Evaluation of in *vitro* antioxidant properties and *in vivo* hepatoprotective effect of *Chamaecrista pumila* (Lam.) K. Larsen

Vu Thanh Binh[1#], Pham Duc Vinh[1#], Nguyen Manh Tuyen[1], Chu Thi Thanh Huyen[1], Ha Van Oanh[1], Nguyen Thuy Duong[1*]

1Hanoi University of Pharmacy, 13-15 Le Thanh Tong, Hoan Kiem, Hanoi

 # These two authors contributed equally to this work

** Corresponding author: Nguyen Thuy Duong, email: duongnt@hup.edu.vn*

ABSTRACT

Antioxidant and hepatoprotective effects of different fractions of extract from *Chamaecrista pumila* (Lam.) *K. Larsen* were investigated by employing in vitro and in vivo models, respectively.

In vitro antioxidant activity of ethanol extract and its *n*-hexan, ethyl acetate, chloroform, *n*-butanol and remained water fraction extracts obtained from *C. pumila* was assessed by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical and superoxide radical scavenging assay. *In vitro* results revealed that the ethanol extract had potential DPPH radical and superoxide radical scavenging activities with an IC_{50} value of 18.65 (9.91-35.08) µg/ml and 12.33 (5.24-29.02) µg/mL, respectively. Among fractions extracted from ethanol extract, the ethyl acetate fraction possessed highest antioxidant property through DPPH radical scarvenging activity with an IC_{50}value of 9.98 (6.23-16.01) µg/mL and superoxide radical scavenging activity with an IC_{50} value of 8.38 (6.11-11.50) µg/mL. *In vivo* hepatoprotective activities of ethanolic extract and ethyl acetate fraction obtained from *C. pumila* were investigated in mice using a model of paracetamol-induced hepatotoxicity. Ethanol extract of *C. pumila* at doses of 250 mg/kg and 500 mg/kg decreased levels of serum transaminases ASAT. Ethyl acetate fraction of *C. pumil*a at doses of 250 mg/kg and 500 mg/kg significantly improved the parameters of paracetamol-induced liver injury including ASAT, ALAT and superoxide dismutase (SOD) activities; ethyl acetat fraction of *C. pumila* at dose of 500 mg/kg also exhibited *in vivo* antioxidant properties by reducing malondialdehyde (MDA) content and increasing glutathione (GSH) content.

Keywords: Chamaecrista pumila (Lam.) K.Larsen, antioxidants, liver-protection.

Đánh giá tác dụng chống oxy hóa và bảo vệ gan trên thực nghiệm của cây muồng lùn

Vũ Thanh Bình[1#], Phạm Đức Vịnh[1#], Nguyễn Mạnh Tuyển[1], Chử Thị Thanh Huyền[1], Hà Vân Oanh[1], Nguyễn Thùy Dương[1*]
[1]*Trường Đại học Dược Hà Nội*
 # Hai tác giả có đóng góp như nhau cho nghiên cứu này
** Tác giả liên hệ: Nguyễn Thùy Dương, email: duongnt@hup.edu.vn*
(Ngày gửi đăng:30/5/2023 - Ngày duyệt đăng: 15/7/2023)

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được thực hiện để đánh giá tác dụng chống oxy hóa và bảo vệ gan của muồng lùn. Sàng lọc tác dụng chống oxy hóa của cao toàn phần và các phân đoạn *n*-hexan, ethyl acetat, chloroform, *n*-butanol và phân đoạn nước còn lại bằng thử nghiệm dọn gốc tự do 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) và gốc tự do superoxid. Kết quả cho thấy cao toàn phần có tác dụng dọn gốc tự do DPPH và superoxid với IC_{50} tương ứng là 18,65 (9,91 - 35,08) và 12,33 (5,24 - 29,02) µg/ml. Trong số các phân đoạn, phân đoạn ethyl acetat có tác dụng dọn gốc tự do DPPH và superoxid tốt nhất với giá trị IC_{50} lần lượt là 9,98 (6,23 - 16,01) và 8,38 (6,11 - 11,50) µg/ml. Đánh giá tác dụng bảo vệ gan trên mô hình gây viêm gan bằng paracetamol ở chuột nhắt trắng. Cao toàn phần muồng lùn liều 250 và 500 mg/kg làm giảm hoạt độ ASAT; cao phân đoạn ethyl acetat liều 250 mg/kg và 500 mg/kg làm giảm hoạt độ ASAT, ALAT, tăng hoạt độ SOD gan; cao phân đoạn ethyl acetat liều 500 mg/kg còn làm giảm hàm lượng MDA, tăng hàm lượng GSH trong gan.

