

NHÓ ĐÔNG (MORINDA LONGISSIMA Y. Z. RUAN) – MỘT LOÀI CÂY THUỐC MỚI CỦA HỆ THỰC VẬT VIỆT NAM

Ngô Văn Trại⁽¹⁾, Phạm Minh Hưng⁽²⁾, Nguyễn Duy Thuận⁽³⁾
1,3- Viện Dược liệu; 2- Viện Thông tin Thư viện Y học Trung ương
(Nhận bài ngày 2 tháng 2 năm 2004)

Summary

Morinda longissima Y. Z. Ruan, a New Medicinal Plant to the Flora of Vietnam

Morinda longissima Y. Z. Ruan (Rubiaceae) has been found to be a new medicinal species to the Flora of Vietnam. Its roots can be used to treat hepatitis and cirrhosis. This valuable medicinal plant deserves thorough studies to broaden use.

Key words: *Morinda longissima* Y. Z. Ruan Medicinal Plant.

Đông bào dân tộc Tày và Thái ở xã Chiềng An, thị xã Sơn La, thường dùng rễ cây nhó đông thái mỏng, phơi khô, sắc uống chữa bệnh viêm gan, xơ gan cổ trướng với kết quả rất tốt. Đây là loài cây thuốc quý được sử dụng theo kinh nghiệm dân gian. Ngay từ đầu năm 2002, chúng tôi đã tiến hành thu mẫu cây nhó đông ở Sơn La để xác định tên khoa học và nghiên cứu thành phần hóa học. Sau đó, cây thuốc này còn được phát hiện thêm tại một số địa phương khác thuộc tỉnh Lào Cai, Quảng Nam và Thừa Thiên - Huế.

Qua nghiên cứu tất cả các mẫu đã thu thập, đối chiếu với các tài liệu hiện có [3, 5, 6, 7, 8], chúng tôi xác định cây nhó đông thuộc loài *Morinda longissima* Y. Z. Ruan, họ Cà phê (Rubiaceae), một loài thực vật mới chưa được công bố ở Việt Nam [1, 2, 3, 4, 7]. Xem ảnh bìa 4.

1. Hình thái thực vật

Cây bụi, mọc thẳng đứng, cao 2 – 4m; gỗ thân và rễ có màu vàng, vị đắng. Cành non có 4 cạnh, màu xanh lục nhạt. Lá mọc đối, cuống dài 2 – 3cm; hình bầu dục thuôn hoặc hình mác đảo, gốc thuôn, đầu nhọn, dài 12 – 18cm, rộng 6 – 10cm; hai mặt lúc non gần như không lông, khi già mặt dưới có ít lông ngắn, mềm; gân giữa nổi rõ ở cả hai mặt, gân bên 8 – 10 đôi mọc xiên lên phía đầu lá; gân mạng lưới không rõ; lá kèm 2, mọc đối, hình bán nguyệt hoặc gần hình tim, đỉnh nhọn sắc hoặc chia hai thùy. Cụm hoa mọc ở đầu cành hay kẽ lá thành đầu; có cuống dài 2 – 2,5cm, không lông; hoa nhỏ, hình ống, không cuống, mọc sát nhau; ở gốc mỗi hoa có 1 – 2 hàng phiến bao hình giùi,

phiến bao giữa lớn hơn. Lúc đầu, các lá đài không dính nhau, sau đó biến đổi thành dạng vòng; cánh hoa 4 – 5, màu trắng, ống tràng dài 2,5-3cm, họng không lông; nhị 4 – 5 (số nhị luôn bằng số cánh hoa), dính ở khoảng 2/5 phần trên của ống tràng, chỉ nhị ngắn, khoảng 1mm, không vươn ra khỏi ống tràng, bao phấn thuôn, 2 ô, mở dọc; bầu 4 ô, vòi nhụy xuất phát từ chỗ lõm của bầu, dài khoảng 7mm, đầu nhụy xẻ thành 2 thùy dạng sợi; sau khi hoa tàn, vòi nhụy còn tồn tại thêm một thời gian nữa cùng với quả non. Quả nạc gồm nhiều quả mọng nhỏ.

Mẫu nghiên cứu do Phạm Minh Hưng thu ở xã Chiềng An, thị xã Sơn La vào tháng 4 năm 2002, Ngô Văn Trại và cộng sự thu ở Than Uyên (Lào Cai), năm 2000; ở Tiên Phước, Hiệp Đức, Nam Giang (Quảng Nam), năm 2002 và 2003; ở Nam Đông (Thừa Thiên - Huế), năm 2003.

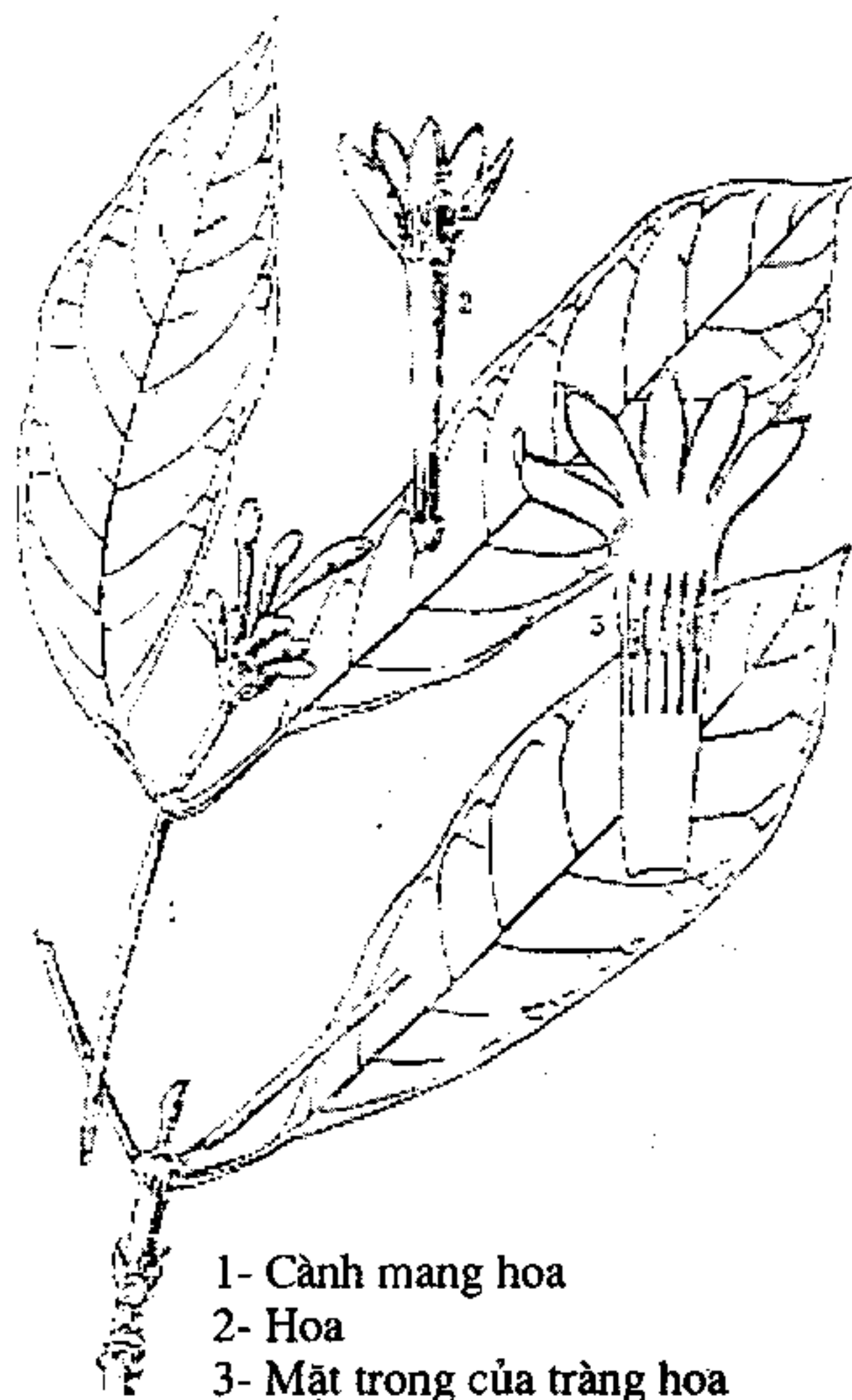
2. Đặc điểm sinh học

+ Mùa hoa quả: Hoa, tháng 4 – 6; quả, tháng 6 – 12. Trên cùng cụm hoa, các hoa ở dưới nở trước các hoa ở trên.

+ Phân bố: - Thế giới: Phía Nam tỉnh Vân Nam, Trung Quốc (giáp Việt Nam).

+ Trong nước: Sơn La (xã Chiềng An, thị xã Sơn La), Lào Cai (xã Hố Mít và xã Tân Thuộc, huyện Than Uyên), Quảng Nam (rải rác ở các huyện Hiệp Đức, Tiên Phước, Nam Giang, Trà My), Thừa Thiên - Huế (xã Thượng Lộ, Nam Đông).

+ Nơi mọc: Rải rác ở rừng thứ sinh, ven rừng



1- Cành mang hoa
2- Hoa
3- Mặt trong của tràng hoa

nguyên sinh hoặc trên nương rẫy cũ. Độ cao dưới 800m so với mặt biển.

3. Giá trị sử dụng:

Cây mới được dùng theo kinh nghiệm của nhân dân (thị xã Sơn La, huyện Than Uyên - Lào Cai). Rễ băm nhỏ, sắc uống chữa viêm gan, xơ gan. Ngoài ra, đồng bào ở xã Chiềng An, thị xã Sơn La còn dùng rễ hoặc thân già của cây nhỏ đông, phối hợp với cây hé mọ (*Psychotria* sp.) họ Cà phê (Rubiaceae) để chữa viêm đại tràng với kết quả tốt.

Kết luận

Nhớ đông là một cây thuốc mới, được xác định tên khoa học là *Morinda longissima* Y. Z. Ruan, họ Cà phê (Rubiaceae) và đã bổ sung thêm một loài mới cho hệ thực vật Việt Nam, nâng số loài thuộc chi *Morinda* ở nước ta từ 10 lên 11 loài.

Đây là một cây thuốc quý, cần tiếp tục được nghiên cứu thêm để sử dụng rộng rãi hơn.

Tài liệu tham khảo

- 1). Võ Văn Chi, 1997. Từ điển cây thuốc Việt Nam; 2). Phạm Hoàng Hộ, 1993. Cây cỏ Việt Nam. Q 3: 264 - 267; 3). Phạm Hoàng Hộ, 2000. Cây cỏ Việt Nam. Q 3: 214 - 218; 4). Đỗ Tất Lợi, 1999. Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam, in lần thứ 8; 5). Chen Weichui, 1999. Flora Reipublicae Popularis Sinicae. 71 (2): 179-202; 6). J. D. Hooker, 1881. Flora British India. 3: 155-158; 7). F. Gagnepain, 1923. Flore General de L'Indochine, 3: 418-426; 8). Chen Weichui, 1999. Addenda, Diagnoses Taxarum Plantarum Novorum. 323-324, fig.3.

Tap chí Dược liệu, tập 9, số 1/2004 (trang 2-6)

PHENOL GLYCOSIDES FROM VIETNAMESE *ARTOCARPUS TONKINENSIS*

L. K. Dung, T. T. Thuy, T. V. Sung, P. T. Ninh

Institute of Chemistry, National Center for Natural Science and Technology

(Received 23 Dec. 2004)

Summary

Activity-guided fractionation of the n-butanol extract from the leaves of Artocarpus tonkinensis led to the isolation of two auronol glycosides named maesopsin 4-O-β-D-glucopyranoside, the new alphitonin-4-O-β-D-glucopyranoside, as well as kaempferol-3-O-β-D-glucopyranoside and benzyl-O-β-D-glucopyranoside. Their structures were determined on the basis of MS and NMR spectroscopic data. The lymphocyte stimulation test showed isolated compounds having immunosuppressive activity.

Key words: Artocarpus tonkinensis, auronol glucopyranoside, maesopsin, alphitonin, kaempferol

Introduction

Artocarpus tonkinensis A. Cheval. (Moraceae) is a 15 m high tree growing in North Vietnam. The decoction of its leaves and roots is used in folk medicine to treat backache and rheumatism [1]. The crude extract from the leaves of this plant is seems to be effective in treatment of autoimmune diseases [2,3]. In our previous studies on *Artocarpus tonkinensis* we isolated from the bark oxyresveratrol, catechin, several triterpenoids and the new benzofuran named artotonkin [4], as well as the auronol glycosides hovetrichoside C (maesopsin 4-O- β -D-glucoside, 1), the new 2,4,6-trihydroxy-2-[3',4'-dihydroxyphenyl] methyl]-3(2H)-benzofuranone-4-yl- β -D-glucopyranoside (alphitonin 4-O- β -D-glucoside, 2) [5]. Our bioassays indicated that the n-butanol extract was significantly active. We now describe the isolation and structural elucidation of two phenol glycosides, kaempferol-3-O- β -D-glucopyranoside (3) and benzyl-O- β -D-glucoside (4) from the leaves of this plant. Their structures were elucidated by FT-IR, MS, NMR techniques and comparison with the data reported in the literatures.

Experimental

Instruments and general methods

NMR: Bruker Avance 500. EI-MS: Hewlett Packard 5989B Engine, 70 eV. FT-IR: Nicolet IMPACT 410. TLC: Silica gel 60 F-254 (Merck); LiChroprep RP-8. CC: Diaion HP[®]₂₀ (supelcopark, Bellefonte, PA), Silica gel 60 (230-400 mesh, Merck) and LiChroprep RP-8 (Merck).

Plant material, Extraction and Isolation

Leaves of *Artocarpus tonkinensis* were collected in Son Tay in March 2003. The species was identified by Dr. Nguyen Van Tap. A voucher specimen (Nr. 1482) was deposited in the herbarium of the Institute for Materia Medica, Hanoi, Vietnam.

The dried and powdered leaves (13 kg) were extracted with 95% aqueous EtOH at room temperature. Evaporation of EtOH in vacuo gave an aqueous solution which was subjected to liquid-liquid partition with n-hexan, followed by ethyl acetate and n-BuOH. The n-BuOH solution was evaporated in vacuo to afford 525.5 g residue. 46g of this residue was chromatographed over Diaion ion exchange HP-20 and gradually eluted with MeOH-H₂O (10:90→50:50) followed by MeOH

100 % to give 2 main fractions (fractions 1-2) of increasing unpolarity. Fraction 1 was subjected to CC over reversed phase CC over RP-8 with MeOH-H₂O (1:2) and purified by CC over silica gel with CHCl₃/MeOH/H₂O (40:10:1→70:30:2) to afford 6 fractions. The fractions were finally purified by reversed phase CC to afford 1 (0.058 %), 2 (0.0040 %), 3 (0.0012 %) and 4 (0.0034 %).

Maesopsin-4-O- β -D-glucopyranoside (1, 2,4,6-trihydroxy-2-[(4'-hydroxyphenyl)methyl]-3(2H)-benzofuranone-4-yl- β -D-glucopyranoside)

Powder from MeOH; $[\alpha]_D^{25}$ -30° (MeOH, c1.0); HR-ESI-TOF-MS (*m/z*): 473.10539 [M+Na]⁺ (C₂₁H₂₂O₁₁Na requires 473.10543). ESI-MS (negative ions): 449 [M-H]⁻; FT-IR ν_{\max}^{KBr} (cm⁻¹): 3400-3300, 2914, 1684, 1617, 1518, 1445, 1357, 1278, 1122, 1109, 1071, 1005, 929, 834, 708. ¹H- and ¹³C-NMR data: literature [5].

Alphitonin-4-O- β -D-glucopyranoside (2, 2,4,6-trihydroxy-2-[3',4'-dihydroxyphenyl)methyl]-3(2H)-benzofuranone-4-yl- β -D-glucopyranoside)

Powder from MeOH, m.p. 102-105 °C (MeOH); $[\alpha]_D^{25}$ -187° (MeOH, c 0.02); HR-ESI-TOF-MS (*m/z*): 489.10134 [M+Na]⁺ (C₂₁H₂₂O₁₂Na requires 489.10035); ESI-MS (negative ions): 465 [M-H]⁻; FT-IR ν_{\max}^{KBr} (cm⁻¹): 3500-3300, 1692, 1626, 1459, 1298, 1109, 1078; ¹H- and ¹³C-NMR data: literature [5].

Kaempferol-3-O- β -D-glucopyranoside (3, 5,7,4'-trihydroxy-3-O- β -D-glucopyranoside)

White needles from MeOH, m.p. 102-105 °C; EI-MS (*m/z*, %): 286 [M-glc]⁺, 285 [M-glc-H]⁺ (35), 257 (12), 229 (10), 213 (10), 121 (14); FT-IR ν_{\max}^{KBr} (cm⁻¹): 3425 (OH), 1638 (C=O), 1411, 1298, 1184, 1075; ¹H- and ¹³C- NMR data see Table 1.

Benzyl-O- β -D-glucopyranoside (4)

Powder from MeOH; EI-MS 70 eV (*m/z*, %): 225 (40), 179 (45), 167 (28), 150 (50), 137 (55), 109 [M-gluco+H]⁺ (45), 91 [C₆H₅CH₂]⁺ (100), 73 (80), 57 (45); ¹H- and ¹³C- NMR data see Table 1.

Lymphocyte stimulation test

The lymphocyte stimulation test (immunosuppressive activity) was carried out at the

National Hygiene and Epidemiology Institute, Hanoi, Vietnam according to V.T.Trao [6] in the following manner:

Mononuclear cells were isolated from healthy human blood by gradient specific weight centrifuge over Ficoll layer ($d=1.007$) with a speed of 2,000 rounds/minute; washed in PBS (pH=7.2) and supplemented with 10 % human AB serum (according to a routine procedure of the Immunology Lab of the National Hygiene and Epidemiology Institute, Hanoi, Vietnam [6]). The cells were seeded into 96 wells of round-bottomed microtitre plates at $5-7.5 \times 10^4$ cells with twice

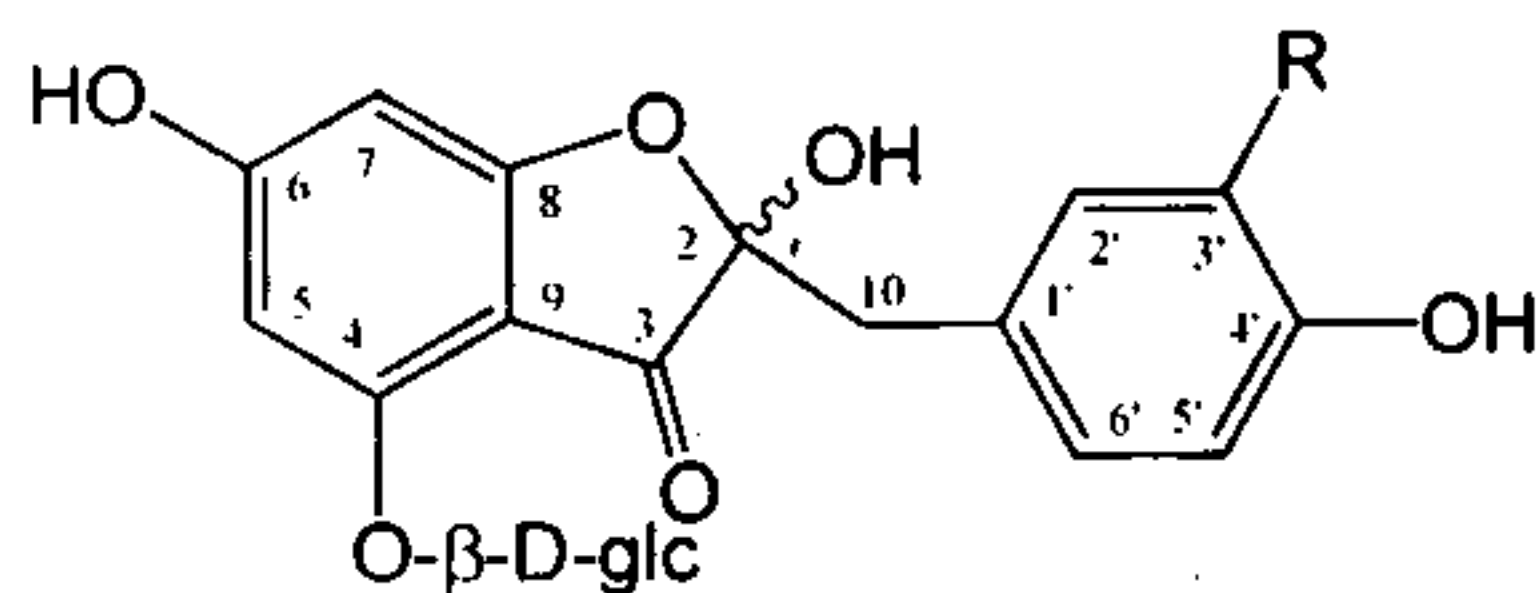
diluted concentration (1/2- 1/128) of test substance. All cultures were set up in triplicate. After incubation at 37°C for 72 hours in a humidified 5 % CO₂ atmosphere, 20 μ l ³H-thymidine (specific activity 2.0 Ci/mmol) was added and the cultures incubated a further 18 h before harvesting on a "Titertek" multiple automatic sample harvester and counting of the retained radioactivity in a "Beckman" liquid scintillation counter. Activation, as measured by ³H-thymidine incorporation, was expressed as counts per minute (cpm) [6]. The inhibition (% I) of the test substance was calculated as follows:

$$\% I = \frac{\text{cpm PHA control cell} + \text{test substance}}{\text{cpm PHA control cell without test substance}} \times 100$$

