

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM
KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VN**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Đàm Ngọc Mỹ

**NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG ỨC CHẾ ACETYLCHOLINESTERASE
VÀ KÉO DÀI CÁC SỢI TRỤC NEURON CỦA DỊCH CHIẾT CÂY
RAU MÁ (*CENTELLA ASIATICA*)**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ
SINH HỌC THỰC NGHIỆM**

Hà Nội - Năm 2022

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM
KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VN**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Đàm Ngọc Mỹ

**NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG ỨC CHẾ ACETYLCHOLINESTERASE
VÀ KÉO DÀI CÁC SỢI TRỤC NEURON CỦA DỊCH CHIẾT CÂY
RAU MÁ (*CENTELLA ASIATICA*)**

Chuyên ngành : Sinh học thực nghiệm
Mã số: 8420114

**LUẬN VĂN THẠC SĨ NGÀNH
SINH HỌC**

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:
TS. Nguyễn Văn Trữ

Hà Nội - 2022

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự nghiên cứu và tìm hiểu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn toàn chịu trách nhiệm.

Học viên

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lời cảm ơn sâu sắc đến TS. Nguyễn Văn Trữ-người thầy đã luôn khích lệ, động viên, tận tình chỉ dạy cho tôi về chuyên môn và tạo mọi điều kiện thuận lợi nhất cho tôi trong suốt thời gian thực hiện luận văn.

Tôi xin cảm ơn lãnh đạo và các đồng nghiệp Trung tâm Vật lý chất mềm-Vật lý Sinh học và Viện Công nghệ Sinh học đã truyền kinh nghiệm, tạo điều kiện giúp đỡ và đưa ra những góp ý, lời khuyên bổ ích và quý báu trong suốt thời gian tôi làm việc tại trung tâm.

Tôi xin trân trọng cảm ơn tất cả các thầy cô, cán bộ của Học viện Khoa học và Công nghệ đã giảng dạy, cung cấp cho tôi các kiến thức mới và giúp tôi hoàn thành chương trình đào tạo.

Cuối cùng, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn tới toàn thể gia đình, người thân và bạn bè đã động viên, quan tâm, khích lệ tôi trong quá trình học tập và nghiên cứu.

Luận văn được giúp đỡ về mặt kinh phí và thực hiện trong khuôn khổ nhiệm vụ Khoa học Công nghệ Chủ tịch Viện giao cấp Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam: “*Nghiên cứu hoạt tính cải thiện trí nhớ của dịch chiết từ các cây dược liệu nhờ khả năng ức chế acetylcholinesterase và kéo dài các sợi trục của neuron* Mã số nhiệm vụ: CT0000.03/21-22.

Học viên

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CHỮ CÁI VIẾT TẮT	v
DANH MỤC CÁC BẢNG	vi
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ	vii
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1 Cây Rau má	3
1.1.1 Đặc điểm sinh học	3
1.1.2 Thành phần hoá học	4
1.2 Tổng quan các hội chứng sa sút trí tuệ	4
1.2.1 Tình hình bệnh sa sút trí tuệ.....	4
1.2.2 Các bệnh sa sút trí tuệ phổ biến	5
1.3 Cấu trúc và vai trò của acetylcholinesterase enzyme (AChE) trong bệnh sa sút trí tuệ	6
1.4 Thuốc ức chế hoạt tính enzym cholinesterase (ChE Is) trong điều trị bệnh suy giảm trí nhớ	8
1.5 Ảnh hưởng của yếu tố dinh dưỡng thần kinh não và Yếu tố tăng trưởng thần kinh trong các bệnh về suy giảm trí nhớ	9
1.6 Quá trình acety hóa histone và sự phát triển tế bào thần kinh	10
1.7 Sử dụng cây dược liệu trong điều trị bệnh sa sút trí tuệ	10
1.8 Nghiên cứu và ứng dụng cây dược liệu trong điều trị bệnh suy giảm trí nhớ ở Việt Nam	14
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	16
2.1 ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	16
2.1.1 Đối tượng và phạm vi nghiên cứu.....	16
2.1.2 Hoá chất và thiết bị nghiên cứu.....	16
2.2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	17
2.2.1 Phương pháp thu mẫu	17
2.2.2 Nghiên cứu đặc điểm vi phẫu.....	17
2.2.3 Phương pháp xử lý và chiết xuất dược liệu	18
2.2.4 Phương pháp định danh loài bằng phương pháp sinh học phân tử.....	18

2.2.5 Phương pháp sắc ký bản mỏng	20
2.2.6 Phương pháp đánh giá khả năng ức chế enzym	20
2.2.7 Phương pháp nuôi cấy tế bào	22
2.2.8 Phương pháp sàng lọc hoạt tính kéo dài sợi trục neurite	22
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	23
3.1 KẾT QUẢ ĐỊNH DANH MẪU CÂY RAU MÁ	23
3.1.1 Mô tả đặc điểm hình thái.....	23
3.1.2 Đặc điểm vi phẫu	25
3.1.3 Tách chiết DNA tổng số và nhân dòng các đoạn gen	28
3.2 Kết quả điều chế các phân đoạn dịch chiết.....	34
3.2.1 Điều chế các phân đoạn dịch chiết.....	34
3.2.2 Kiểm tra thành phần phân đoạn dịch chiết bằng sắc ký bản mỏng.....	35
3.3 Kết quả sàng lọc hoạt tính ức chế enzyme acetylcholinesterase.....	37
3.3.1 Lựa chọn phân đoạn dịch chiết có khả năng ức chế hoạt tính enzyme acetylcholinesterase.....	37
3.3.2 Đánh giá tác dụng ức chế enzyme acetylcholinesterase của phân đoạn dịch chiết <i>n</i> -Hexan và <i>n</i> -BuOH.....	39
3.4 Sàng lọc hoạt tính kéo dài sợi trục neurite	43
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	45
TÀI LIỆU THAM KHẢO	46
PHỤ LỤC	

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CHỮ CÁI VIẾT TẮT

STT	Từ viết tắt	Từ viết đầy đủ/nghĩa
1	AChE	Acetylcholinesterase
2	Hex	Hexan
3	EtOAc	Ethyl acetat
4	EtOH	Ethanol
5	IC ₅₀	Nồng độ ức chế tối đa 50%
6	I%	% Inhibition
7	RM	Rau má
8	R _f	Retention factor
9	AD	Alzheimer
10	VaD	Sa sút trí tuệ não mạch (Vascular dementia)
11	DLB	Bệnh thể dạng Lewy (Lewy body disease)
12	BDNF	Yếu tố dinh dưỡng thần kinh não (brain-derived neurotrophic factor)

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1. đặc điểm hình thái cây rau má	3
Bảng 2.1. Thông tin các môi sử dụng	19
Bảng 3.1. Vị trí phân loại cây Rau má (<i>Centella asiatica</i>) [71]	23
Bảng 3.2. Bảng miêu tả hình thái mẫu cây Rau má nghiên cứu	25
Bảng 3.3. Kết quả tóm tắt Blast search trình tự gen RM.SP.MatKF	30
Bảng 3.4. Kết quả tóm tắt Blast search trình tự gen RM.SP.RbcLF	32
Bảng 3.5. Khối lượng các phân đoạn dịch chiết của cây Rau má.....	35
Bảng 3.6. Kết quả định tính sơ bộ thành phần hoá học có trong các phân đoạn dịch chiết cây Rau má	37
Bảng 3.7. Thành phần hỗn hợp phản ứng	38
Bảng 3.8. Kết quả khảo sát I% của 4 cao chiết, ở nồng độ 1000 µg/ml	38
Bảng 3.9. Kết quả đo OD của mẫu Rau má dịch chiết n-Hexan ở 7 nồng độ khác nhau.....	39
Bảng 3.10. Kết quả đo OD của mẫu Rau má dịch chiết n-BuOH ở 7 nồng độ khác nhau.....	40
Bảng 3.11. Kết quả đo OD của đối chứng dương Berberin clorid ở 8 nồng độ khác nhau.....	41
Bảng 3.12. Kết quả xác định giá trị IC50 của các phân đoạn dịch chiết và Berberin clorid.....	42
Bảng 3.13. Kích thước sợi trục neurite của tế bào thần kinh dưới tác động của các phân đoạn dịch chiết cây Rau má và mẫu đối chứng (DMSO)	43

