Tạp chí Công nghệ Sinh học **16**(2): 327-335, 2018

NGHIÊN CỨU TÁCH CHIẾT VÀ TÁC DỤNG TĂNG CƯỜNG MIỄN DỊCH CỦA CÁC POLYSACCHARIDE TỪ LÁ CÂY THUỐC XUÂN HOA *PSEUDERANTHEMUM PALATIFERUM* (NEES) RADLK

Võ Hoài Bắc[1,2,✉], Trần Thị Vân Anh[1,2], Nguyễn Thị Mai Phương[1,2], Nguyễn Thị Thanh Hương[3,2], Lê Văn Trường[1,2]

[1]*Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*
[2]*Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*
[3]*Viện Sinh thái và Tài nguyên vinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: vhbac@ibt.ac.vn

Ngày nhận bài: 08.9.2017
Ngày nhận đăng: 04.4.2018

TÓM TẮT

Cây Xuân Hoa *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk là cây thuốc đã được sử dụng trong dân gian Việt Nam để chữa nhiều bệnh như: bệnh nhiễm khuẩn đường tiêu hóa, trĩ, chấn thương chảy máu, tiêu mủ các vết thương, các bệnh ung thư thời kỳ phát bệnh, các bệnh về gan. Cho đến nay, nhiều nghiên cứu về cấu trúc, đặc tính và tác dụng dược lý của các chất thứ cấp từ cây Xuân Hoa như: flavonoid, palmitic acid, ß-sitosterol, triterpene saponin, stigmasterol, salicylic acid, lignan, triterpene, dipeptide đã được nghiên cứu. Polysaccharide là nhóm hợp chất rất được các nhà khoa học trên thế giới quan tâm do các tác dụng quan trọng của chúng về tăng cường miễn dịch, kháng viêm, làm lành vết thương…Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tách chiết, tinh sạch sơ bộ và xác định được tác dụng tăng cường miễn dịch của polysaccharide chiết xuất từ cây thuốc này: hàm lượng polysaccharide trong lá cây Xuân Hoa đạt 8,2 % (± 0,65) trọng lượng khô. Các điều kiện chiết rút polysaccharide thích hợp đã được xác định: dung môi ethanol 25%, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi (1g mẫu khô/10ml), nhiệt độ chiết rút 70°C, thời gian chiết rút 12 giờ. Chế phẩm polysaccharide đã được tinh sạch bằng TCA 10%, có độ sạch đạt 77,8% (± 1,19 %) và hiệu suất thu nhận chế phẩm polysaccharide đạt 1,79 % (± 0,24). Chuột bị suy giảm miễn dịch bằng cyclophosphamide được điều trị chế phẩm polysaccharide qua đường uống ở lượng 150mg/kg thể trọng chuột trong 5 ngày đã làm tăng có ý nghĩa ($p<0,05$) số lượng bạch cầu so với nhóm chuột không được điều trị.

Từ khóa: *Cây Xuân Hoa, Pseuderanthemum palatiferum, polysaccharide, tách chiết, tăng cường miễn dịch*

MỞ ĐẦU

Cây thuốc Xuân Hoa *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk thuộc họ Ôrô Acanthaceae là cây thuốc được định danh tại Việt Nam từ những năm 1980. Lá cây Xuân Hoa đã được dùng trong dân gian để chữa nhiều bệnh như: nhiễm khuẩn đường tiêu hóa, trĩ, chấn thương chảy máu, tiêu mủ các vết thương, các bệnh ung thư thời kỳ phát bệnh, các bệnh về gan (Trần Công Khánh *et al.*, 1997). Trong khoảng 15 năm gần đây, nhiều nhà khoa học Việt Nam và thế giới đã xác minh được một số tác dụng sinh học của lá cây thuốc này như: cao ethyl acetate và n-butanol (ở nồng độ 10 mg/ml) từ lá cây Xuân Hoa có tác dụng kháng các chủng vi khuẩn Gram dương (*Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus*), Gram âm (*Escherichia coli*) và vi nấm (*Candida albicans, C. stellatoides*) và tác dụng chống oxy hóa (Phan Minh Giang *et al.*, 2005), tác dụng ức chế acetylcholinesterase của dịch chiết nước lá cây *P. palatiferum* trên chuột bạch (Buncharoen *et al.*, 2010), giảm đường huyết ở chuột bị tiểu đường (Padee *et al.*, 2010). Cao đặc toàn phần lá cây *P. Palatiferum* không gây độc tính cấp diễn trên chuột, (Nguyễn Thị Minh Thu *et al.*, 1999).

Cây Xuân Hoa *P. palatiferum* đã được quan tâm nghiên cứu sâu rộng về cả lĩnh vực hóa học lẫn dược học, tuy nhiên, việc nghiên cứu cấu trúc, đặc tính và tác dụng dược lý chỉ tập trung vào các chất thứ cấp như: flavonoid, phytol, palmitic acid, ß-sitosterol, triterponoid saponin, stigmasterol, salicylic acid, lignan, triterpene, dipeptide… (Phan Minh Giang *et al.*, 2005; Mai *et al.*, 2011). Hiện nay, nhiều

