

KHẢO SÁT KHẢ NĂNG BẢO VỆ GAN CỦA RỄ CÂY Ô RÔ (*ACANTHUS ILICIFOLIUS* L.) TRÊN CHUỘT TỒN THƯƠNG GAN BỞI CARBON TETRACHLORIDE

Phan Kim Định, Trương Đình Yên An, Trương Thị Thanh Trúc, Đái Thị Xuân Trang

Đại học Cần Thơ

Ngày nhận bài: 25.02.2016

Ngày nhận đăng: 12.6.2016

TÓM TẮT

Hiệu quả bảo vệ gan của cao methanol rễ cây Ô rô trên chuột tổn thương gan bằng carbon tetrachloride (CCl_4) được khảo sát thông qua hiệu quả giảm enzyme chỉ thị chức năng gan là ALT (alanine aminotransferase) và AST (aspartate aminotransferase). Chuột được gây tổn thương gan bằng CCl_4 pha trong dầu olive với tỷ lệ 1:4 với liều uống là 0,2 ml/ lần/ ngày và uống mỗi ngày trong thời gian 4 tuần (hoặc 8 tuần). Hiệu quả bảo vệ gan của cao methanol rễ cây Ô rô được thực hiện bằng cách cho chuột uống cao Ô rô nồng độ 15, 30 và 45 mg/kg trọng lượng chuột sau 1 giờ uống CCl_4 . Silymarin là chất có khả năng bảo vệ gan thương mại được sử dụng như đối chứng dương. Kết quả thí nghiệm cho thấy, sau 4 tuần thí nghiệm hàm lượng AST giảm lần lượt 86,6%, 86,3%, 85,3%, ALT giảm lần lượt 83,9%, 83,8%, 81,4%. Sau 8 tuần thí nghiệm kết quả cho thấy cao Ô rô ở nồng độ 30 mg/kg trọng lượng chuột có hàm lượng AST giảm 95,1% và ALT giảm 94,4% cao hơn so với nhóm chuột được uống cao Ô rô ở hai nồng độ còn lại. Hiệu quả bảo vệ gan của rễ cây Ô rô có thể so sánh tương đương với silymarin khi sử dụng liều 16 mg/kg trọng lượng. Tiêu bản hiển vi lát cắt ngang gan chuột cho thấy tế bào gan của nhóm chuột được điều trị bằng rễ Ô rô nồng độ 45 mg/kg phục hồi đáng kể so với nhóm chuột không được điều trị. Kết quả định tính thành phần hóa học xác định rễ Ô rô chứa các hợp chất alkaloid, flavonoid, triterpenoid, steroid, glycoside và phenol.

Từ khóa: Bảo vệ gan, kháng oxy hóa, enzyme ALT, enzyme AST, Ô rô, tetrachloric carbon (CCl_4)

MỞ ĐẦU

Gốc oxy hóa tự do (reactive oxygen species, ROS) và các gốc tự do khác là nguyên nhân dẫn đến nhiều rối loạn dẫn đến nhiều bệnh ở người như: bệnh tim mạch, đái tháo đường và ung thư (Bahramikia *et al.*, 2008). Nhiều nghiên cứu chứng minh rằng carbon tetrachloride (CCl_4) là nguyên nhân gây tổn thương gan liên quan đến sự tăng quá mức các gốc tự do. Đây là nguyên nhân phá hủy cấu trúc gan dẫn đến sự phóng thích các enzyme gan vào trong vòng tuần hoàn (Rabeh and Oboraya, 2014). Mặt khác, việc sử dụng các thuốc được tổng hợp hóa học được biết có nhiều tác dụng phụ và gây tổn thương gan, ảnh hưởng đến sự tái tạo tế bào gan (Adewusi *et al.*, 2010). Chính vì vậy, cần nghiên cứu các thuốc mới điều trị các bệnh về gan bổ sung hoặc thay thế các thuốc hiện có. Giới thực vật được biết là nguồn hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học có thể ứng dụng để làm thuốc rất đa dạng và phong phú. Hơn 25% các thuốc hiện nay được chiết xuất từ thực vật (Sharma *et al.*, 2009; Rahmatullah *et al.*, 2009). Các thực vật có khả năng bảo vệ gan thường chứa các hợp chất như phenol, coumarin, lignan,

monoterpene, carotinoid, glycoside, flavanoid, acid hữu cơ, lipid, alkaloid và xanthene (Sharma *et al.*, 2009). Phần lớn các thực vật được sử dụng điều trị các bệnh về gan theo y học cổ truyền hoặc theo kinh nghiệm dân gian thường thiếu hoặc chưa được chứng minh một cách khoa học. Chính vì vậy, việc nghiên cứu một cách hệ thống và khoa học nguồn thực vật có khả năng bảo vệ gan là rất cần thiết.

