

Tác dụng hạ đường huyết *in vivo* của hệ vi tự nhũ berberin

Võ Văn Lệnh*, Nguyễn Việt Cường, Đào Thị Thanh Thảo, Nguyễn Dương Ngọc Thới

Khoa Dược, Trường Đại học Lạc Hồng, phường Trần Biên, tỉnh Đồng Nai, Việt Nam

Ngày nhận bài 8/5/2024, ngày chuyển phân biện 10/5/2024, ngày nhận phân biện 25/5/2024, ngày chấp nhận đăng 29/5/2024

Tóm tắt:

Berberin (BER) là một benzyloquinolin alkaloid có nhiều hoạt tính sinh học, được phân lập từ các dược liệu như Vàng đắng, Hoàng bá, Hoàng liên. Một số tác dụng của BER gồm kháng khuẩn, hạ lipid, chống khối u, trị Alzheimer và đặc biệt là tác dụng hạ đường huyết. Sinh khả dụng của BER rất thấp, do đó nhóm nghiên cứu đã bào chế BER thành hệ vi tự nhũ nhằm cải thiện độ tan và tính thấm với công thức gồm 19,5% Peceol, 39% Cremophor RH 40, 39% propylen glycol và 2,5% BER (kl/kl). Nghiên cứu này nhằm đánh giá hiệu quả hạ đường huyết của hệ vi tự nhũ BER (SMEDDS-BER), qua đó khẳng định hệ vi tự nhũ có thể cải thiện sinh khả dụng và hiệu quả trị liệu của BER. Hệ vi tự nhũ BER với liều 50 mg/kg có tác dụng hạ đường huyết có ý nghĩa trên chuột gây đái tháo đường (ĐTĐ) bởi alloxan, tương đương glibenclamid và hiệu quả hơn so với BER thô.

Từ khóa: berberin, hạ đường huyết, hệ vi tự nhũ, sinh khả dụng.

Chỉ số phân loại: 1.6, 3.1, 3.4

In vivo hypoglycemic activity of the self-microemulsifying drug delivery system of berberine

Van Lenh Vo*, Viet Cuong Nguyen, Thi Thanh Thao Dao, Duong Ngoc Thoi Nguyen

Faculty of Pharmacy, Lac Hong University, Tran Bien Ward, Dong Nai Province, Vietnam

Received 8 May 2024; revised 25 May 2024; accepted 29 May 2024

Abstract:

Berberine (BER) is a benzyloquinoline alkaloid with many biological activities, isolated from medicinal plants such as *Coscinium fenestratum*, *Phellodendron amurense* and *Coptis chinensis*. Some effects of BER include antibacterial, lipid-lowering, anti-tumor, anti-Alzheimer, and especially anti-diabetic activity. The bioavailability of BER is very low, so BER was formulated into a self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) to improve the solubility and permeability of BER, using a formula consisting of 19.5% Peceol, 39% Cremophor RH 40, 39% propylene glycol, and 2.5% BER (w/w). This study aimed to evaluate the hypoglycemic effect of SMEDDS-BER, thereby confirming that SMEDDS-BER can improve the bioavailability and therapeutic effectiveness of BER. SMEDDS-BER at a dose of 50 mg/kg significantly lowered blood glucose in alloxan-induced diabetic rats compared to glibenclamide and demonstrated a more effective hypoglycemic effect than raw BER.

Keywords: berberine, bioavailability, hypoglycemic, self-microemulsifying drug delivery system.

