

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO**                          **BỘ Y TẾ**  
**HỌC VIỆN Y DƯỢC HỌC CỔ TRUYỀN VIỆT NAM**



**TRẦN QUANG HUY**

**NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG ĐIỀU TRỊ  
UNG THƯ GAN CỦA VIÊN NANG  
CTHEPAB TRÊN ĐỘNG VẬT THỰC  
NGHIỆM**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ Y HỌC**

**HÀ NỘI – 2021**

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO**

**BỘ Y TẾ**

**HỌC VIỆN Y DƯỢC HỌC CỔ TRUYỀN VIỆT NAM**



**TRẦN QUANG HUY**

**NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG ĐIỀU TRỊ UNG  
THƯ GAN CỦA VIÊN NANG CTHEPAB TRÊN  
ĐỘNG VẬT THỰC NGHIỆM**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ Y HỌC**

**Chuyên ngành Y học cổ truyền**

**Mã số: 8720115**

**Người hướng dẫn khoa học:**

**PGS.TS Lê Thị Tuyết**

**PGS.TS Đậu Xuân Cảnh**

**HÀ NỘI, NĂM 2021**

## LỜI CẢM ƠN

Hoàn thành luận văn này, với tất cả lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc, tôi xin được gửi lời cảm ơn đến Đảng ủy, Ban Giám đốc, Phòng đào tạo Sau Đại học, các Bộ môn, Khoa phòng Học viện Y dược học cổ truyền Việt Nam, là nơi trực tiếp đào tạo và tận tình giúp đỡ tôi trong quá trình học tập, nghiên cứu để hoàn thành luận văn.

Tôi xin bày tỏ lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc tới PGS.TS Lê Thị Tuyết, PGS.TS Đậu Xuân Cảnh - Học viện Y dược học cổ truyền Việt Nam, những người thầy hướng dẫn trực tiếp luôn theo sát, thường xuyên giúp đỡ, cho tôi nhiều ý kiến quý báu, sát thực trong quá trình học tập, nghiên cứu để hoàn thành luận văn này.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Đảng ủy, Ban Giám hiệu Trường Học Viện Quân Y đã quan tâm, tạo điều kiện tốt nhất cho tôi trong việc thu thập, hoàn thiện số liệu và nghiên cứu để hoàn thành đề tài.

Tôi xin được gửi lời cảm ơn đến các Thầy, các Cô trong Hội đồng thông qua đề cương luận văn đã cho tôi nhiều ý kiến quý báu trong quá trình hoàn thiện luận văn.

Tôi xin chân thành cảm ơn các Thầy, các Cô, các bác sỹ, kỹ thuật viên của Bộ môn Dược lý, trường Học Viện Quân Y đã tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học tập, nghiên cứu và làm việc tại Bộ môn.

Tôi vô cùng biết ơn gia đình, bạn bè, anh chị em đồng nghiệp và tập thể học viên lớp cao học khóa 2018-2020 chuyên ngành Y học cổ truyền đã đồng viên, giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận văn.

Xin trân trọng cảm ơn!

Học viên

Trần Quang Huy

## LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận án này là công trình nghiên cứu của riêng tôi. Tất cả số liệu trong luận án là trung thực và chưa được công bố trong bất kỳ công trình nghiên cứu nào.

5-FU	5 - Fluorouracil
AFB	Alpha - Foetoprotein
ALT	Alanin Amino Transferase
AST	Aspartate Amino Transferase
BALB	Bagg's albinos
BASO	Basophils
BN	Bệnh nhân
DC	Dendritic cells
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
EOS	Eosinophils
FBS	Fetal bovine serum
GSH	Glutathione
HBsAg	Hepatitis B surface antigen
HBV	Virus viêm gan B
HCT	Hematocrit
HGB	Hemoglobin
HPLC	High-performance liquid chromatography
LYM	Lymphocyte
LDH	Lactico dehydrogenaza
MCV	Mean corpuscular volume
MDA	Malondialdehyde
MON	Monocyte
NEUT	Neutrophil
NK	Natural killer
PDX	Xenograft lấy từ bệnh nhân
SOD	Superoxide dismutase
TAS	Total antioxidant status
TB	Tế bào

UBTG

Ung thư biểu mô tế bào gan

UTGNP

Ung thư gan nguyên phát

WHO

World Health Organization

## MỤC LỤC

<b>ĐẶT VẤN ĐỀ .....</b>	<b>1</b>
<b>CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1. Tổng quan bệnh học ung thư gan .....</b>	<b>3</b>
1.1.1. Khái niệm ung thư gan.....	3
1.1.2. Nguyên nhân và điều kiện thuận lợi .....	3
1.1.5. Ung thư gan theo YHCT .....	9
<b>1.2. Tổng quan về bài thuốc nghiên cứu và chế phẩm nghiên cứu .....</b>	<b>11</b>
1.2.1. Thành phần bài thuốc CT <sub>HepaB</sub> .....	11
1.2.2. Cơ sở xây dựng bài thuốc CT <sub>HepaB</sub> .....	12
1.2.3. Tổng quan về viên nang cứng CT <sub>HepaB</sub> .....	13
<b>1.3. Tình hình nghiên cứu về các vị thuốc trong bài thuốc CT<sub>HepaB</sub>.....</b>	<b>16</b>
1.3.1. Cà gai leo ( <i>Solanum hainanense</i> Hance <i>Solanaceae</i> ).....	16
1.3.2. Cỏ sữa lá nhỏ ( <i>Euphorbia thymifolia</i> ).....	17
1.2.3. Chi tử ( <i>Gardeniae jasminoidis</i> ) .....	18
1.2.4. Đại Hoàng ( <i>rhubarb</i> ).....	19
1.2.5. Đinh lăng ( <i>Polyscias fruticosa</i> ) .....	19
1.3.6. Đông trùng hạ thảo ( <i>Cordyceps militaris</i> ) .....	20
1.3.7. Linh chi ( <i>Ganoderma lucidum</i> ).....	21
1.3.8. Hà thủ ô ( <i>Fallopia multiflora</i> ) .....	23
<b>1.4. Nghiên cứu ung thư và ung thư gan trên thực nghiệm .....</b>	<b>25</b>
1.4.1. Nghiên cứu ung thư trên thực nghiệm .....	25
1.4.2. Nghiên cứu ung thư gan trên thực nghiệm.....	26
<b>1.5. Giới thiệu về các phương pháp nghiên cứu thử nghiệm mô hình gây ung thư tế bào gan nhiễm virus viêm ganB trên chuột Nude.....</b>	<b>29</b>
<b>CHƯƠNG 2. CHẤT LIỆU, ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....</b>	<b>30</b>
<b>2.1. Chất liệu nghiên cứu .....</b>	<b>30</b>
2.1.1. Chế phẩm nghiên cứu.....	30

2.1.2. Thuộc tham chiếu.....	31
<b>2.2. Đối tượng nghiên cứu.....</b>	<b>32</b>
<b>2.3. Địa điểm và thời gian nghiên cứu .....</b>	<b>33</b>
<b>2.4. Phương pháp nghiên cứu.....</b>	<b>33</b>
2.4.1. Thiết kế nghiên cứu.....	33
2.4.2. Các bước nghiên cứu.....	33
2.4.3. Phương pháp nghiên cứu.....	34
<b>2.5. Các biến số, chỉ số trong nghiên cứu .....</b>	<b>37</b>
2.5.1. Đánh giá hiệu quả của việc triển khai mô hình gây khối ung thư TB gan nhiễm virus viêm gan B trên chuột Nude .....	37
2.5.2. Đánh giá tác dụng điều trị của viên nang CTHePaB trên một số chỉ số xét nghiệm cận lâm sàng trên mô hình chuột Nude đã gây khối ung thư tế bào gan người nhiễm virus viêm gan B .....	39
<b>2.6. Sai số và biện pháp khống chế sai số .....</b>	<b>39</b>
<b>2.7. Phân tích và xử lý số liệu .....</b>	<b>39</b>
<b>2.8. Đạo đức trong nghiên cứu .....</b>	<b>39</b>
<b>CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.....</b>	<b>41</b>
<b>3.1. Triển khai mô hình gây khối ung thư tế bào gan nhiễm virus viêm gan B trên chuột Nude.....</b>	<b>41</b>
3.1.1. Kết quả nuôi cấy, tăng sinh tế bào ung thư gan. ....	41
3.1.2. Kết quả cấy ghép tế bào ung thư gan nhiễm virus viêm gan B .....	43
3.1.3. Đánh giá sự phát triển của khối u và thời gian sống của chuột mang khối u: 45	
<b>3.2. Đánh giá tác dụng điều trị của viên nang CTHePAB trên chuột mang khối u ..</b>	<b>49</b>
3.2.1. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của CTHePaB lên tế bào NK trong lách chuột mang khối u .....	49
3.2.2. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của CTHePaB lên tế bào Macrophage trong lách chuột mang khối u:.....	50
3.2.3. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của CTHePaB lên tế bào tua (DC) trong lách chuột gây ung thư tế bào gan nhiễm virus viêm gan B .....	51



3.2.4. Kết quả định lượng HBV-DNA của tế bào khối u trên chuột nude sau thời gian điều trị .....	52
<b>CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN.....</b>	<b>54</b>
<b>4.1. Nghiên cứu triển khai mô hình gây khối ung thư gan người nhiễm virus viêm gan B trên chuột nude .....</b>	<b>54</b>
4.1.2. Kết quả cấy ghép tế bào ung thư gan nhiễm virus viêm gan B .....	55
4.1.3. Đánh giá sự phát triển của khối u trên chuột nude và tỷ lệ sống, thời gian sống của chuột mang khối u .....	56
<b>4.2. Kết quả đánh giá tác dụng điều trị của viên nang CTHEPAB trên chuột mang khối u: .....</b>	<b>60</b>
4.2.1. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của CTHePaB lên tế bào NK trong lách chuột mang khối u .....	60
4.2.2. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của CTHePaB lên tế bào Macrophage trong lách chuột mang khối u .....	61
4.2.3. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của CTHePaB lên tế bào tua trong lách chuột mang khối u .....	62
4.2.4. Kết quả định lượng HBV-DNA của tế bào khối u trên chuột nude sau thời gian điều trị .....	63
<b>KẾT LUẬN .....</b>	<b>65</b>
<b>KIẾN NGHỊ.....</b>	<b>67</b>

## DANH MỤC BẢNG

Bảng 3.1. Tỷ lệ chuột hình thành khối ung thư gan trên đuôi chuột theo thời gian

Bảng 3.2. Kích thước khối ung thư gan trên đuôi chuột

Bảng 3.3. Kích thước khối u của các lô chuột nghiên cứu trong 21 ngày đầu sau khi uống thuốc ( $\text{mm}^3$ )

Bảng 3.4. Kích thước khối u của các lô chuột nghiên cứu từ ngày 21 đến ngày 63 sau khi uống thuốc ( $\text{mm}^3$ )

Bảng 3.5. Số chuột sống sót ở các lô chứng, lô tham chiếu và lô trị.

Bảng 3.6. Thời gian sống trung bình của các lô chuột tính đến thời điểm kết thúc thí nghiệm giữa lô chứng, lô tham chiếu và lô trị

Bảng 3.7. Số lượng tế bào NK trong lách chuột mang khối u giữa lô chứng, lô tham chiếu và lô trị

Bảng 3.8. Tỷ lệ tế bào Macrophage trong lách chuột mang khối u giữa lô chứng, lô tham chiếu và lô trị

Bảng 3.9. Tỷ lệ tế bào tua (DC) trong lách chuột mang khối u giữa lô chứng, lô tham chiếu và lô trị

Bảng 3.10. Định lượng HBV-DNA trong tế bào khối u trên chuột giữa lô chứng, lô tham chiếu và lô trị

## DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Sơ đồ nguyên nhân gây ung thư gan

Hình 1.2. Dạng thô của các vị thuốc trong bài thuốc CT<sub>HepaB</sub>

Hình 1.3: Cây cà gai leo

Hình 1.4: Cỏ sữa lá nhỏ

Hình 1.5: Chi tử

Hình 1.6: Đại hoàng

Hình 1.7. Cây đinh lăng

Hình 1.8. Nấm trùng thảo

Hình 1.9. Nấm linh chi đỏ

Hình 1.10. Hà thủ ô đỏ

Hình 2.1. Hình ảnh viên nang cứng CT<sub>HepaB</sub>

Hình 2.2: Thuốc kẹp NSK

Hình 3.1. Tế bào ung thư gan khi mới gieo vào môi trường, mật độ  $0,3-0,4 \times 10^6$  tế bào/chai.

Hình 3.2. Hình ảnh TB ung thư gan người Hep 3B phủ khoảng 75% diện tích chai nuôi sau 6 ngày nuôi cấy.

Hình 3.3. Hình ảnh khối u hình thành và phát triển ở đùi phải chuột

## **ĐẶT VẤN ĐỀ**

Ung thư vẫn luôn là mối quan tâm trên toàn cầu. Theo thống kê của GLOBOCAN năm 2020, tình hình mắc và tử vong do ung thư trên toàn thế giới đều có xu hướng tăng [1]. Ung thư gan là một trong mười loại ung thư phổ biến nhất ở cả nam và nữ [2]. Loại ung thư gan nguyên phát phổ biến nhất ở người lớn là ung thư biểu mô tế bào gan (HCC), có nguồn gốc từ tế bào gan và chiếm 70% đến 80% các trường hợp [3][4].

Theo thống kê của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) Việt Nam có tỷ lệ mắc ung thư gan theo giới tính nam cao thứ 3 thế giới, chỉ đứng sau Mông Cổ và Lào và là nguyên nhân hàng đầu gây tử vong liên quan đến ung thư tại Việt Nam [5]. Chưa có số liệu quốc gia được công bố chính thức về xuất độ HCC, tuy nhiên một nghiên cứu ghi nhận số liệu tại miền Trung và miền Nam Việt Nam trong thời gian 2010 đến 2016 có là 24091 trường hợp bị ung thư HCC, trong đó 62,3% có nhiễm virus viêm gan B (HBV) mạn và 26% có nhiễm virus viêm gan C (HCV) mạn. Việt Nam là nước có xuất độ nhiễm HBV cao, ước tính có khoảng 12,3% nam giới và 8,8% nữ giới có nhiễm HBV mạn. Tuy việc chủng ngừa HBV cho trẻ em tại Việt Nam đã làm giảm phần nào xuất độ viêm gan virus B mạn, nhưng vẫn đang có tình trạng bùng phát ung thư biểu mô tế bào gan liên quan đến nhiễm HBV tại Việt Nam [6]

Những người bị nhiễm viêm gan B mạn tính có nguy cơ bị ung thư gan cao gấp 100 lần những người không nhiễm bởi vì virus tấn công trực tiếp và lặp lại gây xơ gan và dẫn đến ung thư. Nồng độ HBV DNA trong huyết thanh cao hơn có tương quan với tỷ lệ mắc HCC ở bệnh nhân trong tương lai [7].

Phan Thị Phi Phi và CS khám 1.251 BN bị bệnh gan đã phát hiện 193 bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào gan (15,4%), sàng lọc 4.677 người trong quần thể phát hiện 2 bệnh nhân bị HCC [8].

Ngoài ra, tỷ lệ tái phát của ung thư biểu mô tế bào gan cao ở những bệnh nhân đã được phẫu thuật cắt gan, dẫn đến tỷ lệ chữa khỏi thấp và thời gian sống lâu dài thấp [2][9].

Một trong những thành tựu về nghiên cứu ung thư từ cuối thế kỷ 20 là các nhà khoa học đã tạo ra được những con chuột mang ung thư người [10], [11]. Đứng trước thách thức về mức độ ác tính, kháng điều trị của ung thư gan, ngày nay người ta đang phát triển các liệu pháp và dược chất mới điều trị, đặc biệt là hoạt chất có nguồn gốc từ thực vật, do đó cần phải có mô hình bệnh lý để áp dụng cho thử nghiệm tiền lâm sàng. Tế bào ung thư người được dung nạp và chuột sẽ mang khối ung thư người. Trên mô hình chuột mang ung thư người này, người ta đánh giá sự hình thành, phát triển khối u và áp dụng để phát hiện, điều trị cho bệnh nhân ung thư [12][13].

Viên nang CT<sub>HepaB</sub> bào chế từ bài thuốc CT<sub>HepaB</sub>, bài thuốc kinh nghiệm của Đậu Xuân Cảnh, với thành phần là những vị thuốc đã có hiệu quả nhất định trên lâm sàng [14][15][16][17][18], được chứng minh có tác dụng bảo vệ tế bào gan, ức chế sự nhân lên của HBV, ức chế sự phát triển của xơ gan, ung thư gan v...v, tạo tiền đề cho việc phát triển sản phẩm có nguồn gốc thảo dược phòng và điều trị ung thư gan.

Chính vì vậy, chúng tôi thực hiện đề tài: “**Nghiên cứu tác dụng điều trị ung thư gan của viên nang CT<sub>HEPAB</sub> trên động vật thực nghiệm**” với mục tiêu:

1. *Triển khai mô hình gây khối ung thư tế bào gan nhiễm virus viêm gan B trên chuột Nude.*
2. *Đánh giá tác dụng điều trị của viên nang CT<sub>HEPAB</sub> trên chuột mang khối u.*

## CHƯƠNG 1

### TỔNG QUAN TÀI LIỆU

#### 1.1. Tổng quan bệnh học ung thư gan

##### 1.1.1. Khái niệm ung thư gan

Ung thư gan gồm các ung thư nguyên phát và thứ phát [19][20].

Ung thư gan nguyên phát phần lớn là ung thư tế bào gan (hepatocellular carcinoma – HCC) hoặc tế bào ống mật (cholangio carcinoma), còn ung thư gan thứ phát là do di căn từ ung thư ở nơi khác đến gan.

Ung thư gan, hay còn gọi là ung thư gan nguyên phát, là sự phát triển và lan rộng nhanh chóng của các tế bào không lành mạnh trong gan.

Gan là cơ quan lớn nhất trong cơ thể. Nó giúp lọc bỏ độc chất trong máu khỏi cơ thể bạn. Nó cũng đóng vai trò trong tiêu hóa thức ăn và dự trữ năng lượng. Khi các tế bào gan ung thư hóa, gan không thể thực hiện chức năng thích hợp, dẫn tới các tác động có hại và nghiêm trọng đến cơ thể.

Ung thư gan nguyên phát thường gặp ở các nước nhiệt đới. Ở Việt Nam, ung thư gan đứng hàng thứ ba sau ung thư phế quản và ung thư dạ dày, hay gặp nhất là ung thư tế bào gan [20].

Ung thư tế bào biểu mô gan thường gặp nhiều ở lứa tuổi từ 50 - 60 tuổi, tuy nhiên nhiều nghiên cứu cho thấy tuổi trung bình ở các nước Đông Nam Á và châu Phi thường thấp hơn các nước khác. Về giới, ung thư tế bào biểu mô gan thường gặp ở nam nhiều hơn nữ, với tỉ lệ nam/nữ thay đổi từ 2/1 đến 9/1 [21].

##### 1.1.2. Nguyên nhân và điều kiện thuận lợi

Nguyên nhân trực tiếp gây ung thư gan chưa rõ ràng, cơ chế gây ung thư được cho là do rối loạn cấu trúc AND của nhân tế bào. Có nhiều yếu tố nguy cơ có thể làm rối loạn cấu trúc gây đột biến gen [20] như:

###### 1.1.2.1. Viêm gan virus

Có sự liên quan giữa viêm gan virus B và C với ung thư gan nguyên phát [22]. Ở Việt Nam, 81% bệnh nhân ung thư gan có kháng nguyên HBsAg (+) (viêm gan B) so với nhóm bệnh thường là 15% [20]. Một nghiên cứu ghi nhận số liệu ung

thư tế bào gan tại miền Trung và miền Nam Việt Nam là 24091 trường hợp trong thời gian 2010 đến 2016, trong đó 62,3% có nhiễm virus viêm gan B (HBV) mạn và 26% có nhiễm virus viêm gan C (HCV) mạn [6].