Dịch chiết từ các bộ phận cây Ô rô được chứng minh có chứa các hợp chất hóa học kháng oxy hóa như alkaloid, glycoside, lignan, saponin, triterpenoid, sterol, các acid béo và các dẫn xuất của các acid coumaric (Singh *et al.*, 2009). Ngoài ra, cây Ô rô được chứng minh có khả năng kháng virus viêm gan siêu vi B và có khả năng bảo vệ gan (Babu *et al.*, 2001; Wei *et al.*, 2015) và kháng viêm (Wai *et al.*, 2015). Ở đồng bằng sông Cửu Long cây Ô rô phân bố khá rộng rãi và được sử dụng nhiều trong dân gian để điều trị bệnh trong đó có bệnh gan.

Mục tiêu của nghiên cứu này là chứng minh khả năng bảo vệ gan của rễ cây Ô rô trên mô hình chuột nhiễm độc CCl_4 , cũng như định tính thành phần hóa học có trong dịch trích methanol rễ cây Ô rô. Nghiên

cứu là bước đầu khảo sát về hoạt tính sinh học của các hợp chất có trong rễ cây Ô rô nhằm định hướng cho việc khai thác và sử dụng nguồn tài nguyên cây Ô rô theo hướng dược liệu.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Phương tiện, hóa chất và vật liệu

Thiết bị được sử dụng trong nghiên cứu gồm máy cô quay chân không Heidolph (Đức), máy ly tâm lạnh Mikro 220R (Đức), máy đo pH Metler Toledo, cân phân tích, máy đo quang phổ, máy khuấy từ, máy vortex.

Hóa chất sử dụng trong thí nghiệm gồm: sylimarin (Sgima), methanol (Merck), bismuth nitrate (Merck), acid acetic (Merck), KI (Merck), HgCl₂ (Merck), *t*-butanol (Merck), anhydride acetic (Merck), chloroform (Merck), H₂SO₄ (Merck), pyridin (Merck), AgNO₃ (Merck), FeCl₃ (Merck) và các hóa chất khác.

Vật liệu nghiên cứu là cây Ô rô được thu hái ở Hà Tiên (Kiên Giang) và được định danh dựa vào hình thái cơ quan thực vật theo Phạm Hoàng Hộ (2003).

Đối tượng thí nghiệm là chuột nhắt trắng *Mus musculus* var. *Albino* khỏe mạnh 8 tuần tuổi có trọng lượng khoảng 20 – 24 g do Viện Pasteur Thành phố Hồ Chí Minh cung cấp, được nuôi ở phòng thí nghiệm Bộ môn Sinh học, Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ ở nhiệt độ phòng và chu kỳ sáng tối 12/12 giờ.

Phương pháp chuẩn bị mẫu cao methanol rễ cây Ô rô

Từ 3000 g rễ cây Ô rô sau khi thu hái được phơi khô tự nhiên dưới ánh nắng mặt trời cho đến khi khô hoàn toàn (400 g). Mẫu sau khi phơi khô được nghiền thành bột, sau đó ngâm dầm trong methanol trong 48 giờ. Sau đó, phần dịch lỏng được lọc qua giấy lọc có kích cỡ 20 µm, phần dịch sau khi lọc tiếp tục được cô quay dưới áp suất thấp để cô đuổi dung môi và thu được cao dạng sệt gọi là cao methanol. Dung môi methanol thu hồi được cho vào ngâm lại với mẫu rễ Ô rô và sau 48 giờ tiến hành cô quay lần 2. Việc cô quay được thực hiện 3 lần lặp lại như đã mô tả trên. Từ 400 g bột khô rễ cây Ô rô sau khi cô quay thu được 15,2 g cao methanol (hiệu suất chiết cao là 3,8% tính trên trọng lượng khô).

Khảo sát khả năng bảo vệ gan của cao methanol rễ cây Ô rô trên mô hình chuột bị nhiễm độc CCl₄

Chuột có trọng lượng từ 20-24 g được chia thành 6 nhóm thí nghiệm, mỗi nhóm gồm 5 con chuột. Hiệu quả bảo vệ gan của rễ cây Ô rô được khảo sát ở chuột được gây độc bởi CCl₄ và điều trị bằng cách uống cao methanol rễ cây Ô rô ở các nồng độ 15, 30 và 45 mg/kg trọng lượng × 1 lần/ngày liên tục trong thời gian thử nghiệm 4 tuần (hoặc 8 tuần); sylimarin được sử dụng như nhóm đối chứng dương với liều sử dụng là 16 mg/kg trọng lượng × 1 lần/ ngày. Các nhóm thí nghiệm được bố trí như sau:

Nhóm 1: Chuột bình thường uống dầu olive

Nhóm 2: Chuột bình thường uống CCl₄.

Nhóm 3: Chuột bình thường uống CCl₄ sau 1 giờ uống sylimarin nồng độ 16 mg/kg trọng lượng chuột.

Nhóm 4: Chuột bình thường uống CCl₄ sau 1 giờ uống cao methanol Ô rô nồng độ 15 mg/kg trọng lượng chuột.

