

BLOOD GLUCOSE-LOWERING, REGULATING ENZYME ACTIVITY OF GLUCOSE-6-PHOSPHATASE AND ANTIOXIDANT *IN VIVO* OF *Nauclea orientalis* L. ROOT EXTRACT

Phan Kim Dinh, Le Thi Hong To, Nguyen Thi Kim Xuyen, Dai Thi Xuan Trang, Tran Chi Linh*
Can Tho University

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 05/9/2022 Revised: 19/10/2022 Published: 21/10/2022 KEYWORDS Diabetes mellitus Glucose-6-phosphatase Glutathione Malondialdehyde <i>Nauclea orientalis</i> L.	The present study aimed to estimate the activities of malondialdehyde, glutathione and glucose-6-phosphatase in the pancreas, liver and kidneys of diabetic mice treated by extracts of <i>Nauclea orientalis</i> L. roots. In addition, this study evaluated the antioxidant activity and marker enzymes inhibitory (α-amylase; α-glucosidase) of the <i>Nauclea orientalis</i> L. roots extract. Hyperglycemia was induced in mice by administration of alloxan monohydrate (135 mg/kg, ip.). Hyperglycemic mice were treated with the extract of <i>Nauclea orientalis</i> L. roots (100, 200, 400 mg/kg body weight/twice a day). Glucosephage was used as a positive control agent with dose of 108 mg/kg body weight/twice a day. The experimental mice were administered with both Glucophage and <i>Nauclea orientalis</i> L. roots extract orally during 21 days. The treatment of <i>Nauclea orientalis</i> L. roots and Glucophage significantly decreased the blood glucose levels; suppressed the abnormal elevations of malondialdehyde levels and increased the activity of glutathione in the pancreas, liver and kidneys of diabetic mice. Besides, the results proved that the extracts of <i>Nauclea orientalis</i> L. roots also managed the excessive activity of glucose-6-phosphatase.

TÁC DỤNG HẠ GLUCOSE HUYẾT, ĐIỀU HÒA HOẠT TÍNH ENZYME GLUCOSE-6-PHOSPHATASE VÀ KHÁNG OXY HÓA *IN VIVO* CỦA CAO CHIẾT RỄ CÂY GÁO VÀNG (*Nauclea orientalis* L.)

Phan Kim Định, Lê Thị Hồng Tô, Nguyễn Thị Kim Xuyên, Đái Thị Xuân Trang, Trần Chí Linh*
Trường Đại học Cần Thơ

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 05/9/2022 Ngày hoàn thiện: 19/10/2022 Ngày đăng: 21/10/2022 TỪ KHÓA Đái tháo đường Glucose-6-phosphatase Glutathione Malondialdehyd <i>Nauclea orientalis</i> L.	Mục tiêu của nghiên cứu này là xác định hoạt động của malondialdehyde, glutathione và glucose-6-phosphatase trong gan, thận và tuyến tụy của chuột mắc bệnh đái tháo đường được điều trị bằng cao chiết rễ cây gạo vàng. Ngoài ra, nghiên cứu cũng đánh giá hoạt tính kháng oxy hóa và ức chế enzyme (α-amylase, α-glucosidase) của cao rễ gạo vàng. Sự tăng glucose huyết được gây ra ở chuột bằng cách sử dụng alloxan monohydrate (135 mg/kg). Chuột tăng glucose huyết được điều trị bằng cao rễ gạo vàng (100, 200, 400 mg/kg khối lượng/ hai lần một ngày). Glucophage được sử dụng như một chất đối chứng dương với liều 108 mg/kg khối lượng/ hai lần một ngày. Chuột được cho uống với Glucophage hoặc cao rễ gạo vàng trong 21 ngày. Việc bổ sung cao rễ gạo vàng hoặc Glucophage làm giảm đáng kể hàm lượng glucose trong máu; ức chế sự gia tăng của malondialdehyde và tăng hoạt động của glutathione trong tuyến tụy, gan và thận của chuột mắc bệnh đái tháo đường. Bên cạnh đó, kết quả cũng đã chứng minh rằng rễ gạo vàng làm giảm hoạt động của enzyme glucose-6-phosphatase.

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.6429>

* Corresponding author. Email: tclinh@ctu.edu.vn

1. Giới thiệu

Đái tháo đường (ĐTĐ) là một bệnh chuyển hóa nội tiết có đặc điểm là tăng glucose huyết mạn tính do thiếu insulin, được xem là nguy cơ sức khỏe lớn trên toàn thế giới [1]. Bệnh ĐTĐ có thể gây ra tổn thương bệnh lý cho gan, thận và tuyến tụy với những bất thường đặc trưng trong quá trình chuyển hóa carbohydrate, lipid và protein [2]. Bệnh ĐTĐ được chứng minh bị ảnh hưởng bởi yếu tố di truyền, chế độ ăn uống và môi trường sống. Những khảo sát lâm sàng cho thấy, stress oxy hóa tham gia vào sự phát triển của bệnh ĐTĐ và các biến chứng nguy hiểm [3]. Các loại thuốc có nguồn gốc từ hóa tổng hợp được sử dụng trong điều trị ĐTĐ và các biến chứng trong thời gian dài có thể gây ra nhiều tác dụng phụ [4]. Do đó, các hợp chất thiên nhiên có hoạt tính kháng oxy hóa có thể ức chế tổn thương do stress oxy hóa gây ra đã trở thành một chiến lược trị liệu để giảm nguy cơ mắc bệnh ĐTĐ và các biến chứng.

