

## **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. Theo dự đoán của Tổ chức Y tế thế giới (WHO), đến năm 2020 số người mới mắc ung thư có thể đạt tới 16 triệu người mỗi năm. Tại Việt Nam, mỗi năm có khoảng 150.000 trường hợp mới mắc ung thư và khoảng 75.000 trường hợp tử vong do ung thư [1]. Hiện nay, ung thư đang được điều trị bằng nhiều phương pháp: phẫu thuật, hóa trị, xạ trị (phương pháp điều trị truyền thống), liệu pháp hormon, liệu pháp sinh học (miễn dịch), điều trị trúng đích và ghép tế bào gốc [2],[3] trong đó hóa trị, xạ trị, phẫu thuật được áp dụng rộng rãi và đến nay vẫn là biện pháp trị ung thư cơ bản nhất tại Việt Nam. Tuy nhiên, phương pháp điều trị truyền thống cũng có những hạn chế nhất định, đặc biệt là với những bệnh nhân ung thư giai đoạn cuối khi sức đề kháng của cơ thể giảm do tổn hại chức năng của tủy xương, gan, thận.

Đã từ lâu, Y học cổ truyền (YHCT) được xem như một phương thức hỗ trợ điều trị ung thư tương đối hiệu quả. Các công trình nghiên cứu được ứng dụng trên lâm sàng đã cho thấy nhiều vị thuốc, bài thuốc YHCT 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 [4],[5],[6],[7],[8],[9]. Sự kết hợp giữa Y học hiện đại (YHHĐ) và YHCT trong điều trị ung thư đã phát huy được thế mạnh của các thuốc YHCT, nâng cao sức đề kháng của cơ thể, hạn chế được tối đa tình trạng tái phát và di căn khối u và các tác dụng không mong muốn của hóa - xạ trị, nên các triệu chứng lâm sàng được cải thiện. 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 (tên khoa học là *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai) là một vị thuốc được ghi nhận có tác dụng hỗ trợ điều trị một số loại hình ung thư [10],[11]. Tuy nhiên, tại Việt Nam, chưa có một nghiên cứu đầy đủ và khoa học về tác dụng kháng u hay hỗ trợ điều trị ung thư của cây Sói rừng. Vì vậy, để khởi đầu cho các nghiên cứu tiền lâm sàng và lâm sàng tiếp theo, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu đề tài **“Nghiên cứu tính an toàn và tác dụng kháng u sarcoma 180 của cỏm cây sói rừng *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai trên thực nghiệm”** với các mục tiêu sau:

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

# CHƯƠNG 1

## TỔNG QUAN

### 1.1. UNG THƯ VÀ ĐÁP ỨNG MIỄN DỊCH TRONG UNG THƯ

#### 1.1.1. Khái niệm về ung thư

Ung thư là tên dùng chung để gọi một nhóm bệnh gồm 200 loại khác nhau về nguyên nhân, tiến triển, cách thức điều trị, tiên lượng bệnh nhưng đều có chung một đặc điểm nổi bật là các tế bào ung thư có khả năng xâm lấn, phát triển và tồn tại ở các cơ quan, tổ chức khác trong cơ thể. Đây 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 [12].

#### 1.1.2. Nguyên nhân ung thư

Ung thư không phải do một nguyên nhân gây ra. Tùy theo mỗi loại ung thư mà có những nguyên nhân khác nhau [13], [14], [15]. Có thể chia các nguyên nhân gây ung thư ra thành hai nhóm lớn: nguyên nhân bên ngoài và nguyên nhân bên trong.

##### *1.1.2.1. Các nguyên nhân từ bên ngoài*

- Tác nhân vật lý: có thể là các tia phóng xạ phát ra từ các chất phóng xạ tự nhiên hay nhân tạo trong quân sự, y học... hoặc là các tia cực tím trong ánh nắng mặt trời có khả năng tác động trực tiếp hoặc gián tiếp lên DNA thông qua việc tạo ra nhiều gốc tự do làm thay đổi cấu trúc DNA. Từ đó tạo điều kiện hình thành một số bệnh di truyền và ung thư [16].

- Tác nhân hóa học: Là các hóa chất sử dụng trong công nghiệp, chiến tranh, trong thực phẩm hàng ngày của con người như các chất bảo quản thịt, cá, lạp xưởng, jămbon, các loại thịt, cá ướp muối ... hoặc là các chất thải trong môi trường như khói thuốc lá, thuốc diệt cỏ, thuốc trừ sâu, amiăng, dioxin, các gốc tự do... [15],[17],[18],[19],[20].

- Tác nhân sinh học: chủ yếu là virus. Các loại virus được nghiên cứu đến nhiều nhất gồm: Virus viêm gan B và C, virus gây u nhú ở người (HPV), virus Epstein – Barr (EBV). Ngoài ra sán Schistosoma và vi khuẩn Helicobacter Pylori (HP) cũng được coi là nguyên nhân gây nên một số ung thư như ung thư bàng quang, ung thư dạ dày [21],[22].

#### ***1.1.2.2. Nguyên nhân bên trong***

- Nội tiết tố: Một số nhóm nội tiết tố làm tăng nguy cơ ung thư sau khi dùng chúng. Ví dụ như estrogen được dùng điều trị để giảm các triệu chứng mãn kinh, giảm nguy cơ bệnh tim do mạch vành nhưng lại làm tăng nguy cơ ung thư nội mạc tử cung [23], [24].

- Enzym và chất vi lượng: Một số ion như  $Fe^{++}$ ,  $Cu^{++}$  có nồng độ cao dễ gây tách nước, tạo thành gốc superoxid gây độc cơ thể hoặc hoạt động của enzym SOD bị giảm sút cũng có thể gây ung thư [25].

- Các gốc tự do: có hoạt tính hóa học mãnh liệt, phản ứng nhanh với các phân tử sinh học gây tổn thương DNA tạo điều kiện cho sự hình thành ung thư [25].

- Các yếu tố di truyền: Gen bất thường có thể dẫn đến ung thư và khoảng 5% - 10% của tất cả các loại ung thư là do xuất hiện các đột biến gen được di truyền từ cha mẹ. Một số hội chứng của ung thư đã được biết

có mang yếu tố di truyền như bệnh đa u tuyến nội tiết, hội chứng Li-Fraumeni, hội chứng Turcot...

- Suy giảm miễn dịch và AIDS: Sự suy giảm miễn dịch nặng và kéo dài làm tăng cao nguy cơ nhiễm các loại virus bao gồm cả những virus đã được biết hoặc nghi ngờ là nguyên nhân gây ung thư như EBV, CMV. Người có HIV dương tính, đặc biệt khi chuyển qua giai đoạn AIDS có nguy cơ rất cao mắc sarcom Kaposi, u lympho không Hodgkin và một số ung thư khác như ung thư vòm, ung thư cổ tử cung [26].

**1.1.3. Cơ chế bệnh sinh ung thư:** cơ chế bệnh sinh của ung thư còn nhiều điểm chưa được sáng tỏ. 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. Có bốn nhóm gen liên quan đến quá trình phát sinh, phát triển của bệnh ung thư:

- Nhóm gen gây ung thư (Oncogenes): là tên gọi chung cho một nhóm các gen mà sự có mặt các gen này ở trạng thái tăng cường hoạt động sẽ dẫn tới sự hình thành và phát triển bệnh ung thư. Oncogen có nguồn gốc từ các tiền gen ung thư (pro-oncogen) – là các gen bình thường chỉ hoạt động trong thời kỳ phôi và là các gen tế bào khởi động sự phát triển biệt hóa bình thường. Chức năng sinh lý của tiền gen sinh ung là điều hòa đường dẫn truyền tín hiệu tế bào để tế bào nhận các kích thích cho sự phân bào và chết theo lập trình. Khi nó bị đột biến thì gây ra sự tăng sinh tế bào không kiểm soát được và lúc ấy tiền gen sinh ung trở thành gen sinh ung thư. Hiện nay có trên 50 loại gen sinh ung thư đã được phát hiện như gen APC, myc, ras...[27],[28],[29].

- Gen ức chế ung thư (tumor suppressor genes): mã hoá cho những protein kiểm soát phân bào làm chu kỳ phân bào bị dừng ở một pha, thường ở

pha G<sub>1</sub>. Các gen ức chế ung thư còn có chức năng làm biệt hoá tế bào hoặc kích thích tế bào đi vào quá trình chết theo chương trình. Khi các gen ức chế ung thư bị đột biến sẽ làm biến đổi tế bào lành thành tế bào ác tính. Hiện nay, các gen ức chế ung thư đã được phát hiện bao gồm các gen BRCA-1, BRCA-2, NF-1, NF-2, WT-1, Rb, p53...[15],[27],[28],[29].

- Nhóm gen điều hòa chết tế bào theo chương trình: Ở người trưởng thành bình thường, số lượng tế bào mới tái sinh trong cơ thể cân bằng với số lượng tế bào già chết đi. Khi cơ chế kiểm soát sự chết của tế bào bị hỏng thì dẫn đến nguyên phân không giới hạn, tế bào hầu như không biệt hoá và hình thành ung thư. Một số gen điều hòa chết tế bào theo chương trình đã được xác định như là bcl - 2, bcl - xL, bax, bad, bcl - xS, p53 và myc. Hoạt hóa p53 làm thúc đẩy tế bào đi vào quá trình chết theo chương trình. Gen myc bị đột biến sẽ kích thích tế bào phân chia. Sự chết theo chương trình của tế bào (apoptosis) giữ vai trò cơ bản trong nhiều bệnh: điều hoà trực tiếp sự phát triển của khối u, góp phần ngăn chặn hay làm chậm đi sự phát triển của bệnh AIDS [25],[28],[29].

- Nhóm gen sửa chữa DNA (DNA repair genes): các tế bào bình thường có khả năng sửa chữa thương tổn của DNA khi tiếp xúc với các tác nhân gây hư hại DNA trong môi trường sống. Các gen sửa chữa thương tổn DNA duy trì sự toàn vẹn của bộ gen. Bản thân các gen sửa chữa DNA không gây ung thư, nhưng chúng cho phép xuất hiện đột biến trong các gen khác trong quá trình phân chia tế bào bình thường [30].

Trong cơ chế bệnh sinh ung thư, vai trò của các nhóm gen sinh ung thư, gen ức chế ung thư, gen sửa chữa các thương tổn DNA và gen điều hòa chết tế bào theo chương trình là rất lớn. Khi có sự mất cân bằng giữa các nhóm gen hay xuất hiện không đúng giai đoạn sinh lý, không đúng pha phân bào

trong chu kỳ tế bào đều góp phần trong việc tích lũy các đột biến gen để làm cho tế bào tiến triển ác tính.

#### **1.1.4. Điều trị ung thư**

Do ung thư là một căn bệnh phát triển trong một thời gian tương đối dài kể từ khi khởi phát từ một tế bào ban đầu, nên điều trị bệnh là hoàn toàn có thể. Tuy nhiên, khi bệnh ở giai đoạn di căn thì việc điều trị sẽ rất khó khăn và tỷ lệ tử vong cao. Vì thế việc điều trị bệnh được thực hiện càng sớm càng tốt [14],[31].

- Điều trị phẫu thuật: Từ trước đến nay, phẫu thuật vẫn là phương pháp chủ yếu để điều trị đại đa số các bệnh nhân ung thư còn có khả năng phẫu thuật được. Phẫu thuật ung thư có thể được dùng để chẩn đoán, điều trị, xác định giai đoạn bệnh hoặc làm giảm các triệu chứng do ung thư gây ra. Phẫu thuật có thể là điều trị duy nhất hoặc có thể phối hợp với các phương pháp điều trị khác như xạ trị, hóa trị, liệu pháp hormon và liệu pháp sinh học [31].

- Điều trị tia xạ: Là phương pháp sử dụng nguồn năng lượng cao từ tia X, tia  $\gamma$ , neutron và các nguồn phóng xạ khác để tiêu diệt tế bào ung thư và các khối u. Xạ trị thường dùng để hỗ trợ cho biện pháp phẫu thuật trong trường hợp khối u quá lớn thì có thể tiến hành xạ trị trước hoặc sau mổ mà có lo ngại ung thư tái phát. Các kỹ thuật xạ trị đang được áp dụng hiện nay gồm chiếu xạ từ ngoài vào, xạ trị áp sát (Brachytherapie) và uống hoặc tiêm các thuốc có đồng vị phóng xạ để diệt tế bào ung thư. Một số tác dụng không mong muốn thường gặp của xạ trị là mệt mỏi, chán ăn, khô và bong da, viêm loét niêm mạc, giảm các dòng bạch cầu, tiểu cầu, hồng cầu [32],[33].

- Điều trị bằng hóa chất: Là phương pháp sử dụng hóa chất có khả năng tiêu diệt hoặc ngăn chặn sự phát triển của tế bào ung thư. Phương pháp này

được áp dụng khi ung thư đã lan ra ngoài vị trí ban đầu hoặc khi có di căn ở nhiều địa điểm [34],[35]. Trong điều trị phối hợp, hóa chất có thể dùng trước hoặc dùng sau các phương pháp khác để ngăn ngừa sự phát triển các vi di căn. Cho đến nay, hóa trị liệu vẫn được xem là phương pháp điều trị hiệu quả nhưng thường đi kèm với nhiều tác dụng phụ như buồn nôn, nôn, chán ăn, rối loạn tiêu hóa, rụng tóc, xạm da, thay đổi các chỉ số về xét nghiệm máu, chức năng gan, thận... [14], [34]. Hiện nay có khoảng 200 loại thuốc chống ung thư được sử dụng trên lâm sàng và được phân chia thành các nhóm như nhóm alkyl hóa (thuốc Cyclophosphamide, Cisplatin, Carboplatin), nhóm thuốc chống chuyển hoá (5-fluorouracil, Mercaptopurine, Methotrexate), nhóm thuốc ức chế sự phân bào (Vincristine, Vinblastine, Taxol), nhóm kháng sinh kháng ung thư (Adriamycin, Mitomycin, Plicamycin) [35], [36].

- Điều trị nội tiết: Điều trị nội tiết đóng vai trò quan trọng trong chiến lược điều trị một số loại ung thư, đặc biệt là các ung thư đặc trưng liên quan đến giới. Điều trị nội tiết trong ung thư có thể bằng các cách sau:

+ Loại bỏ các hormon trực tiếp kích thích khối u phát triển bằng cách cắt bỏ tuyến nội tiết như cắt buồng trứng trong ung thư vú.

+ Dùng thuốc ức chế sản xuất nội tiết tố hoặc ức chế, cạnh tranh tác dụng của nội tiết tố trên tế bào ung thư.

+ Dùng các nội tiết tố (hormon): ví dụ như dùng Megestrol acetat trong điều trị ung thư nội mạc tử cung...

- Điều trị miễn dịch (Miễn dịch trị liệu): là sử dụng các thuốc làm thay đổi sự tương tác qua lại giữa vật chủ và khối u từ đó mà có tác dụng chống u. Phương pháp này có thể được sử dụng đơn thuần hoặc phối hợp với phẫu thuật, tia xạ và hóa chất. Đây là lĩnh vực tuy còn mới mẻ nhưng đã có nhiều tiến bộ. Bên cạnh một số thuốc đã được áp dụng rộng rãi hoặc đang



trong các thử nghiệm lâm sàng, hiện nay còn nhiều thuốc đang được nghiên cứu [35],[36],[37]:

+ Các cytokine như Interferon alpha (INF-  $\alpha$ ), Interferon gamma (INF-  $\gamma$ ), Interleukin-2 (IL-2), IL-1, IL-4, IL-6, IL-7, IL-12.

+ Yếu tố kích thích tạo cụm (Colony stimulating factor-CSF): gồm yếu tố kích thích tạo cụm dòng bạch cầu hạt (G-CSF), yếu tố kích thích tạo cụm dòng bạch cầu hạt và đại thực bào (GM-CSF), IL-3.

+ Các kháng thể đơn dòng: Các kháng thể gắn với các kháng nguyên bề mặt tế bào u từ đó phá hủy tế bào u. Ngoài ra các kháng thể này được dùng trong việc chuyên chở các đồng vị phóng xạ, các chất độc hoặc thuốc để tiêu diệt tế bào u. Một số kháng thể đơn dòng được sử dụng điều trị ung thư như Rituximab, Alemtuzumab, Trastuzumab, Cetuximab.

- Điều trị trúng đích: có một số phân tử đặc hiệu của cơ thể quyết định sự dẫn truyền tín hiệu tăng trưởng, sinh mạch, điều hòa chu trình chết theo chương trình của tế bào ung thư. Khi tấn công vào các phân tử này thì sẽ ngăn chặn hay loại trừ được ung thư. Các thuốc có tác dụng gây chết tế bào nhưng có độc tính và tác dụng phụ thấp hơn các thuốc gây độc tế bào kinh điển. Các thuốc trúng đích gồm: Imatinib, Nilotinib, Sorafenib...(có tác dụng ức chế protein kinase), Bevacizumab (có tác dụng ức chế tăng sinh mạch của khối u)...

## **1.1.5. Đáp ứng miễn dịch trong ung thư**

### ***1.1.5.1. Khái niệm về đáp ứng miễn dịch***

Miễn dịch là khả năng của cơ thể nhận biết, đáp ứng và loại bỏ các yếu tố lạ gây hại [38].

Đáp ứng miễn dịch là một quá trình bảo vệ quan trọng và phức tạp của cơ thể sinh vật. Các yếu tố tham gia đáp ứng miễn dịch bao gồm: các cơ quan lympho trung ương (tủy xương, tuyến ức) và ngoại vi (hạch lympho, lách, các mô lympho không có vỏ bọc); các tế bào lympho T, B, các tế bào diệt tự nhiên NK; các tế bào thực bào đơn nhân và một số tế bào máu khác như bạch cầu hạt trung tính, bạch cầu ái toan, bạch cầu ái kiềm và tiểu cầu.

Ở người, đáp ứng miễn dịch chia hai loại: đáp ứng miễn dịch tự nhiên và đáp ứng miễn dịch thu được.

\* Miễn dịch tự nhiên (miễn dịch không đặc hiệu): là khả năng tự bảo vệ sẵn có và mang tính di truyền trong các cơ thể cùng một loài. Cơ thể loại trừ các kháng nguyên (vi khuẩn, virus...) gây bệnh thông qua hàng rào vật lý, hoá học, tế bào, thể chất [38], [39].

\* Miễn dịch thu được (miễn dịch đặc hiệu): là trạng thái miễn dịch xuất hiện do kháng thể đặc hiệu tương ứng với từng kháng nguyên được tạo ra sau khi cơ thể tiếp xúc với kháng nguyên (KN). Miễn dịch thu được gồm hai phương thức: đáp ứng miễn dịch dịch thể do các tế bào lympho B đảm nhiệm với các globulin miễn dịch và đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào do tế bào lympho T đảm nhiệm với các cytokine do chúng tiết ra.

- Đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào (cell mediated immunoreponse): có hai loại phản ứng tùy theo tính chất KN và tế bào trình diện.

Khi MHC lớp I trình diện KN cho các thụ thể tế bào T (T cell receptor - TCR) của lympho T độc (Tc: T cytotoxic) thì dòng này được hoạt hóa và tiêu diệt mọi tế bào có mang KN ấy, đó là phản ứng độc tế bào.

Nếu là phân tử MHC lớp II trình diện KN cho TCR của tế bào lympho T hỗ trợ (Th: T helper) thì kích thích tế bào tiết ra các cytokine mà chủ yếu là

các interleukin (IL). Cytokine này hoạt hóa nhiều tế bào khác như hoạt hóa tế bào Th, Tc, lympho B trong đáp ứng miễn dịch dịch thể. Các cytokine đóng vai trò quan trọng trong tương tác và điều hoà miễn dịch cũng như trong viêm đặc hiệu [38], [40].

- Đáp ứng miễn dịch dịch thể (humoral immunoresponse) giữ vai trò bảo vệ thông qua những kháng thể (KT) hoà tan có mặt trong mọi dịch sinh học của cơ thể. KT có bản chất là globulin nên còn được gọi là globulin miễn dịch (immunoglobulin: Ig). Các globulin miễn dịch là sản phẩm của các tương bào (plasma cell), giai đoạn cuối cùng của quá trình biệt hoá tế bào lympho B [11], [13].

#### ***1.1.5.2. Đáp ứng miễn dịch trong ung thư***

Kháng nguyên ung thư cũng như các kháng nguyên khác, khi có mặt trong cơ thể sẽ chịu sự kiểm soát của hệ thống miễn dịch. Mặc dù một số ung thư có thể lẩn tránh sự kiểm soát này nhưng phần lớn ung thư có đáp ứng miễn dịch. Cả đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu và đặc hiệu đều liên quan tới kiểm soát miễn dịch ung thư [41], [42].

- Đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu

Các tế bào hiệu ứng miễn dịch không đặc hiệu gồm đại thực bào, tiêu thực bào và tế bào giết tự nhiên NK (nature killer). Các tế bào này có thể gây độc tế bào làm cho tế bào ung thư ly giải hoặc bị kìm hãm, ức chế sự phát triển mà không cần mẫn cảm trước.

- Đáp ứng miễn dịch đặc hiệu: Cả đáp ứng miễn dịch trung gian tế bào và miễn dịch dịch thể đều có hiệu quả kháng u.

+ Đáp ứng miễn dịch dịch thể: Vai trò của đáp ứng này trong ung thư không rõ bằng đáp ứng miễn dịch tế bào. Đáp ứng miễn dịch dịch thể cũng có

thể tham gia vào phá hủy các tế bào u thông qua sự hoạt hóa bổ thể và gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể bởi các tế bào NK.

+ Đáp ứng miễn dịch tế bào: Tế bào Tc có vai trò quan trọng trong đáp ứng miễn dịch chống ung thư. Ở người, chúng giữ vai trò bảo vệ chống lại các u gây nên do virus, ví dụ như u lympho Burkitt do EBV và các u do HPV. Tc nhận biết kháng nguyên trên bề mặt tế bào ung thư nhờ MHC. Các protein MHC hiện diện 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. Như vậy Tc và tế bào ung thư phải có cùng MHC. Khả năng đáp ứng miễn dịch của Tc đối với ung thư đều có đáp ứng lần 2, vì sau một lần miễn cảm bởi kháng nguyên ung thư sẽ hình thành Tc trí nhớ. Vì vậy ở những lần sau, khả năng gây độc của Tc tăng nhanh hơn lần đầu.

### ***1.1.5.3. Sự tương tác giữa khối u và đáp ứng miễn dịch của cơ thể***

Đáp ứng miễn dịch của cơ thể đối với ung thư thường là đáp ứng có tính chất bảo vệ, nhằm loại trừ kháng nguyên đó ra khỏi cơ thể. Một số ung thư có thể thoái triển tự nhiên do sự điều chỉnh các rối loạn chuyển hóa hoặc do tăng cường các phản ứng miễn dịch. Các đáp ứng miễn dịch thường gây ly giải tế bào ung thư nhờ có bổ thể hoặc phụ thuộc kháng thể (ADCC) và các lymphokin, từ đó mà hạn chế được sự phát triển của ung thư. Tuy nhiên, ung thư đều có thể né tránh sự phá hủy của các phản ứng miễn dịch và phát triển ác tính ở vật chủ do một số nguyên nhân sau:

- Một số ung thư có tính sinh miễn dịch yếu nên không biểu lộ đủ các phân tử MHC cần thiết cho quá trình gắn và trình diện kháng nguyên đã được tế bào ung thư nhận biết. Vì vậy, cơ thể vật chủ không nhận diện được kháng nguyên và sẽ không có các đáp ứng miễn dịch.

- Vật chủ đã dung nạp một số kháng nguyên ung thư từ lúc mới sinh hoặc tế bào ung thư trình diện các kháng nguyên thuộc dạng dung nạp cho hệ thống miễn dịch. Khi trưởng thành, vật chủ sẽ không nhận diện kháng nguyên này là “ lạ” khi gặp lại và sẽ không gây đáp ứng miễn dịch.

- Tế bào ung thư có lượng kháng nguyên quá ít nên cơ thể vật chủ không nhận diện được. Khi lượng kháng nguyên đủ lớn để hệ thống miễn dịch cơ thể nhận diện được thì khối u đã phát triển quá lớn.

- Một số tế bào ung thư bị đột biến, không biểu hiện các protein có khả năng sinh miễn dịch, làm mất các kháng nguyên mà các dòng tế bào lympho Tc có thể nhận biết được.

- Sự gắn kháng nguyên – kháng thể trên bề mặt tế bào ung thư làm thay đổi protein màng. Kháng nguyên sẽ tập trung về một cực của tế bào, kháng thể thì mất khả năng cố định bổ thể nên tế bào ung thư sẽ không bị ly giải.

- Hoạt động của các phức kháng nguyên - kháng thể làm mất chức năng điều hòa của tế bào Th với kháng nguyên đặc hiệu ung thư.

- Các tế bào ung thư thường bộc lộ các phân tử glycoalyx, là phân tử có chứa nhiều mucoopolysaccharid tạo nên “màng che kháng nguyên” nhiều hơn tế bào bình thường nên giúp các tế bào u có thể né tránh hệ thống miễn dịch.

- Các sản phẩm của ung thư như TGF –  $\alpha$  hoặc các tác nhân hóa học, vật lý, nhiễm trùng gây suy giảm miễn dịch do ức chế hay làm mất chức năng của các tế bào lympho và đại thực bào.

#### **1.1.6. Mô hình thực nghiệm điều trị ung thư**

Để khảo sát hoạt tính kháng u tiền lâm sàng của các thuốc nghiên cứu, mô hình nghiên cứu *in vitro* và *in vivo* thường được sử dụng.

### **1.1.6.1. Mô hình nghiên cứu *in vitro***

Để sàng lọc nhanh các hoạt chất có tác dụng chống ung thư, phương pháp nuôi cấy tế bào *in vitro* thường được sử dụng. Trong mô hình *in vitro*, các chế phẩm được thử bằng cách ủ trực tiếp với các dòng tế bào ung thư có nguồn gốc từ người hay động vật được nuôi cấy ở điều kiện đặc biệt và môi trường thích hợp để tạo dạng đơn lớp (2D) hay dạng khối cầu (3D). Phương pháp nuôi cấy 2D là phương pháp cơ bản nhất nhưng có nhiều hạn chế vì không mô phỏng được điều kiện *in vivo* của cơ thể. Còn các tế bào trong mô hình nuôi cấy 3D phát triển trong không gian ba chiều phản ánh đầy đủ các mối quan hệ giữa tế bào với tế bào, tế bào với chất nền ngoại bào và tế bào với môi trường dinh dưỡng như trong cơ thể bình thường. Trong mô hình này, các chỉ số như tỷ lệ tế bào sống/chết, chỉ số  $IC_{50}$ , tỷ số tăng/giảm kích thước khối cầu các tế bào ung thư và các ảnh hưởng của chế phẩm lên hình thái tế bào sẽ được đánh giá [43],[44]. Tại các phòng thí nghiệm Việt Nam thường sử dụng các dòng tế bào ung thư người như tế bào ung thư cổ tử cung (HeLa), ung thư biểu mô vú (MCF-7), MCF-7 kháng Tamocifen (MCF-7/TamR), MCF-7 kháng Adriamicin (MCF-7/ADR), ung thư phổi (A549), ung thư buồng trứng (OVCAR-8), ung thư gan (HepG2) trong nghiên cứu *in vitro*.

### **1.1.6.2. Mô hình nghiên cứu *in vivo***

Phương pháp *in vivo* được dùng để chỉ những thí nghiệm dùng các mô sống hay toàn bộ cơ thể còn sống làm đối tượng thử nghiệm. Thí nghiệm trên động vật và thử nghiệm lâm sàng là hai hình thức trong nghiên cứu *in vivo*. Thực tế cho thấy có những hợp chất có tác dụng, biểu hiện hoạt tính khi thử nghiệm *in vitro* nhưng chưa chắc đã có kết quả mong muốn khi áp dụng lên cơ thể động vật thí nghiệm. Vì vậy, thử nghiệm *in vivo* vẫn được coi là bước thử nghiệm chắc chắn nhất sau khi các đã tiến hành thử nghiệm *in vitro*.

Trong lĩnh vực nghiên cứu ung thư thực nghiệm, mô hình nghiên cứu *in vivo* là mô hình nghiên cứu bắt buộc để có thể đưa ra các số liệu khoa học tin cậy về một chất có thực sự tác động và biểu hiện hoạt tính chống lại ung thư hay không, trước khi tiến hành thử nghiệm trên người. Trong mô hình này, các chỉ tiêu như tỷ số phát triển u (GR%), tỷ số thoái lui u (IR%), thời gian sống thêm (ILS) cũng như sự ảnh hưởng của chế phẩm tới tình trạng sức khỏe chung của động vật thí nghiệm (sự tăng trọng, chỉ tiêu sinh lý máu, sự biến đổi các cơ quan nội tạng, miễn dịch...) sẽ được khảo sát [45],[46]. Mô hình *in vivo* có ưu điểm nổi bật là đánh giá được chính xác tác động của thuốc lên khối u cũng như lên cơ thể do sự tương tác của cả 3 yếu tố: khối u, thuốc và hệ miễn dịch của động vật thí nghiệm. Tuy nhiên, quá trình sàng lọc trên mô hình này tốn nhiều thời gian hơn so với các mô hình khác và cần có sự theo dõi chặt chẽ, thường xuyên của người làm thí nghiệm. Có nhiều loài động vật được sử dụng để xây dựng mô hình nghiên cứu ung thư *in vivo* như thỏ, mèo, chuột, các loài linh trưởng. Trong số đó, chuột được sử dụng rộng rãi hơn cả do sự tương đồng về mặt di truyền với con người cũng như sự tiện lợi khi nuôi và chăm sóc trong phòng thí nghiệm. Chuột dễ sinh sản và đặc biệt là có sự ổn định khi dùng để gây tạo khối u thực nghiệm. Chuột nhắt dùng trong phòng thí nghiệm có thể chia thành 2 loại [47]:

- Chuột không thuần chủng (outbred mice): Là sản phẩm của quá trình lai tạp giữa các cá thể không cùng dòng, dẫn đến sự pha trộn về hệ gen, thế hệ sau có các đặc tính tốt hơn của bố mẹ. Chúng có ưu điểm là khả năng thích nghi với môi trường cao. Loại chuột này được sử dụng nhiều trong những thí nghiệm thông thường cần những cá thể khỏe mạnh, sinh sản tốt mà không quá chú trọng vào kiểu hình đặc trưng. Swiss Webster là dòng chuột không thuần chủng, không có sắc tố, được sử dụng phổ biến nhất trong các phòng thí

nghiệm hiện nay, đặc biệt ở Việt Nam do khả năng thích ứng tốt với môi trường, sinh sản nhanh, giá thành rẻ

- Chuột thuần chủng (inbred mice): Chuột thuần chủng đồng nhất về mặt di truyền, chúng có kiểu hình đặc trưng riêng cho từng dòng. Chuột thuần chủng được sử dụng trong nghiên cứu ung thư hơn 60 năm nay. Mặc dù chúng có giá thành đắt, khả năng thích nghi với môi trường kém hơn chuột không thuần chủng, nhưng chúng có những đặc điểm di truyền phù hợp với nhiều loại nghiên cứu nên việc sử dụng chuột thuần chủng vẫn là lựa chọn tối ưu [47]. Các dòng chuột thuần chủng thường được sử dụng hiện nay như C57BL/6, BALB/c, C3H, FBV... Cho đến nay, đã có hơn 200 thế hệ chuột BALB/c ra đời và trở thành dòng chuột thuần chủng được sử dụng phổ biến nhất trong các nghiên cứu ung thư và miễn dịch.

Trong các mô hình nghiên cứu ung thư *in vivo*, có các hình thức cấy ghép u sau:

- Cấy chuyển các dòng tế bào ung thư trên động vật: Các dòng tế bào ung thư thực nghiệm đã có từ khá lâu. Các nhà khoa học nhận thấy tế bào ung thư dù ở trong cơ thể động vật hay nuôi cấy trong ống nghiệm vẫn giữ được đặc tính mô bệnh học của nó và khi cấy chuyển những tế bào này vào cá thể cùng loài thì tạo nên khối u mới có đặc tính của khối u nguyên phát. Hiện nay, hai dòng tế bào sarcoma 180 và Lewis Lung Carcinoma được sử dụng nhiều trong các mô hình ung thư thực nghiệm [45].

- Chuột ghép khối u người: Nhiều mô hình u người ghép trên chuột “nude” đã được tiến hành trong nghiên cứu thực nghiệm. U người ghép trên chuột có tính nhạy cảm với hóa chất chống u ổn định và giúp bảo quản số lượng lớn tế bào ung thư người cho các nghiên cứu một cách thường xuyên,



liên tục. Từ đó, có thể đánh giá kết quả của các kỹ thuật chẩn đoán và áp dụng hàng loạt các phương pháp trị liệu mới. Tại Việt Nam, các nhà khoa học của Học viện Quân y đã ứng dụng thành công quy trình tạo khối ung thư người trên chuột nude bằng kỹ thuật ghép dị loài [48],[49].

Việc sử dụng bất kì mô hình nào cũng sẽ có những ưu nhược điểm riêng. Việc sử dụng mô hình *in vitro* như mô hình sàng lọc sơ cấp sẽ cho phép chúng ta tiết kiệm thời gian cũng như kinh phí khi sàng lọc một số lượng lớn, lựa chọn ra những hợp chất tiêu biểu có tác dụng để tiến hành thử *in vivo*. Đồng thời từ đồ thị đáp ứng liều của các dòng tế bào ung thư với các hợp chất đã xác định được ở sàng lọc *in vitro* sẽ gợi ý cho người làm thí nghiệm nồng độ chất nên thử trên mô hình *in vivo*.

## **1.2. QUAN NIỆM VỀ UNG THƯ TRONG Y HỌC CỔ TRUYỀN**

### **1.2.1. Khái niệm**

Trong y học cổ truyền (YHCT), danh từ “Ung thư” dùng để chỉ các loại ung nhọt phát sinh cấp tính (ung), hoặc mạn tính (thư) [50]. Trong các sách “Linh khu”, “Chư bệnh nguyên hậu luận” đã có những khái niệm như “thạch thư” mô tả giống ung thư xương hay “thạch ung” mô tả giống ung thư hạch. Sau triều đại Kim Nguyên ở Trung Quốc cho đến nay thường dùng cụm từ “Thũng lự” để chỉ các loại ung thư nói chung, còn với loại ác tính thì dùng từ “Nham” (đá núi) vì bờ của khối u nham nhở và cứng như đá. Như vậy ung thư trong y học hiện đại thuộc nham chứng trong YHCT.

### **1.2.2. Nguyên nhân**

#### ***1.2.2.1. Yếu tố ngoại nhân***

Ngoại nhân là 6 yếu tố thời tiết ở môi trường xung quanh khi tác động đến con người một cách thái quá hoặc nhân khi cơ thể suy yếu mà xâm nhập

vào cơ thể dễ gây ra bệnh gọi là lục dâm gồm: phong, hàn, thử, thấp, táo, hỏa [51]. Lục dâm phạm vào kinh lạc làm khí huyết bị trở trệ, lâu ngày không giải tỏa được dẫn đến kinh lạc bị ứ tắc, tà độc uất kết mà sinh bệnh. Trong sách “Linh khu – Cửu châm luận” có viết: “Gió tám hướng xâm phạm kinh lạc có thể sinh ra ung bướu”. Sách Y tông kim giám viết: “Hỏa ứ trệ thành độc mà gây bệnh”. Còn theo sách Linh khu – Bách bệnh sử sinh thiên thì sự ứ trệ thường do hàn gây nên, ứ trệ lâu ngày sẽ sinh u.

Sự phát sinh và phát triển của Nham chứng từ quan điểm tạng tượng, chính tà có quan hệ với các yếu tố di truyền, virus, yếu tố vi lượng, dinh dưỡng, ô nhiễm môi trường,... Những điều này hoàn toàn phù hợp của quan điểm của YHHĐ cho rằng hoàn cảnh sống (ngoại tà), thói quen sinh hoạt đều liên quan đến việc hình thành khối u như bức xạ mặt trời, hóa chất, chất phóng xạ, ăn uống phải thức ăn nhiễm độc thuốc trừ sâu, chất phụ gia, chất bảo quản....

#### ***1.2.2.2. Yếu tố nội nhân***

Nội nhân là 7 trạng thái tình cảm của con người bao gồm hi, nộ, ưu, tư, bi, kinh, khủng, khi phát triển quá mức sẽ trở thành yếu tố gây bệnh. YHCT gọi là thất tình [51]. Ngoài ra, nội nhân còn chỉ chính khí suy nhược, âm dương rối loạn, khí huyết vận hành bất thường, công năng tạng phủ suy yếu. YHCT nhấn mạnh do nội nhân gây ra chứng nham, chính khí suy nhược nên ngoại tà thừa cơ xâm nhập vào kinh lạc và tạng phủ làm ảnh hưởng đến chính khí và lưu thông khí huyết, điều hòa âm dương mà gây ra khí trệ, huyết ứ, đàm ngưng. Độc tích lâu ngày hình thành u cục. Trong y văn cổ “Cách chí dư luận” có viết nguyên nhân gây ung thư vú (Nhũ nham) là “Tình chí lo lắng cáu giận ức chế, tích lũy lâu dài khiến tỳ khí tiêu hao, can khí tích trệ, lâu dần tích tụ thành hạch, sau thành nhũ nham”. Sách Cảnh nhạc toàn thư viết: “É

cách (u thực quản) là do có ưu tư, uất kết ở bên trong mà thành”. Trong “Hoạt pháp cơ yếu” có ghi: “Trượng nhân vô tích, hư nhân tắc hữu chi, tỳ vị hư nhược, khí huyết lưỡng suy, tứ thời hữu cảm, giai năng thành tích” [52],[53]. Điều này phù hợp với quan điểm của Y học hiện đại, cho rằng trong thời gian dài bị kích thích bởi những tâm lý bất lợi khiến chức năng miễn dịch của cơ thể suy giảm hoặc do bẩm sinh tiên thiên bất lợi nên dễ có những mầm mống ung bướu nảy sinh.

### ***1.2.2.3. Yếu tố bất nội ngoại nhân***

Bên cạnh các yếu tố ngoại nhân và nội nhân, YHCT còn nhấn mạnh ăn uống không điều độ là nguyên nhân quan trọng có thể sinh ra ung thư ác tính. Sách “Tổ vấn - Dịch pháp phương nghi luận” viết: “Ăn nhiều thức ăn có tính chất thuộc hỏa làm cho nhiệt tích ở trong, bệnh tật hay phát loại ung nhọt”. Trong sách “Y môn pháp luật” có đề cập đến một trong những nguyên nhân gây ế cách (nghẹn), hoặc phản vị (nôn) là do uống rượu quá nhiều. Sách “Y học thống chí” thì cho rằng nguyên nhân của ung thư thực quản, ung thư dạ dày do ăn uống đồ cay nóng và những thức ăn khó tiêu gây tích trệ trong dạ dày, làm tổn thương trường vị. Nghiên cứu dịch tễ học ngày nay cũng đã chứng minh có mối liên quan nhất định giữa việc ăn thức ăn nóng trong một thời gian dài với sự phát bệnh ung thư thực quản.

### **1.2.3. Cơ chế bệnh sinh của nham chứng**

Y học cổ truyền quan niệm rằng cơ chế bệnh sinh của chứng nham chủ yếu gồm 4 mặt, được khái quát thành “độc, ứ, đàm, hư” [54]. Đây chính là những kết quả của sự tương tác giữa các yếu tố gây bệnh

### ***1.2.3.1. Nhiệt độ***

Nhiệt tà xâm phạm vào cơ thể, lâu ngày sẽ uất kết lại thành nhiệt độ. Nội thương tình chí bị uất kết cũng có thể thành hỏa. Sách ‘Đinh cam nhâm y án’ có đề cập đến vấn đề này: “Nguồn gốc bệnh là do tình chí uất kết, uất sinh ra hỏa, uất hỏa kết hợp với ứ huyết, dinh vệ thất điều mà gây nên”. Hỏa nhiệt làm tổn thương khí, đốt nóng tạng phủ, tích lại bên trong lâu ngày thành khối, tân dịch gặp hỏa thành đàm, khí huyết đàm trọc bế tắc ở kinh lạc, tạng phủ kết thành bệnh. Nhiệt độ thường gặp trong ung thư gan (can nham), ung thư máu (huyết chứng) hoặc một số ung thư khác như ung thư lưỡi (thiệt nham)...

### ***1.2.3.2. Khí trệ huyết ứ***

Khí huyết đóng vai trò công năng sinh lý chủ yếu của cơ thể duy trì sự sống, là cơ sở vật chất quan trọng của con người. Vì một nguyên nhân nào đó làm cho công năng của khí mất điều hòa, dẫn đến tình trạng khí uất, khí trệ, khí tụ, lâu ngày làm cho huyết ứ trệ, tích lại thành khối, đó là hiện tượng nham chứng. Sách “Kim Quỹ thiên ngũ tạng phong hàn” viết: “Tích là bệnh của tạng, không di động, đau ở một chỗ và bệnh thường ở phần huyết do huyết ứ không thông lợi”.

Trong “Y lâm cải thác” chỉ ra: “Huyết gặp hàn tắc ngưng kết thành khối, huyết gặp nhiệt tắc tạo thành khối” đã chứng minh sự hình thành khối u có liên quan đến khí trệ huyết ứ.

Trong sách “Linh khu” viết: “Buồn rầu hay bực tức làm cho khí nghịch lên, khí nghịch lên làm cho đường vận hành của lục kinh không thông, khí âm không được vận hành, huyết bị ngưng tụ ở trong không thể tán ra được, tân dịch bị trệ lại không thấm được đến toàn thân, đọng lại lâu ngày không vận hành được, vậy là hình thành tích”.

Trên lâm sàng thấy đa số sự phát sinh phát triển của khối u có quan hệ mật thiết với khí trệ huyết ứ. Do huyết vận hành không thông, ứ trệ lại, “bất thông tắc thống”, bệnh nhân có tính chất đau cố định, thời gian đau kéo dài vẫn không thay đổi, do huyết vận hành không thông hoặc huyết ứ cục bộ có thể dẫn đến sắc mặt sạm, móng cứng và da thô ráp, lưỡi có điểm huyết ứ, chất lưỡi tím, tĩnh mạch dưới lưỡi ứ huyết

### **1.2.3.3. Đàm ngưng**

Tỳ là gốc của đàm, phế là cơ quan tích trữ đàm, công năng tỳ phế thất điều, tân dịch không phân bố, thủy thấp nội đình, nhiệt tà chung đốt, đàm ngưng kết lại thành đàm. Y học cổ truyền cho rằng đàm sinh bách bệnh. Người xưa cho rằng trong cơ thể người có khối tích tụ là do đàm cho nên các loại u bướu đều có liên quan đến đàm.

### **1.2.3.4. Chính khí hư**

Sách “Nội kinh” chỉ ra: “Chính khí tồn nội, tà bất khả can” nhấn mạnh chính khí có ý nghĩa quan trọng đối với sự phát sinh và dự phòng bệnh tật [55]. Bệnh u ác tính xuất hiện nhanh chóng, tà độc phát tán, bệnh tình nguy hiểm, người bệnh đa phần sút cân thậm chí dẫn đến suy kiệt, xuất hiện triệu chứng âm hư, dương hư, khí hư, huyết hư. Khi chính khí của cơ thể được bồi bổ, điều hòa âm dương khí huyết thì cơ thể sẽ nâng cao khả năng chống đỡ bệnh, khống chế sự phát triển của bệnh.

## **1.2.4. Điều trị nham chứng**

### **1.2.4.1. Nguyên tắc chính trong điều trị**

- Kết hợp giữa phù chính và khu tà: Khu tà là dùng thuốc hoặc các phương pháp điều trị để trừ độc tà với bệnh nhân nham chứng có tà khí quá thịnh. Phù chính để điều trị bệnh nhân nham chứng mà khí huyết hư nhược.

Bệnh nhân trong giai đoạn đầu chính khí chưa tổn thương suy bại, nên chủ yếu khu tà; giai đoạn cuối đa phần bệnh nhân chính khí suy kiệt, cần phù chính khí là chính.

- Cấp tắc trị tiêu, hoãn tắc trị bản: Trong quá trình điều trị nham chứng có những giai đoạn xuất hiện các chứng trạng nghiêm trọng, nếu không điều trị kịp thời có thể nguy hại đến tính mạng, ảnh hưởng đến bước điều trị tiếp theo, do đó nên điều trị chứng cấp trước. Nếu bệnh nhân nham chứng có bệnh tình tương đối ổn định, không có chứng trạng cấp tính thì trị gốc là điều trị nham chứng.

