

Đặc biệt trong nghiên cứu này chúng tôi đã tiến hành phân tích hồi qui đa biến về mối liên quan giữa các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình nuôi dưỡng, kết quả cho thấy những bệnh nhi không bị cắt ruột, không bị nhiễm trùng kèm theo, không bị đẻ non, có cân nặng khi sinh từ 2500g trở lên và không có tình trạng suy dinh dưỡng bào thai có tỷ lệ suy dinh dưỡng thấp hơn từ 0,1-0,5 lần so với các bệnh nhi khác và các sự khác biệt này đều mang ý nghĩa thống kê. Chúng ta đều biết rằng phân tích hồi qui đa biến có một ưu điểm rất tốt, đó là xem xét mối liên quan giữa một yếu tố ảnh hưởng đến nuôi dưỡng bằng đường tĩnh mạch hoàn toàn có căn nhắc đến các yếu tố khác vào trong phương trình. Phân tích này còn có tác dụng loại bỏ các yếu tố nhiễu ảnh hưởng đến các mối liên quan này.

V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu cho thấy bệnh nhi không bị cắt ruột, không bị nhiễm trùng kèm theo, không bị đẻ non, có cân nặng khi sinh từ 2500g trở lên và không có tình trạng suy dinh dưỡng bào thai có tỷ lệ suy dinh dưỡng thấp hơn từ 0,1-0,5 lần so với các bệnh nhi khác. Các yếu tố khác chưa thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

Khuyến cáo: khi nuôi dưỡng bằng đường tĩnh mạch hoàn toàn cần chú ý theo dõi chặt các bệnh nhi bị cắt ruột, nhiễm trùng kèm theo, sinh non, có cân nặng khi dưới 2500g và có tình trạng suy dinh dưỡng bào thai.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Artinian V, Krayem H, Di Giovine B (2006). "Effects of early enteral feeding on the outcome of critically ill mechanically ventilated medical patients". *Chest*; 129: 960-967.
2. Phạm Thị Xuân Tú (2013). Nuôi dưỡng trẻ sơ sinh bằng đường tĩnh mạch. Bệnh viện Nhi Trung ương, Hà Nội.
3. Kritchevsky SB, Braun BI, Kusek L, et al (2008). "The impact of hospital practice on central venous catheter associated bloodstream infection rates at the patient and unit level: a multicenter study". *Am J MedQual*, 23:24
4. Lê Thị Kim Dung, Nguyễn Thị Phương, Nguyễn Thị Xuân Hương và CS (2013). "Đánh giá kết quả nuôi dưỡng tĩnh mạch ở trẻ sơ sinh non tháng điều trị tại khoa Nhi, Bệnh viện Đa khoa Trung ương Thái Nguyên". *Tạp chí Y học Việt Nam*, số 2, tr. 45-50.
5. Susan M. King, Riccardo Superina, Walter Andrews et al (2014). "Randomized Comparison of Ganciclovir Plus Intravenous Immune Globulin (IVIG) with IVIG Alone for Prevention of Primary Cytomegalovirus Disease in Children Receiving Liver Transplants". *Clinical Infectious Diseases*, 25, pp. 1173-1179.
6. Debora Duro, Paul D. Mitchell, Leslie A. Kalish et al (2011). "Risk Factors for Parenteral Nutrition - associated Liver Disease Following Surgical Therapy for Necrotizing Enterocolitis". *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 52(5), pp. 595-600.
7. Kim HU, Chung JBand Kim CB (2011). "The Comparison between Early Enteral Nutrition and Total Parenteral Nutrition after Total Gastrectomy in Patients with Gastric Cancer: The Randomized Prospective Study. Korean J Gastroenterol Vol. 59 No. 6, 407-413.

NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG GÂY CHẾT TẾ BÀO THEO CHƯƠNG TRÌNH CỦA TỎI ĐEN TRÊN DÒNG TẾ BÀO UNG THƯ ĐẠI TRÀNG

Phạm Xuân Phong*, Hồ Anh Sơn**

TÓM TẮT

Nhiều nghiên cứu cho thấy các hoạt chất chống ung thư từ nhiều nguồn khác nhau như tỏi tươi, tỏi lâu năm, tỏi đen có tác dụng kháng ung thư bao gồm

phòng và điều trị ung thư sarcoma, ung thư vú, gan, đại tràng và biểu mô vảy. Các hoạt chất có tác dụng sinh học chủ yếu do các thành phần sulfur hữu cơ trong tỏi, các chất này có hiệu lực cao trong ức chế sự tăng sinh tế bào ung thư trong môi trường nuôi cấy thông qua cơ chế gây chết theo chương trình (apoptosis). Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá khả năng chống ung thư của tỏi đen trên dòng tế bào ung thư đại tràng người HT 29 bằng hệ thống máy FACS. Tại thời điểm 24 giờ sau khi ủ tế bào với môi trường có tỏi đen nồng độ 0,1mg/ml đã gây chết apoptosis tế bào ung thư đại tràng HT 29.

Từ khóa: tỏi đen, ung thư đại tràng, apoptosis, FACS

* Bệnh Viện y học Cổ truyền Quân đội

** Học viện Quân y

Chịu trách nhiệm chính: Hồ Anh Sơn

Email: hoanhsonghp@gmail.com ĐT: 0978437229

Ngày nhận bài: 18/01/2015

Ngày phân biên khoa học: 12/02/2015

Ngày duyệt bài: 25/02/2015

SUMMARY

STUDY APOPTOSIS EFFECT OF BLACK GARLIC ON COLON CARCINOMA CELL LINE

A number of studies have demonstrated the chemopreventive activity of garlic by using different garlic preparations including fresh garlic extract, aged garlic, black garlic works as anticarcinogens in both prevention and treatment in sarcoma, mammary carcinoma, hepatoma, colon cancer, and squamous cell carcinoma. Biological effects of garlic are attributed to its characteristic organosulfur compounds are highly effective in suppressing the proliferation of cancer cells in culture by inducing apoptosis. In current study, we investigated anti-cancer activities of fermented garlic (black garlic) on HT 29, human colon carcinoma cells by using FACS. At the time point of 24 hour after treated with 0,1 mg/ml of black garlic have been shown apoptosis on HT 29 cell line.

Keywords: black garlic, colon carcinoma, apoptosis, FACS

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư là một nhóm bệnh liên quan đến rối loạn phân chia tế bào mất kiểm soát và di căn. Các bệnh ung thư thường gặp nhất trên toàn thế giới (2008) là ung thư phổi (1,61 triệu ca, 12,7% tổng số), ung thư vú (1,38 triệu ca, 10,9%) và ung thư đại trực tràng (1,23 triệu ca, 9,7%) [3]. Ung thư đang là một thách thức lớn của y học, nghiên cứu để tìm ra những thuốc mới điều trị ung thư, đặc biệt là các hợp chất có nguồn gốc thiên nhiên đang là một lĩnh vực được ưu tiên hàng đầu.

Tỏi là một loại dược liệu có nhiều công dụng trong chữa bệnh như chống virus, kháng vi khuẩn, nấm, khả năng chống gốc tự do, hỗ trợ điều trị các bệnh lý tim mạch và chống ung thư [1,2]. Hiện nay, trên thế giới tỏi đen được nhiều nhà khoa học quan tâm nghiên cứu và sử dụng trong công nghệ dược phẩm và thực phẩm chức năng hỗ trợ điều trị ung thư. Trong phạm vi nghiên cứu này, chúng tôi muốn đánh giá tác dụng của tỏi đen gây chết tế bào theo chương trình (apoptosis) trên dòng tế bào ung thư đại tràng người HT 29 *in vitro*.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng

- Tế bào ung thư đại tràng (UTĐT) người dòng HT-29 (ATCC, Hoa Kỳ). Đây là một dòng ung thư biểu mô tuyến của đại tràng được phân lập từ một BN nữ da trắng, có biểu hiện về một số oncogen như: myc +; ras +; myb +; fos +; sis +; p53 +; abl -; ros -; src -.