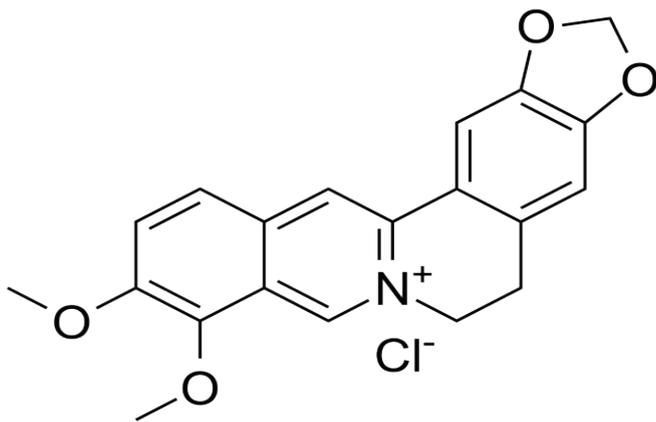
Classification numbers: 1.6, 3.1, 3.4

*Tác giả liên hệ: Email: vanlenh@lhu.edu.vn

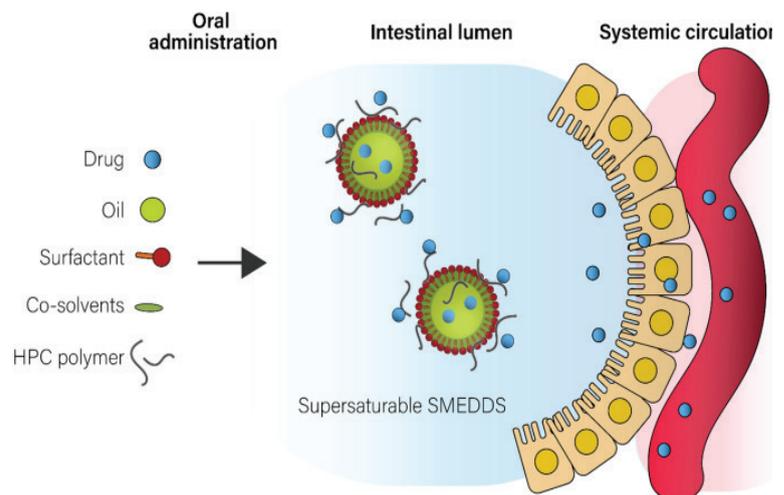
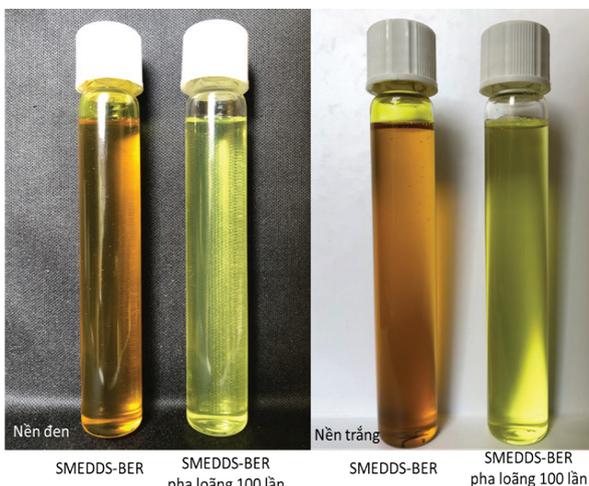
1. Đặt vấn đề

Một trong những bệnh lý mãn tính ngày càng gia tăng nhanh chóng là ĐTĐ. Trên toàn thế giới có khoảng 537 triệu người mắc ĐTĐ trong năm 2023. Dự đoán vào năm 2045, con số này sẽ lên tới khoảng 783 triệu người, tăng 46% [1]. Điều trị ĐTĐ bằng các thuốc tân dược giúp kiểm soát đường huyết tốt, tuy nhiên, các thuốc này vẫn không ngăn được các biến chứng và đều có tác dụng phụ không mong muốn. Vì vậy, sử dụng thuốc có nguồn gốc từ dược liệu đang là xu thế, nhằm giảm sự phụ thuộc vào thuốc tân dược, giảm tác dụng không mong muốn, phát huy thế mạnh nguồn dược liệu phong phú của nước ta.

Berberin là một benzyloquinoline alkaloid tự nhiên có nhiều tác dụng dược lý quan trọng. Các tác dụng như trị bệnh lý, tiêu chảy, kháng viêm, hạ lipid, kháng *Helicobacter pylori*, chống khối u và đặc biệt là tác dụng hạ đường huyết của BER đã được nghiên cứu cho nhiều kết quả khả quan [2, 3]. Với nhiều tác dụng dược lý hiệu quả nhưng sinh khả dụng (SKD) đường uống của BER rất thấp (<5%) do độ tan kém, tính thấm kém nên bị chuyển hóa và đào thải mạnh [4]. SMEDDS-BER đã được bào chế và đánh giá cho thấy độ hòa tan tăng ở môi trường pH 1,2 và 6,8; đồng thời kích thước tiểu phân đạt dưới 100 nm [5]. Nhằm khẳng định tác dụng hạ đường huyết của BER có được cải thiện khi tải vào hệ SMEEDS; do đó, nghiên cứu tác dụng hạ đường huyết *in vivo* của hệ vi tự nhũ BER được tiến hành.