Gáo vàng (*Nauclea orientalis* L.) là loài thực vật thân gỗ lâu năm được sử dụng trong điều trị sốt rét, xơ gan cổ trướng, giảm đau, chữa vết loét, tiêu chảy và đau răng [5]. Nhiều nghiên cứu trên thế giới cho thấy, rễ gáo vàng có chứa nhiều hợp chất thiên nhiên như: naucleficine, naucleactonin A, naucleidinal, 19-epi-naucleidinal, riososamide, pumiloside, aligenoside, sweroside, epimethoxynaucleaorine và vanillic acid [6], [7]. Tuy nhiên, những nghiên cứu về hoạt tính sinh học của rễ cây gáo vàng ở Việt Nam vẫn còn nhiều hạn chế. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định tiềm năng hạ glucose huyết, kháng oxy hóa và ức chế enzyme cơ bản tham gia vào quá trình chuyển hóa carbohydrate ở chuột ĐTĐ của rễ gáo vàng.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Rễ gáo vàng (RGV, Hình 1) mọc tự nhiên được thu tại tỉnh Vĩnh Long vào tháng 08/2021. Đặc điểm hình thái thực vật của cây gáo vàng được xác định dựa theo miêu tả của Phạm Hoàng Hộ (2003) [8]. Cây gáo vàng được lưu giữ tại Phòng thí nghiệm Thực vật 2, Bộ môn Sinh học, khoa Khoa học Tự nhiên, trường Đại học Cần Thơ.

Chuột *Mus musculus* var. Albino (Hình 1) 10 tuần tuổi, có khối lượng khoảng 30 đến 35 g, giống đực được cung cấp bởi viện Pasteur thành phố Hồ Chí Minh và nuôi dưỡng ở phòng thí nghiệm động vật 1 của Bộ môn Sinh học, khoa Khoa học Tự nhiên, trường Đại học Cần Thơ trong chuồng thủy tinh có kích thước 25 × 20 × 15 cm ở nhiệt độ phòng, điều kiện chiếu sáng 12/12 giờ.



Hình 1. Một số hình ảnh về cây gáo vàng và chuột *Mus musculus* var. Albino

Thiết bị nghiên cứu: Tủ sấy (BE 200, Memmert, Đức), cân phân tích (AB104-S, Mettler Toledo, Thụy Sĩ), máy ly tâm lạnh (Mikro 12-24, Hettich, Đức), bể ủ (Mettmert, Đức), máy cô quay chân không (Heidolph, Đức), máy đo quang phổ (Thermo Scientific Multiskan GO, Phần Lan).

Hóa chất nghiên cứu: GRIESS-ILOSVAY'S nitrite reagent (Merck), methanol (Merck), trolox (Sigma-Aldrich), trichloroacetic acid (Merck), 2,2- azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic

acid (Germany), 2, 4, 6-tripyridyl-s-triazine (Sigma-Aldrich), Ammonium heptamolybdate (Xilong), dimethyl sulfoxide (Merck), enzyme α -amylase (Sigma-Aldrich), enzyme α -glucosidase (Sigma-Aldrich), acarbose (Sigma-Aldrich), thibarbituric acid (Merck), alloxan monohydrate (Sigma-Aldrich), glucose-6-phosphate (Japan).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Xử lý và chiết xuất cao RGV

Rễ tươi cây gạo vàng (5000 g) được làm sạch, cắt lát mỏng, sấy khô ở 60°C và xay nhuyễn thành bột và rây để thu được hạt bột được liệu có kích thước 60 mesh. Dung môi methanol với thể tích là 11800 mL được sử dụng để ngâm 1180 g bột RGV ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ. Sau 3 lần ngâm, dịch ngâm được gom lại và cô đuổi dung môi dưới áp suất thấp bằng máy cô quay chân không (Heidolph, Đức) thu được 42,40 g cao RGV.

2.2.2. Đánh giá hoạt tính chống oxy hóa của cao rễ gạo vàng

Đánh giá hoạt tính kháng oxy hóa tổng (total antioxidant capacity, TAC)

Hoạt tính kháng oxy hóa tổng của cao RGV được xác định dựa theo mô tả của Phatak & Anup (2014) có hiệu chỉnh [9]. Cao RGV ở các nồng độ từ 10, 20, 40, 60, 80 và 100 $\mu\text{g/mL}$ với thể tích là 150 μL được cho phản ứng với 450 μL hỗn hợp gồm: 0,6 M sulfuric acid, 28 mM sodium phosphate và 4 mM ammonium molybdate. Quá trình phản ứng xảy ra ở 95°C trong 1,5 giờ. Sau khi làm mát ở nhiệt độ phòng, độ hấp thụ quang phổ của mẫu thử được xác định ở bước sóng 695 nm.

Đánh giá hoạt tính trung hòa gốc tự do 2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)

Hoạt tính kháng oxy hóa của cao chiết RGV tiếp tục được xác định bằng phương pháp khử màu ABTS^{•+} mô tả bởi Mukherjee và cộng sự (2011) có hiệu chỉnh [10]. Thuốc thử ABTS^{•+} được tạo ra bằng cách cho 7 mM ABTS phản ứng với 2,45 mM K₂S₂O₈ ở 27°C trong bóng tối 16 giờ theo tỷ lệ 1:1 (v/v) trước khi sử dụng. Hỗn hợp trên được pha loãng với nước cho đến khi độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 734 nm đạt 0,7 $\pm$ 0,005. Sau đó, 1980 μL ABTS^{•+} sẽ được cho phản ứng với 20 μL cao RGV ở các nồng độ 10, 20, 40, 60, 80 và 100 $\mu\text{g/mL}$ trong 6 phút ở nhiệt độ phòng. Độ hấp thụ quang phổ của ABTS^{•+} được xác định ở bước sóng 734 nm.

Ức chế sự hình thành nitric oxide

Khả năng ức chế sự hình thành gốc tự do nitric oxide (NO[•]) của cao RGV được thực hiện theo mô tả của Bhatt & Negi (2012) [11]. Cao RGV với thể tích là 400 μL ở nồng độ 50, 100, 200, 400, 600, 800 và 1000 $\mu\text{g/mL}$ được cho phản ứng với 800 μL Na₂[Fe(CN)₅NO].2H₂O (5 mM). Phản ứng tiếp tục thực hiện ở 25°C trong 60 phút, rồi ly tâm 11000 vòng/ phút trong 15 phút. Phần dịch nổi ở phía trên được trộn với 1200 μL dung dịch GRIESS-ILOSVAY'S nitrite reagent. Độ hấp thụ quang phổ của NO[•] được xác định ở bước sóng 546 nm sau khi đã ủ mẫu 5 phút ở 25°C.