- Mẫu bột phun sấy cao khô (TĐ) chứa 50% tỏi đen đạt TCCS (số lô 010313) do Trung tâm nghiên cứu ứng dụng sản xuất thuốc - Học viện Quân y cung cấp.

- Môi trường nuôi cấy tế bào: môi trường nuôi cấy tế bào McCoy's 5a Medium Modified (Catalog No. 30-2007, ATCC), bổ sung 10% dung dịch huyết thanh bào thai bê (FBS), dung dịch penicillin/ streptomycin, dung dịch PBS, dung dịch Trypsin-EDTA (ATCC, Hoa Kỳ).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Nuôi cấy và tăng sinh tế bào

Nuôi cấy tế bào UTĐT người dòng HT - 29 trong môi trường McCoy's 5a Medium Modified bổ sung 10% FBS, 1% penicillin và streptomycin. Nuôi cấy tăng sinh TBUT trong chai có diện tích đáy chai 75 cm², đặt trong tủ vô trùng, duy trì nhiệt độ 37°C và CO₂ 5%.

Thay môi trường nuôi cấy 3 ngày/lần. Khi tế bào đạt mật độ 80% diện tích bề mặt chai, tách khỏi chai nuôi bằng Trypsin EDTA 0,05% và cấy chuyển sang chai nuôi cấy mới. Khi số lượng tế bào đủ lớn, thu hoạch tế bào và đếm số lượng tế bào thu được, điều chỉnh mật độ tế bào đạt mật độ 10⁷ tế bào/ml.

2.2.2. Kỹ thuật tiến hành

Để tiến hành kiểm tra xem chất có khả năng làm tế bào ung thư chết theo chương trình không, chúng tôi tiến hành phương pháp nhuộm tế bào với Alexa Fluor @ 488 Annexin V và thuốc nhuộm nhân PI (Propidium iodide).

2.2.3. Quy trình tiến hành

- Chuẩn bị tế bào: tế bào ung thư đại tràng được nuôi khỏe mạnh, sau đó được đưa vào đĩa 24 giếng với mật độ 300.000 tế bào/1800µl/giếng. Sau đó, đĩa 24 giếng được bảo quản trong tủ ấm 37°C, 5%CO₂.

- Chuẩn bị dung dịch tỏi đen và ù thuốc: sau 24 giờ đưa tế bào vào đĩa, đưa dịch tỏi đen với các nồng độ 0,1; 1 và 10 mg/ml tương ứng vào các giếng và ù trong 37°C, 5%CO₂, theo dõi hình thái tế bào ở thời điểm 24 giờ.

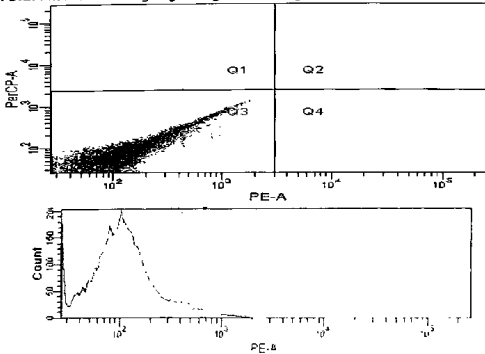
- Dừng thí nghiệm ở thời gian đã xác định, tiến hành thu tế bào và nhuộm với Annexin V/7AAD: Tiến hành theo bộ kit Annexin V PE Apop Dtec Kit 100 Tests của hãng BD.

- Đánh giá tỉ lệ tế bào chết apoptosis trên hệ thống FACS CANTO 2 (BD): Xác định quần thể tế bào cần đánh giá, xác định vùng giá trị huỳnh quang (PE và PerCP) âm tính, xác định tỉ lệ tế bào chết apoptosis/necrosis tại thời điểm 24, 48 và 72 giờ.