Hình 1. Nguyên liệu berberin (trái) và cấu trúc phân tử berberin (phải).



Hình 2. Hình ảnh cảm quan SMEDDS-BER (trái) và cơ chế hình thành SMEDDS (phải).

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Nguyên liệu BER và cấu trúc phân tử BER được mô tả ở hình 1. SMEDDS-BER được bào chế tại Phòng Bảo chế - Công nghiệp dược, Khoa Dược, Trường Đại học Lạc Hồng theo nghiên cứu đã công bố [5] (hình 2).

Động vật thử nghiệm: Chuột nhắt trắng giống đực, loài *Swiss albino*, trọng lượng 22-28 g, tuổi 6-8 tuần, khỏe mạnh, được nhập từ Viện Pasteur Nha Trang. Chuột được nuôi ổn định ít nhất một tuần tại Phòng Thực hành Dược lý, Khoa Dược, Trường Đại học Lạc Hồng sau đó mới tiến hành thử nghiệm.

Dung môi, hóa chất: Berberin clorid (Trung Quốc), alloxan (98%) (A7413, Sigma Aldrich, Đức), glibenclamid 5 mg (Domesco). Bộ kit thử (Đức) gồm: dung dịch glucose chuẩn (100 mg/100 ml), dung dịch đệm phosphate pH 7,5, 4-aminophenazone (4 AAP), peroxidase (POD), phenol và glucose oxidase (GOD).

Trang thiết bị, dụng cụ nghiên cứu: Máy ly tâm mini centrifuge C1008-G (Việt Nam), máy phân tích sinh hóa Clindia SA-20 (Đức), tủ sấy Memmert IN5 (Đức), cân phân tích Praxum 224-1S Sartorius (Đức), micropipet AHN (Đức), máy siêu âm ELMA (Đức).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Gây đái tháo đường trên chuột bởi alloxan

Những con chuột có đường huyết sinh lý sẽ được chọn để tiến hành thử nghiệm. Cho chuột nhịn đói 12 giờ, sau đó tiêm tĩnh mạch alloxan 60 mg/kg một liều duy nhất (pha trong nước muối sinh lý, điều kiện tiêm là 0,1 ml/10 g chuột). Sau 72 giờ, lấy máu và đo đường huyết, chuột có đường huyết >200 mg/dl (chuột ĐTĐ) đủ tiêu chuẩn cho thử nghiệm tiếp theo [6].

2.2.2. Đánh giá tính khả dụng của mô hình gây đái tháo đường bởi alloxan

Chia chuột bị ĐTĐ thành 2 lô (đường huyết không khác biệt có ý nghĩa giữa 2 lô): lô chứng bệnh (n=6): không điều trị và cho uống nước cất mỗi ngày; lô thuốc đối chứng (n=6): điều trị bằng glibenclamid liều 5 mg/kg, cho uống mỗi ngày. Lô sinh lý (n=6) là nhóm chuột không gây ĐTĐ và cho uống nước cất mỗi ngày. Ngày đầu tiên cho chuột uống glibenclamid được chọn là ngày 0, đường huyết của các lô chuột được đo vào các ngày 0, 5, 10 và 15.

2.2.3. Đánh giá tác dụng hạ đường huyết của hệ vi tự nhũ berberin

Từ những con chuột đã gây ĐTĐ, chia chuột một cách ngẫu nhiên thành 5 lô với chỉ đường huyết giữa các lô không khác biệt có ý (bảng 1).

Bảng 1. Các lô thử nghiệm tác dụng hạ đường huyết của SMEDDS-BER trên chuột.

