

Nghiên cứu tác dụng của dịch chiết cây Hạ khô thảo nam [*Blumea lacera* (Burn. f.) DC] trên chuột bị gây suy thận mạn bởi adenine

Trịnh Khánh Linh¹, Trần Văn Cường¹, Hồ Anh Sơn^{2*}

¹Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

²Viện Nghiên cứu Y dược học Quân sự, Học viện Quân y

Ngày nhận bài 3/12/2018; ngày gửi phản biện 5/12/2018; ngày nhận phản biện 2/1/2019; ngày chấp nhận đăng 8/1/2019

Tóm tắt:

Mục tiêu của nghiên cứu nhằm đánh giá tác dụng của dịch chiết Hạ khô thảo nam (*Blumea lacera*) trên chuột bị suy thận mạn. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: bột cây Hạ khô thảo nam được chiết 3 lần bằng EtOH 96%, bốc hơi dung môi dưới áp suất giảm thu được cặn EtOH để làm thí nghiệm. Chuột bị gây suy thận mạn bằng cách cho uống adenine liều 100 mg/kg cách ngày. Sau 35 ngày, lấy ngẫu nhiên 16 chuột (đã bị suy thận) chia thành 2 nhóm: (i) Nhóm HKT: uống dịch chiết Hạ khô thảo nam, liều tương đương 8 g dược liệu/kg, uống cách ngày, xen kẽ uống adenine liều 100 mg/kg; (ii) Nhóm ST: không uống dịch chiết, uống adenine liều 100 mg/kg, uống cách ngày. Ngoài ra, nhóm chứng gồm 8 chuột nhất khỏe mạnh, cho uống nước cất. Quá trình này kéo dài 21 ngày. Các chỉ tiêu đánh giá bao gồm: nồng độ ure, creatinin, huyết đồ và giải phẫu bệnh thận, hình ảnh siêu cấu trúc thận. Kết quả cho thấy, sau 21 ngày, các chỉ tiêu theo dõi ở nhóm chứng và nhóm HKT có sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Nhóm ST có nồng độ ure và creatinine cao hơn rõ rệt, số lượng hồng cầu và hemoglobine giảm rõ rệt so với 2 nhóm còn lại. Hình ảnh cấu trúc và siêu cấu trúc thận ở nhóm HKT không có tổn thương rõ rệt, trong khi ở nhóm ST có hình ảnh tổn thương rất rõ. Qua nghiên cứu có thể kết luận: cặn chiết EtOH Hạ khô thảo nam có tác dụng điều trị bệnh suy thận mạn trên mô hình gây tổn thương thận chuột bằng adenine.

Từ khóa: adenine, Hạ khô thảo nam, suy thận mạn.

Chỉ số phân loại: 3.4

Đặt vấn đề

Suy thận mạn là hậu quả cuối cùng của các bệnh thận, tiết niệu mạn tính, làm chức năng thận giảm sút dần dần và mất hoàn toàn chức năng. Lúc đó, thận không lọc được các chất độc ra khỏi cơ thể như ure, creatinin, gây rối loạn các chức năng nội tiết, ngoại tiết của thận, đòi hỏi phải điều trị bằng phương pháp lọc máu chu kỳ hoặc ghép thận.

Số lượng bệnh nhân suy thận mạn tính đang gia tăng nhanh ở nhiều nước trên thế giới, đặc biệt là bệnh suy thận mạn giai đoạn cuối. Chi phí để điều trị cho nhóm bệnh nhân này cũng không ngừng gia tăng. Tại các nước phát triển, chi phí cho bệnh nhân suy thận mạn chiếm 2-3% tổng chi phí của ngành y tế [1].

Ở Việt Nam, cho đến nay chưa có số liệu thống kê chính xác trên toàn quốc về căn bệnh này, song ước tính có khoảng 6 triệu người bị bệnh suy thận mạn, chiếm 6,73% dân số,

trong đó có khoảng 800.000 bệnh nhân giai đoạn cuối, trung bình có 8.000 bệnh nhân mắc mới mỗi năm. Khi bị suy thận mạn giai đoạn cuối thì bệnh nhân có chỉ định điều trị thay thế thận, bao gồm 3 phương pháp: chạy thận nhân tạo; lọc màng bụng; hoặc ghép thận với chi phí điều trị là rất lớn, gây ra gánh nặng cho gia đình và xã hội.