Nhóm 5: Chuột bình thường uống CCl₄ sau 1 giờ uống cao methanol Ô rô nồng độ 30 mg/kg trọng lượng chuột.

Nhóm 6: Chuột bình thường uống CCl₄ sau 1 giờ uống cao methanol Ô rô nồng độ 45 mg/kg trọng lượng chuột.

Carbon tetrachloride (CCl₄) được pha trong dầu olive với tỷ lệ 1:4, chuột được cho uống 0,2 ml/ 1 lần/ ngày × 4 tuần (hoặc 8 tuần). Sau một giờ uống CCl₄ chuột được cho uống 0,2 ml hoặc thuốc thương mại sylimarin hoặc cao methanol với các nồng độ tương ứng trong từng nhóm thí nghiệm. Chuột được cho uống CCl₄ và được điều trị bằng thuốc thương mại hoặc sylimarin mỗi ngày trong thời gian 4 tuần (hoặc 8 tuần). Sau thời gian khảo sát 4 tuần (hoặc 8 tuần) chuột ở mỗi nhóm thí nghiệm được giải phẫu. Chuột sau khi giải phẫu máu được lấy ở tim. Khả năng bảo vệ gan được đánh giá dựa trên hàm lượng enzyme alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST). Ảnh hưởng của cao methanol đến chức năng thận của rễ cây Ô rô được đánh giá dựa trên sự thay đổi hàm lượng urine và creatinine trong huyết thanh. Các chỉ tiêu trên được khảo sát bằng phương pháp đo sinh hóa được thực hiện bằng máy bán tự động Erba CHEM-7 (Erba, Đức) theo hướng dẫn của nhà

sản xuất, tại trung tâm chẩn đoán y khoa 144 Nguyễn An Ninh, TP. Cần Thơ.

Định tính thành phần hóa học có trong cao methanol rễ cây Ô rô

Thành phần hóa học của các cao methanol từ rễ cây Ô rô được định tính sơ bộ bằng các phương pháp định tính các nhóm hợp chất tự nhiên (Nguyễn Kim Phi Phụng, 2007; Subhash, 2015). Các nhóm hợp chất được đánh giá bao gồm: alkaloid, triterpene, flavonoid, tannin, glycoside, saponin, phenol.

Phương pháp thực hiện tiêu bản mô bệnh học của gan chuột

Sau khi kết thúc thí nghiệm, chuột được giải phẫu, gan được thực hiện tiêu bản mô bệnh học. Mẫu gan được cố định trong dung dịch formaldehyde 4% trong thời gian 24 giờ ở nhiệt độ 4°C. Mẫu gan sau khi cố định được tắm paraffin và cắt mẫu có chiều dày 5 µm. Mẫu sau khi cắt được nhuộm bằng

hematoxylin và eosin (H&E). Cuối cùng, mẫu được quan sát dưới kính hiển vi quang học.

Thông kê phân tích số liệu

Các số liệu được đo và ghi lại sau mỗi thí nghiệm. Số liệu được phân tích thống kê bằng phần mềm Minitab 16.0 và vẽ đồ thị bằng phần mềm Microsoft Excel.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khảo sát khả năng bảo vệ gan của rễ cây Ô rô

Hiệu quả bảo vệ gan của rễ cây Ô rô sau 4 tuần chuột gây tổn thương gan và điều trị

Chuột được gây tổn thương gan bởi CCl₄ sau đó được điều trị bằng cao methanol rễ cây Ô rô liên tục 4 tuần. Kết quả về hiệu quả bảo vệ gan của rễ cây Ô rô sau 4 tuần thí nghiệm được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Hàm lượng enzyme liên qua đến chức năng gan (AST và ALT) và marker chỉ thị cho chức năng thận (urine và creatinine) sau 4 tuần thí nghiệm.

Thí nghiệm	Nồng độ			
	AST (U/L)	ALT (U/L)	Urine (mmol/L)	Creatinine (µmol/L)
Bình thường	23,8 ± 0,54	22,0 ± 1,50	3,44 ± 0,11	99,8 ± 1,00
CCl ₄	189,6 ⁺ ± 23,01	157,8 ⁺ ± 20,78	4,5 ± 0,78	95,8 ± 4,82
CCl ₄ + Sylimarin	23,8 ⁺ ± 1,59	30,0 ⁺ ± 2,02	8,18 ⁺ ± 2,0	204,2 ⁺ ± 14,02
CCl ₄ + Cao Ô rô 15 mg/kg	25,4 ⁺ ± 1,15	25,6 ⁺ ± 1,40	5,54 ± 1,35	127,8 ⁺ ± 11,92
CCl ₄ + Cao Ô rô 30 mg/kg	26,0 ⁺ ± 2,94	25,6 ⁺ ± 1,61	5,88 ± 1,92	207,2 ⁺ ± 21,04
CCl ₄ + Cao Ô rô 45 mg/kg	27,8 ⁺ ± 0,91	29,4 ⁺ ± 1,912	5,68 ± 1,36	150,8 ⁺ ± 11,96

Ghi chú: P^{*} < 0,05; P^{**} < 0,01 khác biệt với nhóm gây bệnh bằng CCl₄, P^{*} < 0,05 khác biệt với nhóm chuột bình thường.

