

Đánh giá tác dụng hạ lipid máu của viên hoàn giọt chứa đan sâm, tam thất Việt Nam trên thực nghiệm

Hoàng Thị Kim Quý^{1,2}, Bùi Thị Thúy Luyện¹, Trần Trọng Biên¹,
Hoàng Thị Khánh Linh¹, Hà Vân Oanh¹, Nguyễn Thùy Dương^{1,*}

¹Trường Đại học Dược Hà Nội, ²Trường Đại học Duy Tân

*Tác giả liên hệ: duongnt@hup.edu.vn

(Ngày gửi đăng: 11/10/2021 – Ngày duyệt đăng: 23/6/2022)

SUMMARY

The dripping pills were formulated from the dry extracts of Salvia miltiorhiza Bunge and Panax notoginseng Burk. with PEG 6000 as carrier. The study aimed at evaluating the hypolipidemic effects of Danshen dripping pills in poloxamer-407 induced hyperlipidemic mice and high-fat/high-cholesterol induced hyperlipidemic rats. The results showed that serum cholesterol levels, triglyceride levels, LDL-C levels were significantly decreased in the group of poloxamer-407 induced hyperlipidemia mice treated with dripping pills at a dose of 400 mg/kg, serum cholesterol levels were also significantly decreased in group of poloxamer -407 induced hyperlipidemia mice treated with dripping pills at a dose of 200 mg/kg. In the model of exogenous hyperlipidemia rats induced by high-cholesterol diet for 28 days, taking dripping pills at a dose of 200mg/kg significantly decreased serum cholesterol levels, LDL-C levels.

Từ khóa: hạ lipid máu, Panax notoginseng Burk., poloxamer- 407, Salvia miltiorhiza Bunge, viên hoàn giọt.

Đặt vấn đề

Rối loạn lipid máu là bệnh lý rối loạn chuyển hóa khá phổ biến, có xu hướng gia tăng ở các nước đang phát triển và làm tăng nguy cơ xuất hiện các bệnh lý tim mạch nguy hiểm. Bài thuốc có chứa đan sâm, tam thất đã được sử dụng khá phổ biến trong y học cổ truyền với tác dụng làm giảm cholesterol, làm chậm sự tiến triển của quá trình xơ vữa động mạch vành, điều trị đau thắt ngực, loạn nhịp tim, thiếu máu cơ tim, sau nong vành hoặc phẫu thuật bắc cầu động mạch [1],[3]. Viên hoàn giọt chứa đan sâm, tam thất Việt Nam (VHG ĐS-TT) là chế phẩm kết hợp giữa hai loại dược liệu trên, được phát triển với mục đích cung cấp một sản phẩm từ dược liệu có tác dụng hạ lipid máu. Viên hoàn giọt là dạng bào chế dưới dạng hệ phân tán rắn bằng phương pháp đun chảy nhỏ giọt cao khô của hai loại dược liệu trên, đây là dạng bào chế thích hợp với các loại cao dược liệu [13]. Những năm gần đây, dạng bào chế hoàn giọt nói chung và viên hoàn giọt chứa đan sâm - tam thất nói riêng rất được quan tâm trong phát triển nghiên cứu thuốc mới từ dược liệu nhưng cho đến thời điểm hiện tại, chưa có nghiên cứu nào được thực hiện một cách đầy đủ. Vì vậy, nhóm nghiên cứu tiến hành đánh giá tác dụng hạ lipid máu của VHG ĐS-TT trên thực nghiệm với mong muốn tạo ra sản phẩm kích thước nhỏ gọn dễ sử dụng, được minh chứng tác dụng dược lý, góp phần hiệu quả trong quá trình nghiên cứu và phát triển thuốc mới có nguồn gốc từ dược liệu.