Nghiên cứu đã sử dụng ascorbic acid làm chất đối chứng dương trong các thử nghiệm hoạt tính kháng oxy hóa tổng, trung hòa gốc tự do ABTS^{•+} và ức chế sự hình thành NO[•]. Cao RGV được so sánh hoạt tính kháng oxy hóa với ascorbic acid thông qua nồng độ trung hòa hoặc khử được 50% gốc tự do (Effective Concentration of 50%, EC₅₀) theo mô tả của Piaru và cộng sự (2012) [12].

2.2.3. Khảo sát hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase và α -amylase

Hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase

Cao RGV được xác định hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase theo mô tả của Sindhu và cộng sự (2013) có điều chỉnh [13]. Cao rễ gạo vàng (80 μL) ở nồng độ từ 10 đến 100 $\mu\text{g/mL}$ được trộn với đệm phosphate (200 μL ; pH=6,8; 100 mM) và enzyme α -glucosidase (40 μL ; 1 U/mL). Phản ứng được tiến hành ở 37°C trong 15 phút. Sau đó, *p*-nitro-phenyl- α -D-glucopyranoside (80 μL ; 5 mM) được cho vào và ủ thêm 20 phút ở 37°C. Sodium hydroxide (200 μL ; 0,1 M) được sử dụng để kết thúc phản ứng. Hợp chất *p*-nitrophenol được phóng thích ra sau phản ứng được xác định ở bước sóng 405 nm.

Hoạt tính ức chế enzyme α -amylase

Cao RGV được xác định hoạt tính ức chế enzyme α -amylase theo mô tả của Mohamed và cộng sự (2012) có điều chỉnh [14]. Cao RGV (100 μ L) ở các nồng độ khác nhau từ 10 đến 100 μ g/mL được trộn với đệm phosphate (100 μ L; pH=7) và tinh bột (100 μ L; 2 mg/mL) trong 5 phút ở 37°C. Enzyme α -amylase (3 U/mL, 100 μ L) được thêm vào hỗn hợp phản ứng và tiếp tục ủ ở 37°C trong 15 phút. Sau đó, hydrochloric acid (400 μ L; 1 M) được sử dụng để kết thúc phản ứng. Hàm lượng tinh bột còn lại sau phản ứng được xác định ở bước sóng 660 nm sau khi thêm vào thuốc thử iod (600 μ L).

Hợp chất acarbose được sử dụng làm đối chứng dương. Hiệu quả ức chế α -amylase, α -glucosidase của cao rễ gạo vàng và acarbose được đánh giá dựa vào giá trị inhibitory concentration of 50% (IC_{50} , nồng độ mà tại đó cao chiết hoặc acarbose ức chế được 50% hoạt tính của enzyme α -amylase, α -glucosidase) theo mô tả của Mohamed và cộng sự (2012) [14].

2.2.4. Khảo sát ảnh hưởng của cao rễ cây gạo vàng đến chuột ĐTD

Bệnh ĐTD ở chuột được gây ra bằng cách tiêm 0,2 mL alloxan monohydrate liều 135 mg/kg khối lượng chuột vào xoang bụng của chuột mỗi ngày 1 lần trong 3 ngày liên tiếp. Sau 7 ngày ủ bệnh, máy đo glucose huyết ACCU-CHEK® Active được sử dụng để xác định hàm lượng glucose huyết cho chuột. Chuột có hàm lượng glucose huyết từ 250-400 mg/dL được xem là đã mắc bệnh ĐTD và chọn làm thí nghiệm [15]. Cao RGV lần lượt được khảo sát ở các liều 100, 200, 400 mg/kg. Đối chứng dương được sử dụng trong nghiên cứu là Glucophage liều 108 mg/kg. Chuột được chia ngẫu nhiên thành 6 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức gồm 5 con chuột. Các nghiệm thức chuột thí nghiệm được bố trí như sau: chuột bình thường uống nước cất; chuột bệnh ĐTD không điều trị; chuột bệnh ĐTD điều trị bằng Glucophage 108 mg/kg; chuột bệnh điều trị bằng cao RGV liều 100, 200 hoặc 400 mg/kg. Thời gian thí nghiệm kéo dài 4 tuần, kết thúc thí nghiệm chuột được cân khối lượng, đo hàm lượng glucose huyết và gây mê giải phẫu lấy gan, thận và tụy tạng để xác định hàm lượng malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH), glucose-6-phosphatase (G-6-pase) lần lượt theo mô tả của Sedlak & Lindsay (1968) [16], Attanayake và cộng sự (2018) [17] và Punitha (2005) [18].

2.2.5. Thống kê, phân tích số liệu

Phần mềm Minitab 16 (ANOVA-Tukey's) được sử dụng để phân tích thống kê các số liệu thực nghiệm. Số liệu trong nghiên cứu được trình bày dưới dạng trung bình $\pm$ sai số. Phần mềm Microsoft Excel 2016 được sử dụng để vẽ các biểu đồ.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Hoạt tính kháng oxy hóa, ức chế enzyme α -glucosidase và α -amylase của cao RGV

