

NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG CHỐNG OXY HOÁ CỦA CHẾ PHẨM PANTOGIN

Phạm Thành Suôi^{}; Phạm Hùng Lược^{*}
Nguyễn Văn Minh^{**}; Trịnh Văn Lầu^{***}*

TÓM TẮT

Pantogin được bào chế từ sâm nhung, là “loại thuốc bổ đầu tay”. Thành phần có hoạt tính chủ yếu của nhân sâm là hỗn hợp > 30 triterpenoid saponin, được gọi là các ginsenoside, chúng thể hiện những tác dụng sinh học rất đa dạng trong đó có tác dụng chống oxy hoá. Phương pháp đánh giá hoạt tính chống oxy hóa của chế phẩm có nguồn gốc tự nhiên dựa trên các chỉ tiêu: đo thiobarbituric acid reacted substances (TBA-RS), protein carbonyl trong mô gan chuột thực nghiệm gây độc cho gan bằng carbon tetrachlorid (CCl₄).

* Từ khoá: Pantogin; Tác dụng chống oxy hoá.

STUDY OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PANTOGIN

Pham Thanh Suoi
Pham Hung Luc
Nguyen Van Minh
Trinh Van Lau

SUMMARY

As one of the most tonic traditional medications, combination of ginseng and cornu cervi were studied and developed into a modern product pantogin. The main active ingredients of ginseng contains a mixture of over 30 triterpenoid saponins, commonly referred to as ginsenosides, which have manifested a variety of bio-activities, including antioxydant effects. Methods to evaluate the antioxydant activity of products of natural origin are based on certain criteria such as measuring thiobarbituric acid reacted substances (TBA-RS) and protein carbonyl (PC) contents in hepatic tissues of mice whose liver injury has been induced by CCl₄.

* Key words: Pantogin; Antioxidant activity.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Những năm gần đây, đặc tính chống oxy hóa của các loại thảo dược đã được quan tâm để ứng dụng trên người.

Pantogin được bào chế từ các dược liệu quý như sâm, nhung, là “thuốc bổ đầu tay”. Sản phẩm này là sự kế thừa những thành quả của y học Cổ truyền và kinh nghiệm

* Trường Đại học Y Dược Cần Thơ

** Học viện Quân y

*** Viện Kiểm nghiệm thuốc TW

Phản biện khoa học: PGS. TS. Vũ Mạnh Hùng

dân gian, đồng thời vận dụng những tiến bộ của khoa học hiện đại để nghiên cứu, hiện đại hoá dạng bào chế với mong muốn giữ được tác dụng vốn có của bài thuốc. Thành phần có hoạt tính chủ yếu của nhân sâm là hỗn hợp > 30 triterpenoid saponin thường được gọi là các ginsenoside, chúng có tác dụng sinh học rất đa dạng, trong đó có tác dụng chống oxy hoá, bảo vệ tế bào gan tránh khỏi tổn thương do tác nhân như hoá chất, các gốc tự do gây ra. Từ thực tiễn trên, chúng tôi thực hiện đề tài này nhằm góp phần làm sáng tỏ cơ chế tác dụng của những thuốc có chứa nhân sâm, để có cơ sở bảo tồn và phát huy những vốn quý của nền y dược học Cổ truyền Việt Nam, góp phần đáp ứng nhu cầu sử dụng thuốc của nhân dân.

ĐỐI TƯỢNG, NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng, nguyên vật liệu nghiên cứu.

- Pantogin dựa trên công thức gồm: nhân sâm, nhung hươu, sữa ong chúa.

- Động vật thử nghiệm: chuột nhắt trắng (được) giống DDY, trọng lượng 22 ± 2 g (5 - 6 tuần tuổi), do Viện Pasteur TP. Hồ Chí Minh cung cấp.

- Nguyên liệu, hoá chất khảo sát tính chống oxy hoá:

Coomassie (Bradford), 2, 4 - dinitrophenylhydrazin (2,4-DNPH 0,2%), guanidinchlorid 6M (pH6,5) (Merck), acid thiobarbituric (TBA 0,5%) (Merck), acid trichloroacetic (TCA

20%) (Unichem), carbon tetrachloride (Unichem), chất chuẩn Malonaldehyde bis (Sigma - Aldrich), chất chuẩn BSA (bovine serum albumin) (Sigma).