Nguyên liệu, phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu

VHG ĐS-TT được bào chế tại Bộ môn Công Nghiệp Dược- Trường Đại học Dược Hà Nội, là sản phẩm của đề tài nghiên cứu khoa học cấp Bộ y tế “Xây dựng quy

trình bào chế viên hoàn giọt có chứa đan sâm, tam thất Việt Nam” [2]. Mỗi viên hoàn giọt đạt tiêu chuẩn cơ sở có chứa 5,23 mg cao khô rễ đan sâm sâm (*Radix Salviae miltiorrhiza*) và 0,77 mg cao khô rễ tam thất (*Radix Panax notoginseng*), đường kính viên trung bình $3,69 \pm 0,10$ mm, độ ẩm 6,1 %, độ cầu 1,03, khối lượng viên trung bình $26 \pm 1,5$ mg, đồng đều khối lượng $\pm 5,5$ %. Liều thử được tính theo khối lượng viên. Thiết kế các liều thử căn cứ vào liều dự kiến trên người, sử dụng phương pháp ngoại suy liều có hiệu quả tương đương giữa người và động vật thí nghiệm [4]. Cụ thể, hai mức liều thử được thiết kế dựa trên liều dự kiến dùng trên người và liều cao gấp đôi, qui đổi tương đương trên chuột nhắt trắng là 200 mg/kg – 400 mg/kg và hai mức liều thử trên chuột cống trắng là 100 mg/kg – 200 mg/kg.

Động vật thí nghiệm

Chuột nhắt trắng chủng *Swiss* giống đực, cân nặng từ 18 - 22 g, khỏe mạnh do Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương cung cấp. Chuột cống *Wistar* giống đực, cân nặng 180 - 200 g, khỏe mạnh do Học viện Quân Y cung cấp. Động vật được nuôi ổn định trong điều kiện phòng thí nghiệm 5 ngày trước khi thực hiện nghiên cứu.

Hóa chất

Atorvastatin 20mg của công ty Pfizer (Hoa Kỳ); các bộ kit định lượng cholesterol toàn phần, low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), triglycerid của hãng ERBA Diagnostics Mannheim-USA; Poloxamer 407 của công ty Sigma Aldrich, St. Louis, USA.

Phương pháp nghiên cứu

Đánh giá tác dụng hạ lipid máu trên mô hình gây tăng lipid nội sinh

VHG ĐS-TT với 2 mức liều thử được đánh giá tác dụng trên mô hình gây tăng lipid máu nội sinh bằng P-407 [12]. Chuột nhắt trắng được chia ngẫu nhiên thành 5 lô, mỗi lô 9 động vật:

- Lô 1 (chứng sinh lý): tiêm màng bụng nước muối sinh lý 0,9 % và uống nước cất.
- Lô 2 (chứng bệnh): tiêm màng bụng dung dịch P-407 liều 200 mg/kg và uống nước cất.
- Lô 3 (chứng dương): tiêm màng bụng dung dịch P-407 liều 200 mg/kg và uống atorvastatin liều 100 mg/kg.
- Lô 4 (thử liều 1): tiêm màng bụng dung dịch P-407 liều 200 mg/kg và uống VHG ĐS-TT liều 200 mg/kg.
- Lô 5 (thử liều 2): tiêm màng bụng dung dịch P-407 liều 200 mg/kg và uống VHG ĐS-TT liều 400 mg/kg.

Chuột ở các lô được uống nước cất, atorvastatin hoặc mẫu thử tương ứng trong 10 ngày. Vào ngày thứ 10, chuột ở các lô được tiêm màng bụng P-407 liều 200 mg/kg (trừ lô chứng sinh lý được tiêm NaCl 0,9 %). Tất cả các chuột được nhịn ăn trong 24 giờ, uống nước tự do. Ngày thứ 11, sau 24 giờ kể từ khi tiêm P-407, tất cả các chuột được lấy máu từ xoang tĩnh mạch hốc mắt vào vào ống eppendorf, chờ lắng tự nhiên 1 giờ rồi ly tâm 3000 vòng/phút, lấy huyết thanh làm xét nghiệm định lượng cholesterol toàn phần, triglycerid, LDL- C bằng máy sinh hóa TC 3300 plus (Teco Diagnostic, USA).

