

ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA POLYSACCHARIDE VÀ CÁC HỢP CHẤT TÁCH CHIẾT TỪ NẤM HƯƠNG (*Lentinus edodes*)

Trần Thị Hồng Hà, Lưu Văn Chính, Lê Hữu Cường, Trần Thị Như Hằng,
Đỗ Hữu Nghị, Trương Ngọc Hùng, Nguyễn Thị Nga, Lê Mai Hương*

Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam, *lehuong00@gmail.com

TÓM TẮT: Hai mẫu polysaccharides (Poly1 và Poly2) và 3 hợp chất (galactiol, ergosterol và ergosterol peroxide) đã được tách chiết từ quả thể nấm hương. Mẫu Poly1 và hợp chất ergosterol peroxide (NH-3) biểu hiện hoạt tính gây độc với cả 2 dòng tế bào ung thư gan (Hepatocellular carcinoma Hep-G2) và ung thư mô liên kết (Rhabdomyosarcoma-RD) với giá trị IC_{50} tương ứng là 29,62 và 34,24; 3,84 và 7,61 $\mu\text{g/mL}$. Poly1 và hợp chất NH-3 làm mật độ hình thành khối u tế bào Hep-G2 giảm 54,09 và 58,33% so với đối chứng và giảm kích thước của khối u xuống 35,36 và 55,18 % so với đối chứng.

Từ khóa: *Lentinus edodes*, chống ô xi hóa, gây độc tế bào, nấm hương, polysaccharides.

MỞ ĐẦU

Nấm hương (*Lentinus edodes*), hay còn có những tên khác: đông cô, hương cô, Shiitake, Shing ku thuộc họ Tricholomataceae, bộ Agaricales, lớp phụ Hymenomycetidae, lớp Holobasidiomycetes, ngành phụ Basidiomycotina, ngành Eumycota, giới Nấm [22].

Trên thế giới, nấm hương được sử dụng rộng rãi làm thực phẩm, dược liệu và chúng có thị phần lớn thứ hai trong số nhiều loại nấm. Các hoạt chất trong nấm hương làm tăng cường các chức năng của hệ thống miễn dịch và được sử dụng cho bệnh nhân mắc các bệnh về suy giảm miễn dịch (nhiễm virus, ung thư), dị ứng, nhiễm vi sinh vật gây bệnh [1, 2, 4, 20]. Ngoài ra, nấm còn có tác dụng làm giảm cholesterol, chữa cao huyết áp, tiểu đường và nâng cao hoạt động của gan [1, 3, 9, 14, 22, 23].

Các sản phẩm nổi tiếng từ nấm hương như Lentinan (β 1,3/1,6 glucan từ quả thể), LEM (từ sợi nấm) được dùng điều trị bệnh ung thư [20], đặc biệt LEM có hiệu lực cao trong điều trị bệnh AIDS [22]. Nấm hương giàu các chất như selenium, axit uric, vitamin A, E, C đặc biệt là vitamin D chống oxi hóa; các chất như adenin và cholin ngăn ngừa sự xuất hiện của bệnh xơ gan, xơ vữa động mạch; tyrosinase có tác dụng làm giảm áp suất máu. Nấm hương có thể làm giảm nhanh chóng các lipit tích lũy dư thừa trong gan, giúp tăng cường hoạt động của gan, giải độc cho cơ thể [22].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tách chiết các hợp chất phân tử lượng nhỏ (chất thứ cấp) và polysaccharide từ quả thể nấm hương, đồng thời nghiên cứu hoạt tính ức chế tế bào ung thư của các chất này.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nấm hương thành phẩm: được nuôi trồng tại Sapa nhằm thu nhận quả thể (fruiting body).

Các dòng tế bào ung thư: được cung cấp từ phòng Sinh học thực nghiệm, Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, gồm: RD: Human Rhabdomyosarcoma (ung thư mô liên kết) và Hep-G2: Human Hepatocellular carcinoma (ung thư gan người).

Thiết bị và hóa chất

Điểm nóng chảy được đo trên máy BOTIUS (Heiztisch Mikroskop) của Đức. Phổ phun mù electron ESI-MS được đo trên máy Thermo Finnigan LCQ Advantage spectrometer. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân protom và cacbon được đo trên máy Bruker AC 500 MHz ở các tần số 500 và 125 MHz tại Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam dùng TMS làm chất chuẩn nội.

Sắc kí cột dùng silica gel Merck (Kieselgel 60, 70-230 mesh và 230-400 mesh), pha đảo RP-18. Sắc kí lớp mỏng phân tích dùng bản silica gel tráng sẵn trên đế nhôm của Merck, độ dày 0,2 mm, thuốc thử được sử dụng là $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ pha trong H_2SO_4 65%.

