

THỬ NGHIỆM ĐỘC TÍNH CẤP VÀ TÁC DỤNG BẢO VỆ GAN CỦA CAO BƯỞI NON TRÊN MÔ HÌNH GÂY TỔN THƯƠNG GAN CHUỘT BẰNG CCl₄

Nguyễn Thị Diệu Hiền¹, Trương Minh Nhật¹, Mai Huỳnh Như¹,
Trình Thị Diệu Thường¹, Nguyễn Hữu Lạc Thủy¹

TÓM TẮT

Tiến hành nghiên cứu độc tính cấp và tác dụng bảo vệ gan của cao bưởi non được tiến hành trên chuột nhắt trắng trong phòng thí nghiệm cho thấy: liều tối đa qua kim của cao bưởi non là 13,084 g/kg không gây ra các dấu hiệu nhiễm độc cấp tính hoặc chết trên chuột nhắt trắng sau 14 ngày theo dõi. Cao đặc bưởi non liều 1,3 g/kg thể hiện tác dụng bảo vệ gan ở việc làm giảm lượng AST (ngày 7), giảm lượng MDA sinh ra (ngày 7, ngày 14), hồi phục lượng GSH (ngày 14) và làm giảm mức độ hoại tử của gan; trong khi đó, với liều 5,2 g/kg chỉ thể hiện sự giảm mức độ hoại tử gan. Từ các kết quả nêu trên, chúng tôi kết luận: cao đặc bưởi non an toàn, không gây độc tính cấp tính và liều 1,3 g/kg có tác dụng bảo vệ gan nhẹ trên mô hình gây viêm gan bằng CCl₄ ở động vật thực nghiệm.

Từ khóa: độc tính cấp; bảo vệ gan; cao bưởi non

SUMMARY

EVALUATE ACUTE TOXICITY AND HEPATOPROTECTIVE EFFECT OF YOUNG POMELO EXTRACT AGAINST CCl₄ INDUCED LIVER INJURY IN MICE

The maximum dose of 13.084 g young pomelo extract did not cause abnormality and death in mice. The protective effects of young pomelo extracts on the model of CCl₄ was evident in AST level, demonstrated by a decrease in MDA, a slight increase in GSH, and a decrease in the hepatic necrosis. In conclusion, young pomelo extract with the dose 1,3 g/kg had mild protective activity in a model of hepatitis induced by high doses of CCl₄.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bưởi (*Citrus grandis* L. Osbeck, Rutaceae) là một loại dược liệu được trồng phổ biến ở Việt Nam, có sản lượng lớn ở một số tỉnh thành như Vĩnh Long, Bến Tre, Đồng Nai, Phú Thọ, Một số thành phần hóa học trong vỏ quả bưởi, hoa và lá bưởi như tinh dầu, flavonoid, coumarin, limonoid, ... thể hiện nhiều tác dụng sinh học hữu ích như chống oxy hóa, kháng viêm, hạ lipid máu, ...

Trong quá trình chăm sóc, để vườn bưởi đạt hiệu quả cao, người nông dân thường phải loại bỏ bớt khoảng 30% những quả bưởi khi còn non

để cây tập trung dinh dưỡng cho những quả còn lại được phát triển tốt. Tuy nhiên, bưởi non (BN) cũng là một dược liệu tiềm năng bởi phần vỏ BN dày hơn, chứa nhiều hoạt chất có tác dụng sinh học.

"Thử nghiệm độc tính cấp và đánh giá tác dụng bảo vệ gan của cao đặc bưởi non trên mô hình gây tổn thương gan chuột bằng CCl₄" được tiến hành nhằm mục đích đánh giá sự an toàn và khả năng bảo vệ gan của cao đặc bưởi non, định hướng phát triển sản phẩm bảo vệ sức khỏe từ bưởi non.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu và đối tượng nghiên cứu

- **Nguyên liệu nghiên cứu:** cao BN được chiết bột BN với dung môi ethanol 70 % bằng phương pháp ngâm có gia nhiệt ở 75 °C trong 24 giờ, thỉnh thoảng khuấy trộn. Gộp tất cả dịch chiết, thu hồi dung môi đến thành cao chiết có thể chất ổn định và đạt tiêu chuẩn cơ sở.