Từ khóa: Chamaecrista pumila (Lam.) K.Larsen, chống oxy hóa, bảo vệ gan.

Đặt vấn đề

Muồng lùn (còn được gọi là Me đất) có tên khoa học là *Chamaecrista pumila* (Lam.) K.Larsen (tên đồng danh là *Cassia pumila* Lam., *Cassia prostrata* Roxb. hay *Senna prostrata* Roxb.), họ Đậu (Fabaceae) [1]. Cây mọc hoang nhiều nơi như Hà Tây, Ninh Bình, Thanh Hóa, Gia Lai, Đắc Lắc, Đồng Nai…Cây cũng phân bố ở Ấn Độ, Myanma, Trung Quốc, Lào Camphuchia, Thái Lan [2]. Kinh nghiệm dân gian thường dùng phần trên mặt đất của cây Muồng lùn đun nước uống giúp mát gan, giải độc trong một số bệnh như xơ gan, viêm gan… Tuy nhiên, hiện nay có rất ít công bố về tác dụng sinh học của cây muồng lùn, trong đó hầu như chỉ tập trung vào tác dụng kháng khuẩn và kháng nấm [3]. Vì vậy, nghiên cứu này tập trung nghiên cứu tác dụng theo hướng chống oxi hóa và đánh giá tác dụng bảo vệ gan của cây muồng lùn.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Cây muồng lùn với tên khoa học *Chamaecrista pumila* (Lam.) K.Larsen thuộc họ Đậu (Fabaceae) được thu hái tự nhiên tại Lạc

Sơn, Hòa Bình vào tháng 9 năm 2016. Mẫu nghiên cứu được giám định tên khoa học bởi ThS Nghiêm Đức Trọng - Trường Đại học Dược Hà Nội. Mẫu tiêu bản mang số hiệu HNIP/18301/17 được lưu tại Phòng Tiêu bản cây thuốc

Bộ môn Thực vật - Trường Đại học Dược Hà Nội.

Chiết xuất cao toàn phần và các cao chiết phân đoạn được thực hiện như sau: 12 kg phần trên mặt đất của cây muồng lùn được chiết ngâm bằng ethanol 96%, cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm, được 1047,9 cao ethanol toàn phần (độ ẩm 19,6%). Cao phân đoạn thu được từ chiết phân bố lần lượt với các dung môi hữu cơ *n*-hexan, dichloromethan, ethyl acetat và *n*-butanol với khối lượng tương ứng *n*-hexan (105,0 g; độ ẩm 3,7%), dichloromethan (150,0 g; độ ẩm 3,9%), ethyl acetat (116,0 g; độ ẩm 4,2%), *n*-butanol (125,5 g; độ ẩm 4,5%) và phân đoạn nước còn lại (360,5 g; độ ẩm 8,3%) được dùng để tiến hành các thí nghiệm đánh giá tác dụng sinh học.

Động vật thí nghiệm

Chuột nhắt trắng chủng *Swiss*, giống đực, khỏe mạnh, cân nặng 20- 25g do viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương cung cấp. Động vật được nuôi trong điều kiện tại Phòng nghiên cứu Dược lý, Trường Đại học Dược Hà Nội bằng thức ăn tiêu chuẩn do Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương cung cấp, uông nước tự do.

Thiết bị thí nghiệm

Hệ thống định lượng sinh hoá bán tự động TC 3300 Plus (Teco Diagnostics, Hoa Kỳ); hệ thống ELISA gồm thiết bị đọc khay vi thể (Biotek, Hoa Kỳ) và máy ủ lắc khay (Awareness, Hoa Kỳ).

Hóa chất

Nitroblue tetrazolium (NBT), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), xanthin oxidase từ sữa bò (0,8 U/mg protein, 13 mg protein/ml), xanthin ≥ 99%, (Sigma Aldrich); quercetin (chất chuẩn hàm lượng 90,32% - Viện kiểm nghiệm thuốc Trung ương); Na_2HPO_4, KH_2PO_4, dimethyl sulfoxid (Merck); silymarin (biệt dược Legalon® (Meda Pharma, Bỉ, số lô B1700172); paracetamol (A7085-Sigma Aldrich); bộ kit định lượng ASAT - aspartat aminotransferase và ALAT - alanin aminotransferase (Biosystems, Tây Ban Nha). Các hóa chất nghiên cứu khác đạt tiêu chuẩn nghiên cứu (Sigma Aldrich).

