

PHÂN LẬP CÁC POLISACCARIT TỪ NẤM HẦU THỦ LÊN MEN DỊCH THỂ VÀ ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH KHÁNG U CỦA CHÚNG

Trần Thị Hồng Hà*, Lê Hữu Cường, Trần Thị Như Hằng, Lưu Văn Chính,
Lê Mai Hương

Viện Hoá học các Hợp chất thiên nhiên,
Viện KHCNVN, 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

*Email: tranhongha1974@gmail.com

Đến Tòa soạn: 20/5/2012; Chấp nhận đăng: 17/11/2012

TÓM TẮT

Quả thể nấm hầu thủ chứa các polisaccarit đã được tách chiết và xác định hàm lượng. Phân đoạn chiết bằng NaOH 4 % cho tổng lượng polisaccarit chiếm 80 % và bao gồm cả dạng tan và không tan trong nước. Một lượng ít polisaccarit được tổng hợp trong dịch nuôi cấy nấm. Polisaccarit tan trong phân đoạn chiết NaOH 4 % có hoạt tính ức chế hình thành khối u tế bào ung thư gan (Hep-G2) thể hiện bằng việc giảm kích thước khối u xuống 24,4 % và mật độ hình thành khối u 61,5 % so với đối chứng âm.

Từ khóa: polisaccarit, nấm Hầu thủ, hoạt tính kháng u.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nấm hầu thủ (*Hericium erinaceus*) là một loại nấm quý đã được đưa vào sách Đỏ cần được bảo vệ và bảo tồn. Nấm hầu thủ còn có tên là: đầu khỉ, đầu sư tử, đầu gấu, đầu ông già, râu thần rừng, Hầu đầu cô, Thích khuẩn, Vị khuẩn, Yamabushitake hay Lion's Mane ... Thuộc loài *Hericium erinaceus*, chi *Hericium*, họ phụ *Hericioideae*, lớp *Hymenomycetes*, ngành phụ *Basidiomycotina*, ngành *Eumycota*, giới *Mycota* (fungi) [1].

Nấm Hầu thủ (*Hericium erinaceus*) có tác dụng về dược lí như là giúp nâng cao khả năng miễn dịch của cơ thể, phục hồi niêm mạc dạ dày, chữa thủng loét ruột, nâng cao khả năng đề kháng với tình trạng thiếu oxy, chống mệt mỏi, chống oxy hoá, chống đột biến, làm giảm mỡ máu, xúc tiến việc tuần hoàn máu, chống lão hoá và ức chế sinh trưởng của tế bào ung thư (Lam Tiến, 2001; Lâm Thụ Tiên, 2001). Các phân đoạn polisaccarits khác từ nấm *Hericium erinaceus* như xylan, glucoylan, heteroxyglucan và các phức hợp protein của chúng có các đặc tính như là các yếu tố cải biến đáp ứng sinh học (BRM), đó chính có thể là lợi ích của chúng trong liệu pháp miễn dịch. Trong một số nghiên cứu của tác giả Mizuno (1992, 1998) đã tìm ra 5 loại polisaccarits (F1o-a-a, F1o-a-β, F1o-b, F1lo-1 và F1II-2b) có hoạt tính kháng ung thư được phân

lập từ hệ sợi nấm *Hericium erinaceus* sau khi lên men chìm. Ngoài ra còn có tác dụng kéo dài thời gian sống [3, 4].

Các nghiên cứu về độc tính cho thấy từ trước đến nay cho thấy quả thể và hệ sợi nấm *Hericium erinaceus* không hề có độc tính đối với con người [6].

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên vật liệu

Nấm Hàu thủ: Được nuôi cấy tại Phòng Sinh học thực nghiệm, Viện Hóa học các Hợp chất thiên nhiên.

Các dòng tế bào

Được cung cấp từ phòng Sinh học Thực nghiệm - Viện Hoá học các Hợp chất thiên nhiên, gồm:

Dòng RD: *Rhabdosarcoma* – ung thư cơ vân.

Dòng Hep- G2: *Hepatocellular carcinoma* – ung thư gan.

