

Tác dụng bảo vệ gan của viên nang bạch hoa xà thiệt thảo-bán chi liên trên chuột bị tổn thương gan bởi paracetamol và ethanol

Nguyễn Hoàng Minh¹, Hà Quang Thanh¹, Kim Sô Thia¹, Hà Thị Hồng Linh²,
Dương Hồng Tố Quyên² và Nguyễn Thị Thu Hương³

¹Trung tâm Sâm và Dược liệu TP. Hồ Chí Minh

²Bệnh viện Y học cổ truyền Thành phố Hồ Chí Minh

³Trường Đại học Quốc tế Hồng Bàng

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Tổn thương gan do thuốc hoặc do rượu có thể gây bệnh lý gan cấp hay mạn và ảnh hưởng nghiêm trọng đối với sức khỏe. Bạch hoa xà thiệt thảo-Bán chi liên đã được sử dụng rộng rãi trong y học cổ truyền để hỗ trợ điều trị ung thư. **Mục tiêu:** Đánh giá tác dụng bảo vệ gan trên thực nghiệm của viên nang phối hợp Bạch hoa xà thiệt thảo-Bán chi liên (viên BHXTT-BCL). **Đối tượng và phương pháp:** Viên BHXTT-BCL được đánh giá tác dụng bảo vệ gan trên các chỉ tiêu hoạt độ alanine aminotransaminase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) trong huyết tương và hàm lượng malondialdehyd (MDA) và glutathion (GSH) trong gan chuột nhắt trắng bị gây tổn thương gan bởi paracetamol và ethanol. Silymarin được sử dụng làm đối chiếu. **Kết quả:** Viên BHXTT-BCL liều 1 - 2 viên/kg hoặc silymarin (liều 0,1 g/kg) được cho uống trên chuột bị tổn thương gan bằng paracetamol hoặc ethanol đã làm giảm hoạt độ ALT và AST trong huyết tương, làm giảm MDA và làm tăng GSH trong gan, đạt ý nghĩa thống kê so với chứng không điều trị. **Kết luận:** Viên nang Bạch hoa xà thiệt thảo – Bán chi liên có tác dụng bảo vệ gan khỏi tổn thương stress oxy hóa do paracetamol và ethanol.

Từ khóa: Bạch hoa xà thiệt thảo (*Hedyotis diffusa*) và Bán chi liên (*Scutellaria barbata*), chuột bị tổn thương gan bằng paracetamol hoặc ethanol, stress oxy hóa

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tổn thương gan do thuốc (Drug-induced liver injury: DILI), các chế phẩm bổ sung và sản phẩm có nguồn gốc thảo dược, hoặc các chất ngoại lai khác (xenobiotic) dẫn tới bất thường trong xét nghiệm về gan hoặc rối loạn chức năng gan. Trong 2000 trường hợp suy gan cấp (acute liver failure - ALF) ở Mỹ mỗi năm, số ca liên quan đến thuốc chiếm > 50%, với 37% số ca liên quan đến paracetamol và 13% số ca do các phản ứng có hại của thuốc [1]. Việc lạm dụng paracetamol để tự điều trị hoặc sử dụng quá liều paracetamol có thể gây tổn thương gan nghiêm trọng, hoại tử gan. Bên cạnh đó bệnh gan do rượu cũng là một trong những nguyên nhân chính gây ra tổn thương gan cấp tính và mạn. Nhiều bằng chứng đã được tích lũy về quá trình bệnh lý của bệnh gan do rượu trong suốt nhiều thập kỷ qua [2]. Trong những năm qua, nhiều nghiên cứu đã tập

trung vào việc sử dụng các sản phẩm từ thảo dược có chứa các hợp chất chống oxy hóa, có tác dụng bảo vệ gan nhằm giảm tổn thương gan cấp hoặc mạn. Bạch hoa xà thiệt thảo (*Hedyotis diffusa*) và Bán chi liên (*Scutellaria barbata*) được sử dụng rộng rãi trong y học cổ truyền Trung Quốc và Việt Nam để tăng cường hiệu quả trong điều trị ung thư phổi, ung thư trực tràng, viêm gan cấp, xơ gan [3 - 4]. Trên thế giới đã có các đề tài nghiên cứu được thực hiện dựa trên sự kết hợp của hai loại thảo dược này trên tác dụng chống ung thư [5 - 6]. Acid ursolic và oleanolic được phân lập từ Bạch hoa xà thiệt thảo cho thấy hoạt động chống khối u cụ thể đối với ung thư đại trực tràng COLO205, ung thư gan Hep 3B và các dòng tế bào ung thư phổi H460. Flavonoid toàn phần của Bạch hoa xà thiệt thảo đã cải thiện tổn thương niêm mạc đại tràng, tăng hoạt động

