

HOẠT TÍNH BẢO VỆ GAN CỦA CHIẾT XUẤT ETHANOL QUẢ MAI DÂY (*Cassia rhombifolia* Roxb.) CHỐNG LẠI CARBON TETRACHLORIDE GÂY TỒN THƯƠNG GAN Ở CHUỘT

TRẦN THỊ PHƯƠNG NHUNG^{1*}, NGUYỄN NGỌC THUẦN¹, TRẦN BÍCH THỦY²

¹Viện Công nghệ sinh học và thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh

²Viện Khoa học Công nghệ và Quản lý Môi trường, Trường Đại học Công nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh

* Tác giả liên hệ: tranthiiphuongnhung@iuh.edu.vn

DOIS: <https://doi.org/10.46242/jstiuh.v70i4.4659>

Tóm tắt. Cây mai dây (*Cassia rhombifolia* Roxb.) là cây thân gỗ cỡ vừa, ưa nắng, sinh trưởng nhanh, chịu hạn tốt, phân bố rộng khắp Việt Nam từ đồng bằng đến miền núi. Từ lâu mai dây đã được dân gian Việt Nam sử dụng như là một loại thuốc để chữa táo bón, hạ sốt, phù nề, rối loạn tim mạch, viêm và tổn thương gan, dư thừa axit dạ dày, v.v. Trong nghiên cứu hiện tại, tác dụng bảo vệ gan của chiết xuất ethanol từ quả mai dây (*C. rhombifolia*, EtCR) đối với tổn thương gan do carbon tetrachloride gây ra đã được nghiên cứu ở chuột. Kết quả được so sánh với kết quả của silymarin, một loại thuốc bảo vệ gan tiêu chuẩn. Người ta nhận thấy rằng có sự gia tăng hoạt động của các transaminase huyết thanh, tăng mức độ các cytokine gây viêm, tăng hoạt tính của axit, phosphatase kiềm, hoạt tính enzyme chống oxy hóa ở gan của những con chuột bị tổn thương gan do CCl₄ (0,5 mL/kg; ip) gây ra. Điều trị bằng EtCR trong 8 tuần đã ngăn chặn những thay đổi trung gian này. Kiểm tra mô bệnh học cũng đã xác nhận thêm hoạt động bảo vệ gan của EtCR khi so sánh với chuột đối chứng ở nhóm CCl₄. Tóm lại, những kết quả này chỉ ra rằng chiết xuất ethanol của quả mai dây (*C. rhombifolia*) thể hiện tác dụng bảo vệ gan chống lại tổn thương gan do carbon tetrachloride gây ra ở chuột.

Từ khóa: *Cassia rhombifolia* Roxb., viêm gan, carbon tetrachloride

1. GIỚI THIỆU

Gan thực hiện các chức năng quan trọng như chuyển hóa lipid, tổng hợp protein, tiết enzyme sinh hóa và giải độc xenobamel. Tổn thương gan cấp tính và mãn tính thường do hóa chất độc hại, thuốc hoặc nhiễm trùng mầm bệnh gây ra [1]. Các loại thuốc tổng hợp để điều trị các bệnh về gan như interferon và corticosteroid rất đắt tiền và có thể gây ra phản ứng bất lợi (đau đầu, trầm cảm, tiêu chảy, táo bón, đau xương khớp, thiếu máu, nhiễm độc gan) cho bệnh nhân [2]. Carbon tetrachloride (CCl₄) được sử dụng rộng rãi để gây tổn thương gan cấp tính và mãn tính ở mô hình động vật. Tổn thương gan do CCl₄ gây ra được đặc trưng bởi tình trạng viêm, hình thành các gốc trichloromethyl và sản xuất quá mức các loại oxy phản ứng (ROS), tăng peroxy hóa lipid, tạo ra các gốc tự do, suy giảm tình trạng chống oxy hóa và cuối cùng dẫn đến nhiễm độc gan. Các hoạt động chống tế bào chết theo chương trình, chống oxy hóa và chống viêm rất quan trọng trong việc bảo vệ chống lại tổn thương gan do CCl₄ gây ra [1]. Trong quá trình tìm kiếm các loại thuốc đáng tin cậy và hiệu quả để phòng ngừa và điều trị các bệnh về gan, nhiều nhà nghiên cứu đã tập trung vào việc nghiên cứu các hợp chất bảo vệ gan từ các sản phẩm tự nhiên. Do đó, cây thuốc thường là một lựa chọn hiệu quả và tốt để phòng ngừa hoặc điều trị rối loạn chức năng gan. Các chiết xuất thảo mộc khác nhau có thể bảo vệ gan chống lại stress oxy hóa do CCl₄ gây ra bằng cách đảo ngược mức độ peroxy hóa lipid và tăng cường hoạt động của các enzym chống oxy hóa [3].

Mai dây (*C. rhombifolia*) thuộc họ Fabaceae là một loại cây thân gỗ, ưa nắng, lá hình lông chim gồm 8-12 cặp lá chét, hoa có màu vàng và những chùm dài rủ xuống. Vỏ quả hình trụ và xóp. Hạt màu nâu nhạt, cứng và bóng. Mai dây rất phổ biến và được biết đến rộng rãi nhờ các đặc tính chữa bệnh của nó. Theo truyền thống, loại cây này được sử dụng để điều trị chứng chảy máu cam, loét dạ dày, viêm ngứa, tiểu đường, nôn ra máu, rối loạn đường ruột, hạ sốt, giảm đau và nhuận tràng [4]. Quả, vỏ thân và lá của loài cây này chứa nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học như anthraquinon, flavonoid, dẫn xuất flavon-3-ol, alkaloid, glycosid, tanin, saponin, terpenoid, đường khử và các steroid có nhiều dược tính khác nhau. Chiết xuất vỏ quả và thân cây cho thấy các hoạt động như hạ sốt, chống viêm, chống oxy hóa, trị đái tháo đường, hạ lipid máu, bảo vệ gan, kháng khuẩn, chống ung thư và chống loét [5]. Quả được báo cáo là có khả năng kháng khuẩn, có tác dụng chống béo phì, bảo vệ gan, ... [4]. Tác dụng chống oxy hóa, chống khối u và kháng khuẩn của chiết xuất ethanol từ quả thuộc chi *Cassia* đã được báo cáo trong các nghiên cứu trước đây [6]. Nghiên cứu

hiện tại được thiết kế để điều tra tác động của chiết xuất ethanol quả *C. rhombifolia* đối với nhiễm độc gan do carbon tetrachloride (CCl_4) gây ra ở chuột.

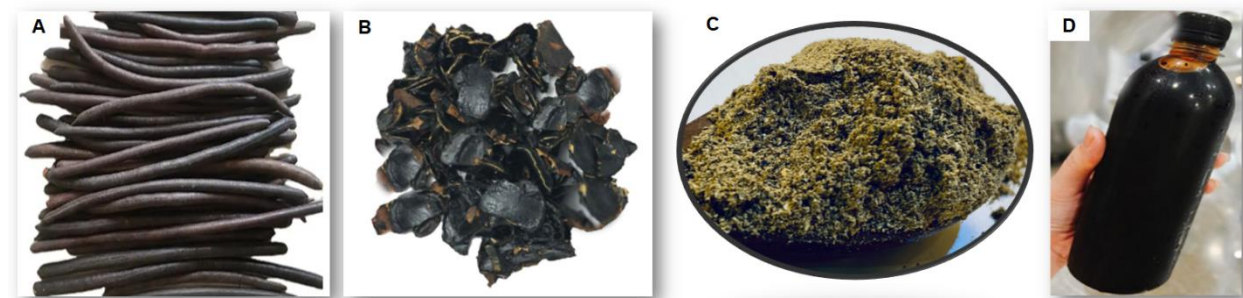
2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Thuốc thử, hóa chất và thiết bị

Carbon tetrachloride (CCl_4), dầu ô liu, silymarin, hematoxylin, eosin và các thuốc thử khác được cung cấp bởi Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Quả mai dây (*C. rhombifolia*) được thu nhận từ thành phố Pleiku, tỉnh Gia Lai. Bộ xử lý mô tự động (Autotechnique), microtom quay, kính hiển vi quang học (BX41, Olympus, Tokyo, Nhật Bản), máy phân tích huyết học tự động (Nihon Kohden MEK-9100, Nhật Bản), máy phân tích sinh hóa tự động (KENZA 240 TX/ISE, Pháp).

2.2. Chuẩn bị nguyên liệu và tạo chiết xuất EtCR

Quả mai dây (Hình 1A) được thu nhận ở phường Tân Sơn, thành phố Pleiku, tỉnh Gia Lai vào tháng 5 năm 2022. Mẫu vật đã được ký gửi tại phòng tiêu bản, Bộ môn Công nghệ Sinh học, Viện Công nghệ Sinh học – Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp, TP. HCM với mã số VST-CR170422 để tham khảo thêm. Toàn bộ quả mai dây được cắt nhỏ và sấy khô trong tủ sấy Memmert ở 60°C (Hình 1B). Sau đó quả khô được nghiền thành bột mịn (180/ 125) (Hình 1C) và được đưa qua rây để duy trì kích thước bộ đồng nhất. Chiết xuất ethanol quả *C. rhombifolia* được thực hiện bằng cách ngâm bột quả ba lần với ethanol 70% ở nhiệt độ phòng trong 3 ngày. Sau thời gian này, dịch lọc được thu nhận và được lọc qua giấy lọc Whatman No. 4. Dung dịch được làm bay hơi bằng thiết bị cô quay ở 40°C cho đến khi mức chất lỏng không thay đổi nữa. Dịch chiết (đặt tên là EtCR) (Hình 1D) được giữ ở 4°C cho đến khi sử dụng.