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp đánh giá khả năng dọn gốc tự do DPPH của các phân đoạn muồng lùn

Mẫu thử là cao toàn phần và các phân đoạn được hòa tan trong DMSO sau đó được pha loãng bằng methanol để thu được dãy nồng độ 300, 100, 50, 30, 10 và 3 µg/ml. Quercetin được sử dụng làm chất đối chứng với dãy nồng độ 30, 10, 5, 3, 2 và 1 µg/ml. Thí nghiệm đánh giá tác dụng dọn gốc tự do DPPH được tiến hành trên đĩa 96 giếng theo phương pháp đã được mô tả trước đây [4], [5], [6]. Trên mỗi đĩa 96 giếng (Costar 3596 - Corning, Mỹ) gồm có các giếng thử và giếng chứng. Lần lượt thêm vào các giếng 20 µl dung dịch thử (dung dịch đối chiếu quercetin hoặc methanol đối với mẫu trắng) và 180 µl dung dịch DPPH (100 µM trong methanol). Sau khi lắc đều, đĩa được giữ trong bóng tối 30 phút. Sau đó, đo độ hấp thụ của các giếng ở bước sóng 517 nm. Tác dụng dọn gốc tự do DPPH được đánh giá thông qua tỷ lệ giảm mật độ quang (OD) của mẫu thử so với mẫu chứng: $I = \frac{\Delta OD_{\text{chứng}} - \Delta OD_{\text{thử}}}{\Delta OD_{\text{chứng}}} x\ 100\%$

(trong đó, $\Delta OD_{\text{chứng}} = OD_{\text{chứng}} - OD_{\text{trắng chứng}}$;

$\Delta OD_{\text{thử}} = OD_{\text{thử}} - OD_{\text{trắng thử}}$).

Tác dụng dọn gốc DPPH của mẫu nghiên cứu được đánh giá theo trị số IC_{50} là giá trị nồng độ (tính toán theo lý thuyết) mà tại đó mẫu thử ức chế 50 % sự có mặt của DPPH dạng gốc tự do trong hỗn hợp phản ứng so mẫu chứng. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Phương pháp đánh giá khả năng dọn gốc tự do superoxid anion $O_2^{\cdot-}$ của các phân đoạn muồng lùn

Mẫu thử là cao toàn phần và các phân đoạn muồng lùn được hòa tan trong DMSO sau đó được pha loãng bằng dung dịch đệm

carbonat (50 nM, pH=10,2) để thu được dãy nồng độ 100, 50, 30, 10, 3 và 1 µg/ml. Quercetin được sử dụng làm chất đối chứng với dãy nồng độ 10, 5, 3, 2, 1, 0,5 và 0,25 µg/ml.

Đánh giá tác dụng dọn gốc tự do SOD của mẫu thử theo quy trình được mô tả bởi Beauchamp C và cộng sự, với một số thay đổi cho phù hợp với điều kiện thí nghiệm [7]. Phản ứng được thực hiện trên đĩa 96 giếng. Hỗn hợp phản ứng trong mỗi giếng bao gồm: 40 µl đệm carbonat pH 10,2 (50 mM) có chứa EDTA 0,1 mM; 20 µl mẫu thử (hoặc chất đối chiếu quercetin) của các nồng độ khác nhau; 100 µl dung dịch xanthin 200 µM (pha trong đệm carbonat); 20 µl dung dịch NBT 100 µM (pha trong đệm carbonat); 20 µl enzym xanthin oxidase nồng độ 0,06 U/ml. Theo dõi động học của phản ứng bằng cách đo mật độ quang của các giếng tại bước sóng 560 nm. Tỷ lệ ức chế gốc tự do SOD của mẫu thử tại một nồng độ được tính theo công thức: % ức chế SOD = (ΔODtrắng/phút – ΔODthử/phút) x 100/ ΔODtrắng/phút. Tác dụng dọn gốc superoxid anion của mẫu thử được đánh giá theo trị số IC_{50} là giá trị nồng độ (tính toán theo lý thuyết) mà tại đó mẫu thử ức chế 50 % sự tạo thành sản phẩm khử của NTB trong hỗn hợp phản ứng so mẫu chứng. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Phương pháp đánh giá tác dụng bảo vệ gan của cây muồng lùn

Tiến hành mô hình gây tổn thương gan bằng paracetamol [8], với chứng dương là silymarin. Chuột nhắt trắng được chia ngẫu nhiên thành 7 lô, mỗi lô 8 động vật:

Lô 1 (chứng sinh lý): uống nước cất 0,1 ml/10g cân nặng.