Tác giả liên hệ: PGS.TS. Nguyễn Thị Thu Hương
Email: huongntt1@hiu.vn

superoxide dismutase (SOD) trong mô ruột kết và giảm hoạt động của myeloperoxidase, malondialdehyd (MDA) và oxit nitric (NO) ở chuột mô hình viêm loét đại tràng. Ngoài ra, dịch chiết Bạch hoa xà thiệt thảo cũng có tác dụng ức chế vi rút viêm gan C và vi rút Dengue với giá trị IC_{50} và EC_{50} đối với vi rút viêm gan C lần lượt là 131.1 và 49.5 $\mu\text{g/mL}$. Ở nồng độ mẫu là 25 $\mu\text{g/mL}$, chiết xuất metanol của Bạch hoa xà thiệt thảo làm giảm biểu hiện RNA của vi rút Dengue $30,0 \pm 8.1\%$ [7]. Bán chi liên có chứa hai hoạt chất chính scutebata S và scutebata T đều có hoạt tính làm giảm sự peroxy hóa lipid tế bào và có tác dụng bảo vệ gan; ở nồng độ 100 $\mu\text{g/mL}$, scutebata T ức chế được 16.07% sự peroxy hóa lipid và tăng cường tỉ lệ tế bào gan sống sót dưới tác động của H_2O_2 tới 76.21% so với 54.74% ở đối chứng âm chỉ có H_2O_2 . Bán chi liên có khả năng tăng cường chức năng đại thực bào trong ống nghiệm, gia tăng tế bào lympho, hoạt động tế bào NK và interleukin-2 sản xuất bởi tế bào lách trên mô hình chuột được gây u bằng tế bào ung thư gan [8]. Để góp phần hiện đại hóa sản phẩm phối hợp hai dược liệu Bạch hoa xà thiệt thảo – Bán chi liên theo hướng tác dụng bảo vệ gan, nghiên cứu tiến hành “Đánh giá tác dụng bảo vệ gan của viên nang Bạch hoa xà thiệt thảo – Bán chi liên trên thực nghiệm”, nhằm cung cấp minh chứng khoa học cho ứng dụng lâm sàng của chế phẩm.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Viên nang cứng Bạch hoa xà thiệt thảo – Bán chi liên (BHXTT-BCL) đạt tiêu chuẩn cơ sở; thành phần chứa 375 mg cao đặc quy về khan, tương ứng 1,4 g Bạch hoa xà thiệt thảo và 0.7 g Bán chi liên được Bệnh viện Y học cổ truyền Thành phố Hồ Chí Minh cung cấp (Khối lượng viên 571 mg, lô sản phẩm nghiên cứu với số lô 030921, sản xuất ngày 3/9/2021, hạn dùng thời điểm nghiên cứu 12 tháng và đang tiếp tục theo dõi).

2.2. Động vật thí nghiệm

Các thử nghiệm được thực hiện trên chuột nhắt trắng đực (*Swiss albino*), 5-6 tuần tuổi, trọng lượng 25 ± 2 gram. Chuột và thực phẩm nuôi được cung cấp bởi Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế - TP. Nha Trang. Thể tích cho uống (p.o.) là 10 ml/kg trọng lượng chuột. Các thí nghiệm trên động vật nghiên cứu

cứu được thực hiện theo “Hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y, thuốc từ dược liệu” của Bộ Y tế (ban hành kèm theo quyết định số 141/QĐ – K2ĐT ngày 27/10/2015).

2.3. Hóa chất, thiết bị

Paracetamol (Bột nguyên liệu xuất xứ từ Mallinckrodt Inco., Mỹ-Lot 637514J027 và được cung cấp bởi Công ty Cổ phần Dược phẩm DOMESCO, độ tinh khiết 98%), ethanol 96% (OPC, Việt Nam); acid trichloroacetic (TCA) (Merck, Đức, độ tinh khiết 98%); acid thiobarbituric (TBA, độ tinh khiết 98%), thuốc thử ellman [5,5'-dithiobis - (2-nitrobenzoic acid), độ tinh khiết 99%], silymarin (Sigma, USA, độ tinh khiết 98%), chất chuẩn MDA và GSH dạng khử (Sigma, USA, độ tinh khiết 98%). Các bộ kit định lượng transaminase AST, ALT của Human Co. Ltd., Germany.

Cân phân tích Ohaus (Mỹ), máy ly tâm lạnh (Hermle- Đức), máy đo quang phổ UV-Vis Beckman Coulter (Đức), máy nghiền đồng thể T25 (Đức), máy đo pH (HI210- Hana), máy khuấy gia nhiệt (Arec-Velp), bể điều nhiệt (BH627-CE-Ovan).

2.4. Phương pháp nghiên cứu

- **Thiết kế thử nghiệm:** Thử nghiệm *in vivo*, bố trí ngẫu nhiên, có đánh giá so sánh với lô chứng không điều trị và lô đối chiếu.

- **Khảo sát độc tính cấp đường uống:** Các chuột uống mẫu thử nghiệm cùng một liều đậm đặc qua kim 31 viên BHXTT-BCL/kg thể trọng chuột với thể tích cho uống 20 ml/kg ($n=10$, 5 con chuột nhắt đực và 5 con chuột nhắt cái). Sự đánh giá dựa vào phản ứng toàn ứng hay bất ứng (sống hay chết) nhận thấy ở mỗi chuột trong nhóm sau 72 giờ. Chuột được tiếp tục theo dõi sau 14 ngày uống để ghi nhận những triệu chứng bất thường (nếu có) [9].

- **Khảo sát tác dụng bảo vệ gan trên thực nghiệm gây tổn thương gan bằng paracetamol [10, 11]:** Chuột được chia ngẫu nhiên thành 2 nhóm: Nhóm bình thường và nhóm bệnh lý.

Trong nhóm bình thường, chuột được chia thành 2 lô ($n=8$): Lô chứng sinh lý uống nước cất và lô uống viên BHXTT-BCL liều 2 viên/kg trong 7 ngày.

Trong nhóm bệnh lý, chuột được cho uống paracetamol liều 250 mg/kg trong 14 ngày.

Ngày thứ 8, tiến hành lựa chọn chuột có hàm lượng AST-ALT trên 80 U/L để chia thành 4 lô điều trị (n=8): Lô chứng bệnh lý uống nước cất; lô uống viên BHXTT-BCL liều 1 viên/kg; lô uống viên BHXTT-BCL liều 2 viên/kg và lô uống thuốc đối chiếu là silymarin liều 0,1 g/kg trong 7 ngày tiếp theo.

Sau 7 ngày uống mẫu thử, cả hai nhóm thử nghiệm đều tiến hành lấy máu đuôi chuột để định lượng hoạt độ AST, ALT trong huyết tương (quy trình thực hiện theo Kit AST, ALT của Human- Đức). Sau đó tiến hành kéo giảm đốt sống cổ chuột cho chuột hy sinh rồi mổ tách lấy gan chuột đem định lượng malondialdehyd (MDA), glutathion (GSH).

