

# Đánh giá tác dụng tăng cường miễn dịch của Bài thuốc Nam Địa Long trên chuột gây suy giảm miễn dịch bằng cyclophosphamide

- Nguyễn Thị Mỹ Nương
- Bùi Thị Như Ngọc
- Âu Tuyết Mai  
Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM
- Đinh Minh Hiệp  
Ban Quản lý Khu Nông nghiệp Công nghệ cao TP.HCM  
Email: ntmnuong@hcmus.edu.vn

(Bài nhận ngày 10 tháng 04 năm 2017, nhận đăng ngày 22 tháng 08 năm 2017)

## TÓM TẮT

Nam Địa Long (NDL) là bài thuốc dân gian Việt Nam gồm các vị địa long, đậu đen, đậu xanh và bồ ngót. Trong dân gian, bài thuốc được dùng điều trị động kinh, viêm khớp, ung thư... nhưng chưa có nghiên cứu được công bố để chứng minh cơ sở khoa học rõ ràng. Bài báo này khảo sát tác động kích thích miễn dịch của bài thuốc NDL trên mô hình được lý thực nghiệm. Trên chuột nhắt trắng bị suy giảm miễn dịch bằng

**Từ khóa:** bài thuốc Nam Địa Long, kích thích miễn dịch, suy giảm miễn dịch, cyclophosphamide

## MỞ ĐẦU

Hóa trị liệu ung thư thường có tác dụng phụ nghiêm trọng cho bệnh nhân do độc tính của các thuốc hóa trị trên tế bào lành, suy giảm hệ tạo máu, dẫn đến suy giảm hệ thống miễn dịch của cơ thể bệnh nhân [1]. Do đó, hóa trị cần ngăn chặn độc tính hay phục hồi hệ miễn dịch là vấn đề quan trọng trong hỗ trợ điều trị ung thư.

Ở Việt Nam, y học cổ truyền đóng vai trò quan trọng trong công tác chăm sóc sức khỏe người dân nói chung và hỗ trợ điều trị ung thư nói riêng. Một trong những định hướng của ngành Dược hiện nay là phát triển các bài thuốc cổ truyền với ưu điểm an toàn, ít tác dụng phụ khi sử dụng lâu dài. Trong đó, các bài thuốc dân gian hỗ trợ điều trị ung thư với tác động hỗ trợ tiêu diệt tế bào ung thư, giảm tác dụng phụ trên tế bào lành, tăng cường miễn

cyclophosphamide (CY), NDL liều uống 1,2 g/kg và 2,4 g/kg giúp hạn chế tình trạng giảm khối lượng cơ thể chuột, tăng khối lượng tương đối của lách, tuyến ức và làm tăng 42 – 44 % số lượng bạch cầu, tăng 48 – 53 % lượng bạch cầu lympho, đặc biệt tăng tỷ lệ phần trăm bạch cầu lympho  $T_{CD4}$  (34–43 %) và lympho  $T_{CD8}$  (35–46 %) so với lô chứng bệnh. Như vậy, bài thuốc NDL thể hiện tác dụng kích thích miễn dịch, có tiềm năng phát triển thành sản phẩm hỗ trợ trong hóa trị ung thư.

dịch, tăng sức đề kháng... đang được quan tâm phát triển [2].

Nam Địa Long (NDL) là bài thuốc được giới thiệu bởi cụ Nguyễn An Định gồm địa long (*Pheretima aspergillum* Michaelson), đậu đen (*Vigna unguiculata* Walp. subsp. *cylindrica* (L.) Verdc), đậu xanh (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) và bồ ngót (*Sauropus androgynus* (L.) Merr.). Trong dân gian, bài thuốc được dùng điều trị động kinh, viêm khớp và ung thư. Tuy nhiên, đến nay chưa có công trình nghiên cứu nào chứng minh tính an toàn của bài thuốc và cơ sở khoa học của những ứng dụng này. Nghiên cứu gần đây của chúng tôi chứng minh NDL có hoạt tính gây độc tế bào ung thư vú MCF-7, ung thư gan HepG2, ung thư phổi NCI H460 và hoạt hóa quá trình apoptosis (chết theo chương trình) của tế bào MCF-7 nhưng

không độc trên tế bào fibroblast bình thường [3]. Đề tài nghiên cứu này khảo sát tác động kích thích miễn dịch *in vivo* của bài thuốc trên mô hình chuột suy giảm miễn dịch do tác nhân hóa trị cyclophosphamide (CY) nhằm tạo tiền đề phát triển bài thuốc thành sản phẩm ứng dụng trong hỗ trợ điều trị ung thư.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Mẫu thử

