

TÁC ĐỘNG PHỐI HỢP CỦA UNTI-K VÀ NANOCURCUMIN TRONG QUÁ TRÌNH PHÒNG VÀ CHỮA TRỊ UNG THƯ VÚ TRÊN CHUỘT

TRẦN THỊ PHƯƠNG NHUNG, NGUYỄN TRƯỜNG SƠN, TRƯƠNG THỊ MỸ ÚC, NGUYỄN THỊ KIM TRINH, VŨ THỊ ÁNH TUYẾT, NGUYỄN VŨ LINH, TRẦN THỊ TRÚC LINH, HỒ THANH HIẾU, NGUYỄN QUỐC NGUYỄN, NGUYỄN NGỌC BẢO TRẦN, ĐINH THỊ DIỄM, LÊ DUY KHANG, NGUYỄN THỊ YẾN NHI

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

Tóm tắt. Ung thư vú - bệnh lý ác tính, phát triển từ biểu mô tuyến vú. Khi bị kích thích bởi tác nhân sinh ung thư, tế bào tuyến vú tăng sinh vô hạn độ, vô tổ chức, hình thành khối u. Unti-K - dược liệu được sản xuất từ thảo dược thiên nhiên gồm bột tam thất, cao khô phylamin, cao khô xạ đen, cao tỏi đen, cao trinh nữ hoàng cung,... chứa các saponin, flavonoid, S-allyl-L-Cystein, alkaloid ... gây độc tế bào ung thư, gây alkyl hóa nucleotide, cản trở DNA sao chép, trì hoãn di căn. Nanocurcumin giúp ngừng tân tạo mạch, hoạt hóa protein kháng ung thư. Tinh chất curcumin được bảo vệ khi gắn kết với nano, dễ di chuyển và không bị hao tổn trên đường đi đến tế bào đích. Trong nghiên cứu này chúng tôi đã xây dựng mô hình phòng và chữa trị ung thư vú (DMBA gây ung thư vú) nhờ tác động cộng gộp của unti-k với nanocurcumin trên chuột (*Mus musculus var. Albino*). Sau 40 tuần phòng và chữa bệnh, các chỉ số về trọng lượng cơ thể, lượng bạch cầu trong máu chuột bị bệnh dần trở về mức bình thường. Hiệu quả phối hợp của unti-k và nanocurcumin đối với việc giảm thể tích khối u đã được chứng minh. Phân tích mô học cho thấy việc phối hợp unti-k và nanocurcumin đã ức chế sự xâm nhập tế bào ung thư biểu mô tuyến vú ở mô xung quanh, việc xâm lấn mô mỡ, mô đệm tuyến vú đã bị kìm hãm, mô tiểu thùy bị hoại tử dần hồi phục trở lại. Như vậy, sự phối hợp unti-k và nanocurcumin tạo hạt tiểu phân kích thước siêu nhỏ, giúp hấp thu nhanh vào máu, tăng lượng tế bào lympho T, hồi phục hệ thống miễn dịch, ngăn chặn tăng sinh, ức chế di căn, đẩy nhanh sự chết của tế bào ung thư.

Từ khóa. ung thư vú, DMBA, unti-k, nanocurcumin, tác dụng hiệp đồng.

CHARACTERIZATION OF SYNERGISTIC EFFECT OF UNTI-K AND NANOCURCUMIN ON TREATMENT OF BREAST CANCER IN MICE

Abstract. Breast cancer is a malignant disease which is developed from epithelium of mammary gland. When the mammary gland is stimulated by a carcinogen, mammary gland cells is unregulated and unorganized proliferation leading to tumor formation. Unti-K is a medicinal product made from natural herbs, including *Panax notoginseng* powder, extracts dry of phylamin, extracts dry of *Celastrus hindsii Benth*, extracts of *Allium sativum*, , extracts of *Crinum latifolium* ... contains saponin, flavonoid, S-allyl-L-Cystein, alkaloid... which cause cytotoxic effect to cancer cells, alkylation of nucleotides, prevention of DNA replication, delay in metastasis process of cancer cells. Nanocurcumin has anti-angiogenesis effect and activates anti-cancer protein. Curcumin is protected in nano form and facilitated to move to the target cell. In this study, we have established a prevention and treatment model for breast cancer induced by DMBA with characterization of unti-k and nanocurcumin on mice (*Mus musculus var. Albino*). After 40 weeks of prevention and treatment, body weight index and white blood cell counts of mice has recovered to normal condition. Effectiveness of combination of unti-k and nanocurcumin for the reduction of tumor volume has been proven. Histological analysis shows that unti-k and nanocurcumin have inhibited the invasion of breast cancer cell tissue in the surrounding tissue or the adipose tissue, stroma tissue, and necrotizing tissue has gradually recovered. So, combination of unti-k and nanocurcumin has created a microscopic particle size, helps to quickly absorb substances into the blood resulting to increases the

amount of T lymphocytes, recovers immune system, prevents proliferation, and inhibit metastases, accelerates the death of cancer cells.

Keywords. breast cancer, DMBA, unti-k, nanocucumin, synergistic effect.

1. TỔNG QUAN

Tế bào trong cơ thể động vật sản xuất và tái sản xuất liên tục. Thông thường, tế bào “lành mạnh” khi nhận được tín hiệu hóa học phân chia, sao chép chính xác với chu kỳ bất biến. Khi chu kỳ bị rối loạn, cấu trúc DNA bị thay đổi, tế bào đột biến không tuân theo qui trình phân chia và sao chép như đã định làm rối loạn hệ thống tái sản xuất tế bào dẫn đến ung thư. Ở ông dẫn hoặc tiêu thụ tuyến vú sự rối loạn quá trình tái sản xuất tế bào làm xuất hiện tế bào ác tính, lây lan trong các mô tuyến - phát sinh ung thư vú.

Hiện nay, việc sử dụng đông tây y kết hợp đang là biện pháp hữu hiệu ngăn ngừa phát triển tế bào ung thư. Sự kết hợp hoạt tính của saponin trong bột tam thất (*Panax notoginseng*) [1], flavonoid là thành phần chính của cao khô xạ đen (*Celastrus hindsii Benth*) [2], S-allyl-L-Cystein trong cao tỏi đen (*Allium sativum*) [3], alkaloid là chất đặc trưng đặc trưng của cao trinh nữ hoàng cung (*Crinum latifolium*) [4]... trong viên nang unti-k [5] và curcumin ở cây nghệ (*Curcuma longa*) [6] giúp không chế phát triển tế bào ung thư vú.

Saponin có cấu trúc gồm một hoặc nhiều nhánh glycoside ưa nước cùng với aglycone chứa lipophilic và dẫn xuất và một hoặc nhiều chuỗi đường, saponin can thiệp vào sự sao chép của DNA tế bào và chúng ngăn chặn sự gia tăng của các tế bào ung thư [7]. Phức hợp saponin và saponin-phospholipid được dùng bằng đường uống ở chuột gây ung thư vú với DMBA, làm tăng hoạt tính của CAT, SOD's, GPx và giảm mức độ peroxid hóa lipid, hoạt động của các enzyme chống oxy hóa (SOD, CAT và GPx) trong saponin và saponin-phospholipid đã loại bỏ gốc tự do, ngăn ngừa sự oxy hóa lipid và bảo vệ tế bào và phân tử chống lại các tổn hại ROS, làm giảm đáng kể sự tiến triển của khối u trên vú [8].