- Khảo sát tác dụng bảo vệ gan trên thực nghiệm gây tổn thương gan bằng ethanol [11]: Chuột được chia ngẫu nhiên thành 2 nhóm: Nhóm bình thường và nhóm bệnh lý.

Ở nhóm bình thường (ETOH -) sau một giờ cho chuột uống viên nang BHXTT-BCL (1 viên/kg) tiến hành cho chuột uống nước cất, trong vòng 4 tuần. Thực hiện lấy máu đuôi chuột kiểm tra hoạt độ AST, ALT vào tuần 2 và tuần 4 ở các lô thử nghiệm.

Ở nhóm bệnh lý (ETOH +) cho chuột uống nước cất, viên nang BHXTT-BCL (1 viên/kg- 2 viên/kg) hay silymarin (0,1 g/kg). Một giờ sau đó tiếp tục cho chuột uống ethanol chuột theo nồng độ tăng dần từng tuần (10%, 20%, 30%, 40%) trong vòng 4 tuần. Vào tuần thứ 5 các lô thử nghiệm chỉ được cho uống mẫu thử, không cho uống ethanol.

Chuột được lấy máu đuôi chuột định lượng hoạt độ AST, ALT ở các thời điểm sau tuần thứ 2 và thứ 4 của thí nghiệm. Ở tuần thứ 4, tiến hành tách gan chuột để định lượng MDA và GSH trong gan [10, 11].

- Phương pháp định lượng malonyl dialdehyd (MDA) và glutathion (GSH) trong gan: Tách gan chuột và nghiền đồng thể trong dung dịch đệm KCl 1.15% (tỉ lệ 1:10). Sau đó, lấy 2 mL dịch đồng thể (cho định lượng MDA) hoặc 1 mL dịch đồng thể (cho định lượng GSH), bổ sung dung dịch đệm Tris (pH = 7,4) vừa đủ 3 mL. Ủ hỗn hợp phản ứng ở 37°C trong 60 phút và dừng phản ứng bằng 1 mL acid trichloroacetic 10%. Sau đó, đem ly tâm hỗn hợp ở 10.000 vòng/phút trong 10 phút ở 5°C [10 - 11].

Định lượng MDA: Sau khi ly tâm lấy 2 mL

dịch trong cho phản ứng với 1 mL acid thiobarbituric 0.8% ở 100°C trong 15 phút và đo quang ở $\lambda = 532$ nm. Hàm lượng MDA (nM/g protein) được tính theo phương trình hồi quy tuyến tính của chất chuẩn MDA: $y = 0.0796x + 0,0035$ ($R^2 = 0.9992$) [7, 9].

Định lượng GSH: Sau khi ly tâm lấy 1 mL dịch trong cho phản ứng với 0.2 mL thuốc thử Ellman là 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) và thêm đệm phosphat-EDTA vừa đủ 3 mL. Đợi 3 phút ở nhiệt độ phòng và tiến hành đo quang ở bước sóng $\lambda = 412$ nm. Hàm lượng GSH (nM/g protein) được tính theo phương trình hồi quy tuyến tính của chất chuẩn GSH: $y = 0,0043x - 0,0033$ ($R^2 = 0,9997$) [10, 11].

- Đánh giá kết quả: Các số liệu được biểu thị bằng trị số trung bình: $M \pm SEM$ (Standard Error of the Mean – sai số chuẩn của giá trị trung bình) và xử lý thống kê dựa vào phép kiểm One-Way ANOVA và hậu kiểm bằng Student-Newman-Keuls test (phần mềm SigmaStat-3.5, USA). Kết quả thử nghiệm đạt ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95% khi $p < 0.05$.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát độc tính cấp đường uống

Chuột được cho uống viên BHXTT-BCL với liều cao nhất có thể bơm được qua kim cho chuột uống là 31 viên/kg thể trọng chuột. Kết quả cho thấy sau khi uống 72 giờ và sau 14 ngày không có chuột tử vong, do đó không xác định được liều LD_{50} , chỉ xác định được liều $D_{max} = 31$ viên/kg thể trọng chuột. Liều thử tác dụng được lý trên chuột nhất trắng sẽ được chọn trong khoảng an toàn của D_{max} và được ngoại suy từ liều dự kiến sử dụng của viên nang BHXTT-BCL trên lâm sàng theo công thức quy đổi như sau: Liều trên chuột /kg/ngày = (Liều trên người/ngày x 11.76)/thể trọng người 50 kg [9]. Đề tài đã chọn hai liều 1 viên/kg thể trọng chuột và 2 viên/kg thể trọng chuột cho các thử nghiệm khảo sát tác dụng bảo vệ gan.

3.2. Khảo sát tác dụng bảo vệ gan trên thực nghiệm gây tổn thương gan bằng paracetamol

Kết quả từ Bảng 1 và Bảng 2 cho thấy viên BHXTT-BCL liều 2 viên/kg không ảnh hưởng đến hoạt độ AST-ALT trong huyết tương và hàm lượng MDA-GSH trong gan ở chuột bình thường sau 4 tuần cho uống mẫu.

