

NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG PHÒNG NGỪA LOẠN SẢN TẾ BÀO GAN VÀ CHỐNG SUY TỦY CỦA LINH CHI

Ngô Kiến Đức*, Trần Mạnh Hùng*

TÓM TẮT

Mở đầu: Ung thư là bệnh gây tỉ lệ tử vong cao, vì thế phòng ngừa ung thư, hóa trị liệu và trị liệu hỗ trợ ung thư luôn được chú trọng. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh linh chi (*Ganoderma lucidum*) có tác dụng phòng ngừa ung thư *in vitro* (Yuen 2005), trong nghiên cứu này, chúng tôi khảo sát tác dụng của linh chi trong phòng ngừa loạn sản tế bào gan và khả năng phục hồi tình trạng suy tủy *in vivo*.

Mục tiêu: Nghiên cứu này đặt ra 2 mục tiêu sau: 1) Nghiên cứu tác dụng của linh chi trong phòng ngừa loạn sản tế bào gan, và 2) Nghiên cứu tác dụng của linh chi trên khả năng phục hồi tình trạng suy tủy do thuốc hóa trị ung thư gây ra.

Phương pháp: Nghiên cứu được tiến hành trên cơ sở mô phỏng phương pháp gây tổn thương tiền ung thư bằng N-nitrosamin (Hecht 1997) và phương pháp gây suy tủy bằng methotrexat (Nakamura 2003).

Kết quả: Trên mô hình gây loạn sản tế bào gan bằng diethylnitrosamin, linh chi (15% và 30%) có tác dụng ức chế sự hình thành khối u; ức chế hiện tượng phân bào bất thường và sự hình thành các nhân quái dị. Trên mô hình gây suy tủy bằng methotrexat, linh chi có tác dụng phục hồi tổng lượng bạch cầu bị suy giảm, đặc biệt linh chi có tác dụng phục hồi dòng bạch cầu trung tính và bạch cầu lympho; ngoài ra linh chi cũng có khả năng phục hồi tình trạng suy giảm tiểu cầu.

Kết luận: Ngoài tác dụng phòng ngừa và ức chế sự hình thành khối u, linh chi cũng có tác dụng phục hồi tình trạng suy tủy do thuốc hóa trị gây ra.

Từ khóa: linh chi, diethylnitrosamin, hóa phòng ngừa, suy tủy

ABSTRACT

INVESTIGATION OF PROTECTIVE EFFECTS OF LINGZHI ON LIVER DYSPLASIA AND BONE-MARROW SUPPRESSION

Ngo Kien Duc, Tran Manh Hung * Y Hoc TP. Ho Chi Minh * Vol. 14 - Supplement of No 1-2010: 52- 58

Background: Cancer is one of the most fatal diseases, therefore cancer prevention as well as cancer chemotherapy and supportive treatment are of important. Many studies have proved cancer-preventive effect of lingzhi (*Ganoderma lucidum*) *in vitro* (Yuen 2005). In this study, we investigated the effect of lingzhi in prevention of hepatic dysplasia and in recovery of bone marrow suppression *in vivo*.

Objectives: The aims of this study were as following: 1) To investigate the effect of lingzhi on prevention of hepatic dysplasia induced by diethylnitrosamine, and 2) to investigate the recovery effect of lingzhi on methotrexate-induced bone marrow suppression.

Methods: Study was conducted in accordance with "two-stage carcinogenesis" method described by Hecht (1997) and bone marrow suppression was induced by methotrexate as suggested by Nakamura (2003).

Results: On hepatic dysplasia model induced diethylnitrosamine: lingzhi 15% or 30% showed inhibitory effects on tumorigenesis and abnormal cell division. On methotrexate-induced bone marrow suppression: lingzhi

* Khoa Dược - Đại học Y Dược Tp. HCM

Địa chỉ liên hệ: DS. Ngô Kiến Đức

ĐT: 0903 055 357

Email: ngokienduc@gmail.com

exerted recovering action on white blood cell count, especially on the numbers of neutrophil and lymphocyte. In addition, lingzhi also showed recovering effect on decreased platelet cell count.

Conclusion: In addition to cancer prevention, lingzhi also possesses recovering effect of bone-marrow suppression induced by chemotherapy.

