

ĐÁNH GIÁ ĐỘC TÍNH CẤP VÀ TÁC DỤNG KIỂM SOÁT LIPID HUYẾT CỦA CAO CHIẾT ETHANOL LÁ CÂY MẬT GẤU NAM TRÊN MÔ HÌNH CHUỘT NHẮT TRẮNG TĂNG LIPID HUYẾT BẰNG TYLOXAPOL

Nguyễn Thị Mỹ Hạnh¹, Cao Thị Tài Nguyễn¹, Mai Huỳnh Nhu^{2*}

¹Trường Đại học Y Dược Cần Thơ

²Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

Tác giả chịu trách nhiệm chính

*Email: mhnhu@ump.edu.vn

Ngày nhận bài: 02/8/2023

Ngày phản biện: 23/9/2023

Ngày duyệt đăng: 30/9/2023

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Mật gấu nam (*Vernonia amygdalina* Asteraceae), là một loại cây được trồng phổ biến ở Việt Nam. Cây Mật gấu nam có tác dụng chống oxy hóa, hạ đường huyết, hạ lipid huyết, ...
Mục tiêu nghiên cứu: Nghiên cứu này nhằm mục đích đánh giá độc tính cấp và tác dụng giảm rối loạn lipid huyết của cao chiết lá Mật gấu nam trên mô hình chuột nhắt trắng gây tăng lipid huyết bằng tyloxapol. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Cao chiết ethanol lá Mật gấu nam. Độc tính cấp được tiến hành dựa theo tài liệu: “Hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y, thuốc từ dược liệu, số 141/QĐ-K2ĐT ngày 27/10/2015 của Bộ Y Tế năm 2015”. Chuột được gây tăng lipid huyết bằng cách tiêm phúc mô một liều duy nhất tyloxapol (400 mg/kg). **Kết quả:** Với liều 15 g/kg trọng lượng chuột, cao chiết lá Mật gấu nam không thể hiện độc tính cấp đường uống. Thêm vào đó, những chuột được uống cao chiết lá cây Mật gấu nam với liều 500 mg/kg, 1500 mg/kg và atorvastatin liều 60 mg/kg thể trọng chuột cho thấy sự giảm đáng kể nồng độ triglycerid ($p < 0,05$) nhưng không giảm nồng độ cholesterol toàn phần ($p > 0,05$) trong huyết tương chuột khi so sánh với nhóm chứng. **Kết luận:** Cao chiết lá Mật gấu nam không gây độc tính cấp đường uống. Nghiên cứu này cho thấy, cao chiết lá Mật gấu nam có tác dụng hạ triglycerid ở liều 500 mg/kg và 1500 mg/kg so với nhóm chứng bệnh ($p < 0,05$). Trong khi đó, liều 250 mg/kg không có tác dụng hạ triglycerid ở mô hình chuột gây tăng lipid máu cấp bằng tyloxapol với liều 400 mg/kg.

Từ khóa: *Vernonia amygdalina*, độc tính cấp, tăng lipid huyết, tác dụng hạ lipid huyết.

ABSTRACT

ACUTE ORAL AND PROTECTIVE EFFECTS OF *VERNONIA AMYGDALINA* DEL. ASTERACEAE LEAVES EXTRACT ON HYPERLIPIDEMIA- INDUCED BY TYLOXAPOL IN ALBINO MICE

Nguyen Thi My Hanh¹, Cao Thi Tai Nguyen¹, Mai Huynh Nhu^{2*}

¹ Can Tho University of Medicine and Pharmacy.

² University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh city

*Email: mhnhu@ump.edu.vn

Background: *Vernonia amygdalina* - a shrub that grows predominantly in tropical Africa and is now a plant widely grown in Vietnam. It has antioxidant, anti-inflammatory, hypoglycemic, lipid-lowering effects, etc. **Objectives:** To evaluate the acute toxicity and protective effects of *Vernonia amygdalina* leaves extract on hyperlipidemia-induced by tyloxapol in Swiss albino mice. **Materials and methods:** Ethanolic extract of the leaves *Vernonia amygdalina*. The acute toxicity was conducted according to “Guidelines for preclinical and clinical trials of oriental and herbal medicines, decision number 141/QĐ-K2ĐT October 27th, 2015 of Ministry of Health”. The mice

