

KHẢO SÁT MÔ HÌNH VÀ NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG GIẢI LO ÂU CỦA MỘT SỐ PHỐI HỢP TỪ DƯỢC LIỆU

Nguyễn Sơn Tùng*, Nguyễn Ngọc Khôi*

TÓM TẮT

Mở đầu: Việc tìm ra những thuốc giải lo âu mới không có hoặc có ít tác dụng có hại là một nhu cầu rất bức thiết hiện nay. Do đó, việc khảo sát các mô hình có thể áp dụng nhằm sàng lọc các thuốc chữa bệnh phong phú và an toàn từ tự nhiên hay tổng hợp là hết sức cần thiết.

Mục tiêu: Khảo sát các mô hình dược lý nhằm nghiên cứu tác dụng giải lo âu, qua đó, khảo sát thăm dò tác dụng giải lo âu của các công thức phối hợp từ những cao dược liệu.

Phương pháp: Ba mô hình nghiên cứu tác dụng giải lo âu được khảo sát bao gồm mô hình môi trường mở, mô hình chữ thập nâng cao và mô hình ngăn sáng - tối. Chuột nhắt đực trắng, chủng Swiss abino được cho uống các phối hợp cao chiết CT1, CT2 và CT3 phối hợp từ các cao chiết dược liệu là rau má, quế và nhân sâm, có so sánh với diazepam 2 mg/kg.

Kết quả: Khi sử dụng diazepam liều 2mg/kg (p.o.) thể hiện tác dụng tác dụng giải lo âu trên chuột nhắt. Khi khảo sát tác dụng của 3 công thức trên cả 3 mô hình dược lý thực nghiệm môi trường mở, chữ thập nâng cao, ngăn sáng-tối đều lặp lại kết quả 3 công thức thử nghiệm không có tác dụng giải lo âu.

Kết luận: Đề tài đã thành công trong việc chứng tỏ có thể áp dụng ba mô hình trong điều kiện thực tế nhằm sàng lọc các hoạt chất có tác dụng giải lo âu.

Từ khóa: mô hình giải lo âu, chuột nhắt, Swiss abino, rau má, quế, nhân sâm

ABSTRACT

EVALUATING THE APPLICABILITY OF ANXIETY MODELS FOR SCREENING SOME NATURAL PRODUCTS FORMULAE

Nguyen Son Tung, Nguyen Ngoc Khoi

* Y Hoc TP. Ho Chi Minh * Vol. 14 - Supplement of No 1 - 2010: 80 – 85

Background: The use of animal models of anxiety has been fundamental in the search for new anxiolytic compounds and for the understanding of the brain mechanisms underlying anxiety.

Objectives: To evaluate the applicability of mouse models for screening anxiolytic compounds. In this study, three formulae from *Centella asiatica*, *Cinnamomum cassia* and *Panax ginseng* extracts were used as testers.

Method: Five-week-old male Swiss albino mice were used. Three models in mice were investigated including open field (OF), elevated plus-maze (EPM) and light dark (LD) test. Compounds were administered at a rate of 0.1 ml/10 g and diazepam 2 mg/kg as a positive control. All test were performed sixty minutes after receiving the oral treatments.

Results: These above mentioned formulae administered groups did not reveal any changes in anxiety-like behaviours. However, diazepam 2 mg/kg administered group showed displayed an increased number of entries and spent more time in the centre area in OF, significantly increased in the percentage of open arm entries and the time spent on the open arm in EPM, and spent more time in light box in LD test.

* Khoa Dược - Đại học Y Dược Tp.HCM
Địa chỉ liên hệ: DS. Nguyễn Sơn Tùng

ĐT: 0973678579

Email: k2cst@yahoo.com

Conclusion: All together, we provide evidence that these models is sensitive and applicable, and diazepam 2 mg/kg is a good positive control for the screening of anxiolytic-like effects.