Các phương pháp cơ bản như ABTS⁺, TAC và NO[•] được sử dụng để xác định khả năng kháng oxy hóa của cao RGV trình bày trong Bảng 1. Trong phương pháp TAC, cao RGV đã khử phức chất photphat/Mo (VI) về dạng phức chất photphat/Mo (V) nhờ các hợp chất có khả năng khử. Theo đó, cao RGV ($EC_{50}=79,20\pm1,83$ μ g/mL) có khả năng khử phức chất photphat/Mo (VI) thành phức chất photphat/Mo (V) kém hơn ascorbic acid ($EC_{50}=14,13\pm0,15$ μ g/mL) 5,61 lần. Cao RGV còn có khả năng trung hòa gốc tự do ABTS⁺ và ức chế sự hình thành NO[•] với giá trị EC_{50} lần lượt là $39,94\pm0,67$ và $366,92\pm14,89$ μ g/mL. Như vậy, cao RGV có khả năng trung hòa gốc tự do ABTS⁺ yếu hơn ascorbic acid 12,03 lần và khả năng ức chế sự hình thành gốc tự do NO[•] mạnh hơn ascorbic acid 2,02 lần. Theo quy ước của Blois (2000), mẫu thử có giá trị EC_{50} thấp hơn 50 μ g/mL là chất kháng oxy hóa rất mạnh; 50-100 μ g/mL là chất kháng oxy hóa mạnh và 101-150 μ g/mL là chất kháng oxy hóa trung bình; trong khi chất kháng oxy hóa yếu có giá trị $EC_{50}>150$ μ g/mL [19]. Kết quả nghiên cứu cho thấy, cao RGV có hoạt tính kháng oxy hóa rất mạnh đối với gốc tự do ABTS⁺. Trong khi đó, quá trình ức chế sự hình thành NO[•] của cao RGV

được đánh giá là yếu. Vỏ thân của cây gạo vàng được thu thập từ Sri Lanka cho thấy hiệu quả kháng oxy hóa ở các phương pháp DPPH, FRAP và NO[•] với giá trị EC₅₀ lần lượt là 135,79±0,13; 10,33±1,30 và 197,47±0,07 µg/mL [20]. Kết quả nghiên cứu này cho thấy, cao RGV trong nghiên cứu của chúng tôi có khả năng trung hòa gốc tự do NO[•] yếu hơn vỏ thân gạo vàng thu tại Sri Lanka 1,86 lần.

Bảng 1. Khả năng kháng oxy hóa, ức chế enzyme α -glucosidase và α -amylase của cao RGV

Kháng oxy hóa	Phương trình hồi quy tuyến tính		Giá trị EC ₅₀ (µg/mL)	
	RGV	Ascorbic acid	RGV	Ascorbic acid
ABTS ^{•+}	$y=0,774x + 19,136$ ($R^2=0,995$)	$y=14,62x + 1,495$ ($R^2=0,997$)	39,94 ^a ±0,67	3,32 ^b ±0,05
TAC	$y=0,0065x - 0,0122$ ($R^2=0,992$)	$y=0,038x - 0,0372$ ($R^2=0,996$)	79,20 ^a ±1,83	14,13 ^b ±0,15
NO [•]	$y=0,074x + 22,858$ ($R^2=0,979$)	$y=0,058x + 7,1384$ ($R^2=0,995$)	366,92 ^a ±14,89	740,25 ^b ±15,82
Ức chế enzyme	Phương trình hồi quy tuyến tính		Giá trị IC ₅₀ (µg/mL)	
	RGV	Acarbose	RGV	Acarbose
α -amylase	$y=13,486x + 12,996$ ($R^2=0,979$)	$y=0,333x + 10,543$ ($R^2=0,999$)	2,75 ^a ±0,10	0,12 ^b ±0,01
α -glucosidase	$y=0,594x + 0,8414$ ($R^2=0,979$)	$y=4,746x + 17,879$ ($R^2=0,996$)	82,88 ^a ±2,65	6,74 ^b ±0,12

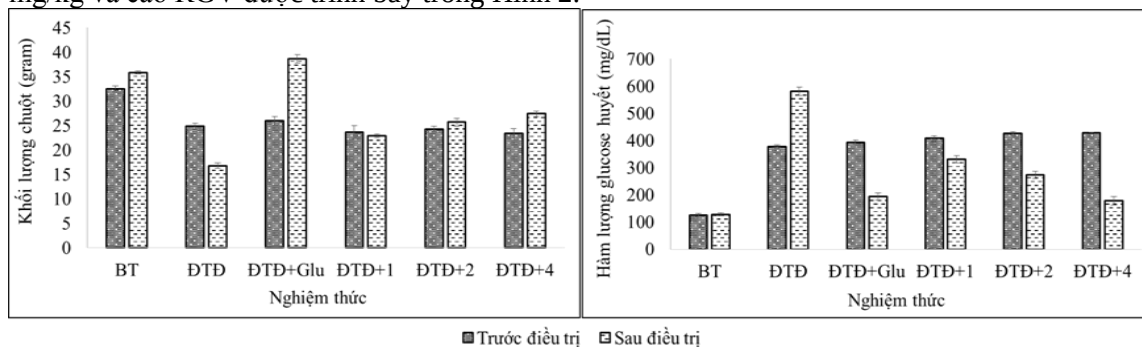
Ghi chú: Những chữ cái thường (a, b) theo sau các số liệu không giống nhau trong cùng một hàng sẽ khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p<0,05$).

Những hợp chất thiên nhiên có khả năng kéo dài thời gian hấp thu glucose huyết thông qua việc ức chế hoạt động của α -amylase và α -glucosidase có thể được sử dụng như một nhóm thuốc hỗ trợ điều trị bệnh ĐTD [21]. Do đó, nghiên cứu đã tiến hành khảo sát khả năng ức chế hoạt động của α -amylase và α -glucosidase. Hợp chất acarbose được sử dụng làm chất đối chứng dương để so sánh tác dụng của ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase của cao RGV. Dựa vào nồng độ mà tại đó cao chiết ức chế được 50% sự hoạt động của các enzyme (giá trị IC₅₀) có thể đánh giá được khả năng ức chế enzyme của cao RGV. Giá trị IC₅₀ càng nhỏ thì chứng minh khả năng ức chế enzyme của cao chiết càng cao và ngược lại. Cụ thể, cao RGV có khả năng ức chế enzyme α -amylase (IC₅₀=2,75±0,10 µg/mL) và α -glucosidase (IC₅₀=82,88±2,65 µg/mL) yếu hơn acarbose (IC₅₀, α -amylase=0,12±0,01 µg/mL; IC₅₀, α -glucosidase=6,74±0,12 µg/mL) lần lượt là 22,92 và 12,30 lần. Như vậy, cao RGV được xác định vừa có khả năng kháng oxy hóa vừa có khả năng ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase.