Đo phổ hấp thu UV của mẫu thử trên máy U-1900 UV/VIS Specphotometer 200 V (Hitachi), máy nghiền đồng thể Sonicator 3080 (USA).

2. Phương pháp nghiên cứu.

Đánh giá hoạt tính chống oxy hoá dựa theo phương pháp xây dựng đường chuẩn MDA, protein toàn phần, định lượng thiobarbituric acid reacted substances (TBA-RS) và định lượng PC (protein carbonyl). Tính toán kết quả theo lượng protein toàn phần trong các mẫu thử nghiệm, thực hiện theo quy trình thử đã được công bố.

** Xác định hàm lượng TBA-RS:*

TBA-RS là một trong các sản phẩm trung gian của quá trình peroxy hóa lipid màng tế bào, khi cho phản ứng với acid thiobarbituric, một phân tử TBA-RS phản ứng với hai phân tử thiobarbituric tạo phức màu hồng hấp thu cực đại ở bước sóng 532 nm. Phản ứng được thực hiện ở môi trường pH 2 - 3, nhiệt độ 90 - 100°C trong vòng 60 phút. Đo cường độ màu của phức suy ra lượng TBA-RS có trong mẫu. Nếu lượng TBA-RS giảm so với mẫu chứng, mẫu được xác định là có hoạt tính chống oxy hóa.

Cách tiến hành: chia chuột thành 9 lô, mỗi lô 10 con và uống nước cất (0,1 ml/10 g), dầu ôliu (0,4 ml/kg, SC), CCl₄ (0,025

ml/kg, SC). Thử nghiệm thuốc với thời gian khác nhau: thử nghiệm phòng ngừa 7 ngày gây độc gan, 10 ngày gây độc gan, 14 ngày gây độc gan. Tất cả chuột được giết, lấy gan cho thử nghiệm mô học và hoá sinh: lô 1 (chứng): nước cất, dầu ôliu; lô 2: nước cất, CCl₄; lô 3: thuốc thử, CCl₄.

Cân lấy 50 mg gan (vì tính toán dựa vào lượng protein toàn phần) nghiền mô tạo dịch đồng thể 5% trên máy nghiền đồng thể trong dung dịch đệm phosphat buffer saline (PBS, pH 7,4). Ly tâm (lượng protein đã được loại hết) lấy 200 µl dịch, thêm 500 µl nước cất, 100 µl SDS 10%. Ủ hỗn hợp ở 37°C trong 30 phút. Thêm 500 µl HCl 0,1 N, lắc kỹ 15 phút. Ly tâm, dùng micropipette hút 1 ml dịch, thêm vào 250 µl TBA 0,5%. Đun cách thủy ở 95°C trong 60 phút. Để nguội đến nhiệt độ phòng. Đo quang phổ ở bước sóng 532 nm.

Tất cả các giai đoạn từ lấy mẫu, cân cho đến nghiền mẫu đều được tiến hành ở nhiệt độ 0 - 4°C.

** Xác định hàm lượng protein carbonyl:*

Protein carbonyl được sinh ra trong quá trình oxy hóa protein, khi cho phản ứng với 2,4-dinitrophenylhydrazin (DNPH) tạo tủa, hoà tan tủa trong guanidinchlorid cho dung dịch có màu vàng, đo quang phổ ở bước sóng 370 nm.

** Cách tiến hành:* giết chuột lấy gan (50 mg), nghiền mẫu mô tạo dịch đồng thể 6,7% trên máy nghiền đồng thể trong dung dịch đệm PBS pH 6,5. Ly tâm lấy dịch. Tất

cả các giai đoạn từ lấy mẫu, cân cho đến nghiền mẫu đều được tiến hành ở nhiệt độ 0 - 4°C.

Bảng 1: Hỗn hợp phản ứng định lượng protein carbonyl.