polysaccharide khác nhau trong thực vật đã được các tác giả trên thế giới chứng minh tác dụng trong Y học: kháng viêm, phân hủy fibrin, làm lành vết thương…(Dourado *et al.*, 2004 ; Chan *et al.*, 2007). Các polysaccharide như: beta-glucans (Vetvicka *et al.*, 2008), pectin (Lim *et al.*, 2003), nhóm galactomannan (Santander *et al.*, 2011) có tác dụng tăng cường miễn dịch, kháng viêm cao. Tại Việt Nam, một số nghiên cứu cho thấy polysaccharide từ rễ củ cây đương quy có tác dụng phục hồi phản ứng miễn dịch ở chuột (Nguyễn Gia Chấn *et al,* 1998). Lê Xuân Thám và đtg. (1999) đã xác định các phân đoạn polysaccharide tách từ nấm hương có khả năng gia tăng đại thực bào, gia tăng yếu tố tạo protein pha cấp tính, yếu tố giãn mạch và tạo interleukin. Cây Xuân Hoa *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk thuộc họ Ôrô *Acanthaceae* được dùng trong dân gian Việt Nam để chữa nhiều bệnh. Lá cây Xuân Hoa *P. palatiferum* có độ nhớt cao, có thể là nguồn polysaccharide giá trị cho các nguyên liệu thuốc. Tuy nhiên chưa có công bố nào nghiên cứu về tách chiết, tinh sạch, đặc tính và tác dụng sinh học của polysaccharide từ cây thuốc Xuân Hoa *P. palatiferum*.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xác định các điều kiện chiết rút polysaccharide hiệu quả nhất: dung môi, nhiệt độ, thời gian, tỷ lệ nguyên liệu và dung môi. Bước đầu tinh sạch chế phẩm polysaccharide từ lá cây thuốc Xuân Hoa *P. palatiferum* và xác định tác dụng tăng cường miễn dịch của polysaccharide chiết xuất từ cây thuốc này. Đây sẽ là những thông tin khoa học mới làm cơ sở cho các nghiên cứu về cấu trúc, đặc tính và các tác dụng sinh học của polysaccharide này.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Lá cây Xuân Hoa *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk dùng trong nghiên cứu được thu nhận tại Hà Nội.

Chuột nhắt trắng giống đực, chủng Swiss, trọng lượng 18-22g do Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương cung cấp. Chuột được nuôi bằng thức ăn tổng hợp, nước sạch ở nhiệt độ 25-28°C.

Hóa chất phenol, trichloroacetic acid, ethanol 96^o, chloroform, **s**ulfuric acid của Merck (CHLB Đức), glucose được mua của hãng Sigma (Mỹ)**,** **c**yclophosphamid của hãng Baxter Oncology GmbH (CHLB Đức).

Phương pháp

Thu nhận và xử lý nguyên liệu

Lá cây Xuân Hoa *P. palatiferum* sau khi thu hái được rửa sạch, sấy khô ở nhiệt độ khoảng 50-60^{o}C, sau đó xay nhỏ lá thành bột, bảo quản ở 4°C cho nghiên cứu.

Chiết rút polysaccharide

Bột khô lá cây Xuân Hoa (2g) được cho vào bình nón, bổ sung dung môi (ethanol hoặc nước cất) theo tỉ lệ 1:20 (2g nguyên liệu: 40ml dung môi), ủ 6h ở nhiệt độ thích hợp trong bể ổn nhiệt. Hỗn dịch được làm nguội tới nhiệt độ phòng sau đó ly tâm với vận tốc 8.000 vòng trong 30 phút ở 4^{o}C để lấy dịch trong. Dịch chiết thu được sau li tâm được xác định hàm lượng polysaccharide theo phương pháp phenol-sunlfuric acid (Dubois *et al.*, 1956).

Phương pháp định lượng polysaccharide

Polysaccharide được định lượng bằng phương pháp phenol-sunlfuric acid (Dubois *et al.*, 1956). Các bước được mô tả tóm tắt như sau: 400µl dịch mẫu chứa polysaccharide cho tác dụng với 200µl dung dịch phenol 5%, cho thêm 1ml H_2SO_4 đậm đặc và để 30 phút ở nhiệt độ phòng. Màu của phản ứng được phát hiện trên máy quang phổ ở bước sóng 490 nm. Hàm lượng polysaccharide được định lượng dựa trên số đo OD thu được của mẫu thí nghiệm đối chiếu với đồ thị chuẩn glucose.

Tinh sạch sơ bộ polysaccharide bằng phương pháp Servag

Polysaccharide được tinh sạch sơ bộ bằng phương pháp Sevag (Staub *et al.*, 1965): Dịch chiết lá Xuân Hoa sau khi chiết rút được loại protein bằng dung dịch sevag (1 butanol: 4 chlorofom) theo tỉ lệ 1:1 (1 dịch mẫu: 1 sevag). Hỗn hợp phản ứng được voltex nhẹ trong 20 phút sau đó được để lắng cho các pha tách ra. Hỗn hợp sẽ được tách làm 3 pha, polysaccharide phần lớn được tách ra ở pha trên sẽ được thu lại, tiếp tục cho sevag như trên (lặp lại 3lần). Dịch pha trên chứa polysaccharide được tủa bằng ethanol 96% theo tỉ lệ 1:4 (1 dịch: 4 ethanol) ở 4^{o}C qua đêm sau đó ly tâm ở 12000 vòng trong 20 phút ở 4^{o}C để thu tủa sau đó sấy khô ở 60°C, thu được chế phẩm polysaccharide sơ bộ tinh sạch.

Tinh sạch sơ bộ polysaccharide bằng TCA (Oliveira et al., 1999)

Dịch chiết lá Xuân Hoa sau khi chiết rút được bổ sung dung dịch TCA 10%, 20% và 40% (tỉ lệ 1:1),

voltex, để qua đêm ở nhiệt độ phòng sau đó ly tâm trên máy ly tâm Sorvall RC26 plus (hãng Thermo Electron GmbH, CHLB Đức) ở 12000 vòng/phút, trong 20 phút ở 4^{o}C. Dịch sau ly tâm chứa polysaccharide ở pha trên được thu lại và tủa với ethanol 96% theo tỉ lệ 1:4 (1 dịch: 4 ethanol) ở 4 ^{o}C qua đêm, sau đó ly tâm ở 12000 vòng/phút trong 20 phút ở 4^{o}C. Polysaccharide kết tủa được thu nhận, sấy khô, thu được chế phẩm polysaccharide tinh sạch một phần.