3.2. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của cao RGV đến chuột bệnh ĐTD

3.2.1. Ảnh hưởng của cao RGV đến khối lượng và hàm lượng glucose huyết của chuột bệnh ĐTD

Chuột được chọn trong nghiên cứu có khối lượng trung bình khoảng 32,00±0,76 g và hàm lượng glucose huyết là 125,64±9,79 mg/dL. Sau khi tiêm alloxan monohydrate, chuột giảm khối lượng nhanh còn 24,45±1,28 g và tăng glucose huyết lên 406,58±20,64 mg/dL. Nhiều nghiên cứu bệnh ĐTD trên chuột cho thấy sụt cân và tăng glucose huyết là dấu hiệu điển hình của bệnh ĐTD [22], [23], chứng tỏ chuột được tiêm alloxan monohydrate đã mắc bệnh ĐTD. Khối lượng và hàm lượng glucose huyết của chuột ĐTD trước điều trị và sau điều trị bằng Glucophage liều 108 mg/kg và cao RGV được trình bày trong Hình 2.



Hình 2. Khối lượng và hàm lượng glucose huyết

BT: Bình thường; Glu: Glucophage liều 108 mg/kg; 1, 2 và 4 lần lượt là cao RGV liều 100, 200 và 400 mg/kg

Những con chuột mắc bệnh ĐTĐ không được điều trị có cơ thể hốc hác so với nhóm chuột được điều trị bằng Glucophage 108 mg/kg và cao RGV liều 100, 200 và 400 mg/kg. Cụ thể, nhóm chuột được điều trị bằng Glucophage liều 108 mg/kg có sự gia tăng khối lượng là $32,68 \pm 3,82\%$, khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$) so với nhóm chuột bình thường ($9,36 \pm 1,58\%$). Glucophage liều 108 mg/kg đã làm giảm đáng kể hàm lượng glucose huyết của chuột bệnh ĐTĐ từ $393,48 \pm 7,80$ còn $193,68 \pm 13,51$ mg/dL, đưa hàm lượng glucose huyết về mức bình thường.

Cao RGV cho thấy hiệu quả điều trị bệnh ĐTĐ phụ thuộc vào nồng độ của cao RGV. Chuột ĐTĐ được điều trị bằng cao RGV ở liều 100 mg/kg có khối lượng giảm $3,24 \pm 0,79\%$; nhưng ở liều 200 ($5,57 \pm 1,56\%$) và 400 mg/kg ($14,43 \pm 3,53\%$) đã tăng tương đương với nhóm chuột bình thường, khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ($p > 0,05$). Chuột bệnh ĐTĐ sau khi điều trị bằng cao RGV, hàm lượng glucose huyết giảm đáng kể so với nhóm chuột bệnh ĐTĐ, cho thấy sự gia tăng bệnh lý có thể được ức chế bằng cách sử dụng cao RGV ở các liều khác nhau ($p < 0,05$). Cụ thể, hàm lượng glucose huyết trong các nhóm chuột sau khi sử dụng cao RGV liều 100, 200 và 400 mg/kg đã giảm lần lượt là $23,39 \pm 4,18$; $55,93 \pm 9,27\%$ và $140,33 \pm 19,27\%$. Cao RGV liều 400 mg/kg đã đưa hàm lượng glucose huyết về mức bình thường là $178,92 \pm 15,04$ mg/dL.

Bảng 2. Tỷ lệ tăng giảm khối lượng và glucose huyết của cao RGV

Nghiệm thức	Tỷ lệ tăng (+), giảm (-) khối lượng	Tỷ lệ tăng (+), giảm (-) glucose huyết
Bình thường	$9,36^{bc} \pm 1,58\%$	$1,68^b \pm 1,79\%$
Đái tháo đường	$-48,39^e \pm 5,69\%$	$34,96^a \pm 2,48\%$
Đái tháo đường, Glucophage liều 108 mg/kg	$32,68^a \pm 3,82\%$	$-104,09^e \pm 16,92\%$
Đái tháo đường, cao rễ gạo vàng liều 100 mg/kg	$-3,25^d \pm 0,79\%$	$-23,39^c \pm 4,18\%$
Đái tháo đường, cao rễ gạo vàng liều 200 mg/kg	$5,57^c \pm 1,56\%$	$-55,93^d \pm 9,27\%$
Đái tháo đường, cao rễ gạo vàng liều 400 mg/kg	$14,43^b \pm 3,53\%$	$-140,33^f \pm 19,27\%$

Ghi chú: Những chữ cái thường (a, b) theo sau các số liệu không giống nhau trong cùng một cột sẽ khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

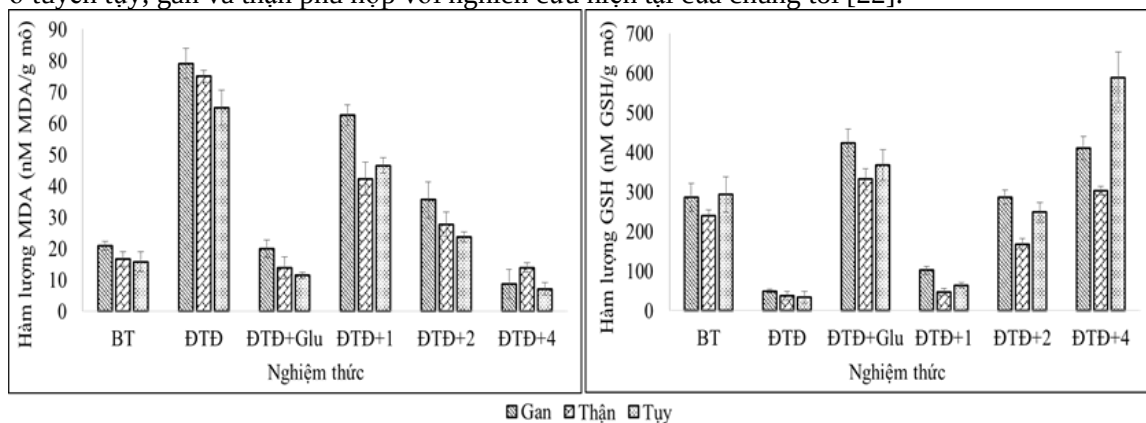
3.2.2. Ảnh hưởng của cao RGV đến hàm lượng malondialdehyde và glutathion

