

XÂY DỰNG MÔ HÌNH CHUỘT TIỂU ĐƯỜNG VÀ KHẢO SÁT HIỆU QUẢ HẠ ĐƯỜNG HUYẾT CỦA CÂY HOÀNG LIÊN (*Coptis teeta* Wall) TRÊN MÔ HÌNH ĐỘNG VẬT

Lao Đức Thuận¹, Đàm Thị Thanh Dương¹,
Nguyễn Thị Thanh Xuân¹, Lê Thị Anh Thy¹,
Nguyễn Vũ Thanh Tùng¹, Hồ Thị Huyền Trang¹,
Phạm Hồng Phi Long¹, Trịnh Hữu Phước¹

TÓM TẮT

Cây Hoàng Liên, tên khoa học *Coptis teeta* Wall, là một loại thảo dược quý mọc trên dãy Hoàng Liên Sơn của nước ta. Trong y học cổ truyền, phần thân rễ được sử dụng làm thuốc do chứa nhiều hợp chất hóa học có khả năng kháng virus, kháng viêm, hạ đường huyết, chống nấm, chống ho gà và hạ áp.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành khảo sát khả năng hạ đường huyết của cao chiết rễ cây Hoàng Liên bằng dung môi ethanol trên hai mô hình chuột bị tiểu đường. Kết quả cho thấy, khi khảo sát ở ba liều lượng 150, 200 và 250 mg/kg, sau 20 ngày thí nghiệm lượng đường huyết của chuột thí nghiệm đều đã giảm từ mức 500 mg/dl xuống dưới 200 mg/dl. Bên cạnh đó, các chỉ tiêu sinh lý chuột thí nghiệm đều ổn định. Qua đó, chúng tôi kết luận cao chiết còn rễ cây Hoàng Liên có tác dụng hạ đường huyết ở những liều được khảo sát và an toàn đối với chuột thí nghiệm.

Từ khóa: Hoàng Liên, bệnh tiểu đường, mô hình chuột tiểu đường.

ABSTRACT

Coptis teeta Wall is known as Hoang Lien, a precious herb and found mostly on Hoang Lien Son mountains, Vietnam. Its rhizomes, contain many chemical compounds have anti-virus, anti-inflammatory, hypoglycemic, anti-fungal, anti-pertussis and antihypertensive effects, are used as drugs.

In this study, we studied the hypoglycemic effect of the Hoang Lien root extracted by ethanol in alloxan induced diabetic mice. According to the results, the blood glucose levels of the diabetic mice were reduced from 500 mg/dl to less than 200 mg/dl after 20 days administration at the dose of 150, 200 and 250 mg/kg. Besides, the physiological indicators of mice are stable. Thus, it was found that the extract of Hoang Lien roots possesses a hypoglycemic effect in diabetic.

Keywords: *Coptis teeta* Wall, Diabetes Mellitus, Diabetic mouse model.

¹ Trường Đại học Mở Tp.HCM.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo Skyler (2004), bệnh tiểu đường (Diabetes Mellitus) là một căn bệnh nội tiết gây rối loạn chuyển hóa carbohydrate được tìm thấy hầu hết các quốc gia trên thế giới và gia tăng nhanh chóng^[12]. Việt Nam được đánh giá là một trong những nước Đông Nam Á có tỷ lệ mắc bệnh cao chiếm 3,8% dân số^[4]. Hiện nay, song song với việc điều trị tiểu đường bằng thuốc có nguồn gốc tổng hợp thì việc sử dụng các loại dược liệu có nguồn gốc thiên nhiên đã được sử dụng rộng rãi trong dân gian do chúng là nguồn dược liệu sẵn có trong tự nhiên, giá thành rẻ và tiện sử dụng^[3]. Do đó, việc tìm kiếm và nghiên cứu các loại thảo dược có khả năng điều trị bệnh tiểu đường đang được các nhà khoa học trên thế giới quan tâm và phát triển.