Kết quả trình bày ở bảng 1 cho thấy, nhóm chuột uống CCl₄ sau đó không được uống cao methanol hoặc sylimarin thì hàm lượng enzyme gan AST (189,6 ± 23,01 U/L) và ALT (157,8 ± 20,78 U/L) cao khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nhóm chuột bình thường và các nhóm chuột còn lại. Hàm lượng hai marker chỉ thị cho chức năng thận là urine và creatinine khác biệt không có ý nghĩa so với nhóm chuột bình thường. Kết quả thí nghiệm ở bảng 1 cho thấy, CCl₄ là nguyên nhân làm gan bị tổn thương dẫn đến hai enzyme chỉ thị cho sự tổn thương gan là AST và ALT tăng cao. Hai marker chỉ thị cho chức năng thận là urine và creatinine khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với chuột

bình thường; như vậy kết quả này cho thấy hóa chất CCl₄ không ảnh hưởng đến chức năng thận.

Sau khi chuột được gây tổn thương gan bằng CCl₄ và được điều trị bằng sylimarin hoặc cao methanol rễ cây Ô rô ở các nồng độ khác nhau kết quả trình bày trong bảng 1. Hiệu quả bảo vệ gan của thuốc sylimarin hoặc cao rễ cây Ô rô được thể hiện bởi sự giảm nồng độ của hai enzyme gan AST và ALT. Nồng độ enzyme gan AST và ALT của các nhóm chuột được điều trị bằng sylimarin và cao Ô rô ở các nồng độ 15, 30 và 45 mg/kg trọng lượng chuột giảm so với nhóm đối chứng chỉ uống CCl₄ lần lượt như sau: nhóm điều trị sylimarin giảm 87,5% (AST) và 80,9% (ALT); nhóm chuột được uống cao Ô rô nồng độ 15 mg/kg giảm 86,6%

(AST) và 83,9% (ALT); nhóm chuột uống cao Ô rô nồng độ 30 mg/kg giảm 86,3% (AST) và 83,8% (ALT) và nhóm chuột cho uống cao chiết Ô rô nồng độ 45 mg/kg giảm 85,3% (AST) và 84,5% (ALT). Nồng độ enzyme gan AST và ALT ở tất cả các nhóm chuột được điều trị bằng thuốc sylimarin hoặc cao methanol rễ cây Ô rô đều giảm khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm gây độc bằng CCl₄ không được điều trị. Mặt khác, kết quả thí nghiệm còn cho thấy, hàm lượng enzyme AST và ALT trong các nghiệm thức gây độc bằng CCl₄ được điều trị ở tất cả các nghiệm thức đều khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với nhóm chuột bình thường. Điều này có ý nghĩa là cao methanol rễ cây Ô rô có khả năng bảo vệ gan tương đương với sylimarin, và có khả năng làm gan bị tổn thương phục hồi trở lại trạng thái bình thường.

Khảo sát sự ảnh hưởng của thuốc sylimarin và cao rễ cây Ô rô đến chức năng thận sau 4 tuần thí nghiệm, kết quả trình bày trong bảng 1 cho thấy rằng: hàm lượng urine và creatinine ở các nhóm chuột được cho uống sylimarin và cao methanol rễ Ô rô ở các nồng độ khảo sát đều tăng rất cao khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm chuột chỉ uống CCl₄ hoặc chuột bình thường. Hàm lượng urine và creatinine ở nhóm điều trị bằng sylimarin tăng gấp 2,4 và 2,1 lần so với nhóm chuột bình thường và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nhóm còn lại. Ở nhóm chuột được điều trị bằng cao Ô rô nồng độ 15, 30 và 45 mg/kg trọng lượng có hàm lượng urine tăng trong khoảng từ 1,6 đến 1,7 lần; hàm lượng creatinine lần lượt tăng 1,3 lần, 2,1 lần và 1,5 lần so với nhóm chuột bình thường. Kết quả thí nghiệm cho thấy, cao Ô rô ở các nồng độ khảo sát có hiệu quả phục hồi enzyme gan tương đương với sylimarin dưới tác động gây tổn thương của CCl₄. Tuy nhiên, cao methanol rễ Ô rô cũng có

sự ảnh hưởng đến chức năng thận. Điều này cho thấy các loại thảo dược có hiệu quả điều trị bệnh, khoa học cần thiết trước khi đưa các thảo dược này vào sử dụng như liệu pháp hỗ trợ điều trị bệnh.