Tuyến tụy là một trong những cơ quan quan trọng nhất giữ vai trò chuyển hóa polysaccharide, duy trì cân bằng glucose trong máu thông qua tổng hợp insuline. Alloxan monohydrate biểu hiện độc tính trên các tế bào β của tuyến tụy, dẫn đến tổn thương tụy làm rối loạn bài tiết insuline [24]. Gan và thận có chức năng giải độc và tham gia vào quá trình chuyển hóa glucose trong cơ thể [25]. Ở bệnh nhân ĐTĐ, hoạt động chức năng của gan và thận thường bị tổn thương [26], [27]. Stress oxy hóa gây ra bởi các gốc tự do hình thành ở bệnh nhân ĐTĐ được xác định là một trong những tác nhân ảnh hưởng đến các chức năng của tuyến tụy, gan và thận [28]. Do đó, nghiên cứu đã tiến hành xác định tình trạng stress oxy hóa ở gan, thận và tụy của chuột ĐTĐ. Hàm lượng MDA và GSH ở gan, thận và tụy chuột được ghi nhận và trình bày trong Hình 3.

Ở chuột ĐTĐ không được điều trị, hàm lượng GSH đã giảm đáng kể, trong khi hàm lượng MDA tăng rõ rệt, khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ($p < 0,05$) so với nhóm chuột bình thường, chứng tỏ rằng gan, thận và tụy đều bị stress oxy hóa. Như được hiển thị trong Hình 3, những thay đổi sinh lý và sinh hóa bất thường ở ba cơ quan của chuột mắc bệnh ĐTĐ đã được phục hồi bằng cách sử dụng Glucophage liều 108 mg/kg và cao RGV. Chuột bệnh ĐTĐ được điều trị bằng cao RGV liều 400 mg/kg có hàm lượng GSH ở gan, thận, tụy lần lượt là $410,08 \pm 29,67$, $303,20 \pm 11,64$ và $588,97 \pm 63,50$ nM GSH/g mô. Hàm lượng GSH ở chuột bệnh ĐTĐ được điều trị bằng cao RGV ở liều 400 mg/kg cao hơn nhóm chuột bình thường ($293,50 \pm 44,76$ nM GSH/g mô) và Glucophage liều 108 mg/kg ($368,06 \pm 38,92$ nM GSH/g mô) lần lượt là 2,01 và 1,60 lần.

Chuột bệnh ĐTĐ có hàm lượng MDA ở gan, thận, tụy đạt tương ứng $79,13 \pm 4,76$, $75,13 \pm 1,83$ và $65,03 \pm 5,65$ nM MDA/g mô cao gấp 3,78, 4,49 và 4,10 lần chuột bình thường. Hàm lượng MDA ở gan, thận và tụy chuột giảm dần theo nồng độ cao RGV. Trong đó, cao RGV ở các nồng

độ khảo sát đều có khả năng ức chế quá trình peroxide hóa lipid mạnh hơn Glucophage liều 108 mg/kg. Đồng thời, kết quả cũng cho thấy cao RGV có khả năng ức chế quá trình peroxide hóa lipid mạnh nhất ở tuyến tụy. Chuột được điều trị bằng Glucophage liều 108 mg/kg cũng biểu hiện sự gia tăng đáng kể hàm lượng GSH và giảm MDA ở ba cơ quan so với chuột mắc bệnh ĐTD ($p < 0,05$). Kết quả này đã chứng minh rằng, cao RGV thể hiện tác dụng kháng oxy hóa tiềm năng mạnh mẽ chống lại stress oxy hóa ở gan, thận và đặc biệt là ở tụy. Nghiên cứu của Zhang và cộng sự (2017) cũng cho thấy, ở chuột mắc bệnh ĐTD hàm lượng GSH giảm và hàm lượng MDA tăng ở tuyến tụy, gan và thận phù hợp với nghiên cứu hiện tại của chúng tôi [22].

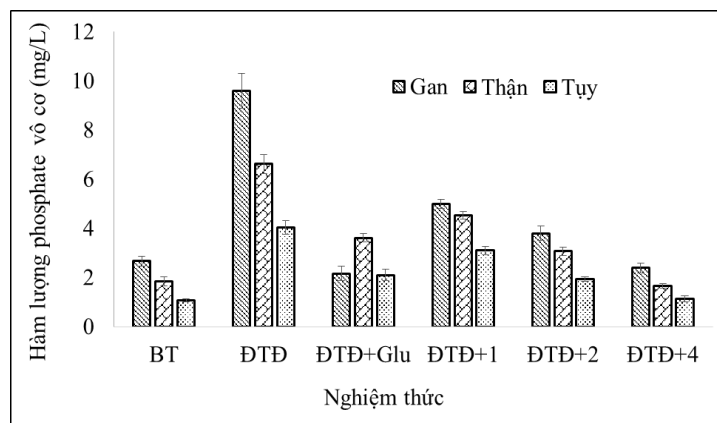


Hình 3. Hàm lượng MDA và GSH

BT: Bình thường; Glu: Glucophage liều 108 mg/kg; 1, 2 và 4 lần lượt là cao RGV liều 100, 200 và 400 mg/kg. Hàm lượng MDA và GSH lần lượt được xác định dựa vào phương trình đường chuẩn $y = 41,685x + 0,1817$ và $y = 3,4657x + 0,1025$.