- **Dung môi, hóa chất:** carbon tetrachlorid, acid thiobarbituric, acid trichloroacetic, acid acetic, natri dodecyl sulfat, dầu oliu, nước cất tinh khiết, silymarin (Merck).

- **Đối tượng nghiên cứu:** Chuột nhắt trắng chủng Swiss albino ở cả hai giống, cân nặng trung bình do viện Pasteur Tp.HCM cung cấp. Chuột khỏe mạnh, không dị tật, không có biểu hiện bất thường. Chuột được ổn định ở nhiệt độ phòng 1 tuần trước khi tiến hành thử nghiệm, đạt trọng lượng 26,00 ± 2,00 g (đối với thử nghiệm độc tính cấp) và 21,50 ± 0,30 g (đối với thử nghiệm đánh giá tác dụng bảo vệ gan). Thức ăn và nước uống được cung cấp mỗi ngày.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khảo sát độc tính cấp đường uống

a. Thăm dò độ tan của mẫu thử. Tiến hành pha các mẫu cao BN trong nước cất và xác định nồng độ tối đa mẫu thử có thể qua kim. Vì cao bưởi là dược liệu được sử dụng rộng rãi và không độc (2) nên dùng phương pháp liều tối đa qua kim. Chuột ở các lô thử nghiệm sẽ được cho thử ở dung dịch đậm đặc nhất này.

b. Khảo sát độc tính cấp đường uống. Giai đoạn sơ bộ: 2 chuột uống cao với thể tích cho uống là 0,1 ml/10 g thể trọng chuột (BW) (1). Quan sát chặt chẽ những bất thường xảy ra trong vòng 24 giờ. Theo dõi sự thay đổi hành vi,

¹Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

Chịu trách nhiệm chính: Nguyễn Hữu Lạc Thủy

Email: nguyenhuulacthuy@ump.edu.vn

Ngày nhận bài: 5.9.2022

Ngày phản biện khoa học: 22.10.2022

Ngày duyệt bài: 2.11.2022

thể trạng chuột, tình trạng tiêu tiểu, tỉ lệ chuột chết trong 72 giờ. Do cả 2 chuột đều không chết nên chuyển sang bước tiếp theo.

Giai đoạn xác định: Lập lại thí nghiệm trên với 10 chuột. Nếu sau 72 giờ chuột không chết thì tiếp tục theo dõi và ghi nhận trọng lượng chuột và bất thường (nếu có) trong vòng 14 ngày. Sau 14 ngày, toàn bộ chuột được mổ quan sát đại thể và các cơ quan nội tạng (1)

2.2.2. Đánh giá tác dụng bảo vệ gan

Chuột được chia ngẫu nhiên thành 5 nhóm, mỗi nhóm 10 chuột. Nhóm I được cho uống nước cất, tiêm dầu olive 0,1 ml/10 g BW; nhóm II → nhóm V được tiêm CCl₄ nồng độ 1 ml/kg chuột 1 lần duy nhất, i.p. (CCl₄ được pha trong olive theo tỉ lệ 1:1).

Nhóm II được cho uống nước cất; nhóm III được cho uống cao BN liều 1,3 g/kg; nhóm IV được cho uống cao BN liều 5,2 g/kg; nhóm V được cho uống silymarin liều 100 mg/kg, [3, 12] trong 14 ngày tiếp theo tính từ lúc tiêm CCl₄.