#### **1.1.2.2. Xơ gan**

Ung thư gan thường gặp ở bệnh nhân xơ gan. Đa số các ung thư tế bào biểu mô gan phát triển trên nền gan đã bị xơ, nhất là xơ gan kiểu hậu viêm gan. Tỷ lệ phát bệnh ung thư tế bào biểu mô gan hàng năm tăng theo mức độ nặng của thương tổn gan: 0,5 - 1% với viêm gan mạn và xơ gan [21].

#### **1.1.2.3. Các chất gây hoại tử tế bào gan và xơ gan**

Aflatoxin là một mycotoxin được tiết ra từ các loài nấm mốc *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* thường mọc trên đậu phộng và các hạt ngũ cốc bị ẩm ướt. Từ lâu người ta đã chứng minh chúng có thể gây ung thư gan thực nghiệm trên súc vật [21].

Chất độc: nhất là chất độc màu da cam (dioxin) làm rụng lá cây. Tetrachlorua carbon, các chất màu Azo hoặc nitrosamin gây ung thư gan trên thực nghiệm [21].

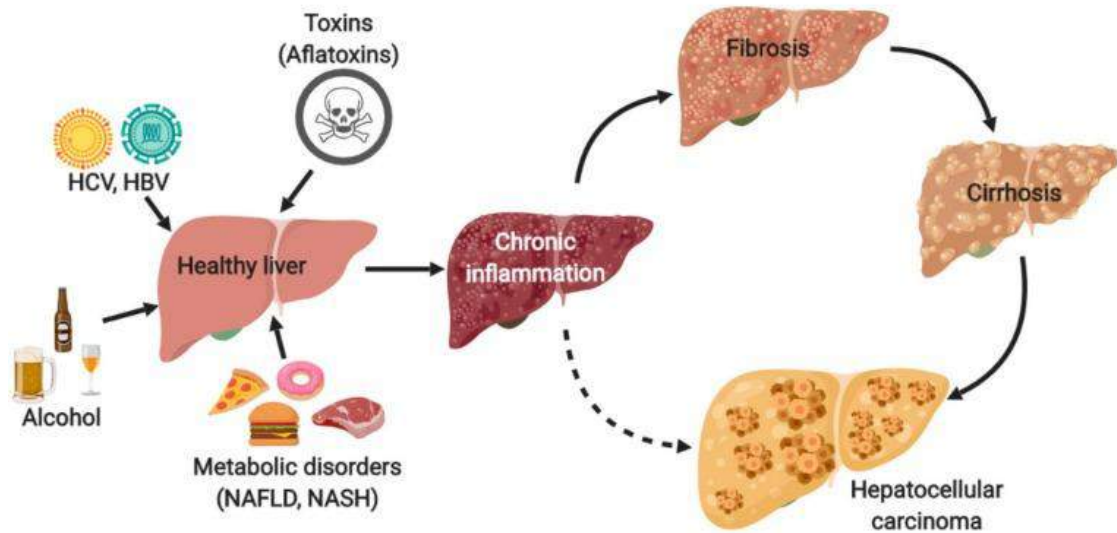
#### **1.1.2.4. Chế độ ăn uống**

Thức ăn bị mốc, uống rượu nhiều, chế độ ăn ít đạm, nhiều mỡ, ít sinh tố B1 [19][20].

Theo nghiên cứu của Zuzana Macek Jilkova and at al [13], ung thư biểu mô tế bào gan (HCC) là loại ung thư gan phổ biến nhất ở người lớn và có tỷ lệ tử vong cao nhất trong các loại ung thư thể rắn. Tỷ lệ mắc ung thư biểu mô tế bào gan đã tăng trong 20 năm qua và sẽ sớm vượt qua một triệu trường hợp hàng năm trên toàn thế giới [23].

Nhiễm mãn tính với HBV hoặc HCV, thực phẩm nhiễm aflatoxin, uống rượu mãn tính và rối loạn chuyển hóa là những nguyên nhân chính gây viêm gan mãn tính dẫn đến xơ hóa hoặc xơ gan, hoặc cả hai, và cuối cùng để phát triển HCC (xem Hình 1.1). Mặc dù sự phân bố của các yếu tố nguy cơ này rất khác nhau, tùy thuộc vào khu vực địa lý hoặc nhóm dân tộc, 90% các trường hợp ung thư biểu mô tế bào gan luôn phát triển trên nền viêm mãn tính và xơ hóa/xơ gan.

Hệ thống miễn dịch của gan đóng một vai trò quan trọng và vốn dĩ góp phần vào mức độ nghiêm trọng của tổn thương viêm hoại tử, hình thành xơ hóa gan và sự tiến triển của bệnh thành HCC [24][25].



**Hình 1.1. Sơ đồ nguyên nhân gây ung thư gan [13]**

Các yếu tố nguy cơ và quá trình dẫn đến sự phát triển của HCC. Virus viêm gan C, HCV; virus viêm gan B, HBV; bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu, NAFLD; viêm gan nhiễm mỡ không do rượu, NASH.

Cũng theo tác giả Yuan-Chi Teng [22], các yếu tố nguy cơ chính của của ung thư biểu mô tế bào gan HCC bao gồm: (1) nhiễm virus viêm gan, ví dụ HBV và HCV; (2) phơi nhiễm aflatoxin B1 (AFB1); (3) xơ gan do rượu; và (4) các yếu tố chuyển hóa như béo phì và tiểu đường [26][27]. Hơn nữa, trong HCC liên quan đến HBV, sự nhân lên của HBV và kiểu gen của HBV mỗi người cũng là những yếu tố nguy cơ. Nồng độ HBV DNA trong huyết thanh cao hơn có tương quan với tỷ lệ mắc ung thư biểu mô tế bào gan ở bệnh nhân trong tương lai [7].

### 1.1.3. Chẩn đoán xác định HCC

Khi tổn thương ở gan có một trong ba tiêu chuẩn sau [28]:

Hình ảnh điển hình\* của HCC trên CT scan bụng có cản quang hoặc MRI bụng có tương phản từ + AFP  $\geq$  400 ng/ml.



Hình ảnh điển hình\* của HCC trên CT scan bụng có cản quang hoặc MRI bụng có tương phản từ + AFP tăng cao hơn bình thường (nhưng chưa đến 400 ng/ml) + có nhiễm HBV và/hoặc HCV. Có thể làm sinh thiết gan để chẩn đoán xác định nếu bác sĩ lâm sàng thấy cần thiết. Các trường hợp không đủ các tiêu chuẩn nói trên đều phải làm sinh thiết khối u gan (có thể phải làm nhiều lần) để chẩn đoán xác định. Nếu sinh thiết lại vẫn âm tính thì có thể theo dõi và làm lại các xét nghiệm hình ảnh học và chỉ dấu sinh học mỗi 2 tháng.

Có bằng chứng giải phẫu bệnh lý là HCC. \* Hình ảnh điển hình trên CT scan bụng có cản quang hoặc MRI bụng có tương phản từ: (các) khối u bắt thuốc trên thì động mạch gan và thải thuốc (wash-out) trên thì tĩnh mạch cửa hay thì chậm. Nên chụp MRI với chất tương phản từ gan - mật gadoxetate disodium (Gd-EOB-DTPA - gadolinium ethoxybenzyl diethylenetriamine pentaacetic acid) để tăng khả năng chẩn đoán ung thư biểu mô tế bào gan

#### **1.1.4. Điều trị [28]**

##### **1.1.4.1. Nguyên tắc điều trị HCC**

Điều trị (các) khối HCC ở giai đoạn còn khả năng điều trị.

Điều trị bệnh lý nền tảng hay yếu tố nguy cơ (viêm gan siêu vi B hoặc C, xơ gan...).

Điều trị nội khoa kết hợp chăm sóc giảm nhẹ ở giai đoạn muộn.

##### **1.1.4.2. Các phương pháp điều trị đối với HCC**

(1). Phẫu thuật cắt bỏ phần gan có mang khối u (phẫu thuật cắt gan)

Phẫu thuật cắt gan được coi là điều trị triệt để đối với HCC và an toàn ngay cả đối với các bệnh nhân có xơ gan. Tuy nhiên, chưa có đồng thuận trên thế giới về tình trạng u và mức độ bảo tồn chức năng gan để đạt được hiệu quả sống còn phù hợp khi chỉ định cắt gan.

Tại Việt Nam, phẫu thuật cắt gan nên được thực hiện đối với các trường hợp:

Phần gan có khối u dự kiến cắt bỏ được (theo giải phẫu hay không theo giải phẫu).

Thể tích gan dự kiến còn lại phù hợp với bệnh nhân. Nên đo thể tích gan để góp phần ra chỉ định cắt gan đối với các trường hợp dự kiến cắt  $\geq 50\%$  thể tích gan.

Nên xem xét phẫu thuật cắt gan cho các trường hợp có huyết khối tĩnh mạch cửa cùng bên với phần gan định cắt, cũng như các trường hợp có tổn thương di căn ngoài gan (hạch cuống gan, tuyến thượng thận, di căn tại mạc nối lớn, ...) có thể lấy bỏ được khi phẫu thuật cắt gan.

(2) Phẫu thuật ghép gan Phẫu thuật ghép gan là biện pháp duy nhất có thể giúp bệnh nhân điều trị cả HCC lẫn bệnh lý gan nền. Chỉ định ghép gan cho bệnh nhân HCC tùy thuộc vào nhiều yếu tố, trong đó có cân nhắc tới hiệu quả của phẫu thuật cắt gan và các phương pháp điều trị tại chỗ, tại vùng, cũng như mức độ ưu tiên so với nhu cầu ghép gan của các bệnh nhân không phải là HCC.

(3) Phá hủy khối u tại chỗ (đốt u) Phá hủy khối u tại chỗ (đốt u) có thể thực hiện bằng sóng cao tần (Radiofrequency Ablation-RFA), bằng vi sóng (Microwave Ablation-MWA), bằng cách tiêm cồn vào 16 khối u (Percutaneous Ethanol Injection-PEI) hay bằng đốt lạnh (cryoablation) .... Phá hủy khối u tại chỗ (đốt u) nên thực hiện cho các trường hợp HCC có số lượng u  $\leq 3$  với kích thước u  $\leq 3$ cm, hoặc có 1 u với kích thước u  $\leq 5$ cm, nhất là khi các trường hợp này không phù hợp để phẫu thuật cắt gan (do vị trí u, do tình trạng bệnh nhân).

(4) Cắt nguồn máu nuôi khối u phối hợp với diệt tế bào ung thư bằng hóa chất:

Nút mạch hóa chất thường quy (conventional TransArterial Chemo-Embolization - cTACE)

Nút mạch sử dụng hạt nhúng hóa chất (Drug-eluting bead TACE - DEB-TACE) TACE được chỉ định cho các trường hợp HCC mà khối u không cắt được, hoặc có nhiều u ở cả hai thùy, chưa có xâm nhập mạch máu và chưa có di căn ngoài gan.

(5) Xạ trị trong chọn lọc (Selective Internal Radiation Therapy - SIRT) Sử dụng hạt vi cầu phóng xạ Yttrium-90 ( $^{90}\text{Y}$ ) bơm vào động mạch nuôi khối u gan.

Các hạt vi cầu này sẽ đi vào các nhánh động mạch nhỏ khắp trong khối u gây tắc mạch.

(6) Truyền hoá chất qua động mạch gan (Hepatic Arterial Infusion Chemotherapy - HAIC) Phương pháp sử dụng buồng truyền và dây dẫn đặt chọn lọc vào động mạch gan sau khi đã nút tắc các nhánh mạch của động mạch gan cấp máu cho các tạng khác. Chỉ định chủ yếu cho các trường hợp HCC giai đoạn tiến xa có xâm lấn tĩnh mạch cửa. Các biến chứng của phương pháp này bao gồm: viêm tắc mạch, loét dạ dày ruột do rò thuốc và nhiễm khuẩn hoặc tắc dây truyền.

#### (7) Xạ trị

##### Xạ trị chiếu ngoài

- Chỉ định: xạ trị chiếu ngoài bằng máy gia tốc có thể dùng đối với những trường hợp không phẫu thuật được. Lựa chọn trường chiếu xạ phụ thuộc vào vị trí, kích thước khối u. Liều xạ trị tùy thuộc vào thể tích trường chiếu, dao động từ 50-70Gy, phân liều 2Gy/ngày.

- Chỉ định xạ trị toàn gan trong những trường hợp điều trị giảm nhẹ triệu chứng, liều xạ 21Gy, phân liều 3Gy/ngày.

- Ngoài ra, có thể chỉ định xạ trị cho những trường hợp HCC di căn xương, di căn não, di căn phổi, di căn hạch.

- Mô phỏng bằng CT, MRI hoặc PET/CT, PET/MRI.

Xạ phẫu: Xạ phẫu có thể bằng dao gamma cố định, dao gamma quay (Rotating Gamma Knife), CyberKnife, ...

- Nguyên lý: bức xạ hội tụ với liều rất cao tại tiêu điểm khối u gây hoại tử hoặc bất hoạt tế bào u, đồng thời liều xạ tại các mô lành ở mức tối thiểu, rất ít gây tác dụng phụ cho cơ quan lành xung quanh.

- Chỉ định cho các trường hợp di căn một vài ổ tại não.

##### Xạ phẫu định vị thân (Stereotatic Body Radiation Therapy - SBRT)

Xạ phẫu định vị thân là phương pháp đang có nhiều bằng chứng đánh giá tác dụng tích cực, có thể dùng cho các khối u nguyên phát tại gan, không còn khả năng cắt bỏ hay các phương pháp phá huỷ u tại chỗ, và các khối u di căn ở gan.

### Cấy hạt phóng xạ

Cấy hạt phóng xạ vào khối u hoặc diện u trong các trường hợp không phẫu thuật triệt căn hoặc không thể phẫu thuật do có bệnh lý kèm theo hay bệnh nhân từ chối phẫu thuật.

#### (8) Điều trị toàn thân

Các trường hợp HCC tiến triển, không còn chỉ định phẫu thuật, nút mạch, đốt u thì có thể xem xét dùng điều trị toàn thân.

- Điều trị đích và điều trị miễn dịch

- Hóa trị toàn thân:

#### **1.1.4.3. Phối hợp các phương pháp điều trị**

Có thể phối hợp các phương pháp nói trên cho từng trường hợp cụ thể.

#### **1.1.4.4. Điều trị giảm nhẹ**

Được thực hiện khi; tổng thể tích các khối u vượt quá 50% thể tích gan; đã có huyết khối tĩnh mạch cửa, tĩnh mạch gan, tĩnh mạch chủ dưới; đã có di căn ngoài gan. ...

#### **1.1.4.5. Điều trị hỗ trợ**

Điều trị bệnh lý gan nền tảng và nâng đỡ chức năng gan; Dùng thuốc kháng virus khi có chỉ định; Hỗ trợ dinh dưỡng để nâng tổng trạng và các bệnh lý đi kèm.

### **1.1.5. Ung thư gan theo YHCT**

#### **1.1.5.1. Khái niệm ung thư gan theo YHCT**

Ung thư gan nguyên phát, theo YHCT gọi Can nham nguyên phát, là chỉ 1 loại u (thũng lưu) ác tính nguyên phát tại tạng gan. Bệnh có thể phát ở mọi lứa tuổi từ trẻ 2 tháng tuổi đến người già 80 tuổi; tuổi trung bình là 43,7; tỷ lệ cao nhất vào tuổi 40 - 49; nam nhiều hơn nữ [29].

Trung Quốc và Việt Nam, can nham chiếm tỷ lệ tương đối cao. Tỷ lệ tử vong do bệnh này đứng vào hàng thứ 3 so với tử vong các bệnh tiêu hóa. Nguyên nhân phát bệnh chưa rõ, đặc điểm lâm sàng thời kỳ đầu không điển hình, thường lẫn trong triệu chứng của bệnh đường tiêu hóa. Thời kỳ 3 đột nhiên tiến triển nhanh, diễn biến nặng không quá 6 tháng. Thời kỳ 4 có tỷ lệ tử vong rất cao. Về điều trị,

hiện nay còn gặp nhiều khó khăn, điều trị hóa chất hiệu quả chưa tiên lượng được; thời kỳ giữa có thể kết hợp điều trị can nham bằng phóng xạ với miễn dịch liệu pháp đến nay được coi là biện pháp hỗ trợ [29].

YHCT thường mô tả can nham trong tổng hợp các chứng: huyết thống, vị quản thống, tiết tả, hoàng đản, cổ trướng, thổ huyết, tiện huyết, hư lao, tích tụ, nội thương phát nhiệt. Bản chất can nham là đặc điểm bản hư và tiêu thực. Điều trị chủ yếu lấy “Công bổ kiêm thi” hoặc công tà là chủ hoặc phù chính là chủ. Hiện nay trên lâm sàng thường kết hợp cả hai phương pháp trên với mục đích kéo dài thời gian sống và nâng cao chất lượng cuộc sống [29].

#### ***1.1.5.2. Biện chứng luận trị***

##### Chứng trị ưu điểm:

Trong bệnh Can nham, những đặc điểm cơ bản là bản hư, tiêu thực hoặc từ hư đến thực hoặc từ thực đến hư mà dẫn đến hư thực thác tạp. Trên lâm sàng hoặc lấy thực là chủ hoặc lấy hư là chủ. Nếu lấy thực là chủ thì đa phần phải dùng thuốc hoạt huyết hóa ứ, thuốc thanh nhiệt - giải độc, thuốc nhuận kiên tán kết kèm theo pháp ích khí dưỡng huyết. Nếu lấy hư là chủ thì trên lâm sàng phải dùng thuốc bổ khí dưỡng huyết, thuốc tư bổ can thận. Ngoài ra còn căn cứ vào bệnh hoãn hay cấp: nếu cấp thì trị tiêu là chính; nếu là hoãn thì phải trị bản là chính [29]. Duy trì và tăng cường thể trạng bằng phương pháp YHCT thì sẽ đem lại hiệu quả rất tốt. Các bài thuốc của YHCT có mục tiêu làm giảm tác hại của hóa xạ trị, tăng cường thể trạng, tăng cường miễn dịch, hạn chế di căn xa, kiểm soát khối u rất tốt. Sau khi điều trị hóa trị, xạ trị, người dân có thể tìm đến YHCT để điều trị củng cố sức khỏe, phối hợp với y học hiện đại để giúp người bệnh chữa bệnh một cách tốt nhất.

##### Chứng trị phương pháp:

##### **Can khí uất kết tỳ thất kiện vận (thể đơn thuần):**

Vùng gan trướng, đau liên tục, đau tăng lên khi ấn gõ, ăn kém, không muốn ăn, vị quản trướng đầy hoặc trướng đau, toàn thân vô lực, sắc mặt vàng bủng, đại tiện lỏng nát, chất lưỡi nhợt hoặc bệu to, rìa lưỡi có hằn răng, mạch hư nhược hoặc tế nhược hoặc huyền tế vô lực.

Phương pháp điều trị: sơ can lý khí - kiện tỳ hóa vị.

Phương thuốc: “Sài hồ sơ can tán” gia giảm [29].

**Thể huyết ú nội trở, can lạc bất thông** (nhóm xơ gan):

Đau nhói vùng gan, cự án, bệnh ngày nhẹ đêm nặng, miệng khô, không muốn ăn, sắc mặt sạm đen, hình thể gầy gò, đa số có kỳ nhiệt, da cơ khô, móng chân móng tay khô sác, có thể có bàn tay son, có sao mạch rõ, nôn ra máu, ỉa ra máu, rêu lưỡi xám tía có ban điểm ú huyết, mạch huyền hoặc là tế nhược [29].

Phương pháp điều trị: hoạt huyết hóa ú - thông kinh hoạt lạc.

Phương thuốc thường dùng: “Huyết phụ trục ú thang” gia giảm [29].

**Thể ú độc nội trở, ngoan tụ bất tán** (thể viêm):

Vùng gan đau kịch liệt, đau mỗi ngày 1 tăng hoặc đau trướng là chính, có lúc sốt cao, có lúc không sốt, bệnh tình tiến triển tăng; thường khoảng 50% các trường hợp có vàng da, vàng mắt; có phúc thủy (cổ trướng), tiểu tiện vàng đỏ; chất lưỡi hồng, rêu lưỡi vàng hoặc vàng nhờn; mạch hoạt sác.