Đánh giá tác dụng hạ lipid máu trên mô hình gây tăng lipid ngoại sinh bằng hỗn hợp dầu cholesterol

VHG ĐS-TT với 2 mức liều thử được đánh giá tác dụng trên mô hình gây tăng lipid máu ngoại sinh bằng hỗn hợp dầu cholesterol [6]. Thành phần trong 1 ml hỗn hợp

giàu cholesterol có chứa 0,1 g cholesterol, 0,01 g acid cholic, 0,005 g propylthiouracil. Trên mô hình này, chuột cống trắng chủng *Wistar* được chia thành 5 lô, mỗi lô 8 động vật:

- Lô 1 (chứng sinh lý): uống nước cất.
- Lô 2 (chứng bệnh): uống hỗn hợp dầu cholesterol, sau đó 2 giờ cho uống nước cất.
- Lô 3 (chứng dương): uống hỗn hợp dầu cholesterol, sau đó 2 giờ cho uống atorvastatin liều 10 mg/kg.
- Lô 4 (thử liều 1): uống hỗn hợp dầu cholesterol, sau đó 2 giờ uống mẫu thử VHG ĐS-TT liều 100 mg/kg/ngày.
- Lô 5 (thử liều 2): uống hỗn hợp dầu cholesterol, sau đó 2 giờ uống mẫu thử VHG ĐS-TT liều 200 mg/kg/ngày.

Động vật được kiểm tra cân nặng tại thời điểm trước nghiên cứu và hàng tuần trong thời gian thực nghiệm để điều chỉnh lượng hỗn hợp dầu cholesterol và lượng mẫu thử theo cân nặng với liều đã thiết kế. Chuột được gây tăng lipid máu ngoại sinh bằng cách cho uống hỗn hợp dầu cholesterol hàng ngày với thể tích 1 ml/100 g chuột trong 28 ngày (trừ lô chứng sinh lý được cho uống nước cất). Trong suốt thời gian thí nghiệm, chuột ở các lô nghiên cứu được uống nước, atorvastatin hoặc mẫu thử tương ứng hàng ngày vào một giờ nhất định. Vào ngày thứ 29, cho chuột nhịn ăn qua đêm. Lấy máu xoang tĩnh mạch hốc mắt của chuột vào ống eppendorf, để lắng tự nhiên 1 giờ rồi ly tâm 3000 vòng/phút lấy huyết thanh làm xét nghiệm định lượng cholesterol, LDL-C, triglycerid, HDL-C bằng máy sinh hóa TC 3300 plus (Teco Diagnostic, USA).

