

TIỀM NĂNG ỨC CHẾ KHỐI U CỦA CHIẾT XUẤT ETHANOL ĐÔNG TRÙNG HẠ THẢO (*Cordyceps militaris*) VÀ NẤM VÂN CHI (*Trametes versicolor*) ĐỐI VỚI BỆNH UNG THƯ VÚ DO DMBA GÂY RA Ở CHUỘT SWISS ALBINO

TRẦN THỊ PHƯƠNG NHUNG

Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm, Đại học Công nghệ thành phố Hồ Chí Minh
tranthiphuongnhung@iuh.edu.vn

DOIs: <https://doi.org/10.46242/jstiuh.v59i05.4589>

Tóm tắt. Đông trùng hạ thảo đã được sử dụng như một phương pháp điều trị hỗ trợ cho bệnh ung thư vú. Nấm vân chi cũng được chứng minh là có lợi ích thiết thực cho bệnh nhân ung thư vú. Tuy nhiên, tác dụng hiệp đồng của Đông trùng hạ thảo và nấm Vân chi trong điều trị ung thư vú vẫn chưa được khoa học chứng minh. Trong nghiên cứu này chúng tôi đã xây dựng mô hình đánh giá tiềm năng ức chế khối u trong điều trị ung thư vú nhờ tác động của chiết xuất ethanol thô của đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*) và nấm vân chi (*Trametes versicolor*) (EtCC) (tỷ lệ 1:1) trên chuột Swiss albino. Sau khi khối u vú (do DMBA gây ra) đạt thể tích khoảng 0,5 cm³, những con chuột được điều trị bằng EtCC trong 12 tuần. Sử dụng EtCC (400 mg/kg thể trọng) điều trị cho chuột ung thư vú đã cho thấy thể tích khối u tuyến vú giảm xuống còn 0,51 cm³ ($p < 0,05$), cùng với việc giảm đáng kể các thông số WBC ($4,82 \times 10^3$ tb/mm³), ALT (46,7 U/L), AST (34,8 U/L), ($p < 0,05$) so với nhóm bệnh ung thư vú (nhóm DMBA). Trong khi đó, khối lượng cơ thể, khối lượng tương đối của tim, gan, phổi, lá lách, thận đã tăng lên so với nhóm đối chứng âm tính ($p < 0,05$). Phân tích mô học cho thấy việc phối hợp đông trùng hạ thảo và nấm vân chi đã ức chế khối u tuyến vú, giúp hồi phục trở lại cấu trúc mô tuyến vú. Như vậy, EtCC có tiềm năng ức chế khối u bằng cách ngăn chặn sự tiến triển của khối u vú trên mô hình chuột. Như vậy, EtCC có tiềm năng ức chế khối u bằng cách ngăn chặn sự tiến triển của khối u vú trên mô hình chuột. Do đó, EtCC có thể được xem như một loại thảo dược tiềm năng trong điều trị ung thư vú.

Từ khóa: *Cordyceps militaris*, *Trametes versicolor*, DMBA, ung thư vú

1. GIỚI THIỆU

Trong số tất cả các bệnh ung thư, ung thư vú là dạng ung thư phổ biến nhất ở phụ nữ. Từ năm 2008, tỷ lệ các ca ung thư vú mới đã tăng 52% trong hơn một thập kỷ. Trên toàn cầu, số ca ung thư vú mới từ 1,38 triệu năm 2008 đã tăng lên 2,1 triệu vào năm 2018 [1]. Sự phát triển của khối u vú gồm rối loạn điều hòa biệt hóa tế bào, tăng sinh quá mức và đề kháng với apoptosis [2]. Ung thư vú có thể được gây ra bởi 7,12-dimethyl-1,2-benzanthracene (DMBA) - chất sinh ung thư vú có tính chọn lọc. DMBA trải qua quá trình kích hoạt chuyển hóa thành dihydrodiolepoxit, sau đó liên kết với dư lượng adenin của axit deoxyribonucleic gây đột biến và sinh ung thư [3]. Ở những người đã được chẩn đoán mắc bệnh ung thư, một số phương pháp điều trị đã được áp dụng như phẫu thuật, xạ trị, hóa trị và liệu pháp nhắm mục tiêu [4]. Mặc dù đã đạt được những hiệu quả nhất định, tuy nhiên các phương pháp điều trị trên vẫn thể hiện những hạn chế đáng kể về tính an toàn và hiệu quả [5, 6]. Việc nghiên cứu và phát triển các loại thuốc chống ung thư giá rẻ, hiệu quả và ít độc hại hơn trở nên cần thiết. Nấm đã được ghi nhận là nguồn quan trọng nhất để cung cấp các tác nhân ngăn ngừa ung thư với cấu trúc mới và cơ chế hoạt động độc đáo [7].

Đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*), một loại nấm gây bệnh côn trùng thuộc lớp ascomycetes, thường được sử dụng như một loại thuốc bổ truyền thống ở Trung Quốc và Đông Á [8]. Độc tính tế bào của *C. militaris* đối với tế bào MCF-7 và HepG2 cũng đã được báo cáo [9]. Nấm vân chi (*Trametes versicolor*) thuộc họ Polyporaceae. Giá trị y học của *T. versicolor* được ghi nhận trong y học cổ truyền Trung Quốc với tác dụng tăng miễn dịch, sức bền và tuổi thọ [10]. Polysaccharopeptide (PSP và PSK) là thành phần hoạt tính sinh học trong *T. versicolor* có khả năng chống khối u, điều hòa miễn dịch [11]. Trong mô hình *in vitro*, PSP và PSK ức chế tăng sinh dòng tế bào u vú, phổi và tuyến tiền liệt [12]. Cordycepin (3-deoxyadenosine) trong *C. militaris* ức chế tăng sinh bằng cách bất hoạt Akt kinase trong tế bào ung thư vú. Polysaccharit (PSP và PSK) trong *T. versicolor* gây ra quá trình chết rụng của tế bào ung thư vú thông qua

TIỀM NĂNG ỨC CHẾ KHỎI U CỦA...

ức chế yếu tố phiên mã NF- κ B và điều chỉnh giảm biểu hiện của COX-2. Các tác động sinh học của *C. militaris* và *T. versicolor* có được bởi tác dụng cộng hưởng và hiệp đồng của cordycepin và polysaccharit trong hai loại nấm trên [13]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thiết lập một mô hình ung thư vú trên chuột Swiss albino do DMBA gây ra, nghiên cứu tác dụng hiệp đồng chiết xuất ethanol của đồng trùng hạ thảo (*C. militaris*) và nấm vân chi (*T. versicolor*) trong phòng và điều trị ung thư vú.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên liệu

Quả thể *Cordyceps militaris* được sử dụng trong nghiên cứu này được cung cấp bởi công ty dược thảo Kim Cương Vàng, Đức Trọng, Lâm Đồng. Quả thể nấm vân chi (*Trametes versicolor* L.) được nuôi trồng và thu nhận tại vườn thực nghiệm Viện Công nghệ Sinh học – Thực phẩm, Đại học Công nghiệp TP. HCM. Nấm tươi *C. militaris* và *T. versicolor* được thu hái và rửa sạch, sau đó được làm khô trong tủ sấy ở 40°C trong 48 giờ cho đến khi đạt được độ ẩm $\leq 12\%$. Quả thể nấm khô được cắt thành từng mảnh, sử dụng máy nghiền điện nghiền thành bột có kích thước $< 0,5$ mm, bột nấm được đóng gói trong chân không, bảo quản ở nhiệt độ phòng dùng cho các thí nghiệm tiếp theo.

2.2. Chuẩn bị cao chiết ethanol của *C. militaris* và *T. versicolor*

Chuẩn bị cao chiết ethanol *C. militaris*: 100g bột nấm *C. militaris* khô được chiết xuất với 2000 mL dung môi ethanol 60%, tỷ lệ dung môi/nguyên liệu là 22/1 (v/w), trong 3 giờ ở 121°C, các chất không hòa tan được loại bỏ bằng cách ly tâm ở 10.000 vòng/phút, ly tâm trong 30 phút và lọc qua giấy lọc Whatman (0,45 μ m) có sử dụng bơm chân không. Dịch lọc cuối cùng được ngưng tụ ở áp suất giảm (130 mmBar), bằng thiết bị bay hơi quay ở 60°C. Cao chiết được bảo quản trong bóng tối ở 4°C để sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

Chuẩn bị cao chiết ethanol *T. versicolor*: 100g bột *T. versicolor* khô được ngâm với 2000 mL ethanol 96% trong bình giữ nhiệt Erlenmeyer (các bình được bọc bằng lá nhôm) và để yên trong 3 ngày. Dịch chiết thu được ly tâm ở 20°C, 3000 vòng/phút, trong 10 phút, phần nổi được lọc qua giấy lọc Whatman (0,45 μ m) có sử dụng bơm chân không. Dịch lọc được cô đặc dưới áp suất giảm trong thiết bị bay hơi quay ở 60°C. Cao chiết được bảo quản trong bóng tối ở 4°C để sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 1. Chiết xuất đồng trùng hạ thảo (*C. militaris*) và nấm vân chi (*T. versicolor*)
A. Quả thể tươi đồng trùng hạ thảo (*C. militaris*); B. Quả thể tươi nấm vân chi (*T. versicolor*);
C. Bột khô đồng trùng hạ thảo; D. Bột khô nấm vân chi; E. EtCC

Cao chiết ethanol *C. militaris* và *T. versicolor* được trộn lẫn theo tỷ lệ 1:1. Hỗn hợp được đặt trên máy khuấy từ gia nhiệt C-MAG HS 4-IKA, tốc độ 1000 rpm/phút, trong 10 phút, độ ẩm 80%, nhiệt độ 30°C [14]. Hỗn hợp chiết xuất thu được sau khi khuấy là chiết xuất ethanol *C. militaris* và *T. versicolor* (có tên là EtCC) (Hình 1). Hàm lượng chất khô trong EtCC chiếm 70,67%.