were induced hyperlipidemia by tyloxapol (400 mg/kg, intraperitoneal injection). **Results:** In our acute toxicity test on mice, the ethanol extract of *Vernonia amygdalina* did not acute oral toxicity happened at the maximum dose (D_{max}) (15 g/kg of body weight). In addition, mice in groups of ethanol extract of the leaves *Vernonia amygdalina* at a dose of 500 mg/kg, 1500 mg/kg and atorvastatin 60 mg/kg, showed a significant decrease ($p < 0.05$) in plasma triglyceride, but no significant decrease ($p > 0.05$) in plasma total cholesterol when compared with control group. **Conclusion:** *Vernonia amygdalina* leaves ethanolic extract affirms no acute toxicity. Evidence from this study proves the lipid-lowering effects of this plant at a dose of 500 mg/kg and 1500 mg/kg compared to a control group ($p < 0.05$), while a dose of 250 mg/kg had no effect on lowering triglycerides in mice model of hyperlipidemia with tyloxapol at a dose of 400 mg/kg.

Keywords: *Vernonia amygdalina*, acute toxicity, hyperlipidemia, hypolipidemia effect.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây Mật gấu nam - một loại cây bụi mọc chủ yếu ở vùng nhiệt đới châu Phi – hiện nay được trồng nhiều ở Việt Nam và được sử dụng với mục đích chống viêm [1], tăng huyết áp, tăng lipid máu, điều trị tăng đường huyết; tác dụng bảo vệ gan [2],... Tuy nhiên, những tác dụng này trước đây chưa có cơ sở khoa học nào đảm bảo, chỉ được truyền miệng, hoặc qua các bài thuốc dân gian. Hiện nay, ở Việt Nam và trên thế giới cũng đã tiến hành nghiên cứu về tác dụng của cây Mật gấu nam nhiều nhưng trên cao chiết methanol, cao chiết ethanol 96% mà chưa có nghiên cứu nào trên cao chiết ethanol 70%. Trong cao chiết ethanol 70% chúng tôi chiết được nhiều hợp chất flavonoid hơn ở cao methanol và cao ethanol 96%. Vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu độc tính cấp và tác dụng hạ lipid máu của cao chiết ethanol 70% lá cây Mật gấu nam trên chuột nhắt trắng, tạo tiền đề cho các thử nghiệm dược lý tiếp theo. Độc tính cấp được thực hiện theo phương pháp liều tối đa qua kim. Chuột được gây tăng lipid huyết bằng tyloxapol (400 mg/kg, i.p).

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Cao chiết ethanol 70% lá Mật gấu nam. Lá Mật gấu nam được thu hái vào tháng 4 năm 2023 tại quận Bình Thủy, thành phố Cần Thơ. Lá thu hái về rửa sạch, sấy khô ở 40°C đến độ ẩm dưới 13%, nghiền thành bột và chiết hoàn toàn bằng ethanol 70% bằng phương pháp chiết nóng [3]. Cho dung môi vào được liệu theo tỷ lệ 10:1, đun hồi lưu ở 70°C trong ba giờ. Sau khi đun, dịch chiết được lọc và cô lại thu được cao chiết ethanol toàn phần.

2.2. Động vật thí nghiệm

Chuột bạch chủng *Swiss albino* khỏe mạnh do Viện Pasteur thành phố Hồ Chí Minh cung cấp có trọng lượng trung bình 25 ± 2 g được dùng làm động vật thí nghiệm. Chuột được cho ăn thức ăn viên và uống nước cất tại Khoa Dược, Đại học Nam Cần Thơ. Những chuột này được nuôi ổn định trong điều kiện phòng thí nghiệm ít nhất 1 tuần cho đến khi tiến hành thí nghiệm.

2.3. Hóa chất

Tyloxapol (Sigma), atorvastatin (Pfizer), ethanol 70% (Việt Nam) và nước cất (Việt Nam)

2.4. Thiết kế nghiên cứu

- Phương pháp thử độc tính cấp

Nghiên cứu được thực hiện theo “Hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y, thuốc từ dược liệu, quyết định số 141/QĐ-K2ĐT ngày 27 tháng 10 năm 2015 của Bộ Y tế” nhằm giảm số lượng chuột thí nghiệm [4].

Chuột được chia thành 2 nhóm, mỗi nhóm 5 con.