Hiệu quả bảo vệ gan của rễ cây Ô rô sau 8 tuần chuột gây tổn thương gan và điều trị

Hiệu quả bảo vệ gan của cao methanol rễ cây Ô rô sau 8 tuần thí nghiệm được trình bày trong bảng 2. Kết quả cho thấy nhóm enzyme chỉ thị sự tổn thương gan ở các nhóm chuột được điều trị bằng sylimarin và cao Ô rô ở các nồng độ khảo sát trong thí nghiệm giảm khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm chuột tổn thương gan không được điều trị. Hiệu quả bảo vệ gan dựa trên khả năng làm giảm enzyme chỉ thị chức năng gan là AST và ALT của cao methanol rễ Ô rô ở các nồng độ khảo sát 15, 30 và 45 mg/kg trọng lượng là khác nhau. Hàm lượng enzyme AST và ALT ở nhóm chuột được điều trị bằng cao rễ Ô rô nồng độ 15 mg/kg trọng lượng giảm lần lượt là 60,9% và 69,9% so với nhóm gây độc không điều trị và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm bình thường và nhóm gây bệnh không được điều trị. Kế đến là nhóm chuột được điều trị bằng cao Ô rô nồng độ 45 mg/kg trọng lượng, hàm lượng enzyme AST và ALT giảm khoảng 81% so với nhóm chuột bị tổn thương gan bởi CCl₄ không được điều trị. Theo kết quả ở bảng 2 cho thấy, ở nồng độ cao methanol rễ Ô rô 30 mg/kg trọng lượng thì khả năng bảo vệ gan hiệu quả nhất khi chuột bị tổn thương trong thời gian dài, hàm lượng enzyme AST và ALT giảm lần lượt là 95% và 94% so với nhóm chuột không được điều trị. Trong khi đó hiệu quả bảo vệ gan của sylimarin khi chuột bị tổn thương gan trong thời gian dài thấp hơn (hàm lượng AST và ALT giảm theo thứ tự là 84,7% và 89%).

Bảng 2. Hàm lượng enzyme liên quan đến chức năng gan (AST và ALT) và marker chỉ thị cho chức năng thận (urine và creatinine) sau 8 tuần thí nghiệm.

Nghiệm thức	Nồng độ			
	AST (U/L)	ALT (U/L)	Urine (mmol/L)	Creatinine (µmol/L)
Bình thường	75,0 ± 2,26	25,2 ± 1,67	6,14 ± 1,52	92,0 ± 24,61
CCl ₄	473,4 ⁺ ± 24,68	485,8 ⁺ ± 22,06	5,86 ± 0,75	95,4 ± 22,91
CCl ₄ + Sylimarin	72,6 ^{**} ± 24,98	53,2 [*] ± 16,19	4,74 ± 1,10	84,6 ± 7,30
CCl ₄ + Cao Ô rô 15 mg/kg	185,2 ^{***} ± 32,8	145,8 ⁺ ± 26,05	5,68 ± 0,91	92,0 ± 13,56
CCl ₄ + Cao Ô rô 30 mg/kg	23,0 ⁺⁺ ± 2,2	28,6 ⁺ ± 3,49	4,6 ± 1,05	84,0 ± 9,08
CCl ₄ + Cao Ô rô 45 mg/kg	89,6 ^{**} ± 32,46	89,8 [*] ± 32,56	4,34 ± 1,14	85,6 ± 8,08

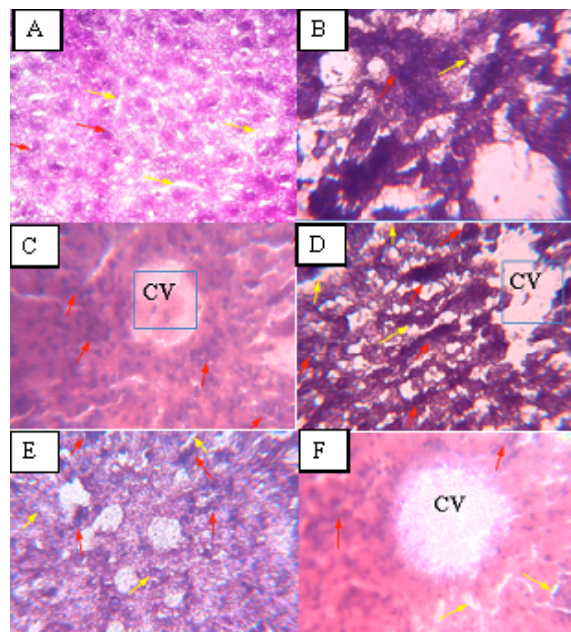
Ghi chú: P^{*} < 0,05; P^{**} < 0,01 khác biệt với nhóm gây bệnh bằng CCl₄, P⁺ < 0,05 khác biệt với nhóm chuột bình thường.