Năm 1984, Ghosal (Ấn Độ) phân lập và xác định từ cán hoa *Crinum latifolium L.*, thủy phân bằng enzym thu được latisodin [9]. Ghosal và Shibnath phân lập được pratorimin, pratosin, pratonmin, ambelin và lycorin từ thân hành lúc cây đang ra hoa. Năm 1986, Ghosal công bố tách được từ trinh nữ hoàng cung một số dẫn xuất alkaloid có tác dụng chống ung thư: crinafoline và crinafolidine. Thử nghiệm hoạt tính các chất này với tế bào ung thư cho kết quả dương tính [10]. Jin-Jian Lu et al, 2016 trong nghiên cứu của mình đã chứng minh rằng alkaloid được chiết xuất từ cây *Crinum latifolium* nhằm mục tiêu sao chép DNA, tổng hợp protein trong cơ chế hoạt động trên tế bào khối u, dẫn đến quá trình apoptosis của các tế bào ung thư [11].

Kết quả nghiên cứu vào năm 2016 của Kim và cộng sự cho thấy sản xuất cao chiết tỏi đen được xử lý bằng enzyme pectinase làm tăng đáng kể các thành phần hoạt tính sinh học, đặc biệt là hàm lượng S-allyl-L-Cystein (là dẫn xuất của cysteine, hoạt chất đã được chứng minh có tác dụng ngăn ngừa các khối u phát sinh) tăng lên 5-6 lần so với tỏi tươi. Hợp chất này cũng được các nhà khoa học Nhật Bản chứng minh là giúp giảm nồng độ cholesterol, giúp hấp thu allicin tốt hơn, giúp ngăn ngừa các tế bào ung thư phát triển...[12].

Saponin, alkaloid, s-allyl-l-cystein, flavonoid là thành phần hóa học của củ tam thất, cao trinh nữ hoàng cung, cao tỏi đen, cao khô xạ đen... là những nguyên liệu chính sản xuất viên nang unti-k có tác dụng bao vây các gốc tự do, có hoạt tính chống oxy hóa. Unti-k là thực phẩm chức năng giúp tăng cường sức đề kháng, kích thích hệ miễn dịch, có hoạt tính sinh học ức chế sự phát triển của tế bào u bướu, ngăn ngừa sự tạo mạch hỗ trợ điều trị u nang buồng trứng, u xơ tử cung, u vú cho phụ nữ và phì đại lành tính tuyến tiền liệt. Sản phẩm unti-k được chứng minh từ các nghiên cứu in vitro và in vivo tại Học viện Quân y, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam về tác dụng tăng sức đề kháng, khả năng miễn dịch, chống oxy hóa, tiêu diệt gốc tự do, gây độc tế bào ung thư trực tiếp trên dòng ung thư phổi, gan, màng tim [5].

Năm 1815, Vogel & Pelletier phân lập được hoạt chất curcumin trong cây nghệ (2-5%). Năm 1910, Milobedzka et al xác định được curcumin là polyphenol kỵ nước có cấu trúc diferuloylmethan. Trong y học hiện nay, curcumin là phân tử tuyệt vời trong số các hợp chất thiên nhiên có tác dụng chống ung thư [13,14]. Bằng sáng chế đầu tiên về curcumin dạng nano được mang mã số EP 103266 A2 ngày 30/5/2001 (Ib-8), tài liệu nghiên cứu đầu tiên về nanocurcumin dành cho mục đích y học được công bố vào năm 2005 [13]. Đánh giá tiềm năng ứng dụng của curcumin dạng nano trong lĩnh vực y học, 254 bằng phát minh phân tích cho thấy 24% bằng liên quan đến điều trị ung thư, 13% bệnh tim mạch, 12% các chứng viêm, 11% bệnh tiêu đường, 10% bệnh khớp và 9% bệnh tiêu hóa ... Phân tích riêng về 24% các bằng liên quan đến ung thư có

16% là điều trị ung thư vú, 10% là u sắc tố, 10% là ung thư tuyến tiền liệt, 10% là ung thư phổi, 9% là ung thư máu ... [14,15].

Năm 2013, Rafat A Siddiqui và cộng sự trong nghiên cứu in vivo về khối u vú do DMBA gây ra ở chuột khẳng định tác dụng hiệp đồng của axit docosahexaenoic (DHA) và nanocurcumin làm giảm phát triển của tế bào SK-BR- có kiểu hình ER⁻ và Her-2⁺ là những tế bào hình thành khối u do DMBA gây ra [16]. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Parisa ZiaSarabi và cộng sự, 2018 khi nghiên cứu tác dụng hiệp đồng của beclermin và nanocurcumin trong chữa trị ung thư vú của chuột bị gây bệnh bởi DMBA [17].

Mô hình động vật thí nghiệm là thực nghiệm bố trí nuôi, chăm sóc động vật, song song với tiến hành khảo sát, đo lường các chỉ tiêu thí nghiệm, áp dụng những phương pháp gây bệnh và chữa bệnh, từ đó quan sát, kiểm tra, đánh giá hiệu quả độ an toàn trước khi áp dụng chữa bệnh cho con người [18]. Năm 2009, mô hình thí nghiệm chữa trị ung thư trên chuột “Đánh giá hoạt tính gây độc in vivo của viên crila Việt Nam chống lại sự tăng trưởng khối u tế bào tuỷ Graffi ở chuột Hamster.” (thực hiện ở phòng miễn dịch-Viện hàn lâm khoa học Bungari) [19]. Nghiên cứu tác dụng của Bis - carboxy ethyl germanium sesquioxide (Ge-132) lên chuột *Wistar Albino* bị gây ung thư vú bằng hóa chất N-methyl-N-nitrosourea (MNU) để xác định các hoạt động chống ung thư của Ge-132 [20]. Nghiên cứu chữa ung thư vú chuột bằng sự kết hợp Anastrozole, Tamoxifen lên chuột cái giống BALB bị ung thư vú do hóa chất N-nitroso-N-methylurea (MNU) gây ra [21].

Gần đây, nhiều loại thực phẩm chức năng hỗ trợ điều trị ung thư có nguồn gốc từ *Crinum latifolium*, *Celastrus hindsii Benth*, *Allium sativum* và *Curcuma longa* đã được đưa vào thị trường. Tuy nhiên, hiệu quả hiệp đồng phối hợp của unti-k và nanocurcumin trong điều trị ung thư vẫn chưa được nghiên cứu. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thiết lập mô hình gây ung thư vú do kích thích của 7, 12 dimethyl benzanthracene (DMBA) và nghiên cứu tác dụng hiệp đồng của sự kết hợp giữa unti-k và nanocurcumin trong phòng ngừa và điều trị ung thư vú.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Hóa chất và thuốc thử

DMBA (7,12 dimethyl benzanthracene) - chất hóa học có cấu trúc Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) - hydratcarbon vòng thơm, cho chuột uống qua ống thông dạ dày gây ung thư vú. Liều lượng cho uống là 0,2 ml DMBA/con/lần/tuần (tương ứng 1 mg/con/lần/tuần) [22]. Sử dụng DMBA cho chuột uống trong 6 tháng sẽ gây bệnh ung thư vú trên chuột.

Viên nang 500 mg, do Học viện Quân y Việt Nam sản xuất. Liều lượng unti-K cho chuột uống 1 lần = (trọng lượng chuột (g)/1000) x 30,2 (mg) [5]. Sử dụng viên nang unti-k kết hợp nanocurcumin cho chuột bị ung thư vú (gây ra bởi DMBA) uống trong 6 tháng để phòng và chữa bệnh.