III. KẾT QUẢ

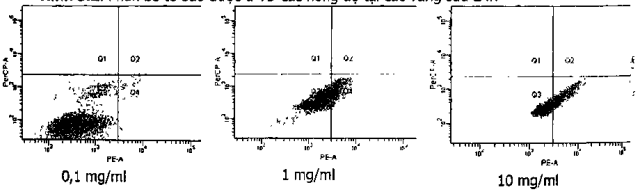
3.1. Kết quả gây chết tế bào theo chương trình của tòi đen

Hình 3.1. Phân bố tế bào giết chứng tại các vùng



Kết quả chạy nhóm giết chứng cho thấy, tuyệt đại đa số các tế bào tập trung tại vùng Q3 (tế bào bình thường). Trong khi đó, vùng độc tế bào (vùng Q1: necrosis) không có tế bào nào. Tương tự, hai vùng tế bào chết theo chương trình (Vùng Q2: apoptosis muộn, vùng Q4: apoptosis sớm)

Hình 3.2. Phân bố tế bào được ủ TD các nồng độ tại các vùng sau 24h

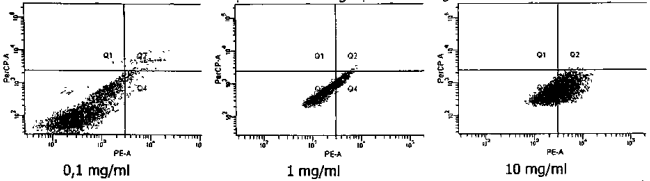


Sau 24h ủ với TD, ở nồng độ 0,1 mg, các tế bào cơ bản vẫn tập trung tại vùng Q3. Tuy nhiên, có một số tế bào bị chết theo kiểu necrosis (Vùng Q1, 0,3%) và một lượng khá lớn tế bào chết kiểu apoptosis (Vùng Q2, Q4; 2,2%). Tỷ lệ tế bào chết apoptosis ở các nồng độ 1 mg/ml và 10 mg/ml lần lượt là 8,2% và 10%.

Bảng 3.1. Tỷ lệ tế bào ung thư gen chết apoptosis sau khi được ủ với tòi đen

	% apoptosis (0,1mg)	% apoptosis (1mg)	% apoptosis (10 mg)
24h	2,2	9,5	18,8
48h	8,2	26,6	41,8
72h	10,0	20,8	49,2

Có thể nhận thấy, ở nồng độ tòi đen 0,1 mg đã gây tế bào chết theo chương trình. Số tế bào chết apoptosis tăng tỉ lệ thuận với nồng độ tòi đen và thời gian ủ.

Hình 3.3. Phân bố tế bào được ùn ĐĐ các nồng độ tại các vùng sau 72h

Nhận thấy, số lượng tế bào chết apoptosis tăng đột biến ở cả ba nồng độ ĐĐ, sau thời gian ùn ĐĐ 72 giờ. Đáng chú ý, ở nồng độ 1 và 10mg/ml, tỉ lệ tế bào chết apoptosis sớm (vùng Q4) chiếm tỉ lệ rất cao, lần lượt là 19% và 48,7%.

IV. BÀN LUẬN

Bằng việc xác định tỉ lệ tế bào chết theo chương trình, kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy ở nồng độ 0,1 mg tỏi đen/ml môi trường nuôi cấy, đã có thể gây chết tế bào ung thư đại tràng HT-29 theo con đường apoptosis.

Kim và cộng sự (2012) cho thấy hoạt chất chính của tỏi có thể gây chết tế bào theo chương trình (apoptosis) trên dòng tế bào ung thư gan Hep 3B bởi sự điều hòa các gốc tự do thông qua các gây tổn thương màng ty thể, giảm bậc lộ các gen chống apoptosis như Bcl-2 và Bcl-xl [4]. Đồng thời, dịch chiết tỏi gây tăng biểu lộ các gen gây chết theo chương trình (apoptosis) như capase 3, capase 8 và capase 9, từ đó thúc đẩy tế bào ung thư gan chết [4], [7].

