

NGHIÊN CỨU PHƯƠNG PHÁP TÁCH TẾ BÀO GAN VÀ THỬ NGHIỆM HOẠT TÍNH BẢO VỆ TẾ BÀO GAN *EX VIVO* CỦA CAO CHIẾT CÂY RÂU MÈO

Nguyễn Ngọc Hồng⁽¹⁾, Võ Văn Giàu⁽¹⁾, Huỳnh Ngọc Thụy⁽²⁾, Trần Hùng⁽²⁾,
Hồ Huỳnh Thùy Dương⁽³⁾

(1) Trường Đại học Tôn Đức Thắng; (2) Trường Đại học Y dược TP.HCM

(3) Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 19 tháng 06 năm 2009, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 01 tháng 11 năm 2010)

TÓM TẮT: Cây Râu mèo (*Orthosiphon aristatus* Blume) là một cây thuốc được sử dụng rộng rãi trong y học dân gian Việt nam và nhiều nước trên thế giới như là một thuốc lợi tiểu. Trong các nghiên cứu trước đây của chúng tôi đã nhận thấy tác dụng chống oxy hoá mạnh của cao chiết cây Râu mèo trên các mô hình thử nghiệm in vitro như ferric reducing/antioxidant power và 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. Trong nghiên cứu này, tác dụng bảo vệ tế bào gan ex vivo của cao chiết Râu mèo chống lại tác dụng gây độc trên tế bào gan của carbon tetrachlorid (CCl_4) trong mô hình gây tổn thương tế bào gan chuột tách rời được thực hiện nhằm đánh giá mối tương quan giữa đặc tính chống oxy hoá và tác dụng bảo vệ gan của Râu mèo. Mô hình được sử dụng là mô hình tách tế bào của Kiso có thay đổi một số bước cho phù hợp với điều kiện hiện tại của phòng thí nghiệm. Tế bào đơn sau khi tách được ủ phục hồi với thời gian 2 giờ trong môi trường E'MEM có bổ sung một số chất cần thiết cho tế bào, sau đó gây độc tế bào bằng CCl_4 1,5% trong thời gian 45 phút làm tăng cao hoạt độ của enzym ALT trong môi trường. Kết quả thử nghiệm cho thấy cao chiết methanol cây Râu mèo ở các nồng độ khác nhau đều có tác dụng hạ enzym gan, bảo vệ tế bào nhưng với các mức độ khác nhau. Ở nồng độ 0,1 và 0,25 mg/ml của cao chiết methanol có khả năng làm giảm 60 % nồng độ ALT so với nhóm chứng độc, đưa nồng độ ALT về còn 104 % so với nhóm chứng trắng. Từ các kết quả thu được, có thể kết luận là cao chiết methanol của cây Râu mèo có tác dụng tốt trong việc bảo vệ tế bào gan chống lại tác dụng độc của carbon tetrachlorid, có nhiều triển vọng trong việc sử dụng phòng ngừa các bệnh về viêm gan cấp tính.

Keywords: Hepatocytes, *Orthosiphon aristatus*, CCl_4 , hepatoprotective effect

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Gan là một cơ quan quan trọng về mặt chuyển hóa các chất của cơ thể. Một trong những chức năng rất quan trọng của gan là tham gia vào quá trình giải độc các chất nội sinh và ngoại sinh. Trong các trường hợp bệnh lý hay sự quá tải các chất độc trong gan, các tế

bào gan sẽ bị huỷ hoại dẫn tới các tổn thương trên gan dần dần dẫn tới các tổn thương không hồi phục, xơ gan làm mất chức năng giải độc của gan [5]. Bệnh gan là một trong những vấn đề thường gặp trong cộng đồng. Có nhiều loại bệnh gan trong đó thường gặp là những tổn thương gan gây ra bệnh viêm gan dẫn đến xơ

gan và ung thư gan cuối cùng là gây tử vong với nguyên nhân chủ yếu là do virút và nhiễm độc. Phần lớn các chất gây độc cho gan có liên quan tới sự peroxid hóa lipid và các stress oxy hóa [1].