2.3. Phân tích thành phần hóa thực vật của EtCC

Phân tích định tính thành phần hóa thực vật của chiết xuất từ nấm thô từ nấm (EtCC) thực hiện thông qua các tiêu chuẩn được mô tả bởi Odebiyi và Sofowora (1978) [15], Trease và Evans (2009) [16] và Banu (2015) [17]. *Nhận dạng alcaloit*: thử nghiệm với HCl 1%; *Nhận dạng saponin*: lắc mạnh và đun nóng trên hơi nước; *Nhận dạng phlobatannin*: thử nghiệm với nước cất và HCl 2%; *Nhận dạng tannin*: thử nghiệm

với nước cất và FeCl_3 0,1%; *Nhận dạng tecpenoit*: thử nghiệm với clorform và H_2SO_4 ; *Nhận dạng steroid*: thử nghiệm với anhydrit axetic và H_2SO_4 ; *Nhận dạng flavonoid*: thử nghiệm với NH_3 loãng và H_2SO_4 đậm đặc; *Nhận dạng polyphenol*: thử nghiệm FeCl_3 ; *Nhận dạng cacdiac glycosit*: thử nghiệm Salkowski's [18]; *Nhận dạng cacbonhydrat*: thử nghiệm Molish's; *Nhận dạng protein và axit amin*: thử nghiệm Biuret [19]; *Nhận dạng dầu và chất béo*: thử nghiệm Saponification [20].

Ngoài ra, mẫu chứng được gửi đến Viện nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường, Đại học Nông lâm Tp. HCM để phân tích định lượng thành phần cordycepin, polysaccharit trong EtCC. Phân tích định lượng Cordycepin được thực hiện bằng hệ thống HPLC pha đảo ngược. Tách sắc ký được thực hiện bằng cột YMC Pack Pro C18 (25 cm \times 4,6 mm, 5 μm). Phân tích được tiến hành với hệ thống rửa giải gradient sử dụng pha động bao gồm 0,5% axit axetic trong nước (A) và axetonitril (B). Hệ thống rửa giải như sau: 100% A ở 0 phút, 0% A ở 15 phút, 0% A ở 20 phút, 100% A ở 21 phút và 100% A ở 25 phút. Nhiệt độ của cột được duy trì ở 30°C và tốc độ dòng được đặt ở 1,1 mL/phút. Thể tích tiêm là 10 μL , bước sóng của máy dò được đặt là 260 nm [21]. Phân tích Polysaccharit được thực hiện trên hệ thống Agilent HPLC (Series 1100) với máy bơm bậc bốn và vòi phun mẫu tự động (Agilent Technologies, Burlington, MA, USA) được trang bị máy dò Sedex 75 ELSD (Sedere, Lawrenceville, NJ, USA). Các tham số trên ELSD là 9, nhiệt độ 50°C. Quá trình phân tách đạt được trên cột BioSep-SEC-S 2000 (300 4,6 mm i.d). Chất rửa giải (A) H_2O và (B) MeCN: 0 min, 0% B; 10 phút, 0% B; 11 phút, 100% B; 15 phút, 100% B; 16 phút, 0% B; 25 phút, 0% B. Tốc độ dòng chảy là 0,7 mL/phút [22].

2.4. Động vật thí nghiệm

Thí nghiệm sử dụng chuột cái Swiss albino 6 tuần tuổi, khoẻ mạnh, chưa cho thụ tinh, trọng lượng trung bình là $25 \pm 2\text{g}$. Chuột được cung cấp bởi Viện Pasteur, TP. Hồ Chí Minh, được nuôi thích nghi 1 tuần tại chuồng nuôi động vật của Viện Công nghệ Sinh học – Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp Tp. Hồ Chí Minh và đạt các tiêu chuẩn theo yêu cầu thí nghiệm. Những con chuột thí nghiệm được nuôi trong lồng bằng kính (30 x 60 cm), 5 con trong một lồng, được phân bố ngẫu nhiên thành các nhóm điều trị và nhóm đối chứng. Chế độ thức ăn và nước uống do phòng thí nghiệm tự chuẩn bị. Nhiệt độ trung bình chuồng nuôi được duy trì ở ($30 \pm 2^\circ\text{C}$), độ ẩm 50 – 60 %, chu kỳ sáng/tối là 12 giờ/12 giờ [23]. Nghiên cứu được thực hiện theo hướng dẫn của Tuyên bố Helsinki (2014) [24].

2.5. Thuốc và hóa chất

Hóa chất gây ung thư vú: DMBA (7,12 dimethyl benzantracene) - chất hóa học có cấu trúc Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) - hydratcarbon vòng thơm, cho chuột uống qua ống thông dạ dày (gavage) để gây ung thư vú. Liều lượng cho uống là 50mg/kg thể trọng DMBA hòa tan trong 0,1 mL dầu mè mỗi tuần một lần trong 4 tuần [25]. Thuốc chữa ung thư vú Okinawa Fucoidan Kanehide Bio: Viên nang, sản xuất tại Nhật Bản, do SHUREIHI (Westminster, CA 92683) phân phối độc quyền tại Hoa Kỳ. Tất cả các dung môi và hóa chất khác được sử dụng là loại phân tích có độ tinh khiết tối thiểu 99%.

2.6. Thử nghiệm độc cấp tính EtCC

Khảo sát độc tính cấp tính của EtCC được thực hiện bằng phương pháp thử nghiệm 'Lên và Xuống' trên chuột Swiss albino theo hướng dẫn số của Tổ chức Phát triển Kinh tế (OECD). 425 [26, 27]. 24 chuột Swiss albino được sử dụng để thử nghiệm độc tính cấp tính. Trước khi nghiên cứu độc tính cấp, những con chuột được cân khối lượng và nhịn ăn qua đêm. Chuột được phân chia vào 4 nhóm thử nghiệm (6 con/nhóm): Nhóm I (nhóm chứng) chuột uống nước bình thường; Nhóm II, III và IV chuột uống EtCC (một liều duy nhất) với nồng độ tương ứng 3000, 4000 và 5000 mg/kg thể trọng. Động vật thử nghiệm được quan sát liên tục trong 4 giờ đầu tiên, sau đó quan sát không liên tục cho đến 24 giờ. Chuột được quan sát trong 7 ngày tiếp theo. Các biểu hiện bất thường về phản ứng và hành vi của chuột được ghi nhận. Các dấu hiệu hành vi của độc tính (thay đổi ở da, lông, mắt, màng nhầy và hô hấp, tuần hoàn, tự chủ và hệ thống thần kinh trung ương, hoạt động vận động, co giật, run, tiết nước bọt, tiêu chảy, hôn mê, ngủ) hoặc tử vong được quan sát, ghi chép cẩn thận [28].

2.7. Thiết kế thí nghiệm ung thư vú

Các khối u tuyến vú được gây ra ở 25 chuột cái Swiss albino 7 tuần tuổi có khối lượng ($24,5 \pm 2\text{g}$). Chuột được uống 50 mg/kg thể trọng DMBA (7,12 - dimethylbenz (a) anthracene) pha loãng trong 0,1 mL dầu mè mỗi tuần một lần trong 4 tuần [25]. Dung dịch DMBA được đưa vào dạ dày bằng ống thông dạ dày

TIỀM NĂNG ỨC CHẾ KHỐI U CỦA...

cho chuột [29]. Chuột được sờ nắn hàng tuần bắt đầu từ tuần thứ 4 sau khi dùng DMBA để kiểm tra sự xuất hiện của khối u. Khối u đầu tiên xuất hiện vào tuần thứ 16, đến tuần thứ 18 khối u xuất hiện ở tất cả các con chuột.

25 chuột cái đã bị bệnh ung thư vú được chia thành 5 nhóm ($n = 5$) trong đó 1/ nhóm kiểm soát âm tính (DMBA) (bị ung thư vú, không được điều trị), được uống nước muối sinh lí; 2/ nhóm kiểm soát tích cực (DMBA+fucoidan) (chuột bị ung thư vú, được điều trị bởi fucoidan), 3,4,5/ nhóm điều trị [DMBA+(EtCC₃₀₀, EtCC₄₀₀, EtCC₅₀₀)] (chuột bị ung thư vú, được điều trị bởi EtCC với liều uống 300, 400, 500 mg/kg thể trọng) [30]; 5 chuột bình thường sẽ được phân vào nhóm đối chứng (Bình thường). Những con chuột bị ung thư vú ở các nhóm được uống EtCC, fucoidan và nước muối sinh lí 2 ngày một lần trong 12 tuần [23].