Hạ khô thảo nam còn gọi là cây Cỏ trời, là loài cây đặc hữu của Việt Nam và được dùng trong bài thuốc đông y cho bệnh nhân bị bệnh thận [2, 3]. Dịch chiết Hạ khô thảo nam có tác dụng dự phòng suy thận mạn trên mô hình gây suy thận cho chuột bằng adenine [4]. Tuy nhiên, cho đến nay ở nước ta chưa có tác giả nào nghiên cứu về tác dụng điều trị suy thận mạn của cây Hạ khô thảo nam. Do đó, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này trên mô hình động vật [4-6], nhằm từng bước đánh giá tác dụng điều trị suy thận mạn của Hạ khô thảo nam.

*Tác giả liên hệ: Email: hoanhsonghp@gmail.com

The effectiveness of *Blumea lacera* extract on chronic renal failure animal model induced by adenine

Khanh Linh Trinh¹, Van Cuong Tran¹, Anh Son Ho^{2*}

¹University of Science, Vietnam National University, Hanoi

²Biomedical & Pharmaceutical Applied Research Centre,
Vietnam Military Medical University

Received 3 December 2018; accepted 8 January 2019

Abstract:

Objective: to evaluate the effectiveness of *Blumea lacera* extract on chronic renal failure model induced by adenine in mice. **Methods:** *Blumea lacera* was extracted by 96% ethanol three times, then the liquid was evaporated with low pressure to get EtOH extract. Swiss mice were induced with renal failure by adenine oral administration (100 mg/kg) every 2 days. After 35 days, 16 renal failure mice were randomly divided into two groups: (i) HKT group, *Blumea lacera* EtOH extract was orally administrated (at the dose equivalent to 8 g/kg) every 2 days; in other days adenine was orally administrated (100 mg/kg); (ii) ST group: adenine was orally administrated (100 mg/kg) every 2 days, without *Blumea lacera* EtOH extract. Experimental periods prolonged to 21 days. Bio-parameters were collected such as blood cell count, urea, creatine, renal histopathology. **Results:** at the end of 21-day duration, the similarity between the control group and the HKT group was identified. ST group showed the significantly higher urea and creatine concentrations than other groups; red blood cells and hemoglobine were significantly lower than those in other groups. The renal structure image and superstructure image showed that, there was no renal damage in the HKT group, while the damage was observed in mitochondrial level in the ST group. **Conclusion:** *Blumea lacera* EtOH extract showed the effectiveness on renal failure animal model induced by adenine.

Keywords: adenine, *Blumea lacera*, chronic renal failure.

Classification number: 3.4

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng và vật liệu nghiên cứu

Chuột nhắt trắng, chủng Swiss, cả hai giống, khỏe mạnh, khối lượng 20 ± 2 g, do Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương cung cấp. Động vật được nuôi trong điều kiện phòng thí nghiệm với đầy đủ thức ăn và nước uống tại Viện Nghiên cứu Y dược học Quân sự - Học viện Quân y từ trước khi nghiên cứu 5 ngày và trong suốt thời gian nghiên cứu.

Nguyên liệu nghiên cứu là phần trên mặt đất của cây Hạ khô thảo nam được thu hái tại Sapa, Lào Cai có ký hiệu là HKTN-018-4 vào tháng 3/2018 để làm tiêu bản (với đầy đủ bộ phận sinh sản) được xác định bởi TS Đỗ Văn Hải, Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật. Tiêu bản mẫu nghiên cứu được lưu giữ tại Phòng tiêu bản, Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật.

Chiết xuất hoạt chất từ Hạ khô thảo nam

Cân 1,1 kg bột thô phần trên mặt đất của cây Hạ khô thảo nam được chiết hồi lưu 3 lần với EtOH 96%, để nguội, lọc, tập trung dịch lọc, bốc hơi dung môi dưới áp suất giảm thu được cặn EtOH (86,4 g).

Đánh giá tác dụng điều trị suy thận mạn

Chuẩn bị hóa chất và mẫu thử:

- Pha adenine: adenine của Hãng Sigma được pha trong dầu ăn với hàm lượng 10 mg/ml dầu (chuột được uống 0,1 ml/10 g thể trọng, tương ứng liều 100 mg/kg thể trọng) [4].