Sau thời gian điều trị, lấy mẫu ở 3 thời điểm là 1 ngày (D₁), 7 ngày (D₇) và 14 ngày (D₁₄) tính từ lúc tiêm CCl₄ (D₀). Chuột được gây mê bằng đá CO₂, mổ bộc lộ tim và nhanh chóng lấy máu tim.

a. Xác định chức năng gan

- Các chỉ số sinh hóa gan như ALT, AST được phân tích trên máy Midray BA-88A.

- Nồng độ malondialdehyd (MDA) được xác định dựa trên phản ứng giữa acid thiobarbituric và MDA tạo phức màu hồng có độ hấp thụ tối đa ở 532 nm. Kết quả được biểu diễn bằng đơn vị mmol/g gan tươi [3].

- Nồng độ glutathion (GSH) được xác định dựa trên phản ứng Ellman. GSH phản ứng với DTNB (acid 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic)) tạo ra TNB (1,3,5-trinitrobenzen) có độ hấp thụ tối đa ở 412 nm [4]. Kết quả được biểu diễn bằng đơn vị µg GSH/g gan tươi.

b. Đánh giá đại thể và vi thể gan. Toàn bộ gan được cân và rửa sạch bằng dung dịch NaCl 0,9 % lạnh, thấm khô và ngâm trong dung dịch formalin 10 % để nhuộm Hematoxylin và eosin tại khoa giải phẫu bệnh bệnh viện Đại học Y Dược Cần Thơ. Kết quả giải phẫu bệnh được đánh giá theo thang Knodell-HAI [2].

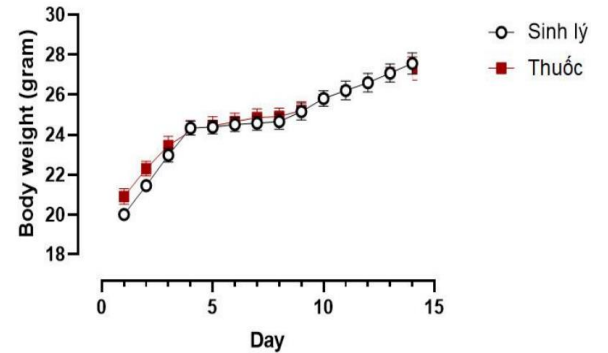
2.3. Phân tích số liệu: Dữ liệu được thống kê bằng spss phân tích phương sai một yếu tố hoặc Kruskal Wallis với p < 0,05 được xem là khác biệt có ý nghĩa thống kê.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả khảo sát độc tính cấp đường uống

3.1.1. Kết quả thăm dò độ tan. Kết quả thăm dò độ tan cho thấy cao BN có thể pha trong nước cất thành dung dịch đậm đặc nhất qua kim có nồng độ lần lượt là 1,3084 g/ml. Vì thế, chuột ở lô uống cao BN sẽ được cho uống cao pha trong nước cất ở nồng độ 1,3084 g/ml (tương ứng với liều 13,084 g cao/kg thể trọng chuột).

3.1.2. Kết quả khảo sát độc tính cấp đường uống



Hình 1. Theo dõi trọng lượng chuột trong 14 ngày thử nghiệm trên mẫu cao BN

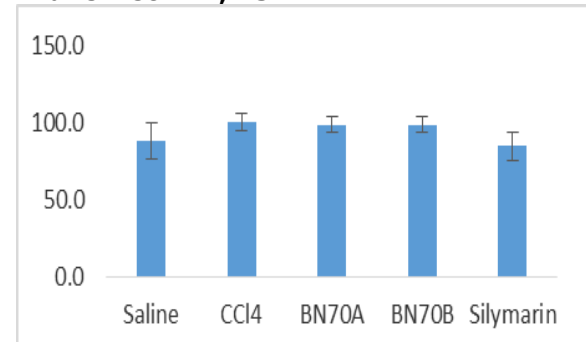
Nhận xét: Trước và sau khi uống cao chiết BN, chuột ăn uống bình thường, vận động bình thường, lông mượt. Chuột không có biểu hiện kích động, không có biểu hiện chậm chạp, li bì,... Cân nặng chuột ở lô cho uống cao BN không khác biệt so với lô sinh lý có ý nghĩa thống kê trong 14 ngày thử nghiệm.