THÀNH PHẦN	ỐNG CHỨNG (µl)	ỐNG THỬ (µl)	NỒNG ĐỘ (mM)
100 mM PBS (pH 7,2)	320	320	
80 mM FeSO ₄ .7H ₂ O	20	20	
8 mM FeCl ₃ .6H ₂ O	20	20	2
4 M KCl	20	20	
0,4 M MgCl ₂ .2H ₂ O	20	20	0,2
Mẫu thử	200	200	10
Sau phản ứng			
Nước cất	120	120	
Tổng cộng	720	720	

Ủ hỗn hợp ở 30°C trong 30 phút. Cho vào hỗn hợp 720 µl TCA 20%, ly tâm bỏ dịch. Thêm vào ống chứng 720 µl HCl 2 N, ống thử 720 µl 2,4-DNPH 0,2%, lắc nhẹ trong 60 phút. Thêm vào mỗi mẫu 720 µl TCA 20%, vortex 10 giây, ly tâm (3.000 vòng x 15 phút). Rửa cần 3 lần với 1,5 ml dung dịch ethanol/ethyl acetat (tỷ lệ 1:1), để khô. Hòa tan trong 1,2 ml guanidinchloride 6 M, ly tâm, lấy dịch, đo quang phổ ở bước sóng 370 nm.

** Xác định hàm lượng protein toàn phần:* phản ứng tạo màu của protein và coomassie.

Phương pháp tiến hành: pha các mẫu đo theo bảng 2. Đo quang phổ ở bước sóng 595 nm.

Bảng 2: Thành phần hỗn hợp phản ứng định lượng protein toàn phần.

THÀNH PHẦN	ÔNG CHỨNG	ÔNG THỬ
Nước	500 µl	498 µl
Coomassie	500 µl	500 µl
Dịch gan		2 µl
Tổng cộng	1 ml	1 ml

* *Xử lý số liệu:*

Xử lý số liệu bằng phương pháp thống kê y - sinh học: phân tích phương sai một

yếu tố với t-test. Giá trị $p < 0,05$ được xem là khác biệt có ý nghĩa thống kê.

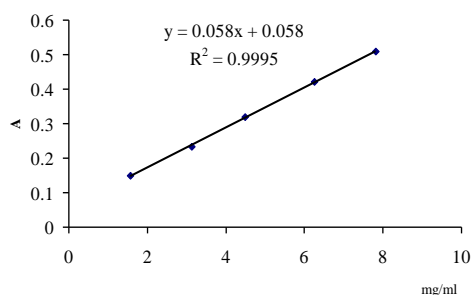
* *Địa điểm nghiên cứu:* Bộ môn Dược lý, Khoa Dược, Đại học Y Dược TP. HCM.

* *Thời gian nghiên cứu:* từ tháng 3 đến 6 năm 2009.

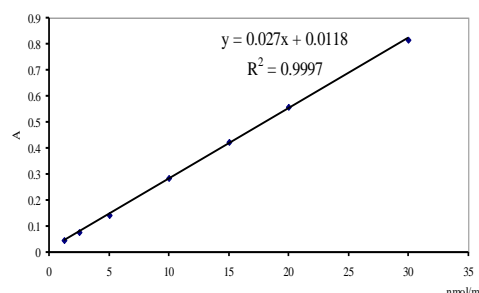
* *Khảo sát mô học:* lấy mẫu mô gan ở các lô thử nghiệm, nhuộm theo phương pháp hematoxylin-eosin, thực hiện tại Bộ môn Giải phẫu bệnh, Đại học Y Dược TP. HCM.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

* *Kết quả xác định hàm lượng TBA-RS và protein carbonyl:*



Biểu đồ 1: Phương trình đường chuẩn protein toàn phần.



Biểu đồ 2: Phương trình đường chuẩn TBA-RS.

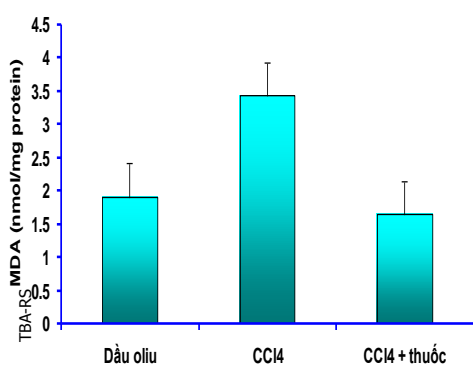
Sau khi có kết quả đo độ hấp thụ, thay vào đường chuẩn để tính toán hàm lượng TBA-RS (nmol/ml), tương tự thì cũng thay vào đường chuẩn để tính lượng protein toàn phần (mg/ml). Sau đó tính toán lượng TBA-RS theo lượng protein toàn phần.

$$\frac{\text{Nmol/ml}}{\text{Mg/ml}} = \text{nmol/mg}$$

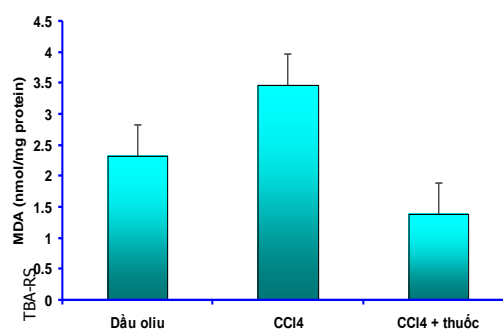
Bảng 3: Hàm lượng TBA-RS (nmol/mg protein).