Key words: anxiolytic, mice, Swiss abino, *Centella asiatica*, *Cinnamomum cassia*, *Panax ginseng*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Bên cạnh việc nghiên cứu các dược phẩm tổng hợp mới, con người nhận ra nguồn thuốc chữa bệnh phong phú và an toàn từ tự nhiên. Nhiều dược liệu (đa số nghiên cứu trên cao toàn phần) đã được phát hiện là có tác dụng giải lo âu trên các thử nghiệm dược lý trên thú vật. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành khảo sát các mô hình dược lý nhằm nghiên cứu tác dụng giải lo âu, qua đó, khảo sát thăm dò tác dụng giải lo âu của các công thức phối hợp từ những cao dược liệu như rau má, quế và nhân sâm. Đây là các dược liệu đã được chứng minh có tác dụng giải lo âu^(1, 2, 3) và nguồn dược liệu lớn, dễ tìm với hy vọng có thể giảm liều sử dụng so với khi sử dụng từng cao riêng lẻ mà vẫn duy trì hiệu quả tác dụng giải lo âu, làm tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo.

NGUYÊN LIỆU - PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguyên liệu

Ba dược liệu đã được lựa chọn để nghiên cứu trong đề tài này gồm có: rau má (*Centella asiatica* (L.) Urban), quế (*Cinnamomum cassia* Blume) và nhân sâm (*Panax ginseng* C.A. Meyer) được mua tại TP Hồ Chí Minh. Các dược liệu đều được lưu mẫu tại Ban nghiên cứu khoa học, Khoa Dược, ĐH Y-Dược TP Hồ Chí Minh.

Súc vật nghiên cứu: Chuột nhắt đực trắng (chủng Swiss abino, 5 – 6 tuần tuổi, khối lượng từ 20 – 25 g) được cung cấp bởi Viện Vắc xin & Sinh phẩm Y tế Nha Trang. Chuột được nuôi ổn định một tuần bằng thức ăn thường trước khi tiến hành thử nghiệm.

Hóa chất: diazepam (Valium®), asiaticosid chuẩn được cung cấp bởi Ban Nghiên Cứu Khoa Học, Khoa Dược, ĐH Y-Dược TP HCM

Chiết xuất: Nguyên liệu được sấy ở 50 °C trong 4 giờ, đem xay để đạt kích thước 1 – 3

mm. Cam thảo được chiết bằng nước bằng phương pháp đun hồi lưu (2 lần). Nghệ được chiết bằng cồn 96° theo phương pháp ngâm kiệt. Nhân sâm được chiết lần lượt bằng phương pháp đun hồi lưu với cồn 90 độ (3 lần) và cồn 45° (3 lần). Tỷ lệ dung môi: dược liệu 1: 10. Tất cả dịch chiết sau đó được cô giảm áp đến khi được cao lỏng. Kết quả chiết xuất được tính sau khi đã trừ độ ẩm.

Định lượng

Cao rau má: Mẫu cao toàn phần được cho vào cột Diaion HP-20, rửa giải lần lượt bằng nước, metanol 50% và metanol. Lấy phân đoạn metanol 50% và metanol, bay hơi dung môi để thu được saponin toàn phần. Định lượng asiaticosid trong saponin toàn phần từ cao rau má bằng phương pháp HPLC. Các điều kiện tiến hành HPLC: Máy HPLC LC-10AD (Shimadzu, Nhật). Cột Supelcosil LC18 (250 x 4,6 mm), kích thước hạt 5 µm, kèm cột bảo vệ Supelguard (20 x 4,6 mm). Pha động: acetonitril - metanol - nước (25: 20: 55). Tốc độ dòng: 0,7 ml/phút. Mẫu thử: cân chính xác khoảng 10 mg saponin toàn phần, hòa tan trong 5 ml pha động, lọc qua lọc 0,45 µm trước khi bơm vào máy HPLC. Thể tích bơm: 10 µl. Dectector PDA, bước sóng phát hiện: 203 nm.