Keywords: lingzhi, diethylnitrosamine, chemoprevention, bone-marrow suppression.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh ung thư ngày càng gia tăng không chỉ ở các nước phát triển mà ở cả các nước đang phát triển, trong đó có Việt Nam. Tỷ lệ tử vong do bệnh ung thư chỉ đứng sau tim mạch. Trước đây ung thư được coi là bệnh nan y, nhưng ngày nay nhờ sự phối hợp tốt giữa phẫu thuật, xạ trị, hóa trị và các trị liệu hỗ trợ, chất lượng cuộc sống và tỷ lệ sống của bệnh nhân ung thư ngày càng được cải thiện.

Trong những loại dược liệu được nghiên cứu nhằm phòng ngừa và điều trị ung thư, linh chi (*Ganoderma lucidum*) được xem là có nhiều tác dụng đáng chú ý. Thành phần polysaccharid cao trong linh chi làm tăng khả năng miễn dịch của cơ thể, làm tăng chức năng gan, cô lập và diệt các tế bào ung thư (Yuen 2005). Nhóm hoạt chất protein mà tiêu biểu là Lingzhi-8 được chứng minh là chất chống dị ứng và điều hòa miễn dịch hữu hiệu, đồng thời duy trì sự tạo kháng thể chống viêm gan B (Kino 1989). Nhóm triterpen có tác dụng hạ huyết áp, ức chế acetylcholine esterase, bảo vệ gan, chống khối u (Lui 1993).

Nhằm góp phần mở rộng khả năng ứng dụng của linh chi trong phòng ngừa và trị liệu hỗ trợ ung thư, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này với 2 mục tiêu chính sau:

- Nghiên cứu tác dụng của linh chi trong phòng ngừa loạn sản tế bào gan gây bởi diethylnitrosamin
- Nghiên cứu tác dụng của linh chi trên khả năng phục hồi tình trạng suy tủy do thuốc hóa trị ung thư gây ra.

ĐỐI TƯỢNG - PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Thú vật thử nghiệm

Thú vật thử nghiệm là chuột nhắt trắng, chủng ddY, giống đực, có trọng lượng từ 18-20 g, được phân bố ngẫu nhiên thành nhiều lô khác

nhau, mỗi lô từ 8-15 con. Chuột được nuôi trong môi trường tiến hành thực nghiệm từ 3-5 ngày để thích nghi với môi trường.

Chế phẩm thử nghiệm

Chế phẩm thử nghiệm là cao khô Linh chi toàn phần do Công ty Cổ Phần Dược Phẩm OPC sản xuất đạt tiêu chuẩn kiểm nghiệm cấp cơ sở. Bột cao khô linh chi được pha vào nước cất để tạo thành cao lỏng với hàm lượng 15% (15g cao khô/100 ml nước) và 30%. Các dung dịch này được sử dụng cho các lô thử nghiệm.

Bảng 1. Công thức bào chế và tiêu chuẩn nguyên liệu của cao linh chi (do OPC sản xuất)

Công thức bào chế	Tiêu chuẩn nguyên liệu
Linh chi (<i>G. lucidum</i>) 10kg	Đạt tiêu chuẩn cơ sở
Natri benzoat 5g	Đạt tiêu chuẩn Dược điển Việt nam II tập 3
Nước uống được vừa đủ	Đạt tiêu chuẩn của Viện vệ sinh y tế công cộng

Phương pháp gây loạn sản gan bằng diethylnitrosamin và khảo sát tác dụng phòng ngừa loạn sản gan của cao linh chi

Mô hình gây loạn sản gan được thực hiện bằng cách tiêm phúc mạc (ip) dung dịch diethylnitrosamin 1%, sau đó tiếp tục tiêm dung dịch CCl₄ 4% trong dầu oliu (ip) hàng tuần. Đánh giá mức độ loạn sản gan bằng việc phân tích đại thể và vi thể tế bào gan (Trần 2005).