Hiện nay, các thử nghiệm chống oxy hoá *in vitro* và các thử nghiệm trên tế bào gan *ex vivo* thường được dùng để đánh giá tác dụng bảo vệ gan của các dược liệu, các cao chiết và phân đoạn của dược liệu. Các thử nghiệm này có ưu điểm là nhanh, kết quả lặp lại, có thể áp dụng để sàng lọc một số lượng mẫu lớn trong thời gian ngắn với chi phí thấp, sử dụng một lượng mẫu nhỏ. Các thử nghiệm *ex vivo* có ưu điểm là gần với hệ thống sinh học hơn nên thường được dùng như những thử nghiệm sàng lọc trước các thử nghiệm *in vivo*. Trong thử nghiệm trên các tế bào gan tách rời, phương pháp của Kiso được sử dụng vì có ưu điểm là nhanh và môi trường, hóa chất đơn giản.

Cây Râu mèo (*Orthosiphon aristatus* Blume, họ Hoa môi - Lamiaceae) là một cây thuốc được sử dụng rộng rãi trong y học dân gian Việt Nam và nhiều nước trên thế giới như là một thuốc lợi tiểu, điều trị viêm thận, sỏi thận, sỏi mật, tê thấp, đau nhức, bệnh Goutte [2, 8] và điều trị bệnh tiểu đường [6]. Trong các nghiên cứu trước đây, chúng tôi đã nhận thấy tác dụng chống oxy hoá mạnh của cao chiết methanol của cây này trên các mô hình thử nghiệm *in vitro* như ferric reducing/antioxidant power và 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl [7].

Để đánh giá mối liên hệ giữa tác động chống oxy hoá của cao chiết Râu mèo với tác

dụng bảo vệ gan, trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng mô hình tế bào gan tách rời gây nhiễm độc bởi carbon tetrachlorid (CCl₄) với một số những thay đổi cho phù hợp với điều kiện hiện tại của phòng thí nghiệm để đánh giá tác dụng bảo vệ gan của cao chiết methanol của cây Râu mèo.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Hóa chất

Collagenase (Type I) (Gibco), dimethyl sulfoxide (DMSO) và trypan blue (Merck), Phosphate Buffered Saline (PBS) (Oxoid), albumin huyết thanh bò, môi trường Eagle's minimal essential medium (E'MEM), huyết thanh bào thai bò, dexamethasone, insulin (Sigma), kit thử alanine aminotransferase (ALT) (Diagnosticum Zrt). Các hóa chất khác đạt tiêu chuẩn phân tích.

2.2. Vật liệu

Phần trên mặt đất của cây Râu mèo được thu mua tại Thủ Đức, Thành phố Hồ Chí Minh vào tháng 4 năm 2007. Mẫu được xác định bằng việc khảo sát đặc điểm hình thái thực vật học dựa trên quan sát cây tươi. Dược liệu được rửa sạch, phơi trong bóng râm đến khô, xay nhỏ làm nguyên liệu cho quá trình chiết thu cao.

Chuột nhắt (chủng Swiss albino) được mua từ Viện Vaccin và Sinh phẩm Nha Trang, được nuôi và thử tại phòng thí nghiệm Dược lý, Khoa Dược – ĐH Y Dược TP. HCM.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Chuẩn bị mẫu thử: 50 g dược liệu được ngâm trong dichloromethan trong 24 tiếng, sau

đó đun hồi lưu cách thủy ở nhiệt độ 40°C trong 3 giờ, lọc nóng, chiết lặp lại đến khi giọt dịch chiết không để lại cặn, gộp các dịch chiết, thu hồi dung môi để thu cao dichloromethan. Bã được liệu được loại sạch dung môi và tiếp tục được chiết bằng cách đun hồi lưu cách thủy với dung môi methanol ở 60°C trong 3 giờ, lọc nóng, chiết kiệt, gộp các dịch chiết, thu hồi dung môi để thu được cao methanol.

Tách tế bào gan: theo phương pháp mô tả của Kiso và cộng sự (1983) [3] với một số những thay đổi cho phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm.

Tế bào đơn sau khi tách đáp ứng được mật độ tế bào tối thiểu ($>10^5$ tế bào/ml) sẽ được huyền phù trong môi trường E'MEM bổ sung huyết thanh bào thai bò (10%), dexamethasone (10^{-6} M), insulin (10^{-8} M), gentamycin (50 µg/L) phân bố đều trong các ống endorff 0,5 ml và ủ ở điều kiện 95% O₂ và 5% CO₂, 37°C trong 2 giờ để phục hồi sau quá trình tách.