Bảng 1. Hoạt độ AST và ALT của các lô chuột trong thực nghiệm gây tổn thương gan bởi paracetamol

Nhóm	Lô (n=8)	Hoạt độ AST (U/L)	Hoạt độ ALT (U/L)
Paracetamol (-)	Chứng sinh lý	48.75 ± 1.07	49.25 ± 1.16
	Viên BHXTT-BCL liều 2 viên/kg	53.63 ± 3.58	51.88 ± 1.13
Paracetamol (+)	Chứng bệnh lý	145.63 ± 2.50***	157.38 ± 6.97***
	Viên BHXTT-BCL liều 1 viên/kg	70.13 ± 3.98***,###	78.75 ± 4.00***,###
	Viên BHXTT-BCL liều 2 viên/kg	61.38 ± 4.02*,###	74.25 ± 2.96***,###
	Silymarin liều 0,1 g/kg	64.63 ± 4.54**,###	70.00 ± 4.76**,###

(^{*}): $p < 0.05$ so với lô chứng sinh lý; (^{**}): $p < 0.01$ so với lô chứng sinh lý; (^{***}): $p < 0.001$ so với lô chứng sinh lý, (^{###}): $p < 0.001$ so với lô chứng bệnh lý.

Sau 7 ngày điều trị, kết quả Bảng 1 cho thấy lô chứng bệnh lý bị gây tổn thương gan bằng các liều lặp lại paracetamol sau 2 tuần có hoạt độ AST tăng 198.72% và hoạt độ ALT tăng 219.54%, đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh lý ($p < 0.001$). Lô bệnh cho uống silymarin liều 0,1 g/kg có hoạt độ AST và ALT giảm đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh lý ($p < 0.001$). Lô chuột được cho uống viên

BHXTT-BCL liều 1 viên/kg và 2 viên/kg đều thể hiện tác dụng làm giảm từ 51.85%- 57.85% đối với hoạt độ AST và giảm từ 49.96%- 52.82% đối với hoạt độ ALT trong huyết tương và có sự khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh lý. Viên BHXTT-BCL ở cả 2 liều thử nghiệm đều thể hiện tác dụng làm giảm hoạt độ AST, ALT tương tự tác dụng của silymarin liều 0.1 g/kg.

Bảng 2. Hàm lượng MDA và GSH của các lô chuột trong thực nghiệm gây tổn thương gan bởi paracetamol

Nhóm	Lô (n=8)	Hàm lượng MDA (nM/g protein)	Hàm lượng GSH (nM/g protein)
Paracetamol (-)	Chứng sinh lý	31.59 ± 1.38	8,733.39 ± 224.80
	Viên BHXTT-BCL liều 2 viên/kg	30.26 ± 0.95	8,415.94 ± 217.42
Paracetamol (+)	Chứng bệnh lý	66.47 ± 4.78***	5,807.29 ± 138.40***
	Viên BHXTT-BCL liều 1 viên/kg	51.79 ± 4.03***,##	6,974.71 ± 267.94***,##
	Viên BHXTT-BCL liều 2 viên/kg	39.25 ± 2.96###,\$\$	8,081.03 ± 325.55###,\$
	Silymarin liều 0,1 g/kg	31.89 ± 1.70###	7,882.62 ± 311.86###

(^{***}): $p < 0.001$ so với lô chứng sinh lý

(^{###}): $p < 0.01$ so với lô chứng bệnh lý; (^{####}): $p < 0.001$ so với lô chứng bệnh lý

(^{\$}): $p < 0.05$ so với lô cho uống Viên BHXTT-BCL liều 1 viên/kg trong cùng chỉ tiêu khảo sát

(^{\$\$}): $p < 0.01$ so với lô cho uống Viên BHXTT-BCL liều 1 viên/kg trong cùng chỉ tiêu khảo sát

Kết quả Bảng 2 cho thấy lô chứng bệnh lý bị gây tổn thương gan bằng các liều lặp lại paracetamol sau 2 tuần có hàm lượng MDA (marker của tổn thương peroxy hóa lipid) tăng 110.44% và GSH (chất chống oxy hóa nội sinh)

giảm 33.50%; đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh lý ($p < 0.001$; tương ứng). Lô bệnh cho uống silymarin liều 0.1 g/kg có hàm lượng MDA giảm 52,03% và GSH tăng 35.74%, đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh lý

($p < 0.001$; tương ứng); điều này cho thấy silymarin thể hiện tác dụng bảo vệ gan đưa hàm lượng MDA và phục hồi hàm lượng GSH trở về giá trị bình thường khi so sánh với chứng sinh lý ($p = 0.948$; $p = 0.07$; tương ứng). Tương tự, viên nang BHXTT-BCL ở cả 2 liều thử nghiệm 1 viên/kg và 2 viên/kg đều thể hiện tác dụng làm giảm hàm lượng MDA và phục hồi hàm lượng GSH trong gan, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh lý. Trong đó, viên nang BHXTT-BCL ở liều 2 viên/kg thể hiện tác dụng làm giảm hàm lượng MDA và phục hồi hàm lượng GSH trong gan tốt hơn, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với liều 1 viên/kg ($p = 0.01$; $p = 0.014$; tương ứng); điều này cho thấy rằng tác dụng bảo vệ gan của viên nang BHXTT-BCL có sự tương quan về liều thử nghiệm trên mô hình gây tổn thương gan bằng paracetamol. Đồng thời, kết quả còn cho thấy viên nang BHXTT-BCL ở liều 2 viên/kg thể hiện tác dụng tương tự như silymarin liều 0.1 g/kg; đưa trị số MDA và GSH

về gần giá trị bình thường khi so với chứng sinh lý ($p = 0.231$; $p = 0.088$; tương ứng), chứng tỏ viên nang BHXTT-BCL giúp bảo vệ gan chuột trước tổn thương oxy hóa gây bởi paracetamol.

3.2. Khảo sát tác dụng bảo vệ gan trên thực nghiệm gây tổn thương gan bằng ethanol

Kết quả Bảng 3 cho thấy lô chuột bình thường uống viên nang BHXTT-BCL liều 2 viên/kg có hoạt độ AST, ALT trong huyết tương và hàm lượng MDA, GSH trong gan không khác biệt với lô chứng sinh lý ở cùng thời điểm khảo sát; điều này cho thấy viên nang BHXTT-BCL liều 2 viên/kg không ảnh hưởng đến các chỉ số này trên chuột bình thường. Lô chứng bệnh lý có hoạt độ AST không khác biệt so với lô chứng sinh lý sau 2 tuần đầu gây tổn thương gan bởi ethanol, do đó không đánh giá được ảnh hưởng của viên nang BHXTT-BCL cũng như silymarin lên giá trị AST trong huyết tương sau 2 tuần điều trị.