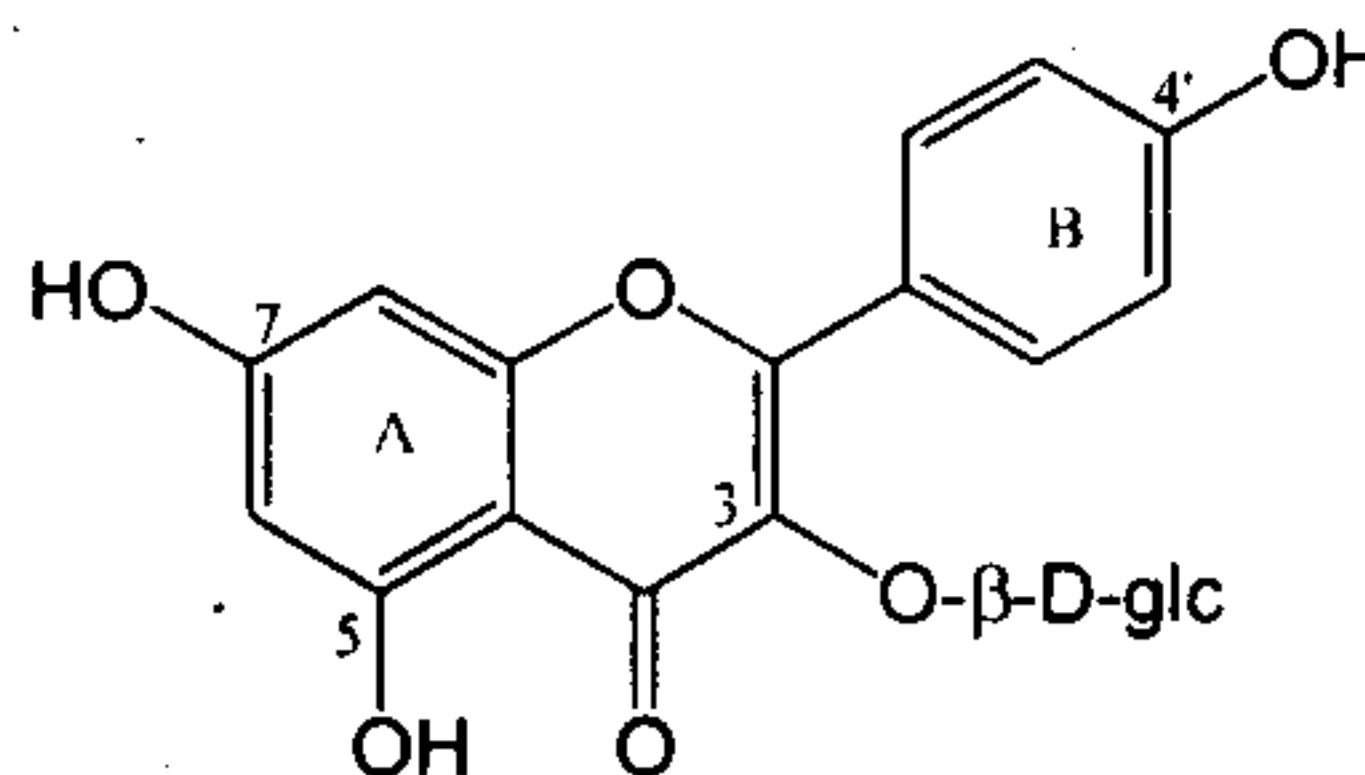
Results and Discussion

Two glycosides were isolated from the n-BuOH extract of the leaves using highly porous polymer

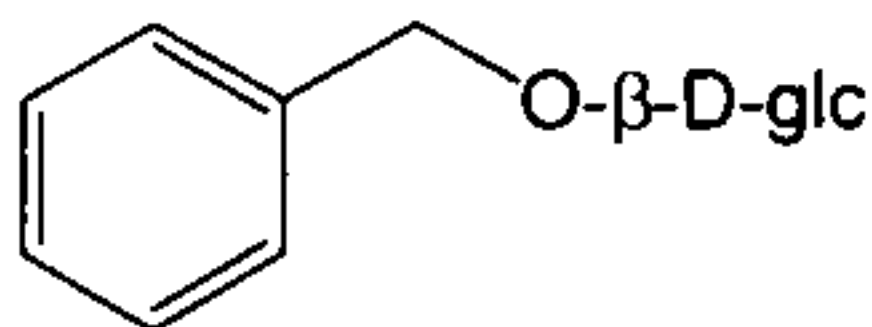
(diaion HP₂₀ ion exchange) to remove a large amount saccharide by eluting with water and then using normal and reversed phase column chromatography to afford 1-4.



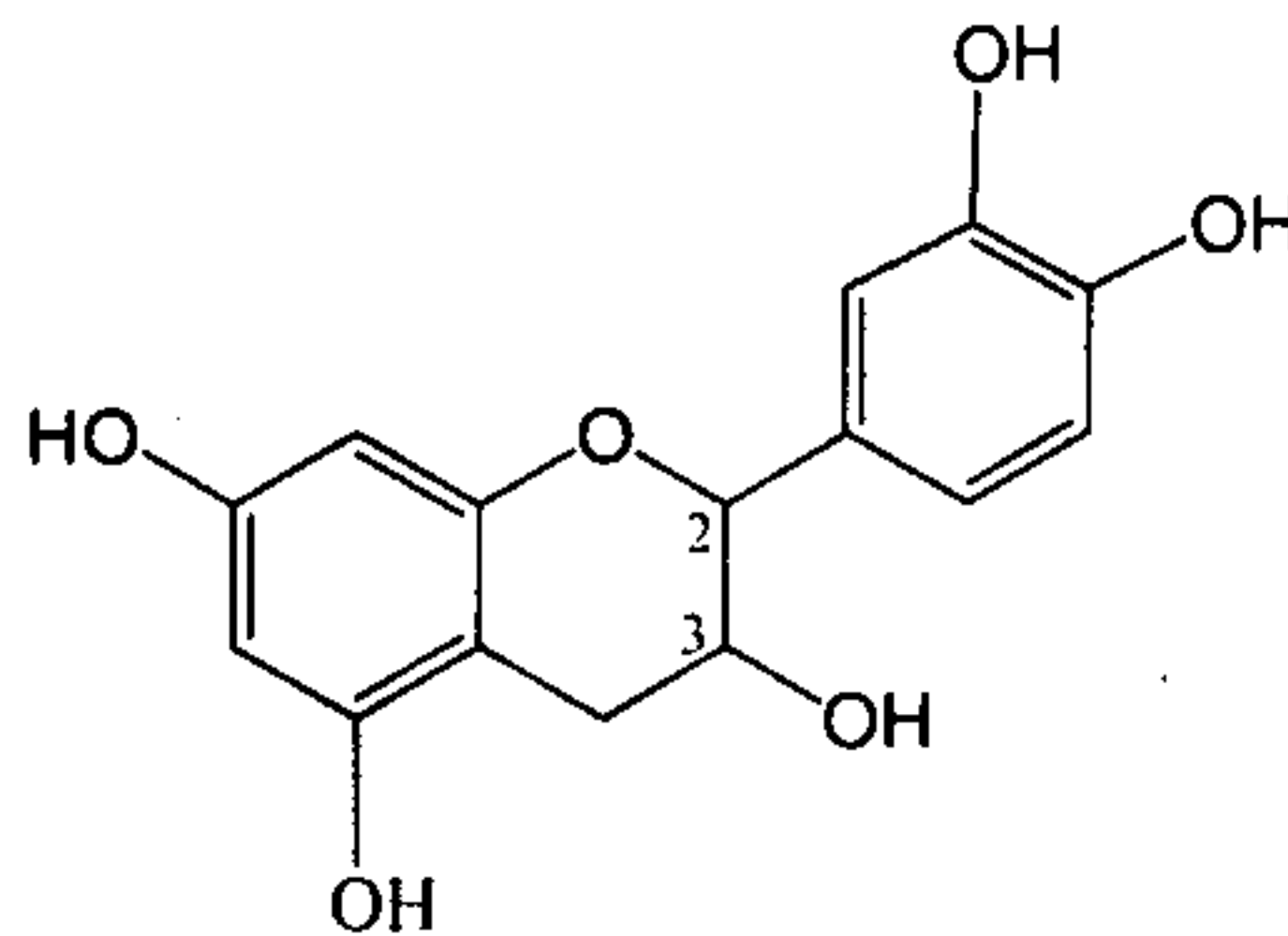
- 1: R = H
2: R = OH



3



4



5

The EI-MS of compound **3** gave the $[M-162]^+$ peak at m/z 286 (100) and the sugar moiety was easily identified from its characteristic signals in the 1H - and ^{13}C -NMR spectra, thus giving $C_{15}H_{10}O_6$ as aglycone. The presence of one carbonyl group (δ_c 179.53) and 15 aromatic signals together with the molecular formula of the aglycone with double bond equivalents suggested a flavone skeleton with 4 hydroxy groups in the aglycone. From the 1H multiplicities of the signals at δ_H 8.07 and 6.90, which were parts of an AA'XX'-system of a *para*-disubstituted benzene-ring, their double integrals and their coupling constant ($J=8,9$ Hz) a 1,4-*para*-disubstituted ring B was deduced. One substituent was identified as a hydroxy group by the high chemical shift of the connected carbon (δ_c 161.58), whereas the other substituent was a quaternary

carbon (C-1') group revealed by the strong CH long-range correlations from C-1' (δ 122.82) and C-2' (δ 132.28) to the methine protons at δ 6.90 (H-3', H-5'). Full analysis of all CH long-range correlations resulted in the structure of kaempferol for the aglycone moiety and gave the signal assignment. The connection of the glucose at C-3 was deduced from the correlation of C-3 (δ 135.48) with the anomeric proton H-1'' (δ 5.26, d, $J=7.5$ Hz). The structure **3** was determined as kaempferol-3-O- β -D-glucopyranosid (3-O- β -D-glucopyranosyl-4',5,7-trihydroxyflavone, stragalin). Kaempferol is well known from various plants, whereas its 3-O- β -D-glucopyranoside was also isolated from *Astragalus* species and recently from Vietnamese *Premna flavescens* [7].

Table 1: ^{13}C - and 1H -NMR data of compounds **3** and **4** in CD_3OD at 125/500 MHz

	3 , δ_c	3 , δ_H (J in Hz)	4 , δ_c	4 , δ_H (J in Hz)
1			139.07	
2	159.10		129.27	7.43 d (7.3)
3	135.48		129.19	7.34 t (7.4)
4	179.53		128.69	7.29 t (8.1)
5	163.09		129.19	7.34 t (7.4)
6	99.92	6.22 d (2.1)	129.27	7.43 d (7.3)
7	166.07		71.75 (CH ₂)	4.95 d (11.8) 4.69 d (11.8)
8	94.77	6.41 d (2.1)		
9	158.53			
10	105.74			
1'	122.82		103.29	4.37 d (7.7)
2'	132.28	8.07 dd (2.4; 8.9)	75.33	3.28 m
3'	116.08	6.90 dd (2.4; 8.9)	78.01	3.38 m
4'	161.58		71.70	3.30 m
5'	116.08	6.90 dd (2.4; 8.9)	78.10	3.28 m
6'	132.28	8.07 dd (2.4; 8.9)	62.82	3.70 dd (5.6; 11.9) 3.92 dd (2.1; 11.9)
1''	104.12	5.26 d (7.5)		
2''	75.47	3.45 dd (2.4; 5.5)		
3''	78.06	3.45 dd (2.4; 5.5)		
4''	71.38	3.32 m		
5''	78.42	3.23 ddd (2.3; 2.4; 5.5)		
6''	62.65	3.71 dd (2.3; 11.8) 3.54 dd (5.5; 11.9)		

The MS spectrum of compound **4** gave $[M-162+H]^+$ peak at m/z 109 and the sugar moiety was easily identified from its characteristic signals in the 1H - and ^{13}C -NMR spectra (Table 1) as β -D-glucopyranose. In the ^{13}C -NMR spectrum 13 signals appeared. The presence of two methylene groups (δ_c 62.82; 71.75) and aromatic signals

together with a small molecular formula of the aglycone with double bond equivalents suggested a phenyl skeleton with methylenoxy group for the aglycone. From 1H multiplicities of the signals at δ_H 7.43/7.34 with double integrals and triplet at δ_H 7.29, which was part of benzene-ring, their double integrals and their CH signal in the DEPT

experiment (Table 1) one disubstituted aromatic ring was deduced. One substituent was additionally identified as a methylene group by a high chemical shift of the connected quaternary carbon of C-1 (δ 139.07) and doublet proton with geminal coupling constant ($J = 11.8$ Hz) of methylene protons at δ 4.95/4.69. Full analysis of

^1H - and ^{13}C -NMR (Table 1) resulted in the structure of benzyloxy for the aglycone moiety. The structure was determined as benzyl-O- β -D-glucopyranoside (4). It was previously isolated from various sources and recently isolated from tomato fruit [8].

Table 2: Result in lymphocyte stimulation test of compounds 1-5

Concentration (mg/ml)	Inhibition I ^a							
	1.25	0.625	0.312	0.156	0.078	0.039	0.019	0.009
1	99.6	99.5	99.3	99.0	56.5	18.9	4.4	3.5
2	99.3	99.3	82.9	23.0	21.3	19.5	15.9	0
3	97.14	92.04	76.69	49.94	-22.15	-43.92	-51.66	-85.75
4	99.19	98.86	94.63	58.28	42.83	21.65	8.95	2.32
5	99.5	81.8	46.3	39.3	20.1	23.6	10.2	11.5
Cyclosporin A	99.1	99.2	99.8	96.7	87.9	78.0	72.7	72.0

^a Calculated according to the formula given in the experimental part
Concentration reduced 10 times

The results of the lymphocyte stimulation tests of isolated compounds were given in tables 2, compared with cyclosporin A, a potent immunosuppressant widely used in clinic to prevent graft rejection or in the treatment of various autoimmune diseases. In this test the immunosuppressive activity of investigated substances will be expressed by transformed blood cells (blast cells) in the test mixture [4, 5]. All compounds 1-4 showed strong activity at higher concentrations. It is interesting that kaempferol 3-O- β -D-glucopyranoside showed strong immuno-

suppressive activity at higher concentrations but significant immunostimulation at low concentrations. This result gives evidence for the use of the crude extract from the leaves of *Artocarpus tonkinensis* in the treatment of autoimmune diseases like lupus and rheumatism in Vietnamese traditional medicine.

Acknowledgements: We are indebted to the NCST Hanoi, Vietnam for financial support in form of a project and Dr. Vu Tan Trao (National Hygiene and Epidemiology Institute, Hanoi, Vietnam) for the biological tests.

References

- Đỗ Tất Lợi. Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật Hà nội, tr. 597 (1991);
- Trình Phương Liên, Ngô Quốc Anh, Trần Văn Sung. *Tạp chí Dược liệu*, 6 (6), 173-176 (2001);
- Nguyễn Đặng Dũng, Trình Hiến Trung, Phạm Hoàng Ngọc, Trần Lưu Văn Hiến. *Tạp chí Dược liệu*, 7 (5), 137-140 (2002);
- T. P. Lien, H. Ripperger, A. Porzel, Tran Van Sung, G. Adam. *Die Pharmazie* 53 (5). *Die Pharmazie*, accepted in July 2003 (beginning with the issue 1/2004);
- V. T. Trao (2002), Báo cáo đề tài khoa học công nghệ cấp cơ sở. Viện Vệ sinh dịch tễ trung ương (report on the research project of National Hygiene and Epidemiology Institute Hanoi, Vietnam, 12/2002). p. 17;
- T. T. Thúy, T. V. Sung, H. Ripperger (1998). *Tạp chí Hoá học (Journal of Chemistry)*, 36 (3), 49-52;
- Salvatore De Rosa, Alfonso De Giulio and Giusppina Tomonaro (1996). *Phytochemistry*, 42 (4), 1031-1033.

EFFECTS OF NICOTINE ON ANGIOGENESIS AND RESTENOSIS

Yin Ruixing¹, Bi Qi¹, Liu Tangwei¹, Nguyen Phu Kieu², Pham Kim Man², Tran Dinh Binh³
1. Department of Cardiology, Institute of Cardiovascular Diseases, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China. 2. Materia Medica Research and Application for Incurable Diseases Institute, Hanoi, Vietnam. 3. Hue Medical College, Hue University, Vietnam

(Received 26 May, 2003)

Summary

Objective: To investigate the effects of nicotine on angiogenesis and restenosis in a rabbit model of ischemic hindlimb and restenosis.

Methods: Forty male New Zealand White rabbits weighing approximately 2.1 kg were randomly divided into control, low-, middle-, and large-dose nicotine groups. Balloon catheter denuding injury iliac artery and ligation of a femoral artery were performed in all animals fed with a 2.0% cholesterol and groundnut oil (6 g per day) diet beginning 2 weeks before operation. Low- (0.005 ãg/kg), middle- (0.05ãg/kg), or large-dose (5ãg/kg) nicotine was administered daily by intramuscular injection in the ischemic hindlimb of three nicotine-treated groups for 3 weeks, respectively. Control rabbits received an equal volume of phosphate-buffered saline alone. Collateral vessels of the ischemic hindlimb were observed by angiography of abdominal aorta, and the density of intramuscular microvessels in ischemic hindlimb was examined by immunohistochemistry. The concentrations of blood lipids and the indexes of hepatic and renal functions were determined before high-cholesterol diet (HCD) and after nicotine treatment.

Result: One rabbit in control, two in low-, one in middle- and two in large-dose group died during the experiment. The remaining 34 rabbits were included in the study. Two or five weeks after HCD, the levels of total cholesterol, triglyceride, and low-density lipoprotein cholesterol were significantly increased in all groups, but there was no significant difference on the levels between control and nicotine-treated groups three weeks after nicotine treatment; Neither indexes of hepatic or renal functions were significant changes three weeks after nicotine treatment; There were no significant differences on collateral vessels shown by angiography in all four groups; The density of intramuscular microvessels in three nicotine-treated groups was significantly higher than that in control group (large-: 19.85 ± 0.92 , middle-: 19.02 ± 0.78 , or low-: 16.85 ± 0.36 vs. control: 6.31 ± 0.36 /high power field; $P < 0.01$, respectively). There was significant difference on the density of microvessels between low- and middle- or large-dose group ($P < 0.01$ for each); The intimal area in all three nicotine-treated groups was larger than that in control group (large-: 1.81 ± 0.30 , middle-: 1.51 ± 0.28 , or low-: 1.22 ± 0.32 vs. control: 0.79 ± 0.22 mm²; $P < 0.05$, respectively). The intimal area in middle-dose group was less than that in large-dose group ($P < 0.05$), but larger than that in low-dose group ($P < 0.05$).

Conclusion: The present study shows that intramuscular administration of nicotine for three weeks could not increase arteriogenesis in ischemic hindlimb of rabbits, but is capable of significantly promoting intramuscular angiogenesis in ischemic hindlimb. Nicotine can also accelerate intimal thickening of balloon catheter denuding injury iliac artery, so it may contribute to the development of restenosis.

Key Words: nicotine; angiogenesis; restenosis

Introduction

Cigarette smoking has been shown to increase the risk of cardiovascular disease. However, the effects of nicotine on the cardiovascular system are

largely unknown. More recently, several studies have shown that nicotine stimulates endothelial cell proliferation¹ and angiogenesis,² promotes tumor growth and atherosclerosis in association

with increased neovascularization,^{2,3} inhibits apoptosis in human coronary artery endothelial cells⁴ and cardiac apoptosis induced by lipopolysaccharide in rats⁵, and accelerates wound healing in genetically diabetic mice.⁶ However, whether nicotine plays an important role in restenosis has not been determined. Therefore, the aim of the present study was to determine the effects of nicotine on blood lipid levels, hepatic and renal functions, arteriogenesis, angiogenesis, as well as restenosis in a rabbit ischemic hindlimb and restenosis model.