- Pha mẫu thử: cặn EtOH được hòa tan trong dung môi dimethyl sulfoxide (DMSO), sau đó được pha vào nước với thể tích vừa đủ tạo dung dịch 630 mg/10 ml (chuột được uống 0,1 ml/10 g thể trọng, tương đương 8 g dược liệu khô/kg thể trọng).

Đánh giá tác dụng của Hạ khô thảo nam:

- Nhóm chứng (n=8 con): chuột được cho ăn uống bình thường, không cho uống adenine và dịch chiết Hạ khô thảo nam.

- Nhóm gây bệnh suy thận mạn: chuột được uống adenine với liều 100 mg/kg, uống cách ngày, các ngày khác uống nước cất. Sau 35 ngày, lấy ngẫu nhiên 16 con chuột (đã bị suy thận) chia thành 2 nhóm:

+ Nhóm HKT (8 con): cho uống dịch chiết Hạ khô thảo nam, liều tương đương 8 g dược liệu khô/kg/ngày; uống xen kẽ adenine liều 100 mg/kg, cách ngày. Quá trình kéo dài 3 tuần.

+ Nhóm ST (8 con): không uống dịch chiết; uống adenine liều 100 mg/kg, uống cách ngày. Quá trình kéo dài 3 tuần.

Các chỉ tiêu theo dõi:

- Nồng độ ure và creatinine máu (sử dụng máy phân tích sinh hóa bán tự động BTS350 của Hãng Biosystem Tây Ban Nha).

- Số lượng hồng cầu, nồng độ Hemoglobin (trên máy xét nghiệm huyết học bán tự động).

- Hình ảnh cấu trúc của thận trên kính hiển vi quang học.

- Hình ảnh siêu cấu trúc của thận trên kính hiển vi điện tử truyền qua.

Xử lý số liệu

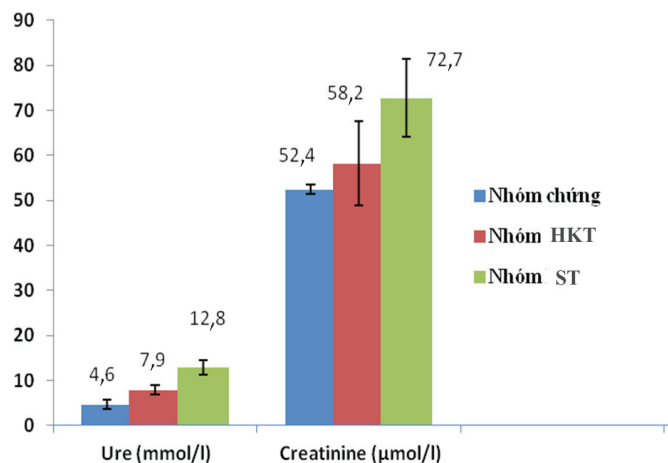
Số liệu được xử lý bằng phần mềm thống kê Statview 5.0.

Kết quả nghiên cứu

Kết quả nghiên cứu về nồng độ ure và creatinine

Bảng 1. So sánh nồng độ ure và creatinine của các nhóm chuột.

Chỉ tiêu theo dõi	Nhóm chứng (1) (n=8)	Nhóm HKT (2) (n=8)	Nhóm ST (3) (n=8)	P
Ure (mmol/l)	4,6±0,6	7,9±1,0	12,8±1,6	$p_{1,2}>0,05$ $p_{1,3}<0,01$ $p_{2,3}<0,05$
Creatinine (μmol/l)	49,5±0,7	58,2±9,3	72,7±8,7	$p_{1,2}>0,05$ $p_{1,3}<0,05$ $p_{2,3}<0,05$



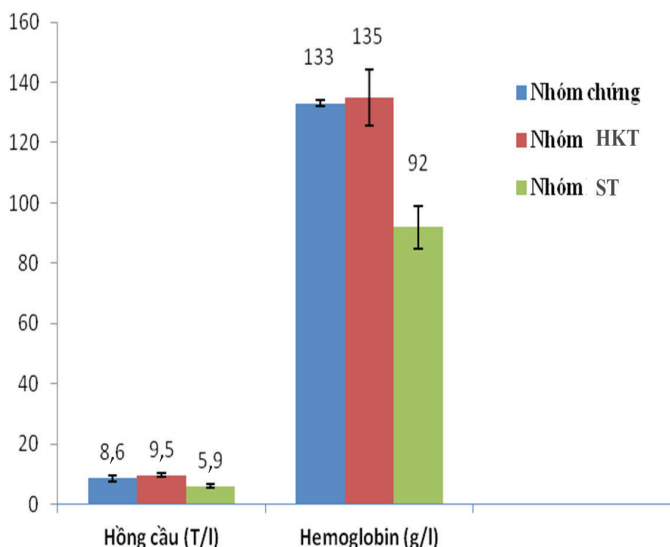
Hình 1. So sánh nồng độ ure, creatinine giữa nhóm HKT và các nhóm.

