

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư đã và đang được xem là căn bệnh của xã hội thời hiện đại. Cùng với các yếu tố di truyền, các loại hóa chất độc hại từ các sản phẩm gia dụng, tia cực tím, khói bụi công nghiệp, môi trường sống bị ô nhiễm, thói quen sinh hoạt thiếu khoa học, uống nhiều bia rượu, hút thuốc lá... đã đẩy nhanh số ca mắc bệnh ung thư trên toàn thế giới. Để điều trị ung thư, Y học hiện đại (YHHĐ) có nhiều phương pháp hiệu quả. Nhiều vị thuốc, bài thuốc YHCT có tác dụng hỗ trợ điều trị ung thư ở 2 khía cạnh: tăng cường đáp ứng miễn dịch của cơ thể và ức chế sự phát triển của khối u. Sự kết hợp giữa YHHĐ và Y học cổ truyền (YHCT) trong điều trị ung thư đã phát huy được thế mạnh của các thuốc YHCT và hạn chế được tối đa các tác dụng không mong muốn của các phương pháp YHHĐ. Một trong những hướng nghiên cứu hiện nay của YHCT là tìm các chất thảo dược nguồn gốc thiên nhiên có tác dụng tăng cường miễn dịch và ức chế sự phát triển của tế bào ung thư. Cây sói rừng là một vị thuốc nam sẵn có ở các vùng miền núi của Việt Nam, được các tài liệu nước ngoài ghi nhận có tác dụng hỗ trợ điều trị một số loại hình ung thư. Ở Việt Nam, cho đến nay chưa có nghiên cứu đầy đủ nào về tác dụng này của cây. Liệu cây sói rừng Việt Nam có tác dụng như cây sói rừng ở nước ngoài hay không? Để trả lời được phần nào câu hỏi trên, chúng tôi tiến hành nghiên cứu về cây sói rừng với các mục tiêu sau:

- 1. Xác định độc tính cấp và bán trường diễn của corm cây sói rừng.**
- 2. Đánh giá tác dụng kháng u rắn sarcoma 180 của corm cây sói rừng trên chuột nhắt.**
- 3. Khảo sát ảnh hưởng của corm cây sói rừng trên tỷ lệ tế bào TCD3, TCD4, TCD8, nồng độ IL-2 và TNF α của chuột mang u rắn sarcoma 180.**

NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

Ý nghĩa khoa học

Lần đầu tiên tại Việt Nam, nghiên cứu tác dụng của cây sói rừng trên mô hình ung thư thực nghiệm được tiến hành, là tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo theo hướng tìm hiểu có chế chống ung thư của thuốc.

Ý nghĩa thực tiễn

Đề tài đã cung cấp những chứng cứ khoa học về độc tính, tác dụng kháng u sarcoma 180, tăng cường miễn dịch của cốm cây sói rừng trên động vật thực nghiệm, là cơ sở cho các ứng dụng thực tiễn của cây sói rừng tại Việt Nam, tránh hiện tượng chảy máu được liệu.

Những đóng góp mới

- ***Về độc tính của cốm cây sói rừng***
 - Độc tính cấp: Đã xác định được LD₅₀ bằng đường uống của cốm cây sói rừng là 72,090 (65,018 – 75,626)g dược liệu/kg trên chuột nhắt.
 - Độc tính bán trường diễn: so với nhóm chứng, cốm cây sói rừng liều 0,6g và 3g/kg thể trọng uống trong 8 tuần gây biến đổi hình thái vi thể của gan thô với các mức độ khác nhau, làm tăng hoạt độ AST, ALT trong huyết thanh ($p < 0,05$) nhưng không ảnh hưởng đến chức năng khác của gan, chức năng tạo máu, chức năng và hình thái đại thể, vi thể thận thô ($p > 0,05$).
- ***Về tác dụng kháng u rắn sarcoma 180 của cốm cây sói rừng trên chuột nhắt***
 - Cốm cây sói rừng với các liều 5g/kg, 10g/kg và 20g/kg thể trọng chuột có tác dụng ức chế sự phát triển khối u thực nghiệm. Thời gian sống thêm của chuột mang khối u sarcoma 180 đã tăng lên so với lô chứng ($p < 0,05$) khi uống cốm cây sói rừng liều 5g/kg thể trọng.
- ***Về tác dụng của cốm cây sói rừng đối với tỷ lệ tế bào TCD3, TCD4, TCD8, IL-2 và TNF- α trên chuột nhắt mang u rắn sarcoma 180:***
 - Cốm cây sói rừng liều 5g/kg thể trọng làm tăng trọng lượng tuyến ức tương đối, trọng lượng lách tương đối, tăng sinh tế bào lympho trên vi thể tuyến ức, lách so với lô chứng ($p < 0,05$).

- Tỷ lệ tế bào lympho TCD3, TCD8, nồng độ IL-2, TNF- α của chuột uống cỏ cây sói rừng 5g/kg thể trọng tăng có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ($p < 0,05$), tỷ lệ tế bào TCD4 có xu hướng giảm so với với lô chứng nhưng không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

CẤU TRÚC LUẬN ÁN

Luận án gồm 128 trang, trong đó đặt vấn đề 2 trang; Chương 1. Tổng quan 33 trang; Chương 2. Nguyên liệu, đối tượng và phương pháp nghiên cứu 17 trang; Chương 3. Kết quả nghiên cứu 39 trang; Chương 4. Bàn luận 34 trang; Kết luận 2 trang; Đề xuất 1 trang. Có 205 tài liệu tham khảo đã được sử dụng, trong đó 84 tài liệu tiếng Việt, 16 tài liệu tiếng Trung, còn lại là tiếng Anh. Luận án được trình bày và minh họa thông qua 23 bảng, 6 hình vẽ, 3 sơ đồ, 7 biểu đồ và 31 ảnh.

Chương 1

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Ung thư và đáp ứng miễn dịch trong ung thư

1.1.1. Nguyên nhân và cơ chế bệnh sinh

Ung thư là bệnh ác tính của tế bào, trong đó các tế bào ung thư tăng sinh nhanh, vô tổ chức và thường xâm lấn vào các tổ chức xung quanh làm rối loạn chức năng của các tổ chức cơ quan này. Nguyên nhân gây ung thư gồm nhóm nguyên nhân bên ngoài (tác nhân vật lý, hóa học, sinh học) và nhóm nguyên nhân bên trong (nội tiết tố, gốc tự do, yếu tố di truyền...). Đa số ung thư là do đột biến DNA ở tế bào gốc khi tế bào tiếp xúc với các yếu tố gây ung thư và do sai lệch sự tái sao chép DNA bên trong tế bào, liên quan đến 4 nhóm gen: gen gây ung thư, gen ức chế ung thư, gen điều hòa chết tế bào theo chương trình và gen sửa chữa DNA.

1.1.2. Điều trị ung thư

Ung thư là một căn bệnh phát triển trong một thời gian tương đối dài kể từ khi khởi phát nên việc điều trị bệnh được thực hiện càng sớm càng tốt. Còn khi bệnh ở giai đoạn di căn thì việc điều trị sẽ rất

khó khăn và tỷ lệ tử vong cao. Có nhiều phương pháp điều trị ung thư như phẫu thuật, hóa trị, xạ trị, liệu pháp hormon, liệu pháp sinh học (miễn dịch), điều trị trúng đích và ghép tế bào gốc. Tùy từng giai đoạn ung thư mà chọn phương pháp điều trị thích hợp hoặc phối hợp các phương pháp.

1.1.3. Đáp ứng miễn dịch trong ung thư

Kháng nguyên ung thư khi có mặt trong cơ thể sẽ chịu sự kiểm soát của hệ thống miễn dịch. Các tế bào hiệu ứng miễn dịch không đặc hiệu (đại thực bào, tiểu thực bào, tế bào giết tự nhiên NK) gây độc tế bào làm cho tế bào ung thư ly giải hoặc bị kìm hãm, ức chế phát triển. Đáp ứng miễn dịch dịch thể tham gia vào phá hủy các tế bào ung thư thông qua sự hoạt hóa bổ thể và gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể bởi các tế bào NK (nature killer). Tế bào T gây độc (Tc) có vai trò quan trọng trong đáp ứng miễn dịch chống ung thư. Các protein MHC (Major Histocompatibility Complex) trên bề mặt tế bào ung thư là mục tiêu để tế bào lympho T nhận biết kháng nguyên và tiêu diệt tế bào ung thư.

1.1.4. Mô hình thực nghiệm điều trị ung thư

Mô hình nghiên cứu *in vitro* và *in vivo* thường được sử dụng để khảo sát hoạt tính kháng u tiền lâm sàng của các thuốc nghiên cứu. Trong *in vitro*, các thuốc nghiên cứu được ủ trực tiếp với các dòng tế bào ung thư có nguồn gốc từ người hay động vật đã được nuôi cấy ở điều kiện đặc biệt và môi trường thích hợp. Thí nghiệm trên động vật và thử nghiệm lâm sàng là hai hình thức trong nghiên cứu *in vivo*. Trong lĩnh vực nghiên cứu ung thư thực nghiệm, mô hình nghiên cứu *in vivo* là mô hình nghiên cứu bắt buộc trước khi tiến hành thử nghiệm trên người. Thỏ, mèo, chuột, các loài linh trưởng được sử dụng trong mô hình nghiên cứu ung thư *in vivo* nhưng chuột được sử dụng rộng rãi hơn. Có 2 hình thức cấy ghép u trong các mô hình nghiên cứu ung thư *invivo*: Cấy chuyển các dòng tế bào ung thư trên động vật. Ghép khối u người trên chuột.

1.2. Quan niệm về ung thư trong Y học cổ truyền

1.2.1. Nguyên nhân và cơ chế bệnh sinh

Ung thư thuộc Nham chứng trong YHCT. Nguyên nhân gây bệnh bao gồm ngoại nhân, nội nhân và bất nội ngoại nhân. Cơ chế bệnh sinh là do nhiệt độc, khí trệ huyết ứ, đàm ngưng và chính khí hư suy làm tổn thương khí, khí huyết ngưng trệ lâu ngày hình thành tích.

1.2.2. Điều trị nham chứng

Theo quan niệm của YHCT, ung thư là bệnh toàn thân mà biểu hiện tại chỗ nên khi điều trị ung thư luôn chú trọng nâng cao sức đề kháng của cơ thể mà không chế sự phát triển của khối u và dựa trên nguyên tắc chung là phù chính và khu tà (kháng nham). Pháp phù chính bao gồm kiện tỳ lý khí, dưỡng âm sinh tân, tư âm bổ huyết, ôn bổ tỳ thận. Pháp khu tà kháng nham gồm thanh nhiệt giải độc, hoạt huyết hóa ứ, trừ đàm nhuyễn kiên và tiêu u.

1.3. Tình hình nghiên cứu điều trị ung thư của các thuốc YHCT

Các nghiên cứu điều trị ung thư bằng thuốc YHCT bao gồm nghiên cứu *trên in vitro* và *in vivo*. Nhiều thảo mộc có tác dụng ức chế phát triển tế bào ung thư như cây *Gordonia longicarpa*, *Palhinha cernua* Lycopodiaceae, *Pterocarpus soyauxii*... Bên cạnh đó, nghiên cứu về các bài thuốc, chế phẩm thuốc YHCT kết hợp thuốc YHHĐ trên lâm sàng cũng đã được triển khai. Các chế phẩm như Phylamin, Aslem, Angala, Linh chi-Tam thất, Cadef, Curcumin... đã được nghiên cứu ứng dụng trong điều trị hỗ trợ ung thư. Kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng thuốc YHCT có tác dụng kích thích miễn dịch, tăng số lượng tế bào lympho và hạn chế giảm số lượng hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu ở các bệnh nhân ung thư điều trị hóa-xạ trị. Sự kết hợp này làm tăng hiệu quả điều trị, tăng tính khoa học và đảm bảo về y đức trong nghiên cứu. Tuy nhiên, các nghiên cứu độc vị, đặc biệt là độc vị về thuốc nam còn rất khiêm tốn.

1.4. Tổng quan về cây Sói rừng

* **Tên khoa học:** Sói rừng có tên khoa học là *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai. Chloranthaceae)

* **Bộ phận dùng:** toàn cây

* **Tính vị, tác dụng:** vị đắng, cay, tính hơi ấm, có độc, vào kinh tâm, can, tác dụng hoạt huyết, chỉ thống, khu phong, trừ thấp, thanh nhiệt giải độc, kháng virus, kháng khuẩn, kháng u.