Nhóm 1 (nhóm chứng): uống nước cất (0,1 ml/10g)

Nhóm 2 (nhóm thử nghiệm): uống cao chiết lá cây Mật gấu nam với liều tối đa qua kim với thể tích cho uống 0,1 ml/10g chuột.

- Phương pháp tăng lipid máu gây ra bởi tyloxapol

Sáu mươi con chuột được chia thành sáu nhóm, mỗi nhóm 10 con. Chuột được chia ngẫu nhiên vào nhóm.

Thí nghiệm này được tiến hành theo phương pháp của nhóm tác giả Chung Thị Mỹ Duyên và cộng sự: Chuột nhịn ăn trong 16 giờ trước khi gây tăng lipid máu bằng cách tiêm phúc mô một liều duy nhất tyloxapol 400 mg/kg trọng lượng chuột [5].

- Nhóm 1 (nhóm chứng): nước muối sinh lý (i.p) + nước cất 0,1 ml/10g (p.o).

- Nhóm 2 (nhóm chứng âm): tyloxapol (400 mg/kg, i.p) + nước cất 0,1 ml/10g (p.o).

- Nhóm 3: tyloxapol (400 mg/kg, i.p) + cao chiết lá Mật gấu nam (250 mg/kg, p.o).

- Nhóm 4: tyloxapol (400 mg/kg, i.p) + cao chiết lá Mật gấu nam (500 mg/kg, p.o).

- Nhóm 5: tyloxapol (400 mg/kg, i.p) + cao chiết lá Mật gấu nam (1500 mg/kg, p.o).

- Nhóm 6 (chứng dương): tyloxapol (400 mg/kg, i.p) + atorvastatin (60 mg/kg, p.o)

[6].

Nhóm 2, 3, 4, 5 và 6 được cho uống nước cất và dùng cao chiết lá Mật gấu nam với liều lần lượt là 250 mg/kg, 500 mg/kg, 1500 mg/kg và atorvastatin 60 mg/kg vào hai thời điểm: (1) 60 phút sau khi tiêm tyloxapol, và (2) 12 giờ sau khi tiêm tyloxapol (ngày 1) [6]. Ngày 2, chuột được gây mê bằng ether. Mổ chuột và lấy máu tim cho vào ống EDTA (1ml) để xét nghiệm cholesterol toàn phần và triglycerid trong huyết tương chuột.

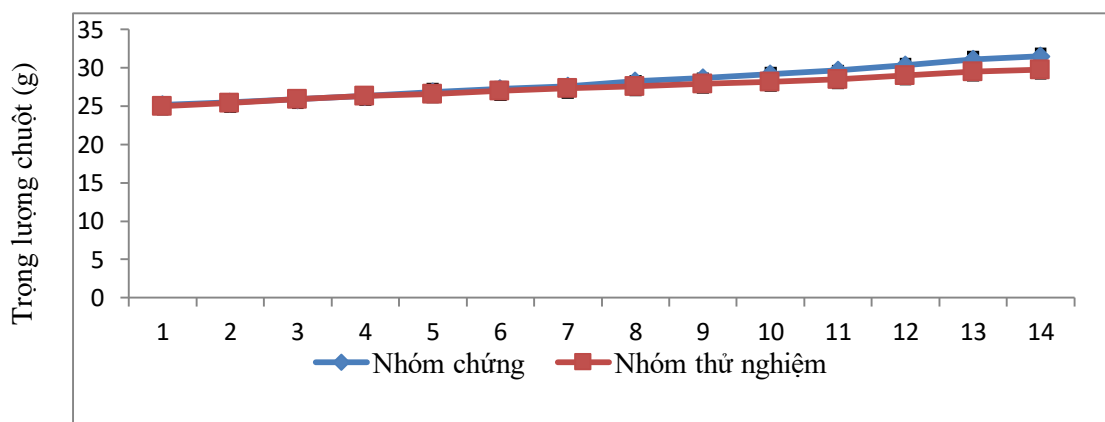
2.5. Phân tích thống kê

Kết quả trình bày dưới dạng trung bình \pm độ lệch chuẩn ($M \pm SD$). Dùng phép kiểm phân tích phương sai 1 yếu tố (One-way ANOVA) với phần mềm SPSS 20. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi giá trị $p < 0,05$ [5].