Phương pháp gây suy tủy bằng methotrexat và khảo sát tác dụng phục hồi suy tủy của cao linh chi

Methotrexat được sử dụng ở liều 7,5 mg/kg thể trọng, tiêm phúc mạc vào các ngày 0, 3, 6 của quá trình thử nghiệm. Toàn bộ quá trình thử nghiệm kéo dài 7 ngày. Việc xác định công thức máu được tiến hành vào ngày 0 (trước khi tiêm methotrexat) và ngày 7 sau khi tiêm liều đầu tiên methotrexat.

Phân tích về mặt mô học

Gan chuột thí nghiệm được cố định trong dung dịch formaldehyd 10% trong dung dịch đệm. Quan sát đại thể được tiến hành bằng việc so sánh hình dạng của gan ở nhóm gây nhiễm độc với gan của nhóm chuột bình thường. Sự hình thành các nốt tăng sản bất thường ở các nhóm chuột thí nghiệm cũng được ghi nhận và thống kê. Quan sát vi thể gan bao gồm quan sát cấu trúc, hình thái tế bào gan trong các tiểu thùy gan để tìm ra những cấu trúc, hình thái bất thường so với gan bình thường.

Xử lý số liệu, thống kê phân tích

Các số liệu thu được từ các thí nghiệm được xử lý theo phương pháp thống kê mô tả và trình bày ở dạng số trung bình \pm sai số chuẩn trung bình. Thực hiện so sánh sự khác biệt về các chỉ tiêu đánh giá giữa hai lô thú vật thử nghiệm bằng trắc nghiệm **t-Student (t test)** hay **chi bình phương (χ^2)**.

KẾT QUẢ

Khảo sát mức độ gây loạn sản gan của diethylnitrosamin và tác dụng phòng ngừa của linh chi

Chuột thí nghiệm được chia thành các lô như sau:

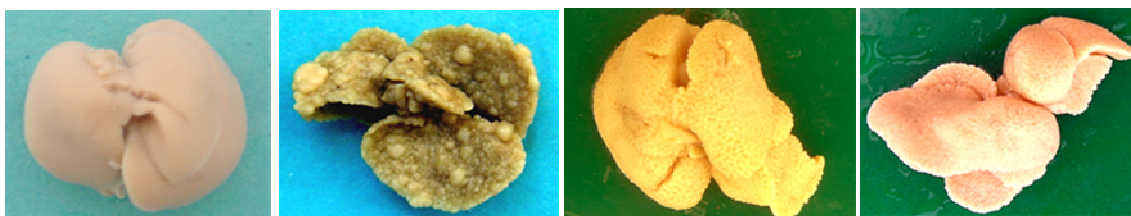
- Lô 1: ip dung dịch NaCl 0,9% (1 lần/tuần x 16 tuần) + uống nước cất 0,2ml/10g thể trọng/ngày, n = 8

- Lô 2: ip dung dịch DEN 1% và CCl₄ 4% (theo mô tả trên) + uống nước cất 0,2ml/10g thể trọng/ngày, n = 10
- Lô 3: ip dung dịch DEN 1% và CCl₄ 4% (theo mô tả trên) và được uống cao linh chi 15% liều 0,2 ml/10g thể trọng/ngày, n = 13
- Lô 4: ip dung dịch DEN 1% và CCl₄ 4% (theo mô tả trên) và được uống cao linh chi 30% liều 0,2 ml/10g thể trọng/ngày, n = 13

Sau 16 tuần thử nghiệm, việc so sánh mô học được thực hiện để đánh giá mức độ tăng sản của mô hình cũng như mức độ bảo vệ gan của cao linh chi.

Về mặt đại thể: không có sự xuất hiện các nốt tăng sản bất thường trên gan ở lô tiêm NaCl 0,9% (hình 1). Tuy nhiên, ở lô DEN + CCl₄ xuất hiện nhiều nốt tăng sản bất thường trên gan. Các nốt tăng sản có màu trắng ngà, có bờ rõ rệt. Tỷ lệ chuột có nốt tăng sản bất thường xuất hiện ở lô DEN + CCl₄ là 70% (7/10 chuột). Như vậy việc kết hợp DEN và CCl₄ có thể đã gây rối loạn quá trình sinh sản tế bào gan dẫn đến sự tăng sản bất thường của các tế bào ở cơ quan này.