Cây Hoàng Liên là một loại thảo dược mọc trên dãy Hoàng Liên Sơn. Phần thân rễ cây Hoàng Liên được sử dụng một cách rộng rãi trong dân gian do chúng chứa các thành phần có khả năng kháng lại virus, vi khuẩn, kháng viêm, điều trị tiểu đường... Xuất phát từ thực tế trên, chúng tôi tiến hành khảo sát khả năng hạ đường huyết của rễ cây Hoàng Liên (*Coptis teeta Wall*) trên mô hình chuột *in vivo* gây bởi Alloxan (A7413, Sigma) và khảo sát được tính điều trị tiểu đường của cao chiết còn rễ cây hoàng liên.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thu nhận cao chiết ethanol rễ cây Hoàng Liên

Rễ cây Hoàng Liên sau khi thu nhận tiến hành phơi khô trong bóng râm, xay thành bột. 100g bột ngâm trong 1000 ml cồn 95^o^[8]. Dịch chiết ethanol Hoàng Liên được tiến hành cô quay đuổi dung môi cho đến khi thu nhận được cao có dạng sệt màu nâu (Luo et al, 2000).

2.2. Động vật thí nghiệm

Chuột (*Mus musculus* var. Albino) có trọng lượng 20 ± 2 g được thu mua từ Viện

Pasteur Thành phố Hồ Chí Minh. Chuột sau khi mua được nuôi ổn định trước 3 ngày thí nghiệm ở nhiệt độ phòng, chu kỳ sáng tối 12/12.

2.3. Khảo sát độc tính cấp và độc tính bán trường diễn

Thử nghiệm khảo sát độc tính cấp được thực hiện theo phương pháp “Up and Down” của chỉ thị hướng dẫn số 425 về khảo sát độc tính hoạt chất tự nhiên của Tổ chức hợp tác và phát triển kinh tế OECD (The Organisation for Economic Cooperation and Development) với các liều lượng thử nghiệm là 2000 mg/kg và 5000 mg/kg^[11].

Thử nghiệm độc tính bán trường diễn được thực hiện với các liều lượng 150, 200, 250 mg/kg. Chuột tiến hành cho uống liên tục trong vòng 15 ngày và theo dõi tỷ lệ sống chết, chỉ tiêu huyết học về hồng cầu, bạch cầu và trọng lượng chuột^[1].

2.4. Tạo mô hình chuột tiểu đường bằng Alloxan

Toàn bộ chuột đưa vào thí nghiệm đều có nồng độ đường huyết nằm trong giới hạn chỉ số bình thường và được chia làm 3 lô thí nghiệm, mỗi lô 10 con. Lô 1 và lô 2, chuột được tiến hành tiêm với Alloxan (A7413, Sigma) ở liều lượng 150 và 200 mg/kg^{[6][7]}. Ở lô 3, chuột được tiêm nước cất, sử dụng làm lô đối chứng. Hai giờ sau khi tiêm, tất cả các con chuột được tiêm 0,5 mL dung dịch Glucose 5%. Sau 72 giờ, các lô chuột được tiến hành kiểm tra đường huyết. Giá trị lượng đường huyết lớn hơn 200 mg/dl là thành công trong việc tạo mô hình chuột tiểu đường.

2.5. Khảo sát tác dụng hạ đường huyết của cao chiết ethanol rễ cây Hoàng Liên^{[6][9]}

Tất cả chuột đưa vào thí nghiệm đều có nồng độ lượng đường huyết lớn hơn 200 mg/dl và được chia làm 5 lô thí nghiệm, mỗi lô 7 con. Lô thí nghiệm được cho sử dụng cao chiết còn Hoàng Liên

với các liều lượng 150, 200, 250 mg/kg. Lô đối chứng âm cho uống nước cất và lô đối chứng dương cho sử dụng với thuốc hạ đường huyết Gliclazide (Stada). Chuột ở các lô được cho uống trong vòng 7 ngày và kiểm tra lượng đường huyết của toàn bộ chuột sau lần uống cuối cùng. Trong quá trình khảo sát, tiến hành ghi nhận sự biến thiên của chỉ tiêu sinh lý hồng cầu, bạch cầu và thể trọng chuột.

2.6. Phương pháp xử lý thống kê

Số liệu và kết quả thu nhận được phân tích, thống kê bằng công cụ Anova trong phần mềm Microsoft Excel 2007 và phần mềm Stargraphic 3.0. Kết quả được trình bày dưới dạng MEAN ± SEM^[2].