Dịch chiết được sắc theo phương pháp của Bệnh viện Y học cổ truyền TP. HCM từ bài thuốc NDL gồm thân địa long (100 g), hạt đậu đen (200 g), hạt đậu xanh (200 g) và thân lá bồ ngót (400 g). Ngâm nguyên liệu trong nước 20 phút theo tỷ lệ 1 g dược liệu khô: 1 mL nước, đun 3 giờ trong hệ thống sắc thuốc tự động, thu dịch chiết, đông khô thành bột, bảo quản -70 °C.

### Động vật nghiên cứu

Chuột nhắt trắng chủng *Swiss albino*, khối lượng  $22 \pm 2$  g, 5 - 6 tuần tuổi, giống đực, khỏe mạnh do Viện Pasteur TP.HCM cung cấp. Chuột được nuôi ổn định 1 tuần trong điều kiện tiến hành thí nghiệm với 12 giờ chu kỳ sáng/12 giờ chu kỳ tối. Chuột được nuôi trong lồng nhựa và cung cấp nước uống, thức ăn cám viên (Viện Pasteur TP. HCM) đầy đủ trong thử nghiệm.

### Các hóa chất sử dụng

Cyclophosphamide được mua từ Sigma-Aldrich (Mỹ); kháng thể CD4 PE Rat Anti-Mouse (553730) và CD8a FITC Rat Anti-Mouse (553031) từ BD Biosciences (Mỹ); levamisol (Bioleva®) từ Bio-Pharmachemie (Việt Nam). Các loại hóa chất khác do Merck cung cấp. Các loại hóa chất sử dụng đạt tiêu chuẩn độ tinh khiết phân tích PA (Pure for analysis).

**Phương pháp khảo sát tác động kích thích miễn dịch trên chuột nhắt trắng gây suy giảm miễn dịch bằng cyclophosphamide [4, 5]**

Dựa trên liều uống 180 mL nước sắc/ngày cho người có khối lượng trung bình 57,7 kg và hiệu suất đông khô của dịch chiết là 0,032 g/mL suy ra liều uống ở người là 5,76 g bột đông khô/ngày, tương đương 0,1 g/kg. Theo hướng dẫn về cách chuyển đổi liều giữa người và động vật thử nghiệm [4], liều trên chuột nhắt = 12 x liều uống ở người = 1,2 g/kg. Từ đó, đề tài chọn 2 liều thử nghiệm trên chuột nhắt là 1,2 g/kg và 2,4 g/kg.

Vào ngày 0, chuột được lấy máu tĩnh mạch đuôi, xác định số lượng bạch cầu (WBC), công thức bạch cầu (bạch cầu lympho, bạch cầu đơn nhân, bạch cầu trung tính, bạch cầu ưa acid).

Chia chuột thành 5 lô (15 chuột/lô) sao cho số lượng bạch cầu ở các lô khác nhau không có ý nghĩa thống kê: (1) lô sinh lý (C) và (2) lô chứng bệnh (CY): cho uống nước cất; (3,4) lô thử 1 và 2 (NDL1, NDL2): cho uống cao NDL liều 1,2 g/kg và 2,4 g/kg; (5) Lô đối chiếu (Leva): cho uống levamisol liều 30 mg/kg.

Vào ngày 1, tiêm phúc mô liều duy nhất NaCl 0,9 % cho lô sinh lý hoặc cyclophosphamide 150 mg/kg pha trong NaCl 0,9 % cho các lô còn lại, thể tích tiêm 0,1 ml/10 g. Thời gian cho chuột uống nước cất hoặc bột NDL đông khô pha trong nước cất hoặc thuốc đối chiếu hằng ngày trong khoảng 8 - 11 giờ sáng, thể tích cho uống 0,1 ml/10 g, liên tục trong 5 ngày từ ngày 1 (sau khi tiêm 1 giờ) đến ngày 5. Ghi nhận khối lượng cơ thể chuột mỗi ngày trước khi cho uống.