Phương pháp điều trị: thanh nhiệt - giải độc, tiêu ú kháng nham.

Phương thuốc điều trị: “Bạch xà lục vị phương” gia giảm [29].

**Khí âm song hao, chính bất thắng tà** (giai đoạn cuối):

Sắc mặt xám đen hoặc xám bệch, thiếu khí pháp lực, loạn ngôn, tư hãn, vùng gan ần thông, khí nghịch ầu thổ, đại tiên lỏng nát, lông tóc khô cứng, móng tay và móng chân khô ráp, mắt rêu lưỡi, lưỡi không có hần răng, mạch tế nhược.

Phương pháp điều trị: ích khí dưỡng âm - phù chính kháng nham.

Phương thuốc thường dùng: “Lục vị địa hoàng hoàn” gia giảm [29].

## 1.2. Tổng quan về bài thuốc nghiên cứu và chế phẩm nghiên cứu

### 1.2.1. Thành phần bài thuốc CT<sub>HepaB</sub>

Cà gai leo 30g

Cỏ sữa lá nhỏ 20g

Chi tử 10g

Đại hoàng 5g

Đinh lăng 10g

Đông trùng hạ thảo 5g

Linh chi 10g

Hà thủ ô 10g

### 1.2.2. Cơ sở xây dựng bài thuốc CTHeptaB

Là bài thuốc kinh nghiệm của Đẩu Xuân Cảnh đã đúc rút trong quá trình lâm sàng, có hiệu quả nhất định trên bệnh nhân.

Thành phần bài thuốc CTHeptaB gồm 8 vị (2 ngày/thang):

Cà gai leo 30g	Cỏ sữa lá nhỏ 20g	Chi tử 10g
Đại hoàng 5g	Đinh lăng 10g	Đông trùng hạ thảo 5g
Linh chi 10g	Hà thủ ô 10g	

Dựa vào lý luận của y học cổ truyền, các triệu chứng biểu hiện của bệnh và dựa vào tính năng các vị thuốc phù hợp để điều trị triệu chứng bệnh xơ gan. Bài thuốc có tác dụng: Thanh nhiệt giải độc, lợi thấp thoái hoàng, bổ khí ích tinh, tư dưỡng can thận. Gồm 8 vị thuốc đã trình bày ở trên:

- Quân: Cà gai leo: tác dụng thanh nhiệt giải độc, lợi thủy thấp
- Thân: Cỏ sữa lá nhỏ; Chi tử giúp cà gai leo thanh nhiệt độc ở can, lợi thấp thoái hoàng.
- Tá: Đinh lăng, Đông trùng hạ thảo, Linh chi, Hà thủ ô bổ khí, ích tinh, tư dưỡng can thận, giúp nâng cao chính khí đẩy lùi thấp nhiệt độc.
- Sứ: Đại hoàng, lương huyết hoạt huyết, dẫn thấp nhiệt qua đường đại tiện.

Dựa vào tác dụng dược lý và thành phần hóa học của các vị thuốc đã được chứng minh có tác dụng bảo vệ tế bào gan, chống xơ gan, ức chế hoạt động của virus, giúp gan hoạt động hiệu quả hơn, hỗ trợ sức đề kháng.

Một số công trình nghiên cứu trên thực nghiệm, trên lâm sàng của các vị thuốc trong bài thuốc như Cà gai leo [30] [31] [14] [32], Đông trùng hạ thảo [33] [34], Nấm linh chi [35], Đại hoàng [36] đã chứng minh các tác dụng: ức chế sự nhân lên và diệt phần nào HBV, ức chế sự phát triển của xơ gan, ung thư gan [37].

Hình ảnh các vị thuốc như sau



**Hình 1.2. Dạng thô của các vị thuốc trong bài thuốc CTHePaB**

### 1.2.3. Tổng quan về viên nang cứng CTHePaB

#### 1.2.3.1. Thành phần viên nang cứng CTHePaB

Thành phần viên nang cứng CTHePaB 400mg gồm các vị thuốc trong bài thuốc CTHePaB đã trình bày ở trên. Các vị thuốc trong CTHePaB đều đạt tiêu chuẩn dược điển Việt Nam V.

Trước khi tạo ra chế phẩm viên nang cứng CTHePaB 400mg từ các vị thuốc trong bài thuốc CTHePaB, chúng tôi đã thực hiện các nghiên cứu: *Bào chế bột cao khô định chuẩn; Xây dựng và thẩm định tiêu chuẩn cơ sở cho bột cao khô; Bào chế viên nang cứng CTHePaB; Xây dựng và thẩm định tiêu chuẩn cơ sở của viên nang cứng CTHePaB*, từ đó xác định được độ ổn định cũng như đánh giá dự đoán về hạn sử dụng của sản phẩm, cụ thể một số nội dung nghiên cứu được trình bày tóm tắt như sau:



### **1.2.3.2. Nghiên cứu bào chế bột cao khô định chuẩn**

Về tiêu chuẩn chất lượng: Các vị thuốc trong bài thuốc CTHePaB đều đạt tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam V.

Về kích thước tiểu phân: Các dược liệu được sấy ở 60°C đến khi hàm ẩm nhỏ hơn 10%, sau đó nghiền nhỏ bằng máy xay búa, rây qua rây có kích thước mắt rây là 1mm. Sấy bột dược liệu ở 60°C trong 2 giờ. Bột nguyên liệu được đóng trong túi PE kín, 2 lớp, bảo quản ở nhiệt độ phòng đến khi sử dụng.

Phương pháp chiết siêu âm được lựa chọn để khảo sát xây dựng quy trình điều chế dịch chiết

Phương pháp cô cao và loại tạp

Chỉ tiêu đánh giá: Căn cứ vào hàm lượng hoạt chất và tỷ lệ chất rắn để đánh giá quá trình cô cao và loại tạp

Bào chế bột cao khô CTHePaB bằng phương pháp phun sấy

### **1.2.3.3. Xây dựng và thẩm định tiêu chuẩn cơ sở cho bột cao khô:**

Tiến hành xây dựng và thẩm định tiêu chuẩn bột cao khô CTHePaB trên các chỉ tiêu:

- Cảm quan.
- Mất khối lượng do làm khô: Không được quá 5,0%.
- Định tính: Định tính các dược liệu có trong bột cao khô bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng.
- Định lượng: Định lượng một hoạt chất trong bài thuốc.
- Độ nhiễm khuẩn: Đạt theo quy định của DĐVN V.

### **1.2.3.4. Bào chế viên nang cứng CTHePaB**

Nghiên cứu xây dựng công thức bào chế:

- Khảo sát, lựa chọn các tá dược: Tá dược độn, tá dược trơn...; nang thuốc; quy trình đóng nang... để đưa ra công thức bào chế tối ưu.

- Các chỉ tiêu đánh giá lựa chọn: Hình thức cảm quan, độ đồng đều khối lượng, độ rã...

### **1.2.3.5. Xây dựng và thẩm định tiêu chuẩn cơ sở của viên nang cứng CTHePaB:**

Xây dựng và thẩm định tiêu chuẩn của viên nang cứng CTHePaB trên các tiêu chí sau:

- Hình thức, cảm quan.
- Độ đồng đều khối lượng.
- Độ rã.
- Mất khối lượng do làm khô.
- Định tính.
- Định lượng.
- Giới hạn nhiễm khuẩn.

Đánh giá độ ổn định của viên nang cứng CTHePaB:

- Độ ổn định viên nang cứng CTHePaB ở điều kiện lão hóa cấp tốc: Nghiên cứu độ ổn định theo quy định chung của Bộ Y tế và Hướng dẫn của ICH theo điều kiện khí hậu vùng nóng ẩm (vùng IVb) ở điều kiện lão hóa cấp tốc với các thời gian lấy mẫu 1, 3, 6 tháng được thiết kế theo mô hình ma trận.

- Độ ổn định ở điều kiện thực: Nghiên cứu độ ổn định theo quy định chung của Bộ Y tế và Hướng dẫn của ICH theo điều kiện khí hậu vùng nóng ẩm (vùng IVb) ở điều kiện thường (điều kiện dài hạn, nhiệt độ  $300C \pm 20C$ , độ ẩm  $75\% \pm 5\%$ ) với các điểm lấy mẫu 3, 6, 9, 12 tháng được thiết kế theo mô hình ma trận.

Từ đó xác định được độ ổn định cũng như dự đoán về hạn sử dụng của sản phẩm.

Viên nang cứng CTHePaB đã thử độc tính cấp và bán trường diễn (3 tháng) trên chuột và cho kết quả an toàn, không gây ảnh hưởng chung của chuột.

### 1.3. Tình hình nghiên cứu về các vị thuốc trong bài thuốc CT<sub>Hepa</sub>B

#### 1.3.1. Cà gai leo (*Solanum hainanense* Hance Solanaceae)

Bộ phận dùng: Rễ, cành lá.

Thành phần hoá học: Rễ cây có chứa tinh bột và đặc biệt chứa các hoạt chất chính như alcaloid, glycoalcaloid...

Tác dụng dược lý: có tác dụng bảo vệ tế bào gan, hỗ trợ điều trị bệnh viêm gan virus, ngăn chặn sự phát triển của xơ gan nên dùng điều trị các bệnh lý gan mật. Ngoài ra tác dụng tiêu độc, trừ ho, tán phong thấp, giảm đau, cầm máu [38].

Theo nghiên cứu của Nguyễn Thị Minh Khai đã chứng minh thành phần



Hình 1.3: cây cà gai leo

trong cây cà gai leo có tác dụng bảo vệ, làm ức chế sự phát triển xơ gan. Trong đó phải kể đến hoạt chất chính là glycoalcaloid. Cũng trong nghiên cứu này đã phát hiện ra tác dụng dược lý mới của cây cà gai leo trong việc ức chế gen gây ung thư của virus và gen ung thư p53 và Rb [39].

Nghiên cứu về khả năng phục hồi tổn thương gan, bảo vệ gan của Nguyễn Trọng Thông đã chứng minh sản phẩm (có cà gai leo một trong 2 thành phần chính của sản phẩm) tác dụng hạ men gan nhanh, bảo vệ gan rất tốt tương đương với thuốc Sylimarín [40]. Một số công trình nghiên cứu tại Viện Dược liệu Trung ương cũng đã chứng minh cà gai leo với hoạt chất glycoalkaloid giúp ngăn ngừa xơ gan tiến triển thông qua việc ức chế sự hình thành tổ chức xơ trong tế bào gan. Từ đó giúp người viêm gan virus giảm nguy cơ biến chứng thành xơ gan [39].

Các hoạt chất trong cà gai leo cũng có công dụng trong việc giải độc gan, tăng cường chức năng gan, hạn chế tối đa tổn thương tế bào gan do virus cũng như các tác nhân gây hại ngoài môi trường sống nên giúp người viêm gan virus B bảo vệ gan hiệu quả.

Y học Việt Nam và thế giới đánh giá rất cao. Đây là cây thuốc nam được đánh giá tốt nhất hiện nay về tác dụng giải độc gan. Trong cây cà gai leo có chất Glycoalcaloid tác dụng ức chế sự sao chép virus viêm gan virus B.

Theo đánh giá trong nghiên cứu của Nguyễn Ngọc Quang (Chủ nhiệm khoa truyền nhiễm của BV TƯ Quân đội 108) trên bệnh nhân bị viêm gan, đặc biệt là viêm gan B mạn tính. Kết quả, sau 3 – 6 tháng sử dụng, 100% bệnh nhân đều hết các triệu chứng của bệnh. Qua xét nghiệm, một số trường hợp âm tính với virus, ngăn ngừa được sự tiến triển của bệnh viêm gan [15].

Trịnh Thị Xuân Hoà; Nguyễn Văn Mùi và cộng sự (2004) nghiên cứu trên 240 bệnh nhân viêm gan mạn tính virus B, được chia làm 2 nhóm, nhóm 1: gồm 90 bệnh nhân điều trị Haina và 90 bệnh nhân nhóm chứng, nhóm 2 gồm 30 bệnh nhân điều trị Dihacharin và 30 bệnh nhân nhóm chứng. Kết quả thấy: sau điều trị các thuốc Haina, Dihacharin có tác dụng làm thay đổi các Marker của virus viêm gan B rõ rệt [41].

### 1.3.2. Cỏ sữa lá nhỏ (*Euphorbia thymifolia*)

Bộ phận dùng: toàn thân.

Thành phần hoá học: Bộ phận trên mặt đất: epitaraxerol, quercetin, 3  $\beta$  – galactosid alcol; Thân lá: flavonoid (cosmosiin). (5,7,4-trihydroxyflavon-7-glucosid); Rễ chứa taraxerol, tirucallol và myrixyl alcohol.

Nghiên cứu của Vũ Minh Trang [42][43], phân lập và xác định được cấu trúc của 11 hợp chất từ lá của cây Cỏ sữa lá nhỏ, trong đó có 2 hợp chất dipeptit là asperglaucid và aurantiamid.

Tác dụng dược lý: Dung dịch cỏ sữa 1/20 đến 1/40 có tác dụng ức chế sự sinh sản của các loại vi trùng lỵ Sonner, Flexne và Shiga.

Tác dụng dược lý: Theo Copacdiuxki 1947 (Bull.Soc. Chimie biologique số 29:924-926) chất nhựa mủ của cỏ sữa có tính gây xót đối với niêm mạc và độc với cá và chuột. tác



Hình 1.4: Cỏ sữa lá nhỏ

dụng kháng khuẩn kháng nấm, chống dị ứng, chống viêm; ức chế miễn dịch, ức chế khối u, chống virus; tác dụng an thần, giảm đau, bảo vệ gan.

Tính vị quy kinh: Cỏ sữa lá nhỏ có vị ngọt đắng nhạt, hơi chua, tính lạnh

Tác dụng: tác dụng thông huyết, tiêu viêm, tiêu độc, lợi tiểu, kháng khuẩn, thông sữa [38].

### 1.2.3. Chi tử (*Gardeniae jasminoidis*)

Bộ phận dùng: Quả chín phơi khô

Thành phần hoá học: Gardenin, Crocin, cocetin D-mannitol, Sitostreol, grandenoside, geniposide

Tác dụng dược lý:

- Giải nhiệt: tác dụng ức chế trung khu sản nhiệt như Hoàng cầm, Hoàng liên nhưng yếu hơn.

- Tác dụng lợi mật: làm tăng tiết mật. Thử nghiệm chứng minh trên súc vật sau khi thắt ống dẫn mật, chi tử có tác dụng ức chế không cho bilirubin trong máu tăng và làm tăng co bóp túi mật.

- Tác dụng cầm máu: Chi tử sao cháy thành than có tác dụng cầm máu.

- Kháng khuẩn: In vitro, thuốc có tác dụng ức chế trực khuẩn lỵ, tụ cầu vàng, trực khuẩn mủ xanh.

- An thần: thuốc có tác dụng chữa mất ngủ trong các bệnh viêm nhiễm do sốt cao làm não xung huyết và hưng phấn thần kinh.

Thử nghiệm đã chứng minh nước ngâm kiệt Chi tử có tác dụng an thần đối với chuột trắng.

Hạ huyết áp: trên súc vật

thử nghiệm cũng đã chứng minh thuốc có tác dụng hạ áp.



Hình 1.5: Chi tử

Ngoài ra trên súc vật thực nghiệm, thuốc có tác dụng ức chế tế bào ung thư trong nước bàng bụng.

Thuốc có tác dụng tả hỏa trừ phiền, thanh nhiệt lợi thấp, lương huyết giải độc, chủ trị chứng nhiệt, bệnh tâm phiền, sốt cao, bứt rứt, thấp nhiệt vàng da, tiểu tiện ít, đỏ. Nhiệt lâm, huyết lâm, huyết nhiệt xuất huyết, ung thũng sang độc, đắp ngoài trị chấn thương phần mềm [44].

Tính vị quy kinh: Vị đắng tính hàn. Qui tâm, phế, vi, tam tiêu

#### 1.2.4. Đại Hoàng (*rhubarb*)

Bộ phận dùng: Thân, rễ (Radix et Rhizoma Rhei).

Thành phần hoá học: Emodin và Rhein

Tác dụng dược lý: Thành phần Emodin và Rhein trực tiếp ức chế sự sinh trưởng của tế bào ung thư của Melanoma, ung thư vú và ung thư gan kèm trướng nước ở bụng chuột (Chinese Herbal Medicine). Nước sắc Đại hoàng có tác dụng lợi tiểu, bảo vệ gan và giảm Cholesterol máu đối với chó bị gây cao Cholesterol và cho uống thuốc. Tuy nhiên với chó bình thường thì không có tác dụng (Chinese Herbal Medicine).



Hình 1.6: Đại hoàng

Tính vị quy kinh: vị đắng, tính hàn, qui kinh Tỳ, Vị, Đại tràng, Can, Tâm

Tác dụng: nhuận tràng; hạ hỏa và giải độc; hoạt huyết hóa ứ, lợi thủy, thanh nhiệt hóa thấp [10] [19].

#### 1.2.5. Đinh lăng (*Polyscias fruticosa*)

Thành phần hoá học: Thành phần hoá học chính là Saponin triterpenic. Bột rễ đinh lăng lá nhỏ có chứa 20 acid amin, vitamin nhóm B, các nguyên tố vi lượng, trong đó có một số acid amin mà cơ thể người không thể tổng hợp được.

Tác dụng: có tác dụng bổ năm tạng, giải độc, bổ huyết, tăng sữa, tiêu thực, tiêu sưng viêm. Đinh lăng là thuốc tăng lực [38].



Vì vậy, người ta đã dùng các chế phẩm từ đỉnh lăng lá nhỏ cho các vận động viên khi thi đấu, bộ đội hành quân đường dài. Các chế phẩm này cũng được dùng cho các nhà du hành vũ trụ để làm tăng sức chịu đựng và thể lực, nâng cao hiệu quả



Hình 1.8. Cây đỉnh lăng

luyện tập trong tư thế tĩnh đầu dốc ngược.

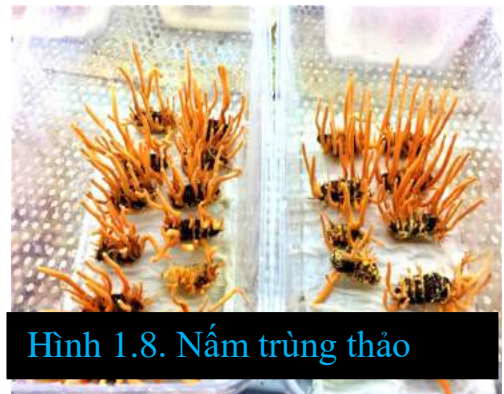
Bởi vậy, các nhà nghiên cứu Nga gọi các chế phẩm này là "Thuốc sinh thích nghi" (Adaptogen), đã được nước ta và Liên Xô cũ sử dụng trong chương trình vũ trụ Itercosmos.

### 1.3.6. Đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*)

Bộ phận sử dụng: toàn thân.

Thành phần hoá học: Cordycepin và Adenosin

Tác dụng dược lý: Trong sinh khối Nấm Đông Trùng Hạ Thảo có chứa 17 axit amin như các nguyên tố vi lượng nhiều khoáng chất quan trọng. Trong đó có adenosine, Selen là các khoáng vi lượng rất



Hình 1.8. Nấm trùng thảo

cần thiết cho cơ thể, có khả năng tăng cường hệ miễn dịch, giúp ngăn ngừa và hỗ trợ điều trị ung thư. Đông Trùng Hạ Thảo là loại thuốc bổ quý giá có tác dụng tích cực với các bệnh thận hư tăng cường sinh lý, giảm đau nhức khớp, bổ phổi, bồi bổ cơ thể, giúp ăn ngon ngủ khỏe, giảm lão hóa kéo dài tuổi thọ.