Cao quế: Tiến hành theo phương pháp định lượng acid hữu cơ trong dược liệu, "Bài giảng Dược liệu", tập 1, ĐH Dược Hà Nội. Cân 500 mg cao toàn phần, hòa tan vào nước và lọc qua giấy lọc vào bình định mức 100 ml, thêm nước cho đủ 100 ml. Lấy 10 ml dịch nước này cho qua cột nhựa cationit để loại các cation. Dịch nước rửa giải được trung hòa bằng Ba(OH)₂ 0,01N. Qua lượng Ba(OH)₂ tiêu thụ ta định lượng được acid hữu cơ toàn phần trong cao quế.

Cao nhân sâm: Định lượng G-Rb₁ và G-Rg₁ trong saponin toàn phần từ cao nhân sâm bằng

phương pháp HPLC. Máy HPLC LC-10AD (Shimadzu, Nhật), cột Supelcosil LC18 (250 x 4,6 mm), kích thước hạt 5 µm, kèm cột bảo vệ Supelguard (20 x 4,6 mm), pha động: acetonitril – nước (33: 67), tốc độ dòng: 0,7 ml/ phút. Cân 6,63 mg saponin toàn phần, hòa tan trong pha động, lọc qua lọc 0,45 µm trước khi bơm vào máy HPLC với thể tích bơm: 10 µl. Detector PDA, bước sóng phát hiện: 203 nm.

Các quy trình định lượng trên đã được thẩm định về độ đúng và độ chính xác (được xây dựng để định lượng saponin sâm Triều Tiên và nghệ tại Ban NCKH – Khoa Dược).

Các công thức phối hợp dược liệu được khảo sát

Tác dụng giải lo âu của rau má, nhân sâm, quế đã được chứng minh với các liều có tác dụng như sau:

Rau má: liều asiaticosid 10 mg/kg (p.o.) có tác dụng giải lo âu trên chuột nhất thử nghiệm trong mô hình chữ thập nâng cao⁽³⁾.

Quế: cao toàn phần chiết bằng cồn 50% của quế có tác dụng giải lo âu trên chuột nhất ở liều 750 mg cao/kg (p.o.), trong mô hình dược lý thực nghiệm chữ thập nâng cao⁽¹⁾.

Nhân sâm: liều 1200 mg bột nhân sâm/kg (p.o.), 100 mg saponin toàn phần/kg (i.p.) và 5mg saponin G-Rb₁/kg (i.p.) đều có tác dụng giải lo âu trong thử nghiệm chữ thập nâng cao ở chuột nhất⁽²⁾.

Vì mục đích thăm dò có hay không tác động hiệp lực giữa các dược liệu này, chúng tôi phối hợp chúng với liều thấp hơn liều ở trên. Cụ thể, chúng tôi dùng rau má với liều khoảng 3-5 mg asiaticosid/kg, tương đương với khoảng 100-150 mg cao toàn phần/kg (hàm lượng asiaticosid của mẫu cao toàn phần rau má trong đề tài này là 3,23%). Liều asiaticosid 5 mg/kg đã được chứng minh là không có tác dụng giải lo âu khi sử dụng riêng lẻ ⁽³⁾. Bên cạnh đó, để đảm bảo tính khả thi khi dùng cho người (liều dược liệu sử dụng không thể quá lớn, phải ở mức có thể chấp nhận được) chúng tôi hạn chế tổng liều

của các dược liệu ở mức 200 mg cao/kg cân nặng chuột. Vì những lý do trên, các công thức phối hợp được đưa ra thử nghiệm trên chuột nhất (tính trên kg cân nặng của chuột) như sau:

Công thức 1:

Rau má: 150 mg cao khô/kg.

Quế: 50 mg cao khô/kg.

Công thức 2:

Rau má: 100 mg cao khô/kg.

Quế: 100 mg cao khô/kg.

Công thức 3:

Rau má: 150 mg cao khô/kg.

Quế: 25 mg cao khô/kg.

Nhân sâm: 25 mg cao khô/kg.