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát độc tính cấp và độc tính bán trường diễn

Sau 72 giờ khảo sát độc tính cấp với liều lượng 2000 mg/kg và 5000 mg/kg, tỷ lệ chuột sống đạt 100% và không có sự biểu hiện bất thường. Theo hướng dẫn của chỉ thị 425 về khảo sát độc tính cấp, giá trị LD₅₀ > 5000 mg/kg và không gây độc tính cấp với liều lượng thí nghiệm^[4].

Ở nghiệm thức khảo sát độc tính bán trường diễn với các liều lượng 150, 200, 250 mg/kg, sau 15 ngày thí nghiệm, tỷ lệ sống đạt 100% và trạng thái sinh hoạt bình thường. Trọng lượng của chuột qua các ngày thí nghiệm thể hiện ở bảng 3.1.

Bảng 3.1. Bảng giá trị trọng lượng trung bình ở lô thí nghiệm khảo sát độc tính bán trường diễn

	Ngày 0	Ngày 5	Ngày 10	Ngày 15
Lô 1 (đối chứng âm)	19,38 ± 0.73	22,36 ± 0.83	24,48 ± 0.28	26,74 ± 0.73
Lô 2 (150 mg/ Kg)	19,52 ± 0.61	21,56 ± 0.56	24,22 ± 0.42	25,06 ± 0.34
Lô 3 (200 mg/ Kg)	19,70 ± 0.63	21,72 ± 0.50	25,60 ± 0.39	26,52 ± 0.46
Lô 4 (250 mg/ Kg)	19,36 ± 0.65	21,42 ± 0.58	22,90 ± 0.50	23,94 ± 0.57

Nhìn chung, trọng lượng chuột ở tất cả các lô sau 15 ngày thí nghiệm đều có sự gia tăng một cách đều đặn. Trọng lượng chuột vào ngày 15 ở tất cả các lô đều có sự khác biệt có ý nghĩa so với ngày 0, điều này chứng minh rằng tất cả chuột đều có sự tăng trọng. Tỷ lệ sống của chuột đạt 100% trong suốt quá trình thí nghiệm, về mặt cảm quan chuột hoạt động bình thường,

không có hiện tượng xù lông, thay đổi màu mắt,... Như vậy, các liều uống 150, 200, 250 mg/kg không có ảnh hưởng đến sức khỏe của chuột, chuột vẫn tăng trọng đều đặn và có thể sử dụng những liều này để khảo sát tác dụng hạ đường huyết, kháng viêm của cao chiết cò rế cây Hoàng Liên.

3.2. Kết quả tạo mô hình chuột tiểu đường bằng Alloxan

Bảng 3.2. Kết quả tạo mô hình chuột tiểu đường bằng Alloxan

	Chỉ số đường huyết trung bình (mg/dl)	Tỷ lệ thành công(%)
Lô 1 (nước cất)	126 ± 6.81*	0%
Lô 2 (150 mg/ Kg)	428 ± 31.28**	50%
Lô 3 (200 mg/ Kg)	477 ± 25.42***	80%

Ghi chú: Khác biệt ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95%

Ở lô đối chứng âm sử dụng nước cất, chỉ số đường huyết của chuột sau 3 ngày thí nghiệm không có sự gia tăng và vẫn ổn định như ban đầu. Tuy nhiên, ở hai lô sử dụng Alloxan 150 mg/dl và 200 mg/dl có sự thay đổi rõ rệt, chỉ số đường huyết tăng cao và lớn hơn 200 mg/dl, chứng tỏ đã gây tiểu đường thành công nhưng hiệu suất tạo thành công ở lô 2 (150 mg/kg) chỉ là 50% và chỉ số đường huyết trung bình của những con tạo mô hình thành công là 428 mg/dl. Đối với lô 3 (200 mg/kg) thì hiệu suất lên đến 80% và chỉ số đường huyết của những con tạo

thành công là 477 mg/dl. Như vậy, liều Alloxan 200 mg/kg thích hợp cho việc tạo mô hình chuột tiểu đường.

