

Nghiên cứu tác dụng tăng cường miễn dịch của phân đoạn dịch chiết polysaccharid từ củ con của cây ô đầu (*A. carmichaeli* Debx.) trồng ở tỉnh Hà Giang

Vũ Đức Lợi^{1*}, Nguyễn Tiến Vững²

Nguyễn Thượng Đông³, Phạm Thị Vân Anh⁴

¹Khoa Y Dược, ĐHQGHN

²Viện Pháp y Quốc gia

³Viện Dược liệu

⁴Trường ĐH Y Hà Nội

*Email: ducloi82@gmail.com

Summary

The immunostimulant activity of polysaccharide fractions extracted from the daughter roots of *A. carmichaeli* Debx. growing in Hà Giang province was tested on Swiss mice with cyclophosphamide-induced immuno suppression at two oral doses of 100 mg/kg and 300 mg/kg. The effect was estimated in term of relative spleen and thymus weights, lymphoid organ histology, total leukocyte count and leukocyte formula of the peripheral blood, delayed type hypersensitivity, IL-2 and TNF- α levels in the peripheral blood. Oral administration of the polysaccharide fractions significantly increased the relative spleen weight. The polysaccharide fractions extracted from the daughter roots of *A. carmichaeli* evoked a significant ($p < 0.05$) increase in IL-2 level of the peripheral blood. The polysaccharide fractions from daughter roots of *A. carmichaeli* Debx. demonstrated desirable immunostimulating potentials.

Keywords: *A. carmichaeli* Debx., polysaccharide, immunomodulatory activity, cyclophosphamide.

Đặt vấn đề

Cây ô đầu thuộc chi *Aconitum* được sử dụng nhiều trong y học cổ truyền với công dụng chính là đau nhức xương khớp, lưng gối đau lạnh, chứng vong dương, thoát dương. Tuy nhiên, những năm gần đây trên thế giới đã có một số công bố về nghiên cứu tác dụng tăng cường miễn dịch của polysaccharid phân lập từ một số loài thuộc chi *Aconitum* [3-6]. Nghiên cứu cho thấy các polysaccharid này làm tăng cường khả năng miễn dịch trên động vật thí nghiệm. Tại Việt Nam đến nay chưa có công bố nào về tác dụng của polysaccharid phân lập từ cây ô đầu. Vì vậy trong bài báo này chúng tôi công bố kết quả nghiên cứu tác dụng tăng cường miễn dịch của phân đoạn polysaccharid phân lập từ củ con (phụ tử) của cây ô đầu trồng ở tỉnh Hà Giang.

Nguyên liệu và phương pháp

Nguyên liệu

Phân đoạn dịch chiết nước chứa polysaccharid được chiết từ củ con (phụ tử) của cây ô đầu thu hái vào tháng 10 năm 2012 tại huyện Quan Bạ, tỉnh Hà Giang. Tên khoa học của cây được PGS. TS. Nguyễn Văn Tập (Viện Dược liệu) xác định là: *A. carmichaeli* Debx..

- Chuột nhắt trắng chủng Swiss trưởng thành khỏe mạnh, cả 2 giống, trọng lượng 20 ± 2 g do Viện Vệ sinh dịch tễ trung ương cung cấp.

Hóa chất, thiết bị

- Cyclophosphamid (CY): dạng thuốc bột, biệt dược Endoxan lọ 500 mg của Hãng ASTA Medica, Đức.

- Levamisol dạng bột trắng, hàm lượng 98,6% do Phòng Hoá lý I, Viện Kiểm nghiệm trung ương, Bộ Y tế cung cấp.

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

- Máy huyết học tự động ABC (Animal Blood Counter) của Hãng Ugo- Basile, Italy.

Phương pháp nghiên cứu

Tiêm màng bụng cyclophosphamid, liều duy nhất 200 mg/kg thể trọng để gây suy giảm miễn dịch. Chuột thí nghiệm được chia thành 5 lô:

Lô 1 (n=10) Chứng sinh học: Chuột không bị tác động gì.

Lô 2 (n=10) Mô hình: Chuột được tiêm CY + uống nước cất.

Lô 3 (n=10) Chứng dương: Chuột được tiêm CY + uống levamisol liều 100 mg/kg.

Lô 4 (n=10) thuốc thử liều 1: Chuột được tiêm CY + uống polysaccharid liều 100 mg/kg tương đương lâm sàng.

Lô 5 (n=10): thuốc thử liều 2: Chuột được tiêm CY + uống polysaccharid liều 300 mg/kg (gấp 3 lần liều tương đương trên lâm sàng).

Sau khi tiêm màng bụng cyclophosphamid liều 200 mg/kg ở các lô 2, 3, 4, 5. Ngày thứ 2 các lô chuột được uống nước cất và các thuốc liên tục trong 7 ngày. Ngày thứ 8, giết chuột, lấy máu và các tổ chức lympho để làm xét nghiệm.