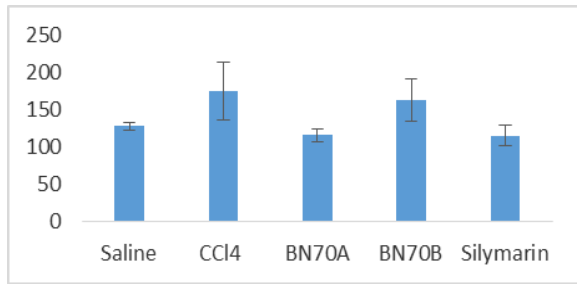
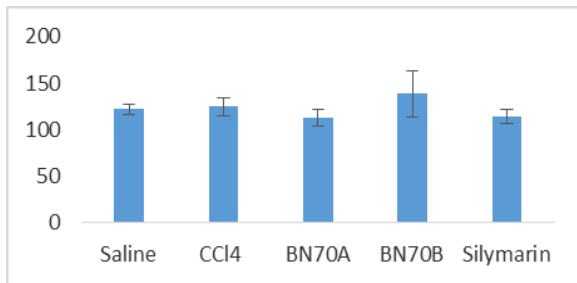
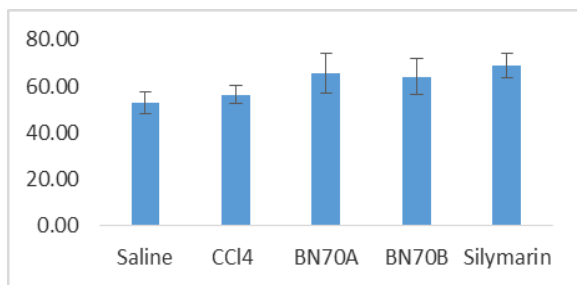
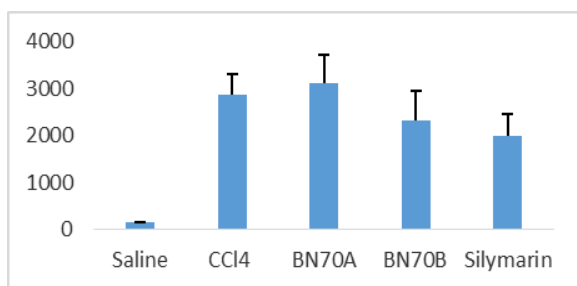
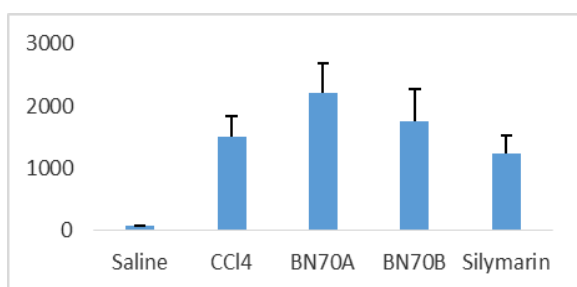
Sau 14 ngày, toàn bộ chuột được mổ quan sát đại thể, các cơ quan nội tạng chuột không có bất thường về hình dạng và màu sắc và không có sự khác biệt giữa lô sinh lý và lô cho uống cao BN. Như vậy, ở liều tối đa qua kim 13,084 g cao/kg thể trọng chuột [1], cao BN không có chuột chết, không xác định được liều LD₅₀ và không ghi nhận độc tính cấp trong thời gian thử nghiệm.