Lô 2 (chứng bệnh lý): uống nước cất 0,1 ml/10g cân nặng + gây tổn thương gan.

Lô 3 (chứng dương-SLM): uống silymarin liều 100 mg/kg cân nặng + gây tổn thương gan.

Lô 4 (MTP1): uống cao muồng lùn toàn phần với liều hàng ngày 250 mg/kg cân nặng + gây tổn thương gan.

Lô 5 (MTP1): uống cao muồng lùn toàn phần với liều hàng ngày 500 mg/kg cân nặng + gây tổn thương gan.

Lô 6 (MET1): uống cao muồng lùn phân đoạn EtOAc với liều hàng ngày 250 mg/kg cân nặng + gây tổn thương gan.

Lô 7 (MET2): uống cao muồng lùn phân đoạn EtOAc với liều hàng ngày 500 mg/kg cân nặng + gây tổn thương gan.

Các lô uống nước hoặc mẫu thử liên tục trong thời gian 7 ngày, ngày thứ 8 sau khi sử dụng mẫu thử 1 giờ, chuột ở tất cả các lô (trừ lô chứng sinh lý) được gây độc tế bào gan bằng cách cho uống paracetamol với liều 400 mg/kg. Sau 24 giờ kể từ khi uống paracetamol, lấy máu ở các lô để xác định hoạt độ ASAT, ALAT huyết thanh, đồng thời lấy các mẫu gan để định lượng MDA, GSH dạng khử, hoạt độ SOD trong gan.

Các thông số đánh giá: hoạt độ ASAT, ALAT huyết thanh được định lượng trên máy sinh hóa bán tự động TC3300 Plus, sử dụng bộ kit và quy trình định lượng tương ứng từ Biosystems (Tây Ban Nha). Hàm lượng MDA trong gan được định lượng theo quy trình được mô tả bởi Wasowicz [9]. Hàm lượng GSH trong gan được định lượng bằng thuốc thử Ellman [10]. Hàm lượng SOD trong gan được định lượng trong dịch nghiền đồng thể gan theo quy trình được mô tả bởi Takada Y. và cộng sự [11].

Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được biểu thị bằng giá trị trung bình ± sai số chuẩn. So sánh giữa các lô thử với lô chứng bằng kiểm định t-test Student, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p< 0,05$. Tính IC_{50} và khoảng tin cậy 95 % của IC_{50} bằng phân tích tương quan nồng độ - đáp ứng theo mô hình sigmoid với $R^2>0,9$ trên phần mềm GraphPad Prism.

Kết quả nghiên cứu

Kết quả đánh giá tác dụng dọn gốc tự do DPDH của cao toàn phần và các phân đoạn muồng lùn

Kết quả đánh giá khả năng dọn gốc tự do DPDH của cao toàn phần và các cao phân đoạn muồng lùn được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1. Khả năng dọn gốc tự do DPDH của cao toàn phần và các phân đoạn muồng lùn

Mẫu thử	IC_{50} (µg/ml)	Khoảng tin cậy 95% của IC_{50}
Quercetin	2,10	1,53 - 2,90
Cao toàn phần	**18,65**	**9,91 - 35,08**
Phân đoạn *n*-Hexan	81,94	49,65 - 135,20
Phân đoạn ethyl acetat	**9,98**	**6,23 - 16,01**
Phân đoạn dicloromethan	94,19	83,00 - 106,90
Phân đoạn *n*-Butanol	300,00	212,90 - 422,80
Phân đoạn nước	245,70	188,50 - 320,20

Bảng 1 cho thấy, chứng dương quercetin thể hiện khả năng dọn gốc tự do DPPH *in vitro* với giá trị IC_{50} là 2,10 µg/ml. Các mẫu thử từ muồng lùn đều thể hiện tác dụng dọn gốc tự do DPPH với khả năng tăng dần theo thứ tự sau: phân đoạn *n*-Butanol < phân đoạn nước < phân đoạn dicloromethan < phân đoạn *n*-Hexan < cao toàn phần < phân đoạn ethyl acetat. Cao toàn phần muồng lùn có khả năng dọn gốc tự do DPPH *in vitro* với giá trị IC_{50} là 18,65 µg/ml. Trong số các phân đoạn thử, ethyl acetat thể hiện khả năng dọn gốc tự do DPPH *in vitro* tốt nhất với giá trị IC_{50} là 9,98 µg/ml. Tiếp đến là phân đoạn *n*-hexan và dicloromethan có khả năng gần tương tự nhau với IC_{50} lần lượt là 81,94 và 94,19 µg/ml. Phân đoạn nước và *n*-Butanol thể hiện tác dụng này ở mức thấp.