Bố trí thí nghiệm

Tất cả chuột được mã hóa bằng chữ và số để thuận tiện cho việc phân tích kết quả sau này. Chuột được chia ngẫu nhiên thành 5 nhóm:

- Nhóm 1: nhóm chứng, uống nước cất.
- Nhóm 2: nhóm đối chiếu, uống diazepam liều 2 mg/kg.
- Nhóm 3: nhóm thử, uống công thức 1.
- Nhóm 4: nhóm thử, uống công thức 2.
- Nhóm 5: nhóm thử, uống công thức 3.

Mô hình môi trường mở (Open field test): Bộ dụng cụ gồm 1 hộp kích thước 40 x 40 x 40 cm, với tường trong suốt, đáy hộp được chia ra làm 16 ô vuông có kích thước bằng nhau (10 x 10 cm). Sàn được chia làm vùng rìa và vùng trung tâm (kích thước 20 x 20 cm, nằm ở giữa). Cường độ chiếu sáng ở sàn là 100 lux. Chuột thử nghiệm được cho uống 60 phút trước khi thử nghiệm. Tất cả chuột được đặt cố định vào 1 góc của mô hình, thực hiện thử nghiệm trong 5 phút, ghi nhận số ô vuông chuột di chuyển vào, số lần đứng lên, thời gian và số lần vào vùng trung tâm. Chuột được tính là di chuyển 1 ô hoặc 1 lần vào vùng trung tâm khi cả 4 chân của chuột bước qua vạch phân cách.

Mô hình chữ thập nâng cao (Elevated plus-maze)

Bộ dụng cụ gồm 2 cánh tay mở (30 cm x 5 cm) và 2 cánh tay đóng (30 cm x 5 cm) với tường cao 25 cm, làm bằng plexiglas. Phần giao nhau giữa các cánh tay là 1 hình vuông (5 cm x 5 cm). Cánh tay mở có gờ cao 0,25 cm bao quanh để ngăn chuột rơi xuống đất. Bộ cánh tay được đặt cao hơn nền nhà 73 cm, cường độ chiếu sáng ở cánh tay mở là 20 lux. Chuột thử nghiệm được cho uống 60 phút trước khi thử nghiệm. Tất cả chuột được đặt ở vùng trung tâm, hướng về phía cánh tay mở, sau đó chuột được tự do di chuyển khám phá trong 5 phút, ghi nhận số lần ra vào và thời gian lưu lại ở các vùng cánh tay (đóng và/hoặc mở) của chuột. Chuột được tính 1 lần vào cánh tay mở khi cả 4 chân của chuột bước qua vạch phân cách giữa vùng trung tâm và cánh tay mở.

Mô hình ngăn sáng - tối (Light - dark test)

Bộ dụng cụ gồm 1 hộp làm bằng plexiglas, có 2 ngăn, mỗi ngăn có kích thước 40 x 20 cm. Trong đó 1 ngăn được chiếu sáng với cường độ 400 lux, gọi là ngăn sáng. Ngăn còn lại được sơn đen để giữ tối với cường độ ánh sáng không quá 5 lux, gọi là ngăn tối. Hai ngăn này thông với nhau bằng một cửa có kích thước 8 x 8 cm. Chuột thử nghiệm được cho uống 60 phút trước khi tiến hành thử nghiệm. Chuột được đặt ở cửa ngăn cách vùng sáng, tối, hướng ra ngăn sáng. Sau đó chuột được tự do khám phá trong 5 phút, được ghi lại bằng một camera gắn bên trên. Ghi nhận lại số lần ra vùng sáng của chuột và thời gian ở vùng sáng. Chuột được tính là ra vùng sáng khi cả 4 chân vượt qua lần phân cách giữa 2 vùng.