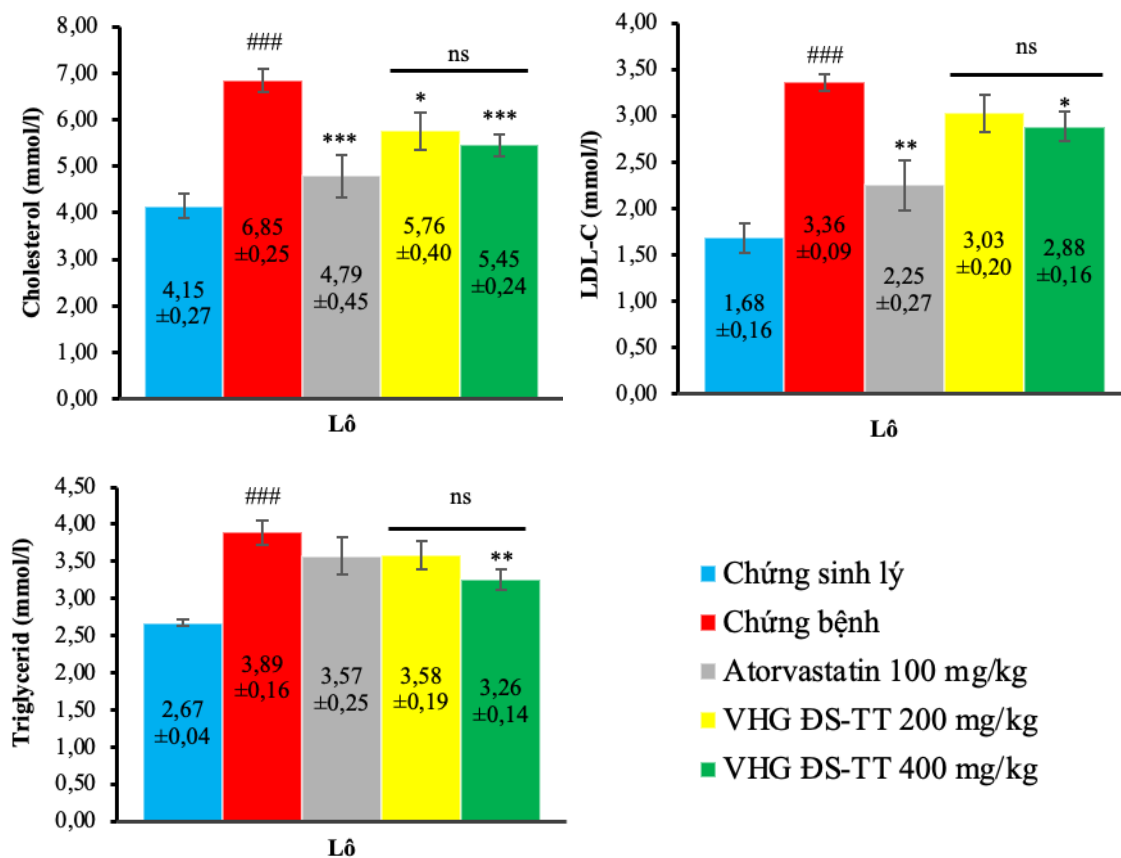
Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm SPSS version 20.0. Kết quả được biểu diễn dưới dạng $M \pm SE$ (M: giá trị trung bình, SE: sai số chuẩn). So sánh giữa các lô bằng one-way ANOVA, dùng post hoc test- LSD để so sánh giá trị trung bình giữa các lô thử với lô chứng bệnh. Sự khác biệt giữa các lô được coi là có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

Kết quả nghiên cứu

Kết quả đánh giá tác dụng hạ lipid máu của VHG ĐS-TT trên mô hình gây tăng lipid máu nội sinh

Kết quả trình bày ở hình 1. Tiêm màng bụng P-407 liều 200 mg/kg đã làm tăng rõ rệt các thông số cholesterol toàn phần, LDL-C và triglycerid huyết thanh ở chuột nhất trắng.