3.3. Khả năng hạ đường huyết của cao chiết ethanol rễ cây Hoàng Liên

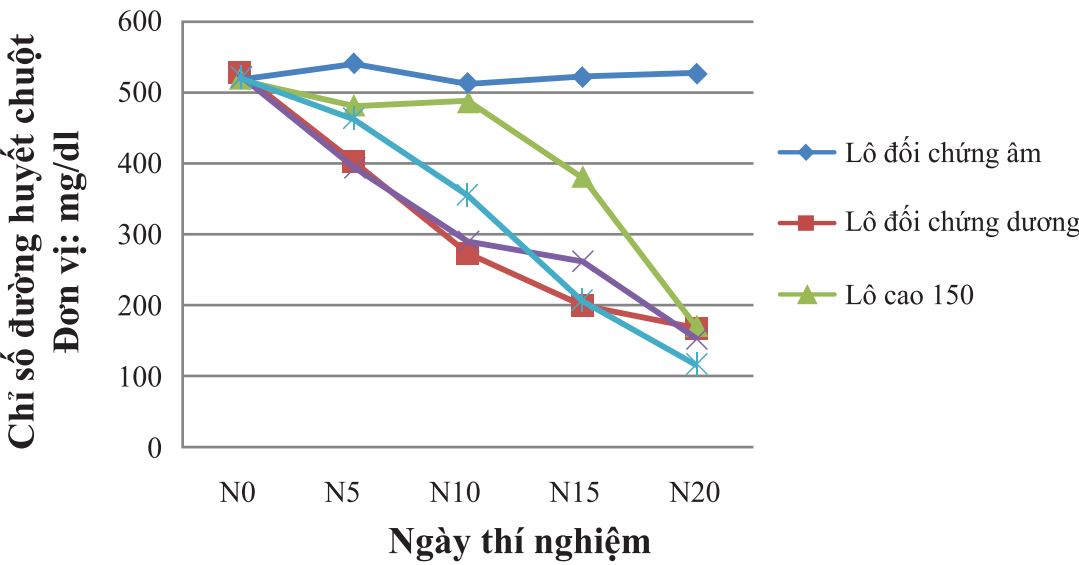
Chúng tôi tiến hành đánh giá khả năng hạ đường huyết của cao chiết còn rễ cây Hoàng Liên dựa trên sự thay đổi lượng đường huyết qua các ngày thí nghiệm. Bên cạnh đó, các chỉ tiêu sinh lý cũng được xem xét như một yếu tố quan trọng để đánh giá liều lượng cao sử dụng tối ưu.

3.3.1. Chỉ tiêu đường huyết

Bảng 3.3. Lượng đường huyết (mg/dl) thay đổi qua các ngày thí nghiệm

	N ₀	N ₅	N ₁₀	N ₁₅	N ₂₀
Lô đối chứng âm	520,29 ± 11,72	539,71 ± 17,27	514,00 ± 12,46	523,14 ± 13,56	526,14 ± 14,82
Lô đối chứng dương	528,00 ± 7,78	403,29 ± 8,29	273,29 ± 7,17	199,00 ± 3,31	166,86 ± 6,30
Lô cao 150 mg/kg	519,57 ± 22,05	480,86 ± 25,57	486,29 ± 22,58	381,14 ± 13,38	172,00 ± 16,08
Lô cao 200 mg/kg	522,71 ± 22,29	394,86 ± 39,20	290,29 ± 23,59	262,00 ± 47,42	152,43 ± 16,08
Lô cao 250 mg/kg	519,86 ± 16,16	462,86 ± 45,28	356,71 ± 38,73	207,29 ± 25,24	118,14 ± 6,15

Hình 3.1. Đồ thị biểu diễn sự biến thiên lượng đường huyết của chuột thí nghiệm



Nhìn chung, ở các lô thí nghiệm chỉ số đường huyết đều giảm. Tuy nhiên, ở lô đối chứng âm thì sau 15 ngày thí nghiệm, giá trị đường huyết vẫn đạt trên 500 mg/dl,

do đó, chuột vẫn ở trạng thái bệnh lý tiểu đường. Đối với các lô thí nghiệm còn lại, ở ngày 0 giá trị đường huyết vẫn ở mức cao, trên 500 mg/dl nhưng đến ngày 15 đã

có sự thay đổi rõ rệt, giá trị đường huyết ở tất cả các lô đã trở về dưới 200 mg/dl, điều này cho thấy chuột không còn bị tiểu đường. Như vậy, khi sử dụng cao chiết còn ở ba liều lượng 150, 200 và 250 mg/kg đều có tác dụng hạ đường huyết.