Hình 1. Chiết xuất ethanol từ quả mai dây (*C. rhombifolia*). A. Quả mai dây; B. Quả mai dây cắt nhỏ và phơi khô; C. Bột quả mai dây; D. Chiết xuất ethanol quả mai dây (EtCR)

2.3. Định tính thành phần hóa học của EtCR

Phân tích hóa thực vật được thực hiện đối với saponin, flavonoid, glycoside, carbohydrate, terpenoid, steroid, protein, tannin, alkaloid như mô tả của Rohit-Kumar và cộng sự (2017) [7]. Thử nghiệm định tính alkaloid (phép thử Mayer's): 1 mL dịch chiết + 1 mL KHgI . Kết quả xuất hiện màu vàng trắng hoặc màu kem, có mặt alkaloid. Thử nghiệm định tính glycoside (phép thử Legal's): 1 mL dịch chiết + Pyridine + $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$. Hỗn hợp không màu chứng tỏ glycoside vắng mặt. Thử nghiệm carbohydrate (phép thử Benedict's): 5mL thuốc thử Benedict + 1 mL dịch chiết, đun sôi 2 phút, để nguội, màu đỏ xuất hiện chứng tỏ sự có mặt carbohydrate. Thử nghiệm định tính steroid (phép thử Salkowski's): 1 mL dịch chiết + 1 mL CHCl_3 + thêm vào H_2SO_4 đặc. Xuất hiện màu đỏ hơi xanh đến đỏ anh đào trong CHCl_3 và phát huỳnh quang xanh lục trong axit chứng tỏ sự có mặt steroid. Thử nghiệm định tính protein (phép thử Biuret's): 1mL NaOH 40% + 2 giọt dung dịch CuSO_4 1% cho đến khi xuất hiện màu xanh + 1 mL dịch chiết. Xuất hiện màu hơi hồng hoặc hơi tím chứng tỏ có mặt protein. Thử nghiệm định tính saponin (phép thử Foam's): 2mL dịch chiết + 2 mL nước cất + natri cacbonat và lắc. Bột hình thành, có mặt saponin. Thử nghiệm định tính tannin: Dịch chiết + dung dịch chì axetat. Trắng kết tủa, có mặt tannin. Thử nghiệm định tính flavonoid (phép thử Shinoda's): 1 mL dịch chiết + magnesium + vài giọt HCl . Màu đỏ tươi xuất hiện chứng tỏ flavonoid có mặt trong dịch chiết. Thử nghiệm định tính terpenoid (phép thử salkowski's): 5 mL dịch chiết + 2 mL cloroform và 3 mL H_2SO_4 đậm đặc để tạo thành một lớp. Màu nâu đỏ được hình thành cho thấy sự hiện diện của terpenoid.

2.3. Động vật thí nghiệm

Chuột nhắt trắng trưởng thành nặng 30 - 35 g được thu mua từ Viện Pasteur, TP. HCM để sử dụng cho nghiên cứu này. Chuột được nuôi trong lồng nuôi động vật của Viện Công nghệ Sinh học – Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp, TP. HCM. Các con vật được nhốt trong lồng nuôi bằng kính, thể tích 54 cm³, chất lót chuồng bằng dăm gỗ được trộn với chế phẩm sinh học EM để khử mùi và được thay đổi 2 lần/tuần. Phòng nuôi động vật luôn được duy trì chế độ nuôi của phòng thí nghiệm tiêu chuẩn như nhiệt độ 30 ± 2°C, độ ẩm 55 – 60%, chu kỳ sáng tối (12/12h). Thời gian nuôi thích nghi kéo dài trong 7 ngày. Tất cả các động vật được cho ăn với chế độ ăn thức ăn viên tiêu chuẩn dành cho động vật gặm nhấm và uống nước được lọc sạch bằng công nghệ lọc nước RO trong suốt thời gian thử nghiệm. Việc điều trị động vật được thực hiện theo hướng dẫn của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) [8]. Quy trình thử nghiệm được tuân thủ nghiêm ngặt theo Tuyên bố Helsinki (2014) [9]. Tất cả động vật được con người chăm sóc theo quy định Pháp luật Việt Nam về sử dụng và chăm sóc động vật thí nghiệm và theo Bộ Y tế Việt Nam Hướng dẫn về đạo đức trong nghiên cứu y sinh [10]. Tất cả các phương pháp được thực hiện đều cố gắng giảm thiểu sự đau đớn của động vật.

2.5. Thử nghiệm độc tính cấp tính của EtCR

Hai mươi bốn con chuột (30 - 35 g) chia vào 4 nhóm (6 chuột/nhóm), 3 nhóm điều trị được cho uống EtCR với liều lượng 1000, 3000 và 5000 mg/kg, nhóm đối chứng uống nước muối sinh lí với liều 0,5 mL/ngày. Chuột được uống 1 liều duy nhất (liều đơn) và được quan sát trong 14 ngày. Những con chuột thí nghiệm được cung cấp và theo dõi hàng ngày về thức ăn và nước uống tiêu thụ. Các dấu hiệu nhiễm độc, tỷ lệ tử vong hoặc sự thay đổi về da, lông, mắt, màng nhày, di chuyển, nhịp hô hấp, tiết nước bọt, tiêu chảy, hung hăng, xù lông và quần quai được theo dõi thường xuyên và ghi chép đầy đủ.

2.6. Thiết kế thí nghiệm điều trị viêm gan do CCl₄ gây ra bởi EtCR

30 con chuột thí nghiệm được chia ngẫu nhiên thành 6 nhóm thí nghiệm (5 con chuột trong mỗi nhóm). Những con chuột trong nhóm đối chứng bình thường (Nhóm NC) và nhóm CCl₄ (Nhóm CCl₄) được cho uống nước cất. Silymarin đã được sử dụng như một biện pháp kiểm soát tích cực. Những con chuột trong nhóm silymarin (Nhóm CCl₄ + Silymarin) được cho uống silymarin (200 mg/kg trong CMC) và những con trong nhóm EtCR (Nhóm CCl₄ + EtCR₂₀₀, CCl₄ + EtCR₄₀₀ và CCl₄ + EtCR₆₀₀) được cho uống EtCR (200, 400 và 600 mg/kg, tương ứng) mỗi ngày, trong 8 tuần. Mỗi nhóm chuột, ngoại trừ NC, được tiêm CCl₄ trong màng bụng (0,5 mL/kg trong dầu ô liu) hai lần mỗi tuần trong phúc mạc (ip) trong 8 tuần [11]. Nồng độ của EtCR, silymarin, chiết xuất thảo dược và CCl₄ được xác định dựa trên các báo cáo trước đó [12, 13]. Những con chuột ở nhóm NC đã nhận được một lượng dầu ô liu (ip) tương đương dưới dạng giả dược.

Khối lượng cơ thể được đo hàng tuần trong suốt quá trình nghiên cứu. 72 giờ sau lần tiêm CCl₄ cuối cùng, máu đã được thu thập bằng phương pháp chọc dò tim, được bảo quản ở 4°C cho đến khi phân tích. Sau đó chuột được gây mê bằng hỗn hợp thuốc an thần xylazil - ketamil [14] và được giải phẫu, gan và thận đã được thu nhận. Các mẫu gan riêng biệt được đông lạnh nhanh trong nitơ lỏng và bảo quản ở -80°C hoặc cố định trong formol đậm trung tính 15% (pH 7,4) cho các phân tích tiếp theo.

2.7. Khối lượng cơ thể và khối lượng cơ quan tương đối

Trước khi đo khối lượng cơ thể bằng cân điện tử (Sartorius Entris 3202i-1S, Đức), tất cả chuột được nhịn ăn trong 12 giờ để giảm thiểu sự khác biệt khi cho ăn. Khối lượng cơ thể của chuột được đo 7 ngày một lần. Mức tăng khối lượng cơ thể được tính từ sự khác biệt về cân nặng giữa ngày thứ 7 (mỗi tuần) và ngày thứ 0. Phần trăm tăng khối lượng cơ thể (WG) được tính theo công thức:

$$WG (\%) = \frac{\text{Khối lượng cơ thể vào cuối mỗi tuần (g)} - \text{Khối lượng cơ thể ban đầu (g)}}{\text{Khối lượng cơ thể ban đầu (g)}} \times 100 \quad [15]$$

Vào ngày cuối cùng của giai đoạn thí nghiệm, những con chuột được gây mê bằng hỗn hợp thuốc an thần xylazil - ketamil [14] và được phẫu thuật, gan và thận đã được thu nhận và được cân bằng cân điện tử. Khối lượng gan tương đối được tính bằng tỷ lệ khối lượng gan so với khối lượng cơ thể vào ngày cuối giai đoạn thí nghiệm. Khối lượng tương đối của cơ quan nội tạng được tính theo công thức:

$$\text{Khối lượng cơ quan tương đối (\%)} = \frac{\text{khối lượng nội tạng tuyệt đối (g)}}{\text{khối lượng cơ thể vào ngày phẫu thuật (g)}} \times 100 \quad [16]$$

2.8. Xét nghiệm huyết học và sinh hóa

Máu được thu nhận bằng phương pháp chọc dò tim và đựng trong ống tráng K₂EDTA hoặc ống không chứa chất chống đông máu, được bảo quản lạnh ở 4°C. Các thông số huyết học như hồng cầu (RBC), hemoglobin (HGB), hematocrit (HCT), bạch cầu (WBCs) được phân tích bằng máy phân tích huyết học tự động (Nihon Kohden MEK - 6510K, Nhật Bản). Máu từ ống không chứa chất chống đông được ly tâm ở 3.200 vòng/phút, trong 20 phút ở nhiệt độ phòng để thu nhận huyết thanh. Các thông số sinh hóa như aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), phosphatase kiềm (ALP) và mức bilirubin tổng số (TB) được đo bằng máy phân tích sinh hóa tự động (Dri-Chem NX500i; Fuji Medical System, Tokyo, Nhật Bản).