Xử lý số liệu thực nghiệm

Các dữ liệu được biểu thị dưới dạng Mean±SEM. Qua phân tích các số liệu bằng phép kiểm Kolmogorov-Smirnov cho thấy có sự phân bố không bình thường ở một số dãy số liệu. Do đó việc xử lý thống kê sử dụng phần mềm SPSS phiên bản 16, sử dụng phép kiểm Kruskal-

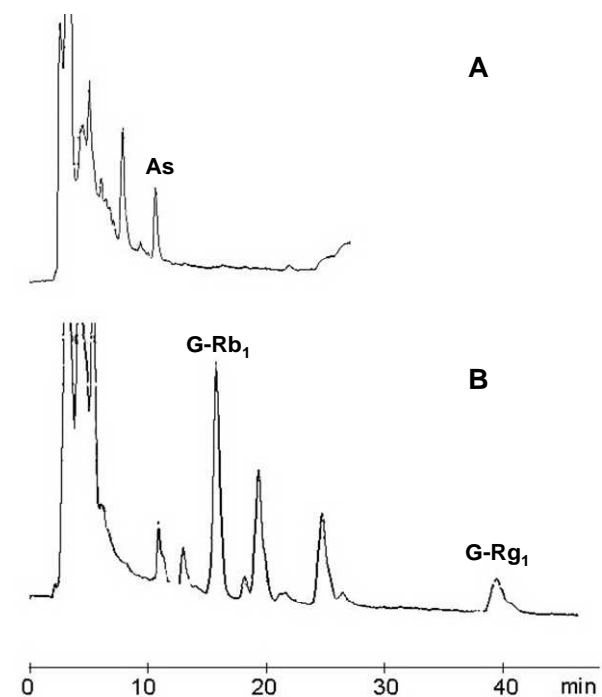
Wallis, tiếp theo dùng phép kiểm Mann-Whitney-U test để so sánh sự khác biệt giữa các lô. Sự khác nhau được xem là có ý nghĩa khi giá trị $p < 0,05$.

KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

Kết quả chiết xuất

Bảng 1. Kết quả chiết xuất cao toàn phần

Dược liệu	Khối lượng dược liệu (kg)	Khối lượng cao (g)	Hiệu suất chiết (%)
Rau má	2,0	420	21
Quế	1,6	150	9,4
Nhân sâm	0,4	180	45