Phân tích độ sạch của chế phẩm polysaccharide bằng phổ UV

Độ sạch của chế phẩm polysaccharide sau tinh sạch được phân tích trên máy đo quang phổ theo phương pháp của Cai và cộng sự (Cai *et al.*, 2013). Chế phẩm polysaccharide được hòa vào nước cất với nồng độ 100 µg/ml sau đó được quét trên máy UV-vis spectrophotometer (Shimadzu, Japan) với bước sóng từ 200 -700nm.

Thử nghiệm chế phẩm polysaccharide trên chuột được tiêm cyclophosphamide (Nguyễn Trọng Thông et al., 2004))

Chuột được tiêm cyclophosphamide (CY). Cyclophosphamide là chất gây tổn thương về cấu trúc và chức năng hệ miễn dịch ở chuột. Chuột được tiêm với liều 200mg/kg thể trọng vào phúc mạc. Chuột nhắt trắng dòng Swiss thuần chủng được chia làm 3 lô mỗi lô 10 con: Lô đối chúng sinh học (lô I), lô đối chứng thí nghiệm (lô II), lô thí nghiệm (lô III). Lô I tiêm nước cất, lô II, III tiêm cyclophosphamide (CY) với liều 200mg/kg thể trọng vào phúc mạc tại ngày thứ nhất. Lô I và II cho uống nước cất 0,15ml/con/ ngày trong 5 ngày. Lô III cho uống chế phẩm polysaccharide tinh sạch từ lá cây Xuân Hoa *P. palatiferum* với liều uống 150mg/kg thể trọng chuột trong 5 ngày làm thí nghiệm. Sau 5 ngày thí nghiệm, xác định trọng lượng chuột, trọng lượng tương đối của lách và tuyến ức, số lượng hồng cầu, bạch cầu của các lô chuột.

Phân tích thống kê

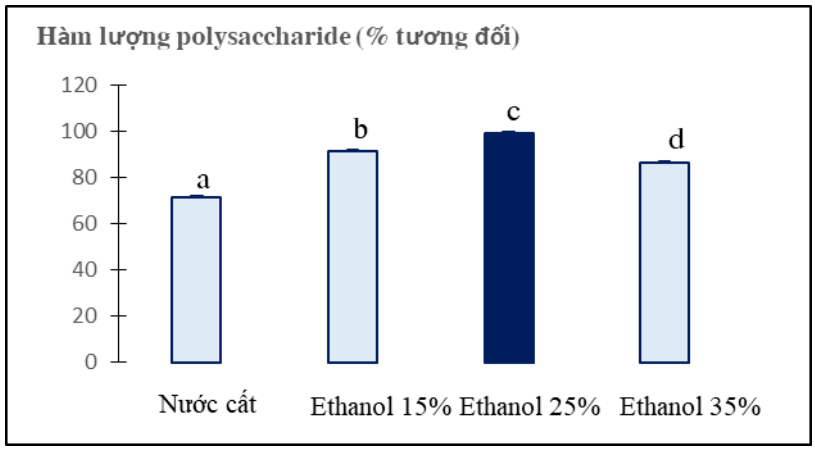
Phân tích thống kê được thể hiện ý nghĩa bằng ± SD và được phân tích bằng ANOVA-test khi so sánh giá trị trung bình của các nhóm. Sự khác nhau sẽ được chỉ ra ý nghĩa bằng p< 0.05.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Dung môi, nhiệt độ, thời gian chiết xuất và tỷ lệ dung môi và mẫu là những điều kiện quan trọng ảnh hưởng đến hiệu quả chiết rút polysaccharide (Zhang *et al.,* 2015). Vì vậy chúng tôi xác định ảnh hưởng của các điều kiện này đến khả năng chiết rút polysaccharide từ lá cây Xuân Hoa *P. palatiferum.*

Lựa chọn dung môi thích hợp cho chiết rút polysaccharide từ lá Xuân Hoa

Dựa vào các nghiên cứu chiết rút polysaccharide từ thực vật đã công bố, chúng tôi đã lựa chọn chiết polysaccharide từ lá cây Xuân Hoa với dung môi ethanol và nước cất (Zhang *et al.*, 2013; Aoxue *et al.*, 2011). Bột khô lá Xuân Hoa được cho vào bình nón, chiết polysaccharide bằng ethanol với các nồng độ 15%, 25%, 35% và bằng nước cất ở điều kiện 60°C trong 6h. Kết quả cho thấy, dung môi ethanol 25% cho hiệu quả chiết rút polysaccharide là cao nhất so với chiết bằng ethanol 15%, 35% và nước cất (Hình 1).