3.2.3. Ảnh hưởng của cao RGV đến hàm lượng glucose-6-phosphatase

Trong cơ thể sinh vật, sự mất cân đối giữa việc sản xuất và tiêu thụ glucose ở các mô có thể dẫn đến phát sinh bệnh ĐTD. Do đó, duy trì được sự cân bằng giữa sản xuất và tiêu thụ glucose góp phần làm giảm nguy cơ ĐTD [29]. Trong đó, enzyme G-6-Pase là một trong những enzyme quan trọng trong quá trình chuyển hóa carbohydrate [30]. Enzyme G-6-Pase có vai trò xúc tác thủy phân glucose-6-phosphate (G-6-P) thành glucose và gốc phosphate vô cơ [31]. Trong nghiên cứu này, hoạt động của enzyme G-6-Pase trên chuột ĐTD được khảo sát dựa vào khả năng tạo ra gốc phosphate vô cơ sau phản ứng thủy phân G-6-P của enzyme G-6-Pase được trình bày trong Hình 4.



Hình 4. Hàm lượng phosphate vô cơ trong gan, thận, tụy chuột

BT: Bình thường; Glu: Glucophage liều 108 mg/kg; 1, 2 và 4 lần lượt là cao RGV liều 100, 200 và 400 mg/kg. Hàm lượng phosphate vô cơ được xác định dựa vào phương trình đường chuẩn $y = 0,3139x - 0,0232$

Như vậy, chuột ĐTĐ có hàm lượng phosphate vô cơ tăng cao trong gan ($9,60 \pm 0,71$ mg/L), thận ($6,62 \pm 0,38$ mg/L) và tuyến tụy ($4,04 \pm 0,28$ mg/L), khác biệt có ý nghĩa so với nhóm chuột bình thường. Chuột ĐTĐ uống cao RGV làm giảm hàm lượng phosphate vô cơ lần lượt theo nồng độ cao chiết được khảo sát. Cao RGV ở liều 400 mg/kg có khả năng giảm lượng phosphate vô cơ tốt nhất, trong gan ($2,38 \pm 0,20$ mg/L), thận ($1,66 \pm 0,10$ mg/L) và tuyến tụy ($1,12 \pm 0,13$ mg/L), đưa hàm lượng phosphate vô cơ về tương đương với nhóm chuột bình thường ($p > 0,05$) và hiệu quả hơn cả Glucophage liều 108 mg/kg ($p < 0,05$).

4. Kết luận

Cao rễ gáo vàng trong thử nghiệm *in vitro* cho thấy có hiệu quả trong việc trung hòa hoặc khử các gốc tự do, cũng như ức chế mạnh hoạt động của các enzyme chuyển hóa carbohydrate. Trong mô hình thử nghiệm đái tháo đường trên động vật cho thấy, cao rễ gáo vàng có hiệu quả trong việc hạ glucose huyết, làm giảm hàm lượng malondialdehyde, tăng hàm lượng glutathione và điều hòa tốt hoạt động của enzyme glucose-6-phosphatase.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] G. Kaur, R. Padiya, R. Adela, U. K. Putcha, G. S. Reddy, B. R. Reddy, and S. K. Banerjee, "Garlic and resveratrol attenuate diabetic complications, loss of β -cells, pancreatic and hepatic oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats," *Frontiers in Pharmacology*, vol. 7, pp. 360-375, 2016.
- [2] T. Kuzuya, S. Nakagawa, J. Satoh *et al.*, "Report of the committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus," *Diabetes Research and Clinical Practice*, vol. 55, no. 1, pp. 65-85, 2002.
- [3] L. E. Fridlyand and L. H. Philipson, "Oxidative reactive species in cell injury: Mechanisms in diabetes mellitus and therapeutic approaches," *Japan Automobile Manufacturers Association*, vol. 1066, pp. 136-151, 2005.
- [4] L. D. May, J. H. Lefkowitz, M. T. Kram, and D. E. Rubin, "Mixed hepatocellular cholestatic liver injury after pioglitazone therapy," *Annals of Internal Medicine*, vol. 136, pp. 449-452, 2002.
- [5] H. B. Do, Q. C. Dang, X. C. Bui, T. D. Nguyen, T. D. Do, V. H. Pham, N. L. Vu, D. M. Pham, K. M. Pham, T. N. Doan, T. Nguyen, and T. Tran, *Medicinal plants and medicinal animals in Vietnam*, vol. I, Science and Technology Publishing House, 2004.
- [6] Z. D. He, C. Y. Ma, H. J. Zhang *et al.*, "Antimalarial constituents from *Nauclea orientalis* (L.)," *Chemistry and Biodiversity*, vol. 2, no. 10, pp. 1378-1386, 2005.
- [7] J. Sichaem, W. Worawalai, and S. Tip-pyang, "Chemical constituents from the roots of *Nauclea orientalis*," *Chemistry of Natural Compounds*, vol. 48, no. 5, pp. 827-830, 2012.
- [8] H. H. Pham, *Plants of Vietnam*. Young Publishing House, Ho Chi Minh City, 2003.
- [9] R. S. Phatak and S. H. Anup, "Total antioxidant capacity (TAC) of fresh leaves of *Kalanchoe pinnata*," *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, vol. 2, pp. 32-35, 2014.
- [10] S. Mukherjee, N. Pawar, O. Kulkarni *et al.*, "Evaluation of free-radical quenching properties of standard Ayurvedic formulation *Vayasthapana Rasayana*," *BMC Complement Altern Med*, vol. 11, pp. 38-44, 2011.
- [11] P. Bhatt and P. Negi, "Antioxidant and antibacterial activities in the leaf extracts of Indian Borage (*Plectranthus amboinicus*)," *Food and Nutrition Sciences*, vol. 3, no. 2, pp. 146-152, 2012.
- [12] S. P. Piaru, R. Mahmud, A. M. S. A. Majid, and Z. D. M. Nassar, "Antioxidant and antiangiogenic activities of the essential oils of *Myristica fragrans* and *Morinda citrifolia*," *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, vol. 5, no. 4, pp. 294-298, 2012.
- [13] S. N. Sindhu, K. Vaibhavi, and M. Anshu, "In vitro studies on alpha amylase and alpha glucosidase inhibitory activities of selected plant extracts," *European Journal of Experimental Biology*, vol. 3, no. 1, pp. 128-132, 2013.
- [14] E. A. H. Mohamed, M. J. A. Siddiqui, L. F. Ang, A. Sadikun, S. H. Chan, S. C. Tan, and M. F. Yam, "Potent α -glucosidase and α -amylase inhibitory activities of standardized 50% ethanolic extracts and sinensetin from *Orthosiphon stamineus* Benth as anti-diabetic mechanism," *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 12, no. 1, pp. 176-189, 2012.

