

MDA gây hại cho dạ dày. Trên những đánh giá cấu trúc đại thể và mô học của dạ dày các cao chiết cũng cho thấy tác dụng làm giảm và ngăn ngừa sự hình thành những điểm loét và quá trình

viêm trên mô hình gây tổn thương dạ dày cấp tính bằng ethanol, điển hình nhất là ở cao bóp bóp liều 0,72 g/kg.

Tài liệu tham khảo

1. Anyasor G. N., Aina D. A., Olushola M., Aniyikawe A. F. (2011). Phytochemical constituents, proximate analysis, antioxidants, anti-bacterial and wound healing properties of leaf extracts of *Chromolaena odorata*. *Annals of Biological Research*, 2, 441-51.
2. Odinakachukwu O. J., Okechukwu O. B. (2019), Antibacterial activity of leaf extract of *Chromolaena odorata* and the effect of its combination with some conventional antibiotics on *Pseudomonas aeruginosa* isolated from wounds. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 3, 36-40.
3. Tania S., Biswadeep B., Shakti P., Niruta K., Kishori G. (2018). Oral intake of polyphenols of *Chromolaena odorata*: A perspective in peptic ulcer, thrombocytopenia, and heparin-induced bleeding diathesis in rodent model. *Pharmacognosy Research*, 10, 426-431.
4. Paguigan N. D., Castillo D. H., Chichioco C. L. (2014), Anti-ulcer activity of leguminosae plant, *Arq Gastroenterol*, 51(1), 64-67.
5. Santos Cerqueira G., dos Santos e Silva G. (2012), Effects of hecogenin and its possible mechanism of action on experimental models of gastric ulcer in mice, *European Journal of Pharmacol*, 683(1-3), 260-269.
6. Adinortey M. B., Nyarko A. (2013), *In vivo* models used for evaluation of potential antigastrointestinal ulcer agents, *Hindawi Publishing Corporation*, 1-12.
7. Alisi C. S., Onyeze G. O. C., Ojiako O. A., Osuagwu C. G. (2011), Evaluation of the protective potential of *Chromolaena odorata* Linn. extract on carbon tetrachloride-induced oxidative liver damage, *International Journal of Biochemistry Research & Review*, 1(3), 69-81.
8. Wallace John L. (2008), Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: Why doesn't the stomach digest itself?, *American Physiological Society*, 88(4), 1547-1565.
9. Byeon Lim L, Lee J. (2018), Protective effects of *Dioscorea batatas* flesh and peel extracts against ethanol-induced gastric ulcer in mice, *Nutrients*, 10, 1680.
10. Dekanski J. B., Macdonald A., Sacra P. (1975), Effects of fasting, stress and drugs on gastric glycoprotein synthesis in the rat, *British Journal of Pharmacology*, 55(3), 387-392.

Tạp chí Dược liệu, tập 27, số 5/2022 (Trang 284 - 291)

NGHIÊN CỨU SÀNG LỌC TÁC DỤNG CỦA MỘT SỐ CAO CHIẾT DƯỢC LIỆU TRÊN MÔ HÌNH RUỒI GIẤM CHUYỂN GEN *SNCA* MANG KIỂU HÌNH BỆNH PARKINSON

Đinh Thị Minh¹, Phạm Thị Nguyệt Hằng^{1,4*}, Nguyễn Văn Hiệp¹, Đặng Văn Cường², Đỗ Thị Hồng Khánh⁴, Đinh Thị Huyền Trang³, Nguyễn Thị Lý¹

¹Viện Dược liệu, ²Đại học Dược Hà Nội; ³Đại học Vinh; ⁴Đại học Y Dược - Đại học Quốc gia Hà Nội

*Email: nguyethangpt@nimm.org.vn

(Nhận bài ngày 13 tháng 9 năm 2022)

Tóm tắt

Bệnh Parkinson (Parkinson's disease - PD) là một trong những bệnh thoái hóa thần kinh phổ biến và phức tạp ở người với triệu chứng lâm sàng điển hình là rối loạn và suy giảm khả năng vận động (MS). Các biểu hiện của MS trong PD là do sự mất các tế bào dẫn truyền thần kinh dopamin trong liềm đen (substantia nigra - SN). Có nhiều mô hình ruồi giấm chuyển gen *SNCA* đã được chứng minh có đặc điểm tương đồng với PD ở người. Trên mô hình ruồi giấm, khả năng vận động được đánh giá bằng thử nghiệm hành vi bò của ấu trùng theo tiêu chí hình dạng đường đi và tốc độ di chuyển của ấu trùng. Trong nghiên cứu này, nhóm nghiên cứu ứng dụng thử nghiệm hành vi bò của ấu trùng ruồi giấm trên chủng ruồi giấm chuyển gen *SNCA* là mô hình để sàng lọc tác dụng điều trị Parkinson của dược liệu Việt Nam. Kết quả nghiên cứu cho thấy, trong số 20 cao chiết ethanol 90% từ dược liệu phát hiện được 3 cao chiết bao gồm: Hạ khô thảo (*Prunella vulgaris* L.), Ba kích (*Morinda officinalis* How), Thạch tùng đuôi ngựa (*Huperzia phlegmaria* L.) có tác dụng cải thiện khả năng vận động của ấu trùng bậc 3 ruồi giấm chuyển gen *SNCA* gây PD. Đồng thời, trên thử nghiệm đánh giá khả năng ghi nhớ ngắn hạn của ấu trùng ruồi giấm cũng cho thấy ở nồng độ 4 mg/ml, cả 3 cao chiết này đều có tác dụng cải thiện khả năng ghi nhớ của ấu trùng bậc 3 ruồi giấm PD.