Bảng 3. Hoạt độ AST ở các lô chuột trong thực nghiệm gây tổn thương gan bởi ethanol

Nhóm	Lô (n=8)	Hoạt độ AST (U/L)	
		Tuần 2	Tuần 4
ETOH(-)	Chứng sinh lý	37.50 ± 2,01	41.75 ± 3.22
	Viên BHXTT-BCL liều 2 viên/kg	40.50 ± 2,95	47.88 ± 1.87
ETOH(+)	Chứng bệnh lý	44.50 ± 2.28	60.13 ± 5.58**
	Viên BHXTT-BCL liều 1 viên/kg	39.13 ± 1,29	44.25 ± 1.33##
	Viên BHXTT-BCL liều 2 viên/kg	42.00 ± 2.51	41.13 ± 2.07##
	Silymarin liều 0,1 g/kg	41.13 ± 2,73	43.63 ± 3.79##

(**): $p < 0.01$ so với lô chứng sinh lý; (##): $p < 0.01$ so với lô chứng bệnh lý

Trong khi đó Bảng 4 cho thấy lô chứng bệnh lý có hoạt độ ALT tăng 39.82%, đạt khác biệt thống kê so với lô chứng sinh lý ($p = 0.019$). Hoạt độ ALT ở các lô cho uống BHXTT-BCL liều 1 viên/kg và 2 viên/kg đều giảm (29.11%; 33.12%; tương ứng) đạt ý nghĩa thống kê với lô chứng bệnh lý ($p = 0.03$; $p = 0.017$; tương ứng), tương tự như lô uống silymarin liều 0.1 g/kg ($p = 0.803$; $p = 0.73$; tương ứng). Hoạt độ ALT trở về giá trị bình thường khi so sánh với chứng sinh lý ($p = 0.95$; $p = 0.888$; tương ứng) sau 2 tuần điều trị.

Sau 4 tuần gây tổn thương gan bằng ethanol, kết quả Bảng 3 và Bảng 4 cho thấy hoạt độ

AST, ALT trong huyết tương của lô chứng bệnh lý tăng (44.01%; 62.65%; tương ứng) khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh lý ($p = 0.004$; $p < 0.001$). Lô bệnh lý uống viên nang BHXTT-BCL liều 1 viên/kg- 2 viên/kg đều có hoạt độ AST, ALT giảm đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh lý cùng thời điểm khảo sát. Viên nang BHXTT-BCL cả 2 liều thử nghiệm đều thể hiện tác dụng đưa giá trị men gan trở về giá trị bình thường khi so sánh với chứng sinh lý ($p = 0.871$; $p = 0.901$; $p = 0.541$; $p = 0.709$; tương ứng); thể hiện tác dụng tương tự silymarin 0,1 g/kg ($p = 0.901$; $p = 0.871$; $p = 0.934$; $p = 0.861$; tương ứng) trên mô hình gây tổn

thương mại bằng ethanol.

Kết quả từ Bảng 5 cho chuột uống ethanol hàng ngày với liều tăng dần theo tuần làm tăng hàm lượng MDA trong dịch đồng thể gan chuột đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh lý (tăng 771.60%), đồng thời làm giảm hàm lượng GSH đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh lý (giảm 25.31%) ($p=0.002$; $p=0.01$; tương ứng).

Lô bệnh cho uống silymarin liều 0.1 g/kg có hàm lượng MDA giảm 47.90% và GSH tăng 40.36% đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh lý ($p=0.001$; $p=0.003$; tương ứng); điều này cho thấy silymarin thể hiện tác dụng bảo vệ gan, làm giảm hàm lượng MDA và phục hồi hàm lượng GSH trở về giá trị bình thường khi so sánh với chứng sinh lý ($p=0.709$; $p=0.523$; tương ứng).

Bảng 4. Hoạt độ ALT ở các lô chuột trong thực nghiệm gây tổn thương gan bởi ethanol

Nhóm	Lô (n=8)	Hoạt độ ALT (U/L)	
		Tuần 2	Tuần 4
ETOH(-)	Chứng sinh lý	42.38 ± 3.69	48.25 ± 2.47
	Viên BHXTT-BCL liều 2 viên/kg	40.25 ± 1.51	42.50 ± 2.92
ETOH(+)	Chứng bệnh lý	59.25 ± 5.95*	69.13 ± 5.27***
	Viên BHXTT-BCL liều 1 viên/kg	42.00 ± 4.33 [#]	46.00 ± 3.27 ^{###}
	Viên BHXTT-BCL liều 2 viên/kg	39.63 ± 3.17 [#]	47.00 ± 4.17 ^{###}
	Silymarin liều 0,1 g/kg	45.75 ± 3.12 [#]	48.00 ± 4.00 ^{###}

(*) $p<0.05$ so với lô chứng sinh lý cùng thời điểm; (***) $p<0.001$ so với lô chứng sinh lý cùng thời điểm

([#]) $p<0.05$ so với lô chứng bệnh lý cùng thời điểm; (^{###}) $p<0.001$ so với lô chứng bệnh lý cùng thời điểm

Bảng 5. Hàm lượng MDA và GSH ở các lô chuột trong thực nghiệm gây tổn thương gan bởi ethanol