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

Hình 1.1. Phân bố của cây Rau má trên thế giới.....	4
Hình 1.2. Sơ đồ cấu trúc và quá trình phiên mã của gen AChE	8
Hình 1.3. Cấu trúc của Rivastigmine (A) và neostigmine (B).....	9
Hình 1.4. Cấu trúc hóa học của các thành phần chính của lá cây tía tô: citronellal (1), citral (2), β -caryophyllene (3)	11
Hình 1.5. Cấu trúc hóa học của các thành phần chính của lá cây cam thảo ...	12
Hình 1.6. Cấu trúc hóa học và con đường tổng hợp một số hợp chất trong cây dứa cạn	13
Hình 1.7. Cấu trúc hóa học các hợp chất chính trong cây Rau má.....	14
Hình 2.1. Quy trình thử nghiệm khả năng ức chế AChE của mẫu Rau má....	21
Hình 3.1. Hình ảnh toàn cây Rau má	23
Hình 3.2. Hình ảnh lá và hoa cây Rau má.....	24
Hình 3.3. Vi phẫu lá cây Rau má	26
Hình 3.4. Vi phẫu cuống lá cây Rau má	26
Hình 3.5. Vi phẫu thân cây Rau má	27
Hình 3.6. Hình ảnh điện di DNA tổng số của mẫu cây Rau má	28
Hình 3.7. Kết quả điện di sản phẩm PCR các vùng RbcL, matK của cây Rau má	29
Hình 3.8. Kết quả so sánh trình tự bằng NCBI_BLAST sử dụng môi MatK_F	30
Hình 3.9. Cây phân loại trình tự gen RM.SP.MatKF với các trình tự tham khảo trên genbank	31
Hình 3.10. Kết quả so sánh trình tự bằng NCBI_BLAST sử dụng môi RbcL_F.....	32
Hình 3.11. Cây phân loại trình tự gen RM.SP.RbcLF với các trình tự tham khảo trên genbank	33
Hình 3.12. Sơ đồ chiết xuất phân đoạn mẫu cây Rau má	34
Hình 3.13. Sắc kí đồ thăm dò hệ dung môi cho các dịch chiết cây Rau má với bước sóng UV 254nm	36
Hình 3.14. Sắc kí đồ thăm dò hệ dung môi cho các dịch chiết cây Rau má với thuốc thử vanilin và Cerium(IV) sulfat	36

Hình 3.15. . Đồ thị biểu diễn sự tương quan giữa I% và nồng độ mẫu Rau má dịch chiết n-Hexan	40
Hình 3.16. Đồ thị biểu diễn tương quan giữa I% và nồng độ mẫu Rau má dịch chiết n-BuOH	41
Hình 3.17. Đồ thị biểu diễn sự tương quan giữa I% và nồng độ đối chứng dương Berberin chloride.....	42
Hình 3.18. Hình ảnh tế bào thần kinh dưới tác động của DMSO và phân đoạn dịch chiết n-Hex 5 μ g/ml	44

MỞ ĐẦU

Bệnh suy giảm trí nhớ - phổ biến là bệnh Alzheimer (AD) là nguyên nhân phổ biến nhất của chứng sa sút trí tuệ trên toàn cầu, căn bệnh này vẫn không thể chữa sau nhiều thập kỷ nghiên cứu sâu để tìm ra phương pháp chữa trị dứt điểm và vĩnh viễn. Nghiên cứu cho thấy có hơn 9,9 triệu trường hợp mắc sa sút trí tuệ mới mỗi năm trên toàn thế giới, nghĩa là cứ 3,2 giây lại có một trường hợp mới. Dự kiến số lượng bệnh nhân mắc sa sút trí tuệ sẽ tăng lên 82 triệu vào năm 2030 và 152 triệu người vào năm 2050 [1]. Acetylcholinesterase (AChE) là một loại enzym quan trọng trong hệ thần kinh. Chúng tham gia xúc tác quá trình thủy phân este liên kết với acetylcholine (ACh) để chấm dứt hoạt động truyền xung động của ACh thông qua các khớp thần kinh cholinergic, ở cả hệ thần kinh trung ương và ngoại vi. Việc tìm ra loại dược liệu có hoạt tính ức chế AChE có ý nghĩa lớn về y tế và kinh tế xã hội [2], [3]. Trên thế giới, cây dược liệu đã được sử dụng để điều trị các chứng rối loạn trí nhớ khác nhau như chứng hay quên, sa sút trí tuệ, Alzheimer, Parkinson từ rất lâu. Các nghiên cứu về thành phần hóa học trên các bộ phận thực vật khác nhau đã chứng minh sự có mặt của nhiều hợp chất hoạt tính sinh học, như polyphenol, tannin, flavonoid, triterpenes, alkaloid và sterol. Các hợp chất này được ghi nhận nhiều dược tính và hoạt tính sinh học khác nhau bao gồm tác dụng kháng cholinesterase, kháng viêm, giảm tình trạng hạ huyết áp và chống oxy hóa. Một số cây dược liệu đã được nghiên cứu và công bố hiệu quả cải thiện suy giảm trí nhớ trên thế giới như: cây Tía tô đất (*Melissa officinalis*), cây Cam thảo (*Glycyrrhiza uralensis*), cây Dừa cạn (*Catharanthus roseus*), Bạch quả (*Ginkgo biloba L.*), Rau má (*Centella asiatica*), Đinh lăng (*Polyscias fruticosa*),...

Hiện nay, có nhiều loại thuốc được sử dụng để điều trị chứng sa sút trí tuệ. Một số loại thuốc tổng hợp được sử dụng phổ biến bao gồm: donepezil, rivastigmine (ức chế acetylcholinesterase), memantine (giảm nồng độ glutamate). Tuy vậy, không thể phủ nhận vẫn còn nhiều tác dụng phụ mà các loại thuốc này có thể gây ra, bao gồm các rối loạn về cơ, giảm nhịp tim, tăng nồng độ axit dạ dày, nôn và co giật. Ngoài ra, một số nghiên cứu cho thấy các loại thuốc nói trên không có tác dụng giảm kích động ở những bệnh nhân có triệu chứng hành vi nghiêm trọng. Do đó, xu thế mới hiện nay tìm kiếm các hợp chất có nguồn gốc tự nhiên mang hoạt tính cải thiện suy giảm trí nhớ. Các hợp chất tự nhiên có hiệu quả tốt, không gây ra các tác dụng phụ không mong muốn và với chi phí thấp hơn. Hơn nữa, chúng còn có thể được sử dụng như

một dạng thực phẩm chức năng, làm tăng cường sức khả năng lưu thông máu, cải thiện hệ tuần hoàn, từ đó chống lại sự suy giảm trí nhớ. Các kết quả nghiên cứu cũng về cây dược liệu trên thế giới ghi nhận, các cây dược liệu cho thấy là nguồn cung cấp đa dạng các hoạt chất có tác dụng cải thiện trí nhớ cũng như điều trị chứng sa sút trí tuệ.

Việt Nam là nước được ghi nhận có mức độ đa dạng sinh học cao, nhờ đó có lợi thế lớn trong việc tìm kiếm các nguồn dược liệu tự nhiên. Đã có một số công trình nghiên cứu sử dụng cây dược liệu để cải thiện trí nhớ. Trong đó có công trình của Lê Minh Tuấn và cộng sự (2019) nghiên cứu về khả năng ức chế enzyme acetylcholinesterase của 40 loại cây dược liệu ở tỉnh An Giang, kết quả có 4 mẫu dược liệu có hoạt tính ức chế enzyme acetylcholinesterase mạnh trong đó có cây Rau má (*Centella asiatica*) [4]. Đó là cơ sở để mở ra các nghiên cứu sâu rộng hơn từ việc phân loại, định danh, sàng tách chiết các hợp chất và thử hoạt chất của cây Rau má (*Centella asiatica*) có hoạt tính ức chế enzyme acetylcholinesterase và kéo dài các sợi trục của neuron ở các địa điểm khác nhau, trong nghiên cứu này chọn thu mẫu Rau má tại Sa Pa, Lào Cai – vùng đất được mệnh danh là “vua của các loại thuốc Vì những lý do trên, chúng tôi tiến hành thực hiện nhiệm vụ **“Nghiên cứu khả năng ức chế acetylcholinesterase và kéo dài các sợi trục neuron của dịch chiết cây Rau má (*centella asiatica*)”**

Mục tiêu nghiên cứu:

- 1, Định danh được mẫu cây Rau má thu hoạch từ Sa Pa, Lào Cai.
- 2, Sàng lọc được các phân đoạn tách chiết từ cây Rau má (*Centella asiatica*) có hoạt tính ức chế acetylcholinesterase.
- 3, Sàng lọc được các phân đoạn tách chiết từ cây Rau má (*Centella asiatica*) có hoạt tính kéo dài các sợi trục của neuron.