Từ khóa: Alpha-synuclein *Drosophila melanogaster*, Hành vi vận động, Thử nghiệm trí nhớ mùi, Cao chiết dược liệu

Summary

Screening the Effect of some Plant Extracts on Alpha-Synuclein *Drosophila melanogaster* Model of Parkinson's Disease

Parkinson's disease (PD) is a common and complex degenerative brain condition among humans, with typical clinical symptoms including disorder and deterioration of motor symbol (MS). Symptoms of MS in PD are due to the loss of nerve cells involved in the transmission of dopamine in the substantia nigra (SN). *Drosophila* with genetically modified *SNCA* have been proven to have similar characteristics to PD in humans. The behaviors of motor functions in *Drosophila* model were evaluated by trailing path and the speed of the larvae. The research has assessed the crawling behavior of larvae by *SNCA*

transgenic *Drosophila* as a model for evaluating the effectiveness of Vietnamese botanicals in treating Parkinson's disease. Among 20 herbal extracts, 3 have been discovered to improve motor functions in third-instar larvae modified with the SNCA gene: *Prunella vulgaris* L., *Morinda officinalis* How, and *Huperzia phlegmaria* L. Concomitantly these extracts at 4 mg/ml are effective in enhancing short term memory among stage 3 SNCA larvae.

Keywords: Alpha-synuclein *Drosophila melanogaster*, Locomotor activity, Odor-taste learning assay, Plant extracts.

1. Đặt vấn đề

Bệnh Parkinson (Parkinson's disease - PD) có biểu hiện rối loạn vận động phổ biến nhất và là bệnh thoái hóa thần kinh phổ biến thứ hai (sau Alzheimer) với tỉ lệ mắc khoảng 100-200 bệnh nhân/100 000 người, chiếm 2% dân số độ tuổi từ 60 tuổi trở lên và trên 3% dân số độ tuổi trên 80 [1]. PD đặc trưng bởi các triệu chứng như: đi đứng khó khăn, cử động chậm, tay chân cứng, rung, cơ mặt bị liệt và các chức năng khác như rối loạn nhận thức/hành vi/giấc ngủ [2]. Hiện nay, chưa có thuốc điều trị khỏi PD, các thuốc chỉ có tác dụng giảm các triệu chứng và làm chậm tiến triển của bệnh. Do đó, việc nghiên cứu tìm ra thuốc/ sản phẩm chức năng điều trị PD là cần thiết và là thách thức lớn của các nhà khoa học trong nước cũng như trên thế giới. Trong khi đó, Việt Nam có nguồn tài nguyên dược liệu vô cùng phong phú. Đã có những bài thuốc dân gian làm giảm các triệu chứng của bệnh PD, nên việc sử dụng dược liệu trong điều trị là rất có tiềm năng.

Ruồi giấm (*Drosophila melanogaster*) là sinh vật có khả năng ứng dụng rộng rãi trong việc tìm hiểu cơ chế gây bệnh ở mức độ phân tử hay các vấn đề sinh học cơ bản từ sinh lý cho đến thần kinh, chuyển hóa, có hơn 70% gen tương đồng với bộ gen của người [3]. Ruồi giấm có nguồn gen thuận lợi cho việc nghiên cứu các bệnh liên quan đến di truyền và là mô hình có giá trị kinh tế cho những nghiên cứu sàng lọc thuốc điều trị bệnh. Parkinson là hội chứng thoái hóa thần kinh đặc trưng bởi sự mất các tế bào thần kinh dopaminergic trong chất nền, hình thành các thể vùi nội thần kinh dạng sợi (thể Lewy) và rối loạn vận động ngoại tháp. Mặc dù ruồi giấm có một hệ thống thần kinh trung ương chứa ít các đơn vị tế bào thần kinh hơn so với con người, nhưng chúng có các loại chất dẫn truyền thần kinh như GABA, glutamat, dopamin, serotonin và acetylcholin. Một số gen có liên quan và đã được sử dụng để

gây mô hình ruồi giấm Parkinson trên thế giới như: SNCA, PINK1, Parkin, DJ-1 và LRRK2. Protein α -synuclein được mã hóa bởi gen SNCA, một trong ba gen thuộc họ synuclein (α , β , γ) ở người. Một số đột biến điểm trên gen SNCA như A30P, A53T... đã được chứng minh là có liên quan đến sinh bệnh học Parkinson và có các đặc điểm kiểu hình tương đồng với PD ở người như suy giảm khả năng vận động và mất tế bào thần kinh sinh dopamin theo tuổi [4]. Do đó, trong nghiên cứu này, nhóm nghiên cứu sử dụng dòng ruồi giấm chuyển gen SNCA để nghiên cứu sàng lọc tác dụng của một số cao chiết dược liệu Việt Nam.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Các dạng cao chiết dược liệu sử dụng trong nghiên cứu này là sản phẩm của của tiểu dự án First: "Hợp tác nghiên cứu sàng lọc dược liệu có tác dụng ngăn ngừa/ hỗ trợ điều trị bệnh suy giảm trí nhớ và cơ chế tác dụng", do Ngân hàng thế giới tài trợ (2017 - 2019). Quy trình chiết được mô tả tóm tắt như sau: dược liệu được sấy khô, xay thô, ngâm với ethanol 90%, ở nhiệt độ thường 2 lần, mỗi lần 5 ngày. Các dịch chiết được gộp lại và thu hồi dung môi dưới áp suất giảm đến cạn. Cặn được phục vụ cho các nghiên cứu trong thí nghiệm tiếp theo. Hiệu suất của các cao chiết dược chỉ ra trong Bảng 1.

Chủng ruồi giấm phục vụ nghiên cứu: Được cung cấp bởi GS. Masamitsu Yamaguchi, Viện Công nghệ Kyoto, Nhật Bản với 3 dòng:

- Dòng driver: ruồi giấm định hướng biểu hiện protein GAL4 tại mô não. Kí hiệu: Elav-GAL4 (mã số #8760).

- Dòng bệnh: ruồi giấm chuyển gen SNCA mã hóa cho protein alpha-synuclein mang đột biến A30P của người. Kí hiệu: UAS-SNCA/A30P (mã số #33804).

- Dòng chứng sinh lý: ruồi giấm mang gen biểu hiện protein GFP. Kí hiệu: UASmCD8-GFP (mã số #108068).