Kết quả đánh giá tác dụng dọn gốc tự do SOD của cao toàn phần và các phân đoạn muồng lùn

Kết quả đánh giá khả năng dọn gốc tự do SOD của cao toàn phần và các cao phân đoạn muồng lùn được thể hiện trong Bảng 2.

Kết quả Bảng 2 thể hiện chứng dương quercetin có khả năng dọn gốc tự do SOD tốt với IC_{50} là 1,23 µg/ml. Cao toàn phần muồng lùn tiếp tục thể hiện tác dụng với IC_{50} là 12,33 µg/ml. Trong số các phân đoạn thử, một lần

Bảng 2. Khả năng dọn gốc tự do SOD của cao toàn phần và các phân đoạn muồng lùn

Mẫu thử	IC_{50} (µg/ml)	Khoảng tin cậy 95% của IC_{50}
Quercetin	1,23	1,12 - 1,36
Cao toàn phần	**12,33**	**5,24 - 29,02**
Phân đoạn *n*-Hexan	94,03	74,78 - 118,20
Phân đoạn ethyl acetat	**8,38**	**6,11 - 11,50**
Phân đoạn dicloromethan	25,26	16,64 - 38,36
Phân đoạn *n*-Butanol	-	-
Phân đoạn nước	202,40	45,37 - 902,60

nữa ethyl acetat thể hiện tác dụng mạnh nhất với IC_{50} là 8,38 µg/ml. Tiếp đến là phân đoạn dicloromethan với IC_{50} là 25,26 µg/ml và *n*-Hexan với IC_{50} là 94,03 µg/ml. Phân đoạn *n*-butanol và nước tiếp tục thể hiện tác dụng yếu nhất.

Như vậy, trong cả hai thử nghiệm *in vitro* sàng lọc tác dụng dọn gốc tự do DPPH và superoxid anion (O_2^{-}), nhóm nghiên cứu nhận thấy phân đoạn ethyl acetat và cao toàn phần đều có tác dụng. Trong các phân đoạn, ethyl acetat có tác dụng dọn gốc tự do tiềm năng nhất. Chính vì vậy, cao toàn phần và phân đoạn ethyl acetat được lựa chọn đưa vào thực nghiệm đánh giá tác dụng bảo vệ gan, chống oxy hóa *in vivo*.

Kết quả đánh giá tác dụng bảo vệ gan trên động vật thực nghiệm của cao toàn phần và phân đoạn ethyl acetat muồng lùn

Ảnh hưởng của các cao muồng lùn đến hoạt độ các enzym gan ALAT, ASAT huyết thanh chuột bị gây độc gan bằng paracetamol

Kết quả được trình bày trong bảng 3.

Bảng 3 cho thấy, lô chứng bệnh bị gây độc gan bằng bằng paracetamol với liều 400 mg/kg có sự tăng rõ rệt hoạt độ ASAT, ALAT huyết thanh so với lô chứng sinh lý (p <0,001). Ở lô dùng silymarin liều 100 mg/kg, hoạt độ ASAT và ALAT huyết thanh đều giảm so với lô chứng bệnh (p < 0,05). Cao toàn phần muồng lùn ở cả 2 mức liều thử 250 mg/kg và 500

Bảng 3. Tác dụng của các cao muồng lùn đến hoạt độ ALAT, ASAT huyết thanh chuột bị gây độc gan bằng paracetamol