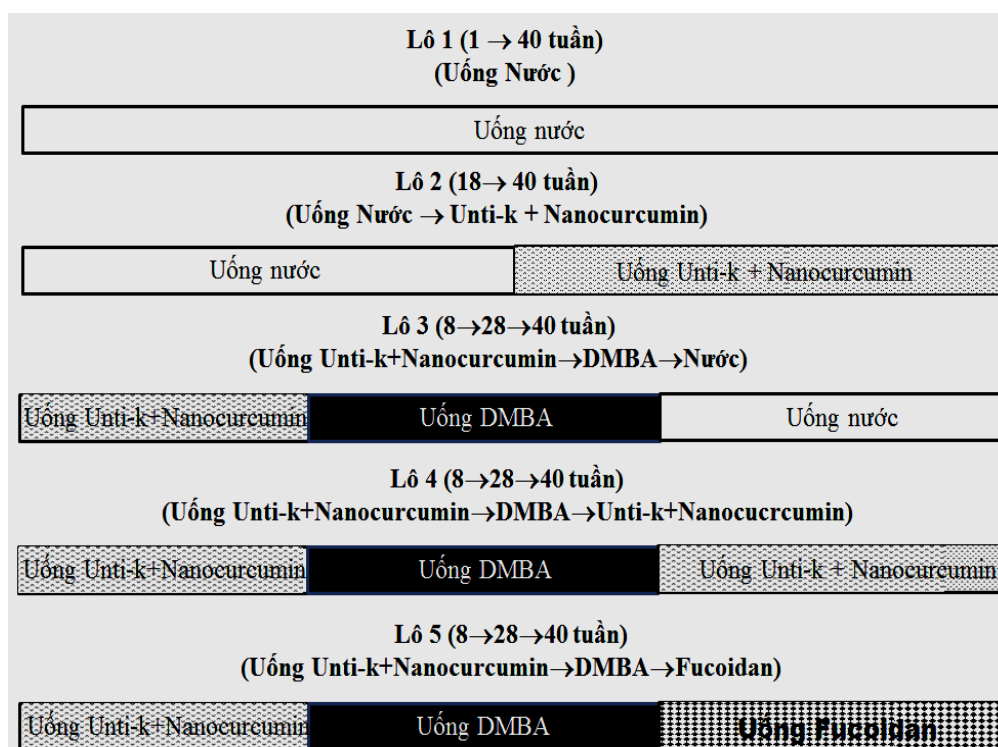
Viên nang cứng 530 mg, sản phẩm của công ty TNHH Liên kết chăm sóc sức khỏe (HLINK). Liều lượng nanocurcumin/1 lần uống = (trọng lượng chuột (g)/1000)x 31,8 (mg) [23]. Sử dụng viên nang nanocurcumin kết hợp unti-k cho chuột bị ung thư vú (gây ra bởi DMBA) uống trong 6 tháng để phòng và chữa bệnh.

Viên nang Okinawa fucoidan Kanehide Bio (Fucoidan), sản xuất tại Nhật Bản, do SHUREIHI (Westminster, CA 92683) phân phối độc quyền tại Hoa Kỳ. Liều lượng Fucoidan/1 lần uống = (trọng lượng chuột (g)/1000)x 21,2 (mg) [24]. Sử dụng viên nang Fucoidan làm thuốc tham khảo đối chứng cho chuột bị ung thư vú (gây ra bởi DMBA) uống trong 6 tháng để phòng và chữa bệnh.

2.2. Động vật và thiết kế thực nghiệm

Chuột cái *Mus musculus var. Albino* 6 tuần tuổi, khỏe mạnh, chưa cho thụ tinh, trọng lượng trung bình là (22,6±0,5) g. Chuột được Viện Pasteur, Tp. Hồ Chí Minh cung cấp, được nuôi tại chuồng nuôi động vật của Viện Công nghệ Sinh học – Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp Tp. Hồ Chí Minh trong điều kiện chiếu sáng 12 giờ (8:00-20:00), thức ăn, nước uống đầy đủ và nuôi 1 tuần để thích nghi với môi trường mới.

Chuột thí nghiệm phân chia thành nhiều lô thí nghiệm (5 con/lô thí nghiệm) với sơ đồ bố trí như sau:



Hình 2.1. Sơ đồ bố trí thí nghiệm

2.3. Phương pháp kiểm tra khối u

Kiểm tra khối u được thực hiện thông qua quan sát số lượng và đường kính khối u. Đường kính khối u được đo bằng thước kẹp điện tử caliper từ tuần thứ 28 sau khi uống DMBA cho đến khi kết thúc điều trị (tuần 40). Khối lượng khối u được tính theo công thức: $V = (L \times W^2)/2$, trong đó V là khối u, L là chiều dài khối u, W là chiều rộng khối u ($L > W$). Các kết quả được trình bày dưới dạng trung bình và độ lệch chuẩn (mm^3) [25].

2.4. Đo trọng lượng cơ thể, số lượng bạch cầu ngoại vi

Trước thời điểm cân trọng lượng và lấy máu, chuột thí nghiệm đã được bỏ đói qua đêm để giảm sự khác biệt của việc cho ăn. Trọng lượng cơ thể được đo bằng thang đo điện tử. Sau đó, chuột đã được gây mê nhờ sử dụng eter diethyl và được thu nhận máu từ tĩnh mạch đuôi vào các ống tráng K_2EDTA chống đông kết. Mẫu máu được gửi đến Khoa Huyết học, Bệnh viện Hòa Hảo, Tp. Hồ Chí Minh để xác định nồng độ bạch cầu máu ngoại vi bằng máy phân tích huyết học tự động [26,27].

2.5. Phân tích mô học

Vào từng thời điểm thí nghiệm nhất định, chuột thực nghiệm được gây mê bằng eter diethyl. Các mô tuyến vú được thu thập và cố định bằng formalin 10%. Mẫu được gửi đến Khoa Giải phẫu bệnh - Bệnh viện Ung bướu thành phố Hồ Chí Minh để thực hiện nhuộm Hematoxylin và Eosin [28].

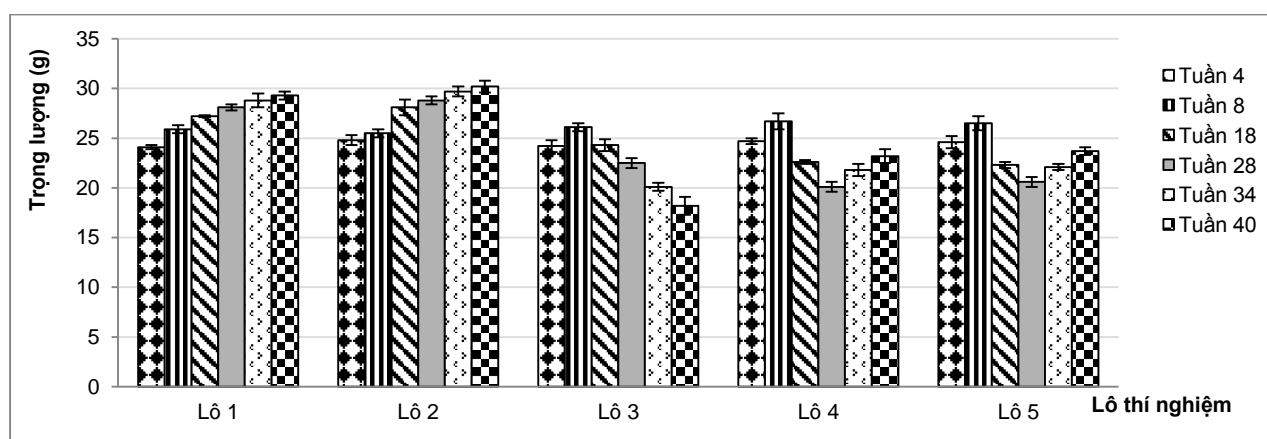
2.6. Phân tích thống kê

Phân tích thống kê được thực hiện bằng phần mềm Statgraphics Centurion XVI (Statpoint Technologies Inc., Warrenton, Virginia, USA). Các số liệu trung bình được trình bày ở dạng $\bar{X} \pm SE$. Mức ý nghĩa được sử dụng để kiểm định sai khác có ý nghĩa giữa các nghiệm thức là $p < 0,05$. Xử lý sai khác giữa các lô thí nghiệm bằng phương pháp phân tích phương sai một nhân tố ANOVA - One Way.

3. KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN

3.1. Thay đổi trọng lượng cơ thể

Trọng lượng cơ thể của chuột đã được thay đổi đáng kể sau 40 tuần. Hình 1, trọng lượng cơ thể của chuột đã tăng dần từ $24,1 \pm 0,2$ lên $29,3 \pm 0,4$ g ở chuột được cho uống nước và tăng từ $24,8 \pm 0,5$ lên $30,2 \pm 0,6$ g ở chuột được cho uống unti-k+nanocurcumin. Ở lô 3,4,5 trọng lượng cơ thể chuột cũng tăng trong 8 tuần cho uống unti-k+nanocurcumin (từ $24,2 \pm 0,6$ đến $26,1 \pm 0,4$ g lô 3; từ $24,7 \pm 0,3$ đến $26,7 \pm 0,8$ g lô 4, từ $24,60,6 \pm$ đến $26,5 \pm 0,7$ g lô 5) nhưng khi chuột uống DMBA đến tuần 28 trọng lượng giảm ($22,5 \pm 0,5$ g lô 3; $20,1 \pm 0,5$ g lô 4, $20,6 \pm 0,5$ g lô 5). Việc sử dụng DMBA dẫn đến gây ra sự điều khiển ngược của các thụ cảm thể (receptor) trong tế bào đó là aryl hydrocarbon receptor (AhR), làm biến đổi các Proto-oncogene (tiền gen sinh ung) thành oncogene (gen sinh ung) dẫn tới hình thành tế bào ung thư nguyên phát, đồng thời gây giảm trao đổi chất trong tế bào, trì trệ quá trình sản tế bào mới do thiết hụt nguyên liệu kiến tạo. Do đó, DMBA đã làm giảm trọng lượng cơ thể chuột. Kết quả này giống với kết quả từ nghiên cứu Do et al [29], trong đó các tác giả chỉ ra rằng sự tăng cân của nhóm bình thường cao hơn nhóm được điều trị bằng DMBA. Biến động trọng lượng cơ thể chuột giữa các lô thí nghiệm trong thời gian phòng bệnh thay đổi nhiều, trọng lượng chuột ở lô 2 đạt $30,2 \pm 0,6$ g cao hơn so với lô 1 ($29,3 \pm 0,4$ g) (40 tuần). Sau 8 tuần nuôi chuột ở các lô 3,4,5 khi được cho uống unti-k+nanocurcumin phòng bệnh có trọng lượng lần lượt $26,1 \pm 0,4$ g, $26,7 \pm 0,8$ g, $26,5 \pm 0,7$ g tăng cao hơn so với lô 1,2 ($25,9 \pm 0,4$ g, $25,5 \pm 0,4$ g) chuột chỉ được uống nước. Điều đó unti-k giúp chống oxi hóa, hạn chế và ức chế các gốc tự do, tăng sức đề kháng và hệ miễn dịch [5], đồng thời nanocurcumin cũng có tác dụng kháng khuẩn, ngăn ngừa sự xâm nhập của vi sinh vật gây bệnh [14,15].



Hình 3.1: Thay đổi trọng lượng cơ thể của chuột ở các lô thí nghiệm

Trọng lượng cơ thể của chuột sau 12 tuần điều trị bằng unti-k+nanocurcumin, fuicodan đã tăng đáng kể trong khi chuột không được điều trị cho thấy sự giảm trọng lượng cơ thể (Hình 1). Những con chuột được điều trị bằng unti-k+nanocurcumin đã tăng trọng lượng cơ thể từ $20,1 \pm 0,4$ lên $23,2 \pm 0,7$ g, và trọng lượng cơ thể của chuột được điều trị bằng fuicodan (thuốc đối chứng (+), $p < 0,05$) (tăng từ $20,6 \pm 0,5$ đến $23,7 \pm 0,7$ g). Chiết xuất từ *Panax notoginseng*, *Celastrus hindsii Benth*, *Allium sativum*, *Crinum latifolium*, thành phần chính của unti-k, có độc tính trên tế bào ung thư thông qua hoạt hóa các đại thực bào và cản trở sự gia tăng tế bào ung thư [30,31]. Curcumin cũng ức chế sự phát triển khối u và hình thành mạch [32]. Do đó, các tế bào ung thư không thể cạnh tranh được oxy và chất dinh dưỡng với các tế bào bình thường, dẫn đến sự phục hồi của trao đổi chất và cân bằng năng lượng, làm tăng trọng lượng cơ thể.

3.2. Thay đổi các thông số huyết học của chuột thực nghiệm trong các phác đồ điều trị

Số lượng bạch cầu của chuột tuần 40 có sự khác biệt giữa các lô thí nghiệm, chuột ở lô 2 sau khi uống unti-k+nanocurcumin có lượng bạch cầu ngoại vi cao hơn so với chuột uống nước bình thường ($6,59 \times 10^3$ so với $6,47 \times 10^3$ tế bào /mm³) (Bảng 1). Curcumin giúp cơ thể tạo ra enzyme giải độc, alkaloid tăng khả năng đề kháng của tế bào khỏe mạnh xung quanh.

Bảng 3.1. Thay đổi tổng số bạch cầu ngoại biên ở các lô thí nghiệm

| Thời gian | Bạch cầu (10^3 tb/mm ³) | | | | |
|-----------|--|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | Lô 1 | Lô 2 | Lô 3 | Lô 4 | Lô 5 |
| Tuần 4 | 6.38±0.02 ^a | 6.36±0.03 ^a | 6.41±0.04 ^c | 6.34±0.05 ^a | 6.39±0.02 ^e |
| Tuần 8 | 6.44±0.05 ^a | 6.45±0.02 ^b | 6.46±0.05 ^b | 6.49±0.02 ^d | 6.51±0.04 ^e |
| Tuần 18 | 6.43±0.01 ^a | 6.44±0.03 ^b | 8.12±0.01 ^c | 8.01±0.04 ^d | 8.03±0.06 ^e |
| Tuần 28 | 6.45±0.04 ^a | 6.52±0.05 ^b | 11.36±0.02 ^c | 10.21±0.03 ^d | 10.45±0.04 ^e |
| Tuần 34 | 6.50±0.05 ^a | 6.55±0.06 ^b | 12.21±0.03 ^c | 8.32±0.07 ^d | 8.12±0.03 ^e |
| Tuần 40 | 6.47±0.03 ^a | 6.59±0.04 ^b | 13.01±0.01 ^c | 7.35±0.06 ^d | 7.27±0.05 ^e |