Bảng 1. Danh sách các cao chiết dược liệu được sử dụng trong nghiên cứu sàng lọc tác dụng điều trị Parkinson trên mô hình ruồi giấm chuyển gen được đánh giá bằng thử nghiệm hành vi bò của ấu trùng (Crawling assay)

STT	Tên Việt Nam	Tên khoa học	Bộ phận dùng	Hiệu suất
1	Bạch chỉ nam	<i>Millettia pulchra</i> (Colebr. ex Benth.) Kurz	Rễ củ	5,29
2	Thạch tùng đuôi ngựa	<i>Huperzia phlegmaria</i> L.	Cả cây	19,27
3	Cải cần	<i>Corydalis balansae</i> Prain	Cả cây	24,50
4	Lạc tiên	<i>Passiflora foetida</i> L.	Cành lá	13,89
5	Hạ khô thảo	<i>Prunella vulgaris</i> L.	Cả cây	4,55
6	Điều nhuộm	<i>Bixa orellana</i> L.	Cành lá	9,77
7	Bọ mây	<i>Clerodendron cyrtophyllum</i> Turcz	Cả cây	12,22
8	Đơn mặt trời	<i>Excoecaria cochinchinensis</i> Lour.	Cành lá	10,58
9	Ba kích	<i>Morinda officinalis</i> How	Rễ củ	22,98
10	Bạch tật lê	<i>Tribulus terrestris</i> L.	Quả	2,80
11	Tầm gửi cây dâu	<i>Scurrula parasitica</i> L.	Cành lá	11,12
12	Hành ta trồng tại Lý Sơn	<i>Allium ascalonicum</i> L.	Thân	13,92
13	Bạch đàn chanh	<i>Eucalyptus maculata</i> Hool	Lá	13,68
14	Hoàng tinh cách	<i>Disporopsis longifolia</i> Craib	Củ	13,05
15	Hoàng kỳ	<i>Astragalus membranaceus</i> (Fisch.) Bunge	Rễ	33,72
16	Rau đắng	<i>Glinus oppositifolius</i> L.	Cả cây	10,03
17	Chè đắng	<i>Ilex kaushue</i> S.Y. Hu	Lá	15,00
18	Tai mèo	<i>Abroma augusta</i> (L.) L. f.	Cành lá	1,56
19	Bạch điệp	<i>Hechychium coronarium</i> Koenig	Thân rễ	4,88
20	Viễn chí	<i>Polygala arvensis</i> Willd.	Rễ	19,49

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Nhân dòng ruồi giấm chuyển gen SNCA mang bệnh Parkinson và dòng chứng sinh lý phục vụ nghiên cứu:

Tiến hành lai với tỷ lệ đực- cái các cặp ruồi bố mẹ (1:1), thực hiện phép lai di truyền theo sơ đồ sau:

- Phép lai 1: tạo dòng đối chứng sinh lý P: ♀ elav-GAL4 X ♂ UAS-GFP-CD8 (tỷ lệ 1:1) F1: **elav-GAL4 UAS-GFP-CD8** Ký hiệu: GFP.

- Phép lai 2: tạo dòng bệnh Parkinson biểu hiện protein alpha-synuclein P: ♀ elav-GAL4 X ♂ UAS-SNCA (tỷ lệ 1:1) F1: **elav-GAL4 UAS-SNCA** Ký hiệu: SNCA.

Ruồi giấm được nuôi trong môi trường thức ăn cơ bản (chứa 5% cao nấm men, 5% đường, 1% agar, 3% sữa bột, 0,5% acid propionic và 0,4% natri benzoat). Thức ăn cho ruồi được thay 3 ngày một lần, đảm bảo cung cấp nguồn dinh dưỡng đầy đủ cho ruồi đến khi làm thí nghiệm. Nhóm ruồi bệnh lý được điều trị mẫu nghiên cứu: Ruồi bố mẹ được lai (tỷ lệ 1:1) và nuôi trong môi trường thức ăn cơ bản có bổ sung mẫu cao chiết với nồng độ 2 và 4 mg/ ml. Ruồi được nuôi trong phòng thí nghiệm ở nhiệt độ $25 \pm 1^\circ\text{C}$ với chu kỳ 12/12 giờ sáng/ tối (sáng từ 7 - 19 giờ). Các thí nghiệm đánh giá hành vi được thực hiện trong giai đoạn sáng từ 9 giờ đến 18 giờ.

2.2.2. Thử nghiệm đánh giá tốc độ di chuyển của ấu trùng (crawling assay):

Thí nghiệm tiến hành theo nghiên cứu của tác giả Nichols và cs. (2012) [5], trên ấu trùng ruồi giấm bậc ba của thế hệ F1 (cả bố mẹ và ấu trùng F1 đều được nuôi trong môi trường cơ bản có bổ sung các cao chiết). Lựa chọn các ấu trùng bậc 3 ruồi giấm đực nhằm đảm bảo tính ổn định của hành vi. Chuyển 4 ấu trùng vào môi trường thạch agar 1,5% trong đĩa petri đường kính 12 cm để chúng bò tự do trong khoảng 60 giây. Ghi lại video và phân tích tốc độ di chuyển của ấu trùng bằng phần mềm Image J 1.53.

2.2.3. Thử nghiệm đánh giá khả năng ghi nhớ mùi của ấu trùng (odor-taste learning assay):

Dựa trên nghiên cứu của tác giả Gerber và cs. (2013) [6], thử nghiệm đánh giá trí nhớ ngắn hạn được tiến hành trên ấu trùng ruồi giấm thế hệ F1 được lai bởi ruồi bố mẹ (được nuôi trong môi trường thức ăn cơ bản có bổ sung cao chiết với các liều lần lượt là 2 và 4 mg/ml). Thử nghiệm bao gồm 2 giai đoạn như sau:

- Giai đoạn luyện tập được tiến hành trên 2 nhóm đối ngược nhau: một nhóm ấu trùng tiếp xúc với n-amyl axetat (AM) với phần thưởng là đường sucrose (+), sau đó tiếp xúc với 1-octanol (OCT) mà không có phần thưởng (ký hiệu là AM+/OCT). Nhóm thứ hai tiến hành tập luyện ngược lại (ký hiệu AM/OCT+). Quá trình tập luyện lặp lại 3 lần.

