TÁC DỤNG KHÁNG VIÊM VÀ ĐỘC TÍNH CỦA THUỐC NƯỚC CHỨA TINH CHẤT LÁ TRẦU (*PIPER BETLE* L.)

Võ Thị Anh Đào, Lê Thị Lan Phương**, Nguyễn Lê Việt Hùng**, Nguyễn Phương Dung***

TÓM TẮT

Tình hình và mục tiêu nghiên cứu: *Trầu (Piper betle L.) đã được sử dụng làm thuốc lâu đời tại Việt Nam. Nghiên cứu này sẽ đánh giá tác dụng kháng viêm và độc tính của 1 một chế phẩm thuốc nước chứa tinh chất lá Trầu (TK) trên chuột nhắt trắng.*

Phương tiện và pháp nghiên cứu: *Chuột nhắt trắng trưởng thành cả 2 phái, chủng Swiss albino, thể trọng 18-22 g, 6-8 tuần tuổi, khoẻ mạnh, do viện Vaccin sinh phẩm Nha trang cung cấp. Áp dụng mô hình gây viêm cấp bằng carrageenan, gây viêm mạn bằng tạo u hạt thực nghiệm trên chuột nhắt trắng. Chỉ tiêu theo dõi: Thể tích chân chuột sau tiêm carrageenan 1, 2, 3 giờ và 1 ngày, 2 ngày; Trọng lượng u hạt, tươi và khô ngày thứ 8 của thí nghiệm gây viêm mạn. Đánh giá độc tính cấp theo hướng dẫn OECD 423 áp dụng đối với dịch chiết thảo dược. Ghi nhận thay đổi hành vi, tỷ suất tử vong sau khi cho chuột uống 1 liều duy nhất thuốc thử nghiệm. Thử nghiệm độc tính bán trường diễn: Chia chuột nhắt thành 3 lô (1 chứng, 2 thử), mỗi lô 10 chuột, dùng thuốc nghiên cứu liên tục 60 ngày, liều thử nghiệm là 120 và 180 mg/kg. Cân thể trọng hàng tuần. Xét nghiệm huyết học, sinh hóa, vi thể gan, thận vào cuối thử nghiệm, 60 ngày sau uống thuốc.*

Kết quả: *Trên mô hình gây phù chân chuột bằng carageenin, thuốc nước chứa tinh chất lá Trầu (TK) thể hiện tác dụng kháng viêm cấp ở cả 3 liều uống 60 mg/kg, 120 mg/kg và 180 mg/kg. Trên mô hình gây u hạt, thuốc nước TK thể hiện tác dụng kháng viêm mạn ở liều uống 120 mg/kg. LD_{50} đường uống của thuốc nước TK là 4069,23 mg/kg. So với lô chứng, ở liều uống 120 mg/kg và 180 mg/kg, thuốc nước TK không ảnh hưởng đến thể trọng, các chỉ số huyết học, sinh hóa cơ bản, hình thái vi thể gan thận của chuột nhắt trắng.*

Kết luận: *Thuốc nước chứa tinh chất lá Trầu (TK) có tác dụng kháng viêm cấp và mạn trên chuột nhắt trắng. LD_{50} của thuốc nước TK là 4069,23 mg/kg (p.o). Kết quả nghiên cứu độc tính bán trường diễn cho thấy thuốc nước TK tương đối an toàn khi uống dài ngày, có thể triển khai thử nghiệm trên người.*

Từ khóa: *Lá Trầu Piper betle. leaves, carrageenan, u hạt, độc tính cấp, độc tính bán trường diễn.*

ABSTRACT

ANTI-INFLAMMATORY AND TOXICITY STUDIES OF THE PREPARATION FROM BETEL LEAVES EXTRACT (PIPER BETLE L.)