Khảo sát nồng độ CCl₄ và thời gian ủ tế bào thích hợp

- Tiến hành thăm dò nồng độ CCl₄ tối thiểu có thể dùng gây độc tế bào, phóng thích enzyme gan đủ để khảo sát sự thay đổi của enzyme trong quá trình thử nghiệm. Pha CCl₄ với 1% DMSO và nước cất để có dãy nồng độ CCl₄ là 1,0%; 1,5% và 2,0%. Chọn nồng độ CCl₄ thích hợp để sử dụng cho thử nghiệm.

- Thăm dò thời gian ủ tế bào với CCl₄ thích hợp. dò tìm thời điểm hoạt độ enzym gan tăng cao nhất bằng cách tiến hành ủ tế bào trong thời gian 90 phút, trong thời gian ủ, cứ mỗi 15 phút hút dịch nuôi cấy đi đo hoạt lực

enzyme ALT trên tất cả các mẫu. Chọn thời điểm mà hoạt lực enzyme cao nhất để làm thí nghiệm.

Thử nghiệm sàng lọc tác dụng làm hạ enzym gan của cao chiết Râu mèo trên mô hình tế bào gan chuột nhiễm độc CCl₄: tế bào gan chuột sau khi tách được ủ phục hồi trong 2h ở điều kiện nêu trên, sau đó tiến hành gây độc tế bào bằng CCl₄ và bổ sung các nồng độ khác nhau của cao chiết Râu mèo (mẫu thử) vào tế bào để kiểm tra hoạt độ enzym gan ALT. Tiến hành song song các thử nghiệm là mẫu chứng trắng không gây độc và mẫu gây độc nhưng không dùng thuốc thử nghiệm để đánh giá so sánh kết quả.

Đánh giá kết quả: đo hoạt tính của enzym gan ALT theo phương pháp đo của nhà sản xuất (Diagnosticum)

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Chuẩn hóa quy trình tách tế bào

Tiến hành tách tế bào gan chuột theo phương pháp tách tế bào gan chuột của Kiso và cộng sự [3], tuy nhiên việc bơm rửa gan bằng đường tĩnh mạch chủ trên không thực hiện được và bơm rửa gan bằng dung dịch có bổ sung collagenase cũng không thể thực hiện do vấn đề kinh phí. Vì vậy, chúng tôi đã tiến hành thăm dò thay đổi một số bước thực hiện cho phù hợp với điều kiện có được trong phòng thí nghiệm hiện tại và rút ra qui trình cụ thể như sau:

- Chuột sau khi đạt đến trọng lượng yêu cầu (20 – 25g) sẽ được gây mê bằng ether. Ổ bụng được mở ra để bộc lộ các cơ quan bên trong, các cơ

quan của hệ tiêu hóa như dạ dày, ruột được kéo sang một bên để có thể quan sát tĩnh mạch cửa gan. Dùng chỉ luôn qua và cột cố định tĩnh mạch chủ phía trên ngực. Cắt tĩnh mạch chủ dưới tại vị trí tĩnh mạch dưới thận để tạo đường thoát dịch cho việc bơm rửa gan. Đâm kim luôn vào trong tĩnh mạch cửa gan, dùng chỉ cột cố định ống luôn với tĩnh mạch cửa. Dùng PBS bơm vào ống luôn tĩnh mạch để rửa gan. Rửa cho đến khi gan chuyển sang màu vàng nhạt hoặc cho đến khi dung dịch PBS chảy ra từ tĩnh mạch thân dưới không còn màu đỏ.

- Gan sau khi được rửa sẽ được tách ra khỏi cơ thể chuột và được giữ trong dung dịch PBS có chứa kháng sinh rồi nhanh chóng chuyển vào tủ cấy vô trùng. Tại đây gan sẽ được rửa lại bằng PBS không có chứa kháng sinh. Gan được ngâm ngập trong dung dịch collagenase 0,075%, lắc 100 vòng/phút bằng máy lắc trong 5 phút ở 37°C. Dùng 2 kẹp mổ nhẹ nhàng vuốt từng lá gan phân tán các tế bào (luôn luôn giữ các lá gan chìm trong dung dịch collagenase 0,075%). Kết quả đạt được sau quá trình này là tạo dung dịch huyền phù trắng đục. Dung dịch huyền phù được này được lắc tiếp 100 vòng/phút, trong 10 phút ở 37°C. Cốc đựng dung dịch huyền phù được để tủ lạnh 15 phút. Lọc dung dịch huyền phù qua gạc-cotton vô trùng. Sau đó thu lấy dịch chứa tế bào đơn, ly tâm 1500 vòng/phút trong 15 phút ở 37°C. Thu lấy cặn tế bào. Rửa cặn tế bào bằng dung dịch PBS không có chứa kháng sinh để loại bỏ collagenase. Ly tâm 1500 vòng/phút trong 15 phút ở 37°C thu lấy tế bào. Quá trình này lặp lại từ 3 – 5 lần nếu còn hồng cầu. (Rửa – lọc – ly tâm)