Vào ngày 5, sau khi cho chuột uống thuốc 2 giờ, lấy máu tĩnh mạch đuôi chuột để xác định WBC và công thức bạch cầu đồng thời mổ lấy máu tim xác định phần trăm bạch cầu lympho  $T_{CD4}$  và  $T_{CD8}$  tại Bộ môn Di truyền, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM. Tách lấy lách, tuyển ức, cân và ghi nhận trọng lượng. Xác định khối lượng tương đối của các cơ quan bằng công thức:  $g\% = (P_{eq}/P_{ct}) \times 100$ , trong đó  $P_{eq}$  và  $P_{ct}$  lần lượt là khối lượng cơ quan và cơ thể (g).

**Xác định số lượng bạch cầu (WBC)**

Sử dụng buồng đếm hồng cầu xác định số lượng bạch cầu sau khi đã phá hồng cầu trong máu bằng acetic acid 3% (v/v). Số lượng bạch cầu được tính theo công thức: Số bạch cầu/mm<sup>3</sup> =  $\frac{N \times 20 \times 10}{4}$

Trong đó: N là số bạch cầu đếm được trong 4 ô; 20: độ pha loãng và 1/10 mm: chiều cao từ buồng đếm đến lamelle

### Xác định công thức bạch cầu bằng phương pháp nhuộm Giemsa

Nhỏ một giọt máu lên lam kính, kéo dài thành một vệt mỏng. Khi vết máu khô, nhúng lam kính trong ethanol tuyệt đối 3 phút và để khô tự nhiên. Sau đó, ngâm lam kính trong thuốc nhuộm Giemsa 3,8 g/L 45 phút, rửa lam dưới vòi nước chảy, để khô. Quan sát dưới kính hiển vi (vật kính x100) và đếm số lượng mỗi loại bạch cầu. Tỷ lệ phần trăm mỗi loại bạch cầu được tính theo công thức: % loại bạch cầu = (số lượng mỗi loại bạch cầu/WBC) x 100.

### Xác định tế bào bạch cầu lympho T<sub>CD4</sub> và T<sub>CD8</sub>

Tỷ lệ phần trăm số bạch cầu lympho T<sub>CD4</sub> và T<sub>CD8</sub> được xác định bằng phương pháp dòng chảy tế bào (flow cytometry) sử dụng kháng thể CD4 PE Rat Anti-Mouse (553730) và CD8a FITC Rat Anti-Mouse (553031) theo phương pháp được mô tả bởi BD Biosciences (Mỹ) [6]. Kháng thể kháng CD4 đánh dấu PE và kháng thể kháng CD8 đánh dấu FITC được cho vào trong 20 µL máu toàn phần (nồng độ kháng thể cuối cùng là 10 µg/mL) và ủ 30 phút trong tối. Sau đó, hỗn hợp được ủ 10 phút trong tối với dung dịch ly giải hồng cầu. Ly tâm 500g trong 5 phút và loại bỏ dịch nổi. Tế bào được rửa lại 1 lần với dung dịch PBS. Thêm 1 mL dung dịch paraformaldehyde 1% và phân tích bằng máy flow cytometer C6 (BD). Mẫu không nhuộm kháng thể được sử dụng để loại trừ tín hiệu nền.

### Phân tích số liệu

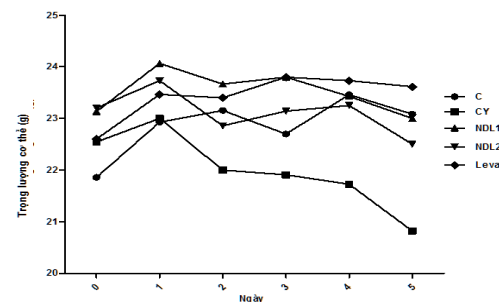
Trong thử nghiệm *in vivo*, các số liệu có giá trị ngoài khoảng giá trị trung bình ± 2 lần độ lệch

chuẩn sẽ loại bỏ khỏi nhóm [7]. Do đó, số chuột (n) ở mỗi lô trong khoảng 8–15 và có thể khác nhau giữa các lô. Mỗi thí nghiệm được lặp lại ít nhất 3 lần. Kết quả được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn của một thí nghiệm đại diện, đánh giá ý nghĩa thống kê bằng phép kiểm two-tailed unpaired Student's t-test trên phần mềm Graphpad Prism 5. Sự khác biệt có ý nghĩa khi p < 0,05.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Tác động trên khối lượng cơ thể chuột

Vào ngày 0, khối lượng cơ thể chuột giữa các lô thử nghiệm khác biệt không có ý nghĩa thống kê (p > 0,05). Sau khi tiêm CY, chuột có hiện tượng bỏ ăn và khối lượng cơ thể từ ngày 2 đến ngày 5 thấp hơn so với chuột ở lô sinh lý khoảng 1g đến 2,5 g (p < 0,001) (Hình 1). Trong khi đó, khối lượng cơ thể chuột ở các lô ND1, ND2, và Leva đều cao hơn có ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh (p < 0,05) và không khác biệt so với lô sinh lý (p > 0,05). Như vậy, việc uống bột đông khô NDL có tác động hạn chế tình trạng giảm khối lượng cơ thể chuột gây ra bởi độc tính của cyclophosphamide.