- Đồng bệnh dị trị, dị bệnh đồng trị: Đồng bệnh dị trị có nghĩa là đối với những nham chứng giống nhau có thể áp dụng phương án và biện pháp khác nhau. Ví dụ cùng là bệnh nhân Can nham (ung thư gan), do thể chất cá thể từng người khác nhau hoặc ở những giai đoạn bệnh khác nhau, hoặc biện chứng phân loại YHCT khác nhau nên sẽ có những phương án điều trị khác nhau. Dị bệnh đồng trị là chỉ những bệnh nham chứng khác nhau hoặc cùng 1 loại nham chứng nhưng phân loại bệnh lý khác nhau, có nguyên nhân và cơ chế gây bệnh giống nhau, một số biểu hiện và chứng trạng lâm sàng giống nhau thì có thể có những phương pháp điều trị giống nhau. Ví dụ bệnh nhân Vị nham (ung thư dạ dày), Can nham (ung thư gan), Phế nham (ung thư phổi) trong quá trình phát triển của bệnh đều xuất hiện các biểu hiện của chứng tỳ hư nên điều trị đều phải sử dụng phương pháp kiện tỳ ích khí.

- Điều trị tổng hợp nhiều phương pháp: Nham chứng (ung thư) trong YHCT cũng được thừa hưởng nhiều thành tựu nghiên cứu ung thư của YHHĐ. Vì vậy có thể kết hợp nhiều phương pháp hay phối hợp YHHĐ và YHCT trong điều trị ung thư

#### ***1.2.4.2. Các phương pháp điều trị***

Quan niệm của YHCT về nham chứng là bệnh toàn thân mà biểu hiện tại chỗ. Do vậy khi điều trị nham chứng luôn phải quan tâm đến cải thiện tình trạng toàn thân để nâng cao sức đề kháng mà không chế sự phát triển của khối u. Hai nội dung chính của điều trị nham chứng là phù chính và khu tà (kháng nham) [54],[56],[57].

*\*Phù chính cố bản:* Phù chính cố bản chính là bổ chính khí, điều hòa khí huyết và chức năng sinh lý của tạng phủ, kinh lạc, nâng cao khả năng chống đỡ bệnh tật, tăng cường thể trạng và khả năng miễn dịch tiến tới loại trừ u bướu. Pháp phù chính bổ hư ngoài vận dụng để biện chứng âm dương khí huyết hư suy còn biện chứng xem hư ở tạng nào để dùng pháp điều trị thích hợp. Trong “Nạn kinh” có viết: “Phế hư tổn thì nên bổ ích phế khí, tâm hư tổn thì nên điều hòa dinh vệ, làm cho khí huyết được vận hành bình thường, tỳ hư tổn thì nên điều tiết ăn uống và luôn luôn giữ gìn cho ăn mặc được thích nghi với nóng lạnh, can hư tổn thì nên sơ can giải uất, dùng thuốc bổ để hòa hoãn ở trong, thận hư tổn thì nên bổ ích tinh khí”[58]. Phương pháp phù chính cố bản bao gồm: kiện tỳ lý khí, dưỡng âm sinh tân, tư âm bổ huyết, ôn bổ tỳ thận trong đó có rất nhiều thuốc Đông dược thuộc nhóm thuốc bổ. Các loại thuốc bổ đông dược còn có rất nhiều tác dụng như bảo vệ cơ thể, hạn chế tác dụng phụ của hóa trị và xạ trị, cải thiện các triệu chứng của người bệnh trong ung thư giai đoạn cuối.

- Kiện tỳ lý khí: Ích khí kiện tỳ là phép điều trị cơ bản dùng cho bệnh nhân ung thư giai đoạn II, III và sau khi hóa trị có suy giảm công năng tỳ vị. Bài thuốc thường gồm các vị hoàng kỳ, nhân sâm, linh chi, bạch truật, phục linh, hoài sơn, cam thảo... [59].

- Ôn tỳ bổ thận: Các bệnh nhân ung thư giai đoạn sau xạ trị, hóa trị hoặc người già hay ung thư vú cắt cả buồng trứng thường được áp dụng pháp điều trị này. Bài thuốc gồm các vị thuốc như phụ tử chế, nhục quế, dâm dương hoắc, tảo dương, nhục dung, ba kích... [59].

- Tư âm bổ huyết: thường dùng cho các bệnh nhân ung thư giai đoạn cuối hoặc sau khi hóa trị. Bài thuốc có thực địa, dương quy, a giao, bạch thược, qui bản, hà thủ ô, kỷ tử, long nhãn, đại táo, kê huyết đằng... Căn cứ vào lý luận “bổ tinh sinh huyết” nên trên lâm sàng pháp này thường được phối hợp với thuốc ích khí kiện tỳ để tăng cường hiệu quả bổ huyết [59].

- Dưỡng âm sinh tân: Pháp này dùng cho bệnh ung thư thể âm hư, ứng dụng trong quá trình hóa trị liệu xuất hiện hỏa nhiệt tiêu đốt bên trong, hao âm thương tân. Thuốc thường dùng có thiên môn đông, mạch môn, sa sâm, thạch斛, ngọc trúc, bách hợp, tri mẫu, thiên hoa phấn... [59].

\* *Khu tà kháng nham*: Khu tà kháng nham có thể phân thành thanh nhiệt giải độc, hoạt huyết hóa ứ, trừ đàm nhuyễn kiên, tiêu ứ. Đây thuộc phạm vi “dĩ độc công độc” trong YHCT.

- Pháp thanh nhiệt giải độc: các tác nhân gây ung thư phần lớn thuộc dương tà, hỏa tà, nhiệt độc gây nhiệt chứng. Pháp thanh nhiệt giải độc có thể là trung hòa bớt các gốc tự do độc hại và đồng thời đào thải nhanh các chất độc hại qua gan, mật, ruột, thận, phổi, da bằng các loại thuốc lợi mật, nhuận tràng, lợi niệu, thông phế, giải biểu.

Nhiều thuốc trong nhóm thanh nhiệt giải độc như bạch hoa xà thiệt thảo, bán chi liên, sơn đậu căn, thất diệp nhất chi hoa... đều có tác dụng ức chế sự sinh trưởng của tế bào ung thư [60],[61],[62],[63], tăng cường miễn dịch dịch thể [64],[65],[66],[67]. Từ các thuốc này đã chiết ra rất nhiều hoạt chất có tác



dụng hoặc tổng hợp các thành phần hóa học có tác dụng hạn chế sự phát triển của khối u như vinblastine, vincristine, indirubin, cantharidin ...

- Pháp hoạt huyết hóa ứ: Các thuốc hoạt huyết như nga truật, xuyên khung, đan sâm, xích thược, xuyên sơn giáp, đào nhân, nhũ hương, một dược...có tác dụng sơ thông kinh lạc, hành huyết tán ứ, cải thiện vi tuần hoàn, tăng tính thấm thành mạch, ức chế sự tăng sinh của tổ chức liên kết, từ đó thu nhỏ dần u bướu. Ngoài ra thuốc còn có những tác dụng nhất định trong điều tiết chức năng miễn dịch, tăng cường chức năng tạo máu [62],[63]. Lâm sàng còn ứng dụng thuốc hoạt huyết hóa ứ để kháng ung thư trực tiếp hoặc phối hợp các liệu pháp khác để tăng cường tác dụng và đặc biệt có tác dụng trong điều trị các chứng đau của ung thư.

- Pháp trừ đàm nhuyễn kiên: Theo YHCT pháp trừ đàm nhuyễn kiên là phép trị tiêu có thể dùng cho tất cả các loại ung thư. Trong số các vị thuốc có tác dụng tán kết thì có một số vị như xuyên bối, côn bố, hải tảo, qua lâu nhân có tác dụng hóa đàm tán kết làm hạn chế sự phát triển của khối u hoặc làm giảm triệu chứng của một số loại ung thư [62],[63].

- Pháp tiêu u, phá tích tụ: Không ít các loại u bướu trong cơ thể biểu hiện thành chứng trung hà tích tụ, khối u ngày một to, lúc đó phải dùng pháp tiêu u nhuyễn kiên, thông lợi phá tích, để tiêu tích trệ, phá vỡ khối u ác. Pháp này thích hợp dùng với mọi loại u bướu ở giai đoạn đầu và giai đoạn giữa khi khối u đã rõ ràng, cơ thể còn mạnh khỏe, chính khí chưa hư. Nhóm thuốc này cũng có tác dụng nhất định để tiêu diệt tế bào ung bướu, một số thuốc như thiêm tô, ngô công dùng lượng thích hợp có thể tăng cường khả năng miễn dịch của cơ thể, tăng tác dụng tiêu u [62],[63].

Trong YHCT bệnh ung thư thuộc phạm trù ung độc lở loét, từ xưa các bác sĩ ngoại khoa thường dùng các loại thuốc là khoáng vật và thuốc phương hương dùng đắp bên ngoài để tán độc, thông tích trệ mà tiêu u. Như dùng nha đởm tử bôi ngoài làm sạch ung thư da, dùng phương pháp hít khói thuốc điều trị ung thư phổi, dùng thuốc thanh nhiệt giải độc hoặc thuốc tả hạ trực thủy đắp ngoài điều trị ung thư gan hoặc ung thư gan cổ trướng... đều thu được kết quả khả quan. Phương pháp châm cứu cũng đã có một số hiệu quả trong việc kiểm soát một số triệu chứng của bệnh ung thư. Châm cứu đã được chứng minh có khả năng làm giảm các triệu chứng như đau đớn, buồn nôn và trầm cảm liên quan đến ung thư, và đã được sử dụng để điều trị các triệu chứng đau, mệt mỏi, khô miệng, mất ngủ, lo âu, trầm cảm ở các bệnh nhân ung thư [68] [69],[70].

#### ***1.2.4.3. Điều trị kết hợp giữa thuốc YHCT với phẫu thuật, hóa trị, xạ trị:***

Thực chất, khả năng gây độc tế bào ung thư của thuốc YHCT khá yếu, do vậy trong điều trị ung thư nên phối hợp với các phương pháp của YHHĐ. Trước phẫu thuật, với một số bệnh nhân thuộc chứng hư, dùng các thuốc có tác dụng phù chính có thể cải thiện hệ miễn dịch và tình trạng toàn thân của bệnh nhân, giúp họ có thể đáp ứng tốt với phẫu thuật. Với bệnh nhân thuộc thực chứng, trước phẫu thuật có thể sử dụng các thuốc YHCT có tác dụng nhuận kiên tán kết để làm nhỏ khối u tạo thuận lợi để tiến hành phẫu thuật, làm tăng tỉ lệ thành công của các ca phẫu thuật cắt bỏ khối u. Sau phẫu thuật nên dùng các thuốc YHCT có tác dụng điều hòa tỳ vị, ích khí dưỡng âm. Đồng thời đối với một số ung thư nhỏ có tác dụng tiêu diệt nhất định, phòng ngừa ung thư tái phát và di căn.

Việc kết hợp thuốc YHCT với các biện pháp YHHĐ trong điều trị ung thư giúp nâng cao khả năng miễn dịch, giảm phản ứng phụ của hóa chất, xạ trị lên bệnh nhân. Xạ trị hay hóa trị thường ảnh hưởng đến hệ thống tạo huyết

làm tế bào máu ngoại vi giảm, bệnh nhân biểu hiện chóng mặt hoa mắt, thiếu khí vô lực, ngủ hay mê, chất lưỡi nhạt, rêu trắng, mạch tế nhược. Vì vậy việc kết hợp với các bài thuốc bổ tỳ ích thận, ích khí dưỡng huyết đã mang lại hiệu quả tốt trong việc thúc đẩy tủy xương hồi phục chức năng tạo máu [71],[72].

### **1.3. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU ĐIỀU TRỊ UNG THƯ CỦA CÁC THUỐC YHCT**

Trạng thái miễn dịch của cơ thể có quan hệ mật thiết đến sự phát sinh, phát triển của khối u. Khi khả năng miễn dịch của cơ thể giảm sút thường làm tăng tỉ lệ phát sinh khối u hoặc làm khối u đã có phát triển nhanh chóng. Vì vậy, các thuốc YHCT có tác dụng kích thích miễn dịch thường được sử dụng phối hợp trong điều trị ung thư.

#### **1.3.1. Trên thế giới**

Trên thế giới có rất nhiều công trình nghiên cứu về các thuốc kích thích miễn dịch từ thảo mộc đặc biệt là ở các nước Trung Quốc, Nhật Bản, Ấn Độ, Hàn Quốc [73],[74],[75].

Kết quả nghiên cứu thử nghiệm *in vitro* của các nhà khoa học Trung Quốc cho thấy rằng nhiều thảo mộc có tác dụng ức chế phát triển tế bào ung thư như cây *Gordonia longicarpa* Theaceae có hoạt tính gây độc tế bào với năm dòng tế bào ung thư ở người (HCT-8, Bel-7402, BGC-823, A549 và A2780), *Palhinha cernua* Lycopodiaceae có tác dụng gây độc tế bào với ba dòng tế bào ung thư ở người (K562, SMMC-7721, SGC-7901) với giá trị IC50 tương ứng là 20,3; 34,0 và 22,5 $\mu$ g /ml, *Pterocarpus soyauxii* thể hiện hoạt tính độc tế bào mạnh trên dòng tế bào ung thư phổi người A549 với IC50 là 16,07 $\mu$ g/ml [76],[77],[78].

Trong nghiên cứu của Kim K. và cộng sự (2012), triterpenoid chiết xuất từ cây *Berberis koreana* Berberidaceae có tác dụng gây độc với dòng tế bào A549 và SK-MEL-2 với giá trị IC<sub>50</sub> là 7,17 và 90,67 µg/ml [79].

Tại Ấn Độ, Senthilnathan P. và cộng sự thấy dịch chiết của sâm Ấn Độ *Withania somnifera* (L.) Dunal có tác dụng làm thay đổi các tế bào miễn dịch, bổ thể và globulin miễn dịch trên động vật bị gây ung thư phổi [80].

Trần Nhuệ Thâm khi dùng các vị thuốc YHCT Trung quốc điều trị cho các bệnh nhân ung thư phổi, thấy thuốc có tác dụng cải thiện miễn dịch, giảm nhẹ triệu chứng và kéo dài thời gian sống [81].

Liu J. và cộng sự so sánh ngẫu nhiên 43 bệnh nhân ung thư đại tràng đã phẫu thuật được hoá trị liệu kết hợp với thuốc Kiện tỳ hóa ứ với 21 bệnh nhân hoá trị liệu đơn thuần trong thời gian 3 tháng thấy tỷ lệ tái phát, hiệu quả điều trị ở nhóm hoá trị liệu kết hợp với thuốc này (39,5% và 72,1%) cao hơn so với nhóm hoá trị liệu đơn thuần (33,3% và 19,0%) [82].

Phan Mẫn Cầu dùng Phế phụ phương (gồm Bách hợp, Thục địa, Sinh địa, Nguyên sâm, Mạch môn, Đương quy, Bạch thược, Sa sâm, Tang bạch bì, Hoàng cầm, Mẫu đơn, Tầm sa, Bạch hoa xà thiệt thảo) điều trị 40 bệnh nhân ung thư tế bào vảy giai đoạn III - IV có so sánh với nhóm chứng dùng hóa trị liệu. Kết quả thời gian sống thêm của nhóm dùng thuốc YHCT tăng có ý nghĩa thống kê so với nhóm dùng hóa trị liệu [83].

Nguyễn Thị Thu Hằng tiến hành nghiên cứu 90 bệnh nhân trên 65 tuổi chẩn đoán ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, chia 3 nhóm: nhóm nghiên cứu dùng bài thuốc YHCT đơn thuần (Đẳng sâm 25g, Phục linh 25g, Miêu trảo thảo 30g, Chỉ xác 15g, Tam thất 10g, Tỳ bà diệp 10g, Tiên hạc thảo 15g, Thổ bồi mẫu 15g, Thủ cung 5g, Trích cam thảo 6g), nhóm đối chứng dùng hóa trị liệu đơn thuần và nhóm kết hợp hóa trị liệu với bài thuốc YHCT. Kết

quả cho thấy bài thuốc có tác dụng cải thiện triệu chứng lâm sàng, giảm tác dụng không mong muốn của hóa trị liệu, nâng cao chất lượng cuộc sống [84].

### 1.3.2. Tại Việt Nam

Một trong các nguyên tắc điều trị ung thư của YHCT là phù chính khu tà. Ngoài ra, khi khối u phát triển hoặc quá trình điều trị bằng các liệu pháp YHHĐ (xạ trị, hóa trị...) cũng làm cho cơ thể người bệnh suy nhược. Việc kết hợp thuốc YHCT với các biện pháp YHHĐ trong điều trị ung thư giúp nâng cao khả năng miễn dịch, giảm phản ứng phụ của hóa chất, xạ trị lên bệnh nhân. YHCT Việt Nam đã có nhiều bài thuốc hay, phương thuốc quý được các kỹ thuật của YHHĐ chứng minh tác dụng nâng cao công năng hệ thống miễn dịch của cơ thể một cách cơ bản, khoa học [85], [86], [87].

Trần Ngọc Dung (2000) khi sử dụng viên M chế từ dịch chiết cây Nhàu để điều trị hỗ trợ cho bệnh nhân ung thư vòm họng sau xạ trị đã cho thấy viên M có tác dụng phục hồi số lượng các tế bào miễn dịch và kéo dài đời sống của các bệnh nhân này so với đối chứng [88].

Bài thuốc “Thập toàn đại bổ” đã được chứng minh có tác dụng làm giảm một số độc tính cho bệnh nhân ung thư vú đang điều trị hóa chất [89]. Nhiều chế phẩm thuốc có nguồn gốc từ thảo dược đã được các tác giả nghiên cứu ứng dụng trong điều trị hỗ trợ ung thư như:

- Phylamin: bào chế từ bèo hoa dâu đã được sử dụng cho bệnh nhân ung thư vòm họng, phổi, hạch. Kết quả cho thấy thể trạng bệnh nhân được cải thiện, thời gian sống kéo dài hơn so với nhóm chứng [90].

- Aslem: sản phẩm tổng hợp glycyfl Funtumin được phân lập từ cây *Funtumia Apocynaceae*, có tác dụng kích thích không đặc hiệu đối với hệ miễn dịch [91].

- Salamin: bào chế từ Hải táo và Côn bố, làm tăng số lượng tế bào TCD4, TCD8 tăng số lượng hồng cầu, bạch cầu ở các bệnh nhân ung thư vú đang xạ trị [92].

- Viên Angala: thành phần là polysaccharide chiết xuất từ rễ cây đương quy Nhật Bản, có tác dụng hạn chế giảm số lượng hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu và làm tăng số lượng tế bào lympho TCD4, TCD8 kích thích tăng cường miễn dịch tế bào trên bệnh nhân ung thư vú đã phẫu thuật đang điều trị hóa xạ trị [93].

- Viên Linh chi – Tam thất: có tác dụng tăng cường miễn dịch với bệnh nhân ung thư vòm mũi họng được xạ trị, làm tăng số lượng tế bào TCD4, TCD8, đưa tỷ lệ TCD4/TCD8 trở lại giá trị bình thường, tăng gama globulin, hạn chế giảm số lượng hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu [94].

- Cadef: thành phần gồm Nhân sâm, Tam thất, Trinh nữ, dừa cạn, mầm thóc.... đã cải thiện chức năng miễn dịch tế bào và thể dịch (tăng TCD4, TCD8, đưa tỷ lệ TCD4/TCD8 trở lại giá trị bình thường, tăng gamma globulin), tăng số lượng hồng cầu, tiểu cầu, hemoglobin, tăng trọng lượng cơ thể, hạn chế tái phát và di căn ung thư ở những bệnh nhân ung thư vú đang hóa xạ trị [95].

- Curcumin: các công trình nghiên cứu cho thấy Curcumin có tác dụng ngăn các tế bào ung thư đi vào pha S là pha tổng hợp của tế bào, thúc đẩy các tế bào ung thư đi vào quá trình chết theo chương trình và là chất ức chế tạo mạch máu mới mạnh [96],[97],[98],[99].

- Crilin T: thành phần có chứa alcaloid và flavonoid của cây Trinh nữ hoàng cung có tác dụng tăng cường miễn dịch, tăng số lượng tế bào lympho và khả năng chế tiết cytokine [100].

#### **1.4. TỔNG QUAN VỀ CÂY SÓI RỪNG (*Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai. Chloranthaceae)**

### 1.4.1. Vị trí phân loại

Cây sói rừng có tên khoa học là *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai, thuộc họ Hoa sói Chloranthaceae. Ở Việt Nam, sói rừng còn có tên khác là sói láng, sói nhẵn, cửu tiết kim túc lan, cửu tiết trà, cửu tiết phong, trúc tiết trà, tiếp cốt liên, thảo sách hồ, tiếp cốt mộc [101].

### 1.4.2. Đặc điểm thực vật

Sói rừng là loại cây bụi nhỏ, cao 1 - 2m, nhánh tròn, không có lông, lá mọc đối, có phiến dài xoan bầu dục, dài 7 - 18cm, rộng 2 - 7cm, đầu nhọn, mép có răng nhọn, gân phụ 5 cặp, cuống ngắn 5- 8mm. Bông kép, ít nhánh, nhánh ngắn. Hoa nhỏ, màu trắng, không cuống. Quả nhỏ, khi chín có màu đỏ gạch, mọng, gần tròn 6 x 4mm. Cây có hoa vào tháng 6 - 7, quả vào tháng 8 - 9 [101], [102].



*Ảnh 1.1. Cây Sói rừng [102]*

Theo Võ Văn Chi [101] cây Sói rừng phân bố ở nhiều nước như: Trung Quốc, Triều Tiên, Nhật Bản, Ấn Độ, Việt Nam và Malaixia. Cây có thể mọc hoang hoặc cũng được trồng để ướp trà hoặc làm thuốc. Ở Việt Nam, cây mọc hoang ở vùng núi đất, ở bìa rừng và ven đồi ẩm nhiều nơi như: Cao Bằng, Lạng Sơn, Thái Nguyên, Hòa Bình đến Kon Tum, Lâm Đồng.

### 1.4.3. Tính vị, tác dụng

Thu hái toàn cây vào mùa hạ, thu, dùng tươi hay phơi khô trong râm. Rễ thu hái quanh năm, rửa sạch cắt đoạn, phơi trong râm hoặc cũng có thể dùng tươi.

Cây có vị đắng, cay, tính hơi âm, cũng có độc, vào kinh tâm, can, có tác dụng hoạt huyết, chỉ thống, khu phong, trừ thấp, thanh nhiệt giải độc, kháng virus, kháng khuẩn, kháng u [101], [102].

Ở Trung Quốc, cây được dùng để chữa một số bệnh như: ung thư tụy, dạ dày, trực tràng, gan, lỵ, gãy xương, thấp khớp, đau lưng, cảm mạo, kinh nguyệt không đều. Liều dùng 20 – 40g, đun sôi uống hoặc tán bột uống với rượu hoặc dùng bột phối thành tễ uống. Hoa dùng để ướp trà [101], [102].

Ở Việt Nam, vị thuốc mới được dùng trong dân gian. Rễ ngâm rượu uống chữa đau tức ngực. Lá tươi giã đắp chữa rắn cắn, gãy xương, bong gân, mụn nhọt. Dạng thuốc sắc dùng liều 20 - 40g/ngày [101], [102].

### 1.4.4. Các nghiên cứu về cây sói rừng

#### 1.4.4.1. Trên thế giới

Các kết quả nghiên cứu của các nhà khoa học Trung Quốc, Mỹ, Nhật trong thời gian gần đây về cây thuốc này cho thấy thành phần hóa học của cây *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai là sesquiterpen, coumarin, flavonoid, triterpenoid, saponin, caroten, chất béo, polysaccharide. Trong đó saponin, coumarin, sesquiterpen và flavonoid là các nhóm chất chính [103], [104], [105], [106], [107], [108], [109].

Các nghiên cứu tại Trung Quốc cho thấy *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai có tác dụng tăng cường miễn dịch không đặc hiệu, chống virus, chống viêm, chống u, ức chế giảm bạch cầu và tiểu cầu, nâng cao sức đề kháng [110], [111], [10], [112], [113].

Các kết quả thử nghiệm *in vitro* cho thấy dịch chiết sói rừng có tác dụng



ức chế sự phát triển các dòng tế bào ung thư người Hep-A549, HCT-29, BGC-823 [114], [115].

Nghiên cứu về tác dụng kháng u, Wen J và cộng sự (2003) đã sử dụng dịch chiết *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai tiêm cho chuột được cấy ghép tế bào ung thư gan Hep-A22 đồng thời cũng quan sát tác dụng của dịch chiết trên sự phát triển *in vitro* của dòng tế bào này. Kết quả cho thấy dịch chiết đã làm giảm sự phát triển của tế bào ung thư Hep-A22 cả trên *in vitro* và *in vivo* [116].

Năm 2014, Triệu Ích tiêm dịch chiết sói rừng cho chuột mang khối u rắn Hep-H22 với các liều 1,5g/kg thể trọng, 3g/kg thể trọng. So sánh với nhóm chuột được tiêm 5-Fluorouracil và nhóm được tiêm phối hợp 5-Fluorouracil với sói rừng thấy tỷ lệ ức chế khối u là 26,84% ở lô chuột tiêm sói rừng liều thấp; 44,74% ở lô tiêm sói rừng liều cao; 30,70% ở lô tiêm 5-Fluorouracil và 58,39% ở lô tiêm kết hợp cả 2 loại thuốc [117].

Các tác giả Kang M, Tang A và cộng sự khi dùng dịch chiết sói rừng cho chuột “nude” cấy dòng tế bào gây ung thư biểu mô mũi - họng người thấy dịch này có tác dụng ngăn cản sự phát triển khối u *in vivo* do làm ngừng chu kỳ tế bào ở pha G1. Đồng thời, tỷ lệ biểu hiện Bax – là gen tạo điều kiện cho chết tế bào theo chương trình cũng tăng lên so với nhóm đối chứng [118],[119].

Trong một nghiên cứu khác của Zhenzhen Z, chất SGP-2, một polysaccharide chiết xuất từ *Sacandra glabra* đã ức chế sự tăng sinh và di căn của tế bào ung thư MG-63 trên *in vitro* [120]. Các kết quả nghiên cứu trên đã tạo tiền đề xây dựng cơ sở khoa học cho những nghiên cứu chống ung thư tiếp theo của các thành phần có hoạt tính sinh học trong cây sói rừng [121].

Đồng thời với nghiên cứu ức chế sự phát triển các tế bào u, các nhà khoa học còn tìm hiểu tác dụng lên hệ miễn dịch của cây sói rừng. Theo các tác giả He R. (2009) và Sun W. (2015) về tác dụng của dịch chiết *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai lên hệ miễn dịch của chuột thì dịch chiết có liên quan tới sự cân bằng của tế bào T, làm tăng phần trăm diệt tự nhiên và hiệu quả bảo vệ theo kiểu miễn dịch ở chuột bị ung thư thông qua sự cải thiện tỉ lệ và số lượng tế bào miễn dịch, tăng trọng lượng lách, tuyến ức và tăng số lượng bạch cầu [122],[123].

Trong một thí nghiệm của tác giả Từ Quốc Lượng và cộng sự (2005), dịch chiết phân đoạn cây sói rừng làm tăng trọng lượng lách, tuyến ức và số lượng tiểu cầu trên chuột xuất huyết giảm tiểu cầu [124]. Nghiên cứu ảnh hưởng của cây sói rừng trên điều trị giảm tiểu cầu do hóa trị liệu, Chen S. và cộng sự (2009) tiêm Cytosan liều 15mg/kg thể trọng kết hợp với dịch chiết sói rừng liều 36mg/kg thể trọng cho chuột cấy truyền tế bào ung thư S-180. Kết quả cho thấy khi phối hợp tiêm Cytosan và dịch chiết sói rừng không những làm tăng tỷ lệ ức chế sự phát triển khối u mà còn ngăn ngừa sự giảm tiểu cầu và tế bào lympho do Cytosan [125].

Trên các bệnh nhân ung thư biểu mô mũi họng, điều trị tia xạ kết hợp uống cao Sói rừng đã làm giảm được một số tác dụng phụ do tia xạ so với chỉ tia xạ đơn thuần [126].

#### **1.4.4.2. Tại Việt Nam**

Các nghiên cứu trong nước về cây sói rừng chưa có nhiều.

Trong nghiên cứu của Mai Thị Hải Yến (2010), khi dùng cao Sói rừng với liều 5g và 10g dược liệu /kg thể trọng chuột có tác dụng giảm trọng lượng u hạt thực nghiệm rõ rệt trên mô hình gây u hạt thực nghiệm bằng amian. Với liều 10g dược liệu/kg thể trọng chuột có tác dụng giảm đau trong 15 phút trên

mô hình gây đau thực nghiệm bằng acid acetic [127].

Còn tác giả Đỗ Thị Oanh (2010) khi nghiên cứu trên mô hình gây tổn thương gan bằng paracetamol liều cao nhận thấy cao Sói rừng có tác dụng làm giảm hoạt độ ALT, AST, làm giảm nồng độ MDA dịch đồng thể tế bào gan chuột và có tác dụng hạn chế tổn thương trên giải phẫu bệnh lý [128].

Nhìn chung, cho đến nay, các nghiên cứu về cây sói rừng tập trung chủ yếu về tác dụng kháng u và tăng các tế bào miễn dịch trên *in vitro* và *in vivo*. Ngoài ra, cũng chỉ tập trung nghiên cứu vào dịch chiết thô mà rất ít nghiên cứu tách chiết và phân lập hoạt chất, do đó khó có thể nói thành phần nào chịu trách nhiệm chính cho tác dụng này.

## CHƯƠNG 2

### CHẤT LIỆU, ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.1. CHẤT LIỆU NGHIÊN CỨU

##### 2.1.1. Thuốc nghiên cứu

- Thuốc dùng trong nghiên cứu là dạng cốm tan được sản xuất tại Khoa Dược, Bệnh viện Y học cổ truyền Cao Bằng theo quy trình: toàn bộ phần thân cây Sói rừng mọc trên mặt đất sau khi thu hái về được rửa sạch, thái lát, phơi khô, chiết toàn phần trong nước. Cốm cây sói rừng dùng trong nghiên cứu đạt tiêu chuẩn cơ sở.

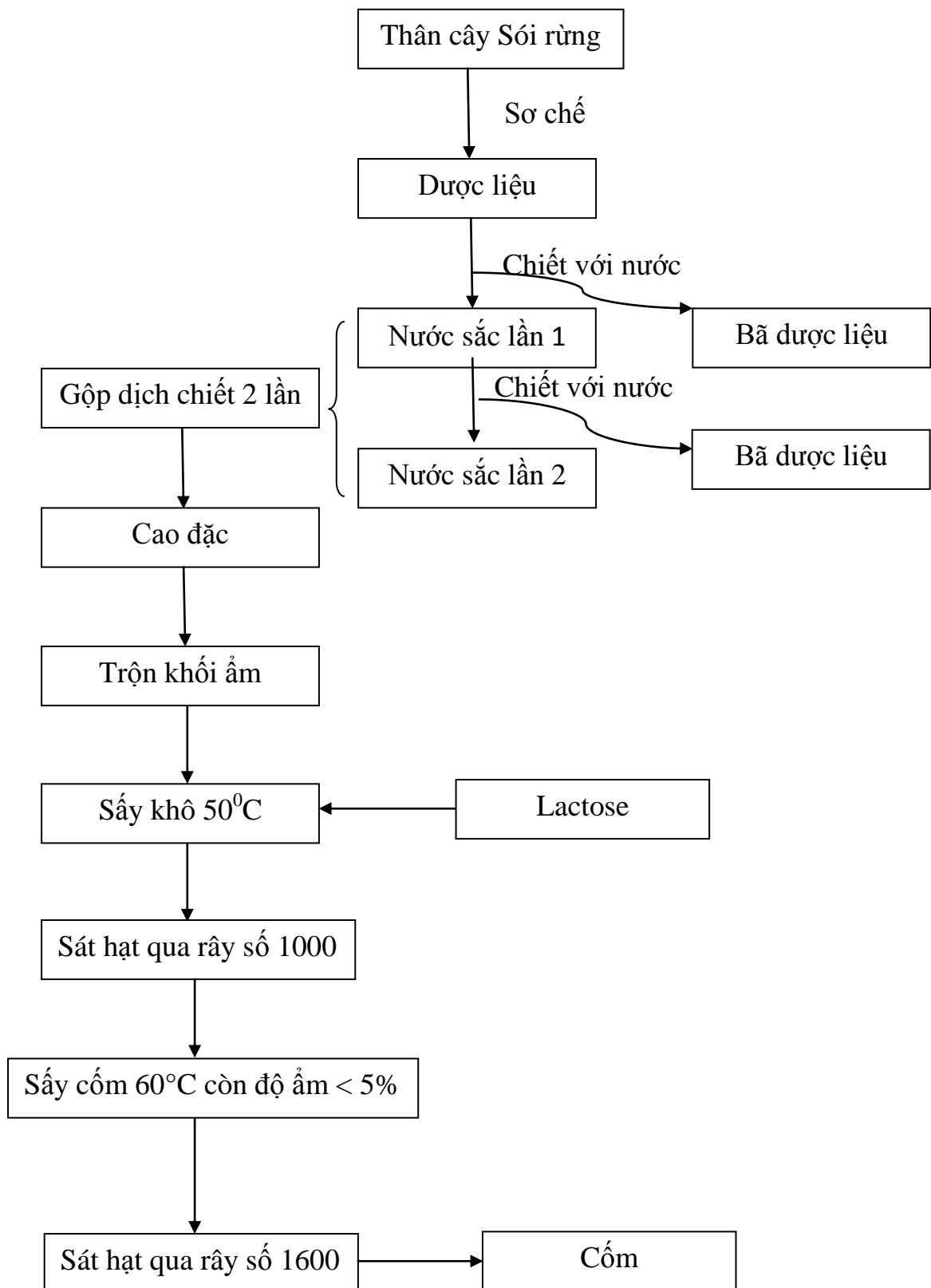
Mô tả chiết xuất và bào chế cốm cây sói rừng:

+ Chiết xuất hoạt chất: Lấy 10kg dược liệu cho vào nồi nấu, dùng vỉ ép chặt, đun với 10 lít nước sạch trong 120 phút rồi chiết lấy nước sắc lần 1. Đổ tiếp 10 lít nước sạch vào dược liệu như lần 1, đun sôi 120 phút, chiết lấy nước sắc lần 2.

+ Cô cao: Gộp nước sắc lần 1 và 2, cô thành cao đặc đạt tiêu chuẩn ĐDVN IV. Thêm chất bảo quản Nipagin 0,15% pha trong cồn tuyệt đối, phân tán đều vào cao đặc.

+ Tạo cốm: Cao đặc trộn với Lactose theo tỷ lệ (1: 2) tạo được khối ẩm vừa phải, sấy ở nhiệt độ 50°C trong khoảng 1 giờ lấy ra sàng qua rây số 1000. Sau đó sấy tiếp ở nhiệt độ 60°C cho đến khi cốm khô có độ ẩm  $\leq 5\%$  rồi sàng qua rây số 1600. Dùng cốm này để thử các tác dụng trên động vật thực nghiệm

- Thuốc đối chứng dương Purinethol (6 – MP): viên nén chứa 50mg mercaptopurine được sử dụng để điều trị nhiều loại ung thư, trong đó đặc trị các dạng ung thư mô liên kết, do công ty GlaxoSmithKline sản xuất.



Sơ đồ 2.1. Quy trình chiết xuất cốm cây sói rừng



*Ảnh 2.1. Côm cây sỏi rừng*

### 2.1.2. Hóa chất nghiên cứu

- Kit định lượng các chỉ số hóa sinh trong máu: ALT, AST, Albumin, Cholesterol, Bilirubin, Creatinin của hãng Hospitex Diagnostics (Italy) và hãng Dialab GmbH (Áo).

- Dung dịch xét nghiệm máu ABX Minidil LMG cho chuột của hãng ABX – Diagnostics.

- Kít định lượng IL-2 (mã: RAB0287-1KT), TNF- $\alpha$  (mã: REF KMC3011) cho chuột của hãng Invitrogen (Mỹ).

- Kháng thể kháng TCD3, TCD4, TCD8 cho chuột của hãng Invitrogen (Mỹ).

### 2.1.3. Phương tiện, dụng cụ

- Máy xét nghiệm huyết học VETABC™ Animal Blood Counter của hãng Ugo Basile (Italy).

- Máy xét nghiệm hóa sinh máu Screen Master của hãng Hospitex Diagnostics (Italy).

- Máy ELISA của hãng Bio-Rad (Mỹ).

- Máy đếm kỹ thuật dòng chảy FACS Canto II của hãng Becton Dickinson (Mỹ)

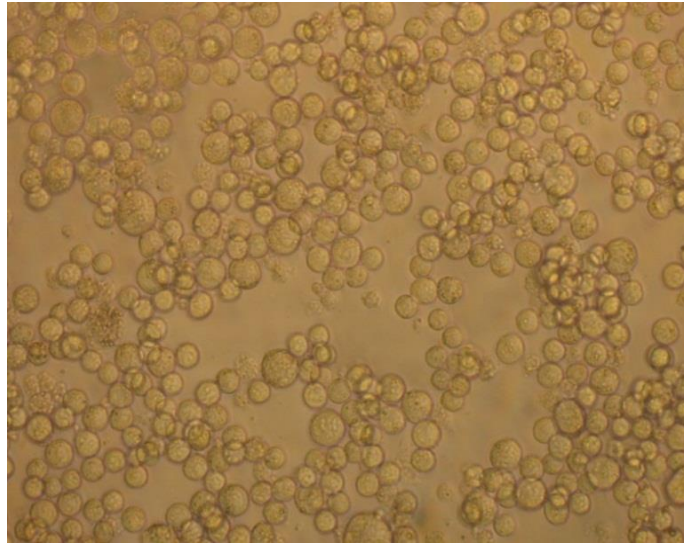
## 2.2. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

- Chuột nhắt trắng chủng Swiss (*Mus musculus*), cả hai giống, khỏe mạnh, cân nặng từ 20 – 22 gam, do Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương cung cấp.

- Thỏ chủng *Newzealand White*, lông trắng, cả 2 giống, khỏe mạnh, trọng lượng 1,8 - 2,2kg do Trung tâm nghiên cứu dê và thỏ Sơn Tây cung cấp.

- Tất cả các động vật trên được nuôi trong điều kiện đầy đủ thức ăn, nước uống, độ ẩm, độ thông khí và ánh sáng thích hợp tại khu nghiên cứu động vật thực nghiệm, Nhóm nghiên cứu ung thư thực nghiệm, bộ môn Sinh học tế bào, Khoa Sinh học trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội và Bộ môn Dược lý trường Đại học Y Hà Nội.

- Dòng tế bào u sarcoma 180 (S-180): là dòng tế bào sống trôi nổi trong môi trường nuôi cấy *in vitro*, có nguồn gốc từ chuột nhắt trắng *Mus musculus* chủng Swiss Webster bị ung thư mô liên kết, do ATCC cung cấp, được hoạt hóa và nhân nuôi tại Nhóm nghiên cứu Ung thư Thực nghiệm, bộ môn Sinh học tế bào, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.



*Ảnh 2.2. Tế bào ung thư mô liên kết Sarcoma-180 (100x4.6)*

## **2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.3.1. Xác định độc tính cấp và bán trường diễn của cỏm cây sói rừng**

#### **2.3.1.1. Xác định độc tính cấp**

- Thử độc tính cấp và xác định LD50 theo phương pháp Litchfield – Wilcoxon [129]: Chuột nhắt trắng trọng lượng 20 – 22gam được chia thành từng lô, mỗi lô 10 con. Cho từng lô chuột uống cỏm cây sói rừng với liều tăng dần từ liều cao nhất không gây chết chuột nào đến liều thấp nhất gây chết toàn bộ chuột thí nghiệm, thể tích cho uống hằng định là 0,2ml/10g thể trọng cho mỗi lần uống (0,4ml/chuột), uống 2lần/24 giờ. Chuột được nhịn ăn 12 giờ trước khi uống thuốc, 2 giờ sau khi uống thuốc lần 2, chuột được cho ăn trở lại. Theo dõi tình trạng chung của chuột và số lượng chuột chết ở mỗi lô trong 72 giờ. Sau đó tiếp tục theo dõi tình trạng chung của chuột đến hết ngày thứ 7 sau khi uống thuốc nghiên cứu.

- Xác định số chuột chết trong vòng 72 giờ đầu. Từ số chuột chết xây dựng được phương trình tương quan tuyến tính giữa liều dùng và tỷ lệ chuột chết để xác định LD50.



### **2.3.1.2. Xác định độc tính bán trường diễn của cốm cây sói rừng**

- Thử độc tính bán trường diễn của thuốc theo đường uống [130]:

Thỏ khỏe mạnh cả hai giống, được nuôi ổn định trong môi trường nghiên cứu trước khi cho uống thuốc. Thỏ được chia ngẫu nhiên thành 3 lô, mỗi lô 10 con, mỗi con nhốt riêng một chuồng. Thỏ được uống nước hoặc uống thuốc thử trong 8 tuần liên tục, mỗi ngày một lần vào buổi sáng:

Lô chứng : uống nước cất 3 ml/kg/ngày

Lô trị 1 : uống cốm cây sói rừng liều 0,6 g/kg/ngày (liều có tác dụng tương đương liều dùng trên người, tính theo hệ số 3)

Lô trị 2 : uống cốm cây sói rừng liều 3,0 g/kg/ngày

- Các chỉ tiêu theo dõi: được kiểm tra vào trước lúc uống thuốc, sau 4 tuần và sau 8 tuần uống thuốc.

+ Tình trạng chung của thỏ: hoạt động tự nhiên, tình trạng ăn uống, thể trọng của thỏ.

+ Đánh giá chức năng tạo máu: thông qua số lượng hồng cầu, hàm lượng hemoglobin, hematocrit, thể tích trung bình hồng cầu, số lượng bạch cầu, công thức bạch cầu và số lượng tiểu cầu.

+ Đánh giá chức năng gan: thông qua định lượng hoạt độ ALT, AST, bilirubin toàn phần, albumin và cholesterol.

+ Đánh giá chức năng thận: thông qua định lượng creatinin huyết thanh.

+ Mô bệnh học: Sau 8 tuần uống thuốc, thỏ được mổ để quan sát đại thể toàn bộ các cơ quan. Kiểm tra ngẫu nhiên cấu trúc vi thể gan, thận của 30% số thỏ ở mỗi lô.

### **2.3.2. Đánh giá tác dụng kháng u rắn sarcoma 180 của cốm cây sói rừng trên chuột nhắt**

#### **2.3.2.1. Phương pháp tạo khối u rắn trên chuột**

- Tế bào ung thư S-180 sau khi được hoạt hóa và nhân nuôi đảm bảo đủ số lượng sẽ được dùng để gây u trên chuột theo phương pháp của Lapis K [131]

- Tiêm 0,2ml huyền dịch tế bào S-180 (tương đương  $10^6$  tế bào) vào dưới da vùng lưng (lệch về phía bên phải chuột) để tạo u rắn.

- Chuột nhắt sau khi gây u được chia thành 2 nhóm, nhóm 1 dùng để theo dõi tác dụng của thuốc trên chuột mang u; nhóm 2 để theo dõi thời gian sống thêm của chuột.

#### **2.3.2.2. Đánh giá tác dụng kháng u:**

- Nhóm 1 có 06 lô, mỗi lô 10 con. Trong đó:

- |                        |  |
|------------------------|--|
| Lô chứng sinh học (SH) | : chuột khỏe mạnh bình thường, không cấy truyền tế bào u S-180   |
| Lô ung thư (UT)        | : chuột được cấy truyền tế bào u S-180 nhưng không được điều trị.  |
| Lô 6-MP                | : chuột được cấy truyền tế bào u S-180 , uống 6-MP hàng ngày liều 48mg/kg thể trọng                          |
| Lô SR1                 | : chuột được cấy truyền tế bào u S-180 , uống cốm cây sói rừng pha trong nước với liều 5g/kg thể trọng/ngày  |
| Lô SR2                 | : chuột được cấy truyền tế bào u S-180 , uống cốm cây sói rừng pha trong nước với liều 10g/kg thể trọng/ngày |
| Lô SR3                 | : chuột được cấy truyền tế bào u S-180 , uống cốm cây sói rừng pha trong nước với liều 20g/kg thể            |

trọng/ngày.

- 5 ngày sau khi được cấy truyền tế bào u S-180, các lô chuột được cho uống nước cất và các thuốc trong 18 ngày liên tục. Quan sát các biểu hiện, hoạt động, tập tính ăn uống vận động của chuột, thể trọng chuột, đo kích thước khối u bằng thước kẹp Caliper để theo dõi sự thay đổi kích thước khối u rắn.