* **Các nghiên cứu về cây Sói rừng**

- Ở nước ngoài, có một số nghiên cứu về cây Sói rừng. Tuy nhiên, các nghiên cứu này tập trung chủ yếu trên thực nghiệm. Kết quả các nghiên cứu đã xác định thành phần hóa học chính của cây Sói rừng là sesquiterpen, coumarin, flavonoid, triterpenoid, saponin, caroten, chất béo, polysaccharide. Trong đó saponin, coumarin, sesquiterpen và flavonoid là các nhóm chất chính. Một số nghiên cứu *in vitro* cho thấy dịch chiết sói rừng có tác dụng ức chế sự phát triển một số dòng tế bào ung thư người (Hep-A549, HCT-29, BGC-823...) và ức chế sự phát triển các tế bào u *in vivo*, cải thiện tỉ lệ và số lượng tế bào miễn dịch, tăng trọng lượng lách, tuyến ức và tăng số lượng bạch cầu của chuột được cấy truyền tế bào ung thư.

- Ở Việt Nam, cây Sói rừng mới được sử dụng trong dân gian với các trường hợp bong gân, đau xương khớp và một số nghiên cứu cho thấy cây sói rừng có tác dụng giảm đau và chống oxy hóa. Tuy nhiên, chưa có những minh chứng khoa học về tác dụng kháng u của cây thuốc này. Vì vậy, cây thuốc chưa được đưa vào chuyên luận Dược điển Việt Nam. Do đó, cần có những nghiên cứu chuyên sâu trên thực nghiệm để cung cấp những minh chứng khoa học, qua đó để có thể tận dụng, phát triển cây thuốc quý này.

Chương 2

CHẤT LIỆU - ĐỐI TƯỢNG - PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Chất liệu nghiên cứu

- Cỏm cây sói rừng được bào chế từ thân cây Sói rừng tại Khoa dược bệnh viện Y học cổ truyền Cao Bằng. Cỏm cây sói rừng đạt tiêu chuẩn cơ sở.

- Thuốc đối chứng: viên nén Purinethol (6 – MP) chứa 50mg mercaptopurine của công ty GlaxoSmithKline.

2.2. Đối tượng nghiên cứu

- Chuột nhắt trắng chủng Swiss trưởng thành, khỏe mạnh chủng *Newzealand White* cả 2 giống đạt tiêu chuẩn nghiên cứu do các trung tâm chăn nuôi động vật thí nghiệm có uy tín cung cấp.
- Dòng tế bào u sarcoma 180 (S-180): do Ngân hàng nuôi cấy tế bào Mỹ cung cấp, được hoạt hóa và nhân nuôi tại Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

- **Nghiên cứu độc tính cấp:** Xác định LD50 theo phương pháp Litchfield – Wilcoxon.
- **Nghiên cứu độc tính bán trường diễn:** được tiến hành theo hướng dẫn của Tổ chức Y tế thế giới
- **Nghiên cứu tác dụng kháng u rắn S- 180 của cốm cây sói rừng trên chuột nhắt:** các lô chuột sau 5 ngày cấy truyền tế bào S-180 được cho uống nước cất, 6-MP và cốm cây sói rừng liều 5g/kg, 10g/kg, 20g/kg thể trọng trong 18 ngày liên tục. Các thông số đánh giá là thể tích khối u, hiệu lực kháng u theo tiêu chuẩn Itokawa; % thời gian sống kéo dài thêm của chuột mang u.
- **Nghiên cứu ảnh hưởng của cốm cây sói rừng trên tỷ lệ tế bào TCD3, TCD4, TCD8, IL-2 và TNF- α của chuột mang u rắn S-180:** sau 18 ngày điều trị, định lượng IL-2 và TNF- α trong huyết tương chuột, số lượng tế bào máu ngoại vi, tỷ lệ TCD3, TCD4, TCD8 tại hạch bạch huyết, trọng lượng tương đối tuyến ức, lách và hình ảnh vi thể tuyến ức, lách.

2.4. Địa điểm thực hiện đề tài:

- Bộ môn Dược lý, trường Đại học Y Hà Nội.
- Bộ môn Sinh học tế bào, Khoa Sinh học, trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc Gia Hà Nội.

2.5. Xử lý số liệu: các số liệu thu thập được xử lý theo theo thuật toán thống kê Y sinh học, sử dụng phần mềm SPSS 18.0. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

Chương 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Xác định độc tính của cỏm cây sói rừng

3.1.1. Độc tính cấp

$LD_{50} = 98,753 (89,065 - 103,597)$ g dược liệu/kg thể trọng

3.1.2. Độc tính bán trường diễn:

* Trong thời gian thí nghiệm, thỏ ở cả 3 lô hoạt động bình thường, nhanh nhẹn, mắt sáng, lông mượt, ăn uống tốt, phân khô. Sau 8 tuần dùng thuốc liên tục với liều 0,6g/kg thỏ và 3g /kg thỏ không gây độc tính trên cơ quan tạo máu và không làm thay đổi chức năng thận thỏ trên xét nghiệm sinh hóa.

* Ảnh hưởng của cỏm cây sói rừng đến chức năng gan

Bảng 3.5. Ảnh hưởng của cỏm cây sói rừng đến hàm lượng albumin, cholesterol và bilirubin trong máu thỏ

Chỉ số nghiên cứu	Thời điểm nghiên cứu	Lô chứng	Lô uống cỏm cây sói rừng 0,6g/kg	Lô uống cỏm cây sói rừng 3g/kg	p
Albumin (g/dl)	Trước uống	6,54±0,25	6,47±0,13	6,44±0,29	> 0,05
	Sau uống 4 tuần	6,20±0,56	6,25±0,61	5,80±0,24	> 0,05
	Sau uống 8 tuần	6,10±1,06	5,91±1,13	5,36±0,20	> 0,05
	p trước - sau	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Cholesterol (mmol/l)	Trước uống	2,20±0,17	2,11±0,24	2,20±0,32	> 0,05
	Sau uống 4 tuần	2,05±0,31	2,13±0,27	2,01±0,17	> 0,05
	Sau uống 8 tuần	2,11±0,29	2,13±0,14	2,06±0,24	> 0,05
	p trước - sau	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Bilirubin (mmol/l)	Trước uống	12,15±0,22	12,15±0,30	12,20±0,29	> 0,05
	Sau uống 4 tuần	12,14±0,30	12,28±0,36	12,27±0,32	> 0,05
	Sau uống 8 tuần	12,20±0,27	12,13±0,28	12,08±0,19	> 0,05
	p trước - sau	> 0,05	> 0,05	> 0,05	

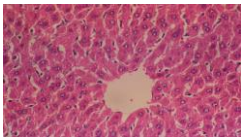
Nhận xét: cỏm cây sói rừng liều 0,6g/kg thể trọng và 3g/kg thể trọng không làm thay đổi các chỉ số albumin, cholesterol và bilirubin toàn phần qua các thời điểm nghiên cứu và không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng.

Bảng 3.6. Ảnh hưởng của cỏ cây sói rừng đến hoạt độ AST, ALT trong máu thỏ

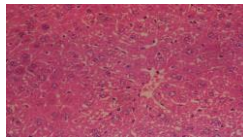
Chỉ số nghiên cứu	Thời điểm nghiên cứu	Lô chứng	Lô uống cỏ cây sói rừng 0,6g/kg	Lô uống cỏ cây sói rừng 3g/kg	p
AST (UI/l)	Trước uống	38,25±10,63	38,54±7,57	41,30±15,45	> 0,05
	Sau uống 4 tuần	42,21±10,57	40,17±5,70	56,10±14,67	> 0,05
	p trước – sau 4 tuần	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
	Sau uống 8 tuần	43,04±16,77	44,36±7,58	66,43±14,01	< 0,05
	p trước – sau 8 tuần	> 0,05	> 0,05	< 0,05	
ALT (UI/l)	Trước uống	43,94±7,51	47,03±7,17	49,95±10,70	> 0,05
	Sau uống 4 tuần	45,40±10,52	55,77±15,46	56,55±10,15	> 0,05
	p trước – sau 4 tuần	> 0,05	> 0,05	< 0,05	
	Sau uống 8 tuần	47,09 ± 9,38	58,11±17,28	73,57±12,31	< 0,05
	p trước – sau 8 tuần	> 0,05	< 0,05	< 0,05	

Nhận xét: cỏ cây sói rừng liều 0,6g/kg làm tăng hoạt độ ALT sau uống 8 tuần và so với lô chứng ($p < 0,05$), với liều 3g/kg thể trọng làm tăng hoạt độ AST, ALT ở các thời điểm nghiên cứu so với lô chứng ($p < 0,05$).

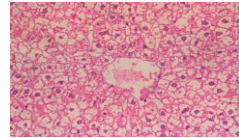
* Ảnh hưởng của cỏ cây sói rừng đến cấu trúc vi thể gan, thận thỏ



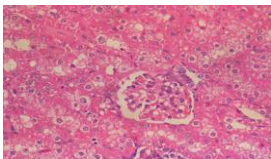
Ảnh 3.1. Hình ảnh vi thể gan thỏ lô chứng (HE x 250)



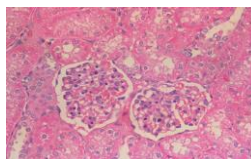
Ảnh 3.2. Hình ảnh vi thể gan thỏ lô sói rừng 0,6g/kg (HE x 250)



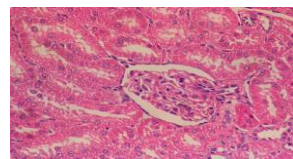
Ảnh 3.3. Hình ảnh vi thể gan thỏ lô sói rừng 3g/kg (HE x 250)



Ảnh 3.4. Hình ảnh vi thể thận thỏ lô chứng (HE x 250)



Ảnh 3.5. Hình ảnh vi thể thận thỏ lô sói rừng 0,6g/kg (HE x 250)



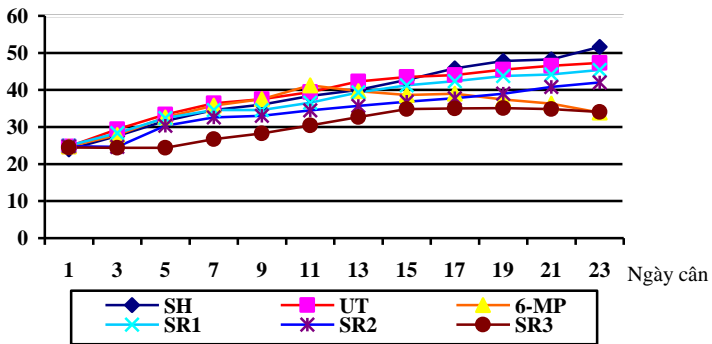
Ảnh 3.6. Hình ảnh vi thể thận thỏ lô sói rừng 3g/kg (HE x 250)

Nhận xét: cỏm cây sói rừng liều 0,6g/kg và 3g/kg thể trọng tỏ gây tổn thương gan thỏ ở các mức độ vừa và nặng tùy theo liều dùng, không làm ảnh hưởng đến hình ảnh vi thể thận thỏ

3.2. Đánh giá tác dụng kháng u rắn sarcoma 180 của cỏm cây sói rừng trên chuột nhắt

3.2.1. Ảnh hưởng của cỏm cây sói rừng đến trọng lượng cơ thể của chuột mang u

Trọng lượng cơ thể

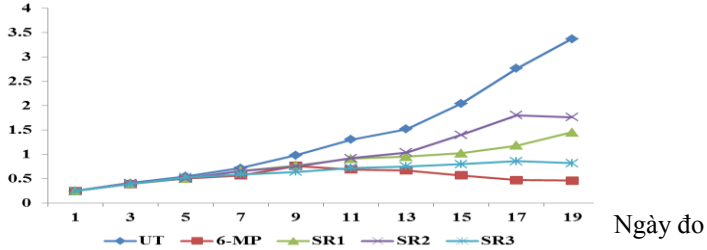


Biểu đồ 3.2. Sự thay đổi trọng lượng cơ thể chuột qua các ngày cân

Nhận xét: Trọng lượng chuột ở các lô đều tăng sau mỗi lần cân. Trọng lượng trung bình của chuột ở lô 6-MP bắt đầu giảm có ý nghĩa thống kê so với các lô từ ngày cân thứ 13 và giảm mạnh ở các ngày cân cuối. Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa 2 lô uống cỏm cây sói rừng liều 5g/kg (SR1) và lô chứng. Ở các lô chuột uống cỏm cây sói rừng liều 10g/kg (SR2) và 20g/kg thể trọng (SR3), trọng lượng chuột thấp hơn hẳn so với lô uống cỏm cây sói rừng liều 5g/kg.