Tác dụng: Trong y học cổ truyền Trung Hoa và Tây Tạng, đông trùng hạ thảo được xem là có sự cân bằng tuyệt vời giữa âm và dương, bởi nó vừa là thực vật vừa là động vật, được hình thành vào mùa đông và trưởng thành vào mùa hạ. Cho

nên đông trùng hạ thảo được xem là một vị thuốc quý, có thể chữa được “bách hu bách tổn”, cụ thể một số bệnh:

- Hỗ trợ điều trị ung thư: Các nghiên cứu lâm sàng được tiến hành tại Nhật Bản và Trung Quốc đã cho thấy các bệnh nhân bị các chứng ung thư khác nhau được tiêm 6 gram đông trùng hạ thảo mỗi ngày kết hợp với hoá trị trong vòng 2 tháng đã làm giảm đáng kể kích thước khối u, trong khi đó, các bệnh nhân được chữa trị bằng phương pháp bức xạ hay hoá trị liệu thì bệnh trạng không chuyển biến đáng kể.

- Tác dụng của đông trùng hạ thảo trong việc hỗ trợ điều trị các bệnh liên quan đến gan: Gần như tất cả các nghiên cứu về mối quan hệ giữa đông trùng hạ thảo và chức năng gan đều cho thấy đông trùng hạ thảo giúp tăng hiệu quả hoạt động của gan. Ngày nay, đông trùng hạ thảo thường được sử dụng trong điều trị xơ gan, viêm gan B, C mãn tính tại nhiều nước ở châu Á. Ngoài ra, đông trùng hạ thảo còn được sử dụng kết hợp với một số loại nấm dược liệu khác để hỗ trợ cho lamivudine trong điều trị viêm gan siêu vi B.

### 1.3.7. Linh chi (*Ganoderma lucidum*)

Bộ phận dùng: toàn thân.

Thành phần hoá học: 7 Acid amin, protein, saponin, sterol.

Các nhà khoa học Việt Nam tìm thấy trong nấm Linh chi có chứa 21 nguyên tố vi lượng cần thiết cho sự vận hành và chuyển hóa của cơ thể như: đồng, sắt, kali, magne, natri, canxi.

Tính vị quy kinh: Hồng chi có vị đắng, tính bình, không độc.

Tác dụng: An thần, tăng trí nhớ, chữa viêm gan cấp và mãn tính, điều hoà huyết áp, tăng tuổi thọ.



**Hình 1.9. Nấm linh chi đỏ**



Ngày nay người ta biết trong nấm Linh chi có germanium giúp tế bào hấp thụ oxy tốt hơn; polysaccharit làm tăng sự miễn dịch trong cơ thể, làm mạnh gan, diệt tế bào ung thư; acid ganodermic chống dị ứng, chống viêm.

Tác dụng dược lý: Trong trang 256 cuốn “Sổ tay sức khỏe” của Doris Chapman, theo các nhà nghiên cứu tại Trung tâm ung thư quốc gia Nhật Bản, 80% các thử nghiệm trên động vật bị ung thư đã cho thấy kết quả rất khả quan, khi cho các loài động vật này sử dụng các chiết xuất từ nấm Linh chi đỏ. Các hợp chất trong mỗi loại nấm làm tăng hoạt động chống khối u của các tế bào NK và cải thiện phản ứng kháng thể.

Nghiên cứu sự hợp tác Chen Hui Hua, Wong Yi Chen và Tung Ta Chen Viện Y Tế Đài Bắc và Viện Y Tế Đài Loan, kết quả sau 3 năm thử nghiệm nấm linh chi đỏ trên động vật đã chứng minh rằng các thành phần trong nấm linh chi nuôi trồng có thể ngăn ngừa tế bào ung thư.

Có nhiều công trình nghiên cứu trên thế giới đã định danh được các hoạt chất và xác định tác dụng dược lý trong nấm Linh chi, có hàm lượng germanium cao hơn trong nhân sâm đến 5 - 8 lần.

Những tác dụng của đông trùng hạ thảo theo nghiên cứu công bố trên Tạp San Nấm Dược Liệu Quốc Tế [45]:

Tác dụng của polysaccharides *Ganoderma lucidum* tan trong nước trên các chức năng miễn dịch của bệnh nhân ung thư phổi tiến triển” [46]. “Tiềm năng dược lý của nấm linh chi [47]. Chất điều hòa miễn dịch chiết suất từ một loại nấm, *Ganoderma lucidum*, có sự tương đồng với các vùng biến đổi immunoglobulin [48].

Theo nghiên cứu của Trần Thị Văn Thi và cộng sự năm 2012 [49], khi nghiên cứu *Khảo sát tác dụng dược lý của phân đoạn polysaccharid từ nấm linh chi nuôi trồng tại Thừa Thiên Huế*”, cho thấy: Linh chi có tác dụng tốt như chữa suy nhược thần kinh, các bệnh tim mạch, làm giảm lượng đường và cholesterol trong máu, tác dụng chống oxy hoá, bảo vệ gan, kích thích miễn dịch.

Theo nghiên cứu của Trần Thị Nguyên Đăng và cộng sự năm 2018 [50] về cao linh chi bào chế công nghệ dạng nano (*Ganoderma lucidum*) hướng tác dụng

kháng cholinesterase cho thấy: Cao linh chi có tác dụng kháng cholinesterase, cải thiện tình trạng suy giảm trí nhớ, dễ dàng hấp thu vào cơ thể sản phẩm được chứng minh tác dụng kháng cholinesterase in vitro.

### 1.3.8. Hà thủ ô (*Fallopia multiflora*)

Bộ phận dùng: Rễ củ phơi hay sấy khô của cây Hà thủ ô đỏ (*Fallopia multiflora* (Thunb.) Haraldson).

Thành phần hoá học chủ yếu: Chrysophanic acid, emodin, rhein, chrysophanic acid, anthrone, lecithin.

Tác dụng dược lý:

- Hà thủ ô có tác dụng hạ Cholesterol huyết thanh, được chứng minh rõ trên mô hình gây cholesterol cao ở thỏ nhà, thuốc còn có tác dụng làm giảm hấp thu cholesterol của ruột thỏ, theo tác giả, thuốc có thành phần hữu hiệu kết hợp với cholesterol (Tân y học, 5 - 6, 1972). Thuốc có tác dụng phòng chống và giảm nhẹ xơ cứng động mạch. Có thể tác dụng giảm xơ cứng động mạch và do thuốc có thành phần Lecithin (Tân y học, 5 - 6, 1972).



- Thuốc làm chậm nhịp tim. Làm tăng nhẹ lưu lượng máu động mạch vành và bảo vệ được cơ tim thiếu máu.

- Thuốc giữ được tuyến ức của chuột nhất già không bị teo mà giữ được mức như lúc chuột còn non, tác dụng này có ý nghĩa chống lão hóa nhưng cơ chế còn cần nghiên cứu thêm.

- Tác dụng kháng khuẩn và virus: thuốc có tác dụng ức chế đối với trực khuẩn lao ở người và trực khuẩn lỵ Flexner. Thuốc có tác dụng ức chế virus cúm (Học báo Vi sinh vật 8,164, 1960).

Tính vị quy kinh: đắng, ngọt, sáp, hơi ôn, qui kinh Can thận.

Tác dụng: Bổ huyết giữ tinh, hoà khí huyết, bổ can thận, mạnh gân xương, nhuận tràng

Công dụng: Bổ máu, chống viêm. Chữa thận suy, yếu gan; thần kinh suy nhược, ăn ngủ kém; sốt rét mạn tính, thiếu máu, ít sữa; các bệnh của phụ nữ sau khi đẻ, xích bạch đới; đau lưng, thấp khớp, di tinh, khí hư, đại tiện ra máu; đái buốt, đái dắt, đái ra máu (lao lâm); mẩn ngứa, bệnh ngoài da.

Uống lâu ngày chữa người già xơ cứng mạch máu não, huyết áp cao hoặc nam giới tinh yếu khó có con; chữa huyết hư máu nóng, tóc khô hay rụng, sớm bạc, hồi hộp chóng mặt, ù tai hoa mắt, lưng gối rũ mõi, khô khát táo bón; điều kinh bổ huyết.

Tác dụng dược lý: Thuốc có tác dụng nhuận tràng do dẫn chất oxymethylanthraquinone làm tăng nhu động ruột (Trích yếu văn kiện nghiên cứu Trung dược - Nhà xuất bản Khoa học xuất bản 1965, trang 345 - 346). Hà thủ ô sống có tác dụng nhuận tràng mạnh hơn Hà thủ ô chín.

Tính vị quy kinh:

- Sách Bản thảo cương mục: túc quyết âm, thiếu âm.
- Sách Bản thảo kinh giải: nhập túc thiếu dương đờm kinh, thủ thiếu dương tam tiêu kinh, thủ thiếu âm tâm kinh, túc thiếu âm thận kinh.
- Sách Bản thảo tái tân: nhập 3 kinh Tỳ Phế Thận.

Theo nghiên cứu của Vũ Minh Trang và cộng sự năm 2011, về các hợp chất phenolic có từ cây cỏ sữa lá nhỏ [42].

Theo nghiên cứu của Nguyễn Hải Hà và cộng sự (2011) [51], Nghiên cứu tác dụng bảo vệ gan và chống oxy hoá của bài thuốc proteclive (PL) trên mô hình gây tổn thương gan bằng paracetamol ở chuột nhắt trắng, kết quả bước đầu có tác dụng trong việc bảo vệ tế bào gan.

Theo nghiên cứu của Chử Thị Thanh Huyền và cộng sự (2012) đã nghiên cứu thành công định lượng được acid oleanolic trong cao khô đỉnh lăng bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao, có thể ứng dụng để xác định hàm lượng acid oleanolic trong cao khô đỉnh lăng nhằm tiêu chuẩn hóa nguyên liệu đầu vào cho sản xuất [52].

Theo nghiên cứu của Dương Thị Ly Hương và cộng sự (2013), đánh giá hoạt tính androgen và tác dụng trên hành vi tình dục của chế phẩm BB1 trên chuột thực nghiệm, chế phẩm BB1 đã thể hiện hoạt tính androgen rõ làm tăng trọng lượng các cơ quan sinh dục phụ và tăng nồng độ testosterone máu ở chuột non thiến [53].

Theo nghiên cứu của Phạm Văn Hiến và cộng sự (2016), Đánh giá hàm lượng adenosin và cordycepin trong các bộ phận khác nhau của đông trùng hạ thảo nuôi cấy (*Cordyceps sinensis* (Berk) Sacc bằng phương pháp HPLC, kết quả cho thấy phần ngọn nấm có hàm lượng hoạt chất cao hơn nhiều so với các phần khác [54].

Theo nghiên cứu của Phạm Văn Hiến và cộng sự (2017), nghiên cứu bào chế bột cao khô đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris* L. ex Fr. Link) nuôi cấy tại Việt Nam bằng phương pháp phun sấy [55].

Theo nghiên cứu của Lê Thị Huyền Trang và cộng sự (2017), nghiên cứu xây dựng quy trình chiết xuất adenosin và cordycepin từ đông trùng hạ thảo nuôi cấy (*Cordyceps militaris*), *kết quả*: Quy trình khảo sát thu được có độ ổn định và lặp lại cao, có thể ứng dụng quy trình này trong chiết xuất cao định chuẩn từ ĐTHT nuôi cấy để sản xuất các sản phẩm thuốc, thực phẩm chức năng [56].

Theo nghiên cứu của Thái Ngọc Trâm và cộng sự (2001), phân lập và xác định cấu trúc của lupeol và hipeol acetat từ cây hà thủ ô trắng (*Streptocaulon juventas*) [28], *kết quả*: Từ phân đoạn kém phân cực chiết từ rễ hà thủ ô trắng, đã phân lập được 2 triterpenoid có hàm lượng cao và xác định cấu trúc là lup-20-en-3-acetyloxy (lupen acetat) và lup-20-en-3-ol (lupenol). Đây có thể là lần đầu tiên lupeol acetat và lupeol được phân lập từ hà thủ ô trắng cũng như từ chi *Streptocaulon*. Công việc nghiên cứu thành phần hóa học và tác dụng sinh học của rễ củ hà thủ ô trắng vẫn đang tiếp tục [57].

#### **1.4. Nghiên cứu ung thư và ung thư gan trên thực nghiệm**

##### **1.4.1. Nghiên cứu ung thư trên thực nghiệm**

Thử nghiệm trên động vật đã đóng một vai trò quan trọng trong nghiên cứu ung thư trong suốt thời gian lịch sử qua.

Theo nghiên cứu của Kubota T. [58] trong nghiên cứu về các mô hình di căn của ung thư ở người đã được ghép cấy trên chuột nude cho thấy: Mô hình di căn của các ca phẫu thuật khối u ở người đã được phát triển bằng cách sử dụng phương pháp cấy ghép trực tiếp mô nguyên vẹn về mặt mô học (cấy ghép) của ung thư biểu mô phổi, dạ dày, ruột kết, tuyến tụy, tuyến tiền liệt và bàng quang. Các mô hình này đại diện cho toàn bộ quá trình di căn, bao gồm sự phát triển của khối u cục bộ, sự xâm lấn mạch máu và bạch huyết tại vị trí cục bộ, dòng chảy trong mạch và bạch huyết, thoát mạch tại các cơ quan di căn, và sự sinh sôi nảy nở tại các vị trí di căn liên quan. Mô hình cấy ghép trực tiếp mô nguyên vẹn dường như hữu ích để nghiên cứu cơ chế di căn nhằm phát hiện ra các chất chống di căn và đối với các khối u của bệnh nhân và cho thiết kế điều trị này.

Theo nghiên cứu của Yamaura et al [59] trong nghiên cứu về "Các khối u phổi đơn độc và sự di căn tự phát của chúng ở những con chuột nude được cấy ghép trực tiếp từ ung thư phổi không tế bào nhỏ ở người": đã kiểm tra khả năng tạo khối u và khả năng di căn của ba dòng tế bào ung thư phổi không tế bào nhỏ (NSCLC) ở người, dòng tế bào PC-14, A549 hoặc Lu-99 trong nước muối đệm phosphat có chứa Matrigel được cấy trực tiếp vào phổi của chuột nude, sự hình thành một nốt khối u đơn độc trong phổi được quan sát thấy sau khi cấy tất cả các dòng tế bào. Cấy ghép tế bào PC-14 hoặc Lu-99 trong phổi dẫn đến di căn xa tự phát. Những kết quả này chỉ ra rằng các kiểu di căn khác nhau của ung thư phổi có thể liên quan đến sự biểu hiện khác biệt của các phân tử liên quan đến di căn. Các mô hình cấy ghép trực tiếp đã hiển thị các đặc điểm lâm sàng tương tự như mô hình NSCLC và có thể cung cấp cơ sở hữu ích cho nghiên cứu ung thư phổi.

#### **1.4.2. Nghiên cứu ung thư gan trên thực nghiệm**

Cũng như trong các lĩnh vực nghiên cứu ung thư khác, các mô hình động vật gặm nhấm, đặc biệt là chuột, ngày càng trở nên quan trọng trong lĩnh vực HCC, chủ yếu do tuổi thọ và khả năng sinh sản ngắn của chúng [54]. Tuy nhiên, điều quan trọng cần đề cập là mọi mô hình động vật HCC đều là nhân tạo theo một cách nào đó. Việc thiết lập tiềm năng các mô hình động vật cấy ghép HCC ở người là một

thách thức đặc biệt, do căn nguyên phức tạp, tính không đồng nhất của khối u và tầm quan trọng của cả tình trạng viêm mãn tính và nền xơ của HCC ở người.

Các mô hình động vật đang được sử dụng trong nhiều thập kỷ để nghiên cứu về quá trình ung thư gan và để đánh giá tiềm năng chống ung thư gan của các liệu pháp và phác đồ. Mặc dù vô cùng quý giá đối với sự hiểu biết của chúng ta về các quá trình sinh lý bệnh, chúng vẫn là mô hình và không ai trong số chúng tái tạo một căn bệnh ở người. Mỗi mô hình (có nghĩa là tác nhân, thiết kế, chủng và loài) cho thấy các đặc điểm cụ thể trong bản chất của sinh bệnh học, định khu và sự tiến triển của ung thư gan [59].

Các mô hình động vật HCC có thể được phân loại như sau [13]: (i) mô hình cảm ứng hóa học, (ii) mô hình biến đổi gen, (iii) mô hình tổng hợp, (iv) mô hình cấy ghép dị loài bao gồm mô hình cấy ghép có nguồn gốc từ bệnh nhân và (v) mô hình nhân bản. Phần lớn các mô hình này có thể được kết hợp với các chế độ ăn cụ thể để tạo ra HCC liên quan đến NASH (non-alcoholic steatohepatitis) Viêm gan nhiễm mỡ không do rượu; rối loạn trao đổi chất -metabolic disorder) [60][61].

Một trong các mô hình đó là mô hình cấy ghép dị loài (xenograft), các tế bào ung thư tập trung được nuôi cấy trong ống nghiệm có thể hình thành các khối u khi được cấy dưới da vào một con chuột bị suy giảm miễn dịch lần đầu tiên được thiết lập vào năm 1969 [62]. Mô hình xenograft này kể từ đó đã chứng minh một số ưu điểm giải thích sự tồn tại của nó như là trụ cột chính trong các nghiên cứu tiền lâm sàng về thuốc chống ung thư in vivo: các khối u nhanh chóng và dễ dàng tạo ra, và vị trí dưới da của chúng cho phép đo trực tiếp sự phát triển của khối u [13].

Trong các mô hình xenograft cổ điển, HCC được thành lập bằng cách cấy các dòng tế bào khối u của người hoặc cấy trực tiếp một mảnh khối u rắn của người vào dưới da hoặc vào gan của động vật bị suy giảm miễn dịch [13].

Các mô hình xenograft trực tiếp phản ánh vi môi trường khối u, đặc biệt là ảnh hưởng của quá trình tuần hoàn mạch gan nhưng có nhiều hạn chế giống như các mô hình xenograft ngoài tử cung cổ điển. Chủ yếu, việc sử dụng vật chủ bị suy

giảm miễn dịch không cho phép người ta nghiên cứu tác dụng điều hòa miễn dịch của thuốc trong các mô hình này

Để bảo tồn tốt hơn trạng thái bệnh tự nhiên được quan sát thấy ở bệnh nhân HCC, một số nhóm sẽ cấy ghép các mảnh HCC mới được ghép lại vào động vật bị suy giảm miễn dịch. Quy trình này, được gọi là xenograft lấy từ bệnh nhân (PDX), bảo tồn các đặc điểm mô bệnh học, phiên mã và bộ gen của HCC ban đầu và thường có thể tổng hợp tốt phản ứng của thuốc hóa trị liệu. Do đó, các mô hình PDX đã chứng tỏ một tiện ích quan trọng để đánh giá thuốc độ chính xác được cá nhân hóa [63]. Phổ biến nhất là cấy ghép dưới da, nhưng tất nhiên, các mô hình PDX trực tiếp của HCC tái tạo tốt hơn vi môi trường khối u và do đó, phù hợp hơn về mặt sinh lý học. Tuy nhiên, các mô hình PDX của HCC liên quan đến xơ hóa vẫn chưa có sẵn. Những hạn chế chung của việc sử dụng các mô hình PDX là khoảng thời gian trễ dài cần thiết cho việc tham gia và truyền tải và chi phí phát triển, bảo trì và thử nghiệm PDX cao. Tuy nhiên, “gót chân Achilles” thực sự của các mô hình PDX là thiếu hệ thống miễn dịch chức năng, điều này phổ biến đối với tất cả các mô hình xenograft.

Việc kết hợp các mô hình PDX trong nghiên cứu HCC mang lại những cải tiến đáng kể và nhiều mô hình PDX ung thư gan thú vị đã được tạo ra và được sử dụng để thử nghiệm tiền lâm sàng đối với thuốc chống ung thư [63][64][65]. Gần đây, Blumer et al. đã thiết lập một số mô hình PDX từ sinh thiết HCC của người, cho thấy rằng các khối u PDX có thể giữ lại các đặc điểm của sinh thiết HCC ban đầu qua sáu thế hệ cấy ghép lại [66].