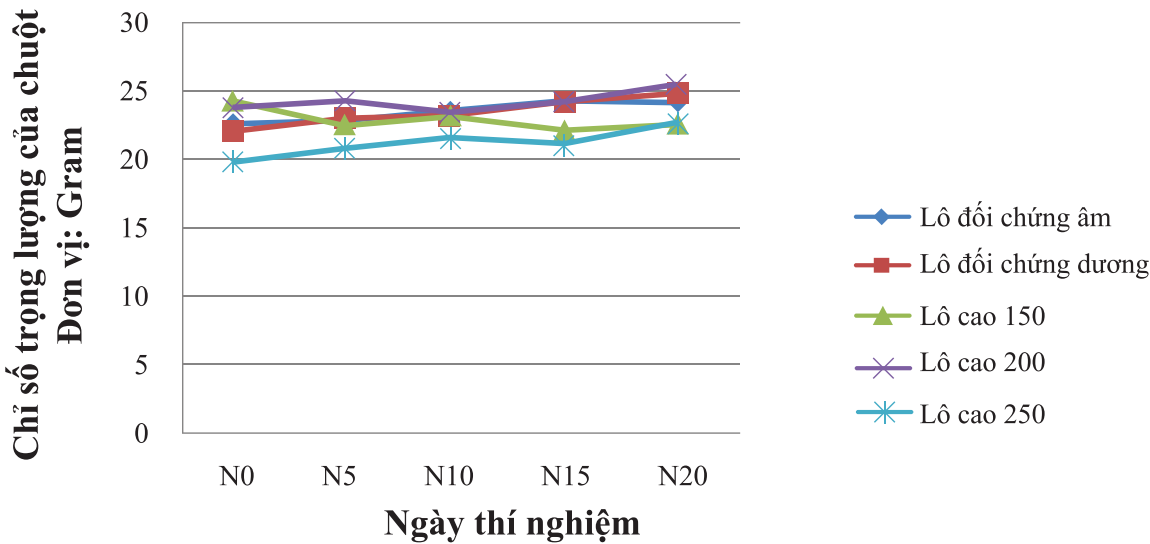
Tình trạng sinh lý và sức khỏe chuột sau khi uống cao chiết thể hiện rõ qua các chỉ số về tổng lượng hồng cầu, tổng lượng bạch cầu, trọng lượng.

3.3.2. Chỉ tiêu trọng lượng

Bảng 3.4. Bảng kết quả thể hiện trọng lượng chuột qua các ngày thí nghiệm

	N ₀	N ₅	N ₁₀	N ₁₅	N ₂₀
Lô đối chứng âm	23,06 ± 1,47	23,23 ± 1,59	23,90 ± 1,49	24,69 ± 1,43	24,62 ± 1,47
Lô đối chứng dương	22,42 ± 0,58	23,43 ± 0,81	23,63 ± 0,70	24,57 ± 0,77	25,18 ± 0,93
Lô cao 150	24,60 ± 1,07	23,00 ± 1,14	23,56 ± 0,99	22,59 ± 1,42	22,97 ± 1,36
Lô cao 200	24,13 ± 1,10	24,65 ± 1,27	23,96 ± 1,63	24,44 ± 1,10	25,76 ± 1,14
Lô cao 250	20,41 ± 0,77	21,27 ± 0,81	22,04 ± 0,73	21,58 ± 0,88	23,03 ± 0,82

Hình 3.2. Đồ thị biểu diễn sự biến thiên trọng lượng của chuột thí nghiệm



Tất cả các chuột thí nghiệm vào ngày 0 đều đạt trọng lượng trung bình khoảng 22 gram. Sau 20 ngày thí nghiệm, chỉ số trọng lượng trung bình là 24,62; 25,18; 22,97; 25,76; 23,03 g tương ứng lần lượt ở các lô đối chứng âm, đối chứng dương, lô sử dụng cao liều 150, 200, và 250 mg/kg. Trọng lượng chuột ở các lô thí nghiệm