Phương pháp tách chiết và phân lập chất

Khối lượng 2 kg quả thể nấm khô được xay nhỏ và ngâm chiết trong ethanol 96% 15 ngày. Phần dịch chiết (A) và phần bã nấm (B) được tách bằng ly tâm 5.000 vòng/phút trong 10 phút.

Phần dịch chiết A được làm lạnh ở 4-10°C thu chất kết tinh NH-1 (6 g), tiếp theo đó, phần dịch được loại dung môi dưới áp suất thấp thu được cặn chiết ethanol (65 g). Cặn chiết được hòa trong nước và tách phân đoạn sử dụng 3 dung môi lần lượt là n-hexan, ethyl axetat và n-butanol. Dịch chiết được làm bay hơi tại 50-60°C thu được cặn chiết tương ứng là cặn n-hexan-A (22 g), cặn ethyl axetat-B (15 g) và cặn n-butanol-C (18 g). Cặn chiết n-hexan tiếp tục được tách phân đoạn bằng sắc ký cột lặp lại trên silica gel với hệ dung môi n-hexan/axeton theo tỷ lệ 49/1-1/1 thu phân đoạn A1, A2, A3. Tiếp theo, A1 được tách chiết phân đoạn sử dụng sắc ký cột với hệ dung môi n-hexan/axeton theo tỷ lệ 3/1-1/1, thu được 2 hợp chất ký hiệu là NH-2 (150 mg) và NH-3 (50 mg).

Phần bã B được làm khô ở 45-50°C và đun trong nước cất ở 100°C trong 8 giờ, lặp lại 3 lần. Dịch chiết của 3 lần được gộp lại và làm giảm thể tích bằng quay chân không tới thể tích còn 1/10 ban đầu. Dịch chiết được bổ sung ethanol 95% vào với tỷ lệ 3:1 (v/v) và ủ 4°C trong 24 h, tiếp theo ly tâm 10.000 vòng/phút trong 10 phút thu cặn chứa polysaccharide. Cặn được rửa 2 lần bằng methanol và làm đông khô, ký hiệu Poly1. Phần bã sau khi chiết nước 100°C được làm khô và tiếp tục chiết bằng 5% NaOH (1:10, w/v), ở 55-60°C trong thời gian 24 h. Phần dịch và cặn được tách bằng ly tâm 10.000 vòng/phút trong 30 phút, thu dịch nổi. Dịch được trung hòa bằng axetic axit 1 M tới pH 6-7, tiếp theo bổ sung 3 thể tích ethanol 95% và ủ 4°C qua đêm. Phần polysaccharide (Poly2) được thu nhận bằng ly tâm 10.000 vòng/phút trong 30 phút.

Xác định hàm lượng polysaccharide [8]

Trộn đều 100 μ l dịch mẫu với 100 μ l phenol 5% trong ống thủy tinh. Hỗn hợp được bổ sung 0,5 mL dung dịch H₂SO₄ đậm đặc và đun nóng tại 100°C trong 5 phút. Ống nghiệm được trộn kỹ và để hiện màu, sau 30 phút tiến hành so

màu tại bước sóng 492 nm. Làm mẫu đối chứng (blank) tương tự, dùng 100 μ l nước cất thay mẫu. Từ hiệu số giá trị OD ($\lambda = 492$ nm) giữa dịch mẫu và đối chứng sẽ tính được hàm lượng polysaccharide có trong mẫu bằng cách so sánh với giá trị OD ($\lambda = 492$ nm) của glucose được dùng làm chất chuẩn.

Phương pháp thử hoạt tính gây độc tế bào

Tế bào ung thư *in vitro* được nuôi cấy theo phương pháp của Skehan et al. (1991) [18]. Hoạt tính gây độc các dòng tế bào ung thư được xác định theo phương pháp SRB Likhivitsayawuid et al. (1993) [11].

Phương pháp xác định hoạt tính chống oxy hóa [17]

Nguyên lý: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) có khả năng tạo ra các gốc tự do bền trong dung dịch etanol bão hòa. Khi các mẫu thử nghiệm được cho vào hỗn hợp này, nếu mẫu trung hòa hoặc bao vây các gốc tự do thì nó sẽ làm giảm độ hấp thụ ánh sáng của các gốc tự do đó. Hoạt tính chống oxy hóa được đánh giá thông qua giá trị hấp thụ ánh sáng của dịch thí nghiệm so với đối chứng khi so màu ở bước sóng 515 nm.

Phương pháp ức chế hình thành khối u 3 chiều trên thạch mềm (anti-tumor promoting assay) *in vitro*

Phương pháp được thực hiện theo các tác giả Gao et al. (2007) [7] và Kim (2005) [10].

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tách chiết polysaccharide từ nấm hương

Từ bột quả thể nấm hương chúng tôi đã tách được 2 phân đoạn chứa polysaccharide và xác định hàm lượng của chúng, kết quả được thể hiện ở bảng 1.