	HÀM LƯỢNG TBA-RS (nmol/mg protein)	HTCO ^(*) (%)
Lô thử nghiệm dự phòng 7 ngày gây độc gan		
Nước cất + dầu ôliu	2,0890 ± 0,2353	
Nước cất + CCl ₄	3,4206 ± 0,3579	0
(1)	(2)	(3)
Thuốc + CCl ₄	1,7279 ± 0,2897	49,49
Lô thử nghiệm dự phòng 10 ngày gây độc gan		
Nước cất + dầu ôliu	1,9142 ± 0,2247	
Nước cất + CCl ₄	3,4341 ± 0,1396	0
Thuốc + CCl ₄	1,647 ± 0,2141	52,04
Lô thử nghiệm dự phòng 14 ngày gây độc gan		
Nước cất + dầu ôliu	2,3300 ± 0,1799	
Nước cất + CCl ₄	3,4740 ± 0,2410	0
Thuốc + CCl ₄	1,3923 ± 0,1323	59,92

HTCO^(*) (%): hoạt tính chống oxy hoá tính theo TBA-RS.



Biểu đồ 3: Kết quả khảo sát hàm lượng TBA-RS ở thử nghiệm dự phòng 10 ngày gây độc.



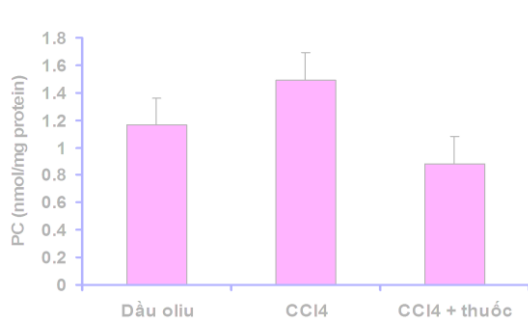
Biểu đồ 4: Kết quả khảo sát hàm lượng TBA-RS ở thử nghiệm dự phòng 14 ngày gây độc.

So sánh TBA-RS trong gan với HTCO^(*) (%) được tính với nhóm gây độc cho gan bằng CCl₄. Nếu xem HTCO^(*) (%) của nhóm gây độc cho gan bằng CCl₄ là 0% thì HTCO^(*) (%) của thử nghiệm thay đổi như sau:

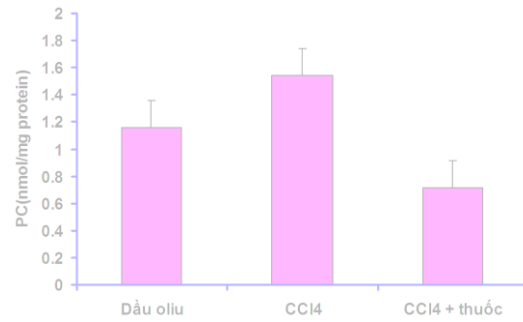
- Sau 7 ngày dùng thuốc dự phòng, thuốc thể hiện HTCO^(*) (%) 49,49% (p < 0,05).
- Sau 10 ngày dùng thuốc dự phòng, HTCO^(*) (%) tăng lên 52,04% (p < 0,01).
- Sau 14 ngày dùng thuốc dự phòng, thuốc thể hiện HTCO^(*) (%) cao nhất (59,92%) (p < 0,001).

Bảng 4: Kết quả xác định hàm lượng protein carbonyl.