Nhóm	Lô (n=8)	Hàm lượng MDA (nM/g protein)	Hàm lượng GSH (nM/g protein)
ETOH(-)	Chứng sinh lý	40.70 ± 3.09	8,281.82 ± 378.72
	Viên BHXTT-BCL liều 2 viên/kg	49.35 ± 3.95	7,859.61 ± 544.24
ETOH(+)	Chứng bệnh lý	72.29 ± 6.14**	6,185.85 ± 403.69**
	Viên BHXTT-BCL liều 1 viên/kg	46.09 ± 3.63 ^{##}	8,104.04 ± 406.42 [#]
	Viên BHXTT-BCL liều 2 viên/kg	45.67 ± 3.75 ^{##}	7,720.72 ± 488.12 [#]
	Silymarin liều 0,1 g/kg	37.66 ± 2.88 ^{###}	8,682.60 ± 506.02 ^{##}

(**) $p<0.01$ so với lô chứng sinh lý; ([#]) $p<0.05$ so với lô chứng bệnh lý;

(^{##}) $p<0.01$ so với lô chứng bệnh lý; (^{###}) $p<0.001$ so với lô chứng bệnh lý.

Lô bệnh uống viên nang BHXTT-BCL ở cả 2 liều thử nghiệm 1 viên/kg và 2 viên/kg đều thể hiện tác dụng làm giảm hàm lượng MDA và phục hồi hàm lượng GSH trong gan, khác biệt ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh lý ($p=0.003$; $p=0.006$; tương ứng). Cả 2 liều thử nghiệm của viên nang BHXTT-BCL thể hiện tác dụng giảm hàm lượng MDA và phục hồi hàm lượng GSH trong gan tương tự nhau.

Viên nang BHXTT-BCL thể hiện tác dụng bảo vệ gan tương tự như tác dụng của silymarin liều 0.1 g/kg; chứng tỏ viên nang BHXTT-BCL giúp bảo vệ gan chuột trước tổn thương oxy hóa gây bởi ethanol.

3.3. Thảo luận

Mô hình gây tổn thương gan bằng paracetamol và ethanol dài ngày thường được

sử dụng cho việc đánh giá tác dụng bảo vệ gan của các sản phẩm từ dược liệu. Khi dùng quá liều paracetamol sẽ sinh ra nhiều chất chuyển hóa có độc tính là N-acetyl-p-benzoquinone imine (NAPQI) dẫn đến suy giảm đáng kể GSH (chất chống oxy hóa nội sinh sẽ liên hợp với NAPQI tạo thành chất chuyển hóa không độc tính) hoặc tạo liên kết cộng hóa trị với các phân tử sinh học như protein, lipid, và acid nucleic của tế bào gan gây tổn thương oxy hóa và gây tăng men gan [12]. Tương tự, sự dung nạp ethanol vào cơ thể dài ngày gây tổn thương trên hầu hết các hệ cơ quan, điển hình là ở gan và có liên quan một phần đến hoạt tính của chất chuyển hóa acetaldehyd và sự giảm tỷ lệ NAD/NADH (NAD/NADH liên quan đến sự hằng định nội môi oxy hóa khử của tế bào). Các thay đổi gây bởi acetaldehyd trên chức năng ty thể sẽ làm suy hỏng sự chuyển hóa acetaldehyd ở ty thể, gây tổn thương DNA ty thể và làm trầm trọng hơn tình trạng apoptosis ở gan, làm suy giảm GSH trong gan, do đó gián tiếp làm tăng quá trình peroxy hóa lipid dẫn đến hàm lượng MDA tăng, marker của tổn thương do stress oxy hóa [13]. Kết quả nghiên cứu cho thấy có sự tăng cao các hoạt độ AST và ALT trong huyết tương, tăng hàm lượng MDA và giảm GSH trong gan ở lô chứng uống paracetamol hay uống ethanol dài ngày so với lô chứng bình thường, cho thấy có sự tổn thương oxy hóa tế bào gan. Thuốc đối chiếu silymarin là sản phẩm được chiết xuất từ hạt của cây Kế sữa (*Silybum marianum*, Milk thistle, cúc gai) chủ yếu chứa các đồng phân flavonolignan như silybin, isosilybin, silydianin và silychristin với silybin là thành phần chính. Silymarin có thể tham gia vào quá trình trao đổi chất ở ty thể và chuỗi chuyển điện tử, thúc đẩy việc loại bỏ các gốc tự do, bảo vệ gan chống lại tổn thương oxy hóa [14 - 15].

Kết quả nghiên cứu cho thấy viên nang BHXTT-BCL, tương tự như silymarin điều hòa hoạt độ AST và ALT trong huyết tương. Ngoài ra, các dữ liệu thu thập được cho thấy hiệu quả tốt của viên nang BHXTT-BCL lên sự phục hồi GSH trong gan với kết quả là làm giảm sự hình thành MDA, sản phẩm của quá trình peroxy hóa lipid tế bào. Tác dụng chống oxy hóa của Bạch hoa xà thiệt thảo có thể là do các hợp chất flavonoid và iridoid [3,16]. Tác dụng chống oxy hóa của 3