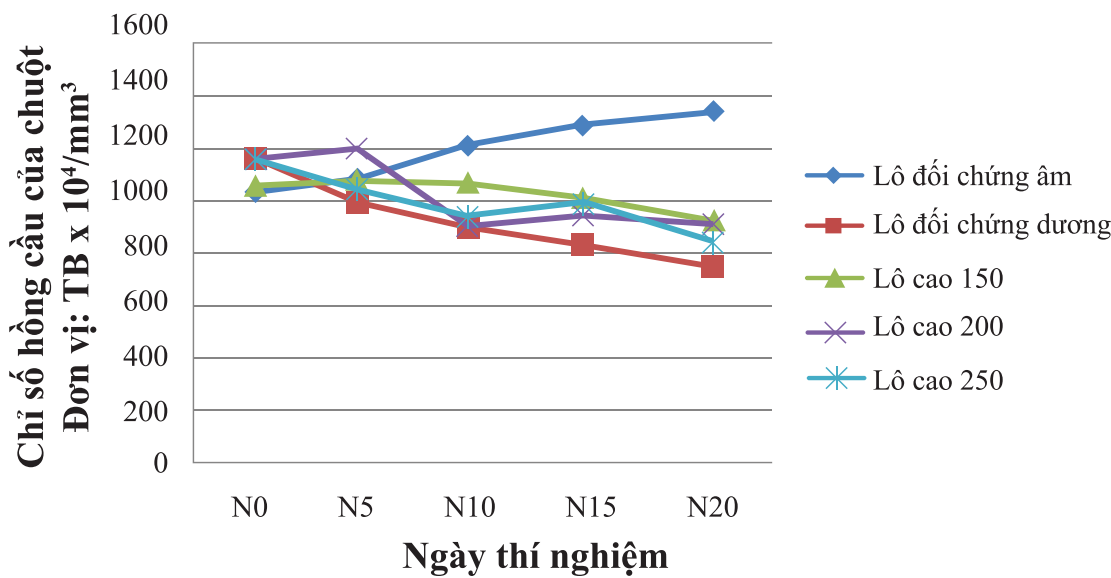
không có sự gia tăng rõ rệt và sự gia tăng này không có sự khác biệt có ý nghĩa đối với lô đối chứng âm. Hơn nữa, trọng lượng chuột ở giai đoạn này đã đạt trạng thái chuột trưởng thành. Do đó, qua thí nghiệm này cho thấy khi sử dụng cao chiết còn rễ cây Hoàng Liên không làm ảnh hưởng đến trọng lượng chuột thí nghiệm.

3.3.3. Chỉ tiêu hồng cầu

Bảng 3.5. Bảng kết quả thể hiện hồng cầu chuột qua các ngày thí nghiệm

	N ₀	N ₅	N ₁₀	N ₁₅	N ₂₀
Lô đối chứng âm	1031,5 ± 67,22	1078,36 ± 125,79	1206,93 ± 144,37	1282,64 ± 87,73	1342,21 ± 70,52
Lô đối chứng dương	1157,57 ± 59,01	991,57 ± 51,57	896,86 ± 31,15	828,71 ± 41,54	746,14 ± 42,53
Lô cao 150 mg/Kg	1057,43 ± 59,64	1082,27 ± 57,90	1069,93 ± 46,46	1008,14 ± 30,48	927,00 ± 14,80
Lô cao 200 mg/Kg	1149,86 ± 82,21	1194,64 ± 80,24	901,14 ± 65,02	945,57 ± 76,55	907,07 ± 43,94
Lô cao 250 mg/Kg	1157,14 ± 55,80	1035,93 ± 52,91	936,36 ± 24,24	986,86 ± 68,53	837,86 ± 50,18

Hình 3.3. Đồ thị biểu diễn sự biến thiên tổng lượng hồng cầu của chuột thí nghiệm