3.2.2. Ảnh hưởng của cốm cây sồi rừng đến sự phát triển khối u

Thể tích trung bình u (cm^3)



Biểu đồ 3.3. Sự thay đổi thể tích trung bình khối u qua các ngày đo

Nhận xét: Từ ngày đo thứ 7, thể tích trung bình khối u ở lô UT tăng liên tục, ở lô 6-MP thể tích khối u giảm sau mỗi lần đo, ở lô SR1 thì tốc độ tăng tăng chậm hơn so với lô UT và lô SR2, lô SR2 có tốc độ tăng nhanh hơn so với lô SR3, còn lô SR3 thể tích khối u tăng ít sau mỗi lần đo.

Bảng 3.9. So sánh sự thay đổi thể tích trung bình khối u giữa các lô chuột vào ngày 23 sau gây u

STT	Lô chuột	n	V trung bình u (cm^3) ($\bar{X} \pm \text{SD}$)	p
1	UT	10	$3,37 \pm 0,33$	$p_{2-3} < 0,05$ $p_{2-4} < 0,05$ $p_{2-5} > 0,05$
2	6-MP	10	$0,46 \pm 0,37^*$	
3	SR1	10	$1,45 \pm 0,96^*$	
4	SR2	10	$1,77 \pm 1,26^*$	
5	SR3	10	$0,82 \pm 0,86^*$	

*: Khác lô UT với $p < 0,05$

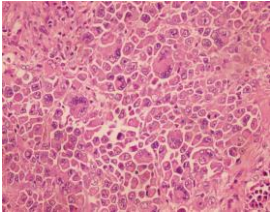
Nhận xét: Thể tích trung bình u ở các lô SR1, SR2 và SR3 giảm có ý nghĩa so với lô UT ($p < 0,05$), nhưng không có sự khác biệt ($p > 0,05$) giữa lô SR3 với lô 6-MP.

Bảng 3.10. Hiệu lực kháng u của các lô điều trị

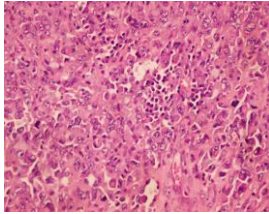
Lô chuột	Tỷ số ức chế u (%)	Hiệu lực kháng u
6-MP	86,35	++
SR1	56,97	+
SR2	47,48	+
SR3	75,67	++

Nhận xét: hiệu lực kháng u của lô SR1 và SR2 là (+), còn lô 6-MP và SR3 đều đạt hiệu lực kháng u (++)

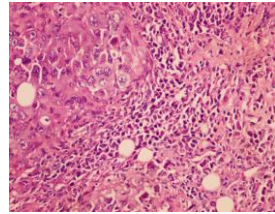
3.2.3. Ảnh hưởng của cốm cây sói rừng đến hình ảnh vi thể khối u



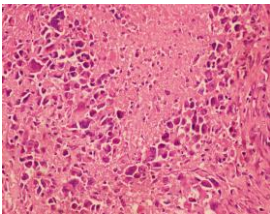
Ảnh 3.10. Hình ảnh khối u lô UT (HE x 400)



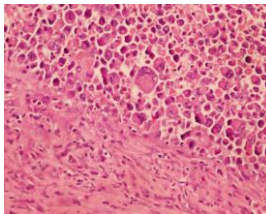
Ảnh 3.11. Hình ảnh khối u lô 6MP (HE x 400)



Ảnh 3.12. Hình ảnh khối u lô SR1 (HE x 400)



Ảnh 3.13. Hình ảnh khối u lô SR2 (HE x 400)



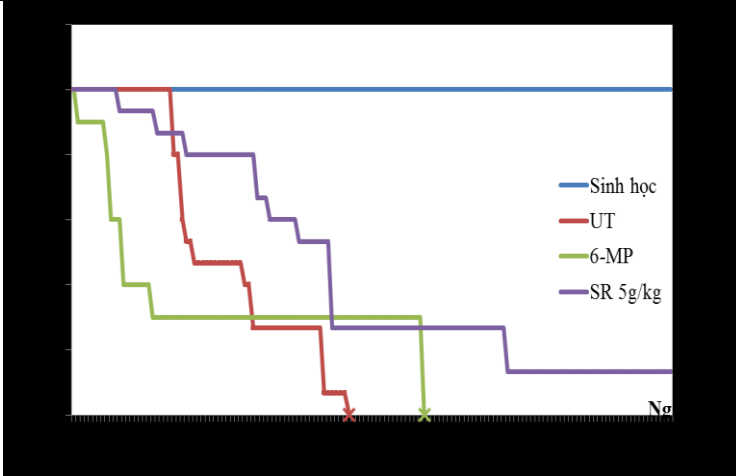
Ảnh 3.14. Hình ảnh khối u lô SR3 (HE x 400)

Nhận xét: cả 5 lô đều có hình ảnh tế bào u đa hình thái. 3 lô SR1, SR2 và SR3 có thâm nhiễm nhiều lympho bào hơn lô 6-MP

3.2.4. Tác dụng của cốm cây sói rừng đến thời gian sống thêm của chuột mang u

Bảng 3.12: Thời gian sống trung bình (TGSTB) và % thời gian sống kéo dài thêm (ILS) của chuột

Chỉ tiêu	Lô chuột			p
	Lô UT	Lô 6-MP	Lô SR1	
TGSTB(ngày)	54,6 ± 15.8	49,2 ± 35.43	84,7 ± 46.4	p < 0,05
ILS (%)		- 9.89	55,13	



Biểu đồ 3.4. Tỷ lệ sống sót của chuột ở các lô thí nghiệm trong 160 ngày theo dõi

Nhận xét: Thời gian sống trung bình lô SR1 kéo dài hơn so với lô 6-MP và lô UT có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Chuột ở lô 6-MP chết sớm nhất, vào ngày 18 của quá trình điều trị, sau đó đến chuột ở lô UT bắt đầu chết vào ngày 41 và chết dần từ ngày 56 đến 82. Chuột ở lô SR1 chết tập trung từ ngày 65 đến 81. Cuối đợt điều trị chỉ còn 2 chuột của lô SR1 sống sót.

3.3. Khảo sát ảnh hưởng của cốm cây sói rừng trên tỷ lệ tế bào CD3, CD4, CD8, LI-2 và TNF- α của chuột mang u rắn sarcoma 180

3.3.1. Đánh giá tình trạng chung của hệ miễn dịch

3.3.1.1. Ảnh hưởng của cốm cây sói rừng đến tuyến ức và lách:

- Trọng lượng tương đối tuyến ức và lách của các lô UT, lô 6-MP và lô SR1 đều tăng có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh học ($p < 0,05$), trong đó lô 6-MP và lô SR1 tăng hơn so với lô UT với $p < 0,05$. Trên hình ảnh vi thể tuyến ức và lách của lô 6-MP và lô SR1 có sự tăng sinh nhiều lympho bào hơn so với lô chứng SH và lô UT.

3.3.1.2. Ảnh hưởng của cỏm cây sói rừng đến tế bào máu ngoại vi

Bảng 3.14. Ảnh hưởng của cỏm cây sói rừng lên số lượng hồng cầu

STT	Lô chuột	n	Số lượng hồng cầu (T/L) ($\bar{X} \pm SD$)	p
1	SH	10	9,48 \pm 0,58	p ₂₋₃ < 0,05 p ₂₋₄ < 0,05 p ₃₋₄ < 0,05
2	UT	10	7,89 \pm 0,67 *	
3	6-MP	10	6,04 \pm 1,24 *	
4	SR1	10	9,40 \pm 0,55	

Bảng 3.15. Ảnh hưởng của cỏm cây sói rừng lên số lượng tiểu cầu

STT	Lô chuột	n	Số lượng tiểu cầu (G/L) ($\bar{X} \pm SD$)	p
1	SH	10	727,80 \pm 200,10	p ₁₋₄ > 0,05 p ₃₋₄ < 0,05
2	UT	10	1407,60 \pm 382,12 *	
3	6-MP	10	512,54 \pm 185,07 *	
4	SR1	10	829,00 \pm 183,16	

Bảng 3.16. Ảnh hưởng của cỏm cây sói rừng lên số lượng bạch cầu

STT	Lô chuột	n	Số lượng bạch cầu (G/L) ($\bar{X} \pm SD$)	p
1	SH	10	6,48 \pm 0,90	p ₁₋₄ > 0,05 p ₃₋₄ < 0,01
2	UT	10	18,96 \pm 9,12 *	
3	6-MP	10	3,49 \pm 0,72 *	
4	SR1	10	7,93 \pm 3,19	

*: Khác lô SH (sinh học) với $p < 0,05$

Nhận xét: Số lượng hồng cầu, bạch cầu và tiểu cầu ở lô SR1 không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô SH, trong khi số lượng các tế bào này giảm có ý nghĩa thống kê ở lô 6-MP so với lô SH và lô SR1.

3.3.2. Đánh giá tỷ lệ các tế bào lympho T và nồng độ IL-2, TNF- α

Bảng 3.18. Ảnh hưởng của cốm cây sói rừng lên tỷ lệ lympho bào TCD3

STT	Lô chuột	n	Tỷ lệ TCD3 (%) ($\bar{X} \pm SD$)	p
1	SH	10	52,31 \pm 6,70	p ₂₋₃ < 0,01 p ₂₋₄ < 0,01 p ₃₋₄ > 0,05
2	UT	10	56,63 \pm 6,14 *	
3	6-MP	10	66,01 \pm 5,71 *	
4	SR1	10	65,63 \pm 8,33 *	

*: Khác lô SH (sinh học) với p < 0,01

Bảng 3.19. Ảnh hưởng của cốm cây sói rừng lên tỷ lệ lympho bào TCD4

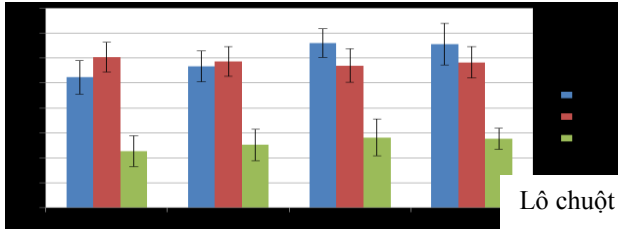
STT	Lô chuột	n	Tỷ lệ TCD4 (%) ($\bar{X} \pm SD$)	p
1	SH	10	60,32 \pm 6,00	p ₂₋₃ > 0,05 p ₂₋₄ > 0,05 p ₃₋₄ > 0,05
2	UT	10	58,61 \pm 6,00	
3	6-MP	10	57,00 \pm 6,71	
4	SR1	10	58,24 \pm 6,30	

Bảng 3.20. Ảnh hưởng của cốm cây sói rừng lên tỷ lệ lympho bào TCD8

STT	Lô chuột	n	Tỷ lệ TCD8 (%) ($\bar{X} \pm SD$)	p
1	SH	10	22,70 \pm 6,21	p ₂₋₃ < 0,05 p ₂₋₄ < 0,05 p ₃₋₄ > 0,05
2	UT	10	25,22 \pm 6,30 *	
3	6-MP	10	28,20 \pm 7,40 *	
4	SR1	10	27,62 \pm 4,23 *	

*: Khác lô SH (sinh học) với p < 0,05

Tỷ lệ (%)



Biểu đồ 3.7. Sự khác biệt trong tỉ lệ các tế bào TCD3, TCD4, TCD8 tại các lô chuột

Nhận xét: Tỷ lệ tế bào CD3, CD8 ở lô 6-MP và lô SR1 tăng có ý nghĩa thống kê so với lô SH và lô UT ($p < 0,05$) nhưng không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa lô 6-MP và lô SR1 ($p > 0,05$).

Bảng 3.21. Ảnh hưởng của cốm cây sói rừng lên nồng độ IL-2 (pg/ml)

STT	Lô chuột	n	Nồng độ IL-2 (pg/ml) ($\bar{X} \pm SD$)	p
1	SH	10	7,33 ± 1,83	p ₂₋₃ < 0,05 p ₂₋₄ < 0,05 p ₃₋₄ > 0,05
2	UT	10	8,14 ± 2,65 *	
3	6-MP	10	12,08 ± 2,33 *	
4	SR1	10	10,53 ± 3,87 *	

*: Khác lô SH (sinh học) với $p < 0,05$

Nhận xét: Nồng độ IL-2 ở lô 6-MP và lô SR1 tăng hơn có ý nghĩa thống kê so với lô SH và lô UT ($p < 0,05$) nhưng không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa lô 6-MP và lô SR1 ($p > 0,05$).