Nội dung nghiên cứu

Nội dung 1: Định danh mẫu cây Rau má thu hoạch từ Sa Pa, Lào Cai bằng chỉ thị phân tử.

Nội dung 2: Điều chế các phân đoạn dịch chiết từ cây Rau má.

Nội dung 3: Sàng lọc hoạt tính ức chế enzyme acetylcholinesterase của các phân đoạn dịch chiết từ cây Rau má.

Nội dung 4: Sàng lọc hoạt tính kéo dài neuron và đánh giá khả năng gây độc của các phân đoạn dịch chiết từ cây Rau má lên tế bào thần kinh

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1 CÂY RAU MÁ

1.1.1 Đặc điểm sinh học

Cây Rau má là một loại thảo mộc thuộc họ hoa tán (Apiaceae) có tên khoa học: *Centella asiatica* (L.) Urban [5]. Loài này thường được gọi là “brahmi” trong tiếng Hindi, “mandu kaparni” trong tiếng Phạn, , “Indian pennywort” trong tiếng Anh, và “gotu kola” ở nhiều nơi khác trên thế giới.

1.1.1.1 Đặc điểm thực vật

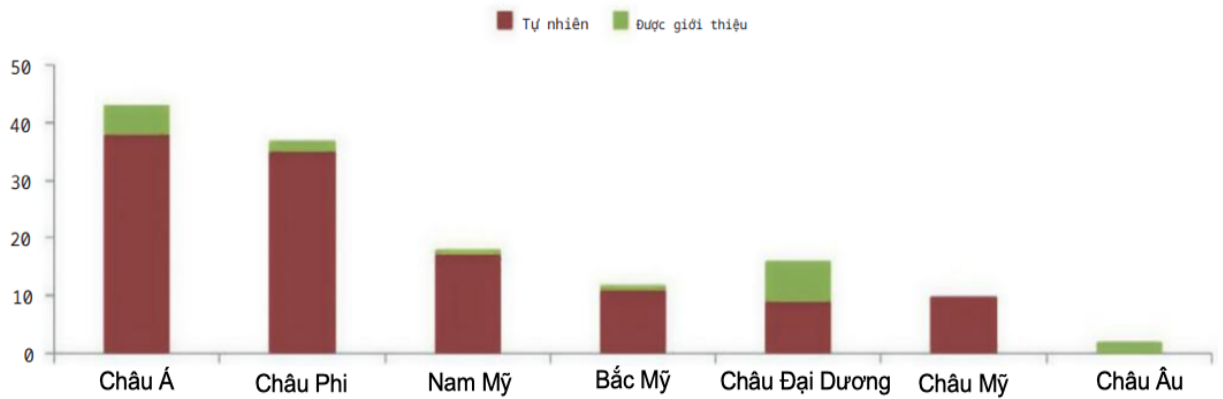
Cây Rau má có độ dài từ 7 đến 70cm. Với các đặc điểm hình thái như bảng 1.1 sau:

Bảng 1.1. đặc điểm hình thái cây rau má

STT	Bộ phận	Đặc điểm
1	Thân	Gầy, mảnh, nhẵn, phân nhánh nhiều, mọc bò, thân non có lông, ở các mấu thân sẽ bén rễ [5], [6]
2	Lá	Màu xanh vàng, mỏng, mọc xen kẽ với cuống lá dài từ 3 đến 8cm [5]. Thường tụ từ 2 đến 5 lá ở mấu, mọc so le [6], phiến lá gần tròn hoặc có hình thận [7], ở những nhánh có hoa thì mép khía tai bèo rộng từ 2 đến 4cm, ở những nhánh thường thì dài từ 10 đến 12cm [6]
3	Hoa	Mọc ở nách lá, hình tán đơn, có từ 1 đến 5 hoa nhỏ có màu đỏ tía nhạt hoặc trắng [7], không có cuống, cánh hoa có hình trái xoan hoặc tam giác, bầu có hình cầu, , bao phấn có hình mắt chim, chỉ nhị ngắn [6].
4	Quả	Đẹt, rộng từ 3 đến 5mm [5], đỉnh lõm, 7 đến 9 cạnh lồi, màu nâu đen, có vân mạng, có lông tơ hoặc nhẵn [6].

1.1.1.2 Phân bố

Cây Rau má- *Centella asiatica* thường được tìm thấy ở nơi ẩm ướt, mát mẻ, mọc thành đám ở bờ ruộng, bãi hoang, dọc đường sắt, ven đường [7]... phân bố khắp các nước nhiệt đới và cận nhiệt đới từ độ cao 200 đến 2100m so với mực nước biển [8]. Nó có nguồn gốc từ Châu Á, Châu Phi, Châu Mỹ và Châu Đại Dương như trong hình 1.1. Cây Rau má được trồng phổ biến ở nhiều nơi hoặc có thể mọc hoang.



Hình 1.1. Phân bố của cây Rau má trên thế giới

1.1.2 Thành phần hoá học

Centella asiatica đã được nghiên cứu rộng rãi để xác định các thành phần hóa học. Nó là một nguồn giàu axit amin (ví dụ: alanin, serine, aspartate và glutamate), phenol (ví dụ: kaempferol và quercetin), terpenoids (ví dụ: asiaticoside, cen telloside, madecassoside và brahmoside) và carbohydrate (ví dụ: glucose, mesoinositol và centellose), một số loại vitamin (ví dụ: B1, B2, B3, C, K) [9], [10].

1.2 TỔNG QUAN CÁC HỘI CHỨNG SA SÚT TRÍ TUỆ

1.2.1 Tình hình bệnh sa sút trí tuệ

Chứng sa sút trí tuệ xảy ra chủ yếu ở người trên 60 tuổi, già hoá dân số dẫn đến số lượng bệnh nhân mắc chứng sa sút trí tuệ ngày càng tăng nhanh [11]. Có hơn 9,9 triệu trường hợp mắc sa sút trí tuệ mới mỗi năm trên toàn thế giới, nghĩa là cứ 3,2 giây lại có một trường hợp mới. Đã có 60% người bị sa sút trí tuệ sống ở các nước có thu nhập thấp và trung bình, dự báo đến năm 2050, con số này sẽ tăng lên 71%, phần lớn sự gia tăng số người mắc chứng sa sút trí tuệ là ở các nước đang phát triển [1].

Theo số liệu từ tổ chức y tế thế giới (WHO) chứng sa sút trí tuệ có những tác động xã hội và kinh tế đáng kể về chi phí chăm sóc y tế và xã hội. Năm 2018, 1 nghìn tỷ đô la Mỹ đã được chi trên toàn thế giới để điều trị chứng sa sút trí tuệ. Đến năm 2030, dự kiến con số này sẽ tăng lên 2 tỷ đô la Mỹ. Có nhiều loại chứng sa sút trí tuệ khác nhau. Phổ biến nhất là bệnh Alzheimer, các dạng chủ yếu khác bao gồm: sa sút trí tuệ tiền đình thái dương, sa sút trí tuệ não mạch, bệnh thể dạng Lewy,... [12], [13].

1.2.2 Các bệnh sa sút trí tuệ phổ biến

Trong số các bệnh về suy giảm trí nhớ, Alzheimer là bệnh phổ biến nhất [14]. Bệnh Alzheimer là nguyên nhân hàng đầu của chứng sa sút trí tuệ và được đặc trưng bởi sự suy giảm dần dần trong chức năng nhận thức, bắt đầu bằng sự suy giảm trí nhớ. Thoái hóa thần kinh và sự suy giảm kết nối của các tế bào thần kinh cholinergic vì những lý do sinh học khác nhau theo thời gian là nguyên nhân gây ra bệnh Alzheimer. Sự mất kết nối synap cholinergic được chỉ định là nguyên nhân chính gây nên bệnh Alzheimer. Bệnh được biểu hiện bởi sự có mặt của các mảng bám amyloid beta β (A) ngoại bào và các đám rối tơ thần kinh (NFTs) nội bào. Các đám rối tơ thần kinh là một bó sợi nhỏ xoắn vào nhau, cấu thành từ một loại protein gọi là 'tau'. Các mảng bám amyloid beta β này là những khối bất thường của một loại protein gọi là beta amyloid. Các tế bào thần kinh bị các đám rối tơ thần kinh và các mảng bám amyloid beta β ngăn chặn sự giao tiếp khiến chúng bị chết đi [15]. Tỷ lệ mắc bệnh Alzheimer tăng theo độ tuổi, cụ thể sau từ 5 đến 10 năm thì tăng gấp đôi. Đối với những người trong độ tuổi 65–69, 70–74, 75–79, 80–84 và 85 tuổi trở lên thì tỷ lệ mắc bệnh Alzheimer được ước tính là 0,6%, 1,0%, 2,0%, 3,3% và 8,4%. Tỷ lệ hiện mắc cũng tăng theo cấp số nhân theo độ tuổi, tăng từ 3% trong số những người 65–74, lên gần 50% ở những người 85 tuổi trở lên [16].