- Giai đoạn kiểm tra: hai nhóm ấu trùng sau đó được kiểm tra trên môi trường thạch không có

phần thường đường để lựa chọn giữa AM và OCT. Kết quả được đánh giá bằng chỉ số học tập (LI) theo công thức như sau:

$$PREF_{AM} = \frac{\text{Số ấu trùng bên AM} - \text{Số ấu trùng bên OCT}}{\text{Tổng số ấu trùng}}$$

$$PREF_{OCT} = \frac{\text{Số ấu trùng bên OCT} - \text{Số ấu trùng bên AM}}{\text{Tổng số ấu trùng}}$$

$$LI = \frac{PREF_{AM} + PREF_{OCT}}{2}$$

Trong đó: PREFAM là chỉ số ưu tiên AM

PREFOCT là chỉ số ưu tiên OCT

LI là chỉ số học tập (Learning Index).

Nếu: LI > 0 cho thấy ấu trùng có khả năng học tập hay ghi nhớ.

LI ~ 0 cho thấy ấu trùng không có khả năng học tập hay ghi nhớ.

LI < 0 cho thấy mùi gây khó chịu cho ruồi giấm.

3. Kết quả nghiên cứu

3.1. Kết quả sàng lọc đánh giá tác dụng cải thiện hành vi vận động của ấu trùng bậc 3 ruồi giấm

Suy giảm chức năng vận động là triệu chứng lâm sàng đặc trưng của bệnh Parkinson [7]. Do vậy, thử nghiệm này là tiêu chí quan trọng để nghiên cứu chẩn đoán bệnh cũng như sàng lọc cao chiết có tác dụng điều trị Parkinson. Sau khi phân tích quãng đường di chuyển của ấu trùng ruồi giấm trong 45 giây, nhóm nghiên cứu tính được tốc độ di chuyển và hình dạng đường đi của ấu trùng được thể hiện trong Bảng 2 và Hình 1:

Bảng 2. Kết quả đánh giá tác dụng của các cao chiết dược liệu trên mô hình ruồi giấm PD được đánh giá bằng hình thử nghiệm hành vi bò

STT	Tên mẫu	Tốc độ trung bình (mm/s)	
		2 (mg/ml)	4 (mg/ml)
I. GFP (Nhóm chứng sinh lý)		1,020 ± 0,02***	
II. SNCA (Nhóm chứng bệnh lý)		0,916 ± 0,02	
III. Nhóm điều trị cao chiết dược liệu			
1	Bạch chỉ nam	0,845 ± 0,07	0,725 ± 0,04
2	Thạch tùng đuôi ngựa	1,047 ± 0,02**	1,045 ± 0,04*
3	Cải cần	0,890 ± 0,06	0,796 ± 0,05
4	Lạc tiên	1,028 ± 0,06	0,835 ± 0,05
5	Hạ khô thảo	1,112 ± 0,05***	1,079 ± 0,06**
6	Điều nhuộm	0,983 ± 0,06	0,854 ± 0,05
7	Bọ mây	0,883 ± 0,04	0,705 ± 0,06
8	Rau ngổ trâu	0,895 ± 0,05	0,814 ± 0,05
9	Ba kích	1,082 ± 0,03**	1,044 ± 0,03**
10	Bạch tật lê	0,831 ± 0,06	0,982 ± 0,04
11	Tầm gửi cây dâu	0,982 ± 0,04	0,904 ± 0,05
12	Hành ta trồng tại Lý Sơn	0,945 ± 0,04	0,799 ± 0,04
13	Bạch đàn chanh	0,669 ± 0,04	0,893 ± 0,03
14	Hoàng tinh cách	0,782 ± 0,03	0,899 ± 0,05
15	Hoàng kỳ	0,853 ± 0,05	0,802 ± 0,06
16	Rau đắng	0,973 ± 0,05	1,000 ± 0,05
17	Chè đắng	0,789 ± 0,04	0,834 ± 0,03
18	Tai mèo	0,818 ± 0,04	0,869 ± 0,04
19	Bạch điệp	0,979 ± 0,04	0,783 ± 0,05
20	Viễn chí	0,924 ± 0,04	0,813 ± 0,07

Chú thích: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ so sánh với lô chứng bệnh lý (SNCA). $n=35-45$ cá thể/lô.

Kết quả Bảng 2 cho thấy ấu trùng ruồi giấm lô bệnh lý (SNCA) có tốc độ di chuyển thấp hơn lô sinh lý (GFP) khoảng 11%, đạt ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$. Trong 20 cao chiết dược liệu ở nồng độ thử nghiệm 2 và 4 mg/ml, có 3 mẫu cao chiết bao gồm: Hạ khô thảo (HKT - *Prunella vulgaris* L.), Ba kích (BK - *Morinda officinalis* How), Thạch tùng đuôi ngựa (TTĐN - *Huperzia phlegmaria* L.) có tác dụng tăng khả năng vận động trên ruồi giấm Parkinson thông qua tiêu chí