Hình 1. Trọng lượng cơ thể chuột ở các lô thử nghiệm

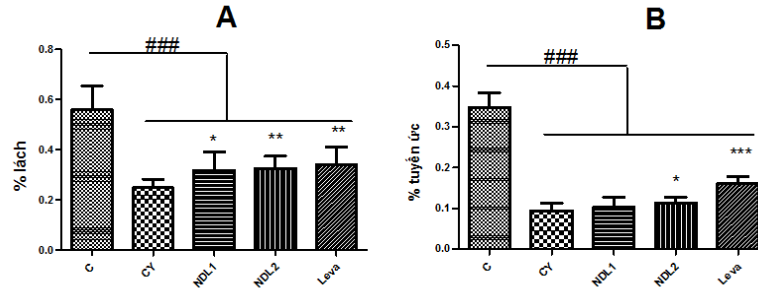
### Tác động trên khối lượng tương đối của lách và tuyến ức

Kết quả thu được cho thấy so với chuột ở lô sinh lý, khối lượng tương đối của lách và tuyến ức của chuột ở lô chứng bệnh thấp hơn lần lượt 2,2 lần và 3,8 lần (p < 0,001; Hình 2). Điều này chứng

tô cyclophosphamide gây tổn thương các cơ quan miễn dịch của chuột thử nghiệm.

Khi cho chuột uống bột cao NDL với liều 1,2 g/kg và 2,4 g/kg, khối lượng tương đối của lách tăng có ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh ( $p < 0,05$ ). Tác dụng này tương tự như thuốc đối chiếu levamisol 30 mg/kg ( $p > 0,05$ ). Tuy nhiên, khối lượng tương đối của lách ở cả 3 lô chưa trở về mức sinh lý bình thường ( $p < 0,05$ ).

Đối với khối lượng tương đối của tuyến ức, chỉ có chuột ở lô được cho uống bột cao NDL liều 2,4 g/kg tăng so với lô chứng bệnh ( $p < 0,05$ ; Hình 2B); tuy nhiên chỉ số này vẫn thấp hơn lô thuốc đối chiếu levamisol 30 mg/kg ( $p < 0,001$ ). Tương tự, khối lượng tương đối của tuyến ức ở lô ND2 và lô Leva chưa trở về mức sinh lý bình thường ( $p < 0,05$ ).



**Hình 2.** Trọng lượng tương đối của lách (A) và tuyến ức (B) của chuột ở các lô thí nghiệm. Kí hiệu \*( $p < 0,05$ ), \*\*( $p < 0,01$ ) và \*\*\*( $p < 0,001$ ) chỉ sự thay đổi có ý nghĩa thống kê ở các lô so với lô CY. Kí hiệu ###( $p < 0,001$ ) chỉ sự khác biệt về mặt thống kê so với lô C

#### Tác động trên số lượng và công thức bạch cầu

Vào ngày 0, kết quả cho thấy số lượng bạch cầu từ máu tĩnh mạch đuôi chuột trước thử nghiệm khoảng  $2,5 - 3,1 \times 10^9/l$ , khác nhau không có ý nghĩa thống kê giữa 5 lô ( $p > 0,05$ ).

Sau 5 ngày thử nghiệm, số lượng bạch cầu thay đổi không đáng kể so với thời điểm trước thử

thử nghiệm ( $p > 0,05$ ; Bảng 1). Kết quả này hoàn toàn phù hợp với báo cáo của Restel và cộng sự (2014) [8] cho thấy số lượng bạch cầu của chuột bình thường không thay đổi trong thời gian thí nghiệm.

Kết quả về số lượng bạch cầu và công thức bạch cầu của chuột ở các lô thử nghiệm vào ngày 0 và ngày 5 được trình bày ở Bảng 1.