Sa sút trí tuệ não mạch (Vascular dementia-VaD) đứng thứ hai sau Alzheimer, chiếm 15% các trường hợp sa sút trí tuệ. Nhưng không giống như bệnh Alzheimer, không có phương pháp điều trị được cấp phép nào cho chứng sa sút trí tuệ não mạch [17]. VaD được định nghĩa là mất chức năng nhận thức do thiếu máu cục bộ hoặc xuất huyết não do bệnh mạch máu não hoặc bệnh lý tim mạch. Chẩn đoán người mắc VaD cần có các biểu hiện sau: mất tri giác, thường chủ yếu là vùng dưới vỏ; tổn thương mạch máu não được chứng minh bằng hình ảnh; mối liên hệ thời gian giữa đột quỵ và chứng sa sút trí tuệ; và loại trừ các nguyên nhân khác của chứng sa sút trí tuệ. VaD sau đột quỵ có thể do bệnh mạch máu lớn với nhiều cơn đột quỵ (sa sút trí tuệ đa tuyến) hoặc do một cơn đột quỵ duy nhất (đột quỵ chiến lược VaD). Một dạng phổ biến là VaD thiếu máu cục bộ dưới vỏ gây ra do tắc mạch máu nhỏ với nhiều tuyến lệ và do tổn thương giảm thông do hẹp các tiểu động mạch tuỷ, như trong bệnh Binswanger. Không giống như AD, trong VaD, rối loạn chức năng điều hành sẽ thường xuất hiện, nhưng suy giảm trí nhớ ở mức độ nhẹ hoặc thậm chí có

thể không xuất hiện. Các chất ức chế cholinesterase được sử dụng cho AD cũng hữu ích trong VaD. Các phương pháp phòng ngừa bệnh nên tập trung vào việc giảm đột quỵ và bệnh tim mạch, trong đó chú ý đến việc kiểm soát các yếu tố có nguy cơ như tăng huyết áp, đái tháo đường, tăng cholesterol máu và tăng phospho máu [18].

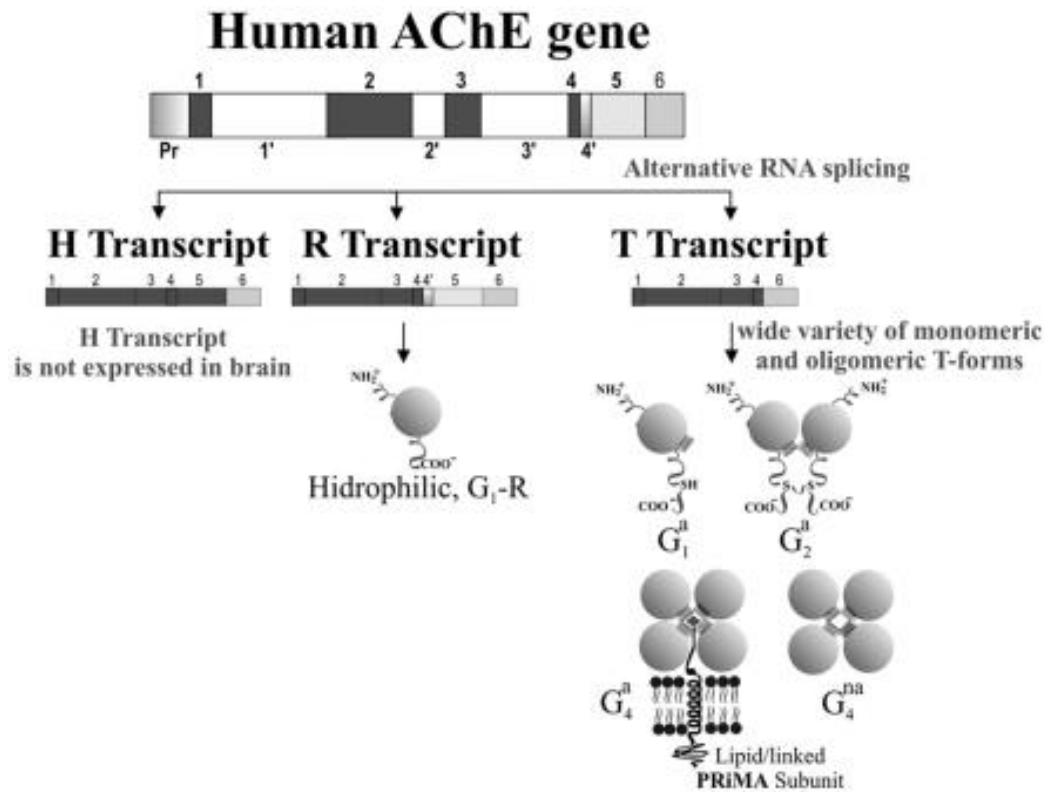
Bệnh thể dạng Lewy (Lewy body disease - DLB): là một rối loạn thoái hóa thần kinh bao gồm các protein sợi thần kinh được phosphoryl hóa bất thường, kết hợp với ubiquitin và α -synuclein dẫn đến chứng mất trí tiến triển chậm và không ngừng cho đến khi chết. Các nghiên cứu về mức độ phổ biến cho thấy đây là bệnh sa sút trí tuệ phổ biến thứ hai ở người cao tuổi. Thể Lewy và bệnh lý liên quan đến thể Lewy được tìm thấy từ thân não đến vỏ não và trong nhiều trường hợp, có liên quan đồng thời đến bệnh lý Alzheimer. Biểu hiện của DLB thường là một trong những suy giảm nhận thức vỏ não và dưới vỏ, với rối loạn chức năng điều hành, không gian thị giác và một phần về trí nhớ, đặc biệt là trong giai đoạn đầu. Các đặc điểm của bệnh bao gồm bao gồm rối loạn hành vi giấc ngủ REM, độ nhạy cảm với thuốc an thần nghiêm trọng và sự hấp thu chất vận chuyển dopamine thấp ở hạch cơ bản về hình ảnh thần kinh chức năng. Các tính năng hỗ trợ bổ sung thường xảy ra trong DLB, nhưng với độ đặc hiệu thấp hơn, bao gồm ngã và ngất lặp đi lặp lại, mất ý thức thoáng qua, không rõ nguyên nhân, rối loạn chức năng tự chủ nghiêm trọng, ảo giác ở các phương thức khác, ảo tưởng được hệ thống hóa, trầm cảm, bảo tồn tương đối cấu trúc thùy thái dương trung gian về hình ảnh thần kinh cấu trúc, hoạt động sóng chậm nổi bật trên điện não đồ và xạ hình cơ tim hấp thu thấp. Việc hỗ trợ bệnh nhân DLB bao gồm các can thiệp dược lý và không dùng thuốc đối với các rối loạn về nhận thức, tâm thần kinh, vận động và giấc ngủ của nó [18], [19].

1.3 CẤU TRÚC VÀ VAI TRÒ CỦA ACETYLCHOLINESTERASE ENZYME (ACHE) TRONG BỆNH SA SÚT TRÍ TUỆ

Enzyme acetylcholinesterase (AChE) là một loại enzym tham gia xúc tác quá trình thủy phân este liên kết với acetylcholine (ACh) để chấm dứt hoạt động truyền xung động của ACh thông qua các khớp thần kinh cholinergic, ở cả hệ thần kinh trung ương và ngoại vi [20]. Trung tâm hoạt động xúc tác của AChE là vùng kỵ nước, bao gồm hai vị trí: i) vị trí este (ES); và ii) vị trí liên

kết cơ chất anion (AS). AS liên kết với amin bậc bốn tích điện dương của ACh, các chất nền cation và chất ức chế khác. ES chứa một bộ ba xúc tác bao gồm Ser200, Glu327 và His440 [21]. Trong đó, Ser200 chịu trách nhiệm thủy phân các este choline bằng cách chuyển proton và tương tác cation giữa axit amin thơm và amoni bậc bốn của ACh [22].