Bảng 3.22. Ảnh hưởng của cốm cây sói rừng lên nồng độ TNF- α (pg/ml)

STT	Lô chuột	n	Nồng độ TNF- α (pg/ml) ($\bar{X} \pm SD$)	p
1	SH	10	25,53 ± 3,97	p ₂₋₃ < 0,05 p ₂₋₄ < 0,05 p ₃₋₄ < 0,05
2	UT	10	26,57 ± 9,41 *	
3	6-MP	10	32,90 ± 10,33 *	
4	SR1	10	38,53 ± 9,97 *	

*: Khác lô SH (sinh học) với $p < 0,05$

Nhận xét: Nồng độ TNF- α ở và lô SR1 tăng hơn có ý nghĩa thống kê so với lô SH, lô 6-MP và lô UT ($p < 0,05$).

Chương 4 **BÀN LUẬN**

4.1. Về độc tính của cỏm cây sói rừng

4.1.1. Độc tính cấp

Qua nghiên cứu độc tính cấp, đã xác định được liều LD₅₀ của cỏm cây sói rừng bằng đường uống trên chuột nhắt thực nghiệm là 98,753 (89,065 – 103,597) g dược liệu/kg thể trọng. Nếu so với liều dùng trên người trong dân gian là 40g dược liệu/ngày thì LD₅₀ gấp 10,27 lần (tính theo hệ số ngoại suy trên chuột nhắt trắng là 12). Theo hướng dẫn của WHO và hướng dẫn nghiên cứu thuốc mới, sử dụng cây sói rừng với liều dân gian là tương đối an toàn. Khi so sánh với các thuốc có nguồn gốc dược liệu khác thì cỏm cây sói rừng thuộc loại có độc, bởi đa số các dược liệu khi nghiên cứu độc tính cấp đều không xác định được LD₅₀

4.1.2. Độc tính bán trường diễn

Kết quả nghiên cứu cho thấy sau 8 tuần uống cỏm cây sói rừng, thể trọng thỏ, số lượng hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu, phần trăm các loại bạch cầu, hematocrite và hàm lượng hemoglobin không có sự biến đổi ở cả lô chứng và các lô uống sói rừng. Như vậy cỏm cây sói rừng không làm ảnh hưởng đến tình trạng chung và chức năng tạo máu của thỏ bình thường, trưởng thành. Kết quả nghiên cứu ở bảng 3.5 cho thấy cả cỏm cây sói rừng liều 0,6g/kg và 3g/kg đều không ảnh hưởng đến nồng độ albumin, bilirubin và cholesterol trong huyết thanh thỏ. Điều đó chứng tỏ cỏm cây sói rừng không ảnh hưởng đến chức năng chuyển hóa protein, lipid cũng như chức năng bài tiết và chuyển hóa mật của gan nhưng kết quả định lượng hoạt độ ALT và AST trong huyết thanh thỏ ở thời điểm sau 8 tuần nghiên cứu cho thấy hoạt độ 2 enzym này ở lô uống cỏm cây sói rừng liều 3g/kg đều tăng cao hơn so với lô chứng và sự khác biệt có ý

nghĩa với $p < 0.05$. Còn với lô cốm cây sói rừng liều 0,6g/kg chỉ làm tăng hoạt độ ALT. Trên chức năng thận, cốm cây sói rừng không gây ra các tác dụng phụ. Theo kết quả mô bệnh học, cốm cây sói rừng liều 3g/kg (gấp 5 lần liều dự kiến cho người trên lâm sàng) gây tổn thương cấu trúc vi thể gan thỏ. Nghiên cứu về tác dụng gây độc tế bào của cây sói rừng cũng cho thấy có tác dụng với 2 dòng tế bào ung thư gan và ung thư máu. Như vậy, có thể thấy trong cây sói rừng có thành phần gây độc. Đây có thể là nguyên nhân dẫn đến độc tính của cây. Trong y học cổ truyền, cây sói rừng cũng được xếp vào nhóm dược liệu có tính độc.

4.2. Về tác dụng kháng u rắn sarcoma 180 của cốm cây sói rừng trên chuột nhắt

4.2.1. Ảnh hưởng của cốm cây sói rừng tới thể trạng chung của chuột và sự phát triển khối u trên chuột

Các lô chuột 6-MP, lô SR1 và lô chuột UT không có sự thay đổi về hoạt động ăn uống so với lô SH còn ở 2 lô SR2 và lô SR3 chuột có biểu hiện ăn kém hơn nhiều so với các lô chuột còn lại. Kết quả biểu đồ 3.2 cho thấy vào ngày đầu tiên của quá trình điều trị, trọng lượng của các lô chuột tương đương nhau và chuột ở các lô đều tăng trọng lượng sau mỗi lần cân nhưng cùng một điều kiện thí nghiệm, chuột lô SR2 và đặc biệt là lô SR3 có trọng lượng thấp hơn hẳn so với các lô còn lại ($p < 0,05$). Còn đối với lô 6-MP, trọng lượng trung bình của chuột bắt đầu giảm từ ngày 13 sau uống thuốc và giảm mạnh sau khi điều trị ở các lần cân cuối. Như vậy, với liều 20g/kg thể trọng chuột, cốm cây sói rừng đã ảnh hưởng tới sự phát triển cân nặng của chuột.

Kết quả biểu đồ 3.3 cho thấy khối u rắn cây ghép dưới da ở các lô chuột tăng trưởng kích thước qua các lần đo, kích thước u tăng đều ở tất cả các lô. Tuy nhiên đến ngày đo thứ 7, kích thước u bắt đầu có sự sai khác. Ở lô UT kích thước u tăng mạnh, ở các lô chuột uống cốm SR kích thước u có tăng nhưng tốc độ tăng trưởng khối u thấp hơn so với lô UT. Ở lô SR3 khối u tăng kích thước chậm hơn hẳn so với 2 lô uống SR1 và SR2, lý do có thể do liều 20g/kg bằng $1/3 LD_{50}$, gần sát với liều gây độc

vi vậy mà cũng có tác dụng gây độc cao hơn với các tế bào ung thư. Còn ở lô uống SR2 thì kích thước u lại tăng nhanh hơn là lô uống SR1. Điều này rất có ý nghĩa trong điều trị vì có thể giảm bớt liều lượng thuốc mà hiệu quả đạt được là tương tự. Với lô 6-MP thì thể tích khối u giảm dần và giảm rõ so với các lô chuột khác. Sự khác biệt về quá trình phát triển u dẫn đến sự khác biệt về thể tích trung bình khối u giữa các lô chuột khi kết thúc thí nghiệm. Thể tích trung bình khối u ở lô 6-MP là nhỏ nhất với tỷ lệ ức chế u đạt 86,35%. Sau đó lần lượt là các lô SR3, SR1, SR2 với tỷ lệ ức chế u tương ứng là 75,67%; 56,97% và 47,48%. Theo thang đánh giá Itokawa, các lô 6-MP, SR3 đều đạt hiệu lực kháng u (++), còn lô SR1 và SR2 đạt (+).

Trên hình ảnh vi thể khối u ở lô SR1, SR2 và SR3, có sự tập trung nhiều tế bào lympho và tương bào tại mô ung thư. Ở lô 6-MP, mật độ tập trung các tế bào lympho và tương bào ít hơn. Với lô UT, vùng rìa u lại có nhiều bạch cầu đa nhân và một ít lympho bào. Với mức độ thâm nhiễm các tế bào lympho tăng cao tại mô ung thư ở các lô chuột ung thư được uống 6-MP hoặc cốm cây sói rừng đã làm cho hạn chế sự phát triển của khối u. Tác dụng ức chế phát triển khối u *in vivo* của cây sói rừng có thể do sự có mặt của saponin, flavonoid, polysaccharide và sesquiterpen trong thành phần hóa học của cây. Qua nhiều nghiên cứu của các tác giả trong và ngoài nước đã chứng minh saponin có tác dụng chống ung thư trên thực nghiệm; flavonoid làm bất hoạt của một số tác nhân gây ung thư, kết thúc chu kỳ tế bào, khởi phát apoptosis và ức chế sự hình thành mạch máu trong khối u, chống oxy hóa; polysaccharidee ức chế sự sinh trưởng của các tế bào ung thư bằng cách ức chế tạo mạch tại khối u, tăng cường và điều chỉnh chức năng miễn dịch.

4.2.2. Ảnh hưởng của cốm cây sói rừng tới thời gian sống thêm của chuột

Cốm cây sói rừng liều 20g/kg có tác dụng hạn chế sự phát triển ung thư sarcoma 180 *in vivo* cao hơn 2 liều 5g/kg và 10g/kg thể trọng nhưng lại làm ảnh hưởng tới tình trạng chung của chuột (ăn kém,

giảm trọng lượng), còn liều 5g/kg lại có tác dụng tương đương liều 10g/kg. Vì vậy, liều 5g/kg cân nặng sẽ được tiếp tục nghiên cứu một số chỉ tiêu khác để góp phần khẳng định hiệu quả của thuốc. Thời gian sống thêm sau điều trị là một chỉ tiêu rất có ý nghĩa để đánh giá hiệu quả tổng hợp của các liệu pháp điều trị ung thư. Kết quả ở bảng 3.12 và biểu đồ 3.4 cho thấy: chuột đầu tiên bị chết là ở lô 6-MP và số chuột chết tập trung xuất hiện ở thời điểm sớm nhất. Ở lô UT, thời điểm mà chuột chết nhiều cũng sớm hơn so với lô SR1. Kết thúc đợt điều trị, chỉ còn 2 chuột ở lô SR1 sống sót. Thời gian sống trung bình của lô chuột ung thư uống sỏi rừng liều 5g/kg đã kéo dài hơn so với lô chuột ung thư không điều trị là 35 ngày. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Trong khi đó, lô chuột ung thư uống 6-MP lại có thời gian sống trung bình ít hơn lô ung thư không điều trị 6 ngày.

4.3. Về khảo sát ảnh hưởng của corm cây sỏi rừng trên tỷ lệ tế bào CD3, CD4, CD8, IL-2 và TNF- α của chuột mang u rắn sarcoma 180

4.3.1. Về tình trạng chung của hệ miễn dịch

4.3.1.1. Biến đổi trọng lượng tương đối và cấu trúc vi thể tuyến ức

Trọng lượng tương đối tuyến ức và lách ở cả 3 lô UT, lô 6-MP và lô SR1 đều tăng lên có ý nghĩa so với lô SH nhưng mức độ tăng của lô 6-MP và lô SR 1 so với lô UT là cao hơn có ý nghĩa với $p < 0,05$. Trong khi đó, mức độ tăng của lô 6-MP so với lô SR 1 không có sự khác biệt ($p > 0,05$). Những kết quả này cũng phù hợp với những hình ảnh cấu trúc vi thể tuyến ức và lách. Ở các lô chuột UT và lô 6-MP có hình ảnh tăng số lượng lympho bào và kích thước của tủy trắng. Còn đối với lô RS1 thì mật độ tập trung các tế bào lympho cũng như kích thước của tủy trắng tăng rất mạnh. Kết quả này cũng tương tự như các nghiên cứu trước đây của Wen J. (2003) và Sun W. (2003) về cây này. Kết quả của các tác giả đó cũng cho thấy cây sỏi rừng đã kích thích đáp ứng miễn dịch chống ung thư *in vivo* thông qua tác dụng làm tăng trọng lượng và biến đổi hình thái vi thể tuyến ức và lách.

4.3.1.2. Ảnh hưởng của cốm cây sói rừng đến tế bào máu ngoại vi

Kết quả nghiên cứu ở bảng 3.14, 3.15, 3.16 cho thấy: chuột ở lô UT có số lượng hồng cầu giảm 15% so với chuột ở lô SH. Ở lô 6-MP số lượng hồng cầu giảm 23,48% so với lô UT, số lượng tiểu cầu giảm 30% so với lô chuột SH, số lượng bạch cầu giảm xuống chỉ còn 53% so với lô SH ($p < 0,05$). Còn với lô SR1 thì số lượng hồng cầu, bạch cầu và tiểu cầu không có sự khác biệt so với lô SH ($p > 0,05$). Kết quả này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của Wen J. và cộng sự (2003), Leng Y. và cộng sự (2010), Chương Võ Cường (2011). Thuốc 6-MP có tác dụng ức chế quá trình tổng hợp và trao đổi các nucleotid thuộc nhóm purin, làm biến đổi quá trình tổng hợp và chức năng của RNA và DNA. 6-MP được chỉ định trong các trường hợp ung thư mô liên kết như bạch cầu cấp, bạch cầu tủy mạn. Một trong những tác dụng phụ của thuốc là gây suy tủy nặng. Vì thế đó có thể là nguyên nhân làm giảm cả 3 dòng hồng cầu, bạch cầu và tiểu cầu ở lô chuột 6-MP so với các lô chuột khác. Đây sẽ là một ưu thế của cốm cây sói rừng đối với thuốc 6-MP.