Lượng fucoidan (dung môi nước) cho một lần uống/chuột được tính theo công thức.

$$\text{Khối lượng fucoidan (mg)} = \frac{\text{Khối lượng cơ thể chuột (g)}}{1000} \times 21,2 \quad [31].$$

Lượng EtCC cho một lần uống/chuột được tính theo công thức.

$$\text{Thể tích EtCC (mL)} = \frac{\text{Khối lượng cơ thể chuột (g)}}{1000} \times \text{Liều uống EtCC}.$$

2.8. Đánh giá các thông số thực nghiệm ung thư vú

Khối lượng cơ thể: Khối lượng cơ thể của mỗi con chuột được theo dõi trước khi bắt đầu nghiên cứu, mỗi tuần một lần trong suốt quá trình nghiên cứu cho đến ngày phẫu thuật. Khối lượng cơ thể của chuột được đo bằng cân điện tử để bàn (A&D SK-5001WP, Nhật Bản). Phần trăm thay đổi khối lượng cơ thể (WG %) được tính theo công thức:

$$\text{Phần trăm thay đổi khối lượng cơ thể (\%)} = \frac{\text{Khối lượng cơ thể vào cuối mỗi tuần (g)}}{\text{Khối lượng cơ thể ban đầu (g)}} \times 100 \quad [32]$$

Khối lượng tương đối cơ quan: Vào thời điểm cuối của quá trình thí nghiệm, chuột được gây chết bằng cách làm chết ngạt với ete dietyl trong một bình hút ẩm thủy tinh và phẫu thuật. Một số nội tạng được lấy ra và cân khối lượng nội tạng tuyệt đối. Các cơ quan tim, gan, phổi, lá lách, thận được khảo sát. Khối lượng tương đối của cơ quan nội tạng (ROW %) được tính theo công thức:

$$\text{Khối lượng cơ quan tương đối (\%)} = \frac{\text{Khối lượng nội tạng tuyệt đối (g)}}{\text{Khối lượng cơ thể vào ngày phẫu thuật (g)}} \times 100 \quad [33]$$

Khối lượng và thể tích khối u: Kích thước khối u tuyến vú được đo bằng thang đo Vernier calliper. Thể tích khối u (V) được tính bằng công thức: $V(\text{cm}^3) = \text{Chiều dài} \times \text{Chiều rộng}^2 \times 0,52$ [23]. Khối lượng khối u được cân bằng cân phân tích điện tử Mettler Toledo (Mỹ - Thụy Sĩ).

Phân tích huyết học và sinh hóa: Máu được thu nhận từ tĩnh mạch đuôi hoặc mắt của chuột bằng phương pháp thu nhận máu tĩnh mạch đuôi hoặc mắt [34]. Máu được đựng trong ống tráng K₂EDTA, được bảo quản lạnh ở 4°C. Mẫu được gửi đến khoa huyết học và sinh hóa, bệnh viện Quân y 175 TP. HCM để phân tích và đọc kết quả. Các thông số huyết học được khảo sát là hồng cầu (RBC), tốc độ lắng hồng cầu (ESR), dải phân bố hồng cầu (RDW-CV%), bạch cầu (WBC), bạch cầu lympho (LYM), bạch cầu mono (MONO), bạch cầu trung tính (NEU), tỷ lệ số lượng bạch cầu trung tính/số lượng lympho (NLR), tiểu cầu (PLT), tỷ lệ số lượng tiểu cầu/số lượng lympho (PLR), thể tích trung bình tiểu cầu (MPV), độ phân bố tiểu cầu (PDW); thông số sinh hóa được khảo sát như glucose, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphate (ALP), bilirubin tổng, ure, creatin, axit uric [23].

Đánh giá mô học: Tuyến vú đã được thu thập. Một phần của cơ quan này được bảo quản trong tủ lạnh - 80 độ, một phần còn lại được rửa bằng dung dịch formalin đậm trung tính (NBF) 10%. Sau khi cố định, các phần mô được rửa bằng nước và khử nước bằng cồn 70%, 90% và cồn tuyệt đối, và làm sạch bằng hai lần thay xylene. Tiếp theo, các mô được nhúng vào sáp parafin tạo thành các khối mô. Các khối mô được cắt thành các dải băng có độ dày 4 μm bởi một microtome. Cố định mô vào các phiến kính và nhuộm màu từ từ bằng hematoxylin (H) và eosin (E). Sau đó, các phiến kính được khử nước bằng cồn 50%, 70%, 95%, cồn tuyệt đối. Các phần mất nước được làm sạch bằng xylene. Sử dụng các lamén gắn cố định lên trên bề mặt lam kính. Quan sát dưới kính hiển vi ánh sáng để điều tra bất kỳ thay đổi mô học nào. Sau khi kiểm

tra, ảnh chụp vi thể của các phần mô mẫu đã chọn và được chụp dưới độ phóng đại của vật kính x20 bằng máy ảnh kỹ thuật số tích hợp tự động (EVOS XL, Hoa Kỳ) [35]. Mẫu bệnh phẩm được gửi đến khoa Giải phẫu bệnh, bệnh viện Quân y 175 Tp. HCM để nhuộm mẫu mô và đọc kết quả.

2.1.9. Phân tích thống kê

Kết quả thực nghiệm được biểu diễn dưới dạng $\bar{X} \pm SD$. Dữ liệu được phân tích thống kê bằng phân tích ANOVA. Tiến hành thực hiện kiểm tra so sánh của Tukey bằng phần mềm thống kê Statgraphics Centurion XVIII. Mức ý nghĩa được sử dụng để kiểm định sai khác giữa các nghiệm thức là $p < 0,05$.

3. KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN

3.2.1. Phân tích thành phần hóa thực vật của EtCC

Phân tích hóa thực vật sơ bộ chiết xuất EtCC cho thấy sự hiện diện của ancaloit, flavonoid, saponin, tannin, cacdiac glycosit, plobatanin, steroid, phenol, protein và axit amin, cacbonhydrat; dầu và chất béo không hiện diện trong EtCC. Hàm lượng cordycepin và polysaccarit trong EtCC được xác nhận bằng phương pháp phân tích HPLC với hàm lượng cordycepin là 6,37 mg/g và hàm lượng polysaccarit là 5,45 mg/g.

3.2.2. Nghiên cứu độc tính cấp tính của EtCC

Trong thời gian 7 ngày theo dõi, EtCC không gây ra bất kỳ triệu chứng nhiễm độc nào ở chuột ngay cả ở liều cao nhất (5000 mg/kg). Tất cả các con chuột đều khỏe mạnh với biểu hiện của màng nhầy, mắt, lông, da, hô hấp, tuần hoàn bình thường. Không xuất hiện các triệu chứng bất thường như co giật, run, tiết nước bọt, tiêu chảy, hôn mê, ngủ, rối loạn tự chủ và hệ thống thần kinh trung ương, rối loạn hoạt động vận động, không có tử vong (Hình 2).



Hình 2. Chuột trong thử nghiệm độc tính cấp tính EtCC.

A. Chuột nhóm đối chứng, B. Chuột uống liều 3000 mg/kg EtCC, C. Chuột uống liều 5000 mg/kg EtCC

3.2.3. Tỷ lệ mắc bệnh và tử vong

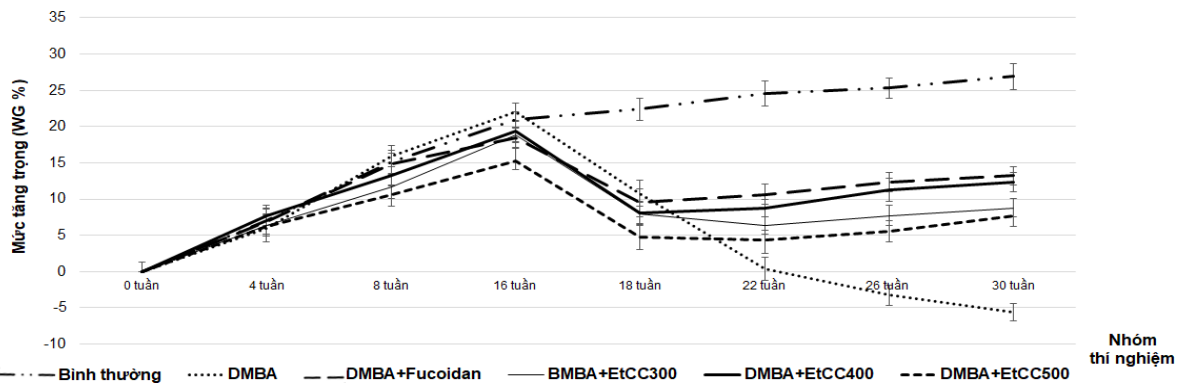
Trong thời gian được gây bệnh bằng DMBA, kiểm tra sự xuất hiện khối u ở từng con chuột từ tuần thứ 4 sau khi uống DMBA. Tuần thứ 16, ở tất cả các con chuột khối u tuyến vú đã nổi lên rõ rệt (100%). Không có trường hợp tử vong nào được quan sát thấy ở các nhóm nghiên cứu.

3.2.4. Khối lượng cơ thể

Khối u xuất hiện sẽ làm cho cân nặng của cơ thể thay đổi do bị mất cơ, mỡ, giảm cảm giác thèm ăn và mệt mỏi. Martin và cộng sự (2003) đã chứng minh rằng ở những con chuột bị ung thư vú cân nặng sẽ giảm và có thể giảm tới 25% trọng lượng cơ thể sau 4 tuần kể từ khi ung thư vú xuất hiện [36]. Từ tuần 16 khi khối u xuất hiện rõ rệt, WG% ở các nhóm có xu hướng tăng, nhưng đến tuần 18 đã có sự sụt giảm đáng kể về WG% ($p < 0,05$) (nhóm DMBA, WG% là $22,09 \pm 1,2\%$ tuần 16 và $10,75 \pm 1,8\%$ tuần 18; nhóm DMBA+EtCC₄₀₀, WG% là $19,33 \pm 1,4\%$ tuần 16 và $8,11 \pm 1,6\%$ tuần 18) (Hình 3). Thời gian khối u đang phát triển WG% tăng nhẹ, sự gia tăng có lẽ là do sự phát triển của các khối u. Các khối u tăng về khối lượng sau khi xuất hiện ung thư vú. Sau đó cân nặng của chuột bắt đầu giảm dần, thời gian phát triển mạnh của khối u cân nặng của chuột có thể bị sụt giảm 20% trong một tuần do chứng chán ăn vì khối u gây ra [35]. Điều này đã thể hiện rõ ở biến động khối lượng cơ thể của chuột ở nhóm DMBA vào các tuần 22, 26 và 30 (WG% = $0,39 \pm 1,6\%$ tuần 22, $-3,22 \pm 1,4\%$ tuần 26 và $-5,57 \pm 1,2\%$ tuần 30) (Hình 3). Vào những thời điểm cuối của quá trình thí nghiệm, chuột không thể ăn uống, nằm bất động và không đáp ứng được với kích thích bằng tay. Tình trạng sụt cân là triệu chứng của hội chứng chán ăn - suy mòn do ung thư [37].