glycosid flavonol và 6 glycoside iridoid đã được xác định, như ức chế hoạt động của xanthine oxidase, hệ thống xanthine-xanthine oxidase, cytochrome c và ức chế peroxy hóa lipid. Asperuloside và k a e m p f e r o l - 3 - O - (2 - O - β - D - glucopyranosyl)- β -D-galactopyranoside cho tác dụng chống peroxy hóa lipid và quercetin diglycoside có tác dụng dọn gốc anion superoxide [3]. Gần đây, quercetin-3-O-sambubioside trong Bạch hoa xà thiệt thảo được xác định là hoạt chất có tác dụng bảo vệ tế bào gan trước tổn thương do thuốc kháng lao isoniazid qua các khảo sát *in silico*, *in vitro* và *in vivo* [17]. Bán chi liên đã được sử dụng rộng rãi trong điều trị các bệnh về gan. Một số nghiên cứu trên người, tế bào và động vật đã chỉ ra tác dụng phòng ngừa của Bán chi liên đối với HCC (Hepatocellular carcinoma; SMMC-7721, HepG2, và Huh7). Flavonoid toàn phần của Bán chi liên ngăn chặn sự xâm lấn của tế bào HCC [18]. Trong Bán chi liên chứa scutebata S và scutebata T có khả năng ức chế quá trình peroxy hóa lipid tế bào chống oxy hóa, chống tổn thương gan thông qua tác dụng làm tăng hoạt tính enzyme SOD và làm giảm hàm lượng MDA trên chuột bị gây ung thư gan; đồng thời scutebata S và scutebata T cũng có khả năng bảo vệ tế bào gan dưới tác động H_2O_2 làm giảm mức độ stress oxy hóa làm chậm hoặc ngăn chặn sự tiến triển của các căn bệnh liên quan. Bộ đôi Bạch hoa xà thiệt thảo và Bán chi liên là cặp thảo mộc phổ biến nhất (thuốc ghép) được sử dụng để điều trị cốt lõi bệnh ung thư, Jiaxin Zhu và cộng sự (2022) đã phát hiện ra các thành phần hoạt chất chính từ liên kết đơn cặp Bạch hoa xà thiệt thảo và Bán chi liên, thành phần chủ yếu là aurantiamide acetate (từ Bạch hoa xà thiệt thảo), scutebarbatine A (từ Bán chi liên) và palmitin (từ Bạch hoa xà thiệt thảo) ức chế đáng kể sự tăng sinh và di chuyển của các tế bào ung thư vú trong ống nghiệm cùng với sự phát triển khối u ở chuột nhắt. Sự kết hợp của Bạch hoa xà thiệt thảo và Bán chi liên đã được chứng minh là cặp thuốc thảo dược dân gian được mô tả phổ biến nhất trong điều trị viêm gan, xơ gan và ung thư gan [19]. Năm 2021, nhóm nghiên cứu của chúng tôi đã chứng minh dịch chiết nước từ Bạch hoa xà thiệt thảo-Bán chi liên có tác dụng giảm men gan trong huyết tương và giảm hàm lượng malondialdehyd (MDA),

phục hồi hàm lượng glutathion (GSH) trong gan trên mô hình thực nghiệm gây tổn thương gan bằng paracetamol [10].

Vì thế kết quả này đã cho thấy rằng viên nang BHXTT-BCL có tác dụng bảo vệ gan khỏi tổn thương do paracetamol và ethanol. Sự kết hợp của Bạch hoa xà thiệt thảo-Bán chi liên dự đoán sẽ có nhiều triển vọng về tác dụng dược lý mới, có ý nghĩa lâm sàng trong tương lai, do đó cần thiết có thêm nhiều nghiên cứu mở rộng để cung cấp minh chứng khoa học cho kinh nghiệm sử dụng trong y học cổ truyền và làm nền tảng cho việc hiện đại hóa các sản phẩm từ hai dược liệu này với sự đa dạng trong hiệu quả trên lâm sàng.

4. KẾT LUẬN

Viên nang Bạch hoa xà thiệt thảo – Bán chi liên

ở liều uống 1 viên/kg và 2 viên/kg thể hiện tác dụng làm giảm hoạt độ ALT và AST trong huyết tương, cải thiện tình trạng stress oxy hóa qua việc làm giảm hàm lượng MDA và làm tăng hàm lượng GSH trong gan trên cả 2 mô hình gây tổn thương gan bằng paracetamol hoặc ethanol. Kết quả cho thấy chế phẩm có thể là một ứng viên tiềm năng có tác dụng bảo vệ gan trên lâm sàng.

LỜI CẢM ƠN

Bài báo là một phần kết quả thuộc nhiệm vụ nghiên cứu khoa học cấp Sở Khoa học và Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh (2020-2022). Nhóm nghiên cứu xin chân thành cảm ơn Quỹ phát triển Khoa học và Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh đã hỗ trợ kinh phí cho việc thực hiện đề tài.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] L. Kuna and I. Bozic and T. Kizivat, ..., M. Smolic, "Models of Drug Induced Liver Injury (DILI) - Current Issues and Future Perspectives", *Current Drug Metabolism*, vol.1, no.10, pp. 830-838, 2018.

[2] S. K. Asrani and H. Devarbhavi and J. Eaton and P. S. Kamath, "Burden of liver diseases in the world", *Journal of Hepatology*, vol. 70, no.1, pp. 151-171, 2019.

[3] R. Chen and J. He and X. Tong and L. Tang and M. Liu, "The *Hedyotis diffusa* Willd. (Rubiaceae): A Review on Phytochemistry, Pharmacology, Quality Control and Pharmacokinetics", *Molecules* (Basel, Switzerland), vol. 21, no. 6, pp. 710, 2016.

[4] Q. Chen and K. Rahman and S. J. Wang and S. Zhou and H. Zhang, "*Scutellaria barbata*: A Review on Chemical Constituents, Pharmacological Activities and Clinical Applications", *Current Pharmaceutical Design*, vol. 26, no.1, pp.160-175, 2020.

[5] Y. C. Yeh and H. Y. Chen and S. H. Yang, ..., J. L. Chen, "*Hedyotis diffusa* Combined with *Scutellaria barbata* Are the Core Treatment of Chinese Herbal Medicine Used for Breast Cancer Patients: A Population-Based Study", *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014, pp. 202-378, 2014.

[6] M. T. Ting and Z. G. Lin and D. C. Fang, ..., X. M. Wang, "*Scutellaria barbata* and *Hedyotis*

diffusa herb pair for breast cancer treatment: Potential mechanism based on network pharmacology", *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 259, pp. 112929, 2020.