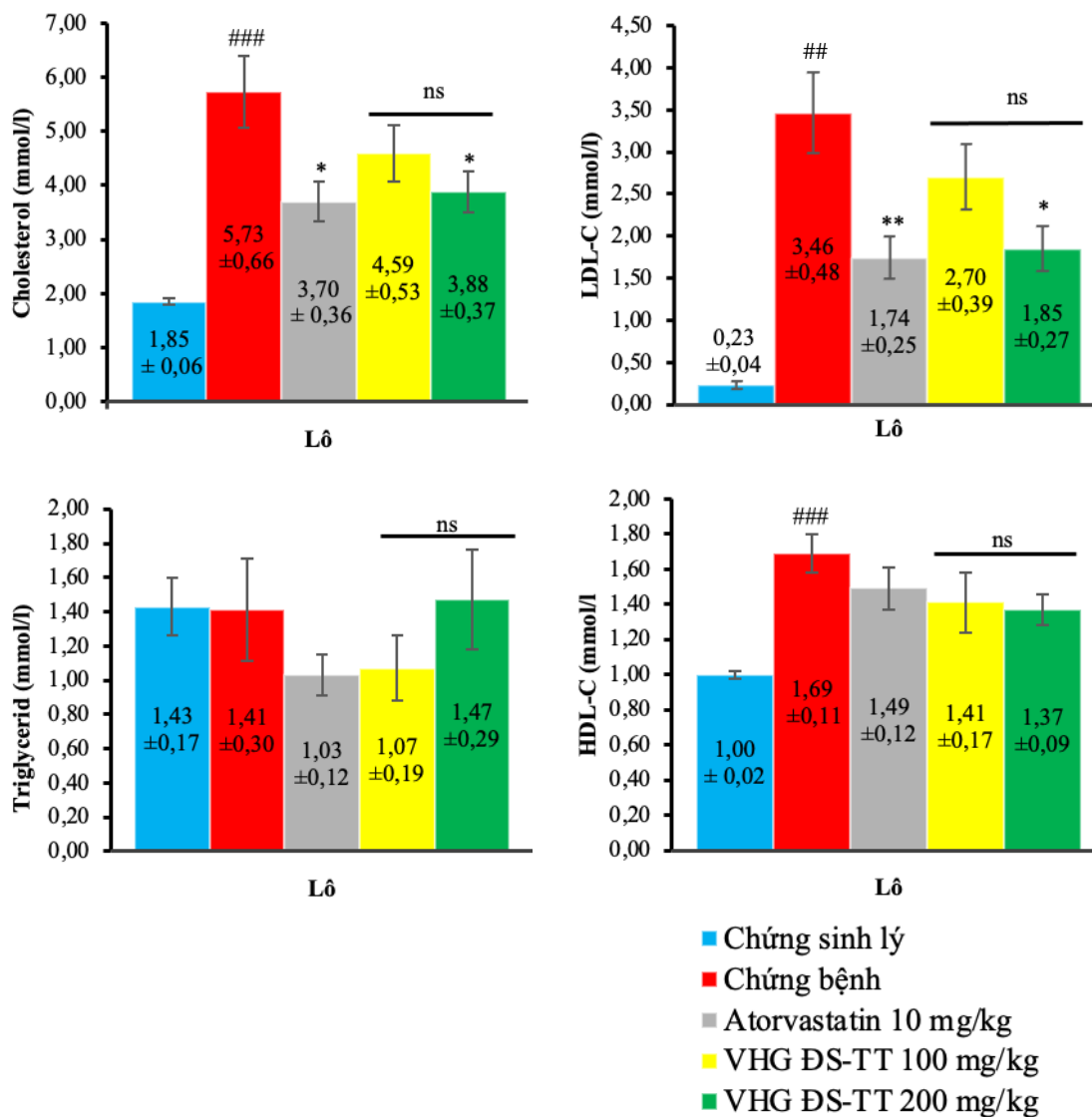
(Kết quả biểu diễn dưới dạng $M \pm SE$; $n=9$; ###: $p < 0,001$ khi so với lô chứng sinh lý; ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$ khi so với lô chứng bệnh, ns: sự khác nhau không có ý nghĩa thống kê giữa hai lô thử)

Hình 1. Ảnh hưởng của VHG ĐS-TT lên nồng độ cholesterol, LDL-C, triglycerid trên mô hình gây tăng lipid máu nội sinh ở chuột nhắt trắng

Kết quả nghiên cứu ở hình 1 cho thấy, VHG ĐS-TT liều 200 mg/kg làm giảm nồng độ cholesterol so với lô chứng bệnh, tỷ lệ giảm là 15,9 % ($p < 0,05$), tuy nhiên mức liều này chưa làm giảm nồng độ LDL-C và triglycerid. Khi dùng liều cao hơn, VHG ĐS-TT liều 400 mg/kg đã làm giảm nồng độ cholesterol, LDL-C, triglycerid so với lô chứng bệnh, tỷ lệ giảm tương ứng 20,4 % ($p < 0,001$), 14,3 % ($p < 0,05$) và 16,2 % ($p < 0,01$). Trong thực nghiệm này, atorvastatin liều 100 mg/kg chuột nhắt trắng làm giảm rõ rệt cholesterol toàn phần và LDL-C so với lô chứng bệnh.