Vo Thi Anh Dao, Le Thi Lan Phuong, Nguyen Le Viet Hung, Nguyen Phuong Dung

* Y Hoc TP. Ho Chi Minh * Supplement of Vol. 19 - No 5 - 2015: 111- 117

Background and Aims: *Piper betle L. leaves have long been used in Vietnam as a traditional medicine. The present study was designed to evaluate the anti-inflammatory activities and the oral toxicity of the preparation from Betel leaves extract (TK).*

Materials and Methods: *Swiss albino mice weight body 18–22g, 6-8 weeks age, purchased from the Institute of Vaccines and Medical Biological - Nhatrang. The anti-inflammatory effects of the preparation from Betel leaves extract on acute (carrageenan-induced) and chronic (cotton pellet granule) phases of inflammation were investigated. The mouse paw edema was measured plethysmometrically from 1, 2, 3 hours and 1 day, 2 days*

* Khoa Sinh - Đại học Khoa học Tự nhiên TP.HCM ** Khoa Y học cổ truyền - Đại học Y Dược TP.HCM
Tác giả liên lạc: PGS.TS. Nguyễn Phương Dung *ĐT*: 0988202625 *Email*: phuongdung463@gmail.com

after injection carrageenan. Pellet granule was weighed on fresh and dried at the end of 8th day. Study sample was followed OECD guidelines OECD 423 for assessing the acute oral toxicity of the plant extracts. The behavior and mortality were examined for up to 14 days. Sub-chronic toxicity test: 3 groups of 10 animals were used. Mice were treated daily for 60 consecutive days. 2 test groups received orally at the dose 120 and 180 mg/kg. Body weight was measured weekly. Hematological and biochemical parameters, relative organ weight were determined at the end of the 60 days administration.

***Results**: The preparation from Betel leaves extract at the dose of 60, 120 and 180 mg/kg was capable of reducing carrageenan-induced inflammation. The TK preparation was showed a potent Antiproliferative effect (69.27%) in the chronic inflammation model (120 mg/kg, p.o). In acute toxicity study, LD_{50} of TK preparation was determined 4069.23 mg/kg (p.o). Sub-chronic toxicity study: Oral administration of the TK preparation at the dose 120 and 180 mg/kg did not induce death or significant changes in body weight, relative weight of vital organs, hematological parameters and was not associated with liver and kidney toxicity.*

***Conclusion**: The findings of the study suggested that preparation from Betel leaves extract (TK) has anti-inflammatory effects, confirming the traditional use of this plant for inflammatory pain. Preparation from Betel leaves extract (TK) showed anti-inflammatory activity on mice. Our study provides data for further investigations on detailed toxic effects of this preparation TK and its safe use in human.*

***Key words**: Carrageenan, cotton pellet granule, anti-inflammatory, Piper betle L., Betel leave, acute toxicity, sub-chronic toxicity.*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Trầu (*Piper betle* L., họ Hồ tiêu, *Piperaceae*) là một loại thực vật dễ trồng, phân bố rộng rãi ở nhiều nước châu Á, vùng nhiệt đới như: Việt Nam, Malaysia, Indonesia, Philippin… Ở Việt Nam, Trầu đã được sử dụng từ thời Hùng Vương dựng nước để làm thuốc và vệ sinh răng miệng. Theo Y học cổ truyền, lá Trầu có vị cay nồng, tính ấm, vào kinh Phế, Tỳ, Vị, có công năng hạ khí, chỉ khái, tiêu viêm, sát trùng, trừ phong thấp, kích thích tiêu hóa và thần kinh, phòng bệnh lam sơn chướng khí… Kinh nghiệm dân gian dùng nước sắc, nước hãm từ lá Trầu để điều trị các chứng viêm nhiễm ngoài da (chàm, rôm sảy, lở loét, mụn nhọt…) ở trẻ nhỏ[2,6].

Những nghiên cứu dược lý thực nghiệm của các tác giả nước ngoài cho thấy Trầu có tác dụng kháng khuẩn, kháng virus, kháng nấm, kháng viêm, giảm đau, kích thích thần kinh trung ương, chống oxy hóa, ức chế sự phát triển của tế bào ung thư Hela, MCF-7….[1,5,7,9] Theo kinh nghiệm của Nhóm nghiên cứu Chu Phạm Ngọc Sơn và Huỳnh Kỳ Trân, tinh dầu lá Trầu có khả năng rút ngắn thời gian hồi phục bệnh Tay chân miệng (TCM) trên một số trẻ nhỏ. Cho thấy, Trầu có thể trở thành nguồn nguyên liệu để bào chế thuốc phòng chống lây lan và điều trị bệnh TCM. Vì thế, Trầu có nhiều hứa hẹn trở thành nguồn nguyên liệu để bào chế thuốc phòng chống lây lan và điều trị bệnh do EV71.