Hình 1. So sánh hiệu quả chiết xuất polysaccharide từ lá Xuân Hoa với các dung môi khác nhau. **(**60^{o}C trong 6h, tỷ lệ:1g mẫu/20ml dung môi**);** *p< 0,05: sự sai khác có ý nghĩa khi chiết bằng ethanol 25% (c) so sánh với chiết ethanol ở các nồng độ khác (a,b,d).*

Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hiệu suất chiết rút polysaccharide

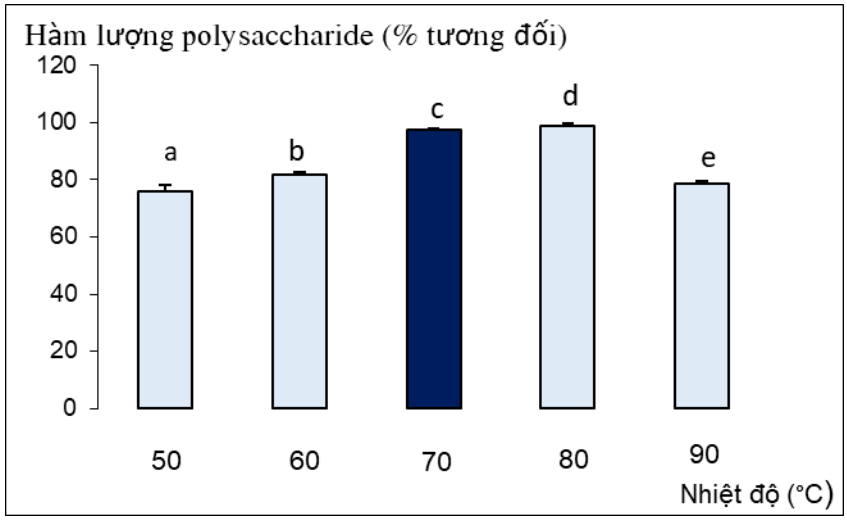
Để đánh giá sự ảnh hưởng của nhiệt độ đến hiệu suất tách chiết polysaccharide, ethanol 25% được sử dụng làm dung môi để chiết rút polysaccharide ở các nhiệt độ từ 50-90°C. Kết quả nghiên cứu cho thấy ở nhiệt độ 70°C-80°C hàm lượng polysaccharide thu được cao nhất. Không có sự khác biệt có ý nghĩa khi chiết ở nhiệt độ 70°C (c) và 80°C (d) (Hình 2). Do vậy, chúng tôi sử dụng 70°C là nhiệt độ thích hợp nhất để chiết rút polysaccharide. Điều này cũng phù hợp với các nghiên cứu sử dụng nhiệt độ cao để chiết rút polysaccharide. Tuy nhiên, khi tăng nhiệt độ chiết rút có thể dẫn đến sự bay hơi của dung môi, chi phí năng lượng và lẫn nhiều tạp chất hơn (Lianfu & Zelong, 2008). Vì thế, nhiệt độ tách tối ưu polysaccharide từ lá Xuân Hoa *P. palatiferum* khoảng 70°C là nhiệt độ rất phù hợp cho việc sản xuất ở quy mô lớn, tiết kiệm năng lượng và chi phí chiết rút.

Thời gian thích hợp chiết rút polysaccharide

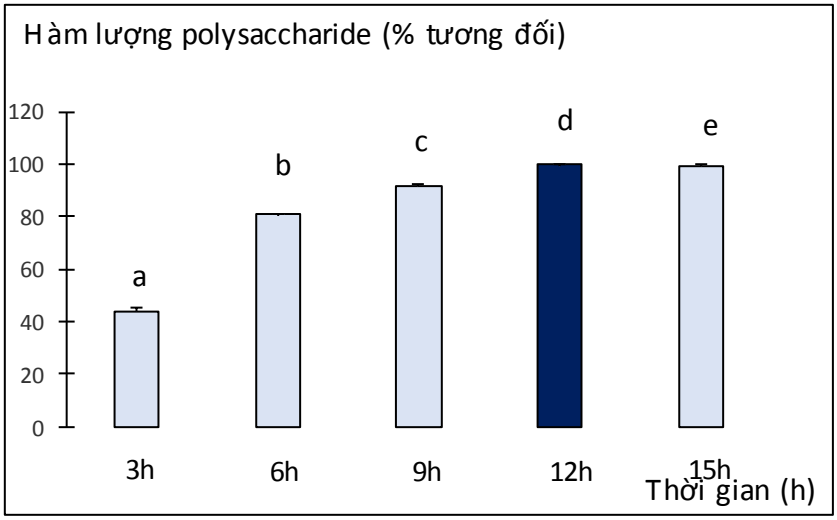
Để tìm ra thời gian chiết polysaccharide từ lá cây Xuân Hoa đạt kết quả cao, chúng tôi đã lựa chọn chiết polysaccharide từ lá cây Xuân Hoa *P. palatiferum* với các thời gian chiết rút sau: 3h, 6h, 9h, 12h, 15h. Chiết polysaccharide bằng ethanol 25% và nhiệt độ 70°C (các điều kiện đã được tối ưu ở trên). Kết quả hình 3 cho thấy với thời gian trích ly càng lâu thì hàm lượng polysaccharide thu được càng tăng lên. Ở thời gian chiết rút 12h, hàm lượng polysaccharide đạt 8,2 (± 1,3)% cao hơn so với khi chiết ở các thời gian 3-9h. Tuy nhiên khi tăng lên 15h chiết rút thì hàm lượng polysaccharide có tăng nhưng không đáng kể so với 12h (Hình 3). Do vậy chúng tôi chọn 12h là thời gian thích hợp để chiết rút polyssacaride.