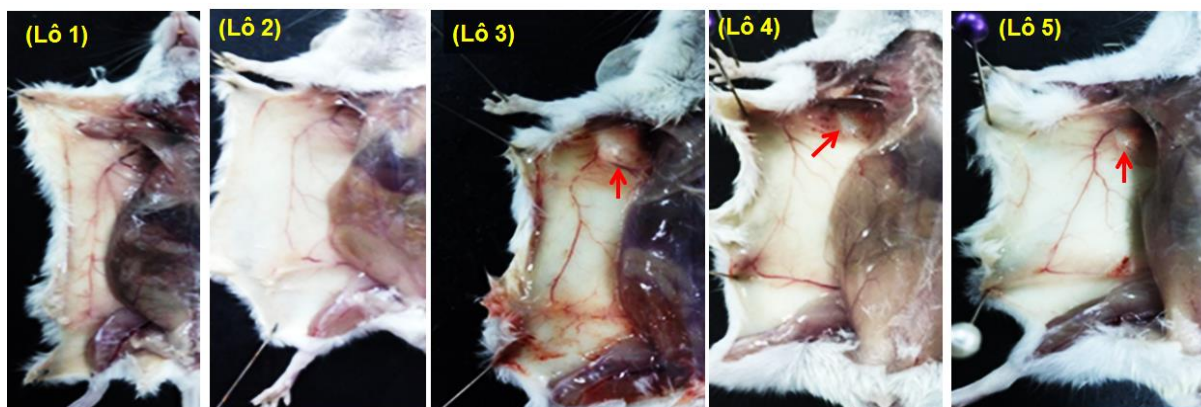
^{a,b,c,d,e} Giá trị với các chữ khác nhau trong hàng có sự khác biệt đáng kể ($p < 0.05$)

Sau khi uống DMBA đến tuần 28 lượng bạch cầu trong máu ngoại vi tăng rất cao (lần lượt ở lô 3,4,5 là $11,36 \times 10^3$, $10,21 \times 10^3$ và $10,45 \times 10^3$ tế bào /mm³). Chúng tôi nhận thấy rằng tổng số bạch cầu của các mô ung thư vú tăng đáng kể sau 20 tuần (Bảng 1). Những kết quả này phù hợp với báo cáo của Chen [33]. Các tác giả gợi ý rằng khi cho chuột uống DMBA với liều 75 mg/kg thể trọng sẽ làm giảm trọng lượng cơ thể, nhưng tổng số bạch cầu và lympho bào sẽ tăng lên. Hơn nữa, Fatemi và Ghandehari (2017) quan sát thấy sự tăng đáng kể của bạch cầu ở chuột nhận DMBA với 5 mg/kg thể trọng [34].

Trong 8 tuần uống unti-k+nanocurcumin phòng bệnh, ở bảng 3.1 chuột ở các lô thí nghiệm 3,4,5 có lượng bạch cầu lần lượt là $6,46 \times 10^3$, $6,49 \times 10^3$, $6,51 \times 10^3$ tế bào/mm³ tăng nhẹ so với chuột ở lô thí nghiệm 1,2 ($6,44 \times 10^3$, $6,45 \times 10^3$ tế bào/mm³) chỉ được uống nước. Đồng thời, sau 40 tuần lượng bạch cầu ở lô 2 cũng tăng nhẹ so với lô 1 ($6,59 \times 10^3$ so với $6,47 \times 10^3$ tế bào/mm³). Điều đó chứng tỏ, chuột có khả năng tăng sức đề kháng khi được uống unti-k+nanocurcumin phòng bệnh.

Sự giảm dần số lượng bạch cầu của chuột sau 12 tuần điều trị bằng unti-k+nanocurcumin biểu hiện rõ ở bảng 3.1. Ở các lô điều trị bằng unti-k+nanocurcumin và fucoidan lượng bạch cầu tổng đến tuần 40 đã giảm (lô 4 là $7,35 \times 10^3$ lô 4 và lô $7,27 \times 10^3$ tế bào /mm³) trong khi đó ở lô 3 chuột đã bị ung thư vú tiếp tục uống nước bình thường thì lượng bạch cầu tăng lên đến $13,01 \times 10^3$ tế bào/mm³. Những kết quả này chứng minh rằng saponin, s-allyl-l-cystein, flavonoid, alkaloid... những thành phần có trong bột tam thất, cao xạ đen, cao tỏi đen, cao trinh nữ hoàng cung ... của viên unti-k đã kích thích sự sinh sản và hoạt hóa tế bào lympho T [5]. Nanocurcumin là một polyphenol tự nhiên có tính chống oxy hóa, chống viêm, kháng khuẩn mạnh mẽ. Sự phối hợp của alkaloid trong crilin và nanocurcumin thúc đẩy quá trình chết (apoptosis) của tế bào ung thư, ngăn chặn sự tăng lên của DNA và protein được sinh ra từ các tế bào ung thư, kìm hãm phát triển tế bào, khối u đang hiện hữu, kích thích miễn dịch của cơ thể. Curcumin giúp cơ thể tạo ra enzyme giải độc, alkaloid tăng khả năng đề kháng của tế bào khỏe mạnh xung quanh [16].

3.3. Thay đổi thể tích khối u của chuột thí nghiệm trong các phác đồ điều trị



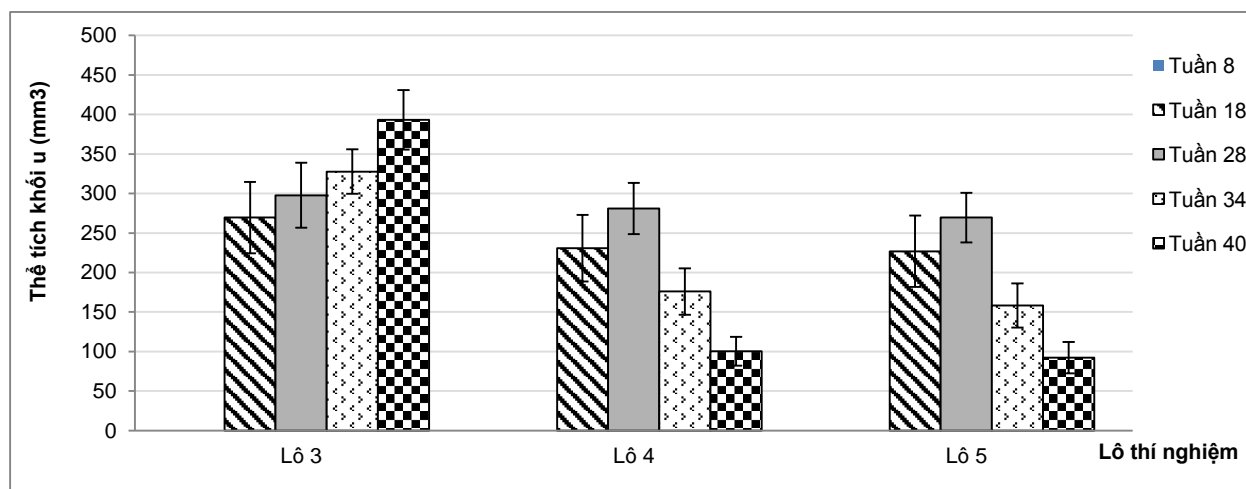
Hình 3.2. Phân tích giải phẫu học của tuyến vú của chuột thí nghiệm với các phác đồ điều trị

Sự thay đổi hình thái khối u và khối lượng được trình bày trong hình 2,3. Khối lượng khối u của chuột bị bệnh ung thư vú do DMBA mà không được điều trị (lô 3) tăng đáng kể trong suốt thời gian thí nghiệm, từ $269,49 \pm 45,32 \text{ mm}^3$ sau 10 tuần uống DMBA (ở tuần 18) lên đến $393,25 \pm 41,02 \text{ mm}^3$ ở tuần thứ 40 ($p < 0,05$). Ngược lại, tất cả các khối u của chuột được điều trị với thực phẩm chức năng unti-k+nanocurcumin và fucoidan thì lại giảm đáng kể về khối lượng của chúng, ở tuần thứ 28 thể tích khối u của chuột ở lô 4 là $281,09 \pm 32,47 \text{ mm}^3$, ở lô 5 là $269,49 \pm 31,29 \text{ mm}^3$, đến tuần thứ 40 thể tích khối u đã giảm ở lô 4 chỉ còn $100,35 \pm 18,23 \text{ mm}^3$ và ở lô 5 chỉ còn $92,26 \pm 19,82 \text{ mm}^3$, $p < 0,05$).