Ở lô uống cao Linh chi 15%, chỉ có 1/13 chuột (7,69%) có sự xuất hiện các nốt tăng sản và ở lô uống cao Linh chi 30% tỷ lệ này là 0/13 (0%). Như vậy, so với lô gây loạn sản bằng DEN + CCl₄ với tỷ lệ nốt tăng sản là 70%, các lô được phòng ngừa bằng cao Linh chi đã thể hiện tác dụng ức chế sự hình thành các nốt tăng sản trên bề mặt gan.



Chứng (NaCl 0,9%)

DEN + CCl₄

Linh chi 15%

Linh chi 30%

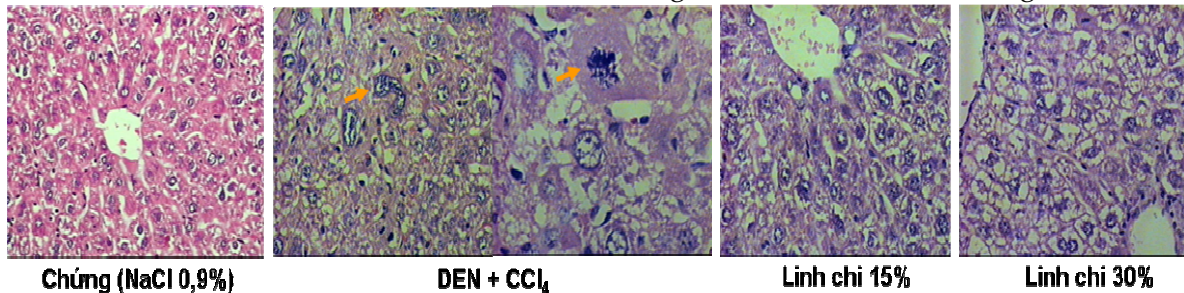
Hình 1.

Hình ảnh đại thể gan chuột ở lô chứng (NaCl 0,9%), lô gây loạn sản (DEN + CCl₄), lô phòng ngừa bằng linh chi (DEN + CCl₄ + linh chi 15% hay 30%)

Về mặt vi thể: ở lô tiêm NaCl 0,9%, cấu trúc và hình thái tế bào gan thể hiện bình thường với tĩnh mạch trung tâm và các xoang

mao mạch hình dạng nan hoa đặc thù (hình 2). Ở lô tiêm DEN + CCl₄ có sự biến đổi bất thường rõ rệt trên hình thái và cấu trúc tế bào

gan. Tế bào gan có kích thước nhân lớn, tăng sắc, nhiễm sắc thể thô và tỉ lệ nhân/bào tương tăng, có hiện tượng phân bào bất thường (mũi tên) và sự xuất hiện nhân quái dị, chứng tỏ có sự xuất hiện của những dòng tế bào đột biến bất thường.



Hình 2. Hình ảnh vi thể gan chuột ở lô chứng (NaCl 0,9%), lô gây loạn sản (DEN + CCl₄), lô phòng ngừa bằng linh chi (DEN + CCl₄ + linh chi 15% hay 30%)

Bảng 2. Tóm tắt kết quả gây loạn sản gan và tác dụng phòng ngừa của linh chi

	NaCl 0,9%	DEN + CCl ₄	Linch chi 15%	Linch chi 30%
n =	8	10	13	13
Nốt tăng sản	0/8 (0%)	7/10 (70%)	1/13 (7,69%)	0/13 (0%)
Vi thể	Bình thường	Tăng sản không điển hình	Bào tương thoái hóa	Bào tương thoái hóa

Khảo sát tác động của linh chi trên sự phục hồi tình trạng suy tủy gây bởi methotrexat

Trong thử nghiệm này, chuột thí nghiệm được chia ra làm các lô như sau:

- Lô gây suy giảm bạch cầu bằng methotrexat (7,5mg/kg, ip, vào các ngày 0,3,6)
- Lô gây suy giảm bạch cầu bằng methotrexat (MTX) và uống cao linh chi 15% (0.1 ml/10 g), uống sau khi tiêm liều đầu tiên methotrexat 1 ngày và liên tục trong 7 ngày
- Lô gây suy giảm bạch cầu bằng methotrexat (MTX) và uống cao linh chi 30% (0.1 ml/10 g), uống sau khi tiêm liều đầu tiên methotrexat 1 ngày và liên tục trong 7 ngày)

Ở cả 2 lô uống linh chi 15% và 30%, vi thể gan vẫn còn biểu hiện các tế bào gan có bào tương thoái hóa, nhân tế bào lớn, nhiễm sắc thể thô, tỉ lệ nhân/bào tương tăng. Tuy nhiên quan sát vi thể không phát hiện các nhân quái dị chứng tỏ không còn sự hiện diện của các dòng tế bào đột biến bất thường.