Tuy nhiên, những kết quả nghiên cứu kể trên vẫn ở dạng tiền đề, mới chỉ khảo sát hoạt tính *in vitro* trên dịch chiết. Để có thể trở thành sản phẩm thương mại, rất cần có các nghiên cứu về dạng bào chế, đánh giá hiệu quả *in vitro*, *in vivo*, độc tính tiền lâm sàng, cũng như các nghiên cứu về hiệu quả, tính an toàn của chế phẩm từ lá Trầu trên lâm sàng.

Với mục đích tìm kiếm một chế phẩm chống lây lan và điều trị bệnh Tay chân miệng (TCM) từ lá Trầu, trong phạm vi nghiên cứu này chúng tôi tiến hành đánh giá tác dụng kháng viêm cấp và kháng viêm mạn, khảo sát độc tính cấp và bán trường diễn của chế phẩm thuốc nước chứa tinh chất lá Trầu trên chuột nhắt trắng.

PHƯƠNG TIỆN - PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Phương tiện nghiên cứu

Dung môi pha thuốc (C), không chứa tinh dầu lá Trầu, do Công ty CPDP OPC sản xuất ngày 21/4/2014, sử dụng làm mẫu chứng trong các thử nghiệm dược lý.

Thuốc nước TK1, TK2, TK3 chứa chứa 0,3%, 0,6%, 0,9% tinh dầu lá Trầu, do Công ty CPDP OPC sản xuất ngày 21/4/2014.

Thuốc nước TK20 chứa 6% tinh dầu lá Trầu, do Công ty CPDP OPC sản xuất ngày 21/4/2014.

Aspirin 81mg (Domesco), số lô 232023.

Carrageenin (Sigma Aldrich - Mỹ), tác nhân gây viêm, được pha trong dung dịch NaCl 0,9% trước thử nghiệm 1 giờ.

Máy đo thể tích phù Plethysmometer 7140 (Ugo Basile - Ý).

Máy xét nghiệm huyết học Sysmex B2207, máy sinh hóa tự động 100277 Eos Bravo Plus (Hospitex Diagnostics - Ý).

Súc vật thử nghiệm: Chuột nhắt trắng trưởng thành cả 2 phái, chủng Swiss albino, thể trọng 18-22 g, 6-8 tuần tuổi, khoẻ mạnh, do viện Vaccin sinh phẩm Nha trang cung cấp. Chuột được ổn định 3 ngày trước khi tiến hành thử nghiệm. Trong suốt quá trình thử nghiệm, chuột được nuôi bằng thực phẩm viên (mua tại Viện Pasteur Tp. Hồ Chí Minh), nước uống theo nhu cầu, nhiệt độ và chế độ chiếu sáng phòng.

Phương pháp nghiên cứu

Khảo sát độc tính cấp[6,10]

Cho chuột nhịn ăn 12 giờ trước thử nghiệm, uống nước tự do. Chia ngẫu nhiên chuột nhắt trắng làm nhiều lô, mỗi lô 10 – 14 chuột. Dùng kim cong đầu tù để cho chuột uống 1 liều thuốc TK20 duy nhất, khoảng cách liều giữa các lô theo cấp số cộng.

Theo dõi các triệu chứng bệnh lý có thể gặp ở chuột không chết, hoặc trước khi chết: Gãi miệng liên tục, chạy hoảng loạn, ngã xiêu vẹo, co giật, run rẩy, ra mồ hôi, tím tái ở tai, chân, đuôi, tư thế nằm, đứng… Ghi lại trong phần kết quả. Xét nghiệm đại thể (gan, thận) ngay sau chết đối với chuột chết, và sau khi kết thúc thí nghiệm đối với chuột còn sống.

Theo dõi tỷ lệ chuột chết trong vòng 48 giờ sau uống thuốc thử nghiệm. Tính LD_{50} theo công thức Kaber-Behrens [9].