Brauer et al. (2007) [2] đã tách polysaccharide từ các nguồn nấm hương khác nhau bằng nước ở 100°C thu được hàm lượng từ 0,91-5,8% (theo trọng lượng khô). Có 6 loại polysaccharide khác nhau được tách và tinh sạch từ dịch chiết nước, trong đó β -1,3/1,6 glucan (lentinan) chiếm tỷ lệ cao nhất [5]. Nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng chất lentinan nằm trong dịch chiết nước nóng, với hàm lượng 0,015-0,82 g/100 g nấm tươi [5, 12]. Tuy nhiên, Rincao et

al. (2012) [15] nhận thấy rằng, dịch chiết nước nóng chủ yếu chứa polysaccharide với liên kết β -1,6 và α -1,4 glucosidic mà không có liên kết β -1,3 của chất lentinan. Surenjav et al. (2006) [19] dùng hỗn hợp NaOH/NaBH₄ tách lentinan với sản lượng 3,5-10% (theo trọng lượng khô). Kết quả ở bảng 1 cho thấy, một phần polysaccharide được chiết bằng nước tại 100°C,

phần lớn polysaccharide vẫn nằm trong phần bã không tan và chỉ được chiết ra khi sử dụng NaOH 5%. Bằng phương pháp tinh sạch lentinan dùng cột trao đổi ion DEAE (Cl⁻) và dùng enzyme β -1,3 glucanase đặc hiệu thủy phân, chúng tôi nhận thấy lentinan chủ yếu nằm trong phân đoạn chiết kiềm (Poly2) (kết quả không được trình bày tại đây).

Bảng 1. Hàm lượng polysaccharide từ nấm hương

Phân đoạn	Kí hiệu mẫu	Hàm lượng polysaccharide (%)*
Chiết nước 100°C	Poly1	3,84
Chiết 5% NaOH	Poly2	11,08

(*) . % so với trọng lượng khô mẫu ban đầu

Kết quả phân lập và xác định cấu trúc các hợp chất từ nấm hương

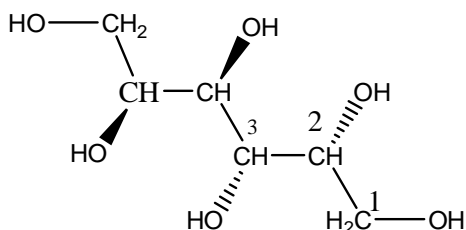
Cấu trúc của các chất được xác định bằng các phổ ¹H-NMR, ¹³C-NMR và các phổ 2 chiều như HSQC và HMBC.

Hợp chất NH-1: C₆H₈ (OH)₆, M = 182, galactiol (hình 1)

Chất kết tinh màu trắng, điểm chảy 167-169°C [21].

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz, ppm) δ 4,40 (d, $J = 5,5$ Hz, 1H-OH), 4,35 (t, $J = 6$ Hz, 1H-OH), 4,13 (d, $J = 7$ Hz, 1H-OH), 3,60 (m, 1H, H_{1a}), 3,53 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H, H₃), 3,45 (m, 1H, H_{1b}), 3,38 (m, 1H, H₂).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz, ppm) δ 71,5 (C₂), 69,8 (C₃), 63,9 (C₁).



Hình 1. Cấu trúc hóa học chất Galactiol

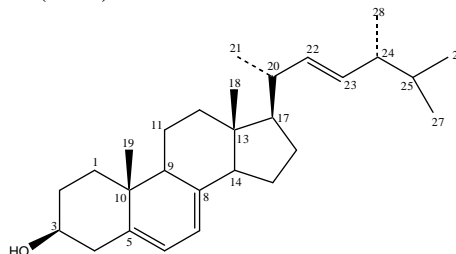
Hợp chất NH-2: Ergosterol (hình 2)

Tinh thể hình kim màu trắng, Tnc: 168°C, ESI-MS: m/z 397,3 [M + H]⁺ (C₂₈H₄₄O, M = 396) [24].

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz, ppm) δ :