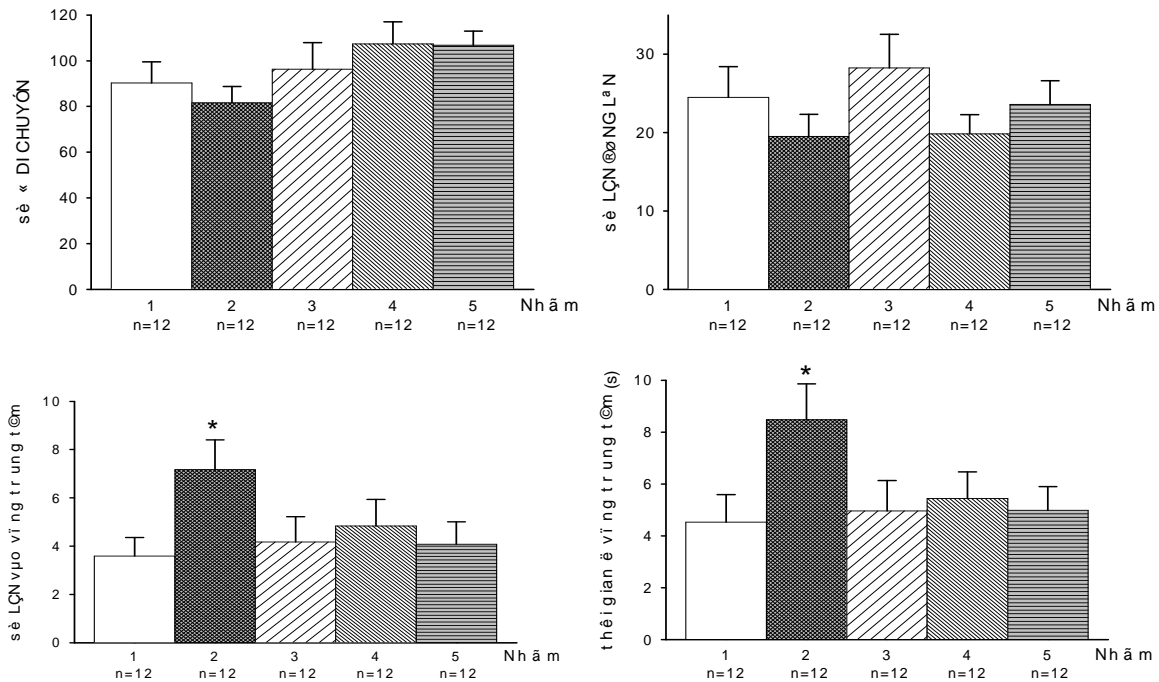


Hình 1. Sắc đồ HPLC khi phân tích rau má (A) và nhân sâm (B). As: asiaticosid, G-Rb₁: ginsenosid Rg₁, G-Rg₁: ginsenosid Rg₁

Kết quả định lượng

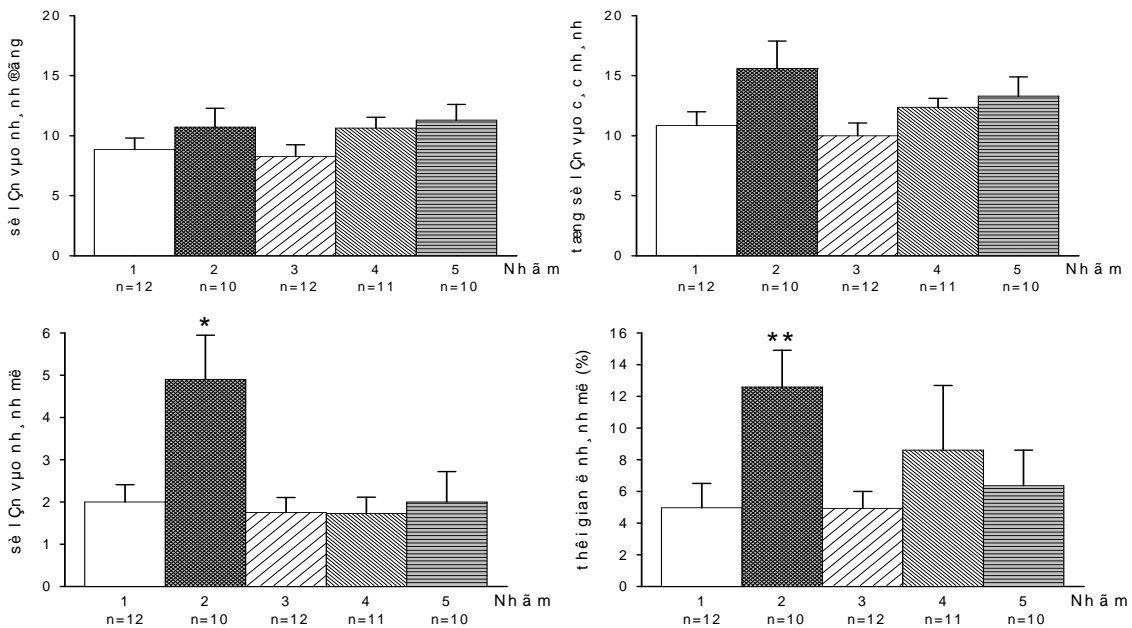
- Cao rau má: hàm lượng asiaticosid trong cao toàn phần rau má là 3,23%.
- Cao quế: hàm lượng các acid hữu cơ trong cao quế là 1,6 mN/1g cao toàn phần.
- Cao nhân sâm: Hàm lượng G-Rb₁ và G-Rg₁ lần lượt là 1,73 % và 1,04%.