Nghiên cứu tương tự trên dòng ung thư tế bào gan Hep G2, các tác giả cho thấy khả năng kim hãm sự phát triển dòng tế bào này, các bằng chứng cho thấy nồng độ protein p53 nội bào tăng đáng kể trong các tế bào được điều trị bằng Allicin từ tỏi và gây giảm nồng độ Bcl-2. Ngược lại, Allicin làm tăng bậc lộ AMPK/TSC2 và con đường tín hiệu Beclin-1 trong dòng tế bào ung thư biểu mô gan Hep G2 thúc đẩy quá trình chết tế bào [5].

Trên thực nghiệm, S-allylcysteine (SAC) có tác dụng ức chế sự phát triển của dòng ung thư phổi không tế bào nhỏ NSCLC A-549. SAC cho thấy khả năng ức chế dòng tế bào này thông qua ức chế sự hoạt hóa các phân tử mTOR, NF- κ B, và cyclin D1. Đồng thời, SAC còn ức chế sự đi căn của dòng ung thư phổi không tế bào nhỏ trên chuột mang khối ung thư này. Các tác giả

cũng phát hiện cơ chế chống ung thư của tỏi trên ung thư phổi cũng tương tự như các dòng ung thư khác. Li và CS (2012) cũng phát hiện khả năng của DATS từ tỏi có khả năng gây chết tế bào ung thư theo con đường apoptosis thông qua cơ chế gây ức chế giảm biểu hiện của Bcl-2 và làm tăng biểu hiện của tỉ lệ Bax/Bcl-2 và tăng hoạt động của các gen mã hóa capase 3, capase 8 và capase 9 [6].

V. KẾT LUẬN

Bằng kỹ thuật nhuộm và đánh giá tỉ lệ tế bào chết apoptosis trên hệ thống FACS có thể xác định tỉ lệ đen gây chết apoptosis đối với tế bào ung thư đại tràng người HT 29 ở nồng độ 0,1 mg/ml; 1 mg/ml và 10 mg/ml lần lượt là 2,2%; 8,2% và 10% tại thời điểm 24h.

Tỉ lệ apoptosis tại thời điểm 48h, với nồng độ tỏi đen tương ứng, lần lượt là 8,2%; 26,6% và 41,8%.

Tỉ lệ tế bào apoptosis tại thời điểm 72h, với nồng độ tỏi đen tương ứng, lần lượt là 10%; 20,8% và 49,2%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Minh Chính, Nguyễn Văn Long, Đào Văn Đôn, Nguyễn Duy Thức (2011), "Nghiên cứu thành phần hoá học của tỏi Lý Sơn (Allium saltivum L.)", Tạp chí Y Dược học Quân sự, 21(2), tr. 91-95.
2. Bùi Khắc Cường, Nguyễn Linh Toàn (2011), "Ảnh hưởng của dịch chiết tỏi trên tế bào ung thư vú người", Tạp chí y học thực hành, 771(5), tr. 43-49.

3. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. (2010), "Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008", *Int J Cancer*, 127(12), pp. 2893-917.
4. Kim HJ, Han MH, Kim GY, Choi YW, Choi YH. Hexane extracts of garlic cloves induce apoptosis through the generation of reactive oxygen species in Hep3B human hepatocarcinoma cells. *Oncol Rep*. 2012
5. Lee BC, Park BH, Kim SY, Lee YJ. Role of Bim in diallyl trisulfide-induced cytotoxicity in human

cancer cells. *J Cell Biochem*. 2011 Jan;112(1):118-27.

6. Li, H.; Zhu, H.; Xu, C. J. and Yuan, J. (1998): Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis, *Cell* 94 [4], pp.491-501 17.
7. Mousa AS, Mousa SA. Anti-angiogenesis efficacy of the garlic ingredient alliin and antioxidants: role of nitric oxide and p53. *Nutr Cancer* 2005;53:104-10.