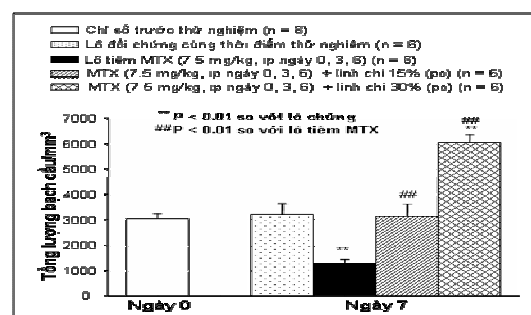
- Lô chứng: tiêm nước cất (0.1 ml/10 g, ip, vào các ngày 0, 3, 6) + uống nước cất (0.1 ml/10 g từ ngày 1 đến ngày 7)

Xét nghiệm huyết học được thực hiện vào các thời điểm: ngày 0 (lô trước thử nghiệm), và ngày 7.

Tác động của methotrexat và linh chi trên tổng lượng bạch cầu

Trước khi tiêm methotrexat (ngày 0) và ngày 7, một nhóm chuột được lấy máu để xét nghiệm công thức máu trên máy xét nghiệm huyết học. Lô lấy máu vào ngày 0 (trước khi tiêm MTX) được xem là lô cung cấp các chỉ số huyết học trên các chuột bình thường ở thời điểm trước khi thử nghiệm. Lô lấy máu ở ngày 7 được xem là lô đối chứng ở cùng thời điểm cho các lô tiêm MTX và thử nghiệm linh chi.

Kết quả gây suy giảm tổng lượng bạch cầu của methotrexat và tác dụng phục hồi bạch cầu của cao linh chi 15% hay 30% được trình bày trong hình 3.

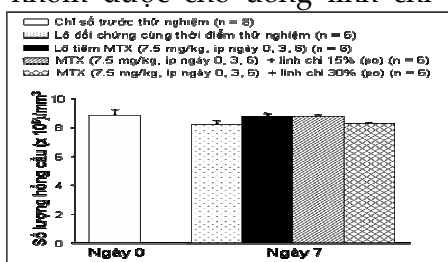


Hình 3. Tổng lượng bạch cầu của các lô thử nghiệm

- Trong thí nghiệm này, methotrexat gây suy giảm rõ rệt tổng lượng bạch cầu vào ngày thứ 7, và ở các lô cho uống linh chi, tổng lượng bạch cầu được khôi phục trở lại gần như bình thường (linh chi 15%) hay tăng khá cao so với bình thường (linh chi 30%).
- Chỉ số trước thực nghiệm và lô chứng ở ngày 7 không cho thấy có sự dao động đáng kể, vì thế có thể xem như kết quả thu được chủ yếu là do tác động của thuốc thử nghiệm. Từ sự suy giảm tổng lượng bạch cầu do methotrexat gây ra, chúng tôi tiếp tục đánh giá tác dụng của methotrexat trên từng loại bạch cầu riêng biệt.