TIỀM NĂNG ỨC CHẾ KHỐI U CỦA...

Suy mòn do ung thư là hội chứng suy mòn liên quan đến việc mất khối lượng cơ và mỡ trực tiếp do các yếu tố khối u gây ra hoặc gián tiếp do phản ứng không bình thường của vật chủ đối với sự hiện diện của khối u [38].



Hình 3. Tác dụng điều trị của EtCC đối với mức tăng trọng lượng cơ thể của chuột bị ung thư vú do DMBA gây ra

Các đặc tính chống ung thư vú của EtCC đã được đánh giá trong nghiên cứu này. Cân nặng của các nhóm được điều trị bởi EtCC tăng lên qua các tuần điều trị 22, 26 và 30. EtCC ở liều điều trị EtCC 400 mg/kg thể trọng có mức tăng cao và gần tương đương với mức tăng của nhóm được điều trị bởi fucoidan (thuốc tham chiếu, $p < 0,05$) (WG% = $8,72 \pm 1,2\%$ tuần 22, $11,13 \pm 1,6\%$ tuần 26 và $12,37 \pm 1,2\%$ tuần 30 ở nhóm DMBA+EtCC400 gần tương đương với nhóm DMBA+fucoidan WG% = $10,67 \pm 1,4\%$ tuần 22, $12,31 \pm 1,3\%$ tuần 26 và $13,21 \pm 1,3\%$ tuần 30) (Hình 2.2.2). Rất nhiều nghiên cứu gần đây đã khẳng định rằng chiết xuất đông trùng hạ thảo giúp tăng cường năng lượng tế bào dưới dạng ATP. Chiết xuất nấm vân chi cũng có tác dụng kích thích sự thèm ăn, giảm rối loạn đường ruột [39]. Trong EtCC, hợp chất polyphenol có thể ức chế sự biệt hóa tiền tế bào, giảm sự tăng sinh và tạo mỡ của tế bào mỡ, thúc đẩy quá trình phân giải lipid. Tecpenoit kiểm soát trọng lượng cơ thể, ngăn chặn sự gia tăng lượng chất béo. Saponin ức chế sự gia tăng trọng lượng cơ thể và làm giảm sự tăng triacylglyceron huyết [40]. Kết quả về sự gia tăng khối lượng cơ thể của chuột bị ung thư vú sau khi được uống EtCC trong nghiên cứu này phù hợp với kết quả của Song và cộng sự (2016) [30] và Luo và cộng sự (2014) [41].

3.2.5. Khối lượng và thể tích khối u

Tuyến vú là một trong số ít các cơ quan không phát triển hoàn toàn khi mới sinh. Nó trải qua những thay đổi về chức năng và tiến hóa trong giai đoạn dậy thì, mang thai và cho con bú. Các khối u tuyến vú ở chuột phát sinh trong biểu mô của chồi cuối tận cùng [42]. Các khối u vú được quan sát thấy ở động vật được sử dụng DMBA ở vùng ngực và bụng. Khối u được phát hiện từ tuần 16 sau khi sử dụng DMBA, đến tuần thứ 18 tất cả chuột được uống DMBA đều xuất hiện khối u rõ rệt (Hình 4).



Hình 4. Hình thái ngoài và khối u tuyến vú của chuột. A. Chuột nhóm bình thường; B. Chuột nhóm DMBA; C. Khối u tuyến vú chuột nhóm DMBA; D. Khối u tuyến vú của chuột nhóm DMBA+EtCC₄₀₀

Bảng 1. Thay đổi khối lượng và thể tích khối u chuột được điều trị bằng EtCC

Thông số	Bình thường	DMBA	DMBA +fucoidan	DMBA +EtCC ₃₀₀	DMBA +EtCC ₄₀₀	DMBA +EtCC ₅₀₀
Thể tích khối u (cm ³)	0,00 ± 0,00 ^a	0,79 ^d ± 0,07	0,33 ^b ± 0,05	0,45 ^c ± 0,04	0,37 ^b ± 0,04	0,51 ^c ± 0,03

Khối lượng khối u (g)	0,00 ^a ± 0,00	0,82 ^f ± 0,027	0,32 ^b ± 0,025	0,55 ^d ± 0,026	0,44 ^c ± 0,031	0,62 ^e ± 0,028
-----------------------	--------------------------	---------------------------	---------------------------	---------------------------	---------------------------	---------------------------

Dữ liệu được biểu thị dưới dạng Mean ± SD. Các chữ cái trên (a, b, c, d, e, f) trong cùng một hàng biểu thị sự khác biệt đáng kể giữa các nghiệm thức khác nhau ($p < 0,05$)

Thể tích và khối lượng khối u tăng cao ở nhóm DMBA. Khi khối ung thư xuất hiện và tăng sinh vô độ, ở tuần thứ 30 thể tích khối u đạt $0,79 \pm 0,07 \text{ cm}^3$, khối lượng là $0,82 \pm 0,027 \text{ g}$ (Bảng 1). Các khối u do DMBA gây ra là đa ổ và tích cực cục bộ. Một số mô có khả năng kích hoạt DMBA, trong đó bao gồm cả tuyến vú. Trong vú, DMBA được chuyển đổi thành epoxit, chất chuyển hóa có hoạt tính làm hỏng phân tử DNA và đây là dấu hiệu đầu tiên của quá trình sinh ung thư. Với chỉ số tăng sinh tế bào của các tiểu thùy tuyến vú, hoạt động trao đổi chất tăng cao và sự hình thành epoxit nhiều hơn [43].

Thể tích và khối lượng khối u giữa nhóm được điều trị bởi EtCC và nhóm DMBA khác nhau đáng kể trong suốt thời gian điều trị. Thể tích và khối lượng khối u của chuột ở các nhóm DMBA+EtCC đã giảm dần ở các nhóm điều trị bằng EtCC so với nhóm đối chứng ($p < 0,05$, Bảng 1). Giảm mạnh nhất là ở nhóm DMBA+EtCC₄₀₀ (thể tích $0,37 \pm 0,04 \text{ cm}^3$, khối lượng $0,44 \pm 0,031 \text{ g}$), gần tương đương với nhóm DMBA+fucoidan (thể tích $0,33 \pm 0,05 \text{ cm}^3$, khối lượng $0,32 \pm 0,025 \text{ g}$) ($p < 0,05$). Thể tích và khối lượng khối u của nhóm điều trị EtCC thấp hơn so với nhóm chứng DMBA ($p < 0,05$). Sự giảm thể tích và khối lượng ở các nhóm được điều trị cho thấy EtCC có tiềm năng ức chế tăng sinh khối u. Cordycepin và polysaccarit những thành phần hoạt tính của EtCC. Cordycepin có khả năng can thiệp vào quá trình truyền tín hiệu, ngăn chặn, ức chế quá trình dịch mã, tăng sinh và phát triển tế bào ung thư [44]. Cordycepin ức chế phát triển khối u thông qua điều chỉnh apoptosis, gây ra quá trình bắt giữ chu kỳ tế bào, nhằm mục tiêu vào các tế bào gốc ung thư, ngăn chặn các con đường liên quan đến di căn của khối u [45]. Polysaccarit có thể kích thích hệ thống miễn dịch không đặc hiệu và thực hiện hoạt động chống khối u qua kích thích cơ chế bảo vệ của vật chủ [46]. Polysaccarit ức chế sự phát triển của tế bào khối u và cảm ứng quá trình apoptosis bằng cách ức chế sự tăng sinh tế bào, cảm ứng quá trình chết và nhằm mục tiêu vào các con đường điều hòa và cơ chế của các gen chu kỳ tế bào [47]. Các thành phần hoạt tính sinh học trong *C. militaris* có hoạt tính kháng u là cordycepin, polysaccharit và steron, chúng ức chế khối u bằng cách gây ra quá trình apoptosis nhờ kích hoạt caspase-3 và bất hoạt Akt nhằm gây rối loạn chức năng ti thể [48]. Các polysaccharit (PSP và PSK) từ *T. versicolor* có thể gây độc trực tiếp đối với tế bào ung thư hoặc khối u. Chúng cũng tăng cường ức chế biểu hiện của các cytokine (TNF- α , IL- β ,...), ức chế chuyển vị hạt nhân yếu tố NF-kappa B, trực tiếp tiêu diệt tế bào khối u [49]. Việc phối hợp chiết xuất ethanol của đông trùng hạ thảo (*C. militaris*) và nấm vân chi (*T. versicolor*) trong phòng và điều trị ung thư vú đã làm tăng tác dụng cộng hưởng và hiệp đồng của polysaccarit, cordycepin và steron trong việc ức chế sự tăng sinh của khối u tuyến vú [13]. Tương tự, Jiang và cộng sự (2010) trong nghiên cứu về tác dụng của thực phẩm chức năng MC - một tổ hợp dược liệu bao gồm sự pha trộn của các loài nấm như *Agaricus blazei*, *Cordyceps sinensis*, *Coriolus versicolor*, *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa* và *Polyporus umbellatus* cũng đã báo cáo rằng dược phẩm MC có khả năng ức chế khối u, ngăn cản sự xâm lấn của tế bào ung thư [13].