Dòng Lu: *Lung cancer* – ung thư phổi.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Tách chiết polisaccarit từ nấm Hàu thủ được nuôi cấy tĩnh trong môi trường dịch thể

Nấm hàu thủ được nuôi cấy tĩnh trong môi trường có thành phần như sau: Glucose 20 g, pepton 5 g, cao nấm men 3 g, KH_2PO_4 0,5 g, KCl 1g, CaCO_3 2 g, 1 lít H_2O . Sau thời gian 1 - 1,5 tháng khi nấm bắt đầu mọc quả thể. Chúng tôi tách ra làm hai phần để nghiên cứu:

- Phần dịch thể: Dịch nuôi cấy được lọc qua giấy lọc lấy phần dịch trong.
- Phần quả thể: Quả thể được rửa sạch, sấy khô, nghiền thành bột mịn.

Dịch nuôi cấy nấm

Lấy 1 lít dịch nuôi cấy được quay cất tại 70 °C, giảm thể tích xuống còn 100 ml. Bổ sung 400 ml cồn 96° vào 100 ml dịch, để tủa qua đêm tại 4 °C. Li tâm 5000 vòng/phút và thu cặn polisaccarit (P1).

Quả thể nấm

100 g bột quả thể nấm khô (độ ẩm khoảng 5 %) được ngâm chiết với 750 ml nước nóng tại 100 °C trong 2 tiếng. Lọc lấy phần dịch tan và bã nấm tiếp tục bổ sung 750 ml nước cất chiết lần 2 trong 2 giờ. Tách riêng phần bã nấm và phần dịch tan (phần dịch của cả 2 lần chiết được gộp lại).

a) *Phần dịch tan:* Làm giảm thể tích phần dịch chiết bằng quay cô đến 100 ml, li tâm thu dịch nổi. Bổ sung 400 ml cồn 96 °C vào dịch và ủ qua đêm tại 4 °C. Li tâm 5000 vòng/phút thu cặn polisaccarit (P2).

b) *Phần bã:* Phần bã quả thể thu được sau khi chiết nước nóng ở trên được làm khô. Bổ sung 500 ml NaOH 4 % vào phần bã quả thể, ủ 55 °C trong 2 giờ. Lọc tách phần dịch và bã nấm

tiếp tục bổ sung 500 ml NaOH 4 % ở 55 °C trong 2 giờ, tách riêng phần bã nấm. Phần dịch của 2 lần chiết kiềm được gộp lại, tổng thể tích khoảng 600 ml. Li tâm 5000 vòng/phút loại bỏ cặn, trung hòa bằng axit axetic và để lắng qua đêm. Lọc thu riêng phần dịch và kết tủa.

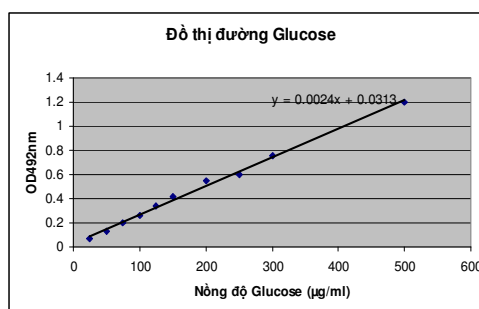
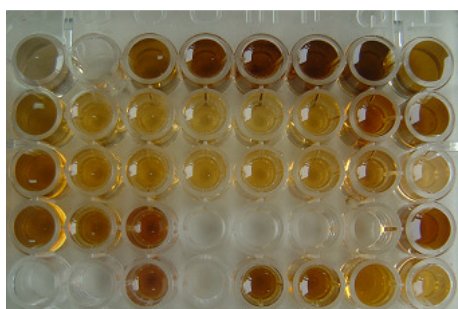
- Phần dịch lọc được li tâm 5000 vòng/phút, loại bỏ cặn. Bổ sung 4 lần thể tích cồn 96 °C, để lắng qua đêm. Thu phần kết tủa, làm khô tại 50 °C đến trọng lượng không đổi (**P3**).

- Phần kết tủa được làm khô 50 °C đến trọng lượng không đổi (**P4**). Hoà trong nước cất, để qua đêm. Li tâm thu kết tủa. Bổ sung HCl 1N khuấy đều sao cho mẫu ở dạng sệt. Đun nóng mẫu ở 100 °C. Thu các mẫu sau các khoảng thời gian 5, 15, 30, 60, 90 phút, trung hòa bằng NaOH 1N, li tâm thu dịch nổi. Bổ sung cồn 96 °C vào dịch nổi với tỉ lệ 3 : 1 và để ở 4 °C qua đêm. Li tâm 5.000 vòng/phút trong 5 phút, thu cặn polisaccarit, làm khô và hòa tan trong nước cất.