Tác động của methotrexat và linh chi trên số lượng các loại bạch cầu

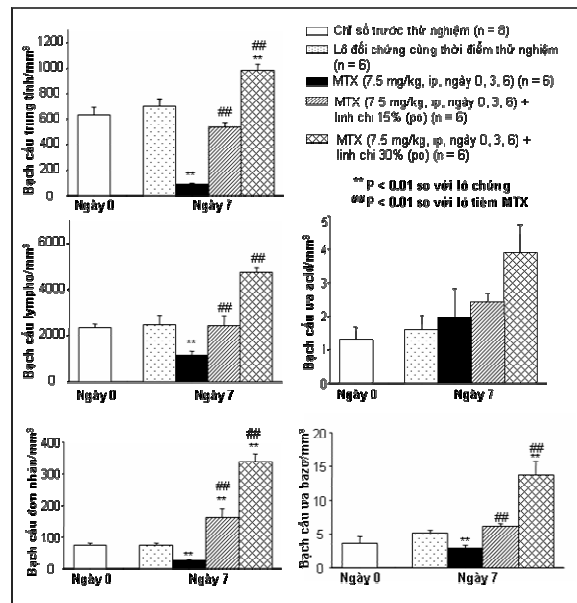
- Đối với mô hình gây suy giảm bạch cầu bằng methotrexat, số lượng bạch cầu trung tính cũng giảm mạnh vào ngày 7; các loại bạch cầu khác cũng giảm có ý nghĩa thống kê so với lô chứng, ngoại trừ bạch cầu ưa acid không có sự thay đổi (hình 4).
- Ở các lô cho uống linh chi 15% hay 30%, sự suy giảm bạch cầu do methotrexat đã được khôi phục trở lại. Đặc biệt ở lô cho uống cao linh chi 30%, hầu như số lượng các loại bạch cầu đều tăng cao so với lô chứng. Đây là điều mà chúng tôi chưa giải thích được vì chuột được nuôi trong điều kiện giống nhau nên có thể loại bỏ nguy cơ nhiễm trùng trên nhóm được cho uống linh chi



Hình 5. Số lượng hồng cầu và tiểu cầu của các lô thử nghiệm

Trên tiểu cầu: kết quả trên cho thấy rằng methotrexat giảm số lượng tiểu cầu gần 2 lần so với số lượng tiểu cầu của lô đối chứng và khác biệt một cách có ý nghĩa thống kê ($p <$

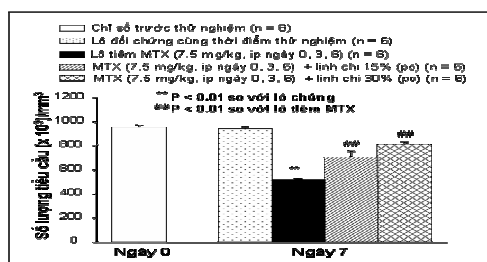
30%. Vì thế có thể giả định rằng linh chi 30% có thể kích thích sự sinh sản mạnh các loại tế bào bạch cầu.



Hình 4. Số lượng các loại bạch cầu của các lô thử nghiệm

Tác động của methotrexat và linh chi trên số lượng hồng cầu và tiểu cầu

Trên hồng cầu: kết quả thí nghiệm cho thấy methotrexat trong điều kiện này chưa gây suy giảm hồng cầu, vì thế cao linh chi 15% hay 30% đều không thể hiện tác động đến số lượng hồng cầu. Ngoài ra, khi so sánh các chỉ số Hb, Htc và thể tích hồng cầu giữa các lô thử nghiệm, kết quả cũng chưa thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.



0,01) so với lô chứng. Ở các lô cho uống cao linh chi 15% và 30% sau khi tiêm methotrexat, số lượng tiểu cầu đều được cải thiện đáng kể và tăng có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$) so với lô

tiêm methotrexat. Mặc dù vậy, cả 2 lô cho uống cao linh chi 15% hay 30% đều không làm phục hồi hoàn toàn sự suy giảm số lượng tiểu cầu do methotrexat gây ra về mức như bình thường (so với lô đối chứng).

BÀN LUẬN

Kết quả khảo sát tác động bảo vệ gan của cao linh chi trên mô hình gây loạn sản gan bằng DEN và CCl₄ cho thấy cao linh chi thể hiện rõ tác dụng bảo vệ trên đại thể và vi thể. Việc các nốt tăng sản không còn xuất hiện chứng tỏ cao linh chi có khả năng ức chế sự hình thành các nốt tăng sản này. Mặt khác quan sát vi thể không phát hiện nhân quái dị cho thấy rằng việc sử dụng linh chi cũng hạn chế sự hình thành các dòng tế bào bất thường. Nhiều công trình nghiên cứu cũng đã chứng minh tác dụng tăng cường hệ miễn dịch và ức chế khối u của linh chi, và có thể cơ chế tác động của linh chi trong khía cạnh này là do sự gia tăng tổng hợp interleukin-2 có tác dụng tăng cường miễn dịch và ức chế khối u (Wang 2007).