Nhận xét: bảng 1 và hình 1 cho thấy, mặc dù nồng độ ure và creatinine ở nhóm HKT cao hơn so với nhóm chứng nhưng sự khác biệt không có ý nghĩa với $p>0,05$. Trong khi đó, nồng độ này thấp hơn có ý nghĩa so với nhóm ST với $p<0,01$ và $p<0,05$. Như vậy, dịch chiết Hạ khô thảo nam có tác dụng điều trị suy thận mạn, thể hiện việc làm giảm rõ rệt nồng độ ure, creatinine trong máu so với nhóm ST.

Kết quả về số lượng hồng cầu và nồng độ hemoglobin

Bảng 2. So sánh số lượng hồng cầu, hemoglobin của các nhóm chuột.

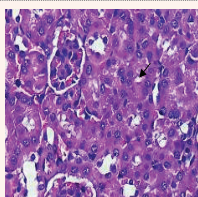
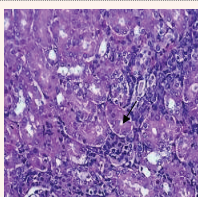
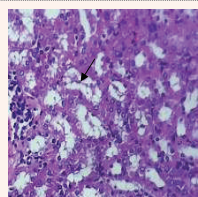
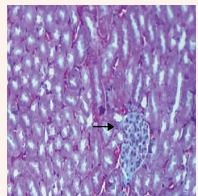
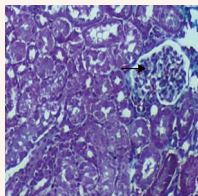
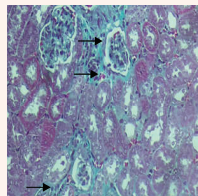
Chỉ tiêu theo dõi	Nhóm chứng (1) (n=8)	Nhóm HKT (2) (n=8)	Nhóm ST (3) (n=8)	P
Số lượng hồng cầu (T/l)	8,6±1,6	9,5±0,6	5,9±0,6	$p_{1,2}>0,05$ $p_{1,3}<0,05$ $p_{2,3}<0,05$
Nồng độ hemoglobin (g/l)	133±12,7	135±9,3	92±7,1	$p_{1,2}>0,05$ $p_{1,3}<0,05$ $p_{2,3}<0,05$



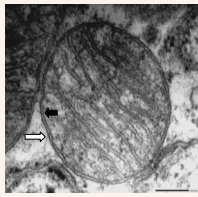
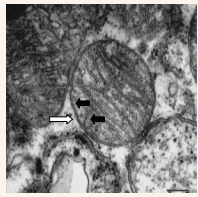
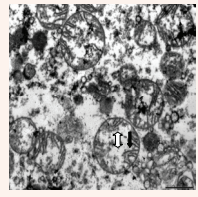
Hình 2. So sánh hồng cầu, hemoglobin giữa nhóm HKT và các nhóm.

Nhận xét: bảng 2 và hình 2 cho thấy, số lượng hồng cầu và nồng độ hemoglobin ở nhóm HKT và nhóm chứng tương đương nhau với $p>0,05$. Ở nhóm ST thì số lượng hồng cầu và nồng độ hemoglobin thấp hơn rõ rệt so với nhóm điều trị. Điều đó chứng tỏ, dịch chiết Hạ khô thảo nam có tác dụng điều trị suy thận mạn, qua đó đã khôi phục được tình trạng thiếu máu ở chuột bị suy thận mạn.

