫn có hiệu quả chống sâu răng cao [8]. Hàng loạt các chất kháng khuẩn mới bao gồm những chất tổng hợp và tự nhiên như các axit yếu, dẫn xuất của các axit béo, triclosan, muối kim loại và cả những chất có nguồn gốc từ thực vật đã được nghiên cứu và thử nghiệm. Việc tìm kiếm và sử dụng những chất kháng khuẩn tự nhiên, đặc biệt là các chất có nguồn gốc thực vật (phytochemicals) đang rất được quan tâm.

Măng cụt (*Garcinia mangostana* L.) là cây ăn quả trồng phổ biến ở các nước nhiệt đới như Việt Nam. Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng vỏ quả măng cụt rất giàu hợp chất polyphenol thuộc nhóm chất xanthone, trong đó có α -mangostin có rất nhiều đặc tính quý như kháng khuẩn, kháng nấm, kháng ung thư, kháng viêm... [1, 5, 9]. Những kết quả nghiên cứu đã công bố cho thấy α -mangostin trong vỏ quả măng cụt có hoạt tính ức chế sự sinh trưởng, sự sinh acid, hô hấp, ức chế sự tạo biofilm và diệt vi khuẩn gây sâu răng *S. mutans* mạnh [1, 9, 10]. Với mong muốn ứng dụng α -mangostin trong việc sản xuất một sản phẩm vệ sinh răng miệng mới, nhóm tác giả đã tiến hành tạo và đánh giá tác dụng kháng sâu răng của nước súc miệng (NSM) chứa α -mangostin từ vỏ quả măng cụt và đã khẳng định NSM chứa α -mangostin có thể triển khai ứng dụng.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

- Chủng vi khuẩn *S. mutans* GS-5 do Phòng Hóa sinh thực vật, Viện Công nghệ sinh học cung cấp.
- α -mangostin chuẩn (Sigma, Mỹ).
- α -mangostin bào chế NSM (LMN International LTD, Trung Quốc).
- Môi trường nuôi cấy vi khuẩn (Difco, Mỹ).
- Bản silicagel tráng sẵn 60 F254 25, tấm nhôm 20 x 20 cm (Merk, Đức).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đo mức độ sinh axit của tế bào

Chủng vi khuẩn *S. mutans* được giữ và cấy chuyển hàng tuần trên môi trường tryptic soy agar. Vi khuẩn nuôi cấy ở 37°C trong môi trường TYG chứa 3% tryptone, 0,5% dịch chiết nấm men và 1% glucose. Với thí nghiệm biofilm, *S. mutans* được nuôi cấy trong môi trường 3% tryptone, 0,5% cao nấm men và 1% sucrose (TYS). Đánh giá khả năng sinh axit của tế bào thông qua việc làm giảm pH của môi trường bên ngoài. Các giá trị pH tại mỗi thời điểm nghiên cứu được đo bằng máy đo pH (pH 225 Mettler Toledo). Tế bào được rửa 2 lần với dung dịch muối có KCl 50 mM và MgCl₂ 1 mM. pH của dung dịch tế bào được chỉnh đến 7,2 bằng KOH 1M. Glucose được bổ sung đạt nồng độ 0.4%, đảm bảo môi trường dư thừa cơ chất cho quá trình đường phân [9].

2.2.2. Tạo và xác định sinh khối biofilm

Biofilm được hình thành trên đĩa nhựa 96 giếng. 50 μ L dịch nuôi cấy 16 giờ của *S. mutans* được điều chỉnh đến OD (590 nm) 0,02 và cho vào các giếng đã có chứa 100 μ L môi trường TYS. Dung dịch nước súc miệng chứa α -mangostin, dung dịch NSM X (đối chứng dương), ethanol 25% (đối chứng âm) được thêm vào. Bản nhựa 96 giếng sau đó được ủ 24 giờ ở 37°C. Sau 24 giờ nuôi cấy, các giếng được làm khô và rửa 2 lần với dung dịch phosphate buffered saline (PBS) để loại bỏ tế bào không bám dính.

Biofilm tạo thành trên các giếng được nhuộm với 0.4% tím kết tinh trong 10 phút. Phần thuốc nhuộm không bám dính được rửa 3 lần với PBS. Thuốc nhuộm tím tinh thể bám dính trên biofilm được phản hấp phụ bằng cách thêm 100 μ L axit axetic 33% vào mỗi giếng và lắc nhẹ trong vòng 20 phút. Giá trị OD tại 590 nm được đo và tính như là % biofilm tạo thành so với mẫu đối chứng (25% ethanol) [10]. Sau 5 ngày nuôi cấy, biofilm được thu hoạch, siêu âm và dùng để đánh giá. Sinh khối biofilm được thu lại sau khi ly tâm 10.000 g trong 10 phút ở 4°C. Sinh khối được rửa 2 lần với nước cất loại ion và xác định trọng lượng khô [10].