**Bảng 1.** Số lượng một số loại tế bào bạch cầu trong máu chuột ở các lô thí nghiệm

Lô	Số lượng bạch cầu ( $10^9/l$ )		Bạch cầu lympho ( $10^7/l$ )		Bạch cầu đơn nhân ( $10^7/l$ )		Bạch cầu trung tính ( $10^7/l$ )		Bạch cầu ưa acid ( $10^7/l$ )	
	Ngày 0	Ngày 5	Ngày 0	Ngày 5	Ngày 0	Ngày 5	Ngày 0	Ngày 5	Ngày 0	Ngày 5
Sinh lý	3,35 ± 0,33	3,74 ± 1,13***	246,60 ± 39,85	280,19 ± 75,62***	1,58 ± 2,48	6,17 ± 5,80	48,69 ± 15,16	66,35 ± 35,97***	0,99 ± 1,55	1,38 ± 1,70
Chứng bệnh	3,80 ± 0,68	0,45 ± 0,26	293,56 ± 59,62	35,75 ± 16,88	1,17 ± 1,88	0	58,85 ± 22,98	5,79 ± 5,78	0	0
NDL 1,2 g/kg	3,73 ± 1,04	0,77 ± 0,31*	310,81 ± 91,85	69,28 ± 33,05*	3,08 ± 3,70	0	75,80 ± 31,83	2,13 ± 2,25	1,93 ± 2,29	0
NDL 2,4 g/kg	3,63 ± 0,51	0,81 ± 0,30**	282,71 ± 32,45	77,50 ± 26,60**	1,54 ± 2,45	0	54,86 ± 28,66	2,61 ± 3,77	0,76 ± 1,38	0
Levamisol	4,35 ± 1,15	1,56 ± 0,72***	291,05 ± 57,62	93,08 ± 36,63***	0	0,96 ± 1,26	87,07 ± 41,62	22,00 ± 24,74*	0	0

Kí hiệu \*, \*\* và \*\*\* lần lượt biểu hiện  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$  và  $p < 0,001$  khi so sánh với lô CY ở ngày 5.

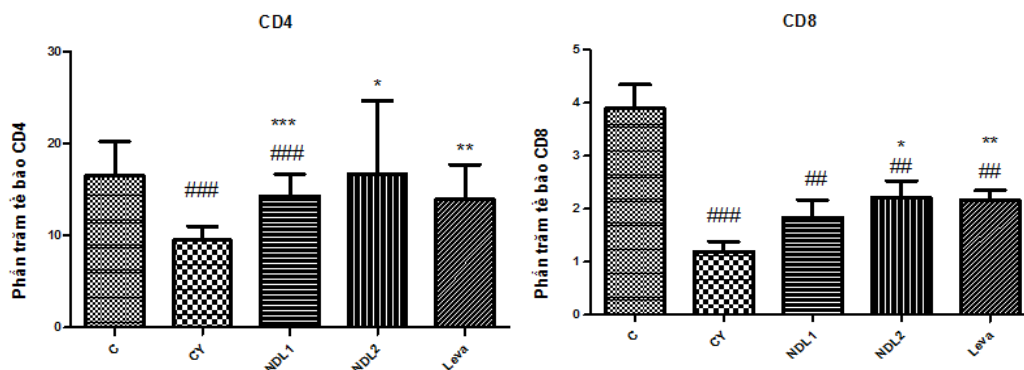
Ở lô chứng bệnh, số lượng bạch cầu giảm 8,3 lần so với lô sinh lý ( $p < 0,001$ ) kèm theo sự giảm có ý nghĩa thống kê số lượng các loại bạch cầu lympho, đơn nhân, trung tính và bạch cầu ưa acid ( $p < 0,05$ ). Kết quả chứng tỏ cyclophosphamide đã gây suy giảm miễn dịch thành công.

Số lượng bạch cầu và bạch cầu lympho ở chuột uống bột cao NDL và thuốc đối chiếu levamisol tăng có ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh ( $p < 0,05$ ). Cụ thể: số lượng bạch cầu của lô levamisol liều 30 mg/kg tăng 3,5 lần, lô NDL liều 1,2 g/kg tăng 1,7 lần, liều 2,4 g/kg tăng 1,8 lần so với lô chứng bệnh. Tương tự, với số lượng bạch cầu lympho, levamisol 30 mg/kg tăng khoảng 2,6 lần, bột cao NDL liều 1,2 g/kg và 2,4 g/kg đều làm tăng khoảng 1,9-2,2 lần. Các chỉ số về bạch cầu ở các lô thử chưa trở về mức của chuột sinh lý. Đối với bạch cầu lympho, đơn nhân, trung tính và bạch cầu ưa acid, kết quả cho thấy không thay đổi hoặc thay đổi không đáng kể so với lô chứng bệnh ( $p > 0,05$ ). Như vậy, bột cao NDL liều uống 1,2 g/kg và 2,4 g/kg phục hồi số lượng bạch cầu và bạch cầu lympho kém hơn thuốc đối chiếu levamisol 30 mg/kg.