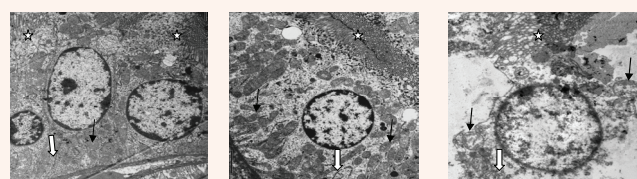
So sánh hình ảnh cấu trúc thận nhóm HKT với nhóm chứng và nhóm ST

Nhóm chứng	Nhóm HKT	Nhóm ST
a) Hình ảnh cấu trúc thận nhuộm HE, độ phóng đại 200 lần:		
		
Hình ảnh các ống thận có cấu trúc bình thường, lòng ống hẹp, không có hình ảnh tổn thương, viêm.	Hình ảnh cấu trúc ống thận bình thường, rải rác có các tế bào viêm.	Hình ảnh thoái hóa biểu mô ống thận, có các trụ niệu trong lòng ống thận, rải rác có các tế bào viêm.
b) Hình ảnh cấu trúc thận nhuộm Masson, độ phóng đại 200 lần:		
		
Hình ảnh cho thấy rõ các sợi của tổ chức liên kết ở cầu thận và rải rác trong khe thận (nhuộm 3 màu Masson, tổ chức liên kết có màu xanh dương).	Mật độ tổ chức sợi liên kết không khác biệt nhiều so với nhóm chứng (nhuộm 3 màu Masson, tổ chức liên kết có màu xanh dương).	Mật độ tổ chức sợi liên kết xuất hiện nhiều ở cầu thận và tổ chức khe thận (nhuộm 3 màu Masson, tổ chức liên kết có màu xanh dương).

So sánh hình ảnh siêu cấu trúc thận của nhóm HKT với nhóm chứng và nhóm ST

Nhóm chứng	Nhóm HKT	Nhóm ST
a) Hình ảnh siêu cấu trúc ty thể tế bào ống lượn gần:		
		
Cấu trúc ty thể nhóm chứng tương tự như nhóm HKT với màng ngoài (mũi tên trắng), màng trong (mũi tên đen) rõ nét, nguyên vẹn, mào ty thể bình thường, chất nền phân bố đậm đặc đồng đều. TEM. x 30.000.	Cấu trúc ty thể nhóm HKT tương tự như nhóm chứng với màng ngoài (mũi tên trắng), màng trong (mũi tên đen) rõ nét, nguyên vẹn, mào ty thể bình thường, chất nền phân bố đậm đặc đồng đều. TEM. x 20.000.	Ty thể với hình ảnh tương phản, màng trong, mào ty thể rách gãy, phân mảnh (mũi tên đen), chất nền (mũi tên trắng) phân bố không đồng đều, chỗ đông vón, chỗ hốc hóa. TEM. x 5.000.

b) Hình ảnh siêu cấu trúc tế bào ống lượn gần:



Cấu trúc tế bào nhóm chứng tương tự như nhóm HKT với tế bào dạng vuông cao, cực đỉnh có bờ bàn chải (ngôi sao trắng), cực đáy có nhiều nếp gấp (mũi tên trắng), màng nhân 2 lớp rõ, chất nhân phân bố đều, bào tương có nhiều ty thể dạng hình trụ với cấu trúc được bảo tồn tốt và tập trung ở cực đáy của tế bào (mũi tên đen). TEM. x 2.000.	Cấu trúc tế bào nhóm HKT tương tự như nhóm chứng với tế bào dạng vuông cao, cực đỉnh có bờ bàn chải (ngôi sao trắng), cực đáy có nhiều nếp gấp (mũi tên trắng), màng nhân 2 lớp rõ, chất nhân phân bố đều, bào tương có nhiều ty thể dạng hình trụ với cấu trúc được bảo tồn tốt và tập trung ở cực đáy của tế bào (mũi tên đen). TEM. x 2.000.	Tế bào ống thận gần bị tương phản, bờ bàn chải phân mảnh (ngôi sao trắng), màng nhân không rõ hai lớp, chất nhân phân bố không đều, chỗ hốc hóa, chỗ đông vón, bào tương sắp xếp lộn xộn, tổn thương nghiêm trọng, nếp gấp cực đáy không còn thấy rõ (mũi tên trắng), ty thể tương phản, màng trong, mào ty thể rách gãy, phân mảnh (mũi tên đen). TEM. x 3.000.
---	---	--

Bàn luận

Về mô hình thí nghiệm, 16 chuột suy thận được lấy ngẫu nhiên đưa vào thử nghiệm tác dụng điều trị bằng dịch chiết Hạ khô thảo nam. Ở đây, cả nhóm HKT và ST đều tiếp tục cho uống adenine là phù hợp với điều kiện thực tế trên bệnh nhân suy thận mạn ở nước ta, đó là mặc dù đã bị bệnh suy thận mạn nhưng các tác nhân gây bệnh suy thận mạn thường vẫn tồn tại.