Lô	Số lượng	Thuốc điều trị	Liều
Bệnh chứng	8	Uống nước cất mỗi ngày	50 mg/kg/ngày
Lô điều trị 1	8	BER nguyên liệu	50 mg/kg/ngày
Lô điều trị 2	8	SMEDDS-BER	Tá dược tương ứng 50 mg berberin/kg/ngày
Lô placebo	8	SMEDDS placebo	Tá dược tương ứng cho liều tương đương 50 mg berberin/kg/ngày
Lô thuốc đối chứng	8	Glibenclamid	5 mg/kg/ngày

Lô sinh lý (n=8) gồm những chuột không gây ĐTĐ và cho uống nước cất.

Ngày 0 là ngày cho chuột uống lần đầu, đo đường huyết các lô chuột thử nghiệm vào các ngày 0, 5, 10 và 15 (đo đường huyết trước khi cho chuột uống, điều kiện uống là 0,1 ml/10 g chuột, thuốc đối chiếu, glibenclamid được pha trong nước cất, SMEDDS-BER được cho uống trực tiếp).

2.2.4. Phương pháp định lượng đường huyết

Glucose được định lượng bằng phương pháp enzyme quang học theo cơ chế glucose trong mẫu sẽ phản ứng với enzyme glucose oxidase tạo thành hydrogen peroxide, hydrogen peroxide sẽ phản ứng với 4-Aminophenazone và phenol dưới xúc tác của peroxidase tạo ra phức hợp quinoimin có màu hồng, tiến hành đo quang sản phẩm tạo thành và so sánh với chuẩn để nồng độ glucose.

Cho chuột nhịn đói 12 giờ, sau đó lấy chính xác 30 µl máu đuôi chuột cho vào eppendorf có sẵn 50 µl EDTA 3,7 %, lắc đều để tránh đông máu. Ly tâm 1000 vòng/phút trong 5 phút, lấy 45 µl huyết thanh, sau đó đem đo đường huyết bằng phương pháp so màu dưới tác động của enzyme glucose oxidase. Định lượng đường huyết bằng phương pháp quang phổ tử ngoại khả kiến UV-Vis, với bộ kit định lượng glucose oxidase (máy phân tích sinh hóa Clindia SA-20). Nồng độ glucose huyết trong mẫu thử được tính theo công thức sau:

$$\text{Nồng độ glucose huyết (mg/dl)} = \frac{\text{OD (mẫu thử)} - \text{OD (mẫu trắng)}}{\text{OD (mẫu chuẩn)} - \text{OD (mẫu trắng)}} \times \frac{8}{3} \times n$$

trong đó n là hệ số pha loãng mẫu.

2.2.5. Phân tích số liệu thống kê thực nghiệm

Dữ liệu được trình bày dạng giá trị trung bình (Mean)±SD. Sự khác biệt đường huyết giữa các lô được phân tích bằng phương pháp ANOVA (phần mềm Minitab 18.0). Biểu đồ đường huyết được vẽ bằng phần mềm Microsoft Excel 2019.

3. Kết quả

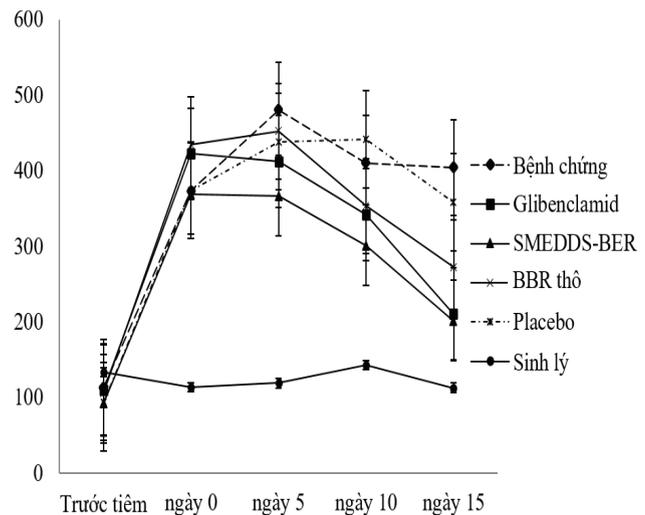
3.1. Đánh giá tính khả dụng của mô hình gây tăng đường huyết bằng alloxan