- [15] H. Zhao, Z. Li, and G. Tian, "Effect of traditional Chinese medicine on rats with type II diabetes induced by high-fat diet and streptozocin: a urine metabonomic study," *African Health Sciences*, vol. 13, pp. 673-681, 2013.
- [16] J. Sedlak and R. H. Lindsay, "Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent," *Analytical Biochemistry*, vol. 25, pp. 192-205, 1968.
- [17] A. P. Attanayake, K. A. P. W. Jayatilaka, L. K. B. Mudduwa, and C. Pathirana, "Biochemical and histological evaluation of three selected medicinal plant extracts of Sri Lankan Origin on dyslipidemia and oxidative stress in alloxan induced diabetic rats," *Journal of Botany*, vol. 8, pp. 1-8, 2018.
- [18] S. Punitha, K. Rajendran, and A. Shirwaikar, "Alcoholic stem extract of *Coscinium fenestratum* regulates carbohydrate metabolism and improves antioxidant status in Streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats," *Published by Oxford University Press*, vol. 2, no. 3, pp. 375-381, 2005.
- [19] M. S. Blois, "Antioxidant determination by the use of stable free radicals," *Nature*, vol. 181, no. 4617, pp. 1199-2000, 2000.
- [20] J. A. N. Sandamali, R. P. Hewawasam, K. A. P. W. Jayatilaka, and L. K. B. Mudduwa, "*Nauclea orientalis* (L.) bark extract protects rat cardiomyocytes from doxorubicin-induced oxidative stress, inflammation, apoptosis, and DNA fragmentation," *Oxid Med Cell Longev*, vol. 14, pp. 1-19, 2022.
- [21] Y. Zhenhua, Z. Wei, F. Fajin, Z. Yong, and K. Wenyi, " α -Glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants," *Food Science and Human Wellness*, vol. 3, pp. 136-174, 2014.
- [22] C. Zhang, J. Li, C. Hu *et al.*, "Antihyperglycaemic and organic protective effects on pancreas, liver and kidney by polysaccharides from *Hericium erinaceus* SG-02 in streptozotocin-induced diabetic mice," *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, pp. 1-13, 2017.
- [23] M. Liu, X. Song, J. Zhang *et al.*, "Protective effects on liver, kidney and pancreas of enzymatic and acidic-hydrolysis of polysaccharides by spent mushroom compost (*Hypsizygus marmoreus*)," *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, pp. 1-12, 2017.
- [24] K. Takemoto, W. Doi, A. Zukeran, J. Inoue, K. Ishihara, and N. Masuoka, "Effect of *Aspergillus awamori*-fermented burdock root on mouse diabetes induced by alloxan-Prevention of β -cell apoptosis," *Food and Nutrition Sciences*, vol. 5, pp. 1554-1560, 2014.
- [25] O. Coskun, M. Kanter, A. Korkmaz, and S. Oter, "Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and β -cell damage in rat pancreas," *Pharmacological Research*, vol. 51, pp. 17-23, 2005.
- [26] B. A. Devi, N. Kamalakkannan, and P. S. Prince, "Supplementation of fenugreek leaves to diabetic rats. effect on carbohydrate metabolic enzymes in diabetic liver and kidney," *Phytotherapy Research*, vol. 17, pp. 1231-1233, 2003.
- [27] R. J. Dinis-Oliveira, J. A. Duarte, F. Remiao, A. Sánchez-Navarro, M. L. Bastos, and F. Carvalho, "Single high dose dexamethasone treatment decreases the pathological score and increases the survival rate of paraquat-intoxicated rats," *Toxicology*, vol. 227, no. 1-2, pp. 73-85, 2006.
- [28] J. Gao, Y. L. Han, Z. Y. Jin, X. M. Xu, X. Q. Zha, H. Q. Chen, and Y. Y. Yin, "Protective effect of polysaccharides from *Opuntia dillenii* Haw. fruits on streptozotocin-induced diabetic rats," *Carbohydr Polymol*, vol. 124, pp. 25-34, 2015.
- [29] M. Momose, C. Abltshauser, J. Neverve *et al.*, "Dysregulation of coronary microvascular reactivity in asymptomatic patients with type 2 diabetes mellitus," *European Journal of Nuclear Medicine*, vol. 29, pp. 1675-1679, 2002.
- [30] Y. S. Lee, S. Shin, T. Shigihara *et al.*, "Glucagon-like peptide-1 gene therapy in obese diabetic mice result in long-term cure of diabetes by improving insulin sensitivity and reducing hepatic gluconeogenesis," *Diabetes*, vol. 16, pp. 1671-1679, 2007.
- [31] R. Froissart, M. Piraud, A. M. Boudjemline *et al.*, "Glucose-6-phosphatase deficiency," *Orphanet Journal of Rare Diseases*, vol. 6, pp. 27-34, 2011.