5,75 (dd, $J_1=2$ Hz, $J_2=5,5$ Hz, 1H, H₆), 5,38 (m, 1H, H₇), 5,23 (dd, $J_1=7$ Hz, $J_2=15$ Hz, 1H, H₂₃), 5,17 (dd, $J_1=7$ Hz, $J_2=15$ Hz, H₂₂), 3,64 (m, H₃), 2,47 (m, 1H), 2,28 (t, $J = 12$ Hz, 2H, H₄), 2,04 (m, 1H, H₂₀), 1,98 (1H, m, H₉), 1,94 (1H, m, H₁₄), 1,90 (1H, m, H_{12b}), 1,76 (2H, m, H_{2b}, H₂₄), 1,75 (1H, m, H_{1b}), 1,73 (1H, m, H₁₄), 1,67 (1H, m, H₁₅), 1,28 (1H, m, H_{16a}), 1,74 (1H, m, H_{16b}), 1,25 (1H, m, H_{15a}), 1,68 (m, 1H, H_{15b}), 1,64 (m, 1H, H₁₁), 1,50 (1H, m, H_{2a}), 1,38 (m, 1H, H₂₅), 1,34 (1H, m, H_{12a}), 1,25 (m, 1H, H_{1a}), 1,78 (1H, m, H_{1b}), 1,04 (d, $J=6,5$ Hz, 3H, H₂₁), 0,95 (s, 3H, H₁₉), 0,92 (3H, d, $J = 6,5$ Hz, H₂₈) và 0,83 (t, $J = 7$ Hz, 6H, H₂₆₋₂₇), 0,63 (s, 3H, H-18).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz, ppm) δ : 141,7 (C-5), 139,9 (C-8), 135,6 (C-22), 131,9 (C-23), 119,60 (C-6), 116,50 (C-7), 70,49 (C-3), 55,79 (C-17), 54,59 (C-14), 46,29 (C-9), 42,87 (C-24), 42,59 (C-13), 40,83 (C-40), 40,82 (C-20), 39,12 (C-12), 38,41 (C-1), 37,06 (C-10), 33,12 (C-25), 32,03 (C-2), 28,29 (C-16), 23,02 (C-15), 21,14 (C-4), 21,12 (C-21), 16,31 (C-19), 19,66 (C-26), 19,96 (C-27), 17,62 (C-28) và 12,07 (C-18).



Hình 2. Cấu trúc hóa học Ergosterol

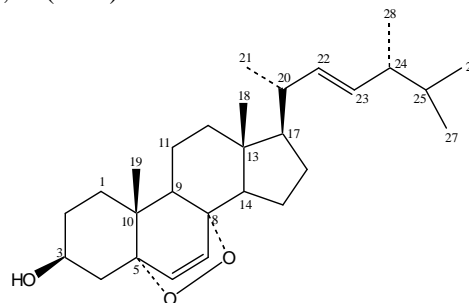
Hợp chất NH-3: C₂₈H₄₄O₃, M = 426, Ergosterol peroxide (hình 3)

Chất tinh thể hình kim màu trắng, Tnc. 181-183°C, phổ khối lượng ESI-MS: *m/z* 429,3 [M + H]⁺ (C₂₈H₄₄O₃, M = 426) [13].

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, ppm) δ: 1,56 (1H, m, H_{1a}), 1,85 (1H, m, H_{1b}), 1,72 (1H, m, H_{2a}), 1,96 (1H, m, H_{2b}), 3,97 (1H, m, H₃), 1,27 (1H, m, H_{4a}), 1,97 (1H, m, H_{4b}), 6,24 (1H, d, *J* = 8,5 Hz, H₆), 6,50 (1H, d, *J* = 8,5 Hz, H₇), 1,51 (1H, m, H₉), 1,41 (1H, m, H_{11a}), 1,62 (1H, m, H_{b-11}), 1,55 (1H, m, H_{12a}), 2,11 (1H, m, H_{12b}), 1,58 (1H, m, H₁₄), 1,25 (1H, m, H_{15a}), 1,53 (1H, m, H_{15b}), 1,37 (1H, m, H_{16a}), 1,78 (1H, m, H_{16b}), 1,24 (1H, m, H₁₇), 0,86 (3H, s, H₁₈), 0,88 (3H, s, H₁₉), 2,03 (1H, m, H₂₀), 1,01 (3H, d, *J* = 7,0 Hz, H₂₁), 5,14 (1H, dd, *J* = 8,5, 15,5 Hz, H₂₂), 5,22 (1H, dd, *J* = 8,5, 15,5 Hz, H₂₃), 1,87 (1H, m, H₂₄), 1,50 (1H, m, H₂₅), 0,88 (3H, d, *J* = 6,6 Hz, H₂₆), 0,83 (3H, d, *J* = 6,5 Hz, H₂₇) và 0,91 (3H, d, *J* = 6,5 Hz, H₂₈).

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, ppm) δ: 30,09 (C-1), 34,71 (C-2), 66,49 (d, C-3), 39,37 (C-4), 82,17 (C-5), 135,22 (C-6), 130,75 (C-7), 79,44

(C-8), 51,12 (C-9), 36,99 (C-10), 20,64 (C-11), 39,91 (C-12), 44,58 (C-13), 51,70 (C-14), 23,42 (C-15), 28,65 (C-16), 56,23 (C-17), 12,88 (C-18), 18,18 (C-19), 39,73 (C-20), 20,89 (C-21), 135,44 (C-22), 132,33 (C-23), 42,79 (C-24), 33,08 (C-25), 19,65 (C-26), 19,96 (C-27), và 17,57 (C-28).