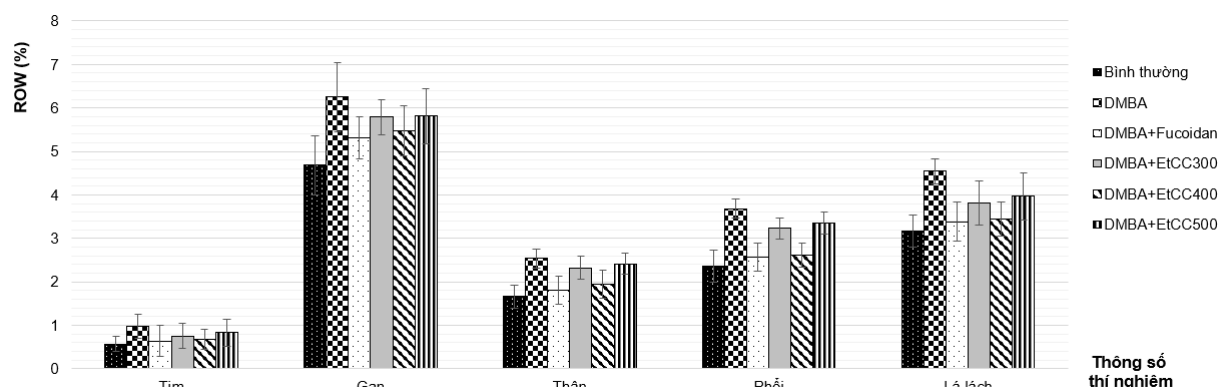
3.2.6. Khối lượng tương đối cơ quan

Sự thay đổi trọng lượng tương đối của nội tạng là dấu hiệu quan trọng để đánh giá tác động độc hại của hóa chất đối với các cơ quan. Trong quá trình tác động, DMBA có thể gây độc hại đến các cơ quan [50]. Khối lượng tương đối của tim, gan, thận, phổi, lá lách của chuột sau thời gian sử dụng DMBA đã có nhiều thay đổi (Hình 5). ROW % của các cơ quan chuột thuộc nhóm DMBA tăng cao hơn so với nhóm bình thường (đối chứng) ($p < 0,05$). Trong đó, ROW của nhóm DMBA (ví dụ, tim $0,98 \pm 0,28\%$, gan $6,25 \pm 0,79\%$) cao hơn so với ROW của nhóm bình thường (tim $0,57 \pm 0,17\%$, gan $4,68 \pm 0,68\%$) ($p < 0,05$). DMBA là một phân tử rất ưa mỡ, khi tiếp xúc với mô mỡ tuyến vú, DMBA đã kích hoạt quá trình trao đổi chất, giảm tiết corticosteron và giảm nhịp sinh học, thúc đẩy ung thư tuyến vú phát triển. Những tác động này làm tăng hoạt động của các cơ quan nội tạng.

Khối lượng tương đối các cơ quan nội tạng của chuột bị ung thư vú được điều trị bằng EtCC đã giảm đáng kể so với những con chuột bị ung thư không được điều trị (Hình 5). Khối lượng tương đối của lá lách ở nhóm DMBA+EtCC₄₀₀ ($3,44 \pm 0,39\%$) giảm so với nhóm DMBA ($p < 0,05$). Điều này cho thấy EtCC đã tác dụng làm cho quá trình tạo máu ngoài màng cứng ở lá lách có thể được giảm bớt [35]. Sau khi sử dụng EtCC các chất chuyển hóa liên quan đến stress oxy hóa, chuyển hóa năng lượng, chuyển hóa axit amin và protein, chuyển hóa choline bị rối loạn trong gan, tim, thận đã được điều chỉnh về gần với chuột bình [51].

TIỀM NĂNG ỨC CHẾ KHỐI U CỦA...

EtCC cũng giúp tăng cường miễn dịch, cải thiện sự thèm ăn, cải thiện chức năng tim, gan, thận, làm dịu hệ thống thần kinh trung ương [52].



Hình 5. Tác dụng điều trị của EtCC đối với khối lượng tương đối các cơ quan của chuột bị ung thư vú do DMBA gây ra

3.2.7. Huyết học và sinh hóa

Bảng 2. Thay đổi thông số huyết học và sinh hóa chuột được điều trị bằng EtCC

Thông số	Bình thường	DMBA	DMBA +fucoidan	DMBA +EtCC ₃₀₀	DMBA +EtCC ₄₀₀	DMBA +EtCC ₅₀₀
ESR (mm/h)	0,09 ^a ± 0,02	2,54 ^f ± 0,01	1,12 ^b ± 0,03	1,68 ^d ± 0,02	1,25 ^c ± 0,01	1,84 ^e ± 0,02
RBC (x10 ⁶ tb/mm ³)	7,12 ^c ± 0,03	5,57 ^a ± 0,02	6,54 ^f ± 0,04	6,15 ^c ± 0,03	6,49 ^d ± 0,02	5,92 ^b ± 0,02
RDW - CV%	0,0003 ^a ± 0,0002	0,0026 ^d ± 0,0001	0,0011 ^b ± 0,0003	0,0018 ^c ± 0,0002	0,0013 ^b ± 0,0001	0,0019 ^c ± 0,0002
WBC (x10 ³ tb/mm ³)	5,13 ^{bc} ± 0,07	8,24 ^a ± 0,05	4,93 ^d ± 0,06	4,45 ^{bc} ± 0,02	4,82 ^{cd} ± 0,07	4,31 ^b ± 0,04
Bạch cầu lympho (%)	80,34 ^e ± 0,2	74,14 ^a ± 0,4	78,45 ^d ± 0,3	76,64 ^c ± 0,5	77,94 ^d ± 0,4	75,87 ^b ± 0,2
Bạch cầu mono (%)	0,53 ^a ± 0,05	4,21 ^f ± 0,08	1,13 ^b ± 0,05	1,81 ^d ± 0,03	1,26 ^c ± 0,04	2,24 ^e ± 0,08
Bạch cầu trung tính (%)	18,21 ^f ± 0,03	14,32 ^a ± 0,07	17,87 ^e ± 0,05	16,89 ^c ± 0,03	17,34 ^d ± 0,04	16,52 ^b ± 0,06
NLR	0,04 ^a ± 0,01	0,18 ^e ± 0,02	0,08 ^b ± 0,03	0,12 ^{cd} ± 0,01	0,09 ^{bc} ± 0,02	0,14 ^d ± 0,01
PLT (x10 ³ tb/mm ³)	737,43 ^f ± 2,7	612,26 ^a ± 1,8	719,34 ^c ± 2,1	688,46 ^c ± 1,6	704,53 ^d ± 1,2	664,58 ^b ± 1,6
MPV (fL)	0,009 ^c ± 0,001	0,003 ^a ± 0,001	0,008 ^c ± 0,002	0,005 ^{ab} ± 0,001	0,007 ^{bc} ± 0,002	0,004 ^a ± 0,002
PDW (fL)	0,004 ^a ± 0,002	0,016 ^d ± 0,002	0,012 ^{bc} ± 0,001	0,004 ^a ± 0,003	0,009 ^b ± 0,002	0,013 ^{cd} ± 0,001
PLR	0,08 ^a ± 0,03	0,29 ^d ± 0,02	0,11 ^{ab} ± 0,01	0,18 ^c ± 0,02	0,13 ^b ± 0,03	0,21 ^c ± 0,01
Glucose (mg/dL)	259,33 ^a ± 2,4	281,82 ^d ± 2,8	261,77 ^{ab} ± 1,5	269,46 ^c ± 1,3	264,64 ^b ± 2,1	271,15 ^c ± 1,5
ALT (U/L)	54,92 ^a ± 1,5	132,41 ^f ± 1,2	78,62 ^b ± 1,8	92,25 ^d ± 2,2	85,71 ^c ± 1,9	106,38 ^e ± 1,7
AST (U/L)	62,34 ^a ± 1,7	113,46 ^f ± 2,6	71,42 ^b ± 2,1	85,55 ^d ± 2,3	78,63 ^c ± 1,8	97,62 ^e ± 2,4
ALP (U/L)	117,64 ^a ± 1,5	187,24 ^f ± 1,4	129,48 ^b ± 1,7	169,39 ^d ± 1,6	135,19 ^c ± 1,6	173,44 ^e ± 1,2
Bilirubin tổng (μmol/L)	0,23 ^a ± 0,05	0,69 ^f ± 0,04	0,31 ^b ± 0,02	0,52 ^d ± 0,02	0,38 ^c ± 0,01	0,59 ^e ± 0,03
Ure (mmol/L)	39,41 ^c ± 0,5	43,58 ^d ± 0,2	33,54 ^a ± 0,4	38,63 ^b ± 0,5	34,19 ^a ± 0,4	39,27 ^{bc} ± 0,3
Creatinine (μmol/L)	0,57 ^a ± 0,03	0,82 ^d ± 0,02	0,61 ^{ab} ± 0,03	0,71 ^c ± 0,02	0,65 ^b ± 0,03	0,75 ^c ± 0,02
Uric axit (mg/L)	12,14 ^a ± 0,02	14,35 ^f ± 0,03	12,56 ^b ± 0,02	13,46 ^d ± 0,04	12,88 ^c ± 0,04	13,73 ^e ± 0,03