Gen mã hóa cho AChE có thể hình thành 3 mRNA khác biệt nhờ quá trình cắt nối phức tạp các exon của gen mã hóa AChE, qua đó tạo nên các protein khác nhau. Các protein có trình tự đầu C khác nhau, xác định khả năng hình thành các dạng monomer hoặc oligomeric khác nhau (Hình 1.2). Hầu hết AChE được tìm thấy dưới dạng tetrameric liên kết với màng tế bào thần kinh. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng, sự phản ứng của hệ thần kinh với các điều kiện stress làm thay đổi sự biểu hiện của gen AChE, dẫn đến hình thành protein ưu thế. Trong điều kiện bình thường, dạng AChE-S (dạng 'khớp thần kinh', thường tồn tại dưới dạng tetrameric G4 liên kết màng) được tạo ra nhiều hơn đáng kể so sánh với dạng AChE-R (thường tồn tại ở dạng hòa tan, monomeric G1). Tuy nhiên, trong điều kiện căng thẳng như sau chấn thương đầu hoặc trong căng thẳng tâm lý [23] và nhiễm độc antiAChE [24], biểu hiện của dạng AChE-R tăng lên rất nhiều do quá trình cắt nối mRNA bị thay đổi. AChE-R có thể góp phần vào suy giảm cấp tính của suy nhược thần kinh [25]. Trong não của bệnh nhân AD, mức độ dạng AChE liên kết màng G4 được quan sát giảm 90% trở lên ở một số vùng nhất định. Tuy nhiên, mức độ AChE-R G1 hầu như không thay đổi [26]. Để xác nhận vai trò của AChE-R gây ra tổn thương hệ thần kinh, một chất ức chế (AChE-R) mRNA là 2'-O-methyl với liều lượng 500 ng được tiêm vào những con chuột bị thương ở đầu. Kết quả cho thấy sự phát triển rõ rệt của các đuôi gai neurite trong vỏ não của chuột bị chấn thương sau 14 ngày. Hơn nữa, việc sử dụng chất ức chế đặc hiệu biểu hiện của (AChE-R) làm giảm số lượng tế bào thần kinh CA3 chết ở những con chuột bị thương, và tạo điều kiện phục hồi thần kinh trong các thử nghiệm phối hợp thần kinh vận động. Ở những con chuột chuyển gen nhạy cảm với chấn thương do sản sinh quá nhiều AChE, sử dụng chất ức chế đặc hiệu biểu hiện của (AChE-R) mRNA làm giảm tỷ lệ tử vong từ 50% xuống 20% [23].

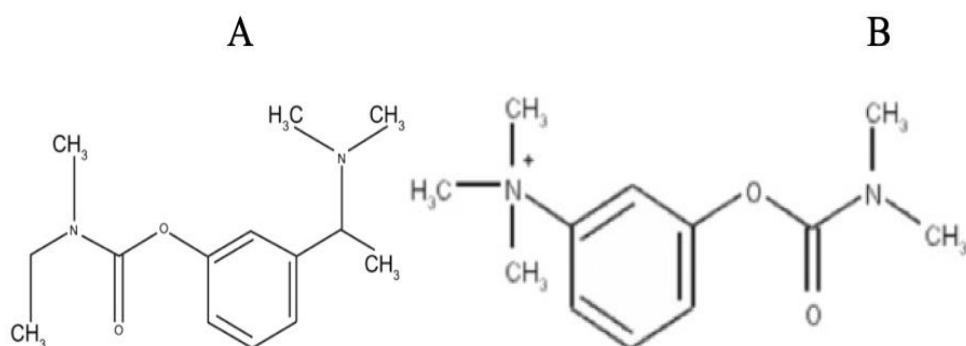


Hình 1.2. Sơ đồ cấu trúc và quá trình phiên mã của gen AChE

1.4 THUỐC ỨC CHẾ HOẠT TÍNH ENZYEM CHOLINESTERASE (ChE IS) TRONG ĐIỀU TRỊ BỆNH SUY GIẢM TRÍ NHỚ

ChE-Is là một nhóm thuốc ức chế các enzym cholinesterase (AChE và/hoặc butyrylcholinesterase BChE) phá vỡ ACh. Trong hệ thần kinh trung ương và hệ thần kinh ngoại vi ACh là chất dẫn truyền thần kinh chính. Từ đó, làm tăng nồng độ ACh trong khe tiếp hợp. Cho đến nay, ChE-Is đã được Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) chấp thuận là loại thuốc hiệu quả nhất để điều trị các bệnh và hành vi liên quan đến suy giảm nhận thức [27], [28]. Trong số các bệnh về suy giảm trí nhớ, Alzheimer là bệnh phổ biến nhất. Thoái hóa thần kinh và sự suy giảm kết nối của các tế bào thần kinh cholinergic vì những lý do sinh học khác nhau theo thời gian là nguyên nhân gây ra bệnh Alzheimer. Sự mất kết nối synap cholinergic được chỉ định là nguyên nhân chính gây nên bệnh Alzheimer, vì vậy chiến lược điều trị hiệu quả nhất được lựa chọn là sử dụng ChE-Is tăng nồng độ ACh trong não. Ngoài ra, ChE-Is cũng được kê đơn cho chứng sa sút trí tuệ không phải Alzheimer như sa sút trí tuệ thể Lewy, rối loạn tâm thần (rối loạn tăng động giảm sự tập trung và suy giảm nhận thức ở bệnh nhân tâm thần phân liệt [29], và các bệnh thần kinh (chấn thương đầu) [30]. Ngoài ra, ChE-Is tạo ra tác dụng giảm đau trong

các thử nghiệm lâm sàng [31]. Rivastigmine là chất ức chế hoạt tính cả AChE và BuChE, mang lại lợi ích hiệu quả cho bệnh nhân sa sút trí tuệ [32], [33]. Một thuốc ức chế hoạt tính cholinesterase khác là neostigmine tác dụng lâu hơn và tác dụng phụ gây độc hệ thần kinh [34]. Neostigmine ức chế AChE bằng cách carbamyl hóa serine trong trung tâm hoạt động của AChE. Do tác dụng không gây độc và kéo dài hơn cho thần kinh làm cho neostigmine trở thành một lựa chọn tốt trong các bệnh suy giảm trí nhớ. Tuy nhiên, neostigmine cũng được nhận thấy là có một số nhược điểm, chẳng hạn như không có khả năng đảo ngược hoạt tính ức chế cholinesterase, gây yếu cơ và tác dụng phụ trên tim mạch [34].



Hình 1.3. Cấu trúc của Rivastigmine (A) và neostigmine (B)

1.5 ẢNH HƯỞNG CỦA YẾU TỐ DINH DƯỠNG THẦN KINH NÃO VÀ YẾU TỐ TĂNG TRƯỞNG THẦN KINH TRONG CÁC BỆNH VỀ SUY GIẢM TRÍ NHỚ

Yếu tố dinh dưỡng thần kinh não (brain-derived neurotrophic factor-BDNF) là một protein trong họ neurotrophins (NT), có vai trò quan trọng trong sự phát triển và duy trì hệ thống thần kinh. Nó kiểm soát sự dẫn truyền thần kinh, tái tạo và hình thái tế bào thần kinh, cùng với đó là tính linh hoạt chức năng của khớp thần kinh trong tế bào thần kinh cả ở ngoại vi hệ thần kinh và hệ thần kinh trung ương. Ba vị trí mà BDNF biểu hiện tích cực nhất là hồi hải mã, vỏ não và não trước. Sự thay đổi của BDNF, cả trong máu tuần hoàn và trong các mô thần kinh trung ương, được cho là có liên quan đến bệnh sinh của các bệnh thoái hóa thần kinh, bao gồm cả bệnh Alzheimer (AD), bệnh Parkinson (PD), xơ cứng teo cơ một bên (ALS), bệnh Huntington (HD) và bệnh đa xơ cứng (MS) [35]–[37]. Sự thiếu hụt của BDNF có thể là kết quả của một loạt các yếu tố như: thiếu hụt các ion kim loại, yếu tố tăng trưởng thần kinh,

mất các monome A β chức năng và sự xuất hiện của các oligomer A β độc hại. Pandini và cộng sự đã chứng minh NGF có thể làm tăng biểu hiện BDNF thông qua quá trình phosphoryl hóa CREB bằng con đường kép bao gồm kinase 1/2 và AKT kinase điều hòa tín hiệu ngoại bào tham gia vào quá trình dẫn truyền thần kinh cùng với các ion kim loại (đồng và kẽm) [38]. Sự kết hợp của yếu tố dinh dưỡng thần kinh và yếu tố tăng trưởng thần kinh giúp làm tăng sự phát triển của tế bào thần kinh [39].