2.9. Hoạt tính enzym chống oxy hóa

Chuẩn bị lysate hồng cầu: Các tế bào được thu nhận sau khi tách huyết thanh, được rửa bằng nước muối sinh lý 3 lần và ly giải bằng dung dịch đệm phosphat nhược trương, pH 7,4. Chất tan máu được tách ra bằng cách ly tâm ở tốc độ 2500 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C và được sử dụng để xét nghiệm các hoạt tính của hồng cầu superoxide dismutase (SOD) và catalase (CAT).

Superoxide dismutase (SOD): Phương pháp này được Tukappa và cộng sự (2015) mô tả rõ ràng [17] g. SOD được ước tính trong lysate hồng cầu được điều chế từ huyền phù hồng cầu 5%. 75 mM dung dịch đệm Tris-HCl (pH 8.2), 30 mM EDTA và 2 mM pyrogallol được thêm vào 50 µL dịch ly giải. Sự gia tăng độ hấp thụ được ghi lại ở bước sóng 420 nm trong 3 phút bằng máy đo quang phổ. Hoạt tính của SOD được biểu thị bằng đơn vị/mg protein.

Catalase (CAT): Hoạt tính của catalase có thể được xác định trong dịch ly giải hồng cầu bằng phương pháp của Tukappa và cộng sự (2015) [17]. Năm mươi micro lít dịch ly giải được thêm vào cuvet chứa 2 mL dung dịch đệm phot phát (pH 7,0) và 1 mL H₂O₂. Hoạt tính catalase được đo ở bước sóng 240nm trong 1 phút bằng máy đo quang phổ. Hệ số mol của H₂O₂ (43,6 M) được sử dụng để xác định hoạt độ catalase. Một đơn vị hoạt động tương đương với 1 mmol H₂O₂ bị phân hủy mỗi phút và được biểu thị bằng đơn vị trên miligam protein.

Malondialdehyde (MDA): Mức độ MDA trong huyết thanh được thực hiện theo phương pháp Esmael và cộng sự (2017) [3]. Theo phương pháp này, 375 mg TBA được hòa tan trong 2 mL axit clohydric (HCl, 0,25 N), tiếp theo là 15 g axit trichloroacetic (TCA) cho tổng thể tích là 100 mL. Dung dịch được đun nóng trong bể nước ở 50°C cho đến khi TBA được hòa tan hoàn toàn. Sau đó, 0,5 mL huyết thanh được trộn với 2 mL TCA-TBA-HCl. Tiếp theo, dung dịch được đun nóng trong 15 phút trong nồi cách thủy đang sôi. Sau khi làm mát, kết tủa keo tụ được loại bỏ bằng cách ly tâm (2500 vòng/phút, trong 15 phút). Cuối cùng, sự hấp thụ của phần nổi phía trên được xác định ở bước sóng 535nm so với mẫu trắng chứa tất cả các thuốc thử ngoại trừ mẫu huyết thanh. Nồng độ MDA huyết thanh được biểu thị bằng nmol/mL

2.10. Cytokine gây viêm

TNF- α , IL-1 β và IL-6 được đo bằng bộ dụng cụ ELISA theo phương pháp của Yung-Jia và cộng sự (2018) [18]. Các kháng thể TNF- α , IL-1 β và IL-6 đã được thả vào từng giếng của đĩa 96 giếng và ủ qua đêm. Ngày tiếp theo, một bộ kháng thể khác được đánh dấu bằng biotin được ủ với mẫu mô hoặc kháng nguyên tiêu chuẩn trên đĩa trước khi thêm streptavidin-HRP. TNF- α , IL-1 β và IL-6 được đo ở bước sóng 450 nm để xác định lượng của chúng. Lượng TNF- α , IL-1 β và IL-6 được biểu thị dưới dạng protein pg/mg.

2.11. Xét nghiệm mô bệnh học tổn thương gan

Để kiểm tra mô học, các mô gan đã được lấy ra từ một phần của thùy trái và cố định trong 10% formalin. Sau khi được xử lý bằng các quy trình mô học thông thường, các mẫu được cắt thành các lát 5 µm. Các phần được nhuộm bằng hematoxylin trong 5 phút ở 40°C và dung dịch eosin trong 1 phút ở nhiệt độ phòng, sau đó các tiêu bản được quan sát để đánh giá hình thái thông thường dưới kính hiển vi ánh sáng (BX41; Olympus, Tokyo, Nhật Bản) và hình ảnh được chụp ở độ phóng đại 200 [19].

2.12. Phân tích thống kê

Tất cả các phân tích thống kê được thực hiện bằng phần mềm Statgraphics Centurion XIX. Phân tích phương sai một chiều được sử dụng để xác định sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm. Phương pháp Student-

Newman-Keuls đã được áp dụng để so sánh giữa các nhóm. Các giá trị được biểu thị bằng giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn, $p < 0,05$ được coi là chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

3. KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN

3.1. Định tính thành phần hóa học của EtCR

Sàng lọc hóa chất thực vật của chiết xuất ethanol quả mai dây (*C. rhombifolia*) cho thấy sự hiện diện của một số chất chuyển hóa thứ cấp như saponin, flavonoid, glycoside, carbohydrate, terpenoid, steroid, protein, tanin, alkaloid và polyphenol. Các hợp chất hóa học thực vật được phát hiện trong EtCR được biết là có tầm quan trọng về mặt y học. Ví dụ, alkaloid đã được báo cáo là có nguồn gốc từ cây thuốc cho thấy các hoạt động sinh học như chống viêm, kháng khuẩn, chống co thắt. Tương tự như vậy, các steroid có nguồn gốc từ thực vật có tác dụng hỗ trợ tim, kháng khuẩn, nhờ vào những hoạt tính sinh học đặc trưng, steroid thường được sử dụng trong lĩnh vực y học. Tannin có tác dụng kháng khuẩn, kháng vi rút, chúng hoạt động bằng cách kết tủa protein của vi sinh vật, từ đó làm cho protein dinh dưỡng không thể sử dụng được cho vi sinh vật. Các hợp chất polyphenol nói trên có thể làm giảm tổn thương gan do stress oxy hóa gây ra. Các hợp chất như flavonoid, glycoside, alkaloid cũng có thể cùng nhau góp phần bảo vệ gan chống lại tổn thương gan cấp tính do CCl_4 gây ra [12].

3.2. Thử nghiệm độc tính cấp tính của EtCR

Việc sử dụng chiết xuất ethanol quả mai dây (*C. rhombifolia*) ở chuột không cho thấy tỷ lệ tử vong ở các mức liều cố định 1000, 3000 và 5000 mg/kg. Hơn nữa, không có dấu hiệu rõ ràng về độc tính cấp tính, tức là lượng thức ăn và nước uống không bị ảnh hưởng, không có sự thay đổi về da, lông, mắt, màng nhầy, di chuyển, nhịp hô hấp, tiết nước bọt, không bị tiêu chảy, hung hăng, xù lông và quần quai trong 14 ngày. Do đó, chúng tôi kết luận rằng EtCR không gây độc cấp tính cho chuột ở các mức liều thử nghiệm.



Hình 2. Thử nghiệm độc tính cấp tính của EtCR.