3.2. Kết quả đánh giá tác dụng bảo vệ gan

3.2.1. Kết quả đánh giá chức năng gan

a. Chỉ số ALT, AST



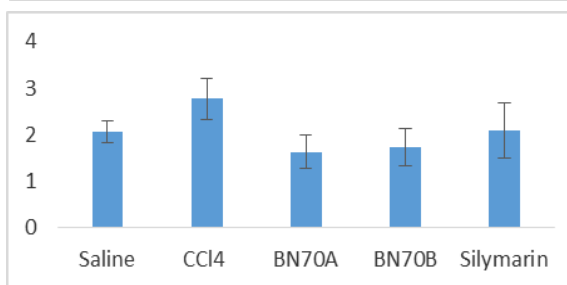
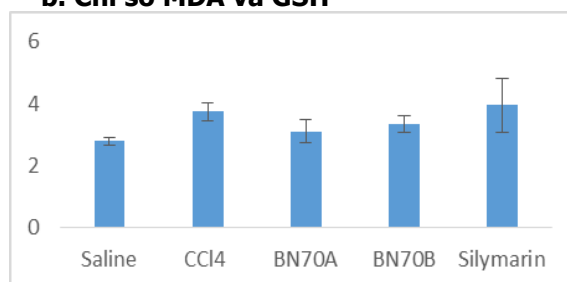


Hình 2. Nồng độ ALT, AST của các nhóm tại các thời điểm D₁, D₇ và D₁₄

Nhận xét: Sau khi tiêm CCl₄, nồng độ ALT, AST tăng cao ở thời điểm sớm nhưng giảm dần trở về mức bình thường. Cao BN và silymarin chỉ làm giảm AST ở thời điểm D₇ (hình 2). Như vậy

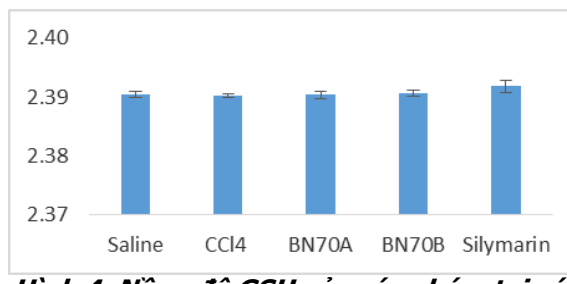
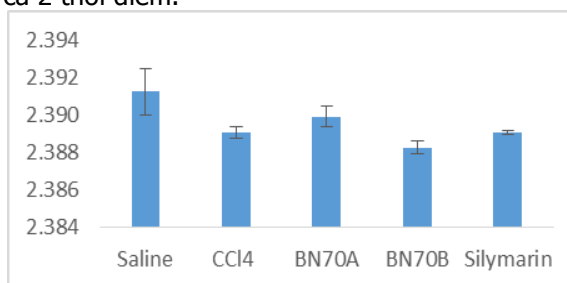
cao burre non chỉ có tác dụng bảo vệ gan nhẹ trước sự tăng AST.

b. Chỉ số MDA và GSH



Hình 3. Nồng độ MDA của các nhóm tại các thời điểm D₇ và D₁₄

Nhận xét: Kết quả lượng MDA tăng ở thời điểm D₇ có ý nghĩa và lượng MDA được giảm bởi cao BN ở cả 2 liều (1,3 g/kg và 5,2 g/kg). Lượng MDA vẫn tiếp tục duy trì khác biệt so với nhóm chứng ở thời điểm D₁₄. Nhóm chứng dương không thể hiện hoạt tính giảm lượng MDA trên cả 2 thời điểm.