Materials and Methods

Animal model

A total of 40 male New Zealand White rabbits (Experimental Animal Center, Guangxi Medical University, China) weighing approximately 2.1 kg each were used. The model of restenosis and ischemic hindlimb was established by balloon catheter denuding injury iliac artery and ligation of a femoral artery. Before operating, the animals were fed with a 2.0% cholesterol and groundnut oil (6 g per day) diet for two weeks. All rabbits were anesthetized with ketamine hydrochloride (25 mg/kg, i.m.) and chlorpromazine hydrochloride (20 mg/kg, i.m.), and a longitudinal incision was performed in the left or right groin, extending inferiorly from the inguinal ligament. Through this incision, using surgical loops, the femoral artery and its major branches including the inferior epigastric, deep femoral, lateral circumflex, and superficial epigastric arteries were dissected and ligated. In this model of hindlimb ischemia, collateral artery development in the ischemic hindlimb model originates only from the internal iliac artery. Restenosis was induced by balloon catheter denuding injury of an iliac artery. A Medtronic balloon catheter (4.0 mm \times 10 mm) was passed through the dissected femoral artery to a distance of 8 cm, inflated to a diameter of 3 to 4 mm by filling with sterile saline (8 Atmospheres), and withdrawn the length of the vessel by using a gentle twisting motion. A moderate resistance to the passage of the balloon was achieved in all animals. The procedure was repeated three times to ensure complete deendothelialization, and the incision was closed. The procedures were performed under sterile conditions. High-cholesterol diet (HCD) was continued until the end of the experiment. In order to prevent infection, penicillin sodium was also administered by intramuscular injection at a dose of 2×10^5 U/kg per

day for the first three days after surgery. The study protocol was approved by the Administrative Panel on Laboratory Animal Care of Guangxi Medical University.

Intramuscular administration of nicotine

Twenty-four hours after surgery, the rabbits were randomly divided into four groups: control, low-, middle-, and large-dose nicotine-treated groups. Low- (0.005 μ g/kg, Sigma, St. Louis, Missouri), middle- (0.05 μ g/kg), or large-dose (5 μ g/kg) nicotine was administered daily by intramuscular injection in the ischemic hindlimb of three nicotine-treated groups for 3 weeks, respectively. Each injection was given intramuscularly in three different sites in the thigh of the ischemic limb (1.5 ml in the medial thigh, 1.0 ml in the lateral thigh, and an additional 1.0 ml in the distal thigh near the knee). Control rabbits received an identical volume of phosphate-buffered saline but without nicotine.

Angiography

Collateral artery development was evaluated by digital subtraction angiography (PHILIPS V5000 DSA, Dutch) on day 22 when the study was terminated. The animals were again anesthetized. A 4F catheter was introduced into the left common carotid artery through a small cutdown and advanced to the lower abdominal aorta, approximately 3 cm proximal to the aortic bifurcation. A total of 10 ml of contrast media (MD-76, meglumine diatrizoate and sodium) was then injected using an angiographic injector. Serial images of both hindlimbs were recorded. Development of collateral vessels was determined by direct observing in each series of angiograms.

Measurements of blood lipid levels and indexes of hepatic and renal functions

The levels of blood lipids were determined before and two or five weeks after HCD (or three weeks after nicotine treatment), and the indexes of hepatic and renal functions were detected before and three weeks after nicotine treatment. Blood lipid levels and the indexes of hepatic and renal functions were measured by using routine methods. Measured variables included total cholesterol, triglyceride, high-density lipoprotein cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol, total bilirubin, alanine transaminase, aspartate aminotransferase, blood urea nitrogen, as well as creatinine.

Intramuscular microvessel counts in ischemic hindlimb

The effect of nicotine on collateral vessel formation was also examined by measuring the number of microvessels in light microscopic sections taken from the ischemic hindlimbs. Tissue specimens were obtained as transverse sections from the adductor muscle of the ischemic limb at the time of death. This muscle was chosen for light microscopic analysis because (1) it is a major muscle of the medial thigh and (2) it was originally perfused by the deep femoral artery, ligated at the time that the common/superficial femoral artery was excised. Muscle samples were embedded in paraffin wax after fixed with 10% neutrality formaldehyde solution and disposed with routine histological methods. Microvessels were identified by monoclonal antibodies against CD146 (Chemicon, Temecula, California) as previously described.¹⁷ The sections were then counterstained with hematoxylin before coverslipping. Microvessels were defined as vessels with a total vessel diameter >10µm. A total of 10 different fields from one muscle section were counted under a 40x objective to determine the microvessel density (mean number of microvessels per high power field). To ensure that analysis of microvessel density was not overestimated because of muscle atrophy or underestimated because of interstitial edema, microvessels identified at necropsy were also evaluated as a function of muscle fibers in the histological section. The counting was performed in a blinded manner.

Histologic evaluation of iliac artery

After angiography, the animal was underwent total body perfusion fixation. Then, the iliac artery was harvested, immediately rinsed in phosphate-buffered saline and cleaned of periadventitia to avoid artifacts of oxidation, and post-fixed in 10% neutral formalin for 16 hours. The arteries were divided into four equal segments and followed by paraffin embedding. Paraffin-embedded specimens were cut into 4-µm-thick serial sections, placed on

poly-L-lysine-coated slides, deparaffined, and stained with hematoxylin and eosin, and orcein for morphometric and elastic fibers studies. The values of luminal area, internal elastic lamina area, external elastic lamina area, intimal area, and medial area were calculated with computer-assisted image analysis (LEICA Q550IW). The assays were performed in a blinded manner.

Statistics

Results were expressed as mean±SD. Statistical significance was evaluated using unpaired Student's *t* test for comparisons between two means, an ANOVA followed by Scheffé's procedure for more than two means. All analyses were performed with SPSS 10.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois). A value of *P*<0.05 denoted statistical significance.

Results

Six animals died during the experiment (one in control, two in low-, one in middle- and two in large-dose group), mostly because of diarrhea (four rabbits), and secondary infection (two rabbits). The remaining 34 rabbits were included in the study.

Effect of nicotine on blood lipid levels

There was no significant difference on the level of blood lipids between the groups before HCD (*P*>0.05). Two weeks after HCD, the levels of total cholesterol, triglyceride, and low-density lipoprotein cholesterol were significantly increased in all groups, but there was no significant difference on their levels between control and nicotine-treated groups. Five weeks after HCD (or three weeks after nicotine treatment), the levels of total cholesterol, triglyceride, and low-density lipoprotein cholesterol remained significantly elevated, but there was also no significant difference on their levels between control and nicotine-treated groups. In addition, the levels of high-density lipoprotein cholesterol five weeks after HCD were also higher than those before HCD in all groups, respectively (Table 1).

Table 1. Comparisons of blood lipid levels before and after high cholesterol diet between the groups (mean ± SD, mmol/L)

	Time	TC	TG	HDL-C	LDL-C
Control group (n=9)	Before HCD	1.88±0.46	1.11±0.46	0.66±0.15	0.98±0.30
	2 wks after HCD	21.40±2.35*	1.48±0.43 ⁰	0.85±0.22	20.1±3.02
	5 wks after HCD	30.65±1.17*	1.62±0.40 ⁰	1.18±0.31 ⁰	31.2±2.98*

Low-dose group (n=8)	Before HCD	1.85±0.45	1.51±0.42	0.71±0.13	1.07±0.22
	2 wks after HCD	20.90±2.33*	2.36±1.10 ⁰	0.83±0.22	19.2±3.38*
	5 wks after HCD	31.35±2.35*	2.19±0.98 ⁰	1.05±0.52 ⁰	30.59±3.49*
Middle-dose group (n=9)	Before HCD	1.84±0.41	1.32±0.39	0.65±0.18	1.06±0.26
	2 wks after HCD	21.28±2.98*	2.06±1.60 ⁰	0.74±0.35	17.50±3.15*
	5 wks after HCD	33.91±1.09*	2.03±1.75 ⁰	1.38±0.70 ⁰	28.86±3.09*
Large-dose group (n=8)	Before HCD	1.83±0.42	1.18±0.61	0.69±0.20	1.08±0.23
	2 wks after HCD	19.98±2.36*	2.23±1.70 ⁰	0.79±0.53	19.02±3.56*
	5 wks after HCD	31.23±1.92*	2.01±0.89 ⁰	1.02±0.55 ⁰	31.93±2.27*

HCD=high cholesterol diet; TC=total cholesterol; TG=triglyceride; HDL-C=high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C=low-density lipoprotein cholesterol; ⁰P<0.05, *P<0.01 in comparison with before HCD

Effects of nicotine on the indexes of hepatic and renal functions

Three weeks after nicotine treatment, the concentrations of serum total bilirubin, alanine transaminase, aspartate aminotransferase, blood urea nitrogen, as well as creatinine were no

significant changes in all groups. There were also no significant differences of serum total bilirubin, alanine transaminase, aspartate aminotransferase, blood urea nitrogen, as well as creatinine concentrations between control and nicotine-treated groups (Table 2).

Table 2. Comparisons of the parameters of hepatic and renal functions before and after nicotine administration between the groups (mean ± SD)

		TBIL (μmol/L)	ALT (U/L)	AST (U/L)	BUN (mmol/L)	Cr (μmol/L)
Control group (n=9)	Before	5.66±0.58	41.34±7.26	53.78±8.12	4.98±0.89	70.92±7.78
	After	5.93±0.66	43.89±7.18	51.36±7.32	5.27±0.93	73.56±8.43
Low-dose group (n=8)	Before	5.72±0.87	41.25±7.69	50.13±13.26	4.76±0.31	67.75±2.55
	After	5.32±0.41	40.38±6.95	55.88±10.63	4.65±1.27	73.75±10.09
Middle-dose group (n=9)	Before	5.78±0.98	36.44±7.78	46.89±9.61	5.04±0.90	72.22±12.04
	After	5.52±0.97	40.00±5.38	50.00±6.61	5.37±0.76	73.00±4.92
Large-dose group (n=8)	Before	5.66±0.35	42.25±11.47	56.00±12.43	5.18±1.03	66.50±12.00
	After	5.91±0.99	38.75±9.42	55.88±10.41	5.02±1.53	70.50±8.09

TBIL=total bilirubin; ALT=alanine transaminase; AST=aspartate aminotransferase; BUN=blood urea nitrogen; Cr=creatinine

Effect of nicotine on collateral circulation formation of ischemic hindlimb

Three weeks after nicotine treatment, abdominal aorta angiogram showed that there was no significant difference on collateral artery development between control and nicotine-treated groups. There was also no significant difference on collateral vessels between the nicotine-treated groups.

Effect of nicotine on intramuscular microvessels of ischemic hindlimb

The density of intramuscular microvessels in ischemic hindlimb in three nicotine-treated groups was significantly higher than that in control group

(large-: 19.85±0.92, middle-: 19.02±0.78, or low-: 16.85±0.36 vs. control-: 6.31±0.36/high power field; P<0.01, respectively). There was significant difference on the density of intramuscular microvessels between low- and middle- or large-dose group (P<0.01 for each), but no significant difference between large- and middle-dose group.

Effects of nicotine on restenosis

The intimal area in all three nicotine-treated groups was larger than that in control group (large-: 1.81±0.30, middle-: 1.51±0.28, or low-: 1.22±0.32 vs. control-: 0.79±0.22 mm²; P<0.05, respectively), whereas the luminal area in all three nicotine-treated groups was less than that in control group

($P < 0.05$, respectively). The intimal area in middle-dose group was less than that in large-dose group ($P < 0.05$), but larger than that in low-dose group ($P < 0.05$). The medial area in large-dose group was

less than that in the remaining three groups. There was no significant difference on external elastic lamina area between control and nicotine-treated groups.

Table 3. Comparisons of vessel wall area after nicotine administration between the groups (mean \pm SD, mm²)

	LA	IELA	EELA	IA	MA
Control group (n=9)	0.15 \pm 0.04	0.94 \pm 0.32	1.94 \pm 0.6	0.79 \pm 0.22	1.00 \pm 0.18
Low-dose group (n=8)	0.10 \pm 0.03*	1.32 \pm 0.28*	2.18 \pm 0.58	1.22 \pm 0.32*	0.86 \pm 0.23
Middle-dose group (n=9)	0.08 \pm 0.03*	1.59 \pm 0.31*	2.39 \pm 0.52	1.51 \pm 0.28 ⁰	0.91 \pm 0.17
Large-dose group (n=8)	0.05 \pm 0.02 ⁰	1.86 \pm 0.32 ⁰	2.28 \pm 0.54	1.81 \pm 0.30 ^{0#}	0.46 \pm 0.22 ^{0#}

LA=luminal area; IELA=internal elastic lamina area; EELA=external elastic lamina area; IA=intimal area; MA=medial area; * $P < 0.05$ in comparison with control group; ⁰ $P < 0.05$ in comparison with low-dose group; # $P < 0.05$ in comparison with middle-dose group

Discussion

Effect of nicotine on blood lipid profile

Results of the present study show that the levels of total cholesterol, triglyceride, and low-density lipoprotein cholesterol were significantly increased two weeks after HCD in all four groups. The levels of them remained significantly elevated five weeks after HCD. In addition, the levels of high-density lipoprotein cholesterol five weeks after HCD were also higher than those before HCD in all groups. These findings suggest that New Zealand White rabbits fed a HCD would provide a convenient model for studying peripheral vascular and coronary artery disease in humans. In the present study, we also showed that there was no significant difference on total cholesterol, triglyceride, and low-density lipoprotein cholesterol levels between control and nicotine-treated groups three weeks after nicotine treatment, indicating that intramuscular administration of nicotine for three weeks do not change the blood lipid profile of rabbits.

Effects of nicotine on hepatic and renal functions

After absorption of nicotine, eighty to ninety percent of it would be detoxicated in the plasma, liver, lungs, and kidneys, especially in the liver; so it has been suspected that nicotine may be harmful to these organs. In the present study, however, we showed that the concentrations of serum total bilirubin, alanine transaminase, aspartate aminotransferase, blood urea nitrogen, as well as creatinine were no significant changes three weeks after nicotine treatment in all three groups. There were also no significant differences of serum total

bilirubin, alanine transaminase, aspartate aminotransferase, blood urea nitrogen, and creatinine concentrations between control and nicotine-treated groups. These findings are in agreement with one earlier report. Czekaj et al⁸ have showed that non-pregnant and pregnant Wistar female rats exposed to cigarette smoke at a carbon monoxide concentration of 1 500 mg/m³ for 6 hours per day, 5 days per week, for 3 weeks produced considerably less-marked morphological changes in hepatic (number of apoptotic hepatocytes) and renal (height of proximal convoluted tubule epithelium) cells as well as in the placenta (for example, size of giant cells in labyrinth, height of epithelium covering yolk sac). Exposure to cigarette smoke did not result in histopathological changes in lungs and liver of surviving foetuses. The duration of pregnancy was not changed but a tendency for a decrease in the mothers' fertility indices as well as some changes in foetal and newborn parameters was observed.

Effect of nicotine on angiogenesis

Nicotine is a major component of cigarette smoke and has been found to play an important role in angiogenesis.¹⁻³ Nicotine at concentrations lower than those obtained in blood after smoking ($< 10^{-8}$ M) could stimulate deoxyribonucleic acid (DNA) synthesis, migration, proliferation, and tube formation of endothelial cells *in vitro*, all of which are major steps of angiogenesis.¹ More recently, Heeschen et al² have provided the anatomic and functional evidence that nicotine induces angiogenesis. Nicotine could also promote tumor growth and atherosclerosis in association with increased neovascularization. In a recently study, Heeschen et al³ have also provided the evidence

that nicotine enhances capillary density in the ischemic hindlimb to a similar extent as basic fibroblast growth factor (bFGF) and reduces the hemodynamic defect in a rabbit model of critical limb ischemia. In the current study, we showed that intramuscular microvessel density of ischemic hindlimb in all three nicotine-treated groups was significantly higher than that in control group. There was significant difference on the density of intramuscular microvessels between low- and middle- or large-dose groups, but no significant difference between large- and middle-dose groups. However, three weeks after nicotine treatment, abdominal aorta angiogram revealed that there was no significant difference on collateral artery development between control and nicotine-treated groups. There was also no significant difference on collateral vessels between the nicotine-treated groups. These findings have somewhat difference from a recent report. Heeschen et al³ have showed that nicotine delivered intra-arterially via osmotic minipumps for 18 days could promote angiogenesis and arteriogenesis in the setting of ischemia. We surmise that the discrepancy may be related to the difference of the applied pathway of nicotine. Indeed, direct intra-arterial infusion upstream from the occluded artery would be expected to optimize concentration and activity of nicotine in the local circulation of the affected limb. There are salient differences between angiogenesis and arteriogenesis. Angiogenesis or capillary sprouting results when an angiogenic stimulus induces endothelial cells in the existing vasculature to proliferate and migrate through the tissue to form new endothelialized channels, typically capillaries or small arterioles. In contrast, arteriogenesis is a result of growth and positive remodeling of pre-existing collaterals into larger conduits that can be visualized angiographically.³

Although the precise mechanism of nicotine on angiogenesis is not clear, there are several pathways by which nicotine might enhance revascularization *in vivo*. Several studies have showed previously that the angiogenic effects of nicotine are mediated by endothelial nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs).¹⁻³ In addition, it is known that nicotine at concentrations lower than those obtained in the blood after smoking could speed the initial rate of transition of the smooth muscle cells from the contractile- into the proliferative- and synthetic phenotype in primary culture, stimulate the initiation of DNA synthesis in growth-arrested secondary cultures, and enhance the proliferation of vascular smooth

muscle cells,⁹ which could affect angiogenesis or remodeling of collateral channels. Nicotine could also directly stimulate peripheral blood monocytes, T-cells, as well as basophiles,¹⁰ which play an important role in collateral vessel formation by attaching to the activated endothelium and by invading the walls of pre-existing arteriolar collateral vessels where they produce growth factors.¹¹ The functional importance of monocyte adhesion during vascular remodeling was recently illustrated by the administration of intercellular adhesion molecule (ICAM) blocking antibodies that markedly reduced collateral vessel growth.¹² Previous studies have demonstrated this process can be promoted by bFGF, tumor necrosis factor-alpha, lipopolysaccharide, vascular endothelial growth factor (VEGF), vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A), ICAM-1, as well as alphaL-, alphaM- and beta2-integrin monomers.¹³ Nicotine and its metabolite cotinine could directly alter activity of endothelial nitric-oxide synthase (eNOS), increase basal prostacyclin production and DNA synthesis of human endothelial cells in primary cultures,¹⁴ enhance the production of bFGF, and up-regulate the expression of several matrix metalloproteinases (collagenase-1, stromelysin-1, and gelatinase A) that were required for the angiogenic effect of nicotine. These data demonstrate nicotine contributes to the development of collateral vessels.¹⁵ Recently, Heeschen, et al³ showed that nicotine can induce monocyte adhesion by more than two-fold if peripheral blood monocytes were pretreated with nicotine. The stimulation of peripheral blood monocytes was accompanied by a significant upregulation of the surface expression of both CD11b (Mac-1) and CD11a(LFA-1). If both the endothelial cells and the peripheral blood monocytes were pretreated with nicotine, an almost six-fold increase in monocyte adhesion was observed. Nicotine also induced the release of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) from endothelial cells.

Effects of nicotine on atherosclerosis and restenosis

In the current study we also showed that the intimal area in all three nicotine-treated groups was larger than that in control group, whereas the luminal area in all three nicotine-treated groups was less than that in control group. The intimal area in middle-dose group was less than that in large-dose group, but larger than that in low-dose group. The medial area in large-dose group was

less than that in the remaining three groups. There was no significant difference on external elastic lamina area between control and nicotine-treated groups. These findings suggest that nicotine can also accelerate intimal thickening of balloon catheter denuding injury iliac artery, so it might contribute to the development of restenosis.

The principal factor limiting the long-term benefit of coronary angioplasty is restenosis, the angiographic renarrowing of the vessel lumen following successful balloon dilatation of a vascular lesion. The pathogenesis of restenosis in response to mechanical injury is incompletely understood and multifactorial. Traditionally, restenosis has been considered to be due the development of neointimal thickening as a result of migration and stimulation of smooth muscle by growth factors. The present study showed that nicotine did affect the levels of blood lipids, indicating that the effect of nicotine on stimulating intimal thickening was not achieved by increasing the levels of blood lipids. Nicotine has been known to modulate the phenotype and enhance the proliferation of vascular smooth muscle cells,⁹ which could affect vessel remodeling or restenosis. Nicotine could activate dendritic cells and augment their capacity to stimulate T-cell proliferation and cytokine secretion [ie, CD86, CD40, major histocompatibility complex (MHC) class II, lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1), CD54, and interleukin-12].¹⁶ These effects of nicotine may contribute to its influence on the progression of atherosclerotic lesions. Nicotine and its metabolite cotinine could also enhance the production of bFGF, a major mitogen for smooth muscle cells, and up-regulate the expression of several matrix metalloproteinases (collagenase-1, stromelysin-1, and gelatinase A) that are critical in cell migration. These data demonstrate nicotine contributes to the development of atherosclerosis and restenosis.¹⁵ However, whether nicotine is capable of stimulating intimal thickening and promoting restenosis in humans is still needed to determine.