Điều trị bằng Fucoidan làm giảm sự biểu hiện của Bcl-2, Survivin, ERKs, và VEGF và kích hoạt hoạt tính của Caspase-3, kết quả là kích hoạt apoptosis và ức chế sự hình thành mạch. Do đó, thể tích khối u của chuột được điều trị bằng Fucoidan đã giảm [35].

Tác dụng chống u bướu của curcumin đã được mô tả rõ trong các nghiên cứu của LV, trong đó các tác giả đã chứng minh rằng curcumin có thể gây ra apoptosis của các tế bào ung thư vú của con người, ví dụ như tế bào ung thư vú MCF-7 và MDA-MB-231, thông qua việc tăng liều Bax/Bcl-2 và ức chế sự phát triển khối u ở chuột nhất phế nang MDA-MB-231 [36]. Hơn nữa, các hệ thống phân phối thuốc dựa trên công nghệ nano của curcumin cải thiện độ hòa tan trong nước và khả dụng sinh học của curcumin, từ đó tăng cường hoạt tính chống phóng xạ của curcumin [37]. Kết quả là những con chuột được điều trị bằng nanocurcumin thể hiện sự giảm khối lượng khối u trong thời gian điều trị.

Pizzorno và cộng sự (2016) khẳng định rằng việc điều trị bằng cao trình nữ hoàng cung trong thành chứa alkaloid có thể làm giảm 20,5% kích cỡ khối u và ức chế sự phát triển của khối u ở 79,5% bệnh nhân nữ mắc u xơ tử cung, nếu không làm giảm tỷ lệ tăng khối u [38]. Işıl Yıldıırım and Türkan Kutlu và cộng sự (2015) cũng chứng minh rằng saponnin trong bột tam thất có khả năng can thiệp vào sự sao chép của DNA tế bào và chúng ngăn chặn sự gia tăng của các tế bào ung thư [7]. Đồng thời năm 2016, Kim và cộng sự cho biết S-allyl-L-Cystein trong cao tỏi đen giúp ngăn ngừa sự phát triển của tế bào ung thư [10]. Trong nghiên cứu này, unti-k với thành phần có chứa cao trình nữ hoàng cung, cao tỏi đen, bột tam thất... đã điều trị các khối u ở chuột giúp thể tích khối u của giảm từ $281,09 \pm 32,47 \text{ mm}^3$ xuống còn $100,35 \pm 18,23$ ($p < 0,05$) mm^3 , kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đó. Những dữ liệu này nói lên rằng sự kết hợp của unti-k và nanocurcumin có tác dụng hiệp đồng giúp làm giảm thể tích khối u vú và hiệu quả giảm khối u của nó tương đương với hiệu quả của thuốc đối chứng (fucoidan).

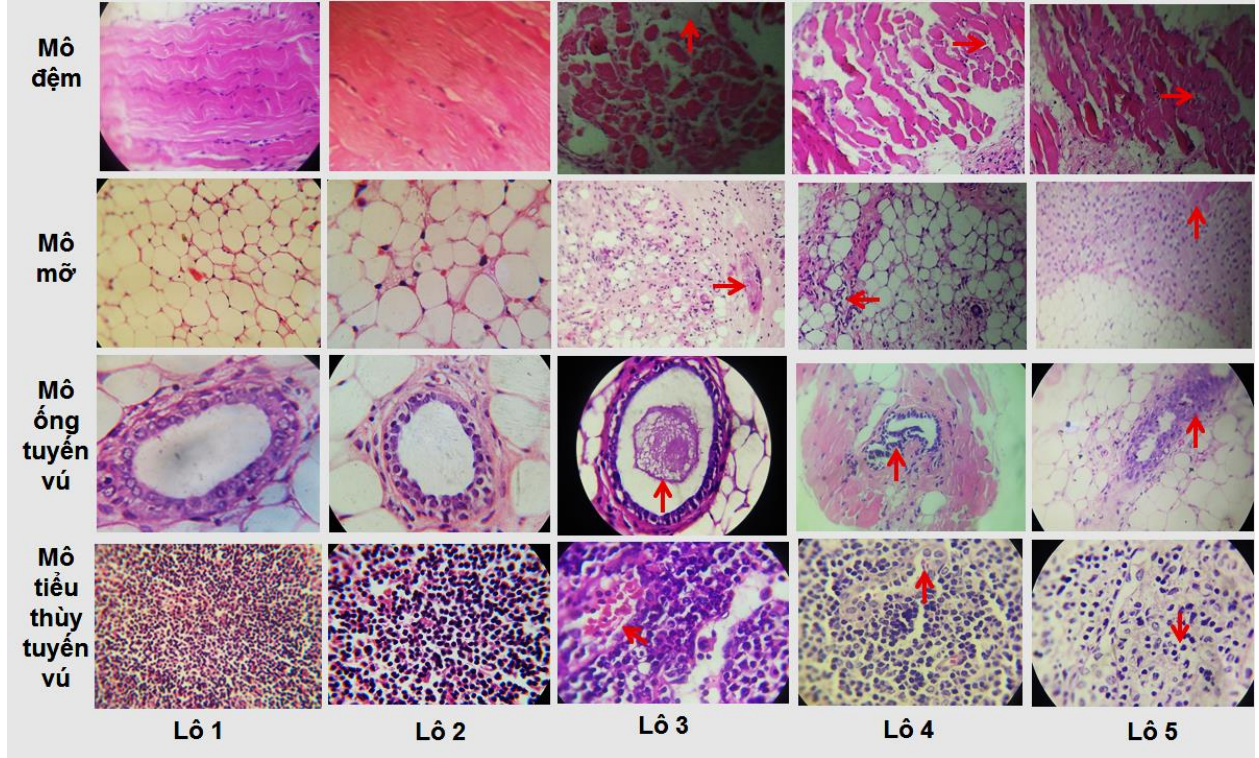


Hình 3.3. Thay đổi thể tích khối u tuyến vú của chuột thực nghiệm

3.4. Thay đổi mô học tuyến vú của chuột thí nghiệm trong các phác đồ điều trị

Phân tích mô học tuyến vú ở chuột được cho uống DMBA, hình ảnh giải phẫu tuyến vú chuột cho thấy sự hủy hoại các mô nghiêm trọng (hình 4-lô 3). Đến tuần 40, mô đệm tuyến vú có hiện tượng xâm lấn của carcinoma ngày càng cao, xâm lấn diện rộng, cấu trúc tế bào mô đệm bị phá vỡ hoàn toàn. Carcinoma lấn ép gần hết các tế bào mô mỡ làm biến dạng cấu trúc của chúng, tế bào lỏng lẻo sắp xếp không định hướng. Tại mô ống tuyến vú có tế bào carcinôm tại chỗ dạng đặc (DCIS – Solid type) các tế u và hệ sợi cơ phát

triển lấp đầy lòng ống tuyến, tế bào tăng sắc nhân không điển hình, hạt nhân rõ và phân bào nhiều. Mô tiêu thụ tuyến vú có tế bào u tăng sinh không kiểm soát, tế bào chồng chéo lên nhau, nhân đồng dạng nhưng méo mó vì số lượng tế bào lớn làm chúng bị chèn ép nhau, ổ bạch cầu bị hủy diệt. Phân tích mô học cho thấy khối u vú phát triển mạnh trong giai đoạn ung thư với biểu hiện không tốt.