- Tính thể tích khối u rắn theo công thức của Teicher B.A [132]:

$$V = 0,4.a.b^2$$

Trong đó: a: đường kính nhỏ nhất của khối u (mm).

b: đường kính lớn nhất của khối u (mm)

V: thể tích khối u (mm<sup>3</sup>)

- Đánh giá hiệu lực kháng u theo tiêu chuẩn của H.Itokawa [133]:

+ Xác định tỷ số phát triển khối u (GR-Growth Ratio):

$$GR (\%) = V_{\text{nghiên cứu}} / V_{\text{đối chứng}} \times 100$$

+ Xác định tỷ số ức chế khối u (IR-Inhibition Ratio):

$$IR (\%) = 100\% - GR$$

Thang đánh giá hiệu lực kháng u của H. Itokawa

IR (%)	Hiệu lực kháng u
0 – 30	-
31 – 60	+
61 – 90	++
91 – 100	+++



*Ảnh 2.3. Thước kẹp caliper*

### **2.3.2.3. Xác định thời gian sống thêm của chuột mang u**

- Nhóm 2 có 3 lô, mỗi lô 15 con. Trong đó:

Lô ung thư (UT) : chuột được cấy truyền tế bào u S-180 nhưng không được điều trị.

Lô 6-MP : chuột được cấy truyền tế bào u S-180 , uống 6-MP liều 48mg/kg thể trọng/ngày

Lô SR 1 : chuột được cấy truyền tế bào u S-180 , uống cốm cây sói rừng pha trong nước với liều 5g/kg thể trọng/ngày

- Chuột ở nhóm 2 tiếp tục được nuôi dưỡng, chăm sóc và theo dõi hằng ngày đến khi chuột chết, tính trung bình thời gian sống của mỗi lô, xác định % thời gian sống kéo dài thêm theo phương pháp của Gerant R.I. và cs [134].

$$ILS (\%) = \left( \frac{T_s}{C_s} - 1 \right) \times 100$$

Trong đó: Ts: thời gian sống trung bình của lô chuột có điều trị.

Cs: thời gian sống trung bình của lô chứng

ILS: thời gian sống tăng thêm ((Increased Life Span)

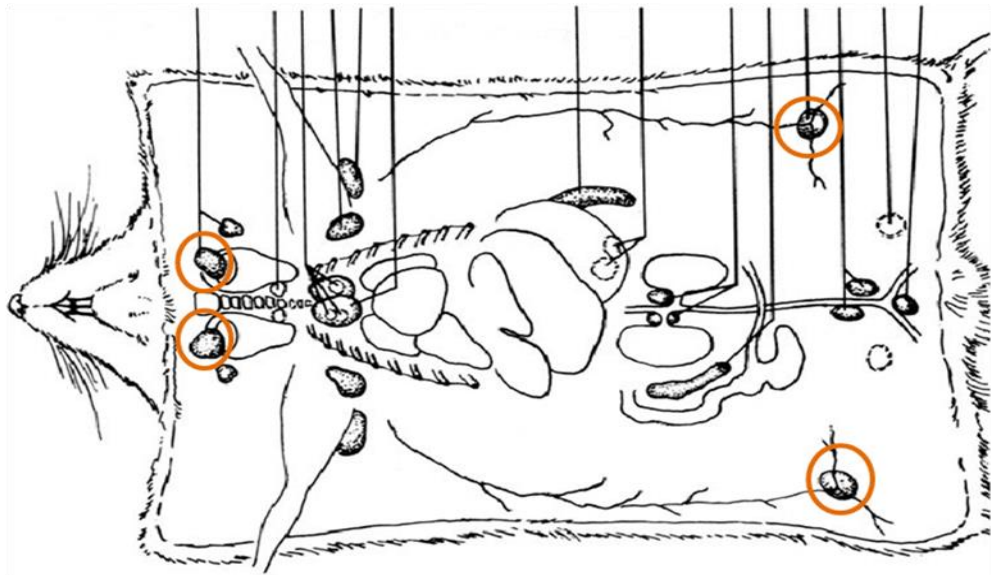
### 2.3.3. Khảo sát ảnh hưởng của cốm cây sói rừng trên tỷ lệ tế bào TCD3, TCD4, TCD8 nồng độ IL-2 và TNF- $\alpha$ của chuột mang u rắn sarcoma 180.

Đến ngày thứ 23 sau cấy truyền tế bào u S-180, mổ các lô chuột ở nhóm 1:

- Lấy huyết tương để định lượng IL-2, TNF- $\alpha$  và máu để xác định các tế bào máu ngoại vi.
- Thu hạch bạch huyết để xác định tế bào TCD3, TCD4, TCD8.
- Bóc tách toàn bộ lách và tuyến ức xét nghiệm giải phẫu bệnh.

#### 2.3.3.1. Phương pháp thu hạch bạch huyết để xác định tế bào TCD3, TCD4, TCD8

- Chuột thí nghiệm được gây mê bằng ete, tiến hành mổ thu lấy các hạch ở vị trí bẹn và cổ (hình 2.3). Các hạch bạch huyết sau khi thu được sẽ được chuyển vào đĩa nuôi cấy 24 giếng (đánh dấu cho từng đối tượng chuột) đã có sẵn 1ml PBS 1X vô trùng.



**Hình 2.1.** Sơ đồ vị trí các hạch bạch huyết trên cơ thể chuột [47]

- Tách tế bào lympho từ các hạch bạch huyết thu được (trong box cấy vô trùng): Sử dụng panh kẹp có đầu nhám đã được khử trùng nhẹ nhàng nghiền các hạch bạch huyết thu được. Tiến hành ly tâm dịch lympho vừa thu được. Thu cặn tế bào loại dịch nổi rồi hòa tan cặn tế bào vừa thu được bằng PBS vô trùng. Đối với mỗi chuột, chia số lượng tế bào lympho thu được vào 3 ống li tâm, mỗi ống chứa  $2 \cdot 10^6$  tế bào lympho/200 $\mu$ l dung dịch PBS rồi tiến hành ủ tế bào lympho với kháng thể đơn dòng gắn chất đánh dấu

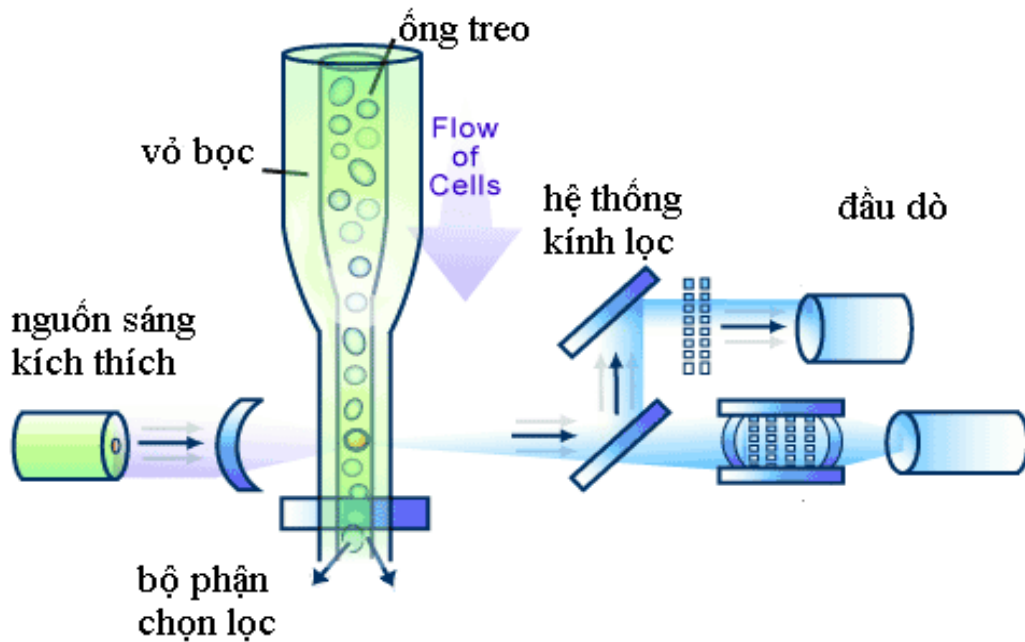
+ Ống 1: nhuộm với kháng thể kháng CD3 gắn FITC (gọi tắt là ống TCD3).

+ Ống 2: nhuộm với kháng thể kháng CD4 gắn PE (gọi tắt là ống TCD4).

+ Ống 3: nhuộm với kháng thể kháng CD8 gắn PE (gọi tắt là ống TCD8).

- Quy trình ủ được tiến hành theo hướng dẫn của hãng sản xuất: Tế bào được trộn với kháng thể theo tỷ lệ: 0.2  $\mu$ g kháng thể/ và  $10^6$  tế bào/100  $\mu$ l dung dịch pha loãng. Hỗn hợp được ủ 20 phút tại nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng trực tiếp. Sau đó li tâm 3 lần để loại bỏ các kháng thể dư thừa. Mẫu sau khi ủ được bảo quản trong PBS 1X, điều kiện nhiệt độ thấp và không có ánh sáng.

- Tiến hành đo mẫu trên máy flow cytometry (máy đếm tế bào dòng chảy): Hỗn hợp tế bào sau khi ủ với các loại kháng thể sẽ được đếm bằng máy FACS Canto II (BD) để xác định tỷ lệ các loại tế bào lympho. Đây là hệ thống đếm tế bào dual-platform, tức là cho kết quả đếm tế bào TCD3, TCD4, TCD8 dưới dạng phần trăm trên tổng số tế bào lympho.



**Hình 2.2. Cấu trúc cơ bản của hệ thống flow cytometry [135]**

### 2.3.3.2. *Phẫu thuật bóc tách lách và tuyến ức.*

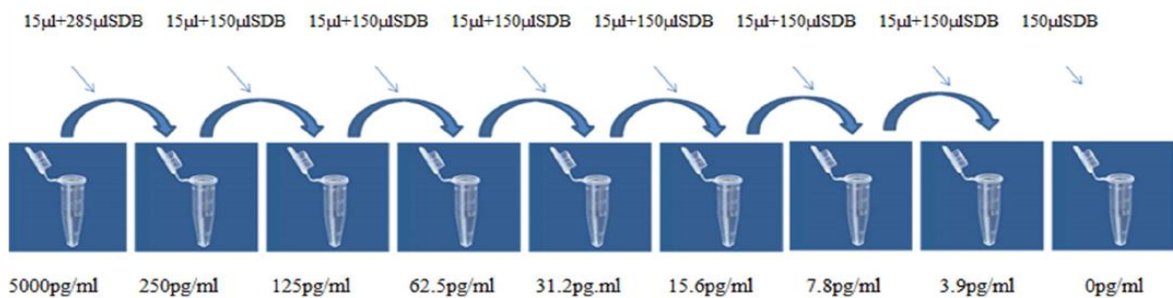
- Chuột sau khi được gây mê, mổ bụng và ngực để bóc lộ lách, tuyến ức. Lách và tuyến ức được ngâm vào dung dịch nuôi tế bào. Lọc sạch các tổ chức xung quanh, dùng gạc thấm khô rồi đem cân. Ghi lại trọng lượng lách, tuyến ức của từng chuột. Trọng lượng lách, tuyến ức tương đối bằng tỷ lệ trọng lượng các cơ quan này so với trọng lượng của từng chuột tương ứng

$$\text{Trọng lượng lách hoặc tuyến ức tương đối} = \frac{\text{Trọng lượng lách hoặc tuyến ức}}{\text{Thể trọng chuột}}$$

- Lấy tổ chức lách, tuyến ức làm giải phẫu vi thể.

**2.3.3.3. Định lượng các cytokine: IL-2 và TNF- $\alpha$  trong máu ngoại vi:** bằng phương pháp ELISA.

- Các bước tiến hành ELISA -TNF- $\alpha$  kit: Được thực hiện theo quy trình của hãng Invitrogen (Mỹ), sử dụng kit thử ELISA -TNF-  $\alpha$
- Xây dựng đường chuẩn: Vì nồng độ cytokine trong huyết thanh chuột là tương đối thấp so với nồng độ dãy chuẩn ban đầu nên cần phải pha loãng dãy chuẩn (hình 2.5) theo hướng dẫn của hãng.



**Hình 2.3. Dải nồng độ sử dụng để xây dựng đường chuẩn**

- Quy trình:

+ Thêm 50  $\mu$ l dung dịch phủ giếng Incubation buffer và 50  $\mu$ l huyết thanh nghiên cứu, 50  $\mu$ l Biotinylated Ms TNF- $\alpha$  vào mỗi giếng, ủ 2 giờ trong tối ở nhiệt độ 37°C.

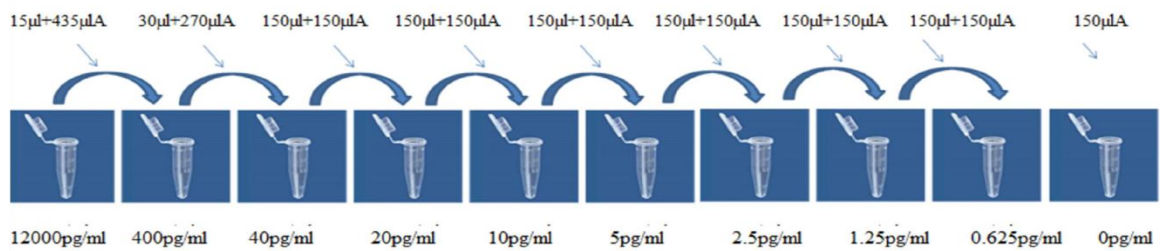
+ Rửa mỗi giếng 4 lần bằng WBF 1X. Thêm 100  $\mu$ l SAV-HRP 1X vào mỗi giếng, ủ tối trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng.

+ Tiếp tục rửa mỗi giếng 4 lần bằng WBF 1X rồi thêm 100  $\mu$ l dung dịch Stabilized chromogen vào mỗi giếng (trong điều kiện tối), sau đó tiếp tục ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Khi dung dịch trong giếng chuyển màu xanh thì bổ sung 100  $\mu$ l stop solution vào mỗi giếng (trong điều kiện tối). Sau 30 phút, đo mức độ hấp thụ màu OD của mẫu ở bước sóng 450nm.



▪ **Các bước tiến hành ELISA Interleukin-2 (IL2) kit:** Được thực hiện theo quy trình của hãng Invitrogen (Mỹ), sử dụng kit thử ELISA –IL-2.

- Xây dựng đường chuẩn: Để xây dựng đường chuẩn tương tự kit TNF- $\alpha$ , pha mẫu IL-2 chuẩn theo dãy nồng độ (Hình 2.6).



**Hình 2.4. Dãy nồng độ sử dụng để xây dựng đường chuẩn IL-2**

- Thêm 50  $\mu$ l dung dịch phủ giếng Incubation buffer và 50  $\mu$ l dung dịch mẫu vào mỗi giếng. Bọc giấy bạc, ủ 2 giờ ở nhiệt độ 37°C.

- Rửa mỗi giếng 4 lần bằng WBF 1X. Thêm 100  $\mu$ l Biotinylated IL-2 vào mỗi giếng, ủ lắc trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng.

- Tiếp tục rửa mỗi giếng 4 lần bằng WBF 1X rồi thêm 100  $\mu$ l SAV-HRP 1X vào mỗi giếng. Bọc giấy bạc rồi ủ 45 phút ở nhiệt độ phòng.

- Tiếp tục rửa mỗi giếng 4 lần bằng WBF 1X. Thêm 100  $\mu$ l dung dịch TMB vào mỗi giếng (trong điều kiện tối), không bọc giấy bạc, ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng cho đến khi dịch trong giếng chuyển màu xanh thì thêm 50  $\mu$ l stop solution vào mỗi giếng (vẫn trong điều kiện tối). Sau 30 phút, đo mức độ hấp thụ màu OD của mẫu ở bước sóng 450nm.

## 2.4. ĐỊA ĐIỂM VÀ THỜI GIAN NGHIÊN CỨU

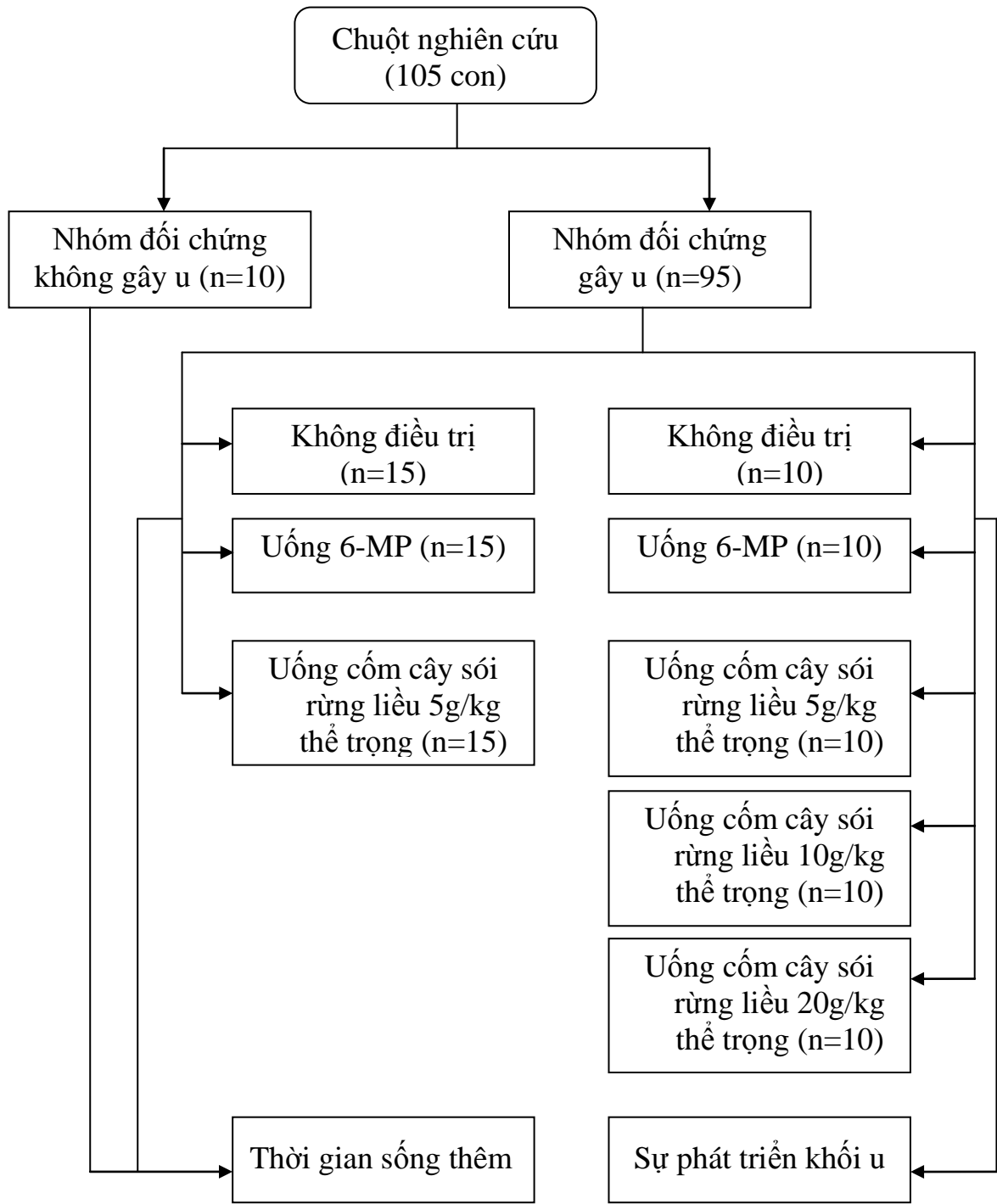
- Xác định độc tính cấp và bán trường diễn được thực hiện tại bộ môn Dược lý, trường Đại học Y Hà Nội. Quy trình đánh giá hình thái mô học gan, thận thỏ được thực hiện tại bộ môn Giải phẫu bệnh trường Đại học Y Hà Nội.

- Cùng với sự giúp đỡ và cộng tác của các cán bộ Nhóm nghiên cứu ung thư thực nghiệm, nghiên cứu viên thực hiện nghiên cứu đánh giá tác dụng kháng u rắn sarcom 180 trên thực nghiệm và tác dụng lên tỷ lệ tế bào TCD3, TCD4, TCD8 và nồng độ IL-2, TNF- $\alpha$  của chuột mang u tại bộ môn Sinh học tế bào, khoa Sinh học, Đại học KHTN, Đại học Quốc gia Hà Nội. Quy trình đánh giá hình thái mô bệnh học lách, tuyến ức và khối u được PGS.TS. Lê Đình Roanh tại Trung tâm Nghiên cứu và phát hiện sớm Ung thư đọc kết quả.

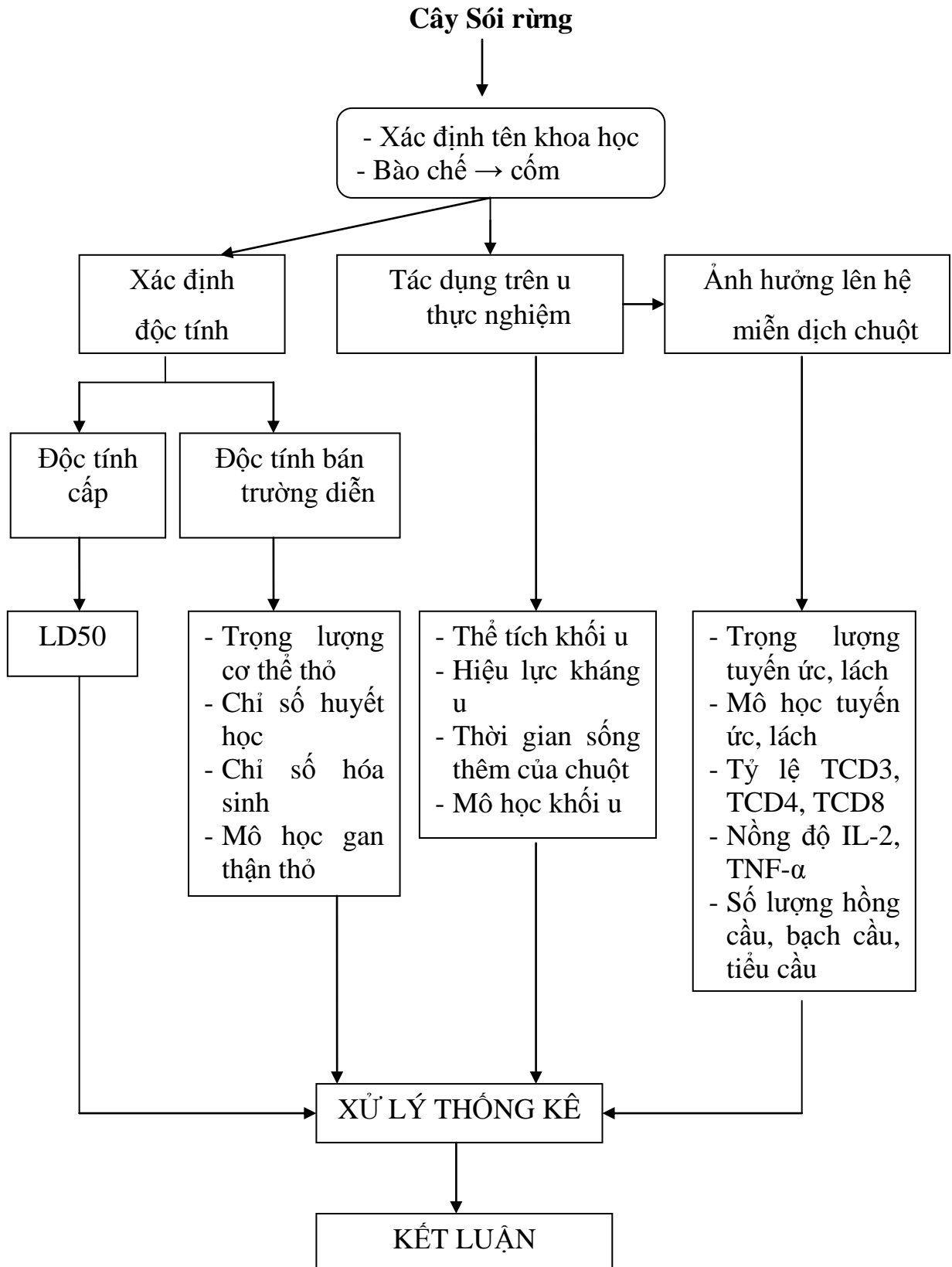
- Thời gian nghiên cứu: được tiến hành từ năm 2013 – 2015.

## 2.5. XỬ LÝ SỐ LIỆU

- Tất cả các số liệu thu được đều được xử lý theo phần mềm SPSS 15.0.
- Sử dụng thuật toán t-test student để so sánh giá trị trung bình.
- Thuật toán  $\chi^2$  để so sánh tỷ lệ.
- Thuật toán avant-apres để so sánh trước-sau.
- Số liệu được trình bày dưới dạng MEAN  $\pm$  SD. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi  $p < 0,05$ .



Sơ đồ 2.2. Cách phân chia các nhóm chuột theo dõi tác dụng kháng u



**Sơ đồ 2.3. Quy trình nghiên cứu**

## CHƯƠNG 3

### KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

#### 3.1. XÁC ĐỊNH ĐỘ TÍNH CẤP VÀ BÁN TRƯỜNG DIỄN CỦA CỎM CÂY SÓI RỪNG

##### 3.1.1. Độ tính cấp

Theo dõi tình trạng chung của chuột và số lượng chuột chết trong vòng 72 giờ. Tiếp tục theo dõi các dấu hiệu bất thường của chuột trong vòng 7 ngày sau khi đã uống thuốc.

*Bảng 3.1. Tỷ lệ chuột chết trong vòng 72 giờ đầu sau khi uống cỏm cây sói rừng*

STT	Liều uống (g dược liệu sói rừng/kg thể trọng)	Số chuột thử	% chuột chết ở mỗi lô
1	82,19	10	0
2	89,04	10	20
3	95,89	10	40
4	99,32	10	60
5	102,74	10	70
6	106,16	10	80
7	109,59	10	80
8	116,44	10	90
9	123,29	10	100

Từ tỷ lệ phần trăm chuột chết ở từng lô, tính liều LD50 theo phương pháp Litchfield – Wilcoxon được kết quả là:

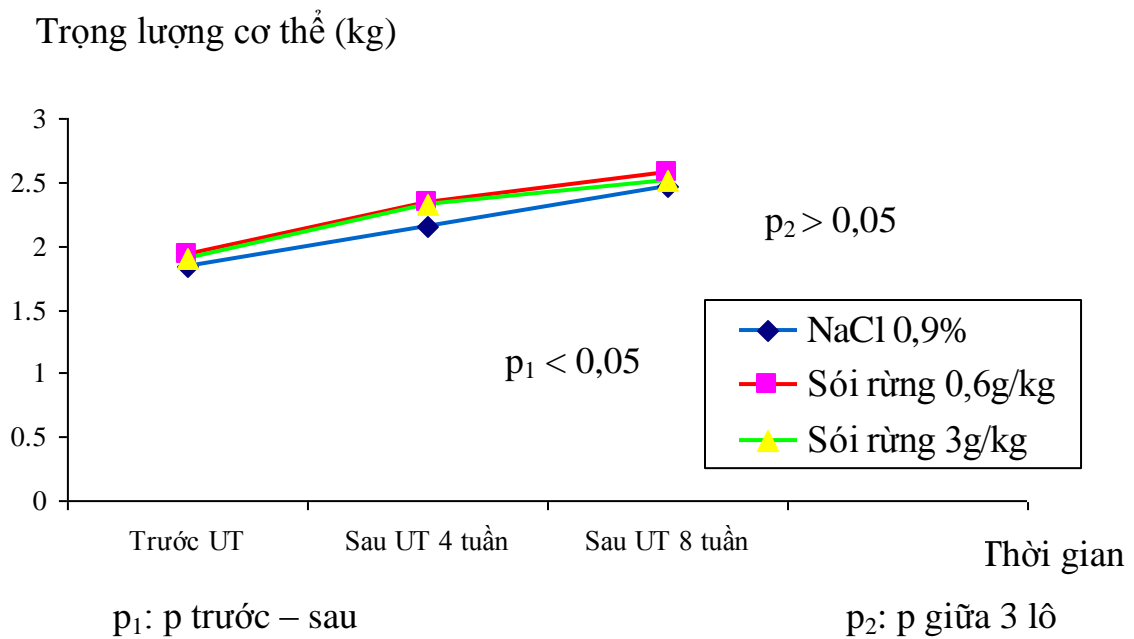
$$LD50 = 98,753 (89,065 - 103,597) \text{ g dược liệu/kg}$$

Nhận xét: Chuột ở lô uống 82,19g dược liệu sói rừng/kg thể trọng không có biểu hiện gì đặc biệt, chuột vẫn ăn uống, vận động và bài tiết bình thường.

- Số lượng chuột chết tăng dần theo liều dùng, từ 89,04g dược liệu/kg (chết 20% số chuột) đến 123,29g/kg (chết 100% số chuột). Số chuột chết tập trung trong 24 giờ đầu sau khi uống thuốc. Đa số các chuột trước khi chết đều có dấu hiệu khó thở. Sau 72 giờ, tất cả các chuột còn sống đều trở lại bình thường.

### 3.1.2. Độc tính bán trường diễn

#### 3.1.2.1. Ảnh hưởng của cốm cây sói rừng đến trọng lượng cơ thể của thỏ thí nghiệm



**Biểu đồ 3.1. Trọng lượng cơ thể thỏ qua các thời điểm nghiên cứu**

Nhận xét: 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. Không thấy biểu hiện gì đặc biệt ở cả 3 lô. Sau 4 tuần và 8 tuần uống thuốc, trọng lượng thỏ ở cả 3 lô đều tăng so với trước khi nghiên cứu ( $p < 0,05$ ). Không có sự khác biệt về mức độ gia tăng trọng lượng thỏ giữa lô chúng và các lô uống cốm cây sói rừng ( $p > 0,05$ ).

### 3.1.2.2. Ảnh hưởng của cốm cây sói rừng đến chức phận tạo máu

**Bảng 3.2. Sự thay đổi số lượng các tế bào máu ngoại vi ở thỏ**

Chỉ số nghiên cứu	Thời điểm nghiên cứu	Lô chứng	Lô uống cốm cây sói rừng 0,6g/kg	Lô uống cốm cây sói rừng 3g/kg	p
Hồng cầu (G/L)	Trước uống	5,07±0,36	5,18±0,44	4,63±0,76	> 0,05
	Sau uống 4 tuần	5,06±0,22	5,33±0,34	5,22±0,72	> 0,05
	Sau uống 8 tuần	5,21±0,25	5,32±0,39	5,35±0,38	> 0,05
Bạch cầu (T/L)	Trước uống	7,53±2,32	6,53±1,48	6,42±2,20	> 0,05
	Sau uống 4 tuần	6,8±2,08	6,10±1,39	6,65±1,65	> 0,05
	Sau uống 8 tuần	7,11±2,71	6,99±1,60	6,50±1,47	> 0,05
Tiểu cầu (T/L)	Trước uống	351,90±74,80	291,90±47,21	302,20±42,19	> 0,05
	Sau uống 4 tuần	308,60±72,23	270,33±83,59	279,60±83,93	> 0,05
	Sau uống 8 tuần	302,88±76,30	268,30±81,99	289,60±88,65	> 0,05

**Bảng 3.3. Ảnh hưởng của cốm cây sói rừng đến một số chỉ số huyết học**

Chỉ số nghiên cứu	Thời điểm nghiên cứu	Lô chứng	Lô uống cốm cây sói rừng 0,6g/kg	Lô uống cốm cây sói rừng 3g/kg	p
Hemoglobin (g/dl)	Trước uống	10,23±0,71	10,51±0,81	9,87±1,52	> 0,05
	Sau uống 4 tuần	10,17±0,48	10,75±0,63	10,59±1,05	> 0,05
	Sau uống 8 tuần	10,85±0,85	10,71±0,86	11,29±0,82	> 0,05
Hematocrit (%)	Trước uống	32,05±2,16	33,33±2,30	30,79±4,72	> 0,05
	Sau uống 4 tuần	32,12±1,46	34,15±1,62	33,14±3,30	> 0,05
	Sau uống 8 tuần	33,36±2,29	34,12±2,13	34,57±2,54	> 0,05
Thể tích TB HC (fl)	Trước uống	63,30±2,00	64,40±2,41	62,90±3,28	> 0,05
	Sau uống 4 tuần	63,50±2,22	61,70±1,70	64,20±1,99	> 0,05
	Sau uống 8 tuần	63,75±3,11	61,70±1,57	64,20±2,04	> 0,05

**Bảng 3.4. Ảnh hưởng của cám cây sói rừng đến công thức bạch cầu trong máu thỏ**

Chỉ số nghiên cứu	Thời điểm nghiên cứu	Lô chứng	Lô uống cám cây sói rừng 0,6g/kg	Lô uống cám cây sói rừng 3g/kg	p
Bạch cầu trung tính (%)	Trước uống	14,90±12,22	14,30±4,85	13,00±11,18	> 0,05
	Sau uống 4 tuần	19,20±7,22	18,10±7,06	18,89±8,02	> 0,05
	Sau uống 8 tuần	14,75±5,65	15,90±3,60	14,80±6,89	> 0,05
Bạch cầu lympho(%)	Trước uống	85,10±12,22	75,70±4,85	77,00±11,18	> 0,05
	Sau uống 4 tuần	80,80±7,22	81,90±7,06	76,11±8,02	> 0,05
	Sau uống 8 tuần	85,25±5,65	80,10±3,60	88,20±6,89	> 0,05

Nhận xét: kết quả từ các bảng 3.2, 3.3 và 3.4 cho thấy: tại 2 thời điểm sau dùng cám cây sói rừng 4 tuần và 8 tuần, tất cả các xét nghiệm đánh giá chức năng tạo máu (số lượng hồng cầu, hàm lượng huyết sắc tố, hematocrit, thể tích trung bình hồng cầu, số lượng bạch cầu, công thức bạch cầu, số lượng tiểu cầu) ở cả lô uống cám cây sói rừng với liều tương đương và liều gấp 5 lần liều lâm sàng đều không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng và so với thời điểm trước khi dùng cám cây sói rừng ( $p > 0,05$ ).



### 3.1.2.3. Ảnh hưởng của cỏ cây sói rừng đến chức năng gan

**Bảng 3.5. Ảnh hưởng của cỏ 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 cỏ cây sói rừng 0,6g/kg	Lô uống cỏ 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: cỏ 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 cốm cây sói rừng đến hoạt độ AST, ALT trong máu thỏ**

Chỉ số nghiên cứu	Thời điểm nghiên cứu	Lô chứng	Lô uống cốm cây sói rừng 0,6g/kg	Lô uống cốm 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	<b>&lt; 0,05</b>
	p trước – sau 8 tuần	> 0,05	> 0,05	<b>&lt; 0,05</b>	
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	<b>&lt; 0,05</b>	
	Sau uống 8 tuần	47,09 ± 9,38	58,11±17,28	73,57±12,31	<b>&lt; 0,05</b>
	p trước – sau 8 tuần	> 0,05	<b>&lt; 0,05</b>	<b>&lt; 0,05</b>	

Nhận xét:

- Hoạt độ AST tăng rõ rệt ở lô thỏ uống cốm cây sói rừng liều 3g/kg thể trọng sau 8 tuần uống và so với lô chứng ( $p < 0,05$ ).
- Với lô uống cốm cây sói rừng liều 0,6g/kg chỉ làm tăng hoạt độ ALT ở thời điểm sau uống 8 tuần và so với lô chứng ( $p < 0,05$ ). Trong khi lô uống

cỏm cây sói rừng liều cao (3g/kg thể trọng), hoạt độ ALT tăng một cách có ý nghĩa thống kê ở cả 2 thời điểm nghiên cứu.

#### 3.1.2.4. Ảnh hưởng của cỏm cây sói rừng đến chức năng thận

**Bảng 3.7. Ảnh hưởng của cỏm cây sói rừng đến nồng độ creatinin trong máu thỏ**

Chỉ số	Thời điểm nghiên cứu	Lô chứng	Lô uống sói rừng 0,6g/kg	Lô uống sói rừng 3g/kg	p
Creatinin (mg/dl)	Trước uống	1,05 ± 0,05	1,04 ± 0,05	1,05 ± 0,05	> 0,05
	Sau uống 4 tuần	1,06 ± 0,07	1,06 ± 0,05	1,08 ± 0,08	> 0,05
	p trước – sau 4 tuần	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
	Sau uống 8 tuần	1,08 ± 0,05	1,04 ± 0,05	1,07 ± 0,05	> 0,05
	p trước – sau 8 tuần	> 0,05	> 0,05	> 0,05	

Nhận xét: sau 4 tuần và 8 tuần uống liên tục, ở cả 2 lô uống cỏm cây sói rừng, hàm lượng creatinin trong máu thỏ không có sự thay đổi khác biệt so với lô chứng và so với thời điểm trước khi uống ( $p > 0,05$ ).

#### 3.1.2.5. Ảnh hưởng của cỏm cây sói rừng đến cấu trúc đại thể và vi thể

Sau khi cho thỏ uống cỏm cây sói rừng 8 tuần, chọn ngẫu nhiên và giết 30% số thỏ ở mỗi lô để kiểm tra cấu trúc đại thể các cơ quan và cấu trúc vi thể gan, thận. Kết quả như sau:

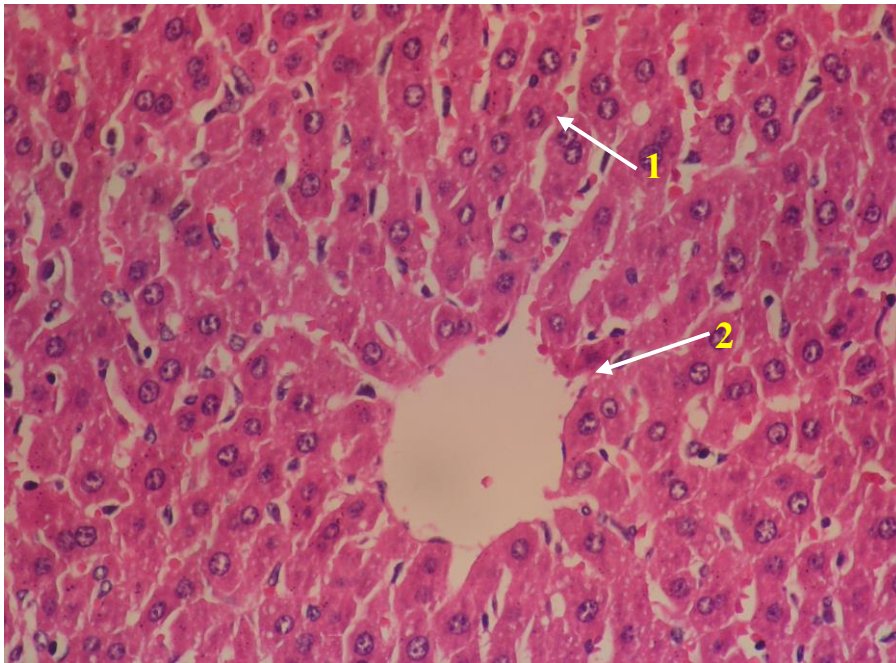
- Đại thể các cơ quan: Trên tất cả các thỏ thực nghiệm (cả lô chứng và 2 lô uống thuốc nghiên cứu), không quan sát thấy có thay đổi bệnh lý nào về mặt đại thể của các cơ quan tim, phổi, gan, lách, tụy, thận và hệ thống tiêu hoá của thỏ.

- Hình ảnh vi thể gan thỏ sau 8 tuần uống cỏm cây sói rừng:

- + Lô chứng: 100% thỏ có cấu trúc vi thể gan hoàn toàn bình thường. Tế bào gan không thoái hóa, không hoại tử, không xung huyết.

+ Lô uồng cốm cây sói rừng 0.6g/kg: phần lớn gan thỏ có hình ảnh thoái hóa vừa và nhẹ, các tế bào gan phồng, bào tương chứa các hốc sáng nhỏ.

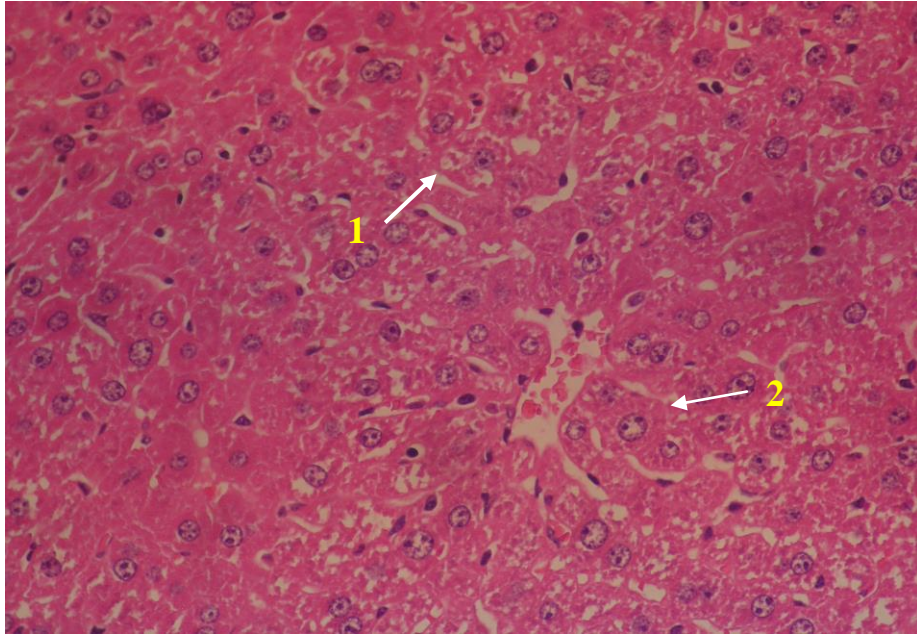
+ Lô uồng cốm cây sói rừng 3/kg: mẫu bệnh phẩm tế bào gan thỏ có hình ảnh thoái hóa mức độ từ nhẹ đến nặng. Các tế bào gan phồng to, bào tương chứa nhiều hốc sáng không đều.