Tỷ lệ nguyên liệu và dung môi thích hợp chiết rút polysaccharide

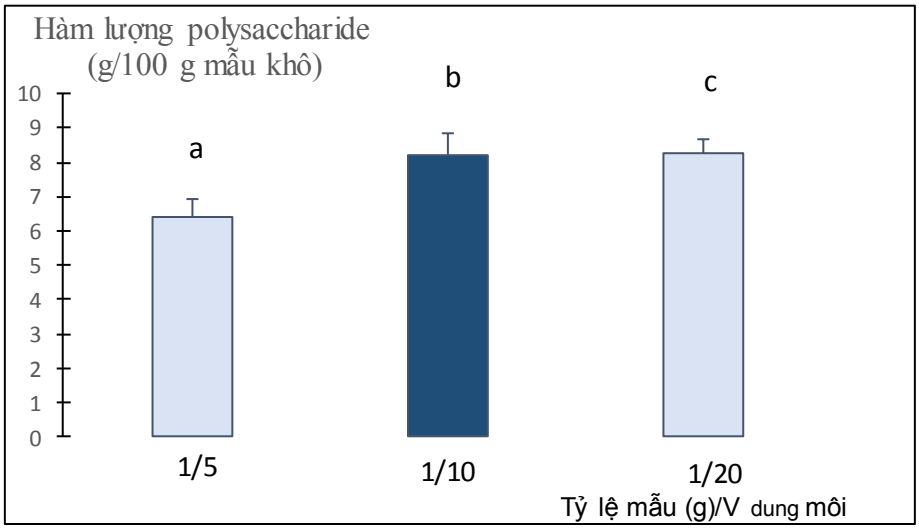
Với lượng dung môi trích ly sử dụng càng nhiều thì hàm lượng polysaccharide thô thu được càng tăng. Lượng dung môi trích ly nhiều sẽ làm cho quá trình trích ly xảy ra nhanh hơn, mật độ và độ nhớt thấp sẽ tạo điều kiện giải phóng các phân tử polysaccharide trong nước, lượng polysaccharide được hòa tan ra trong dịch chiết cao hơn (Chen *et al.*, 2015). Chúng tôi so sánh chiết rút polysaccharide từ lá cây Xuân Hoa *P. palatiferum* theo các tỷ lệ 1/5; 1/10; 1/20 (g/ml). Kết quả hình 4 cho thấy tỷ lệ nguyên liệu và dung môi 1/10 thu được hàm lượng polysaccharide cao hơn so với tỷ lệ chiết 1/5. Tuy nhiên khi xử lý thống kê cho thấy giữa hai mức tỷ lệ 1/10 và 1/20 không có sự khác nhau ở mức ý nghĩa ($p>0,05$). Từ các kết quả nghiên cứu trên, chúng tôi đưa ra điều kiện thích hợp để chiết rút polysaccharide từ lá cây Xuân Hoa như sau: dung môi ethanol 25%, tỷ lệ nguyên liệu trên dung môi là 1/10, nhiệt độ trích ly 70°C, trong 12 giờ. Với các điều kiện chiết rút thích hợp, hàm lượng polysaccharide từ lá cây Xuân Hoa *P. Palatiferum* đạt 8,2 (± 0,65) %.



Hình 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hàm lượng polysaccharide chiết xuất. (ethanol 25%, 60°C trong 6h, tỷ lệ:1g mẫu/20ml dung môi); $p< 0,05$ (sự sai khác có ý nghĩa khi chiết ở nhiệt độ 70°C (c) so sánh với chiết ở các nhiệt độ khác (a, b, e).



Hình 3. Thời gian tối ưu chiết rút polysaccharide. (Ethanol 25%, 70°C trong 6h, tỷ lệ:1g mẫu/20ml dung môi), p< 0,05: sự sai khác có ý nghĩa khi chiết ở thời gian 12h (d) so sánh với chiết ở các nhiệt độ khác (a, b, c).



Hình 4. Tỷ lệ dung môi thích hợp chiết rút polysaccharide. (Ethanol 25%, 70°C trong 12h, tỷ lệ:1g mẫu/20ml dung môi), p< 0,05 (sự sai khác có ý nghĩa khi chiết ở tỷ lệ 1/10 (b) so sánh với chiết ở tỷ lệ dung môi 1/5 (a).

Tinh sạch polysaccharide

Dịch chiết rút theo các điều kiện đã được tối ưu ở trên được tủa ethanol 80% thu chế phẩm polysaccharide. Chúng tôi tiến hành loại protein thu polysaccharide bằng phương pháp Sevag (Staub *et al.*, 1965) và phương pháp TCA (Oliveira *et al.*,1999), đây là hai phương pháp loại protein thường được sử dụng khi tinh sạch polysaccharide, mỗi một phương pháp sẽ thích hợp cho việc loại protein, tinh sạch polysaccharide ở từng loài cây khác nhau.

Kết quả bảng 1 cho thấy khi sử dụng tinh sạch bằng phương pháp TCA 10% sẽ loại được protein hiệu quả nhất, độ tinh sạch của chế phẩm polysaccharide đạt cao nhất (77,8 ±1,19 %) và hiệu suất thu thu hồi cũng đạt được cao nhất (1,79 ± 0,24 %), cao hơn so với các phương pháp còn lại.

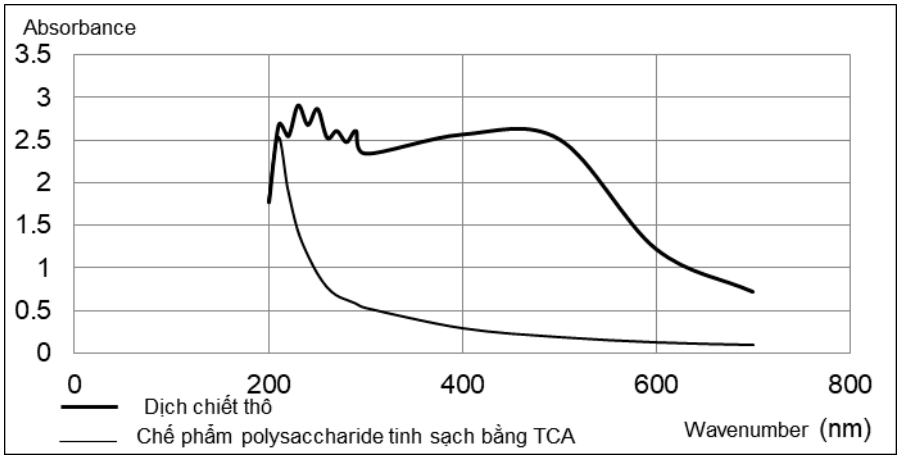
Kiểm tra độ sạch của chế phẩm polysaccharide bằng phổ UV