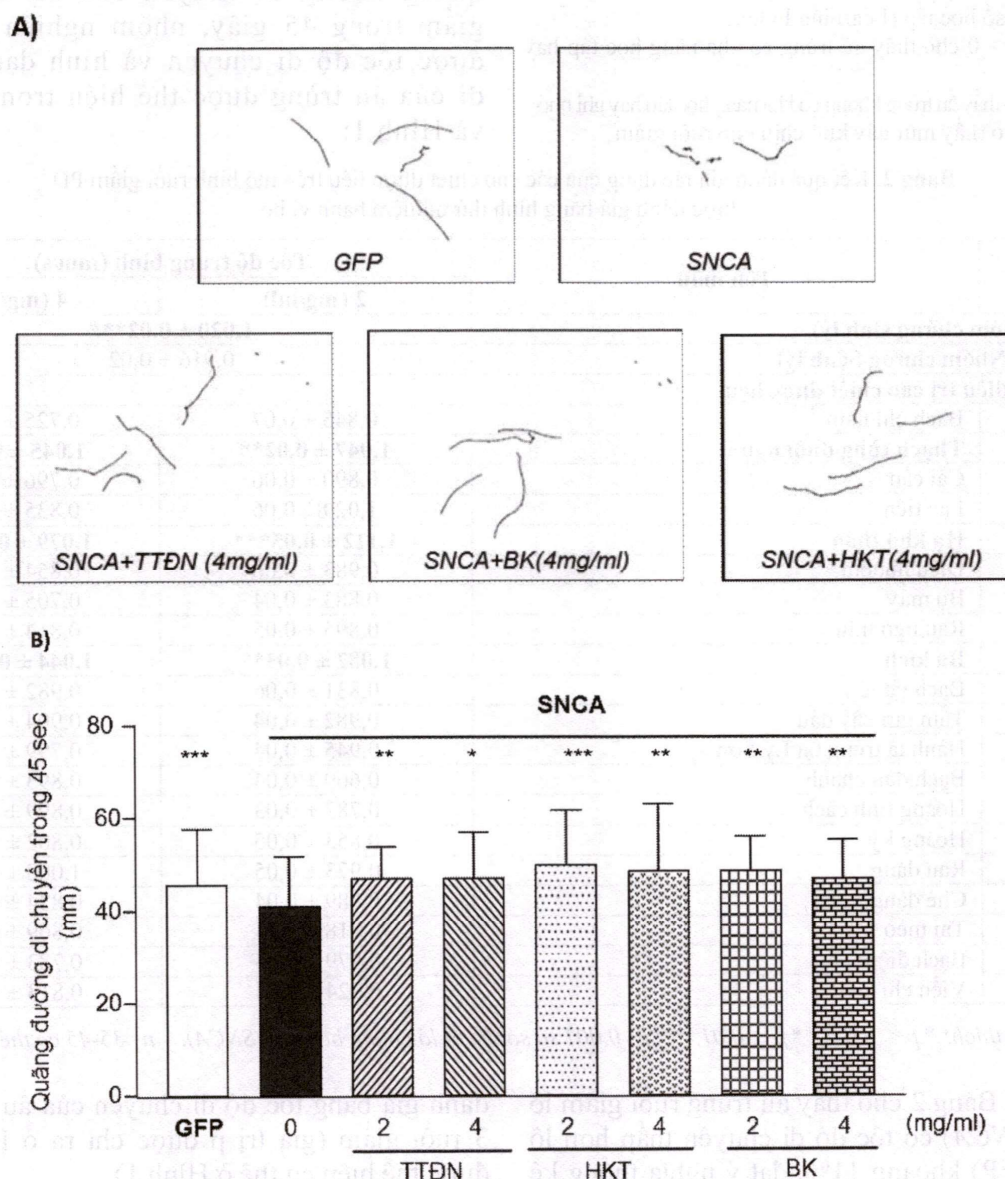
đánh giá bằng tốc độ di chuyển của ấu trùng bậc 3 ruồi giấm (giá trị p được chỉ ra ở Bảng 2 và được thể hiện cụ thể ở Hình 1).

Đánh giá về đặc điểm di chuyển của ấu trùng bậc 3 trong cùng khoảng thời gian là 45 giây, chúng tôi nhận thấy ấu trùng ở lô bệnh lý (SNCA) di chuyển một cách rối loạn, không có định hướng và quỹ đạo không rõ ràng, và có tổng quãng đường vận động trong 45 giây thấp hơn đáng kể so với lô sinh lý. Ấu trùng bậc 3 ở

lô ruồi SNCA được điều trị bằng cả 3 mẫu cao chiết Hạ khô thảo, Ba kích, Thạch tùng đuôi ngựa về một hướng xác định, quỹ đạo di chuyển theo xu hướng đường thẳng hơn, và có tổng quãng được vận động trong 45 giây nhiều hơn đáng kể so với lô ruồi SNCA không được điều trị bằng cao chiết, với giá trị thống kê như chỉ ra ở Hình 1.B.

Từ những kết quả đánh về tốc độ vận động và

quãng được đi được của ấu trùng bậc 3 cho thấy ấu trùng ruồi giảm chuyển gen *SNCA* mang bệnh Parkinson bị suy giảm hành vi vận động và điều trị bằng 3 cao chiết hạ khô thảo, ba kích, thạch tùng đuôi ngựa có tác dụng phục hồi sự suy giảm vận động của ấu trùng ruồi. Do đó, 3 cao chiết được liệu này được nhóm nghiên cứu tiếp tục đánh giá tác dụng trên khả năng học tập và ghi nhớ ngắn hạn.



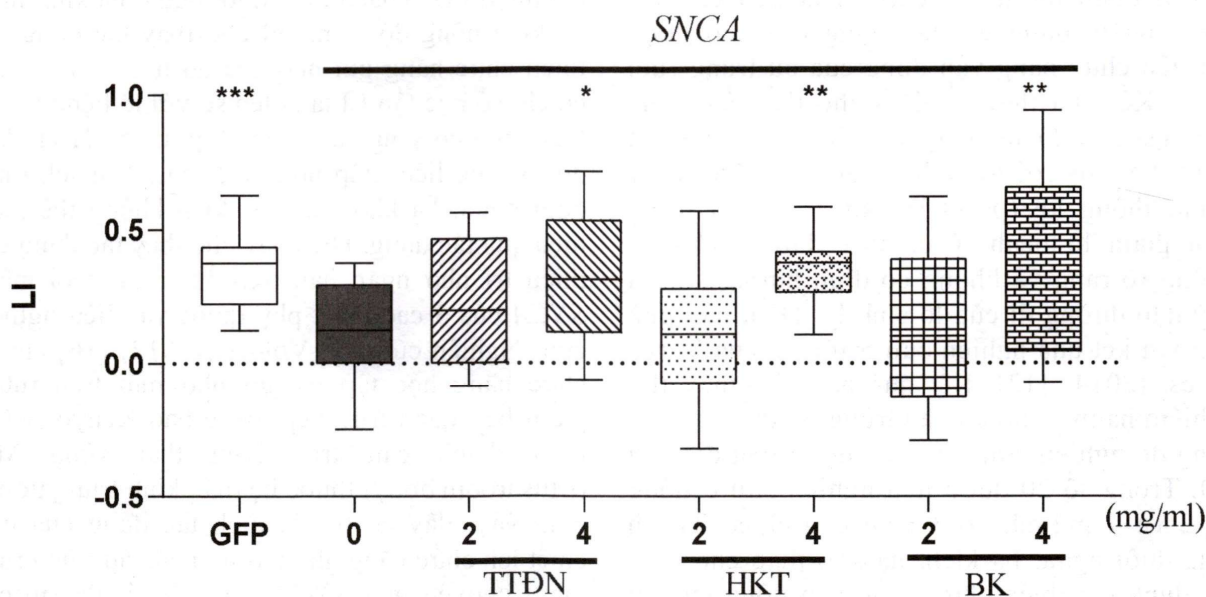
Hình 1. Tác dụng cải thiện khả năng vận động của cao chiết thạch tùng đuôi ngựa, hạ khô thảo, ba kích (nồng độ 2 và 4 mg/ml) trên ấu trùng ruồi giảm chuyển gen *SNCA* mang bệnh Parkinson.