Dữ liệu được biểu thị dưới dạng Mean ± SD. Các chữ cái trên (a, b, c, d, e, f) trong cùng một hàng biểu thị sự khác biệt đáng kể giữa các nghiệm thức khác nhau ($p < 0,05$)

Xác định các chỉ số huyết học được sử dụng để đánh giá các thực thể lâm sàng liên quan đến ung thư [53]. Các thông số ESR, MPV, NLR, RDW, PDW... là những dấu hiệu hữu ích để dự đoán và tiên lượng ung thư vú [54]. Có sự khác biệt đáng kể về các thông số huyết học ở nhóm DMBA so với nhóm bình thường (đối chứng) (Bảng 2, $p < 0,05$). Tăng đáng kể về hàm lượng ESR, RDW, WBC, LYM, NEU trong máu chuột nhóm DMBA so với nhóm bình thường (WBC là $3,24 \pm 0,05 \times 10^3$ tb/mm³ nhóm DMBA so với $5,13 \pm 0,07 \times 10^3$ tb/mm³ nhóm bình thường). Các tỷ lệ NLR, PLR cũng tăng lên ở chuột bị ung thư vú do DMBA gây ra (NLR là $0,18 \pm 0,02$ nhóm DMBA so với $0,04 \pm 0,01$ nhóm bình thường; PLR là $0,29 \pm 0,02$ nhóm DMBA so với $0,08 \pm 0,03$ nhóm bình thường) ($p < 0,05$). Trong khi đó thông số RBC, PLT, MPV ở nhóm DMBA giảm mạnh so với nhóm bình thường (ví dụ, RBC là $5,57 \pm 0,02 \times 10^6$ tb/mm³ nhóm DMBA so với $7,12 \pm 0,03 \times 10^6$ tb/mm³ nhóm bình thường) ($p < 0,05$). Đã có sự giảm và tăng đáng kể các thông số huyết học ESR, RDW, WBC, LYM, NEU, RBC, PLT, MPV ở các nhóm chuột được sử dụng EtCC (Bảng 2). Lượng WBC giảm xuống còn $4,82 \pm 0,07 \times 10^3$ tb/mm³; RBC tăng lên đạt $6,4 \pm 0,02 \times 10^6$ tb/mm³ ở nhóm DMBA+EtCC₄₀₀ ($p < 0,05$). Flavonoit ức chế sự hình thành của leukotriene B₄, giải phóng oxit nitric và ức chế sự hình thành prostaglandin E₂, aromatase (enzym thuộc họ cytochrom P₄₅₀ của ty thể được sản xuất ở mức độ cao trong các mô vú), xúc tác chuyển đổi nội tiết tố androgen thành estrogen, ức chế sự liên kết DNA. Tecpenoit ức chế sự phát triển apoptosis, bắt giữ chu kỳ tế bào, làm chết tế bào apoptotic, chống tăng sinh tế bào ung thư ... Chính vì vậy, EtCC thể hiện hiệu quả trong kháng nguyên bào, kháng u, chống sinh ung thư [53].

Sau khi được uống DMBA, đã có sự thay đổi và khác biệt đáng kể giữa nhóm DMBA và nhóm bình thường về thông số sinh hóa trong huyết thanh chuột (Bảng 2, $p < 0,05$). Các thông số sinh hóa đã tăng lên cao ở nhóm DMBA (AST $113,4 \pm 2,6$ U/L, ALT $132,4 \pm 1,2$ U/L, ure $43,5 \pm 0,2$ mmol/l, creatin $0,82 \pm 0,02$ μmol/L) tăng so với nhóm bình thường (đối chứng) (AST $62,3 \pm 1,7$ U/L, ALT $54,9 \pm 1,5$ U/L, ure $39,4 \pm 0,5$ mmol/L, creatin $0,57 \pm 0,03$ μmol/L). Các thông số AST, ALT, ure, bilirubin ... đã giảm dần ở các nhóm được sử dụng EtCC (Bảng 2). Nồng độ AST, ALT, ure, bilirubin ... giảm mạnh nhất ở nhóm DMBA+EtCC₄₀₀, gần tương đương với nhóm DMBA+fucoidan (thuốc tham chiếu) và khác biệt đáng kể so với nhóm DMBA ($p < 0,05$). Biểu hiện các thông số sinh hóa ở nhóm DMBA+EtCC₄₀₀ (AST $78,6 \pm 1,8$ U/L, ALT $85,7 \pm 1,9$ U/L, ure $34,1 \pm 0,4$ mmol/L, creatin $0,65 \pm 0,03$ μmol/L) gần tương đương với nhóm DMBA+fucoidan (AST $97,6 \pm 2,4$ U/L, ALT $106,3 \pm 1,7$ U/L, ure $39,2 \pm 0,3$ mmol/L, creatin $0,75 \pm 0,02$ μmol/L). Phục hồi theo hướng bình thường hóa các enzym cho thấy rằng saponin, polyphenol, tannin, ancaloit, flavonoit ... trong EtCC có một số vai trò mạnh mẽ trong việc bảo tồn tính toàn vẹn cấu trúc của màng tế bào, ngăn chặn rò rỉ enzym vào tuần hoàn máu. Các phenol và flavonoit có trong EtCC có thể chịu trách nhiệm cho hoạt động bảo vệ gan, thận [23]. EtCC có tiềm năng ức chế sự hoạt hóa chuyển hóa của chất gây ung thư hoặc hỗ trợ bài tiết các chất chuyển hóa gây ung thư của DMBA [55].

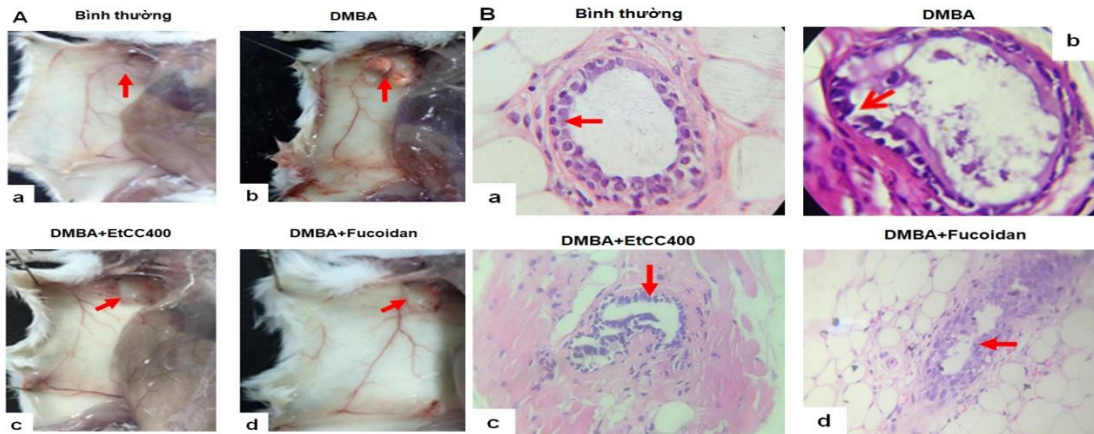
3.2.8. Phân tích hình thái ngoài và mô học tuyến vú

Tuyến vú của chuột trưởng thành có hình giống nửa quả cam, được chia thành nhiều thùy giống như các múi cam nhưng ranh giới không rõ ràng và thường chồng lấp lên nhau. Khối u vú khi xuất hiện thường là một khối có kích thước khoảng 2-3 cm, giới hạn tương đối rõ, mật độ cứng, chắc. Hình thái tuyến vú ngực của chuột ở các nhóm có khác biệt rõ rệt (hình 6A). Tuyến vú của chuột nhóm đối chứng không có triệu chứng bất thường, da vùng tuyến vú không dính, không chảy dịch và lở loét (hình 6 A.a). Khối u tuyến vú của chuột nhóm DMBA có hình tròn và là những khối rắn, bề mặt gồ ghề, da vùng tuyến vú sưng đỏ, chảy dịch (hình 6 A.b). Các khối rắn hình tròn đã nhỏ lại, vùng da bớt nhăn nheo và sưng đỏ, hiện tượng chảy dịch giảm ở các nhóm chuột được sử dụng EtCC và fucoidan (hình 6 A.c và d).

Đặc điểm mô học ống tuyến vú là hệ thống ống dẫn và tiểu thùy, bao quanh bởi mô đệm và mô mỡ. Các ống tận nhỏ nằm trong mô đệm tiểu thùy, mô liên kết giàu tế bào và chất căn bản, ít sợi collagen. Khi xuất hiện các carcinoma (ung thư biểu mô), cấu trúc các tiểu thùy và ống dẫn bị biến dạng, lấp đầy bởi các tế bào tăng sinh, các ống tuyến vú bị mất lớp tế bào cơ biểu mô nằm ngoài lớp tế bào biểu mô. Mô học tuyến vú ngực của chuột ở các nhóm có khác biệt rõ rệt (Hình 6 B). Cấu trúc mô ống tuyến vú chuột ở nhóm bình thường (nhóm đối chứng), ống dẫn lớn, lòng ống rộng, thành ống nguyên vẹn được cấu tạo bởi lớp biểu mô trụ đơn hay vuông đơn lát sừng hóa gồm 3-4 hàng tế bào và được bọc ngoài bởi mô liên kết chun (Hình 6 B.a). Khi bị tác động bởi DMBA, thành ống tuyến bị hủy hoại, biến đổi sợi bọc tăng sinh quá mức dẫn đến phá hủy biểu mô trụ đơn. Tế bào biểu mô tăng sản, chồng chất lên nhau tạo nhú nhô vào lòng bọc (Hình 6 B.b). Mô ống tuyến vú đã thay đổi nhờ tác dụng của EtCC và fucoidan (Hình 6 B c và d), quá trình tăng

TIỀM NĂNG ỨC CHẾ KHỐI U CỦA...

sinh sợi bọc biểu mô ống tuyến vú đã bị kim hãm, các u nhú vào lòng ống đã mất dần, lòng ống rộng ra, lớp biểu mô trụ đơn đang hồi phục, các hàng tế bào thành ống đã nhìn thấy rõ.