Dịch chiết Hạ khô thảo nam đã làm giảm đáng kể nồng độ ure và creatinine ở nhóm HKT so với nhóm ST. Đồng thời, nhóm chuột HKT có số lượng hồng cầu và nồng độ hemoglobin cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm ST. Điều đó chứng tỏ, dịch chiết Hạ khô thảo nam có tác dụng điều trị suy thận mạn, góp phần khôi phục được tình trạng thiếu máu ở chuột bị suy thận mạn.

Hình ảnh cấu trúc và siêu cấu trúc ở nhóm chứng và nhóm HKT tương đương nhau về cấu trúc cơ bản của cầu thận, ống thận, tổ chức liên kết. Tuy nhiên, ở nhóm ST, cấu trúc thận cho thấy hình ảnh thoái hóa biểu mô ống thận, có các trụ niệu trong lòng ống thận, rải rác có các tế bào viêm. Đồng thời trên tiêu bản cấu trúc nhuộm Masson, thấy rõ sự tăng sinh tổ chức xơ sợi ở khe thận, dày màng nền tiểu cầu thận. Trên tiêu bản siêu cấu trúc, ở nhóm ST có hình ảnh tổn thương mức ty thể (mào ty thể đứt gãy, vón đặc), tế bào ống thận xa bị tương phản, bờ bàn chải phân mảnh, màng nhân không rõ hai lớp, chất nhân phân bố không đều, hốc hóa, đông vón, các bào quan sắp xếp lộn xộn, tổn thương

nghiêm trọng, nếp gấp cực đáy không còn thấy rõ, ty thể trương phồng, màng trong, mào ty thể rách gãy, phân mảnh. Như vậy, từ những phân tích trên cho thấy, rõ ràng dịch chiết Hạ khô thảo nam có tác dụng điều trị suy thận mạn trên mô hình gây suy thận mạn bằng adenine.

Kết luận

Cần EtOH cây Hạ khô thảo nam có tác dụng điều trị suy thận mạn trên mô hình suy thận mạn chuột bằng adenine, thể hiện ở các kết quả sau:

- Nồng độ ure, creatinine ở nhóm HKT tương đương nhóm chứng và thấp hơn rõ rệt so với nhóm ST.
- Số lượng hồng cầu và nồng độ hemoglobin ở nhóm HKT tương đương nhóm chứng và cao hơn rõ rệt so với nhóm ST.
- Hình ảnh cấu trúc ở nhóm ST có tổn thương tế bào ống thận, tăng sinh tổ chức xơ.
- Hình ảnh siêu cấu trúc ở nhóm ST có tổn thương ty thể và tổn thương tế bào ống lượn xa.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Nathan R. Hill, Samuel T. Fatoba, Jason L. Oke, Jennifer A. Hirst, Christopher A. O'Callaghan, Daniel S. Lasserson, and F.D. Richard Hobbs (2016), "Global prevalence of chronic kidney disease - a systematic review and meta-analysis", *PLOS ONE*, **11**(7), p.e0158765.
- [2] Võ Văn Chi (1997), *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, tr.170, Nhà xuất bản Y học.
- [3] F.A. Ahmed, et al. (2014), "Ethnobotany and antibacterial potentiality of *Blumea lacera* L. from Sundarban Mangrove forest of Bangladesh", *Jahangirnagar University J. Biol. Sci.*, **3**(2), pp.17-24.
- [4] Trịnh Khánh Linh, Trần Văn Cường, Hồ Anh Sơn (2018), "Nghiên cứu tác dụng điều trị dự phòng suy thận mạn của dịch chiết Hạ khô thảo nam (*Blumea lacera*) trên động vật thực nghiệm", *Y dược lâm sàng* **108**, **13**(6), tr.133-138.
- [5] V. Diwan, A. Mistry, G. Gobe, L. Brown (2013), "Adenine-induced chronic kidney and cardiovascular damage in rats", *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **68**(2), pp.197-207.
- [6] T. Yokozawa, P.D. Zheng, H. Oura, F. Koizumi (1986), "Animal model of adenine-induced chronic renal failure in rats", *Nephron*, **44**(3), pp.230-234.