Ở Việt nam, theo nghiên cứu của Hồ Anh Sơn và CS [11], Các tác giả đã thành công tạo khối ung thư bằng ghép tế bào ung thư gan người dòng hep 3b trên chuột thiếu hụt miễn dịch bằng kỹ thuật ghép dị loài “xenograft”. Tỷ lệ tạo thành công khối ung thư trên chuột là 10/10 (100%). Kích thước khối ung thư điển hình phát triển đạt  $585,9 \pm 114,9 \text{ mm}^3$  sau 4 tuần ghép tế bào. Giải phẫu bệnh lý chứng minh hình ảnh ung thư điển hình với tế bào u to nhỏ không đều, nhân quái, nhân

chia, hình thành các ống tuyến không điển hình, xâm lấn và tăng sinh mạch máu. Trong bào tương một số tế bào u có chứa sắc tố mật.

Cũng theo nghiên cứu của Nguyễn Tuấn Anh và CS [10], các tác giả đã tạo được khối ung thư gan người dưới da đùi chuột thiếu hụt miễn dịch, tương đồng về mặt sinh học như ung thư gan trên bệnh nhân mắc bệnh UBTG.

### **1.5. Giới thiệu về các phương pháp nghiên cứu thử nghiệm mô hình gây ung thư tế bào gan nhiễm virus viêm ganB trên chuột Nude**

Đã có rất nhiều công trình, đề tài nghiên cứu khoa học về xây dựng mô hình gây ung thư tế bào gan nhiễm virus viêm gan B trên chuột Nude, tiêu biểu trong đó là các công trình, đề tài sau:

Đề tài: NGHIÊN CỨU TẠO KHỐI UNG THƯ GAN NGƯỜI TRÊN CHUỘT THIẾU HỤT MIỄN DỊCH “NUDE MICE” của các tác giả: Hồ Anh Sơn, Nguyễn Hữu Toàn, Bùi Khắc Cường; Học viện Quân Y; 2012. Các tác giả đã thành công tạo khối ung thư bằng ghép tế bào ung thư gan người dòng hep 3b trên chuột thiếu hụt miễn dịch bằng kỹ thuật ghép dị loài “xenograft”. Tỷ lệ tạo thành công khối ung thư trên chuột là 10/10 (100%). Kích thước khối ung thư điển hình phát triển đạt  $585,9 \pm 114,9 \text{ mm}^3$  sau 4 tuần ghép tế bào. Giải phẫu bệnh lý chứng minh hình ảnh ung thư điển hình với tế bào u to nhỏ không đều, nhân quái, nhân chia, hình thành các ống tuyến không điển hình, xâm lấn và tăng sinh mạch máu. Trong bào tương một số tế bào u có chứa sắc tố mật.

Đề tài: NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG MÔ HÌNH VÀ ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI UNG THƯ GAN NGƯỜI TRÊN CHUỘT THIẾU HỤT MIỄN DỊCH của các tác giả: ThS.Bs. Nguyễn Tuấn Anh, ThS. Nguyễn Hoàng Phi, ThS. Đặng Xuân Định; Trường Đại học Y khoa Vinh; 2018. Các tác giả đã Tạo được khối ung thư gan người dưới da đùi chuột thiếu hụt miễn dịch, tương đồng về mặt sinh học như ung thư gan trên bệnh nhân mắc bệnh UBTG.



## CHƯƠNG 2

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

#### 2.1. Chất liệu nghiên cứu

##### 2.1.1. Chế phẩm nghiên cứu

Viên nang cứng CTHePaB hàm lượng 0,4g, bào chế từ bài thuốc CTHePaB, đạt tiêu chuẩn cơ sở. Các dược liệu trong bài thuốc được dùng dưới dạng dược liệu khô và đạt tiêu chuẩn trong Dược điển Việt Nam V, được chế biến theo qui định của y học cổ truyền và cân theo tỷ lệ của bài thuốc.

Thành phần bài thuốc gốc (liều 2 ngày/thang) có:

Tên thuốc	Tên Khoa học	Hàm lượng (g)
Cà gai leo	<i>Solanum hainanense – Hance Solanaceae</i>	30
Cỏ sữa lá nhỏ	<i>Euphorbia thymifolia Burm</i>	20
Chi tử	<i>Gardenia jasminoides ellis</i>	10
Đại hoàng	<i>Rhem palmatum Baill</i>	05
Đình lăng	<i>Polyscias fruticosa L. Harms</i>	10
Đông trùng hạ thảo	<i>Cordyceps militaris</i>	05
Linh chi	<i>Ganoderma lucidum</i>	10
Hà thủ ô	<i>Fallopia multiflora</i>	10

Liều dùng được tính theo g bột cao khô trong viên nang/kg/ngày. Từ 10g dược liệu khô của bài thuốc CTHePaB tạo ra 0,8g bột cao khô trong viên nang CTHePaB. Liều dự kiến sử dụng trên người là 4g/người/ngày (tương ứng 50g dược liệu khô/người/ngày). Tính bình quân một người 50kg thì liều dùng dự kiến trên người sẽ là 0,08g/kg/ngày (tương ứng 1,0g dược liệu khô/kg/ngày). Quy đổi ra liều tương đương trên chuột nhất với hệ số quy đổi là 12 thì liều dự kiến có tác dụng trên chuột nude là 0,96g/kg/ngày [67].



**Hình 2.1. Hình ảnh viên nang cứng CTHePaB**

### **2.1.2. Thuốc tham chiếu**

5 – Fluorouracil (5FU), (Aduvicol), thuốc chống ung thư, loại chống chuyển hóa.

Cơ chế tác dụng của 5FU: Khi đi vào cơ thể, hoạt chất này được biến đổi thành 5 – fluorouracil-2-deoxyuridin-5'-monophosphate (5-FdUMP), chất này ức chế thymidylate synthetase, làm suy giảm thymidine triphosphate (một thành phần cần thiết của quá trình tổng hợp DNA). Nhờ đó mà ức chế quá trình sinh tổng hợp AND của tế bào ung thư, tiêu diệt tế bào ung thư.

### **2.1.3. Dòng TB ung thư biểu mô gan: Dòng TB ung thư biểu mô gan Hep3B nhiễm vi rút viêm gan B.**

### **2.1.4. Nước muối sinh lý**

Nước muối sinh lý dùng cho lô chứng sinh lý trong nghiên cứu

### **2.1.5. Dụng cụ, máy móc, thiết bị và hóa chất khác**

- Môi trường nuôi cấy và bảo quản TB: môi trường EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium), Catalog No.30-2003, ATCC được bổ sung 10% FBS và 1% kháng sinh penicillin và streptomycine.

- Hệ thống phòng thí nghiệm phục vụ nuôi cấy TB: phòng sạch, tủ ấm CO<sub>2</sub>, kính hiển vi soi ngược, máy ly tâm, tủ mát 4<sup>0</sup>C, tủ âm -20<sup>0</sup>C, -80<sup>0</sup>C, bình chứa nitơ lỏng...

- Phòng sạch nuôi chuột thiếu hụt miễn dịch.

- Hệ thống giá lồng chuột có thông khí và lọc khí độc lập.

- Thức ăn và nước uống vô trùng.

- Hệ thống kiểm soát nhiệt độ và độ ẩm.

- Máy đếm dòng chảy tế bào

- Máy xét nghiệm sinh hoá tự động Chemix 180 hãng Sysmex.

- Cân phân tích 10<sup>-4</sup>, model CP224S (Sartorius - Đức)

- Bộ dụng cụ mô động vật cỡ nhỏ, Kim cong đầu tù cho chuột uống thuốc được nhập khẩu từ Nhật Bản, thước đo kích thước khối u, và các dụng cụ thí nghiệm khác.

- Hóa chất xét nghiệm.

## 2.2. Đối tượng nghiên cứu

- **Chuột Nude:** Chuột nhắt BALB/c thiếu hụt miễn dịch, không có TB lympho T (nude mice, Foxn1nu) 8-10 tuần tuổi, cân nặng 160 - 180g.

Chuột trụi lông (Nude mouse) là một con chuột thí nghiệm từ một chủng có đột biến di truyền gây ra loại gen thymus xấu đi hoặc thiếu vắng, kết quả là hệ thống miễn dịch bị ức chế do số lượng tế bào T bị giảm đáng kể. Kiểu hình hoặc xuất hiện bên ngoài chính của con chuột là một cơ thể trần trụi thiếu lông (Nude). Cơ sở di truyền của đột biến chuột trụi lông là sự phá vỡ gen FOXN1.

Chuột Nude có giá trị để nghiên cứu vì nó có thể nhận được nhiều loại mô khác nhau và ghép tạng, vì nó không gắn kết phản ứng bài xích. Những ghép phế nang này thường được sử dụng trong nghiên cứu để kiểm tra các phương pháp mới về hình ảnh và điều trị các khối u. Danh pháp cho con chuột trụi lông đã thay đổi nhiều lần kể từ khi phát hiện ra chúng. Ban đầu chúng được mô tả là nu và điều này đã được cập nhật cho Hfh1 1nu khi gen đột biến được xác định là một đột biến trong gen homolog 11 HNF-3. Sau đó, vào năm 2000 gen chịu trách nhiệm cho sự đột

biến này được xác định là một thành viên của họ gen Fox và danh mục được cập nhật cho Foxn1nu.

Những con chuột trụi lông có đột biến tự nhiên trong gen FOXN. Di truyền chuột có mục tiêu xóa bỏ FOXN1 (con chuột "knockout") cũng cho thấy kiểu hình "trần trụi". Vì những con cái trụi lông có những tuyến vú chưa phát triển và không thể nuôi dưỡng được những con chuột non, những con chuột đực trụi lông được sinh ra với những con cái dị hợp tử.

Tuổi thọ của chuột trụi lông bình thường là 6 tháng đến một năm. Trong môi trường được kiểm soát, không mắc bệnh và với các phương pháp điều trị kháng sinh được tìm thấy trong nhiều phòng thí nghiệm thường sử dụng chuột trụi lông, chúng có thể sống gần như chuột bình thường (18 tháng đến hai năm).

Chuột Nude có thể được cấy bằng tế bào ung thư gan chuột và tế bào ung thư gan người.

- Dòng tế bào ung thư gan Hep 3B nhiễm HBV

- Khối ung thư tế bào gan nhiễm virus viêm gan B trên chuột Nude

### 2.3. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

Địa điểm: Học viện Y Dược học cổ truyền Việt Nam và Học viện Quân y

Thời gian: Từ năm 04/2020 đến năm 12/2020.

### 2.4. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.4.1. Thiết kế nghiên cứu

- Nghiên cứu thực nghiệm trên trên đĩa cấy
- Nghiên cứu thực nghiệm trên động vật (chuột Nude)

#### 2.4.2. Các bước nghiên cứu

Để triển khai đánh giá được hiệu quả của viên nang CT<sub>HepaB</sub> trên tình trạng chung của chuột Nude và một số chỉ số xét nghiệm cận lâm sàng trên chuột Nude gây ung thư tế bào gan nhiễm virus viêm gan B, chúng tôi thực hiện các bước nghiên cứu sau:

***Bước 1. Triển khai mô hình gây ung thư gan trên chuột Nude***

Để triển khai mô hình, chúng tôi thực hiện tóm tắt qua 2 nội dung sau:

- Nuôi cấy, tăng sinh tế bào ung thư gan Hep3B nhiễm virus viêm gan B trên đĩa nuôi và chăm sóc chuột nude

- Cấy ghép tế bào ung thư tế bào gan nhiễm virus viêm gan B lên đuôi chuột thiếu hụt miễn dịch.

Sau đó đánh giá thành công của việc cấy ghép tạo khối ung thư ở chuột nude, nếu thành công tiếp tục thực hiện bước tiếp theo.

***Bước 2. Thử nghiệm điều trị trên chuột Nude bị ung thư tế bào gan sau nhiễm virus viêm gan B bằng viên nang CTHePaB***

***Bước 3. Đánh giá hiệu quả điều trị ung thư tế bào gan nhiễm virus viêm gan B của viên nang cứng CTHePaB trên thực nghiệm.***

Nội dung đánh giá:

- Đánh giá tình trạng chung trên mô hình của chuột Nude

- Đánh giá một số chỉ số xét nghiệm cận lâm sàng trên mô hình chuột Nude.

**Cỡ mẫu và cách chọn mẫu**

- Chuột nude 30 con

- Dòng TB ung thư biểu mô gan Hep3B nhiễm HBV.

### **2.4.3. Phương pháp nghiên cứu**

#### **2.4.3.1. Đánh giá hiệu quả của viên nang CTHePaB trên tình trạng chung của chuột Nude gây ung thư tế bào gan nhiễm virus viêm gan B**

*a) Triển khai mô hình gây ung thư tế bào gan nhiễm virus viêm gan B trên chuột Nude.*

Dựa theo phương pháp nghiên cứu của Kubota T. [58], gây khối ung thư tế bào gan nhiễm virus viêm gan B trên chuột nude được tiến hành theo các bước sau:

**Bước 1: Nuôi cấy, tăng sinh tế bào ung thư gan Hep3B nhiễm virus viêm gan B trên đĩa nuôi và chăm sóc Nude.**

*- Nuôi cấy, tăng sinh tế bào ung thư gan Hep3B nhiễm HBV*

Nuôi cấy tế bào ung thư gan Hep3B nhiễm HBV trong môi trường EMEM, bổ sung 10% FBS và 1% kháng sinh penicillin và streptomycine. Mỗi chai nuôi cấy diện tích 75 cm<sup>2</sup> được cấy chứa 0,3-0,4 x 10<sup>6</sup> TB. Tế bào được nuôi cấy tăng sinh

và thay môi trường 3 lần/tuần ở điều kiện nhiệt độ 37<sup>0</sup>C, CO<sub>2</sub> 5%. Khi tế bào phát triển đạt 75 - 80% diện tích, tiến hành cấy chuyển sang chai mới. Phòng nuôi, trang bị và môi trường nuôi tế bào được vô khuẩn tuyệt đối.

- *Chăm sóc-nuôi chuột Nude:*

Chuột Nude, số lượng 15 con, nhập khẩu từ Công ty CharlesRiver (Hoa Kỳ) 8-10 tuần tuổi .

Chuột được nuôi trong điều kiện phòng sạch chuyên dùng, không khí được lọc và có áp lực dương tính. Thức ăn và nước uống được tiệt trùng trước khi sử dụng. Mỗi chuột được đặt trong một lồng, đặt trên hệ thống giá có thông khí độc lập và lọc qua màng bảo đảm khả năng cách ly tốt với mầm bệnh. Tất cả các thao tác trên chuột được tiến hành trong điều kiện vô trùng tuyệt đối.

Duy trì nhiệt độ phòng ở 28 ± 0,50°C, độ ẩm 55 ± 5%, ánh sáng tự động điều khiển bật lúc 7 giờ 00, tắt 19 giờ 00

### **Bước 2: Cấy ghép tế bào ung thư tế bào gan nhiễm virus viêm gan B lên đuôi chuột Nude**

Tế bào ung thư gan *Hep3B* nhiễm virus viêm gan B được cấy lên đuôi chuột để tạo khối tế bào ung thư gan của người nhiễm HBV trên chuột thiếu hụt miễn dịch.

Trước ghép, rửa tế bào 2 lần bằng dung dịch PBS 1X, sau đó, tách bằng dung dịch Trypsin-EDTA 1X. Hút dung dịch tế bào ung thư đã chuẩn bị vào bơm tiêm 1 ml với số lượng 10<sup>7</sup>/ml. Cố định chuột nude và tiêm 0,1 ml vào dưới da đuôi phải (10<sup>6</sup> TB/chuột). Quá trình thao tác thực hiện trong điều kiện vô trùng tuyệt đối.

Sau đó theo dõi :

- Theo dõi tại chỗ tiêm (đuôi phải) và toàn thân chuột hàng ngày và sự phát triển khối u bằng quan sát, sờ nắn và đo kích thước khối u 2 lần/tuần x 4 tuần.

- Xác định kích thước khối u (khối ung thư): đo bằng thước chính xác NSK, 2 lần/tuần được tính theo công thức của Yamaura [68]:

$$V = D \times R^2 \times 0,5$$

Trong đó: V: thể tích khối u ( $\text{mm}^3$ ); D: chiều dài khối u (mm); R: chiều rộng khối u (mm).

- Theo dõi trọng lượng chuột 2 lần/tuần, xác định biến đổi trọng lượng chuột giữa các lần cân kế tiếp.

*b) Thử nghiệm điều trị trên chuột ung thư tế bào gan nhiễm virus viêm gan B của viên nang CTHePaB*

Sau khi xuất hiện khối u trên chuột (ngày 14 kể từ khi cấy ghép, khi này khối u đã hình thành và phát triển, có kích thước trung bình  $70-75 \text{ mm}^3$ ), chia ngẫu nhiên 15 chuột mang khối tế bào ung thư gan người nhiễm virus B thành các lô:

- Lô chứng (10 con): uống dung dịch NaCl 0,9%.
- Lô trị (10 con): uống CTHePaB liều 0,96g/kg/24h.
- Lô tham chiếu (10 con): uống 5FU liều 10mg/kg/24h

Ngày thứ 14 kể từ khi cấy ghép được tính là ngày 0 của các chuột mang khối ung thư. Cho chuột uống thuốc theo phân lô trên, trong thời gian 4 tuần tiếp theo.

*c) Đánh giá hiệu quả của viên nang CTHePaB trên tình trạng chung của chuột Nude*

- Kích thước khối u trên chuột: qua quan sát, sờ nắn và đo kích thước chiều dài, rộng khối u bằng thước chính xác NSK, 1 lần/tuần.

$$\text{Thể tích khối u (mm}^3\text{)} = \mathbf{D \text{ (dài)} \times R^2 \text{ (rộng)} \times 0,5}$$

Quá trình đánh giá kích thước khối u dừng lại khi có chuột chết ở bất kỳ nhóm nào, những con khác vẫn được theo dõi để xác định thời gian sống thêm.

- Thời gian sống của các nhóm: thời gian sống của chuột được tính từ sau khi ghép TB ung thư. Quá trình theo dõi thời gian sống của mỗi nhóm chuột dừng lại khi toàn bộ chuột của nhóm chứng hoặc tham chiếu đều chết.

### **2.4.3.2. Đánh giá ảnh hưởng của viên nang CTHePaB trên một số chỉ số xét nghiệm cận lâm sàng trên mô hình chuột Nude gây ung thư gan nhiễm virus viêm gan B**

a) Điều trị viên nang CTHePaB cho chuột Nude đã được gây ung thư tế bào gan nhiễm virus viêm gan B có xuất hiện khối ung thư

Sau khi xuất hiện khối u trên chuột (ngày 14 kể từ khi cấy ghép, khi này khối u đã hình thành và phát triển, có kích thước trung bình 70-75 mm<sup>3</sup>), chia ngẫu nhiên 15 chuột mang khối tế bào ung thư gan người nhiễm virus B thành các lô:

- Lô chứng (10 con): uống dung dịch NaCl 0,9%.
- Lô trị (10 con): uống CTHePaB liều 0,96g/kg/24h.
- Lô tham chiếu (10 con): uống 5FU liều 10mg/kg/24h

Thời điểm ngày thứ 14 kể từ khi cấy ghép được tính là ngày 0 của các chuột mang khối ung thư. Cho chuột uống thuốc theo phân lô phân lô trên, trong thời gian 4 tuần tiếp theo.

b) Theo dõi đánh giá hiệu quả của viên nang CTHePaB lên một số chỉ số xét nghiệm cận lâm sàng trên chuột gây ung thư tế bào gan nhiễm virus viêm gan B:

- Mật độ một số tế bào miễn dịch trên lách các nhóm chuột

Sau khi kết thúc uống thuốc, mổ chuột lấy lách để đánh giá mật độ một số tế bào miễn dịch trên lách các nhóm chuột: tỉ lệ NK cell (Tế bào giết tự nhiên - natural killer cell-NK), Macrophage (đại thực bào), DC cells (Tế bào tua - Dendritic cells) bằng cách nhuộm kháng thể đặc hiệu và chạy flowcytometry.