Kết quả đánh giá tác dụng hạ lipid máu của VHG ĐS-TT trên mô hình gây tăng lipid máu ngoại sinh

Kết quả trình bày ở hình 2. Việc sử dụng hỗn hợp dầu cholesterol hàng ngày trong 28 ngày đã gây rối loạn lipid máu ngoại sinh trên chuột cống trắng với các thông số cholesterol đều tăng rõ rệt.



(Kết quả biểu diễn dưới dạng $M \pm SE$; $n=8$; ###: $p < 0,001$ khi so sánh với lô chứng sinh lý; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$ khi so sánh với lô chứng bệnh; ns: sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê giữa hai lô thử)

Hình 2. Ảnh hưởng của VHG ĐS-TT lên nồng độ cholesterol, LDL-C, triglycerid, HDL-C huyết thanh trên mô hình gây tăng lipid máu ngoại sinh ở chuột cống trắng

Kết quả nghiên cứu cho thấy, VHG ĐS-TT liều 100 mg/kg chưa làm giảm nồng độ cholesterol, LDL-C, triglycerid, HDL-C huyết thanh chuột cống trắng so với lô chứng bệnh. Với mức liều cao hơn, VHG ĐS-TT liều 200 mg/kg làm giảm nồng độ cholesterol và LDL-C so với lô chứng bệnh, tỷ lệ giảm tương ứng 46,53 % ($p < 0,05$) và 32,29 % ($p < 0,05$). Trong thực nghiệm gây tăng lipid máu ngoại sinh, atorvastatin liều 10 mg/kg dùng 28 ngày đã làm giảm rõ rệt cholesterol và LDL-C huyết thanh của chuột cống trắng.

Bàn luận

Các kết quả thu được trên các mô hình gây tăng lipid máu cho thấy, VHG ĐS-TT có tác dụng hạ lipid máu và tác dụng này có phụ thuộc liều. Ở cả hai mô hình đều cho thấy VHG ĐS-TT với mức liều cao hơn (400 mg/kg chuột nhắt và 200 mg/kg chuột cống) thể hiện tác dụng làm giảm nhiều thông số lipid máu hơn và cho tác dụng tốt hơn. Trong nghiên cứu này, atorvastatin đã làm giảm rõ rệt nồng độ cholesterol

toàn phần và LDL-C nhưng tại thời điểm kết thúc thực nghiệm chưa làm giảm thông số triglycerid. Kết quả này cũng tương đồng với công bố của một số nghiên cứu khác trên cùng mô hình [5], [7].