1.6 QUÁ TRÌNH ACETY HÓA HISTONE VÀ SỰ PHÁT TRIỂN TẾ BÀO THẦN KINH

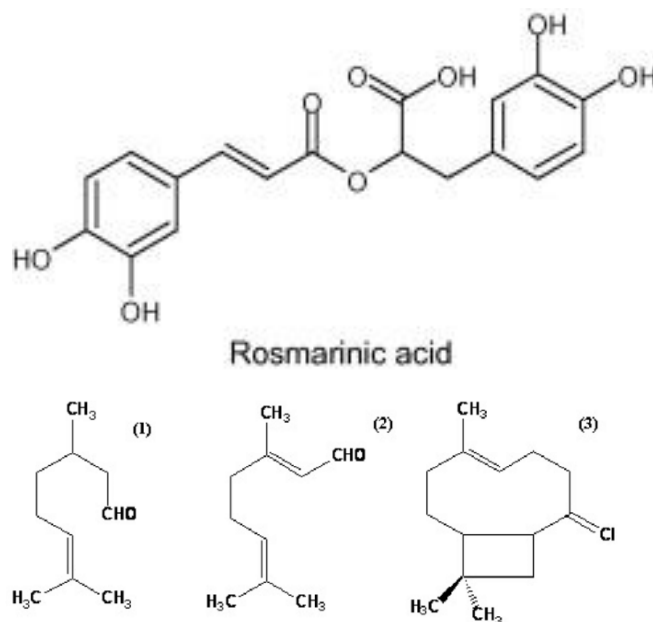
Các biến đổi histone gây ra bởi quá trình methyl hóa và acetyl hóa đã được nghiên cứu rộng rãi. Liên quan đến quá trình biệt hóa tế bào thần kinh, quá trình này có thể kích hoạt hoặc kìm hãm sự biểu hiện của các gen [40]–[42]. Trong nhiều trường hợp, sự biểu hiện gen phụ thuộc vào cấu trúc nhiễm sắc. Nhiễm sắc thể được tạo thành từ nhiều nucleosome đơn bao gồm 147 cặp base DNA (bp) được bao bọc xung quanh một nhóm protein, được gọi là histone. Các nucleosom đơn lẻ chứa tổng cộng tám protein, hai bản sao của mỗi histone 2A (H2A), histone 2B (H2B), histone 3 (H3) và histone 4 (H4). Các gốc axit amin (đuôi đầu N) của các protein này, hoặc đuôi histone, dễ bị ảnh hưởng bởi nhiều biến đổi sau phiên mã điều chỉnh chức năng của chúng. Các biến đổi có thể đảo ngược ở đuôi histone được thiết lập bởi các cơ chế khác nhau như acetyl hóa, phosphoryl hóa, methyl hóa, ubiquitination và isome hóa. Hsieh và cộng sự sử dụng một chất ức chế hoạt tính enzyme histone de-acetylases (HDACs) giúp làm tăng mức độ acetyl hóa histone H3 trong nhân. Từ đó, cảm ứng quá trình biệt hóa của các tế bào thần kinh mầm [40]. Ngoài ra, chất ức chế hoạt tính enzyme histone de-acetylases (HDACs) làm thay đổi quá trình acetyl hóa histone, từ đó tác động đến sự biểu hiện của một số gen biểu hiện tức thì (đáp ứng kích hoạt trong vòng 1h) giúp phát triển các neurite của tế bào thần kinh [42].

1.7 SỬ DỤNG CÂY DƯỢC LIỆU TRONG ĐIỀU TRỊ BỆNH SA SÚT TRÍ TUỆ

Trên thế giới, cây dược liệu đã được sử dụng để điều trị các chứng rối loạn trí nhớ khác nhau như chứng hay quên, sa sút trí tuệ, Alzheimer, Parkinson từ rất lâu. Các nghiên cứu về thành phần hóa học trên các bộ phận thực vật khác

nhau đã chứng minh sự có mặt của nhiều hợp chất hoạt tính sinh học, như polyphenol, tannin, flavonoid, triterpenes, alkaloid và sterol. Các hợp chất này được ghi nhận nhiều hoạt tính sinh học và dược lý khác nhau bao gồm tác dụng viêm, giảm tình trạng hạ huyết áp và chống oxy hóa, kháng cholinesterase. Một số cây dược liệu đã được nghiên cứu và công bố hiệu quả cải thiện suy giảm trí nhớ trên thế giới.

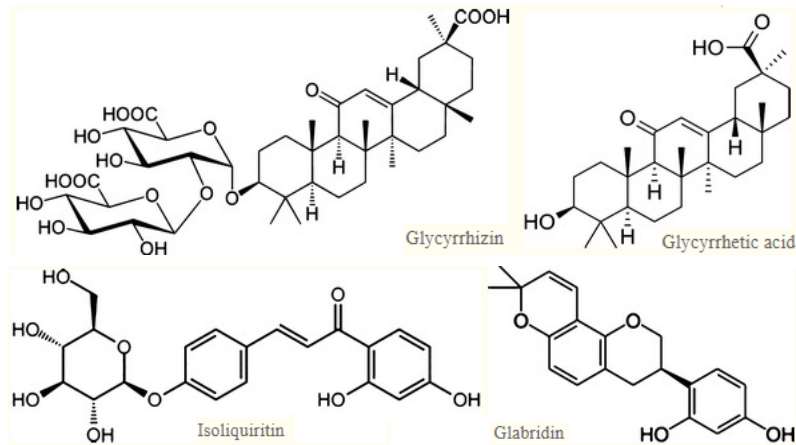
Melissa officinalis (cây tía tô đất) là một loại thảo dược được trồng lâu năm. Cây tía tô đất (Lamiaceae) đã được sử dụng cách đây hơn 2000 năm trong y học cổ truyền, nhờ khả năng kéo dài tuổi thọ và phục hồi trí nhớ [43], [44]. Lá của loại cây này chứa monoterpenes (như citral) có hoạt tính chống AChE yếu và axit phenol cacboxylic- axit rosmarinic giúp chống nhiễm trùng, chống oxy hóa, chống amyloidogenic. Bệnh nhân AD nhẹ đến trung bình sử dụng dịch chiết xuất tía tô đất đã có được những lợi ích về nhận thức sau 16 tuần điều trị, không có tác dụng phụ của việc sử dụng dịch chiết từ cây tía tô đất [45]. Tía tô đất giúp điều chỉnh tâm trạng và hiệu suất nhận thức sau khi dùng thuốc cấp tính [44], [46].



Hình 1.4. Cấu trúc hóa học của các thành phần chính của lá cây tía tô: citronellal (1), citral (2), β -caryophyllene (3)

Cây Thiên lý hay còn gọi là Hoa lý, Dạ lải hương có tên khoa học là *Telosma Cordata* (Burm. f.) Merrill không chỉ được sử dụng làm thực phẩm hàng ngày mà còn dùng để phục hồi cơ thể do thiếu ngủ, giúp giải nhiệt, an thần và chữa mệt mỏi đau lưng [47].