- Định lượng HBV-DNA của tế bào khối u.

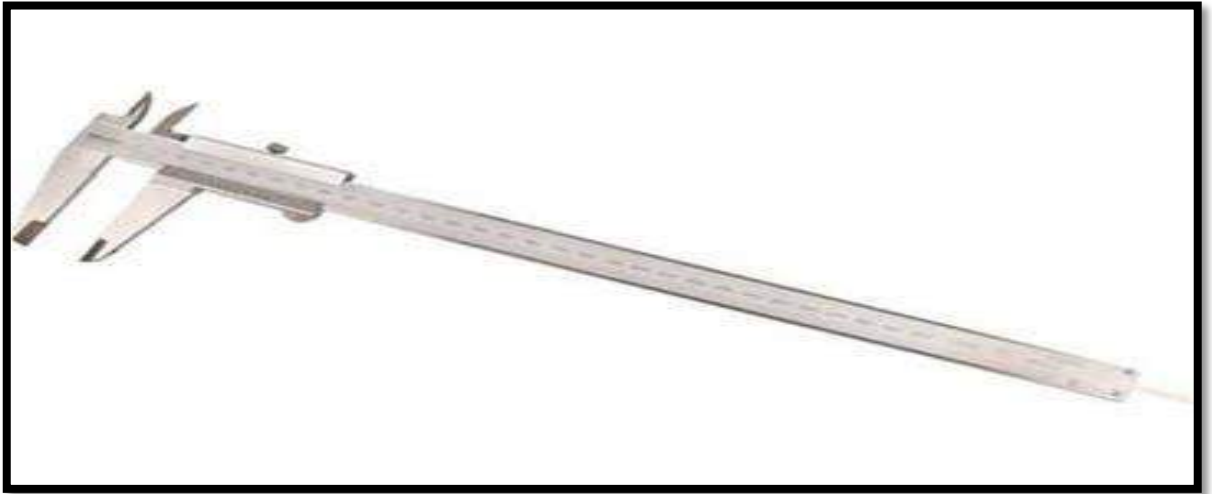
## **2.5. Các biến số, chỉ số trong nghiên cứu**

### **2.5.1. Đánh giá hiệu quả của việc triển khai mô hình gây khối ung thư TB gan nhiễm virus viêm gan B trên chuột Nude**

#### **2.5.1.1. Theo dõi và xác định sự hình thành khối ung thư trên chuột Nude.**

- Đánh giá theo dõi sự phát triển của khối u tại vị trí tiêm (đùi Phải) 2 lần/tuần, bằng quan sát, sờ nắn và đo kích thước khối u bằng thước chính xác NSK





Hình 2.1: Thước kẹp NSK

- Xác định kích thước khối u: Đo theo hai kích thước dài x rộng bằng thước kẹp chính xác NSK (Nhật Bản), 2 lần/tuần được tính theo công thức (Yamaura và Cộng sự, 2000) [68]:

$$V = D \times R^2 \times 0,5$$

Trong đó: V: thể tích khối u ( $\text{mm}^3$ )

D: chiều dài khối u (mm)

R: chiều rộng khối u (mm).

- Theo dõi trọng lượng chuột 2 lần/tuần, xác định biến đổi trọng lượng chuột giữa các lần cân kế tiếp

- Chỉ tiêu đánh giá:

- + Tỷ lệ chuột xuất hiện khối u
- + Kích thước khối u trung bình tại các thời điểm trước điều trị
- + Trọng lượng cơ thể chuột tại các thời điểm trước điều trị
- + Tỷ lệ sống/ chết của chuột trước điều trị
- + Hình ảnh đại thể của khối ung thư trước điều trị

#### **2.5.1.2. Theo dõi hiệu quả của viên nang CT HepaB trên tình trạng chung của chuột Nude đã mang khối ung thư**

- Hình ảnh đại thể khối ung thư của các nhóm sau điều trị

- Kích thước khối u trung bình của các nhóm sau khi điều trị
- Tỷ lệ sống/chết sau 4 tuần điều trị
- Trọng lượng chuột trung bình của các lô sau điều trị

### **2.5.2. Đánh giá tác dụng điều trị của viên nang CTHePaB trên một số chỉ số xét nghiệm cận lâm sàng trên mô hình chuột Nude đã gây khối ung thư tế bào gan người nhiễm virus viêm gan B**

Đánh giá mật độ một số tế bào miễn dịch trên chuột mang u được cho uống chế phẩm: Đánh giá tỷ lệ NK cell, Macrophage, Tế bào tua) trong lách chuột được điều trị bằng các chế phẩm bằng cách nhuộm kháng thể đặc hiệu và chạy flowcytometry (Đánh giá tỷ lệ tế bào tiêu diệt tự nhiên (NK cell); Đại thực bào (Macrophage) ; Tế bào tua (Dendritic cells - DC)

Định lượng HBV-DNA của tế bào khối u sau thời gian điều trị.

Đánh giá các chỉ tiêu huyết học, một số chỉ tiêu sinh hóa đánh giá chức năng gan, thận so sánh giữa các nhóm sau khi uống thuốc (sau 3 tuần điều trị giết chuột làm xét nghiệm)

### **2.6. Sai số và biện pháp khống chế sai số**

Để hạn chế các sai số trong quá trình nghiên cứu, nghiên cứu này thực hiện một số quy định yêu cầu: cho chuột nhịn ăn trước 12h , trọng lượng của chuột đồng đều.

### **2.7. Phân tích và xử lý số liệu**

Các số liệu được xử lý theo các phương pháp thống kê y sinh học, so sánh bằng anova, hậu kiểm Turkey test, sử dụng phần mềm SPSS 16.0. Số liệu được biểu diễn dưới dạng  $\bar{X} \pm SD$ . Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi  $p < 0,05$ .

Sử dụng thuật toán: tính tỷ lệ phần trăm (%), tính số trung bình, tính độ lệch chuẩn (SD). Student - t test

### **2.8. Đạo đức trong nghiên cứu**

Nghiên cứu đã được thực hiện xác định độc tính cấp, độc tính bán trường diễn và một số tác dụng dược lý của viên nang cứng CTHePaB trên thực nghiệm

nhằm mục đích tìm ra thêm một phương pháp điều trị mới đảm bảo an toàn và hiệu quả cho bệnh nhân bị viêm gan ngoài ra không có bất cứ mục đích nào khác.

Nghiên cứu được Hội đồng khoa học & đào tạo, Hội đồng thông qua đề cương Học viện Y dược học cổ truyền Việt Nam thông qua.

Các số liệu thu thập trong nghiên cứu là hoàn toàn trung thực, có độ tin cậy và chính xác cao.

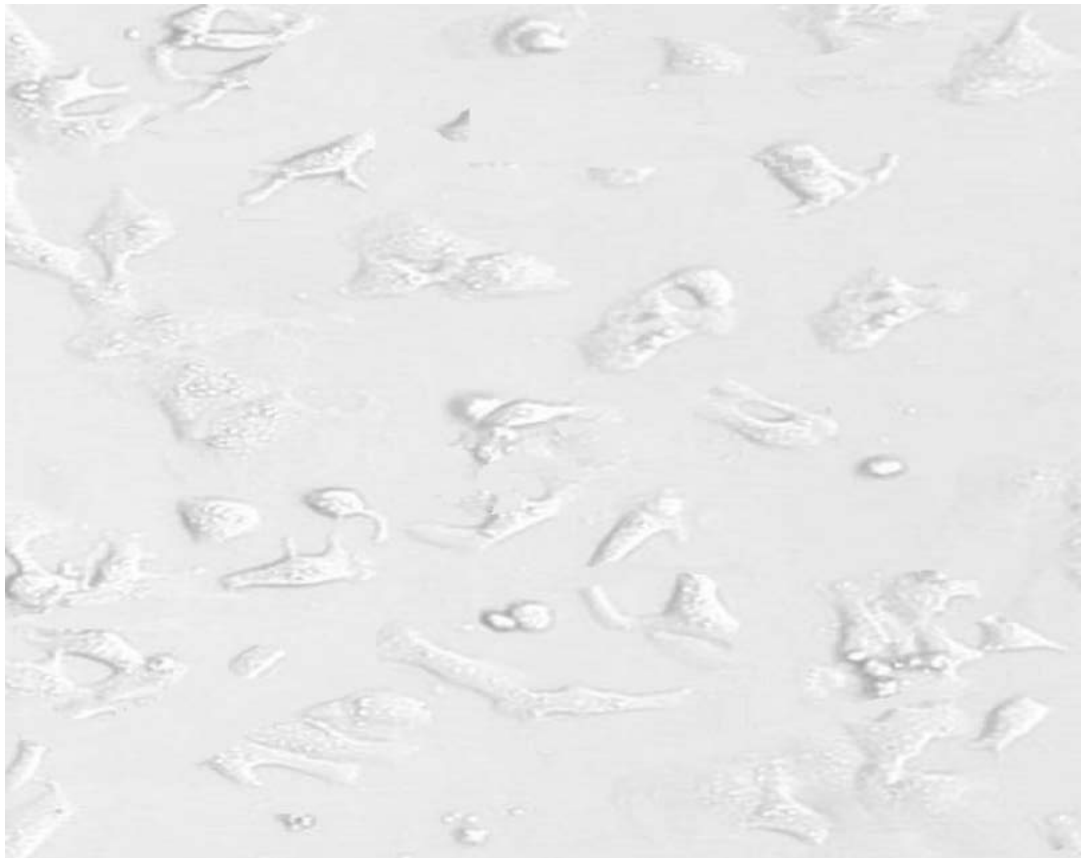
### CHƯƠNG 3

#### KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

#### 3.1. Triển khai mô hình gây khối ung thư tế bào gan nhiễm virus viêm gan B trên chuột Nude

##### 3.1.1. Kết quả nuôi cấy, tăng sinh tế bào ung thư gan.

Tế bào ung thư gan Hep3B nhiễm virus viêm gan B được nuôi cấy, tăng sinh trong môi trường EMEM, bổ sung 10% FBS và 1% kháng sinh penicillin và streptomycine. Mỗi chai nuôi cấy diện tích 75 cm<sup>2</sup> được cấy chứa  $4 \times 10^6$  TB. Phòng nuôi, trang bị và môi trường nuôi tế bào được vô khuẩn tuyệt đối.



Hình 3.1. Tế bào ung thư gan khi mới gieo vào môi trường, mật độ 0,3-0,4 x 10<sup>6</sup> tế bào/chai.

Kết quả hình 3.1 cho thấy:

Tế bào bắt đầu tăng sinh sau 24 giờ gieo, với số lượng TB gieo ban đầu khoảng  $0,3 - 0,4 \times 10^6$ /chai, diện tích che phủ chai đạt khoảng 25 - 30%.



**Hình 3.2. Hình ảnh TB ung thư gan người Hep 3B phủ khoảng 75% diện tích chai nuôi sau 6 ngày nuôi cấy.**

Kết quả hình 3.2 cho thấy:

Tốc độ tăng sinh TB cao nhất trong khoảng 2 - 5 ngày sau gieo. Sau 5 ngày, diện tích che phủ chai nuôi lên tới 65 - 70%. Sau thời điểm này, tốc độ tăng sinh TB chậm lại và đạt 80% diện tích chai nuôi sau 7 - 8 ngày.

Theo khuyến cáo của nhà cung cấp, lúc này là thời điểm thu hoạch TB để tiến hành thử nghiệm hoặc lưu giữ.

Số lượng TB mỗi chai nuôi đạt trung bình  $10^6$  TB

### 3.1.2. Kết quả cấy ghép tế bào ung thư gan nhiễm virus viêm gan B

**Bảng 3.1. Tỷ lệ chuột hình thành khối ung thư gan trên đùi chuột theo thời gian**

Ngày sau ghép	Số chuột hình thành khối ung thư gan (n=15)	
	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Ngày 1	0	0,0
Ngày 2	0	0,0
Ngày 3	0	0,0
Ngày 4	0	0,0
Ngày 5	0	0,0
Ngày 6	0	0,0
Ngày 7	6	40,0
Ngày 8	8	53,3
Ngày 9	11	73,3
Ngày 10	14	93,3
Ngày 11	15	100,0

Kết quả bảng 3.1 cho thấy: Từ ngày 1 đến ngày thứ 6 sau khi tiêm TB ung thư gan người Hep 3B vào đùi phải chuột, thì tất cả các con chuột được tiêm chưa hình thành khối ung thư.

Đến ngày thứ 7 sau khi tiêm, xuất hiện khối ung thư ở 6 con chuột (40,0% số chuột). Sau đó số con chuột xuất hiện khối ung thư tăng dần và đến ngày thứ 11 thì 15\15 con xuất hiện khối ung thư (100,0% số chuột).

**Bảng 3.2. Kích thước khối ung thư gan trên đuôi chuột**

Ngày sau ghép	Kích thước khối u (mm <sup>3</sup> ) (mean ± SD, n =15)
Ngày 11	38,6 ± 8,5
Ngày 14	74,6 ± 14,3
Ngày 18	108,9 ± 22,5
Ngày 21	219,6 ± 42,6
Ngày 25	385,2 ± 65,8
Ngày 28	588,1 ± 116,4

Kết quả bảng 3.2 cho thấy: Sau ghép 11 ngày, khối ung thư xuất hiện ở tất cả các con chuột, với kích thước trung bình 38,6 mm<sup>3</sup>. Sau đó khối u phát triển liên tục theo thời gian đến khi kết thúc thí nghiệm.

Kết quả ở ngày 14 sau ghép tế bào có 100% số chuột hình thành và phát triển khối u, có kích thước trung bình 70-75 mm<sup>3</sup> kích thước khối u đạt 74,6 ± 14,3 mm<sup>3</sup>.

Tốc độ phát triển mạnh khi khối u đạt kích thước trung bình 219,6 mm<sup>3</sup> ± 42,6, tại thời điểm 21 ngày sau ghép TB. Chỉ trong vòng 1 tuần, khối u tăng gần gấp 3 lần kích thước, sau 2 tuần tăng gần 10 lần. Và tại thời điểm kết thúc theo dõi (28 ngày) kích thước trung bình 588,1 ± 116,4 mm<sup>3</sup>.

**Hình 3.3.** Hình ảnh khối u hình thành và phát triển ở đuôi phải chuột

### 3.1.3. Đánh giá sự phát triển của khối u và thời gian sống của chuột mang khối u:

#### 3.1.3.1. Sự thay đổi kích thước khối u của chuột

Kết quả ở ngày 14 sau ghép tế bào có 100% số chuột hình thành và phát triển khối u, có kích thước trung bình 70-75 mm<sup>3</sup> kích thước khối u đạt  $74,6 \pm 14,3$  mm<sup>3</sup>.

Tại thời điểm này được tính là ngày 0 của các chuột mang khối ung thư.

Kích thước khối u được đo bằng thước đo chính xác, sau đó được tính toán ra thể tích khối u (mm<sup>3</sup>)

**Bảng 3.3. Kích thước khối u của các lô chuột nghiên cứu trong 21 ngày đầu sau khi uống thuốc (mm<sup>3</sup>)**

Ngày sau khi uống thuốc	Lô chứng (1)	Lô trị (2)	Lô tham chiếu (3)	p
<b>Ngày 0</b>	74,35 ± 15,26	74,69 ± 16,52	74,59 ± 18,21	p <sub>2,3-1</sub> > 0,05 p <sub>2-3</sub> > 0,05
<b>Ngày 7</b>	221,62 ± 19,64	218,65 ± 21,06	212,32 ± 20,68	p <sub>2,3-1</sub> > 0,05 p <sub>2-3</sub> > 0,05
<b>Ngày 14</b>	591,45 ± 62,24	586,91 ± 61,33	580,92 ± 71,02	p <sub>2-3</sub> > 0,05 p <sub>2-3</sub> > 0,05
<b>Ngày 21</b>	792,47 ± 96,93	789,64 ± 102,33	779,96 ± 101,54	p <sub>2,3-1</sub> > 0,05 p <sub>2-3</sub> > 0,05

Kết quả bảng 3.3 cho thấy: Trong 3 tuần đầu tiên của điều trị, kích thước trung bình khối ung thư của các nhóm chuột giữa lô trị (dùng CTHepaB); lô tham chiếu (dùng 5Flu) so với lô chứng (dùng nước muối sinh lý) không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (p > 0,05).



**Bảng 3.4. Kích thước khối u của các lô chuột nghiên cứu từ ngày 21 đến ngày 63 sau khi uống thuốc (mm<sup>3</sup>)**

<b>Ngày sau khi uống thuốc</b>	<b>Lô chứng (1)</b>	<b>Lô trị (2)</b>	<b>Lô tham chiếu (3)</b>	<b>p</b>
<b>Ngày 35</b>	986,36 ± 102,62	968,46 ± 116,48	960,95 ± 121,09	p <sub>2,3-1</sub> > 0,05 p <sub>2-3</sub> > 0,05
<b>Ngày 42</b>	1194,84 ± 106,56	1126,19 ± 112,44	1118,95 ± 116,36	p <sub>2,3-1</sub> < 0,05 p <sub>2-3</sub> > 0,05
<b>Ngày 49</b>	1356,49 ± 121,43	1268,42 ± 132,46	1259,28 ± 139,54	p <sub>2,3-1</sub> < 0,05 p <sub>2-3</sub> > 0,05
<b>Ngày 56</b>	1562,96 ± 216,83	1432,68 ± 236,71	1425,89 ± 241,05	p <sub>2,3-1</sub> < 0,05 p <sub>2-3</sub> > 0,05
<b>Ngày 63</b>	1792,64 ± 261,85	1596,67 ± 283,64	1588,24 ± 279,44	p <sub>2,3-1</sub> < 0,05 p <sub>2-3</sub> > 0,05

Kết quả bảng 3.4 cho thấy: Ngày thứ 35, kích thước trung bình của khối u ở các lô trị và lô tham chiếu nhỏ hơn lô chứng (968,46 so với 960,95 và 986,36) ; lô trị nhỏ hơn lô tham chiếu(968,46 so với 960,95), tuy nhiên nhỏ hơn chưa có ý nghĩa thống kê, p>0,05.

Từ ngày thứ 42 đến ngày 63, kích thước trung bình của khối u ở các lô trị và lô tham chiếu nhỏ hơn lô chứng, sự nhỏ hơn này khác nhau có ý nghĩa thống kê, p<0,05; kích thước trung bình của khối u ở lô trị nhỏ hơn lô tham chiếu, tuy nhiên nhỏ hơn chưa có ý nghĩa thống kê, p>0,05.

Khối u của các lô chuột vẫn tăng dần đều theo thời gian, trong đó kích thước khối u ở lô chứng tăng nhanh nhất. Đến ngày 63 thì có 01 chuột lô chứng chết, quá trình đo kích thước khối u được dừng lại.

### 3.1.3.2. Tỷ lệ sống chết của các lô chuột

**Bảng 3.5. Số chuột sống sót ở các lô chứng, lô tham chiếu và lô trị.**

Lô chuột		Số ngày tính từ thời điểm bắt đầu uống thuốc chuột sống sót					
		1	63	70	76	85	90
Lô chứng (1)	n	5	4	2	1	0	0
	%	100,0	80,0	40,0	20,0	0,0	0,0
Lô trị (2)	n	5	5	4	3	2	1
	%	100,0	100,0	80,0	60,0	40,0	20,0
Lô tham chiếu (3)	n	5	5	4	2	1	0
	%	100,0	100,0	80,0	40,0	20,0	0
p		> 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05

Kết quả bảng 3.5 cho thấy: Sau khi đã hình thành khối u, chuột được uống thuốc nghiên cứu trong vòng 1 tháng.

Ở lô chứng (dùng nước muối sinh lý): tại thời điểm 63 ngày tính từ thời điểm bắt đầu uống thuốc, đã xuất hiện chuột chết 20% tổng số con ở lô chứng. Các ngày tiếp theo chuột chết dần, ngày thứ 70 chuột chết 60%; ngày thứ 76 chuột chết 80%; đến ngày 85 toàn bộ số chuột ở lô chứng đã chết hết.