Dựa vào biểu đồ đường huyết (hình 3) cho thấy, chỉ số đường huyết sau 72 giờ thí nghiệm của chuột gây ĐTĐ bằng alloxan tăng rõ rệt với tỷ lệ thành công là 80%, đường huyết duy trì cao ổn định trong 15 ngày và khác biệt so với lô sinh lý. Vào ngày cuối thử nghiệm, đường huyết lô gây ĐTĐ vẫn tăng cao gấp hơn 2 lần so với lô sinh lý. Điều trị 15 ngày bằng glibenclamid cho thấy, hiệu quả giảm đường huyết trên chuột có ý nghĩa vào ngày 10 (p=0,008) và ngày 15 (p=0,001). Tỷ lệ giảm đường huyết của ngày cuối so với ngày đầu điều trị là 47,65%. Đường huyết lô điều trị bằng glibenclamid giảm có ý nghĩa thống kê tại ngày 10 (p=0,008) và ngày 15 (p=0,039) so với lô gây ĐTĐ không điều trị. Các kết quả trên cho thấy, mô hình gây ĐTĐ bằng alloxan có tính khả dụng, có thể áp dụng để thử nghiệm mẫu thử, glibenclamid phù hợp làm thuốc đối chiếu. Kết quả cũng tương đương với nghiên cứu trước đây [7], cho thấy tính lặp lại của thí nghiệm.



Hình 3. Biểu đồ đường huyết thể hiện tính khả dụng của mô hình gây đái tháo đường bằng alloxan. *: p<0,05 khác biệt đường huyết có ý nghĩa so với ngày 0 ở cùng một lô, #: p<0,05 khác biệt đường huyết có ý nghĩa so với lô alloxan trong cùng một ngày, **: p<0,05 khác biệt đường huyết có ý nghĩa so với trước tiêm.

3.2. Tác dụng hạ đường huyết của hệ vi tự nhũ berberin



Hình 4. Biểu đồ hiệu quả hạ đường huyết của SMEDDS-BER trên mô hình chuột gây đái tháo đường bằng alloxan.

Dựa vào biểu đồ đường huyết sau điều trị (hình 4) cho thấy:

Đường huyết lô bệnh chứng và lô placebo qua 15 ngày thử nghiệm không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với ngày 0.

Đường huyết của chuột ở các lô thử nghiệm trừ lô sinh lý đều tăng có ý nghĩa thống kê so với đường huyết trước tiêm.

Điều trị với SMEDDS-BER đường huyết lô chuột giảm đáng kể vào ngày 15 (p=0,012) so với ngày 0, tỷ lệ giảm đường huyết ở ngày 15 là 45,29% so với ngày 0.

Sau 15 ngày điều trị bằng BER nguyên liệu thô, đường huyết giảm đáng kể vào ngày 10 (p=0,003) và ngày 15 (p=0,001) so sánh với ngày 0, tỷ lệ giảm đường huyết ở ngày 10 và ngày 15 lần lượt là 18,63 và 37,19%. Thuốc đối chứng điều trị glibenclamid với liều 5 mg/kg, đường huyết của chuột giảm đáng kể vào ngày 10 (p=0,023) và 15 (p=0,001) so sánh với ngày 0, tỷ lệ giảm đường huyết ở ngày 10 và 15 lần lượt là 19,05 và 50,03%.

So sánh kết quả hạ đường huyết của SMEDDS-BER với nguyên liệu thô cho thấy hiệu quả hạ đường huyết khác nhau có ý nghĩa thống kê (p=0,009), SMEDDS-BER thể hiện tác dụng hạ đường huyết tốt hơn nguyên liệu BER (45,29 so với 37,19%).

Như vậy, kết quả thực nghiệm cho thấy, SMEDDS-BER với liều 50 mg/kg giúp hạ đường huyết hiệu quả trên chuột gây ĐTĐ bởi alloxan và tương đương glibenclamid liều 5 mg/kg.

Với cùng liều 50 mg/kg berberin clorid, SMEDDS-BER thể hiện tác dụng hạ đường huyết hiệu quả hơn nguyên liệu BER.