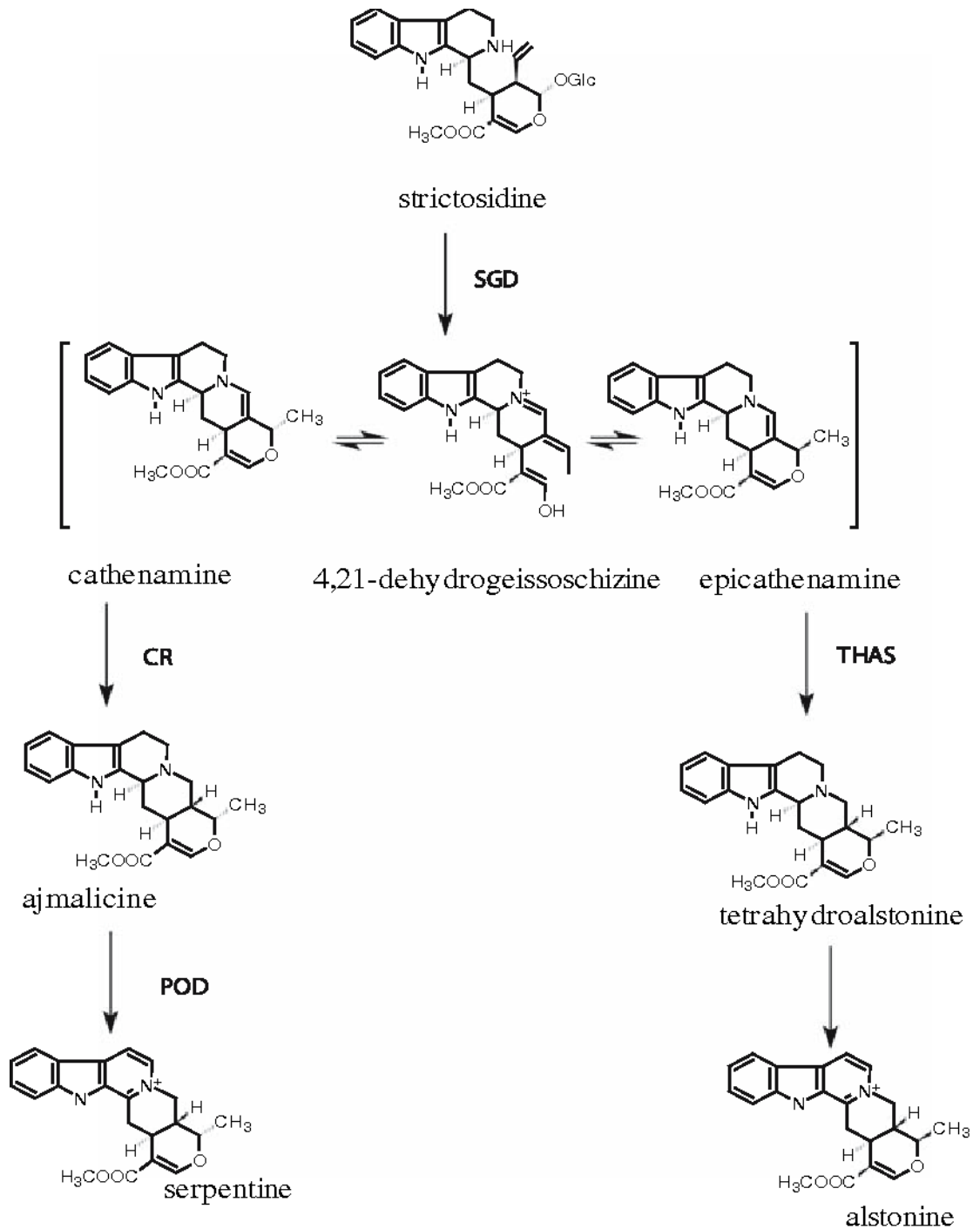
Các thành phần hóa học từ các loài thuộc chi cam thảo (*Glycyrrhiza*) bao gồm triterpene saponin glycyrrhizin và isoliquiritigenin cải thiện suy giảm trí nhớ nhờ khả năng có đặc tính chống oxi hóa. Dịch chiết từ rễ cây cam thảo giúp tăng cường đáng kể sợi trục neurite ở tế bào thần kinh CA3 [48]. Ngoài ra, glabridin, một isoflavan là hai chất chủ yếu có trong cây cam thảo cũng ghi nhận có tác dụng bảo vệ thần kinh [49].



Hình 1.5. Cấu trúc hóa học của các thành phần chính của lá cây cam thảo

Bạch quả (*Ginkgo biloba* L.) với thành phần hoạt động bao gồm: terpene lactones (ginkgolides và bilobalide) và flavonoids (flavonols và flavone glycosides) [50] được sử dụng để điều trị tuần hoàn kém, mệt mỏi, chóng mặt ù tai, suy giảm trí nhớ và các triệu chứng của sa sút trí tuệ thông qua điều chỉnh nồng độ glucocorticoid, cân bằng nội môi và tổng hợp các yếu tố tăng trưởng, điều hòa Stress oxi hóa, bảo vệ tế bào thần kinh ngăn chặn thiếu máu não cục bộ, tăng cường tính toàn vẹn chức năng và các tế bào nội mô mạch máu [51].

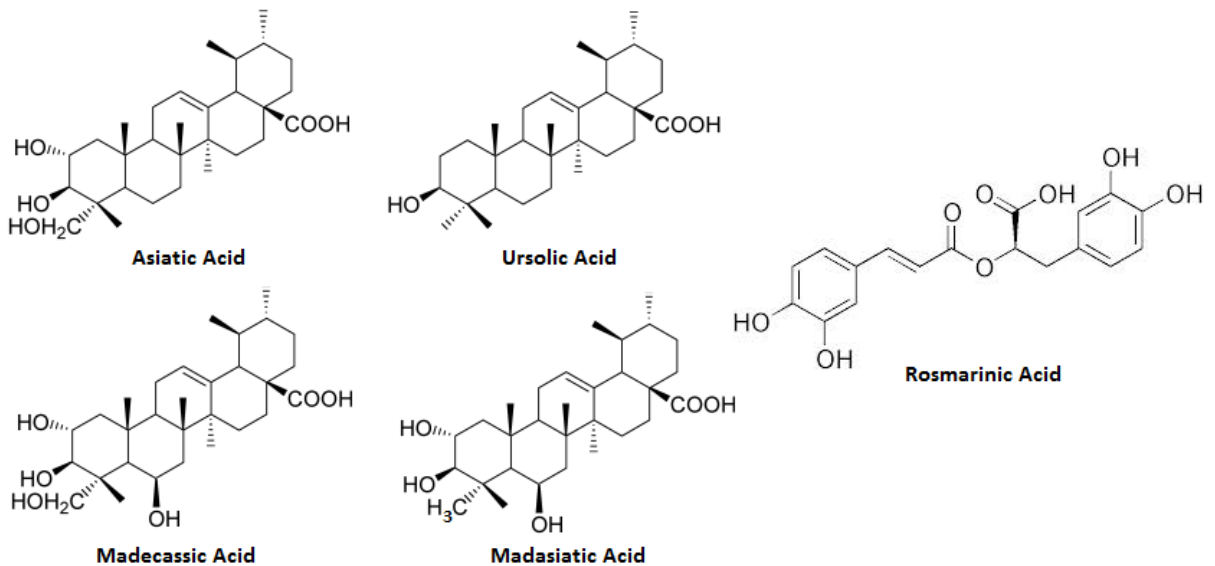
Dừa cạn (tên khoa học: *Catharanthus roseus*) hay còn được gọi là bông dừa, hải đằng, dương giác, hoa tứ quý, trường xuân hoa, thuộc chi *Catharanthus* họ La bố ma (Apocynaceae). Dừa cạn sản sinh ra các alkaloid có hoạt tính kháng viêm thần kinh như ajmalicine và serpentine. Ajmalicine và serpentine trong cây dừa cạn liên kết vào thụ thể của enzyme cyclooxygenase-II, nhờ đó làm giảm hàm lượng enzyme cyclooxygenase-II, cải thiện suy giảm trí nhớ [52]. Hơn nữa các thành phần này còn giúp điều trị các bệnh về cao huyết áp, cải thiện sự lưu thông máu [53].



Hình 1.6. Cấu trúc hóa học và con đường tổng hợp một số hợp chất trong cây dừa cạn

Rau má (*Centella asiatica*) với các hoạt chất asiaticosides, saponins, madasiatic acid, madecassoside, brahminoside, brahmoside, sasiaticoside, tannins, sitosterol, centoic acid, ascorbic acid, thankuniside, centellic acid, brahminoside, brahmoside, thankuniside, siatic acid, triterpine, glycoside, isothankuniside, vellarin có tác dụng cải thiện trí nhớ thông qua hoạt tính chống oxy hóa. Các nghiên cứu cho thấy dịch chiết từ cây Rau má được chứng minh là có hiệu quả trong bảo vệ não chuột chống lại tác hại của quá trình oxy hóa

do tuổi tác [54]. Việc tăng cường cơ chế bảo vệ oxy hóa tế bào giúp bảo vệ thần kinh vỏ não là một tác dụng quan trọng của Asiatic acid - một hợp chất được tách chiết từ cây Rau má [55].