Các thông số nghiên cứu

- Trọng lượng lách tương đối (TTLTD), trọng lượng tuyến ức tương đối (TLTUTD)

- Số lượng bạch cầu, công thức bạch cầu máu ngoại vi.

Phản ứng bì với kháng nguyên OA (Ovalbumin + Al(OH)₃).

- Nồng độ IL2 và TNF α trong máu.

- Giải phẫu bệnh vi thể lách và tuyến ức.

Xử lý số liệu

Các số liệu thu thập được xử lý bằng phương pháp thống kê y sinh học theo T test - Student quy ước:

*: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$ so với lô chứng sinh học

Δ : $p \leq 0,05$; $\Delta\Delta$: $p \leq 0,01$; $\Delta\Delta\Delta$: $p \leq 0,001$ so với lô mô hình

Kết quả và bàn luận

Ảnh hưởng của thuốc thử lên trọng lượng lách và tuyến ức của chuột thử nghiệm

Kết quả thử tác dụng của dịch chiết nước chứa polysaccharid được chiết từ củ con (phụ tử) của cây ô đầu lên trọng lượng lách và tuyến ức chuột thử nghiệm được thể hiện qua bảng 1 và bảng 2.

Bảng 1: Ảnh hưởng của thuốc thử lên trọng lượng lách tương đối

Lô	n	Trọng lượng lách tương đối ($\bar{X} \pm SE$, 1:1000, mg/g)
Lô 1: Chứng sinh học	8	8,83 \pm 0,63
Lô 2: Mô hình CY	8	14,60 \pm 1,32*
Lô 3: Chứng dương levamisol	8	7,56 \pm 1,09 ^{***}
Lô 4: PD polysaccharid liều 100 mg/kg	8	10,41 \pm 1,43 ^Δ
Lô 5: PD polysaccharid liều 300 mg/kg	8	10,01 \pm 3,01 ^Δ

Kết quả trình bày ở bảng 1 cho thấy: CY làm tăng trọng lượng lách tương đối ở chuột nhất trắng. Levamisol làm giảm trọng lượng lách tương đối rất rõ rệt so với lô mô hình. PD polysaccharid cả hai liều có tác dụng hạn chế có ý nghĩa thống kê sự gia tăng trọng lượng lách tương đối gây ra do CY ($p < 0,05$).

Bảng 2: Ảnh hưởng của thuốc thử lên trọng lượng tuyến ức tương đối

Lô	N	Trọng lượng tuyến ức tương đối ($\bar{X} \pm SE$, 1:1000, mg/g)
Lô 1: Chứng sinh học	8	4,17 \pm 0,22
Lô 2: Mô hình CY	8	2,39 \pm 0,22***
Lô 3: Chứng dương levamisol	8	1,89 \pm 0,30***
Lô 4: PD polysaccharid liều 100 mg/kg	8	1,75 \pm 0,28***
Lô 5: PD polysaccharid liều 300 mg/kg	8	1,80 \pm 0,14***

Kết quả ở bảng 2 cho thấy: Trọng lượng tuyến ức tương đối ở lô mô hình (lô 2) giảm rõ rệt so với lô chứng sinh học (lô 1) với $p \leq 0,001$. Trọng lượng tuyến ức ở các lô uống levamisol và PD polysaccharid cả hai liều không có khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình.

Ảnh hưởng của thuốc thử lên số lượng bạch cầu

Bảng 3: Ảnh hưởng của thuốc thử lên số lượng bạch cầu

Lô	n	Số lượng bạch cầu ($\bar{X} \pm SE, G/l$)
Lô 1: Chứng sinh học	8	2,34 ± 0,12
Lô 2: Mô hình CY	8	1,21 ± 0,20***
Lô 3: Chứng dương levamisol 100 mg/kg	8	3,17 ± 0,63 ^{ab}
Lô 4: PD polysaccharid liều 100 mg/kg	8	1,15 ± 0,25***
Lô 5: PD polysaccharid liều 300 mg/kg	8	1,16 ± 0,13***

Kết quả trình bày ở bảng 3 cho thấy: CY làm giảm rõ rệt số lượng bạch cầu trong máu ngoại vi của chuột. Levamisol 100 mg/kg có tác dụng làm tăng bạch cầu máu ngoại vi so với lô mô hình. PD polysaccharid cả 2 liều không có tác dụng làm tăng bạch cầu máu ngoại vi so với lô mô hình ($p > 0,05$).