Hình 6. Các đặc điểm giải phẫu và mô học tuyến vú của chuột được điều trị bằng EtCC (HE, $\times 100$). (A). Đặc điểm giải phẫu tuyến vú (mũi tên chỉ khối u tuyến vú ngực). (B) Đặc điểm mô học ống tuyến vú (mũi tên chỉ tế bào biểu mô thành ống tuyến vú).

Tính nhạy cảm của tuyến vú đến chất sinh ung thư là DMBA là rất cao đặc biệt là bắt đầu từ giai đoạn thành thực sinh dục. DMBA rất ưa mỡ và có khả năng kích hoạt trao đổi chất gây ung thư, vì vậy mô tuyến vú là loại mô có khả năng dễ bị kích hoạt DMBA. Các chất hóa học ngăn ngừa (chất làm đảo ngược hoặc ngăn chặn sự tiến triển của các tế bào tiền ác tính) ở thực vật như carotenoid, tectenoid, các hợp chất phenolic, flavonoid, cordycepin, polysaccarit ... được phân lập từ thảo dược đã được báo cáo có khả năng ngăn chặn quá trình sinh ung thư [56]. Flavonoid có tác dụng điều chỉnh hoạt động của enzym xác định các loại oxy phản ứng (ROS), tham gia vào quá trình bắt giữ chu kỳ tế bào, gây ra apoptosis, autophagy và ngăn chặn sự tăng sinh và xâm lấn của tế bào ung thư [57]. Cordycepin có thể gây ra quá trình apoptosis, chống lại chu kỳ tế bào, gây tổn thương DNA trong tế bào ung thư, tiêu diệt, kiểm soát sự phát triển của tế bào ung thư, ức chế sự di căn của khối u [58]. Polysaccarit có khả năng cải thiện "phản ứng của vật chủ với khối u", tăng khả năng tự bảo vệ của vật chủ khỏi sự tiến triển của khối u [59]. Cordycepin (3'-deoxyadenosine), polysaccarit trong *C. militaris* và *T. versicolor* hoạt động như những chất chống ung thư mạnh. Tác dụng tương hỗ và hiệp đồng của cordycepin (3'-deoxyadenosine) và polysaccarit ức chế sự phát triển tế bào ung thư vú bằng cách làm thay đổi hình thái tế bào, thay đổi thể apoptotic và phân mảnh DNA, đồng thời gây bất hoạt Akt (một gen sinh ung thư) nhằm ức chế tăng trưởng và cảm ứng apoptosis [60]. Patel và cộng sự (2012) trong nghiên cứu của mình cũng đã đề cập đến hiệu quả chống khối u của của cordycepin và polysaccarit trong các loại nấm [61]. Như vậy, EtCC trong thành phần có chứa các hợp chất có hoạt tính sinh học có khả năng ngăn ngừa sự tăng sinh của khối u đã thể hiện được tiềm năng chống tăng sinh ung thư tuyến vú.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã chứng minh được tiềm năng chống tăng sinh của chiết xuất ethanol đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*) và nấm vân chi (*Trametes versicolor* L.) đối với bệnh ung thư vú do DMBA gây ra ở chuột. EtCC (400 mg/kg) thể hiện tiềm năng ức chế sự tăng sinh của tế bào biểu mô ống tuyến vú thông qua làm giảm kích thước và khối lượng khối u tuyến vú, cải thiện khối lượng cơ thể, khối lượng tương đối cơ quan, mô học tuyến vú, khôi phục các thông số huyết học và sinh hóa máu. Những kết quả này cung cấp bằng chứng dược lý bước đầu chứng minh rằng EtCC có tác dụng kim hãm khối u trong ung thư tuyến vú. Do đó, EtCC là loại thảo dược có tiềm năng trong phòng và điều trị ung thư vú.

LỜI CẢM ƠN

Tác giả xin cảm ơn các đồng nghiệp và cộng sự từ Khoa Huyết học và Sinh hóa, Khoa Giải phẫu bệnh Bệnh viện Quân Y 175 Tp.HCM và Viện Pasteur Tp.HCM, Phòng Thí nghiệm Công nghệ Động vật, Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp Tp. HCM đã hỗ trợ chúng tôi trong dự án này.

Tác giả cũng gửi lời cảm ơn đến các anh Vương Gia Huy, Lê Đình Trung, các chị Đặng Hoàng Linh, Võ Quỳnh Như, Nguyễn Thị Thúy Hằng, Tạ Quỳnh Anh, Nguyễn Thị Hồng Phương, Trần Thị Thu Thảo đã tham gia, hỗ trợ giúp dự án thành công.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. J. Ferlay, et al., "Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: Globocan sources and methods", *International journal of cancer*, 144 (8), 1941-1953, 2019.
- [2]. S. Sarkar, et al., "Cancer development, progression, and therapy: an epigenetic overview", *International journal of molecular sciences*, 14(10), 21087-21113, 2013.
- [3]. M. Miyata, et al., "Mechanism of 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene-induced immunotoxicity: role of metabolic activation at the target organ", *The Japanese Journal of Pharmacology*, 86(3), 302-309, 2001.
- [4]. P. A. T. E. Board, "Male Breast Cancer Treatment (PDQ®)", *PDQ cancer information summaries [internet]*, 2021.
- [5]. J. H. Schiller, et al., "Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer", *New England Journal of Medicine*, 346(2), 92-98, 2002.
- [6]. D. S. Ettinger, et al., "Non-small cell lung cancer: Clinical Practice Guidelines in Oncology™", *JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 4(6), 548-582, 2006.
- [7]. W. Kalt, et al., "Interspecific variation in anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity among genotypes of highbush and lowbush blueberries (*Vaccinium* section *cyanococcus* spp.)", *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(10), 4761-4767, 2001.
- [8]. S. K. Das, et al., "Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: current state and prospects", *Fitoterapia*, 81(8), 961-968, 2010.
- [9]. Y. Jing, et al., "Elucidation and biological activities of a new polysaccharide from cultured *Cordyceps militaris*", *Carbohydrate polymers*, 102, 288-296, 2014.
- [10]. K. K. Chu, S. S. Ho, A. H. Chow, "Coriolus versicolor: a medicinal mushroom with promising immunotherapeutic values", *The Journal of Clinical Pharmacology*, 42(9), 976-984, 2002.
- [11]. H. Sakagami, et al., "Induction of immunopotentiating activity by a protein-bound polysaccharide, PSK", *Anticancer research*, 11(2), 993-999, 1991.
- [12]. L. W. Chow, et al., "Polysaccharide peptide mediates apoptosis by up-regulating p21 gene and down-regulating cyclin D 1 gene", *The American journal of Chinese medicine*, 31(1), 1-9, 2003.
- [13]. J. Jiang, D. Sliva, "Novel medicinal mushroom blend suppresses growth and invasiveness of human breast cancer cells", *International journal of oncology*, 37(6), 1529-1536, 2010.
- [14]. K. D. Beattie, et al., "Ethanol and aqueous extracts derived from Australian fungi inhibit cancer cell growth in vitro", *Mycologia*, 103(3), 458-465, 2011.
- [15]. O. Odebiyi, E. Sofowora, "Phytochemical screening of Nigerian medicinal plants II", *Lloydia*, 41(3), 234-246, 1978.
- [16]. W. C. Evans, *Trease and evans' pharmacognosy E-book*, Elsevier Health Sciences, 2009
- [17]. K. S. Banu, L. Cathrine, "General techniques involved in phytochemical analysis", *International Journal of Advanced Research in Chemical Science*, 2(4), 25-32, 2015.
- [18]. S. I. Awala, V. O. Oyetayo, "The Phytochemical and Antimicrobial Properties of the Extracts Obtained from *Trametes Elegans* Collected from Osengere in Ibadan, Nigeria", *Jordan Journal of Biological Sciences*, 8(4), 1239-1245, 2015.
- [19]. N. Raaman, *Phytochemical techniques*, New India Publishing, 2006
- [20]. K. R. Khandelwal, *Practical pharmacognosy*, Pragati Books Pvt. Ltd, 2008
- [21]. J. Choi, et al., "Quantitative analysis of cordycepin in *Cordyceps militaris* under different extraction methods", *Journal of Applied Biological Chemistry*, 64(2), 153-158, 2021.
- [22]. C. Bergeron, S. Gafner, "Quantitative Analysis of the Polysaccharide and Glycoprotein Fractions in *Echinacea purpurea* and *Echinacea angustifolia* by HPLC-ELSD for Quality Control of Raw Material", *Pharmaceutical Biology*, 45(2), 98-105, 2007.
- [23]. V. Akhouri, M. Kumari, A. Kumar, "Therapeutic effect of *Aegle marmelos* fruit extract against DMBA induced breast cancer in rats", *Scientific Reports*, 10(1), 1-12, 2020.
- [24]. S. A. Hurst, "Declaration of Helsinki and protection for vulnerable research participants", *Jama*, 311(12), 1252-1252, 2014.
- [25]. B. Karimi, et al., "Therapeutic effect of simvastatin on DMBA- induced breast cancer in mice", *Fundamental & clinical pharmacology*, 33(1), 84-93, 2019.
- [26]. R. Solecki, et al., "Guidance on setting of acute reference dose (ARfD) for pesticides", *Food and Chemical Toxicology*, 43(11), 1569-1593, 2005.