2.2.3. Đánh giá sự tích lũy của α -mangostin trên biofilm

Biofilm được thu hoạch sau 68 giờ nuôi cấy bằng siêu âm và ly tâm ở 9.500 g trong 10 phút ở 4°C. Rửa tủa biofilm 2 lần với nước loại ion. α -mangostin được

phân hấp phụ bằng rửa với ethanol 100% (Sigma). Hàm lượng α -mangostin trên mỗi biofilm được phân tích bằng máy sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC (Alliance series 2695, detector PDA 2996 Waters, Mỹ). α -mangostin thương mại (Sigma) sử dụng làm chất chuẩn. Các thông số được sử dụng trên cột HPLC: C18 RP (4.6 x 150 mm), 5 μ m; pha động: H₂O thêm 0,1% axit formic (kênh A) và acetonitrile (kênh B), tốc độ dòng: gradient 1ml/min, detector PDA: 315 nm.

2.2.4. Đánh giá độ ổn định của sản phẩm

Đánh giá độ ổn định của sản phẩm bằng cách theo dõi các chỉ tiêu cảm quan, định tính sự có mặt của α -mangostin và hoạt tính kháng sự sinh axit của dung dịch NSM sau mỗi 2 tháng trong vòng 8 tháng. Định tính α -mangostin bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng. Việc phân tích được thực hiện trên các bản sắc ký đã được chuẩn bị sẵn có độ dày 1mm (60 F254, Merck). Hệ dung môi hexane: acetone tỉ lệ 3:1. Sau khi khai triển sắc ký, bản sắc ký được làm khô ở nhiệt độ phòng. Màu sắc các vạch được quan sát dưới ánh sáng thường hoặc bằng hơi NH₃.

2.2.5. Xử lý số liệu

Xử lý số liệu bằng phương pháp thống kê sử dụng tiêu chuẩn t-test hoặc ANOVA trong trường hợp so sánh nhiều mẫu với giá trị $p < 0,05$.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Thành phần công thức NSM

Dựa trên những kết quả nghiên cứu thu được trước đây [1, 9, 10] và các công bố về thành phần NSM thương mại hiện nay, nhóm tác giả đã tiến hành bào chế nước súc miệng chứa α -mangostin ở nồng độ 150 μ M. Nồng độ này có khả năng kháng vi khuẩn *S. mutans* trên biofilm tốt nhất, kết hợp với fluoride, tinh dầu và một số chất hóa học khác nhằm tăng cường và duy trì sự ổn định của sản phẩm. Công thức NSM chứa α -mangostin được trình bày ở bảng 1.

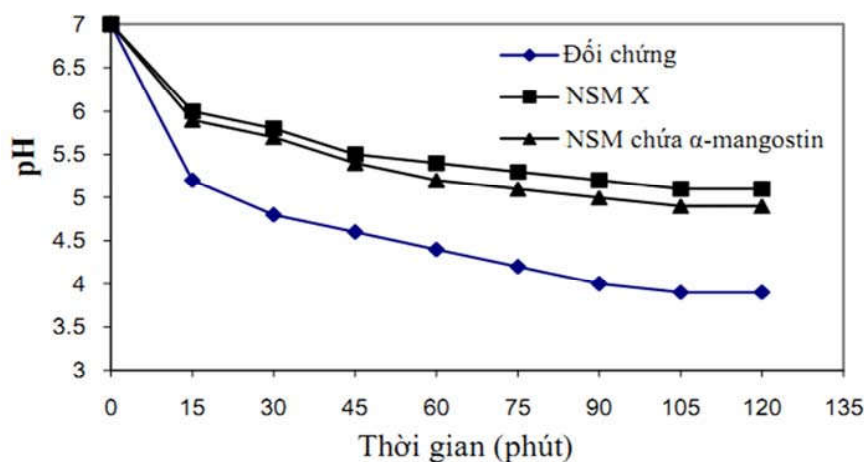
Bảng 1. Thành phần NSM chứa α -mangostin

Thành phần (1 L)	Hàm lượng
Sorbitol	100 g
Ethanol	110 mL
α -Mangostin	65 mg
NaF	250 mg
Natri benzoat	2,5 g
Tween 80	320 mg
Menthol	360 mg
Eucaliptol	720 mg
Nước tinh khiết	vđ 20 L

3.2. Đánh giá tác dụng của NSM

3.2.1. Khả năng ức chế sự sinh axit

Khả năng ức chế sự sinh axit của vi khuẩn *S. mutans* được đánh giá thông qua việc xác định khả năng ức chế giảm pH môi trường của các tế bào *S. mutans* khi xử lý với các dung dịch NSM được minh họa ở hình 1.