Đánh giá tác dụng kháng viêm trên mô hình carragenan[3,5,12]

Chuột được gây viêm bằng cách tiêm vào gan bàn chân trái 0,025 mL dung dịch carrageenin 1%. Đo thể tích chân chuột 3 giờ sau khi tiêm. Các chuột có thể tích chân sưng phù trên 50% so với bình thường được lựa chọn cho thử nghiệm.

Chuột được chia ngẫu nhiên thành 5 lô, mỗi lô 8-10 chuột:

Lô trắng (C): Uống dung môi dùng pha thuốc nước (không chứa tinh dầu lá Trầu).

Lô đối chứng (As): Uống aspirin, 240mg/kg thể trọng.

Lô thử (TK1): Uống thuốc TK1, uống liều 60mg/kg, tương đương 1/68 LD_{50}.

Lô thử (TK2): Uống thuốc TK2, uống liều 120mg/kg, tương đương 1/23 LD_{50}.

Lô thử (TK3): Uống thuốc TK3, uống liều 180mg/kg, tương đương 1/17 LD_{50}.

Theo dõi thể tích sưng phù của chân chuột sau 1 giờ, 2 giờ, 3 giờ, 4 giờ và 5 giờ.

Mức độ phù chân chuột được tính theo công thức: $X= (V_n – V_0)/V_0 \times 100$.

Trong đó, X: Mức độ phù chân chuột tính theo %; V_0: Thể tích chân chuột trước khi gây viêm (đơn vị đo 1/100 mL). V_n: Thể tích chân chuột sau khi gây viêm (đơn vị đo 1/100 mL).

Mức độ giảm phù chân chuột được tính theo công thức: $Y = [1 – (V_t/V_c)] \times 100$.

Trong đó: Y: Mức độ giảm chân chuột phù tính theo %. V_t: Thể tích chân chuột lô thử nghiệm (đơn vị đo 1/100 mL). V_c: Thể tích chân chuột lô chứng (đơn vị đo 1/100 mL).

Đánh giá tác dụng kháng viêm mạn trên mô hình u hạt thực nghiệm[4]

Cắt sợi cotton thành từng đoạn ngắn, trọng lượng 20 ± 1 mg, vê tròn, sấy khô ở nhiệt độ 60^{0}C đến trọng lượng không đổi. Cạo sạch lông vùng lưng chuột, dùng đầu kéo bấm 1 lỗ nhỏ vùng da trên lưng chuột tách ra khỏi lớp cơ, cấy miếng cotton. Khâu chỉ để nối liền vết mổ.

Chia ngẫu nhiên chuột thành 3 lô, mỗi lô 10 chuột:

Lô trắng (C): Uống dung môi dùng pha thuốc nước (không chứa tinh dầu Trầu).

Lô đối chứng (As): Uống aspirin, 240mg/kg thể trọng.

Lô thử (TK2): Uống thuốc TK2, uống liều 120mg/kg, tương đương 1/23 LD_{50}

Đến ngày thứ 8, mổ lấy khối u hạt, cân u hạt tươi. Sấy u hạt ở nhiệt độ 60^{0}C đến trọng lượng không đổi và cân.

Tác dụng ức chế u hạt được biểu thị bằng tỷ lệ % giảm trọng lượng trung bình các u hạt ở lô dùng thuốc thử nghiệm so với lô chứng.

Tỷ lệ ức chế u hạt được tính theo công thức:

$$X = W_c - W_t / W_c \times 100.$$

Trong đó: X: Mức độ ức chế u hạt tính theo %. W_c: Chênh lệch trọng lượng u hạt tươi và khô của nhóm chứng. W_t: Chênh lệch trọng lượng u hạt tươi và khô của nhóm thử nghiệm.

Khảo sát độc tính bán trường diễn

Chia ngẫu nhiên chuột nhắt trắng thành 3 lô, mỗi lô 10 chuột:

Lô chứng (C): Uống nước cất.

Lô thử (TK2): Uống TK2, uống liều 120mg/kg, tương đương 1/23 LD_{50}.

Lô thử (TK3): Uống TK3, uống liều 180mg/kg, tương đương 1/17 LD_{50}.

Thể tích cho uống 0,2ml/10g, liên tục trong 60 ngày, mỗi ngày uống lúc 8-9 giờ sáng, trước khi cho chuột ăn.

Mỗi tuần đều cân chuột, xác định thể trọng để điều chỉnh thể tích thuốc cho uống cho tuần kế tiếp.