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả độc tính cấp

Trọng lượng trung bình của chuột trong thử nghiệm độc tính cấp được thể hiện qua hình 1.



Hình 1. Trọng lượng chuột trong thử nghiệm độc tính cấp

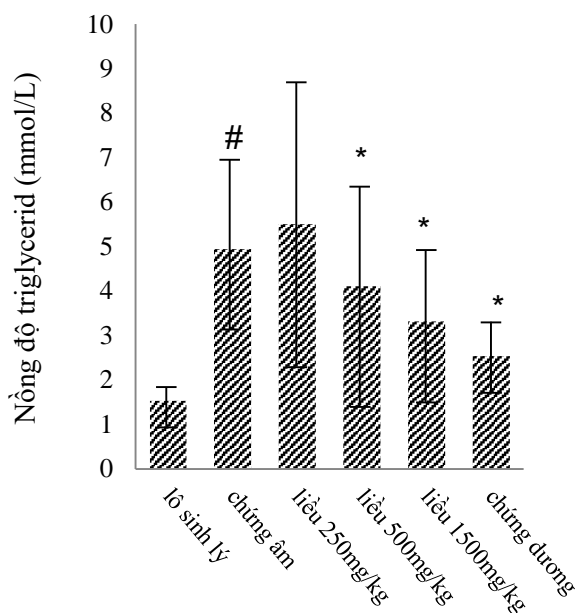
Nhận xét: Liều tối đa có thể bơm qua đầu kim của cao chiết lá Mật gấu nam là 15 g/kg. Trong suốt thời gian 72 giờ và 14 ngày quan sát tiếp theo, không ghi nhận được bất kỳ dấu hiệu bất thường nào xảy ra trên chuột thử nghiệm. Tất cả các chuột đều ăn uống và hoạt động bình thường, không có chuột chết. Do đó, không tìm được LD_{50} vì lô chuột uống 15 g/kg là liều tối đa thuốc phân tán vào nước có thể bơm qua kim để cho uống mà không có chuột chết. Sau 14 ngày theo dõi, mỡ chuột ở tất cả các lô để quan sát đại thể. Tất cả các chuột ở lô thực nghiệm không thấy bất kỳ thay đổi bệnh lý nào về hình thái đại thể của cơ quan gan, tim, đồng thời cao chiết lá Mật gấu nam cũng không ảnh hưởng đến thể trọng của chuột thí nghiệm.

Cao chiết lá Mật gấu nam với liều 15 g/kg không gây chết cũng như không gây bất thường về vận động, màu lông, cân nặng... của chuột ở nhóm thử so với nhóm chứng sau 14 ngày. Vì vậy cao chiết lá Mật gấu nam không gây độc tính cấp trên mô hình thử nghiệm độc tính cấp trên chuột.

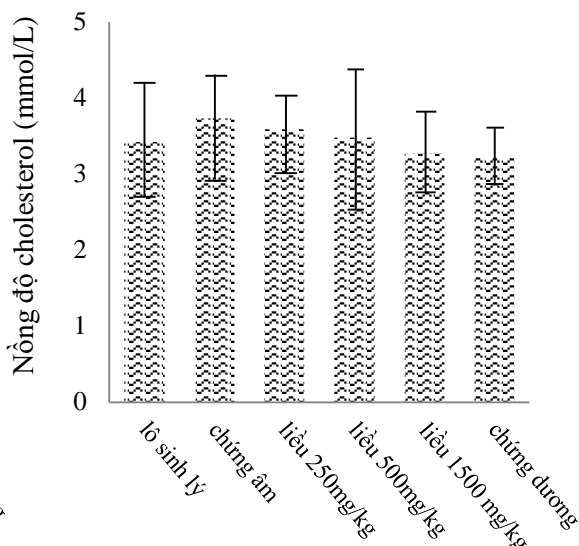
3.2. Kết quả tăng lipid máu do tyloxapol gây ra

Nghiên cứu của chúng tôi đã quyết định chọn ba liều thử nghiệm: 250 mg/kg, 500 mg/kg và 1500 mg/kg [7].

Các kết quả thử nghiệm được trình bày trong hình 2 và hình 3.



Hình 2. Nồng độ triglycerid của chuột thí nghiệm



Hình 3. Nồng độ cholesterol toàn phần của chuột thí

*: $p < 0,05$ so với nhóm chứng âm.