### Tác động trên tỷ lệ phần trăm bạch cầu lympho $T_{CD4}$ và $T_{CD8}$

Tỷ lệ phần trăm bạch cầu lympho  $T_{CD4}$  và  $T_{CD8}$  của chuột ở các lô thử nghiệm được trình bày ở Hình 3. Kết quả cho thấy khi tiêm cyclophosphamid, ở lô chứng bệnh, tỷ lệ bạch cầu lympho  $T_{CD4}$  và  $T_{CD8}$  giảm lần lượt khoảng 1,7 lần và 3,3 lần so với lô sinh lý ( $p < 0,001$ ). Như vậy, cyclophosphamide gây suy giảm hệ miễn dịch của chuột, làm giảm tế bào lympho  $T_{CD4}$  và  $T_{CD8}$ .

Ở các lô bột cao NDL và levamisol, tỷ lệ phần trăm bạch cầu lympho  $T_{CD4}$  cao hơn có ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh ( $p < 0,05$ ). Bột cao NDL liều 1,2 g/kg và 2,4 g/kg đều làm tăng tỷ lệ tế bào lympho  $T_{CD4}$  khoảng 1,5 – 1,7 lần so với lô chứng bệnh ( $p < 0,05$ ), tương đương với thuốc đối chiếu levamisol ( $p > 0,05$ ). Đối với tỷ lệ phần trăm bạch cầu lympho  $T_{CD8}$ , bột cao NDL chỉ tăng có ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh ở liều cho uống 2,4 g/kg ( $p < 0,05$ ), tương đương với thuốc đối chiếu levamisol 30 mg/kg (tăng khoảng 1,5 – 1,8 lần, Hình 3). Kết quả bước đầu cho thấy bột cao NDL liều 2,4 g/kg có khả năng kích thích miễn dịch tốt hơn liều 1,2 g/kg.



**Hình 3.** Tỷ lệ phần trăm bạch cầu lympho  $T_{CD4}$  và  $T_{CD8}$  của chuột ở các lô thử nghiệm  
Kí hiệu \*( $p < 0,05$ ), \*\*( $p < 0,01$ ) và \*\*\*( $p < 0,001$ ) chỉ sự thay đổi có ý nghĩa thống kê ở các lô so với lô bệnh lý CY, trong khi ##( $p < 0,01$ ), ###( $p < 0,001$ ) chỉ sự khác biệt về mặt thống kê khi so sánh với lô C

Cyclophosphamide là một tác nhân alkyl hóa kìm tế bào, thuộc nhóm oxazaphosphorin, một hợp chất tương tự với khí mù-tạt nitrogen, được sử dụng chủ yếu trong hóa trị liệu ung thư. Khi vào cơ thể, CY được chuyển hóa ở gan tạo sản phẩm có hoạt tính alkyl hóa cao, gây tổn thương ADN ở những tế bào đang phân chia. Ngoài ra, CY còn thể hiện hoạt tính tế bào bình thường, làm giảm bạch cầu, hồng cầu, tiểu cầu, lympho B, T... và gây tổn thương gan, lách, thận... [1]. Do đó, trong dược lý thực nghiệm, có thể gây suy giảm miễn dịch của chuột *Swiss albino* bằng cách tiêm phúc mô CY ở các liều khác nhau từ 50 đến 200 mg/kg, 1 liều duy nhất hoặc 2 liều cách nhau 2 ngày hoặc 3 ngày liên tiếp [8, 10-12]. Từ đó, đề tài này tiến hành trên mô hình chuột nhất gây suy giảm miễn dịch bằng cách tiêm phúc mô liều duy nhất CY 150 mg/kg theo các nghiên cứu trước đã công bố [10-11]. Sau 5 ngày, chuột yếu, có tình trạng giảm khối lượng cơ thể, giảm khối lượng tương đối của một số cơ quan miễn dịch như lách và tuyến ức, số lượng bạch cầu cũng như bạch cầu lympho, bạch cầu đơn nhân, bạch cầu trung tính và tỷ lệ bạch cầu lympho  $T_{CD4}$ ,  $T_{CD8}$ . Điều này chứng tỏ cyclophosphamide đã gây suy giảm hệ miễn dịch của chuột, có thể ứng dụng mô hình này để khảo sát tác động kích thích miễn dịch của bột cao NDL.