Các kết quả trình bày ở trên chứng minh rằng cao methanol rễ cây Ô rô có tác dụng giảm hàm lượng enzyme chỉ thị sự tổn thương gan ở chuột được gây độc bằng CCl₄. Trong thí nghiệm này, cao Ô rô nồng độ 30 mg/kg trọng lượng chuột có hiệu quả khi điều trị gan bị tổn thương trong thời gian dài (8 tuần). Lá cây Ô rô được ly trích bằng ethanol 70% cũng được chứng minh có khả năng bảo vệ gan khi bị gây độc bởi CCl₄ ở nồng độ khảo sát là 250 và 500 mg/kg trọng lượng (Babu *et al.*, 2001). Trong thí nghiệm này chúng tôi sử dụng rễ cây Ô rô với liều lượng thấp hơn khoảng 10 lần bằng dung môi methanol thì hiệu quả bảo vệ gan rất cao (>85%). Hiệu quả bảo vệ gan của nhiều thực vật cũng được chứng minh như cây cà ba thụ (Solanum trilobatum) (Singh, Vidhu, 2011) ở liều sử dụng là 250 mg/kg cũng có khả năng bảo vệ gan (hàm lượng AST và ALT giảm lần lượt là 48% và 72%). Lá cây me (Tamarindus indica L.) cũng được chứng minh có khả năng giảm enzyme ALT và AST khi sử dụng cho chuột tổn thương gan bởi CCl₄ được uống ở nồng độ 100 và 200 mg/kg trọng lượng chuột (Rodriguez Amado *et al.*, 2016). Vỏ của một loài cây thuộc họ công là Mammea africana cũng được chứng minh có khả năng bảo vệ gan khi sử dụng ở liều 30-90 mg/kg trọng lượng (Okokon *et al.*, 2016). Như vậy, so với nhiều nghiên cứu trước rễ cây Ô rô có hiệu quả bảo vệ gan cao hơn, khi sử dụng liều 30 mg/kg trọng lượng chuột thì hiệu quả giảm hàm lượng enzyme ALT và AST khoảng 95% khi chuột bị gây tổn thương dài (8 tuần).

Kết quả phân tích mô bệnh học của chuột tổn thương gan được điều trị bằng rễ cây Ô rô

Vi phẫu mô gan của các nhóm chuột thí nghiệm được trình bày trong hình 1. Kết quả cho thấy ở nhóm chuột uống CCl₄ không được điều trị có sự khác biệt so với nhóm chuột bình thường và các nhóm được điều trị bằng sylimarin và rễ cây Ô rô. Ở nhóm tổn thương gan không điều trị phần lớn các tế bào gan to hơn bình thường có nhân không điển hình và bị hoại tử, bị viêm nặng ở khoang cửa và tiểu thùy gan. Nhóm chuột được cho uống cao rễ Ô rô nồng độ 15 mg/kg các tế bào gan bị tổn thương và hoại tử tương tự như nhóm chuột không được điều trị. Nhóm chuột được điều trị bằng cao rễ Ô rô nồng độ 30 mg/kg các tế bào gan cũng có nhân không điển hình và xuất hiện hoại tử nhưng thấp hơn so với nhóm chuột không được điều trị. Đối với nhóm chuột được uống rễ Ô rô nồng độ 45 mg/kg chỉ xuất hiện một số tế bào gan tổn thương,

hầu hết các tế bào gan bình thường; cấu trúc mô gan của nhóm này gần giống với nhóm chuột được điều trị bằng sylimarin.



Hình 1. Vi phẫu gan chuột ở các nhóm thí nghiệm. (A) chuột bình thường; (B) chuột tổn thương gan bởi CCl₄ không điều trị; (C) chuột tổn thương gan được điều trị bởi sylimarin; (D, E, F) chuột tổn thương gan được điều trị bằng cao Ô rô ở nồng độ lần lượt 15, 30 và 45 mg/kg. Mũi tên màu vàng: các mao mạch gan, mũi tên màu đỏ: dây gan (những tế bào nhu mô gan xếp lại tạo thành hàng tiếp xúc với những mao mạch gan), CV: Central Vein, (tĩnh mạch trung tâm).

Kết quả định tính thành phần hóa học của cao methanol rễ cây Ô rô

Kết quả định tính thành phần hóa học của cao methanol rễ cây Ô rô được trình bày trong bảng 3. Kết quả cho thấy trong cao methanol rễ cây Ô rô có các hợp chất như alkaloid, flavonoid, triterpenoid, steroid, glycoside và phenol. Thành phần các hợp chất hóa học được xác định trong nghiên cứu này cũng phù hợp với nghiên cứu của Singh *et al.*, (2009). Trong các hợp chất hiện diện trong rễ cây Ô rô thì alkaloid và flavonoid được biết là các hợp chất có khả năng kháng oxy hóa mạnh (Pietta, 2000). Bên cạnh đó cao methanol rễ cây Ô rô cũng đã được chứng minh có khả năng kháng oxy hóa *in vitro* (Đài Thị Xuân Trang *et al.*, 2014). Khả năng kháng oxy hóa thường liên quan đến hiệu quả bảo vệ gan

(Morisco *et al.*, 2008), nên kết quả đạt được trong nghiên cứu này là phù hợp với nhiều nghiên cứu trước đây. Trong các nghiên cứu y dược hiện đại các hợp chất phenolic, alkaloid, flavonoid và terpenoid

sẽ là nguồn cung cấp các chất có tiềm năng cho các nghiên cứu về các hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học ứng dụng trong phòng và điều trị các bệnh ở người (Ohira *et al.*, 1998; Mekem *et al.*, 2001).