Giá trị tổng lượng hồng cầu có sự liên hệ đối với lượng đường huyết của chuột. Nhìn chung, qua giá trị tổng lượng hồng cầu ở tất cả các lô vào ngày 0 (chuột đang bị tiểu đường) cho thấy các giá trị này đều ở mức cao và đều vượt ngưỡng giá trị giới hạn bình thường là $5 - 9,5 \times 10^6$ tế bào/ mm^3 . Sau 20 thí nghiệm, chỉ số hồng cầu ở lô đối chứng âm tăng dần qua các ngày thí nghiệm và vượt quá giới

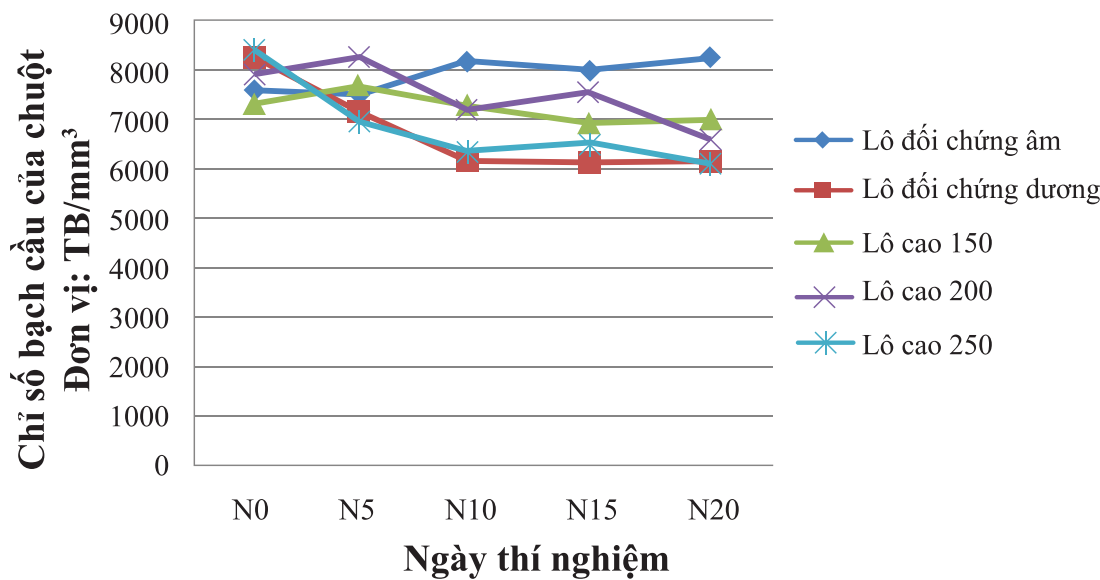
hạn sinh lý bình thường. Chỉ số hồng cầu ở các lô đối chứng dương (sử dụng thuốc Gliclazide), lô sử dụng cao liều 150, 200 và 250 mg/kg đều giảm so với ngày 0. Bên cạnh đó, tổng lượng hồng cầu ở ngày 20 ở các lô này đều nằm trong giới hạn sinh lý bình thường^[10]. Điều đó cho thấy sau khi sử dụng cao chiết, chỉ số hồng cầu chuột đã được ổn định ở mức độ sinh lý bình thường.

3.3.4. Chỉ tiêu bạch cầu

Bảng 3.6. Bảng kết quả thể hiện bạch cầu chuột qua các ngày thí nghiệm

	N ₀	N ₅	N ₁₀	N ₁₅	N ₂₀
Lô đối chứng âm	7590,14 ± 940,75	7468,71 ± 2448,35	8116,71 ± 1208,85	7943,71 ± 2003,61	8211,00 ± 1505,19
Lô đối chứng dương	8258,57 ± 630,92	7166,71 ± 1003,84	6148,86 ± 570,57	6127,14 ± 474,65	6151,00 ± 386,68
Lô cao 150	7302,57 ± 780,85	7694,29 ± 366,21	7297,86 ± 536,55	6911,71 ± 606,51	6984,00 ± 436,2
Lô cao 200	7918,14 ± 2096,02	8235,00 ± 1411,98	7171,29 ± 1198,69	7542,57 ± 1055,68	6585,29 ± 666,55
Lô cao 250	8403,86 ± 634,28	6952,00 ± 755,31	6323,57 ± 487,14	6463,14 ± 667,44	6082,29 ± 567,04