Kết quả đề tài cho thấy bột cao NDL thể hiện tác động kích thích miễn dịch, giúp hạn chế sự giảm khối lượng cơ thể chuột, tăng khối lượng tương đối của lách và tuyến ức, tăng số lượng bạch cầu. Đặc biệt, việc uống bột cao NDL giúp tăng bạch cầu lympho, bạch cầu chiếm tỉ lệ lớn nhất và đóng vai trò quan trọng trong phản ứng miễn dịch của cơ thể; trong đó tăng tỷ lệ bạch cầu lympho  $T_{CD4}$  (tham gia đáp ứng miễn dịch với tác nhân gây bệnh nội ngoại bào, hoạt hóa lympho B, đại thực

bào,  $T_{CD8}$ ...thông qua các cytokin) và lympho  $T_{CD8}$  (tiêu diệt trực tiếp tác nhân gây bệnh).

Về cơ chế tác động, một phần hoạt tính kích thích miễn dịch của bài thuốc NDL có thể giải thích do tác dụng dược lý của vị thuốc đậu xanh trong thành phần. Thật vậy, Cherg và cộng sự (2007) đã chứng minh cao chiết đậu xanh có tác dụng kích thích tăng sinh tế bào bạch cầu máu ngoại vi người [13]. Hoạt chất verbascose từ đậu xanh kích thích hoạt động của dòng tế bào đại thực bào RAW264, làm tăng trọng lượng tương đối của lách, hoạt động lysozym ở lách và huyết thanh trên mô hình chuột suy giảm miễn dịch do CY [14].

### KẾT LUẬN

Trên mô hình chuột gây suy giảm miễn dịch bằng cyclophosphamid, bột cao NDL liều cho uống 1,2 g/kg và 2,4 g/kg thể hiện tác động kích thích miễn dịch, giúp hạn chế sự giảm trọng lượng cơ thể chuột, tăng trọng lượng tương đối của lách và tuyến ức, tăng số lượng bạch cầu. Đặc biệt, liều 2,4 g/kg của bột cao NDL còn giúp tăng bạch cầu lympho, tỷ lệ bạch cầu lympho  $T_{CD4}$  và lympho  $T_{CD8}$ . Kết quả này là tiền đề để nghiên cứu, phát triển bài thuốc thành sản phẩm ứng dụng trong hỗ trợ điều trị ung thư.

**Lời cảm ơn:** Công trình được tài trợ bởi Sở Khoa học và Công nghệ TPHCM (chương trình Vườn ươm sáng tạo Khoa học và Công nghệ trẻ, do Thành Đoàn TPHCM chủ trì). Nhóm tác giả xin cảm ơn bệnh viện Y học cổ truyền TPHCM vì đã cung cấp bài thuốc. Nhóm tác giả cũng gửi lời cảm ơn đến Khoa Y học cổ truyền và Phòng thí nghiệm Vi sinh công nghệ Dược, ĐHY Dược TP HCM đã hỗ trợ các thiết bị để thực hiện nghiên cứu này. Các tác giả cũng xin gửi lời cảm ơn chân thành đến PGS.TS. Nguyễn Thị Thu Hương, Trung Tâm Sâm và Dược liệu vì những chia sẻ kinh nghiệm và hỗ trợ hóa chất cho các thử nghiệm ban đầu.

# Immuno– enhancement effect of the Nam Dia Long decoction on immuno suppressed mice induced by cyclophosphamide

- **Nguyen Thi My Nuong**
- **Bui Thi Nhu Ngoc**
- **Au Tuyet Mai**  
University of Science, VNU-HCM
- **Dinh Minh Hiep**  
Agricultural Hi-tech Park of Ho Chi Minh City

## ABSTRACT

*Nam Dia Long (NDL) formula which is composed of earthworm, black bean, mung bean and sweet leaf has been empirically used for the treatment of cancer, arthritis, epilepsy... However, there is no scientific report about the therapeutic activity of this traditional remedy. The aim of this work was to study on the in vivo immunostimulating effect of NDL formula. In cyclophosphamide - induced immunodeficient*