LÔ THỬ	HÀM LƯỢNG PC ($\mu\text{mol/mg protein}$)	HTCO ^(*) (%)
Lô thử nghiệm dự phòng 7 ngày gây độc gan		
Nước cất + dầu ôliu	1,1798 \pm 0,1252	
Nước cất + CCl ₄	1,5214 \pm 0,1206	0
Thuốc + CCl ₄	1,0637 \pm 0,1097	30,01
Lô thử nghiệm dự phòng 10 ngày gây độc gan		
Nước cất + dầu ôliu	1,1627 \pm 0,1083	
Nước cất + CCl ₄	1,49 \pm 0,17	0
Thuốc + CCl ₄	0,883 \pm 0,0538	40,74
Lô thử nghiệm dự phòng 14 ngày gây độc gan		
Nước cất + dầu ôliu	1,1571 \pm 0,1079	
Nước cất + CCl ₄	1,5441 \pm 0,0893	0
Thuốc + CCl ₄	0,7155 \pm 0,0459	53,66



Biểu đồ 5: Thay đổi hàm lượng PC trong gan ở thử nghiệm 10 ngày dự phòng gây độc.

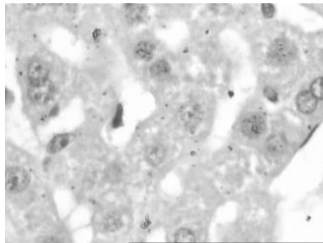


Biểu đồ 6: Thay đổi hàm lượng PC trong gan ở thử nghiệm 14 ngày dự phòng gây độc.

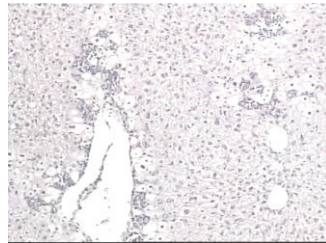
So sánh protein carbonyl trong gan với HTCO^(*) (%) với nhóm gây độc cho gan bằng CCl₄. Nếu xem HTCO^(*) (%) của nhóm gây độc cho gan bằng CCl₄ là 0% thì HTCO^(*) (%) của lô thử nghiệm thay đổi như sau:

- Sau 7 ngày dùng thuốc dự phòng, thuốc thể hiện HTCO^(*) (%) là 30,01% (p < 0,05).
- Sau 10 ngày dùng thuốc dự phòng, HTCO^(*) (%) tăng lên 40,74% (p < 0,01).
- Sau 14 ngày dùng thuốc dự phòng, thuốc thể hiện HTCO^(*) (%) cao nhất (53,66%) (p < 0,001).

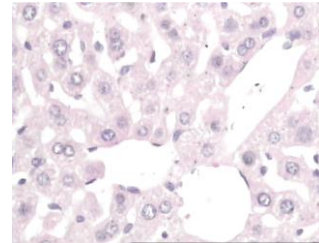
Kết quả khảo sát vai trò bảo vệ tế bào gan của viên nang pantogin ở thử nghiệm 14 ngày dự phòng gây độc (n = 6) trong mỗi lô:



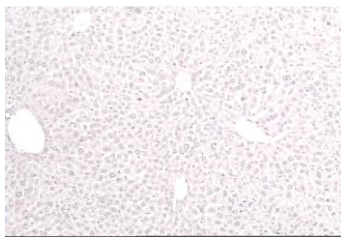
Nhóm chứng tiêm dầu oliu.



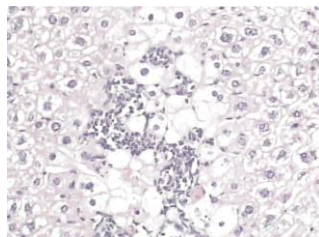
Nhóm tiêm CCl₄/dầu oliu.



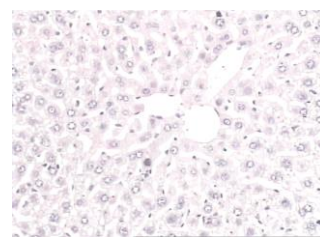
Nhóm tiêm CCl₄/ôliu + thuốc.



Tế bào gan bình thường.



Tế bào gan bị tổn thương.



Tế bào gan bình thường.

Hình 1: Vai trò của viên nang pantogin đối với tổn thương tế bào gan gây ra do CCl₄ qua nhuộm HE.

- Dầu ôliu (liều 0,025 ml/kg) không làm thay đổi cấu trúc tế bào gan.

- Sau 24 giờ gây độc gan bằng CCl₄ (liều 0,025 ml/kg) thấy tế bào gan thoái hóa.