Để đánh giá độ sạch của chế phẩm polysaccharide chiết từ lá cây Xuân Hoa *P. palatiferum*, trong quá trình chiết rút, chúng tôi đã đo phổ UV của dịch chiết và dung dịch polysaccharide sau tinh sạch từ bước sóng 200-700nm. Kết quả cho thấy chế phẩm polysaccharide tinh sạch đạt độ sạch khá cao khi đường biểu diễn phổ UV của dung dịch chỉ còn một đỉnh ở bước sóng từ 200-220nm và rất thấp ở bước sóng 260 -280 nm. Ngược lại, dịch chiết thô do có nhiều tạp chất nên phổ UV rất cao ở bước sóng từ 200- 600nm (Hình 5). Kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu của các nghiên cứu trước đây như: polysaccharide từ *Pinus koraiensis* (Pan *et al.,* 2013), từ chè xanh (Cai *et al.,* 2013).

Bảng 1. So sánh phương pháp loại protein bằng Sevag và TCA.

Phương pháp tinh sạch		Chế phẩm polysaccharide tinh sạch thu được từ 100 g nguyên liệu khô (g)	Hàm lượng polysaccharide (%)	Hiệu suất (%)
Sevag		1,4 ± 0,09	36,78 ± 0,86	0,52 ± 0,09
TCA	5%	2,1 ± 0,16	11,04 ± 0,98	0,23 ± 0,16
	10%	2,3 ± 0,24	**77,8 ± 1,19 ***	1,79 ± 0,24
	20%	1,35 ± 0,11	34,07 ± 1,16	0,46 ± 0,11

Chú thích: ∗: p< 0,05 (sự sai khác về hàm lượng polysaccharide có ý nghĩa so với các phương pháp tinh sạch còn lại)



Hình 5. Đồ thị biểu diễn phổ UV của polysaccharide chiết từ lá cây Xuân Hoa *P. palatiferum.*

Đánh giá tác dụng tăng cường miễn dịch của chế phẩm polysaccharide trên chuột được tiêm cyclophosphamide

Chuột ở các lô thí nghiệm và đối chứng được cân khi đói ở các mốc thời gian sau thử nghiệm trước và sau 5 ngày sử dụng chế phẩm polysaccharide nhằm đánh giá tác dụng của polysaccharide đến khối lượng của chuột. Kết quả theo dõi được chỉ ra ở bảng 2. Kết quả bảng 2 cho thấy trọng lượng của lô II, III giảm so với lô đối chứng sinh học ($p<0.05$). Trọng lượng chuột của lô III cao hơn lô II nhưng sự khác nhau này không rõ rệt.

Tuyến ức và lá lách là các cơ quan miễn dịch quan trọng và trọng lượng của chúng được công nhận là chỉ số quan trọng cho khả năng đáp ứng miễn dịch của sinh vật (Chen et al., 2012). Trong nghiên cứu này, trọng lượng tuyến ức, trọng lượng lá lách có xu hướng tăng lên ở nhóm điều trị polysaccharide XH 150 mg/kg, nhưng sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê (Bảng 3).

Cyclophosphamide gây giảm bạch cầu và suy giảm hệ miễn dịch (Shalit *et al.,* 2001). Kết quả ở bảng 3 cho thấy số lượng bạch cầu giảm mạnh ở lô II (5859) so với lô I (6765). Ở lô III, số lượng bạch cầu tăng rõ rệt (7720) so với lô II (5859) khi so sánh $p<0.05$. Điều đó chứng tỏ chế phẩm polysaccharide từ lá cây Xuân Hoa *P. palatiferum* đã giúp cho cơ thể chuột phản ứng tạo bạch cầu chống lại chất cyclophosphamide. Các kết quả thu được phần nào cũng phù hợp với kết quả của nghiên cứu trên thế giới về khả năng tăng số lượng bạch cầu, tăng cường miễn dịch của polysaccharide như: polysaccharide từ rượu gạo cổ truyền của Hàn Quốc *Makgeolli* (Chang *et al., 2014)* có tác dụng khi khi điều trị đường uống liều từ 100-200mg/kg trọng lượng chuột, polysaccharide từ *Ganoderma lucidum* (Zhu *et al.,* 2007*)*.

Bảng 2. Sự thay đổi trọng lượng của chuột sau 5 ngày thí nghiệm.

Lô	Trọng lượng ban đầu (p_o)g	Trọng lượng trong 5 ngày thí nghiệm (p_1)g	Tỉ lệ p_1/p_o(%)
I	23,36 ± 1,21	25,63 ± 0,57	109,72
II	23,50 ± 1,20	21,16 ± 0,7 *	90,04
III	23,83 ± 0,98	22,7 ± 0,96 *	95,88

* p<0,05 (sự khác nhau có ý nghĩa giữa nhóm đối chứng không gây suy giảm miễn dịch và nhóm tiêm CY gây suy giảm miễn dịch)

Bảng 3. Trọng lượng tương đối của tuyến ức, lách, hàm lượng hemoglobin (Hb), số lượng hồng cầu (HC), bạch cầu (BC).