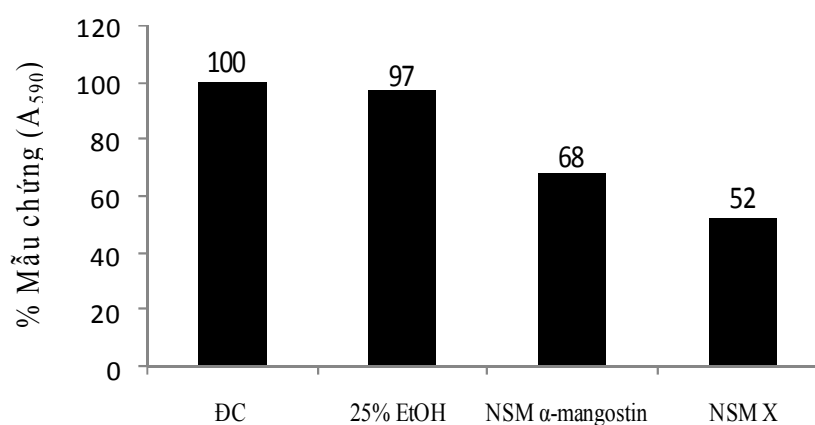


Hình 1. Khả năng ức chế sinh axit của tế bào vi khuẩn *S. mutans* của NSM

Hình 1 cho thấy các dung dịch NSM tạo được ức chế rõ rệt sự sinh axit của vi khuẩn *S. mutans* trên biofilm. Giá trị pH cuối cùng thu được với NSM chứa α -mangostin và NSM X lần lượt là 4,9 và 5,1, trong khi ở mẫu đối chứng là 3,9. Như vậy, khả năng ức chế sự sinh axit của *S. mutans* tương đương với dung NSM X.

3.2.2. Khả năng ức chế sự hình thành biofilm (mảng bám răng)

Để đánh giá khả năng hạn chế sự tạo mảng bám răng của dung dịch NSM trên mô hình biofilm nhân tạo, các biofilm của *S. mutans* được xử lý với NSM chứa α -mangostin và NSM X (hình 2).



Hình 2. Khả năng ức chế sự hình thành biofilm của *S. mutans* của các NSM

Kết quả thu được ở hình 2 cho thấy sinh khối biofilm trung bình của các mẫu được xử lý với NSM chứa α -mangostin và NSM X giảm đi lần lượt 32% và 48% so với đối chứng. Như vậy, NSM chứa α -mangostin có khả năng ức chế sự hình thành mảng bám răng.

3.3. Khả năng tích lũy của α -mangostin trên biofilm

Các chất kháng khuẩn sử dụng trong các sản phẩm vệ sinh răng miệng thường có thể tích lũy trên mảng bám răng. Trong trường hợp NSM có chứa fluor, nồng độ tích lũy đạt tới 0,5 mM [7]. Nồng độ này đủ để ức chế sự sinh axit của vi khuẩn, vì thế nó có tác dụng lâu dài ngay cả khi các sản phẩm vệ sinh răng miệng không còn được sử dụng nữa. Đây cũng là một chỉ số quan trọng để đánh giá tác dụng của một chất kháng khuẩn sâu răng tiềm năng.

Bảng 2. Khả năng tích lũy của α -mangostin trên biofilm của vi khuẩn *S. mutans*

Biofilm	Diện tích peak (HPLC)	α -mangostin (μ g/biofilm)
Đối chứng	2910 $\pm$ 1240	0
NSM chứa α -mangostin	15200 $\pm$ 3610	2.37 $\pm$ 0,01

Kết quả ở bảng 2 cho thấy diện tích peak xác định bằng HPLC của biofilm xử lý với NSM chứa α -mangostin lớn hơn diện tích peak của mẫu đối chứng 5 lần (15200 so với 2910) điều này cho thấy thấy α -mangostin được tích lũy trên biofilm. Hàm lượng α -mangostin tích lũy đạt 2,37 μ g/biofilm sau 68 giờ nuôi cấy qua 10 lần xử lý 1 phút với dung dịch NSM α -mangostin 150 μ M.

3.4. Đánh giá độ ổn định của sản phẩm

Độ ổn định của sản phẩm NSM chứa α -mangostin đã được đánh giá thông qua các chỉ tiêu về cảm quan (màu sắc, độ trong), hoạt tính ức chế sự sinh axit và sự có mặt của α -mangostin trong sản phẩm trong thời gian 8 tháng (bảng 3).

Bảng 3. Chỉ tiêu về cảm quan, hoạt tính ức chế sự sinh axit của NSM

Thời gian (tháng)	Màu sắc	Kết tủa	Hoạt tính ức chế sự sinh axit	Định tính α -mangostin
0	Vàng nhạt	-	+++	+
2	Vàng nhạt	-	+++	+
4	Vàng nhạt	-	++	+
6	Vàng nhạt	-	++	+
8	Vàng nhạt	-	++	+

Bảng 3 cho thấy sau 8 tháng bảo quản ở nhiệt độ phòng, NSM chứa α -mangostin vẫn giữ nguyên được màu sắc, không thấy xuất hiện kết tủa và duy trì được hoạt tính ức chế sinh axit trong tế bào vi khuẩn *S. mutans*.