Trên mô hình gây tăng lipid máu nội sinh, VHG ĐS-TT ở cả hai mức liều thử 200 mg/kg (tương ứng cao khô đan sâm liều 40 mg/kg và cao khô tam thất liều 6 mg/kg) và 400 mg/kg đều có tác dụng làm giảm cholesterol huyết thanh chuột nhất trắng thí nghiệm. Khi đối chiếu với các nghiên cứu tương tự liên quan đến hai vị dược liệu đan sâm và tam thất có trong chế phẩm nghiên cứu, chúng tôi nhận thấy có sự tương đồng về tác dụng và liều thử (khi qui đổi liều thử giữa chuột nhất và chuột cống). Trong nghiên cứu của Ji W. và Gong B. Q. (2008), dịch chiết nước của đan sâm liều 150 mg/kg chuột cống làm giảm nồng độ cholesterol, LDL-C, triglycerid huyết tương và giảm nồng độ cholesterol trong gan trên chuột thực nghiệm so với nhóm chứng bệnh [9]. Thêm vào đó, tác giả còn chỉ ra dịch chiết của đan sâm có tác dụng giảm LDL-C trên chuột thực nghiệm theo cơ chế tăng biểu hiện gen LDL receptor của protein liên kết yếu tố điều hòa sterol (SREBP), giúp nhận LDL vào trong tế bào và bị thoái hóa trong các lysosome, làm giảm LDL-C huyết tương. Tương tự, Joo Il Woo và cộng sự (2010) công bố dịch chiết tam thất liều 40 mg/kg chuột cống chỉ làm giảm nồng độ cholesterol, nhưng liều 100 mg/kg đã giảm cả cholesterol, triglycerid, LDL-C so với lô chứng bệnh [11]. Như vậy, kết quả của nghiên cứu này cho thấy, tác dụng của VHG ĐS-TT phối hợp 2 dược liệu khá tương đồng, thậm chí thể hiện tác dụng với liều thấp hơn (khi qui đổi liều về cùng loài động vật) khi so với các nghiên cứu trên từng dược liệu riêng lẻ đã công bố trên mô hình gây tăng lipid nội sinh.

Trên mô hình gây tăng lipid máu ngoại sinh, tác dụng điều chỉnh RLLPM của VHG ĐS-TT được thể hiện rõ ràng sau 4 tuần nghiên cứu với sự giảm nồng độ cholesterol, LDL-C khi dùng mức liều 200 mg/kg. Kết quả nghiên cứu này cho thấy VHG ĐS-TT đáp ứng tốt trong mục tiêu chính trong quản lý và điều trị RLLPM là giảm nồng độ LDL-C [8]. Khi đối chiếu với nghiên cứu của Wu Jian- Hong (2013), tác giả này công bố tam thất liều 100 mg/kg làm giảm đáng kể nồng độ cholesterol, triglycerid, LDL-C so với lô chứng bệnh sau 28 ngày gây mô hình ngoại sinh. Nhóm nghiên cứu còn chỉ ra hoạt chất saponin trong dịch chiết tam thất làm tăng mức biểu hiện mRNA của enzym cholesterol 7 α -hydroxylase, thúc đẩy quá trình chuyển cholesterol thành acid mật, làm giảm nồng độ cholesterol [14]. Kết quả nghiên cứu của Ji W. và Gong B. Q. (2007) cũng cho thấy dịch chiết n-butanol của tam thất với liều 60 mg/kg và 90 mg/kg có khả năng làm giảm nồng độ cholesterol, LDL-C và triglycerid so với lô chứng bệnh [10]. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy, khi đưa 2 dược liệu vào một dạng bào chế hiện đại VHG ĐS-TT đã thể hiện tác dụng không thua kém các nghiên cứu thực hiện trên các cao và phân đoạn chiết của từng dược liệu thành phần. Thậm chí, khi đưa vào sản phẩm phối hợp, VHG ĐS-TT đã thể hiện tác dụng với liều thấp hơn nhiều khi qui đổi về cao dược liệu thành phần. Như vậy, việc chuyển dạng bào chế từ các cao dược liệu sang viên hoàn giọt chứa đan sâm, tam thất đã bước đầu cho kết quả khả quan về tác dụng dược lý.

Kết luận

Kết quả của nghiên cứu này cho phép rút ra kết luận về tác dụng của VHG ĐS-TT như sau:

- Trên mô hình gây tăng lipid máu nội sinh bằng poloxamer 407 ở chuột nhất trắng: VHG ĐS-TT liều 400 mg/kg làm giảm cholesterol, giảm LDL-C, giảm triglycerid so với lô chứng bệnh, tỷ lệ giảm tương ứng là 20,4 %, 14,3 % và 16,2 %.

VHG ĐS-TT liều 200 mg/kg chuột nhắt trắng làm giảm nồng độ cholesterol với tỷ lệ giảm 15,9 % nhưng liều này chưa làm thay đổi nồng độ triglycerid và LDL- C.