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

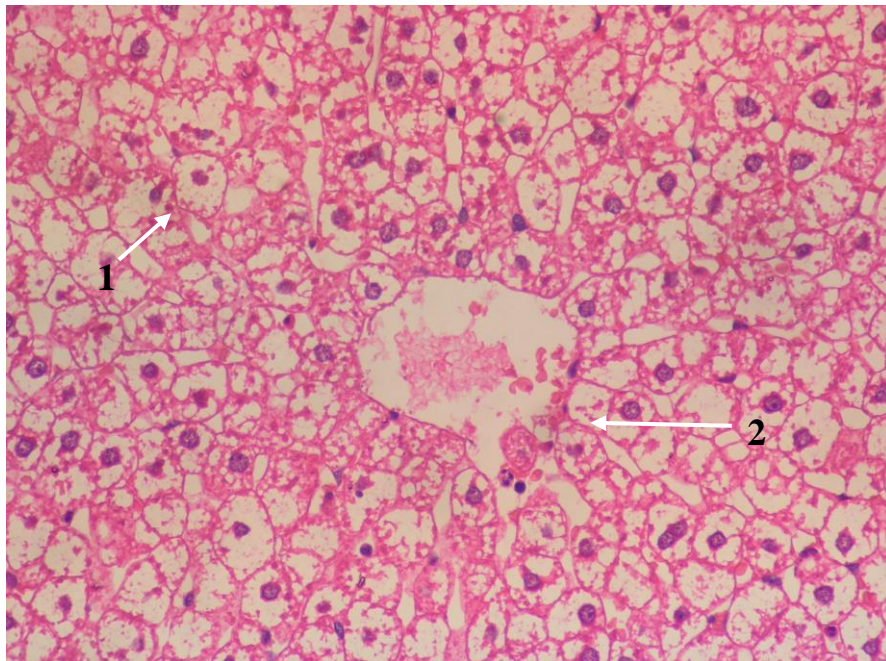
*1. Tế bào gan không thoái hóa*

*2. Xoang mạch không xung huyết*



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

*1. Tế bào gan thoái hóa nhẹ    2. Xoang mạch không xung huyết*



*Ảnh 3.3. Hình ảnh vi thể gan thỏ lô sỏi rùng 3g/kg (HE x 250)*

*1. Tế bào gan thoái hóa nặng                      2. Xoang mạch không xung huyết*

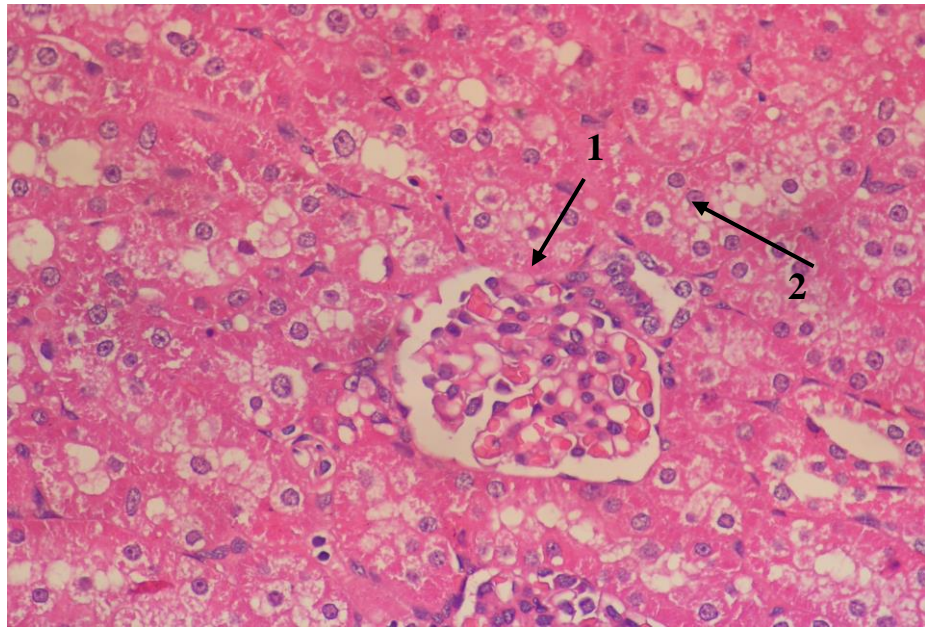


- Hình ảnh vi thể thận thỏ sau 8 tuần uống cỏ cây sói rừng

+ Lô chứng: 2/3 bệnh phẩm có hình ảnh và cấu trúc cầu thận và ống thận bình thường, riêng một mẫu bệnh phẩm có hình ảnh thoái hóa vừa ống lượn gần (mẫu số 84)

+ Lô uống cỏ cây sói rừng 0,6g/kg: 2/3 bệnh phẩm có hình ảnh cầu thận, ống lượn gần bình thường (mẫu số 14)

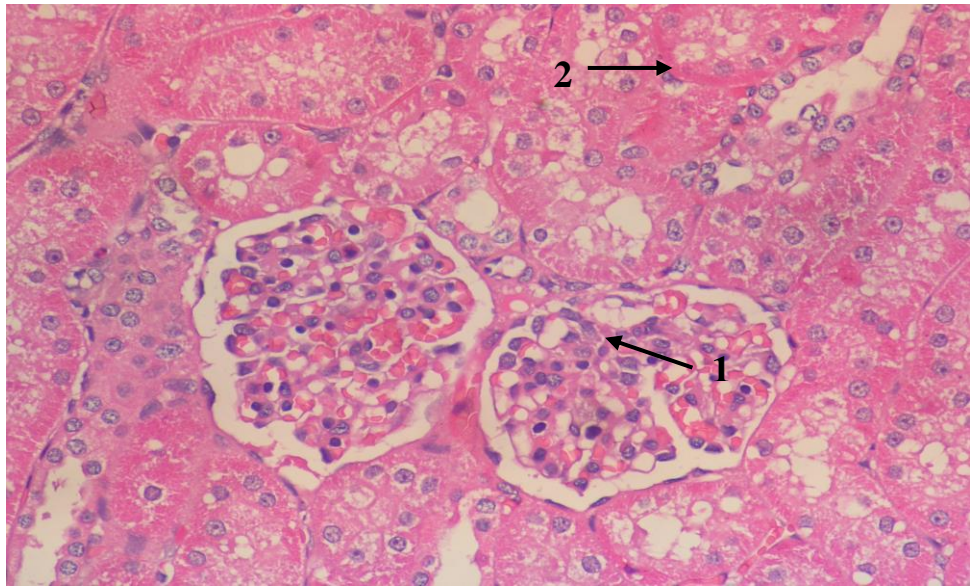
+ Lô uống cỏ cây sói rừng 3g/kg: bệnh phẩm có hình ảnh cầu thận bình thường, thoái hóa nhẹ ống lượn gần.



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

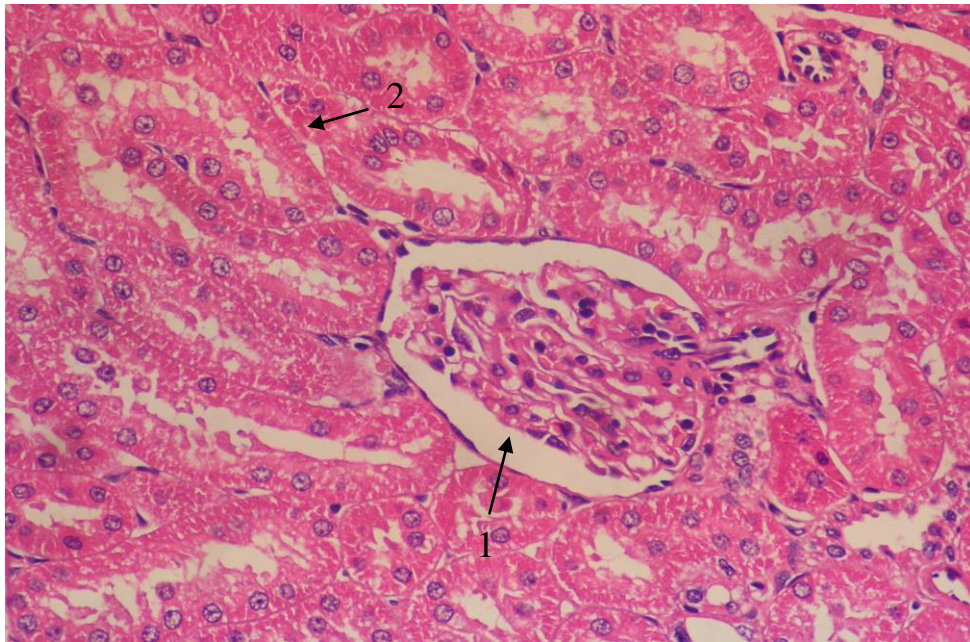
*1. Cầu thận bình thường*

*2. Ống lượn gần bình thường*



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

**1. Cầu thận bình thường      2. Ống lượn gần bình thường**



**Ảnh 3.6. Hình ảnh vi thể thận thỏ lô sỏi rùng 3g/kg (HE x 250)**

**1. Cầu thận bình thường      2. Ống lượn gần thoái hóa nhẹ**

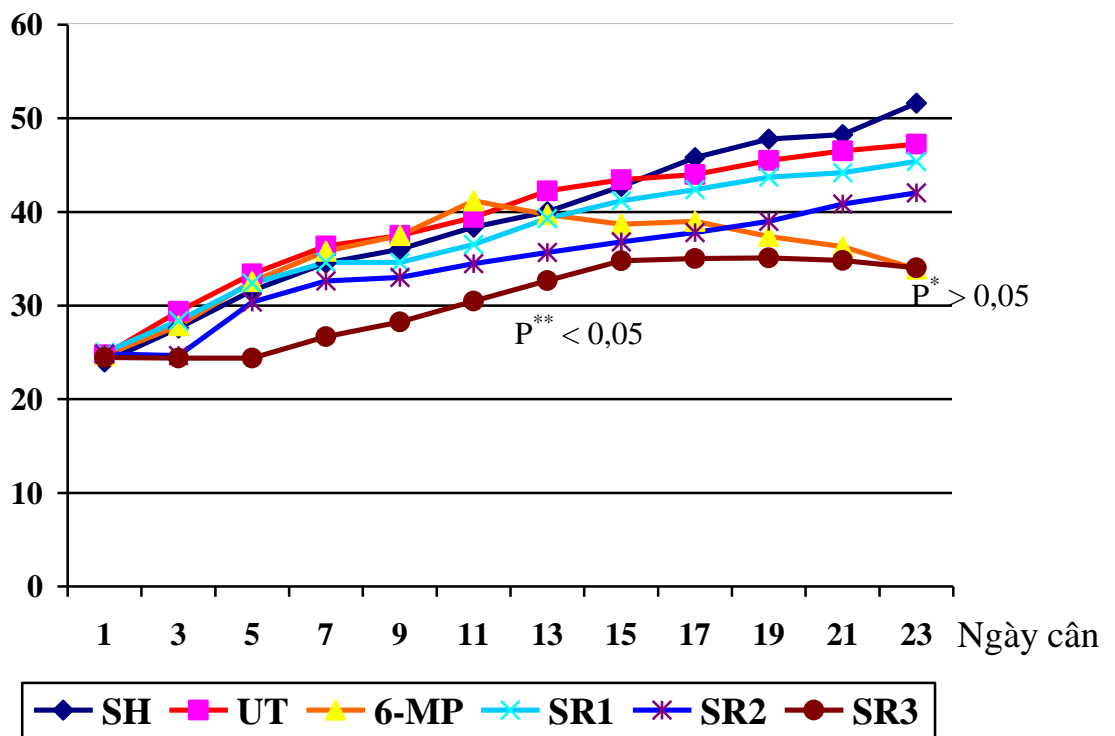
## 3.2. ĐÁNH GIÁ TÁC DỤNG KHÁNG U RẮN SARCOMA 180 CỦA CÓM CÂY SÓI RỪNG

### 3.2.1. Kết quả tạo khối u thực nghiệm

Kết quả tạo mô hình thực nghiệm cho thấy toàn bộ chuột nhắt trắng sau 5 ngày được tiêm huyền dịch chứa  $10^6$  tế bào sarcoma 180 vào dưới da vùng lưng đều thấy xuất hiện những khối ung thư phát triển tại dưới da vùng lưng. Thể tích khối u tăng dần theo thời gian gây u. Động vật mang u vào giai đoạn muộn có biểu hiện bỏ ăn, suy kiệt, xù lông và một số bắt đầu chết vào khoảng ngày 18 sau khi tiêm tế bào ung thư.

### 3.2.2. Ảnh hưởng của cốm cây sói rừng đến trọng lượng cơ thể của chuột mang u

Trọng lượng cơ thể (g)



p\* : p lô SR so với lô SH

p\*\* : p lô 6-MP so với các lô

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

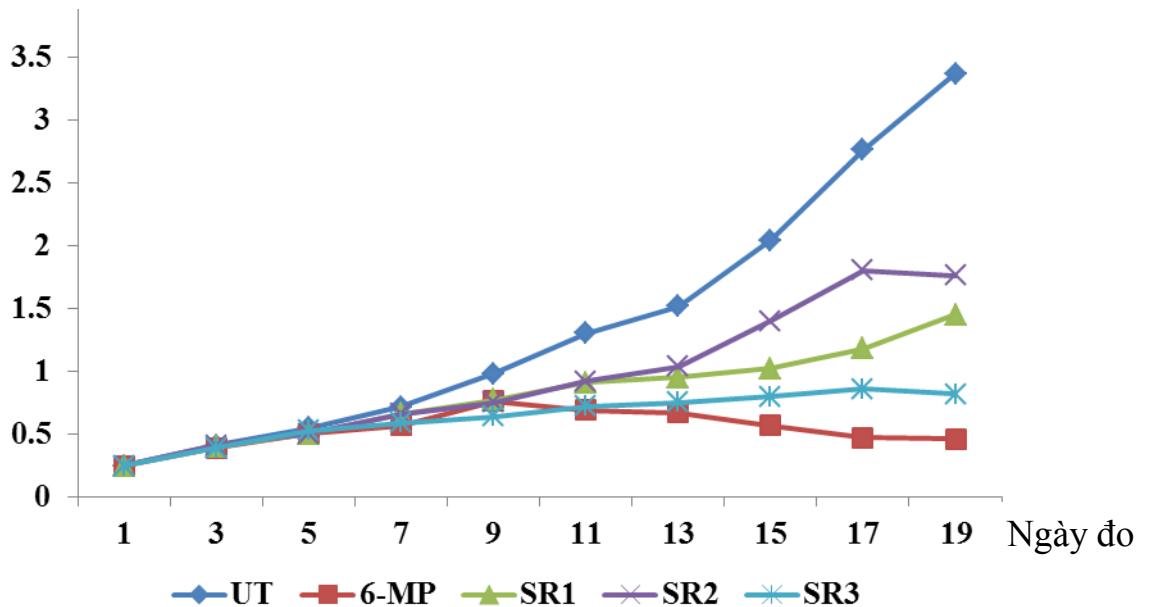


Nhận xét:

- Trọng lượng chuột ở các lô đều tăng sau mỗi lần cân. Với lô 6 – MP, từ ngày cân thứ 13, trọng lượng trung bình của chuột bắt đầu giảm so với các lô và giảm mạnh ở các ngày cân cuối. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ .
- Ở các lô chuột bị ung thư được điều trị bằng cốm cây sói rừng, trọng lượng chuột có tăng nhưng thấp hơn sự tăng trọng lượng ở lô chứng. Tuy nhiên, ở lô uống cốm cây sói rừng liều 10g/kg thể trọng (lô SR2) và 20g/kg thể trọng (lô SR3), trọng lượng chuột thấp hơn hẳn so với lô uống cốm cây sói rừng liều 5g/kg (lô SR1). Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa 2 lô uống cốm cây sói rừng liều 5g/kg và lô SH với  $p > 0,05$ .

### 3.2.3. Ảnh hưởng của cốm cây sói rừng đến sự phát triển khối u

Thể tích trung bình u ( $\text{cm}^3$ )



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

Nhận xét:

- Ở ngày đo thứ 3 và 5, thể tích trung bình u ở 5 lô chuột không có sự khác biệt.

- Từ ngày đo thứ 7, bắt đầu có sự khác biệt về thay đổi thể tích trung bình của khối u giữa các lô chuột:

+ Lô UT: thể tích tăng liên tục và rất nhanh sau mỗi lần đo (tăng từ  $0,98\text{cm}^3$  lên  $3,37\text{cm}^3$ ).

+ Lô 6-MP: thể tích khối u bắt đầu giảm sau mỗi lần đo (giảm từ  $0,76\text{cm}^3$  xuống còn  $0,46\text{cm}^3$ ).

+ Lô SR1: thể tích khối u tăng dần nhưng tốc độ tăng chậm hơn so với lô UT và lô SR2.

+ Lô SR2: thể tích khối u cũng tăng liên tục sau mỗi lần đo nhưng tốc độ tăng chậm hơn so với lô UT. Tuy nhiên lại tăng nhanh hơn so với lô SR3.

+ Ở lô SR3: thể tích khối u không tăng liên tục và tăng ít sau mỗi lần đo. Ở ngày đo thứ 19, thể tích khối u không khác biệt so với ngày thứ 15.

**Bảng 3.8. Tỷ lệ chuột có giảm thể tích khối u sau 18 ngày điều trị**

Lô chuột	Chuột tạo u		Chuột giảm thể tích u			
			Ngày 10 sau uống thuốc		Ngày 18 sau uống thuốc	
	n	Tỷ lệ (%)	n	Tỷ lệ (%)	n	Tỷ lệ (%)
UT	10/10	100	0/10	0	0/10	0
6-MP	10/10	100	4/10	40	8/10	80
SR1	10/10	100	0/10	0	6/10	60
SR2	10/10	100	0/10	0	4/10	40
SR3	10/10	100	2/10	20	7/10	70

Nhận xét:

- Sau 18 ngày điều trị, ở lô chuột dùng 6-MP có 80% cá thể chuột có hiện tượng giảm thể tích khối u. Với các lô uống cỏm cây sói rừng, tỷ lệ chuột giảm kích thước u lần lượt là 60%; 40%; 70% tương ứng với các liều là 5g/kg thể trọng, 10g/kg thể trọng và 20g/kg thể trọng.

**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 <sup>3</sup> ) ( $\bar{X} \pm SD$ )	p
1	UT	10	3,37±0,33	p <sub>2-3</sub> < 0,05 p <sub>2-4</sub> < 0,05 p <sub>2-5</sub> > 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 *	

\*: Khác lô UT với p < 0,05

Nhận xét:

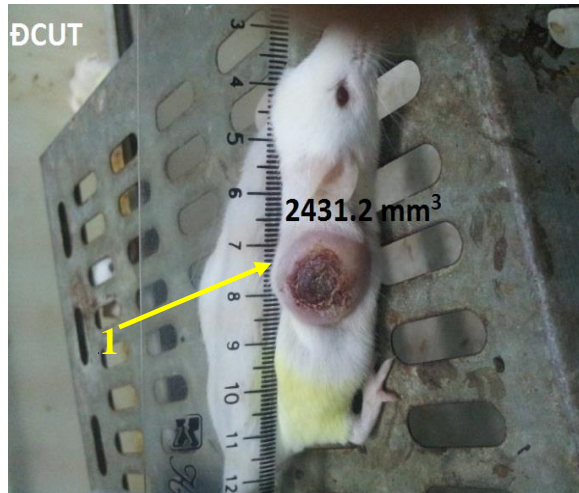
- Cỏm cây sói rừng liều 5g/kg, 10g/kg và 20g/kg thể trọng đều làm giảm sự phát triển của khối u có ý nghĩa thống kê so với lô UT (p < 0,05).
- Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (p > 0,05) về khả năng làm giảm sự phát triển khối u giữa lô SR 3 với lô 6-MP.

### 3.2.4. Hiệu lực kháng u của thuốc nghiên cứu

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

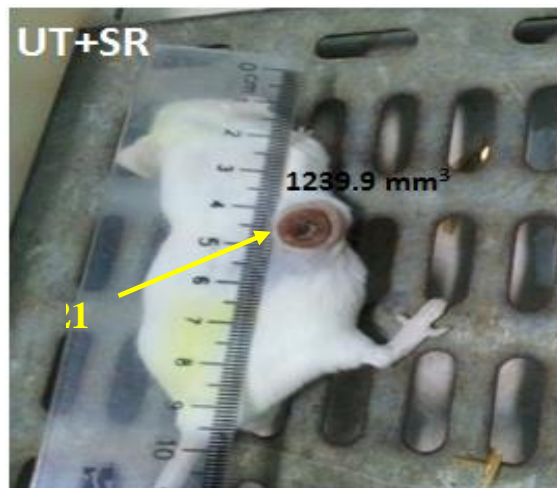
Lô chuột	Tỷ số ức chế u (%)	Hiệu lực kháng u
6-MP	86,35	++
SR1	56,97	+
SR2	47,48	+
SR3	75,67	++

Nhận xét: khả năng làm giảm khối u của lô SR1 là 56,97% và lô SR2 là 47,48%, đạt hiệu lực kháng u (+) theo thang đánh giá của H.Itokawa; còn các lô 6-MP và SR3 đều đạt hiệu lực kháng u (++) với tỷ số ức chế u lần lượt là 86,35% và 75,67%.



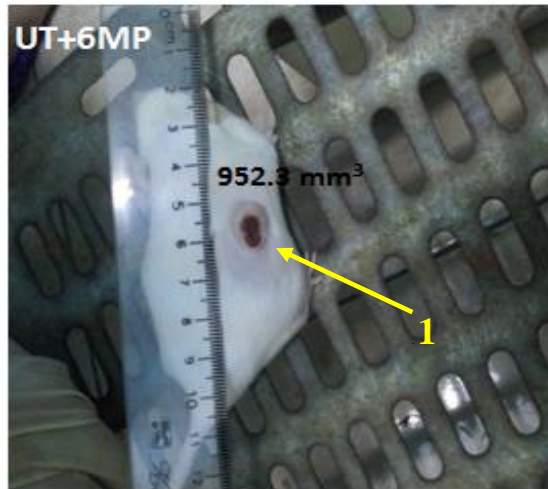
***Ảnh 3.7: Khối u ở chuột lô UT vào ngày thứ 23 sau cấy truyền tế bào sarcoma 180***

**1. Khối u của chuột**



***Ảnh 3.8: Khối u ở chuột tại lô uống cỏm cây sói rừng 5g/kg thể trọng vào ngày thứ 23 sau cấy truyền tế bào sarcoma 180***

**1. Khối u của chuột**



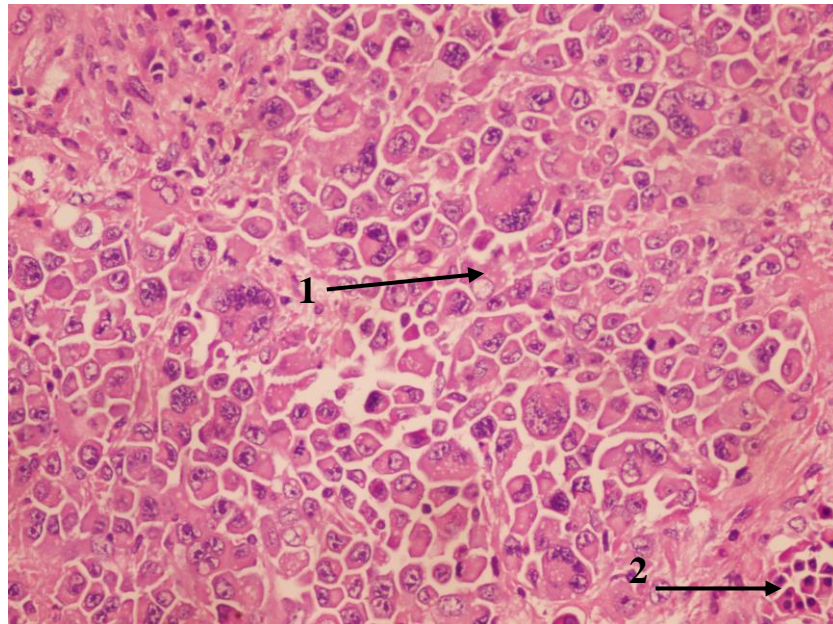
***Ảnh 3.9: Khối u ở chuột tại lô uống 6-MP vào ngày thứ 23 sau cấy truyền tế bào sarcoma 180***

**1. Khối u của chuột**

**3.2.5. Ảnh hưởng của côm cây sói rừng đến hình ảnh vi thể khối u**

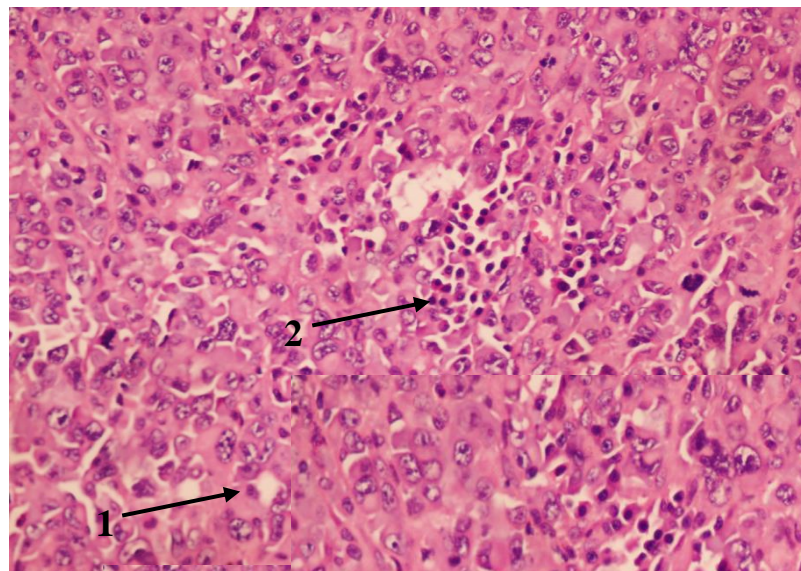
- Lô ung thư : u ác tính, tế bào đa dạng, nhân đa hình thái, nhiều nhân chia điển hình và không điển hình, vùng rìa u có xâm nhập nhiều bạch cầu đa nhân và lympho bào
- Lô 6-MP : đa hình thái tế bào, nhiều nhân chia, xâm nhập lympho và tương bào ít
- Lô SR1 (liều 5g/kg) : tế bào u đa hình thái, có các vùng hoại tử, chỉ còn những đảo tế bào u nằm trên vùng hoại tử hoàn toàn, có phản ứng xơ hóa, nhiều lympho và tương bào
- Lô SR2 (liều 10g/kg) : tế bào u đa dạng, có ít vùng hoại tử, mô đệm có xâm nhập nhiều lympho bào, tương bào
- Lô SR3 (liều 20g/kg) : tế bào u đa dạng, có ít vùng hoại tử, mô đệm có phản ứng xơ mạnh





**Ảnh 3.10. Hình ảnh vi thể khối u chuột lô UT (HE x 400)**

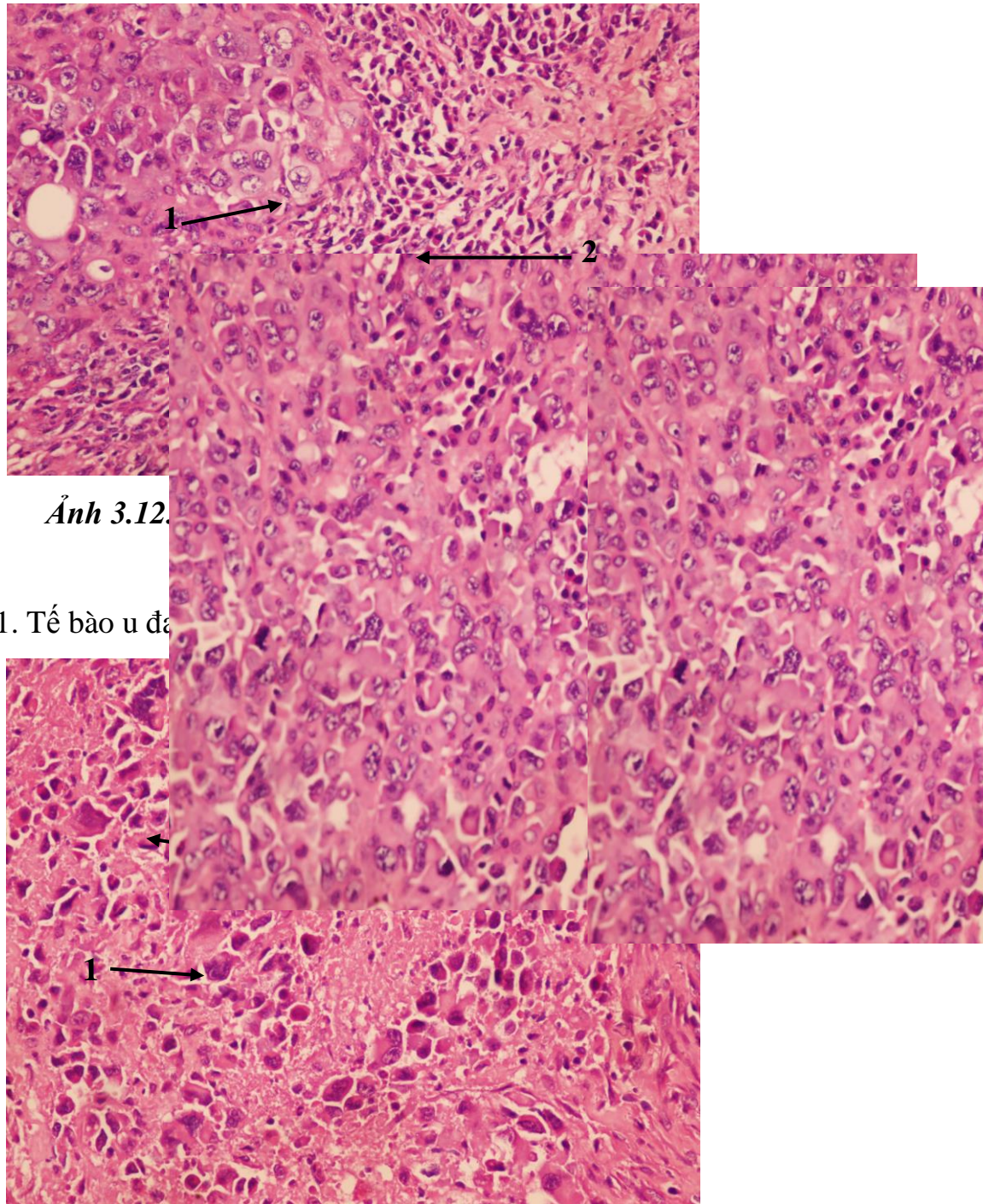
1. Tế bào u nhân chia không điển hình
2. Tế bào lympho



**Ảnh 3.11.**

1. Tế bào u nhân chia không điển hình





*Ảnh 3.12.*

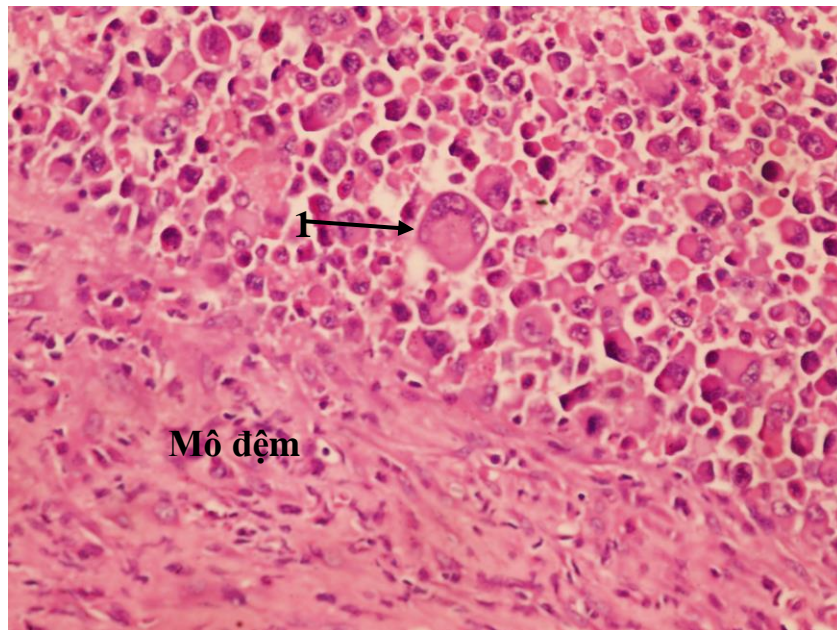
1. Tế bào u đ

*Ảnh 3.13. Hình ảnh vi thể khối u chuột lô SR2*

(HE x 400)

1. Tế bào u

2. Tế bào lympho



**Ảnh 3.14. Hình ảnh vi thể khối u chuột lô SR3**

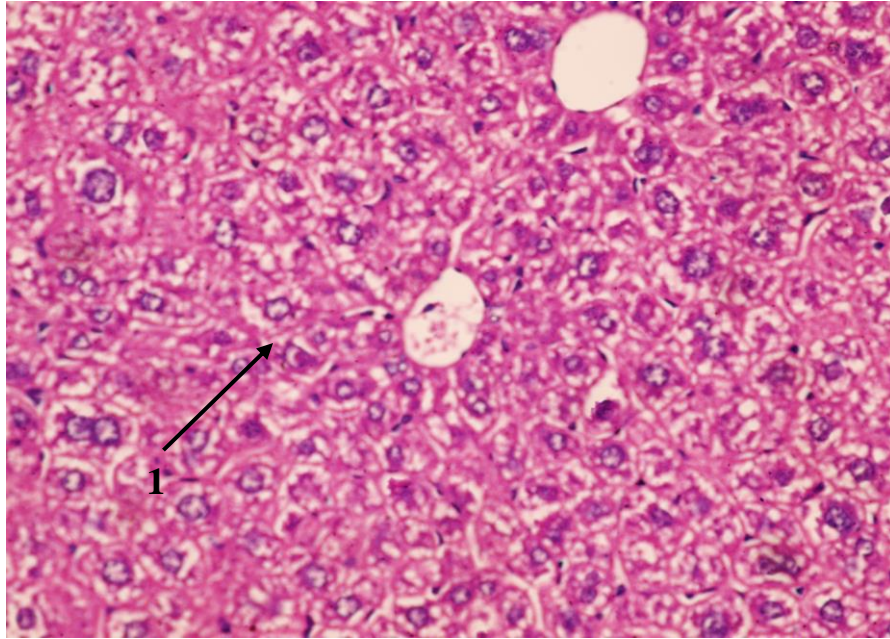
(HE x 400)

1. Tế bào u

### **3.2.6. Ảnh hưởng của côm cây sói rừng đến vi thể gan**

- Lô sinh học : tế bào gan thoái hóa nhẹ
- Lô 6-MP : tế bào gan thoái hóa nhẹ, bào tương tế bào gan có ít hốc sáng nhỏ
- Lô SR1 (liều 5g/kg) : tế bào gan thoái hóa nhẹ, bào tương tế bào gan có ít hốc sáng nhỏ
- Lô SR2 (liều 10g/kg) : tế bào gan thoái hóa nhẹ, bào tương tế bào gan có ít hốc sáng nhỏ
- Lô SR3 (liều 20g/kg) : tế bào gan thoái hóa vừa, bào tương tế bào gan có khá nhiều hốc sáng nhỏ

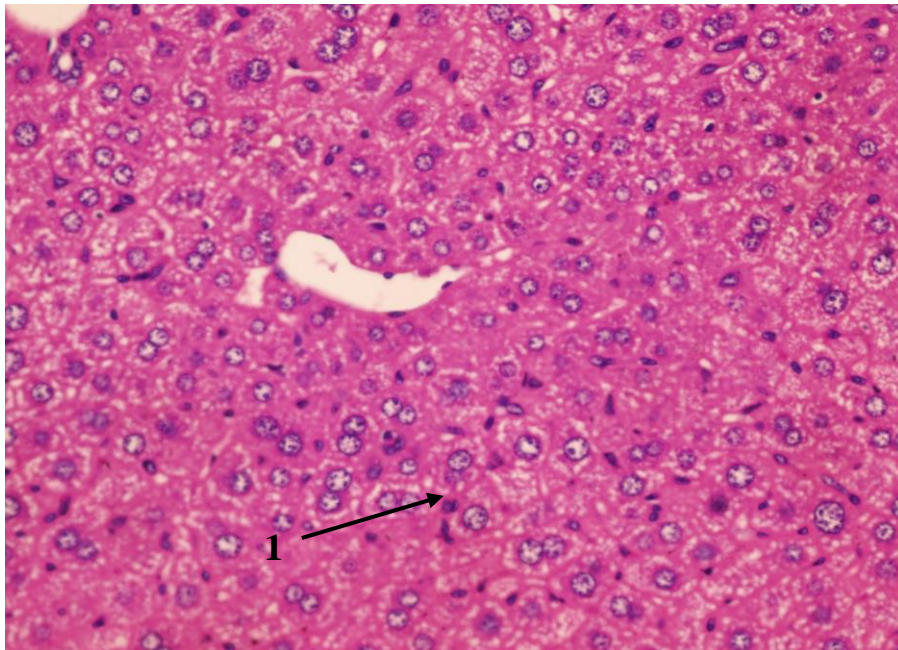




*Ảnh 3.15. Hình ảnh vi thể gan chuột lô sinh học*

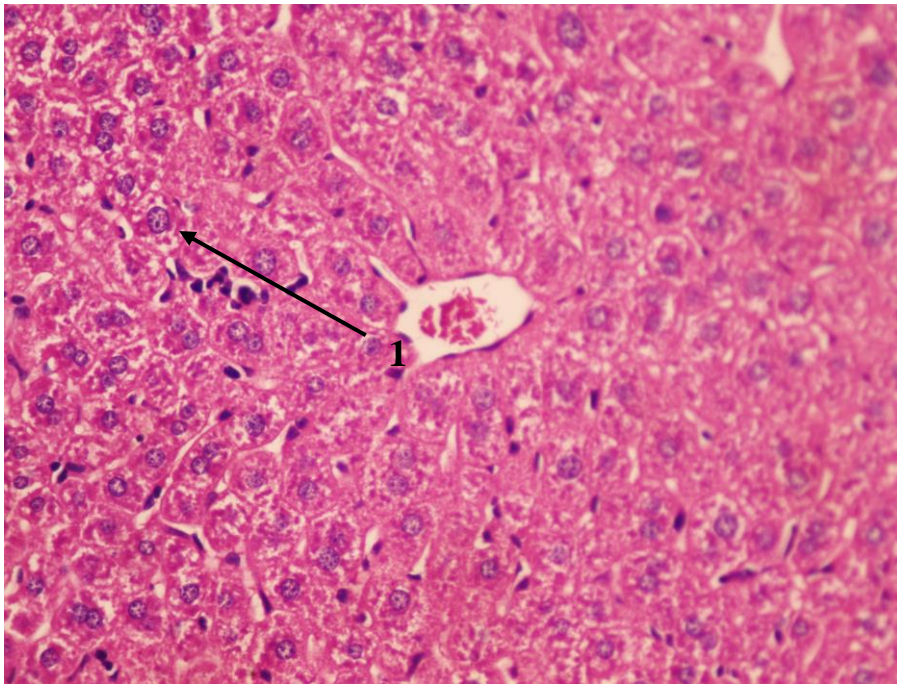
(HE x 400)

1. Tế bào gan thoái hóa nhẹ



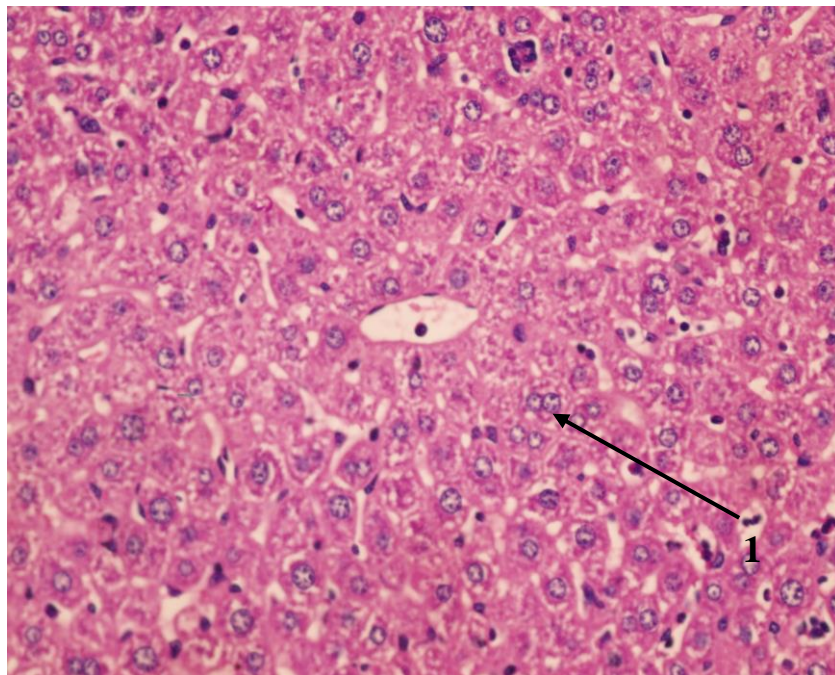
*Ảnh 3.16. Hình ảnh vi thể gan chuột lô 6-MP (HE x 400)*

1. Tế bào gan thoái hóa nhẹ



*Ảnh 3.17. Hình ảnh vi thể gan chuột lô SR1 (HE x 400)*

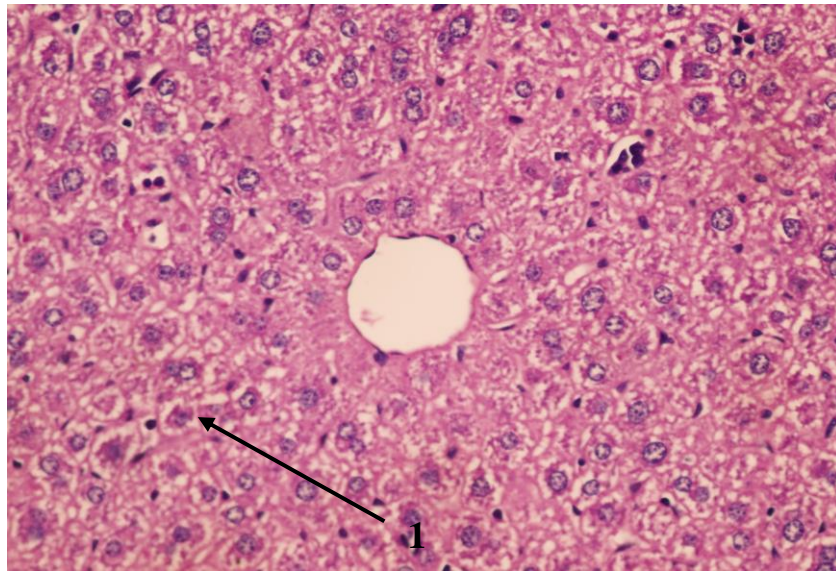
1. Tế bào gan thoái hóa nhẹ



*Ảnh 3.18. Hình ảnh vi thể gan chuột lô SR2 (HE x 400)*

1. Tế bào gan thoái hóa nhẹ





**Ảnh 3.19. Hình ảnh vi thể gan chuột lô SR3 (HE x 400)**

1. Tế bào gan thoái hóa vừa

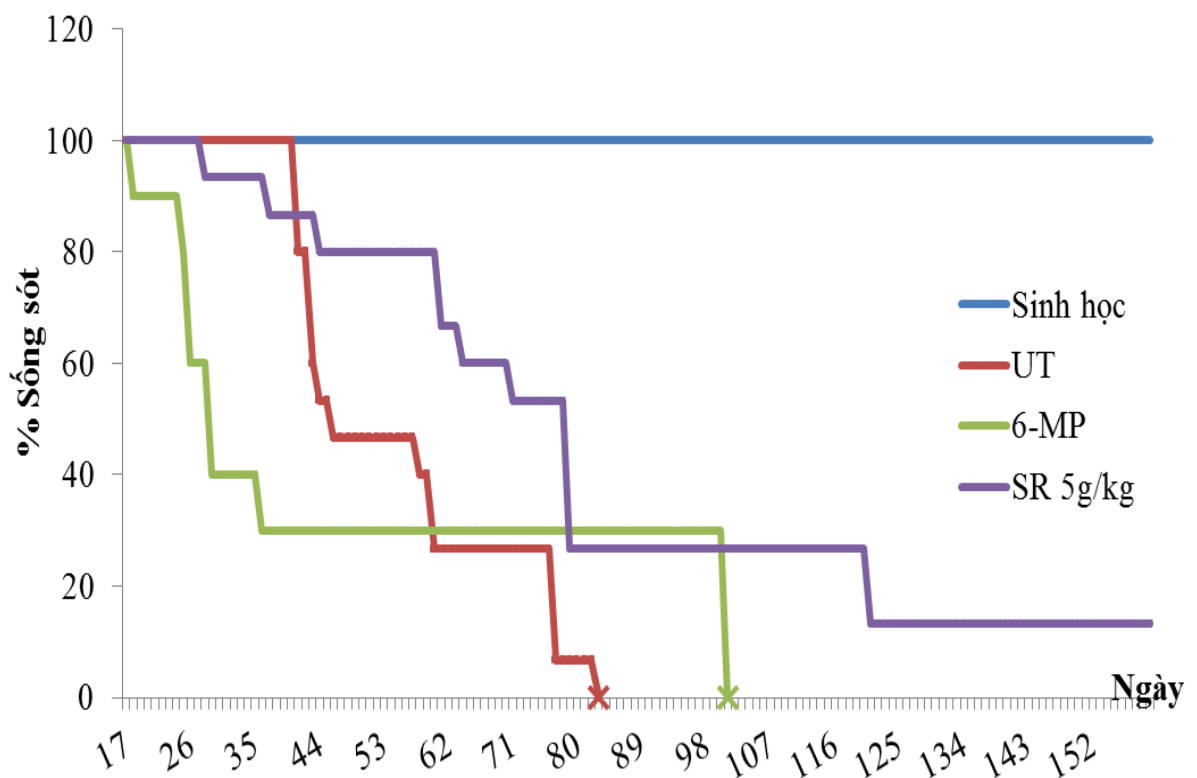
### 3.2.7. Tác dụng của cốm cây sói rừng đến thời gian sống thêm của chuột mang u

**Bảng 3.11. Số chuột sống sót ở các lô thí nghiệm**

Lô chuột		Số ngày sau uống thuốc					
		1	18	43	83	101	160
SH	n	10	10	10	10	10	10
	%	100	100	100	100	100	100
UT <sup>(2)</sup>	n	15	15	9	0	0	0
	%	100	100	60	0	0	0
6-MP <sup>(3)</sup>	n	15	14	4	4	0	0
	%	100	80	26,67	26,67	0	0
SR1 <sup>(4)</sup>	n	15	15	13	4	4	2
	%	100	100	86,67	26,67	26,67	13,33
p		> 0,05		p <sub>2-4</sub> < 0,05			
				p <sub>3-4</sub> < 0,05			

Nhận xét:

- Lô 6-MP có cá thể chuột đầu tiên chết vào ngày 18 và tiếp tục xuất hiện chuột chết trong các ngày tiếp theo.
- Các cá thể chuột chết đầu tiên ở lô UT và lô SR1 xuất hiện vào ngày thứ 43. Tuy nhiên, tỷ lệ chuột sống sót của lô uống cỏ cây sỏi rừng cao hơn lô ung thư tại thời điểm này có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ .
- Tại ngày thứ 160 của thí nghiệm vẫn còn 2 cá thể chuột ở lô uống cỏ cây sỏi rừng sống sót trong khi ở lô ung thư vào ngày thứ 83 và lô 6-MP vào ngày thứ 101 đã không còn cá thể chuột nào sống sót.