*mice, NDL powder at two doses of 1.2 g/kg and 2.4 g/kg attenuated the decrease of body weight, increased relatively the weights of spleen and thymus. These two doses also rised 42–44 % of leukocytes, 34 – 43 % of CD4 T cells and 35 – 46% of CD8 T cells in comparison with the pathological control. Therefore, NDL formula showed in vivo immunostimulating effect and has the potential to be developed as an adjuvant drug in cancer chemotherapy.*

**Keywords:** *Nam Dia Long formula, immunostimulating effect, immunodeficiency, cyclophosphamide*

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. A. Emadi, R.L.Jones, R.A. Brodsky, Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary, *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 6, 638–647 (2009).
- [2]. W.L.W.Hsiao, L. Liu, The role of traditional Chinese herbal medicines in cancer therapy from TCM theory to mechanistic insights, *Planta Med.*, 76,1118–1131 (2010).
- [3]. T.M.N.Nguyen, T.D. Ho-Huynh, Selective cytotoxicity of a Vietnamese traditional formula, Nam Dia long, against MCF-7 cells by synergistic effects. *BMC Complement Alter Med.*, 16, 202–236 (2016).
- [4]. Đ.T. Đàm, N.guyễn Thượng Đông, Phương pháp sàng lọc tác dụng của thuốc từ cây thuốc và phương pháp chuẩn bị mẫu sử dụng trong nghiên cứu tác dụng dược lý. Trong Viện Dược liệu, Phương pháp nghiên cứu tác dụng dược lý của thuốc từ dược thảo, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, 2, 31(2006).
- [5]. M.F.W.Festing, D.G.Altm, Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals, *ILAR J.*, 43, 4, 244–258 (2002).
- [6]. Bdbiosciences, Support protocols: Direct Immunofluorescence Staining of Whole Blood Using a Lyse/Wash Procedure. [cited 2016 July 10<sup>th</sup>]; Available from: <http://m.bdbiosciences.com/us/resources/protocols/s/stainlysewash> (2016)
- [7]. J. Miller, Reaction time analysis with outlier exclusion: Bias varies with sample size. *Q. J. Exp Psychol.*, 43, 4, 907–912(1991).
- [8]. T.I.Restell, L.C.Porfio, A.S.Souza, I.S.Silva, Hematology of Swiss mice (*Mus*

- musculus*) of both genders and different ages, *Acta Cir. Bras.*, 29, 5, 306–312 (2014).
- [9]. C.W.Cho, C.J.Han, Y.K.Rhee, Y.C.Lee, K.S.Shin, J.S.Shin, K.T.Lee, H.D. Hong, Cheonggukjang polysaccharides enhance immune activities and prevent cyclophosphamide-induced immunosuppression, *Int. J. Biol. Macromolec.*, 72, 519–525 (2015).
- [10]. Nguyễn Thị Phương Thùy, Nguyễn Phương Dung, Xây dựng tiêu chuẩn kiểm nghiệm và đánh giá tác dụng của cao chiết hà thủ ô đỏ kết hợp mè đen trên chuột nhắt trắng bị gây suy giảm miễn dịch bởi cyclophosphamide, *Tạp chí Y học Tp. Hồ Chí Minh*, 18, 1, 269–276 (2014).
- [11]. Nguyễn Thị Thu Hương, Phạm Thị Mỹ Loan, Tác dụng của sâm Việt Nam và Đinh lăng trên thực nghiệm gây suy giảm miễn dịch, *Tạp chí Dược liệu*, 12, 121–126 (2007).
- [12]. Z.Ren, C.He, Y.Fan, L.Guo, H.Si, Y.Wang, Z.Shi, H.Zhang, Immuno-enhancement effects of ethanol extract from *Cyrtomium macrophyllum* (Makino) Tagawa on cyclophosphamide – induced immunosuppression in BALB/c mice, *J Ethnopharmacol*, 155, 769–775 (2014).
- [13]. Z.Dai, D. Su, Y.Zhang, Y.Sun, B.Hu, H.Ye, S.Jabbar, X.Zeng, Immunomodulatory activity *in vitro* and *in vivo* of verbascose from mung beans (*Phaseolus aureus*), *J. Agric. Food Chem.*, 62, 10727–10735 (2014).
- [14]. J.M.Cherng, W.Chiang, L.C.Chiang, Immunomodulatory activities of edible beans and related constituents from soybean, *Food Chem.*, 104, 613–618 (2007).