#: $p < 0,05$ so với nhóm sinh lý

Nhận xét: Sau khi tiêm tyloxapol (400 mg/kg, i.p) không gây tăng nồng độ cholesterol toàn phần trong huyết tương chuột ($p > 0,05$), tuy nhiên, có sự gia tăng đáng kể về nồng độ triglycerid huyết tương chuột ($p < 0,05$) khi so sánh với nhóm đối chứng.

Khi cho cao chiết lá Mật gấu nam ở các liều khác nhau, nồng độ triglycerid huyết tương giảm đáng kể ($p < 0,05$) ở nhóm 4 (liều 500 mg/kg) và nhóm 5 (liều 1500 mg/kg) nhưng không giảm đáng kể ($p > 0,05$) ở nhóm nhóm 3 (liều 250 mg/kg).

Khi sử dụng atorvastatin liều 60 mg/kg thể trọng chuột, nồng độ triglycerid trong huyết tương chuột giảm có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng âm ($p < 0,05$).

IV. BÀN LUẬN

4.1. Khảo sát độc tính cấp

Qua nghiên cứu thử nghiệm độc tính cấp trên chuột, cao ethanol lá Mật gấu nam không xác định được giá trị LD_{50} , điều đó có nghĩa là không có độc tính cấp tính nào xảy ra ở liều tối đa (D_{max}) (15 g/kg trọng lượng cơ thể). Điều này đã chứng minh sự an toàn của cao chiết lá Mật gấu nam trong thời gian ngắn. Tuy nhiên, việc sử dụng lâu dài cần phải được nghiên cứu thêm.

Sau khi cho cao chiết còn 96% cây Lá đắng với liều 22 g/kg và theo dõi chuột trong 14 ngày, tác giả Trần Lý Minh Châu và cộng sự cũng chỉ ra kết quả tương tự: không có độc tính cấp và không gây chết chuột [7]. Nghiên cứu này khác nghiên cứu của chúng tôi khi tác giả Trần Lý Minh Châu sử dụng cao chiết cồn 96% còn chúng tôi sử dụng cao chiết cồn 70%. Tuy nhiên, cả cồn 96% và cồn 70%, lá cây Mật gấu nam đều không thể hiện độc tính cấp.

Ngoài ra, Bihonegn và cộng sự thực hiện thử nghiệm độc tính cấp của cao chiết ethanol lá Mật gấu nam trên chuột nhắt trắng với liều 2000 mg/kg cũng không gây độc tính cấp [8].

Kết quả này cũng tương đồng với kết quả nghiên cứu của nhóm tác giả Kiều Xuân Thy và cộng sự khi các tác giả kết luận không có sự thay đổi về cân nặng khi chuột được cho uống cao chiết lá Mật gấu nam với liều 100 mg/kg và 200 mg/kg trong 15 ngày [9].

4.2. Tăng lipid máu do tyloxapol gây ra

Sau khi tiêm phúc mô tyloxapol liều 400 mg/kg thể trọng chuột một liều duy nhất, nồng độ triglycerid trong huyết tương chuột tăng lên đáng kể. Trong khi đó nồng độ cholesterol toàn phần trong huyết tương chuột tăng không có ý nghĩa thống kê. Điều này khác với nghiên cứu của nhóm tác giả Chung Thị Mỹ Duyên và cộng sự [5], Trần Lý Minh Châu và cộng sự [7]. Sự khác biệt này có thể là do kỹ thuật tiêm phúc mô trên chuột hoặc có thể do điều kiện thí nghiệm khác nhau, thể trạng của chuột khác nhau, giống chuột,... từ những điều kiện trên dẫn đến sự khác biệt nồng độ cholesterol toàn phần so với nghiên cứu của nhóm tác giả Lý Trần Minh Châu và cộng sự.

Các thí nghiệm trước đây dùng cao ở các liều 500 – 1000 mg/kg thể trọng nhưng ở đa liều. Đây là lần đầu tiên chúng tôi thử nghiệm tác dụng hạ lipid máu trên cao chiết ethanol 70% lá cây Mật gấu nam ở liều điều trị đơn liều (2 ngày). Điều trị bằng cao chiết lá Mật gấu nam với liều 500 mg/kg và 1500 mg/kg thể trọng chuột có tác dụng làm giảm triglycerid trong huyết tương chuột trong khi liều 250 mg/kg thì chưa ghi nhận tác dụng giảm triglycerid.