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

Nhận xét:

- Chuột ở lô 6-MP bắt đầu chết vào ngày thứ 18 và chết dần vào các ngày 25 đến ngày 30 và đến ngày thứ 101 thì không còn cá thể chuột nào sống sót

- Chuột ở lô ung thư bắt đầu chết vào ngày thứ 41 và chết liên tiếp vào các ngày 56 đến ngày 82. Đến ngày thứ 89 thì không còn chuột nào sống sót.

- Chuột ở lô SR 5g/kg thể trọng, số chuột chết tập trung vào các ngày 65 đến ngày 81, đến cuối đợt thí nghiệm vẫn còn 2 cá thể chuột sống

**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 ( $\bar{x} \pm SD$ )	Lô 6-MP ( $\bar{x} \pm SD$ )	Lô SR1 ( $\bar{x} \pm SD$ )	
TGSTB (ngày)	54,6 ± 15.8	49,2 ± 35.43	84,7 ± 46.4	p < 0,05
ILS (%)		- 9.89	55,13	

Nhận xét:

- Lô uống cỏm cây sói rừng có thời gian sống trung bình kéo dài hơn so với lô uống 6-MP. Sự khác biệt là có ý nghĩa thống kê với p < 0,05.
- Thời gian sống trung bình ở lô uống cỏm cây sói rừng tăng hơn so với lô ung thư có ý nghĩa thống kê tại cùng thời điểm nghiên cứu.
- Cỏm cây sói rừng đã làm tăng % thời gian sống thêm ở chuột lên 55,13%.

### 3.3. KHẢO SÁT ẢNH HƯỞNG CỦA CỎM CÂY SÓI RỪNG TRÊN TỶ LỆ TẾ BÀO CD3, CD4, CD8, IL-2 VÀ TNF- $\alpha$ CỦA CHUỘT MANG U RẮN SARCOMA 180

#### 3.3.1. Đánh giá tình trạng chung của hệ miễn dịch

##### 3.3.1.1. Trọng lượng tuyến ức tương đối và vi thể tuyến ức

**Bảng 3.13. Ảnh hưởng của cỏm cây sói rừng lên trọng lượng tuyến ức tương đối**

STT	Lô chuột	n	Trọng lượng tuyến ức tương đối (mg) ( $\bar{x} \pm SD$ )	p
1	SH	10	1,94 $\pm$ 0,02	p <sub>2-3</sub> < 0,05 p <sub>2-4</sub> < 0,05 p <sub>3-4</sub> > 0,05
2	UT	10	2,53 $\pm$ 0,02 *	
3	6-MP	10	3,54 $\pm$ 0,01 *	
4	SR1	10	2,86 $\pm$ 0,05 *	

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

Nhận xét:

- Trọng lượng tuyến ức tương đối của cả lô UT, lô 6-MP và lô SR1 đều tăng có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh học (p < 0,05).
- Thuốc 6-MP và cỏm cây sói rừng làm tăng trọng lượng tuyến ức tương đối của chuột hơn so với lô ung thư không được điều trị. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với p < 0,05.
- Ở lô uống 6-MP, trọng lượng tuyến ức tương đối có xu hướng cao hơn so với lô uống sói rừng.

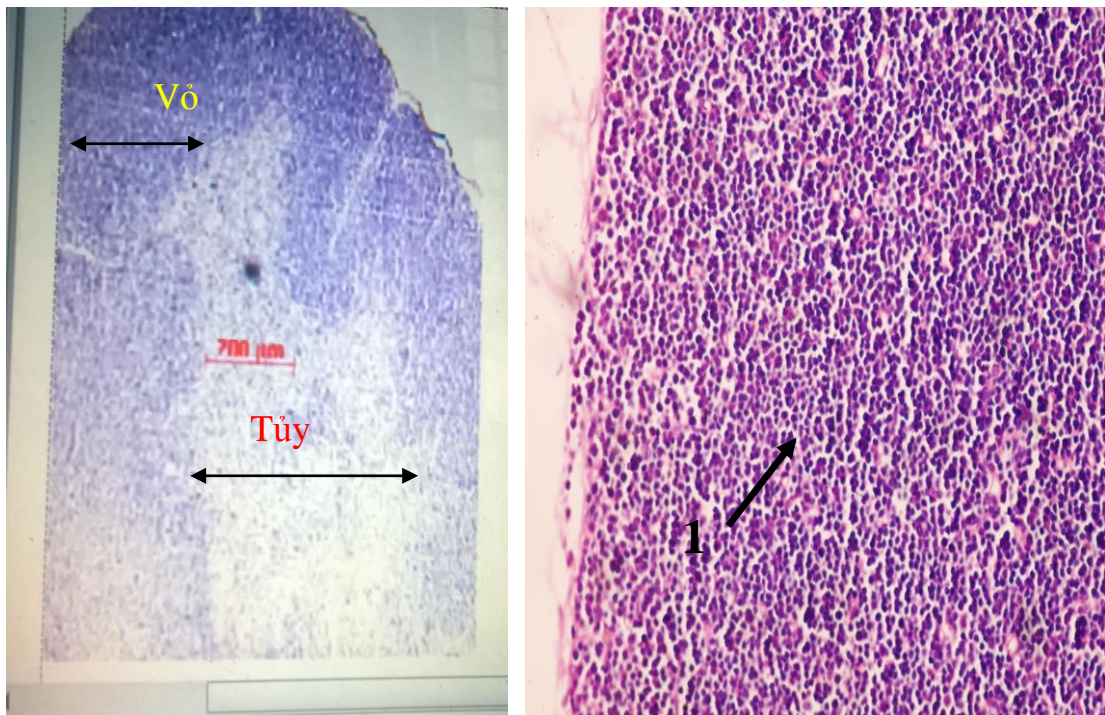
### 3.3.1.2. *Biến đổi cấu trúc vi thể tuyến ức:*

Lô sinh học : Tuyến ức bình thường

Lô ung thư : Số lượng lympho bào gần như bình thường, tỷ lệ tủy/vỏ cao hơn so với lô sinh học

Lô 6-MP : Tập trung nhiều lympho bào ở vùng vỏ và tủy, tỷ lệ tủy/vỏ cao hơn so với lô sinh học

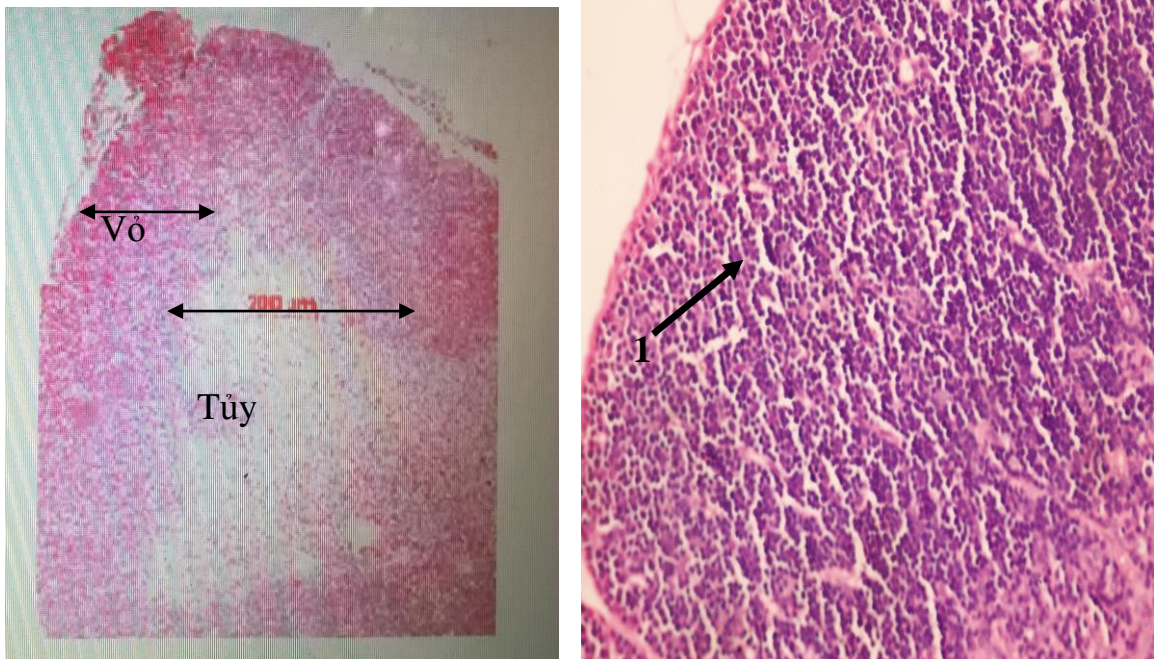
Lô SR1 : Tập trung nhiều lympho bào ở vùng vỏ và tủy, tỷ lệ tủy/vỏ cao hơn so với lô sinh học



**Ảnh 3.20. Hình ảnh vi thể tuyến ức lô chuột sinh học**

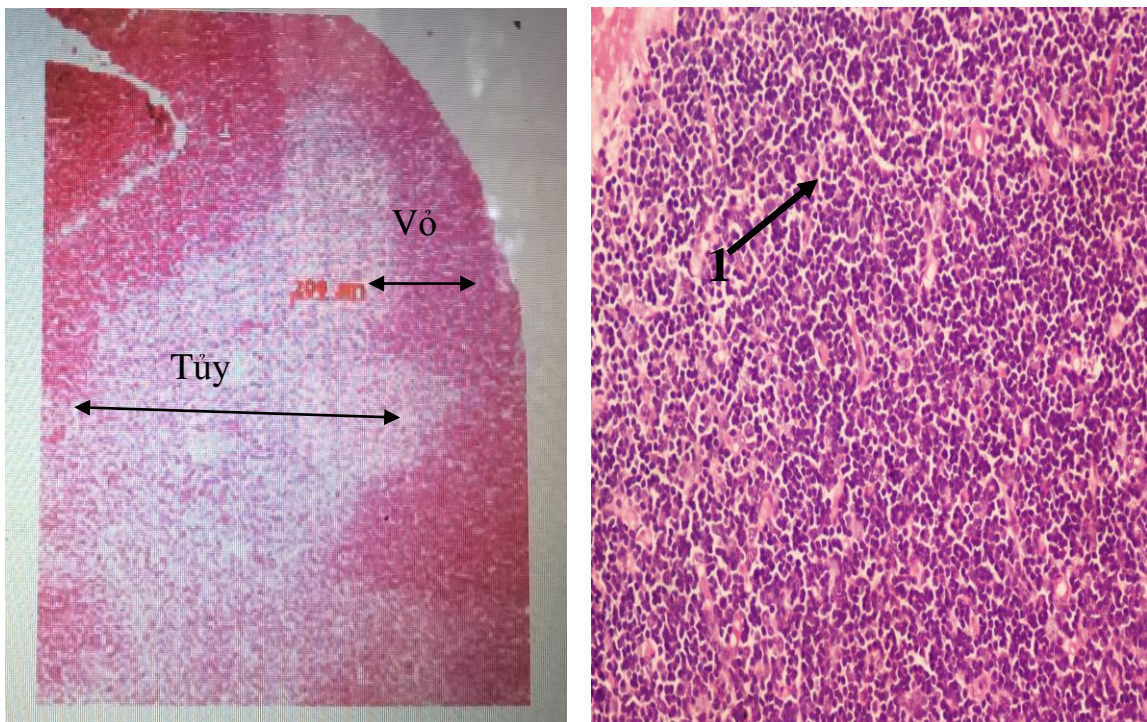
1. Tế bào lympho





*Ảnh 3.21. Hình ảnh vi thể tuyến ức lô chuột ung thư*

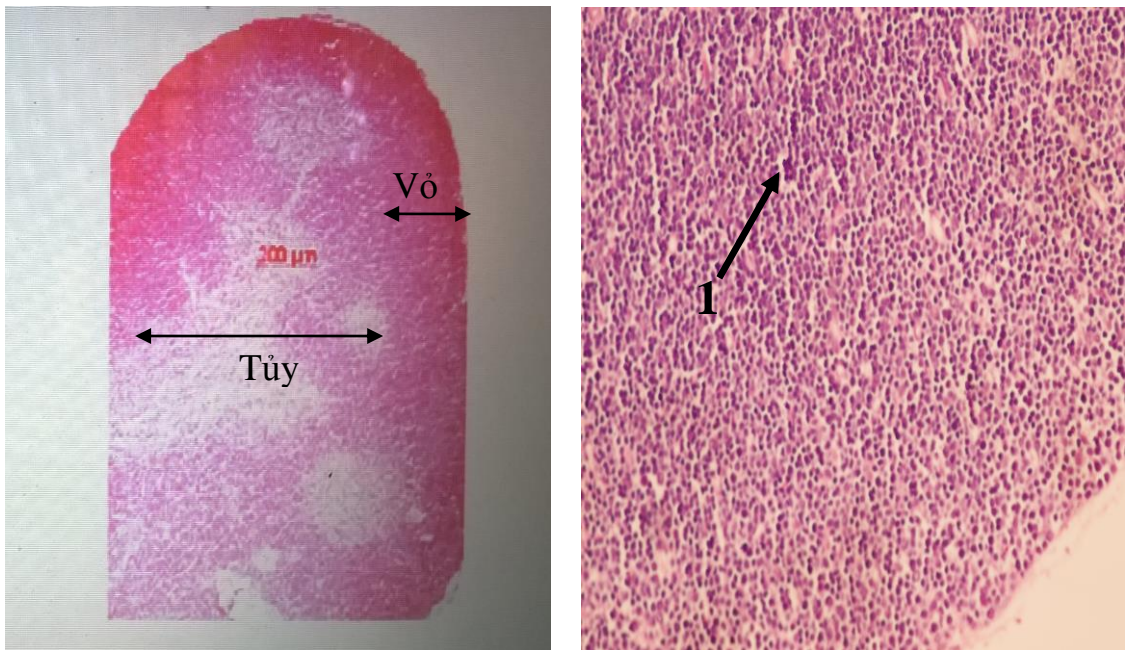
1. Tế bào lympho



*Ảnh 3.22. Hình ảnh vi thể tuyến ức lô chuột uống 6-MP*

1. Tế bào lympho

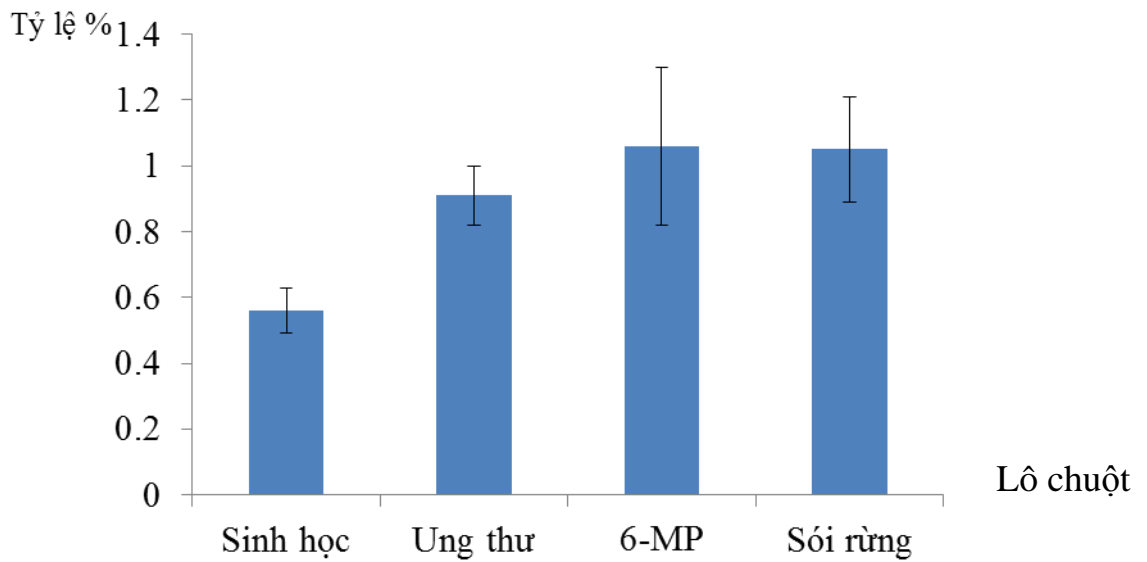




**Ảnh 3.23. Hình ảnh vi thể tuyến ức lô chuột uống sói rừng**

1. Tế bào lympho

**3.3.1.3. Trọng lượng lách tương đối và vi thể lách**



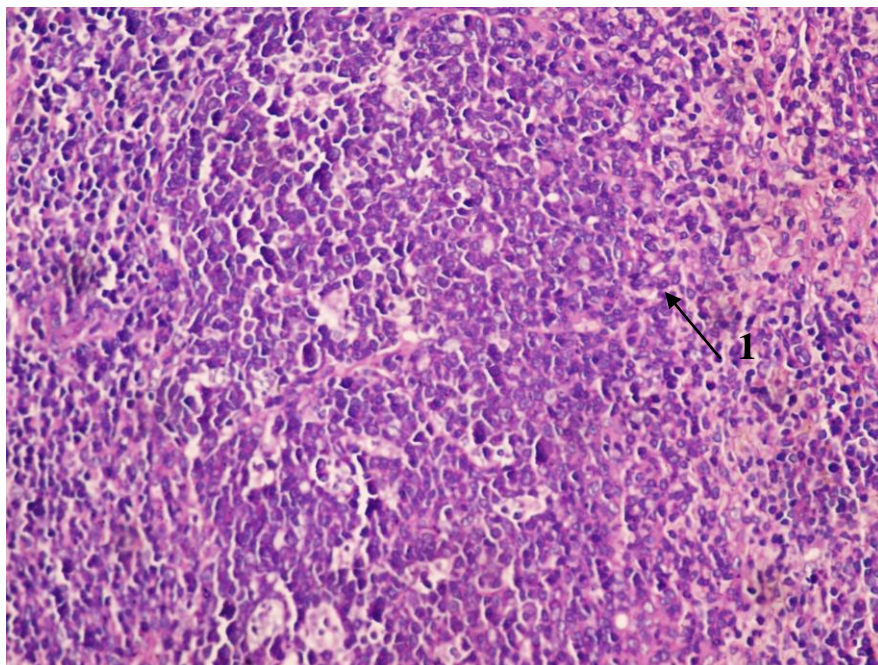
**Biểu đồ 3.5. Ảnh hưởng của cốm cây sói rừng lên trọng lượng lách tương đối**

Nhận xét:

- Cuối đợt điều trị, trọng lượng lách tương đối của cả 3 lô chuột ung thư, uống 6-MP và uống cốm cây sói rừng đều tăng rõ rệt so với lô chứng sinh học.
- Chỉ số này của lô uống 6-MP và lô uống cốm cây sói rừng thay đổi có ý nghĩa thống kê so với lô ung thư ( $p < 0,05$ ) nhưng không có sự khác biệt giữa lô uống 6-MP và lô uống cốm cây sói rừng ( $p > 0,05$ ).

**3.3.1.4. Biến đổi cấu trúc vi thể lách:**

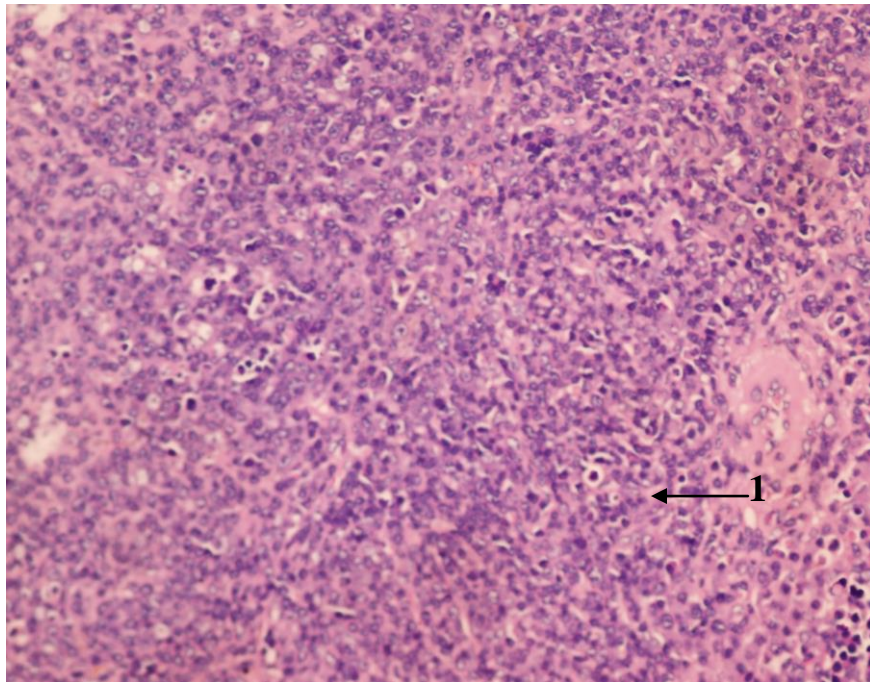
Lô sinh học	: Tủy trắng bình thường
Lô ung thư	: Tăng số lượng lympho bào và kích thước của tủy trắng
Lô 6-MP	: Tăng số lượng lympho bào và kích thước của tủy trắng
Lô SR1	: Tủy trắng tăng mạnh kích thước và số lượng lympho bào



**Ảnh 3.24. Hình ảnh vi thể lách chuột lô sinh học (HE x 400)**

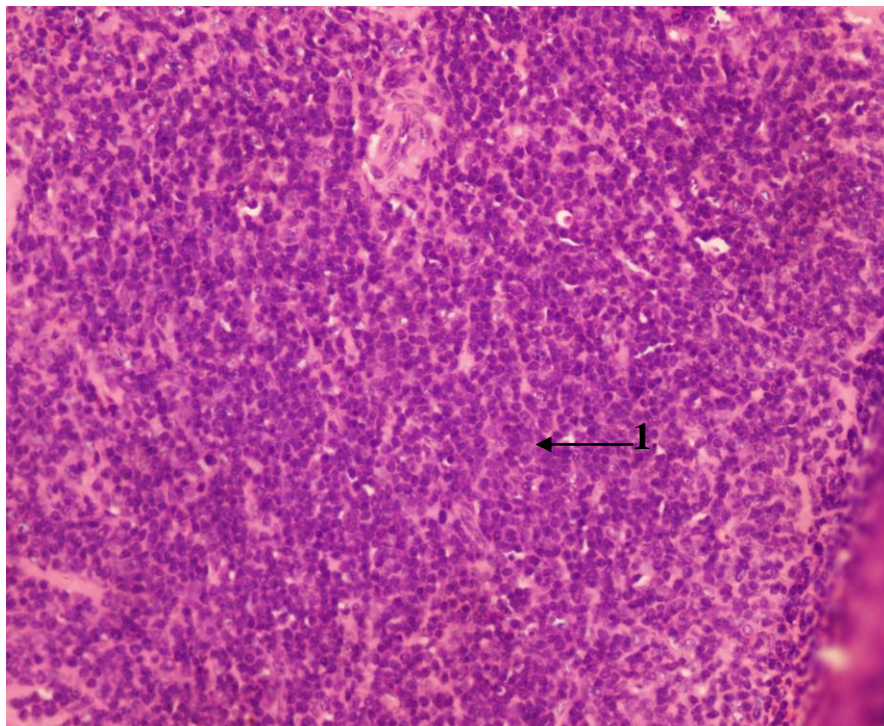
1. Tế bào lympho





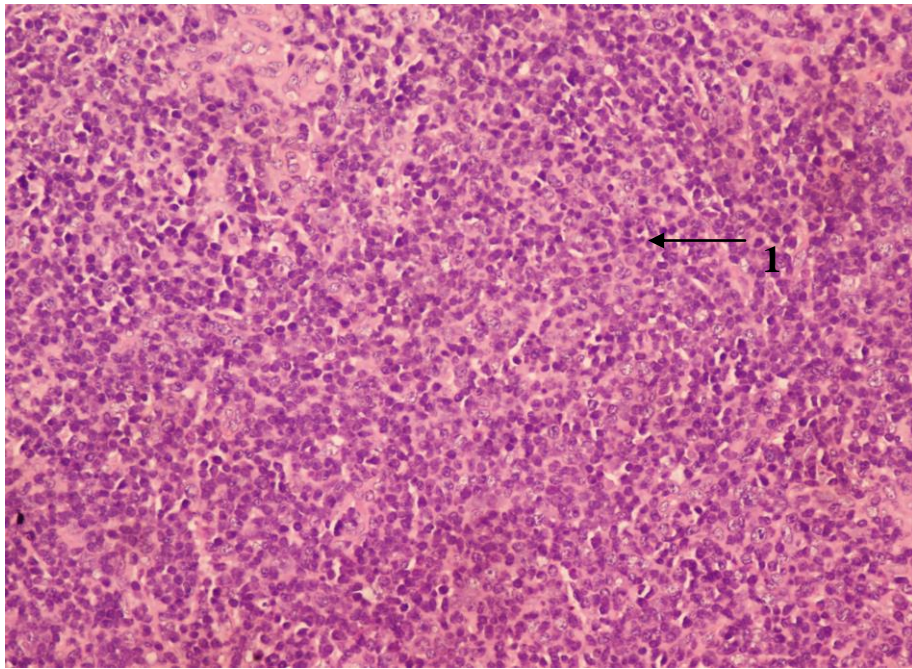
*Ảnh 3.25. Hình ảnh vi thể lách chuột lô ung thư (HE x 400)*

1. Tế bào lympho



*Ảnh 3.26. Hình ảnh vi thể lách chuột lô 6-MP (HE x 400)*

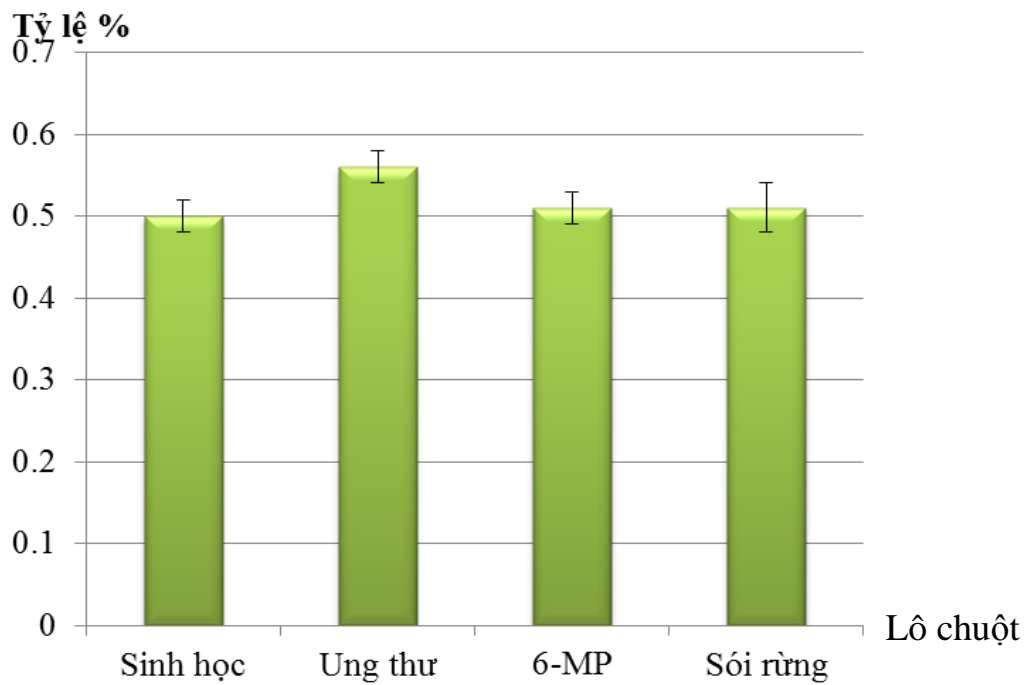
1. Tế bào lympho



*Ảnh 3.27. Hình ảnh vi thể lách chuột lô SR1 (HE x 400)*

1. Tế bào lympho

### **3.3.1.5. Trọng lượng tim tương đối**



*Biểu đồ 3.6. Ảnh hưởng của cỏ cây sói rừng lên trọng lượng tim tương đối*

Nhận xét: không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tỷ lệ % trọng lượng tim/trọng lượng cơ thể giữa lô đối chứng sinh học và các lô điều trị bằng 6MP, cốm cây sói rừng liều 5g/kg thể trọng ( $p > 0,05$ ). Riêng ở lô đối chứng ung thư, tỷ lệ này có xu hướng tăng hơn các lô khác

### 3.3.1.6. Số lượng tế bào máu ngoại vi

**Bảng 3.14. Ảnh hưởng của cốm 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	

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

Nhận xét:

- Số lượng hồng cầu ở cả lô UT, 6-MP và SR1 đều giảm so với lô SH (lô chứng sinh học). Tuy nhiên sự khác biệt chỉ có ý nghĩa thống kê ở lô ung thư và lô uống 6-MP với  $p < 0,05$ .
- Ở lô UT và lô 6-MP, số lượng hồng cầu giảm rõ rệt so với lô SR1, sự khác biệt chỉ có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ .

**Bảng 3.15. Ảnh hưởng của cốm 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	

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

Nhận xét:

- Số lượng tiểu cầu ở lô UT tăng cao hơn hẳn so với lô SH
- Khi điều trị bằng 6-MP, số lượng tiểu cầu ở máu ngoại vi chuột giảm rõ so với chuột khỏe mạnh (lô SH), sự khác biệt chỉ có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ .
- Ở lô điều trị bằng cốm cây sói rừng liều 5g/kg thể trọng (lô SR1), số lượng tiểu cầu của chuột tăng lên rõ so với lô 6-MP. Trong khi sự khác biệt về chỉ số này lại không có ý nghĩa thống kê so với lô SH.

**Bảng 3.16. Ảnh hưởng của cốm 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 ± 0,90	$p_{1-4} > 0,05$ $p_{3-4} < 0,01$
2	UT	10	18,96 ± 9,12 *	
3	6-MP	10	3,49 ± 0,72 *	
4	SR1	10	7,93 ± 3,19	

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

Nhận xét:

- Số lượng bạch cầu ở lô UT tăng cao hơn hẳn so với các lô SH, 6-MP và SR1
- Ở lô 6-MP số lượng bạch cầu giảm rõ so với lô chứng sinh học và lô SR1, sự khác biệt chỉ có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ . Trong khi sự khác biệt về chỉ số này lại không có ý nghĩa thống kê giữa lô SH và lô SR1 với  $p > 0,05$ .

**Bảng 3.17. Ảnh hưởng của cốm cây sồi rừng lên số lượng các loại bạch cầu**

STT	Lô chuột	n	Số lượng các loại BC (G/L)		
			( $\bar{X} \pm SD$ )		
			Trung tính	Lympho	Mono
1	SH	10	1,89 ± 1,22	4,02 ± 0,10	0,57 ± 0,02
2	UT	10	14,03 ± 0,75 *	3,90 ± 0,91 *,**	1,02 ± 0,27
3	6-MP	10	1,38 ± 0,08*	1,95 ± 0,07*,**	0,15 ± 0,01*,**
4	SR1	10	2,38 ± 0,34	5,02 ± 0,39*	0,54 ± 0,12
p			$p_{1-4} > 0,05$	$p_{1-4} < 0,05$ $p_{2-3} < 0,01$	$p_{1-4} > 0,05$

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

\*\* : Khác lô SR1 với  $p < 0,05$

Nhận xét:

- Tỷ lệ bạch cầu trung tính ở 2 lô UT, 6-MP đều tăng cao hơn hẳn so với lô SH, trong khi tỷ lệ này không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa lô SR1 và lô SH.
- Tỷ lệ bạch cầu lympho và mono ở 2 lô UT, 6-MP giảm có ý nghĩa thống kê so với lô SH và lô SR1. Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về sự biến đổi tỷ lệ này giữa lô SR1 và lô SH.

### 3.3.2. Đánh giá tỷ lệ các tế bào lympho T và nồng độ IL-2, TNF- $\alpha$

**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 <sub>2-3</sub> < 0,01 p <sub>2-4</sub> < 0,01 p <sub>3-4</sub> > 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

Nhận xét:

- Các lô chuột cấy truyền tế bào u S-180 có tỷ lệ tế bào TCD3 tăng rõ so với lô sinh học.
- Ở lô 6-MP và lô SR1, tỷ lệ tế bào TCD3 tăng có ý nghĩa thống kê so với lô UT với p < 0,01.
- Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tỷ lệ tế bào TCD3 giữa 2 lô 6-MP và lô SR1 với p > 0,05.

**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 <sub>2-3</sub> > 0,05 p <sub>2-4</sub> > 0,05 p <sub>3-4</sub> > 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	



Nhận xét:

- Với các lô chuột cấy truyền tế bào S-180, tỷ lệ tế bào TCD4 có xu hướng giảm so với lô sinh học. Cắm cây sỏi rừng có xu hướng làm tăng tỷ lệ tế bào này trên chuột tốt hơn lô 6-MP nhưng chưa có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê .

**Bảng 3.20. Ảnh hưởng của cắm cây sỏi rừng lên tỷ lệ lympho bào TCD8**

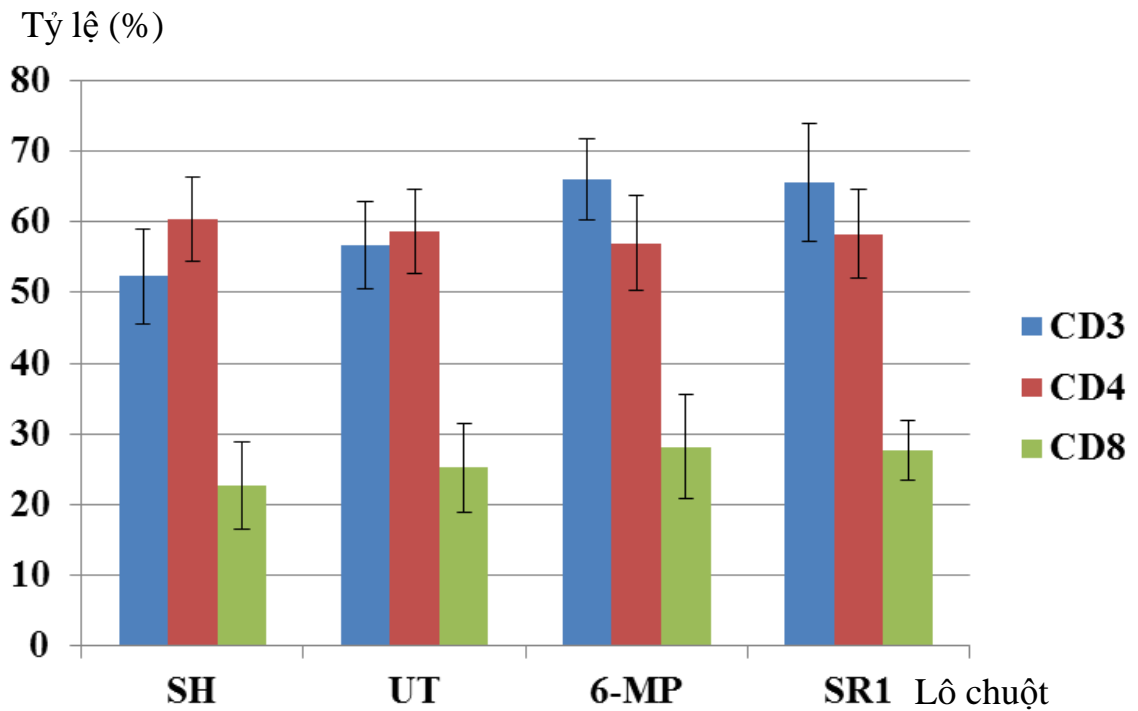
STT	Lô chuột	n	Tỷ lệ TCD8 (%) ( $\bar{x} \pm SD$ )	p
1	SH	10	22,70 ± 6,21	p <sub>2-3</sub> < 0,05 p <sub>2-4</sub> < 0,05 p <sub>3-4</sub> > 0,05
2	UT	10	25,22 ± 6,30 *	
3	6-MP	10	28,20 ± 7,40 *	
4	SR1	10	27,62 ± 4,23 *	

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

Nhận xét:

- Tỷ lệ các tế bào TCD8 tại các lô chuột cấy truyền tế bào S-180 đều cao hơn so với lô sinh học. Hai lô được điều trị với 6-MP và cắm cây sỏi rừng, tỷ lệ tế bào TCD8 đã tăng lên rõ rệt so với lô UT, sự khác biệt chỉ có ý nghĩa thống kê với p < 0,05.

- Không có sự khác biệt về tỷ lệ tế bào TCD3 giữa 2 lô 6-MP và lô SR1 với p > 0,05. Tuy nhiên, trong lô SR1, sự khác biệt về tỷ lệ tế bào TCD8 ở các chuột là rất thấp ( $\pm 4,23\%$ ) so với lô 6-MP ( $\pm 7,40\%$ ).



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

**Bảng 3.21. Ảnh hưởng của côm 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 <sub>2-3</sub> < 0,05 p <sub>2-4</sub> < 0,05
2	UT	10	8,14 ± 2,65 *	
3	6-MP	10	12,08 ± 2,33 *	
4	SR1	10	10,53 ± 3,87 *	p <sub>3-4</sub> > 0,05

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

Nhận xét:

- Các lô chuột cấy truyền tế bào S-180, nồng độ IL-2 ở huyết tương đều cao hơn so với lô sinh học.
- Hai lô 6-MP và SR1, nồng độ IL-2 đã tăng lên rõ rệt so với lô UT và ở lô 6-MP có xu hướng tăng cao hơn so với lô SR1 nhưng chưa có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p > 0,05$ .

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

STT	Lô chuột	n	Nồng độ TNF- $\alpha$ (pg/ml) ( $\bar{X} \pm SD$ )	p
1	SH	10	25,53 $\pm$ 3,97	p <sub>2-3</sub> < 0,05 p <sub>2-4</sub> < 0,05 p <sub>3-4</sub> < 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 *	

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

Nhận xét:

- Các lô chuột cấy truyền tế bào S-180 có nồng độ TNF- $\alpha$  ở huyết tương đều cao hơn so với lô sinh học đặc biệt ở hai lô 6-MP và SR1, nồng độ TNF- $\alpha$  đã tăng lên rõ rệt so với lô UT, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ .

- Nồng độ TNF- $\alpha$  ở lô SR1 cũng tăng lên có ý nghĩa thống kê so với lô 6-MP với  $p < 0,05$ .

## CHƯƠNG 4

### BÀN LUẬN

Việc nghiên cứu các thuốc có tác dụng điều trị hoặc ngăn cản sự phát triển của tế bào ung thư luôn được các nhà khoa học trên thế giới cũng như trong nước quan tâm. Khoảng 80% các loại thuốc đã và đang được lưu hành hiện nay hoặc đang trong giai đoạn thử nghiệm lâm sàng có nguồn gốc từ các hợp chất thiên nhiên, trong đó chủ yếu là cây thuốc [136]. Đến nay, nhiều hoạt chất chống ung thư có nguồn gốc tự nhiên đã được khám phá và đưa vào sử dụng trên lâm sàng như paclitaxel (taxol), vinblastine, vincristin, camptothecin, adriamycin. Cây sói rừng (tên khoa học là *Sarcandra Glabra* (Thunb.) Nakai) là một vị thuốc được ghi nhận có tác dụng hỗ trợ điều trị một số loại hình ung thư.

Vì vậy, kết quả nghiên cứu giai đoạn thực nghiệm là cơ sở khoa học đầu tiên chứng minh có hay không tác dụng hỗ trợ điều trị ung thư của cây sói rừng.

#### 4.1. VỀ ĐỘC TÍNH CỦA CỎM CÂY SÓI RỪNG

##### 4.1.1. Về độc tính cấp

Cây sói rừng là một dược liệu mới, có rất ít tài liệu ở Việt Nam đề cập đến và cũng chưa có trong Dược điển Việt Nam IV. Vì vậy, việc xác định độc tính cấp và liều chết 50% để đánh giá mức độ độc và có cơ sở chọn liều thử tác dụng cho các bước nghiên cứu tiếp theo là cần thiết. Nghiên cứu độc tính cấp trên chuột nhắt trắng được thực hiện theo phương pháp Litchfield – Wilcoxon. Đây là phương pháp kinh điển được sử dụng để thử độc tính cấp của thuốc. Theo kết quả nghiên cứu ở bảng 3.1, 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 ở  $p = 0,05$ . 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 cỏ 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. Phan Anh Tuấn (2006) khi cho chuột uống bột sâu chít đến liều 18g/kg/ngày (là liều tối đa chuột có thể uống được) không thấy có thay đổi bất thường, không có chuột nào chết trong vòng 72 giờ [137]. Tạ Thu Thủy và cộng sự (2013) nghiên cứu độc tính cấp của bài thuốc Đại an hoàn cũng nhận thấy với liều 119g/kg (gấp 110 lần liều dùng trên người) cũng không xác định được độc tính cấp LD50 [138]. Trong nghiên cứu độc tính cấp, những chuột chết được mổ để quan sát đại thể thì đều thấy gan, thận hồng, mềm mại và không xung huyết. Như vậy, có thể độc tính của cỏ cây sói rừng không phải do ảnh hưởng đến chức năng gan, thận và là độc tính tối cấp mà có thể ảnh hưởng đến chức năng của nhiều hệ cơ quan khác. Đặc biệt, khó thờ là dấu hiệu thường thấy ở những lô uống cỏ cây sói rừng liều cao. Liệu thuốc có ảnh hưởng gì đến hệ hô hấp không? Như vậy cần phải có những nghiên cứu về độc tính chuyên biệt để có thể làm sáng tỏ được câu hỏi này.

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 [139],[140]. Như vậy, có thể thấy trong cây sói rừng có thành phần gây độc. Đây có thể là nguyên nhân dẫn đến độc tính LD50 của cây. Trong y học cổ truyền, cây sói rừng cũng được xếp vào nhóm dược liệu có tính độc [101].

Đỗ Thị Oanh và cộng sự (2010) khi nghiên cứu độc tính cấp bằng đường uống trên chuột nhắt trắng nhận thấy liều LD50 của cao lỏng sói rừng trong khoảng 240 – 270g dược liệu/kg cân nặng chuột [128], thấp hơn liều LD50 trong nghiên cứu của chúng tôi. Lý giải cho sự khác biệt này, theo chúng tôi có thể do một số nguyên nhân sau:

- Địa điểm và thời gian thu hái dược liệu: trong nghiên cứu của Đỗ Thị Oanh, cây sói rừng được thu hái vào tháng 7 tại Tam Đảo, Vĩnh Phúc. Cây sói rừng trong nghiên cứu của chúng tôi được thu hái vào tháng 5 tại Hòa An, Cao Bằng. Theo WHO, các dược liệu nguồn gốc từ cùng một loài có thể có chất lượng rất khác nhau khi trồng ở những địa điểm khác nhau, do ảnh hưởng của đất, khí hậu và các yếu tố khác. Dược liệu cũng cần được thu hái trong thời điểm hay khoảng thời gian thích hợp để bảo đảm chất lượng tốt nhất có được trong nguyên liệu và thành phẩm. Nồng độ định lượng của các thành phần hoạt tính sinh học thay đổi tùy theo giai đoạn cây tăng trưởng và phát triển, đặc biệt với các thành phần của cây bản địa có độc tố hay độc hại [141].

- Dạng bào chế của thuốc: thuốc nghiên cứu của Đỗ Thị Oanh được bào chế dưới dạng cao lỏng. Thuốc dùng trong nghiên cứu của chúng tôi là dạng cốm tan, trong quá trình tạo cốm có trộn thêm Lactose đóng vai trò là tá dược đệm. Do Lactose tan trong nước tạo kênh khuếch tán nên Lactose có vai trò đảm bảo độ bền cơ học đồng thời làm tăng khả năng giải phóng hoạt chất của thuốc [142].

Như vậy, có thể vì những sự khác biệt trên nên cốm cây sói rừng có liều LD50 cao hơn so với cao lỏng cây sói rừng. Đây có thể là một điểm lưu ý trong vấn đề chọn lựa dạng bào chế của thuốc để giảm thiểu độc tính.