A. Chuột nhóm NC; B. Chuột nhóm EtCR₃₀₀₀; C. Chuột nhóm EtCR₅₀₀₀

3.3. Khối lượng cơ thể và khối lượng cơ quan

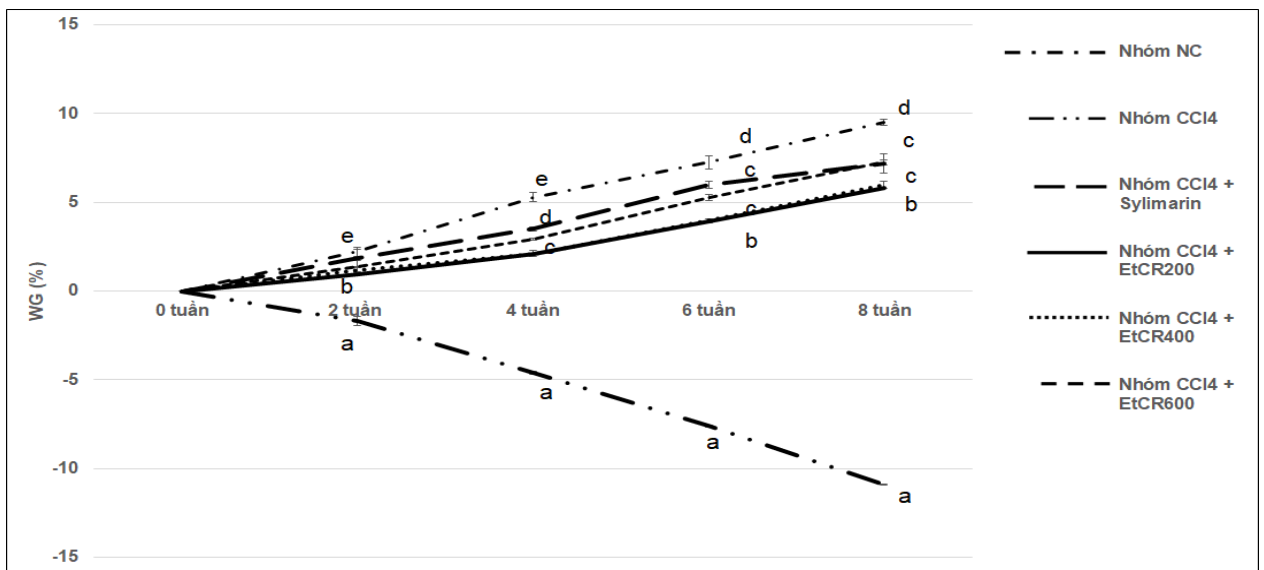
Theo dõi sự thay đổi khối lượng cơ thể mỗi tuần trong 8 tuần. Vào ngày 0, khối lượng cơ thể của nhóm NC là $31,13 \pm 0,06$ g và không có sự khác biệt giữa các nhóm thử nghiệm (nhóm CCl_4 là $31,28 \pm 0,06$ g, nhóm $CCl_4 + EtCR_{600}$ là $30,95 \pm 0,08$ g) ($p > 0,05$). Trong suốt quá trình thí nghiệm (từ tuần 1 đến tuần 8), việc tiếp xúc với CCl_4 làm giảm đáng kể khối lượng cơ thể so với nhóm đối chứng ($p < 0,05$) (Bảng 1). Không chỉ khối lượng cơ thể tuyệt đối mà cả mức tăng khối lượng cơ thể cũng được biến động theo xu hướng tương tự (Hình 3), mức tăng khối lượng cơ thể giảm đáng kể ở các nhóm tiếp xúc với CCl_4 (nhóm CCl_4 chỉ số WG tuần 2 là -1.68% và tuần 8 là -10.9%) so với đối chứng (nhóm NC chỉ số WG tuần 1 là 2.22% và tuần 8 là 9.51%) ($p < 0,05$). Việc tiêm CCl_4 đã làm giảm đáng kể mức tăng khối lượng cơ thể ($p < 0,05$), điều này hoàn toàn phù hợp với các báo cáo trước đây rằng CCl_4 đã gây chán ăn cho chuột [19]. Tuy nhiên, EtCR (200 - 600 mg/kg) ức chế đáng kể quá trình giảm mức tăng khối lượng cơ thể qua trung gian CCl_4 ($p < 0,05$). Khối lượng cơ thể ở nhóm $CCl_4 + EtCR_{(200-600)}$ cao hơn đáng kể so với nhóm CCl_4 trong 8 tuần điều trị ($p < 0,05$). Những dữ liệu này cho thấy việc sử dụng EtCR trong 8 tuần không ảnh hưởng đáng kể đến sự thay đổi khối lượng cơ thể, EtCR có thể chống lại việc giảm khối lượng cơ thể do CCl_4 gây ra. Những thay đổi về khối lượng cơ thể của chuột được đo lường như một trong những thông số để đánh giá quá trình bệnh vì giảm cân cho thấy bệnh đang hoạt động, trong khi tăng cân là dấu hiệu của sự phục hồi [19]. Mức tăng cân thấp được quan sát thấy ở tất cả các nhóm được tiếp xúc với CCl_4 so với nhóm đối chứng phù hợp với thực tế là CCl_4 gây chán ăn cho động vật và là kết quả của quá trình chuyển hóa quá

mức do cytokine điều khiển [19]. Các phương pháp điều trị bằng EtCR hoặc silymarin dường như giảm thiểu sự mất khối lượng cơ thể. Krithika và cộng sự (2019) cũng báo cáo tương tự với kết quả của nghiên cứu hiện tại về sự sụt giảm đáng kể khối lượng cơ thể của chuột đực cho uống CCl₄, điều này đã được giảm thiểu đáng kể khi điều trị bằng chiết xuất *S. nigrum* [19].

Bảng 1. Hiệu quả điều trị của EtCR đối với khối lượng cơ thể của chuột

Thời gian thí nghiệm	Khối lượng cơ thể (g)					
	Nhóm NC	Nhóm CCl ₄	Nhóm CCl ₄ + Silymarin	Nhóm CCl ₄ + EtCR ₂₀₀	Nhóm CCl ₄ + EtCR ₄₀₀	Nhóm CCl ₄ + EtCR ₆₀₀
0 tuần	31.13 ± 0.06 ^d	31.28 ± 0.06 ^e	30.85 ± 0.08 ^a	31.04 ± 0.07 ^{cd}	31.08 ± 0.04 ^c	30.95 ± 0.08 ^b
2 tuần	31.82 ± 0.07 ^d	30.76 ± 0.05 ^a	31.46 ± 0.08 ^c	31.33 ± 0.06 ^b	31.45 ± 0.04 ^c	31.34 ± 0.06 ^b
4 tuần	32.77 ± 0.08 ^d	28.85 ± 0.07 ^a	31.93 ± 0.06 ^c	31.68 ± 0.06 ^b	31.74 ± 0.04 ^b	31.85 ± 0.07 ^c
6 tuần	33.59 ± 0.09 ^e	28.91 ± 0.05 ^a	32.69 ± 0.07 ^d	32.26 ± 0.05 ^b	32.31 ± 0.06 ^b	32.58 ± 0.06 ^c
8 tuần	34.09 ± 0.05 ^e	27.88 ± 0.06 ^a	33.26 ± 0.06 ^d	32.85 ± 0.05 ^b	32.94 ± 0.09 ^c	33.19 ± 0.06 ^d

Các giá trị được biểu thị bằng Mean ± SD (n = 5), các chữ cái a, b, c, d, e biểu thị sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm



Hình 3. Hiệu quả điều trị của EtCR đối với mức tăng khối lượng cơ thể của chuột.

Để kiểm tra tác động của EtCR và phơi nhiễm mãn tính với CCl₄ đối với khối lượng cơ quan, chúng tôi đã đo khối lượng tuyệt đối của gan và thận. Tỷ lệ khối lượng gan/khối lượng cơ thể cao hơn đáng kể ($p < 0,05$) ở những con chuột được tiêm CCl₄ so với chuột ở nhóm đối chứng (Bảng 2). Ngược lại, điều trị bởi EtCR đã làm giảm tỷ lệ khối lượng gan/khối lượng cơ thể do ($p < 0,05$). Trong khi đó, tỷ lệ khối lượng thận/khối lượng cơ thể của các nhóm được điều trị bởi EtCR và silymarin không khác biệt đáng kể ($p > 0,05$) so với nhóm đối chứng (Bảng 2). Những dữ liệu này chỉ ra rằng EtCR ngăn chặn CCl₄ gây ra giảm khối lượng cơ thể và tăng khối lượng gan tương đối. Nhận máu trực tiếp từ hệ thống tiêu hóa, gan là con đường giao nhau mà phần lớn các kháng nguyên xâm nhập vào cơ thể. Do đó, môi trường của gan phải đảm bảo sự cân bằng giữa việc tạo ra khả năng chịu đựng bản thân với sự xâm nhập các phân tử và vi sinh vật, đồng thời tạo ra phản ứng miễn dịch thích hợp với mầm bệnh. Cơ chế duy trì hiệu quả sự cân bằng này là rất quan trọng [19]. Chỉ số gan (khối lượng gan tương đối so với khối lượng cơ thể) là cơ sở để chẩn đoán tổn thương gan. Các kết quả được trình bày trong bảng 2 cho thấy khối lượng gan và khối lượng gan tương đối ở chuột được điều trị bằng CCl₄ cao hơn đáng kể ($p < 0,05$) so với đối chứng. Duta và cộng sự (2018) [19] đã cho thấy

rằng sự gia tăng khối lượng gan có thể là do sự hình thành các loại oxy phản ứng (ROS) dẫn đến tổn thương gan và viêm gan. Việc sử dụng EtCR dường như làm tăng tỷ lệ khối lượng gan. Elmasry và cộng sự (2021) [1] cũng báo cáo kết quả tương tự khi chứng minh tác dụng của chiết xuất dâu tằm và dâu đen đối với tổn thương gan do carbon tetrachloride gây ra ở chuột.

Bảng 2. Hiệu quả điều trị của EtCR đối với khối lượng gan và thận của chuột

Nhóm thí nghiệm	Khối lượng của gan		Khối lượng của thận	
	Khối lượng tuyệt đối (g)	Khối lượng tương đối (%)	Khối lượng tuyệt đối (g)	Khối lượng tương đối (%)
Nhóm NC	1.19 ± 0.04 ^a	3.49 ± 0.11 ^a	0.24 ± 0.03 ^a	0.71 ± 0.07 ^a
Nhóm CCl ₄	1.46 ± 0.04 ^e	5.23 ± 0.13 ^e	0.29 ± 0.04 ^a	0.77 ± 0.05 ^a
Nhóm CCl ₄ + Sylimarin	1.25 ± 0.05 ^{ab}	3.75 ± 0.15 ^b	0.24 ± 0.05 ^a	0.73 ± 0.06 ^a
Nhóm CCl ₄ + EtCR ₂₀₀	1.36 ± 0.04 ^{de}	4.13 ± 0.11 ^d	0.25 ± 0.05 ^a	0.74 ± 0.03 ^a
Nhóm CCl ₄ + EtCR ₄₀₀	1.34 ± 0.06 ^{cd}	4.06 ± 0.18 ^{cd}	0.25 ± 0.06 ^a	0.74 ± 0.08 ^a
Nhóm CCl ₄ + EtCR ₆₀₀	1.28 ± 0.04 ^{bc}	3.89 ± 0.18 ^{bc}	0.24 ± 0.06 ^a	0.72 ± 0.09 ^a

Các giá trị được biểu thị bằng Mean ± SD (n = 5), các chữ cái a, b, c, d, e biểu thị sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm

3.4. Huyết học và sinh hóa

Bảng 3. Hiệu quả điều trị của EtCR đối với các thông số huyết học và sinh hóa của chuột

Thông số	Nhóm NC	Nhóm CCl ₄	Nhóm CCl ₄ + Sylimarin	Nhóm CCl ₄ + EtCR ₂₀₀	Nhóm CCl ₄ + EtCR ₄₀₀	Nhóm CCl ₄ + EtCR ₆₀₀
RBC (x10 ⁶ tb/mm ³)	7.47 ± 0.06 ^f	4.47 ± 0.07 ^a	6.27 ± 0.04 ^e	5.14 ± 0.04 ^b	5.44 ± 0.05 ^c	5.96 ± 0.06 ^d
HGB (g/dL)	13.38 ± 0.07 ^f	8.01 ± 0.08 ^a	11.24 ± 0.04 ^e	9.23 ± 0.06 ^b	9.77 ± 0.06 ^c	10.71 ± 0.07 ^d
HCT (%)	38.72 ± 0.05 ^f	23.19 ± 0.06 ^a	33.67 ± 0.04 ^e	26.71 ± 0.05 ^b	28.26 ± 0.04 ^c	30.98 ± 0.06 ^d
WBC (x10 ³ tb/mm ³)	3.79 ± 0.05 ^a	10.49 ± 0.05 ^f	4.31 ± 0.07 ^b	6.07 ± 0.05 ^e	5.53 ± 0.05 ^d	4.79 ± 0.05 ^c
AST (U/L)	17.69 ± 0.07 ^a	71.58 ± 0.07 ^f	28.54 ± 0.06 ^b	58.36 ± 0.04 ^e	47.78 ± 0.04 ^d	31.66 ± 0.04 ^c
ALT (U/L)	18.26 ± 0.04 ^a	69.83 ± 0.06 ^f	27.27 ± 0.04 ^b	56.56 ± 0.04 ^e	45.69 ± 0.05 ^d	30.13 ± 0.05 ^c
ALP (U/L)	129.41 ± 0.09 ^a	496.15 ± 0.06 ^f	196.54 ± 0.04 ^b	37413 ± 0.05 ^e	322.27 ± 0.03 ^d	215.11 ± 0.06 ^c
Bilirubin tổng (μmol/L)	0.31 ± 0.06 ^a	1.19 ± 0.06 ^e	0.46 ± 0.04 ^b	0.96 ± 0.04 ^d	0.77 ± 0.04 ^c	0.51 ± 0.07 ^b

Các giá trị được biểu thị bằng Mean ± SD (n = 5), các chữ cái a, b, c, d, e, f biểu thị sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm. Ghi chú: RBC (Hồng cầu), HGB (Hemoglobin), HCT (Hematocrit), WBC (Bạch cầu), AST (Aspartate aminotransferase), ALT (Alanine aminotransferase), ALP (Alkaline phosphatase).

Bảng 3 cho thấy, sau khi nhiễm độc cấp tính bởi CCl₄, tổng số lượng RBC, HGB và HCT gần như đều giảm xuống ở nhóm CCl₄ (p < 0,05), ngược lại, lượng WBC tăng cao ở nhóm được xử lý bởi CCl₄ (p < 0,05) so với nhóm NC sau 8 tuần điều trị. Các kết quả đã cho thấy CCl₄ làm thay đổi đáng kể số lượng tế bào RBC, HGB, HCT và WBC trong độc tính gan do CCl₄ gây ra ở chuột. Tiền xử lý với các liều lượng khác nhau của chiết xuất ethanol quả mai dây đã làm giảm tác dụng độc hại của CCl₄, đưa số lượng RBC, HGB, HCT và WBC về mức gần mức bình thường. Như vậy, tiền xử lý với EtCR đã đảo ngược thành công

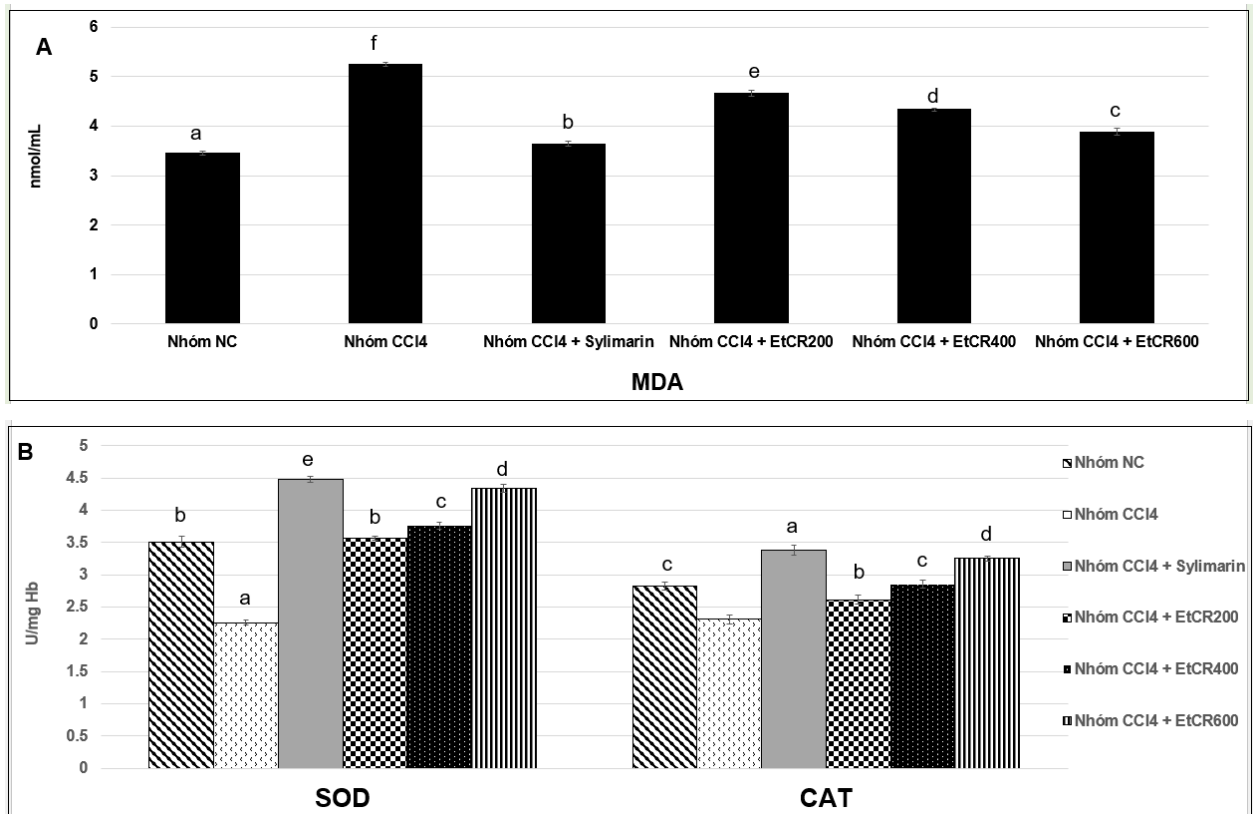
ảnh hưởng của ngộ độc CCl_4 vào tuần thứ 8. Độ tính tế bào gan được đặc trưng bởi sự gia tăng ALT và AST, cả hai loại enzyme này đều tham gia vào quá trình chuyển các nhóm amin của aspartate và alanine thành axit ketoglutaric [19]. Như thể hiện trong bảng 3, mức ALT, AST, ALP và Bilirubin tổng ở chuột bình thường (nhóm NC) và nhóm xử lý CCl_4 khác nhau đáng kể ($p < 0,05$), có sự gia tăng đáng kể về chỉ số gan (AST, ALT, ALP và Bilirubin tổng) của những con chuột được điều trị bằng CCl_4 ($p < 0,05$). Tuy nhiên, kết quả của những thông số này đã giảm đáng kể ở các nhóm $\text{CCl}_4 + \text{EtCR}_{200-600}$, thấp hơn đáng kể so với nhóm CCl_4 ($p < 0,05$). Những kết quả này chỉ ra rằng chiết xuất EtCR làm giảm sự gia tăng nồng độ ALT, AST, ALP và Bilirubin tổng trong huyết tương của chuột bị nhiễm độc bởi CCl_4 gây ra.

Giảm hồng cầu trong máu thường liên quan đến sự phát triển của suy dinh dưỡng và thiếu máu. Mức HGB thấp có thể là do mất máu và mức HCT thấp thường là do thiếu máu [25]. Cả hàm lượng HGB và RBC đều giảm trong nhóm CCl_4 , điều này cho thấy tình trạng thiếu máu ở chuột, thiếu máu có thể liên quan đến nồng độ sắt trong huyết tương thấp. Sự tăng lên về số lượng WBC trong nhóm được xử lý bởi CCl_4 cảnh báo tình trạng viêm nhiễm, tích tụ và ảnh hưởng đến quá trình lưu thông máu, khiến quá trình sản xuất ra những tế bào máu khỏe mạnh bị cản trở. ALT và AST là các chỉ số ưu tiên để đánh giá tổn thương gan. Trong quá trình tổn thương gan, các enzym này xâm nhập vào máu dẫn đến tăng nồng độ ALT và AST trong huyết thanh. Nồng độ ALT và AST huyết thanh có mối tương quan thuận với mô bệnh học gan [26]. EtCR làm giảm đáng kể nồng độ RBC, HGB, HCT trong máu và ALT và AST trong huyết thanh ở chuột được điều trị bằng EtCR. Kết hợp lại với nhau, dữ liệu đã chứng minh rằng việc sử dụng chiết xuất ethanol quả mai dây đã cải thiện độc tính tế bào gan do CCl_4 gây ra. Hơn nữa, Rahman và cộng sự (2022) [27] cũng báo cáo rằng thành phần chính của chiết xuất *C. tuberculata* có thể đảo ngược sự gia tăng các thông số WBC, ALT, AST trong mô hình tổn thương gan cấp tính do CCl_4 gây ra.