Chỉ tiêu quan sát cuối thử nghiệm:

Huyết học: Số lượng hồng cầu (triệu/mm^3), số lượng bạch cầu (ngàn/mm^3), tiểu cầu (ngàn/mm^3), hemoglobin (g/dl), hematocrit (%).

Sinh hoá: SGOT (U/L), SGPT (U/L), Creatinin (mg/dL).

Mô học: Gan, thận.

Thống kê số liệu thực nghiệm

Phương pháp thống kê mô tả được sử dụng để tính giá trị trung bình các lô. Dữ liệu được trình bày dưới dạng số trung bình (Mean) ± SEM. Sự khác biệt giữa các lô được phân tích bằng chương trình MS Exell. Áp dụng phép kiểm ANOVA 1 yếu tố để so sánh các trị số trung bình, t-student độc lập để so sánh trị số trung bình của 2 lô khác nhau, t-student bắt cặp để so sánh trị số trung bình trước sau trong cùng 1 lô. $p < 0,05$ được cho là có ý nghĩa thống kê.

KẾT QUẢ

Độc tính cấp

***Bảng 1**. Số chuột chết sau khi uống thuốc nước chứa tinh chất lá Trầu*

Lô	Liều (mg/kg)	Số chuột thử nghiệm	Số chuột tiêu phân lỏng	Tỷ lệ tiêu phân lỏng (%)	Số chuột khó thở, co giật	Tỷ lệ khó thở, co giật (%)	Số chuột chết	Tỷ lệ chuột chết (%)
1	2700	10	5	50	0	0	0	0
2	3000	10	4	40	2	20	2	20
3	3300	10	6	60	1	10	1	10
4	3600	10	4	40	4	40	4	40
5	3900	10	0	0	8	80	8	80
6	4200	14	4	28,57	7	50	8	57,14

Lô	Liều (mg/kg)	Số chuột thử nghiệm	Số chuột tiêu phân lỏng	Tỷ lệ tiêu phân lỏng (%)	Số chuột khó thở, co giật	Tỷ lệ khó thở, co giật (%)	Số chuột chết	Tỷ lệ chuột chết (%)
7	4500	14	0	0	14	100	14	100

Sau 2-3 giờ, chuột giảm vận động, có hiện tượng khó thở, co giật, và tử vong trong vòng 24 giờ ở các liều trong khoảng 3000 - 4500 mg/kg.

Với các chuột còn sống (liều 2700 - 4200 mg/kg), có hiện tượng tiêu phân lỏng sau 24 giờ.

Kết quả quan sát đại thể ở chuột chết: Gan, ruột bình thường; phổi trắng; dạ dày căng, đầy hơi; tim ở thời kỳ tâm thu.

Áp dụng công thức Karber - Behrens tính được liều gây chết 50% súc vật thử nghiệm của thuốc nước chứa tinh chất lá Trầu: LD_{50} = 4069,23 mg/kg.

Chọn 2 liều 1/23 và 1/34 LD_{50} tương đương 180 mg/kg và 120 mg/kg để tiến hành thử nghiệm đánh giá độc tính bán trường diễn của thuốc nước chứa tinh chất lá Trầu.

Chọn 3 liều 1/23, 1/34 và 1/68 LD_{50} tương đương 180 mg/kg, 120 mg/kg và 60mg/kg để tiến hành các thử nghiệm đánh giá tác dụng kháng viêm của thuốc nước chứa tinh chất lá Trầu.