Tế bào đơn sau khi được tách, tiến hành xác định mật độ tế bào và tỷ lệ sống, chết bằng cách nhuộm tế bào bằng trypan blue 0.4%. Sau khi nhuộm tế bào bằng trypan blue, đếm tế bào chết, ghi nhận tế bào sống trên buồng đếm Neubauer. Kết quả cho thấy tế bào gan sau khi được tách với tỉ lệ sống cao được trình bày trong bảng 1

Huyền phù tế bào trong môi trường nuôi E'MEM có bổ sung 10% huyết thanh bê, 10^{-7} M insulin, 1% DMSO. Ủ tế bào 2 giờ trong tủ ủ tế bào ở điều kiện 37°C, 5% CO₂/95% O₂. Tế bào tách được sẽ tiếp tục được sử dụng nghiên cứu theo các hướng khác nhau.

Việc chuẩn hóa quá trình phân lập và tách tế bào gan được thay đổi một số bước như sau:

- Bỏ qua giai đoạn truyền enzym collagenase vào buồng gan thay vào đó là ngâm hẳn buồng gan trong một thể tích dung dịch enzym Collagenase nhất định với thời gian nhất định

- Kết hợp thời gian ngâm buồng gan trong dung dịch enzym và thời gian lắc tiếp xúc enzym với buồng gan, giảm thời gian tách tế bào.

So sánh với qui trình của Kiso, qui trình này có những ưu điểm:

- Do bỏ qua giai đoạn truyền collagenase liên tục vào buồng gan, tiến hành ngâm thẳng gan vào dung dịch enzym collagenase nên giảm đáng kể lượng collagenase sử dụng, giảm đáng kể chi phí cho thử nghiệm và đơn giản hóa qui trình

– Thời gian thực hiện nhanh từ 10-15 phút nên hạn chế tỷ lệ tế bào gan bị chết.

Với kết quả như trên, chúng tôi có thể nhận định là kết quả tách tế bào tốt và ổn định. Nhận xét bước rửa gan rất quan trọng. Nếu rửa gan không kỹ thì hồng cầu còn nhiều dẫn đến

việc phải lặp lại nhiều lần giai đoạn rửa gan, điều này dẫn đến tỉ lệ tế bào gan chết cao, mật độ tế bào sống thấp.

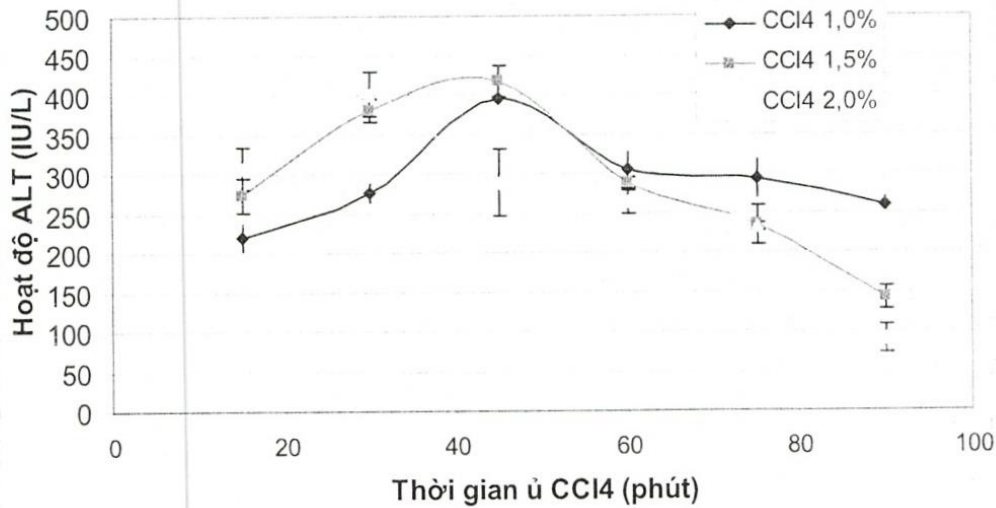
Bảng 1. Kết quả tách tế bào đơn bằng enzyme collagenase type I