3.5. Hoạt tính enzym chống oxy hóa

Cơ thể có một hệ thống chống oxy hóa hiệu quả chống lại các gốc tự do và tổn thương do ROS gây ra, trong đó các chất chống oxy hóa enzyme và phi enzyme nội sinh như SOD, CAT và MDA đóng vai trò quan trọng. Các enzym chống oxy hóa SOD và CAT tạo thành một nhóm bảo vệ hỗ trợ lẫn nhau chống lại ROS. Mức MDA tăng cao cho thấy sự hình thành quá mức các gốc tự do và kích hoạt hệ thống peroxy hóa lipid dẫn đến tổn thương gan. MDA được sản xuất như sản phẩm phụ của quá trình peroxy hóa lipid xảy ra trong lõi kỵ nước của màng sinh học [17]. Trong nghiên cứu hiện tại, các kết quả trong Hình 4 đã chứng minh rằng nhiễm độc CCl_4 đã gây ra sự xáo trộn trong hệ thống phòng thủ chống oxy hóa và căng thẳng oxy hóa thể hiện rõ qua việc giảm đáng kể hoạt động của enzyme chống oxy hóa SOD và CAT cùng với sự gia tăng MDA. Các giá trị SOD và CAT được tìm thấy là $2,26 \pm 0,04$ và $2,31 \pm 0,07$ U/mg Hb ở nhóm xử lý bởi CCl_4 khác biệt đáng kể so với nhóm đối chứng lần lượt là $3,51 \pm 0,08$ và $2,82 \pm 0,06$ U/mg Hb ($p < 0,05$) (Hình 4B). Nồng độ MDA tăng cao ở nhóm điều trị bằng CCl_4 là $5,24 \pm 0,04$ nmol/mL so với nhóm đối chứng là $3,46 \pm 0,04$ nmol/mL ($p < 0,05$) (Hình 4A), cho thấy sự hình thành quá mức các gốc tự do và kích hoạt hệ thống peroxy hóa lipid dẫn đến tổn thương gan. Tiền xử lý bởi EtCR ở liều 200, 400 và 600 mg/kg và silymarin ở liều 200 mg/kg làm tăng đáng kể SOD với $3,57 \pm 0,03$; $3,76 \pm 0,05$; $4,34 \pm 0,06$ và $4,48 \pm 0,05$ U/mg Hb và CAT lần lượt là $2,61 \pm 0,07$; $2,85 \pm 0,06$; $3,25 \pm 0,04$ và $3,38 \pm 0,08$ U/mg Hb. Có sự suy giảm đáng kể về nồng độ MDA ở những con chuột được xử lý bởi EtCR₂₀₀₋₆₀₀ và silymarin với $4,66 \pm 0,06$; $4,34 \pm 0,03$; $3,88 \pm 0,07$ và $3,64 \pm 0,05$ nmol/mL tương ứng, biểu thị tác dụng chống oxy hóa lipid của EtCR. Kết quả trên cho thấy EtCR có đặc tính chống oxy hóa mạnh đối với tổn thương gan do hóa chất. Để đối phó với stress oxy hóa, các hệ thống sinh học tự bảo vệ mình bằng các chất chống oxy hóa nội sinh như catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) và malondialdehyde (MDA). Những chất chống oxy hóa này có vai trò quan trọng trong việc giải độc các gốc tự do và ROS dẫn đến việc tiếp xúc với các hóa chất độc hại và xenobamel khác nhau [28]. SOD, enzyme chống oxy hóa nội sinh, xúc tác quá trình phân hủy gốc superoxide thành oxy phân tử và hydro peroxide. CAT, một enzyme chống oxy hóa quan trọng để bảo vệ tế bào khỏi tổn thương oxy hóa do ROS gây ra, xúc tác phản ứng của hydro peroxide với nước và oxy phân tử. Các enzym chống oxy hóa dễ dàng bị bất hoạt bởi peroxid lipid hoặc các loại oxy phản ứng và sự suy giảm của các enzym chống oxy hóa này trong tế bào gây ra sự thất bại trong việc bảo vệ và dẫn đến tổn thương gan [29]. Trong nghiên cứu hiện tại, sự suy giảm đáng kể mức CAT trong nhóm CCl_4 và sự gia tăng đáng kể hoạt động của CAT trong nhóm chữa bệnh sau khi sử dụng EtCR cũng đã được chứng minh. Việc áp dụng chiết xuất ethanol quả mai dây đã làm tăng hoạt động của CAT trong mô gan về mức bình thường trong các nhóm điều trị. Những kết quả này cho thấy rằng do nhiễm độc gan CCl_4 , các hoạt động SOD và

CAT chống oxy hóa nội sinh sẽ bị giảm trong trường hợp không được cung cấp chất tăng cường bên ngoài mặc dù gan có cơ chế tự phục hồi và chiết xuất quả mai dây đã làm suy yếu CCl₄, chất gây nhiễm độc gan.



Hình 4. Ảnh hưởng của EtCR đối với SOD, CAT, MDA đối với ở chuột bị tổn thương gan do CCl₄ gây ra. A. Các thông số MDA; B. Các thông số SOD, CAT

3.6. Cytokine gây viêm

Bảng 5. Hiệu quả điều trị của EtCR đối với các cytokine gây viêm ở chuột

Nhóm thí nghiệm	TNF- α (pg/mL)	IL-1 β (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
Nhóm NC	141.24 \pm 0.15 ^a	279.04 \pm 0.19 ^a	0.24 \pm 0.03 ^a
Nhóm CCl ₄	294.16 \pm 0.17 ^f	633.16 \pm 0.12 ^f	0.51 \pm 0.04 ^d
Nhóm CCl ₄ + Sylimarin	171.73 \pm 0.13 ^b	346.28 \pm 0.21 ^b	0.29 \pm 0.05 ^{ab}
Nhóm CCl ₄ + EtCR ₂₀₀	226.73 \pm 0.16 ^c	416.28 \pm 0.17 ^d	0.41 \pm 0.05 ^c
Nhóm CCl ₄ + EtCR ₄₀₀	219.37 \pm 0.18 ^d	432.02 \pm 0.14 ^e	0.39 \pm 0.06 ^c
Nhóm CCl ₄ + EtCR ₆₀₀	180.73 \pm 0.17 ^c	359.17 \pm 0.22 ^c	0.32 \pm 0.06 ^b

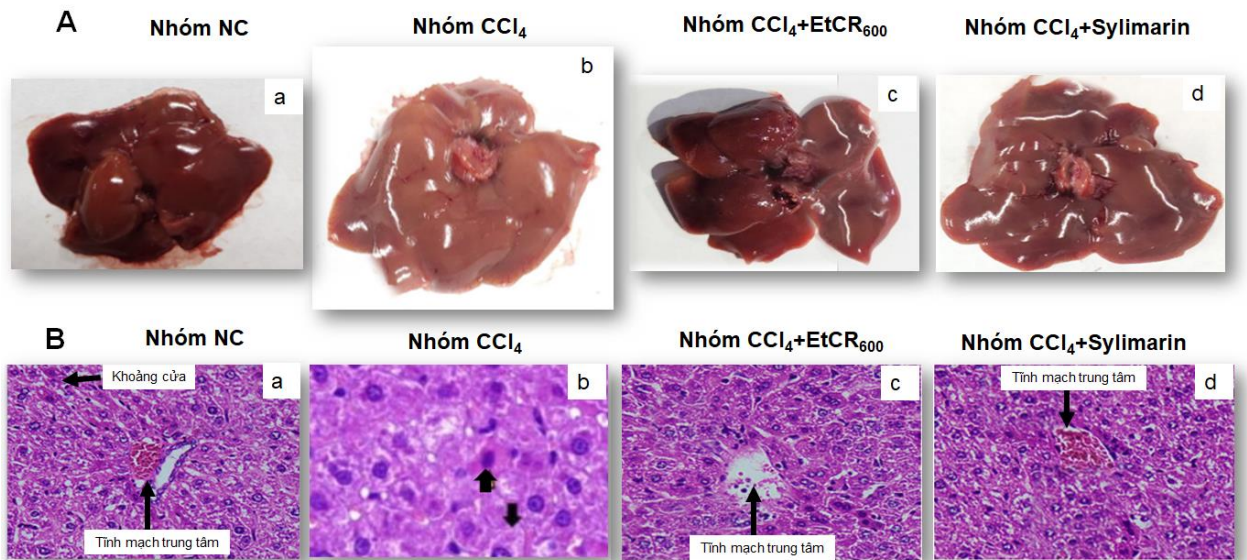
Các giá trị được biểu thị bằng Mean \pm SD (n = 5), các chữ cái a, b, c, d, e, f biểu thị sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm

Việc sản xuất quá mức các cytokine tiền viêm là một dấu hiệu đặc trưng của quá trình bệnh viêm gan. Mức độ của các cytokine tiền viêm TNF- α , IL-1 β và IL-6 đã được tăng cường ở chuột do CCl₄ gây ra [25]. CCl₄ đã làm tăng đáng kể mức độ của TNF- α , IL-1 β và IL-6 (p < 0,05) so với nhóm đối chứng (nhóm NC) (Bảng 4). Sử dụng ba liều EtCR khác nhau đã ức chế đáng kể sự gia tăng nồng độ của các cytokine tiền viêm do CCl₄ gây ra (p < 0,05). Mức độ ức chế IL-6 của EtCR₆₀₀ gần tương đương với mức độ đạt được khi đáp ứng với silymarin. Kết quả hiện tại cho thấy EtCR làm giảm đáng kể sự xâm nhập qua trung gian CCl₄ của các tế bào viêm và sản xuất các cytokine tiền viêm.