Hình 3. Cấu trúc hóa học Ergosterol peroxide

Kết quả thử hoạt tính sinh học của các chất chiết

Chúng tôi đánh giá sơ bộ hoạt tính gây độc tế bào và chống ôxi hóa của 3 loại cận chiết từ nấm hương (xem phần phương pháp), kết quả được trình bày ở bảng 2 và 3.

Bảng 2. Hoạt tính gây độc tế bào các chất chiết từ nấm hương

S TT	Ký hiệu mẫu	Nồng độ mẫu (µg/mL)	Tế bào sống sót (%)		Kết luận
			Hep-G2	RD	
1	DMSO		100 ± 0,0	100 ± 0,0	
2	Đối chứng (+)	5	0,5 ± 0,07	0,7 ± 0,1	Dương tính
3	Cận n-hexan	40	24,8±0,3	19,5±0,7	Dương tính
4	Cận EtOAc	40	88,7±0,9	92,5±1,2	Âm tính
5	Cận n-butanol	40	81,2±1,1	88,6±0,7	Âm tính

Bảng 3. Hoạt tính chống oxy hóa của 3 cận chiết dung môi nấm hương

STT	Kí hiệu mẫu	SC%	Kết quả
1	Chứng (+)	78,25±0,5	Dương tính
2	Chứng (-)	0,0±0,0	Âm tính
3	n-hexan	1,2±0,3	Âm tính
4	EtOAc	23,57±1,3	Âm tính
5	n-butanol	2,23±0,0	Âm tính

Kết quả cho thấy, cận chiết n-hexan có biểu hiện hoạt tính gây độc với dòng tế bào ung thư Hep-G2 và RD với giá trị IC₅₀ tương ứng là 24,8 và 19,5. Từ kết quả đó chúng tôi đã lựa

chọn cận chiết n-hexan để nghiên cứu tiếp.

Kết quả về hoạt tính chống ôxi hoá cho thấy, tất cả các mẫu thử đều không biểu hiện hoạt tính.

Kết quả thử hoạt tính gây độc tế bào của các phân đoạn của dịch chiết n-hexan

Từ cận chiết n-hexan, chúng tôi tiến hành phân lập bằng sắc ký cột lặp lại trên silica gel với hệ dung môi n-hexan/axeton theo tỷ lệ 49/1-1/1 thu được 3 phân đoạn ký hiệu A1-A3, trong đó, phân đoạn A1 có hoạt tính gây độc 2 dòng tế bào ung thư Hep-G2 và RD (bảng 4). Bảng

sắc ký cột với hệ dung môi n-hexan/axeton theo tỷ lệ 3/1-1/1, phân đoạn A1 tiếp tục được tách thu được 2 hợp chất ký hiệu lần lượt là **NH-2** (150 mg) và **NH-3** (50 mg).

Bảng 4. Hoạt tính gây độc tế bào các phân đoạn của dịch chiết n-hexan

STT	Ký hiệu mẫu	Nồng độ mẫu ($\mu\text{g/mL}$)	Dòng tế bào sống sót (%)		Kết luận
			Hep-G2	RD	
1	DMSO		100 \pm 0,0	100 \pm 0,0	
2	Chứng (+)	5	1,2 \pm 0,3	1,5 \pm 0,09	Dương tính
3	A1	20	19,1 \pm 0,08	11,2 \pm 0,7	Dương tính
4	A2	20	92,3 \pm 0,5	95,6 \pm 1,3	Âm tính
5	A3	20	94,7 \pm 0,9	96,8 \pm 0,3	Âm tính

Kết quả thử hoạt tính gây độc tế bào của các polysaccharide và hợp chất phân lập được

Chúng tôi đã đánh giá hoạt tính gây độc tế bào của 2 mẫu polysaccharide và 3 hợp chất phân lập được từ nấm hương, kết quả được trình bày ở bảng 5.

Kết quả bảng 5 cho thấy, mẫu poly1 và hợp chất NH-3 biểu hiện hoạt tính gây độc với cả 2 dòng tế bào ung thư gan (Hep-G2) và ung thư cơ vân (RD) với giá trị IC_{50} lần lượt là 29,62 và 34,24; 3,84 và 7,61 $\mu\text{g/mL}$. Các β 1,3/1,6 glucan được biết là chất ức chế tế bào ung thư thông qua cơ thể chủ (tăng sinh tế bào miễn dịch, sản xuất kháng thể) mà không gây độc trực tiếp lên tế bào ung thư (*in vitro*). Israilides (2008) [8] cho thấy hoạt tính ức chế tế bào ung

thư biểu mô vú ở người (IC_{50} 73 $\mu\text{g/mL}$) của cặn chiết polysaccharide bằng nước tại nhiệt độ phòng. Rincao (2012) [15] nghiên cứu tính ức chế virus (PV1 và BoHV-1) của polysaccharides và cặn chiết ethanol nấm hương cho thấy polysaccharide có hoạt lực ức chế virus rất tốt so với cặn chiết ethanol, với giá trị IC_{50} tương ứng với PV1 và BoHV-1 là 0,19 và 0,1 $\mu\text{g/mL}$, so với cặn ethanol là 1,3 và 2,1 $\mu\text{g/mL}$. Rincao (2012) [15] cho rằng khả năng kháng virus chủ yếu nhờ các polysaccharides.