Lần thực hiện	Mật độ tế bào (tế bào/ml)	Số tế bào sống (tế bào/ml)	Tỷ lệ (%)
Lần 1	79,7.10 ⁵	77,8.10 ⁵	97,6
Lần 2	88,1.10 ⁵	83,6.10 ⁵	94,9
Lần 3	59,3.10 ⁵	54,6.10 ⁵	92,1
Trung bình	75,7.10⁵	71,9.10⁵	94,8

3.2. Khảo sát nồng độ gây độc của CCl₄ và thời gian ủ thích hợp

CCl₄ là một chất độc được sử dụng phổ biến trong mô hình thử nghiệm gây tổn thương gan *ex vivo* và *in vivo*. Chất này gây nên sự xơ hóa gan và làm thay đổi các chỉ số sinh hóa của gan với các triệu chứng tương tự với viêm gan do virut cấp tính [4, 9]. Khi tế bào bị tổn thương các *enzym transaminase* như ALT... tiết ra môi trường làm cho hoạt độ ALT đo được trong môi trường tăng. Người ta tiến hành đo hoạt lực các men này để đánh giá mức độ thương tổn tế bào gan.

Kết quả khảo sát việc sử dụng các nồng độ CCl₄ khác nhau (1,0; 1,5; 2,0%) và tìm thời gian ủ thích hợp trong khoảng thời gian 90 phút được trình bày trong hình 1. Kết quả cho thấy ở nồng độ 1,0 và 1,5%, lượng enzym gan tiết ra môi trường tăng theo thời gian ủ từ 15 phút đến 45 phút và giảm dần ở thời gian 75 phút và 90 phút trong khi ở nồng độ 2,0% CCl₄, hoạt độ enzym gan tăng dần trong khoảng 15-30 phút và giảm dần trong khoảng 45-90 phút. Hoạt độ enzym gan đo được cao nhất và ổn định nhất là ở nồng độ CCl₄ 1,5% với thời gian 45 phút.

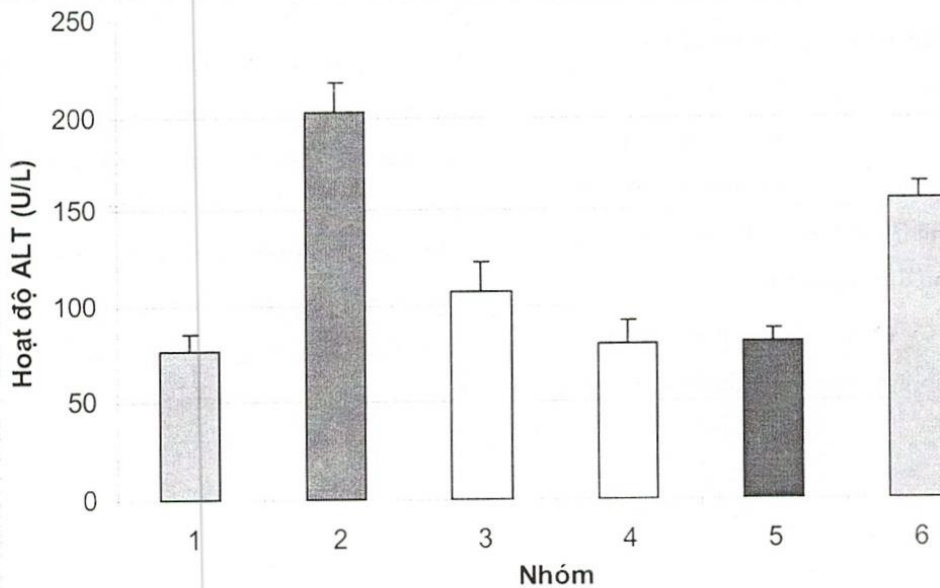


Hình 1. Ảnh hưởng của nồng độ CCl₄ và thời gian ủ đến sự thay đổi enzym gan của môi trường nuôi tế bào

Với kết quả ở trên, chọn nồng độ gây độc của CCl₄ là 1,5% và thời gian gây độc tế bào là 45 phút làm thông số để thực hiện thí nghiệm sàng lọc tác dụng bảo vệ gan *ex vivo*.