[7] H. Y. Hung and K. C. Cheng and P. C. Kuo, ..., T. S. Wu, "Chemical Constituents of *Hedyotis diffusa* and their anti-inflammatory bioactivities", *Antioxidants* (Basel). 9;11(2), pp. 335, 2022.

[8] N. T. Nga và N. T. T. Hà và Đ. T. Thảo, ..., N. H. Nam, "Nghiên cứu hoạt tính chống oxy hóa và điều hòa miễn dịch của hai hoạt chất mới Neoclerodane tách từ cây Bán chi liên Việt Nam (*Scutellaria Barbata* D. Don)", *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 13(1), pp. 44-61, 2015.

[9] Đ. T. Đàm, "*Phương pháp xác định độc tính cấp của thuốc*", Nhà xuất bản Y Học, pp. 7-14, 2014.

[10] D. H. T. Quyen và N. H. Minh và H. Q. Thanh, ..., N. T. T. Hương, "Hepatoprotective effect of extracts from *Hedyotis diffusa* and *Scutellaria barbata* against paracetamol - induced liver injury in mice", *Journal of Medicinal Materials*, vol. 26, no. 1+2, pp. 90 – 94, 2021.

[11] H. Q. Thanh và M. T. Chung và N. M. T. Tiên và N. T. T. Hương, "Tác dụng bảo vệ gan của các cao chiết từ rau trai trên mô hình chuột tổn thương gan do ethanol", *Tạp chí Dược liệu*, vol. 24, no. 6, pp. 362-368, 2019.

[12] M. R. McGill and C. D. Williams and Y. Xie and A. Ramachandran and H. Jaeschke,

“Acetaminophen-induced liver injury in rats and mice: Comparison of protein adducts, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress in the mechanism of toxicity”, *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 264, no. 3, pp. 387-394, 2012.

[13] M. Comporti and C. Signorini and S. Leoncini, ..., B. Arezzini, “Ethanol-induced oxidative stress: basic knowledge”, *Genes & Nutrition*, vol. 5, no. 2, pp.101–109, 2010.

[14] Z. Papackova and M. Heczkova and H. Dankova,...,M. Cahova, “Silymarin prevents acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice”, *PLoS One*, vol.13, no. 1, pp. 0191353, 2018

[15] Z. Song and I. Deaciuc and M. Song M,..., C. McClain, “Silymarin Protects Against Acute Ethanol-Induced Hepatotoxicity in Mice”, *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, vol. 30, no. 3, pp. 407–413, 2006.

[16] Y. L. Li and X. Chen and S. Q. Niu,..., Q. S. Li, “Protective Antioxidant Effects of Amentoflavone and Total Flavonoids from

Hedyotis diffusa on H₂O₂ -Induced HL-O2 Cells through ASK1/p38 MAPK Pathway”, *Chemistry & Biodiversity*, vol. 17, no. 7, pp. 2000251, 2020.

[17] X. Wang and J. Zhao and R. Zhang,..., P. Yang, “Protective Effect of *Hedyotis diffusa* Willd. Ethanol Extract on Isoniazid-Induced Liver Injury in the Zebrafish Model”, *Drug Design, Development and Therapy*, vol.16, pp.1995-2015, 2022.

[18] Y. Li and J. Zhang and Zhang K, ..., M. Dai, “*Scutellaria barbata* inhibits hepatocellular carcinoma tumorigenicity by inducing ferroptosis of hepatocellular carcinoma Cells. *Front Oncol*, vol. 7; no.12, pp.693395, 2022.

[19] J. Zhu and Zh. Zhang and R. Wang, ..., Q. Wei, “Nanoparticles derived from *Scutellaria barbata* and *Hedyotis diffusa* herb pair and their anti-cancer activity”, *Pharmacological Research- Modern Chinese Medicine*, vol. 2, pp. 100048, 2022.

Hepatoprotective effects of bach hoa xa thiet thao-ban chi lien capsules on liver injury in mice by paracetamol and ethanol

Nguyen Hoang Minh, Ha Quang Thanh,
Kim Sô Thia, Ha Thi Hong Linh,
Dương Hong To Quyen and Nguyen Thi Thu Hương

ABSTRACT

Background: Drug-induced liver injury or alcoholic liver disease are well-recognized problems and symptomatically can mimic both acute and chronic liver diseases and severely threats to public health. *Hedyotis diffusa* and *Scutellaria barbata* have been widely used in traditional medicine as adjuvant therapy of various cancer. **Objective:** The present study aimed to evaluate the hepatoprotective effects of a preparation combined from *Hedyotis diffusa* and *Scutellaria barbata* (named as BHXTT-BCL capsules) on experimental liver injury. **Methods:** Plasma aspartat transaminase (AST), plasma alanine transaminase (ALT), hepatic malondialdehyde (MDA), and hepatic glutathione (GSH) levels were determined to evaluate hepatoprotective effects of BHXTT-BCL capsules on paracetamol and ethanol-induced hepatotoxicity models in Swiss albino mice. Silymarin was used as a reference drug. **Results:** Oral treatment of liver damage induced by paracetamol or ethanol with BHXTT-BCL capsules at the dose of 1 capsule/kg or 2 capsules/kg, as well as a reference drug silymarin (0.1 g/kg) significantly reduced plasma ALT and AST levels, improving oxidative stress status via decreased MDA contents and increased GSH contents in the mouse liver homogenates which reached statistical significance compared with untreated

controls. *Conclusions: The preparation combined from Hedyotis diffusa and Scutellaria barbata demonstrated protective effects on oxidative stress during paracetamol and alcohol hepatotoxicity.*

Keywords: *Hedyotis diffusa - Scutellaria barbata capsules, mouse models of liver injury induced by paracetamol or ethanol, oxidative stress*

Received: 12/04/2023

Revised: 18/05/2023

Accepted for publication: 22/05/2023