Hình 4. Nồng độ GSH của các nhóm tại các thời điểm D₇ và D₁₄

Nhận xét: Lượng GSH ở thời điểm D₇ không thể hiện sự khác biệt giữa tất cả các nhóm nhưng ở thời điểm D₁₄ lượng GSH ở nhóm CCl₄

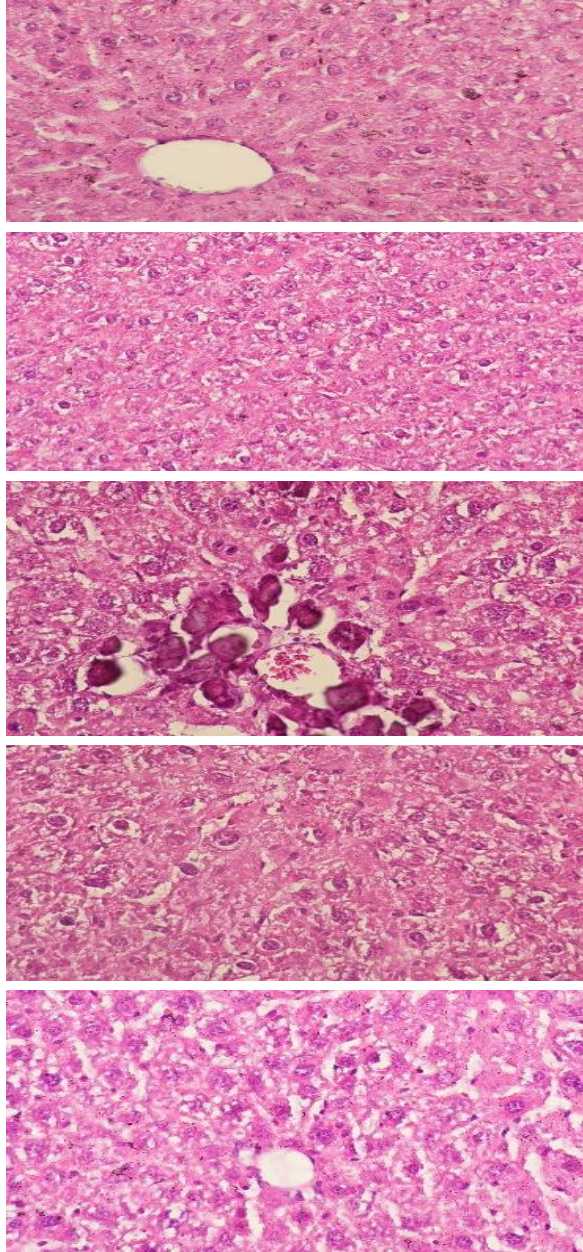
giảm so với nhóm chứng. Cao BN liều 1,3 g/kg thể hiện hoạt tính cải thiện sự giảm lượng GSH. Như vậy cao BN có tác dụng bảo vệ, làm tăng

lượng GSH trong gan, giúp chống lại tác nhân oxy hóa, MDA sinh ra sau khi tiêm CCl₄ [5].

c. Kết quả nhuộm H&E

Bảng 3. Đánh giá mức độ viêm gan của các nhóm vào thời điểm D₁₄

| | Bình thường | Viêm công | Thoái hóa nội bào | Hoại tử |
|-----------------------------|-------------|-----------|-------------------|---------|
| Nhóm I (saline) | 50 % | - | 50 % | 0 % |
| Nhóm II (CCl ₄) | - | - | 22 % | 75 % |
| Nhóm III (BN70A) | 14 % | - | 14 % | 71 % |
| Nhóm IV (BN70B) | - | - | 50 % | 50 % |
| Nhóm V (silymarin) | 40 % | 20 % | 20 % | 20 % |



Hình 5. Giải phẫu bệnh nhu mô gan ở các nhóm
 Chú thích: A: Nhóm trắng; B: Nhóm tiêm CCl₄; C:

Nhóm BN liều 1,3 g/kg; D: Nhóm BN liều 5,2 g/kg; E: Nhóm silymarin liều 100 mg/kg

Nhận xét: Mức độ hoại tử ở gan của chuột ở mức 75% sau khi tiêm CCl₄ ở thời điểm 14 ngày. Cao BN ở liều 1,3 g/kg và 5,2 g/kg làm giảm mức độ hoại tử của gan xuống còn 71% và 50%. Vậy cao BN có tác dụng giảm mức độ hoại tử của gan trong mô hình gây tổn thương gan bằng CCl₄