2.2.2. Xác định hàm lượng polisaccarit

Theo phương pháp của **Michel. DuBois, K. A. Gilles** và *cs*, 1956 [9].

100 µl dịch mẫu (chứa tối đa 50 µg polisaccarit) được trộn đều với 100 µl phenol 5 %. Bổ sung 500 µl dung dịch H₂SO₄ đậm đặc vào mẫu và ủ hỗn hợp ở 100 °C trong 5 phút. Lắc đều ống, để hiện màu trong 30 phút, tiến hành so màu tại bước sóng 492 nm. Làm mẫu đối chứng dùng 100 µl nước cất thay mẫu. Từ hiệu số giá trị OD ($\lambda = 492$ nm) giữa dịch mẫu và đối chứng sẽ tính được hàm lượng polisaccarit có trong mẫu bằng cách so sánh với giá trị OD ($\lambda = 492$ nm) của glucose như chất chuẩn.



Ảnh minh họa so màu $\lambda = 492$ nm đo hàm lượng polisaccarit

2.2.3. Phương pháp thử hoạt tính gây độc tế bào

Nuôi tế bào ung thư *in vitro* theo Skehan và *cs* [10]. Xác định hoạt tính gây độc các dòng tế bào ung thư theo phương pháp SRB của Likhawitayawuid và *cs* [5] đang được tiến hành tại Viện Nghiên cứu Ung thư Quốc gia của Mỹ (NCI). Phương pháp này đã được phòng Sinh học Thực nghiệm thuộc Viện Hoá học các Hợp chất thiên nhiên áp dụng từ năm 1996.

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

Theo tác giả Jong Bin Kim(2005) [3] và Huiyuan Gao & CS, 2007 [2], hiện đang được triển khai thực hiện tại phòng Sinh học thực nghiệm, Viện Hóa học các Hợp chất thiên nhiên.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Hàm lượng polisaccarit từ nấm *Hầu thủ* lên men dịch thể

Từ 4 lít dịch lên men nấm *Hầu thủ* chúng tôi đã tách ra làm 2 phần: Phần dịch nuôi cấy (**P1**) và phần quả thể, phần quả thể sấy khô chúng tôi thu được 100 g mẫu và được tách chiết như đã trình bày ở mục 2.2.1 phần phương pháp. Hàm lượng polisaccarit trong các phân đoạn chiết từ phần lên men dịch thể nấm *Hầu thủ* được thể hiện trong bảng 1.

Bảng 1. Hàm lượng polisaccarit từ nấm *Hầu thủ* lên men dịch thể
(trong 1 lít nấm *Hầu thủ* lên men dịch thể)

Phân đoạn		Chất rắn chứa polisaccarit tổng (g/l)	% polisaccarit trong mẫu	Hàm lượng polisaccarit (g/l)
Dịch nuôi cấy (P1)		3,6	5,28	0,19
Phần quả thể	Dịch chiết nước nóng (P2)	0,55	35,8	0,2
	Dịch chiết 3 (P3)	0,68	56,8	0,39
	Tủa (P4)	1,36	33,7	0,46

Theo kết quả trên bảng 1, tất cả các phân đoạn tách chiết đều có chứa polisaccarit. Trong dịch nuôi cấy, lượng polisaccarit thô là 3,6 g/L với hàm lượng polisaccarit chiếm 5,28 %. Ở nấm lớn, nấm sợi, nấm men, polisaccarits được biết là tập trung chủ yếu ở vách tế bào và nội bào. Tuy nhiên, cũng có một lượng nhỏ polisaccarits do nấm tổng hợp được phát hiện ở dịch nuôi cấy nấm *Hầu thủ* [4].

Ở các phân đoạn khác, hàm lượng polisaccarit tăng từ 33,7 đến 56,8 % tổng lượng chất khô thu được trong mỗi phân đoạn. Ở nấm *Hầu thủ*, các polisaccarit dịch chiết nước nóng quả thể cũng được một số tác giả nghiên cứu. Các kết quả chỉ ra rằng, liên kết mạch chính là glucoside 1 - 6 galactose và 1 - 6 glucose [11]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, lượng polisaccarit thu được nhiều nhất trong phân đoạn chiết bằng NaOH 4 %. Trong đó, polisaccarit ở dạng không tan (water insoluble glucan) chiếm lượng lớn trong dịch chiết kiềm (**P4** = 1,36 g), nhưng hàm lượng polisaccarit chỉ chiếm có 33,7 % trong đó. Hàm lượng polisaccarit ở dịch chiết 3 khá cao (**P3** chiếm 56,8 %).

