

## ĐÁNH GIÁ TÁC DỤNG TAN HUYẾT KHỐI CỦA CÁC PHÂN ĐOẠN DỊCH CHIẾT TỪ CỦ TAM THẤT TRỒNG Ở TỈNH LÀO CAI

Bùi Thanh Tùng<sup>1,\*</sup>, Vũ Đức Lợi<sup>1</sup>, Nguyễn Thanh Hải<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Đại học Quốc gia Hà Nội

\*Email: tungasia82@gmail.com

(Nhận bài ngày 30 tháng 9 năm 2015)

### Tóm tắt

Củ tam thất (*Panax notoginseng*) được chiết bằng ethanol và được phân đoạn bằng cách sử dụng các dung môi có độ phân cực tăng dần *n*-hexan, ethyl acetat (EtOAc) và *n*-butanol (BuOH). Các phân đoạn của cao chiết ethanol được đánh giá tác dụng tan huyết khối thực nghiệm trên *in vitro* và *in vivo*. Kết quả thực nghiệm cho thấy tác dụng tan huyết khối của các phân đoạn dịch chiết theo thứ tự BuOH > EtOAc > *n*-hexan. Phân đoạn dịch chiết BuOH có tác dụng làm tan 51,33% cục huyết khối trên *in vitro* và kéo dài các thông số đặc trưng cho sự đông máu bao gồm thời gian thromboplastin được hoạt hóa từng phần (APTT, 22,89 ± 0,48 s), thời gian prothrombin (PT, 14,36 ± 0,82 s) và thời gian thrombin (TT, 30,64 ± 1,24s).

Từ khóa: Tam thất, Tác dụng chống huyết khối, APPT, PT, TT.

### Summary

#### Evaluation of Antithrombotic Activity of Fractions from the Root Extract of *Panax notoginseng* Growing in Lao Cai Province

The roots of *Panax notoginseng* was extracted with ethanol and fractionated with increasing polar solvents as following *n*-hexane, ethyl acetate and *n*-butanol. These fractions were evaluated for the antithrombotic activity *in vitro* and *in vivo*. The *in vitro* results showed the strongest clot lysis activity as the following order: *n*-BuOH > EtOAc > *n*-hexane. The BuOH fraction induced 51.33% lysis of thrombus *in vitro* and also prolonged characteristic coagulation indices such as an activated partial thromboplastin time (APTT, 22.89 ± 0.48 s), prothrombin time (PT, 14.36 ± 0.82 s) and thrombin time (TT, 30.64 ± 1.24s) *in vivo*.

Keywords: *Panax notoginseng*, Anti thrombotic activity, APPT, PT, TT.

### 1. Đặt vấn đề

Từ lâu, tam thất đã được sử dụng rộng rãi trong y học cổ truyền để thúc đẩy tuần hoàn máu, loại bỏ ứ máu, giảm sưng và giảm đau. Ngoài ra, tam thất còn có lợi cho bệnh tim mạch vành, bệnh mạch máu não cũng như cải thiện khả năng học tập và khả năng ghi nhớ. Những tác dụng sinh học của tam thất chủ yếu dựa vào các hoạt chất của nó, cụ thể là saponin, flavonoid và polysaccharid [1, 2]. Thành phần hoạt chất chính của tam thất bao gồm chủ yếu là ginsenosid Rb1, ginsenosid Rg1 và notoginsenosid R1. Các saponin phân lập từ tam thất có tác dụng làm tăng lưu lượng máu trong động mạch vành, ngăn ngừa kết tập tiểu cầu, giảm sử dụng oxy của cơ tim, phục hồi khả năng học tập gây ra bởi sử dụng morphin dài ngày và bảo vệ tế bào thần kinh khỏi quá trình stress oxy hóa [3]. Flavonoid làm tăng lưu lượng mạch vành, làm giảm tiêu thụ oxy cơ tim [4]. Hơn nữa, các polysaccharid chiết xuất từ củ tam thất cũng được coi là một thành phần có khả

năng kích hoạt các hoạt động của hệ miễn dịch [5]. Để đánh giá hiệu quả của các phân đoạn tách chiết từ tam thất lên hệ tim mạch bao gồm ức chế kết tập tiểu cầu, tăng lưu lượng máu, cải thiện chức năng trương tâm thất trái ở bệnh nhân tăng huyết áp, chúng tôi tiến hành đánh giá tác dụng chống huyết khối trên *in vitro* và *in vivo* của các phân đoạn tách chiết từ tam thất (bao gồm bao gồm ethanol, *n*-hexan, ethyl acetat và *n*-butanol).

### 2. Nguyên liệu và phương pháp

#### 2.1. Nguyên liệu

Các phân đoạn tách chiết từ củ tam thất (bao gồm ethanol, *n*-hexan, ethylacetat, butanol) được chuẩn bị từ nguyên liệu tam thất thu hái ở Lào Cai vào tháng 10-2014 và được lưu mẫu tại Bộ môn Dược liệu & Dược học cổ truyền-Khoa Y Dược, ĐHQGHN. Củ tam thất (1 kg) sau khi sơ chế được ngâm chiết bằng dung môi ethanol 3 lần sử dụng thiết bị chiết siêu âm ở 40°C. Các dịch chiết ethanol thu được được lọc qua giấy lọc, gom lại và cất loại

dung môi dưới áp suất giảm cho cao chiết ethanol toàn phần. Hòa tan cặn chiết ethanol này trong nước cất và chiết phân bố bằng *n*-hexan, ethylacetat và *n*-butanol (3 lần). Các phân đoạn *n*-hexan, ethylacetat, *n*-butanol được cất loại dung môi dưới áp suất giảm để thu được phân đoạn tương ứng *n*-hexan (15g), EtOAc (38 g), BuOH (74 g).

### 2.2. Hóa chất

Streptokinase (Sigma-Aldrich, Singapore), sodium pentobarbital (Tokyo, Nhật), CaCl<sub>2</sub> (Shouguang, Trung Quốc), thuốc thử thời gian thrombin Helena, Mỹ), thuốc thử thời gian prothrombin (Helena, Mỹ), thuốc thử thời gian thromboplastin được hoạt hóa từng phần (Helena, Mỹ) đạt tiêu chuẩn phân tích.

### 2.3. Động vật

Chuột cống trắng Wistar, 10 tuần tuổi, giống đực được nuôi trong điều kiện phòng sạch, không khí được lọc và có áp lực dương tính. Nhiệt độ phòng được duy trì ở 28 ± 0,5°C, độ ẩm 55 ± 5%, ánh sáng được tự động điều khiển bật lúc 7h00, tắt lúc 19h00. Thức ăn và nước uống được tiết trùng trước khi sử dụng. Chuột được chia thành nhóm, 5 con mỗi nhóm. Lồng chuột được để trên hệ thống giá có thông khí độc lập và lọc qua màng bảo đảm khả năng cách ly tốt với mầm bệnh.

### 2.4. Phương pháp nghiên cứu

#### Tác dụng tan huyết khối *in vitro* [6]:

Lấy 1,5 ml máu tĩnh mạch đuôi chuột và cho vào 3 ống vô trùng vi ly tâm (đã cân trước) (0,5 ml/ống) và ủ ở 37°C trong 45 phút. Sau khi hình thành cục máu đông, hút loại bỏ hết huyết thanh (không làm ảnh hưởng đến cục máu đông đã hình thành).

Tiến hành cân các ống có cục máu đông để xác định trọng lượng cục máu đông theo công thức:

Khối lượng cục máu đông = Khối lượng của ống chứa cục máu đông - khối lượng của ống

Với mỗi ống vi ly tâm chứa cục máu đông đã được cân trước, thêm vào 100 μl phân đoạn dịch chiết tam thất (10 mg/ml).

Chuẩn dương: 100 μl streptokinase (Chuẩn bị: Thêm 5 ml dung dịch đệm phosphat (PBS, pH 7.2) vào lọ chứa 10000 IU streptokinase và trộn đều).

Đối chứng: 100 μl nước cất.

Tất cả các ống đem ủ ở 37°C trong 90 phút và quan sát sự ly giải của cục máu đông. Sau khi ủ, hút loại bỏ chất lỏng và tiến hành cân ống để xác định khối lượng cục máu đông. Phần trăm ly giải cục máu đông tính bằng sự chênh lệch về khối lượng trước và sau ly giải cục máu đông. Tiến hành lặp lại thí nghiệm ít nhất 3 lần với mẫu máu tĩnh mạch đuôi chuột khác nhau.

$\% \text{ Ly giải huyết khối} = \frac{\text{Khối lượng cục máu đông sau ly giải}}{\text{Khối lượng cục máu đông trước ly giải}} \times 100$

#### Tác dụng tan huyết khối *in vivo* [7]:

Chia chuột thành các nhóm: Đối chứng, chứng dương streptokinase, và các nhóm phân đoạn dịch chiết EtOH, *n*-hexan, EtOAc, BuOH, 10 con/nhóm. Cho chuột uống các phân đoạn dịch chiết 150 mg/kg bằng kim chuyên biệt dùng cho chuột uống theo đường miệng, thể tích mỗi lần uống là 1,0 ml. Nhóm đối chứng được cho uống nước cất. Thời gian cho chuột uống kéo dài 10 ngày liên tiếp. Nhóm chứng dương streptokinase được tiêm dưới bụng một liều duy nhất streptokinase 10000 IU/kg vào thời điểm cho chuột ở các nhóm khác uống phân đoạn dịch chiết lần cuối. Sau 1,5 giờ, tiến hành gây mê chuột bằng 50 mg sodium pentobarbital/kg trọng lượng bằng cách tiêm màng bụng. Máu từ tĩnh mạch dưới được hút vào ống ly tâm nhựa và trộn ngay lập tức với 3,8% trisodium citrat (v: v, 9: 1). Đem ly tâm ở 2000 vòng/phút trong 15 phút để thu được huyết tương nghèo tiểu cầu (PPP).

Tác dụng tan huyết khối được đánh giá bằng cách đo các thông số đông máu của huyết tương bao gồm thời gian thromboplastin được hoạt hóa từng phần (APTT), thời gian prothrombin (PT) và thời gian thrombin (TT) trong huyết tương nghèo tiểu cầu ở chuột cống.

Xét nghiệm APTT được thực hiện như sau: trộn 100 μl mẫu thử (PPP) với 100 μl thuốc thử APTT (acid ellagic, phospholipid) và ủ ở 37°C trong 3 phút. Sau đó, thêm 100 μl dung dịch CaCl<sub>2</sub> (0,025 mol/l) vào hỗn hợp và tiến hành đo APTT.

TT và PT được xác định như sau: Ủ 100 μl mẫu

thử (PPP) ở 37°C trong vòng 3 phút. Sau đó, trộn với 100 µl thuốc thử TT (thrombin) hoặc thuốc thử PT (thromboplastin) và tiến hành đo thời gian TT hoặc PT.

#### Xử lý số liệu:

Các số liệu nghiên cứu được xử lý thống kê theo phương pháp t-test student sử dụng phần mềm

SigmaPlot 10 (Systat Software Inc, Mỹ).

Số liệu được biểu diễn dưới dạng  $X \pm SEM$ . Sự khác biệt có ý nghĩa khi  $p < 0,05$ .

### 3. Kết quả và bàn luận

#### Tác dụng tan huyết khối trên *in vitro*

Kết quả % ly giải huyết khối trên *in vitro* của các phân đoạn dịch chiết được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1. Kết quả ly giải huyết khối trên *in vitro*

Mẫu thử	Khối lượng trung bình cục máu đông	Khối lượng trung bình cục máu đông sau ly giải	% ly giải huyết khối
Đối chứng	0,5742 ± 0,321	0,0252 ± 0,0042	4,44
Streptokinase	0,5325 ± 0,0124	0,4906 ± 0,0242 <sup>a</sup>	92,14 <sup>a</sup>
EtOH	0,5917 ± 0,0237	0,1762 ± 0,0146 <sup>a</sup>	29,78 <sup>a</sup>
n-hexan	0,4994 ± 0,0236	0,0593 ± 0,0078	11,87 <sup>a</sup>
EtOAc	0,6167 ± 0,0175	0,2075 ± 0,0321 <sup>a</sup>	33,64 <sup>a</sup>
BuOH	0,6038 ± 0,0235	0,3124 ± 0,0251 <sup>a</sup>	51,33 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm đối chứng; <sup>b</sup> Khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm đối chứng.

Trong xét nghiệm đánh giá khả năng tan huyết khối *in vitro* bằng cách sử dụng phương pháp ly giải cục máu đông, các phân đoạn BuOH và EtOAc cho thấy tác dụng phần trăm ly giải cục máu đông cao 51,33% và 33,6%. Chúng dương streptokinase cho thấy phần trăm ly giải cục máu đông rất cao, lên tới 92,14%, chứng tỏ phương pháp nghiên cứu hoạt động tốt. Phần trăm ly giải cục máu đông của cả 4 phân đoạn dịch chiết đều có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với mẫu đối chứng. Điều này chứng

tỏ rằng các phân đoạn dịch chiết từ tam thất có khả năng làm tan huyết khối.

#### Tác dụng tan huyết khối trên *in vivo*

Tác dụng tan huyết khối *in vivo* được đánh giá dựa trên các thông số về sự đông máu như TT (thời gian thrombin), (thời gian thromboplastin), APTT (thời gian thromboplastin được hoạt hóa từng phần). Nếu các thông số này bị kéo dài ra và lâu hơn thì các phân đoạn có khả năng làm tan huyết khối và máu lâu bị đông hơn. Kết quả được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả thời gian APTT, PT và TT của các phân đoạn chiết từ tam thất

Nhóm	APTT (s)	PT (s)	TT (s)
Đối chứng	16,45 ± 0,72	10,54 ± 0,28	25,78 ± 0,89
Streptokinase	27,02 ± 0,21 <sup>a</sup>	19,38 ± 0,74 <sup>a</sup>	45,34 ± 0,61 <sup>a</sup>
EtOH	21,17 ± 0,57 <sup>a</sup>	12,29 ± 0,19	28,54 ± 0,57 <sup>a</sup>
Hexan	18,45 ± 0,45	11,41 ± 0,74	26,12 ± 0,29
EtOAc	22,14 ± 0,87 <sup>a</sup>	13,98 ± 0,89 <sup>a</sup>	29,89 ± 0,12 <sup>a</sup>
BuOH	22,89 ± 0,48 <sup>a</sup>	14,36 ± 0,82 <sup>a</sup>	30,64 ± 1,24 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng.

Dựa trên kết quả Bảng 2, quan sát thấy các phân đoạn dịch chiết có thời gian đông máu (APTT, PT và TT) theo thứ tự sau: BuOH > EtOAc > EtOH > n-hexan. So với mẫu chứng, các phân đoạn dịch chiết BuOH và EtOAc đều làm tăng thời gian APTT, PT và TT có ý nghĩa thống kê. Huyết khối được hình thành bởi sự gắn kết tiểu cầu của các vùng bị tổn thương trên bề mặt tế bào nội mô. Quá

trình huyết khối được bắt đầu khi các tiểu cầu kích hoạt hình thành liên kết giữa các tiểu cầu và cũng liên kết với các tế bào bạch cầu và tạo thành một phức hợp. Đông máu không chỉ là kết quả của một quá trình phức tạp mà bắt đầu bằng cách kích hoạt các yếu tố nội sinh hoặc ngoại sinh hoặc con đường chung mà còn là một quá trình có liên quan đến quá trình điều hòa tương tác giữa các tiểu cầu, các yếu



tổ đông máu và thành mạch máu [8]. Trong các xét nghiệm đông máu, thời gian thromboplastin được hoạt hóa từng phần (APTT) được sử dụng để đánh giá các yếu tố đông máu nội sinh, thời gian prothrombin (PT) được sử dụng để đánh giá các yếu tố đông máu ngoại sinh, thời gian thrombin (TT) để đánh giá sự hình thành fibrin [8]. Kết quả của chúng tôi cho thấy các phân đoạn dịch chiết, đặc biệt là phân đoạn BuOH, có khả năng kéo dài các thông số về sự đông máu APTT, PT và TT có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng. Cơ chế chống huyết khối của các phân đoạn dịch chiết có thể liên quan đến ức chế các yếu tố nội sinh, ngoại sinh của quá trình đông máu và sự hình thành fibrin. Kết quả nghiên cứu này cũng phù hợp với những nghiên cứu tác dụng chống huyết khối trên *in vitro* và *in vivo* của tam thất đã được công bố [9-11]. Lau A. J. và cộng sự đã chứng minh cả tam thất thô và tam thất hấp đều có khả năng ức chế kết tập tiểu cầu và chống đông máu thông qua khả năng kéo dài thời gian chảy máu *in vivo* sau khi chuột được cho uống tam thất [9]. Nghiên cứu mới đây của Gao B. và cs. đã chứng minh tác dụng của notoginsenosid Ft1, một hợp chất saponin được phân lập từ tam thất, có tác dụng giảm các thông số APPT, PT và TT trên huyết tương người và chuột *in vitro*. Cơ chế tác dụng có thể là do Ft1 liên kết và kích hoạt thụ thể tiểu cầu P2Y<sub>12</sub> [10]. Ngoài ra, Wang J. và cộng sự

đã phát triển phương pháp HPLC-DAD-ESI-MS/MS để sàng lọc các hợp có khả năng kết tập tiểu cầu trong tam thất. Kết quả là có 4 hợp chất được xác định có khả năng gây kết tập tiểu cầu, bao gồm adenosin, guanosin, ginsenosid Rh1, và ginsenosid F1 [11]. Trong các phân đoạn dịch chiết của chúng tôi thì phân đoạn BuOH và EtOAc là các phân đoạn có hàm lượng saponin cao hơn so với các phân đoạn khác, đặc biệt là phân đoạn BuOH. Điều này giải thích tác dụng chống huyết khối cao nhất của phân đoạn BuOH so với các phân đoạn khác.

#### 4. Kết luận

Nghiên cứu đã đánh giá được khả năng làm tan huyết khối trên *in vitro* và *in vivo* của các phân đoạn dịch chiết từ tam thất. Kết quả cho thấy phân đoạn dịch chiết BuOH có tác dụng chống huyết khối, ly giải 51,33 % cục huyết khối trên *in vitro* và kéo dài các thông số APTT (22,89 ± 0,48 s), PT (14,36 ± 0,82 s) và TT (30,64 ± 1,24 s) trên *in vivo*. Kết quả này gợi ý cho việc nghiên cứu sâu hơn về thành phần hóa học của phân đoạn dịch chiết BuOH để phân tách được hoạt chất tinh khiết có tiềm năng trong phòng, điều trị các bệnh liên quan đến huyết khối và tim mạch.

**Lời cảm ơn:** Đề tài được tài trợ bởi Chương trình Khoa học và Công nghệ phục vụ phát triển bền vững vùng Tây Bắc, ĐHQGHN, mã số đề tài: KHCN-TB.05C/13-18.

#### Tài liệu tham khảo

- Choi R. C.-Y., Jiang Z., Xie H. Q., Cheung A. W.-H., Lau D. T.-W., Fu Q., Dong T. T., Chen J., Wang Z., Tsim K. W.-K., (2010), Anti-oxidative effects of the biennial flower of *Panax notoginseng* against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cytotoxicity in cultured PC12 cells. *Chinese Medicine*, 5, 38-38.
- Ng T. B., (2006), Pharmacological activity of sanchi ginseng (*Panax notoginseng*). *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 58(8), 1007-1019.
- Huang Y. S., Yang Z. C., Yan B. G., Hu X. C., Li A., Crowther R. S., (1999), Improvement of early postburn cardiac function by use of *Panax notoginseng* and immediate total eschar excision in one operation. *Burns*, 25(1), 35-41.
- Wei J. X., Wang J. F., Chang L. Y., Du Y. C. Chemical studies of san-chi *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen. I. Studies on the constituents of San-Chi root hairs. *Acta Pharmaceutica Sinica* 1980, 15(6), 359-364.
- Gao H., Wang F., Lien E. J., Trousdale M. D., (1996), Immunostimulating polysaccharides from *Panax notoginseng*. *Pharmaceutical Research*, 13(8), 1196-1200.
- Ali M. S., Amin M. R., Kamal C. M. I., Hossain M. A., (2013), *In vitro* antioxidant, cytotoxic, thrombolytic activities and phytochemical evaluation of methanol extract of the *A. philippense* L. leaves. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(6), 464-469.
- Gong G., Qin Y., Huang W., (2000), Anti-thrombosis effect of diosgenin extract from *Dioscorea zingiberensis* C.H. Wright *in vitro* and *in vivo*. *Phytomedicine* 2011, 18(6), 458-463.
- Triplet D. A. Coagulation and bleeding disorders: review and update. *Clinical Chemistry*, 46(8), 1260-1269.
- Lau A.-J., Toh D.-F., Chua T.-K., Pang Y.-K., Woo S.-O., Koh H.-L., (2009), Antiplatelet and anticoagulant effects of *Panax notoginseng*: Comparison of raw and steamed *Panax notoginseng* with *Panax ginseng* and *Panax quinquefolium*. *Journal of Ethnopharmacology*, 125(3), 380-386.
- Gao B., Huang L., Liu H., Wu H., Zhang E., Yang L., Wu X., Wang Z., (2014), Platelet P2Y(12) receptors are involved in the haemostatic effect of notoginsenoside Ft1, a saponin isolated from *Panax notoginseng*. *British Journal of Pharmacology*, 171(1), 214-223.
- Wang J., Huang Z.-G., Cao H., Wang Y.-T., Hui P., Hoo C., Li S.-P., (2008), Screening of anti-platelet aggregation agents from *Panax notoginseng* using human platelet extraction and HPLC-DAD-ESI-MS/MS. *Journal of Separation Science*, 31(6-7), 1173-1180.