IV. BÀN LUẬN

Sau khi tiêm CCl₄ liều 1 ml/kg, nồng độ ALT, AST tăng cao ở thời điểm D₁ nhưng giảm dần trở về mức bình thường (ALT ở thời điểm D₇; AST ở thời điểm D₁₄), điều này phù hợp do ALT, AST được dùng để đánh giá viêm gan ở giai đoạn sớm, ít được dùng trong đánh giá viêm gan mãn hay viêm gan tiến triển chậm. Cao BN và silymarin có xu hướng làm giảm nồng độ ALT nhưng sự giảm này không có ý nghĩa và chỉ làm giảm AST có ý nghĩa ở thời điểm D₇.

CCl₄ được chuyển hóa ở gan bởi cytochrom P450 tạo thành trichloromethyl dạng gốc tự do gây nên thay đổi trong chuyển hóa chất béo, làm tăng thoái hóa chất béo, peroxid hóa chất béo, tăng tạo MDA tăng hoại tử tế bào gan [5, 6]. Lượng MDA vẫn tiếp tục tăng đến thời điểm 14 ngày, trong khi đó GSH thay đổi từ không khác biệt đến giảm ở thời điểm 14 ngày, phù hợp với quá trình tác động chống oxy hóa của GSH. Ở thời điểm sớm (ngày 1, ngày 7), cao BN chưa thể hiện hoạt tính bảo vệ sự hoại tử của tế bào gan nhưng cao BN thể hiện hoạt tính giảm hoại tử gan ở thời điểm 14 ngày, nên có thể kết luận cao BN giúp hỗ trợ quá trình phục hồi của gan sau 14 ngày điều trị. Do đó cao BN an toàn sử dụng thời gian dài và hỗ trợ quá trình phục hồi của gan, giúp giảm tỉ lệ hoại tử của gan.

V. KẾT LUẬN

Ở liều tối đa qua kim 13,084 g cao/kg thể trọng chuột, cao BN không gây bất thường và không gây chết chuột. Vì vậy có thể kết luận cao chiết bưởi non an toàn. Cao BN có hoạt tính bảo

vệ nhẹ trong mô hình viêm gan gây ra bởi liều cao đơn độc CCl₄. Việc bảo vệ thể hiện qua giảm lượng MDA, tăng nhẹ GSH và giảm phần trăm hoại tử ở gan.

VI. LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Sở Khoa học và Công nghệ TP. Hồ Chí Minh (DOST HCMC) cho PGS.TS.Lê Minh Trí, tại Quyết định số 1055/QĐ-SKHCHN và Hợp đồng số 52/2021/HĐ-QKHCHN.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **BỘ Y TẾ** (2015), "Hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y, thuốc tử dược liệu", Quyết định số 141.
2. **Brunt E. M.** (2000), "Grading and staging the

- histopathological lesions of chronic hepatitis: the Knodell histology activity index and beyond", *Hepatology*. **31** (1), pp. 241-246.
3. **Draper H. et al.** (1993), "A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials", *Free Radical Biology Medicine*. **15** (4), pp. 353-363.
 4. **Rahman I. et al.** (2006), "Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method", *Nature protocols*. **1** (6), pp. 3159-3165.
 5. **Scholten D. et al.** (2015), "The carbon tetrachloride model in mice", *Laboratory animals*. **49** (1_suppl), pp. 4-11.
 6. **Zhu R. et al.** (2013), "Oroxylin A accelerates liver regeneration in CCl₄-induced acute liver injury mice", *PLoS one*. **8** (8), pp. e71612.