3.2. Thủy phân polisaccarit kết tủa bằng axit HCl

Phân đoạn chứa polisaccarit ở dạng không tan chiếm một lượng khá lớn, nhưng vì nó ở dạng không tan nên khi vào cơ thể nó rất dễ bị đào thải ra ngoài qua đường tiêu hóa. Vì vậy muốn sử dụng cho con người thì phải chuyển nó về dạng tan bằng cách thủy phân bằng enzyme hoặc axit. Ở đây chúng tôi đã thủy phân bằng axit HCl theo các thời gian khác nhau, hàm lượng polisaccarit hòa tan thu được từ 200 mg kết tủa khô (**P4**), được trình bày tại bảng 2.

Từ kết quả bảng 2 cho thấy, hàm lượng polisaccarit thu được ở dạng tan sau 30 phút là cao nhất 3,2 %. Thời gian thủy phân lâu hơn, các đường đơn và oligosaccharide sẽ tạo thành, giảm hiệu suất thu hồi polisaccarit. Cặn polisaccarit có thể được thủy phân tiếp, nhằm thu nhận thêm polisaccarit tan.

Bảng 2. Hàm lượng polisaccarit tan thu được sau khi thủy phân
(Hàm lượng polisaccarit tan thu được sau khi thủy phân 200 mg kết tủa)

Thời gian thủy phân (phút)	5	15	30	60	90
Hàm lượng polisaccarit tổng (mg)	72	72	72	72	72
Polisaccarit tan (mg)	1,5	1,8	2,3	2	1,9
Hiệu suất (%)	2,1	2,5	3,2	2,8	2,6

3.3. Hoạt tính gây độc tế bào

Bảng 3. Hoạt tính gây độc tế bào của các phân đoạn polisaccarit

STT	Kí hiệu mẫu	Dòng tế bào Phần trăm sống sót (%)		
		Hep-G2	Lu	RD
1	DMSO	100 ± 0,0	100 ± 0,0	100 ± 0,0
2	Chứng (+)	0,5 ± 0,02	1,2 ± 0,04	0,3 ± 0,0
3	P1	80,6 ± 0,3	84,2 ± 0,5	75,2 ± 1,2
4	P2	89,0 ± 0,7	93,3 ± 1,1	90,9 ± 0,2
5	P3	84,1 ± 0,5	82,5 ± 0,0	80,5 ± 0,09
6	P4	98,3 ± 0,07	96,8 ± 0,9	100,0 ± 0,1