Bảng 3. Kết quả về các hợp chất hóa học hiện diện trong cao methanol rễ cây Ô rô.

Nhóm chất	Thuốc thử	Hiện tượng	Kết quả
Alkaloid	Dragendorff	Tủa đỏ nâu	+
	Mayer	Tủa vàng nhạt	+
	Wagner	Tủa màu nâu	+
Flavonoid	Cyanidin	Màu đỏ, cam hoặc tím	+
	Liebermann-Buchard	Xanh dương, lục, cam, đỏ	+
Triterpenoid - steroid	Rosenthaler	Xanh lục, tím	+
	Tollens	Tủa Ag kim loại	+
Glycoside	FeCl ₃	Phức xanh đen	+
Phenol	Lắc tạo bọt	Có bọt bền	-
Saponin	Gelatin mặn	Tủa vàng nhạt	-
Tannin			

Ghi chú: (+) có hiện diện nhóm chất xác định, (-) không có sự hiện diện của nhóm chất xác định.

KẾT LUẬN

Cao methanol rễ Ô rô có hiệu quả bảo vệ gan tương đương sylimarin sau 4 tuần thí nghiệm. Hàm lượng enzyme AST và ALT ở các nhóm chuột tổn thương gan bởi CCl₄ và được điều trị bằng cao methanol tương đương với nhóm chuột được điều trị bằng sylimarin và chuột bình thường.

Khi chuột bị tổn thương gan bởi CCl₄ trong thời gian dài (8 tuần), hiệu quả bảo vệ gan của rễ Ô rô ở nồng độ 30 mg/kg (AST: 23,00 ± 2,2 U/L, ALT: 28,60 ± 3,49 U/L) cao hơn so với nồng độ 45 mg/kg trọng lượng (AST: 89,6 ± 32,46 U/L, ALT: 89,8 ± 32,56 U/L) và 15 mg/kg trọng lượng (AST: 185,20 ± 32,8 U/L, ALT: 145,80 ± 26,05 U/L). Hiệu quả bảo vệ gan của rễ cây Ô rô ở nồng độ 30 mg/kg trọng lượng cũng cao hơn sylimarin (AST: 72,6 ± 24,98, ALT: 53,2 ± 16,19).

Các hợp chất chính có trong cao methanol rễ cây Ô rô gồm alkaloid, flavonoid, triterpenoid, steroid, glycoside và phenol.

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Đại học Cần Thơ đã hỗ trợ kinh phí và phương tiện để các tác giả thực hiện nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Adewusi E, Afolayan A (2010). A review of natural products with hepatoprotective activity. *J Med Plant Res* 4:1318-4.
- Babu BH, Shylesh BS, Padikkala J (2001). Antioxidant and hepatoprotective effect of *Acanthus ilicifolius*. *Fitoterapia* 72(3): 272-7.
- Bahramikia S, Yazdanparast R (2008). Antioxidant and free radical scavenging activities of different fractions of *Anethum graveolens* leaves using *in vitro* models. *Pharmacol Online* 2: 219-233.
- Đái Thị Xuân Trang, Nguyễn Thị Yến Chi, Trương Đình Yên An và Phan Kim Định (2014). Khảo sát khả năng kháng oxy hóa của cây Ô rô (*Acanthus ilicifolius* L.). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ* 35a: 104-110.
- Mekem SM, Konig WA (2001). Study of essential oil of *Cyperus rotundus*. *Phytochem*: 58:799-801.
- Morisco F, Vitaglione P, Amoroso D, Russo B, Fogliano V, Caporaso N (2008). Food and liver health. *Mol Asp Med* 29: 144-50.
- Muhamad F, Asep AP, Rahmi N (2012). Antioxidant and cytotoxic activity of *Acanthus ilicifolius* flower. *Asian Pac J Trop Biomed* 3(1): 17-21.
- Nguyễn Kim Phi Phụng (2007) Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ, NXB Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh.