Xét nghiệm công thức máu thường biểu thị số lượng các loại tế bào máu với một khoảng dao động nhất định, tuy nhiên trong nghiên cứu này, chỉ số các loại bạch cầu trước thực nghiệm và chỉ số này ở lô đối chứng vào ngày 7 dao động không đáng kể, do đó sự khác biệt về chỉ số các loại tế bào máu giữa lô gây suy giảm bạch cầu bằng methotrexat so với lô chứng và sự khác biệt giữa lô cho uống linh chi so với lô gây suy giảm bạch cầu không thể gán cho nguyên nhân về khoảng dao động bình thường khi xét nghiệm, mà đây chính là tác động của thuốc thử nghiệm. Mặt khác, sự giảm mạnh bạch cầu trung tính xuống đến mức rất thấp chứng tỏ đây là do độc tính đặc thù của thuốc hóa trị, từ đó có thể cho rằng khả năng phục hồi dòng bạch cầu của linh chi cũng chính là tác dụng dược lý của linh chi.

Được tiến hành trong cùng một điều kiện thử nghiệm, tuy nhiên chỉ có lô được cho uống cao linh chi 30% mới có sự gia tăng một số loại

bạch cầu gần gấp đôi trị số bình thường, như vậy có thể đây là tác động của linh chi kèm theo một yếu tố ảnh hưởng khác chưa giải thích được, chứ không thể do nguyên nhân nhiễm trùng. Một điều khá ngạc nhiên là linh chi lại có tác dụng phục hồi một phần số lượng tiểu cầu mặc dù ít có tài liệu nào đề cập đến tác dụng này. Nhiều tài liệu chứng minh linh chi có tác dụng tăng cường miễn dịch, tuy nhiên kết quả từ nghiên cứu này cho thấy linh chi còn có tác dụng khôi phục các loại tế bào máu.

KẾT LUẬN

Những kết quả trên chỉ là bước đầu trong việc xác định xem cao linh chi toàn phần (một nguyên liệu chính trong bào chế các chế phẩm chứa linh chi của OPC) có tác động ở mức độ nào trên khả năng phòng ngừa loạn sản gan và phục hồi tình trạng suy tủy do thuốc hóa trị gây ra. Qua việc tổng hợp các kết quả thực nghiệm chúng tôi cho rằng, linh chi ở các liều lượng khảo sát có tác dụng tốt trên các hướng nghiên cứu trên và cần được tiếp tục nghiên cứu mở rộng trong việc thử nghiệm ứng dụng trị liệu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hecht SS (1997), Approaches to cancer prevention based on an understanding of N-nitrosamine carcinogenesis, Proc Soc Expt Biol Med 216: 181-191.
2. Kino K, Yamashita A, Yamaoka K, Watanabe J, Tanaka S, Ko K, Shimizu K, Tsunoo H (1989) Isolation and characterization of a new immunomodulatory protein, ling zhi-8 (LZ-8), from *Ganoderma lucidum*. J Biol Chem 264: 472-478.
3. Lui GT, Chang ST, Buswell TA (1993), Pharmacology and clinical uses of *Ganoderma*, Mushroom biology and mushroom products, the Chinese University Press, Hong Kong, pp. 267-273.
4. Nakamura K, Yamasaki M (2003), Effect of Methotrexate-Induced Neutropenia on Pulpal Inflammation in Rats, Journal of Endodontics 28: 287 – 290.
5. Trần Mạnh Hùng, Ngô Kiến Đức (2005), Phương pháp gây tăng sản bất thường tế bào gan bằng carbon tetraxlorid và dietylnitrosamin, Tạp chí Dược học 350: 26-29.
6. Wang G, Zhao J, Liu J, Huang Y, Zhong JJ, Tang W (2007), Enhancement of IL-2 and IFN-gamma expression and NK cells activity involved in the anti-tumor effect of ganoderic acid in vivo. Int Immunopharmacol 7: 864-870.

7. Yuen JW, Gohel MD (2005), Anticancer effects of Ganoderma lucidum: a review of scientific evidence, *Nutrition and Cancer*, 53: 11-17.