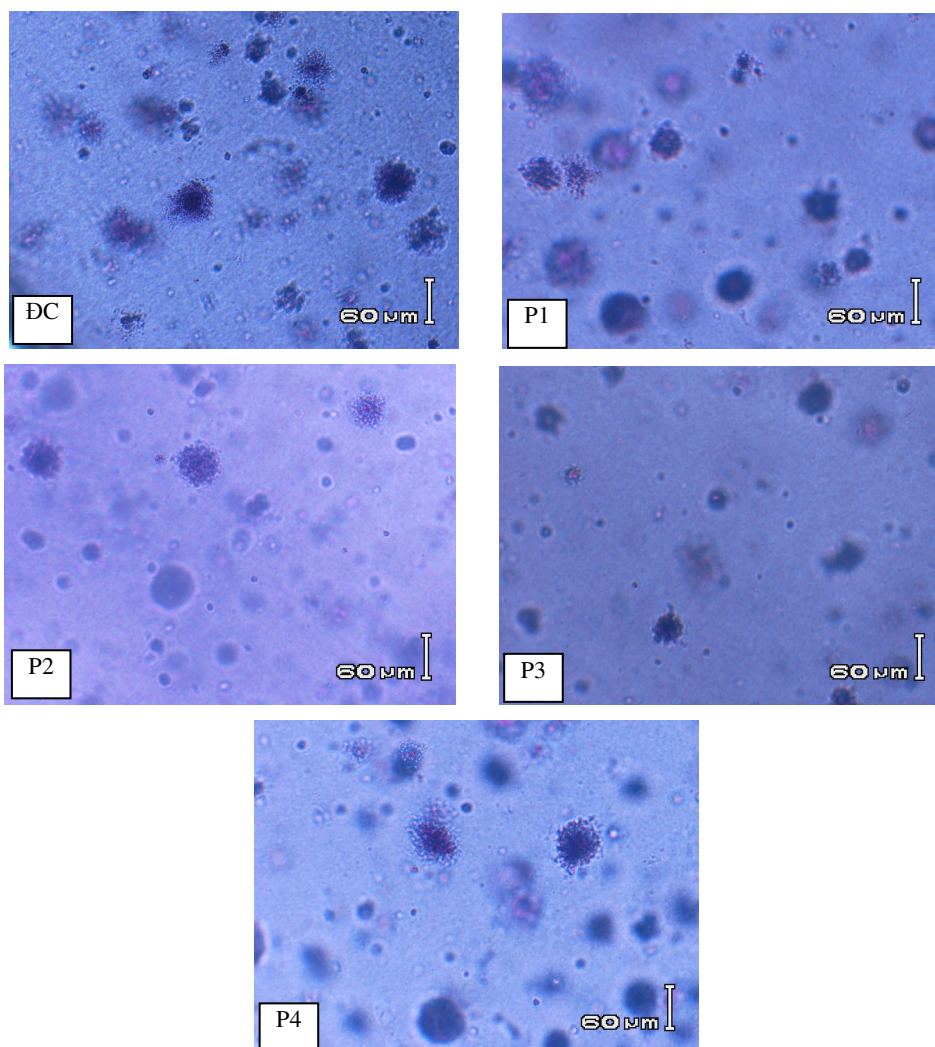
Các phân đoạn polisaccarit không biểu hiện hoạt tính gây độc tế bào khi nuôi cấy *in vitro*. Theo một số công bố trước đây thì các polisaccarit phân lập từ nấm hầu thủ không có hoạt tính với tế bào ung thư nuôi cấy *in vitro*, chủ yếu là giúp tăng cường miễn dịch và ức chế khối u trên động vật thực nghiệm.

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

Chúng tôi đã thử khả năng ức chế tạo u của tế bào ung thư gan Hep-G2 trên thạch mềm của các phân đoạn polisaccarit. Kết quả thu được ở bảng 4.

Bảng 4. Kết quả thử nghiệm hoạt tính ức chế tạo u trên thạch mềm của các phân đoạn polisaccarit

Kí hiệu mẫu	Kích thước trung bình của khối u		Mật độ hình thành khối u giảm so với đối chứng (%)
	Đường kính (µm)	% giảm so với đối chứng	
Đối chứng	25,5	0	100
P1	23,5	7,8±0,51	14,8±1,2
P2	20,2	20,8±0,72	44,6±0,5
P3	19,2	24,7±0,64	61,5±0,9
P4	23,7	7,1±0,92	24,9±0,8



Hình ảnh sự hình thành khối u 3 chiều trên thạch mềm cho thấy hiệu quả ức chế rõ rệt sự hình thành khối u của phân đoạn polisaccarit **P3**. Mật độ hình thành khối u trên thạch mềm là 38,5 % và kích thước trung bình của khối u giảm 24,7 % so với đối chứng

4. KẾT LUẬN

Tất cả các phân đoạn tách chiết từ nấm *Hầu thủ* lên men dịch thể đều có chứa polisaccarit. Trong dịch nuôi cấy, lượng polisaccarit thô là 3,6 g/L với hàm lượng polisaccarit chiếm 5,28 %. Ở các phân đoạn khác, hàm lượng polisaccarit tăng từ 22,8 đến 53,8 % tổng lượng chất khô. Lượng lớn polisaccarit thu được trong phân đoạn chiết NaOH 1% (> 70 % tổng). Trong đó, polisaccarit ở dạng không tan (water insoluble glucan) chiếm lượng lớn trong dịch chiết kiềm (**P4** chiếm 65,4 %), khối lượng (5,46 g) với hàm lượng polisaccarit 33,7 %. Hàm lượng polisaccarit ở dịch chiết 3 khá cao (P3 chiếm 56,8 %).

Đã tiến hành thủy phân bằng axit HCl Polisaccarit không tan (**P4**) ở các thời gian khác nhau cho thấy hàm lượng polisaccarit thu được ở dạng tan sau 30 phút là cao nhất là 3,2 %. Thời

gian thủy phân lâu hơn, các đường đơn và oligosaccharide sẽ tạo thành, giảm hiệu suất thu hồi polisaccarit.