A) Hình ảnh đường đi của ấu trùng ruồi giảm; B) Kết quả phân tích quãng đường di chuyển của ấu trùng ruồi giảm. $n=35-45$ cá thể/lô. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ so sánh với lô chứng bệnh lý (SNCA). GFP: lô chứng sinh lý. SNCA (lô bệnh lý): ruồi giảm chuyển gen *SNCA* mang bệnh Parkinson. TTDN-2,4; HKT-2,4; BK-2,4 (lô mẫu thử): ruồi giảm chuyển gen *SNCA* mang bệnh Parkinson được điều trị bằng cao chiết thạch tùng đuôi ngựa; hạ khô thảo; ba kích ở các nồng độ 2mg/ml và 4mg/ml.

3.2. Kết quả đánh giá khả năng học tập và ghi nhớ ngắn hạn

Tác dụng của cao chiết trên khả năng học tập và ghi nhớ ngắn hạn của ấu trùng ruồi giấm

Parkinson được đánh giá bằng thử nghiệm trí nhớ mùi. Thông qua chỉ số học tập LI, khả năng ghi nhớ ngắn hạn sẽ được so sánh giữa các lô nghiên cứu.



Hình 2. Tác dụng cải thiện trí nhớ ngắn hạn của cao chiết Thạch tùng đuôi ngựa, Hạ khô thảo, Ba kích trên ấu trùng bậc 3 ruồi giấm chuyển gen *SNCA*. $n = 144$, với * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ so sánh với lô bệnh lý (*SNCA*).

Kết quả Hình 2 cho thấy ấu trùng ruồi giấm ở lô bệnh lý (*SNCA*) có chỉ số học tập LI thấp hơn lô chứng sinh lý (GFP), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$. Ấu trùng ruồi giấm được điều trị bằng cao chiết Thạch tùng đuôi ngựa, Hạ khô thảo, Ba kích nồng độ 4 mg/ml có chỉ số học tập LI cao hơn so với lô bệnh lý, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Mặc dù vậy, điều trị bằng cao chiết Thạch tùng đuôi ngựa, Hạ khô thảo, Ba kích nồng độ 2 mg/ml không ảnh hưởng tới trí nhớ ngắn hạn của ấu trùng ruồi giấm *SNCA*.

4. Bàn luận

PD là một bệnh lý thần kinh phức tạp, nguyên nhân gây ra PD hiện còn chưa rõ ràng. Các nhà khoa học cho rằng có 2 nguyên nhân gây bệnh Parkinson là yếu tố di truyền và yếu tố môi trường, bên cạnh đó sự lão hóa cũng là một vấn đề cần quan tâm. Chỉ riêng nghiên cứu về các yếu tố di truyền, hơn 20 dạng đơn gen của PD đã được mô tả và hơn 100 locus đã được xác định là yếu tố nguy cơ đối với PD [8]. Chính vì tính chất phức tạp của cơ chế bệnh sinh nên cho đến nay vẫn chưa có thuốc đặc hiệu điều trị bệnh. Việc tìm nghiên cứu thuốc điều trị PD đang là một thách thức lớn của các nhà khoa học.

Hiện nay, nhiều nghiên cứu sử dụng ruồi giấm làm mô hình để đánh giá PD bởi ưu thế về mặt đạo đức, yếu tố kinh tế, tính hợp lý về di truyền và sinh lý. Một số gen liên quan đã được sử dụng để gây mô hình ruồi giấm Parkinson trên thế giới như: *SNCA*, *PINK1*, *Parkin*, *DJ-1* và *LRRK2* [9]. Protein α -synuclein được mã hóa bởi gen *SNCA*, một trong ba gen thuộc họ synuclein (α , β , γ) ở người. Một số đột biến điểm trên gen *SNCA* như A30P, A53T... đã được chứng minh có liên quan đến sinh bệnh học Parkinson [10]. Nghiên cứu của Mizuno và cs. (2010) dùng ruồi giấm chuyển gen *SNCA* làm mô hình nghiên cứu PD, mô hình này biểu hiện triệu chứng suy giảm khả năng vận động và mất tế bào thần kinh tạo dopamin theo tuổi [11]. Gần đây nghiên cứu của Nguyễn Trọng Tuệ và cs. (2021) trên mô hình ruồi giấm chuyển gen *SNCA* sử dụng GAL4/UAS để biểu hiện protein α -synuclein ở mô não cho kết quả ruồi giấm có biểu hiện kiểu hình đặc trưng của bệnh Parkinson như suy giảm khả năng vận động (ở cả giai đoạn ấu trùng và ruồi trưởng thành) và rút ngắn tuổi thọ [10]. Thực tế, nhiều mô hình ruồi giấm chuyển gen *SNCA* cũng đã được sử dụng và chứng minh là có thể tạo ra một số đặc điểm kiểu

hình tương đồng PD của con người [11]. Do đó mô hình ruồi giấm chuyển gen *SNCA* mang bệnh Parkinson là mô hình tiềm năng để nghiên cứu thử nghiệm cũng như sàng lọc được liệu hỗ trợ điều trị bệnh Parkinson.