Các nghiên cứu về tác dụng kháng u, tăng cường miễn dịch của cây sói rừng hiện nay trên thế giới cũng như trong nước chủ yếu tập trung vào dịch

chiết toàn phần nên khó tránh khỏi độc tính. Trong luận án này, cốm cây sói rừng được bào chế từ dịch chiết toàn phần cũng được sử dụng để nghiên cứu tác dụng sinh học và độc tính. Đây là một hạn chế cần được khắc phục trong tương lai. Hy vọng sẽ tiếp tục có những nghiên cứu về chất phân lập để xác định rõ thành phần có hoạt tính kháng u, tăng cường miễn dịch và thành phần gây độc để có những định hướng đúng đắn trong việc sử dụng thuốc trên lâm sàng, đảm bảo tính an toàn và hiệu quả cho bệnh nhân.

#### **4.1.2. Về độc tính bán trường diễn**

Theo nguyên tắc ngoại suy liều của Đỗ Trung Đàm [143], nếu coi liều dùng cho người là 1 thì tỷ lệ liều tương ứng ngoại suy sang thỏ là 3. Như vậy, với liều dùng cốm cây sói rừng trên người là 10g/kg cân nặng thì liều ngoại suy trên thỏ sẽ là 0,6g/kg. Do đó, trong nghiên cứu độc tính bán trường diễn của cốm cây sói rừng trên thỏ, 2 mức liều 0,6g/kg (tương ứng với liều sẽ sử dụng trên lâm sàng) và 3g/kg thể trọng thỏ (tương ứng với liều gấp 5 lần liều sẽ dùng trên lâm sàng) sẽ được đánh giá

##### ***4.1.2.1. Ảnh hưởng của cốm cây sói rừng tới tình trạng chung và thay đổi thể trọng thỏ***

Kết quả nghiên cứu ở biểu đồ 3.1 cho thấy thỏ ở cả 3 lô chứng, lô uống cốm cây sói rừng liều 0,6g/kg và lô uống cốm cây sói rừng liều 3g/kg có sự phát triển bình thường về cân nặng, không có sự khác biệt về mức tăng trọng lượng giữa các lô thỏ. Những theo dõi về tình trạng sức khỏe hàng ngày cũng cho thấy không có biểu hiện bất thường của các lô thỏ.

Thỏ dùng trong nghiên cứu là thỏ đã trưởng thành, có trọng lượng ổn định từ 2 – 2,5kg. Vì vậy cân nặng duy trì ở mức độ trên là hoàn toàn phù hợp với sinh lý phát triển. Như vậy, cốm cây sói rừng không ảnh hưởng đến tình trạng chung và trọng lượng thỏ giai đoạn trưởng thành.

#### ***4.1.2.2. Ảnh hưởng của cỏ cây sói rừng đến chức năng tạo máu***

Kết quả nghiên cứu ở các bảng 3.2,3.3,3.4 cho thấy sau 8 tuần uống cỏ cây sói rừng, 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 cỏ cây sói rừng. Như vậy cỏ cây sói rừng không làm ảnh hưởng đến chức năng tạo máu của thỏ bình thường, trưởng thành.

#### ***4.1.2.3. Ảnh hưởng của cỏ cây sói rừng đến chức năng gan***

Chuyển hóa chất là một trong những chức năng quan trọng của gan. Gan có một hệ thống các enzym chuyển hóa rất phong phú cho quá trình tổng hợp và thoái hóa protit, lipit... Tổn thương gan cũng ảnh hưởng tới hàm lượng protein máu toàn phần. Kết quả nghiên cứu ở bảng 3.5 cho thấy cả cỏ 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 cỏ 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.

Khi đưa thuốc vào cơ thể, thuốc có thể gây độc với gan, làm ảnh hưởng đến cấu trúc và chức năng gan. Vì vậy, khi đánh giá độc tính của thuốc, nghiên cứu ảnh hưởng của thuốc tới cấu trúc và chức năng gan là rất cần thiết. Mức độ tổn thương tế bào gan thường được đánh giá thông qua hoạt độ các transaminase trong huyết thanh là ALT và AST. Khi tổn thương hủy hoại tế bào gan, hoạt độ enzym ALT tăng cao. Khác với ALT, đa số enzym AST cư trú trong ty thể, chỉ 1/3 enzym cư trú ở bào tương của tế bào. Khi tổn thương gan ở mức độ dưới tế bào, hoạt độ enzym AST trong ty thể được giải phóng ra ngoài. Vì vậy, trong viêm gan nói chung, hoạt độ ALT luôn tăng cao hơn AST [144],[145]. Kết quả định lượng hoạt độ ALT và AST trong huyết thanh thỏ ở bảng 3.6 cho thấy: thời điểm sau 8 tuần nghiên cứu, 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 cỏm cây sói rừng liều 0,6g/kg chỉ làm tăng hoạt độ ALT sau 8 tuần uống thuốc.

Kết quả nghiên cứu hình thái đại thể gan thỏ, cả ở những lô uống cỏm cây sói rừng liều cao cho thấy kích thước, màu sắc, mật độ nhu mô không có biểu hiện gì khác biệt so với lô chứng. Nghiên cứu cấu trúc vi thể thấy ở cả 2 lô uống sói rừng đều có hình ảnh tế bào gan thoái hóa mức độ từ nhẹ đến nặng. Điều này cho thấy thỏ khi được uống cỏm cây sói rừng với liều gấp 5 lần liều điều trị hoặc uống trong thời gian dài có thể bị nhiễm độc gan ở mức độ nhẹ, một số tế bào gan bị phá hủy nên tăng tiết men gan vào máu. Đây là lần đầu tiên phát hiện ra tác dụng này của sói rừng, do đó cần được kiểm chứng trong các nghiên cứu tiếp theo.

#### ***4.1.2.4. Ảnh hưởng của cỏm cây sói rừng đến chức năng thận***

Thận là cơ quan bài tiết của cơ thể. Nhu mô thận dễ bị tổn thương bởi các chất nội sinh và ngoại sinh [145]. Vì vậy, khi các thuốc vào cơ thể có thể gây độc, làm tổn thương thận, từ đó ảnh hưởng đến chức năng thận. Để đánh giá chức năng thận sau khi dùng thuốc thường dùng xét nghiệm định lượng creatinin máu. Creatinin là thành phần đạm trong máu ổn định nhất, hầu như không thay đổi do chế độ ăn hoặc những thay đổi sinh lý mà chỉ phụ thuộc vào sự đào thải của thận. Kết quả ở bảng 3.7 cho thấy sau 4 và 8 tuần uống thuốc, ở cả 2 lô uống cỏm cây sói rừng liều 0,6g/kg và liều 3g/kg, nồng độ creatinin trong máu thỏ không có sự thay đổi khác biệt so với lô chứng và so với trước khi uống thuốc ( $p < 0,05$ ).

Giải phẫu vi thể thận là một trong các chỉ số bắt buộc cần làm khi đánh giá độc tính bán trường diễn của thuốc theo hướng dẫn của WHO. Ở lô uống cỏm cây sói rừng liều 3g/kg, sau 8 tuần có thấy hình ảnh thoái hóa mức độ nhẹ ống lượn gần.

Như vậy, các chỉ số hóa sinh và hình ảnh vi thể gan, thận thỏ đều cho thấy cốm cây sói rừng liều 3g/kg (gấp 5 lần liều dự kiến cho người trên lâm sàng) làm tăng hoạt độ cả ALT và AST đồng thời cũng gây tổn thương cấu trúc vi thể gan thỏ.

Hiện nay, cây Sói rừng đã được bào chế có trong thành phần của một số chế phẩm như Flamasol, Hoàng thấp linh, Tiêu khiết thanh chỉ định trong hỗ trợ điều trị thoái hóa khớp, viêm khớp dạng thấp, viêm thanh quản, viêm amidan.. , tuy nhiên rất ít các nghiên cứu về tính an toàn và độc tính của thuốc được công bố. Hơn nữa, nếu được trồng trên những chất đất khác nhau, với khí hậu, tuổi cây và điều kiện chăm sóc khác nhau có thể cho ra sản phẩm có chất lượng khác nhau, điều này sẽ ảnh hưởng trực tiếp tới tính an toàn của thuốc. Do đó, để đảm bảo an toàn cho người dùng, nhất thiết phải tiếp tục có các nghiên cứu kỹ hơn trong tương lai về độc tính, bao gồm cả độc tính bán trường diễn và trường diễn của cây sói rừng, từ đó mà có các khuyến cáo thích hợp cho người sử dụng.

## **4.2. VỀ TÁC DỤNG KHÁNG U RẮN SARCOM 180 CỦA CỐM CÂY SÓI RỪNG TRÊN CHUỘT NHẮT**

### **4.2.1. Về mô hình nghiên cứu**

Có rất nhiều cách gây u cho động vật: bằng hóa chất, ghép mô ung thư, cấy ghép tế bào ung thư, gây đột biến gen hoặc chuyển gen ung thư [48],[49],[146]. Trên thế giới đang sử dụng 3 loại mô hình ung thư thực nghiệm trên chuột. Đó là các mô hình chuột chuyển gen ung thư, chuột cấy ghép ung thư người và chuột mang dòng ung thư cây chuyển. Với mô hình chuột chuyển gen ung thư, bằng kỹ thuật chuyển đoạn DNA chứa tiền gen hoặc gen ung thư liên kết với gen hoạt hóa (promoter) đã làm cho các gen ung thư biểu lộ tại tế bào, mô đặc hiệu của chuột thuần chủng. Mô hình này chủ

yếu để nghiên cứu cơ chế bệnh sinh ung thư, kiểm tra hoạt tính sinh ung thư. Ngoài ra chuột chuyển gen ung thư còn được rất nhiều tác giả sử dụng như mô hình u người để thử nghiệm độc tính, đánh giá tác dụng và tính ổn định của thuốc chống ung thư.

Mô hình chuột mang dòng ung thư người được Povlsen C. và Rygaard J. (1971) lần đầu tiên xây dựng bằng cách ghép dưới da chuột khối ung thư biểu mô tuyến đại tràng người [147]. Hiện nay, mô hình chuột cấy ghép ung thư người chủ yếu là khối u thể rắn với hai loại ung thư hay sử dụng là ung thư vú và ung thư đại tràng. Mô hình ung thư thực nghiệm này có vai trò quan trọng trong hệ thống sàng lọc các trị liệu mới chống ung thư. Ngoài ra, mô hình này còn được sử dụng cho việc nghiên cứu di căn xa của một số tế bào ung thư, tìm hiểu cơ chế bệnh sinh, kiểm tra hoạt tính gây u của nhiều loài tế bào gây u.

Mô hình chuột mang dòng ung thư cấy chuyển đã có từ khá lâu. Bắt đầu từ năm 1910 khi Roux lấy dịch lọc của u sarcom gà nghiền nát tiêm vào gà khỏe mạnh đã tạo nên khối sarcom mới. Carrel và Lewis (1923) nhận thấy tế bào ung thư dù ở trong cơ thể động vật hay nuôi cấy trong ống nghiệm vẫn giữ được đặc tính mô bệnh học của nó [45]. Hiện nay, có khoảng 3000 dòng tế bào ung thư được phân lập và có hơn 1000 dòng tế bào được sử dụng thường xuyên. Với một thí nghiệm sàng lọc thuốc chống ung thư, số lượng dòng tế bào được lựa chọn là khác nhau tùy vào số lượng thuốc, đặc tính của mỗi dòng tế bào và điều kiện cho phép của phòng thí nghiệm [148].

Tại Việt Nam, có 2 dòng tế bào ung thư là ung thư mô liên kết (Sarcom 180) và ung thư biểu mô phổi (Lewis Lung Carcinoma) được sử dụng nhiều trong các mô hình ung thư thực nghiệm. Hai dòng tế bào này có thể được tiêm vào khoang bụng chuột để gây u báng hoặc tiêm vào cơ đùi, dưới da để gây u rắn [45].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng dòng tế bào sarcoma 180 để gây u cho chuột nhắt trắng dòng Swiss. Dòng tế bào ung thư sarcoma 180 là dòng tế bào chuẩn đã được rất nhiều viện nghiên cứu ung thư trên thế giới sử dụng do tế bào này có thể sống trong dịch ổ bụng, mô liên kết, dễ xác định đặc tính di truyền và nhạy cảm với các trị liệu chống ung thư [149],[150], [151]. Dòng tế bào này do ATCC cung cấp, được bảo quản trong nitơ lỏng ở -196°C, sau đó được rã đông rồi nuôi *in vitro* trong môi trường RPMI, bổ sung 10% FBS. Tế bào sarcoma 180 trong môi trường nuôi cấy ở dạng trôi nổi, có dạng hình cầu, khi đạt được số lượng trên 100 triệu tế bào mỗi đợt nuôi cấy sẽ được lưu trữ làm tế bào giống gốc và cấy ghép để gây u cho chuột thí nghiệm. Một số tác giả sử dụng mô hình u bóng trong nghiên cứu ung thư thực nghiệm. Tuy nhiên, trên mô hình này, dòng tế bào ung thư phát triển rất nhanh nên phù hợp với nghiên cứu động học nhưng lại làm cho đời sống động vật (thời gian sống thêm) khá ngắn. Còn trong mô hình u rắn, tế bào ung thư phát triển nhanh nên thích hợp với nghiên cứu hình thái và chức năng u. Khi khối u phát triển, để chống lại khối u, cơ thể có các đáp ứng tại chỗ và toàn thân, tạo điều kiện để nghiên cứu các biến đổi về kích thước, thể tích khối u tại các thời điểm xác định. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã gây u rắn bằng cách tiêm vào dưới da vùng lưng (lệch về phía bên phải) mỗi chuột nhắt trắng Swiss 0,2ml huyền dịch chứa  $10^6$  tế bào sarcoma 180. Quan sát động vật hàng ngày, định kỳ đo đường kính khối u cho thấy sau khi được tiêm tế bào sarcoma 180 đều hình thành các khối u tại vùng lưng với thể tích các khối u này tăng dần theo thời gian. Sau khi tiêm tế bào ung thư, các triệu chứng toàn thân của chuột lô không được điều trị diễn biến tăng dần, đa số có biểu hiện bỏ ăn, suy kiệt và từ ngày thứ 43 trở đi xuất hiện chuột chết.

Như vậy để đánh giá tác dụng kháng u của côm cây sói rừng (một loại thảo dược) trên động vật thực nghiệm thì mô hình nghiên cứu chúng tôi chọn là hoàn toàn hợp lý.

#### 4.2.2. Về tác dụng kháng u rắn sarcoma 180

Theo kinh nghiệm sử dụng của Trung Quốc cũng như ở Việt Nam, thường dùng 20 – 40 gam sói rừng sắc uống để trị bệnh. Vậy liều dùng thực sự có tác dụng trên người là bao nhiêu. Để trả lời câu hỏi này, côm cây sói rừng với 3 mức liều 5g/kg; 10g/kg và 20g/kg cân nặng chuột nhất trắng (tương ứng với liều ngoại suy trên người) đã được lựa chọn trong nghiên cứu [143]. Theo Đỗ Trung Đàm, liều có tác dụng dược lý dao động trong giới hạn từ 1/20 đến 1/5 LD50 [152], vậy các tỷ lệ 1/3, 1/7 và 1/15 là chấp nhận được. Hơn nữa, nếu xét giữa liều cao nhất cho chuột uống trong thí nghiệm là 20g côm/kg (tương đương 27g dược liệu/kg thể trọng) với liều bắt đầu gây độc, nhận thấy: so với liều cao nhất không gây chết động vật thí nghiệm (bảng 3.1) là 89,04g dược liệu/kg thì khoảng cách giữa liều cao nhất trong thí nghiệm với liều bắt đầu gây độc khoảng 1/3 cũng có thể chấp nhận được.

##### 4.2.2.1. Ảnh hưởng của côm cây sói rừng tới tình trạng chung và thay đổi thể trọng chuột

Bất kỳ một chế phẩm lạ nào tác động vào cơ thể, dù ở dạng đắp, tiêm hay uống đều có những ảnh hưởng nhất định đến tình trạng sức khỏe và sinh lý của cơ thể đó. Trước khi khảo sát hoạt tính ức chế khối u thì ảnh hưởng của côm cây sói rừng đến tình trạng sức khỏe chuột sẽ được theo dõi thông qua quan sát hoạt động ăn uống, vận động và tăng trọng của chuột.

Khi quan sát hoạt động ăn uống, các lô chuột 6-MP (ung thư uống 6-MP), lô SR 5g/kg (ung thư uống côm SR liều 5g/kg) và lô chuột UT (ung thư không điều trị) không có sự thay đổi so với lô SH (chuột không ung thư). Tuy nhiên, ở 2 lô SR 10g/kg và lô SR 20g/kg thể trọng 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 (trung bình khoảng 25g) và

chuột ở các lô đều tăng trọng lượng sau mỗi lần cân, trong đó trọng lượng của lô sinh học là lớn nhất. Điều này hợp lý vì ở lô này, chuột không phải chịu một tác động nào về sự phản ứng giữa tế bào ung thư với cơ thể và phản ứng với thuốc thử nghiệm. Ở lô chuột bị ung thư được điều trị bằng cốm SR liều 5g/kg, trọng lượng chuột trong quá trình điều trị tăng nhẹ nhưng thấp hơn trọng lượng ở lô sinh học cũng như lô UT (ung thư không điều trị). Sự khác biệt là không có ý nghĩa với  $p > 0,05$ . Cùng một điều kiện thí nghiệm, lô SR 10g/kg và đặc biệt là lô SR 20g/kg có trọng lượng chuột thấp hơn hẳn so với các lô còn lại ( $p < 0,05$ ). Còn đối với lô 6-MP (ung thư uống 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.

Trong quá trình uống thuốc, hoạt động vận động của các lô chuột mang u được điều trị bằng 6-MP và cốm cây sói rừng không thấy có sự khác thường so với lô chuột mang u không được điều trị và lô chuột sinh học.

Như vậy, với liều 20g/kg thể trọng chuột, cốm cây sói rừng đã ảnh hưởng tới sự phát triển cân nặng và tình trạng chung của chuột.

#### ***4.2.2.2. Ảnh hưởng của cốm cây sói rừng tới sự phát triển của khối u trên chuột***

Để đánh giá sự phát triển của khối u, chuột ở tất cả các lô được theo dõi, đo kích thước u bằng thước kẹp 2 ngày một lần.

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 (có u không điều trị), kích thước u tăng mạnh, thể hiện bằng đường đồ thị lúc này dần tách khỏi đường đồ thị của các lô khác và càng ở các lần đo sau càng rõ. Cùng điều kiện, thời điểm thí nghiệm thì kích thước khối u của các lô

chuột uống cỏm SR có tăng nhưng tốc độ tăng trưởng khối u thấp hơn so với lô UT và ở các ngày đo cuối thì khối u hầu như ít có sự thay đổi kích thước. So sánh giữa các lô chuột được điều trị bằng cỏm cây sói rừng nhận thấy: ở lô SR3 (uống SR liều 20g/kg) thì khối u tăng kích thước chậm hơn hẳn so với 2 lô uống SR liều 5g/kg và liều 10g/kg. Điều này có thể giải thích là: liều 20g/kg bằng  $1/3 LD_{50}$ , gần sát với liều gây độc vì vậy mà cũng có tác dụng gây độc cao hơn với các tế bào ung thư. Tuy nhiên, bên cạnh đó thì liều này cũng có ảnh hưởng đến thể trọng của chuột (biểu đồ 3.2). Còn ở lô uống SR liều 10g/kg thì kích thước u lại tăng nhanh hơn là lô uống SR liều 5g/kg. 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 (ung thư uống 6-MP) thì thể tích khối u giảm dần và giảm rõ so với các lô chuột khác. Có lẽ do khối u giảm kích thước nhiều mà dẫn đến việc trọng lượng của chuột ở lô này giảm hẳn so với lô UT và các lô chuột uống cỏm cây sói rừng.

Kết quả bảng 3.8 cho thấy khi bắt đầu quá trình điều trị, 100% chuột ở cả 5 lô đều tạo u khi được cấy chuyên khối u sarcom 180. Đến ngày 10 sau gây u có một số chuột có hiện tượng thu nhỏ kích thước khối u, tập trung vào 2 lô 6-MP (ung thư uống 6-MP) và lô SR3 (ung thư uống SR liều 20g/kg). Khi kết thúc quá trình điều trị, các lô chuột 6-MP, SR1 (ung thư uống SR liều 5g/kg) và SR3 có trên 50% chuột suy giảm thể tích khối u, trong khi ở lô SR2 (ung thư uống SR liều 10g/kg) thì tỷ lệ đó là 40% và ở lô UT không có chuột nào có hiện tượng đó.

Điều này 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 [133], các lô 6-MP, SR3 đều đạt hiệu lực kháng u (++), còn lô SR1 và SR2 đạt (+).

Vương Kính và cộng sự (1999) khi nghiên cứu tác dụng của cây sói rừng trên chuột mang u sarcoma 180 nhận thấy cây sói rừng đã có tác dụng nhất định trong ức chế sự phát triển của khối u [153]. Chen S. (2009) khi tiêm dịch sói rừng liều 36mg/kg kết hợp với Cytoxan cho chuột mang u sarcoma 180 thì tác dụng ức chế sự phát triển khối u đã tăng lên 29% so với chỉ dùng đơn thuần Cytoxan [125].

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 [103],[104],[105].

Saponin có tác dụng chống ung thư trên thực nghiệm và đã được chứng minh qua nhiều nghiên cứu của các tác giả trong và ngoài nước [154],[155]. Các gốc tự do sinh ra trong quá trình trao đổi chất thường là các gốc tự do như OH<sup>•</sup>, ROO<sup>•</sup> là các yếu tố gây đột biến gen, huỷ hoại tế bào, ung thư, tăng nhanh sự lão hóa... Các chất flavonoid làm ngăn chặn quá trình oxy hóa do các gốc tự do. Ngoài ra, flavonoid còn có khả năng tạo phức với các ion kim loại nên có tác dụng như những chất xúc tác ngăn cản các phản ứng oxy hoá xảy ra [156]. Flavonoid đã được chứng minh là có tác dụng chống khối u, 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. [157], [158], [159], [160],[161]. Theo Borek C. (2004), với tác dụng như một chất chống oxy hóa, các flavonoid đóng vai trò như những chất kim hãm khi tham gia vào ức chế quá trình gây ung thư. Cơ chế này có thể là do flavonoid ức chế quá trình chuyển hóa của các chất gây ung thư, hoặc cảm ứng các enzym khử độc của chất gây ung thư hay hạn chế tác dụng độc hại của các chất gây ung thư với các đích tác động như DNA, RNA và protein [162].

Polysaccharidee ức chế sự sinh trưởng của các tế bào ung thư bằng cách ức chế tạo mạch tại khối u. Theo nghiên cứu về polysaccharidee của các nhà khoa học trong nước và thế giới thì các polysaccharidee còn có tác dụng tăng cường và điều chỉnh chức năng miễn dịch, điều chỉnh sự trao đổi chất và tăng cường tổng hợp các acid nucleic và protein, loại bỏ các gốc tự do, ngăn chặn quá trình oxy hóa của lipit giúp bảo vệ các tế bào, tăng cường tổng hợp DNA [163],[164],[165]. Zhenzhen Z. (2014) đã phân lập được SGP-2, một polysaccharide chiết xuất từ cây sói rừng nhận thấy chất này có tác dụng ức chế sự tăng sinh và di căn của tế bào ung thư MG-63 *in vitro* [120]. Trong nghiên cứu của Jin L. và cộng sự (2012), polysaccharidee chiết xuất từ cây sói rừng có tác dụng ức chế các gốc tự do rất tốt [166]. Hoạt chất sesquiterpen cũng đã được chứng minh có tác dụng ức chế sự phát triển của tế bào ung thư cả *in vitro* và *in vivo* [167],[168].

Như vậy, với sự có mặt của các hoạt chất trên trong thành phần hóa học đã phần nào giải thích được tác dụng ức chế phát triển tế bào ung thư của cây sói rừng. Tuy nhiên, khó có thể nói thành phần nào chịu trách nhiệm chính cho tác dụng này vì cho đến nay, các nghiên cứu về tác dụng ức chế ung thư của cây sói rừng mới tập trung vào dịch chiết thô mà rất ít nghiên cứu tách chiết và phân lập hoạt chất.

Các nhóm gen sinh ung thư, gen ức chế ung thư, gen sửa chữa các thương tổn DNA và gen chỉ huy quá trình apoptosis có vai trò quan trọng trong có chế hình thành ung thư. Dưới tác động của các tác nhân vật lý, hóa học, chế độ dinh dưỡng không hợp lý hoặc các rối loạn di truyền...có thể ảnh hưởng đến các nhóm gen này dẫn đến sự mất cân bằng giữa các nhóm gen hoặc xuất hiện các đột biến gen từ đó tạo điều kiện cho tế bào lành của cơ thể biến chuyển thành ác tính. Liệu cây sói rừng có tác động đến các nhóm gen này không? Trên thế giới, các nghiên cứu về cơ chế tác động của cây sói rừng

chưa nhiều. Nghiên cứu của Kang M và cộng sự (2008) cho thấy: trên chuột “nude” mang tế bào ung thư biểu mô mũi họng người được uống dịch chiết sói rừng, ngoài tác dụng làm tăng tỷ lệ ức chế khối u lên 40,8% so với nhóm đối chứng, dịch chiết sói rừng còn làm tăng tỷ lệ biểu hiện gen Bax - là gen tạo điều kiện cho chết tế bào theo chương trình và làm ngừng chu trình tế bào ở pha  $G_0/G_1$  [119]. Đây sẽ là một gợi ý để tiến hành cho các nghiên cứu chuyên sâu hơn trong tương lai về loại cây này.

Các tế bào ung thư sarcoma 180 khi cấy ghép vào cơ thể chuột sẽ trở thành một kháng nguyên và sẽ chịu sự kiểm soát của hệ thống miễn dịch giống như các loại kháng nguyên khác. Có hai loại đáp ứng miễn dịch trong ung thư. Đó là đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu và đáp ứng miễn dịch đặc hiệu. Trong đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu, các tế bào hiệu ứng miễn dịch không đặc hiệu như đại thực bào, tiểu thực bào và tế bào NK có thể gây độc tế bào làm cho tế bào ung thư ly giải hoặc bị kìm hãm, ức chế sự phát triển.

Đáp ứng miễn dịch đặc hiệu đối với kháng nguyên ung thư chủ yếu là loại miễn dịch chống kháng nguyên ghép phụ thuộc tế bào lympho T. Tuy nhiên đáp ứng miễn dịch dịch thể vẫn có vai trò nhất định trong đáp ứng miễn dịch chống ung thư. Kháng nguyên ung thư sẽ kích thích các tế bào lympho biệt hoá thành tế bào hiệu quả có chức năng loại bỏ kháng nguyên bao gồm tế bào  $T_H$ , tế bào  $T_c$ , và tế bào B tiết kháng thể. Các tế bào  $T_H$  sau khi biệt hoá sẽ sản xuất ra các lymphokin để hoạt hoá đại thực bào, tế bào NK. Tế bào  $T_c$  sau khi hoạt hoá sẽ có khả năng ly giải các tế bào ung thư. Lympho bào B được biệt hoá thành tương bào (plasma cell) sản xuất kháng thể tác động lên tế bào ung thư.

Trên tiêu bản mô bệnh học khối u ở tất cả các lô chuột, các tế bào ung thư phát triển tốt, tế bào u đa dạng, nhân tế bào đa dạng, nhiều nhân chia không điển hình. Điều này chứng tỏ khối u do cấy ghép các tế bào ung thư

sarcoma 180 chính là do khối tế bào ung thư tạo thành. Hình ảnh vi thể khối u ở lô chuột ung thư được điều trị bằng côm cây sói rừng ở cả 3 liều 5g/kg, 10g/kg và 20g/kg cho thấy trong cơ thể chuột đã xảy ra đáp ứng miễn dịch đặc hiệu mạnh mẽ, biểu hiện bằng sự tập trung nhiều tế bào lympho và tương bào tại mô ung thư. Ở lô chuột ung thư điều trị 6-MP cũng có hiện tượng đáp ứng miễn dịch đặc hiệu nhưng yếu hơn các lô uống sói rừng, biểu hiện bằng mật độ tập trung của các tế bào lympho và tương bào ít hơn. Với lô chuột ung thư không được điều trị, vùng rìa u lại có nhiều bạch cầu đa nhân và một ít lympho bào. Theo Nguyễn Văn Phan, một tiêu chuẩn có thể dùng để đánh giá độ ác tính của ung thư là mức độ thâm nhiễm và phản ứng của hệ miễn dịch lympho tại u. Sự thâm nhiễm các loại tế bào có thẩm quyền miễn dịch này càng mạnh thì sự tiến triển của khối u càng chậm và khi u phát triển nhanh thì tình trạng thâm nhiễm đó càng ít [trích dẫn từ 169]. Như vậy rõ ràng 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 côm cây sói rừng đã làm cho hạn chế sự phát triển của khối u.

Hình ảnh vi thể gan ở các lô chuột cho thấy trong nghiên cứu này, côm cây sói rừng chưa ảnh hưởng gì bất thường tới cấu trúc gan chuột.

#### ***4.2.2.3. Ảnh hưởng của côm cây sói rừng tới thời gian sống thêm của chuột***

Một số tác giả cho rằng các dịch chiết từ thảo mộc có tác dụng tối ưu ở liều thấp và không có biểu hiện độc mạn tính, nhưng phải có tác dụng kích thích hệ thống miễn dịch của cơ thể một cách đặc hiệu, thường xuyên vì chúng không phải là những yếu tố kháng phân bào (Antimitosis) giống như những chất chống ung thư thường dùng [113],[137],[160],[170],[171]. Khi so sánh tác dụng hạn chế sự phát triển ung thư sarcoma 180 *in vivo* của côm cây sói rừng liều 5g/kg với liều 10g/kg và 20g/kg thể trọng chuột thấy

tác dụng của liều 20g/kg là tốt nhất nhưng với liều này 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 ở liều 5g/kg.

Thời gian sống thêm sau điều trị là một chỉ tiêu rất có ý nghĩa trên lâm sàng. Nhiều tác giả còn cho rằng đây là tiêu chuẩn quan trọng nhất để đánh giá hiệu quả tổng hợp của các liệu pháp điều trị ung thư [172], [173]. Kết quả ở bảng 3.11 và biểu đồ 3.4 cho thấy: chuột đầu tiên bị chết là ở lô ung thư uống 6-MP, vào ngày thứ 18 sau gây u và số chuột chết tập trung xuất hiện ở thời điểm sớm nhất. Cùng vào ngày 43 của quá trình điều trị, có 2 chuột chết ở lô ung thư uống sói rừng liều 5g/kg nhưng ở lô ung thư không điều trị lại là 6 ( $p < 0,05$ ). Sau đó, ở lô ung thư không điều trị, thời điểm mà chuột chết nhiều cũng sớm hơn so với lô ung thư uống sói rừng liều 5g/kg. Kết thúc đợt điều trị, chỉ còn lô ung thư uống sói rừng liều 5g/kg là còn 2 chuột sống. Thời gian sống trung bình của lô chuột ung thư uống sói 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.

Hiện tượng lô chuột uống cỏ cây sói rừng có tỷ lệ sống sót cao hơn lô uống 6-MP và lô ung thư không được điều trị đã gợi ý trong thành phần sói rừng có những chất giúp cho chuột kháng lại những ảnh hưởng do tế bào ung thư gây ra. Theo nghiên cứu của Mai Thị Hải Yến (2010), trong dược liệu sói rừng có chứa flavonoid và các acid béo không no. Vậy phải chăng nhờ tác dụng chống oxy hóa của flavonoid và tác dụng bảo vệ màng tế bào của các

acid béo mà đã làm tăng tỷ lệ sống sót cho chuột.

Về khả năng kéo dài thời gian sống thêm cho chuột, kết quả này có cao hơn nhận xét của một số tác giả khi nghiên cứu trên mô hình u rắn sarcoma 180 (bảng 4.1).

**Bảng 4.1. Tỷ lệ thời gian sống kéo dài thêm (ILS) của chuột mang u sarcoma 180 so với một số kết quả nghiên cứu khác**

Tác giả	ILS (%)	
	Thuốc	Tỷ lệ (%)
Châu Văn Minh [174]	MB <sub>2</sub> từ cây Bùm bụp	26,44
Vương Kính [153]	Sói rừng	27,64
Kết quả nghiên cứu	Sói rừng	55,13

### **4.3. VỀ KHẢO SÁT ẢNH HƯỞNG CỦA CÓM CÂY SÓI RỪNG TRÊN TỶ LỆ TẾ BÀO CD3, CD4, CD8, IL-2 VÀ TNF- $\alpha$ 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**

Tuyến ức là cơ quan lympho trung ương của hệ lympho T, nơi biệt hóa lympho bào từ tủy xương để trở thành lympho bào T trưởng thành có chức năng miễn dịch. Theo dõi trọng lượng và mô học của tuyến ức có thể đánh giá được đáp ứng qua miễn dịch trung gian tế bào và một phần đáp ứng miễn dịch dịch thể với các kháng nguyên phụ thuộc tuyến ức [38],[39],[175].

Qua bảng 3.13 cho thấy sau điều trị, trọng lượng tuyến ức tương đối ở cả 3 lô UT (ung thư không điều trị), lô 6-MP (ung thư uống 6-MP) và lô SR1

(ung thư uống cỏ cây sói rừng liều 5g/kg) đều tăng lên có ý nghĩa thống kê so với lô SH (chứng sinh học). Tuy nhiên mức độ tăng của lô 6-MP và lô SR1 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 SR1 không có sự khác biệt ( $p > 0,05$ ).

Tuyến ức là nơi biệt hóa và trưởng thành của tế bào lympho T. Hầu hết các tế bào T non đều đi vào vùng vỏ tuyến ức qua hệ thống mạch máu. Tại vùng vỏ các tiền tế bào dạng lympho chuyển thành tế bào dạng lympho chưa chín đi vào vùng tủy. Vùng tủy là nơi các tế bào dạng lympho chưa chín trưởng thành thành các tế bào lympho T chín và rời tuyến đi vào máu và tới các mô lymphô ngoại biên [39]. Khi có các yếu tố gây bệnh xâm nhập, cơ thể sẽ có đáp ứng miễn dịch làm tăng các tế bào có thẩm quyền miễn dịch như tế bào lympho. Do đó sự tăng trọng lượng tương đối tuyến ức có thể do tăng số lượng tế bào ở các cơ quan này. Điều này đã được làm sáng tỏ trên nghiên cứu cấu trúc vi thể tuyến ức. Cấu trúc vi thể tuyến ức trên chuột mang u sarcoma 180 cho thấy: tỷ lệ tủy/vỏ cao hơn so với lô chứng sinh học. Khi được điều trị bằng thuốc 6-MP hoặc cỏ cây sói rừng thì thấy mật độ tế bào lympho tập trung nhiều ở cả vùng vỏ và vùng tủy. Trong khi ở lô không được điều trị, số lượng tế bào lympho chỉ tương đương với lô chứng sinh học.

Như vậy, khi cấy ghép tế bào ung thư vào cơ thể, chuột ở các lô trong nghiên cứu đã có các biểu hiện đáp ứng miễn dịch nhưng với các mức độ khác nhau. Lô chuột ung thư uống cỏ cây sói rừng liều 5g/kg có kết quả tốt hơn so với lô chuột ung thư không được điều trị cả về trọng lượng tương đối cũng như hình ảnh vi thể. Sự gia tăng trọng lượng tuyến ức tương đối ở chuột nhất trắng mang u sarcoma 180 được uống sói rừng cũng cho kết quả tương tự như các nghiên cứu trước đây của một số tác giả khác về cây này [116], [120], [123], [124]. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy cỏ cây sói rừng đã kích



thích đáp ứng miễn dịch chống ung thư sarcoma 180 *in vivo* thông qua tác dụng làm tăng trọng lượng và biến đổi hình thái vi thể tuyến ức. Trong đáp ứng miễn dịch tế bào chống ung thư thông qua tế bào T, vai trò kiểm soát của tuyến ức là quan trọng, vì tuyến ức là nơi các tế bào lympho chưa biệt hóa trưởng thành. Trong quá trình này, hệ miễn dịch tự nhận dạng các kháng nguyên lạ và phát triển đáp ứng miễn dịch. Tuyến ức còn sản xuất ra một số yếu tố hòa tan như thymulin, thymosin  $\alpha$ , thymopoietin...giúp tuyến ức đảm nhiệm chức năng huấn luyện, phân chia và biệt hóa các tế bào lympho T.

#### **4.3.1.2. Biến đổi trọng lượng tương đối và cấu trúc vi thể lách**

Lách là cơ quan lympho ngoại vi lớn nhất, vị trí chủ yếu của đáp ứng miễn dịch đối với kháng nguyên đến từ máu. Nhu mô lách chia thành tủy trắng và tủy đỏ. Tủy trắng chiếm 5 -20% trọng lượng lách, được cấu tạo chủ yếu bởi các mô lympho. Tế bào lympho T ở tủy trắng thường xếp xung quanh động mạch trung tâm, chiếm một diện tích khá lớn, đó là vùng tế bào T. Đáp ứng miễn dịch tế bào chống u làm vùng tế bào T tăng diện tích. Vùng tế bào B hay là nang lympho thường nằm gần các nhánh động mạch nhỏ, được bao bọc bởi một vòng tế bào lymphô và đại thực bào. Tủy đỏ chiếm khoảng 80% trọng lượng lách, đóng vai trò lọc các hồng cầu già, các tế bào chết và trữ máu cho cơ thể. Tế bào trong tủy đỏ chủ yếu là hồng cầu, đại thực bào, tế bào hình sao, một ít tế bào lymphô và tương bào. Ngoài nhiệm vụ lọc và trữ máu, lách là nơi tập trung kháng nguyên, nhất là các kháng nguyên vào cơ thể bằng đường máu. Sau khi xâm nhập, kháng nguyên bị đại thực bào xử lý, cố định tại tủy đỏ, sau đó vào tủy trắng nơi có nhiều nang lympho, kích thích các lympho bào phân chia biệt hóa thành tương bào [39].

Kết quả ở biểu đồ 3.5 cho thấy cuối đợt điều trị, trọng lượng lách tương đối của chuột ở các lô ung thư, lô 6-MP (ung thư uống 6-MP) và SR1 (ung

thư uống cỏm cây sói rừng) có giá trị tương ứng 0,91% - 1,06% cao hơn hẳn so với lô SH (sinh học) (0,56%) với  $p < 0,01$ . Trọng lượng lách tương đối của chuột ở lô SR1 là 1,05% cao hơn so với lô UT là 0,91% với  $p < 0,05$  nhưng không khác biệt so với lô 6-MP (1,06%) với  $p > 0,05$ . Những kết quả này cũng phù hợp với những hình ảnh cấu trúc vi thể 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 SR1 thì mật độ tập trung các tế bào lympho cũng như kích thước của tủy trắng tăng rất mạnh. Sự tăng tế bào lympho ở lách của các lô chuột UT, 6-MP và SR1 là cơ sở cắt nghĩa cho sự khác nhau về trọng lượng lách tương đối của các lô chuột.

Sự biến đổi trọng lượng tương đối và cấu trúc vi thể lách của chuột cấy chuyển tế bào ung thư sarcoma 180 được uống sói rừng trong nghiên cứu này cũng cho kết quả tương tự như trong nghiên cứu của Wen J. (2003) trên chuột mang tế bào ung thư gan Hep A22 [116] và của Sun W. (2003) trên chuột cấy chuyển tế bào ung thư dạ dày [123].

Để khẳng định sự tăng trọng lượng tương đối của tuyến ức và lách, tỷ lệ (%) trọng lượng tương đối của tim ở các lô thí nghiệm sẽ được khảo sát. Kết quả biểu đồ 3.6 cho thấy tỷ lệ này không có sự khác biệt giữa lô sinh học và các lô điều trị bằng 6MP, cỏm cây sói rừng liều 5/kg thể trọng. Riêng ở lô UT, tỷ lệ này lại tăng lên. Điều này có thể giải thích là do ở chuột ung thư, tim phải hoạt động nhiều để đảm bảo cung cấp chất dinh dưỡng cho cơ thể và cả khối u. Hơn nữa bản thân khối u cũng tiết ra các chất làm tăng sinh hệ mạch, kích thích hoạt động của tim như yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi (basic Fibroblast Growth Factor: bFGF), yếu tố phát triển tế bào nội mô mạch (Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF). Còn ở các lô ung thư được điều trị, khối u bị kìm hãm không phát triển mạnh nên không đòi hỏi sự tăng

hoạt động của tim. Sự không khác biệt trọng lượng tim tương đối ở các lô điều trị so với lô sinh học chứng tỏ rằng sự tăng trọng lượng các cơ quan miễn dịch là có chọn lọc. Như vậy, có thể thấy cốm cây sói rừng có tác dụng kích thích tăng sinh cơ quan miễn dịch tuyến ức và lách. Theo Zhenzhen Z. (2014), Mai Thị Hải Yến (2010), trong cây sói rừng chứa một hàm lượng lớn polysaccharide, chính chất này có hoạt tính chống khối u ở chuột thể hiện qua sự ức chế phát triển tế bào ung thư, điều hòa hệ thống miễn dịch ở vật chủ [120],[127]. Đã có nhiều nghiên cứu trong nước và nước ngoài đề cập đến tác dụng của polysaccharide trên hệ thống miễn dịch. Theo Nguyễn Gia Chấn (1999), các dược liệu giàu chất polysaccharide có tác dụng kích thích miễn dịch rõ rệt trên thực nghiệm [176]. Trong nghiên cứu của Nguyễn Thị Vân Anh (2011), cao quả nhàu - một dược liệu có nhiều polysaccharide trong thành phần hóa học, có tác dụng kích thích miễn dịch trên chuột nhắt trắng thông qua làm tăng trọng lượng các cơ quan miễn dịch, tăng số lượng tế bào lympho B và T [177]. Đặc biệt, hiện nay các chất có bản chất là các polysaccharide chiết xuất từ xác vi khuẩn đã được sử dụng rộng rãi để làm các chất kích thích miễn dịch trên lâm sàng như Bromchovaxon [178].

#### ***4.3.1.3. Ảnh hưởng của cốm cây sói rừng đến tế bào máu ngoại vi***

Kết quả nghiên cứu ở bảng 3.14 cho thấy: khi bị cấy truyền tế bào ung thư sarcoma 180 (lô UT), số lượng hồng cầu bị giảm 15% so với chuột khỏe mạnh (9,48 – 7,89 T/L). Khi bị cấy truyền tế bào ung thư sarcoma 180 và được điều trị bằng 6-MP (lô 6-MP) thì số lượng hồng cầu giảm đi 23,48% so với lô ung thư không được điều trị. Còn với lô SR1 (ung thư uống cốm cây sói rừng liều 5g/kg) thì số lượng hồng cầu cao hơn lô UT và lô 6-MP ( $p < 0,05$ ) nhưng không có sự khác biệt so với lô SH (chuột khỏe mạnh).

Thông thường khi chuột bị cấy truyền tế bào ung thư, số lượng tiểu cầu tăng lên. Đó là tình trạng tăng tiểu cầu phản ứng. Vì thế, chuột ở lô UT có số lượng tiểu cầu tăng cao hơn nhiều so với lô SH. Khi chuột ung thư được điều trị bằng 6-MP (lô 6-MP) thì số lượng tiểu cầu giảm xuống 30% so với lô chuột SH. Trong khi ở lô chuột ung thư điều trị bằng cốm SR (lô SR1) số lượng tiểu cầu lại không khác biệt so với lô SH (bảng 3.15). Kết quả này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của Chương Võ Cường (2011): sói rừng không ảnh hưởng đến số lượng tiểu cầu của chuột mang u sarcoma 180 đồng thời có tác dụng phục hồi lại số lượng tiểu cầu ở chuột dùng sói rừng phối hợp hóa trị liệu so với chuột dùng hóa trị liệu đơn thuần [179].

Số lượng bạch cầu trong máu ngoại vi phản ánh cả hai phương thức đáp ứng miễn dịch tự nhiên và đáp ứng miễn dịch đặc hiệu. Theo dõi số lượng bạch cầu định kỳ là một chỉ số huyết học cần thiết cho các bệnh nhân ung thư được điều trị bằng thuốc hoặc tia xạ. Trong nghiên cứu này, số lượng bạch cầu ở lô UT tăng lên rất cao (292% ) so với lô SH. Với lô 6-MP thì số lượng bạch cầu giảm xuống chỉ còn 53% so với lô SH ( $p < 0,05$ ). Khi được điều trị bằng cốm cây sói rừng (lô SR1) thì đã có sự phục hồi số lượng bạch cầu so với lô 6-MP, thể hiện bằng số lượng bạch cầu đã tăng 127% so với lô 6-MP.

Các loại bạch cầu trong máu ngoại vi có vai trò quan trọng trong quá trình nhận diện kháng nguyên để hình thành đáp ứng miễn dịch. Vì thế, đánh giá sự thay đổi về các loại tế bào này cho phép đánh giá một phần tình trạng đáp ứng miễn dịch của cơ thể.