Các phân đoạn polisaccarit đều không biểu hiện hoạt tính gây độc tế bào trên dòng tế bào ung thư nuôi cấy *in vitro*. Nhưng hiệu quả ức chế sự hình thành khối u rõ rệt của phân đoạn polisaccarit **P3**, mật độ hình thành khối u trên thạch mềm là 38,5 % và kích thước trung bình của khối u giảm 24,7 % so với đối chứng.

Lời cảm ơn. Công trình được hỗ trợ kinh phí trích từ các đề tài:

“Khảo sát hoạt tính kháng u thực nghiệm của các polisaccarit đặc biệt từ nấm ăn và nấm dược liệu và nghiên cứu sản phẩm chuyển hóa sinh học các polisaccarit này thành các sản phẩm có giá trị sử dụng cao hơn” quỹ NCCB Nafosted.

“Nghiên cứu quá trình chuyển hóa các polymer tự nhiên bởi enzyme từ nấm Việt Nam” NĐT giữa Việt Nam - CHLB Đức giai đoạn 2.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lê Xuân Thám, Lê Viết Ngọc, Hoàng Thị Mỹ Linh, Kume T. - Nghiên cứu nuôi trồng Nấm Hầu Thủ (Yamabushitake) *Hericium erinaceum* (Bull:Fr) Fers, Tạp chí Dược học (7) (1998) 14-16.
2. Huiyuan Gao, Bailing Hou, Masonori Kuroyanagi, Lijun Wu - Asian J. of Trad. Medi., **2** (3) (2007) 104-109.
3. Jong Bin Kim - Seminar in Cancer Biology **15** (2005) 365-377.
4. Jong Seok Lee, Jae Youl Cho, Eock Kee Hong - Study on macrophage activation and structural characteristics of purified polysaccharides from the liquid culture broth of *Hericium erinaceus*, Carbohydrate Polymers **78** (2009) 162-168.
5. Likhitayawuid K., Angerhofer C. K., Cordell G. A., Pezzuto J. M., Ruangrunsi N. - Cytotoxic and antimalarial bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Sephania erecta*, Journal of natural products **56** (1) (1993) 30-38.
6. Kim B. K., H. S. Chung., K. S. Chung., and M. S. Yang - Antineoplastic component of korean basidiomycetes, Kor. J. Mycol **8** (1980) 107-114.
7. Mizuno - Development and utilization of bioactive substance from medicinal and edible mushroom, Fungi (2); Yamabushitake, *hericium erinaceum*, The Chemical Times **1** (1992) 8-13.
8. Muzino - Bioactive substances in Yamabustutake, the *Hericium erinaceum* Fungus and its Medicinal Utilization, Food ingredients J. Jpn. **175** (1998) 105-114.
9. Michel DuBois K. A., Gilles J. K., Hamilton., P. A. Rebers., Fred Smith - Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances, Anal. Chem. **28** (3) (1956) 350-356.
10. Skehan P., Storeng R., Scudiero D., Monks A., McMahon J., Vistica D., Warren J.T., Bokesch H., Kenney S., Boyd M.R. - New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer agents, Eur. J. Cancer **27** (1991) 1162-1168.
11. Zhaojing Wang., Dianhui Luo., Zhongyan Liang - Structure of polysaccharide from the fruiting body of *Hericium erinaceus* Pers, Carbohydrate Polymers **57** (3) (2004) 241-247.

ABSTRACT

ISOLATION OF POLYSACCHARIDES FROM *HERICIUM ERINACEUS* AND THEIR ANTI-TUMOR ACTIVITY

Tran Thi Hong Ha^{*}, Le Huu Cuong, Tran Thi Nhu Hang, Luu Van Chinh,
Le Mai Huong

Institute of Natural Products Chemistry, VAST, 18 Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Hanoi

^{*}Email: tranhongha1974@gmail.com

Polysaccharides from fruiting body of *Heridium erinaceus* were isolated using hot water and alkaline solution and their contents were determined. Polysaccharides extracted with 4 % NaOH were accounted for over 80 % of total polysaccharides and contained both water soluble and insoluble forms. A small amount of polysaccharides was also detected in the cultured medium. The water soluble, NaOH- extracted polysaccharides showed inhibitory activity against tumor forming of Hepatocellular carcinoma cells (Hep-G2) by decline in dimensions of tumors and tumor forming density 24.4 % , 61.5 % respectively, in comparison to no-treated cells (control).

Keywords: polysaccharides, *Heridium erinaceum*, anti-tumor.