Tác dụng kháng viêm cấp

***Bảng 2**. Thể tích chân chuột (mL) trước và sau điều trị*

Lô	Vo (mL)	Vn (mL)	Thể tích chân chuột sau gây viêm (mL)						
			1 giờ	2 giờ	3 giờ	4 giờ	5 giờ	1 ngày	2 ngày
C (n=10)	0,54 ± 0,03	0,95 ± 0,14	0,95 ± 0,11	0,92 ± 0,142	0,88 ± 0,109	0,83 ± 0,098	0,80 ± 0,10	0,64 ± 0,04	0,59 ± 0,05
As 240 mg /kg (n=8)	0,54 ± 0,03	0,89 ± 0,12	0,72 ± 0,10***	0,67 ± 0,11 ***	0,64 ± 0,09***	0,62 ± 0,07***	0,59 ± 0,06 ***	0,56 ± 0,04	0,55 ± 0,03
TK1 60mg /kg (n=10)	0,54 ± 0,02	0,98 ± 0,11	0,90 ± 0,10	0,84 ± 0,10	0,78 ± 0,10	0,72 ± 0,07***	0,66 ± 0,05***	0,62 ± 0,05	0,61 ± 0,05
TK2 120mg /kg (n=10)	0,55 ± 0,04	0,90 ± 0,13	0,71 ± 0,07 ***	0,66 ± 0,08***	0,62 ± 0,09***	0,61 ± 0,08***	0,57 ± 0,07	0,56 ± 0,04	0,54 ± 0,04
TK3 180 mg /kg (n=10)	0,53 ± 0,03	0,92 ± 0,10	0,78 ± 0,07***	0,69 ± 0,08***	0,63 ± 0,07**	0,60 ± 0,07***	0,56 ± 0,05***	0,56 ± 0,03	0,54 ± 0,02

Chú thích: V_0 là thể tích chân chuột ban đầu (mL); V_n là thể tích chân chuột sau 3 giờ sau tiêm carrageenin (mL).

** p < 0,05; ** p < 0,01; ***p < 0,001 (khác biệt so với lô C uống dung môi).*

Sau tiêm carrageenan, thể tích chân chuột lô chứng tăng 75,93% (p < 0,001), không trở về giới hạn bình thường sau 1 ngày, sau 2 ngày vẫn cao hơn mức bình thường 9,26% (p < 0.05).

Thể tích chân chuột trong lô uống aspirin (240mg/kg) tăng 64,81 % (p < 0,001), sau đó giảm dần và trở về giới hạn bình thường sau 1 ngày, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng (p < 0,01).

Thể tích chân chuột lô uống thuốc TK1 (60 mg/kg) tăng đến 81,48% (p < 0,001), sau đó giảm dần và trở về giới hạn bình thường sau 1 ngày, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng (p < 0,01).

Thể tích chân chuột lô uống thuốc TK2 (120 mg/kg) tăng 63,64% và trở về mức bình thường sau 1 ngày, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng (p < 0,001).

Thể tích chân chuột lô uống thuốc TK3 (180 mg/kg) tăng 73,58%, sau đó giảm dần chỉ còn phù 5,66 % sau 5 giờ cho uống, trở về giới hạn bình thường sau 1 ngày, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng (p < 0,01).

***Bảng 3**. Độ phù chân chuột (%) so với ban đầu (V_0) ở các thời điểm*

Lô	V_n	Sau điều trị						
		1 giờ	2 giờ	3 giờ	4 giờ	5 giờ	1 ngày	2 ngày
Chứng (n=10)	75,93	75,93	70,37	62,96	53,7	48,15	18,52	9,26

Lô	V_n	Sau điều trị						
		1 giờ	2 giờ	3 giờ	4 giờ	5 giờ	1 ngày	2 ngày
Aspirin 240 mg /kg (n=8)	64,81	33,33	24,07	18,52	14,81	9,26	3,7	1,85
TK1 60mg /kg (n=10)	81,48	66,67	55,56	44,44	33,33	22,22	14,81	12,96
TK2 120mg /kg (n=10)	63,64	29,09	20,00	12,73	10,91	3,64	1,82	1,82
TK3 180 mg /kg (n=10)	73,58	47,17	30,19	18,87	16,98	5,66	5,66	1,89

***Bảng 4**. Mức độ giảm phù chân chuột (%) sau điều trị*

Lô	Vn	Sau điều trị						
		1 giờ	2 giờ	3 giờ	4 giờ	5 giờ	1 ngày	2 ngày
Aspirin 240 mg /kg (n=8)	66,04	19,1	25,84	30,34	31,46	34,83	38,2	39,33
TK1 60mg /kg (n=10)	81,48	8,16	14,29	20,41	26,53	32,65	36,73	37,76
TK2 120mg /kg (n=10)	63,64	21,11	26,67	31,11	32,22	36,67	37,78	37,78
TK3 180 mg /kg (n=10)	73,58	15,22	25,00	31,52	33,7	39,13	39,13	41,30

Thuốc nước lá Trầu thể hiện tác dụng giảm phù chân chuột ở cả 3 liều uống 60, 120 và 240 mg.kg. Trong đó, liều 120 mg/kg và 180 mg/kg có tác dụng kháng viêm cấp nhanh hơn so với liều 60 mg/kg và gần như tương đương với aspirin (240 mg/kg).

Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa 2 liều 120 và 180mg/kg về tác dụng kháng viêm cấp. Do đó, chúng tôi chọn liều 120 mg/kg để khảo sát tác dụng kháng viêm mạn.

Tác dụng kháng viêm mạn

***Bảng 5.** Trọng lượng u hạt tươi (mg) và u hạt khô (mg) sau gây viêm mạn 7 ngày*

Lô	n	Trọng lượng u hạt tươi (mg)	Mức giảm trọng lượng u hạt tươi so với lô chứng (%)	Trọng lượng u hạt khô (mg)	Mức giảm trọng lượng u hạt khô so với lô chứng (%)
Chứng	10	65,44 ± 7,85	-	8,85 ± 1,72	-
Aspirin 240mg/kg	10	49,35 ± 3,10***	24,59	3,11 ± 1,98***	64,86
TK2 120mg/kg	10	49,12 ± 3,73***	24,94	2,72 ± 0.99***	69,27

Ở lô chuột uống aspirin (240 mg/kg), khối lượng u hạt tươi là 24,59 %, u hạt khô là 64,86 % so với lô chứng ($p < 0,001$).

Ở lô chuột uống TK2 (120 mg/kg), trọng lượng u hạt tươi là 24,94%, u hạt khô là 69,27% so với lô chứng ($p < 0,001$).

Như vậy, thuốc nước Trầu làm giảm trọng lượng u hạt, thể hiện tác dụng kháng viêm mạn ở liều uống 120 mg/kg, tác dụng này tương đương aspirin 240 mg/kg.

Độc tính bán trường diễn

***Bảng 6.** Sự thay đổi thể trọng chuột (g)*

Lô	n	Ban đầu	Sau 60 ngày	Trọng lượng với ban đầu (%)
Chứng	10	19,83 ± 1,34	27,67 ± 2,49	139,54%
TK2 (120mg/kg)	10	19,73 ± 1,22	25,82 ± 3,54	130,87%
TK3 (180 mg/kg)	10	19,82 ± 1,25	26,55 ± 2,98	133,95%

Sau 60 ngày uống thuốc trọng lượng chuột ở lô uống thuốc nước Trầu liều 120 mg/kg và 180 mg/kg tăng so với ban đầu, nhưng tốc độ tăng trọng kém hơn lô chứng 8,67% và 5,59% ($p > 0,05$).

***Bảng 7.** Các trị số huyết học, sinh hóa của chuột nhắt sau 60 ngày dùng thuốc*

Chỉ số	Lô Chứng (n = 10)	Lô nghiên cứu	
		TK2 (120mg/kg) n = 10	TK3 (180mg/kg) n = 10
Hồng cầu (triệu/mm^3)	9,12 ± 0,29	8,89 ± 0,64	9,02 ± 0,88
Bạch cầu (ngàn/mm^3)	11,88 ± 1,31	11,10 ± 2,35	10,78 ± 2,13

Chỉ số	Lô Chứng (n = 10)	Lô nghiên cứu	
		TK2 (120mg/kg) n = 10	TK3 (180mg/kg) n = 10
Hemoglobin (g/dL)	16,73 ± 0,36	16,32 ± 0,84	16,48 ± 1,26
Hematocrit (%)	0,50 ± 0,012	0,492 ± 0,028	0,493 ± 0,039
Tiểu cầu (ngàn/mm^3)	909,3 ± 54,6	869,1 ± 41,4	914,6 ± 38,7
GPT (U/L)	54,6 ± 12,4	6,09 ± 9,81	55,59 ± 9,11
GOT(U/L)	101,0 ± 15,1	97,7 ± 14,5	90,4 ± 21,2
Creatinin (mg/dL)	0,88 ± 0,142	1,03 ± 0,29	0,93 ± 0,323
Protein (g/dL)	6,526 ± 0,831	6,533 ± 0,294	6,419 ± 0,516

Kết quả bảng 7 cho thấy sau 60 ngày dùng thuốc nước Trầu liều 120 mg/kg và 180mg/kg không làm thay đổi số lượng hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu, hemoglobin, hematocrit, SGOT,SGPT, creatinin, protein toàn phần so với lô chứng (p > 0,05).