- Trên mô hình gây tăng lipid máu ngoại sinh bằng hỗn hợp dầu cholesterol ở chuột cống trắng: VHG ĐS-TT liều 200 mg/kg chuột cống trắng làm giảm cholesterol, giảm LDL-C so với lô chứng bệnh, tỷ lệ giảm lần lượt là 32,3 % và 46,53 % trong khi liều 100 mg/kg chuột cống trắng chưa làm thay đổi các chỉ số lipid.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Huy Bích (2004), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam* NXB khoa học và kỹ thuật, Hà Nội, tr. 733-738, 776-780.
2. Trần Trọng Biên, Nguyễn Hà Yên, Bùi Thị Thúy Luyện, Nguyễn Văn Hân (2018), "Bước đầu nghiên cứu bào chế viên hoàn giọt chứa đan sâm, tam thất trồng ở Việt Nam", *Tạp chí Dược học*, tập 58, số 510, tr. 43-48.
3. Tào Duy Cần (2007), *Cây thuốc vị thuốc bài thuốc Việt Nam*, NXB Hà Nội, Hà Nội, tr. 78, 194-195.
4. Đỗ Trung Đàm (2015), "Cách biểu thị liều dùng của các chất chiết được từ dược liệu", *Đánh giá về lượng các kết quả nghiên cứu y dược sinh học*, NXB Y học, Hà Nội, tr. 565-568.
5. Đỗ Quốc Hương (2016), Nghiên cứu độc tính và hiệu quả của viên nang Lipidan trong điều trị hội chứng rối loạn lipid máu, Luận án tiến sĩ Y học, Trường Đại học Y Hà Nội, Hà Nội.
6. Nguyễn Trọng Thông, Vũ Thị Ngọc Thanh và cộng sự (2013), "Xây dựng mô hình gây rối loạn lipid máu bằng hỗn hợp dầu cholesterol chứa lượng thấp acid cholic trên chuột cống trắng", *Nghiên cứu dược & Thông tin thuốc*, 5, tr. 179-182.
7. Tạ Thu Thủy (2016), Đánh giá tác dụng điều trị hội chứng rối loạn lipid máu của cao lỏng Đại An, Luận án tiến sĩ Y học, Trường Đại học Y Hà Nội, Hà Nội.
8. François Mach, Colin Baigent, et al. (2019), "2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk", 290, pp. 140-205.
9. Ji W., Gong B. Q. (2008), "Hypolipidemic activity and mechanism of purified herbal extract of *Salvia miltiorrhiza* in hyperlipidemic rats", *J Ethnopharmacol*, 119(2), pp. 291-8.
10. Ji W., Gong B. Q. (2007), "Hypolipidemic effects and mechanisms of *Panax notoginseng* on lipid profile in hyperlipidemic rats", *J Ethnopharmacol*, 113(2), pp. 318-24.
11. Joo Il Woo, Ryu Jae Hwan, et al. (2010), "The influence of Sam-Chil-Geun (*Panax notoginseng*) on the serum lipid levels and inflammations of rats with hyperlipidemia induced by poloxamer-407", *Yonsei medical journal*, 51(4), pp. 504-510.
12. Leon C., Wasan KM., et al (2006), "Acute P-407 administration to mice causes hypercholesterolemia by inducing cholesterolgenesis and down-regulating low-density lipoprotein receptor expression", *Pharmaceutical research*, 23(7), pp. 1597-1607.
13. The State Pharmacopoeia Commission of P. R. China (2010), *Pharmacopoeia of the people's republic of China, volume I*, pp. 682-683, A-11, A-79.
14. Wu Jian-Hong, Leung George Pak-Heng, et al. (2013), "Suppression of diet-induced hypercholesterolaemia by saponins from *Panax notoginseng* in rats", *Journal of Functional Foods*, 5(3), pp. 1159-1169.