Possible therapeutic effect of nicotine on cardiovascular disease

The effects of smoking and nicotine on coronary and peripheral arterial function have been probed with various invasive and noninvasive techniques. Tobacco use accelerates coronary and peripheral arterial disease. Tobacco cessation is a mainstay of therapy for these patients. Smoking

exerts its deleterious effects through many interactive mechanisms. Nicotine and carbon monoxide produce acute cardiovascular consequences, including altered myocardial performance, tachycardia, hypertension, and vasoconstriction. Smoking injures blood vessel walls by damaging endothelial cells, thus increasing permeability to lipids and other blood components. Among metabolic and biochemical changes induced by smoking are elevated plasma, free fatty acids, elevated vasopressin, and a thrombogenic balance of prostacyclin and thromboxane A₂. Chronic smoking is associated with a tendency for increased serum cholesterol, reduced high-density lipoprotein, and other lipid effects that contribute to atherosclerosis. In addition to rheologic and hematologic changes from increased erythrocytes, leukocytes, and fibrinogen, smokers have alterations in platelet aggregation and survival that produce thrombosis. However, tobacco smoke is a complex mixture of over 4 000 chemical constituents, and the effect of nicotine delivered via the use of tobacco may be quite different.³ Indeed, there are many toxins in cigarette smoke other than nicotine (for example, cadmium, carbon monoxide, and reactive oxygen species) that might contribute to the cardiovascular toxicity.²³ The findings in this study are also contradictory. On the one hand nicotine stimulates angiogenesis, but on the other accelerates intimal thickening and promotes the development of restenosis. We hypothesized that the beneficial or harmful effects of nicotine on vascular disease might mainly be decided by the dosage, course, duration, pathway of administration, as well as the hereditary property of host tissue or cell. The dosage of nicotine used in the present study was determined according to a previous study,² and might not be the best dosage because of the difference of experimental animals.

The angiogenic effect of nicotine is mainly mediated by nAChRs.¹⁻³ Agonists of nAChRs are currently being studied for their beneficial effects in some neurologic disorders, including Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and chronic pain.¹⁸ Although the findings in the present study show that nicotine is a double-edged sword, the potent angiogenic effects of nicotine might have application for disorders characterized by inadequate angiogenesis. To date, therapeutic angiogenesis has become a therapeutic approach of coronary heart disease. Transdermal applications of nicotine have been predominantly used for

tobacco cessation, and have been under investigation for some neurologic disorders.¹⁸ In addition, nicotine has been applied to the treatment of patients suffering from recurrent aphthous ulcers or active ulcerative colitis.¹⁹ In a crossover, single-blinded, placebo-controlled study, Tanus-Santos et al²⁰ have shown that the use of transdermal nicotine in mildly hypertensive smokers is probably safe. Nicotine patches, as used in actual practice, do not appear to be associated with an increased risk of myocardial infarction.²¹

References

- 1). Villablanca AC. *J Appl Physiol*. 1998;84(6):2089-2098; 2). Heesch C, Jang JJ, Weis M, Pathak A, Kaji S, Hu RS, Tsao PS, Johnson FL, Cooke JP. *Nat Med* 2001;7(7):833-839; 3). Heesch C, Weis M, Cooke JP. *J Am Coll Cardiol* 2003;41(3):489-496; 4). Hakki A, Friedman H, Pross S. *Int Immunopharmacol* 2002;2(10):1403-1409; 5). Suzuki J, Bayna E, Dalle Molle E, Lew WY. *J Am Coll Cardiol* 2003;41(3):482-488; 6). Jacobi J, Jang JJ, Sundram U, Dayoub H, Fajardo LF, Cooke JP. *Am J Pathol* 2002;161(1):97-104; 7). St Croix B, Rago C, Velculescu V, Traverso G, Romans KE, Montgomery E, Lal A, Riggins GJ, Lengauer C, Vogelstein B, Kinzler KW. *Science*. 2000;289(5482):1197-1202; 8). Czekaj P, Palasz A, Lebda-Wyborny T, Nowaczyk-Dura G, Karczewska W, Florek E, Kaminski M. *Int Arch Occup Environ Health* 2002;75(Suppl):S27-S35; 9). Thyberg J. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1986;52(1):25-32; 10). Sopori ML, Kozak W, Savage SM, Geng Y, Kluger MJ. *Adv Exp Med Biol* 1998;437:279-289; 11). Scholz D, Ito W, Fleming I, Deindl E, Sauer A, Wiesnet M, Busse R, Schaper J, Schaper W. *Virchows Arch* 2000;436(3):257-270; 12). Hoefer IE, van Royen N, Buschmann IR, Piek JJ, Schaper W. *Cardiovasc Res* 2001;49(3):609-617; 13). Arras M, Ito WD, Scholz D, Winkler B, Schaper J, Schaper W. *J Clin Invest* 1998;101(1):40-50; 14). Bouterin-Falson O, Blaes N. *Nouv Rev Fr Hematol* 1990;32(4):253-258; 15). Carty CS, Soloway PD, Kayastha S, Bauer J, Marsan B, Ricotta JJ, Dryjski M. *J Vasc Surg* 1996 ;24(6):927-934; 16). Aicher A, Heesch C, Mohaupt M, Cooke JP, Zeiher AM, Dimmeler S. *Circulation* 2003;107(4):604-611; 17). Krupski WC. *Ann Vasc Surg* 1991;5(3):291-304; 18). Court JA, Piggott MA, Lloyd S, Cookson N, Ballard CG, McKeith IG, Perry RH, Perry EK. *Neuroscience* 2000;98(1):79-87; 19). Scheid P, Bohadana A, Martinet Y. *N. Engl. J. Med* 2000;343(24):1816-1817; 20). Tanus-Santos JE, Toledo JC, Cittadino M, Sabha M, Rocha JC, Moreno H Jr. *Am J Hypertens* 2001;14(7 Pt 1):610-614; 21). Kimmel SE, Berlin JA, Miles C, Jaskowiak J, Carson JL, Strom BL. *J Am Coll Cardiol* 2001;37(5):1297-1302.

Tap chí Dược liệu, tập 9, số 1/2004 (trang 14-20)

NGHIÊN CỨU SƠ BỘ THÀNH PHẦN HOÁ HỌC VÀ TÁC DỤNG DƯỢC LÝ CỦA LÁ NEEM

*Nguyễn Thương Dong¹, Nguyễn Kim Phương¹, Phạm Thị Nguyệt Hằng¹
Nguyễn Trang Thuý¹, Nguyễn Quang Khuân², Nguyễn Thế Hùng², Nguyễn Văn Khang³*

(1) Viện Dược Liệu - (2) Đại học Dược Hà Nội - (3) Viện Kiểm Nghiệm

(Nhận bài ngày 26 tháng 11 năm 2003)

Summary

Preliminary Studies on Chemical Composition and Pharmacological Effects of Neem Leaves

Neem leaves (Azadirachta indica A.Juss) collected in Binh Thuan province in May have been shown to contain alkaloids (0,66%), flavonoids (2,95%), coumarins, reduced sugars and lipids. The alkaloid fraction gave 6 spots and the flavonoid fraction yielded 7 spots on thin layer chromatography. Two substances, i.e., A6, an alkaloid and a flavonoid suspected to be Azadirachin A, have been isolated for further study.

Liquid extract of Neem leaves exerted anti-microbial activity against Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Salmonella typhi, Pseudomonas aeruginosa and Candida albicans.

Key words: *Azadirachta indica*, Alcaloid A_n, Agadirachin A; Anti-microbial Activity, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*.

I. Đặt vấn đề

Cây Neem còn được gọi là xoan Ấn Độ, có nguồn gốc từ Nam Á và phát triển tốt ở các vùng có lượng mưa trung bình hàng năm từ 400 đến 1200mm, có khả năng chịu hạn tốt, nên đã được Giáo sư Lâm Công Định nhập về Việt Nam từ năm 1981 và trồng ở vùng Ninh Phước, Ninh Thuận. Cây được đặt tên là cây "xoan chịu hạn".

Nhiều công trình nghiên cứu đã xác minh tác dụng kháng khuẩn, kháng nấm, chống virus và ký sinh trùng, giảm đau và chống viêm. Neem đã được sử dụng để trị các bệnh ngoài da như eczema, vảy nến, trứng cá, viêm da, herpes... Nó còn có tác dụng điều hoà miễn dịch, hạ đường huyết và hạ sốt. Trong nông nghiệp, cây được sử dụng để diệt côn trùng. Đã có một số dạng thương phẩm từ Neem như dịch chiết dầu lá Neem (Neem leaf oil dry extract), dịch chiết từ hạt (Neem seed extract), kem đánh răng (Neem toothpaste), xà phòng Neem (Neem cream) và một số dạng thành phẩm dùng trong nông nghiệp như Neem EC (Emulsifiable concentrate), Neem UCA (urea coating agent), Exona conditioner (1).

Để xác định giá trị sử dụng của Neem di thực vào Việt Nam, chúng tôi tiến hành nghiên cứu sơ bộ thành phần hoá học và tác dụng sinh học của lá Neem.

II. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

1. Nguyên liệu: Lá Neem được thu hái vào tháng 5 năm 2002, ở xã Phước Định, huyện Ninh Phước, tỉnh Bình Thuận.

2. Nguyên cứu thành phần hoá học:

2.1: Định tính một số nhóm chất tự nhiên trong dược liệu bằng các phản ứng hoá học theo phương pháp của trường đại học Dược Hà Nội (2).

2.2: Chiết tách, định tính alcaloid bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng và phân lập bằng sắc ký cột: Cân chính xác 20g dược liệu đã tán nhỏ, cho vào bình thủy tinh 200ml, thấm ẩm dược liệu bằng một hỗn hợp gồm 16ml dung dịch amoniac 10%, 20ml dung dịch ethanol 90° và 40 ml ether. Đậy kín để yên trong 12 giờ. Sau đó, chuyển toàn bộ vào Soxhlet rồi chiết liên tục bằng ether trong 6 giờ. Chuyển dịch chiết ether vào bình gạn dung tích 250ml. Lắc 4 lần với dung dịch HCl 1%, mỗi lần 20ml. Kiểm hoá bằng dung dịch amoniac 10% đến pH= 9,5-10. Chiết 4 lần với chloroform, mỗi lần 25ml. Lọc dịch chiết qua natri sulfat khan. Cô cách

thủy để định tính, định lượng và phân lập alcaloid.

+ Định tính bằng sắc ký lớp mỏng: Hoà tan cân alcaloid bằng cloroform để chấm sắc ký. Sử dụng bản mỏng silica gel G₆₀ F₂₅₄ tráng sẵn, triển khai trong hệ dung môi cloroform - acetone (6:4). Quan sát các vết trên sắc ký đồ dưới ánh sáng tử ngoại ở 2 bước sóng λ= 254nm và λ = 366nm, hiện màu bằng thuốc thử Dragendorff.

+ Phân lập và nhận dạng chất A_n bằng sắc ký cột silica gel CoMerck cỡ hạt 0,062- 0,2mm. Dung môi khai triển bằng cloroform - acetone (6:4) với tốc độ 20 giọt/ phút.

+ Nhận dạng sơ bộ chất A_n bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng 2 chiều, do phổ tử ngoại trên máy UV-VIS-Spectro- photometer Cary 1E- Australia và phổ hồng ngoại trên máy FT- IR- Nexus- 870 Nicolet của Viện Dược Liệu.

+ Định lượng alcaloid toàn phần bằng phương pháp cân hàm lượng alcaloid được tính theo công thức:

$$X\% = \frac{n}{a(100 - C)} \times 10^4$$

Trong đó, X là hàm lượng alcaloid toàn phần (%), n là khối lượng cao khô (g), a là khối lượng dược liệu đem định lượng (g) và c là độ ẩm (%) của dược liệu.

2.3: Chiết tách, định tính flavonoid bằng sắc ký lớp mỏng và phân lập bằng sắc ký cột.

Cân chính xác 30g dược liệu, chiết nóng với cloroform trong 30 phút để loại chlorophyl. Lấy dược liệu ra để bay hết hơi dung môi, chiết tiếp trong Soxhlet với cồn 90° trong 10 giờ. Thu hồi còn 50ml dịch chiết đậm đặc, cho tủa với nước, lọc bỏ tủa. Dịch lọc lắc 3 lần để loại tạp. Dịch chiết nước lắc 8 lần với ethyl acetat mỗi lần 25ml. Dịch chiết ethyl acetat đem thu hồi hết dung môi, thu được flavonoid toàn phần.

+ Định tính flavonoid bằng sắc ký lớp mỏng: Hoà tan cân bằng ethyl acetat để chấm sắc ký trên bản mỏng silica gel G₆₀ F₂₅₄ tráng sẵn. Triển khai trong hệ dung môi toluen- ethyl acetat- acid formic (5:6:1)

+ Định lượng flavonoid bằng phương pháp cân.

2.4: Phân lập azadiractin A (theo phương pháp của Tripathi): Cân khoảng 30g lá Neem đã được cắt

nhỏ. Chiết Soxhlet với 300ml n-hexan trong 8 giờ, cất thu hồi dung môi, thu được cân B đã loại chất béo, phần dung môi thu hồi chứa dầu béo A. Cân B được chiết 5 lần với methanol, lọc qua giấy lọc. Dịch lọc C (chứa Aza- A) được chiết với ethyl-acetat 3 lần. Dịch chiết lọc qua natri sulfat khan cất thu hồi dung môi được cân E. Tiếp tục rửa E 4 lần với n- hexan, mỗi lần 15ml, để bay hơi tự nhiên, thu được cân màu vàng nhạt F. Tinh chế thu được Aza-A.

+ Sơ bộ nhận dạng Aza-A bằng phổ hồng ngoại và tử ngoại và sắc ký lớp mỏng 2 chiều như đã mô tả ở phần trên.

3. Thử tác dụng kháng khuẩn:

+ Mẫu thử: Cao lỏng tỷ lệ 11,52% (5,76g cao tương đương 50g dược liệu) pha loãng thành các nồng độ 1/20, 1/40, 1/80, 1/100, 1/160, 1/200, 1/240.

+ Kháng sinh chuẩn: Gentamycin và tetracyclin.

+ Chủng vi khuẩn: *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* và *Staphylococcus aureus*.

+ Môi trường nuôi cấy: Muller Hinton.

Áp dụng phương pháp khuếch tán của Reddish và Abraham. Đường kính vô khuẩn được đo trên máy Protozone- UGO Basile- Synopics.

Cân chính xác 3,8g môi trường và 100ml nước cất. Đun cách thủy cho đến khi môi trường đông nhất. Đổ vào mỗi đĩa 20ml môi trường. Lượng vi khuẩn được trải đều trên mặt thạch khoảng 107-108 CFU/ml. Sau khi trải đều vi khuẩn, đặt hộp petri vào tủ ấm 37°C trong 30 phút. Dùng dụng cụ đục môi trường tạo những lỗ có đường kính 8mm. Nhỏ vào mỗi lỗ 100µl dung dịch mẫu thử ở các nồng độ khác nhau. Nhỏ các kháng sinh chuẩn làm chứng với nồng độ 5 UI/ml vào những lỗ cùng trong hộp petri. Ủ các petri ở nhiệt độ 37°C trong 24 giờ. Đo đường kính vòng vô khuẩn và tính giá trị trung bình theo công thức:

$$\bar{X} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{n-1} X_i$$

$$S_d = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^{n-1} (X_i - \bar{X})^2}}{n - 1}$$

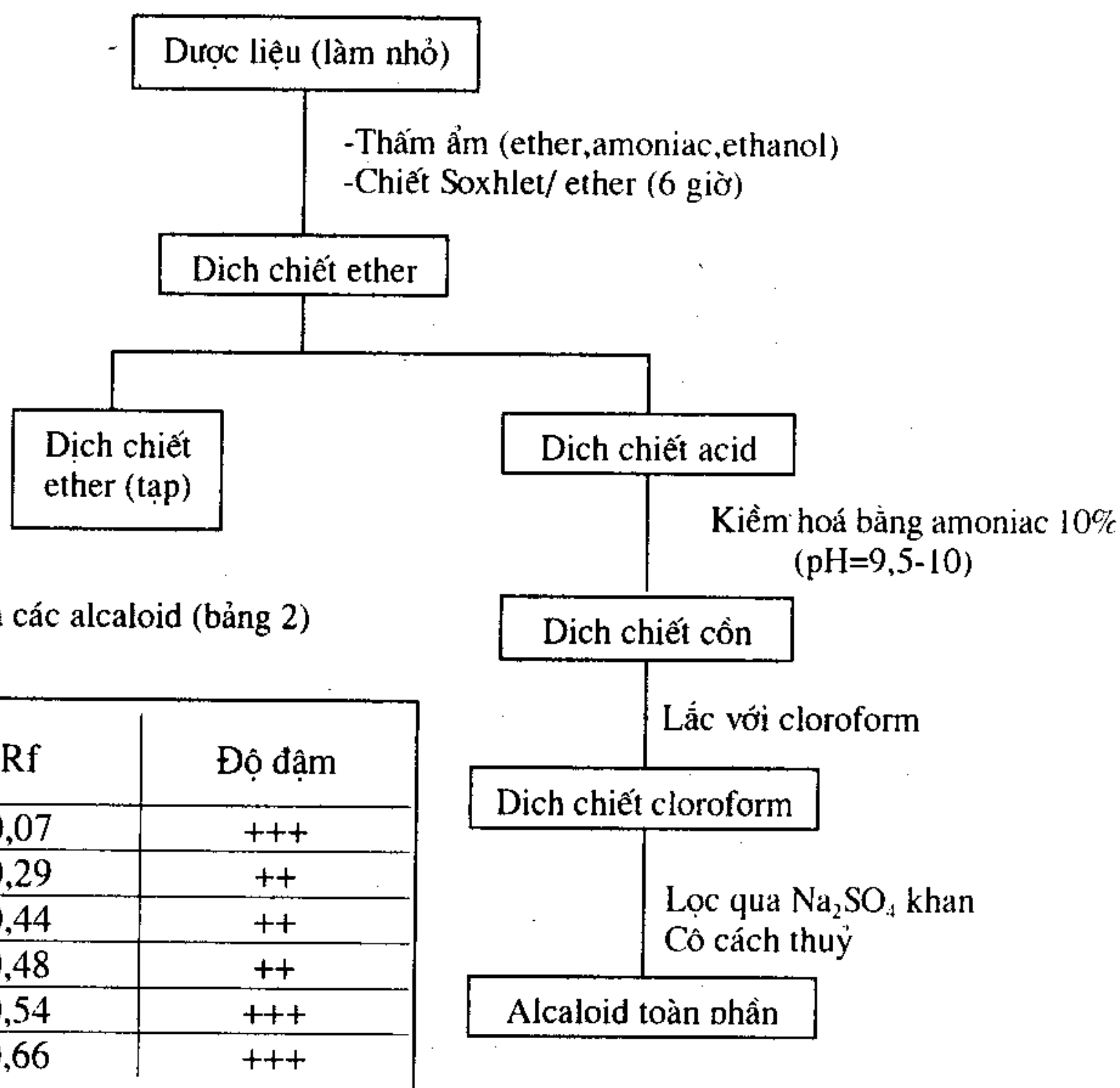
Trong đó, \bar{X} là đường kính trung bình vòng vô khuẩn, X_i là giá trị các vòng vô khuẩn, $n-1$ là số bậc tự do và S_d là độ lệch chuẩn.

III. Kết quả nghiên cứu

1. Kết quả định tính các hợp chất tự nhiên trong lá Neem (Bảng 1).

Hợp chất	Các phản ứng định tính	Kết quả	Kết luận
Phytosterol	Phản ứng với anhydrid acetic và H ₂ SO ₄ đậm đặc	-	Không
Glycosid trợ tim	Phản ứng Lieberman- Bouchardt Phản ứng Baljet Phản ứng Legal	- - -	Không
Alcaloid	Phản ứng với thuốc thử Dragendorff Phản ứng với thuốc thử Bouchardat Phản ứng với thuốc thử Mayer	+++ +++ +++	Có
Tanin	Phản ứng với FeCl ₃ 5% Phản ứng với gelatin 1%	+ -	Không
Acid hữu cơ	Phản ứng với Na ₂ CO ₃	-	Không
Đường khử	Phản ứng với thuốc thử Fehling	++	Có
Saponin	Phản ứng tạo bọt Phản ứng Salkovski	- -	Không
Chất béo	Vết dầu để lại trên giấy lọc	++	Có
Caroten	Phản ứng với H ₂ SO ₄ đậm đặc	++	Có
Coumarin	Phản ứng đóng, mở vòng lacton Phản ứng với thuốc thử Diazo Quan sát dưới ánh sáng tử ngoại	++ + +	Có
Flavonoid	Phản ứng với kiềm Phản ứng với FeCl ₃ 5% Phản ứng cyanidin	+++ +++ +++	Có

Quy trình chiết xuất alcaloid (Sơ đồ 1)



Giá trị Rf trên SKLM của các alcaloid (bảng 2)

Vết	Rf	Độ đậm
A ₁	0,07	+++
A ₂	0,29	++
A ₃	0,44	++
A ₄	0,48	++
A ₅	0,54	+++
A ₆	0,66	+++

Sơ bộ nhận dạng chất A₆

204 và 278nm.

+ Sắc ký lớp mỏng 2 chiều (Hệ dung môi CHCl₃-MeOH- NH₄OH (q=1- 0,05) và CHCl₃ - acetone (4:6): chỉ cho 1 vết.