Mô hình môi trường mở



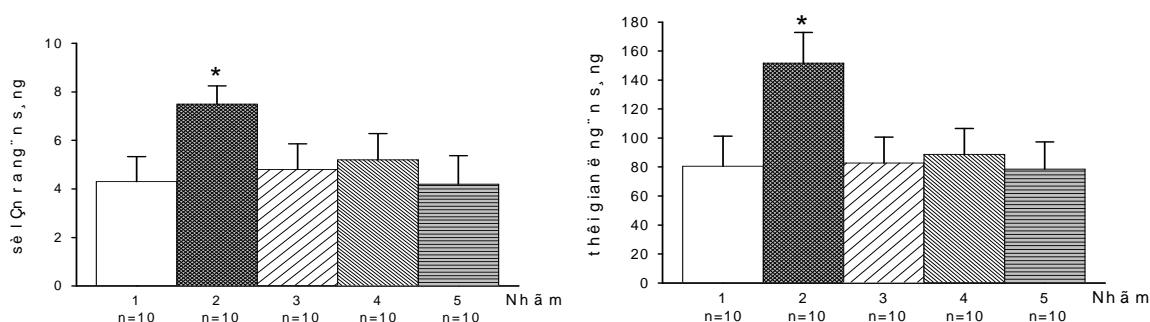
Hình 2. Ảnh hưởng của của CT 1, CT 2, CT 3 và diazepam trên số ô di chuyển và số lần đứng lên trong thử nghiệm mô hình môi trường mở. n thể hiện số chuột trong mỗi nhóm.

Mô hình chữ thập nâng cao (Elevated plus-maze test)



Hình 3. Ảnh hưởng trên tổng số lần vào các nhánh (đóng và mở), số lần vào nhánh đóng, số lần vào nhánh mở và thời gian ở nhánh mở của diazepam và các công thức 1, 2, 3 trong thử nghiệm chữ thập nâng cao. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ so với nhóm chứng (nhóm 1)

Mô hình ngăn sáng - tối (Light - dark test)



Hình 2. Ảnh hưởng trên số lần và thời gian ra ngăn sáng của diazepam và các công thức 1, 2, 3 trong thử nghiệm ngăn sáng-tối, * $p < 0,05$ so với nhóm chứng (nhóm 1)

Nghiên cứu đã tiến hành khảo sát lại mô ba mô hình trên được lý thực nghiệm thông dụng trong các thử nghiệm về tác động giải lo âu trên chuột nhắt. Khi sử dụng diazepam liều 2mg/kg (p.o.) thể hiện tác dụng giải lo âu trên chuột nhắt, điều đó chứng tỏ có thể áp dụng các mô hình này trong điều kiện thực tế nhằm sàng lọc các hoạt chất có tác dụng giải lo âu.

Khi khảo sát tác dụng của 3 công thức CT1, CT2 và CT3 trên cả 3 mô hình được lý thực nghiệm môi trường mở, chữ thập nâng cao, ngăn sáng-tối đều lặp lại kết quả 3 công thức thử nghiệm không có tác dụng giải lo âu. Trong các công thức phối hợp 1, 2, 3, liều của cao rau má, quế, nhân sâm đều nhỏ hơn liều có tác dụng đã được công bố. Cụ thể ở đây liều của rau má tương đương 4,8 mg asiaticosid/kg ở công thức 1, 3 và 3,2 mg asiaticosid/kg ở công thức 2; liều của nhân sâm tương đương 0,43 mg G-Rb₁/kg; liều của quế là 100 mg cao/kg ở công thức 2 hoặc 50 mg cao/kg ở công thức 1 hoặc 25 mg cao/kg ở công thức 3. Do liều của từng dược liệu nhỏ hơn liều có tác dụng đã công bố, chưa kể đến việc có thể có các tương tác làm giảm hoạt tính lẫn nhau của các hoạt chất trong các cao chiết, nên các công thức phối hợp trên không thể hiện được tác dụng giải lo âu. Từ kết quả này có thể rút ra kết luận sơ bộ là các hoạt chất giải lo âu trong các dược liệu này không có tác dụng hiệp lực tăng khả năng giải lo âu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hyun-Sook Yu et al., "Involvement of 5-HT_{1A} and GABA_A receptors in the anxiolytic-like effects of Cinnamomum cassia in mice", *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 87, 164-170 (2007).
2. Mellisa N. Carr et al., "Identification of anxiolytic ingredients in ginseng root using the elevated plus-maze test in mice", *European Journal of Pharmacology*, 531, 160-165 (2006).
3. Si Wen Chen et al., "Anxiolytic-like effect of asiaticoside in mice". *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 85, 339-344 (2006).