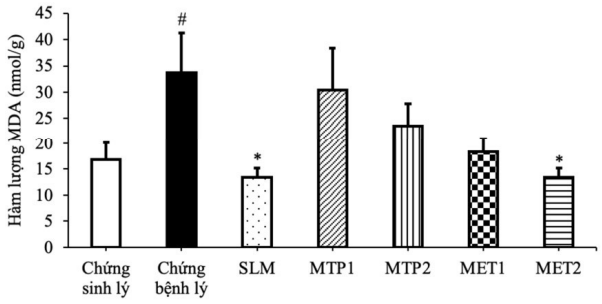
Lô thí nghiệm	ALAT (UI/L)	Giảm ALAT so với chứng bệnh	ASAT (UI/L)	Giảm ASAT so với chứng bệnh
Chứng sinh lý	61,6 ± 4,6		93,5 ± 9,71	
Chứng bệnh lý	681,0 ± 75,9##		585,5 ± 67,5##	
SLM 100 mg/kg	448,0 ± 44,0*	34,2%	332,9 ± 59,8*	43,1%
MTP1 250 mg/kg	641,1 ± 97,1	5,9%	367,2 ± 47,8*	37,3%
MTP2 500 mg/kg	603,2 ± 47,1	11,4%	401,8 ± 47,2*	31,4%
MET1 250 mg/kg	281,5 ± 65,6**	58,7%	180,9 ± 72,8**	69,1%
MET2 500 mg/kg	343,1±71,8*	49,6%	264,6 ± 65,8**	54,8%

*Số liệu biểu diễn dưới dạng M ± SE; ##: khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh lý (p <0,001); *: khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh lý (p < 0,05); **: khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh lý (p<0,01); n=8.*

mg/kg tuy không làm giảm hoạt độ ALAT nhưng có làm giảm hoạt độ ASAT lần lượt tương ứng là 37,3% và 31,4% ((*p* < 0,05). Cao phân đoạn ethyl acetat ở cả 2 mức liều thử đều thể hiện tác dụng rõ rệt trên cả 2 thông số nghiên cứu. Lô MTET1 làm giảm ALAT và ASAT khá mạnh so với lô chứng bệnh, tỷ lệ giảm lần lượt là 58,7% và 69,1% (*p* < 0,01) trong khi đó lô MTET2 làm giảm các thông số này tương ứng là 49,6% (*p* < 0,05) và 54,8% (*p* < 0,01).

Ảnh hưởng của các cao muồng lùn đến hàm lượng MDA trong gan chuột bị gây độc bằng paracetamol

Kết quả được biểu diễn ở Hình 1.



Hình 1. Ảnh hưởng của các cao muồng lùn đến hàm lượng MDA trong gan chuột bị gây độc gan bằng paracetamol.

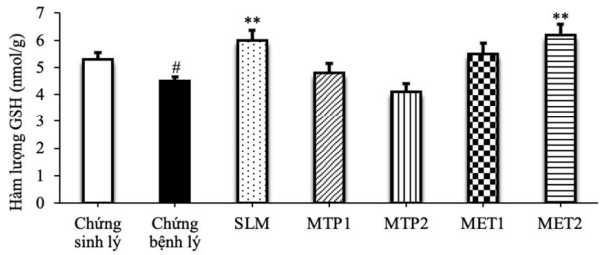
*#: khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh lý (p < 0,05); *: khác biệt ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh lý (p < 0,05); n=8.*

Hình 1 cho thấy, khi gây độc gan bằng paracetamol, hàm lượng MDA có xu hướng tăng cao so với bình thường. Chứng dương silymarin liều 100 mg/kg làm giảm hàm lượng MDA trong gan 60,4% so với lô chứng bệnh lý (*p* < 0,05). Ở lô dùng cao phân đoạn ethyl acetat muồng lùn liều 500 mg/kg, thông số này giảm 60,3% so với lô bệnh lý (*p* < 0,05). Cao toàn phần muồng lùn ở cả 2 mức liều thử và phân đoạn ethyl acetat liều 250 mg/kg tuy có xu hướng làm giảm MDA gan so với chứng bệnh lý nhưng mức giảm này chưa có ý nghĩa thống kê.

Ảnh hưởng của các cao muồng lùn đến hàm lượng GSH trong gan chuột bị gây độc bằng paracetamol

Kết quả được thể hiện ở Hình 2.

Kết quả ở hình 2 cho thấy, sau khi gây độc gan bằng paracetamol, hàm lượng MDA của lô chứng bệnh giảm so với lô chứng sinh lý. Chứng dương silymarin liều 100 mg/kg làm tăng hàm lượng GSH trong gan 32,9% so với lô chứng bệnh lý (*p* < 0,01). Chuột dùng cao phân đoạn ethyl acetat muồng lùn liều 500



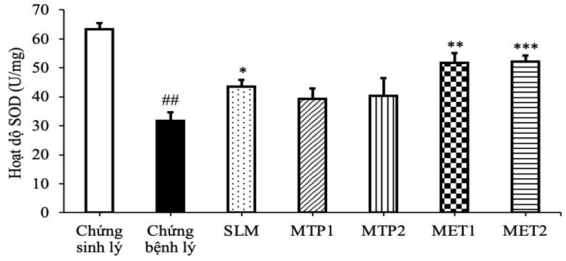
Hình 2. Ảnh hưởng của các cao muồng lùn đến hàm lượng GSH trong gan chuột bị gây độc gan bằng paracetamol.