- [27]. M. Van den Heuvel, et al., "The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD50 test", *Food and Chemical Toxicology*, 28(7), 469-482, 1990.
- [28]. C. Aloke, et al., "Anti-arthritic potentials of ethanol and aqueous extracts of stem bark of *Cleistopholis patens* on complete Freund's adjuvant-induced rheumatoid arthritis in rats", *Journal of Ayurveda and integrative medicine*, 12(1), 28-34, 2021.
- [29]. G. Liu, et al., "The effect of VPA on increasing radiosensitivity in osteosarcoma cells and primary-culture cells from chemical carcinogen-induced breast cancer in rats", *International journal of molecular sciences*, 18(5), 1027, 2017.
- [30]. J. Song, et al., "Cordyceps *militaris* induces tumor cell death via the caspase- dependent mitochondrial pathway in HepG2 and MCF- 7 cells", *Molecular medicine reports*, 13(6), 5132-5140, 2016.
- [31]. F. Atashrazm, et al., "Fucoidan and cancer: a multifunctional molecule with anti-tumor potential", *Marine drugs*, 13(4), 2327-2346, 2015.
- [32]. N. A. Al-Afifi, et al., "Acute and sub-acute oral toxicity of *Dracaena cinnabari* resin methanol extract in rats", *BMC complementary and alternative medicine*, 18(1), 1-14, 2018.
- [33]. S. O. Aniagu, et al., "Toxicity studies in rats fed nature cure bitters", *African Journal of Biotechnology*, 4(1), 72-78, 2005.
- [34]. J. Hoff, *Methods of blood collection in the mouse*, Technique, 2000.
- [35]. L. S. Yazan, et al., "Anti-breast cancer properties and toxicity of *Dillenia suffruticosa* root aqueous extract in BALB/c mice", *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, (5)12, 1018-1026, 2015.
- [36]. T. A. Martin, et al., "Growth and angiogenesis of human breast cancer in a nude mouse tumour model is reduced by NK4, a HGF/SF antagonist", *Carcinogenesis*, 24(8), 1317-1323, 2003.
- [37]. K. Fearon, et al., "Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus", *The lancet oncology*, 12(5), 489-495, 2011.
- [38]. J. M. Argilés, et al., "Cancer cachexia: understanding the molecular basis", *Nature Reviews Cancer*, 14(11), 754-762, 2014.
- [39]. M. Szeto, "Coriolus *versicolor* extracts: relevance in cancer management", *Current Oncology*, 15(2), 79, 2008.
- [40]. M. Marrelli, et al., "Effects of saponins on lipid metabolism: a review of potential health benefits in the treatment of obesity", *Molecules*, 21(10), 1404, 2016.
- [41]. K. W. Luo, et al., "In vivo and in vitro anti-tumor and anti-metastasis effects of *Coriolus versicolor* aqueous extract on mouse mammary 4T1 carcinoma", *Phytomedicine*, 21(8-9), 1078-1087, 2014.
- [42]. A. C. S. Barros, et al., "Induction of experimental mammary carcinogenesis in rats with 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene", *Revista do Hospital das Clínicas*, 59(5), 257-261, 2004.
- [43]. J. Russo, et al., "Estrogen and its metabolites are carcinogenic agents in human breast epithelial cells", *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 87(1), 1-25, 2003.
- [44]. H. S. Tuli, S. S. Sandhu, A. Sharma, "Pharmacological and therapeutic potential of *Cordyceps* with special reference to *Cordycepin*", *Biotech*, 4(1), 1-12, 2014.
- [45]. Y. Jin, et al., "Anti-tumor and anti-metastatic roles of cordycepin, one bioactive compound of *Cordyceps militaris*", *Saudi journal of biological sciences*, 25(5), 991-995, 2018.
46. S. V. Reshetnikov, K. K. Tan, "Higher Basidiomycota as a source of antitumor and immunostimulating polysaccharides", *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 3(4), 134-145, 2001.
- [47]. F. Zhang, et al., "Anti-cancerous potential of polysaccharide fractions extracted from peony seed dreg on various human cancer cell lines via cell cycle arrest and apoptosis", *Frontiers in pharmacology*, 8, 102-113, 2017.
- [48]. X. Zhou, et al., "Cordyceps fungi: natural products, pharmacological functions and developmental products", *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 61(3), 279-291, 2009.
- [49]. S. Habtemariam, "Trametes *versicolor* (Synn. *Coriolus versicolor*) polysaccharides in cancer therapy: Targets and efficacy", *Biomedicines*, 8(5), 135, 2020.
- [50]. V. Kumar, et al., "Chemopreventive effects of *Melastoma malabathricum* L. extract in mammary tumor model via inhibition of oxidative stress and inflammatory cytokines", *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 137(1), 11298-11305, 2021.
- [51]. X. Liu, et al., "Cordyceps *sinensis* protects against liver and heart injuries in a rat model of chronic kidney disease: a metabolomic analysis", *Acta Pharmacologica Sinica*, 35(5), 697-706, 2014.
- [52]. J. Cui, Y. Chisti, "Polysaccharopeptides of *Coriolus versicolor*: physiological activity, uses, and production", *Biotechnology advances*, 21(2), 109-122, 2003.
- [53]. J. Arroyo-Acevedo, et al., "Protective effect of *Piper aduncum* capsule on DMBA-induced breast cancer in rats", *Breast cancer: basic and clinical research*, 9, BCBCR. S24420, 2015.
- [54]. Z. M. Dezayee, M. S. Al-Nimer, "The Clinical Importance of Measurement of Hematological Indices in the Breast Cancer Survivals: A Comparison Between Premenopausal and Postmenopausal Women", *World journal of oncology*, 7(1), 1-11, 2016.

- [55]. V. Sharma, R. Paliwal, "Potential chemoprevention of 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene induced renal carcinogenesis by *Moringa oleifera* pods and its isolated saponin", *Indian journal of clinical biochemistry*, 29(2), 202-209, 2014.
- [56]. A. Roslida, K. Kim, "Anti-inflammatory and anti-hyperalgesic effects of *Ardisia crispa* Thunb. DC", *Pharmacognosy Magazine*, 4(16), 262, 2008.
- [57]. W. Ren, et al., "Flavonoids: promising anticancer agents", *Medicinal research reviews*, 23(4), 519-534, 2003.
- [58]. M. A. Khan, M. Tania, "Cordycepin in anticancer research: molecular mechanism of therapeutic effects", *Current medicinal chemistry*, 27(6), 983-996, 2020.
- [59]. M. Fisher, L. X. Yang, "Anticancer effects and mechanisms of polysaccharide-K (PSK): implications of cancer immunotherapy", *Anticancer research*, 22(3), 1737-1754, 2002.
- [60]. M. Khan, et al., "Cordyceps mushroom: a potent anticancer nutraceutical", *The Open Nutraceutical Journal*, 3, 179, 2010.
- [61]. S. Patel, A. Goyal, "Recent developments in mushrooms as anti-cancer therapeutics: a review", *Biotech*, 2(1), 1-15, 2012.

TUMOR INHIBITORY POTENTIAL OF ETHANOL EXTRACTS OF CORDYCEPS (*Cordyceps militaris*) AND YUNZHI MUSHROOM (*Trametes versicolor*) ON DMBA-INDUCED BREAST CANCER IN SWISS ALBINO MICE

THI PHUONG NHUNG TRAN

*Institute of Biotechnology and Food-technology, Industrial University of Ho Chi Minh city
tranthiphuongnhung@iuh.edu.vn*

Abstract. Cordyceps has been used as adjuvant therapy for cancer. Yunzhi has also been shown to have practical benefits for cancer patients. However, the synergistic effect of Cordyceps and Yunzhi mushroom in the treatment of breast cancer has not been scientifically proven. In this study, we built a model to evaluate the potential for tumor suppression in breast cancer treatment by the crude ethanol extracts of cordyceps (*Cordyceps militaris*) and Yunzhi mushroom (*Trametes versicolor*) (EtCC) (1:1 ratio) in Swiss albino mice. After the mammary tumor (induced by DMBA) reached a volume of about 0.5 cm³, the mice were treated with EtCC for 12 weeks. Using EtCC (400 mg/kg b.w.) to treat breast cancer mice showed a reduction in mammary tumor volume to 0.51 cm³ ($p < 0.05$), along with a significant reduction in the parameters of breast cancer number of WBC ($4.82 \times 10^3 \text{ cell/mm}^3$), ALT (46.7 U/L), AST (34.8 U/L), etc ($p < 0.05$) compared with breast cancer group (group DMBA). Meanwhile, body weight, the relative weight of heart, liver, lung, spleen, kidney increased compared with the negative control group ($p < 0.05$). Histological analysis showed that the combination of Cordyceps and Yunzhi mushroom inhibited mammary gland tumors, helping to restore the mammary tissue structure. Thus, EtCC has tumor suppressor potential by suppressing breast tumor progression in a mouse model. Therefore, EtCC can be considered as a potential herbal remedy for the treatment of breast cancer.

Keywords: *Cordyceps militaris*, *Trametes versicolor*, DMBA, breast cancer

Ngày gửi bài: 16/05/2021

Ngày chấp nhận đăng: 06/09/2021