- Với nhóm chuột có dùng thuốc 7 ngày, 10 ngày, 14 ngày, thuốc thể hiện khả năng bảo vệ tế bào gan, tế bào gan bình thường không bị tổn thương.

BÀN LUẬN

* Kết quả chống oxy hóa:

Thông qua 2 chỉ tiêu là hàm lượng TBA-RS và protein carbonyl với mô hình gây viêm gan cấp bằng CCl₄ trên chuột thực nghiệm, kết quả cho thấy chế phẩm pantogin có khả năng chống oxy hóa sau 7 ngày dùng thuốc, thời gian dùng thuốc càng lâu, tác dụng chống oxy hóa càng rõ (thử nghiệm 10 ngày, 14 ngày). Do đây là thuốc có nguồn gốc từ thảo dược nên cần một thời gian đủ dài để thuốc đạt được tác dụng bảo vệ tế bào gan. Mặt khác, để có tác dụng chống oxy hóa, ginsenoside trong nhân sâm và protein trong sữa ong chúa phải được chuyển hóa tạo ra các chất có tác dụng chống oxy hoá, cải thiện những tổn thương tế bào gan do CCl₄ tạo ra.

HTCO^(*) (%) được tính toán dựa trên khả năng làm giảm gia tăng hàm lượng TBA-RS hoặc protein carbonyl trong gan do CCl₄ gây độc cho gan.

* Kết quả mô học:

Kết quả khảo sát khả năng chống oxy hóa của viên nang pantogin dựa trên 2 chỉ tiêu là hàm lượng TBA-RS và protein carbonyl hoàn toàn phù hợp với kết quả rút ra từ khảo sát sự tổn thương tế bào gan bằng

phương pháp nhuộm HE. Khả năng bảo vệ tế bào gan của chế phẩm thể hiện hiệu quả cao trong việc chống lại quá trình oxy hóa gây độc tế bào gan.

KẾT LUẬN

Chế phẩm viên nang pantogin thể hiện vai trò bảo vệ tế bào gan chống lại các tác nhân oxy hoá sinh ra từ carbon tetrachlorid, một tác nhân gây độc tế bào gan. Kết quả mô học cho thấy khả năng bảo vệ tế bào gan rất cao, tế bào gan bình thường, không bị tổn thương bởi carbon tetrachlorid (liều 0,025 ml/kg). Kết quả này hoàn toàn phù hợp với khảo sát khả năng làm giảm hàm lượng TBA-RS và protein carbonyl, là hai sản phẩm sinh ra trong quá trình oxy hóa tế bào. Pantogin là phối hợp của ba dược liệu: nhân sâm, nhung hươu, sữa ong chúa, có khả năng chống oxy hóa và bảo vệ tế bào gan chống lại tác nhân gây độc hại là carbon tetrachlorid. Pantogin là sản phẩm của sự kế thừa và phát huy những kinh nghiệm dân gian bằng các dạng bào chế hiện đại với mong muốn vừa giữ được tác dụng vốn có của bài thuốc, vừa đáp ứng được yêu cầu chất lượng của một dạng bào chế hiện đại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trần Phi Hoàng, Võ Phùng Nguyên. Khảo sát tác dụng chống oxy hoá in-vivo của một số dẫn chất flavon bán tổng hợp từ rutin. Y học TP. Hồ Chí Minh. 2009, 13, tr.157-163.

2. *Antolovich M., Prenzler P.D., Patsalides E.* Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*. 2002, pp.183-198.

3. *Byung Hoon Han, Myung Hwan Park, Yong Nam Han.* Studies on the antioxidant components of Korean ginseng. The mechanism of antioxidant activity of maltol and phenolic acid. *Korean Biochem*. 1985, 18 (4), pp.337-340.

4. *David D. Kitts, Arosha N. Wijewickreme, Chun Hu.* Antioxidant properties of a North American ginseng extract. University of British Columbia. 2000.

5. *Hang Guo, Yoshiaki Kouzuma, Masami Yonekura.* Isolation and properties of antioxidative peptides from water-soluble Royal jelly protein hydrolysate. *Food sci. Technol. Res*. 2005, pp.222-230.

6. *Michael Antolovich, Paul D. Prenzler, Emiliós Patsalides, Suzanne McDonald, Kevin Robards.* Method for testing antioxidant activity. *Analyst*. 2002, pp.183-198.