*#: khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh lý ($p < 0,05$); **: khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh lý ($p < 0,01$); n=8.*

mg/kg có hàm lượng GSH tăng đáng kể 38,0% so với chứng bệnh lý ($p < 0,01$). Cao toàn phần muồng lùn ở cả 2 múc liều thử và phân đoạn ethyl acetat liều 250 mg/kg không thể hiện tác dụng này.

Ảnh hưởng của các cao muồng lùn đến hàm lượng GSH trong gan chuột bị gây độc bằng paracetamol

Kết quả được biểu diễn ở Hình 3.



Hình 3. Ảnh hưởng của các cao muồng lùn đến hoạt độ GOD trong gan chuột bị gây độc gan bằng paracetamol.

*##: khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh lý ($p < 0,001$); *: khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh lý ($p < 0,05$);**: khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh lý ($p < 0,01$); n=8.*

Kết quả ở hình 3 thể hiện việc gây độc gan bằng paracetamol dẫn đến hoạt độ SOD gan ở lô chứng bệnh giảm rõ rệt so với lô chứng sinh lý. Chứng dương silymarin liều 100 mg/kg làm tăng có ý nghĩa hoạt độ SOD trong gan so với chứng bệnh, với tỷ lệ tăng là 37,6% ($p < 0,05$). Cao phân đoạn ethyl acetat ở cả 2 mức liều thử 250 mg/kg và 500 mg/kg đều làm tăng đáng kể hoạt độ SOD trong gan so với lô chứng bệnh lý, mức tăng lần lượt tương ứng là 64,1,2% ($p < 0,01$) và 65,4% ($p < 0,001$). Cao toàn phần muồng lùn tuy có xu hướng làm tăng hoạt độ SOD gan nhưng sự tăng này không có ý nghĩa thống kê.

Bàn luận

Nhiều tác giả cho rằng các gốc tự do có liên quan đến hiện tượng viêm và nhiều bệnh lý liên quan đến viêm trong đó có viêm gan. Một số loại tổn thương viêm đã được xác định là do tác dụng các chất trung gian của phản ứng oxy hóa. Vì vậy, tác dụng chống oxy hóa giúp làm giảm thiểu tổn thương tế bào và rối loạn chức năng trong một số hội chứng viêm [12], [13]. Vì vậy, để sàng lọc tác dụng chống oxy hóa, dọn gốc tự do của cao toàn phần và các phân đoạn muồng lùn trước khi đưa vào thử nghiệm trên mô hình gây viêm gan bằng paracetamol, nhóm nghiên cứu đã sử dụng phương pháp đánh giá khả năng dọn gốc tự do DPPH *in vitro* và superoxid anion ($O_2^{-\cdot}$) *in vitro*. Đây là hai phương pháp đã được nhiều tác giả sử dụng để đánh giá tác dụng chống oxy hóa, dọn gốc tự do của các dược liệu [4], [14]. Kết quả của hai thử nghiệm *in vitro* này cho thấy, cao toàn phần và phân đoạn ethyl acetat muồng lùn thể hiện tác dụng chống oxy hóa rất khả quan. Trong đó, tác dụng dọn gốc tự do DPPH và $O_2^{-\cdot}$ in vitro của phân đoạn ethyl acetat có xu hướng tốt nhất trong các mẫu thử với IC_{50} tương đối thấp, đều dưới 10 µg/ml. Như vậy, cao toàn phần và phân đoạn ethyl acetat muồng lùn có tác dụng dọn gốc tự do, chống oxy hóa tiềm năng và là cơ sở để được lựa chọn đưa vào thực nghiệm đánh giá tác dụng bảo vệ gan *in vivo*.