Lô	Trọng lượng tương đối (mg/g trọng lượng cơ thể)		Hb (g%)	HC (triệu)	BC
	Tuyến ức	Lách			
I	2,32 ± 0,24	3,72 ± 0,25	15,58 ± 0,50	7,33 ± 0,33	6765 ± 45,57
II	1,23 ± 0,23	3,31 ± 0,13	14,87 ± 0,59	7,13 ± 0,26	5859 ± 85,63
III	1,46 ± 0,15	3,37 ± 0,24	15,38 ± 0,56	7,41 ± 0,35	77207,17*

* p<0,05 (sự khác nhau có ý nghĩa giữa nhóm gây suy giảm miễn dịch không điều trị và nhóm gây suy giảm miễn dịch điều trị polysaccharide XH) I. Nhóm đối chứng không tiêm CY; II Nhóm tiêm CY không điều trị polysaccharide XH; III. Nhóm tiêm CY điều trị polysaccharide XH 150mg/kg trọng lượng chuột.

KẾT LUẬN

Polysaccharide từ lá cây Xuân Hoa *P. palatiferum* đã được tách chiết, tinh sạch sơ bộ và đánh giá tác dụng tăng cường miễn dịch của chế phẩm trên chuột được tiêm cyclophosphamide. Điều kiện tối ưu chiết rút polysaccharide như sau: dung môi ethanol 25%, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi (1g/10ml), nhiệt độ chiết rút 70°C, thời gian chiết rút 12 giờ. Với các điều kiện chiết rút thích hợp, hàm lượng polysaccharide từ lá cây Xuân Hoa *P. palatiferum* đạt 8,2 % (±0,65). Phương pháp tinh sạch polysaccharide từ lá cây Xuân Hoa bằng TCA 10% là hiệu quả nhất, sản phẩm có độ sạch là 77,8 % (±1,19), hiệu suất thu hồi chế phẩm polysaccharide tinh sạch đạt 1,79% (±0,24). Chế phẩm polysaccharide qua đường uống ở lượng 150mg/kg thể trọng chuột trong 5 ngày đã làm tăng có ý nghĩa ($p<0,05$) số lượng bạch cầu so với nhóm chuột bị suy giảm miễn dịch bằng cyclophosphamide không được điều trị.

Lời cảm ơn: *Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ IFS (International Foundation for Science, Stockholm, Sweden, through a grant N0 F/5371-1) và Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 106-NN.02-2015.54.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Aoxue L, Yijun F (2011) In vitro Antioxidant of a Water-Soluble polysaccharide from Dendrobium fimhriatum Hook.var.oculatum Hook. *Int J Mol Sci* 12(6): 4068-4079.

Buncharoen W, Saenphet S, Saenphet K (2010) Acetylcholinesterase inhibitory effect of *Pseuderanthemum palatiferum* in Albino Rats. *Trends Res Sci Technol* 2(1) : 13-18.

Cai W, Xie L, Chen Y, Zhang H (2013) Purification, characterization and anticoagulant activity of the polysaccharides from green tea. *Carbohydr Polym* 92: 1086-1090.

Chan Y, Chang T, Chan CH, Yeh YC, Chen CW, Shieh B (2007) Immunomodulatory effects of Agaricus blazei Murill in Balb/cByJ mice. *J Microbiol Immunol Infect* 40: 201-208.

Chang WC, Chun JH, Young KR, Young CL, Kwang SS, Hee DH (2014) Immunostimulatory effects of polysaccharides Isolated from *Makgeolli* (Traditional Korean Rice Wine). *Molecules* 19: 5266-5277.

Chen C, You LJ, Abbasi AM, Fu X, Liu RH (2015) Optimization for ultrasound extraction of polysaccharides from mulberry fruits with antioxidant and hyperglycemic activity in vitro. *Carbohydr Polym*:130-122.

Chen Y, Tang J, Wang X, Sun F, Liang S (2012) An immunostimulatory polysaccharide (SCP-IIa) from the fruit of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. *Int J Biol Macromol* 50: 844-848.

Dourado F, Madureira P, Carvalho V, Coelho R, Coimbra MA, Vilanova M (2004) Purification, structure and immunobiological activity of an arabinan-rich pectic polysaccharide from the cell walls of *Prunus dulcis* seeds. *Carbohydr Res* 339: 2555–2566.

Dubois M, Gilles AK, Hamilton KJ, Rebers AP, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28: 350-356.

Lê xuân Thám, Trần hữu Độ (1999) Bổ sung vào nhóm nấm chống ung thư Việt Nam: Nấm Chân chim. *Tạp chí Dược học* 8: 10-12.

Lianfu Z, Zelong, L (2008) Optimization and comparison of ultrasound/ microwave assisted extraction (UMAE) and ultrasonic assisted extraction (UAE) of lycopene from tomatoes. *Ultrason Sonochem* 15(5): 731-737.

Lim BO, Lee SH, Park DK, Choue RW (2003) Effect of dietary pectin on the production of immunoglobulins and cytokines by mesenteric lymph node lymphocytes in mouse colitis induced with dextran sulfate sodium. *Biosci Biotechnol Biochem* 67: 1706-1712.

Mai HD, Minh HN, Pham VC, Bui KN, Nguyen VH, Chau VM (2011) Lignans and other constituents from the roots of Vietnamese medicinal plant *Pseuderanthemum palatiferum*". *Planta Med* 77(9): 951-954.

Nguyễn Gia Chấn, Lê Minh Phương, Bùi Thị Bằng, Phan Thị Phi Phi, Phạm Thu Anh, Đỗ Hòa Bình (1998) Tác dụng phục hồi miễn dịch của polisaccarit chiết xuất từ rễ củ cây đương quy. *Tạp chí Dược liệu* 3(2): 49-52.

Nguyễn Thị Minh Thu, Trần Công Khánh, Trần Vân Hiền, Tạ Thị Phòng, Trần Lê Du (1999) Thử độc tính cấp diễn và tác dụng bảo vệ tế bào gan của cây Xuân Hoa. *Tạp chí Dược học* 9: 15-17.