Trong số các cytokine tiền viêm được tạo ra, TNF- α là độc nhất về khả năng cảm ứng nhanh và khả năng gây chết tế bào sau khi tiêm CCl₄. Sự gián đoạn có mục tiêu của thụ thể TNF- α sẽ làm giảm tổn thương gan và giảm hoạt động ALT do CCl₄ gây ra, điều đó chứng tỏ rằng TNF- α là cytokine quan trọng nhất đối với

sự tiến triển của CCl₄ gây tổn thương gan cấp tính qua trung gian [12]. Sự gắn kết tiếp theo của TNF- α với các thụ thể được biểu hiện bởi các tế bào viêm và các tế bào gan bị tổn thương sẽ kích hoạt các tăng tín hiệu đa dạng tiếp tục kích thích sản xuất các cytokine tiền viêm (IL-1 β và IL-6). Hơn nữa, sự giải phóng qua trung gian CCl₄ của các mẫu phân tử liên quan đến tổn thương từ các tế bào gan bị tổn thương sẽ kích hoạt chứng chết tế bào theo chương trình gây viêm nhiễm cao, thúc đẩy sự trưởng thành và bài tiết IL-1 β [30]. Tác dụng của EtCR đối với các cytokine tiền viêm đã được nghiên cứu. Kết quả cho thấy rằng tiền xử lý EtCR đã ức chế đáng kể quá trình sản xuất TNF- α , IL-1 β và IL-6 trong mô gan của chuột bị tổn thương gan do CCl₄ gây ra. Tương tự như vậy, COX-2 là một chất trung gian gây viêm thiết yếu đóng vai trò quan trọng trong quá trình viêm bệnh lý. Do tổn thương gan, các tế bào Kupffer được kích hoạt dẫn đến tăng biểu hiện COX-2, từ đó làm trầm trọng thêm tình trạng viêm gan. Tiền xử lý với EtCR đã điều chỉnh giảm mức độ COX-2 trong mô gan của chuột [31]. Song song với một báo cáo trước đó của Han và cộng sự (2017) [32] kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng cho thấy rằng EtCR đã phối hợp ngăn chặn sự gia tăng mức độ các cytokine tiền viêm (TNF- α , IL-1 β và IL-6) ($p < 0,05$). Chiết xuất EtCR đã làm giảm đáng kể mức độ của các cytokine gây viêm khi so sánh với nhóm đối chứng ($p < 0,05$). Các cuộc điều tra này chứng minh rằng EtCR có thể làm giảm tổn thương gan thông qua các hoạt động chống viêm của nó.

3.7. Phân tích mô bệnh gan



Hình 5. Tác dụng của EtCR, Silymarin đối với hình thái tổng thể và mô học gan ở chuột viêm gan do CCl₄ gây ra. A. Hình thái tổng thể gan; B. Mô học gan (nhuộm HE, x 200) (➔ Cấu trúc tế bào phì đại)

Tác dụng điều trị bệnh gan của EtCR đối với những thay đổi hình thái tổng thể và mô học của mô gan được thể hiện trong Hình 5. Gan của nhóm đối chứng (Hình 5Aa) và gan của các nhóm điều trị bởi EtCR (Hình 5Ac) và Silymarin (Hình 5Ad) có cấu trúc đều, màu đỏ sẫm, nhẵn bóng, hình thái tổng thể bình thường. Tuy nhiên gan của nhóm được xử lý bởi CCl₄ (Hình 5Ab) có các bờ không đều, gan to ra và thay đổi màu sắc (nâu nhạt), độ cứng (kết cấu cứng) và bề mặt khô. Kiểm tra mô bệnh học các phần gan của nhóm NC (Hình 5Ba) cho thấy cấu trúc tế bào đều đặn với các tế bào gan riêng biệt, khoảng trống hình sin và tĩnh mạch trung tâm. Các tế bào gan là các tế bào hình đa giác với tế bào chất được bảo quản tốt, có nhân nổi bật. Ở nhóm CCl₄ (Hình 5Bb), kiểm tra mô học cho thấy mất cấu trúc, viêm và tắc nghẽn với không bào trong tế bào chất, thay đổi chất béo, giãn xoang, hoại tử trung tâm tiêu thụ và hiển thị các bó collagen bao quanh tiêu thụ, dẫn đến xơ lớn, vách ngăn và cấu trúc mô bị biến dạng, xuất hiện tế bào phì đại. Ở nhóm các nhóm EtCR₂₀₀₋₆₀₀ (Hình 5Bc) động vật được điều trị bởi chiết xuất, các phần gan cho thấy viêm tế bào gan và hầu như không quan sát thấy thay đổi rõ rệt nào. Kiểm tra mô bệnh học cũng cho thấy khả năng phục hồi tốt của các mô gan bị hoại tử do CCl₄ gây ra bằng EtCR so với silymarin (Hình 5Bd). Kết quả nghiên cứu cho thấy các mô hình gần như bình thường với sự gia tăng nhu mô tế bào gan bình thường và giảm sự phát triển của vách xơ và thâm nhiễm tế bào lympho.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu hiện tại đã chứng minh rằng EtCR sở hữu tác dụng bảo vệ gan chống lại CCl₄ gây tổn thương gan ở chuột thông qua việc cải thiện hiệu quả phản ứng viêm và kích hoạt cơ chế chống oxy hóa. EtCR làm giảm mạnh mức độ của các cytokine gây viêm, AST, ALT và ALP trong huyết thanh chuột. Do đó, EtCR ức chế xuất huyết và hoại tử trong mô gan, làm giảm đáng kể tổn thương gan. Nghiên cứu này sẽ mang lại lợi ích cho việc phát triển và sử dụng quả mai dây (*C. rhombifolia*) như là một loại thảo dược mới, an toàn và hiệu quả trong điều trị tổn thương gan. Đồng thời, cung cấp bằng chứng đáng tin cậy cho các ứng dụng lâm sàng trong tương lai của EtCR vào y học truyền thống và hiện đại.

LỜI CẢM ƠN

Tác giả xin cảm ơn các đồng nghiệp và cộng sự từ Khoa Huyết học và Sinh hóa, Khoa Giải phẫu bệnh Bệnh viện 175 Tp.HCM và Viện Pasteur Tp.HCM, Phòng Thí nghiệm Công nghệ Động vật, Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp Tp. HCM đã hỗ trợ chúng tôi trong dự án này. Tác giả cũng gửi lời cảm ơn đến các chị Nguyễn Thu Viên, Mai Nguyễn Nguyên Thảo, Nguyễn Thị Hồng Trâm, Lê Chi Na đã tham gia, hỗ trợ, giúp dự án thành công

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. S. Elmasry, M. Moawad, "The hepatoprotective effect of gooseberry and black mulberry extracts against carbon tetrachloride-induced liver injury in rats", *The Journal of Basic and Applied Zoology*, 2021, 82(33), 1-11. <https://doi.org/10.1186/s41936-021-00224-z>
2. C. Yang, L. Li, Z. Ma, Y. Zhong, W. Pang, M. Xiong, S. Fang, Y. Li, "Hepatoprotective effect of methyl ferulic acid against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats", *Experimental and Therapeutic Medicine*, 15(3), 2228-2238, 2017. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.5678>
3. K. P. Esmaeel, A. Kyomarth, S. Heibatollah, S. Hossein, D. Fahemeh, D. Nazanin, A. R. Mahmoud, "Hepatoprotective effect of Stachys pilifera ethanol extract in carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats", *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 1389-1393, 2017. <https://doi.org/10.1080/13880209.2017.1302484>
4. P. Sarma, M. Borah, and S. Das, "Evaluation of the effect of ethanolic extract of fruit pulp of Cassia fistula Linn. on forced swimming induced chronic fatigue syndrome in mice", *Research in Pharmaceutical Sciences*, 10(3), 206–213, 2015.
5. A. Ali, "Cassia fistula Linn: A review of phytochemical and pharmacological studies", *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3, 2125-2130. DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.5(6).2125-30
6. S. Deshpande, S. Naik, "Evaluation of in vitro antimicrobial activity of extracts from Cassia obtusifolia L. and Senna sophera (L.) Roxb against pathogenic organisms", *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6(1), 083-085, 2016. DOI:10.7324/JAPS.2016.600114
7. B. Rohit-Kumar, K. Pradeep-Kumar, "Extractions, phytochemical screening and in-vitro antioxidant activity of Cassia fistula extracts", *International journal of research in pharmacy and chemistry*, 7(4), 518-524, 2017.
8. Organization, W.H., "General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine", *World Health Organization*, 2000.
9. S. A. Hurst, "Declaration of Helsinki and protection for vulnerable research participants", *Jama*, 311(12), 1252-1252, 2014. DOI: 10.1001/jama.2014.1272
10. Bộ Y tế, Việt Nam, "Hướng dẫn quốc gia về đạo đức trong nghiên cứu y sinh học", Hà Nội, 2013, tr. 173.
11. Y. Hiroki, N. Tsunemasa, F. Shiori, I. Yoshimi, N. Akito, Y. Masae, F. Hirohisa, N. Makoto, "Sasa veitchii extract protects against carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in mice", *Environmental Health and Preventive Medicine*, 23, 49, 2018. DOI: 10.1186/s12199-018-0739-7
12. C. Beom-Rak, C. Je, J. Su-Jin, K. Jae-Kwang, L. Dae-Geon, K. Sae-Kwang, P. Ki-Moon, "Lemon Balm and Dandelion Leaf Extracts Synergistically Protect against Carbon Tetrachloride-Induced Acute Liver Injury in Mice", *Applied Sciences*, 11(1), 390, 2021. <https://doi.org/10.3390/app11010390>