+ Phổ hồng ngoại: peak λ_{max} 3426 (nhóm -OH), 2914 (-CH₃), 1710cm⁻¹ (-C=O).

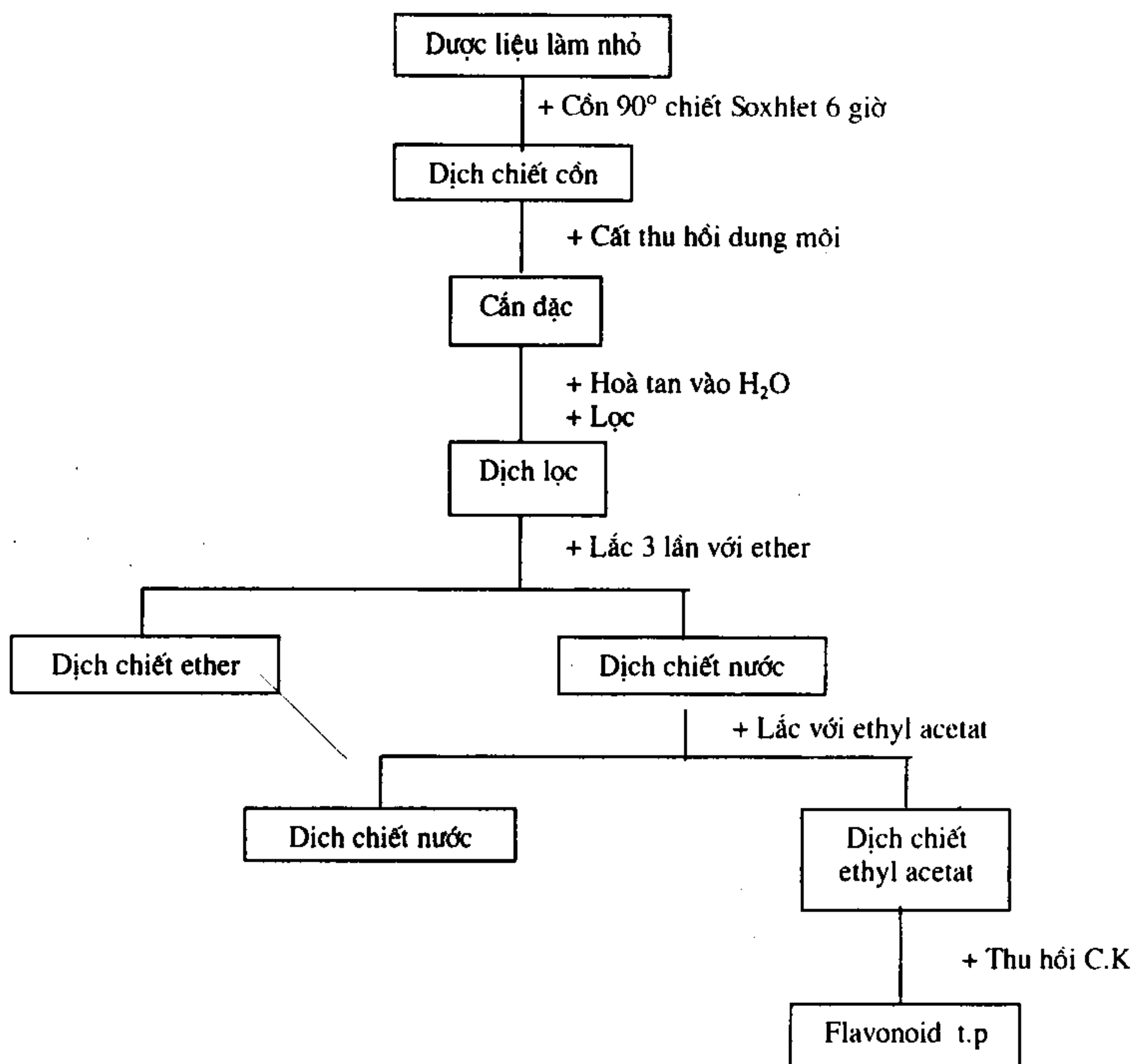
+ Phổ tử ngoại: 2 đỉnh hấp thụ ở bước sóng λ_{max} =

Kết quả định lượng alcaloid trong lá Neem (bảng 3).

Số lần	n(g)	a(g)	c(g)	X(%)
Lần 1	0,111	20	10,15	0,62
Lần 2	0,129	20	10,25	0,72
Lần 3	0,125	20	9,98	0,69
Lần 4	0,123	20	11,05	0,69
Lần 5	0,100	20	10,59	0,56
Lần 6	0,115	20	10,99	0,65
Trung bình	$\bar{X} \pm Sd$			0,66 ± 0,059

X % = 0,66%

Quy trình chiết xuất flavonoid (Sơ đồ 2)



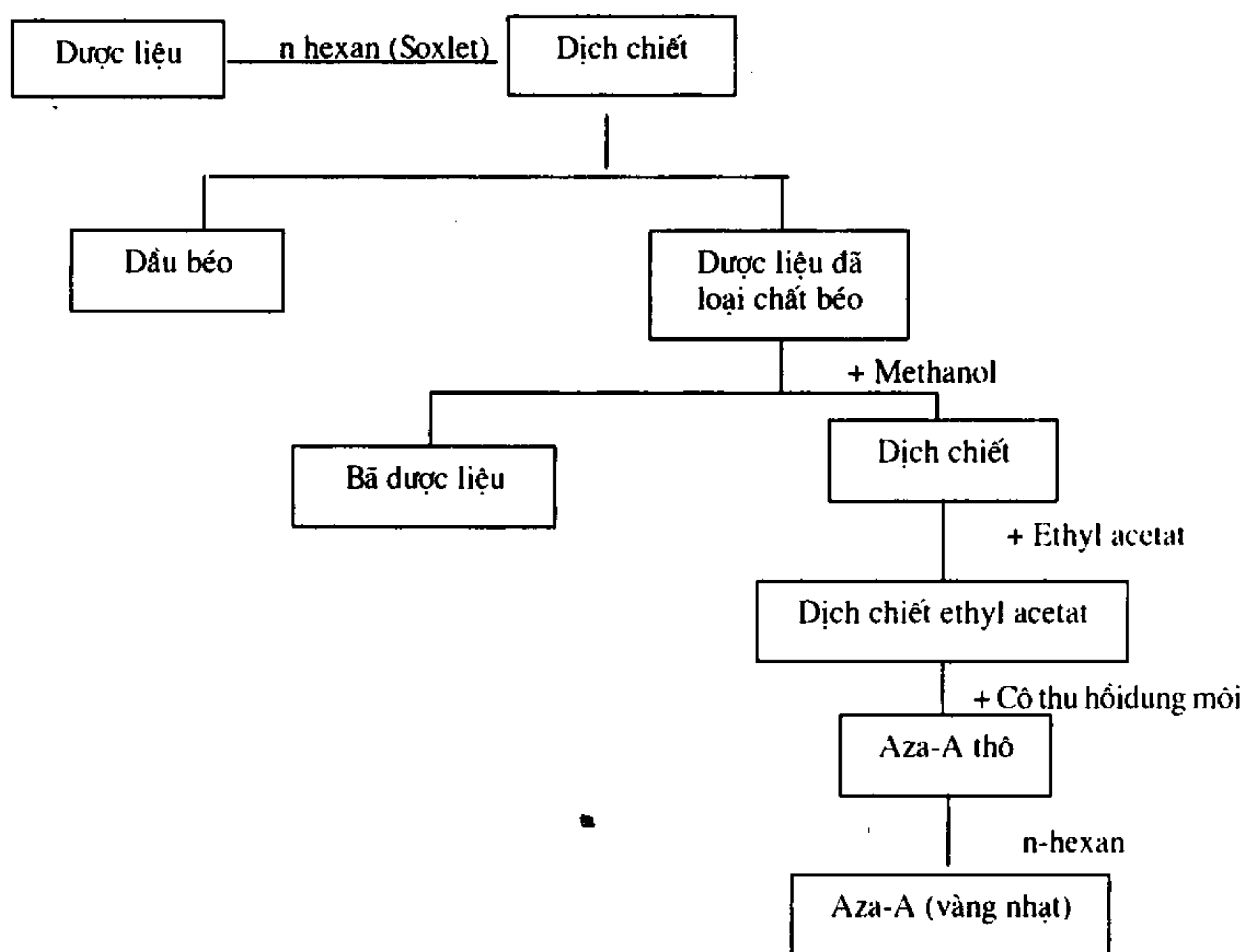
Giá trị Rf trên SKLM của các flavonoid (bảng 4):

Vết	Hệ dung môi: Toluene- ethyl acetat- acid formic (5=6=1)		Hệ dung môi: Toluene- ethyl acetat - aceton - acid formic (5=6=2=1)	
	Rf	Độ đậm	Rf	Độ đậm
F ₁	0,12	+++	0,08	+++
F ₂	0,29	+++	0,17	+++
F ₃	0,47	++	0,34	+
F ₄	0,51	+	0,37	+
F ₅	0,56	+	0,39	+
F ₆	0,64	+	0,43	+
F ₇	0,73	+++	0,55	+++

Kết quả định lượng flavonoid trong lá Neem (bảng 5):

Số thứ tự	n(g)	a(g)	c(g)	X%
Lần 1	0,78	30	10,14	2,89
Lần 2	0,78	30	10,56	2,91
Lần 3	0,85	30	10,36	3,16
Lần 4	0,85	30	10,98	3,18
Lần 5	0,76	30	9,86	2,81
Lần 6	0,75	30	9,89	2,77
TB	X ± Sd			2,95 ± 0,18

Quy trình phân lập azadirachtin A (Sơ đồ 3)
(Theo phương pháp Tripathi)



Kết quả kháng nấm (bảng 6):

Vi sinh vật	Đường kính vòng vô khuẩn(m m)					
	Dịch chiết nước				K.S đối chiếu (gentamicin)	
	Nồng độ 1/100		Nồng độ 1/200		Số 1	Số 2
<i>Candida albicans</i>	21,73	21,73	18,93	18,93	21,73	21,73
	21,72	21,37	19,62	17,52	21,72	21,37
	19,44	19,09	17,70	17,70	20,13	20,48
	21,50	20,45	17,63	17,27	20,15	21,86
Trung bình	21,10±1,1	20,66±1,17	18,47±0,97	17,86±0,74	21,18±0,75	21,36±0,62

Kết quả kháng khuẩn (bảng 7):

Vi sinh vật	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)						
	Dịch chiết nước					K.S đối chiếu	
	Nồng độ					Genta	Tetra
	1/20	1/40	1/80	1/160	1/240	5UI/ml	5UI/ml
<i>E. coli</i>	30	26,80	18,80	17,06	17,75	17,06	24
	31,68	25,76	19,84	17,41	17,41	18,45	24
	30,28	25,06	20,18	17,41	17,41	19,15	24
	29,24	25,06	17,06	18,84	17,06	18,10	24
	29,59	24,72	17,06	20,54	16,36	18,45	24
	TB	30,16±0,94	25,48±0,83	18,59±1,49	18,25±1,45	17,20±0,53	18,24±0,76
<i>Pseu. aeruginosa</i>	29,33	24,38	20,14	17,69	15,90	0	0
	28,97	22,97	19,79	16,61	15,90	0	0
	30,74	24,03	19,43	16,96	16,25	0	0
	30,03	23,67	20,14	17,13	16,25	0	0
	30,06	23,92	20,05	16,88	16,53	0	0
TB	29,93±0,77	23,79±0,53	19,91±0,30	17,05±0,40	16,17±0,27	0	0
<i>Sta. aureus</i>	43,74	38,23	25,14	18,60	18,26	24,11	22,04
	42,71	37,20	26,52	18,60	19,29	17,22	24,11
	42,37	37,54	25,83	19,29	18,26	22,39	24,46
	48,22	38	31	19,98	18,60	19,98	22,39
	43,40	37,89	21,18	19,63	18,94	23,08	23,77
TB	44,08±2,37	37,77±0,41	26,93±2,32	19,22±0,62	18,67±0,45	21,36±2,76	23,35±1,08
<i>Sal. typhi</i>	41,48	34,28	27,77	19,88	19,20	20,23	0
	46,63	41,14	29,83	21,26	17,40	20,57	0
	45,60	40,45	28,11	21,94	18,51	20,57	0
	47,31	39,43	30,17	22,97	18,51	20,91	0
TB	45,26±2,61	38,83±3,11	28,97±1,21	21,51±1,30	18,41±0,74	20,57±0,14	0

IV. Kết luận

Lá Neem thu hái vào tháng 5 ở Bình Thuận, sơ bộ cho thấy chứa alcaloid (0,66%), flavonoid (2,95%), coumarin, đường khử và chất béo. Trên SKLM, có 6 vết alcaloid và 7 vết flavonoid. Đã phân lập được 2 chất là A₆ thuộc nhóm alcaloid

và một chất có nhiều khả năng là azadirachtin A.

Dịch chiết lá Neem có tác dụng kháng chủng vi sinh vật như *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa* và *Candida albicans*.

Tài liệu tham khảo

- 1). Washington D.C Natural Research Council 1992. Neem, a tree for solving global problems. National Academy press; 2). Thực tập Dược liệu (phân hoá học), Đại học Dược Hà Nội (1999); 3). Tripathi Y.C, Prabhu V.V; *National Acad Sci Lett.* (India), 1996,19 (11&12) 210- 213;

(Tiếp theo trang 35)

Tài liệu tham khảo

- 1). Viện Dược liệu, 1986. Công trình nghiên cứu khoa học 1972 - 1986, Nhà Xuất bản Y học; 2). Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật, 2001. Tài nguyên thực vật có tính dầu ở Việt Nam. Tập I. Nhà Xuất bản Nông nghiệp; 3). Nguyễn Thị Tâm, 2003. Những tinh dầu lưu hành trên thị trường. Nhà Xuất bản Khoa học và Kỹ thuật; 4). Sở Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn Quảng Nam. Báo cáo giải trình chủ trương và quá trình chỉ đạo của sở trong việc phát triển cây quế từ 1993 - 1999.

ĐỘC TÍNH CẤP CỦA HAI LOẠI CAO DƯỢC LIỆU BAN VÀ BAN TRÒN

Nguyễn Quốc Thúc, Nguyễn Thương Đông, Bùi Thị Bằng,
Ngô Tiến Dũng, Nguyễn Thị Dung

(Nhận bài ngày 28 tháng 10 năm 2003)

Summary

Acute Toxicity of *Hypericum japonicum* and *Hypericum patulum* Extracts

Water extracts of *Hypericum japonicum* and *Hypericum patulum* collected in Ha Tay and Laocai (Vietnam) have been proved to possess liver protective and choloretic activities in Swiss mice. At indicated doses, the herbs show no acute toxicity.

Key words: *Hypericum*, Liver Disease, Toxicity.

1- Mở đầu

Ở Việt Nam trước đây, cây ban và ban tròn chưa được nghiên cứu về thành phần hoá học, tác dụng sinh học và sử dụng rộng rãi để làm thuốc. Những thí nghiệm của chúng tôi mới đây cho thấy hai loài đều có những tác dụng tích cực trên mô hình thử nghiệm một số tác dụng sinh học có liên quan đến hệ gan mật như bảo vệ gan, chống viêm và lợi mật. Vì vậy, chúng tôi đã tiếp tục nghiên cứu độc tính cấp của hai loài nhằm xác minh khả năng sử dụng chúng vào việc điều trị một số bệnh về gan.

2- Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

+ Ban (HJ): Toàn bộ phần trên của cây ban (*Hypericum japonicum* Thunb. ex Murr.) được thu hái vào tháng 4, khi đang có hoa ở Hà Tây (do Khoa Tài nguyên cây thuốc của Viện Dược liệu cung cấp). Nguyên liệu được phơi khô trong bóng râm và dùng để điều chế cao nước cho nghiên cứu độc tính cấp. Cao nước được điều chế đến dạng cao đặc và pha với nước theo tỉ lệ thích hợp cho từng thí nghiệm.

+ Ban tròn (HP): Lá của cây ban tròn (*Hypericum patulum* Thunb. ex Murr.) được Khoa Tài nguyên cây thuốc thu hái vào tháng 10 năm 2001 ở Sa Pa. Nguyên liệu được phơi, điều chế cao và pha với nước như cách làm trên.

2.2. Đối tượng và địa điểm nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng thực nghiệm

Nghiên cứu được thực hiện trên 152 chuột nhắt trắng có trọng lượng khoảng 20 gam ở độ tuổi 8-12 tuần. Tất cả các chuột đã chọn đều nhanh nhẹn,

khỏe mạnh, không bị các dị tật bẩm sinh.

Tổng số chuột được chia thành hai nhóm:

+ Nhóm I: Nhóm nghiên cứu tìm hiểu độc tính của cao lỏng HJ gồm 80 chuột, được chia thành 8 lô, mỗi lô 10 con. Cao lỏng HJ được chế với tỷ lệ 1 gam cao tương đương 0,31 gam dược liệu khô. Liều thường dùng trong đông y là 40-60 gam dược liệu khô/ngày, sắc uống.

+ Nhóm II: Nhóm nghiên cứu tìm hiểu độc tính của cao lỏng HP gồm 72 chuột, được chia thành 12 lô, mỗi lô 6 con. Cao lỏng HP được chế với tỷ lệ 1 gam cao tương đương 2,61 gam dược liệu khô. Liều thường dùng trong đông y là 10-100 gam dược liệu khô/ngày, sắc uống.

Nghiên cứu được thực hiện trên 8 mức liều của HJ và 12 mức liều của HP.

Mức liều tối thiểu được khảo sát là 2-5 g/kg thể trọng (gấp 2-5 lần liều sử dụng) và mức liều tối đa là 120-240 g/kg thể trọng đối với từng loại chất.

2.2.2. Địa điểm nghiên cứu

Thí nghiệm được tiến hành ở Khoa Độc học-Học viện quân y 103.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu xác định liều độc cấp của hai loại cao dược liệu HJ và HP được tiến hành theo phương pháp Kerber dựa vào tỷ lệ sống, chết của động vật thí nghiệm khi có sự tăng liều.

Đường đưa thuốc vào cơ thể của cao HJ và HP là đường tiêu hoá. Dịch lỏng cao dược đưa qua miệng bằng phương pháp uống bắt buộc (dùng kim cong đầu tây đưa thẳng dung dịch cao dược liệu vào thực quản chuột). Trong thực nghiệm, dùng

loại xy lanh có thể tích là 1 ml để đảm bảo độ chính xác của lượng dịch lỏng cao HJ và HP khi đưa vào cơ thể chuột.

Tính toán liều để thể tích dịch cao lỏng HJ và HP bơm vào đường tiêu hoá chuột không vượt quá 0,5 ml cao lỏng đối với mỗi con.

Quan sát hành vi của chuột uống cao lỏng HJ và HP trong khoảng thời gian 24 giờ liên tục. Nuôi,

chăm sóc và theo dõi tiếp tục trong vòng 4 tuần sau khi uống được liệu nhằm tìm hiểu ảnh hưởng kéo dài của HJ và HP.

3. Kết quả nghiên cứu

3.1. Kết quả nghiên cứu đối với loại cao được liệu HJ:

3.1.1. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Bảng nghiên cứu tỷ lệ sống chết của chuột nhắt trắng uống cao dịch lỏng HJ

Số TT	Mức liều (g/kg)	Lượng uống (ml)	Số lượng động vật (chuột)	Chỉ tiêu chết (chuột)		Ghi chú
				Số lượng	Tỷ lệ (%)	
1	02	0.1	10	0	0	+Bắt đầu thấy xuất hiện những biểu hiện tăng vận động không bình thường ở chuột.
2	04	0.2	10	0	0	
3	10	0.5	10	0	0	
4	20	1.0	10	0	0	
5	30	0.25*	10	0	0	
6	60	0.5*	10	0	0	
7	90	0.75*	10	0	0	
8	120	1.0*	10	2	20	+Khó thở, giảm vận động, xù lông, đi lỏng, phân đen-bết.

* : Loại cao lỏng HJ đã được cô cách thủy với nồng độ đặc gấp 6 lần dịch lỏng ban đầu.

+ Với liều 20 g/kg thể trọng, chuột bắt đầu có những biến đổi đầu tiên về hành vi như hoạt động nhanh nhẹn hơn, chạy đi chạy lại nhiều hơn so với chuột ở lô đối chứng và xuất hiện những biểu hiện hưng phấn, tăng kích thích, hay dừng lại ngửi (như đang tìm kiếm cái gì).

+ Ở mức liều 60-90 mg/kg thể trọng, chuột giảm hẳn vận động, thường đứng một chỗ, lông xù, lưng uốn cong vồng lên, khó thở và thở giật cục. Quan sát thấy chuột phải vận dụng toàn bộ sức lực của cơ thể vào động tác thở, đi lỏng, phân nhão màu đen, quánh, luôn dính bết ở hậu môn. Phần lớn chuột trong nhóm biểu hiện chậm chạp, hầu như cả ngày chỉ đứng yên một chỗ, lông xù, dựng đứng, bần và bết.