Hình 3.4. Phân tích mô học tuyến vú của chuột thí nghiệm với các phác đồ điều trị

Sau khi điều trị đồng thời với unti-k và nanocurcumin trong 12 tuần, phân tích mô học tuyến vú của chuột ở tuần 40 cho thấy chuyển biến tốt (hình 4- lô 4). Cấu trúc mô đệm hồi phục rõ rệt, các bó sợi collagen kết thành đám tập trung, tế bào bắt màu rõ nhân vừa không tăng sắc, sắp xếp định hướng. Carcinoma xâm lấn giảm rõ rệt, cấu trúc mô mỡ hồi phục, tế bào sắp xếp có định hướng, nhân đồng dạng đều màu, phân bào giảm. Tế bào carcinôm ống tuyến vú tại chỗ dạng nhú và vi nhú (DCIS – Micropapillary type) biến mất thay vào đó là sự sắp xếp có trật tự của cấu trúc ống tuyến, lớp tế bào cơ biểu mô đã giảm sự tăng sản, các ổ khu trú bạch cầu không còn, phân bào giảm, tế bào đồng dạng bắt màu tốt tuy nhiên còn lỏng lẻo so với cấu trúc bình thường. Cấu trúc tiêu thụ có sự hồi phục rõ rệt, tế bào kết dính nhau chặt chẽ, nhân bắt màu tốt, các ổ khu trú bạch cầu không còn rõ. Vì vậy, điều trị mô hình ung thư vú với các thực phẩm chức năng unti-k+ nanocurcumin và fucoidan, đã được khôi phục lại cấu trúc bình thường của tuyến vú.

4.KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã đạt được một số kết quả quan trọng như sau:

Chứng minh được tác dụng kết hợp của unti-k và nanocurcumin giúp tăng sức đề kháng, kích thích hệ miễn dịch, phục hồi tuyến vú bị ung thư và cơ thể chuột thí nghiệm thông qua khảo sát các chỉ tiêu cân nặng, chỉ số bạch cầu ngoại vi, hình thái giải phẫu và thể tích khối u tuyến vú, phân tích mô bệnh học tuyến vú.

Sự phối hợp của saponin, s-allyl-l-cystein, flavonoid, alkaloid và nanocurcumin đem lại hiệu quả cao trong việc ức chế tế bào ung thư, phục hồi cơ thể. Công nghệ nano tạo ra các hạt tiểu phân curcumin và saponin, s-allyl-l-cystein, flavonoid, alkaloid với kích thước siêu nhỏ, giúp hấp thu nhanh vào máu và xâm nhập tốt vào các tế bào ung thư, làm tăng số lượng tế bào lympho T, kích thích hệ miễn dịch kháng khuẩn mang lại hiệu quả điều trị vượt trội cho các bệnh nhân ung thư.

LỜI CẢM ƠN

Các tác giả xin chân thành cảm ơn Khoa Huyết học - Bệnh viện Hòa hảo, Khoa Giải phẫu bệnh - Bệnh viện Ung bướu Tp. Hồ Chí Minh, các cộng sự Viện Công nghệ Sinh học – Thực phẩm trường Đại học Công nghiệp Tp. Hồ Chí Minh đã nhiệt tình cộng tác, hỗ trợ nhóm nghiên cứu trong suốt quá trình thực hiện đề tài.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. T. B. Nasakai (2016). Pharmacological activity of sanchi ginseng (*Panax notoginseng*). *Jouarnal of pharmacy and phamacology*, Vol 1 , P: 1-12.
- [2]. Trinh Thi Thuy, Nguyen Huy Cuong, Tran Van Sung (2017). Triterpenes from *Celastrus hindsii* Benth. *Journal of Chemistry*, Vol. 45 (3), P: 373 - 376.
- [3]. Vinay K Singh, Dinesh K Singh (2008). Pharmacological Effects of Garlic (*Allium sativum* L.). *ARBS Annual Review of Biomedical Sciences*, Vol 78(2) , P: 112-120.
- [4]. Shibnath Ghosal, Kulwant S. Saini (1993). Ancaloid of *Crinum latifolium*. *Phytochemistry*, Vol. 22 (10), P:2305 - 2309.
- [5]. Trung tâm nghiên cứu ứng dụng sản xuất thực phẩm chức năng Học viện Quân y Việt Nam (2017). Unti-K và ung bướu. *Tạp chí y dược học quân sự*, tháng 11/2017.
- [6]. Flavio Dias Ferreira et al (2013). Inhibitory effect of the essential oil of *Curcuma longa* L. and curcumin on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* Link. *Food Chemistry*, Vol. 136, P:789 –793.
- [7]. I.Yıldırım and T.Kutlu (2015). Anticancer Agents: Saponin and Tannin. *International Journal of Biological Chemistry*, Vol. 9 (6): P.332-340.
- [8]. Thu Dang Kim, Hai Nguyen Thanh, Duong Nguyen Thuy, Loi Vu Dyc, Thu Vu Thi, Hung Vu Manh, Patchree Boonsin, Tung Bui Thanh (2016). Anticancer effects of saponin-phospholipid complex of *Pannax notoginseng* grown in Vietnam. *Asian Pacific Journal of Tropical complex Biomedicine*, Vol 5(12), P: 198-208.
- [9]. J. Chan. Res at el (1983). Phase variation of hyaluronidase-producing peptostreptococci associated with periodontal disease. *NCBI*, Vol. 62(9), P:1009-12.
- [10]. Nguyễn Thị Ngọc Trâm)2013). Hành trình hai thập niên của sản phẩm thuốc được bào chế từ cây trinh nữ hoàng cung. *Tạp chí dược và mỹ phẩm* tập 2/240/497.
- [11]. Jin-Jian Lu, Jiao-Lin Bao, Xiu-Ping Chen, Min Huang, and Yi-Tao Wang (2016). Alkaloids Isolated from Natural Herbs as the Anticancer Agents. *Pharmacognosy Review*, Vol. 10 (20), P. 90-99.
- [12]. Kim, J.S, Kang, O.K and Gwone, O.G (2013). Comparision of phenolic acids and flavonoids in black garlic at different thermal processing steps. *Journal of Functional Foods*, Vol. 5(1): P:80-86.
- [13]. Đào Văn Phan (2015). Vai trò curcumin – nanocurcumin trong điều trị ung thư. *Bộ môn Dược lý - Trường Đại Học Y Hà Nội*.
- [14]. Ul-Islam M, Wahid F, Lee YS (2014). Multifunctional polymeric nanocurcumin for cancer therapy, *J Nanosci Nanotechnol*, *NCBI*, Vol 14(1), P: 803-14.
- [15]. Altaf S. Darvesh et al (2012). Curcumin and liver cancer: a review. *Curr Pharm Biotech.*, Vol 13,P:218-228.
- [16]. R. A Siddiqui, K.A Harvey, C.Walker, J. Altenburg, Z. Xu, C.Terry, I. Camarillo, Y.J. Hall and C.Mariash (2013). Characterization of synergistic anti-cancer effects of docosahexaenoic acid and curcumin on DMBA-induced mammary tumorigenesis in mice. Siddqui et al. *BMC Cancer*, Vol. 12 , P: 75-89.
- [17]. P.Z.Sarabi, A.Hesari, M.Bagheri, M.Baazm, F.Ghasemi)2018). Evaluation of Cytotoxicity Effects of Combination Nano-Curcumin and Berberine in Breast Cancer Cell Line. *Iranian Journal of Toxicology*, Vol. 12 (4), P: 23-37.