4. KẾT LUẬN

Đã nghiên cứu tạo được NSM chứa α -mangostin ở nồng độ 150 μ M có khả năng ức chế sự sinh axit và sự hình thành biofilm. pH môi trường nuôi cấy vi khuẩn xử lý với NSM là 4,9, cao hơn so với mẫu đối chứng 1 đơn vị pH. Khả năng hạn chế sự tạo biofilm của dung dịch NSM chứa α -mangostin giảm 32% so với đối chứng. α -mangostin tích lũy trên biofilm với hàm lượng đạt 2,37 μ g/biofilm sau 10 lần xử lý biofilm với dung dịch NSM được nghiên cứu.

Độ ổn định của dung dịch NSM sau 8 tháng vẫn đạt yêu cầu về các chỉ tiêu cảm quan và hoạt tính ức chế sự sinh axit của vi khuẩn *S. mutans*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thị Mai Phương, Phan Tuấn Nghĩa, Đỗ Ngọc Liên, Nguyễn Thị Ngọc Dao, *Thành phần polyphenol vỏ quả măng cụt (Garcinia mangostana L.) và tác dụng ức chế sự sinh acid của vi khuẩn sâu răng Streptococcus mutans*, Tạp chí Dược học, 2004, **44**:18-21.
2. Trần Văn Trường, Trịnh Đình Hải, Spencer J. A., Thomson R. K., *Điều tra sức khỏe răng miệng toàn quốc ở Việt Nam 1999 - 2000*, Tạp chí Y học Việt Nam, 2000, **8**:1-10.
3. Trịnh Đình Hải, *Giáo trình dự phòng sâu răng*, Nhà xuất Y học, 2004.
4. Bowen WH, Koo H., *Biology of Streptococcus mutans-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms*, Caries Res, 2011, **45**:69-86.
5. Ho CH, Huang YL, Chen CC, *Garcinin E, a xanthone derivatives, has potent cytotoxic effect against hepatocellular carcinoma cell lines*, Planta Med, 2002, **68**(11):975-979.
6. Koo H, Duarte S, Muarata RM, Scott-Anne K, Gregoire S, Warson GE, Singh AP, Vorsa N., *Influence of cranberry proanthocyanidins on formation of biofilms by Streptococcus mutans on saliva-coated apatitic surface and on dental caries development in vivo*, Caries Res, 2010, **44**(2):116-126.
7. Marsh P., Martin M.V., *Oral microbiology*, 4th edition, Reed Educational and Professional Publishing Ltd. USA, 2000.
8. Murata RM, Branco-de-Almeida LS, Franco EM, Yatsuda R, dos Santos MH, de Alencar SM, Koo H, Rosalen PL, *Inhibition of Streptococcus mutans biofilm accumulation and development of dental caries in vivo by 7-epiclusianone and fluoride*, Biofouling, 2010, **26**(7):72-865.
9. Nguyen P.T.M, Marquis R.E., *Antimicrobial actions of alpha-mangostin against oral Streptococci*, Can. J. Microbiol, 2011, **57**(3):25-217.
10. Nguyen PTM, Megan L. Falsetta, Geelsu Hwang, Mireya Gonzalez, Hyun Koo, *α -Mangostin disrupts the development of Streptococcus mutans biofilms and facilitates its mechanical removal*, Plos One, 2014, 9(10):e111312 doi: 10.1371/journal.pone.0111312.

SUMMARY

EVALUATION OF THE ANTI TOOTH DECAY EFFECT OF THE MOUTHWASH CONTAINING α -MANGOSTIN

The mouthwash containing 150 μ M α -mangostin concentration was created which had inhibiting activities against the acid secretion and biofilm formation by bacterial *S. mutans* as well as commercial X mouthwash. The final pH value of cultivation medium after using this mouthwash liquid was approximate 4.9, higher than the control sample using ethanol solvent. Our mouthwash product decreases biofilm formation to 32% in comparison with the control sample. The *S. mutans* inhibiting activity of the mouthwash product remained unchanged after 8 months storage at room temperature.

Từ khóa: Nước súc miệng, mouth rinse, *Streptococcus mutans*, α -mangostin, biofilm.

Nhận bài ngày 03 tháng 4 năm 2017

Hoàn thiện ngày 23 tháng 6 năm 2017

⁽¹⁾ *Viện Y sinh nhiệt đới, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga*

⁽²⁾ *Viện Sinh thái nhiệt đới, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga*

⁽³⁾ *Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam*