

Đánh giá tác dụng tan huyết khối của các phân đoạn dịch chiết từ rễ cây đan sâm (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) trồng ở tỉnh Lào Cai

Bùi Thanh Tùng¹, Vũ Đức Lợi^{1*}, Nguyễn Thanh Hải¹, Hà Bá Tiến²

¹Khoa Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội

²Học viện Quân Y

*E. mail: ducloi82@gmail.com

Summary

The roots of *Salvia miltiorrhiza* Bunge were extracted with ethanol and fractionated with n-hexan, ethyl acetate and n-butanol. These obtained fractions were evaluated antithrombotic activity in vitro and in vivo. The BuOH fractions proved the strongest antithrombotic activity, followed by EtOAc fractions, and the weakest were the Hexane ones. The BuOH fractions were able to induce thrombolysis in vitro up to 39.56% and also extended the coagulation time by partially activating thromboplastin time (APTT, 26.29 ± 0.53 s), prothrombin time (PT, 18.82 ± 0.35 s) and thrombin time (TT, 34.89 ± 0.76 s) in vivo.

Keywords: *Salvia miltiorrhiza* Bunge, antithrombotic activity, in vitro, in vivo.

Đặt vấn đề

Đan sâm (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) là một cây thuốc quý trong y học cổ truyền. Từ lâu đan sâm đã được sử dụng rộng rãi ở Trung Quốc, Hàn Quốc, Nhật Bản và các nước châu Á khác để điều trị bệnh rối loạn liên quan đến máu và hệ tuần hoàn như bệnh tim mạch, bệnh mạch máu não. Nhiều nghiên cứu được tiến hành để xác định các tác dụng sinh học và các cơ chế của đan sâm. Rất nhiều báo cáo cho thấy đan sâm có thể làm giãn động mạch vành, tác dụng chống oxy hóa bảo vệ cơ tim, ức chế sự kết tập tiểu cầu, ngăn chặn oxy hóa lipoprotein tỷ trọng thấp [1]. Hoạt tính dược lý của cây đan sâm gồm có: hoạt động chống vi khuẩn hoạt động hỗ trợ, bảo vệ tim mạch, hoạt tính kháng viêm, cảm ứng quá trình apoptosis và hoạt động chống ung thư, hoạt tính bảo vệ thần kinh, hoạt động chống oxy hóa, bảo vệ chống lại chứng thiếu máu cục bộ ở não và tim và sự tưới máu lại [2]. Các thành phần có hoạt tính sinh học quan trọng của đan sâm bao gồm các hợp chất diterpen thuộc nhóm "tanshinones", trong đó các hợp chất quan trọng là tanshinon IIA, cryptotanshinon và acid acid salvianolic A. Để đánh giá hiệu quả của các phân đoạn tách chiết từ đan sâm 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 làm tan huyết khối của các phân đoạn dịch chiết từ đan sâm, bao gồm ethanol, n-hexan, ethyl acetat và butanol.

Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu

Các phân đoạn tách chiết từ rễ đan sâm (bao gồm ethanol, n-hexan, ethyl acetat, butanol) được chuẩn bị từ nguyên liệu đan sâm thu hái ở Lào Cai vào tháng 10-2014 và được lưu trữ mẫu tại Bộ môn Dược liệu & Dược học Cổ truyền - Khoa Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội. Rễ đan sâm (1,0 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 dư ở áp suất giảm cho cao chiết ethanol toàn phần (254 g). Hòa 100 g cao chiết ethanol này trong nước cất và chiết phân bố bằng n-hexan, ethyl acetat và n-butanol (3 lần). Các phân đoạn n-hexan, ethyl acetat, butanol được cất loại dung môi dư ở áp suất giảm để thu được phân đoạn tương ứng n-hexan (5,2 g), EtOAc (33,8 g), BuOH (6,4 g).

Hóa chất

Streptokinase (Sigma-Aldrich, Singapore); natri pentobarbital (Tokyo, Nhật Bản); CaCl₂ (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.

Động vật

Chuột cống trắng *Wistar*, 10 tuần tuổi, giống đực được nuôi trong điều kiện phòng sạch,

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

không khí được lọc và có áp lực dương tính. Nhiệt độ phòng được duy trì ở $28 \pm 0,5^\circ\text{C}$, độ ẩm $55 \pm 5\%$, ánh sáng được tự động điều khiển bật lúc 7 giờ 00, tắt lúc 19 giờ 00. Thức ăn và nước uống được liệt 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.

Phương pháp nghiên cứu

Tác dụng tan huyết khối *in vitro*¹⁹

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 dung dịch thử tương ứng với các phân đoạn chiết từ rễ đan sâm (10 mg/ml).

Chứng 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.

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

Tác dụng tan huyết khối *in vivo*¹⁶⁾

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 trong màng 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 natri pentobarbital/kg trọng

lượng bằng cách tiêm màng bụng. Máu từ tĩnh mạch chủ (lấy bằng cách chọc dò vào tim) được hút vào ống ly tâm nhựa và trộn ngay lập tức với 3,8% trinitrat 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 huyết tương nghèo tiểu cầu của mỗi chuột 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_2 (0,025 mol/l) vào hỗn hợp và tiến hành đo APTT.

TT và PT được xác định như sau: Ủ 100 μl huyết tương nghèo tiểu cầu của mỗi chuột 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 $\bar{X} \pm \text{SEM}$. Sự khác biệt có ý nghĩa khi $p < 0,05$.

Kết quả và bàn luận

Tác dụng tan huyết khối *in vitro* của đan sâm

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

Bảng 1: Kết quả làm tan huyết khối *in vitro*

Mẫu thử	Khối lượng trung bình cục máu đông (g)	Khối lượng trung bình cục máu đông bị ly giải (g)	% ly giải huyết khối
Đối chứng	0,5742 \pm 0,0321	0,0259 \pm 0,0027	4,52
Streptokinase	0,5325 \pm 0,0327	0,4763 \pm 0,0158*	89,45*
EtOH	0,5503 \pm 0,0158	0,1269 \pm 0,0162*	23,05*
n-hexan	0,5290 \pm 0,0241	0,0634 \pm 0,035*	11,99*
EtOAc	0,5114 \pm 0,0326	0,1677 \pm 0,0147*	32,78*
BuOH	0,5320 \pm 0,0217	0,2105 \pm 0,0245*	39,56*

*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 phân trăm ly giải cục máu đông cao (39,56% và 32,78%) so với chuẩn dương streptokinase (89,45%). Phần trăm ly giải cục máu đông của cả 4 phân đoạn dịch chiết

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

đều khác có ý nghĩa so với so sánh với đối chứng. Điều này chứng tỏ rằng các phân đoạn dịch chiết từ đan sâm có khả năng làm tan huyết khối.

Tác dụng tan huyết khối *in vivo*

Tác dụng tan huyết khối *in vivo* được đánh giá dựa trên các thông số về sự đông máu như TT (thrombin time), PT (prothrombin time), APTT (activated partial thromboplastin time). 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 đan sâm

Nhóm	APTT (s)	PT (s)	TT (s)
Đối chứng	17,34 ± 0,25	13,21 ± 0,67	27,92 ± 0,34
Streptokinase	27,52 ± 0,31*	19,24 ± 0,14*	45,32 ± 0,53*
EtOH	24,12 ± 0,14*	16,21 ± 0,45*	32,42 ± 0,63*
Hexane	21,23 ± 0,29	14,24 ± 0,52	28,56 ± 0,44
EtOAc	25,48 ± 0,38*	17,64 ± 1,32*	34,18 ± 0,87*
BuOH	26,29 ± 0,53*	18,82 ± 0,35*	34,89 ± 0,76*

*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 tố đông máu và thành mạch máu [7]. 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 [7]. 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 *in vitro* và

in vivo của đan sâm đã được công bố [8, 9]. Theo tác giả Yang Seun-Ah và cộng sự thì dịch chiết methanol của đan sâm kéo dài đáng kể các thông số APTT, PT *in vitro* nhờ vào khả năng quét các gốc tự do những nghiên cứu tác dụng chống huyết khối *in vitro* và *in vivo* của đan sâm đã được công bố [8]. Tác dụng chống huyết khối của đan sâm có thể liên quan đến khả năng chống kết tập tiểu cầu do thành phần acid salvanolic A gây ra. Cơ chế có thể liên quan đến khả năng làm tăng AMP vòng [8]. Trong các phân đoạn dịch chiết của chúng tôi thì phân đoạn BuOH và EtOAc là các phân đoạn có hàm lượng tanshinones và acid salvanolic A 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.

Kết luận

Nghiên cứu đã đánh giá được khả năng làm tan huyết khối *in vitro* và *in vivo* của các phân đoạn dịch chiết từ đan sâm. Kết quả cho thấy phân đoạn dịch chiết BuOH có tác dụng chống huyết khối, ly giải 39,56% cục huyết khối *in vitro* và kéo dài các thông số APTT (26,29 ± 0,53 s), PT (18,82 ± 0,35 s) và TT (34,89 ± 0,76s) *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.

Ghi chú: 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: KH-CN-TB.05C/13-18.

Tài liệu tham khảo

- Chan T. Y. (2001), "Interaction between warfarin and danshen (*Salvia miltiorrhiza*)", *Annals of Pharmacotherapy*, 35(4), pp. 501-504.
- Wang B. Q. (2010), "*Salvia miltiorrhiza*: Chemical and pharmacological review of a medicinal plant", *J. Med. Plants Res.*, 4(25), pp. 2813-2820.
- Liu J. J., Lin D. J., Liu P. Q., Huang M., Li X. D., Huang R. W. (2006), "Induction of apoptosis and inhibition of cell adhesive and invasive effects by tanshinone IIA in acute promyelocytic leukemia cells *in vitro*", *Journal of Biomedical Science*, 13(6), pp. 813-823.
- Zhou L., Zuo Z., Chow M. S. S. (2005), "Danshen: an overview of its chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use", *The Journal of Clinical Pharmacology*, 45(12), pp. 1345-1359.
- 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

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

extract of the *A. philippense* L. leaves", *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(6), pp. 464-469.

6. Gong G., Qin Y., Huang W. (2011), "Anti-thrombosis effect of diosgenin extract from *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright *in vitro* and *in vivo*", *Phytomedicine*, 18(6), pp. 458-463.

7. Triplett D. A. (2000), "Coagulation and bleeding disorders: review and update", *Clinical Chemistry*, 46(8), pp. 1260-1269.

8. Yang S. A., Im N. K., Lee I. S. (2007), "Effects of methanolic extract from *Salvia miltiorrhiza* Bunge on *in vitro* antithrombotic and antioxidative activities", *Korean Journal of Food Science and Technology*, 39(1), pp. 83-87.

9. Fan H. Y., Fu F. H., Yang M. Y., Xu H., Zhang A. H., Liu K. (2010), "Antiplatelet and antithrombotic activities of salvianolic acid A", *Thrombosis Research*, 126(1), pp. e17-e22.

(Ngày nhận bài: 08/01/2016 - Ngày duyệt đăng: 02/06/2016)

Nghiên cứu ảnh hưởng... (Tiếp theo trang 17)

Một kết quả cần chú ý nữa là khi so sánh mức độ ức chế biểu hiện gen G6Pase với khả năng làm giảm glucose máu của các nhóm dược liệu thì thấy hai tác dụng này không tỷ lệ với nhau. Ví dụ như mẫu G11 thu hái tại Hà Nội có khả năng hạ glucose máu tốt nhất^[2] trong khi khả năng ức chế biểu hiện gen G6Pase của dược liệu này lại thấp nhất. Mặc dù sự khác biệt này chưa có ý nghĩa thống kê nhưng kết quả này cùng với kết quả đã được công bố trước đó của chúng tôi về khả năng ức chế alphasglucosidase^[1] gợi ý rằng tác dụng hạ glucose máu của *Gymnema inodorum* ở Việt Nam có được là sự phối hợp hiệp đồng của nhiều cơ chế khác nhau.

Cuối cùng, cũng tương tự như với khả năng ức chế alphasglucosidase, mặc dù cùng có khả năng ức chế biểu hiện gen G6Pase nhưng, mức độ ức chế biểu hiện gen G6Pase của cả 4 mẫu không đồng nhất với nhau. Nguyên nhân của hiện tượng này cũng có thể giải thích là do số lượng cũng như hàm lượng của các hoạt chất giữa các mẫu thu hái tại những địa phương khác nhau của cùng một loài không hoàn toàn giống nhau^[4]. Nghiên cứu gần đây nhất về thành phần hóa học của 2 mẫu *Gymnema inodorum*, thu hái tại 2 địa điểm khác nhau cho thấy chúng có những thành phần hóa học không giống nhau [Nguyễn Ngọc Tú (2013), "Nghiên cứu phân loại các loài trong chi *Gymnema* R. Br thu ở Việt Nam sử dụng văn tay hóa học HPTLC", *Khóa luận tốt nghiệp Dược sĩ*, Trường Đại học Dược Hà Nội]. Kết quả này là những minh chứng đầu tiên cho giả thiết của chúng tôi.

Kết luận

Cả 4 mẫu *Gymnema inodorum* (Lour.) Dence ở Việt Nam đều có khả năng ức chế biểu hiện gen của enzym G6Pase. Mặt khác, mức độ ức chế biểu hiện gen G6Pase của các mẫu dược liệu ở những vùng địa lý khác nhau không đồng nhất.

(Ngày nhận bài: 11/03/2016 - Ngày duyệt đăng: 02/06/2016)

Tài liệu tham khảo

1. Nguyễn Thị Hương, Phùng Thanh Hương, Đào Thị Mai Anh (2015), "Đánh giá tác dụng ức chế enzym alpha glucosidase *in vitro* của 4 loài *Gymnema* R. Br ở Việt Nam", *Tạp chí Dược học*, 469 (55), 50-56.

2. Phạm Hà Thanh Tùng, Phạm Hà Thanh Tùng (2014), "Đánh giá tác dụng hạ glucose máu trên thực nghiệm của 4 loài *Gymnema* R. Br ở Việt Nam", *Tạp chí Dược học*, 462 (54), 43-48.

3. Phạm Hà Thanh Tùng (2012), "Nghiên cứu tinh đa dạng thực vật và thành phần hóa học của các loài trong chi *Gymnema* R. Br ở Việt Nam", *Luận văn Thạc sĩ Dược học*, Trường Đại học Dược Hà Nội.

4. Agius L. (2007), "New hepatic targets for glycaemic control in diabetes.", *Best Pract Res. Clin. Endocrinol Metab*, 21: p. 587-605.

5. Anchalee Chiabchalard, Tewin Tencomnao and Rachana Santianont (2010), "Effect of *Gymnema inodorum* on postprandial peak plasma glucose levels in healthy human", *African J. of Biotechnology*, Vol. 9(7), pp. 1079-1085.

6. Ananthan, Rajendran, Muniappan Latha, Leelavinothan Pari, et al (2003), "Effect of *Gymnema montanum* on blood glucose, plasma insulin, and carbohydrate metabolic enzymes in alloxan-Induced diabetic rats.", 6, p. 143-49, doi: 10.1089/109662003765184732.

7. Barthel, Andreas, and Dieter Schmolli (2003), "Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis.", *American J. of Physiology: Endocrinology and Metabolism* 285, no. 4, p. 685-92. doi:10.1152/ajpendo.00253.

8. J. Singh, E. Cumming, G. Manoharan, H. Kalasz, and E.Adeghate (2011), "Medicinal chemistry of the anti-diabetic effects of momordica charantia: active constituents and modes of actions," *Open Medicinal Chemistry J.*, vol. 5, supplement 2, pp. 70-77.

9. Shimizu, K. et al. (1997), "Suppression of glucose absorption by extracts from the leaves of *Gymnema inodorum*", *J. Vet. Med. Sci. Jpn. Soc. Vet. Sci.*, 59, 753-757.