Kết quả đánh giá miễn dịch dịch thể

Bảng 4: Ảnh hưởng của thuốc thử lên nồng độ IgG máu ngoại vi

Lô	n	Nồng độ IgG ($\bar{X} \pm SE, pg/ml$)
Lô 1: Chứng sinh học	8	84,98 ± 0,55
Lô 2: Mô hình CY	8	77,20 ± 1,14***
Lô 3: Chứng dương levamisol	8	81,47 ± 0,62**** ^a
Lô 4: PD polysaccharid liều 100 mg/kg	8	81,92 ± 0,34**** ^a
Lô 5: PD polysaccharid liều 300 mg/kg	8	82,44 ± 0,49**** ^a

Kết quả bảng 4 cho thấy: CY làm giảm rõ rệt nồng độ IgG máu ngoại vi so với lô chứng sinh học ($p < 0,001$). Levamisol làm tăng nồng độ IgG máu ngoại vi so với lô mô hình. PD polysaccharid cả 2 liều cũng có tác dụng làm tăng nồng độ IgG máu ngoại vi so với lô mô hình ($p < 0,05$).

Kết quả đánh giá miễn dịch qua trung gian tế bào

Phản ứng bì với kháng nguyên OA

Bảng 5: Ảnh hưởng của thuốc thử đến phản ứng bì với kháng nguyên OA

Lô	n	Phản ứng bì ($\bar{X} \pm SE, mm$)
Lô 1: Chứng sinh học	8	2,95 ± 0,07
Lô 2: Mô hình CY	8	3,04 ± 0,10

Lô 3: Chứng dương levamisol 100 mg/kg	8	2,93 ± 0,11
Lô 4: PD polysaccharid liều 100 mg/kg	8	2,96 ± 0,30
Lô 5: PD polysaccharid liều 300 mg/kg	8	2,85 ± 0,29

Kết quả trình bày ở bảng 5 cho thấy: Không có sự khác biệt giữa các lô so với lô mô hình và so với lô chứng sinh học.

Định lượng các cytokin trong máu

Bảng 6: Ảnh hưởng của thuốc thử đến nồng độ IL-2

Lô	n	Nồng độ IL-2 ($\bar{X} \pm SE, pg/ml$)
Lô 1: Chứng sinh học	8	7,73 ± 0,23
Lô 2: Mô hình CY	8	2,97 ± 0,46***
Lô 3: Chứng dương levamisol 100 mg/kg	8	7,21 ± 1,51 ^a
Lô 4: PD polysaccharid liều 100 mg/kg	8	5,74 ± 0,97 ^a
Lô 5: PD polysaccharid liều 300 mg/kg	8	7,52 ± 1,24 ^a

Kết quả nghiên cứu ở bảng 6 cho thấy: CY gây ra tình trạng giảm rõ rệt nồng độ IL-2 trong máu ngoại vi. Levamisol 100 mg/kg có tác dụng làm tăng nồng độ IL-2 so với lô mô hình. Nồng độ IL-2 ở lô uống levamisol không khác biệt so với nhóm chứng sinh học. PD polysaccharid liều 100 mg/kg có tác dụng làm tăng nồng độ IL-2 so với lô mô hình ($p < 0,05$) nhưng vẫn thấp hơn so với nhóm chứng sinh học. PD polysaccharid liều 300 mg/kg có tác dụng rõ rệt làm tăng nồng độ IL-2 so với lô mô hình, nồng độ IL-2 ở lô PD polysaccharid liều 300 mg/kg không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh học.

Bảng 7: Ảnh hưởng của thuốc thử đến nồng độ TNF- α

Lô	n	Nồng độ TNF- α ($\bar{X} \pm SE, pg/ml$)
Lô 1: Chứng sinh học	8	5,01 ± 0,59
Lô 2: Mô hình CY	8	16,55 ± 2,75***
Lô 3: Chứng dương levamisol 100 mg/kg	8	8,33 ± 1,40 ^a
Lô 4: PD polysaccharid liều 100 mg/kg	8	15,13 ± 3,82 ^a
Lô 5: PD polysaccharid liều 300 mg/kg	8	13,70 ± 1,31 ^a

Kết quả nghiên cứu ở bảng 7 cho thấy: CY gây gia tăng rõ rệt nồng độ TNF- α trong máu

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

ngoại vi của chuột nhắt. Levamisol 100 mg/kg có tác dụng làm giảm có ý nghĩa thống kê TNF- α so với lô mô hình ($p < 0,05$). PD polysaccharid cả 2

liều không làm thay đổi có ý nghĩa thống kê nồng độ TNF- α so với lô mô hình ($p > 0,05$).