Kết quả nghiên cứu về tính gây độc tế bào ung thư bởi mẫu polysaccharide nấm hương (Poly1 và Poly2) lần đầu tiên thực hiện trên 2 dòng tế bào ung thư kể trên (bảng 5), trong đó mẫu Poly1 có hoạt tính gây độc tế bào.

Bảng 5. Hoạt tính gây độc tế bào các polysaccharide và hợp chất phân lập

STT	Ký hiệu mẫu	Nồng độ mẫu ($\mu\text{g/mL}$)	Dòng tế bào sống sót (%)		Dòng tế bào Giá trị IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)		Kết luận
			Hep-G2	RD	Hep-G2	RD	
	DMSO		100 \pm 0,0	100 \pm 0,0			
	Chứng (+)	5	2,1 \pm 0,07	0,3 \pm 0,02	0,22	0,16	Dương tính
1	NH-1	10	92,7 \pm 0,8	94,4 \pm 0,5	>10	>10	Dương tính
2	NH-2	10	61,1 \pm 0,4	79,5 \pm 1,1	>10	>10	Âm tính
3	NH-3	10	26,5 \pm 0,7	42,2 \pm 0,4	3,84	7,61	Dương tính
4	Poly1	40	43,7 \pm 1,1	40,5 \pm 0,3	29,62	34,24	Dương tính
5	Poly2	40	90,1 \pm 0,5	77,9 \pm 1,1	>40	>40	Âm tính

Hoạt tính ức chế tạo u trên thạch mềm của các sản phẩm

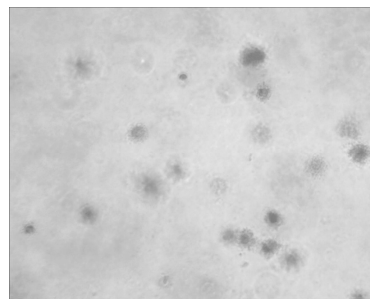
Chúng tôi đã thử khả năng ức chế u tế bào

ung thư gan Hep-G2 trên thạch mềm của các hợp chất phân lập được. Kết quả được trình bày ở bảng 6 và hình 4.

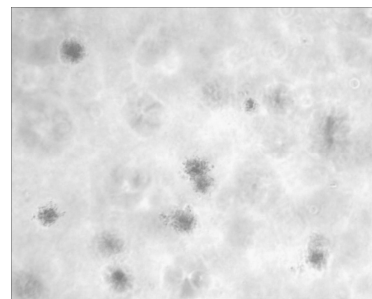
Kết quả bảng 6 và hình 4 cho thấy, mẫu Poly1 và hợp chất NH-3 ức chế rõ rệt sự hình thành khối u với mật độ hình thành khối u giảm tương ứng là 54,09 và 58,33% so với đối chứng và kích thước trung bình của khối u giảm tương ứng là 68,44 và 63,03 % so với đối chứng.

Bảng 6. Kết quả thử nghiệm hoạt tính ức chế tạo u trên thạch mềm của các hợp chất

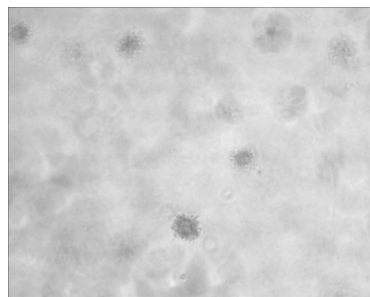
Kí hiệu mẫu	Nồng độ mẫu thử ($\mu\text{g/mL}$)	Kích thước trung bình của khối u		Độ giảm mật độ khối u (%)
		Đường kính (μm)	% giảm so với đối chứng	
Đối chứng âm (DMSO 1%)		29,63 \pm 1,71	0	0
NH-1	10	27,75 \pm 1,35	5,14	3,33 \pm 0,58
NH-2	10	28,11 \pm 1,57	3,91	48,33 \pm 0,50
NH-3	10	13,28\pm0,98	55,18	58,33\pm1,26
Poly1	40	19,15\pm1,35	35,36	54,09\pm0,58
Poly2	40	23,45 \pm 1,57	20,84	3,6 \pm 0,76