- Ohira S, Hasegawa T, Hayasahi KI, Hoshino T, Takaoka D, Nozaki H (1998). Sesquiterpenoids from *Cyperus rotundus*. *Phytochem* 47: 577-579.
- Okokon JE, Bawo MB, Mbagwu HO (2016) Hepatoprotective activity of *Mammea africana* ethanol stem bark extract. *Avicenna J Phytomed* 6(2): 248-259.
- Phạm Hoàng Hộ (2003) *Cây cỏ Việt Nam*. NXB Trẻ Hà Nội.
- Pietta PG (2000) Flavonoids as antioxidants, *J Nat Prod*, 63(7),1035-42.
- Rabeh NM, Aboraya AO (2014) Hepatoprotective effect of dill (*Anethum graveolens* L.) and fennel (*Foeniculum vulgare*) oil on hepatotoxic rats. *Pak J Nutr* 13: 303- 309.
- Sharma B, Upendra KS (2009) Hepatoprotective activity of some indigenous plants. *Int J Pharmtech Res* 1:1330-1334.
- Rahmatullah M, Mukti IJ, Fahmidul Haque AKM, Mollik AH, Parvin K, Jahan R, Chowdhury MH, Rahman T (2009) An ethnobotanical survey and pharmacological evaluation of medicinal plants used by the Garo tribal community living in Netrakona district Bangladesh. *Adv Nat Appl Sci* 3: 402-18.
- Rodriguez Amado JR, Lafourcade Prada A, Escalona Arranz JC, Pérez Rosés R, Morris Quevedo H, Keita H, Puente Zapata E, Pinho Fernandes C, Tavares Carvalho JC (2016) Antioxidant and Hepatoprotective Activity of a New Tablets Formulation from *Tamarindus indica* L. *Evid Based Complementary Alternat Med*. Article ID 3918219, 7 pages.
- Singh A, Duggal S, Suttee A (2009) *Acanthus ilicifolius* Linn. Lesser Known Medicinal Plants with Significant Pharmacological Activities. *Int J Phytomed* 13: 431-436.
- Singh D, Vidhu A (2011) Phytochemical and pharmacological potential of *Acanthus ilicifolius*. *J Pharm Bioallied Sci* 5(1): 17-20.
- Subhash CM (2015). *Essentials of Botanical Extraction. Principles and Applications*. Elsevier.
- Wai KK, Liang Y, Zhou L, Cai L, Liang C, Liu L, Lin X, Wu H, Lin J (2015) The protective effects of *Acanthus ilicifolius* alkaloid A and its derivative on pro- and anti-inflammatory cytokine in rats with hepatic fibrosis. *Biotechnol Appl Biochem* 62 (4): 537-546.
- Wei PH, Wu SZ, Xu B, Su QJ, Wei JL, Yang J, Qin B, Xie ZC (2015). Effect of alcohol extract of *Acanthus ilicifolius* L. on anti-duck hepatitis B virus and protection of liver. *J Ethnopharmacol* 160:1-5.

STUDY ON HEPATOPROTECTIVE EFFECT OF ROOT METHANOLIC EXTRACT OF *ACANTHUS ILICIFOLIUS* L. IN CARBON TETRACHLORIDE INDUCED MICE

Phan Kim Dinh, Truong Dinh Yen An, Truong Thi Thanh Truc, Dai Thi Xuan Trang[✉]

Can Tho University

SUMMARY

Acanthus ilicifolius is a common medicinal herb used in treatment for hepatic diseases in Vietnamese traditional medicine. This study investigated hepatoprotective effects of methanol extract of *A. ilicifolius* roots at various concentrations on mice having carbon tetrachloride (CCl₄)-induced liver damages by measuring levels of two liver enzymes (alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST)). Mice's livers were injured by using CCl₄ in olive oil, in the ratio of 1 to 4 with the dosing concentration of 0.2 ml per day in 4 consecutive weeks (or 8 consecutive weeks). After one hour taking CCl₄ by oral administration, mice were treated with roots' methanol extract at three different concentrations (15, 30, and 45 mg/kg BW). Silymarin, a commercial liver protector was used as a positive control. After 4 weeks of treatment, the AST levels decreased by 86.6%, 86.3%, 85.3% and ALT levels declined by 83.9%, 83.8%, 81.4%. After 8 weeks of treatment, the use of 30 mg/kg BW root extract showed the best hepatoprotective activity with the lowest levels of AST and ALT. Our result also indicated that the hepatoprotective effects of roots' methanol extract of *A. ilicifolius* were similar to that of silymarin (using at 16 mg/kg BW). The microscopic structure proved that the hepatocytes recovered significantly in mice treated with roots' methanol extract of *A. ilicifolius* at dose 45 mg/kg BW. However, root extract of *A. ilicifolius* at dose of 15 and 30 mg/kg BW could not improve liver damages comparing to untreated mice. The qualitative analysis of phytochemical compounds showed that *Acanthus ilicifolius* root contains alkaloid, flavonoid, triterpenoid, steroid, glycoside, and phenol substances.

Keywords: *Acanthus ilicifolius* L., Antioxidant, ALT enzyme, AST enzyme, carbon tetrachloride (CCl₄), hepatoprotection

[✉] Author for correspondence: E-mail: dtxttrang@ctu.edu.vn