THIẾT KẾ MỒI XÁC ĐỊNH ĐỘT BIẾN GEN *SLC22A5* GÂY BỆNH THIẾU HỤT CARNITIN

Nguyễn Thị Phương Thúy¹, Nguyễn Thị Thảo Vi², Tạ Văn Thọ¹,
Trịnh Thị Phương Dung¹, Bùi Thị Bảo³

TÓM TẮT

Bệnh lý thiếu hụt carnitin nguyên phát (CDSP) gây ra bởi một đột biến lặn trên gen *SLC22A5* mã hóa cho protein vận chuyển carnitin (OCTN2) trong huyết thanh và được đặc trưng bởi triệu chứng hạ đường huyết giảm lượng ketone máu (hypoketotic hypoglycemia), bệnh lý về xương và nhược cơ tim có thể dẫn tới tử vong nếu không được điều trị kịp thời [1,2]. Bệnh nhân mắc bệnh thiếu hụt carnitin nguyên phát thường đáp ứng tốt với việc bổ sung L-Carnitin đường uống và cải thiện đáng kể các triệu chứng lâm sàng của họ [3]. Do đó, chẩn đoán sớm và can thiệp kịp thời có ý nghĩa rất quan trọng với bệnh nhân thiếu hụt carnitin nguyên phát. Xét nghiệm phân tích gen *SLC22A5* mã hóa protein vận chuyển carnitin có giá trị chẩn đoán xác định bệnh thiếu hụt carnitin nguyên phát bởi kỹ thuật này xác định được chính xác các đột biến trên gen *SLC22A5* ảnh hưởng trực tiếp tới việc tổng hợp protein vận chuyển carnitin. Ở Việt Nam hiện nay để xác định đột biến gen *SLC22A5* chủ yếu sử dụng các bộ mồi được tham khảo từ nghiên cứu trước đây trên thế giới tuy nhiên vẫn gặp phải sự không đặc hiệu về mồi dẫn đến khó xác định được đột biến. Nghiên cứu này tập trung vào thiết kế và tối ưu hóa bộ mồi đặc hiệu trong xác định đột biến gen *SLC22A5* gây

bệnh thiếu hụt carnitin nguyên phát ở người Việt Nam.

Từ khóa: Thiếu hụt carnitin nguyên phát (CDSP); đột biến gen *SLC22A5*; OCTN2; β-oxi hóa của axit béo; mồi PCR

SUMMARY

PREPARING PRIMERS FOR IDENTIFYING THE *SLC22A5* GENE MUTATION IN PRIMARY CARNITIN DEFICIENCY

Primary systemic carnitine deficiency (PSCD) is caused by defects in OCTN2 function as a result of mutations in the *SLC22A5* gene. Systemic primary carnitine deficiency (CDSP) presents episodic periods of hypoketotic hypoglycemia. The main symptoms of CDSP are episodic periods of hypoketotic hypoglycemia, skeletal and cardiac myopathy [1]. The disease brings serious complications including death if not treated promptly. Patients with primary carnitine deficiency often respond well to oral L-carnitine supplementation and significantly improve their clinical symptoms [3]. Therefore, early diagnosis and timely intervention are very important for patients with primary carnitine deficiency. The analysis of the carnitin-encoding gene *SLC22A5* has diagnostic value in determining primary carnitine deficiency because this technique accurately identifies mutations in the *SLC22A5* gene that directly affect carnitin protein synthesis. In Vietnam, currently, to identify the *SLC22A5* gene mutation, mainly using primer sets referenced from previous studies in the world, but still encountering non-specificity about primers, making it difficult to identify mutations. This study focuses on the design and optimization of specific primers in identifying the *SLC22A5* gene mutation causing primary carnitine deficiency in Vietnamese.

¹Trường đại học Y Hà Nội

²Bệnh viện Xanh Pôn

³Phòng khám chuyên khoa xét nghiệm Chemedic Việt Nam

Chịu trách nhiệm chính: Nguyễn Thị Phương Thúy

Email: nguyenphuongthuy.1508@gmail.com

Ngày nhận bài: 29.8.2022

Ngày phản biện khoa học: 22.10.2022

Ngày duyệt bài: 28.10.2022