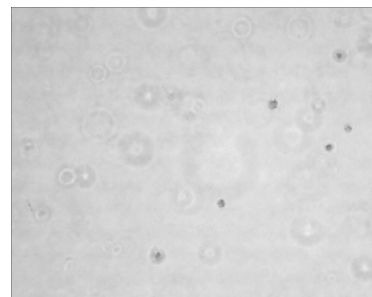
Đối chứng âm



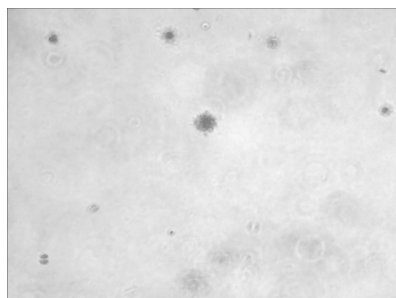
Hợp chất NH-1



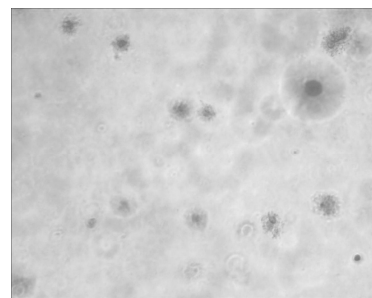
Hợp chất NH-2



Hợp chất NH-3



Mẫu Poly1



Mẫu Poly2

Hình 4. Ức chế phát triển khối u tế bào HepG2 bởi các chất phân lập

KẾT LUẬN

Đã có 2 mẫu polysaccharide (Poly1, Poly2) và 3 hợp chất (galactiol, cerebroside B và ergosterol peroxide) được phân lập từ quả thể nấm hương. Hoạt tính gây độc tế bào trên 2 dòng tế bào ung thư gan (HepG2) và ung thư mô liên kết (RD) của các chất phân lập đã được đánh giá, trong đó, mẫu poly1 và hợp chất NH-3 có hoạt tính gây độc với cả 2 dòng tế bào ung thư gan (Hep-G2) và ung thư mô liên kết (RD) với giá trị IC₅₀ tương ứng là 29,62 và 34,24; 3,84 và 7,61 µg/mL. Mẫu Poly1 và hợp chất NH-3 làm giảm mật độ khối u Hep-G2 (phát triển trên thạch mềm) tương ứng là 54,09 và 58,33% và giảm kích thước của khối u tương ứng là 35,36 và 55,18 % so với đối chứng.

Lời cảm ơn: Công trình này là kết quả của đề tài "Nghiên cứu quá trình chuyển hóa các polymer tự nhiên bởi enzyme từ nấm Việt Nam", mã số: 54/2011/ HĐ - NĐT NĐT giữa Việt Nam-CHLB Đức giai đoạn 2. Nhóm tác giả xin cảm ơn Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam, Bộ Khoa học và Công nghệ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bisen P. S., Baghel R. K., Sanodiya B. S., Thakur G. S., Prasad G. B., 2010. *Lentinus edodes*: a macrofungus with pharmacological activities. *Curr Med Chem.*, 17(22): 2419-2430.
2. Brauer D., Kimmons T., Phillips M., 2007. Comparison of two methods for the quantitation of beta glucans from Shiitake mushrooms. *J. Herbs Spices. Med. Plants*, 13(3): 15-26.
3. Breene W. M., 1990. Nutritional and medicinal value of speciality mushroom. *J. Food. Prot.*, 53: 883-894.
4. Chang S., Philip G. M., 2004. Medicinal value. In: *Mushrooms cultivation, nutritional value, medicinal effect and environmental impact*, 2nd ed.: 39-51.
5. Chihara G., Hamuro J., Maeda Y.Y., Arai Y., Fukuoka F., 1970. Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing, (an Edible Mushroom). *Cancer Research*, 30: 2776-2781.
6. DuBois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem*, 28(3): 350-356.
7. Gao H., Bailing H., Kuroyanagi M., Wu L., 2007. Constituents from anti-tumor-promoting active part of *Dioscorea bulbifera* L. in JB6 mouse epidermal cells. *Asian J. Trad. Medi.*, 2(3): 104-109.
8. Israilides C., Kletsas D., Arapoglou D., Philippoussis A., Pratsinis H., A. Ebringerova', Hr'ibalova' V., Harding S. E., 2008. In vitro cytostatic and immunomodulatory properties of the medicinal mushroom *Lentinula edodes*. 2008. *Phytomedicine*, 15: 512-519.
9. Ito H., Shimura K., Itoh H., Kawade M., 1977. Antitumor effects of a new polysaccharide-protein complex (ATOM) prepared from *Agaricus blazei* (Iwade strain 101) "Himematsutake" and its mechanisms in tumor-bearing mice. *Anticancer Res.*, 17(1A): 277.
10. Kim J. B., 2005. Seminar in Cancer Biology, 15: 365-377.
11. Likhitayawuid K., Angerhofer C. K., Cordell G. A., Pezzuto J. M., Ruangrunsi N., 1993. Cytotoxic and antimalarial bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Sephania erecta*. *J. Nat. Prod.*, 56 (1): 30-38.
12. Monic M. M. T., Hendrix E. A. H. J., Sonnenberg A. S. M., Wichers H. J., Mes J. J., 2011. Variation of bioactive lentinan-containing preparations in *Lentinula edodes* strains and stored products. *Proceedings of the 7th international conference on mushroom biology and mushroom products*: 259-267.
13. Ramos-Ligonio A., López-Monteon A., Trigos A., 2012. Trypanocidal activity of