Hình ảnh vi thể gan, thận của chuột uống thuốc nước Trầu không có biểu hiện khác biệt so với lô chứng.

KẾT LUẬN

Trên mô hình gây phù chân chuột bằng carageenan, thuốc nước chứa tinh chất lá Trầu thể hiện tác dụng kháng viêm cấp ở cả 3 liều uống 60 mg/kg, 120 mg/kg và 180 mg/kg. Trong đó, liều 120 và 180 mg/kg thể hiện tác dụng kháng viêm tốt hơn liều 60 mg/kg và tương tự aspirin 240 mg/kg.

Trên mô hình gây u hạt, thuốc nước chứa tinh chất lá Trầu thể hiện tác dụng kháng viêm mạn ở liều uống 120 mg/kg, tương tự aspirin 240 mg/kg.

Đã xác định LD_{50} đường uống của thuốc nước chứa tinh chất lá Trầu là 4069,23 mg/kg, gấp 68 lần liều có tác dụng kháng viêm.

So với lô chứng, ở liều uống 120 mg/kg và 180 mg/kg, thuốc nước chứa tinh chất lá Trầu không làm thay đổi có ý nghĩa thống kê về sự thể trọng, các chỉ số huyết học, sinh hóa cơ bản, hình thái vi thể gan thận của chuột nhắt trắng.

Lời cảm ơn: *Nhóm nghiên cứu trân trọng cảm ơn sự tài trợ kinh phí của Sở Khoa học và Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh trong quá trình thực hiện đề tài này.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Abrahim NN, Kanthimathi MS, Abdul-Aziz A (2012). "Piper betle show antioxidant activities, inhibits MCF-7 cell proliferation and increases activities of catalase and superoxidase dismutase". *BMC Complementary and Alternative Medicine;* p.12-22.
2. Đỗ Tất Lợi (2014*). Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*. Nhà xuất bản Y học, tr.118-119.
3. Gerhard Vogel H et al (2008), *Drug Discovery and Evaluation Pharmacological Assays, 3rd Edition*. Springer, p.1113.
4. Goldstein SA, Shemano L, Daweo R, Betler J, (1996). "Cotton pellet ganuloma pou method for evaluation of anti-inflammatory activity", *Arch Pharmacodynamic Ther;* 165:725-771.
5. Lê Thị Lan Phương, Nguyễn Phương Dung (2012). "Đánh giá tác dụng kháng viêm, giảm đau của viên nang PT5 trên chuột nhắt". *Tạp chí Y học Tp. Hồ Chí Minh*, tập 19, số 1: 135-139.
6. Organisation for Economic Cooperation and Development (2002). Guidelines for the testing of chemicals, Acute oral toxicity acute toxic class method, *Paris, Fancer*, Section 4.
7. Pradhan D, Suri A, Pradhan K, Biswasroy (2013), "Golden Heart of the Nature: Piper betle L.", *J Pharmacog and Phytochem*;1(6).
8. Rathee JS et al. (2006), "Antioxidant activity of Piper betle leaf extract and its constituents". *J Agric Food Chem*; 54(24):9046-9054.
9. Viện Dược liệu (2004). *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam tập II*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, tr.1007-1009.
10. Viện Dược liệu (2004), *Phương pháp nghiên cứu tác dụng dược lý của thuốc từ dược thảo*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, tr.140-149.
11. Widowati W et al. (2013). "Antioxidant, anticancer, and appoptosis-inducing effects of Piper betle extracts in Hela cells". *J Exp Integr Med*;3(3):225-230.
12. Winter CA et al. (1962). "Carrageenan-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatoty drugs". *Proc Soc Exp Biol Med;* 111:544-547.

Ngày nhận bài báo: *27/02/2015*
Ngày phản biện nhận xét bài báo: *18/05/2015*
Ngày bài báo được đăng: *08/09/2015*