Nguyễn Trọng Thông, Phạm Thị Vân Anh, Nguyễn Thị Vinh Hà, Vũ Thị Ngọc Thanh (2004) Nghiên cứu ảnh hưởng của Cao Trái Nhàu (*Morinda Citrifolia L. Rubiaceae*) trên động vật thực nghiệm bị gây suy giảm miễn dịch bằng Cyclophosphamid. *Tạp chí Nghiên cứu y học* 2(1): 28-33.

Nguyễn Văn Hùng, Lê Anh Tuấn, Nguyễn Quyết Chiến (2004) Nghiên cứu thành phần hóa học cây Xuân Hoa (Pseuderanthemum palatiferum Nees Radlk). *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* 42: 75-79.

Oliveira R, Marques F, Azeredo J (1999) Purification of polysaccharides from a biofilm matrix by selective precipitation of proteins. *Biotechnol Tech13*: 391-393.

Padee P, Nualkaew S, Talubmook C, Sakuljaitrong S (2010) Hypoglycemic effect of a leaf extract of *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 132: 491–496.

Pan Z, Xin Y, Wei WH, Hai TZ, Jing W, Ren BX, Xing LH, Si YS, Di Q (2013) Characterization and Bioactivity of Polysaccharides Obtained from Pine Cones of *Pinus koraiensis* by Graded Ethanol Precipitation. *Molecules* 18: 9933-9948.

Phạn Minh Giang, Hà Việt Bảo, Phan Tống Sơn (2005) Nghiên cứu hoạt tính chống oxy hoá và khảo sát sơ bộ tác dụng kháng khuẩn, kháng nấm của các phần chiết giàu flavonoid từ lá Xuân Hoa (*Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk.). *Tạp chí Dược học* 45 (9): 9-12.

Santander SP, Aoki M, Hernandez JF, Pombo M, Moins TH, Mooney N, Fiorentino S (2011) Galactomannan from *Caesalpinia spinosa* induces phenotypic and functional maturation of human dendritic cells. *Int Immunopharmacol* 11: 652–660.

Shalit I, Kletter Y, Halperin D, Waldman D, Vasserman E, Nagler, A, Fabian I (2001) Immunomodulatory effects of moxifloxacin in comparison to ciprofloxacin and G-CSF in a murine model of cyclophosphamide-induced leukopenia. *Eur J Haematol* 66: 287-296.

Staub AM (1965) Removal of protein-Sevag method. *Methods in Carbohydrate Chemistry* 5: 1-5.

Trần Công Khánh (1997) Sự thật về cây thuốc "kỳ diệu", cây Xuân Hoa. *Tạp chí Thuốc và Sức khỏe* 101: 10-11.

Vetvicka V, Vashishta A, Saraswat OS, Vetvickova J (2008) Immunological effects of yeast- and mushroom derived beta-glucans. *J Med Food* 11: 615-622.

Zhang ZF, Lv GY, He WQ, Shi LG, Pan HG, Fan LF (2013) Effects of extraction methods on the antioxidant activities of polysaccharides obtained from *Flammulina velutipes*. *Carbohydr Polym* 98: 1524-1531.

Zhang ZF, Lv GY, Jiang X, Cheng JH, Fan LF (2015). Extraction optimization and biological properties of a polysaccharide isolated from *Gleoestereum incarnatum. Carbohydr Polym* 117: 185-191.

Zhu XL, Chen AF, Lin ZB (2007) Ganoderma lucidum polysaccharides enhance the function of immunological effector cells in immunosuppressed mice. *J Ethnopharmacol* 111(2): 219-226

OPTIMIZED EXTRACTION AND IMMUNOSTIMULATORY EFFECTS OF POLYSACCHARIDES FROM *PSEUDERANTHEMUM PALATIFERUM* (NEES) RADLK

Vo Hoai Bac[1,2], Tran Thi Van Anh[1,2], Nguyen Thi Mai Phuong[1,2], Nguyen Thi Thanh Huong[3,2], Le Van Truong[1,2]

[1]*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*
[2]*Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology*
[3]*Institute of Ecology and Biological Resource, Vietnam Academy of Science and Technology*

SUMMARY

Pseuderanthemum palatiferum (Ness) Radlk is a tree native of Vietnam with various use in traditional medicine. It has been used for the treatment of many diseases including wound, colitis, stomach-aches, trauma, high blood pressure, nephritis, diarrhoea. However, the research on effective constituents from *P. palatiferum* has mainly been focused on small-molecular compounds. Some compounds: flavonoids, phytol, palmitic acid, ß-sitosterol, triterpenoid saponin, stigmasterol and salicylic acid have been detected in leaves. Polysaccharides have attracted great attentions for its benefits to human health. Polysaccharides from natural sources have diverse anti-inflammatory, anticoagulant and wound healing activities. In this study, we extracted and determined the polysaccharide content from the leaves of *P. palatiferum* plant. The polysaccharide content in *P. palatiferum* leaves was 8.2% (± 0.65) in dry weight. The appropriate polysaccharide extraction conditions were determined as: 25% ethanol, material/solvent ratio (1g/10ml), extracted temperature of 70°C, extraction time 12 hours. The polysaccharide composition was purified by TCA 10%, with a purity of 77.8% (± 1.19). The immunostimulatory activities of polysaccharide XH were also examined in cyclophosphamide (CY)-induced immunosuppressed mice. Mice treated with polysaccharide XH exhibited increased white blood cell counts ($p < 0.05$) compared with immunosuppressed mice. These results indicate that polysaccharide XH from *P. palatiferum* can enhance immune function in CY-induced immunosuppressed mice.

Keywords: *Extraction, immunostimulatory activity, Pseuderanthemum palatiferum, polysaccharide, Xuan Hoa plant*