4.3.2. Về ảnh hưởng tới tỷ lệ tế bào T và nồng độ IL-2, TNF- α

4.3.2.1. Về tỷ lệ tế bào T

Kết quả ở bảng 3.14, 3.15, 3.16 và biểu đồ 3.7 cho thấy ở các lô chuột cấy chuyển tế bào ung thư sarcoma 180 đều có tỷ lệ tế bào TCD3, TCD8 tăng lên rõ rệt so với lô SH nhưng tỉ lệ tế bào lympho TCD4 có xu hướng giảm hơn. Tuy nhiên, so với lô UT thì tỷ lệ tế bào TCD3, TCD8 ở lô SR1 và lô 6-MP tăng cao hơn ($p < 0,05$) nhưng. Điều này cũng phù hợp với hình ảnh vi thể của khối u, tuyến ức và lách ở các lô chuột với mật độ thâm nhiễm các tế bào lympho từ ít đến nhiều lần lượt tương ứng là lô UT, lô 6-MP, lô SR1. Khoảng 90% các tế bào đã biểu lộ CD3 thì sẽ hoặc phải biểu lộ CD4, hoặc phải biểu lộ CD8. Do đó, sự tăng tỉ lệ CD3 sẽ xảy ra nếu tỉ lệ CD8 tăng, hoặc tỉ lệ CD4 giảm hoặc cả hai trường hợp trên. Trong nghiên cứu này, tỷ lệ lympho TCD4 có xu hướng giảm so với nhóm chứng với sự khác biệt không

có ý nghĩa thống kê, vì vậy có thể coi sự tăng tỷ lệ lympho CD8 là nguyên nhân chính làm tăng TCD3. Như vậy có thể cho rằng 6-MP và cốm cây sói rừng đều tác động lên sự biệt hóa của tế bào lympho T, ưu tiên biệt hóa thành tế bào lympho TCD8 thông qua tăng cường biệt hóa các tế bào TCD3. Các nhà khoa học đã xác định được các hoạt chất chính trong thành phần hóa học cây sói rừng ngoài flavonoid, polysaccharide còn có coumarin. Chất này đã được nhiều tác giả chứng minh có tác dụng ức chế sự phát triển của tế bào ung thư *in vitro*, *in vivo*, tăng cường điều hòa miễn dịch thông qua tăng cường số lượng tế bào TCD4, TCD8, nồng độ IL-2 và TNF- α .

4.3.2.2. Về nồng độ IL-2 và TNF- α

Kết quả nghiên cứu trong bảng 3.21, 3.22 cho thấy: nồng độ IL-2, TNF- α ở cả 3 lô chuột bị ung thư đều tăng lên so với lô chuột khỏe mạnh (lô SH). Chuột ở lô SR1 có sự biểu hiện IL-2 và TNF- α cao hơn so với lô UT ($p < 0,05$). Ở lô SR1 có nồng độ IL-2 cao mặc dù tỷ lệ tế bào biểu lộ TCD4 giảm so với đối chứng. Điều này có thể do cốm cây sói rừng không kích thích tăng sinh số lượng CD4 nhưng gây tăng hoạt tính của các tế bào lympho này dẫn đến sự tăng hàm lượng IL-2 trong huyết thanh của chuột được điều trị. Ngoài ra, IL-2 còn do một số tế bào khác tiết ra như TCD8, đại thực bào... Như vậy, các kết quả trên phần nào phù hợp với kết quả đếm tế bào TCD8, có thể khi số lượng các tế bào CD8 tăng lên cao đồng nghĩa với sự chế tiết IL-2 cũng tăng lên.

4.3.3. Tác dụng kháng u và tăng cường miễn dịch của cây sói rừng theo quan điểm của y học cổ truyền

Các thuốc YHCT điều trị chứng nam được phân ra 2 nhóm chính là nhóm phù chính và nhóm khu tà. Sự liên quan chặt chẽ giữa phù chính - khu tà với miễn dịch liệu pháp góp phần nâng cao hiệu quả điều trị nam chứng. Theo quan điểm của YHCT, cây sói rừng có tác dụng hoạt huyết, thanh nhiệt giải độc chữa sang chấn, đau nhức xương khớp, ung nhọt, các

chứng viêm nhiễm. Trên mô hình ung thư thực nghiệm trong nghiên cứu này, cây sói rừng đã hạn chế được sự phát triển tế bào ung thư thực nghiệm, tăng cường miễn dịch của cơ thể thông qua làm tăng tỷ lệ tế bào lympho TCD3, TCD8, tăng nồng độ IL-2 và TNF- α . Như vậy, nếu xét về góc độ YHCT, cây sói rừng thuộc nhóm thuốc khu tả điều trị ung thư. Còn theo phân loại thuốc điều trị ung thư của YHHĐ thì cây sói rừng thuộc nhóm thuốc điều hòa miễn dịch (điều biến miễn dịch). Vậy có thể cây sói rừng đã giúp cơ thể tăng cường miễn dịch tạo điều kiện cho việc kìm hãm tế bào ung thư phát triển.

KẾT LUẬN

1. Độc tính cấp và bán trường diễn của côm cây sói rừng

- Về độc tính cấp: Đã xác định được $LD_{50} = 98,753$ (89,065 – 103,597) g được liệu/kg thể trọng bằng đường uống trên chuột nhắt trắng thực nghiệm

- Về độc tính bán trường diễn trên thỏ thực nghiệm

+ Với liều 3g/kg thể trọng côm cây sói rừng đã làm tăng hoạt độ AST, ALT trong huyết thanh so với lô chứng và so với trước khi uống thuốc với $p < 0,05$ nhưng với liều 0,6g/kg thể trọng chỉ làm tăng hoạt độ ALT với $p < 0,05$.

+ Với cả 2 liều: Côm cây sói rừng gây biến đổi hình thái vi thể của gan thỏ với các mức độ khác nhau nhưng không ảnh hưởng đến chức năng chuyển hóa & bài tiết mật của gan, chức năng tạo máu, chức năng lọc của cầu thận, hình thái đại thể, vi thể thận thỏ.

2. Tác dụng kháng u rắn sarcoma 180 của côm cây sói rừng trên chuột nhắt .

- Côm cây sói rừng liều 5g/kg, 10g/kg và 20g/kg thể trọng đã có tác dụng ức chế sự phát triển khối u, so với lô ung thư không được điều trị, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$; đạt hiệu lực kháng u lần lượt là (++) với liều 20g/kg thể trọng; (+) với liều 5g/kg thể trọng chuột nhắt và liều

10g/kg thể trọng.

- Cỏm cây sói rừng liều 5g/kg thể trọng đã kéo dài thời gian sống thêm cho chuột mang khối u sarcoma 180 lên 155,13%, so với lô ung thư không được điều trị và lô ung thư điều trị bằng 6-MP, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

3. Ảnh hưởng của cỏm cây sói rừng trên tỷ lệ tế bào TCD3, TCD4, TCD8, nồng độ IL-2 và TNF- α của chuột mang u rắn sarcoma 180.

- Cỏm cây sói rừng liều 5g/kg thể trọng làm tăng trọng lượng tuyến ức tương đối, trọng lượng lách tương đối so với lô chứng với $p < 0,05$; tăng sinh tế bào lympho trên vi thể tuyến ức, lách

- Cỏm cây sói rừng liều 5g/kg thể trọng làm tăng tỷ lệ tế bào lympho TCD3, TCD8, tăng nồng độ các cytokin: IL-2, TNF- α so với lô chứng với $p < 0,05$.

- Cỏm cây sói rừng liều 5g/kg thể trọng có xu hướng làm giảm tỷ lệ tế bào TCD4 so với với lô chứng nhưng không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$.

KIẾN NGHỊ VÀ ĐỀ XUẤT

- Cần nghiên cứu kỹ hơn về độc tính của cây sói rừng, đặc biệt độc tính trên gan, cần xác định rõ thành phần có hoạt tính và thành phần gây độc trong cây sói rừng.

- Tiếp tục nghiên cứu cơ chế kháng ung thư của cây sói rừng

- Cần tiến hành các thử nghiệm lâm sàng để đánh giá tính an toàn và hiệu quả của cây sói rừng trước khi sản phẩm được đưa vào sử dụng cho người.

INTRODUCTION

Cancers have been considering to be a disease of modern society. Along with genetic factors, toxic chemicals from household appliances, UV, industrial dust, polluted living environment, unhealthy lifestyles, alcohol and tobacco abuse... have remarkably increased the incident number of cancers throughout the world. Modern medicine has many effective therapies to treat cancers. Numbers of herbals and remedies of traditional medicine have supportive effects in cancers treatment in two aspects: Promoting body's immune reaction and inhibiting the development of tumors. The combination between modern medicine and traditional medicine has proved the advantages of traditional herbals and reduced maximum adverse side effects of modern medicine therapies. One of the current research directions is to look for natural originated medicinal plants which have effects in promoting immune and inhibiting development of cancer cells. Soi rung (*Sarcandra Glabra* (Thunb.) Nakai.) is a Vietnamese herbal available in the mountain areas of Vietnam, has been recorded its supportive effect in treating some types of cancers by international documents. In Vietnam, so far no studies have been fully conducted on the effects of this plant. Whether Vietnamese Soi runghas the same effects as the one planted oversea? In order to answer this question, we conducted this research on Soi rung with the following objectives:

- 1. Study on the acute and sub – chronic toxicity of Soi rung granule.***
- 2. Evaluate the growth inhibitor of sarcoma 180 solid tumor effect of Soi rung granule on mice.***
- 3. Investigate the affects of Soi rung granule on the ratio of TCD3, TCD4, TCD8 cells, IL-2 and TNF a concentration of rats bearing sarcoma 180 solid tumor.***

NEW CONCLUSIONS OF THE THESIS

Scientific value

This is the first research on the experimental cancer treatment of *Sarcandra Glabra* (Thunb.) Nakai conducted in Vietnam, giving the premise for following researches in studying the cancer inhibitor mechanism of herbals.

Reality value

The thesis has provided the scientific results of toxicological studies, sarcoma 180 antitumor effects and immune promoting of Soi rung granule on experimental animals. It is the reality base for application of Soi rung in Vietnam, preventing medicinal plants drain.

New conclusions

- Acute toxicity and semi-chronic toxicity:
 - Acute toxicity: Determined oral LD₅₀ of Soi rung granule as 98.753g herb/kg of mouse weight.
 - Sub chronic toxicity: Compared with the control group and before using, dose of 0.6g and 3g Soi rung granule/kg of rabbit weight (5 times greater than the clinical dose) was used for 8 weeks continuously, which caused microscopic morphological changes of the rabbits' liver with different levels, which increased serum AST, ALT level ($p < 0.05$) but did not affect the metabolic function of liver, hematopoietic function as well as function of glomerular filtration, macroscopic and microscopic morphological kidney of experimental rabbits ($p > 0.05$).
- Sarcoma 180 antitumor effect:
 - With doses 5g/kg, 10g/kg and 20g/kg of mouse weight, Soi rung granule inhibited experimental tumor growth. Dose 5g Soi rung granule/kg mouse weight has prolonged lifespan for mice bearing sarcoma 180 than control group ($p < 0.05$).
- Effects on TCD3, TCD4, TCD8, IL-2, and TNF- α ratio in mice bearing sarcoma 180 solid tumor:

- The dose 5g Soi rung granule/kg of mouse weight increased the relative weight of the thymus gland and spleen as well as lymphocyte proliferation on microscopic thymus and spleen compared to control group ($p < 0.05$).
- Proportion of TCD3, TCD8 lymphocyte, the concentration of IL-2 and TNF- α in mice using 5g Soi rung granule/kg of mouse weight has significantly increased compared to control group ($p < 0.05$). TCD4 ratio decreased without statistical significance in comparing with control group ($p > 0.05$).

THESIS CONSTRUCTION

Thesis contains of 128 pages, including 2 pages of Introduction; 33 pages of Chapter 1: Overview of documents, 17 pages of chapter 2: Research materials, subjects and methodology; 39 pages of Chapter 3: Research results; 34 pages of Chapter 4: Discussion; 2 pages of Conclusion and 1 page of Recommendation. Thesis has referenced 205 documents with 84 in Vietnamese, 16 in Chinese and 105 in English. Thesis was illustrated by 23 tables, 18 figures, diagrams, graphs and 31 pictures.

Chapter 1

OVERVIEW OF DOCUMENTS

1.1. Cancer and immune response in cancer

1.1.1. Etiology and pathogenesis mechanism

Cancer is a malignant disease of cells, in which cancer cells grow remarkably, unorganized and often invade into adjacent organs and cause function disorders of these organs. The etiology of cancer includes exogenous causes (physics, chemics, biology factors) and endogenous causes (hormones, free radical, genetics factors...). Most of cancers happen due to DNA mutation in stem cells when cells expose to carcinogenic factors and mistakes in DNA replication inside cells, relating

to 4 types of gen: oncogenes, tumor suppressor genes, self destruction genes, DNA repair genes.