Ở lô trị (dùng CTHePaB): tại thời điểm 63 ngày tính từ thời điểm bắt đầu uống thuốc, chưa xuất hiện chuột chết. Đến ngày thứ 70 chuột chết 20%; ngày thứ 76 chuột chết 40%; đến ngày 90 vẫn còn 20% chuột chưa chết.

So sánh giữa 2 lô trị và chứng, tỷ lệ chuột chết ở lô trị giảm hơn và kéo dài thời gian sống hơn lô chứng. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ , từ ngày thứ 63.

Ở lô tham chiếu (dùng 5FU): tại thời điểm 63 ngày tính từ thời điểm bắt đầu uống thuốc, chưa xuất hiện chuột chết; bắt đầu ngày thứ 70 chuột chết 20%; sau 85 ngày chết 80% và kết thúc 90 ngày không còn con chuột nào sống

So sánh giữa 2 lô tham chiếu và chứng, tỷ lệ chuột chết ở lô tham chiếu giảm hơn và kéo dài thời gian sống hơn lô chứng. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ , từ ngày thứ 63.

So sánh giữa 2 lô trị và lô tham chiếu, tỷ lệ chuột chết ở lô trị giảm hơn và kéo dài thời gian sống hơn lô tham chiếu. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ , từ ngày thứ 76

### 3.1.3.3. Thời gian sống trung bình của các lô chuột

**Bảng 3.6. Thời gian sống trung bình của các lô chuột tính đến thời điểm kết thúc thí nghiệm giữa lô chứng, lô tham chiếu và lô trị**

Lô	Số mẫu NC	Thời gian sống trung bình (ngày)	$\pm$ SD
Lô chứng	5	68,60	5,77
Lô trị	5	81,80	8,61
Lô tham chiếu	5	79,20	8,11
<b>p</b>		$<0,05$	

Kết quả bảng 3.6 cho thấy:

Ở lô chứng (dùng nước muối sinh lý): Thời gian sống trung bình của chuột 68,60 ngày.

Ở lô trị (dùng CTHePaB): Thời gian sống trung bình của chuột 81,80 ngày

So sánh giữa 2 lô trị và chứng, Thời gian sống trung bình của chuột ở lô trị kéo dài thời gian sống hơn lô chứng (81,80 ngày so với 68,60 ngày). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ .

Ở lô tham chiếu (dùng 5 FU): Thời gian sống trung bình của chuột 79,20 ngày

So sánh giữa 2 lô tham chiếu và chứng, thời gian sống trung bình của chuột ở lô tham chiếu kéo dài thời gian sống hơn lô chứng (79,20 ngày so với 68,60 ngày). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ .

So sánh giữa 2 lô trị và tham chiếu, thời gian sống trung bình của chuột ở lô trị kéo dài thời gian sống hơn lô tham chiếu (81,80 ngày so với 79,20 ngày), tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê với  $p > 0,05$ .

### 3.2. Đánh giá tác dụng điều trị của viên nang CTHEPAB trên chuột mang khối u

#### 3.2.1. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của CTHePaB lên tế bào NK trong lách chuột mang khối u

**Bảng 3.7. Số lượng tế bào NK trong lách chuột mang khối u giữa lô chứng, lô tham chiếu và lô trị**

Lô	Số mẫu NC	Số lượng tế bào NK trung bình ( $\times 10^6$ )	$\pm$ SD
Lô chứng	5	1,26	0,24
Lô trị	5	1,43	0,19
Lô tham chiếu	5	1,16	0,21
<b>p</b>		$< 0,05$	

Kết quả bảng 3.7 cho thấy:

Ở lô chứng (dùng nước muối sinh lý): Số lượng tế bào NK trong lách chuột mang khối u là  $1,26 \times 10^6$ .

Ở lô trị (dùng CTHePaB): Số lượng tế bào NK trong lách chuột mang khối u là  $1,43 \times 10^6$

So sánh giữa 2 lô trị và chứng, số lượng tế bào NK trong lách chuột mang khối u của lô trị tăng so với lô chứng không dùng thuốc ( $1,43 \times 10^6$  so với  $1,26 \times 10^6$ ), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$

Ở lô tham chiếu (dùng 5 FU): Số lượng tế bào NK trong lách chuột mang khối u là  $1,16 \times 10^6$

So sánh giữa 2 lô tham chiếu và chứng, số lượng tế bào NK trong lách chuột mang khối u của lô tham chiếu giảm so với lô chứng không dùng thuốc ( $1,16 \times 10^6$  so với  $1,26 \times 10^6$ ), tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê với  $p > 0,05$ .

So sánh giữa 2 lô trị và lô tham chiếu, số lượng tế bào NK trong lách chuột mang khối u của lô trị tăng so với lô chứng không dùng thuốc ( $1,43 \times 10^6$  so với  $1,16 \times 10^6$ ), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ .

### 3.2.2. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của CTHepaB lên tế bào Macrophage trong lách chuột mang khối u:

**Bảng 3.8. Tỷ lệ tế bào Macrophage trong lách chuột mang khối u giữa lô chứng, lô tham chiếu và lô trị**

Lô	Số mẫu NC	Tế bào Macrophage (%)	± SD
Lô chứng	5	5,86	0,35
Lô trị	5	6,97	0,82
Lô tham chiếu	5	5,24	0,71
<b>p</b>		<b>&lt; 0,05</b>	

Kết quả bảng 3.8 cho thấy:

Ở lô chứng (dùng nước muối sinh lý): Tỷ lệ tế bào Macrophage trong lách chuột gây ung thư tế bào gan nhiễm virus viêm gan B là 5,86%

Ở lô trị (dùng CTHepaB): Tỷ lệ tế bào Macrophage trong lách chuột gây ung thư tế bào gan nhiễm virus viêm gan B là 6,97%.

So sánh giữa 2 lô trị và chứng, Tỷ lệ tế bào Macrophage trong lách chuột gây ung thư tế bào gan nhiễm virus viêm gan B lô trị tăng so với lô chứng không dùng thuốc (6,97% so với 5,86%), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ .

Ở lô tham chiếu (dùng 5 FU): Tỷ lệ tế bào Macrophage trong lách chuột gây ung thư tế bào gan nhiễm virus viêm gan B là 5,24%

So sánh giữa 2 lô tham chiếu và chứng, tỷ lệ tế bào Macrophage trong lách chuột gây ung thư tế bào gan nhiễm virus viêm gan B lô tham chiếu giảm so với lô

chúng không dùng thuốc (5,24% so với 5,86%), tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê với  $p > 0,05$ .

So sánh giữa 2 lô trị và tham chiếu, tỷ lệ tế bào Macrophage trong lách chuột gây ung thư tế bào gan nhiễm virus viêm gan B lô trị tăng so với lô tham chiếu (6,97% so với 5,24%), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ .

### 3.2.3. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của CTHepaB lên tế bào tua (DC) trong lách chuột gây ung thư tế bào gan nhiễm virus viêm gan B

**Bảng 3.9. Tỷ lệ tế bào tua (DC) trong lách chuột mang khối u giữa lô chứng, lô tham chiếu và lô trị**

Lô	Số mẫu NC	Tế bào tua (%)	$\pm$ SD
Lô chứng	5	2,35	0,29
Lô trị	5	3,51	0,43
Lô tham chiếu	5	2,08	0,53
<b>p</b>		<b>&lt; 0,05</b>	

Kết quả bảng 3.9 cho thấy:

Ở lô chứng (dùng nước muối sinh lý): Số lượng tế bào tua trong lách chuột gây ung thư tế bào gan nhiễm virus viêm gan B là 2,35%

Ở lô trị (dùng CTHepaB): Số lượng tế bào tua trong lách chuột gây ung thư tế bào gan nhiễm virus viêm gan B là 3,51%.

So sánh giữa 2 lô trị và chứng, số lượng tế bào tua trong lách chuột gây ung thư tế bào gan nhiễm virus viêm gan B lô trị tăng so với lô chứng không dùng thuốc (3,51% so với 2,35%), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ .

Ở lô tham chiếu (dùng 5 FU): Số lượng tế bào tua trong lách chuột gây ung thư tế bào gan nhiễm virus viêm gan B là 2,08%.

So sánh giữa 2 lô tham chiếu và chứng, số lượng tế bào tua trong lách chuột gây ung thư tế bào gan nhiễm virus viêm gan B lô tham chiếu giảm so với lô chứng

không dùng thuốc (2,08% so với 2,35%), tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê với  $p > 0,05$ .

So sánh giữa 2 lô trị và tham chiếu, số lượng tế bào tua trong lách chuột mang khối u của lô trị tăng so với lô tham chiếu (3,51% so với 2,08%), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ .

### 3.2.4. Kết quả định lượng HBV-DNA của tế bào khối u trên chuột nude sau thời gian điều trị

**Bảng 3.10. Định lượng HBV-DNA trong tế bào khối u trên chuột giữa lô chứng, lô tham chiếu và lô trị**

Lô	Số mẫu NC	HBV-DNA trung bình ( $\times 10^5$ UI)	$\pm$ SD
Lô chứng	5	12,68	2,93
Lô trị	5	10,84	2,61
Lô tham chiếu	5	12,36	2,84
<b>p</b>		$< 0,05$	

Kết quả bảng 3.10 cho thấy:

Ở lô chứng (dùng nước muối sinh lý): định lượng HBV-DNA trong tế bào khối u trên chuột trung bình là  $12,68 \times 10^5$ .

Ở lô trị (dùng CT<sub>HepaB</sub>): định lượng HBV-DNA trong tế bào khối u trên chuột trung bình là  $10,84 \times 10^5$ .

So sánh giữa 2 lô trị và chứng, định lượng HBV-DNA trong tế bào khối u trên chuột có xu hướng thấp hơn so với lô chứng ( $10,84 \times 10^5$  so với  $12,68 \times 10^5$ ), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê,  $p < 0,05$ .

Ở lô tham chiếu (dùng 5 FU): lượng HBV-DNA trong tế bào khối u trên chuột trung bình là  $12,36 \times 10^5$ .

So sánh giữa 2 lô tham chiếu và chứng, lượng HBV-DNA trong tế bào khối u chuột trung bình lô tham chiếu giảm so với lô chứng không dùng thuốc

( $12,36 \times 10^5$  so với  $12,68 \times 10^5$ ), tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê với  $p > 0,05$

So sánh giữa 2 lô trị và tham chiếu, lượng HBV-DNA trong tế bào khối u thấp hơn so với lô tham chiếu ( $10,84 \times 10^5$  so với  $12,36 \times 10^5$ ), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê,  $p < 0,05$ .



## CHƯƠNG 4

### BÀN LUẬN

#### **4.1. Nghiên cứu triển khai mô hình gây khối ung thư gan người nhiễm virus viêm gan B trên chuột nude**

Ung thư biểu mô tế bào gan (HCC) là loại ung thư gan phổ biến nhất ở người lớn và có tỷ lệ tử vong cao nhất trong các loại ung thư thể rắn. Tỷ lệ mắc ung thư biểu mô tế bào gan đã tăng trong 20 năm qua và sẽ sớm vượt qua một triệu trường hợp hàng năm trên toàn thế giới [23]. Nhiễm virus mãn tính với HBV hoặc HCV, thực phẩm nhiễm aflatoxin, uống rượu mãn tính và rối loạn chuyển hóa là những nguyên nhân chính gây viêm gan mãn tính dẫn đến xơ hóa hoặc xơ gan, hoặc cả hai, và cuối cùng để phát triển HCC. Mặc dù sự phân bố của các yếu tố nguy cơ này rất khác nhau, tùy thuộc vào khu vực địa lý hoặc nhóm dân tộc, 90% các trường hợp ung thư biểu mô tế bào gan luôn phát triển trên nền viêm mãn tính và xơ hóa / xơ gan. Hệ thống miễn dịch của gan đóng một vai trò quan trọng và vốn dĩ góp phần vào mức độ nghiêm trọng của tổn thương viêm hoại tử, hình thành xơ hóa gan và sự tiến triển của bệnh thành HCC [24][25].

Mô hình thực nghiệm của ung thư biểu mô tế bào gan [69], các mô hình này sẽ là công cụ trong việc đánh giá các hợp chất nhắm vào các con đường phân tử cụ thể trong các nghiên cứu tiền lâm sàng trong tương lai.

Chúng tôi đã mô tả cả hai mô hình sinh ung thư truyền thống, trong đó sự biểu hiện của chất sinh ung thư và gen ức chế khối u được thay đổi di truyền để tạo ra HCC và các mô hình khác trong đó sự hình thành khối u phụ thuộc vào tình trạng viêm. Lịch sử tự nhiên của sự phát triển HCC ở người, kết hợp với bằng chứng cho thấy các đột biến gen đôi khi không tạo ra khối u trừ khi do tác nhân tiền viêm khởi phát, nhấn mạnh sự cần thiết phải phát triển các mô hình mới trong đó HCC phát triển tự phát trong môi trường xơ hóa, để tóm tắt tốt nhất quá trình bệnh tật của con người. Ngoài ra, các nghiên cứu bộ gen chức năng tích hợp đã gợi ý rằng các HCC ở người có thể được phân loại thành các nhóm phụ dựa trên sự kích hoạt con đường phân tử. So sánh biểu hiện gen giữa các mô hình chuột và HCC ở người có thể cho

phép chúng tôi tạo ra các mô hình chuột trong tương lai tổng hợp các phân nhóm khác nhau, điều này sẽ tạo thành mô hình lý tưởng cho các nghiên cứu tiền lâm sàng.

Mô hình xenograft ngoài tử cung dòng tế bào, trong đó các tế bào HCC của con người được cấy chủ yếu vào dưới da, đã được sử dụng rộng rãi trong lĩnh vực HCC trong nhiều thập kỷ. Tính dễ dàng và nhanh chóng mà các mô hình này được điều chế khiến chúng trở thành một mô hình tiền lâm sàng hấp dẫn để sàng lọc các loại thuốc gây độc tế bào. Tuy nhiên, kết quả thu được với các mô hình này thường dự đoán không đầy đủ về kết quả lâm sàng ở người, như đã được xem xét ở những nơi khác [70][71]. Một trong những lý do được đưa ra là nhu cầu phát triển khối u ở những con chuột bị suy giảm miễn dịch, điều này không phản ánh quá trình năng động của giám sát miễn dịch khối u. Do đó, hệ thống miễn dịch chức năng bị thiếu trong các mô hình này. Thứ hai, các mô hình này không tính đến vi môi trường gan. Điều này dẫn đến mô hình mà vi môi trường khối u cực kỳ nhân tạo với sự vắng mặt hoàn toàn của mô sợi xung quanh.

#### **4.1.2. Kết quả cấy ghép tế bào ung thư gan nhiễm virus viêm gan B**

Từ ngày 1 đến ngày thứ 6 sau khi tiêm TB ung thư gan người Hep 3B vào đuôi phải chuột, thì tất cả các con chuột được tiêm chưa hình thành khối ung thư.

Đến ngày thứ 7 sau khi tiêm, xuất hiện khối ung thư ở 6 con chuột (40,0% số chuột). Sau đó số con chuột xuất hiện khối ung thư tăng dần và đến ngày thứ 11 thì 15\15 con xuất hiện khối ung thư (100,0% số chuột) (bảng 3.1).

Sau ghép 11 ngày, khối ung thư xuất hiện ở tất cả các con chuột, với kích thước trung bình  $38,6 \text{ mm}^3$ . Sau đó khối u phát triển liên tục theo thời gian đến khi kết thúc thí nghiệm.

Kết quả ở ngày 14 sau ghép tế bào có 100% số chuột hình thành và phát triển khối u, có kích thước trung bình 70-75  $\text{mm}^3$  kích thước khối u đạt  $74,6 \pm 14,3 \text{ mm}^3$ . Tốc độ phát triển mạnh khi khối u đạt kích thước trung bình  $219,6 \text{ mm}^3 \pm 42,6$ , tại thời điểm 21 ngày sau ghép TB. Chỉ trong vòng 1 tuần, khối u tăng gần gấp 3 lần kích thước, sau 2 tuần tăng gần 10 lần. Và tại thời điểm kết thúc theo dõi (28 ngày)

kích thước trung bình  $588,1 \pm 116,4 \text{ mm}^3$  (bảng 3.2).

Mặc dù tế bào ung thư gan Hep 3B có nhiễm virus viêm gan B được nuôi cấy tăng sinh thành công, với đặc điểm về khả năng bám dính và tăng sinh tốt, tuy nhiên do đây là tế bào ung thư người, khi cấy ghép lên chuột, sẽ là tế bào dị loài (khác loài) nên sẽ xảy ra quá trình đào thải tế bào. Để tế bào bám dính, phát triển được trên chuột, chúng tôi đã dùng chuột nude gây suy giảm miễn dịch. Khi đó đáp ứng miễn dịch yếu của chuột nên phản ứng thải loại rất yếu, mới cho phép tế bào ung thư nhiễm virus viêm gan B phát triển thành khối u trên chuột. Do suy giảm miễn dịch, chuột rất dễ mắc các bệnh lý khác.

Vì vậy, việc chăm sóc chuột và quá trình cấy ghép tế bào lên chuột phải bảo đảm vô trùng tuyệt đối. Với việc tuân thủ đúng quy trình vô khuẩn, chăm sóc và cấy ghép, mô hình gây khối ung thư tế bào gan trên chuột nude của chúng tôi đã được thực hiện thành công, với 100% số chuột đều hình thành khối u, không có chuột nào chết trong quá trình gây khối u. Sau 28 ngày ghép khối u có kích thước trung bình là  $588,1 \text{ mm}^3$ . Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Nguyễn Tuấn Anh [10], đã ghép thành công tế bào Hep3B trên chuột nude, tỷ lệ mọc u 100%, kích thước trung bình là  $593,6 \text{ mm}^3$ .

Kỹ thuật này tạo ra các khối u với kích thước tương đối đồng đều về mặt sinh học với khối u trên người.

#### **4.1.3. Đánh giá sự phát triển của khối u trên chuột nude và tỷ lệ sống, thời gian sống của chuột mang khối u**

##### **4.1.3.1. Sự thay đổi kích thước khối u của chuột**

Kết quả ở ngày 14 sau ghép tế bào có 100% số chuột hình thành và phát triển khối u, có kích thước trung bình 70-75  $\text{mm}^3$  kích thước khối u đạt  $74,6 \pm 14,3 \text{ mm}^3$  (bảng 3.2).

Tại thời điểm này được tính là ngày 0 của các chuột mang khối ung thư.

Trong 3 tuần đầu tiên của điều trị (21 ngày), kích thước trung bình khối ung thư của các nhóm chuột giữa lô trị (dùng CTHePaB); lô tham chiếu (dùng 5Flu) so

với lô chứng (dùng nước muối sinh lý) không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ) (bảng 3.3).

Ngày thứ 35, kích thước trung bình của khối u ở các lô trị và lô tham chiếu nhỏ hơn lô chứng (968,46 so với 960,95 và 986,36) ; lô trị nhỏ hơn lô tham chiếu (968,46 so với 960,95) tuy nhiên nhỏ hơn chưa có ý nghĩa thống kê,  $p > 0,05$ .

Từ ngày thứ 42 đến ngày 63, kích thước trung bình của khối u ở các lô trị và lô tham chiếu nhỏ hơn lô chứng, đặc biệt ở ngày thứ 63 (1596,67 và 1588,24 so với 1792,64), sự nhỏ hơn này khác nhau có ý nghĩa thống kê,  $p < 0,05$ ; kích thước trung bình của khối u ở lô trị nhỏ hơn lô tham chiếu (1596,67 so với 1588,24), tuy nhiên nhỏ hơn chưa có ý nghĩa thống kê,  $p > 0,05$  (bảng 3.4). Khối u của các lô chuột vẫn tăng dần đều theo thời gian, trong đó kích thước khối u ở lô chứng tăng nhanh nhất. Đến ngày 63 thì có 01 chuột lô chứng chết, quá trình đo kích thước khối u được dừng lại.