3.3. Khảo sát tác dụng hạ enzyme gan trên mô hình tế bào gan chuột bị nhiễm độc CCl₄ của cao chiết cây Râu mèo

Tác dụng bảo vệ gan của cao methanol cây Râu mèo được trình bày trong hình 2.



Hình 2. Hoạt tính bảo vệ gan *ex vivo* của cao chiết cây Râu mèo ở các nồng độ khác nhau chống lại chất độc CCl₄ gây độc cho gan thông qua hoạt độ ALT đo được trong môi trường ủ

Nhóm 1: nhóm chứng trắng (tế bào chưa bị nhiễm độc); Nhóm 2: Mẫu độc (tế bào bị gây độc bởi CCl₄); Nhóm 3, 4, 5, 6: nhóm thử nghiệm có dùng thuốc sau khi gây độc. Các nhóm thử nghiệm 3, 4, 5, 6 thử tự ở các nồng độ 0,05; 0,1; 0,25 và 0,5 mg/ml

Nhóm độc cho kết quả hoạt độ enzym gan tăng 264 % so với nhóm chứng trắng (tế bào trước khi ù CCl_4) khi ù tế bào gan ở nồng độ 1,5% CCl_4 trong khoảng thời gian 45 phút. Kết quả cho thấy nhóm thử ở các nồng độ khác nhau của cao chiết cây Râu mèo (0,05; 0,1; 0,25 và 0,5 mg/ml) đều có tác dụng làm hạ enzym gan, bảo vệ gan. Tuy nhiên, ở nhóm thử 6 (có nồng độ 0,5 mg/ml) cho kết quả hạ enzym gan yếu nhất với hoạt độ enzym gan là 156 ± 9 U/L chỉ giảm 23% so với nhóm chứng độc. Ở nồng độ 0,1 và 0,25 mg/ml của cao chiết Râu mèo (nhóm 4, 5) đều cho tác dụng hạ enzym gan mạnh nhất, với hoạt độ lần lượt là 80 ± 12 U/L và 81 ± 7 U/L giảm khoảng 60% so với nhóm chứng độc, đưa nồng độ ALT về còn 104% so với nhóm chứng trắng.

Từ các kết quả thu được trong thử nghiệm này có thể kết luận là cây Râu mèo có tác dụng hạ enzym gan theo kết quả thử nghiệm *ex vivo*. Cũng từ kết quả này cho thấy sự tương quan giữa đặc tính chống oxy hóa mạnh của cao chiết methanol của cây Râu mèo có vai trò quan trọng trong việc bảo vệ tế bào chống lại chất độc gây tổn thương tế bào.

Nhận xét ở nhóm chứng trắng hoạt độ enzyme đều cao hơn mức bình thường, các thử

nghiệm lặp lại đều cho kết quả tương tự, chúng tôi nhận định có thể do tế bào ít nhiều bị thương tổn, và do thời gian thử nghiệm quá ngắn (chỉ trong vòng 45 phút) nên các thương tổn tế bào do quá trình rửa tách chưa hồi phục hoàn toàn. Để kết quả tốt hơn nên kéo dài thời gian hồi phục của tế bào sau khi tách và nuôi cấy rồi mới đưa vào thử nghiệm.

4. KẾT LUẬN

Đã đề nghị được một số bước chuẩn hóa qui trình tách tế bào gan để thử nghiệm sàng lọc bảo vệ tế bào gan *ex vivo*, tế bào gan thu được có thể được dùng cho các nghiên cứu khác như nuôi cấy tế bào gan và sàng lọc sinh học cho các mẫu thử nghiệm. Nồng độ gây độc của CCl_4 là 1,5%; thời gian thử nghiệm 45' được dùng làm thông số cho nghiên cứu sàng lọc bảo vệ gan của các cao chiết, phân đoạn hay các chất tinh khiết của nghiên cứu chúng tôi. Qua phần thử nghiệm *ex vivo* cho thấy cao methanol của cây Râu mèo có tác dụng chống lại chất độc, làm hạ enzym gan, bảo vệ tế bào gan có hiệu quả. Như vậy, cao methanol của cây Râu mèo sẽ được nghiên cứu sâu hơn qua nghiên cứu tác dụng bảo vệ gan *in vivo* cũng như phân lập các chất tinh khiết có tác dụng bảo vệ gan trong phân đoạn này.