Cải thiện tốc độ di chuyển là tiêu chí đặc trưng nhằm đánh giá tác dụng của cao dược liệu lên chức năng vận động của ấu trùng ruồi giấm. Kết quả thực nghiệm cho thấy ấu trùng ruồi giấm ở lô bệnh lý có tốc độ di chuyển chậm hơn so với lô sinh lý, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Ngoài ra, ấu trùng ruồi giấm lô bệnh lý có quỹ đạo di chuyển không rõ ràng và không có định hướng so với quỹ đạo đường đi của lô sinh lý. Điều này phù hợp với kết quả nghiên cứu trước đó của Varga và cs. (2014) [12]. Kết quả này cho thấy thử nghiệm hành vi bò của ấu trùng có thể được sử dụng để nghiên cứu sàng lọc được liệu điều trị PD. Trong số 20 dược liệu nghiên cứu ở nồng độ 2 và 4 mg/ml, có 3 mẫu cao chiết: Thạch tùng đuôi ngựa, ba kích, hạ khô thảo cho thấy tác dụng cải thiện chức năng vận động của ấu trùng ruồi giấm, tốc độ di chuyển trung bình của ấu trùng cao hơn so với lô bệnh lý, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Nghiên cứu của Varga (2014) cho thấy sự khiếm khuyết vận động ở ấu trùng ruồi giấm chuyển gen *SNCA* là do giảm giải phóng dopamin ở synap [12]. Hơn nữa nghiên cứu của Ryabova (2014) đã chứng minh ruồi giấm chuyển gen *SNCA* mang đột biến điểm A30P có thể gây ra các rối loạn chức năng khớp thần kinh (synap) thông qua phân tích cấu trúc thần kinh cơ NMJ tại nhóm cơ số 4 của ấu trùng bậc 3 ruồi giấm như giảm số lượng và diện tích các nút thần kinh [13]. Như vậy, đây có thể là đích tác dụng của 3 cao chiết lên chức năng vận động của ấu trùng ruồi giấm chuyển gen *SNCA* mang bệnh Parkinson.

Cùng với đặc điểm đặc trưng của PD là suy giảm hành vi vận động ở trên, suy giảm trí nhớ là một dấu hiệu thường gặp liên quan đến các rối loạn không vận động ở người PD, xuất hiện khi quá trình thoái hóa ảnh hưởng đến các tế bào thần kinh có chức năng trong việc ghi nhớ và mức độ tập trung [14]. Chúng tôi sử dụng mô hình đánh giá khả năng học tập và ghi nhớ mùi nhằm đánh giá tác dụng của cao dược liệu lên khả năng ghi nhớ ngắn hạn của ấu trùng ruồi giấm. Kết quả thực nghiệm cho thấy khả năng ghi nhớ mùi của

ấu trùng ruồi giấm ở lô bệnh lý kém hơn so với lô sinh lý, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Zhao (2015) [15]. Điều này cho thấy mô hình phù hợp để đánh giá tác dụng của cao chiết có tác dụng cải thiện PD. Thạch tùng đuôi ngựa, hạ khô thảo, ba kích nồng độ 4 mg/ml cho thấy tác dụng cải thiện chức năng ghi nhớ của ấu trùng ruồi giấm có chỉ số học tập LI tăng lên so với lô bệnh lý, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê $p < 0,05$. Trong khi đó, ở mức liều thấp hơn là 2 mg/ml, thạch tùng đuôi ngựa, hạ khô thảo, ba kích không thể hiện hiệu quả tác dụng. Điều này cho thấy tác dụng cải thiện trí nhớ ngắn hạn trên ấu trùng ruồi giấm *SNCA* của 3 cao chiết phụ thuộc vào liều nghiên cứu. Nghiên cứu của Volders (2012) [16] chỉ ra chức năng học tập và ghi nhớ mùi trên ruồi giấm liên quan trực tiếp tới tế bào Kenyon (KC), hình thành cấu trúc hình thái vùng MB (Mushroom body) thuộc hệ thần kinh trung ương. Như vậy, đây có thể là đích tác dụng của cao chiết lên chức năng ghi nhớ mùi của ấu trùng ruồi giấm chuyển gen *SNCA* mang bệnh Parkinson. Tuy nhiên vẫn cần nghiên cứu sâu hơn để khẳng định chính xác.

5. Kết luận

Sử dụng mô hình ruồi giấm chuyển gen *SNCA* gây bệnh Parkinson để nghiên cứu sàng lọc 20 cao chiết dược liệu phát hiện được 3 cao chiết bao gồm Hạ khô thảo (*Prunella vulgaris* L.), Ba kích (*Morinda officinalis* How), Thạch tùng đuôi ngựa (*Huperzia phlegmaria* L.) có tác dụng cải thiện đáng kể hành vi vận động của ấu trùng bậc 3 ruồi giấm chuyển gen *SNCA* gây PD. Đồng thời, trên thử nghiệm đánh giá khả năng ghi nhớ ngắn hạn của ấu trùng ruồi giấm cũng cho thấy 3 cao chiết này có tác dụng cải thiện trí nhớ ngắn hạn của ấu trùng ruồi giấm chuyển gen *SNCA*. Kết quả nghiên cứu này làm tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo để đánh giá tác dụng điều trị Parkinson của các dược liệu Việt Nam trong thời gian tới.

Lời cảm ơn: Kết quả thu được trong nghiên cứu này là sản phẩm của đề tài cấp Viện Dược liệu (2021-2022): “Triển khai mô hình Parkinson trên ruồi giấm thực nghiệm và áp dụng đánh giá tác dụng của một số dược liệu”. Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn tiểu dự án First (2017-2019): “Hợp tác nghiên cứu sàng lọc dược liệu có tác dụng ngăn ngừa/ hỗ trợ điều trị bệnh suy giảm trí nhớ và cơ chế tác dụng”, do Ngân hàng thế giới tài trợ đã cung cấp nguồn cao chiết dược liệu phục vụ nghiên cứu này.