Sau 2-3 ngày, chuột hết thải phân đen, các hoạt động nhanh nhẹn trở lại.

Toàn bộ số chuột nghiên cứu được nuôi tiếp và theo dõi hàng ngày trong khoảng thời gian 30 ngày với kết quả không có chuột nào chết.

+ Đến mức liều 120 g/kg thể trọng, có 20% chuột

chết vào ngày thứ 2 sau khi uống được liệu. Chúng tôi nhận định rằng nguyên nhân gây tử vong ở những chuột này chưa hẳn đã do tác dụng của hoạt chất trong dịch cao lỏng gây ra mà có thể do chuột bị uống ép buộc một lượng lớn cao trong khoảng thời gian tương ngắn nên dễ gây hiện tượng rối loạn tiêu hoá mạnh, làm cho chuột không thích nghi kịp dẫn đến tử vong. Chính vì vậy, chúng tôi quyết định dừng nghiên cứu ở liều 120 mg/kg thể trọng vì các lý do kỹ thuật sau:

- Không thể cô đặc hơn nữa dịch lỏng HJ nhằm đạt hiệu quả tăng liều vì ở mức liều này dịch cao cô đã đặc quánh, sệt.

- Không thể cho chuột uống dịch cao sệt HJ với khối lượng thể tích lớn hơn nữa cũng như không thể cho uống với số lần nhiều hơn để tăng liều.

Như vậy, với mức liều 90 g/kg thể trọng cũng đủ để kết luận rằng đây là một loại dược liệu không độc đối với chuột vì để đạt được mức liều này thì một người trung bình có trọng lượng nặng

50 kg sẽ phải sử dụng $90 \times 50 = 4.500$ gam/người/ngày. Nói cách khác là phải sử dụng 4,5 kg được liệu khô trong một ngày. Điều này trên thực tế thường khó thực hiện được.

3.1.2. Nhận xét:

a. Cao dịch lỏng HJ không độc đối với chuột nhắt trắng khi tiếp xúc qua đường tiêu hoá ở các liều được sử dụng làm thuốc.

b. Các phản ứng đầu tiên của chuột khi uống dịch cao lỏng HJ xuất hiện ở mức liều 20 g/kg thể trọng.

c. Những triệu chứng lâm sàng khi uống dịch cao lỏng HJ ở mức liều 60g/kg thể trọng là khó thở, giảm vận động, xù lông, đi lỏng, phân đen-bết.

d. Những biểu hiện của chuột khi được uống liều trên 60g/kg thể trọng là:

- Giảm hẳn vận động, xù lông, khó thở và thở giật cục.

- Đi lỏng, phân nhão màu đen, quánh, luôn dính bết ở hậu môn.

- Sau 2-3 ngày, chuột hết thái phân đen, các hoạt động nhanh nhẹn trở lại và không thấy tử vong trong vòng 30 ngày.

3.2. Kết quả nghiên cứu đối với cao HP.

Kết quả được trình bày ở bảng 2 cho thấy:

- + Với liều 80 gam/kg thể trọng, chuột bắt đầu có những biến đổi đầu tiên về hành vi như chạy đi chạy lại nhanh nhẹn hơn so với chuột ở lô đối chứng và hoạt động hưng phấn hơn so với những con ở lô không uống cao lỏng HP.

- + Ở liều 100-120 mg/kg thể trọng, chuột giảm hẳn vận động, thường đứng yên tại chỗ, lông xù, có biểu hiện khó thở và muốn thở phải dướn cổ lên, đi ngoài ra phân đen, nhão.

- + Ở mức liều 160-180mg/kg thể trọng, triệu chứng khó thở càng rõ hơn, thở giật cục và phải vận dụng toàn bộ sức lực của cơ thể để thở, hoạt động chậm chạp, hầu như cả ngày chỉ đứng yên một chỗ, lông xù dính bết, bần, phân lỏng, nhão, màu đen, quánh, luôn dính bết ở hậu môn. Sau 2-3 ngày, chuột hết thái phân đen, các hoạt động nhanh nhẹn trở lại. Toàn bộ số chuột nghiên cứu được nuôi tiếp và theo dõi trong khoảng thời gian 30 ngày với kết quả không có chuột nào chết.

- + Đến mức liều 240 g/kg thể trọng, có 16,7% chuột chết vào ngày thứ hai sau khi uống được liệu. Nguyên nhân gây tử vong chưa hẳn là do tác dụng của hoạt chất trong dịch cao lỏng. Nhiều khả năng chuột chết là do bị uống một lượng lớn cao, có hiện tượng rối loạn tiêu hoá mạnh, làm cho chuột không thích nghi kịp mà chết.

Bảng 2. Bảng nghiên cứu tỷ lệ sống chết của chuột nhắt trắng được uống cao dịch lỏng HP.

Số TT	Mức liều (g/kg)	Lượng uống (ml)	Số lượng động vật (chuột)	Chỉ tiêu chết (chuột)		Ghi chú
				Số lượng	Tỷ lệ (%)	
1	05	0.025	6	0	0	+ Bắt đầu thấy xuất hiện những biểu hiện không bình thường . + Giảm vận động, xù lông, phân đen, dính bết ... + Khó thở, giảm vận động, xù lông, đi lỏng, phân đen-bết nt nt
2	10	0.05	6	0	0	
3	20	0.1	6	0	0	
4	40	0,2	6	0	0	
5	80	0.4	6	0	0	
6	100	0.5	6	0	0	
7	120	0.6	6	0	0	
8	140	0,7	6	0	0	
9	160	0,8	6	0	0	
10	180	0,9	6	0	0	
11	220	1,1	6	0	0	
12	240	1,2	6	1	16,7	

Cũng như đối với trường hợp cao lỏng HJ, chúng tôi quyết định dừng nghiên cứu ở liều 240 mg/kg thể trọng vì không thể cho chuột uống dịch cao sệt HP với khối lượng thể tích lớn hơn nữa, cũng không thể cho uống với số lần nhiều hơn để

tăng liều, vì ở mức liều này chuột đã phải chịu đựng một thể tích cao HP quá lớn (dịch cao được liệu đưa vào trong cơ thể lên đến 1,72 gam, tương đương với 8,5% trọng lượng cơ thể chuột).

Như vậy, với mức liều 220 g/kg thể trọng cũng đủ để kết luận HP là một dược liệu không độc đối với chuột, vì:

- Với mức liều 220 g/kg thể trọng, chuột đã có những biểu hiện lâm sàng rõ rệt như giảm vận động, xù lông, đi lỏng, phân bết v.v... song chỉ sau 1-2 ngày, các chất này được thải hết khỏi cơ thể và các hoạt động của chuột trở lại bình thường. Theo dõi trong thời gian 30 ngày liên tục, không thấy có chuột nào chết. Điều đó chứng tỏ HP không làm chết chuột ở mức liều này.

- Để đạt được mức liều 220 g/kg thể trọng, một người trung bình có trọng lượng 50 kg sẽ phải sử dụng $220 \times 50 = 11.000$ gam/người/ngày. Đây là điều khó thực hiện được trên thực tế.

3.2.2. Nhận xét:

a. Cao dịch lỏng HP không độc đối với chuột nhất trắng khi tiếp xúc qua đường tiêu hoá ở các liều

được sử dụng làm thuốc.

b. Các biểu hiện khác thường xuất hiện ở chuột khi uống cao lỏng HP ở mức liều trên 80 g/kg thể trọng.

c. Những triệu chứng khi chuột uống cao lỏng HP với mức liều >100g/kg thể trọng là:

- Giảm vận động, xù lông, khó thở và thở giật cục.

- Đi lỏng, phân nhão màu đen, quánh, luôn dính bết ở hậu môn.

Sau 2-3 ngày, chuột hết thải phân đen, các hoạt động nhanh nhẹn trở lại và không thấy tử vong trong vòng 30 ngày.

3. Kết luận

Kết quả thí nghiệm cho thấy ở liều sử dụng làm thuốc, cả hai loại cao dược liệu ban và ban tròn đều không gây ngộ độc cấp.

Tài liệu tham khảo

1). Võ Văn Chi. Từ điển cây thuốc Việt Nam. NXB Y học, 1997, p.291; 2). Phạm Hoàng Hộ. Cây cỏ Việt Nam, quyển 1. NXB Trẻ, 1999, p.463; 3). Rudii. R. V. Pharmacologia i Toksikologia, 1977, 4, 11-16; 4). Taget. G. E. Methods in Toxicology. Oxf. Edinburg, 1970.

Tap chí Dược liệu, tập 8, số 5/2003 (trang 24-28)

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA CAO QUẢ NHÀU TRÊN SỨC VẬT THỰC NGHIỆM BỊ SUY GIẢM MIỄN DỊCH BẰNG TIA XẠ

Phạm Thị Vân Anh, Nguyễn Trọng Thông, Vũ Thị Ngọc Thanh

Bộ môn Dược lý - Trường đại học Y Hà Nội

(Nhận bài ngày 27 tháng 11 năm 2003)

Summary

Influence of *Morinda citrifolia* Fruit on γ -Radiation Induced Immunosuppressive Animals

*Fruit extract of *Morinda citrifolia* given to mice after being treated with 100rad x 6 days at oral daily dose of 6 gram/kg body weight in 9 consecutive days increased the relative weights of spleen and thymus, total leukocyte count, number of lymphocytes, natural killers and monocytes, rates of immune rosette forming and platelet forming cells and dermoreaction with OA antigen as compared with the control group.*

*Key words: *Morinda citrifolia* Fruit, Immune Indices, Gamma Radiation, Mice.*

1. Đặt vấn đề

Cây nhàu còn được gọi là cây giầu, ngao núi, nhàu núi, tên khoa học là *Morinda citrifolia* L., họ Cà phê (Rubiaceae).

Từ lâu, nhân dân đã sử dụng nhàu làm thuốc hạ huyết áp, thuốc bổ nâng cao sức đề kháng của cơ thể [3]. Nhiều công trình nghiên cứu của Phan Thị Phi Phi và cộng sự đã chứng minh tác dụng kích

thích miễn dịch của rê nhàu toàn phần trên *in vitro*, *in vivo* và lâm sàng [4], [5].

Trên thế giới, đặc biệt ở Mỹ, có nhiều công trình nghiên cứu về tác dụng chống khối u và kích thích miễn dịch của quả nhàu trồng ở Hawaii [6], [7], [8]. Ở Việt Nam, cho đến nay chưa có công trình nghiên cứu nào về quả nhàu được công bố. Để có thể tìm được một nguồn dược liệu dồi dào có tác dụng kích thích miễn dịch, chúng tôi tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của cao quả nhàu lên một số chỉ tiêu miễn dịch ở chuột nhắt trắng bị gây suy giảm miễn dịch bằng chiếu tia gamma.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu:

2.1.1. Thuốc: Cao mềm quả nhàu, tỷ lệ 1:5 (1 gam cao từ 5 gam dược liệu khô) do Xí nghiệp Dược phẩm trung ương 25 cung cấp. Khi sử dụng, cao được pha với nước đến tỷ lệ 1:2.

Levamisol, dạng bột trắng, hàm lượng 98,6% do phòng Hoá lý I, Viện Kiểm nghiệm cung cấp.

2.2.2. Động vật thực nghiệm: Chuột nhắt trắng, chủng Swiss, cả hai giống, nặng 20 ± 2 g do Viện Vệ sinh dịch tễ cung cấp.

2.1.3. Dụng cụ và hoá chất:

- Nhũ dịch OA (Ovalbumin + $Al(OH)_3$), albumin huyết thanh bò (BSA), hồng cầu cừu...đủ tiêu chuẩn phòng thí nghiệm.

- Kính hiển vi quang học Olympus CH20 của Nhật và các dụng cụ chuẩn của phòng thí nghiệm Bộ môn Miễn dịch - Sinh lý bệnh Trường ĐHYHN.

- Máy chiếu tia gamma: máy Chicobalt- Picker của Tiệp khắc, dùng nguồn cobalt 60.

2.2. Phương pháp nghiên cứu:

Chuột nhắt trắng được chia thành 4 lô.

Lô 1: Chuột không bị tác động gì.

Lô 2: Chuột được chiếu tia γ liều 100 rad/ngày x 6.

Lô 3: Chuột được chiếu tia γ (liều như ở lô 2), được uống levamisol (100 mg/kg) trong 9 ngày sau chiếu tia γ .

Lô 4: Chuột được chiếu tia γ (liều như ở lô 2), được uống cao quả nhàu (6g/kg) trong 9 ngày sau chiếu tia γ .

Ngày thứ 16, giết chuột đánh giá các chỉ số sau:

- Các chỉ số chung:

+ Trọng lượng lách tương đối (TLLTĐ) và tuyến ức tương đối (TLTƯTĐ) được tính là trọng lượng lách, tuyến ức tương ứng với 100g thể trọng chuột.

+ Số lượng bạch cầu, công thức bạch cầu trong máu ngoại vi.

- Các thông số đánh giá miễn dịch dịch thể:

Tỷ lệ tế bào lympho lách tạo hoa hồng mẫn cảm (TBTHHMC).

Tỷ lệ tế bào lympho lách tạo quang dung huyết (TBTQDH).

- Thông số đánh giá đáp ứng miễn dịch tế bào:

Phản ứng bì với kháng nguyên OA (PUBVKNOA)

2.3 Xử lý số liệu:

Các số liệu được xử lý thống kê theo T-test của Student, kí hiệu: *:<0,05; **:<0,01; ***<0,001.

3. Kết quả nghiên cứu

3.1. Nghiên cứu đánh giá tình trạng chung của hệ miễn dịch:

* Trọng lượng lách và tuyến ức tương đối

Kết quả ở bảng 1 cho thấy TLLTĐ ở cả 3 lô chuột 2, 3, 4 giảm rõ rệt so với lô 1. TLLTĐ ở lô 3 đã tăng hơn rõ rệt so với lô 2. Ở lô 4, TLLTĐ tăng lên có ý nghĩa so với lô 2. TLTƯTĐ ở các lô 2, 3, 4 giảm rõ rệt so với lô 1. Ở lô 3, TLTƯTĐ có xu hướng tăng hơn lô 2 nhưng khác biệt không có ý nghĩa. Trong khi đó, TLTƯTĐ ở lô 4 tăng lên rõ rệt so với lô 2 và lô 3.

Bảng 1. Ảnh hưởng của cao quả nhàu lên trọng lượng lách, tuyến ức tương đối

Thông số Lô	TLLTĐ (%)	p so với lô 1	p so với lô 2	TLTƯTĐ (%)	p so với lô 1	p so với lô 2
Lô 1	$6,2 \pm 1,5$		***	$3,5 \pm 1,5$		**
Lô 2	$1,9 \pm 0,4$	***		$1,5 \pm 0,6$	**	
Lô 3	$2,2 \pm 0,4$	**		$1,8 \pm 0,4$	*	
Lô 4	$2,6 \pm 0,6$	**	*	$2,4 \pm 0,6$	*	*

* Số lượng bạch cầu:

Bảng 2. Ảnh hưởng của cao quả nhàu lên số lượng bạch cầu

Lô	Số lượng bạch cầu (nghìn/mm ³)	p so với lô 1	p so với lô 2
Lô 1	4,9 ± 0,6		*
Lô 2	1,5 ± 0,7	*	
Lô 3	1,6 ± 0,5	*	
Lô 4	1,7 ± 0,6	*	*

Kết quả ở bảng 2 cho thấy số lượng bạch cầu giảm rõ rệt ở các lô 2, 3, 4 so với lô 1. Tuy nhiên, ở lô 3 và lô 4, số lượng bạch cầu có xu hướng cao hơn so với lô 2, nhưng chỉ ở lô 4 sự khác biệt này mới có ý nghĩa.

* Công thức bạch cầu

Bảng 3. Ảnh hưởng của cao quả nhàu lên công thức bạch cầu

Chỉ số	Số lượng tuyệt đối các loại bạch cầu (BC/mm ³)			
	Lô 1 (n=10)	Lô 2 (n=10)	Lô 3 (n=10)	Lô 4 (n=15)
BCMTT	2.087 ± 856	370 ± 101	537 ± 196 *	380 ± 194
BC lympho	2.700 ± 889	772 ± 219	887 ± 257 *	1213 ± 291 **
BC mono	70 ± 21	22 ± 6	22 ± 7	32 ± 9 *
BCNK	61 ± 18	28 ± 8	44 ± 13 *	60 ± 14 **
BC ưa acid	54 ± 17	10 ± 3	11 ± 4	16 ± 5 *

BCMTT: Bạch cầu mủi trung tính

BCNK: Bạch cầu diệt tự nhiên

Kết quả ở bảng 3 cho thấy số lượng các loại bạch cầu ở lô 2,3,4 giảm rõ rệt so với lô 1. Ở lô 3, số lượng các loại bạch cầu đều có xu hướng tăng lên so với lô 2, nhưng chỉ có BCMTT, BC lympho và BCNK tăng cao có ý nghĩa. Trong khi đó ở lô 4, số lượng bạch cầu lympho, mono, NK và ưa acid

tăng có ý nghĩa so với lô 2, riêng BC lympho và BCNK tăng lên với mức ý nghĩa thống kê cao.

3.2. Đánh giá đáp ứng miễn dịch dịch thể:

* Tỷ lệ tế bào tạo hoa hồng mãn cảm:

Bảng 4. Ảnh hưởng của cao quả nhàu lên tỷ lệ tế bào tạo hoa hồng mãn cảm

Lô	Tỷ lệ TBTHHMC (%)	p (so với lô 1)	p (so với lô 2)
Lô 1	14,8 ± 2,1		
Lô 2	3,0 ± 0,7	**	
Lô 3	2,2 ± 1,1	**	
Lô 4	10,9 ± 2,3	*	***

Kết quả ở bảng 4 cho thấy tỷ lệ TBTHHMC ở các lô chuột 2, 3, 4 giảm hơn so với lô 1. Đặc biệt, ở lô 2 và lô 3, tỷ lệ này giảm rõ rệt. Trong khi đó, ở

lô 4 tỷ lệ TBTHHMC tăng lên có ý nghĩa so với lô 2 và lô 3.

* Tỷ lệ tế bào tạo quang dung huyết:

Bảng 5. Ảnh hưởng của cao quả nhàu lên tỷ lệ tế bào tạo quang dung huyết

Lô	Tỷ lệ TBQDH (%)	p (so với lô 1)	p (so với lô 2)
Lô 1	17,2 ± 2,3		
Lô 2	7,6 ± 2,4	**	
Lô 3	12,0 ± 1,4	*	*
Lô 4	16,1 ± 3,2		**

Kết quả ở bảng 5 cho thấy tỷ lệ TBTQDH giảm rõ rệt ở lô 2 và lô 3 so với lô 1. Ở lô 3 và lô 4, tỷ lệ này so với lô 2 tăng có ý nghĩa thống kê.

3.3. *Đánh giá đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào:*

* *Phản ứng bì với kháng nguyên OA*

Bảng 6. Ảnh hưởng của cao quả nhàu lên sự đáp ứng phản ứng bì với kháng nguyên OA

Lô	Phản ứng bì với kháng nguyên OA (mm)	p (so với lô 1)	p (so với lô 2)
Lô 1	0,80 ± 0,09		*
Lô 2	0,09 ± 0,04	*	
Lô 3	0,14 ± 0,05	**	**
Lô 4	0,15 ± 0,04	**	**

Kết quả ở bảng 6 cho thấy phản ứng bì với kháng nguyên OA ở lô 2 giảm rõ rệt so với lô 1. So với lô 2, phản ứng ở lô 3 và lô 4 tăng có ý nghĩa nhưng không có sự khác biệt giữa hai lô này.

4. Bàn luận

4.1. Ảnh hưởng của cao quả nhàu lên các chỉ số chung

Theo dõi trọng lượng lách và tuyến ức tương đối, có thể đánh giá được phần nào đáp ứng miễn dịch dịch thể do các lympho bào B đảm nhận, miễn dịch tế bào do các lympho bào T đảm nhận [2]. Các tổn thương do tia γ gây ra là do bức xạ năng lượng, các tế bào của hệ thống miễn dịch nhạy cảm nhất với tia xạ, vì vậy, với liều xạ 100rad/ngày, chiếu trong 6 ngày đã có thể gây tổn thương hệ thống miễn dịch một cách toàn diện [trích từ 1]. Kết quả ở bảng 1, 2 cho thấy ở lô 4, TLLTD, TLTUTD và SLBC tăng lên rõ rệt so với lô 2, đặc biệt SLBC lympho tăng lên rõ rệt so với cả lô 1 và lô 2, trong khi BCMTT ít thay đổi; điều này chứng tỏ cao quả nhàu làm giảm tác dụng ức chế miễn dịch do tia γ gây ra. Tác dụng này có thể do cao quả nhàu tăng cường đáp ứng miễn dịch đặc hiệu mạnh hơn trên miễn dịch không đặc hiệu.