13. H. Kalantari, M. Jalali, A. Jalali, M. Mahdavinia, A. Salimi, B. Juhasz, A. Tosaki, R. Gesztelyi, "Protective effect of Cassia fistula fruit extract against bromobenzene-induced liver injury in mice", *Human & Experimental Toxicology*, 30(8), 1039-44, 2011. DOI: 10.1177/09603271110386256.
14. Lê Thị Ánh, Phan Thị Diệu Ngân, Nguyễn Diệu Âu, Lê Hoàng Duy Minh, Nguyễn Tất Minh Phước, "Chuẩn hóa liều gây mê trên chuột Swiss bằng hỗn hợp thuốc an thần xylazil – ketamil", *Tạp chí khoa học và công nghệ, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế*, 14(2), 55-63, 2019.
15. N. A. Al-Afifi, A. M. Alabsi, M. M. Bakri, A. Ramanathan, "Acute and sub-acute oral toxicity of *Dracaena cinnabari* resin methanol extract in rats", *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 18(1), 50, 2018. DOI: 10.1186/s12906-018-2110-3.
16. S. O. Aniagu, F. C. Nwinyi, D. D. Akumka, G. A. Ajoku, S. Dzarma, K. S. Izebe, M. Ditse, P. E. C. Nwaneri, C. Wambebe, K. Gamaniel, "Toxicity studies in rats fed nature cure bitters", *African Journal of Biotechnology*, 4(1), 72-78, 2005.
17. A. Tukappa, R. L. Londonkar, H. B. Nayaka, S. Kumar, "Cytotoxicity and hepatoprotective attributes of methanolic extract of *Rumex vesicarius* L.", *Biological Research*, 48: 1-10, 2015. DOI: 10.1186/s40659-015-0009-8
18. C. Yung-Jia, C. Shen-Chieh, C. Chuan-Sung, K. Chun-Pin, W. Kun-Chang, C. Chao-Jung, T. Jen-Chieh, P. Wen-Huang, "Hepatoprotective effect of the ethanol extract of *Polygonum orientale* on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice", *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(1), 369-379, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2017.04.007>
19. Gia-Buu Tran, Sao-Mai Dam, Nghia-Thu Tram Le, "Amelioration of Single Clove Black Garlic Aqueous Extract on Dyslipidemia and Hepatitis in Chronic Carbon Tetrachloride Intoxicated Swiss Albino Mice", *International Journal of Hepatology*, 2018, 1-9, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/9383950>
20. B. R. Choi, I. J. Cho, S. J. Jung,; J. K. Kim, D. G. Lee, S. K. Ku, K. M. Park, "Study on the hepatoprotective effects of lemon balm and dandelion leaf extract combination in carbon tetrachloride-mediated liver injured mice", *Herbal Formula Science*, 27, 199–211, 2019. DOI:10.14374/HFS.2019.27.3.199
21. C. Nasuti, D. Fedeli, L. Bordoni, M. Piangerelli, M. Servili, R. Selvaggini, R. Gabbianelli, "Anti-Inflammatory, Anti-Arthritic and Anti-Nociceptive Activities of *Nigella sativa* Oil in a Rat Model of Arthritis", *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 8(9), 342, 2019. DOI: 10.3390/antiox8090342
22. R. Krithika, R. J. Verma, "Solanum nigrum confers protection against CCl₄-induced experimental hepatotoxicity by increasing hepatic protein synthesis and regulation of energy metabolism", *Clinical Phytoscience*, 5(1), 1-8, 2019. <https://doi.org/10.1186/s40816-018-0096-5>
23. A. S. Ibraheem, M. F. El-Sayed, H. A. Khalil, "Establishment of hepatitis model in rat liver induced by injecting extracted DNA: Histopathological study", *The Journal of Basic & Applied Zoology*, 77, 102-111, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jobaz.2016.12.007>
24. S. Dutta, A. K. Chakraborty, P. Dey, P. Kar, P. Guha, S. Sen, "Amelioration of CCl₄ induced liver injury in Swiss albino mice by antioxidant rich leaf extract of *Croton bonplandianus* Baill", *PLoS One*, 13(4), 1–30, 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0196411
25. N. Jong-Hyun, K. A-Hyeon, J. Ho-Kyung, L. Mu-Jin, J. Ji-Hun, Y. Beo-Dul, L. Hyun-Ju, L. Ki-Ho, W. Kyeong-Wan, C. Hyun-Woo, "Water Extract of *Acori Graminei* Rhizoma Attenuates Features of Rheumatoid Arthritis in DBA/1 Mice", *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, 3637453, 2019. DOI: 10.1155/2019/3637453
26. S. Islam, H. Yu, L. Miao, Z. Liu, Y. He, H. Sun, "Hepatoprotective Effect of the Ethanol Extract of *Illicium henryi* against Acute Liver Injury in Mice Induced by Lipopolysaccharide", *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 8(10), 446, 2019. DOI: 10.3390/antiox8100446
27. S. S. Rahman, M. Zahid, A. A. Khan, T. Aziz, Z. Iqbal, W. Ali, F. F. Khan, S. Jamil, M. Shahzad, M. Alharbi, A. Alshammari, "Hepatoprotective effects of walnut oil and *Caralluma tuberculata* against paracetamol in experimentally induced liver toxicity in mice", *Acta Biochimica Polonica*, 69(4), 871-878, 2022. DOI: 10.18388/abp.2020_6387.
28. T. Ajiboye, "In vivo antioxidant potentials of *Piliostigma thonningii* (Schum) leaves: studies on hepatic marker enzyme, antioxidant system, drug detoxifying enzyme and lipid peroxidation", *Human & Experimental Toxicology*, 30(1), 55–62, 2010. DOI:10.1177/0960327110366785

29. E. Colak, M. C. Utuner, N. Tekin, E. Colak, D. Burukoglu, I. Degirmenci, H. V. Gunes, "The hepatocurative effects of *Cynara scolymus* L. leaf extract on carbon tetrachloride-induced oxidative stress and hepatic injury in rats", *Springer Plus*, 5, 216, 2016. DOI 10.1186/s40064-016-1894-1
30. A. Shi, H. Shi, Y. Wang, X. Liu, Y. Cheng, H. Li, H. Zhao, S. Wang, L. Dong, "Activation of Nrf2 pathway and inhibition of NLRP3 inflammasome activation contribute to the protective effect of chlorogenic acid on acute liver injury", *International Immunopharmacology*, 54, 125-130, 2018. DOI: 10.1016/j.intimp.2017.11.007
31. S. Islam, H. Yu, L. Miao, Z. Liu, Y. He, H. Sun, "Hepatoprotective Effect of the Ethanol Extract of *Illicium henryi* against Acute Liver Injury in Mice Induced by Lipopolysaccharide", *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 8(10), 446, 2019. DOI: 10.3390/antiox8100446
32. J. Han, D. Wang, D. Li, X. Chen, B. Wang, F. Wang, X. Liu, J. Shang, Q. Zheng, "Licochalcone E protects against carbon tetrachloride-induced liver toxicity by activating peroxisome proliferator-activated receptor gamma", *Molecular Medicine Reports*, 16, 5269-5276, 2017. DOI: 10.3892/mmr.2017.7268

HEPATOPROTECTIVE ACTIVITY OF ETHANOL EXTRACT FROM *Cassia rhombifolia* Roxb FRUIT AGAINST CARBON TETRACHLORIDE-INDUCED LIVER INJURY IN MICE

PHUONG-NHUNG TRAN THI^{*}, NGOC-THUAN NGUYEN¹, BICH-THUY TRAN²

¹Institute of Food and Biotechnology, Industrial University of Ho Chi Minh City

²Institute of Science, Technology and Environmental Management, Industrial University of Ho Chi Minh City

* Corresponding author: tranthiphuongnhung@iuh.edu.vn

Abstract. *Cassia rhombifolia* Roxb., a medium-sized woody plant that prefers sunlight, grows rapidly, tolerates drought well, and is widely distributed throughout Vietnam from the delta to the mountainous regions. For a long time, *C. rhombifolia* has been used by Vietnamese folk medicine as a remedy for constipation, fever, edema, cardiovascular disorders, inflammation and liver damage, excess stomach acid, and other conditions. In current research, the hepatoprotective effects of ethanol extract from *C. rhombifolia* fruit (EtCR) against carbon tetrachloride-induced liver damage in mice were investigated. Results were compared with those of silymarin, a standard liver-protective drug. It was found that the serum transaminase activity, levels of cytokines causing inflammation, and activity of acid and alkaline phosphatase and antioxidant enzymes in the livers of mice with CCl₄ (0.5 mL/kg; ip)-induced liver injury were increased. Treatment with EtCR for 8 weeks prevented these intermediate changes. Histopathological examination also confirmed the liver-protective activity of EtCR when compared to the CCl₄ control group. In conclusion, these results indicate that ethanol extract from *Cassia rhombifolia* fruit (*C. rhombifolia*) exhibits hepatoprotective effects against carbon tetrachloride-induced liver damage in mice.

Keywords: *Cassia rhombifolia* Roxb., hepatitis, carbon tetrachloride

Ngày nhận bài: 14/4/2023

Ngày chấp nhận đăng: 14/7/2023