Hoạt độ ASAT và ALAT là một chỉ báo của tổn thương gan, thường tăng trong những trường hợp phơi nhiễm các tác nhân gây độc gan trong đó có paracetamol. Trên mô hình gây độc gan bằng paracetamol, cao toàn phần muồng lùn làm giảm hoạt độ ASAT

trong khi phân đoạn ethyl acetat ở cả 2 mức liều thử đều có tác dụng cải thiện đáng kể cả 2 chỉ số ASAT, ALAT. Kết quả nghiên cứu cũng thể hiện cao phân đoạn ethyl acetat còn làm giảm tình trạng stress oxy hóa, một đặc điểm bệnh học đặc trưng của tổn thương gan. Tác dụng này được thể hiện thông qua giảm sản sinh MDA (sản phẩm cuối cùng của quá trình peroxit hóa lipid màng tế bào), cải thiện mức dự trữ các tác nhân chống oxy hóa nội sinh tại gan bao gồm GSH dạng khử và SOD. Như vậy, có sự thống nhất cao giữa thử nghiệm chống oxy hóa *in vitro* và chống oxy hóa *in vivo* của cao phân đoạn ethyl acetat trong nghiên cứu này. Vì vậy, chúng tôi hướng tới giả thuyết tác dụng bảo vệ tế bào gan của cao phân đoạn ethyl acetat muồng lùn có thể liên quan gián tiếp đến việc ngăn cản hình thành gốc tự do và tác dụng chống oxy hóa của nó. Từ phân đoạn này, chúng tôi đã phân lập được 2 hoạt chất mới thuộc nhóm stiben- phenylpropanoid, cả 2 chất đều thể hiện tác dụng ức chế sự sản sinh NO *in vitro* [15]. Các chất mới này cùng với các chất phân lập từ phân đoạn ethyl aceate sẽ tiếp tục được đánh giá khả năng dọn gốc tự do, tác dụng trên tế bào gan *in vitro* ở các nghiên cứu tiếp theo.

Kết luận

Kết quả của nghiên cứu cho phép rút ra kết luận về tác dụng của muồng lùn:

1. Cao toàn phần muồng lùn có tác dụng dọn gốc tự do DPPH và superoxid với giá trị IC_{50} tương ứng là 18,65 (9,91 - 35,08) và 12,33 (5,24 - 29,02) µg/ml. Trong số các phân đoạn, phân đoạn ethyl acetat có tác dụng dọn gốc tự do DPPH và superoxid tốt nhất với giá trị IC_{50} lần lượt là 9,98 (6,23 - 16,01) và 8,38 (6,11 - 11,50) µg/ml.

2. Trên mô hình gây viêm gan bằng paracetamol ở chuột nhắt trắng, cao toàn phần muồng lùn liều 250 và 500 mg/kg làm giảm hoạt độ ASAT; cao phân đoạn ethyl acetat liều 250 mg/kg và 500 mg/kg làm giảm hoạt độ ASAT, ALAT, tăng hoạt độ SOD gan, cao phân đoạn ethyl acetat liều 500 mg/kg còn làm giảm hàm lượng MDA, tăng hàm lượng GSH trong gan.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Võ Văn Chi (2012), "Từ điển cây thuốc Việt Nam", tập 1, 2. NXB Y học Hà, Nội.
2. Đỗ Huy Bích và cộng sự (2006), "Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam", NXB KHKT, tập 2.
3. Sharma R. A., Bhardwaj R., Sharma P. et al (2012), Antimicrobial activity of sennosides from Cassia pumila Lamk, *Journal of Medicinal Plants Research*, 6 (19), 3591-3595.
4. Nguyễn Thị Hồng Anh, Đỗ Thị Hà, Nguyễn Thùy Dương (2020), "Nghiên cứu tác dụng chống oxy hóa và chống viêm trên thực nghiệm của Tỏa dương (*Balanophora laxiflora* Hemsl., Balanophoraceae)", Tạp chí Nghiên cứu Dược và Thông tin thuốc, tập 11, số 4, trang 34-40.
5. Chen Yu-Chi, Sugiyama Yasumasa, et al. (2005), "DPPH radical-scavenging compounds from dou-chi, a soybean fermented food", *Bioscience, biotechnology, and biochemistry,* 69(5), pp. 999-1006.
6. Saito Shizuka, Okamoto Yasuko, et al. (2004), "Effects of alcoholic solvents on antiradical abilities of protocatechuic acid and its alkyl esters", *Bioscience, biotechnology, and biochemistry,* 68(6), pp. 1221-1227.
7. Beauchamp Charles, Fridovich, Irwin (1971), "Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels", *Analytical biochemistry,* 44(1), pp. 276-287.
8. Girish C, Koner, BC,Jayanthi, S,Rao, KR, Rajesh, B,Pradhan, SC (2009), "Hepatoprotective activity of six polyherbal formulations in paracetamol induced liver toxicity in mice", *The Indian Journal Medical Research,* pp. 569-578.

(Xem tiếp trang 17)