4.2. Ảnh hưởng của cao quả nhàu lên đáp ứng miễn dịch dịch thể

Tỷ lệ lympho bào T có thụ thể tự nhiên với hồng cầu cừu rất ít, chỉ chiếm 1-2%. Trong khi tỷ lệ này rất cao đạt 80-90% ở lympho bào B; đây là đặc tính khác biệt giữa hai loại lympho bào B và T; nhờ đó, có thể đánh giá một phần cấu trúc bề mặt và khả năng kết hợp kháng nguyên của lympho bào B thông qua tỷ lệ TBTHHMC. Tỷ lệ

TBTQDH không những đánh giá được khả năng tiết kháng thể đặc hiệu của các lympho B mà còn đánh giá được các thụ thể bề mặt của tế bào này với C3 của bổ thể [2]. Kết quả ở bảng 4, 5 cho thấy cao quả nhàu làm tăng rõ rệt cả hai chỉ số trên ở lô 4 so với lô 2. Như vậy, cao quả nhàu đã làm tăng số lượng của các tế bào miễn dịch dẫn đến tăng trọng lượng các cơ quan lympho, tăng khả năng đáp ứng miễn dịch của các lympho bào B với kháng nguyên đặc hiệu.

4.3. Ảnh hưởng của cao quả nhàu lên đáp ứng miễn dịch tế bào

Phản ứng bì với kháng nguyên OA có giá trị để đánh giá đáp ứng miễn dịch tế bào với kháng nguyên OA của các lympho bào T đảm nhận [2]. Kết quả ở bảng 6 cho thấy cao quả nhàu làm tăng phản ứng này rất rõ so với lô 2. Điều này cho thấy cao quả nhàu cũng làm tăng đáp ứng miễn dịch tế bào. Các kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với các tác giả trong nước và nước ngoài [1], [4], [5]. Theo Hirazumi [6], quả nhàu chứa một hàm lượng lớn polysaccharid, chính chất này có hoạt tính chống khối u ở chuột thể hiện qua sự ức chế phát triển của khối ung thư, điều hoà hệ thống miễn dịch của vật chủ. Theo Wang và Hirazumi [6], [7], [8] cơ chế tác dụng của quả nhàu là làm tăng giải phóng các chất trung gian có hoạt tính trong quá trình đáp ứng miễn dịch như TNF α , IL1 β , IL10, IL12, IFN γ và nitric oxyd.

5. Kết luận

Cao quả nhàu uống với liều 6g/kg thể trọng liên tục trong 9 ngày làm tăng cường hồi phục các chỉ số miễn dịch ở chuột nhất trắng được gây suy giảm miễn dịch bằng chiếu tia gamma.

Tài liệu tham khảo

- 1). Phạm Thị Vân Anh (2003), *Nghiên cứu độc tính và sự ảnh hưởng của cao trái Nhàu lên một số chỉ tiêu miễn dịch của súc vật thực nghiệm*, Luận văn thạc sỹ y học, Trường đại học Y Hà Nội; 2). Bộ môn Miễn dịch-Sinh

lý bệnh (1997), *Miễn dịch học*, Trường Đại học Y Hà Nội, Nhà xuất bản Y học; 3). Đỗ Tất Lợi (1999), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học, tr. 306-307; 4). Phạm Huy Quyến, Phan Thị Phi Phi, Phan Thu Anh (1994), *Tạp chí Y học Việt Nam*, (Số 9), tr 21-26; 5). Phạm Huy Quyến (1996), *Tác dụng kích thích miễn dịch của dịch chiết rễ cây Nhàu trên súc vật thí nghiệm*, Luận án Phó tiến sĩ Y học, Trường Đại học Y Hà Nội; 6). Hirazumi A., Furusawa E. (1999), *Phytother Res*, Aug. 13(5), pp.380- 387; 7). Wang M.Y., Su C. (2001), *Annals of the New York Academy of sciences*, 952, pp.161 - 168; 8). Wang M.Y., West B.J., Jensen C.J. (2002), *Acta Pharmacol Sin*, Dec, 23(12), pp.1127-1141.

Tạp chí Dược liệu, tập 9, số 1/2004 (trang 28-31)

NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG CHỐNG VIÊM CẤP CỦA CAO QUẢ NHÀU TRÊN THỰC NGHIỆM

*Nguyễn Trọng Thông, Vũ Thị Ngọc Thanh,
Phạm Thị Vân Anh, Nguyễn Thế Siển*

Trường đại học Y Hà Nội

(Nhận bài ngày 20 tháng 11 năm 2003)

Summary

Studies on Experimental Acute Anti-inflammatory Effect of *Morinda citrifolia*

The liquid extract of Morinda citrifolia fruit in doses of 24g and 48g per kg body weight of mice have provoked acute anti-inflammatory effect through inhibiting carragenin induced edema in hind paw, decreasing volume and leucocyte count of exsudation as compared with the control group. The acute anti-inflammatory effect of the fruit is equivalent to that of aspirin in a dose of 150mg/kg.

Key words: Morinda citrifolia Fruit, Acute Anti-inflammatory Effect.

1. Đặt vấn đề:

Cây nhàu (*Morinda citrifolia* L) thuộc họ Cà phê (Rubiaceae), mọc nhiều ở miền Nam Việt Nam và một số nước trên thế giới (Ấn Độ, Thái Lan, các nước vùng Trung Mỹ...). Theo kinh nghiệm dân gian, cây nhàu được dùng để hạ huyết áp, nhuận tràng, làm thuốc bổ, chữa đau gân, nhức mỏi xương, ho, hen. Rễ nhàu đã được nhiều tác giả trong và ngoài nước nghiên cứu thấy có tác dụng giảm đau, chống viêm, an thần, hạ huyết áp, kích thích miễn dịch... [2], [3], [4], [5], [9], [10]. Một số sản phẩm từ rễ nhàu đã được lưu hành trên thị trường. Tuy nhiên, vì là cây lâu năm nên việc sử dụng rễ nhàu làm nguyên liệu sản xuất thuốc gặp một số khó khăn về kinh tế và ảnh hưởng xấu đến môi trường sinh thái. Gần đây, một số nhà khoa học đã nghiên cứu quả nhàu và thấy quả cũng có tác dụng dược lý tương tự như rễ [1, 6, 8, 9].

Công trình nghiên cứu này của chúng tôi là đánh giá tác dụng chống viêm cấp của cao quả nhàu trên động vật thực nghiệm.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Chất liệu nghiên cứu:

* *Thuốc và hoá chất:*

Cao mềm quả nhàu (CTN) tỷ lệ 5:1 (5g dược liệu khô/1ml cao).

Aspegic gói 500mg (Pháp).

Các chất carragenin, formaldehyd, natri clorid... đều đủ tiêu chuẩn thí nghiệm.

* *Dụng cụ nghiên cứu:*

Phù kế Plethysmometer No 7280 của hãng Ugo. Basile (Italy).

Kính hiển vi quang học Olympus (Nhật).

2.2. Động vật thực nghiệm:

Chuột cống trắng cả 2 giống, khoẻ mạnh, trọng lượng 150-180g, được nuôi trong điều kiện phòng thí nghiệm với đầy đủ thức ăn và nước uống.

2.3. Phương pháp nghiên cứu:

2.3.1. Gây phù chân chuột bằng carragenin:

Chuột cống trắng được chia ngẫu nhiên thành 6 lô, mỗi lô 12 con.

Lô 1 (đối chứng): uống NaCl 0,9%, 1,0ml/100g

Lô 2: uống aspirin 50 mg/kg

Lô 3: uống aspirin 150 mg/kg

Lô 4: uống cao quả nhàu tương đương 12g dược liệu/kg

Lô 5: uống cao quả nhàu tương đương 24g dược liệu/kg

Lô 6: uống cao quả nhàu tương đương 48g dược liệu/kg

Chuột được uống thuốc 3 ngày liên trước khi gây viêm. Ngày thứ 3, sau khi uống thuốc thử 1 giờ, gây viêm bằng cách tiêm carragenin 1% (pha trong nước muối sinh lý) 0,05 ml/chuột vào gan bàn chân sau, bên phải của chuột.

Đo thể tích chân chuột (đến khớp cổ chân) bằng dụng cụ chuyên biệt (phù kế Plethysmometer) vào các thời điểm: trước khi gây viêm và sau khi gây viêm 2 giờ, 4 giờ, 6 giờ và 24 giờ.

Kết quả được tính theo công thức của Fontaine.

- Độ tăng thể tích chân của từng chuột được tính theo công thức:

$$\Delta V\% = \frac{V_t - V_0}{V_0} \times 100$$

Trong đó: V_0 : thể tích chân chuột trước khi gây

viêm, V_t : thể tích chân chuột sau khi gây viêm.

- Tác dụng chống viêm của thuốc được đánh giá bằng khả năng ức chế phản ứng phù (I%).

$$I\% = \frac{\overline{\Delta V_c\%} - \overline{\Delta V_t\%}}{\overline{\Delta V_c\%}} \times 100$$

Trong đó: $\overline{\Delta V_c\%}$: trung bình độ tăng thể tích chân chuột ở lô đối chứng (%), $\overline{\Delta V_t\%}$: trung bình độ tăng thể tích chân chuột ở lô uống thuốc (%).

2.3.2. Gây viêm màng bụng chuột:

Chuột cống trắng được chia ngẫu nhiên thành 6 lô, mỗi lô 14 con. Các lô chuột được uống NaCl 0,9% hoặc các thuốc thử với liều lượng và thời gian như trong thí nghiệm trên (mục 2.3.1). Gây viêm màng bụng chuột bằng dung dịch carragenin 0,05g + formaldehyd 1,4 ml, pha vừa đủ trong 100ml nước muối sinh lý, với thể tích tiêm 2 ml vào khoang màng bụng mỗi chuột.

Sau 24 giờ, mở ổ bụng chuột hút dịch rỉ viêm, đo thể tích và đếm số lượng bạch cầu/1ml dịch rỉ viêm. Tác dụng chống viêm được đánh giá thông qua thể tích dịch rỉ viêm và số lượng bạch cầu trong dịch rỉ viêm.

3. Kết quả nghiên cứu

3.1. Tác dụng chống viêm cấp của cao quả nhàu trên mô hình gây phù chân chuột bằng carragenin.

Bảng 3.1. Độ tăng thể tích chân chuột sau khi gây viêm bằng carragenin

Lô nghiên cứu	Sau 2 giờ		Sau 4 giờ		Sau 6 giờ		Sau 24 giờ	
	$\overline{\Delta V\%}$	p so với đối chứng	$\overline{\Delta V\%}$	p so với đối chứng	$\overline{\Delta V\%}$	p so với đối chứng	$\overline{\Delta V\%}$	p so với đối chứng
1. NaCL 9%	53,5 ±3,3		101,3 ±6,5		63,5 ±9,1		16,7 ±7,6	
2. Aspirin 50 mg/kg	33,5 ±9,9	< 0,05	81,3 ±7,6	< 0,05	56,2 ±7,7	NS	14,9 ±5,9	NS
3. Aspirin 150 mg/kg	32,5 ±11,4	< 0,05	72,0 ±18,2	< 0,05	52,8 ±4,3	NS	14,3 ±2,7	NS
4. Quả nhàu 12 g/kg	48,5 ±14,5	NS	76,7 ±11,4	< 0,05	62,3 ±2,8	NS	16,4 ±7,5	NS
5. Quả nhàu 24 g/kg	37,9 ±6,8	< 0,05	75,0 ±11,2	< 0,05	61,3 ±4,2	NS	16,2 ±6,5	NS
6. Quả nhàu 48 g/kg	34,3 ±9,7	< 0,05	72,3 ±2,7	< 0,05	59,6 ±3,2	NS	15,8 ±4,9	NS
p so sánh giữa các lô	p_{5-2}		NS		NS		NS	
	p_{6-2}		NS		<0,05		NS	
	p_{5-3}		NS		NS		NS	

	$p_{6,3}$		NS		NS		NS		NS
	$p_{5,6}$		NS		NS		NS		NS

(*) NS: không có ý nghĩa.

Bảng 3.2. Mức độ ức chế phản ứng phù chân chuột của cao quả nhàu

Lô nghiên cứu	Mức độ ức chế phản ứng phù (1%)			
	Sau 2 giờ	Sau 4 giờ	Sau 6 giờ	Sau 24 giờ
Aspirin 50 mg/kg	37,38	19,74	11,50	10,78
Aspirin 150 mg/kg	39,25	28,92	16,85	14,37
Quả nhàu 12 g/kg	9,35	24,28	1,89	1,80
Quả nhàu 24 g/kg	29,16	25,96	3,46	2,99
Quả nhàu 48 g/kg	35,89	28,63	6,14	5,39

Kết quả nghiên cứu ở bảng 3.1 và bảng 3.2 cho thấy:

- Sau khi gây viêm 2 giờ, quả nhàu liều 24g/kg và 48g/kg có tác dụng chống viêm cấp, ức chế phản ứng phù chân chuột với tỷ lệ tương ứng 29,16% và 35,89%, tác dụng tương đương aspirin. ở thời điểm này, quả nhàu liều 12g/kg chưa có tác dụng chống viêm.

- Sau 4 giờ, quả nhàu cả 3 liều 12, 24 và 48 g/kg đều có tác dụng chống viêm cấp rõ rệt, mức độ ức

chế phản ứng phù tăng dần theo liều dùng, từ 24,28% đến 28,63%. Tuy nhiên, không có sự khác biệt rõ rệt giữa các liều quả nhàu đã dùng ($p > 0,05$). Quả nhàu liều 48 g/kg có tác dụng tốt hơn aspirin 50mg/kg, tương đương aspirin liều 150 mg/kg.

- Sau 6 giờ, tác dụng chống viêm cấp của cả quả nhàu và aspirin giảm dần, không có sự khác biệt so với lô đối chứng.

3.2. Tác dụng chống viêm màng bụng:

Bảng 3.3. Tác dụng ức chế sự tạo thành dịch rỉ viêm của cao quả nhàu

Lô nghiên cứu	Thể tích dịch rỉ viêm (ml)	Mức độ ức chế tạo thành dịch rỉ viêm (%)	p so với đối chứng	p so với aspirin	
				50 mg/kg	150 mg/kg
1. NaCl 0,9%	4,39 ± 0,99				
2. Aspirin 50 mg/kg	3,38 ± 0,74	23,01	< 0,05		
3. Aspirin 150 mg/kg	2,29 ± 1,17	47,84	< 0,01	< 0,05	
4. Quả nhàu 12 g/kg	4,24 ± 1,48	3,42	NS		
5. Quả nhàu 24 g/kg	3,11 ± 1,24	29,16	< 0,05	NS	NS
6. Quả nhàu 48 g/kg	2,78 ± 1,14	36,67	< 0,01	< 0,05	NS

Bảng 3.4. Tác dụng ức chế số lượng bạch cầu trong dịch rỉ viêm của cao quả nhàu

Lô nghiên cứu	Bạch cầu (nghìn/mm ³)	Mức độ ức chế số lượng BC (%)	p so với chứng	p so với aspirin	
				50 mg/kg	150 mg/kg
1. NaCl 0,9%	15,18 ± 3,47				
2. Aspirin 50 mg/kg	13,42 ± 2,25	11,59	NS		
3. Aspirin 150 mg/kg	10,06 ± 2,25	33,73	< 0,01	< 0,05	
4. Quả nhàu 12 g/kg	12,98 ± 2,75	14,49	NS		
5. Quả nhàu 24 g/kg	10,15 ± 3,59	33,14	< 0,05	NS	NS
6. Quả nhàu 48 g/kg	10,29 ± 2,59	32,21	< 0,01	< 0,05	NS

Kết quả ở bảng 3.3 và bảng 3.4 cho thấy khi gây viêm màng bụng, quả nhàu liều 24g/kg và 48g/kg có tác dụng chống viêm rõ rệt, thể hiện ức chế sự tạo thành dịch rỉ viêm 29,16%, 36,67% và

làm giảm số lượng bạch cầu trong dịch rỉ viêm tương ứng là 33,14% và 32,21%. Tác dụng chống viêm của quả nhàu liều 24g/kg tương đương aspirin 50mg/kg. Tác dụng chống viêm của quả

nhàu liều 48g/kg mạnh hơn aspirin 50mg/kg tương đương aspirin 150mg/kg. Trong thí nghiệm này, quả nhàu liều 12g/kg không có tác dụng chống viêm.

4. Bàn luận và kết luận

Cây nhàu đã được dùng từ lâu đời ở nhiều nước để điều trị một số bệnh, trong đó có những bệnh liên quan đến phản ứng viêm như ho, hen, viêm khớp, phù, nhiễm khuẩn, rắn cắn... [7], [9]. Theo Đỗ Tất Lợi, liều dùng của quả nhàu trên người khoảng 30g [3], tương đương với 0,6g/kg cơ thể, còn trên chuột khoảng 6g/kg. Vì vậy, chúng tôi dùng các bội số của liều trên (gấp 2, 4, 8 lần) để nghiên cứu tác dụng chống viêm cấp của quả nhàu trên chuột cống.

Kết quả nghiên cứu cho thấy quả nhàu liều 24g/kg và 48g/kg có tác dụng chống viêm cấp rõ rệt. Trên mô hình gây phù chân chuột bằng carragenin, quả nhàu có tác dụng chống viêm cấp trong vòng 4 giờ, mức độ ức chế tối đa phản ứng phù ở thời điểm 4 giờ tương ứng với hai liều trên là 25,98% và 29,14%. Trên mô hình gây viêm màng bụng, quả nhàu liều 24g/kg và 48g/kg có tác dụng ức chế rõ rệt sự tạo thành dịch rỉ viêm 25,16% và 36,67%, làm giảm số lượng bạch cầu trong dịch rỉ viêm 32,21% và 33,14%.

Để giải thích kết quả chống viêm, theo chúng tôi, quả nhàu có tác dụng làm giảm tính thấm thành mạch và giảm hoá ứng động của các bạch cầu gây ra bởi một số chất trung gian hoá học chính như histamin, serotonin, prostaglandin,

leucotrien ở vị trí viêm, dẫn tới làm giảm lượng dịch rỉ viêm, và làm giảm số lượng bạch cầu xuyên mạch trong dịch rỉ viêm.

Một số tác giả nước ngoài đã nghiên cứu tác dụng và cơ chế tác dụng chống viêm cấp của quả nhàu, có so sánh với một số thuốc chống viêm phi steroid thường dùng.

Li R.W. (2003) thấy quả nhàu có tác dụng ức chế cyclo oxygenase -1 (COX-1) với nồng độ ức chế IC_{50} là 163 μ g/ml, so sánh với aspirin là 241 μ g/ml và indomethacin là 1,2 μ g/ml [7].

Zang L. D. (1994), Horton J. K. (1999) và Komoike Y. (2002) nghiên cứu *in vitro* thấy dịch chiết quả nhàu có tác dụng ức chế chọn lọc trên COX - 2, có thể so sánh với celebrex, một thuốc ức chế chọn lọc COX-2 đã biết. IC_{50} COX-2/COX-1 của quả nhàu là 0,76, aspirin là 119, indomethacin là 40 và celebrex là 0,34 [trích từ 7]. Nghiên cứu của Wang M.Y. (2001) thấy quả nhàu còn có tác dụng chống viêm trên mô hình gây tổn thương gan cấp bằng CCl_4 [9].

Tác dụng ức chế COX, đặc biệt chọn lọc trên COX-2, làm giảm tổng hợp các prostaglandin ở vị trí viêm dẫn đến giảm các triệu chứng của viêm, trong khi hạn chế được nhiều tác dụng phụ. Đó cũng là ưu điểm của quả nhàu so với nhiều thuốc chống viêm phi steroid khác thường dùng trong lâm sàng.

Như vậy, quả nhàu liều 24g/kg và 48g/kg có tác dụng chống viêm cấp rõ rệt trên thực nghiệm.

Tài liệu tham khảo

- 1). Phạm Thị Vân Anh (2003), *Nghiên cứu độc tính và ảnh hưởng của cao trái Nhàu lên một số chỉ tiêu miễn dịch của súc vật thực nghiệm*, Luận văn Thạc sĩ Y học, Đại học Y Hà Nội; 2). Phạm Khuê, Trần Thanh Hà và cộng sự (1983), "Nhận xét về tác dụng hạ huyết áp của cao rễ Nhàu", *Báo cáo Khoa học Đại học Dược Hà Nội*, tr.9-13; 3). Đỗ Tất Lợi (1999), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học, tr. 306-307; 4). Phạm Huy Quyển (1996), *Tác dụng kích thích miễn dịch của dịch chiết rễ cây Nhàu trên súc vật thí nghiệm*, Luận án Phó tiến sĩ Y học, Trường Đại học Y Hà Nội; 5). Nguyễn Trọng Thông (1981), *Tác dụng dược lý của Cao rượu rễ Nhàu trên thực nghiệm*, Luận văn tốt nghiệp Bác sĩ nội trú, Trường Đại học Y Hà Nội; 6). Hirazumi A., Furusawa E. (1999). *Phytother Res*, Aug, 13(5), pp. 380 - 387; 7). Li R.W., Myers S.P., Leach D.N. (2003). *Journal Ethnopharmacol*, Mar, 85(1), pp. 25-32; 8). Wang M.Y., Su C. (2001). *Annals of the New York Academy of sciences*, 952, pp. 161 - 168; 9). Wang M.Y., West B.J., Jensen C.J. (2002). *Acta Pharmacol Sin*, Dec, 23(12), pp.1127-1141; 10). Younos C., Rolland A. (1990). *Planta Medica*, Oct, 56(5), pp. 430 - 434.