Nghiên cứu cấy ghép tế bào ung thư biểu mô gan nhiễm virus viêm gan B trên chuột nude đã thành công, cũng như sự tiến triển của quá trình hình thành ung thư đã cung cấp một mô hình cấy ghép trên động vật có tác dụng để thử nghiệm điều trị [65] và sàng lọc một cách hiệu quả các loại thuốc chống ung thư biểu mô gan mới [67]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, khi khối u hình thành, chỉ sau 01 tuần (từ ngày 0 đến ngày 7) kích thước khối u ở các lô đã tăng lên gấp 03 lần. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với một số tác giả [10][58][72].

Chuột được cho uống thuốc trong 4 tuần, kích thước khối u ở các lô chuột dùng CTHePaB và 5FU ở các lần đo sau, càng giảm so với ở lô chứng. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê đạt được, bắt đầu từ thời điểm ngày thứ 42 kể từ khi bắt đầu dùng thuốc. Như vậy, tác dụng của thuốc có thể đã bắt đầu có tác dụng từ những thời điểm ban đầu khi dùng CTHePaB và 5FU, khi đó các tế bào khối u đã bị ức chế, làm hạn chế sự phát triển, và dần được nhìn thấy rõ ở những thời điểm sau, là kích thước khối u to lên chậm, còn tế bào khối u ở lô chứng vẫn phát triển với tốc độ nhanh, nên kích thước khối u to hơn hẳn so với lô dùng thuốc.

Một số vị thuốc trong Viên nang CTHepaB có tác dụng chống viêm, chống oxy hoá, kháng khuẩn như cà gai leo, cỏ sữa lá nhỏ, linh chi, chi tử, đại hoàng... Một số vị thuốc có tác dụng bồi bổ cơ thể, tăng cường miễn dịch như đông trùng hạ thảo, đinh lăng, hà thủ ô, cà gai leo, đại hoàng... Ngoài ra còn được chứng minh có chứa những thành phần có tác dụng ức chế sự phát triển của virus viêm gan B, tế bào ung thư, chống oxy hoá, ngăn ngừa xơ gan [15]; Như vậy, tác dụng ức chế sự phát triển khối u của viên nang CTHepaB có thể có nhiều cơ chế khác nhau hỗ trợ cho nhau: cơ chế tăng cường miễn dịch, cơ chế ức chế tế bào khối u, cơ chế chống viêm, chống oxy hoá...

#### **4.1.3.2. Tỷ lệ sống chết của các lô chuột**

Sau khi đã hình thành khối u, chuột được uống thuốc nghiên cứu trong vòng 1 tháng.

Ở lô chứng (dùng nước muối sinh lý): tại thời điểm 63 ngày tính từ thời điểm bắt đầu uống thuốc, đã xuất hiện chuột chết 20% tổng số con ở lô chứng.

Các ngày tiếp theo chuột chết dần, ngày thứ 70 chuột chết 60%; ngày thứ 76 chuột chết 80%; đến ngày 85 toàn bộ số chuột ở lô chứng đã chết hết.

Ở lô trị (dùng CTHepaB): tại thời điểm 63 ngày tính từ thời điểm bắt đầu uống thuốc, chưa xuất hiện chuột chết.

Đến ngày thứ 70 chuột chết 20%; ngày thứ 76 chuột chết 40%; đến ngày 90 vẫn còn 20% chuột chưa chết.

So sánh giữa 2 lô trị và chứng, tỷ lệ chuột chết ở lô trị giảm hơn và kéo dài thời gian sống hơn lô chứng (đến ngày 90 lô trị vẫn còn 20% chuột sống, nhưng lô chứng đến ngày 85 toàn bộ số chuột ở lô chứng đã chết hết). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$  (bảng 3.5).

Ở lô tham chiếu (dùng 5FU): tại thời điểm 63 ngày tính từ thời điểm bắt đầu uống thuốc, chưa xuất hiện chuột chết; bắt đầu ngày thứ 70 chuột chết 20%; sau 85 ngày chết 80% và kết thúc 90 ngày không còn con chuột nào sống

So sánh giữa 2 lô tham chiếu và chứng, tỷ lệ chuột chết ở lô tham chiếu giảm hơn và kéo dài thời gian sống hơn lô chứng. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ , từ ngày thứ 63 (bảng 3.5).

So sánh giữa 2 lô lô trị và lô tham chiếu, tỷ lệ chuột chết ở lô trị giảm hơn và kéo dài thời gian sống hơn lô tham chiếu. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ , từ ngày thứ 76 (bảng 3.5).

#### **4.1.3.3. Thời gian sống trung bình của các lô chuột**

Sau khi được dùng thuốc CTHepaB, lô trị thời gian sống trung bình của chuột ở lô trị (dùng thuốc CTHepaB) kéo dài thời gian sống hơn lô chứng (81,80 ngày so với 68,60 ngày). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$  (bảng 3.6).

Thời gian sống trung bình của chuột ở lô tham chiếu (dùng 5FU) kéo dài thời gian sống hơn lô chứng (79,20 ngày so với 68,60 ngày). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$  (bảng 3.6).

So sánh giữa 2 lô trị và tham chiếu, thời gian sống trung bình của chuột ở lô trị kéo dài thời gian sống hơn lô tham chiếu (81,80 ngày so với 79,20 ngày), tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê với  $p > 0,05$  (bảng 3.6).

Chuột ở lô dùng CTHepaB có tỷ lệ sống sót cao hơn so với lô chứng, ở các thời điểm đánh giá 70, 76, 85, 90 ngày sau uống thuốc, và thậm chí còn cao hơn so với lô tham chiếu dùng 5FU liều 10mg/kg/24h tại các thời điểm ngày 85, 90. Thời gian sống trung bình của chuột ở lô dùng CTHepaB cũng cao hơn so với lô chứng ( $p < 0,05$ ), và cũng cao hơn so với lô tham chiếu dùng 5FU, tuy nhiên chưa đạt ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ). Sự giảm kích thước khối u là một trong những nguyên nhân giúp cho chuột có thời gian sống lâu hơn, tỷ lệ sống sót cao hơn so với lô chứng. Ngoài tác dụng làm giảm kích thước khối u, các tác dụng như tăng cường miễn dịch, chống hủy hoại tế bào gan của bài thuốc CTHepaB, nên tác dụng tốt hơn so với thuốc 5FU (một thuốc ức chế phát triển khối u nhưng làm suy giảm miễn dịch, độc cho gan, thận).

Tác dụng của Juzen-taiho-to, một hỗn hợp gồm 10 loại thảo mộc, trong đó có thân rễ cây đinh lăng, cho thấy có tác dụng chống lại sự hình thành ung thư gan ở

bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào gan, và làm thời gian sống ở những bệnh nhân dài hơn [73].

## **4.2. Kết quả đánh giá tác dụng điều trị của viên nang CTHEPAB trên chuột mang khối u:**

### **4.2.1. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của CTHePaB lên tế bào NK trong lách chuột mang khối u**

Mặc dù chuột không thể bị nhiễm HBV một cách tự nhiên, nhưng chuột biến đổi gen mang gen HBV đã giúp các nhà khoa học hiểu rõ hơn về cơ chế phân tử và nhân lên của virus, và đóng vai trò là mô hình động vật để đánh giá liệu pháp chống HBV. Đầu tiên, các hạt virus được tạo ra trong gan chuột biến đổi gen rất giống với các hạt ở bệnh nhân người. Ngoài ra, virus được tinh chế từ máu của chuột biến đổi gen HBV có thể lây nhiễm tế bào gan của thai nhi trong ống nghiệm [30]. Điều này chỉ ra rằng cơ chế phân tử điều chỉnh sự tổng hợp các bản phiên mã và protein HBV, cũng như gói virus và bài tiết virus, có thể được chia sẻ trong tế bào gan của người và chuột. Theo đó, các mô hình chuột biến đổi gen này có thể đóng vai trò là một nền tảng in vivo của các mô hình động vật để đánh giá các tác nhân trị liệu chống lại sự nhân lên của virus bằng RNA tương tự hoặc RNA can thiệp nhỏ [74].

Tất nhiên, mục tiêu cuối cùng vẫn là sử dụng chuột chuyển gen để tìm ra phương pháp chữa trị cho những bệnh nhân bị nhiễm HBV và HCC.

Dưới tác dụng của viên nang CTHePaB có tác dụng tăng cường miễn dịch làm tăng số lượng tế bào giết NK trong lách chuột gây bệnh

So sánh giữa 2 lô trị (dùng CTHePaB) và chứng, số lượng tế bào NK trong lách chuột gây ung thư tế bào gan nhiễm virus viêm gan B lô trị tăng so với lô chứng không dùng thuốc ( $1,43 \times 10^6$  so với  $1,26 \times 10^6$ ), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$  (bảng 3.7).

So sánh giữa 2 lô tham chiếu và chứng, số lượng tế bào NK trong lách chuột gây ung thư tế bào gan nhiễm virus viêm gan B lô tham chiếu giảm so với lô chứng không dùng thuốc ( $1,16 \times 10^6$  so với  $1,26 \times 10^6$ ), tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê với  $p > 0,05$  (bảng 3.7).

So sánh giữa 2 lô trị và tham chiếu, số lượng tế bào NK trong lách chuột gây ung thư tế bào gan nhiễm virus viêm gan B lô trị tăng so với lô chứng không dùng thuốc ( $1,43 \times 10^6$  so với  $1,16 \times 10^6$ ), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$  (bảng 3.7).

Thuốc tham chiếu 5FU có tác dụng ức chế sự phát triển của tế bào ung thư thông qua tác dụng gây độc tế bào, tuy nhiên tác dụng này cũng làm tổn thương đến các tế bào miễn dịch của chuột. Mặc dù 5FU làm giảm kích thước khối u ở chuột mang u do đó cải thiện được tình trạng chung của chuột làm chuột lâu chết hơn (như đã nghiên cứu ở nội dung trước), tuy nhiên do cũng có tác dụng gây độc tế bào miễn dịch nên kết quả không thấy có sự cải thiện khi đánh giá về số lượng tế bào NK trong lách chuột.

#### **4.2.2. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của CTHePaB lên tế bào Macrophage trong lách chuột mang khối u**

So sánh giữa 2 lô trị (dùng CTHePaB) và chứng (dùng nước muối sinh lý), số lượng tế bào Macrophage trong lách chuột mang khối ung thư tế bào gan nhiễm virus viêm gan B lô trị tăng so với lô chứng không dùng thuốc (6,97% so với 5,86%), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$  (bảng 3.8).

So sánh giữa 2 lô tham chiếu (dùng 5 FU) và chứng, số lượng tế bào Macrophage trong lách chuột mang khối gây ung thư tế bào gan nhiễm virus viêm gan B lô tham chiếu giảm so với lô chứng không dùng thuốc (5,24% so với 5,86%), tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê với  $p > 0,05$  (bảng 3.8).

So sánh giữa 2 lô trị và tham chiếu, Số lượng tế bào Macrophage trong lách chuột mang khối ung thư tế bào gan nhiễm virus viêm gan B của lô trị tăng so với lô tham chiếu (6,97% so với 5,24%), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$  (bảng 3.8).

Thuốc tham chiếu 5FU có tác dụng ức chế sự phát triển của tế bào ung thư thông qua tác dụng gây độc tế bào, tuy nhiên tác dụng này cũng làm tổn thương đến các tế bào miễn dịch của chuột. Mặc dù 5FU làm giảm kích thước khối u ở chuột mang u do đó cải thiện được tình trạng chung của chuột làm chuột lâu chết hơn



(như đã nghiên cứu ở nội dung trước), tuy nhiên do cũng có tác dụng gây độc tế bào miễn dịch nên kết quả không thấy có sự cải thiện khi đánh giá về số lượng tế bào Macrophage trong lách chuột.

CTHepa B có tác dụng tăng cường miễn dịch, nên làm tăng số lượng tế bào Macrophage trong lách chuột gây bệnh.

#### **4.2.3. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của CTHepaB lên tế bào tua trong lách chuột mang khối u**

Số lượng tế bào tua trong lách chuột gây ung thư tế bào gan nhiễm virus viêm gan B lô trị tăng so với lô chứng không dùng thuốc (3,51% so với 2,35%), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$  (bảng 3.9).

Số lượng tế bào tua trong lách chuột gây ung thư tế bào gan nhiễm virus viêm gan B lô tham chiếu giảm so với lô chứng không dùng thuốc (2,08% so với 2,35%), tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê với  $p > 0,05$  (bảng 3.18).

Số lượng tế bào tua trong lách chuột gây ung thư tế bào gan nhiễm virus viêm gan B lô trị tăng so với lô tham chiếu (3,51% so với 2,08%), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$  (bảng 3.9).

Như vậy, trong điều trị ung thư, ngoài tác dụng ức chế trực tiếp sự phát triển của tế bào ung thư, thì tác dụng làm tăng cường đáp ứng miễn dịch của cơ thể, sẽ làm hạn chế sự phát triển của tế bào ung thư cũng rất quan trọng.

Tế bào miễn dịch NK chứa các hạt granzyme và perforin là 2 thành phần thiết yếu tạo nên hoạt tính gây độc, tiêu diệt các tác nhân lạ, tế bào nhiễm virus và các tế bào ung thư. Bên cạnh đó, tế bào NK có khả năng sản xuất chất gây viêm (IFN- $\gamma$ ) và chất gây hoại tử khối u (TNF- $\alpha$ ), đóng vai trò lớn trong khả năng chống lại vi khuẩn và thực hiện giám sát miễn dịch các khối u. Tế bào NK tăng, giúp khả năng tự bảo vệ của cơ thể trước những tác nhân gây bệnh, đặc biệt là khả năng loại bỏ các tế bào ung thư.

Tế bào macrophage, có vai trò là thực bào các thành phần cận bã của tế bào và các tác nhân gây bệnh. Tế bào tua (Dendritic cells, DC) là tế bào chuyên trình diện kháng nguyên cho các tế bào lympho T trong đáp ứng miễn dịch.

Việc chứng minh với bằng chứng y học hiện đại, xác định số lượng các tế bào miễn dịch trong lách chuột mang khối ung thư tế bào gan người, có ý nghĩa khoa học và thực tiễn cao. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy các tế bào miễn dịch NK, Macrophage và DC trong lách chuột nude, ở lô dùng CTHepaB cao hơn có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ , so với lô chứng và lô tham chiếu. Chúng tỏ ưu thế của viên nang CTHepaB tác dụng làm tăng cường đáp ứng miễn dịch của cơ thể, từ đó làm hạn chế sự phát triển của tế bào ung thư.

Theo nghiên cứu về một số hỗn hợp thảo dược cổ điển trong y học thảo dược Trung Quốc như Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang (bao gồm tám loại thảo mộc, trong đó có thân rễ cây đinh lăng), cho thấy thuốc này có tác dụng Kích thích sản xuất bạch cầu hạt G-CSF và TNF- $\alpha$ , từ đó làm tăng cường đáp ứng miễn dịch của cơ thể, từ đó làm hạn chế sự phát triển của tế bào ung thư [75] hoặc Sihoga-Yonggol-Moryo-Tang (bao gồm 11 loại thảo mộc, trong đó có cây đại hoàng), tác dụng giảm khả năng xâm lấn của ung thư biểu mô tế bào gan [18].

#### **4.2.4. Kết quả định lượng HBV-DNA của tế bào khối u trên chuột nude sau thời gian điều trị**

Lượng HBV-DNA trong tế bào khối u trên chuột có xu hướng thấp hơn so với lô chứng ( $10,84 \times 10^5$  so với  $12,68 \times 10^5$ ), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê,  $p < 0,05$  (bảng 3.10).

Lượng HBV-DNA trong tế bào khối u trên chuột trung bình lô tham chiếu giảm so với lô chứng không dùng thuốc ( $12,36 \times 10^5$  so với  $12,68 \times 10^5$ ), tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê với  $p > 0,05$  (bảng 3.10).

Lượng HBV-DNA trong tế bào khối u trên chuột thấp hơn so với lô tham chiếu ( $10,84 \times 10^5$  so với  $12,36 \times 10^5$ ), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê,  $p < 0,05$  (bảng 3.10).

So với lô chứng và lô tham chiếu dùng 5FU, viên nang CTHepaB làm giảm lượng HBV-DNA. Đây có thể là kết quả của tác dụng trực tiếp của viên nang CTHepaB đối với virus viêm gan B, cũng có thể là kết quả gián tiếp thông qua tác dụng làm tăng miễn dịch của viên nang. Cà gai leo, một thành phần dược liệu trong

viên nang CTHePaB đã được chứng minh có tác dụng tốt trong điều trị Cà gai leo, một thành phần dược liệu trong viên nang CTHePaB đã được chứng minh có tác dụng tốt trong điều trị bệnh virus viêm gan B, làm giảm số lượng HBV [15][76]. Nghiên cứu của Trịnh Thị Xuân Hoà [14] sử dụng chế phẩm HAINA chiết xuất Cà gai leo 250 mg, sau điều trị 60 ngày, marker của virus viêm gan B có 23,3% bệnh nhân mất HBsAg, 44% bệnh nhân xuất hiện anti-HBe, so với nhóm chứng là 0% và 15%.

## KẾT LUẬN

Từ kết quả nghiên cứu trên thực nghiệm chúng tôi kết luận:

### **1. Hiệu quả của viên nang CTHePaB trên tình trạng chung của chuột Nude mang khối ung thư tế bào gan người nhiễm virus viêm gan B.**

Sau 14 ghép ung thư tế bào gan nhiễm virus viêm gan B có 100% số chuột hình thành và phát triển khối u, có kích thước trung bình 70-75 mm<sup>3</sup> kích thước khối u đạt  $74,6 \pm 14,3$  mm<sup>3</sup>.

Sau điều trị viên nang CTHePaB liều 0,96g/kg/24h:

- **Kích thước khối u trung bình:** làm giảm kích thước khối u so với lô chứng, tương đương so với lô dùng 5FU liều 10mg/kg/24h.

- **Tỷ lệ chết của chuột:** Làm hạn chế tỷ lệ chuột chết ở các thời điểm đánh giá 70, 76, 85, 90 ngày sau uống thuốc so với lô chứng. Tại các thời điểm ngày 85, 90, tỷ lệ chuột sống sót ở lô dùng CTHePaB cao hơn so với lô tham chiếu (ngày 90 lô trị vẫn còn 20% chuột sống; lô tham chiếu không còn con chuột nào sống; đến ngày 85 toàn bộ số chuột ở lô chứng đã chết hết)

- **Thời gian sống trung bình của chuột:** Làm tăng thời gian sống trung bình của chuột, so với lô chứng và lô tham chiếu (81,80 so với 79,20 và 68,60 ngày).

### **2. Ảnh hưởng của viên nang CTHePaB trên một số chỉ số xét nghiệm cận lâm sàng trên mô hình chuột Nude mang khối ung thư gan người nhiễm virus viêm gan B.**

Viên nang CTHePaB liều 0,96g g/kg/24h có hiệu quả hỗ trợ điều trị tốt trên chuột nude có mang tế bào ung thư biểu mô gan nhiễm virus viêm gan B qua các chỉ số:

**- Tế bào NK, Macrophage và DC cells trong lách chuột mang khối u:**  
Làm tăng số lượng tế bào NK, tế bào Macrophage và tế bào DC cells trong lách chuột gây ung thư tế bào gan nhiễm virus viêm gan B, có ý nghĩa thống kê so với lô chứng và lô tham chiếu.

**- Lượng HBV-DNA của tế bào khối u chuột:** Làm giảm lượng HBV-DNA trong tế bào khối u chuột gây ung thư tế bào gan nhiễm virus viêm gan B so với lô chứng và lô tham chiếu.

## **KIẾN NGHỊ**

1. Viên nang CTHePaB bước đầu cho thấy có hiệu quả điều trị khá tốt trên động vật thực nghiệm, sử dụng an toàn, không có tác dụng phụ không mong muốn trên động vật thực nghiệm. Do vậy có thể tiến hành nghiên cứu trên lâm sàng để đánh giá tác dụng của viên CTHePaB trên người bệnh.