Qua kết quả nghiên cứu ở bảng 3.17, cùng với sự thay đổi số lượng bạch cầu, số lượng bạch cầu máu trung tính ở lô UT tăng cao hơn hẳn so với các lô chuột còn lại, trong khi số lượng bạch cầu lympho lại có xu hướng giảm hơn. So với lô SH, số lượng bạch cầu máu trung tính ở lô SR1 có tăng

hơn nhưng không có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) và số lượng tế bào lympho thì tăng cao hơn 25%. Cùng thời điểm nghiên cứu, tại lô 6-MP, cả 3 loại bạch cầu trung tính, bạch cầu lympho và bạch cầu mono đều giảm rõ rệt so với lô SH và lô SR1 ( $p < 0,05$ ).

Mỗi loại bạch cầu có một chức năng riêng biệt. Bạch cầu mủi trung tính chiếm một số lượng lớn trong máu ngoại vi. Chức năng quan trọng của chúng là thực bào, có vai trò chủ yếu trong đáp ứng miễn dịch tự nhiên và thường tăng cao trong nhiễm trùng cấp tính. Các tế bào này được điều động đến các vị trí có nhiễm trùng để nhận diện, tấn công và phá hủy các vi khuẩn, virus khi vừa xâm nhập vào cơ thể [38],[39],[180]. Chính vì vậy mà tại lô chuột ung thư không được điều trị (lô UT) có số lượng bạch cầu trung tính tăng cao.

Tế bào lympho là những tế bào có vai trò chính trong đáp ứng miễn dịch đặc hiệu. Do có sự khác nhau trong quá trình biệt hóa về hình thái, chức năng, về các dấu ấn bề mặt mà các tế bào lympho được chia thành 2 quần thể lympho bào T và quần thể lympho bào B. Các tế bào lympho B có vai trò chính trong đáp ứng miễn dịch dịch thể. Còn các tế bào lympho T giữ vai trò chủ đạo trong đáp ứng miễn dịch tế bào [38],[39],[180].

Trong máu ngoại vi có tế bào diệt tự nhiên NK có chức năng diệt một số tế bào đích như tế bào ung thư, tế bào nhiễm virus, các bạch cầu mono có vai trò thực bào, trình diện kháng nguyên cho các tế bào miễn dịch... Trong nghiên cứu, số lượng bạch cầu mono ở lô UT và lô SR1 tuy có biến động nhưng vẫn nằm trong giới hạn sinh lý bình thường, riêng lô 6-MP thì giảm rõ rệt.

Thuốc đối chứng dương sử dụng trong nghiên cứu là 6-MP còn có tên khác là Purithenol, Mercaptopurin. Thuốc 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 [181]. 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. Theo kết quả nghiên cứu, khi chuột ung thư được điều trị bằng cốm cây sói rừng liều 5g/kg số lượng hồng cầu, tiểu cầu và bạch cầu chung không có biến đổi so với chuột khỏe mạnh ở lô SH, đặc biệt là số lượng bạch cầu lympho tăng hơn so với 3 lô chuột còn lại. Sự tăng bạch cầu lympho trên gián tiếp nói lên tác dụng kích thích miễn dịch của cốm cây sói rừng. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với Wen J. và cộng sự (2003). Các tác giả nhận thấy sau khi được tiêm dịch chiết sói rừng, số lượng bạch cầu lympho ở chuột cấy chuyển tế bào ung thư gan Hep A22 tăng lên rõ rệt so với chuột đối chứng [116]. Theo nghiên cứu của Leng Y. và cộng sự (2010), cây sói rừng làm tăng số lượng tiểu cầu, số lượng bạch cầu lympho và tăng cường đáp ứng miễn dịch *in vivo*, hạn chế được các tác dụng độc ở máu ngoại vi do tia xạ và hóa chất trên bệnh nhân ung thư được điều trị phối hợp với sói rừng với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi so với nhóm chứng [121]. Kết quả nghiên cứu của Mai Thị Hải Yến (2010) cho thấy cao sói rừng có tác dụng chống viêm mạn tính trên mô hình gây u hạt thực nghiệm [127]. Tác dụng chống viêm và tác dụng kích thích miễn dịch của cây sói rừng có vẻ như mâu thuẫn với nhau. Vì chống viêm có nghĩa là ức chế số lượng và hoạt động chức năng của các tế bào miễn dịch. Trong khi kích thích miễn dịch thì ngược lại. Dựa vào diễn biến, quá trình viêm phân ra viêm cấp và viêm mạn tính. Quá trình viêm cấp là quá trình diễn ra trong những giờ đầu khi kháng nguyên xâm nhập vào cơ thể, đó là một phần

trong đáp ứng miễn dịch tự nhiên. Quá trình này có vai trò to lớn của các bạch cầu trung tính, các chất trung gian hóa học như histamin, prostaglandin, leucotrien... Quá trình viêm mạn thường xảy ra sau viêm cấp, có đặc điểm là thâm nhiễm đại thực bào và tế bào lympho tại mô viêm [182]. Trong nghiên cứu, cốm cây sói rừng không làm tăng số lượng bạch cầu trung tính có vẻ phù hợp với tác dụng chống viêm mạn. Và qua đó có thể lý giải được cây sói rừng vừa có tác dụng chống viêm vừa có tác dụng kích thích miễn dịch.

### **4.3.2. Về ảnh hưởng tới tỷ lệ tế bào T và nồng độ IL-2, TNF- $\alpha$**

#### **4.3.2.1. Về tỷ lệ tế bào T**

Mỗi loại tế bào lympho có các dấu ấn bề mặt riêng (CD – cluster of differentiation) và được coi như là những dấu ấn để phân biệt tế bào lympho ở các giai đoạn khác nhau. Các tế bào lympho T có nhiều dấu ấn CD nhưng CD3 là dấu ấn đặc trưng của các tế bào này. CD3 có mặt ở mọi tế bào lympho T trưởng thành [38],[39],[180]. Vì vậy, xét nghiệm xác định tỷ lệ tế bào TCD3 thường được sử dụng để đánh giá số lượng các tế bào lympho T trong đáp ứng miễn dịch.

Kết quả ở bảng 3.18 cho thấy ở các lô chuột cấy chuyển tế bào ung thư sarcoma 180 đều có tỷ lệ tế bào TCD3 tăng lên rõ rệt so với lô chuột khỏe mạnh không cấy chuyển tế bào ung thư (lô SH). Tuy nhiên, so với lô ung thư không được điều trị (lô UT) thì tỷ lệ này ở lô được điều trị bằng cốm cây sói rừng (lô SR1) và bằng 6-MP (lô 6-MP) tăng lên rõ rệt, mức độ tăng 110% ở lô SR và 112% ở lô 6-MP. 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.



Đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào là phương thức đáp ứng thứ hai, bên cạnh đáp ứng miễn dịch dịch thể nhằm loại trừ kháng nguyên lạ khi xuất hiện trong cơ thể. Lympho bào T là tế bào phụ trách đáp ứng miễn dịch tế bào. Lympho bào T có nhiều phân nhóm (dưới nhóm) thực hiện các chức năng khác nhau. Đó là Th có CD4 trên bề mặt, Ts và Tc mang CD8 trên bề mặt. Trong đó, các tế bào TCD4, TCD8 là các phân nhóm gây độc với ung thư rất đặc hiệu, thông qua các cytokine như IL-2, TNF- $\alpha$  hoặc có thể gây ly giải trực tiếp tế bào ung thư [38],[39],[180],[183]. Tế bào TCD4 có chức năng kích thích sự tăng trưởng và biệt hóa lympho bào B, hỗ trợ cho Tc thực hiện tốt chức năng tiêu diệt hoặc gây độc với kháng nguyên đặc hiệu. Tế bào TCD8 có tác dụng tấn công trực tiếp các tế bào nhiễm virus và các tế bào ung thư [38],[39],[180], [184]. Vì vậy, đánh giá ảnh hưởng của cúm cây sói rừng lên tỷ lệ các tế bào TCD4 và TCD8 có thể đánh giá được phần nào tác dụng lên đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào và giải thích được cơ chế chống ung thư của cây sói rừng.

Kết quả đếm tế bào đối với chuột ung thư nhưng không được điều trị (lô UT) cho thấy tỉ lệ lympho TCD4 giảm so với chuột ở lô sinh học (lô SH). Nhưng tỉ lệ lympho TCD8 có sự thay đổi mạnh. Tỷ lệ phần trăm các tế bào biểu hiện TCD8 ở lô UT là 25,22%, tăng khoảng 1,2 lần so với so với chuột ở lô SH. Điều này có thể là do phản ứng của hệ miễn dịch trong cơ thể trước sự có mặt của các tế bào ung thư. Thông thường các tế bào lympho dòng T sau khi được sinh ra sẽ trải qua một quá trình thay đổi để biệt hóa thành tế bào lympho TCD4 hoặc lympho TCD8. Trong điều kiện bình thường, tỷ lệ tế bào lympho TCD4 luôn cao hơn lympho TCD8. Tế bào lympho TCD8 có khả năng tấn công các tế bào ung thư bằng phản ứng gây độc tế bào. Do vậy ở cơ thể bị ung thư (đặc biệt ở giai đoạn sớm), tỷ lệ tế bào này luôn tăng lên so với đối chứng.

Kết quả bảng 3.19,3.20 cho thấy ở lô chuột bị ung thư được điều trị 6-MP (lô 6-MP) và cốm cây sói rừng (lô SR1), tỉ lệ tế bào lympho TCD4 có xu hướng giảm hơn so với lô SH, còn tỷ lệ tế bào lympho TCD8 tăng rõ so với lô SH ( $p < 0,05$ ). So với lô UT, tỷ lệ tế bào biểu lộ CD8 ở 2 lô 6-MP và SR1 cũng tăng có ý nghĩa thống kê. Có thể nhận thấy bên cạnh tỉ lệ tế bào biểu lộ CD8 tăng cao ở các lô 6-MP, SR1 là sự giảm nhẹ của tỉ lệ tế bào biểu lộ CD4 (giảm khoảng 1% so với lô SH) và tăng khá mạnh ở tỉ lệ tế bào biểu lộ CD3 (tăng khoảng 25% so với lô SH). Điều này là hoàn toàn hợp lí vì 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. Với các số liệu thu được, 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. Có một điểm đặc biệt là với lô uống cốm cây sói rừng, sự khác biệt về tỉ lệ các tế bào biểu hiện CD8 giữa các chuột là rất thấp ( $\pm 4,2\%$ ) so với lô uống 6-MP ( $\pm 7,4\%$ ). Vậy có thể cho rằng với cùng hiệu quả tăng cường miễn dịch (tăng tỉ lệ tế bào lympho TCD8), cốm cây sói rừng có tác dụng đồng đều lên tất cả các cá thể chuột thí nghiệm hơn là so với thuốc 6-MP. Như vậy, cốm cây sói rừng liều 5g/kg có tác dụng tăng cường khả năng miễn dịch qua trung gian tế bào thông qua việc làm tăng tỷ lệ các lympho bào T.

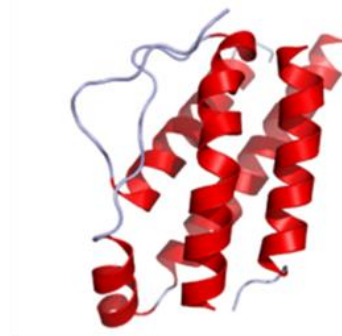
Nhiều tác giả đã đề cập mối quan hệ giữa ung thư và miễn dịch. Một trong các nguyên nhân gây ung thư có một phần do tổn thương hoặc suy giảm

hệ thống miễn dịch. Vì vậy, trong điều trị ung thư có thể dùng các thuốc kích thích miễn dịch thích hợp. 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 [127]. 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- $\alpha$  [185],[186],[187],[188].

#### 4.3.2.2. Về nồng độ IL-2 và TNF- $\alpha$

Hệ thống miễn dịch ngoài các cơ quan miễn dịch và các tế bào có thẩm quyền miễn dịch còn có sự tham gia của các cytokine. Đây là những chất tiết quan trọng của các tế bào miễn dịch đã được hoạt hóa bởi kháng nguyên. Trong số đó thì IL-2 và TNF- $\alpha$  là 2 cytokine có vai trò quan trọng trong đáp ứng miễn dịch với các tế bào ung thư [29],[38],[39],[180].

Interleukin-2 (IL-2) do tế bào lympho Th hoạt hóa tiết ra, có tác dụng kích thích tế bào lympho T cụ thể là các tế bào TCD4 và TCD8, đồng thời kích thích tế bào lympho B phát triển và biệt hóa, tăng cường tế bào NK (Natural killer cells) và tế bào LAK (Lymphokine – activated killer cells).



**Hình 4.1. Mô hình cấu trúc phân tử interleukin-2 [189]**

IL-2 sẽ được giải phóng khi kháng nguyên gắn vào thụ thể tế bào T (TCR) và sự biểu hiện của các thụ thể IL-2 (IL-2R). Sự tương tác xảy ra sau đó giữa IL-2 và IL-2R sẽ kích thích sự tăng trưởng, biệt hóa và tồn tại của các tế bào Tc. IL-2 còn cần thiết trong quá trình phát triển của tế bào T ở tuyến ức (thymus). IL-2 kích thích hệ miễn dịch và có thể dẫn tới sự tăng mạnh lượng tế bào TCD4 [29],[38],[39],[180]. IL-2 được chứng minh là có hiệu quả cao trong việc điều trị các bệnh ung thư phổi, ung thư bạch cầu, ung thư buồng trứng, ung thư vú, ung thư máu, ung thư thận, u hắc tố ác tính,... Những kết quả nghiên cứu tiền lâm sàng và lâm sàng đều cho thấy, IL-2 có khả năng kích thích, phát triển các tế bào miễn dịch, tăng khả năng tiêu diệt các tế bào ung thư, đặc biệt là ung thư biểu mô tế bào thận và u hắc tố ác tính. Khả năng chữa trị cho 2 loại ung thư này có thể lên đến 18% với u hắc tố ác tính và 37% với ung thư biểu mô tế bào thận nếu có liệu pháp điều trị IL-2 phù hợp [190],[191],[192],[193].

TNF-  $\alpha$  (yếu tố hoại tử khối u) là một cytokine đa chức năng tham gia vào quá trình apoptosis, quá trình viêm và đáp ứng miễn dịch của cơ thể, được tổng hợp chủ yếu ở đại thực bào. Một số loại tế bào khác cũng tham gia vào tổng hợp TNF-  $\alpha$  như các tế bào giết tự nhiên, bạch cầu hạt, lympho bào T, B, tế bào mô mỡ, tế bào sao và nội mạc mạch máu. Sự tổng hợp và tiết TNF-  $\alpha$  chủ yếu do sự kích thích khi tế bào tiếp xúc với kháng nguyên. TNF-  $\alpha$  ảnh hưởng đến các tế bào đích thông qua các thụ thể đặc hiệu. Hiện nay TNF-  $\alpha$  được sử dụng trong điều trị một số loại ung thư mô liên kết như ung thư sắc tố... với cơ chế chính là phá hủy các mạch máu trong khối u [38],[39],[180],[194]. Vì vậy, định lượng nồng độ IL-2 và TNF-  $\alpha$  trong huyết thanh chuột nhằm đánh giá tác dụng của thuốc thử lên khả năng chế tiết cytokine.

Kết quả nghiên cứu trong bảng 3.21 cho thấy: nồng độ IL-2 ở cả 3 lô chuột bị ung thư đều tăng lên so với lô chuột khỏe mạnh (lô SH) và đạt giá trị lớn nhất là lô 6-MP (ung thư uống 6-MP). Chuột ở lô SR1 (ung thư uống côm cây sói rừng) có sự biểu hiện IL-2 cao hơn 130% so với lô UT (ung thư không điều trị). 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 côm 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.

Nồng độ TNF- $\alpha$  cũng tăng lên ở các lô chuột bị ung thư so với lô SH. Lô SR1 đạt giá trị cao nhất 38,53pg/ml, tăng hơn lô UT 45% và hơn lô 6-MP 20% (bảng 3.22).

Các kết quả nghiên cứu cho thấy côm cây sói rừng liều 5g/kg thể trọng có tác dụng làm tăng số lượng tế bào lympho TCD8, kích thích tăng tiết IL-2 và TNF- $\alpha$ . Điều này lý giải tại sao côm cây sói rừng liều 5g/kg có thể ức chế sự phát triển tế bào ung thư sarcoma trên chuột và có thể xếp cây sói rừng vào nhóm thuốc kích thích miễn dịch.

Nhìn chung, cho đến nay, các nghiên cứu về tác dụng kháng ung thư của cây sói rừng đều khẳng định tác dụng nâng cao miễn dịch, làm tăng số lượng các tế bào lympho T, thúc đẩy tế bào đi vào quá trình tự chết của cây sói rừng [10],[195]. Tuy nhiên, dạng bào chế, liều lượng, thời gian và đường dùng thuốc vẫn chưa được nghiên cứu kỹ, đặc biệt những ảnh hưởng bất lợi có thể xảy ra khi dùng dài ngày. Vì vậy cần có những nghiên cứu chuyên sâu và toàn diện hơn trong tương lai.

### **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 nham được phân ra 2 nhóm chính là nhóm phù chính và nhóm khu tà. Phù chính là nâng cao sức đề kháng. Khu tà là đuổi tác nhân gây bệnh ra ngoài cơ thể hoặc tiêu trừ tác nhân gây bệnh. Thông qua tác dụng phù chính với khu tà để điều hòa sự ổn định và tăng cường chức năng miễn dịch bảo vệ cơ thể từ đó đạt được mục đích loại trừ và khống chế bệnh tà. Sự liên quan chặt chẽ giữa phù chính - khu tà với miễn dịch liệu pháp góp phần nâng cao hiệu quả điều trị nham chứng.

Theo YHCT, chứng nham là một bệnh mạn tính, đa phần thuộc hư chứng, đặc biệt là khi phải sử dụng đến các biện pháp như phẫu thuật, hoá trị liệu, xạ trị liệu... Vậy nên, trước hết và nhất thiết phải chú ý phù chính bồi bản, có nghĩa là phải chú ý nâng cao sức đề kháng của cơ thể thông qua một số biện pháp trọng yếu như bổ ích khí huyết, ích khí kiện tỳ, dưỡng âm sinh tân, tư âm bổ huyết, ôn thận tráng dương, kiện tỳ bổ thận... Kết quả nghiên cứu hiện đại cho thấy các biện pháp này có tác dụng: nâng cao chức năng miễn dịch của cơ thể, cải thiện công năng tạo huyết của tủy xương, thúc đẩy quá trình chuyển hoá các chất, điều tiết hệ thống nội tiết, tăng cường tác dụng của thuốc kháng ung, giảm thiểu các tác dụng không mong muốn của hoá trị và xạ trị, ngăn ngừa di căn tái phát, nâng cao hiệu quả điều trị, kéo dài thời gian sống. Các nghiên cứu lâm sàng và thực nghiệm chứng minh pháp phù chính cổ bản có liên quan đến tăng cường và điều chỉnh khả năng miễn dịch của cơ thể. Thuốc phù chính bổ hư có thể nâng cao khả năng miễn dịch của người bệnh, thúc đẩy tác dụng của tuyến yên – tuyến thượng thận từ đó ức chế sự sinh trưởng của khối u [196].

Phần lớn các bệnh nhân ung thư là có biểu hiện “bản hư tiêu thực”, có nghĩa là sức đề kháng thì suy nhược trong khi các nhân tố bệnh lý thì đang phát huy mạnh mẽ sức tàn phá. Bởi vậy, trong trị liệu, không những phải phù chính bồi bản mà còn phải chú ý khứ tà kháng ung. “Tà” ở đây được hiểu là các nguyên nhân gây bệnh, các tế bào ung thư và các rối loạn bệnh lý toàn thân hoặc tại chỗ do chúng gây nên. Do đó cần phải tác động trực tiếp vào các nhân tố gây bệnh bằng nhiều biện pháp như : thanh nhiệt giải độc, hóa đàm trừ thấp, công hạ trục thủy, nhuận kiên tán kết, tiêu thũng chỉ thống, sơ can lý khí, hoạt huyết hóa ứ... Kết quả nghiên cứu hiện đại cho thấy, các biện pháp này có tác dụng trực tiếp tiêu diệt hoặc ức chế sự phát triển của tế bào ung thư, làm giảm các triệu chứng như giảm đau, chống viêm, kháng khuẩn, hạ sốt, giải độc, chống phù nề, cầm máu, chống ngưng tập tiểu cầu, ngăn ngừa di căn... Các thuốc khu tà thường là các thuốc thuộc nhóm thanh nhiệt giải độc, hoạt huyết hóa ứ và nhuận kiên tán kết. Các loại thuốc này đa phần có tác dụng ức chế chức năng miễn dịch của cơ thể hoặc là vừa ức chế vừa hỗ trợ, tức là ngoài ức chế miễn dịch còn có tác dụng tăng cường miễn dịch (điều hòa miễn dịch – điều biến miễn dịch). Một số thuốc hoạt huyết hóa ứ có tác dụng tăng cường miễn dịch thông qua làm tăng số lượng bạch cầu lympho, tăng khả năng thực bào của bạch cầu, kích thích tăng tiết IL-2 như khương hoàng, nga truật [197], [198], [199], [200], [201]. Nhiều loại thuốc thanh nhiệt giải độc có tác dụng tăng cường đáp ứng miễn dịch của cơ thể như thất diệp nhất chi hoa, bạch hoa xà thiệt thảo, bán chi liên, khổ sâm [202], [203], [204], [205]. Nhìn chung, nam chứng giai đoạn đầu thường lấy khứ tà làm chủ, phù chính là phụ ; giai đoạn giữa kết hợp vừa khứ tà vừa phù chính (công bổ kiêm thi) ; giai đoạn muộn lấy phù chính là chủ, khứ tà là phụ.

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 [101]. 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- $\alpha$ . Như vậy, nếu xét về góc độ YHCT, cây sói rừng thuộc nhóm thuốc khu tà 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). Tuy hiệu quả mới chỉ ở mức độ nhất định, nhưng cây sói rừng đã giúp cơ thể tăng cường miễn dịch tạo điều kiện cho việc tìm hãm tế bào ung thư phát triển. Đây sẽ là cơ sở lý luận để tiếp tục nghiên cứu về cây này trên lâm sàng.



## KẾT LUẬN

Qua quá trình nghiên cứu độc tính và tác dụng của côm cây sói rừng lên chuột mang u sarcoma 180, luận án rút ra một số kết luận sau:

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

- Về độc tính cấp: Đã xác định được LD<sub>50</sub> là 98,753 (89,065 – 103,597)g dược 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, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ . Nhưng với liều 0,6g/kg thể trọng chỉ làm tăng hoạt độ ALT so với lô chứng và so với trước khi uống thuốc, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ .

+ Với cả 2 liều: Côm cây sói rừng gây biến đổi hình thái mô học của gan thỏ với các mức độ khác nhau nhưng không ảnh hưởng đến chức năng chuyển hóa và 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.

- Côm 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 cốm cây sói rừng trên tỷ lệ tế bào TCD3, TCD4, TCD8 nồng độ IL-2 và TNF- $\alpha$  của chuột 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 có ý nghĩa thống kê so với lô chứng với  $p < 0,05$ ; tăng sinh tế bào lympho trên hình ảnh vi thể tuyến ức, lách.

- Cốm cây sói rừng liều 5g/kg thể trọng làm tăng tỷ lệ tế bào lympho TCD3, TCD8, tăng nồng độ các cytokine: IL-2, TNF- $\alpha$  có ý nghĩa thống kê so với lô chứng với  $p < 0,05$ .

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

## **KIẾN NGHỊ VÀ ĐỀ XUẤT**

Để khẳng định hơn nữa tính hiệu quả và an toàn của cây sói rừng trên bệnh lý ung thư và từng bước đưa thuốc vào ứng dụng lâm sàng, đề tài xin có một số kiến nghị sau:

1. 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.
2. Tiếp tục nghiên cứu cơ chế kháng ung thư của cây sói rừng.
3. 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.

## **DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN**

1. Trần Thị Hải Vân, Phan Anh Tuấn, Nguyễn Trọng Thông, Phạm Thị Vân Anh (2012). Nghiên cứu ảnh hưởng của cốm sỏi rùng đến cấu trúc và chức năng gan, thận trên thỏ thực nghiệm. Tạp chí Y dược học cổ truyền Việt Nam, 35, 71-77.
2. Trần Thị Hải Vân, Nguyễn Quỳnh Anh, Đỗ Hòa Bình, Phan Anh Tuấn (2013). Tác dụng kháng ung thư của cốm sỏi rùng trên chuột mang u sarcoma 180. Tạp chí Y dược học cổ truyền Việt Nam, 38, 9-15.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bùi Diệu và cộng sự (2013). Xu hướng của bệnh ung thư vú ở Việt nam. *Tạp chí ung thư học Việt nam*, 34-39.
  2. Đái Duy Ban và Lữ Thị Cẩm Vân và cs (2000). *Phòng bệnh ung thư*. Nhà xuất bản Y học Hà Nội, 150-155.
  3. Nguyễn Hải Nam (2012). *Một số mục tiêu phân tử và ứng dụng trong nghiên cứu phát triển thuốc điều trị ung thư hiện nay*. Nhà xuất bản Y học Hà Nội, 18-25.
  4. Cai Y, Xiong S, et al. (2011). Trichosanthin enhances anti-tumor immune response in a murine lewis lung cancer model by boosting the interaction between TSLC1 and CRTAM. *Cell Mol Immunol*, 8(4), 359-67.
  5. Tanaka K, Matsui Y, et al. (2012). Oral ingestion of Lentinula edodes mycekaa extract can restore the antitumor T cell response of mice inoculated with colon-26 cell into the subserosal space of the cecum. *Oncol Rep*, 27(2), p. 325-32.
  6. Lê Thu Huyền (2004). *Nghiên cứu tác dụng ức chế phát triển ung thư sarcom 180 và biến đổi cấu trúc một số cơ quan miễn dịch trên chuột sau điều trị bằng thuốc Salamin*. Luận văn thạc sĩ y học, Học viện quân y.
  7. Đỗ Thị Thảo (2006). *Nghiên cứu xác định khả năng phòng chống ung thư và bản chất hóa học của một số cây thuốc Việt Nam*. Luận án tiến sĩ sinh học, Viện Công nghệ sinh học.
  8. 阮氏秋恒(2012). *益气化痰法治疗老年晚期非小细胞肺癌的临床观察*. 博士学位论文- 广州中医药大学.
- Nguyễn Thị Thu Hằng (2012). *Đánh giá tác dụng của pháp ích khí hóa đàm trên bệnh nhân cao tuổi ung thư phổi không phải tế bào nhỏ giai đoạn cuối*, Luận án tiến sĩ y học, Trường Đại học Trung y dược Quảng Châu.

9. Trần Thị Thu Huyền (2004). *Đánh giá tác dụng điều trị hỗ trợ của viên Angala trên bệnh nhân ung thư vú điều trị bằng tia xạ và hóa chất*. Luận văn thạc sỹ y học, trường Đại học Y Hà Nội.
10. 张园 ; 吕佳源 ; 俞静静 (2006). 肿节风研究进展. 俞静静,38(5).  
Trương Viên, Lữ Giai Nguyên, Du Tịnh Tịnh (2006). Các nghiên cứu về thũng tiết phong. *Tạp chí Trung Y dược*, 38(5).
11. Hu X, Xu X, Yang J (2008). Progree in research on Sarcandra Glabra. *Zhongguo Yao Xue Za Zhi*, 43(10), 721-723.
12. Nguyễn Bá Đức (2009). *Ung thư học đại cương*. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 9-12.
13. Nguyễn Bá Đức (2009). Khái niệm cơ bản về bệnh ung thư, *Ung thư học đại cương*, Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam, Hà Nội, 9-13.
14. Bùi Diệu (2012). *Những kiến thức cơ bản về phòng chống ung thư*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 21-30.
15. Lê Đình Roanh (2008). *Bệnh học các khối u*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 76-80.
16. Wilson. S, Jones. L, Coussen. C & Hanna. K (2002). *Cancer and the Environment: Gene – Environment interaction*, Washington DC. National Academy Press, Washington DC, 45-47.
17. Moscow. J et Cowan. K (2011). *Biology of cancer*, Sauders Elservier, Philadelphia, 209-221.
18. Markowitz. S, Levin. S, Miller. A (2013). Asbestos, asbestosis, smoking, and lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med*, 188(1), 90 – 96.
19. Straif. K, Benbrahim. L, Baan. R et al (2009). A review of human carcinogens -- part C: metals, arsenic, dusts, and fibres, *Lancet Oncol*, 10, 453–454.

20. Jakszyn, Gonzalez. A (2006). Nitrosamin and related food intake and gastric and oesophageal cancer risk: A systematic review of the epidemiology evidence, *WJG*, 12 (27), 4296 - 4303.
21. Hoàng Trọng Thắng (2007). Helicobacter pylori và bệnh lý liên quan đến dạ dày tá tràng, *Tạp chí khoa học Tiêu hóa Việt Nam*, 2(6), tr 362-369.
22. Anderson J, Gonzalez J (2000). H. Pylori infection: review of the guideline for diagnosis and treatment geriatrics, 55(6), pp.44-48.
23. Nguyễn Bá Đức (2009). Nguyên nhân ung thư. *Ung thư học đại cương*, Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam, Hà Nội, 33-42.
24. Hope S Rugo (2004). *Cancer current medical diagnosis and Treatment, USA: Lange Medical Books, Mc Graw Hill, New York, 245-250.*
25. Lê Khánh Trai và cs (2006). *Phương Hướng Kết Hợp Đông Tây Y trong phòng và chống ung thư*, Nhà xuất bản y học Hà Nội, 106-113.
26. Tachikawa. T et al (2009). *New trends in the molecular and biological. Basic for clinical oncology*, Springer Healthcare, 29-36.
27. Nguyễn Bá Đức (2009). *Ung thư học đại cương*. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 22-26.
28. Hiệp hội quốc tế chống ung thư (UICC) (1995). *Cẩm nang ung bướu học lâm sàng*, 2rd, Nhà xuất bản Y học, TP. HCM, 191-197.
29. Phan Thị Phi Phi (2007). *Một số vấn đề y sinh học cập nhật cho bác sỹ*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 27-33.
30. Nguyễn Viết Nhân và Hà Thị Minh Thi (2005). *Giáo trình di truyền y học*, Đại học Huế, 24-27.
31. Phạm Duy Hiền và Nguyễn Văn Hiếu (2008). Các nguyên tắc phẫu thuật ung thư, *Chẩn đoán và điều trị ung thư*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 26-30.
32. Nguyễn Hữu Thợ (2008). Các nguyên tắc xạ trị trong ung thư, *Chẩn*

- đoán và điều trị ung thư*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 227-228.
33. Nguyễn Thanh Đạm, Hà Phan Hải An et al. (2002). *Ứng dụng phương pháp miễn dịch phóng xạ trong ung thư học*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 25-27.
  34. Nguyễn Bá Đức (2003). *Hóa chất điều trị bệnh ung thư*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 228-230.
  35. Nguyễn Bá Đức và Trần Văn Thuận (2008). Nguyên tắc điều trị hệ thống bệnh ung thư, *Chẩn đoán và điều trị ung thư*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 39-60.
  36. Nguyễn Hải Nam (2012). *Một số mục tiêu phân tử và ứng dụng trong nghiên cứu phát triển thuốc điều trị ung thư hiện nay*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 21-23.
  37. Nguyễn Thanh Đạm (2004). *Miễn dịch điều trị bệnh ung thư*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 176-177.
  38. Nguyễn Ngọc Lanh và Văn Đình Hoa (2006). *Miễn dịch học*. Nhà xuất bản Y học Hà Nội, 21-24.
  39. Nguyễn Ngọc Lanh (2007). *Sinh lý bệnh và miễn dịch*. Nhà xuất bản Y học Hà Nội, 11-15.
  40. Phạm Mạnh Hùng, Nguyễn Đình Hương, Đặng Đức Trạch và cs (1992). *Các khía cạnh miễn dịch học trong bệnh học*. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 260-262.
  41. Laurence L et al (2011). Immunosuppressants, Tolerogens and Immunostimulants, *Goodman and Gilman's the pharmacological basic of therapeutic*. Mc Graw Hill, New York, 172-175.
  42. Ronit E, Hope L (2009). The biology of cancer and its relationship to disparities in cancer occurrence and outcomes. *Cause and Evidence – based solution*. Springer Publishing Company, New York, 10-12.



43. Sutherland.M (1988). Cell and Enviroment Interaction in Tumor Microregions: Th multicell spheroid model. *Science*, 240, 177-184.
44. Teicher.B et Andrew.P (2004). *Anticancer drug development guide*. Human Press, New Jersey, 2, 3-23.
45. Trần Văn Hanh, Nguyễn Minh Thông, Nguyễn Thị Đức và cs (2000). Một số mô hình ung thư thực nghiệm in vivo của labo nghiên cứu ung thư thuộc Học viện Quân y. *Kỷ yếu hội nghị quốc tế về điều trị phóng xạ ion hóa trong ứng dụng y học*, 241-242.
46. Nguyễn Thị Quỳnh (1993). *Gây mô hình u bàng thực nghiệm và thử tác dụng phòng chống ung thư của một số chế phẩm tự nhiên và tổng hợp*. Luận án tiến sỹ sinh học, Đại học Tổng hợp Hà Nội.
47. Suckow. M (2001). *The laboratory mouse*. A Volume in the laboratory animal pocket reference series, 31-45.
48. Hồ Anh Sơn, Nguyễn Lĩnh Toàn, Bùi Khắc Cường (2012). Tạo khối ung thư vú người trên chuột nude. *Tạp chí Y dược học quân sự*, 9, 10-17.
49. Bùi Khắc Cường, Hồ Anh Sơn, Nguyễn Lĩnh Toàn (2012). Nghiên cứu tạo khối ung thư đại tràng người trên chuột thiếu hụt miễn dịch bằng kỹ thuật ghép dị loài. *Tạp chí Y dược học quân sự*, 8, 6-12.
50. Học viện Trung y Nam kinh (1992). *Trung y học khái luận*, tập 2, Hội YHCT TP Hồ Chí Minh, 141-147.
51. Trường Đại học Y Hà Nội (2011). *Bài giảng y học cổ truyền*, tập 1, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 112-115.
52. 韩锐 (2002). 肿瘤化学预防及药物治疗。北京医科大学协和医科大学联合出版社。  
Hàn Nhuệ (2002). *Thuốc điều trị và dự phòng ung thư*. Nhà xuất bản liên hợp Đại học Y khoa Bắc Kinh và Đại học Y khoa Hiệp Hòa.

53. 催守仁(2003). 实用放射肿瘤学及药物治疗，中国医药科技出版社  
Thôi Thủ Nhân (2003). *Thực hành xạ trị và thuốc điều trị ung thư*. Nhà xuất bản Khoa học kỹ thuật Y dược Trung Quốc.
54. Chu Đạt Hàm (2006). *Trung y lâm sàng ung thư học*, Nhà xuất bản Kỹ thuật Thượng Hải, 40-45.
55. Bộ y tế (1995). *Nội kinh*. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 10-15.
56. Mạnh Lâm Thắng (2007). *Trung y trị nham đại thành*, Nhà xuất bản Khoa học kỹ thuật, Bắc Kinh, 212-215.
57. Chu Nghi Cường và Hoàng Diệu Quyền (2000). *Biện bệnh chuyên phương trị liệu khối u*, Nhà xuất bản Vệ sinh Nhân dân, 82 – 347.
58. Bộ Y tế (1995). *Nạn kinh*. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 9 – 11.
59. Trường Đại học Y Hà Nội (2011). *Bài giảng y học cổ truyền*, tập 2, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 112-115.
60. Lee MS, Yuet-Wa JC, Kong SK, et al (2005). Effects of polyphyllin D, a steroidal saponin in *Paris polyphylla*, in growth inhibition of human breast cancer cells and in xenograft, *Cancer Bio Ther*, 4(11),1248 – 1254.
61. Zhu F, Di Y, Li X et al (2011). Neoclerodane diterpenoids from *Scutellaria barbata*, *Planta Med*, 77(13), 1536 – 1541.
62. Viện dược liệu (2004). *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, tập 1. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, 720-721.
63. Viện dược liệu (2004). *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, tập 2. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, 850-851.
64. Park K, Park H, Kang S et al (2011). Korean *Scutellaria baicalensis* water extract inhibits cell cycle G1/S transition by suppressing cyclin D1 expression and matrix – metalloproteinase 2 activity in human lung cancer cell. *J Ethnopharmacol*, 133(2), 634 – 641.
65. Takahashi H, Chen M et al (2011). Baicalein, a component of *Scutellaria baicalensis* induce apoptosis by Mcl – 1 down regulation in human

- pancreatic cancer cell. *Biochim Biophys Acta*, 1813(8), 1465 – 1474.
66. Ye F, Che Y, McMillen E (2009). The effect of *Scutellaria baicalensis* on the signaling network in hepatocellular carcinoma cells. *Cancer*, 61(4), 530 – 537
  67. Đỗ Tất Lợi (2004). *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 307.
  68. C. Smith et al (2003). The effect of acupuncture on post-cancer fatigue and well-being for women recovering from breast cancer: a pilot randomised controlled trial. *Acupunct Med*, 31(1), 9-15.
  69. Đỗ Trí Đức (2005). *Đánh giá tác dụng chữa trị đau và mất ngủ bằng điện châm ở bệnh nhân ung thư vòm họng giai đoạn muộn*. Luận văn thạc sỹ y học, trường Đại học Y Hà Nội
  70. R.Wong et al. (2015). Acupuncture-Like Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation versus Pilocarpine in Treating Radiation-Induced Xerostomia: Result of RTOG 0537 Phase 3 Study. *Int J Oncol Biol Phys*, 15,163-167.
  71. Trần Thị Thu Huyền (2004). *Đánh giá tác dụng điều trị hỗ trợ của viên Angala trên bệnh nhân ung thư vú điều trị bằng tia xạ và hóa chất*. Luận văn thạc sỹ y học, trường Đại học Y Hà Nội.
  72. Nguyễn Thị Kim Dung (2001). *Bước đầu nghiên cứu tác dụng điều trị hỗ trợ của viên Linh chi – Tam thất trên bệnh nhân ung thư vòm mũi họng trong quá trình xạ trị*. Luận văn thạc sỹ y học, trường Đại học Y Hà Nội.
  73. Makino T. (2005). Pharmacological properties of Gyokuheifusan, a traditional Kampo medicinal formula. *Yakugaku Zasshi*, 125(4), 349-354.

74. Nair P. K., Rodriguez S., Ramachandran R. et al. (2004). Immune stimulating properties of a novel polysaccharide from the medicinal plant *Tinospora cordifolia*. *Int. Immunopharmacol.*, 4(13),1645-1659.
75. Radad K., Gille G., Liu L. et al. (2006). Use of ginseng in medicine with emphasis on neurodegenerative disorders. *J. Pharmacol. Sci.*, 100(3),175-186.
76. Tang J., Yu L. et al. (2013). Cytotoxic triterpenoid saponin from the stem of *Gordonia longicarpa*. *Planta Med*, 79(5), 353-360.
77. Jian Y., Zhongyu Z. et al. (2012). New serratene triterpenoids from *Palhinhaea cernua* and their cytotoxic activity. *Plant medica*, 78(12), 1387-1391.
78. Zushang S., Wei Y., Shiyu L. (2013). Flavonoids and 3- Arylcoumarin from *Pterocarpus soyauxii*. *Plant medica*, 79(06), 487- 491.
79. Kim K., Choi S., Lee K. (2012). Cytotoxic Triterpenoids from *Berberis koreana*. *Plant medica*,78(1), 86-89.
80. Senthilnathan P., Padmavathi R., Banu S. M. et al. (2006). Enhancement of antitumor effect of paclitaxel in combination with immunomodulatory *Withania somnifera* on benzo(a)pyrene induced experimental lung cancer. *Chem. Biol. Interact.*, 159(3), 180- 185.
81. 陈锐深, 曹洋.辨证化治肺癌132例分析[J].中医药学刊, 2005,23(4), 593-594.  
Trần Nhuệ Thâm, Tào Dương (2005). Đánh giá kết quả điều trị 132 bệnh nhân ung thư phổi theo biện chứng luận trị Y học cổ truyền kết hợp với hóa trị liệu, *Tạp san Trung y dược* 23 (4), 593-594.
82. Liu J., Wang W. P., Zhou Y. Y. (2005). Observation on therapeutic effect of Jianpi Huoxue herbs combined with chemotherapy in treating post-operational colonic cancer patients. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi.*, 25(3), 207- 209

83. .潘敏求,黎月恒, 刘静安, 等.肺复方与化疗对照治疗中晚期原发性支气管肺鳞癌80例报道[J].中国中医药学报, 1990,5 (3) :19.  
Phan Mẫn Cầu, Lê Nguyệt Hằng, Lưu Tịnh An (1990). Đánh giá tác dụng điều trị của bài thuốc Phế phụ phương kết hợp với hóa trị liệu trong điều trị bệnh nhân ung thư phế quản tế bào vảy giai đoạn III và IV, *Tạp chí Trung y dược Trung Quốc*, 5, 19.
84. 阮氏秋恒(2012).益气化痰法治疗老年晚期非小细胞肺癌的临床观察. 博士学位论文 - 广州中医药大学.  
Nguyễn Thị Thu Hằng (2012). *Đánh giá tác dụng của pháp ích khí hóa đàm trên bệnh nhân cao tuổi ung thư phổi không phải tế bào nhỏ giai đoạn cuối*, Luận án tiến sĩ y học, Trường Đại học Trung y dược Quảng Châu.
85. Nguyễn Gia Chấn, Bùi Thị Bằng, Lê Nguyệt Nga và cs. (1997). Nghiên cứu sàng lọc tìm cây thuốc và thành phần hóa học có tác dụng kích thích miễn dịch. *Tạp chí Dược liệu*, 2(2),14- 17
86. Nguyễn Thị Kim Dung (1999). *Nghiên cứu tác dụng của chế phẩm HTCK trên bệnh nhân ung thư vú được xạ trị đối với sự thay đổi một số tế bào miễn dịch và tế bào máu*. Luận văn Thạc sĩ Y học, trường Đại học Y Hà Nội.
87. Nguyễn Trọng Thông, Phan Thị Vân Anh, Nguyễn Thị Vinh Hà và cs. (2004). Nghiên cứu ảnh hưởng của cao trái nhàu (*Morinda Citrifolia L. Rubiaceae*) trên động vật thực nghiệm bị gây suy giảm miễn dịch bằng cyclophosphamid. *Tạp chí Nghiên cứu y học*, 27(1), 28- 33
88. Trần Ngọc Dung (2000). *Nghiên cứu động học một số chỉ số miễn dịch sinh học giúp tiên lượng, dự đoán tái phát ung thư vòm họng, thử điều trị viên M sau xạ trị*. Luận án tiến sĩ Y học, trường Đại học Y Hà Nội.

89. Nguyễn Thị Bích Thảo (2008). *Đánh giá tác dụng hỗ trợ của bài thuốc thập toàn đại bổ trên bệnh nhân ung thư vú đang điều trị phác đồ AC*. Luận văn thạc sỹ y học, trường Đại học Y Hà Nội
90. Lê Văn Thảo (1995). Nghiên cứu tác dụng điều trị phối hợp của Phylamine với chiếu xạ gamma cobalt trên bệnh nhân ung thư. *Y học Việt Nam*, 189(2), 26- 31.
91. Nguyễn Hoàng Anh, Nguyễn Tiến Thành, Đỗ Mai Lâm và cs. (2002). Nghiên cứu tình trạng suy giảm miễn dịch ở bệnh nhân ung thư vùng tâm vị và kết quả bước đầu của phác đồ điều trị Aslem bổ trợ sau phẫu thuật. *Ngoại khoa*, 3,34- 40.
92. Vũ Tam Lâm (2004). *Nghiên cứu tác dụng của thuốc Salamin đến một số chỉ tiêu huyết học và miễn dịch trên bệnh nhân ung thư vú sau phẫu thuật đang tia xạ*, Luận văn Thạc sỹ Y học, Học viện Quân y.
93. Trần Thị Thu Huyền (2004). *Đánh giá tác dụng điều trị hỗ trợ của viên Angala trên bệnh nhân ung thư vú điều trị bằng tia xạ và hóa chất*. Luận văn thạc sỹ y học, trường Đại học Y Hà Nội.
94. Nguyễn Thị Kim Dung (2001). *Bước đầu nghiên cứu tác dụng điều trị hỗ trợ của viên Linh chi – Tam thất trên bệnh nhân ung thư vòm mũi họng trong quá trình xạ trị*. Luận văn thạc sỹ y học, trường Đại học Y Hà Nội
95. Đái Duy Ban và cộng sự (2002). *Nghiên cứu phòng và hạn chế ung thư thực nghiệm gây ra do độc chất hoá học bằng các thảo dược giàu hoạt tính sinh học*. Báo cáo đề tài nghiên cứu khoa học, Viện Công nghệ Sinh học.
96. Teiten M, Dicato M, Diederich M (2014). Hybrid Curcumin Compounds: A New Strategy for Cancer Treatment. *Molecules*, 19(12), 20839-20863.