- [18]. Chương trình nghiên cứu và phát triển (2007). Thử nghiệm trên động vật. Sanofi 99F88254-6E71-4152-A31F-F0165C2DAAB6.
- [19]. Nguyễn Thị Ngọc Trâm (2009). Báo cáo tổng hợp “Nghiên cứu khả năng kích thích hệ miễn dịch chống ung thư của các alcaloid và flavonoid được chiết xuất từ cây Trinh nữ hoàng cung (*Crinum latifolium* L.) để sử dụng làm nguyên liệu sản xuất thuốc hỗ trợ điều trị ung thư”. Tạp chí dược và mỹ phẩm, tháng 12/ 2009.
- [20]. J.Vinodhini, S. Sudha (2013). Effect of bis-carboxy ethyl germanium sesquioxide on n-nitroso-n-methylurea-induced rat mammary carcinoma. Department of Biotechnology, Karpagam University, Coimbatore, Tamilnadu, India.
- [21]. Jaime Yeo (2017). *Cancer counsellor touched by love - Posted in healthnews*. Public access, 11/2017
- [22]. Đỗ Thị Thảo, Đỗ Thị Phương, Nguyễn Thị Cúc, Nguyễn Thị Nga, Nguyễn Thị Trang (2009). Gây u thực nghiệm trên chuột bằng DMBA (7,12 Dimethyl benz[A] anthracene). Tạp chí Khoa học ĐHQGHN, Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, Vol 25, P: 107-111.
- [23]. Đào Văn Phan (2014). Ứng dụng Nanocurcumin trong phòng và trị bệnh. Viện hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.
- [24]. Farzaneh Atashrazm et al (2015). Fucoidan and Cancer: A Multifunctional Molecule with Anti-Tumor Potential. *Mar Drugs*, Vol 13(4),P: 2327–2346.
- [25]. C. I. Asyura, A. E. Z. Hasan, Hasim1, H. Julistiono, Husnawati, N. Bermawie and E. I. Riyanti (2017). Effectiveness of Ethyl Acetate Extract of Endophytic Fungi in Soursop Leaves towards the Growth of Mammary Tumor Induced by 7,12dimethylbenz(α)anthracene in Female Rats. *Annual Research & Review in Biology*, Vol. 18(5), P: 1-8.
- [26]. Iigo.M, Hoshi.A, Kadosawa.H, Fujigaki. M (1991). Antitumor Activity and Metabolism of a New Anthracycline-containing Fluorine (ME2303) in Lewis Lung Carcinoma-bearing Mice. *Jpn.J. Cancer Res*. Vol. 82, P: 13-17.
- [27]. C.H. Chen, S.H. Wu, Y.M. Tseng, J.B. Liao, H.T. Fu, S.M. Tsai & L.Y. Tsai (2017). Suppressive Effects of Puerariae Radix on the Breast Tumor Incidence in Rats Treated with DMBA. *Journal of Agricultural Science*; Vol. 9, No. 7, pp. 68-79.
- [28]. F. Ghandehari, M. Fatemi. The effect of *Ficus carica* latex on 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene-induced breast cancer in rats. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, Vol. 1, P: 1-7.
- [29]. T.T. Do, P.T. Do, C.T. Nguyen, N.T. Nguyen, T.T. Nguyen (2009). Experimental tumorization on mice by DMBA (7,12 Dimethyl Benz[A] Anthracen). *VNU Journal of Science-Natural Science and Technology*, Vol 25,P:107-182.
- [30]. M. Jenny, A. Wondrak, E. Zvetkova E, N.T.N. Tram, P.T.P. Phi, H. Schennach, Z Culig, F. Ueberall, D. Fuchs (2011). *Crinum Latifolium* Leave Extracts Suppress Immune Activation Cascades in Peripheral Blood Mononuclear Cells and Proliferation of Prostate Tumor Cells. *Scientia Pharmaceutica*, Vol. 79, P: 323-329.
- [31]. H.Y. Nguyen, B.H. Vo, L.T. Nguyen, J. Bernad, M. Alaeddine, A. Coste, K. Reybier, B. Pipy, F. Nepveu (2013). Extracts of *Crinum latifolium* inhibit the cell viability of mouse lymphoma cell line EL4 and induce activation of anti-tumour activity of macrophages in vitro. *Journal of Ethnopharmacology*,Vol149,P:75-81.
- [32]. S. Bimonte, A. Barbieri, G. Palma, A. Luciano, D. Rea, C Arra (2013). Curcumin Inhibits Tumor Growth and Angiogenesis in an Orthotopic Mouse Model of Human Pancreatic Cancer. *BioMed Res. Int.*, Vol 8, P:10-23.
- [33]. C.H. Chen, S.H. Wu, Y.M. Tseng, J.B. Liao, H.T. Fu, S.M. Tsai, L.Y. Tsai (2017). Suppressive Effects of Puerariae Radix on the Breast Tumor Incidence in Rats Treated with DMBA. *Journal of Agricultural Science*, Vol 9, P:68-75.
- [34]. M. Fatemi and F. Ghandehari (2017). F, The effect of *Ficus carica* latex on 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene-induced breast cancer in rats. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, in press,Vol 1, P: 17-29.

- [35]. M. Xue, Y. Ge, J. Zhang, Q. Wang, L. Hou, Y. Liu, L. Sun, Q. Li (2012). Anticancer Properties and Mechanisms of Fucoidan on Mouse Breast Cancer In Vitro and In Vivo. PLoS ONE, Vol 7, P: 43-83.
- [36]. Z.D. Lv, X.P. Liu, W.J. Zhao, Q. Dong, F.N. Li, H.B. Wang, B. Kong, B (2014). Curcumin induces apoptosis in breast cancer cells and inhibits tumor growth in vitro and in vivo. International Journal of Clinical and Experimental Pathology, Vol. 7, P: 18-28.
- [37]. M.H. Khosropanah, A. Dinarvand, A. Nezhadhosseini, A. Haghighi, S. Hashemi, F. Nirouzaad, S. Khatamsaz, M. Entezari, M. Hashemi, H. Dehghani (2016). Analysis of the Antiproliferative Effects of Curcumin and Nanocurcumin in MDA-MB231 as a Breast Cancer Cell Line. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, Vol 15, P: 231-236.
- [38]. J.E. Pizzorno, M.T. Murray, H. Joiner-Bey (2016). The Clinician's Handbook of Natural Medicine E-Book. Elsevier Health Sciences Publisher, Amsterdam.

Ngày gửi bài: 18/09/2018

Ngày chấp nhận đăng: 05/04/2019