- ergosterol peroxide from *Pleurotus ostreatus*. *Phytother Res.*, 26(6): 938-43.
14. Rasmy G. S., William A. Botros, Sanaa S. K., Ayman D. S., 2010. Preparation of glucan from *Lentinula edodes* edible mushroom and elucidation of its medicinal value. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 4(11): 5717-5726.
 15. Rincão P. V., Yamamoto K. A., Ricardo N. M. P. S., Soares S. A., Meirelles L. D. P., Nozawa C., Linhares R. E. C., 2012. Polysaccharide and extracts from *Lentinula edodes*: structural features and antiviral activity. *Virology Journal*, 9: 2-6.
 16. Sarkar S., 1993. Antiviral effect of the culture medium of *Lentinus edodes* on the replication of the herpes simplex virus type 1. *Antiviral Research*, 20: 293-303.
 17. Shela G., Olga M. B., Elen K., Lojek A., Ciz M., Grigelmo-Miguel N., Park Y-S., Jung S-T., Haruenkit R., Trakhtenberg S., 2003. Comparison of the contents of the main biochemical compounds and the antioxidant activity of some Spanish olive oils as determined by four different radical scavenging tests. *J. Nutr. Biochem.*, 14: 154-159.
 18. Skehan P., Storeng R., Scudiero D., Monks A., McMahon J., Vistica D., Warren J. T., Bokesch H., Kenney S., Boyd M. R., 1991. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer agents. *Eur. J. Cancer.*, 27: 1162-1168.
 19. Surenjav U., Zhang L., Xu X., Zhang X., Zeng F., 2006. Effects of molecular structure on antitumor activities of (1/3)- β -D-glucans from different *Lentinus edodes*. *Carbohydr. Polym.*, 63: 97-104.
 20. Tochikura T. S., Nakashima H., Ohashi Y., Yamamoto N., 1988. Inhibition (*in vitro*) of replication and of the cytopathic effect of human immunodeficiency virus by an extract of the culture medium of *Lentinus edodes* mycelia. *Med Microbiol. Immunol.*, 177(5): 235-244.
 21. Volpon L., Young C. R., Matte A., Gehring K., 2006. NMR structure of the enzyme GatB of the galactitol-specific phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system and its interaction with GatA. *Protein Sci.*, 15(10): 2435-2441.
 22. Wasser S. P., 2005. Shiitake (*Lentinus edodes*). In: *Encyclopedia of dietary supplements*. Marcel Dekker, New York (USA): 653-664.
 23. Yamamoto Y., 1977. Immunopotentiating activity of the water-soluble lignin rich fractions prepared from LEM, the extract of the solid culture medium of *Lentinus edodes* mycelia. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 61: 1909-1912.
 24. Yusoo S., Yutaka T., Minoru T., 2001. Chemical constituents of *Inonotus obliquus* IV. *Eurasian J. For. Res.*, 2: 27-30.

**EVALUATION OF BIOLOGICAL ACTIVITIES OF POLYSACCHARIDES
AND COMPOUNDS ISOLATED FROM *Lentinus edodes***

**Tran Thi Hong Ha, Luu Van Chinh, Le Huu Cuong, Tran Thi Nhu Hang,
Do Huu Nghi, Truong Ngoc Hung, Nguyen Thi Nga, Le Mai Huong**

Institute of Natural Products Chemistry, VAST

SUMMARY

Two polysaccharide samples (Poly1 and Poly2) and three compounds (galactiol, ergosterol and ergosterol peroxide) were isolated from the fruiting body of *Lentinus edodes*. Poly1 and ergosterol peroxide (NH-3) showed cytotoxicities against two liver cancer cell lines Hep-G2 (Hepatocellular carcinoma) and RD (Rhabdomyosarcoma) with IC₅₀ values of 29.62 and 34.24; 3.84 and 7.61 µg/mL respectively. Poly1 and NH-3 showed capacities for decreasing Hep-G2 tumor density by 54.09 and 58.33%, respectively in comparison to the control. In addition, the average sizes of tumors treated with Poly1 and NH-3 were decreased by 35.36 and 55.18%, respectively as compared to the control.

Keywords: *Lentinus edodes*, Antioxidant, Cytotoxicity, Polysaccharides.

Ngày nhận bài: 10-3-2013