97. Nagaraju G, Zhu S, Ko J (2014). Antiangiogenic effects of novel synthetic curcumin analogue in pancreatic cancer. *Cancer Lett*, 14, 750-752.
98. Nguyễn Thị Bình Minh (2008). *Nghiên cứu tác dụng của curcumin tách chiết từ củ nghệ vàng Việt Nam (Curcumin Longa L) trên tế bào ung thư đại tràng dòng SW 480*. Luận văn thạc sĩ Y học, trường Đại học Y Hà Nội.
99. Nguyễn Thu Giang (2008). *Nghiên cứu tác dụng của curcumin tách chiết từ củ nghệ vàng Việt Nam (Curcumin Longa L) trên tế bào ung thư vú dòng MCF-7*. Luận văn thạc sĩ Y học, trường Đại học Y Hà Nội.
100. Nguyễn Thị Ngọc Trâm, Phan Thị Phi Phi, Phan Thị Thu Anh và cộng sự (2013). Tác dụng tăng cường chức năng miễn dịch chuyên nhiệm chống ung thư của Crilin T. *Tạp chí Dược học*, 445, 22-26.
101. Võ Văn Chi (2004). *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, tập 1. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 704-705.
102. Nguyễn Việt Thân (2013). *Cây thuốc Việt Nam và những bài thuốc thường dùng*, tập 3. Nhà xuất bản Thế giới, Hà Nội, 140-141.
103. Wang A, Feng S, He X et al (1988). A new sesquiterpen lactone from *Sarcandra Glabra*. *Yao Xue Xue Bao*, 23(1), 64-66
104. Luo Q, Dai K, Ma A (2009). Study on the chemical constituents of *Sarcandra Glabra* by HPLC-ESI-MS/MS. *Zhong Yao Cai*, 32(4), 526-529.
105. Hu X, Yang J, Xu X. (2009). Three novel sesquiterpen glycosides of *Sarcandra Glabra*. *Chem Pharm Bull*, 57(4), 418-420
106. Luan L, Zhang D, Li J et al (2006). Hepatoprotective sesquiterpen glycosides from *Sarcandra glabra*. *J Nat Prod*, 69(4), 616-620
107. Feng S, Xu L, Wu M et al (2010). A new coumarin from *Sarcandra Glabra*. *Fitoterapia*, 81(6), 472-474.

108. Huang MJ, Zeng GY, Tan JB et al (2008). Studies on flavonoid glycosides from *Sarcandra Glabra*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 33(14), 1700 – 1702.
109. Luo Y, Liu A, Zhang D et al (2005). Two new triterpenoide saponin from *sarcandra Glabra*. *J Asian Nat Prod Res*, 7(6), 829-834
110. Hu X, Xu X, Yang J (2008). Progree in research on *Sarcandra Glabra*. *Zhongguo Yao Xue Za Zhi*, 43(10), 721-723
111. Li W, Chiu L, Lam W (2007). Ethyl alcetate extract of Chinese medicinal herb *Sarcandra Glabra* induces growth inhibition on human leukemic HL-60 cell associated with cell cycle arrest and up regulation of pro-apoptotic Bax/Bcl-2 ratio. *Onco Rep*, 17(2), 425-431
112. 周斌 ; 刘可越 ; 常军(2009).中药肿节风的化学成分和药理研究进展. *中医现代应用药理学杂志*, 26(12).
- Chu Bân, Lưu Khả Việt, Thường Quân (2009). Nghiên cứu thành phần hóa học, tác dụng dược lý của thuốc trung y thũng tiết phong. *Tạp chí Dược học hiện đại Trung Quốc*, 26(12).
113. 梅全喜; 胡莹 (2011). 肿节风的药理作用及临床应用研究进展. *时珍国医国药第*, 22(1), 230-232.
- Mai Toàn Hỷ, Hồ Doanh (2011). Quá trình nghiên cứu tác dụng dược lý và ứng dụng lâm sàng của Thũng Tiết Phong. *Tạp chí Trung Y dược*, 22(1), 230-232.
114. 蒋伟哲, 孔晓龙(2001). 肿节风片对恶性肿瘤和免疫功能的影响. *广西医科大学学报*, 18(1), 39-40.
- Tường Vĩ Triết, Khổng Hiểu Long (2001). Tác dụng của thũng tiết phong với khối u ác tính và chức năng miễn dịch. *Tạp chí Đại học Khoa học y Quảng Tây*, 18(1), 39-40.



115. 赵益, 孙有智, 陈奇 (2007). 肿节风注射液体外抗肿瘤作用的实验研究. *中国民族民间医药*, 19(5), 8-10.
- Triệu Ích, Tôn Hữu Trí, Trần Kỳ (2007). Nghiên cứu tác dụng kháng u của dung dịch tiêm Thũng tiết phong trên thực nghiệm. *Tạp chí Y dược học cổ truyền Trung Quốc*, 19(5), 8-10.
116. Wen J, Li J, Lan F, Yan G. (2003). Antitumor effect of Zhongjiefeng Injection on mice liver cancer HepA22 and its toxicity. *Chinese Traditional Patent Medicine Journal*, 4, 39-43.
117. 赵益, 陈奇, 孙有智 (2014). 肿节风与氟尿嘧啶联合应用的抗肿瘤作用. *河南中医学院学报*, 23(135), 169-171.
- Triệu Ích, Trần Kỳ, Tôn Hữu Trí (2007). Nghiên cứu ảnh hưởng kháng u khi kết hợp Thũng tiết phong và Fluorouracil. *Tạp chí Học viện Trung y Hà Nam*, 23(135), 169-171.
118. Kang M, Tang AZ, Liang G et al (2008). Studies on the apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cell line administrated with *Sarcandra Glabra* extracts invivo and its mechanism. *Zhong Yao Cai*, 31(10), 1529-1533.
119. Kang M, Tang A, Liang G (2008). The inhibitory role of zhongjiefeng extracts on apoptosis and telomerase activity of nasopharyngeal carcinoma cell line exnograf in nude mice. *J Clin Otorhinolaryngol Head Neck Surg (China)*, 22, (24), 1132-1138.
120. Zhenzhen Z, Wei L, Ying Z et al (2014). SGP-2, an acidic polysaccharidee from *Sarcandra Glabra* inhibits proliferation and migration of human osteosarcoma cell. *Food Funct*, 5, 167-175
121. Leng Y, Li G, Chen S (2010). Research related to the effectiveness of anti tumor effect of Herba *Sarcandra*. *Chin J Mod Drug App*, 14, (6), 16-20

122. He RR, Yao XS, Li HY et al. (2009). The anti-stress effects of *Sarcandra glabra* extract on restraint- evoked immunocompromise. *Biol Pharm Bull*, 32(2), 247-252.
123. Sun W., Li J., Lan F. (2014). Antitumor activities of Zhongjiefeng injection on FC in mice with precarcinoma of stomach and its toxicity. *Chinese Traditional Patent Medicine Journal* , (3), 169-171.
124. 徐国良,肖兵华,陈奇(2005). 肿节风及其分离部位对免疫性血小板减少性紫癜小鼠血小板的影响. *中国实验方剂学杂志*, 11(4),120-124.  
Tù Quốc Lượng, Tiêu Tân Hoa, Trần Kỳ (2005). Tác dụng của thũng tiết phong và thành phần của thuốc tới tiểu cầu chuột xuất huyết giảm tiểu cầu. *Tạp chí thực nghiệm Trung Quốc*, 11(4),120-124.
125. Chen S, Zhang Y et al (2009). Synergistic Effects and Decreasing Toxicity of *Sarcandra Glabra* Essential Oils on Tumor bearing Mice Treated by Cytosan. *Journal of Zhejiang collegue of traditional Chinese medicine*, 33(1), 115-118.
126. Huang D, Huang H, Lu Y (2013). *Clinical Observation of Sarcandra glabra combined chemoradiotherapy for treating patients with local advanced nasopharyngeal carcinoma*. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie Za Zhi*, 33(4), 456-458.
127. Mai Thị Hải Yến (2010). *Nghiên cứu thành phần hóa học và một số tác dụng sinh học của cây Sói rừng*. Luận văn thạc sỹ dược học, Học viện quân y.
128. Đỗ Thị Oanh (2010). *Nghiên cứu thành phần hóa học và một số tác dụng sinh học của cây Sói rừng*. Luận văn thạc sỹ dược học, Đại học Dược Hà Nội
129. WHO (2000). *General Guidelines for Methodologies on Reseach and Evaluation of Traditional Medicine*.

130. Viện Dược liệu (2006). Phương pháp nghiên cứu tác dụng dược lý của thuốc từ thảo dược, NXB Khoa học và Kỹ thuật, 14-16.
131. Lapis K., Kopper L., Hanh T.V (1982). *Experimental model for liver metastasis formation using Lewis Lung Tumor*. J Cancer Res Clin Oncol, 103, 31-38.
132. Teicher B.A. (2010). *Tumor Models in Cancer Research, Cancer Drug Discovery and Deverlopment*. 2<sup>nd</sup>, Human Press, New Jersey, 43-50.
133. Itokawa H., Siripong P, Kongkathip B et al (1998). Study on antitumor potential of *Acanthus ebracteatus* Vahl roots. *Thai Cancer J*, 55-66.
134. Gerant R.I., Greenberg N.H. (1972). Protocol for screening chemical agents and natural product against animal and other biological system. *Cancer Chemother Rep*, 3, 51-61
135. Bộ Y tế (2012). Xét nghiệm đếm tế bào TCD4 trong điều trị HIV, 26-30.
136. Phillipson J. (2001). Phytochemistry and medical plants. *Phytochemistry*, 56(3), 237-243.
137. Phan Anh Tuấn (2006). *Đánh giá tác dụng phục hồi thương tổn hệ miễn dịch sau chiếu xạ của “Đông trùng hạ thảo nam-sâu chít (Brihaspa Atrostigmella Moore 1868)” giai đoạn thực nghiệm*. Luận án tiến sĩ y học, trường Đại học Y Hà Nội.
138. Tạ Thu Thủy, Nguyễn Trần Thị Giáng Hương, Phạm Thị Vân Anh và cs (2013). Nghiên cứu độc tính cấp và tác dụng điều chỉnh rối loạn lipid máu của bài thuốc Đại an hoàn trên thực nghiệm. *Tạp chí nghiên cứu Y Dược học cổ truyền Việt Nam*, 38, 1-8.
139. Li W, Chiu L, Lam W (2007). Ethyl alacetate extract of Chinese

medicinal herb *Sarcandra Glabra* induces growth inhibition on human leukemic HL-60 cell associated with cell cycle arrest and up regulation of pro-apoptotic Bax/Bcl-2 ratio. *Onco Rep*, 17(2), 425-431.

140. 黄宇玫, 赵益, 杨艳平 (2007). 肿节风注射液抗肿瘤及与阿霉素联合用药的实验研究. *中药新药与临床药理*, 18,(3),200-204.  
Hoàng Vũ Mai, Triệu Ích, Dương Diễm Bình (2007). Nghiên cứu tác dụng kháng u dung dịch tiêm thũng tiết phong và kết hợp với adriamycin trên thực nghiệm. *Tạp chí thuốc cổ truyền hiện đại và dược lý lâm sàng*, 18,(3),200-204.
141. Tổ chức Y tế Thế giới (2003). Hướng dẫn của Tổ chức Y tế Thế giới về thực hành tốt nuôi trồng và thu hái dược liệu, 17-20.
142. Võ Thị Trà An, Phạm Châu Giang, Nguyễn Thị Thúy Huyền và cộng sự (2007). Tá dược. *Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Nông Lâm nghiệp*, 1, 219-229 .
143. Đỗ Trung Đàm (2001). Phương pháp ngoại suy liều có hiệu quả tương đương giữa người và động vật thí nghiệm. *Tạp chí Dược học*, 3, 8-9.
144. Nguyễn Thế Khánh, Phạm Tử Dương (2005). Xét nghiệm sử dụng trong lâm sàng. Nhà xuất bản Y học.
145. Vũ Đình Vinh (2001). *Hướng dẫn sử dụng các xét nghiệm sinh hóa*. Nhà xuất bản Y học, 115-287.
146. Đỗ Thị Thảo, Đỗ Thị Phương, Nguyễn Thị Cúc và cộng sự (2009). Gây u thực nghiệm trên chuột bằng DMBA (7,2 Dimethyl benx[A] anthracene. *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN, Khoa học Tự nhiên và Công nghệ*, 25, 107-111.
147. Povlsen C., Rygaard J. (1971).Heterotransplantation of human adenocarcinomas of the colon and rectrum to the mouse mutant Nude. A study of nine consecutive transplantation. *Acta Pathol Microbiol*

*Scand A*, 79(2),159-169.

148. Landon S. (2004). *Cancer cell culture: Method and Protocol*. Humana Press, Totowa, 17-29.
149. Workman P. (1994). *New approach in cancer pharmacology: drug design and development*. Springer Verlag, London, 85-103.
150. Kanno S., Tomizawa A., Hiura T. et al (2005). Inhibitory Effects of Naringenin on Tumor Growth in Human Cancer Cell Lines and Sarcoma S-180-Implanted Mice. *Biol. Pharm. Bull*, 28(3), 527—530.
151. Akindele A., Wani Z., Mahajan G. et al (2014). Anticancer activity of *Aristolochia ringens* Vahl. (Aristolochiaceae). *J Tradit Complement Med*, 5(1), 35-41
152. Đỗ Trung Đàm (1996). *Phương pháp xác định độc tính cấp của thuốc*. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 28-29.
153. Vương Kính, Dương Phong (1999). Thực nghiệm nghiên cứu tác dụng kháng ung thư của thũng tiết phong. *Tạp chí Trung y Chiết giang*, 29(1), 450-452.
154. Wang Y., Niu H., Zhang Z. et al (2015). Medicinal values and their chemical bases of Paris. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 40(5), 833-839
155. Cuong N., Vien T., Hanh T. et al (2015). Cytotoxic triterpene saponins from *Cercodemas anceps*. *Bioorg Med Chem Lett*. 25(16), 3151-3156.
156. Bộ môn Dược liệu (2011). *Dược liệu chứa flavonoid. Bài giảng dược liệu*. Trường Đại học Dược Hà Nội, 126-143.
157. Busch C., Burkard M., Leischner C. et al (2015). Epigenetic activities of flavonoids in the prevention and treatment of cancer. *Clin Epigenetics*. 7(1), 64.
158. Miceli N., Buongiorno L., Celi M. et al (2015). Role of the flavonoid-rich fraction in the antioxidant and cytotoxic activities of *Bauhinia forficata* Link. (Fabaceae) leaves extract. *Nat Prod Res*. 1, 1-11.

159. Yang N, Jia X., Zhang Z. et al (2015). Advance in studies on anti-cancer activity and mechanism of flavonoids. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 40(3), 373–381.
160. Ren W., Qiao Z., Wang H. et al (2003). Flavonoids: promising anticancer agents. *Med Res Rev*, 23 (4), 519-534 .
161. Sak K, Everaus H.(2015). Role of flavonoids in future anticancer therapy by eliminating the cancer stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther*, 10(3), 271-282.
162. Borek C. (2004). Dietary antioxydant and human cancer. *Interge Cancer ther*, 3(4), 333-341
163. Yang X, Wu X (2015). Main anti-tumor angiogenesis agents isolated from Chinese herbal medicines. *Mini Rev Med Chem*, 1.
164. Ren D., Jiao Y., Yang X. et al (2015). Antioxidant and antitumor effects of polysaccharidees from the fungus *Pleurotus abalonus*. *Chem Biol Interact*, 25, 166-174.
165. Luo Z., ZengH., Ye Y. et al (2015). Safflower polysaccharidee inhibits the proliferation and metastasis of MCF-7 breast cancer cell. *Mol Med Rep*, 11(6), 4611-4616.
166. Jin L., Guan X., Liu W. et al (2012). Characterization and antioxidant activity of a polysaccharidee extracted from *Sarcandra glabra*. *Carbohydr Polym*, 90(1), 524-532.
167. Dahham S., Tabana M., Iqbal A. et al (2015). The Anticancer, Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Sesquiterpene  $\beta$ -Caryophyllene from the Essential Oil of *Aquilaria crassna*. *Molecules*, 20(7), 11808-11829.
168. Martino R., Beer MF., Elso O. et al (2015). Sesquiterpene lactones from

Ambrosia spp. are active against a murine lymphoma cell line by inducing apoptosis and cell cycle arrest. *Toxicol In Vitro*, ;29(7), 1529-1536.

169. Vũ Triệu An (1990). Hoàn chỉnh panel hòa hợp mô ở 100 người Việt Nam. Đề tài cấp Bộ, 20-27.
170. Tapsell C., Hemphill I., Cobiac L. et al (2006). Health benefits of herbs and spices: the past, the present, the future. *J Hematol Oncol*, 185(4), 4-24.
171. Chan C., Chan K., Sze M. (2009). The effects of beta-glucan on human immune and cancer cells. *J Hematol Oncol*, 2, 25 – 27
172. Lê Thế Trung, Trần Văn Hanh, Nguyễn Minh Thông và cs (1999). Nghiên cứu các vị thuốc cổ truyền hỗ trợ điều trị ung thư thực nghiệm và lâm sàng. Kỷ yếu công trình khoa học ngành y tế 1991 – 1995, Hà Nội, 174 – 178.
173. Vokes E., Golom M.(1999). *Oncologic therapies*. Springer Verlag, Berlin, 2, 95 – 97.
174. Châu Văn Minh (2007). Nghiên cứu hoàn thiện quy trình tách chiết malloapelta B từ cây bùm búp (*Mallotus Apelta*) và tác dụng của nó trong điều trị khối u thực nghiệm. Đề tài cấp Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 17-25.
175. Đào Văn Chinh, Nguyễn Quốc Tuấn, Phạm Văn Thức (2002). *Miễn dịch học lâm sàng*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 62-66.
176. Nguyễn Gia Chấn, Phan Thị Phi Phi (1999). *Nghiên cứu thuốc kích thích miễn dịch từ polysaccharide*. Báo cáo đề tài nhánh KH-CN 11-05-02-01.
177. Phạm Thị Vân Anh, Nguyễn Trọng Thông, Đàm Đình Tranh (2011). Nghiên cứu ảnh hưởng của cao quả nhàu (*Morinda citrifolia*) lên số lượng lympho bào TCD<sub>3</sub>, lympho bào BCD<sub>19</sub> và khả năng tiết cytokine IL-2, TNF $\alpha$  trên chuột nhắt trắng bị suy giảm miễn dịch bằng cyclophosphamid. *Tạp chí Nghiên cứu Y học*, 1, 58-62.
178. Gutierrez T., Berber A. (2001). Safety and efficacy of two courses of-

OM-85-Bromchovaxon in the prevention of respiratory tract infection in children during 12 months. *Chest J*, 119(6), 1742-1748.

179. 章武强 (2011). 肿节风总黄酮对阿糖胞苷诱发小鼠S<sub>180</sub>血小板减少模型的影响. *中国医药导报*, 2.
- Chuong Võ Cường (2011). Hiệu lực của Flavonoid thũng tiết phong trên mô hình chuột mang u sarcoma 180 bị gây xuất huyết giảm tiểu cầu. *Tạp chí Y học Trung Quốc*, 2
180. William E. (1999). *Fundamental Immunology*, 4<sup>th</sup> edition, Lippincott – Raven Philadelphia, New York, 639-659.
181. Bộ Y tế (2010). Dược điển Việt Nam IV. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 1221-1222.
182. Nguyễn Ngọc Lanh (2012). *Sinh lý bệnh học*, 2, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 209-229.
183. Toftegaard CL., Kinigge U., Kjaer A. (2003). Effect of interleukin 1 $\beta$  on the HPA axis in H(1)-receptor knockout mice. *Neuroimmunomodulation*, 10(6), 344-350.
184. Wilson EB., Livingstone AM. (2008). Cutting edge: CD4<sup>+</sup> T cell-derived IL-2 is essential for help-dependent primary CD8<sup>+</sup> T cell responses. *J Immunol*, 181(11), 7445-7448.
185. Zhang L., Jiang G., Yao F. et al (2015). Osthole promotes anti-tumor immune responses in tumor-bearing mice with hepatocellular carcinoma. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 37(3), 301-307
186. Stefanova TH., Nikolova NJ., Toshkova RA. Et al (2007). Antitumor and immunomodulatory effect of coumarin and 7-hydroxycoumarin against Sarcoma 180 in mice. *J Exp Ther Oncol*, 6(2), 107-115.
187. Leung KN., Leung PY., Kong LP. (2005). Immunomodulatory effects of esculetin (6,7-dihydroxycoumarin) on murine lymphocytes and peritoneal. *Cell Mol Immunol*, 2(3), 181-188.



188. Kaur M., Kohli S., Sandhu S. et al. (2015). Coumarin: A Promising Scaffold for Anticancer Agents. *Anticancer Agents Med Chem*, 1.
189. Stauber D., Debler E. et al. (2006). Crystal structure of the IL-2 signaling complex: paradigm for a heterotrimeric cytokine receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(8), 2788-2793.
190. Massari F., Santoni M., Ciccarese C. et al (2015). The immunocheckpoints in modern oncology: the next 15 years. *Expert Opin Biol Ther*, 15(7), 917-921
191. Pels E. (2015). Comparison of saliva interleukin-2 concentration to the condition of gums in children with acute lymphoblastic leukaemia during anti-tumour treatment. *Cancer Chemother Pharmacol*, 76(1), 205-210
192. Bunimovich-Mendrazitsky S., Halachmi S., Kronik N. (2015). Improving Bacillus Calmette-Guérin (BCG) immunotherapy for bladder cancer by adding interleukin 2 (IL-2): a mathematical model. *Math Med Biol*, 16
193. Hassan S., Petrella TM., Zhang T. et al (2015). Pathologic complete response to intralesional interleukin-2 therapy associated with improved survival in melanoma patients with in-transit disease. *Ann Surg Oncol*, 22(6), 1950-1958
194. Lu L., Li ZJ., Li LF. et al (2015). Vascular-targeted TNF $\alpha$  improves tumor blood vessel function and enhances antitumor immunity and chemotherapy in colorectal cancer. *J Control Release*, 210, 134-146.
195. 冷永涛, 吕圭源, 陈素红(2010). 肿节风抗肿瘤相关作用及机制研究. *中国现代药物应用*, 7, 275-276.  
Lãnh Vĩnh Đào, Lã Khuê Nguyên, Trần Tố Hồng (2010). Cơ chế và hiệu lực chống khối u của thũng tiết phong. Ứng dụng thuốc hiện đại Trung Quốc, 7, 275-276.
196. Nguyễn Gia Chấn (2005). Tổng quan về nghiên cứu triển khai gần đây các chất chống u từ các thuốc thảo mộc Trung Quốc. *Tạp chí Dược liệu*, 10(2), 35 – 40.

197. Devassy JG, Nwachukwu ID, Jones PJ. (2015). Curcumin and cancer: barriers to obtaining a health claim. *Nutr Rev*,73(3), 155-165.
198. Shiri S., Alizadeh AM., Baradaran B. (2015). Dendrosomal curcumin suppresses metastatic breast cancer in mice by changing m1/m2 macrophage balance in the tumor microenvironment. *Asian Pac J Cancer Prev*, 16(9), 3917-3922.
199. Singh M., Ramos I., Asafu-Adjei D. et al (2013). Curcumin improves the therapeutic efficacy of Listeria(at)-Mage-b vaccine in correlation with improved T-cell responses in blood of a triple-negative breast cancer model 4T1. *Cancer Med*, 2(4), 571-582
200. Zhou Y, Shen J, Xia L, Wang Y. (2015). Curcuma zedoaria (Berg.) Rosc. essential oil and paclitaxel synergistically enhance the apoptosis of SKOV3 cells. *Mol Med Rep*. 12(1), 1253-1257
201. Chen W., Lu Y., Gao M., et al (2011). Anti-angiogenesis effect of essential oil from Curcuma zedoaria in vitro and in vivo. *J Ethnopharmacol*, 133(1), 220-226.
202. Xiao YJ, Chen YZ, Chen BH et al (2008). Study on cytotoxic activities on human leukemia cell line HL-60 by flavonoids extracts of *Scurrula parasitica* from four different host trees. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 33(4), 427-432.
203. Auyeung KK, Mok NL, Wong CM et al (2010). Astragalus saponins modulate mTOR and ERK signaling to promote apoptosis through the extrinsic pathway in HT-29 colon cancer cells. *Int J Mol Med*, 26(3),341-349

204. Frank U., Engel I., Wagner A. (2003). Influence of Mistletoe (*Viscum album*) extract on phagocytosis/burst activity of human phagocytes. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, Aug, 22(8), 501-503.
205. Van Huyen J., Bayry J (2002). Induction of apoptosis of endothelia cell by *Viscum album*: A role for anti – tumoral properties of Mistletoe Lectins. *Mol Med*, Oct, 8(10), 600-606.

## LỜI CẢM ƠN

**Với tất cả sự kính trọng và lòng biết ơn sâu sắc, tôi xin bày tỏ tới:**

*PGS.TS. Đỗ Hòa Bình, nguyên Phó chủ nhiệm Bộ môn Miễn dịch – Sinh lý bệnh, trường Đại học Y Hà Nội, người thầy đã tận tình hướng dẫn, động viên và khích lệ tôi trong suốt quá trình nghiên cứu hoàn thành luận án này. Sự hiểu biết sâu sắc về khoa học cũng như kinh nghiệm của cô chính là tiền đề giúp tôi có được những kinh nghiệm quý báu.*

*PGS.TS. Phan Anh Tuấn, Giám đốc Trung tâm huấn luyện và đào tạo, Viện YHCT Quân đội, người thầy đã kiên nhẫn hướng dẫn, giúp đỡ và tạo mọi điều kiện cho tôi trong suốt quá trình nghiên cứu đề tài.*

*Tôi xin trân trọng cảm ơn PGS.TS. Đỗ Thị Phương, nguyên Trưởng khoa YHCT, trường Đại học Y Hà Nội đã quan tâm, giúp đỡ, tạo mọi điều kiện thuận lợi để tôi có thể hoàn thành luận án.*

*Tôi cũng xin chân thành cảm ơn TS. Phạm Thị Vân Anh, Chủ nhiệm Bộ môn Dược lý, trường Đại học Y Hà Nội; PGS.TS. Hoàng Thị Mỹ Nhung, Phó chủ nhiệm Bộ môn Sinh học tế bào, Khoa Sinh, Đại học KHTN- ĐH Quốc gia Hà Nội đã dành cho tôi sự giúp đỡ nhiệt tình, nhiều ý kiến quý báu để tôi có thể thực hiện được các nghiên cứu thực nghiệm tại bộ môn.*

*Tôi xin trân trọng cảm ơn tập thể cán bộ giáo viên, kỹ thuật viên Bộ môn Dược lý, trường Đại học Y Hà Nội, Bộ môn Sinh học tế bào, Khoa Sinh, Đại học KHTN- ĐH Quốc gia Hà Nội, Bệnh viện YHCT tỉnh Cao Bằng đã giúp đỡ tôi rất nhiều về mặt nguyên liệu, kỹ thuật cũng như phương pháp thực nghiệm để tôi có thể hoàn thành được các yêu cầu của luận án,*

*Tôi xin trân trọng cảm ơn Ban giám hiệu, phòng Đào tạo Sau đại học trường Đại học Y Hà Nội đã tạo điều kiện cho tôi hoàn thành luận án này.*

*Tôi vô cùng biết ơn bạn bè và các đồng nghiệp ở Khoa YHCT, trường Đại học Y Hà Nội đã dành những tình cảm tốt đẹp, tạo điều kiện thuận lợi và giúp đỡ tôi trong quá trình học tập và nghiên cứu.*

*Cuối cùng tôi gửi lời cảm ơn sâu sắc tới bố mẹ, chồng con và người thân đã luôn động viên, giúp đỡ, tạo mọi điều kiện tốt nhất để tôi học tập và nghiên cứu.*

Trần Thị Hải Vân

## **LỜI CAM ĐOAN**

Tôi là Trần Thị Hải Vân, nghiên cứu sinh khóa 30 trường Đại học Y Hà Nội, chuyên ngành Y học cổ truyền, xin cam đoan:

1. Đây là luận án do bản thân tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn của:  
- PGS.TS. Đỗ Hòa Bình  
- PGS.TS. Phan Anh Tuấn
2. Công trình này không trùng lặp với bất kỳ nghiên cứu nào khác đã được công bố tại Việt Nam.
3. Các số liệu và thông tin trong nghiên cứu là hoàn toàn chính xác, trung thực và khách quan, đã được xác nhận và chấp thuận của cơ sở nơi nghiên cứu

Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật về những cam kết này.

*Hà Nội ngày 24 tháng 5 năm 2016*

**Người viết**

**Trần Thị Hải Vân**

## NHỮNG CHỮ VIẾT TẮT

ADCC	:	Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity (gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể)
AIDS	:	Acquired Immuno Deficiency Syndrome (Hội chứng suy giảm miễn dịch mắc phải)
ALT	:	Alanin Transaminase
AST	:	Aspartate Transaminase
ATCC	:	American Type Culture Collection (ngân hàng nuôi cấy tế bào Mỹ)
CD	:	Cluster of differentiation (dấu ấn bề mặt)
CMV	:	Cytomegalo Virus
CSF	:	Colony Stimulating Factor (Yếu tố kích thích tạo cụm)
ĐĐVN	:	Dược điển Việt Nam
DNA	:	Acid Deoxynucleic
EBV	:	Epstein – Barr Virus
G – CSF	:	Grannulocyte Colony Stimulating Factor (yếu tố kích thích dòng bạch cầu hạt)
GM – CSF	:	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (yếu tố kích thích tạo cụm dòng bạch cầu hạt và đại thực bào)
HP	:	Helicobacter Pylori
HPV	:	Human Papilloma Virus (Virus gây u nhú ở người)
LAK	:	Lymphokine Activated Killer (Tế bào diệt được hoạt hóa bởi lympho)
LD50	:	Lethal Dose (liều gây chết một nửa)
MDA	:	Malonyl dialdehyd
MHC	:	Major Histocompatibility Complex

		(Phức hợp hòa hợp mô chính)
PBS	:	Phosphat Buffer Salin (muối đệm phát)
PE	:	Phycoerythrin
RNA	:	Acid Ribonucleic
SAV-HRP	:	Streptavidin Horseradish Peroxidase ((kháng thể có gắn enzym)
SOD	:	Superoxide Dismutase
Tc	:	T cytotoxic (Tế bào T gây độc)
TCR	:	T Cell Receptor (Thụ thể tế bào T)
TGF- $\alpha$	:	Transforming Growth Factor (Yếu tố tăng trưởng chuyển hóa)
Th	:	T helper (Tế bào T hỗ trợ)
TMB	:	Tetramethylbenzidin (cơ chất tạo màu)
TNF	:	Tumor Necrosis Factor (Yếu tố hoại tử u)
WBF 1X	:	Wash Buffer (dung dịch rửa nồng độ 1%)
WHO	:	World Health Organization (Tổ chức Y tế Thế giới)



## MỤC LỤC

ĐẶT VẤN ĐỀ.....	1
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN.....	3
1.1. UNG THƯ VÀ ĐÁP ỨNG MIỄN DỊCH TRONG UNG THƯ.....	3
1.1.1. Khái niệm về ung thư .....	3
1.1.2. Nguyên nhân ung thư .....	3
1.1.3. Cơ chế bệnh sinh ung thư.....	5
1.1.4. Điều trị ung thư.....	7
1.1.5. Đáp ứng miễn dịch trong ung thư.....	9
1.1.6. Mô hình thực nghiệm điều trị ung thư.....	13
1.2. QUAN NIỆM VỀ UNG THƯ TRONG Y HỌC CỔ TRUYỀN .....	17
1.2.1. Khái niệm .....	17
1.2.2. Nguyên nhân.....	17
1.2.3. Cơ chế bệnh sinh của nam chứng.....	19
1.2.4. Điều trị nam chứng .....	21
1.3. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU ĐIỀU TRỊ UNG THƯ CỦA CÁC THUỐC YHCT .....	27
1.3.1. Trên thế giới .....	27
1.3.2. Tại Việt Nam .....	29
1.4. TỔNG QUAN VỀ CÂY SÓI RỪNG .....	30
1.4.1. Vị trí phân loại.....	31
1.4.2. Đặc điểm thực vật.....	31
1.4.3. Tính vị, tác dụng.....	32
1.4.4. Các nghiên cứu về cây sói rừng .....	32
CHƯƠNG 2: CHẤT LIỆU, ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	36
2.1. CHẤT LIỆU NGHIÊN CỨU.....	36
2.1.1. Thuốc nghiên cứu .....	36

2.1.2. Hóa chất nghiên cứu .....	38
2.1.3. Phương tiện, dụng cụ .....	38
2.2. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU .....	39
2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....	40
2.3.1. Xác định độc tính cấp và bán trường diễn của cốm cây sói rừng.....	40
2.3.2. Đánh giá tác dụng kháng u rắn sarcoma 180 của cốm cây sói rừng trên chuột nhắt .....	42
2.3.3. Khảo sát ảnh hưởng của cốm cây sói rừng trên tỷ lệ tế bào TCD3, TCD4, TCD8 nồng độ IL-2 và TNF- $\alpha$ của chuột mang u rắn sarcoma 180....	45
2.4. ĐỊA ĐIỂM VÀ THỜI GIAN NGHIÊN CỨU.....	50
2.5. XỬ LÝ SỐ LIỆU .....	50
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU .....	53
3.1. XÁC ĐỊNH ĐỘC TÍNH CẤP VÀ BÁN TRƯỜNG DIỄN CỦA CỐM CÂY SÓI RỪNG .....	53
3.1.1. Độc tính cấp.....	53
3.1.2. Độc tính bán trường diễn.....	54
3.2. ĐÁNH GIÁ TÁC DỤNG KHÁNG U RẮN SARCOMA 180 CỦA CỐM CÂY SÓI RỪNG .....	64
3.2.1. Kết quả tạo khối u thực nghiệm .....	64
3.2.2. Ảnh hưởng của cốm cây sói rừng đến trọng lượng cơ thể của chuột mang u .....	64
3.2.3. Ảnh hưởng của cốm cây sói rừng đến sự phát triển khối u.....	65
3.2.4. Hiệu lực kháng u của thuốc nghiên cứu .....	67
3.2.5. Ảnh hưởng của cốm cây sói rừng đến hình ảnh vi thể khối u.....	69
3.2.6. Ảnh hưởng của cốm cây sói rừng đến vi thể gan .....	72
3.2.7. Tác dụng của cốm cây sói rừng đến thời gian sống thêm của chuột mang u .....	75

3.3. KHẢO SÁT ẢNH HƯỞNG CỦA CÓM CÂY SÓI RỪNG TRÊN TỶ LỆ TẾ BÀO CD3, CD4, CD8, IL-2 VÀ TNF- $\alpha$ CỦA CHUỘT MANG U RẮN SARCOMA 180.....	78
3.3.1. Đánh giá tình trạng chung của hệ miễn dịch.....	78
3.3.2. Đánh giá tỷ lệ các tế bào lympho T và nồng độ IL-2, TNF- $\alpha$ .....	88
CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN.....	92
4.1. VỀ ĐỘC TÍNH CỦA CÓM CÂY SÓI RỪNG.....	92
4.1.1. Về độc tính cấp.....	92
4.1.2. Về độc tính bán trường diễn.....	95
4.2. VỀ TÁC DỤNG KHÁNG U RẮN SARCOM 180 CỦA CÓM CÂY SÓI RỪNG TRÊN CHUỘT NHẮT.....	98
4.2.1. Về mô hình nghiên cứu.....	98
4.2.2. Về tác dụng kháng u rắn sarcoma 180.....	101
4.3. VỀ KHẢO SÁT ẢNH HƯỞNG CỦA CÓM CÂY SÓI RỪNG TRÊN TỶ LỆ TẾ BÀO CD3, CD4, CD8, IL-2 VÀ TNF- $\alpha$ CỦA CHUỘT MANG U RẮN SARCOMA 180.....	109
4.3.1. Về tình trạng chung của hệ miễn dịch.....	109
4.3.2. Về ảnh hưởng tới tỷ lệ tế bào T và nồng độ IL-2, TNF- $\alpha$ .....	117
4.3.3. Tác dụng kháng u và tăng cường miễn dịch của cây sói rừng theo quan điểm của y học cổ truyền.....	123
KẾT LUẬN.....	126
KIẾN NGHỊ VÀ ĐỀ XUẤT.....	128
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN	
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

## DANH MỤC BẢNG

Bảng 3.1.	Tỷ lệ chuột chết trong vòng 72 giờ đầu sau khi uống cốm cây sói rừng.....	53
Bảng 3.2.	Sự thay đổi số lượng các tế bào máu ngoại vi ở thỏ .....	55
Bảng 3.3.	Ảnh hưởng của cốm cây sói rừng đến một số chỉ số huyết học..	55
Bảng 3.4.	Ảnh hưởng của cốm cây sói rừng đến công thức bạch cầu trong máu thỏ.....	56
Bảng 3.5.	Ảnh hưởng của cốm cây sói rừng đến hàm lượng albumin, cholesterol và bilirubin trong máu thỏ .....	57
Bảng 3.6.	Ảnh hưởng của cốm cây sói rừng đến hoạt độ AST, ALT trong máu thỏ.....	58
Bảng 3.7.	Ảnh hưởng của cốm cây sói rừng đến nồng độ creatinin trong máu thỏ.....	59
Bảng 3.8.	Tỷ lệ chuột có giảm thể tích khối u sau 18 ngày điều trị .....	66
Bảng 3.9.	So sánh sự thay đổi thể tích trung bình khối u giữa các lô chuột vào ngày 23 sau gây u .....	67
Bảng 3.10.	Hiệu lực kháng u của các lô điều trị.....	67
Bảng 3.11.	Số chuột sống sót ở các lô thí nghiệm.....	75
Bảng 3.12:	Thời gian sống trung bình và % thời gian sống kéo dài thêm của chuột.....	77
Bảng 3.13.	Ảnh hưởng của cốm cây sói rừng lên trọng lượng tuyến ức tương đối ..	78
Bảng 3.14.	Ảnh hưởng của cốm cây sói rừng lên số lượng hồng cầu .....	85
Bảng 3.15.	Ảnh hưởng của cốm cây sói rừng lên số lượng tiểu cầu .....	85
Bảng 3.16.	Ảnh hưởng của cốm cây sói rừng lên số lượng bạch cầu .....	86
Bảng 3.17.	Ảnh hưởng của cốm cây sói rừng lên số lượng các loại bạch cầu..	87
Bảng 3.18.	Ảnh hưởng của cốm cây sói rừng lên tỷ lệ lympho bào TCD3...	88
Bảng 3.19.	Ảnh hưởng của cốm cây sói rừng lên tỷ lệ lympho bào TCD4...	88

Bảng 3.20. Ảnh hưởng của cốm cây sói rừng lên tỷ lệ lympho bào TCD8...	89
Bảng 3.21. Ảnh hưởng của cốm cây sói rừng lên nồng độ IL-2 .....	90
Bảng 3.22. Ảnh hưởng của cốm cây sói rừng lên nồng độ TNF- $\alpha$ .....	91
Bảng 4.1. Tỷ lệ thời gian sống kéo dài thêm của chuột mang u sarcoma 180 so với một số kết quả nghiên cứu khác .....	109

## DANH MỤC BIỂU ĐỒ

Biểu đồ 3.1.	Trọng lượng cơ thể thỏ qua các thời điểm nghiên cứu.....	54
Biểu đồ 3.2.	Sự thay đổi trọng lượng cơ thể chuột qua các ngày cân.....	64
Biểu đồ 3.3.	Sự thay đổi thể tích trung bình khối u qua các ngày đo .....	65
Biểu đồ 3.4.	Tỷ lệ sống sót của chuột ở các lô thí nghiệm trong 160 ngày theo dõi.....	76
Biểu đồ 3.5.	Ảnh hưởng của cỏ cây sỏi rừng lên trọng lượng lách tương đối...	81
Biểu đồ 3.6.	Ảnh hưởng của cỏ cây sỏi rừng lên trọng lượng tim tương đối..	84
Biểu đồ 3.7.	Sự khác biệt trong tỉ lệ các tế bào TCD3, TCD4, TCD8 tại các lô chuột.....	90

## DANH MỤC HÌNH

Hình 2.1. Sơ đồ vị trí các hạch bạch huyết trên cơ thể chuột .....	45
Hình 2.2. Cấu trúc cơ bản của hệ thống flow cytometry .....	47
Hình 2.3. Dải nồng độ sử dụng để xây dựng đường chuẩn .....	48
Hình 2.4. Dải nồng độ sử dụng để xây dựng đường chuẩn IL-2 .....	49
Hình 4.1. Mô hình cấu trúc phân tử interleukin-2 .....	120

## DANH MỤC ẢNH

Ảnh 1.1. Cây Sói rừng .....	31
Ảnh 2.1. Cỏm cây sói rừng .....	38
Ảnh 2.2. Tế bào ung thư mô liên kết Sarcoma-180 .....	40
Ảnh 2.3. Thước kẹp caliper.....	44
Ảnh 3.1. Hình ảnh vi thể gan thỏ lô chứng .....	60
Ảnh 3.2. Hình ảnh vi thể gan thỏ lô sói rừng 0,6g/kg .....	61
Ảnh 3.3. Hình ảnh vi thể gan thỏ lô sói rừng 3g/kg .....	61
Ảnh 3.4. Hình ảnh vi thể thận thỏ lô chứng .....	62
Ảnh 3.5. Hình ảnh vi thể thận thỏ lô sói rừng 0,6g/kg .....	63
Ảnh 3.6. Hình ảnh vi thể thận thỏ lô sói rừng 3g/kg .....	63
Ảnh 3.7. Khối u ở chuột lô UT vào ngày thứ 23 sau cấy truyền tế bào sarcoma 180 .....	68
Ảnh 3.8. Khối u ở chuột tại lô uống cỏm cây sói rừng 5g/kg thể trọng vào ngày thứ 23 sau cấy truyền tế bào sarcoma 180 .....	68
Ảnh 3.9. Khối u ở chuột tại lô uống 6-MP vào ngày thứ 23 sau cấy truyền tế bào sarcoma 180.....	69
Ảnh 3.10. Hình ảnh vi thể khối u chuột lô UT .....	70
Ảnh 3.11. Hình ảnh vi thể khối u chuột lô 6-MP .....	70
Ảnh 3.12. Hình ảnh vi thể khối u chuột lô SR1 .....	71
Ảnh 3.13. Hình ảnh vi thể khối u chuột lô SR2.....	71
Ảnh 3.14. Hình ảnh vi thể khối u chuột lô SR3.....	72
Ảnh 3.15. Hình ảnh vi thể gan chuột lô sinh học.....	73
Ảnh 3.16. Hình ảnh vi thể gan chuột lô 6-MP .....	73
Ảnh 3.17. Hình ảnh vi thể gan chuột lô SR1 .....	74
Ảnh 3.18. Hình ảnh vi thể gan chuột lô SR2 .....	74
Ảnh 3.19. Hình ảnh vi thể gan chuột lô SR3 .....	75



Ảnh 3.20. Hình ảnh vi thể tuyến ức lô chuột sinh học .....	79
Ảnh 3.21. Hình ảnh vi thể tuyến ức lô chuột ung thư.....	80
Ảnh 3.22. Hình ảnh vi thể tuyến ức lô chuột uống 6-MP.....	80
Ảnh 3.23. Hình ảnh vi thể tuyến ức lô chuột uống sói rừng.....	81
Ảnh 3.24. Hình ảnh vi thể lách chuột lô sinh học.....	82
Ảnh 3.25. Hình ảnh vi thể lách chuột lô ung thư .....	83
Ảnh 3.26. Hình ảnh vi thể lách chuột lô 6-MP .....	83
Ảnh 3.27. Hình ảnh vi thể lách chuột lô SR1 .....	84

## **DANH MỤC SƠ ĐỒ**

Sơ đồ 2.1. Quy trình chiết xuất cốm cây sói rừng.....	37
Sơ đồ 2.2. Cách phân chia các nhóm chuột theo dõi tác dụng kháng u.....	51
Sơ đồ 2.3. Quy trình nghiên cứu .....	52