4. Bàn luận

BER là một hoạt chất tiềm năng, có nhiều tác dụng dược lý. Tuy nhiên, SKD của nó rất thấp, đó là rào cản cho khả năng hấp thu vào tuần hoàn chung để cho hiệu quả trị liệu. Để cải thiện SKD của BER, hầu hết các nghiên cứu đều tập trung vào bào chế các tiểu phân nano theo nhiều phương pháp như nano lipid, nano polymer, liposome, micelles, dendrimer và nano hỗn dịch đều cho thấy cải thiện đáng kể độ hòa tan, SKD và tác dụng dược lý của BER [4]. SMEDDS-BER khi vào cơ thể sẽ được dịch tiêu hóa và nhu động ruột nhũ hóa pha dầu tạo thành các hạt vi nhũ tương ở kích thước nano chứa BER, các hạt nhũ này có bản chất gần giống cấu trúc màng tế bào, do đó rất dễ vận chuyển qua màng tế bào, cải thiện đáng kể các nhược điểm về độ tan và tính thấm của BER [5].

Nghiên cứu này đã khẳng định, hiệu quả hạ đường huyết của SMEDDS-BER ở liều 50 mg/kg tương đương với glibenclamid 5 mg/kg và vượt trội hơn nhiều so với BER dạng nguyên liệu thô. Qua đó có thể đánh giá SKD của BER khi được bào chế dạng vi tự nhũ sẽ được cải thiện đáng kể. Quá trình bào chế SMEDDS-BER không quá phức tạp, có thể phát triển thêm các nghiên cứu nhằm củng cố hiệu quả của dạng bào chế này, nhằm ứng dụng vào lâm sàng, gia tăng sự lựa chọn an toàn, hiệu quả trong điều trị ĐTĐ.

5. Kết luận

SMEDDS-BER với liều 50 mg/kg giúp hạ đường huyết có ý nghĩa trên chuột gây ĐTĐ bởi alloxan, hiệu quả tương đương với thuốc glibenclamid 5 mg/kg. Với cùng liều 50 mg/kg SMEDDS-BER thể hiện tác dụng hạ đường huyết hiệu quả hơn nhiều so với dạng BER nguyên liệu thô. Qua đó cho thấy, hệ vi tự nhũ chứa BER đã cải thiện được tác dụng hạ đường huyết của BER.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Trường Đại học Lạc Hồng thông qua đề tài mã số LHU-RF-MP-22-07-04.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] International Diabetes Federation Diabetes Atlas (2023), “Diabetes facts and figures”, *International Diabetes Federation*, 10th Edition, <https://idf.org/about-diabetes/diabetes-facts-figures>, accessed 6 January 2023.
- [2] M.A. Neag, A. Mocan, J. Echeverría, et al. (2018), “Berberine: Botanical occurrence, traditional uses, extraction methods, and relevance in cardiovascular, metabolic, hepatic, and renal disorders”, *Frontiers in Pharmacology*, **9**, DOI: 10.3389/fphar.2018.00557.
- [3] X. Xu, H. Yi, J. Wu, et al. (2021), “Therapeutic effect of berberine on metabolic diseases: Both pharmacological data and clinical evidence”, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **133**, DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110984.
- [4] C.S. Liu, Y.R. Zheng, X.Y. Long, et al. (2016), “Research progress on berberine with a special focus on its oral bioavailability”, *Fitoterapia*, **109**, pp.274-282, DOI: 10.1016/j.fitote.2016.02.001.
- [5] L.V. Van, C.V. Nguyen, V.T. Tran (2021), “Development of self-microemulsifying drug delivery system of berberine”, *Vietnam Journal of Pharmacology*, **38**, pp.91-96 (in Vietnamese).
- [6] O.M. Ighodaro, A.M. Adeosun, O.A. Akinloye (2017), “Alloxan-induced diabetes: A common model for evaluating the glycemic-control potential of therapeutic compounds and plant extracts in experimental studies”, *Medicina (Kaunas)*, **53(6)**, pp.365-374, DOI: 10.1016/j.medic.2018.02.001.
- [7] P. Ambika, S.N. Nair (2019), “Wound healing activity of plants from the Convolvulaceae family”, *Advances in Wound Care (New Rochelle)*, **8(1)**, pp.28-37, DOI: 10.1089/wound.2017.0781.