Hình 3.4. Đồ thị biểu diễn bị biến thiên tổng lượng bạch cầu của chuột thí nghiệm



Tổng lượng bạch cầu vào ngày 0 đều nằm trong khoảng sinh lý bình thường^[10]. Sau 20 ngày thí nghiệm, giá trị tổng lượng bạch cầu ở tất cả các lô không có sự thay đổi có ý nghĩa so với ngày 0 và vẫn nằm trong giới hạn sinh lý bình thường. Điều này cho thấy khi sử dụng Gliclazide ở lô đối chứng dương và sử dụng cao chiết còn rễ cây Hoàng Liên ở ba liều thí nghiệm như trên không gây ảnh hưởng đến tổng lượng bạch cầu của chuột thí nghiệm.

Dựa trên kết quả thu nhận được, chúng tôi nhận thấy liều 200 mg/kg và

250 mg/kg có tác dụng hạ đường huyết tốt và không gây ảnh hưởng đến sức khỏe và sinh lý chuột.

4. KẾT LUẬN

Dựa trên các kết quả thí nghiệm đạt được, chúng tôi kết luận cao chiết còn rễ cây Hoàng Liên khi được thử nghiệm trên mô hình động vật có tác dụng hạ đường huyết sau 20 ngày sử dụng ở ba liều thí nghiệm là 150, 200 và 250 mg/kg. Bên cạnh đó, sử dụng cao chiết ở những liều lượng trên là an toàn đối với chuột thí nghiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ y tế, (1996), *Quy chế đánh giá tính an toàn và hiệu lực của thuốc cổ truyền*.
2. Đặng Văn Giáp (1997), *Phân tích dữ liệu khoa học bằng chương trình ES – Excel*. Nhà xuất bản Giáo dục, trang 45 – 46.
3. Akhtar FM, Ali MR (1984), *Study of antidiabetic effect of a compound medicinal plant prescription in normal and diabetic rabbits*. Med. Assoc. 34, pp. 239 – 244.
4. Ambady Ramachandran, Chamukuttan Snehalatha (2012), “Trends in prevalence of diabetes in Asian countries”, *World Journal of Diabets*, pp. 110 – 117.
5. Diniz S. F., Amorim F. P. L. G, (2008), “Alloxan - induced diabetes delays repair in a rat model of closed tibial fracture”, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, pp. 373 – 379.
6. Etuk (2010), “Animals models for studying diabetes mellitus”, *Agriculture and Biology Journal of North America*, pp. 130 – 140.
7. Hanefi Özbek, Ebubekir Ceylan (2004), *Hypoglycemic effect of Rheum ribes roots in alloxan induced diabetic and normal mice*, Scand. J. Lab. Anim. Vol. 31, pp. 113 – 117.
8. Jong Chang Tsai, Shuli Tsai, Weng-Cheng Chang (2004), “Effect of Ethanol Extracts of Three Chinese Medicinal Plants with Anti-diarrheal Properties on Ion Transport of the Rat Intestinal Epithelia”, *Journal of Pharmacological Sciences*, pp. 60 – 66.
9. K. Kulathuran Pillai, N. Chidambaranathan (2012), “Extracts of cnidoscolus chayamansa in experimental diabetes and their effects on key metabolic enzymes involved in carbohydrate metabolism”, *International journal of research in pharmacy and chemistry*, pp. 179 – 187.
10. Mark A. Suckow, Peggy Danneman, Cory Brayon, *The Laboratory Mouse*, CRC Press, London, New York, Washington, D.C, pp. 20 – 21.
11. OECD (2008). *Guidelines for the testing of chemical, Acute Oral Toxicity, Up and Down Prodnure*.
12. Skyler JS (2004), *Diabetes mellitus: pathogenesis and treatment strategies*. Chemistry, 47, pp. 4113 – 4117.
13. Szkudelski T. (2001), *The mechanism of alloxan and streptozotocin action B cells of the rat pancreas*, Physiology, pp. 536 – 546.

(Ngày nhận bài: 10/11/2012; Ngày phản biện: 23/11/2012; Ngày chấp nhận đăng: 27/05/2013).