Tài liệu tham khảo

1. Kalia L. V., Lang A. E. (2015), Parkinson's disease, *Lancet*, 386(9996), 896-912.
2. Rizek P., Kumar N., Jog M. S. (2016), An update on the diagnosis and treatment of parkinson disease, *CMAJ (Canadian Medical Association journal)*, 188(16), 1157-1165.
3. Reiter L. T., Potocki L., Chien S., Gribskov M., Bier E. (2001), A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*, *Genomeresearch*, 11(6), 1114-1125.
4. Mel B. (2000), A *Drosophila* model of parkinson's disease, *Nature*, 400, 394-398.
5. Nichols C. D., Becnel J., Pandey U. B. (2012), Methods to assay *Drosophila* behavior, *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 61, e3795.
6. Gerber B., Biernacki R., Thum J. (2013), Odor-taste learning assays in *Drosophila* larvae, *Cold Spring Harbor Protocols*, 2013(3).
7. Pham Thanh Ky, Pham Thanh Huong, Than Kieu My, Pham Tuan Anh, Phan Van Kiem, Chau Van Minh, Nguyen Xuan Cuong, Nguyen Phuong Thao, Nguyen Xuan Nhiem, Jae-Hee Hyun, Hee-Young Kang, Yong Ho Kim (2010), Dammarane-type saponins from *Gynostemma pentaphyllum*, *Phytochemistry*, 71(8-9), 994-1001.
8. Đỗ Mạnh Hưng, Nguyễn Hải Hà, Nguyễn Đăng Tôn (2021), Bệnh parkinson: Một số đặc điểm bệnh lý, di truyền và cơ chế bệnh sinh, *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 19, 411-432.
9. Liu Z., Wang X., Yu Y., Li X., Wang T., Jiang H., Ren Q., Jiao Y., Sawa A., Moran T., Ross C. A., Montell C., Smith W. W. (2008), A drosophila model for LRRK2-linked parkinsonism, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(7), 2693-2698.
10. Tạ Ngọc Khánh, Trần Quốc Đạt, Nguyễn Trọng Tuệ (2021), Rối loạn khả năng vận động trên mô hình ruồi giấm biểu hiện protein alpha-synuclein gây bệnh Parkinson, *Tạp chí Nghiên cứu Y học*, 138(2), 28-36.
11. Marder K. S., Tang M. X., Mejia-Santana H., Rosado L., Louis E. D., Comella C. L., Colcher A., Siderowf A. D., Jennings D., Nance M. A., Bressman S., Scott W. K., Tanner C. M., Cote L. J., Frucht S., Ford B., Alcalay R. N., Rezak M., Novak K., Friedman J. H., Pfeiffer R. F., Marsh L., Hiner B., Neils G. D., Verbitsky M., Kisselev S., Caccoppolo E., Ottman R., Clark L. N. (2010), Predictors of parkin mutations in early-onset parkinson disease: the consortium on risk for early-onset Parkinson disease study, *Archives of Neurology*, 67(6), 731-738.
12. Varga S. J., Qi C., Podolsky E., Lee D. (2014), A new *Drosophila* model to study the interaction between genetic and environmental factors in Parkinson's disease, *Brain Research*, 1583, 277-286.
13. Ryabova E., Schuvalova P., Golomidov I., Bolshakova O. (2014), Overexpression of human SNCA gene in *Drosophila* motor neurons causes morphological and functional abnormalities in larval neuromuscular junction, *Visnyk of the Lviv University*, 105-109.
14. Balestrino R., Schapira A. (2020), Parkinson disease, *Neurol*, 27(1), 27-42.
15. Zhao X., Sun X., Cai S., Ran D., Yan Y., Pei Z. (2015), Role of α -synuclein in cognitive dysfunction: Studies in *Drosophila melanogaster*, *Molecular Medicine Reports*, 12(2), 2683-2688.
16. Volders K., Scholz S., Slabbaert J. R., Nagel A. C., Verstreken P., Creemers J. W. M., Callaerts P., Schwärel M. (2012), *Drosophila rugose* is a functional homolog of mammalian neurobeachin and affects synaptic architecture, brain morphology, and associative learning, *Journal of Neuroscience*, 32(43), 15193-15204.

Tạp chí Dược liệu, tập 27, số 5/2022 (Trang 291 - 297)

TÁC DỤNG HẠ ACID URIC MÁU, GIẢM ĐAU VÀ KHÁNG VIÊM CỦA DÂY ĐAU XƯƠNG TRONG HỖ TRỢ ĐIỀU TRỊ BỆNH GÚT

Chương Thị Ngọc Hiếu³, Hà Quang Thanh¹, Chung Thị Mỹ Duyên¹,
Nguyễn Hoàng Minh¹, Nguyễn Thị Thu Hương^{2,*}

¹Trung tâm Sâm và Dược liệu thành phố Hồ Chí Minh - Viện Dược liệu;

²Đại học Quốc tế Hồng Bàng; ³Trung tâm Công nghệ sinh học thành phố Hồ Chí Minh

*Email: huongsam@hotmail.com

(Nhận bài ngày 07 tháng 9 năm 2022)

Tóm tắt

Tác dụng hỗ trợ điều trị bệnh gút của cao chiết ethanol 80% từ dây đau xương [*Tinospora sinensis* (Lour.) Merr.] được nghiên cứu bao gồm các thực nghiệm đánh giá các tác dụng hạ acid uric máu, giảm đau và kháng viêm trên chuột nhắt trắng. Khảo sát khả năng hạ acid uric máu của cao thử nghiệm được thực hiện trên mô hình chuột gây tăng acid uric máu bởi kali oxonate. Tác dụng giảm đau được khảo sát trên thực nghiệm mâm nóng, tác dụng kháng viêm được đánh giá trên mô hình gây phù chân chuột bởi carrageenan. Kết quả cho thấy ở phác đồ điều trị dự phòng, lô bệnh cho uống cao chiết dây đau xương (liều uống 0,231 g/kg và 0,462 g/kg, tương đương 2,5 g và 5 g dược liệu khô /kg) có nồng độ acid uric máu trở về mức giá trị bình thường, tương tự tác dụng của thuốc đối chiếu allopurinol (liều uống 10 mg/kg). Bên cạnh đó, cao chiết ethanol 80% từ dây đau xương còn thể hiện giúp làm kéo dài thời gian chịu nhiệt của chuột với kích thích nhiệt do mâm nóng và giảm 00 độ phù chân chuột gây bởi carrageenan, thể hiện tác dụng giảm đau tương tự với lô điều trị bằng thuốc đối chiếu là morphin (10 mg/kg, tiêm phúc mạc) và tác dụng kháng viêm tương tự Celebrex® liều uống 25 mg/kg. Tóm lại, cao chiết ethanol 80% của dây đau xương có tác dụng dự phòng điều trị bệnh gút.

Từ khóa: Dây đau xương, Hạ acid uric máu, Giảm đau, Kháng viêm.