Giải phẫu vi thể lách và tuyến ức

Bảng 8: Kết quả giải phẫu vi thể lách và tuyến ức

Lô nghiên cứu	Lách	Tuyến ức
Lô 1: Chứng sinh học	Chuột số 2, số 3 và số 4: Các vùng tủy trắng của lách bình thường	Chuột số 2, số 3 và số 4: Mô tuyến ức bình thường
Lô 2: Mô hình CY	Chuột số 12, số 13 và số 14: Tủy trắng giảm số lượng và kích thước lympho bào	Chuột số 12, số 13 và số 14: Giảm số lượng lympho bào tuyến ức
Lô 3: Chứng đương levamisol 100 mg/kg	Chuột số 22: Tủy trắng giảm nhẹ kích thước, có tế bào thoái hóa.	Chuột số 22: Tuyến ức có giảm số lượng lympho bào.
	Chuột số 24: Tủy trắng có dấu hiệu phục hồi với số lượng và kích thước tế bào tăng. Chuột số 25: Các vùng tủy trắng của tuyến ức gần như bình thường hoặc giảm nhẹ.	Chuột số 24: Tuyến ức có tăng lympho bào. Chuột số 25: Tuyến ức gần như bình thường.
Lô 4: Phụ từ liều 100 mg/kg	Chuột số 53 và 55: Tủy trắng giảm nặng số lượng và kích thước lympho bào	Chuột số 53: Tuyến ức giảm số lượng lympho bào. Chuột số 55: Tuyến ức giảm nhẹ số lượng lympho bào.
	Chuột số 72: Vùng tủy trắng giảm mức độ vừa về số lượng và kích thước lympho bào Chuột số 73: Vùng tủy trắng giảm nặng về kích thước và số lượng lympho bào.	Chuột số 72 và 73: Tuyến ức giảm số lượng lympho bào.

Bàn luận

CY là tác nhân gây suy giảm miễn dịch được sử dụng phổ biến trong nghiên cứu thực nghiệm. Theo dõi trọng lượng lách và tuyến ức có thể gián tiếp đánh giá được khả năng đáp ứng của hệ miễn dịch để bảo vệ cơ thể trước sự xâm nhập của kháng nguyên.

Phản ứng bị với kháng nguyên OA thể hiện khả năng đáp ứng miễn dịch của các lympho bào T qua đáp ứng miễn dịch tế bào^[1,2]. Kết quả cho thấy phản ứng bị giữa các lô nghiên cứu không có sự khác biệt nhiều. CY chủ yếu gây ức chế miễn dịch dịch thể, ít ảnh hưởng đến chức năng của các lympho bào T, do đó, khả năng đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào của các lô nghiên cứu ít có sự thay đổi.

Định lượng nồng độ IL-2 và TNF- α trong máu ngoại vi, hai cytokin quan trọng được các tế bào có thẩm quyền miễn dịch tiết ra khi tiếp xúc với kháng nguyên, giúp tìm hiểu rõ hơn khả năng kích thích miễn dịch qua trung gian tế bào của PD polysaccharid. Kết quả cho thấy nồng độ IL-2 ở hai lô uống PD polysaccharid tăng cao hơn so với lô 2. Trong khi đó, PD polysaccharid cả 2 liều không làm thay đổi có ý nghĩa thống kê nồng độ TNF- α so với lô mô hình ($p > 0,05$).

Kết luận

Phân đoạn polysaccharid chiết xuất từ phụ từ liều 100 mg/kg và liều 300 mg/kg có tác dụng kích thích miễn dịch trên mô hình gây suy giảm miễn dịch bằng cyclophosphamid. Tác dụng kích thích miễn dịch thông qua thuốc thử làm tăng bạch cầu số lượng bạch cầu, tăng nồng độ cytokine IL-2, nồng độ globulin miễn dịch và hạn chế được một phần tổn thương trên giải phẫu vi thể tổ chức lympho trung ương và ngoại vi.

Tài liệu tham khảo

- Bô Y tế (2007), Sinh lý bệnh và Miễn dịch - Phần Miễn dịch học, Nhà xuất bản Y học.
- Nguyễn Trọng Thông (2005), "Thuốc tác dụng trên hệ thống miễn dịch", *Dược lý học lâm sàng, Nhà xuất bản Y học*, tr. 567-578.
- Chi Zhao, Min Li, Yifan Luo, Weikang Wu (2006), "Isolation and structural characterization of an immunostimulating polysaccharide from fuzi, *Aconitum carmichaeli*", *Carbohydrate Research*, Vol. 341, Issue 4, Pages 485-491.
- Huisheng Li, Meina Sun, Jin Xu, Hui Li, Meng Zang, Yunfu Cui (2013), "Immunological response in H22 transplanted mice undergoing *Aconitum coreanum* polysaccharide treatment", *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 55, pp 295-300.
- Tingting Gao, Shuai Ma, Jiayin Song, Hongtao Bi, Yanduo Tao (2011), "Antioxidant and immunological activities of water-soluble polysaccharides from