(Tiếp theo trang 33)

Tài liệu tham khảo

- 1). Đỗ Tất Lợi (1999). *Những cây thuốc và vị thuốc Việt nam*. NXB khoa học kỹ thuật 396 - 7; 2). Bộ Y Tế, Dược điển Việt Nam III (2002). NXB Y học, pp. 332, 333; 3). Keplinger K., Laus G., Wurm M., Dierich M. P., Teppner H. J. *Ethnopharmacol*, 1999; 64: 23-34; 4). Sheng Y., Pero RW, Amiri A., Brygelsson C. *Anticancer Res* 1998; 18: 3363 - 8; 5). Dua, P. R. Effect of hexobarbital sleeping time in mice. In: The use of pharmacological techniques for the evaluation of natural products. Eds.: B.N. Dhavan and R.C. Srimal, UNESCO, 1984.

NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG DƯỢC LÝ CỦA CÂY CÂU ĐÀNG

Koson Sosolithan, Nguyễn Duy Thuần,
Nguyễn Kim Phương

Viện Dược Liệu

(Nhận bài ngày 26 tháng 11 năm 2003)

Summary

Effect of *Uncaria macrophylla* on Cat Blood Pressure and Mouse Sleep

Alkaloids from *Cau dang* (*Uncaria macrophylla* Wall ex. Roxb -Rubiaceae) have been shown to prolong the duration of thiopental induced sleep in mice at doses of 10, 15 and 20g of hooked stem per kg body weight. Intravenous transfusion of total alkaloids from stem of *Cau dang* reduced the normal blood pressure in cats at doses of 0,2 ml aqueous extract (1: 1) according to the mechanism of peripheral venous dilatation.

Key words: *Uncaria macrophylla*, Blood Pressure, Sleep.

I. Đặt vấn đề

Các cây thuốc thuộc chi Câu đằng (*Uncaria* sp.) được dùng nhiều trong y học cổ truyền ở các nước Châu Á, đặc biệt là Trung Quốc, Việt Nam và Lào.

Theo tài liệu cổ, câu đằng có vị ngọt, tính hàn, vào hai kinh can và tâm bào, có tác dụng thanh nhiệt, bình can, trấn kinh chữa nhức đầu, cao huyết áp, hoa mắt, trẻ em sốt cao kinh giật [1]

Những năm gần đây, các nhà nghiên cứu trên thế giới đã phát hiện nhiều tác dụng dược lý quý giá và đáng lưu ý của câu đằng như chống viêm, kháng virus, tăng khả năng thực bào, ức chế phospholipase và ức chế sự tăng sinh các tế bào ung thư, hạ huyết áp, hạ cholesterol [2,3]

Trong công trình này, chúng tôi nghiên cứu tác dụng hạ huyết áp và an thần của loài câu đằng *Uncaria macrophylla* Wall. ex. Roxb, Rubiaceae thu hái ở vùng Trung Lào.

II. Vật liệu và phương pháp

1. Vật liệu

- Bột alcaloid toàn phần 0,1% so với dược liệu khô tuyệt đối được chiết từ cành có móc và thân của cây câu đằng

- Mèo thí nghiệm: loại trưởng thành, khoẻ mạnh, có trọng lượng từ 2 đến 2,5 kg

- Chuột nhắt trắng thuần chủng khoẻ mạnh, trọng lượng 20-22g, đạt tiêu chuẩn thí nghiệm, do Viện vệ sinh dịch tễ cung cấp.

- Thiopentan tinh khiết.

- Dung dịch urethan 25%.

- Dung dịch Natri citrat 25%.

- Huyết áp kế thủy ngân có bút ghi trên giấy âm khói.

- Máy đo lưu lượng dòng chảy T106/206 Flowmeter (Mỹ).

2. Phương pháp nghiên cứu

- Đo huyết áp của mèo bằng phương pháp trực tiếp, bộc lộ động mạch cổ của mèo đã được gây mê [6].

- Đo lưu lượng máu chảy qua động mạch đuôi của mèo bằng máy đo lưu lượng dòng chảy. Lưu lượng dòng chảy qua mạch tăng tức là giãn mạch và ngược lại. Qua đó xác định được tác dụng co hoặc giãn của mạch.

- Xác định tác dụng hợp đồng với thuốc ngủ bằng cách gây ngủ cho chuột bằng dung dịch thiopentan tiêm tĩnh mạch đuôi, đồng thời cho chuột uống dung dịch câu đằng. Nếu thuốc có tác dụng thì thời gian ngủ của chuột sẽ kéo dài hơn chuột không uống thuốc. Quan sát thời gian ngủ của chuột theo tư thế nằm ngửa, đến khi chuột lật mình trở dậy trên bốn chân [5].

- Kết quả nghiên cứu dược lý được biểu thị bằng trị số trung bình cộng trừ sai số chuẩn ($M \pm SE$) và đánh giá thống kê giữa các lô bằng nghiệm pháp "t" của Student.

III. Kết quả nghiên cứu

1. Tác dụng của câu đàng trên thời gian ngủ do Thiopentan

- Thí nghiệm được tiến hành trên chuột nhắt trắng có trọng lượng 20 - 22g. Thuốc được cho uống với các liều khác nhau: 10g, 15g và 20g được liều/ kg.

- Sau khi cho chuột uống được 20 phút, gây ngủ bằng cách tiêm dung dịch thiopentan với liều 44mg/kg qua tĩnh mạch đùi (i.v). Sau đó theo dõi thời gian ngủ của từng con. Ở lô đối chứng cho uống nước với cùng thể tích như ở lô thử thuốc.

Bảng 1. Thời gian ngủ của chuột ở các liều khác nhau

	Lô đối chứng (n = 11)	Lô thuốc Liều 10g/ kg (n = 10)	Lô thuốc Liều 15g / kg (n = 12)	Lô thuốc Liều 20g/ kg (n= 10)
Trung bình (phút)	4,0 ± 0,47	6,80 ± 1,16	20,90 ± 6,62	30,40 ± 6,67
P		P < 0,05	P < 0,05	P < 0,001

2. Tác dụng hạ huyết áp trên mèo thí nghiệm

Mèo được gây mê bằng tiêm phúc mạc dung dịch urethan 25% với liều 5-7ml/kg. Khi đã bị mê, mèo được cố định trên bàn mổ để bóc lộ mạch cổ và lườn canuyn thủy tinh chứa dây dung dịch natri citrat 25% nối với huyết áp kế thủy ngân, đầu canuyn được nhỏ 1 giọt heparin để tránh đông máu.

Bộc lộ tĩnh mạch đùi, một bên truyền dung dịch thuốc nghiên cứu và bên kia nối vào đầu dò của

lưu lượng kế để ghi lưu lượng máu chảy qua động mạch, qua đó theo dõi tình trạng co giãn của mạch. Sau khoảng 20 phút để huyết áp mèo ổn định, bắt đầu tiến hành thí nghiệm: Ghi huyết áp bình thường, sau đó truyền dịch câu đàng và theo dõi sự thay đổi của huyết áp và sự co giãn mạch.

Sau nhiều lần thăm dò với các liều 0,4, 0,3, 0,2 và 0,1 ml, nhận thấy liều 0,2 ml dung dịch câu đàng (1:1) là tốt nhất và liều này đã được sử dụng để nghiên cứu tác dụng hạ huyết áp của câu đàng.

Bảng 2. Huyết áp của mèo trước và sau khi truyền câu đàng với liều 0,2 ml dung dịch 1:1

n = 9	Huyết áp tối đa (mmHg)		% giảm	Huyết áp tối thiểu (mmHg)		% giảm	Thời gian huyết áp hạ nhất sau khi truyền thuốc (phút)
	Trước truyền câu đàng	Sau truyền câu đàng		Trước truyền câu đàng	Sau truyền câu đàng		
Trung bình	123,89 ± 5,45	100,56 ± 4,67	18,4	112,78 ± 5,12	91,11 ± 19,22	19,22	29,38 ± 7,04
P	P = 0,005 < 0,05			P = 0,01 < 0,05			

Bảng 3. Lưu lượng máu qua động mạch đùi trước và sau khi truyền dung dịch câu đàng (0,2ml, 1: 1)

Số súc vật, thí nghiệm n = 7	Lưu lượng máu (ml/ phút)		% tăng lưu lượng máu	Thời gian lưu lượng máu tăng nhất sau truyền (phút)
	Trước truyền câu đàng	Sau truyền câu đàng		
Trung bình	0,58 ± 0,04	0,85 ± 0,05	46,55 %	29,83 ± 8,01
P	P = 0,0005 < 0,001			

IV. Kết luận

1. Alcaloid toàn phần của câu đàng khi cho chuột uống ở cả 3 liều 10g, 15g, 20g được liều/ kg đều có tác dụng kéo dài giấc ngủ của chuột gây bởi thiopenthan (có ý nghĩa thống kê)

2. Alcaloid toàn phần của câu đàng khi truyền tĩnh mạch với liều 0,2ml (1:1) có tác dụng giảm huyết áp bình thường của mèo theo cơ chế giãn mạch (thời gian huyết áp hạ nhất sau khi truyền tương đương với thời gian mạch giãn nhất sau khi truyền)

(Xem tiếp trang 31)

THÔNG BÁO - TRAO ĐỔI

BƯỚC ĐẦU NGHIÊN CỨU CHẤT LƯỢNG QUẾ QUẢNG NAM

Nguyễn Thị Tâm¹⁾, Lê Văn Căn²⁾, Trần Quang Thủy³⁾

¹⁾: Trường Đại học Dược Hà Nội, ²⁾: Hiệu thuốc Phước Sơn, Quảng Nam, ³⁾: Viện Dinh Dưỡng Hà Nội

Summary

Preliminary Study on Quality of *Cinnamomum cassia* Grown in Quang Nam

Essential oils of leaves and trunk barks of *Cinnamomum cassia* J.S. Persl. of two different origins (Quang Nam and Thanh Hoa) grown in Phuoc Son district, Quang Nam province were collected and analyzed by GC/MS. The barks of Quang Nam origin gave higher oil percentage and cinnamaldehyde content (6.80% and 88.74%, respectively), while those of Thanh Hoa origin were only 0.65% and 67.39%, respectively.

Key words : *Cinnamomum cassia* J.S. Persl., Lauraceae, Oil Quality.

Mở đầu

Quế Quảng Nam (*Cinnamomum cassia* J.S. Presl.) là một trong những dược liệu quý được biết đến từ lâu của tỉnh Quảng Nam. Hiện nay, cây được trồng và khai thác ở đây có xuất xứ chính từ giống quế có nguồn gốc Quảng Nam và giống được gieo từ hạt quế mua ở Yên Bái hoặc Thanh Hoá và được gọi là "Quế ngoài tỉnh". Hơn 10 năm trở lại đây, Sở Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn tỉnh Quảng Nam đã có những chủ trương rất cụ thể để bảo vệ và phát triển giống quế nguồn gốc trong tỉnh. Song do những nguyên nhân khác nhau, diện tích trồng

Quế ngoài tỉnh vẫn chiếm phân ưu thế.

Để khẳng định về chất lượng hai loại quế này, bước đầu chúng tôi đã lấy hai mẫu dược liệu này đã trồng được 10 năm ở huyện Phước Sơn, tỉnh Quảng Nam, vào tháng 4 năm 2003 để tiến hành xác định hàm lượng tinh dầu trong vỏ và lá, phân tích tinh dầu cất được bằng phương pháp GC/MS.

Kết quả và thảo luận

1. Xác định hàm lượng tinh dầu trong quế Quảng Nam và quế được gieo từ hạt mua ở Thanh Hoá. Kết quả sau 3 lần xác định hàm lượng được tóm tắt như sau (bảng 1):

Bảng 1: Hàm lượng tinh dầu trong lá và vỏ quế có nguồn gốc khác nhau trồng ở Quảng Nam

Các loại quế	Hàm lượng TD trong lá		Hàm lượng TD trong vỏ	
	DL khô	DL khô td	DL khô	DL khô td
Quảng Nam	0,02	0,03	6,20	6,80
Thanh Hoá	0,02	0,03	0,60	0,65

2. Phân tích tinh dầu quế Quảng Nam và quế có nguồn gốc ngoài tỉnh. Kết quả được tóm tắt ở bảng 2

Bảng 2: Thành phần tinh dầu quế Quảng Nam (192, 200) và tinh dầu quế có nguồn gốc ngoài tỉnh (191, 201), các con số 191, 192, 200, 201 là số lưu của mẫu tinh dầu.

STT	Thành phần	Quế Quảng Nam		Quế ngoài tỉnh	
		lá (192)	vỏ (200)	lá (191)	vỏ (201)
1	benzaldehyd	0,53	0,09	1,55	-
2	1,8-cineol	-	0,06	-	-
3	acid benzoic	-	-	-	0,33
4	2-methyl bezoffuran	-	0,03	-	-
5	hydrocinnamaldehyd	0,21	0,46	-	-
6	3,5-dimethylbenzyl alcohol	-	-	0,53	-
7	vinylbenzyl alcohol	-	-	-	0,12

8	benzylmalonic dialdehyd	0,27	0,91	1,42	0,57
9	phenyl-2-propyl ether	0,14	-	0,38	-
10	cinnamaldehyd	38,70	88,74	73,45	67,39
11	α -copaen	5,13	0,34	0,21	6,87
12	eugenol	2,49	-	-	-
13	vinylbenzyl aldehyd	-	0,24	0,08	0,30
14	β -caryophylen	2,72	-	0,10	-
15	γ -gurjunen	0,46	-	0,13	-
16	aromadren	4,52	-	1,60	0,14
17	cinnamyl acetat	-	3,97	7,28	15,54
18	α -amorphen	4,69	-	-	-
19	isolefen	-	-	0,78	-
20	coumarin	-	1,15	4,86	--
21	α -gurjunen	7,32	-	-	1,90
22	δ -cadinen	5,48	-	-	2,07
23	α -cubeben	-	-	-	0,65
24	torreyol	1,19	-	-	-
25	α -calacoren	0,81	0,10	-	0,13
26	duvatriendiol	6,27	-	1,86	-
27	sinularen	6,35	0,30	2,33	0,02
28	caryophylen oxid	-	0,16	-	0,43
29	globulol	-	0,18	-	0,10
30	α -longipinen	1,67	-	0,44	-
31	leden	-	-	-	0,30
32	widdren	1,43	-	0,34	0,45
33	ι -cadinol	2,51	0,78	1,12	1,00
34	cyclosativen	1,62	0,16	-	0,14
35	β -guaien	-	0,36	-	0,18
36	naphthalenol	1,32	-	-	-
37	longifolenaldehyd	-	0,15	-	0,36
38	kaural-16,18-diol	-	0,10,73		

Thảo luận kết quả:

1. Mâm vỏ quế Quảng Nam có hàm lượng tinh dầu là 6,80%. Có lẽ đây là một trong những loại quế có hàm lượng cao nhất ở Việt Nam đã được nghiên cứu từ trước đến nay. Trong khi đó, mâm vỏ quế có nguồn gốc ngoài tỉnh (Thanh Hoá) có hàm lượng tinh dầu rất thấp (0,65%).

2. Thành phần chính trong tinh dầu vỏ quế Quảng Nam là cinnamaldehyd (aldehyd cinnamic) với hàm lượng 88,74%, đạt tiêu chuẩn DD Việt Nam III (80%). Trong khi đó, hàm lượng tinh dầu vỏ quế ngoài tỉnh là 67,39%. Hơn nữa, hàm lượng cinnamyl acetat (thành phần được coi là cản trở chất lượng tinh dầu quế) trong tinh dầu vỏ quế Quảng Nam là 3,97%, và trong tinh dầu vỏ quế ngoài tỉnh là 15,54%.

3. Lá của cả hai loại quế ở thời điểm nghiên cứu đều có hàm lượng tinh dầu rất thấp (0,03%), hàm

lượng cinnamaldehyd trong tinh dầu cũng thấp (38,70 và 73,45%). Do đó, không nên khai thác lá để đảm bảo chất lượng và hiệu suất tinh dầu

4. Những kết quả nêu trên chỉ phản ánh được một phần chất lượng quế hiện trồng ở Quảng Nam. Muốn có một kết luận đầy đủ, toàn diện và chính xác, cần tiếp tục nghiên cứu thêm trên diện rộng với nhiều đối tượng khác nhau.

Phân thực nghiệm

1. Xác định hàm lượng tinh dầu bằng phương pháp cất kéo hơi nước với dụng cụ "Định lượng tinh dầu cải tiến" của Bộ môn Dược liệu trường Đại học Dược Hà Nội.

2. Phân tích tinh dầu bằng GC/MS: Máy SKK GC-17A, cột capillar SPB- 5, Detector GCMS-QP 5050 A, khí mang He, nhiệt độ 60-200°C (tốc độ tăng nhiệt độ 4°C/ min.), Nhiệt độ buồng tiêm 250°C, nhiệt độ detector 280°C.

(Xem tiếp trang 20)

Tap chí Dược liệu thông báo:

Theo quyết định số 20/2003/QĐ-HĐGSNN ngày 24/2/2003 của Hội đồng chức danh giáo sư Nhà nước do GS.TSKH. Phạm Minh Hạc, Chủ tịch Hội đồng ký, điểm công trình của bài đăng trong các tạp chí áp dụng cho ngành dược như sau:

TT	Tên tạp chí	Cơ quan xuất bản	Điểm CT
1	Tạp chí Dược học	Bộ Y tế	Từ 0 đến 1
2	Tạp chí Dược liệu	Viện Dược liệu	Từ 0 đến 1
3	Tạp chí Sinh học	Trung tâm KHTN & CNQG	Từ 0 đến 1
4	Tạp chí HH và C. nghệ hoá chất	Hội hoá học Việt Nam	Từ 0 đến 1
5	Tạp chí Y học VN	Tổng hội Y Dược học VN	Từ 0 đến 1
6	Tạp chí Y học thực hành	Tổng hội Y Dược học VN	Từ 0 đến 1
7	Revue Pharmaceutique	Tổng hội Y Dược học VN	Từ 0 đến 1
8	Tạp chí Nghiên cứu Y học	ĐH Y khoa Hà Nội	Từ 0 đến 1
9	Tạp chí NC Y Dược học Quân sự	Học viện Quân Y	Từ 0 đến 1
10	Tạp chí Y học Tp. HCM	ĐH Y Dược Tp. Hồ Chí Minh	Từ 0 đến 1
11	Tạp chí KH	ĐH Quốc gia HN	Từ 0 đến 0,5
12	Tạp chí Y học quân sự	Cục Quân Y	Từ 0 đến 0,5
13	Tạp chí KNKT Nông nghiệp	ĐH Nông nghiệp I HN	Từ 0 đến 0,5
14	Tạp chí Ngoại khoa	Hội Ngoại khoa Việt Nam	Từ 0 đến 0,5
15	Tạp chí Nội khoa	Hội Nội khoa Việt Nam	Từ 0 đến 0,5
16	Tạp chí Nhi khoa	Hội Nhi khoa Việt Nam	Từ 0 đến 0,5
17	Tạp chí Sản phụ khoa	Hội Sản phụ khoa Việt Nam	Từ 0 đến 0,5
18	Tạp chí Đông Y	Hội Đông Y Việt Nam	Từ 0 đến 0,5
19	Tạp chí Kiểm nghiệm (chỉ tính các bài là kết quả nghiên cứu)	Viện Kiểm nghiệm, Bộ Y tế	Từ 0 đến 0,5
20	TC NC Y Dược học Cổ truyền VN	Viện Y học Cổ truyền VN	Từ 0 đến 0,5
21	Tạp chí Phòng chống Sốt rét và các bệnh Ký sinh trùng	Viện Sốt rét, Ký sinh trùng & Côn trùng	Từ 0 đến 0,5
22	Tạp chí Y Sinh hoá	Hội Sinh hoá	Từ 0 đến 0,5
23	TC Y học Lâm sàng các bệnh n.đới	Hội Hen miễn dịch lâm sàng	Từ 0 đến 0,5
24	Công trình NCKH Đại học Dược	Trường ĐH Dược Hà Nội	Từ 0 đến 0,5
25	Tạp chí Khoa học	Trường ĐH Huế	Từ 0 đến 0,5
26	Tạp chí KH & CN	ĐH Thái Nguyên	Từ 0 đến 0,5
27	Tạp chí KH	Trường ĐH Cần Thơ	Từ 0 đến 0,5
28	Báo cáo KH tại Hội nghị KH Quốc gia và Quốc tế đăng toàn văn trong kỷ yếu (Proceedings) hội nghị		Từ 0 đến 1
29	- Các tạp chí KH chuyên ngành nước ngoài có uy tín (in bằng 1 trong 5 thứ tiếng: Anh, Nga, Pháp, Đức, Trung Quốc) - Các tạp chí KH chuyên ngành nước ngoài khác		Từ 0 đến 1 Từ 0 đến 0,5