Đây là lần đầu tiên cao chiết ethanol 70% của lá cây Mật gấu nam được dùng với 2 liều so với nghiên cứu trước đây của tác giả Trần Lý Minh Châu (dùng cao chiết ethanol 96% trước khi tiêm tyloxapol) và nhóm tác giả Wei Ong cho kết quả tương tự là 500 mg/kg trở lên cho tác dụng kiểm soát lipid huyết.

Cao chiết ethanol 70% của lá cây Mật gấu nam chỉ cần dùng 2 liều đã thể hiện được tác dụng, không cần dùng trong thời gian dài và với liều 250 mg/kg dùng 2 lần chưa thể hiện tác dụng. Cần dùng thời gian dài hơn để xem xét khả năng kiểm soát lipid huyết ở liều thấp 250 mg/kg.

V. KẾT LUẬN

Cao chiết ethanol lá Mật gấu nam không có độc tính cấp tính, không có LD₅₀, không làm thay đổi trọng lượng đáng kể ở chuột thử nghiệm.

Nghiên cứu này cho thấy khi dùng 2 liều theo cách dùng của mô hình tyloxapol đã chứng minh được tác dụng làm giảm triglycerid (liều 500 mg/kg và liều 1500 mg/kg). Tuy nhiên ở liều 250 mg/kg thể trọng chưa thể hiện được tác dụng hạ triglycerid.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyen T. X. T., Dang D. L., Ngo V. Q., Trinh T. C., Trinh Q. N., *et al.* Anti-inflammatory activity of a new compound from *Vernonia amygdalina*. *Nat Prod Res.* 2021. 35(23), 5160-5165, <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1788556>.
2. Asante D. B., Effah-Yeboah E., Barnes P., Abban H. A., Ameyaw E. O., *et al.* Antidiabetic Effect of Young and Old Ethanolic Leaf Extracts of *Vernonia amygdalina*: A Comparative Study. *J Diabetes Res.* 2016. 2016, 1-13, doi: 10.1155/2016/8252741.

3. Nguyễn Kim Phi Phụng. Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ. Đại học quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh. 2017. 22-54.
 4. Bộ Y tế. Quyết định số 141/QĐ-K2ĐT ngày 27/10/2015 - Hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y, thuốc từ dược liệu. 2015.
 5. Chung Thị Mỹ Duyên, Nguyễn Thị Thu Hương. Tác dụng hạ lipid máu của chế phẩm Xích linh chi trên mô hình gây tăng lipid máu nội sinh bằng Tyloxapol (Triton WR-1339). *Tạp chí Y học Thành phố Hồ Chí Minh*. 2014. 18(1), 62-68.
 6. Nguyễn Thanh Tuấn, Nguyễn Thị Sơn, Trần Kim Trang. Tác dụng điều hòa lipid máu của viên nang cứng Nguru tất – Đan sâm – Tam thất trên mô hình gây tăng lipid máu nội sinh bằng Tyloxapol (Triton WR-1339). *Tạp chí Y học Thành phố Hồ Chí Minh*. 2019. 23(4), 256-260.
 7. Trần Lý Minh Châu, Hoàng Thị Phương Liên. Khảo sát độc tính cấp và tác dụng hạ lipid máu của cao chiết lá cây lá đắng (*Vernonia amygdalina* Del., Asteraceae) . *TNU Journal of Science and Technology*. 2021. 226(10), 71-75.
 8. Bihonegn T., Giday M., Yimer G., Animut A., Sisay M. Antimalarial activity of hydromethanolic extract and its solvent fractions of *Vernonia amygdalina* leaves in mice infected with *Plasmodium berghei*. *Sage Journals*. 2019. 7, 1-10. <https://doi.org/10.1177/2050312119849766>.
 9. Kiều Xuân Thy, Bùi Phạm Minh Mẫn, Nguyễn Văn Đán, Bùi Chí Bảo, Trịnh Thị Diệu Thường. Tác động lên trọng lượng và đường huyết của chuột bị đái tháo đường của cao nước lá Mật gấu thu thập tại tỉnh Sóc Trăng. *Tạp chí Y học Thành phố Hồ Chí Minh*. 2019. 23(4), 179-184.
-