1.1.2. Cancer treatment

Cancer develops in a relatively long period from activation, so the treatment must be started as soon as possible. In metastasis stage, the treatment becomes extremely difficult and leads to high rate of death. There are many therapies for cancer treatment such as operation, chemotherapy, radiation therapy, hormone therapy, biology (immune) therapy, cell targeted therapy and stem cell implant. Choosing suitable treatment or the combination treatment must base on each cancer stage.

1.1.3. Immune response in cancer

Cancer antigens once appear in human body are controlled by the immune system. Nonspecific immune effectors cells (macrophage, microphage, natural killer cells) harm cancel cells, leading to destroy or inhibit them. Humoral immune response involves in destroying cancer cells by activating complement and are cytotoxic to antibodies –depending cancer cells by NK (nature killer) cells. Cytotoxic T cells (Tc) has important role in immune response against cancer. MHC (Major Histocompatibility Complex) on cell surface is the target for T cell to recognize antigen and destroy cancer cells.

1.1.4. Experimental model in cancer treatment

In vitro and *in vivo* research models are often used to investigate preclinical antitumor effect of studying drugs. *In vitro*, studying drugs are directly kept with cancer cells from human or animal, which are grown in certain condition and environment. Experiments on animal and clinical trials are two forms of *in vivo* study. This is a mandatory step before applying on human in oncology field. Rabbits, cats, mice, primates are used in *in vivo* study on oncology, which mice are more widely used. There are two ways to implant tumor in *in vivo* model: Cell line implants on animals or human tumor xenograft implants.

1.2. Traditional medicine concepts on cancer

1.2.1. Etiology and pathology mechanism

Cancer belongs to Ai Zheng 癌 症 in traditional medicine. The etiology includes exogenous, endogenous and miscellaneous causes. The pathology mechanisms are due to toxic heat, energy and blood stagnation, phlegm stagnation, vital energy deficiency, causing energy injury, energy and blood stasis, and forming masses after a long term.

1.2.2. Tumors treatment

According to traditional medicine, cancer is a systemic disease but having local appearance, therefore the treatment must pay attention to increase human resistance ability to control tumors growth and must base on the principle of treating with both elimination and reinforcement (anticancer). Reinforcement includes tonifying spleen and regulating energy, tonifying yin and creating fluid, cool and enriching yin and tonifying blood, warm and tonifying spleen and kidney. Elimination and anticancer include clearing heat and inflammation, regulating blood and resolving stasis, removing phlegm and soften masses, destroying tumors.

1.3. Researches on cancer treatment of traditional medicine

The researches on cancer treatment by traditional medicine include *in vitro* and *in vivo* studies. Some herbals have anticancer effects such as *Gordonia Longicarpa*, *Palhinhaea Cernua* Lycopodiaceae, *Pterocarpus Soyauxii*... Besides, some studies on the effect of traditional remedies, products combining traditional and modern medicine in clinical have been conducted to evaluate the supportive effect in cancer treatment, like Phylamin, Aslem, Angala, Lingzhi – False Ginseng, Cadef, Curcumin... These researches' results show that traditional medicine has immune promoting effect, increasing lympho cells and reducing red blood cells, white blood cells and platelets drop in patient having chemotherapy and

radiation therapy. The combination elevates treatment effects, scientific value and ensuring ethnic in research. However, researches on a particular herbal, especially a Vietnamese plant, are still lacking.

1.4. Overview of Soi rung

* **Scientific name:** *Sarcandra Glabra* (Thunb.) Nakai. (Chloranthaceae).

* **Used parts:** Whole plant.

* **Characteristics, effects:** Bitter, pungency, mild warm, contains toxic. Affecting liver and heart meridians. Regulate blood, stop pain, dispel wind, drain dampness, clear heat and inflammation, antivirus, antibacterial, antitumor.

*** Studies on Soi rung**

- Studies on Soi rung oversea mainly focused on experiments, have specified the chemical components of Soi rung: sesquiterpen, coumarin, flavonoid, triterpenoid, saponin, caroten, lipid, polysaccharid, in which saponin, coumarin, sesquiterpen and flavonoid are the main components. Some *in vitro* studies shows that Soi rung extracts have the effect of inhibiting some human cancer cell lines growth (Hep-A549, HCT-29, BGC-823...) and inhibiting tumor growth *in vivo*, improving ratio and increasing immune cells, spleen weight, thymus and white blood cells os mice implanted cancer cells.

- In Vietnam, Soi rung has only been used in folk for spraines, joints and skeletal pains and some studies concluded its effects of analgesia and antioxidant. However, because scientific evidence on antitumor effect of this plant hasn't been reported, Soi rung wasn't listed in Vietnam pharmacopeia yet. Therefore professional experimental researches are needed to explore the scientific evidence, in order to apply and develop this medicinal plant.

Chapter 2

RESEARCH MATERIALS – SUBJECTS – METHODOLOGY

2.1. Research materials

- Soi rung granule was manufactured from Soi rung plant's stem at Pharmacology department, Cao Bang traditional medicine hospital, passing local standards.
- Control drug: Purinethol (6 – MP) tablet contains 50mg mercaptopurine, manufactured by GlaxoSmithKline.

2.2. Research subjects

- Swiss grown white mice, healthy New Zealand white rabbits, both passed research standards and provided by prestigious centres of experimental animals.
- Sarcoma 180 (S-180) cell line: Provided by American Association of Tissue Banks, activated and grew at Biology department, Natural science University, Hanoi National University.

2.3. Research methodology

- *Study on the acute toxicity*: Determine LD50 by Litchfield – Wilcoxon method.
- *Study on the sub - chronic toxicity*: Under the guidance of World Health Organization.
- *Study on growth inhibitor of sarcoma 180 solid tumor effect of Soi rung granule on mice*: After 5 days from S-180 cells implanted, mice groups drink water, 6-MP and Soi rung granule dose of 5g/kg, 10g/kg, 20g/kg of body weight in 18 continuous days. Study figures are tumor volume, antitumor validity by Itokawa standard; % of lifespan of mice bearing tumor.
- *Study on Soi rung granule effect on ratio of TCD3, TCD4, TCD8 cells, IL-2 and TNF- α of mice bearing S-180 solid tumor*: After 18 days of treatment, measure serum IL-2 and TNF- α of mice, count peripheral blood cells, ratio of TCD3, TCD4, TCD8 at lymph nodes, relative weight of thymus, spleen and microscopic of thymus, spleen.

2.4. Research places

- Pharmacology department, Hanoi medical university.
- Cell biology department, Biology department, Natural science university, Hanoi National university.

2.5. Data processing: The collected data is processed in accordance with Biomedical statistical algorithms, using SPSS 18.0 software. The differences are statistically significant at $p < 0.05$.

Chapter 3 RESEARCH RESULTS

3.1. Determine toxicity of Soi rung granule

3.1.1. Acute toxicity

$LD_{50} = 98.753 (89.065 - 103.597)$ g medicinal plant/kg of body weight.

3.1.2. Sub – chronic toxicity

* During the experiment, rabbits in 3 groups operate normally, agile, bright eyes, silky hair, fine dining, dry stool. After 8 weeks of continuously using the study medicine with doses of 0.6g/kg rabbit and 3g/kg rabbit, no toxicity on blood forming system or any changes on rabbit liver and kidney function biochemical tests were observed.

* Soi rung granule effect on liver functions:

Table 3.5. Effects of Soi rung granule on albumin, cholesterol and bilirubin in rabbits blood

Study index	Study time	Control group	0.6g/kg Soi rung granule group	3g/kg Soi rung granule group	p
Albumin (g/dl)	Before treatment	6,54±0,25	6,47±0,13	6,44±0,29	> 0,05
	After 4 weeks	6,20±0,56	6,25±0,61	5,80±0,24	> 0,05
	After 8 weeks	6,10±1,06	5,91±1,13	5,36±0,20	> 0,05
	p before - after	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Cholesterol (mmol/l)	Before treatment	2,20±0,17	2,11±0,24	2,20±0,32	> 0,05
	After 4 weeks	2,05±0,31	2,13±0,27	2,01±0,17	> 0,05
	After 8 weeks	2,11±0,29	2,13±0,14	2,06±0,24	> 0,05
	p before - after	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Bilirubin (fl)	Before treatment	12,15±0,22	12,15±0,30	12,20±0,29	> 0,05
	After 4 weeks	12,14±0,30	12,28± 0,36	12,27±0,32	> 0,05
	After 8 weeks	12,20±0,27	12,13±0,28	12,08±0,19	> 0,05
	p before - after	> 0,05	> 0,05	> 0,05	

Remarks: Doses of 0.6g/kg and 3g/kg of rabbit weight did not change albumin, cholesterol and total bilirubin levels by each study timeline, there was no statistical significance compared to before treatment and between 2 groups ($p < 0.05$).

Table 3.6. Effects of Soi rung granule on AST, ALT levels in rabbit blood

Study index	Study time	Control group	0.6g/kg Soi rung granule group	3g/kg Soi rung granule group	P
AST (U/l)	Before treatment	38,25±10,63	38,54±7,57	41,30±15,45	> 0,05
	After 4 weeks	42,21±10,57	40,17±5,70	56,10±14,67	> 0,05
	p before - after	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
	After 8 weeks	43,04±16,77	44,36±7,58	66,43±14,01	< 0,05
	p before - after	> 0,05	> 0,05	< 0,05	
ALT (U/l)	Before treatment	43,94±7,51	47,03±7,17	49,95±10,70	> 0,05
	After 4 weeks	45,40±10,52	55,77±15,46	56,55±10,15	> 0,05
	p before - after	> 0,05	> 0,05	< 0,05	
	After 8 weeks	47,09 ± 9,38	58,11±17,28	73,57±12,31	< 0,05
	p before - after	> 0,05	< 0,05	< 0,05	

Remarks: Soi rung granule dose 0.6g/kg of body weight increased ALT after 8 weeks and higher than control group ($p < 0.05$), dose 3g/kg of body weight increased AST, ALT at study timelines compared to control group ($p < 0.05$).

* Effects of Soi rung granule on microscopic structure of rabbit liver, kidney:

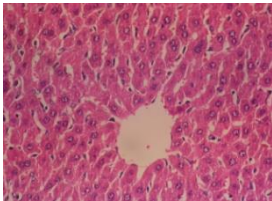


Figure 3.1.
Microscopic image of rabbit liver in control group (HE x 250)

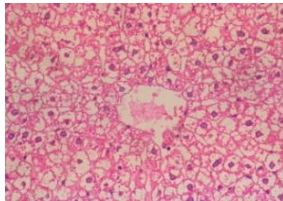


Figure 3.2.
Microscopic image of rabbit liver in 0.6g/kg granule group (HE x 250)

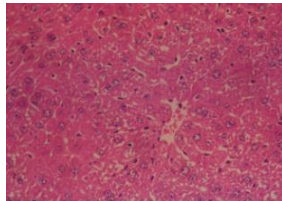


Figure 3.3.
Microscopic image of rabbit liver in 3g/kg granule group (HE x 250)

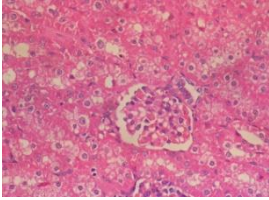


Figure 3.4.
Microscopic image of rabbit kidney in control group (HE x 250)

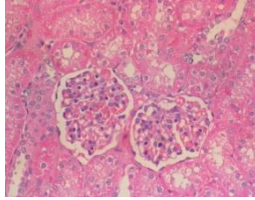


Figure 3.5.
Microscopic image of rabbit kidney in 0.6g/kg granule group (HE x 250)

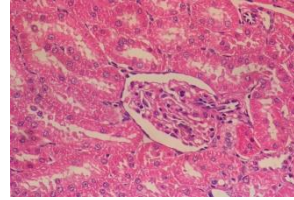
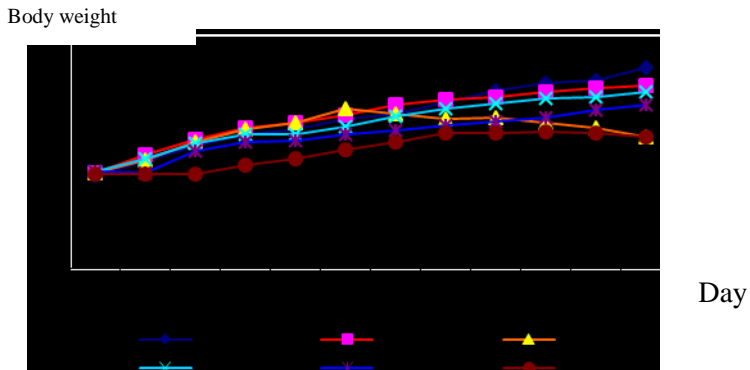


Figure 3.6.
Microscopic image of rabbit kidney in 3g/kg granule group (HE x 250)

Remarks: Soi rung granule dose of 0.6g/kg and 3g/kg rabbit body weight injured liver in mild and severe levels depending on dose. Dose of 3g/kg body weight (5 times higher than clinical dose) injured rabbit kidney mildly.