**HEPATOCYTE ISOLATION AND EX VIVO HEPATOPROTECTION OF
ORTHOSIPHON ARISTATUS EXTRACT ON CARBON TETRACHLORIDE
INDUCED HEPATOTOXICITY**

Nguyen Ngoc Hong⁽¹⁾, Vo Van Giau⁽¹⁾, Huynh Ngoc Thuy⁽²⁾, Tran Hung⁽²⁾

Ho Huynh Thuy Duong⁽³⁾

(1) Ton Duc Thang University

(2) University of Medicine and Pharmacy-Ho Chi Minh City

(3) University of Sciences, VNU-HCM

ABSTRACT: *Orthosiphon aristatus* Blume, a member of the Lamiaceae family, is a medicinal herb known as a useful diuretic agent, used popularly in Vietnam and other nations in the world. In our previous research, it was found that *O. aristatus* had strong antioxidant in both methods of the ferric reducing/antioxidant power assay and the 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl free radical scavenging assay. The purpose of the present study was to examine the methanolic extract of *O. aristatus* with strong antioxidative activity against carbon tetrachloride (CCl₄) induced cytotoxicity in isolated mouse hepatocytes using a modified procedure of Kiso. Suspension of isolated mouse hepatocytes incubated in E'MEM medium under a gas 95% O₂ and 5% CO₂, 37°C in 2h before the addition of 1.5% CCl₄ and incubated in 45'. CCl₄ administration significantly increased serum alanine aminotransferase (ALT) activity, a biochemical marker of hepatocyte injury in medium. Pretreatment with different concentration of methanolic extract of *O. aristatus* reduced ALT level. Methanolic extract with concentration of 0.1 và 0.25 mg/ml, were decreased ALT activity 60% compared to toxic group, remaining of the serum ALT was 104% compared to control group. The results of the present study showed that strong antioxidative activity of methanolic extract plays a crucial role in providing protection against such hepatocyte damage, and also supported the traditional believes on hepatoprotective effect of *O. aristatus* extract.

Keywords: Hepatocytes, *Orthosiphon aristatus*, CCl₄, hepatoprotective effect

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. M.U. Dianzani, G. Muzia, M.E. Biocca, R.A. Canuto, *Lipid peroxidation in fatty liver induced by caffeine in rats. International journal of tissue reactions* 13, 79-85 (1991).

[2]. J. Englert, G. Harnischfeger, *Diuretic action of aqueous Orthosiphon extract in rats. Planta Medica* 58, 237-238 (1992).

[3]. Y. Kiso, M. Tohkin, H. Hikino, *Assay method for antihepatotoxic activity using carbon tetrachloride induced cytotoxicity in primary cultured hepatocytes. Planta*

- Medica 49(12), 222-225 (1983).
- [4].V. Kumar, RS. Cotran, SL. Robbins, *Cell injury and adaptation*; 5th ed. Bangalore. India: Prime Books Publ, 3-24 (1992).
- [5].S. Shahani, *Evaluation of hepatoprotective efficacy of APCL-A polyherbal formulation in vivo in rats*. Indian Drugs 36, 628-631 (1999).
- [6].K Sriplang, S. Adisakwattana, A. Rungsipipat, S. Yibchok-Anun, *Effects of Orthosiphon stamineus aqueous extract on plasma glucose concentration and lipid profile in normal and streptozotocin-induced diabetic rats*. Journal Ethnopharmacology 109(3), 510-514 (2007).
- [7].Tran Hung, Nguyen Ngoc Hong, Ho Thi Cam Hoai, Ho Huynh Thuy Duong. *Screening of some Vietnamese medicinal plants for antioxidant using ferric reducing/antioxidant power and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging assays*. 12th Asian Chemical Congress, Kuala Lumpur, Malaysia (2007).
- [8].Viện Dược liệu, *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam (tập 2)* – NXB Khoa học và kỹ thuật (2004).
- [9].B. A. Vogels; O. T. Karlsen; M. A. Mass; W. M. Boveé; R. A. Chamuleau, *L-ornithine vs. L-ornithine-L-aspartate as a treatment for hyperammonemia-induced encephalopathy in rats*. Journal of hepatology 26 (1), 174-178 (1997).