ĐÁNH GIÁ MỘT SỐ DẤU ẤN MIỄN DỊCH QUẢ KHỐI TẾ BÀO VÀ SO SÁNH GIÁ TRỊ CỦA CB VỚI CS VÀ SINH THIẾT MÀNG PHỔI MÙ

Nguyễn Thị Hằng*, Trần Trọng Dương**, Nguyễn Tuấn Bình***

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Kỹ thuật khối tế bào là một phương pháp có nhiều giá trị trong chẩn đoán dịch các khoang cơ thể. Để tăng độ nhạy, hầu hết các phòng xét nghiệm đều dùng hai hoặc nhiều phương pháp chẩn đoán dịch. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Nghiên cứu 39 bệnh nhân bệnh nhân có tràn dịch màng phổi tại Trung tâm Hồ hấp; Trung tâm Y học hạt nhân và Ung bướu Bệnh viện Bạch Mai từ 1/3/2012 đến 31/07/2012. **Kết quả nghiên cứu, kết luận:** Kiểu hình miễn dịch của K biểu mô tuyến: 100% các dấu ấn CK, CK19, CK7 dương tính; 100% CK20 và calretinin âm tính; 70% TTF-1 dương tính; 73,4% CEA dương tính; 16,7% mesothelin dương tính. Kiểu hình miễn dịch của K biểu mô dạng đáy: TTF-1-/CK+/CK19+/CDX2+(đ)/CK7-/CK20-CEA-/CK5/6-/Caire-/Meso-/Synap-/Chromo. Kiểu hình miễn dịch của K biểu mô dạng sarcoma: TTF-1-/CK+/Vimentin+/CDX2-/CK7-/CK20-CEA-/CK5/6-/Caire-/Meso-/HMB45. Chẩn đoán bằng CB tăng thêm 33,3% số trường hợp ác tính so với CS. Trong 3 phương pháp chẩn đoán tổn thương ác tính của màng phổi, phương pháp khối tế bào có độ nhạy cao nhất (86,7%), tiếp đến là sinh thiết màng phổi mù (66,7%), độ nhạy của CS thấp nhất (57,6%). Độ đặc

hiệu của cả 3 phương pháp chẩn đoán đều rất cao, đạt tới 100%.

Từ khóa: K phổi qua kỹ thuật CB, CS.

SUMMARY

EVALUATING SOME IMMUNE MARKERS BY CELL BLOCK TECHNIQUE AND COMPARATING THE VALUE OF THE CS AND CB WITH BLIND PLEURAL BIOPSY

Rationale: cell block technique is a method many diagnostic value of the services the body cavity. To increase the sensitivity, most laboratories have used two or more methods of diagnostics. **Subjects and methods research:** Study of 39 patients with pleural effusion at the Respiratory Centre, Centre for Nuclear Medicine and Oncology Bach Mai Hospital from 1/3/2012 to 31/07 /in 2012. **Results:** 100% of the mark CK, CK19, CK7 positive, CK20 and 100% negative calretinin, 70% positive for TTF-1, 73.4 % CEA positive, mesothelin positive 16.7%. Immune phenotype of epithelial K bottom shape: TTF-1-/CK + / CK19 + / CDX2 + (drive) / CK7-/CK20-CEA-/CK5/6-/Caire-/Meso-/Synap-/Chromo. K immune phenotype of epithelial sarcoma types: TTF-1-/CK + / vimentin + / CDX2-/CK7-/CK20-CEA-/CK5/6-/Caire-/Meso-/HMB45. Diagnosis by CB increased 33.3% malignant cases compared with CS. In the third method of diagnosing malignant lesions of the pleura, the cell block method with the highest sensitivity (86.7%), followed by blind pleural biopsy (66.7%), the sensitivity of CS lowest (57.6%). Specificity of the 3 diagnostic methods are very high, up to 100%.

Keywords: K through technical lungs CB, CS.

* Đại học Y Hà Nội

** Cục Y tế, Tổng cục Hậu cần-Kỹ thuật, Bộ Công an

*** Bệnh viện Y học cổ truyền, Bộ Công an

Chịu trách nhiệm chính: Trần Trọng Dương

Email: bsduongretechco@gmail.com ĐT: 01677685789

Ngày nhận bài: 27/01/2015

Ngày phản biện khoa học: 10/02/2015

Ngày duyệt bài: 25/02/2015