3.2. Sarcoma 180 antitumor effect of Soi rung granule on mice

3.2.1. Effects of Soi rung granule on weights of mice bearing tumor



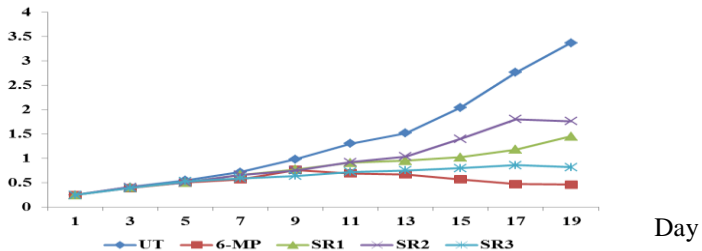
Graph 3.2. Body weight changes by days

Remarks: Mice weight in all groups increased after each time weighing. Mean mice weight in 6-MP group started to decrease significantly compared to other groups from day 13 and remarkably decreased for the last days. There was no statistically significant different between 5g/kg

Soi rung granule (SR1) group and control group. In 10g/kg (SR2) and 20g/kg (SR3) groups, mice weight were clearly slower than Soi rung granule 5g/kg group.

3.2.2. Effects of Soi rung granule on tumor growth

Tumor mean volume (cm³)



Graph 3.3. Tumor mean volume changes by days

Remarks: From day 7, mean volume of tumor in UT group continuously increases, in 6-MP group decreased after each measurement, in SR1 group increasing speed was lower than UT and SR2 groups, SR2 increased faster than SR3 group, in SR3 group the tumor volume just slightly increased after each measurement.

Table 3.9. Compare the mean tumor volume between groups at day 23 after tumor forming

No.	Groups	n	Mean tumor volume (cm ³) ($\bar{X} \pm SD$)	p
1	UT	10	3,37±0,33	p ₂₋₃ < 0,05 p ₂₋₄ < 0,05 p ₂₋₅ > 0,05
2	6-MP	10	0,46± 0,37 *	
3	SR1	10	1,45 ± 0,96 *	
4	SR2	10	1,77±1,26 *	
5	SR3	10	0,82±0,86 *	

*: Different to UT with $p < 0.05$.

Remarks: Mean tumor volume in SR1, SR2 and SR3 groups decreased statistically significant compared to UT group ($p < 0.05$), but no significant different between SR3 and 6-MP groups ($p > 0.05$).

Table 3.10. Antitumor validity of study groups

Groups	Antitumor rate (%)	Antitumor validity
6-MP	86,35	++
SR1	56,97	+
SR2	47,48	+
SR3	75,67	++

Remarks: Antitumor validity of SR1 and SR2 were (+), 6-MP and SR3 were both (++).

3.2.3. Effects of *Soi rung granule* on microscopic image of tumor

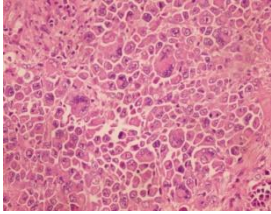


Figure 3.10. Tumor image in UT group (HE x 400)

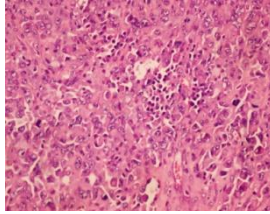


Figure 3.11. Tumor image in 6-MP group (HE x 400)

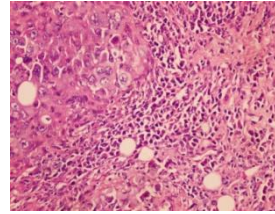


Figure 3.12. Tumor image in SR1 group (HE x 400)

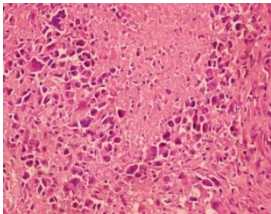


Figure 3.13. Tumor image in SR2 group (HE x 400)

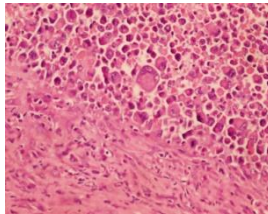


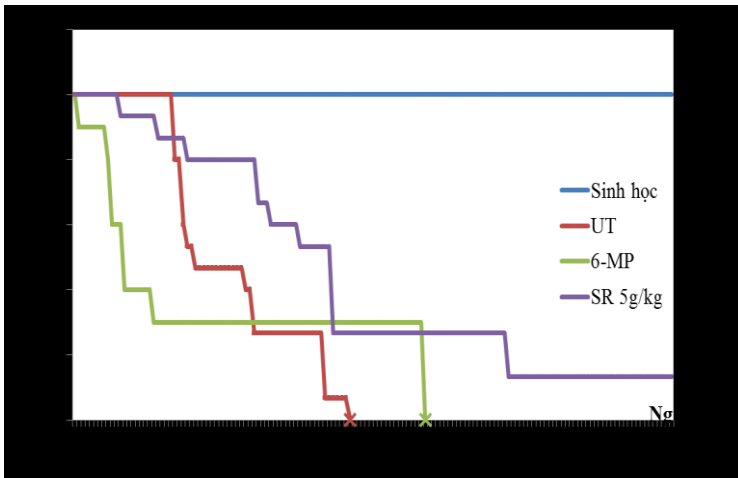
Figure 3.14. Tumor image in SR3 group (HE x 400)

Remarks: 5 groups both had multi-morphology image of tumor cells. SR1, SR2 and SR3 groups had more lymphocytes infiltrated than 6-MP group.

3.2.4. Effects of Soi rung granule on lifespan time of mice bearing tumors

Table 3.12: Mean lifespan time and % lifespan time (ILS) of mice

Index	Groups			p
	UT	6-MP	SR1	
Mean lifespan time (day)	54,6 ± 15.8	49,2 ± 35.43	84,7 ± 46.4	p < 0,05
ILS (%)		- 9.89	55,13	



Graph 3.4. Survival rate of mice in study in 160 days monitoring

Remarks: Mean lifespan time in SR1 group was longer than 6-MP and UT groups, statistically significant ($p < 0.05$). Mice in 6-MP group began to die at day 18 of treatment, earliest among groups; followed by mice in UT group began to die at day 41 and cummulative died from day 56 to day 82. Mice in SR1 group died mainly from day 65 to day 81. At the end of treatment only 2 mice of SR1 group were alive.

3.3. Investigate the affects of Soi rung granule on ratio of CD3, CD4, CD8 cells, IL-2 and TNF- α of mice bearing sarcoma 180 solid tumor

3.3.1. Overall assessment of immune system

3.3.1.1. Effects of Soi rung granule on thymus and spleen:

- Relative weight of thymus and spleen of UT, 6-MP and SR1 groups increased statistically significant compared to control group ($p < 0.05$), 6-MP and SR1 groups increased more than UT group with $p < 0.05$. Microscopic images of thymus and spleen in 6-MP and SR1 groups showed more lymphocyte proliferation than control and UT groups.

3.3.1.2. Effects of Soi rung granule on peripheral blood cells

Table 3.14. Effects of Soi rung granule on red blood cells count

No.	Groups	n	Red blood cells (T/L) ($\bar{X} \pm SD$)	P
1	SH	10	9,48 \pm 0,58	p ₂₋₃ < 0,05 p ₂₋₄ < 0,05 p ₃₋₄ < 0,05
2	UT	10	7,89 \pm 0,67 *	
3	6-MP	10	6,04 \pm 1,24 *	
4	SR1	10	9,40 \pm 0,55	

Table 3.15. Effects of Soi rung granule on platelets count

No.	Groups	n	Platelets (G/L) ($\bar{X} \pm SD$)	P
1	SH	10	727,8 \pm 200,10	p ₁₋₄ > 0,05 p ₃₋₄ < 0,05
2	UT	10	1407,6 \pm 382,12 *	
3	6-MP	10	512,54 \pm 185,07 *	
4	SR1	10	829 \pm 183,16	

Table 3.16. Effects of Soi rung granule on white blood cells count

No.	Groups	n	White blood cells (G/L) ($\bar{X} \pm SD$)	P
1	SH	10	6,48 \pm 0,9	p ₁₋₄ > 0,05 p ₃₋₄ < 0,01
2	UT	10	18,96 \pm 9,12 *	
3	6-MP	10	3,49 \pm 0,72 *	
4	SR1	10	7,93 \pm 3,19	

*: Statistically significant different to control group ($p < 0.05$).

Remarks: Count of red blood cells, white blood cells and platelets in SR1 group did not change significantly compared to control group; these

figures decreased significantly in 6-MP group compared to control and SR1 groups.

3.3.2. Evaluation of T lymphocyte and IL-2, TNF- α levels

Table 3.18. Effects of *Soi rung granule* on TCD3 ratio

No.	Groups	n	TCD3 ratio (%) ($\bar{X} \pm SD$)	P
1	SH	10	52,31 \pm 6,70	p ₂₋₃ < 0,01 p ₂₋₄ < 0,01 p ₃₋₄ > 0,05
2	UT	10	56,63 \pm 6,14 *	
3	6-MP	10	66,01 \pm 5,71 *	
4	SR1	10	65,63 \pm 8,33 *	

*: Statistically significant different to control group (p < 0.01).

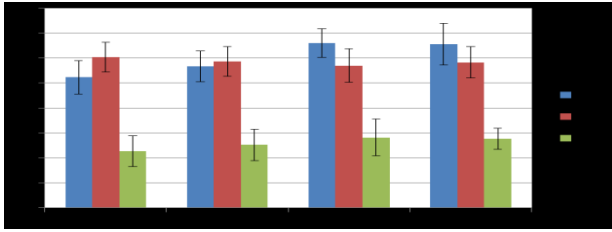
Table 3.19. Effects of *Soi rung granule* on TCD4 ratio

No.	Groups	n	TCD4 ratio (%) ($\bar{X} \pm SD$)	P
1	SH	10	60,32 \pm 6,0	p ₂₋₃ > 0,05 p ₂₋₄ > 0,05 p ₃₋₄ > 0,05
2	UT	10	58,61 \pm 6,0	
3	6-MP	10	57,0 \pm 6,71	
4	SR1	10	58,24 \pm 6,30	

Table 3.20. Effects of *Soi rung granule* on tỷ lệ lympho bào TCD8

No.	Groups	n	TCD8 ratio (%) ($\bar{X} \pm SD$)	P
1	SH	10	22,70 \pm 6,21	p ₂₋₃ < 0,05 p ₂₋₄ < 0,05 p ₃₋₄ > 0,05
2	UT	10	25,22 \pm 6,30 *	
3	6-MP	10	28,20 \pm 7,4 *	
4	SR1	10	27,62 \pm 4,23 *	

*: Statistically significant different to control group (p < 0.05).



Graph 3.7. Differences between groups on TCD3, TCD4, TCD8 ratio

Remarks: CD3, CD8 ratio in 6-MP and SR1 groups increased statistically significant compared to control and UT groups ($p < 0.05$) but not significantly different between 6-MP and SR1 groups ($p > 0.05$).

Table 3.21. Effects of *Soi rung granule* on IL-2 level (pg/ml)

No.	Groups	n	IL-2 level (pg/ml) ($\bar{X} \pm SD$)	P
1	SH	10	7,33 \pm 1,83	$p_{2-3} < 0,05$ $p_{2-4} < 0,05$ $p_{3-4} > 0,05$
2	UT	10	8,14 \pm 2,65 *	
3	6-MP	10	12,08 \pm 2,33 *	
4	SR1	10	10,53 \pm 3,87 *	

*: Statistically significant different to control group ($p < 0.05$).

Remarks: IL-2 level in 6-MP and SR1 groups increased statistically significant compared to control and UT groups ($p < 0.05$) but not significantly different between 6-MP and SR1 groups ($p > 0.05$).

Table 3.22. Effects of *Soi rung granule* on TNF- α level (pg/ml)

No.	Groups	n	TNF- α level (pg/ml) ($\bar{X} \pm SD$)	P
1	SH	10	25,53 \pm 3,97	$p_{2-3} < 0,05$ $p_{2-4} < 0,05$ $p_{3-4} < 0,05$
2	UT	10	26,57 \pm 9,41*	
3	6-MP	10	32,90 \pm 10,33 *	
4	SR1	10	38,53 \pm 9,97 *	

*: Statistically significant different to control group ($p < 0.05$).

Remarks: TNF- α level in SR1 group increased statistically significant compared to control, 6MP and UT groups ($p < 0.05$).

Chapter 4

DISCUSSION

4.1. Soi rung granule toxicity

4.1.1. Acute toxicity

By studying on acute toxicity, we have determined LD₅₀ of oral Soi rung granule on experimental mice, which is 98.753 (89.065 – 103.597) g herbal/kg body weight. Compared to folk dose for human 40g herbal/day, LD₅₀ is 10.27 times higher (extrapolation coefficient in mice is 12). According to WHO guidance and new drug research guidance, using Soi rung with folk dose is relatively safe. Comparing to some drugs originated to medicinal herbals, Soi rung granule belong to group containing toxic, because most of other medicinal plants can not be determined LD₅₀ when studying on acute toxicity.

4.1.2. Sub – chronic toxicity

After 8 weeks drinking Soi rung granule, rabbit's body weight, number of red blood cells, white blood cells, platelets, white blood cells ratio, hematocrit, hemoglobin levels did not change in both control and study groups. So, Soi rung granule did not affect the overall condition and blood forming function of normal adult rabbits. Results in table 3.5 showed Soi rung granule both dose 0.6g/kg and 3g/kg did not affect rabbit's serum levels of albumin, bilirubin and cholesterol. This proved that Soi rung granule had no affects on protein and lipid metabolism, as well as bile excretion and metabolism of liver; however the AST and ALT levels in serum after 8 weeks increased statistically significant in 3g/kg group than control group ($p < 0.05$). In 0.6g/kg group, only ALT level was elevated. Soi rung granule did not cause any adverse side effects on kidney functions. According to pathologic results, Soi rung granule dose 3g/kg (5

times higher than predicted clinical dose for human) injured microscopic structure of liver. Study on injuring cells effect, *Soi rung* granule had affected liver cancer cells and blood cancer cells. Based on research results, *Soi rung* has toxic components, leading to toxicity of this plant. In traditional medicine, it is categorized in toxic group.

4.2. Sarcome 180 antitumor effect of *Soi rung* granule on mice

4.2.1. *Soi rung* granule effects on mice overall condition and tumor growth

Mice in 6MP, SR1, UT groups did not have changes in eating behaviours, compared to control group, in SR2 and SR3 groups mice decreased clearly to other groups. Results in graph 3.2 showed the equivalent body weight of mice in all groups in the first day, in each group mice increased weight but SR2 and SR3 mice had lower weight than other groups ($p < 0.05$). 6-MP groups had mean weight of mice started to decrease from day 13 of drinking and decreased dramatically in the last measurements. Dose of 20g/kg mice body weight has affected weight growing of mice.

Graph 3.3 showed that solid tumor implanted subcutaneous increased size by each measurements, similar in all groups. From day 7, differences were observed. Tumor size in UT group elevated remarkably, while in SR groups elevated but slower than UT. In SR3, size developed slower than SR1 and SR2, maybe because of dose 20g/kg is 1/3 of LD₅₀, quite near toxic dose so it had injuring cell effect higher on cancer cells. In SR2, tumor size increased faster than SR1. This brings a good news in treatment because we can decrease drug dose but still have the same effect. In 6MP group, tumor size decreased gradually and clearer than other groups. The difference in tumor development leads to difference in mean tumor volume between groups when study finished. Mean tumor volume in 6-

MP groups was lowest with antitumor ratio 86.35%. Followed in turn by SR3, SR1, SR2 with antitumor ratio respectively 75.67%; 56.97% and 47.48%. According to Itokawa scale, 6-MP, SR3 had antitumor power (++) , while SR1 and SR2 were (+).

The microscopic tumor images in SR1, SR2 và SR3 had lymphocytes and blast concentrated in cancer tissue. In 6-MP, lymphocytes and blasts density were lower. In UT, the tumor edge had many neutrophil white blood cells and some lymphocytes. The infiltration level of lymphocytes increased in cancer tissue in mice having 6-MP or Soi rung granule, has decreased tumor growth. Antitumor effect *in vivo* of Soi rung maybe due to saponin, flavonoid, polysaccharid and sesquiterpen in its chemical components. Many studies of international and Vietnamese authors have proved saponin's experimental antitumor effect; flavonoid's deactivating some carcinogenic factors effect, ending cell cycle, starting apoptosis and inhibiting vessels forming inside tumors, antioxidant; polysaccharide inhibits cancer cell growth by inhibiting vessels forming in tumor, promoting and adjusting immune function.

4.2.2. Soi rung granule effects on lifespan time of mice

Soi rung granule dose 20g/kg had effect of limiting sarcoma 180 cancer development *in vivo*, higher than dose 5g/kg and 10g/kg body weight, but affect overall condition of mice (decreases eating and weight), dose 5g/kg had the similar effect to dose 10g/kg. So, dose 5g/kg must be further studied to contributively prove herbal's effective. Lifespan time after treatment is an important index to evaluate the total effective of cancer treatment therapies. Results in table 3.12 and graph 3.4 showed that the first died mouse in 6-MP group and numbers of died mice concentrated at earliest time. In UT, the tiem of many died mice was also before SR1. After treatment, only 2 mice in SR1 were

still alive. Mean lifespan time of cancer mice having *Soi rung* dose 5g/kg has been prolonged 35 days than untreated cancer mice. The difference was statistically significant with $p < 0.05$. Mice having 6-MP had mean living time 6 days shorter than cancer group.

4.3. Investigate *Soi rung* granule effect on ratio of CD3, CD4, CD8 cells, IL-2 and TNF- α of mice bearing sarcoma 180 solid tumor

4.3.1. The overall immune system

4.3.1.1. Weight and microscopic thymus structure changes

Relative weight of thymus gland and spleen in 3 groups UT, 6-MP and SR1 both increased significantly than control group but 6-MP and SR 1 increased more than UT, statistically significant with $p < 0.05$. Between 6-MP and SR 1 there was no significant difference ($p > 0.05$). These results are appropriate to microscopic images of thymus gland and spleen. In UT and 6-MP groups, there were images of increasing lymphocytes and white marrow size. In SR1 group, lymphocytes density as well as white marrow size both elevated remarkably. These results are similar to previous studies of Wen J. (2003) and Sun W. (2003) on this plant. These two authors' results also indicated that *Soi rung* has stimulated immune response against cancer *in vivo* by increasing weight and microscopic deforming thymus gland and spleen.

4.3.1.2. Effects of *Soi rung* granule on peripheral blood cells

Results in table 3.14, 3.15, 3.16 showed: Number of red blood cells in mice of UT group decreased 15% than control group. In 6-MP group, red cells decreased 23.48% than UT, platelets decreased 30% than control group, white blood cells decreased to 53% of control group ($p < 0.05$). In SR1, number of red blood cells, white blood cells, platelets were not different from control group ($p > 0.05$). This result is appropriate to study

results of Wen J. et al (2003), Leng Y. et al (2010), Chuong Vo Trong (2011). 6-MP is a drug inhibiting the synthesizing and exchanging purin nucleotid, causing changes in synthesizing and function of RNA and DNA. 6-MP is indicated in cancer of connective tissue like acute and chronic leukemias. One of its adverse side effects is severe marrow dysfunction, this could be the reason leading to decrease red blood cells, white blood celss, platelets in group using 6-MP. This will be an advantage of Soi rung granule comparing to 6-MP.

4.3.2. Effects of Soi rung granule on T cells ratio and IL-2, TNF- α levels

4.3.2.1. T cells ratio

Results in table 3.14, 3.15, 3.16 and graph 3.7 showed that mice in sarcoma 180 cancer cells implanted both had TCD3, TCD8 cells ratio increased drammatically than control group but TCD4 cells ratio tended to decrease. However, comparing to UT group, 6-MP and SR1 group had TCD3, TCD8 ratio higher than ($p < 0.05$). This was suitable to microscopic images of tumor, thymus gland and spleen in mice groups with infiltrated levels of lymphocytes from low to high, respectively UT, 6-MP, SR1. Approximately 90% cells which has presented CD3 then either present CD4 or CD8. Then, the increasing of CD3 ratio will happen if CD8 ratio increases, or CD4 ratio decreases, or both. In this study, TCD4 lymphocyte ratio tended to decrease lower than control group but not statistically significant, so increasing TCD8 ratio might be considered to be the main reason to increase TCD3. Therefore, we might state that 6-MP and Soi rung granule both affect on lymphocyte T differentiation, primarily differentiating into TCD8 through increasing differentiating TCD3. Scientists have identified the main components in Soi rung which is coumarin, along with flavonoid,

polysaccharid. This substance has been proved by many scientists to have inhibitor effect on cancer cells growth *in vitro*, *in vivo*, promoting conditioning immune by increasing number of TCD4, TCD8 cells, levels of IL-2 and TNF- α .

4.3.2.2. Concentration of IL-2 and TNF- α

Research results in table 3.21, 3.22 showed: IL-2, TNF- α levels in all 3 groups of cancer mice both elevated higher than healthy mice in control group. Mice in SR1 group had higher IL-2 and TNF- α levels than UT group ($p < 0.05$). SR1 had high IL-2 level although the ratio of cells presenting CD4 decreased lower than control group. This might be explained that Soi rung granule did not stimulate increasing number of CD4 cells but increasing their lymphocytes' activity, leading to elevating serum IL-2 level of treating mice. Besides, IL-2 is produced by some other cells such as TCD8, macrophage... So, these results somehow are appropriate to CD8 cells count, the IL-2 produce may increase when the number of CD8 increases.

4.3.3. Antitumor and promoting immune effects of Soi rung in Traditional medicine

The traditional medicine herbals in treating cancers are catergorized into two main kinds: Elimination and reinforcement. The close connection between these two methods and immune therapy help increasing treatment results. According to traditional medicine, effects of Soi rung include blood regulating, clearing heat and inflammation to treat trauma, joints pain, boil and ulcer, swelling status. In model of experimental cancer, Soi rung has limited the growth of experimental cancer cells, promoting body immune by increasing TCD3, TCD8 lymphocytes ratios, increasing IL-2 and TNF- α levels. So if based ontraditional medicine, Soi rung belongs to elimination herbal group treating cancer. If based on cancer treating drugs

classification of modern medicine, Soi rung is put in the immune regulating (immune modulating) group. In conclusion, Soi rung has helped the human body to improve immune system, providing condition for inhibiting cancer cells to develop.

CONCLUSION

1. Acute toxicity and sub-chronic toxicity of Soirung granule

- Acute toxicity: determined oral LD₅₀ of Soi rung granule as 98.753g herb/kg of mouse weight.

- Sub-chronic toxicity on rabbit

+ Compared to control group and before using, a dose of 3g/kg of rabbit weight, Soirung granule increased AST, ALT level with $p < 0.05$, a dose of 0.6g/kg of rabbit weight just increased ALT level with $p < 0.05$.

+ Both doses of Soi rung granule/kg of rabbit weight caused microscopic morphological changes of the rabbits' liver with different levels, but did not affect the metabolic function of liver, haematopoietic functions as well as function of glomerular filtration, macroscopic and microscopic morphological kidney of experimental rabbits.

2. Effect of inhibitor of sarcoma 180 solid tumor of Soi rung granule on mice.

- With doses 5g/kg, 10g/kg and 20g/kg of mouse weight, Soi rung granule inhibited tumor growth, efficiency antitumor as (++) with dose of 20g/kg of mouse weight; (+) with doses of 5g/kg and 10g/kg of mouse weight.

- Dose 5g Soi rung granule /kg mouse weight had prolonged lifespan for mice bearing sarcoma 180 up to 155,13%.

3. The effect of TCD3, TCD4, TCD8, IL-2, and TNF- α ratio in mice bearing sarcoma 180 solid tumor:

- The dose 5g Soi rung granule /kg of mouse weight increased the relative weight of the thymus gland and spleen as well as lymphocyte proliferation on microscopic thymus and spleen compared to control group ($p < 0.05$).
- Proportion of TCD3, TCD8 lymphocyte, the concentration of IL-2 and TNF- α in mice using 5g Soi rung granule/kg of mouse weight had significantly increased compared to control group ($p < 0.05$).
- The dose 5g Soi rung granule /kg of mouse weight decreased TCD4 ratio without statistical significance in comparing with control group ($p > 0.05$)

RECOMMENDATIONS

- Toxicity of Soirung should be studied more, particularly hepatotoxicity, should clearly identify the active ingredients and toxic elements in Soi rung herbal.
- The mechanism of Soi rung herbal should be continued to study .
- The safety and effectiveness of Soi rung herbal must be researched in clinical trials for evaluating them before treating in human.