Hình 1.7. Cấu trúc hóa học các hợp chất chính trong cây Rau má

1.8 NGHIÊN CỨU VÀ ỨNG DỤNG CÂY DƯỢC LIỆU TRONG ĐIỀU TRỊ BỆNH SUY GIẢM TRÍ NHỚ Ở VIỆT NAM

Ở Việt Nam, sử dụng cây dược liệu trong điều trị các bệnh suy giảm trí nhớ được sử dụng từ lâu trong các bài thuốc y học cổ truyền. Một số cây dược liệu được sử dụng phổ biến trong y học cổ truyền như: Cây đinh lăng, Đan sâm, cây Rau má, Hoàng liên ô rô, nhân sâm... Trần Thị Loan và cộng sự sử dụng rễ Đan sâm để nghiên cứu hoạt tính cải thiện trí nhớ trên mô hình chuột bị suy giảm trí nhớ bằng scopolamin. Kết quả ghi nhận cao ethanol rễ đan sâm ở hai mức liều 600 và 1200 mg/kg có tác dụng cải thiện chỉ số phân biệt. Ngoài ra, trên test né tránh thụ động, cao ethanol rễ Đan sâm ở hai mức liều 600 và 1200 mg/kg có tác dụng cải thiện thời gian tiềm tàng vào buồng tối. Cơ chế tác dụng cải thiện trí nhớ của cao ethanol rễ Đan sâm có thể do giảm hoạt độ enzym AChE trong mô não chuột ở cả hai mức liều nghiên cứu [56]. Một loại sâm khác cũng được nghiên cứu tác dụng dược lý, kết quả cho thấy tác dụng của lá Sâm Việt Nam (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) trên hệ thần kinh trung ương. Ngoài ra, ở các liều thử nghiệm 600, 1200 mg/kg, saponin toàn phần ở liều 200 mg/kg của cao lá Sâm Việt Nam có tác dụng phục hồi thời gian ngủ bị rút ngắn bởi stress[57]. Ức chế hoạt tính enzyme acetylcholinesterase được thừa nhận là một trong các biện pháp giúp làm cải thiện tình trạng suy giảm trí

nhớ. Trên cơ sở đó, tác giả Bùi Thanh Tùng và cộng sự đã nghiên cứu đối tượng là cây Hoàng liên ô rô, tiến hành sàng lọc hoạt tính ức chế enzyme acetylcholinesterase in vitro của các phân đoạn dịch chiết. Kết quả cho thấy phân đoạn *n*-BuOH có hoạt tính ức chế enzyme acetylcholinesterase mạnh nhất, tiếp theo là cao tổng EtOH và thấp nhất là phân đoạn EtOAc. Tác dụng ức chế enzyme acetylcholinesterase của phân đoạn *n*BuOH tăng dần theo nồng độ với IC_{50} là $3,38 \pm 0,07 \mu\text{g/mL}$ [58].

Trong những năm gần đây, nấm dược liệu đông trùng hạ thảo đã được nghiên cứu và phát triển. Thành phần dược chất quan trọng của nấm đông trùng hạ thảo là Cordycepin và adrenoizin được ghi nhận có tác dụng an thần, giảm căng thẳng mệt mỏi. Nghiên cứu cơ chế tác dụng còn ghi nhận khả năng ức chế hoạt tính enzyme acetylcholinesterase trên 50% ở nồng độ 3 mg/ml từ các dịch chiết nấm đông trùng hạ thảo. Thử nghiệm trên chuột cũng cho thấy một số dịch chiết của nấm đông trùng hạ thảo có tác dụng cải thiện tình trạng suy giảm trí nhớ ngắn hạn ở chuột [59], [60].

Dựa trên các công bố nghiên cứu khoa học và danh mục thuốc sử dụng trong hỗ trợ điều trị các bệnh suy giảm trí nhớ, cây thạch tùng răng cưa đã được phê duyệt triển khai nhiều dự án bảo tồn, khai thác và chiết xuất hoạt chất huperzinA ở nước ta. Với mục tiêu bảo tồn, khai thác và phát triển nguồn dược liệu thạch tùng răng cưa, Lê Thị Bích Thủy và cộng sự tại viện công nghệ sinh học đã nghiên cứu và nhân giống in vitro giống cây Thạch tùng răng cưa. Do hạn chế về số lượng và thời gian sinh trưởng của cây thạch tùng răng cưa, hướng nghiên cứu mới phát triển các vi nấm nội sinh trong cây thạch tùng răng cưa có khả năng sinh tổng hợp huperzinA cũng đã được tiến hành [61], [62]. Ngoài ra, một số sản phẩm chức năng có nguồn gốc từ cây dược liệu cũng đã được đưa ra thị trường.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

2.1.1 Đối tượng và phạm vi nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu: Cây Rau má (*Centella asiatica*) được thu hoạch tại Sa Pa, Lào Cai vào thời gian tháng 4 năm 2020. Mẫu cây được bổ sung chất hút ẩm silicagel trong quá trình vận chuyển về phòng thí nghiệm, để sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

Phạm vi nghiên cứu: Các nghiên cứu được thực hiện trên quy mô phòng thí nghiệm tại Trung tâm Vật lí Chất mềm - Vật lí Sinh học thuộc Trung tâm Phát triển Công nghệ cao và viện Công nghệ sinh học thuộc Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.1.2 Hoá chất và thiết bị nghiên cứu

2.1.2.1 Hoá chất nghiên cứu

Hóa chất tách chiết DNA: Chloroform: Isoamylalcohol (24:1), CTAB Buffer (20 mM EDTA pH 8.0, 1% CTAB, 1.4 M NaCl, β -mercaptoethanol, 100 mM Tris pH 8.0), Enzyme RNase, ethanol (70%), Isopropanol.

Hóa chất điện di và PCR: Agarose tinh khiết, PCR 2X MasterMix, Ladder 1 kb plus (Thermo Scientific, USA), thuốc nhuộm Redsafe, Loading dye 6x, TAE 1X, nước tinh sạch, TE buffer (pH 8).

Hóa chất tách chiết các phân đoạn dịch chiết: Ethanol(EtOH) (Shouguang, Trung Quốc), Methanol (MeOH) (Merck), *n*-Hexan, Ethyl acetat (EtOAc),), *n*-Butanol (BuOH) và nước cất.

Hóa chất làm sắc ký bản mỏng: Ethanol(EtOH) (Shouguang, Trung Quốc), *n*-Hexan, Diclometan, Acetone, *n*-Butanol (*n*-BuOH), Methanol (MeOH) (Merck), Ethyl acetat (EtOAc), nước cất thuốc thử Vanilin.

Hóa chất sàng lọc hoạt tính ức chế acetylcholinesterase: berberin clorid chuẩn (Sigma, Singapore), HCl (Merck), AChE (mã số EC 3.1.1.7) (Sigma, Singapore), Tris-HCl, Methanol (MeOH) (Merck), Acetylthiocholine (ACTI) (Sigma, Singapore), Acid 5-5'-dithiobis-2-nitrobenzoic (DTNB) (Sigma, Singapore) và nước cất.

Hóa chất sàng lọc khả năng kéo dài sợi trục neurite: tế bào C6, môi trường nuôi tế bào DMEM, trypsin/EDTA, đệm PRS (Merck),

2.1.2.2 Thiết bị nghiên cứu

Thiết bị định danh mẫu cây: Bể điện di, lò vi sóng, máy PCR, Máy soi gel bằng tia UV.

Thiết bị tách chiết các phân đoạn dịch chiết: cân phân tích có độ chính xác 0,1 mg, hệ thống máy cô quay, dụng cụ thủy tinh: bình cầu dung tích 1000 ml, các loại cốc có mỏ dung tích 25-100 ml, phễu thủy tinh, phễu chiết quả lê, bình định mức.

Thiết bị sắc ký bản mỏng: đèn tử ngoại phát các bức xạ có bước sóng ngắn 254 nm, bình triển khai có nắp đậy kín, dụng cụ để phun thuốc thử, tủ sấy, tủ hút, máy sấy, bản mỏng tráng sẵn chất hấp phụ.

Thiết bị sàng lọc hoạt tính ức chế acetylcholinesterase: Máy đo pH Mettler Toledo (Thụy Sĩ), máy đo quang SpectraMax iD5 Multi-Mode Microplate Readers (Mỹ), Dụng cụ thủy tinh: bình cầu dung tích 1500 ml, các loại cốc có mỏ dung tích từ 25ml đến 100 ml, bình định mức, pipet chính xác, cân phân tích Mettler Toledo (Thụy Sĩ) độ chính xác 0,1 mg.

Thiết bị sàng lọc khả năng kéo dài sợi trục neurite: tủ cấy vô khuẩn, kính hiển vi, máy ảnh, tủ nuôi tế bào, bình CO₂, máy ly tâm.

2.2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1 Phương pháp thu mẫu

Thu hái mẫu có đủ thân, lá, cơ quan sinh sản và được giám định thực vật học bởi chuyên gia thực vật học Thạc sĩ Trần Thị Lương, Phòng Di truyền tế bào thực vật, Viện Công nghệ Sinh học và so sánh hình thái mẫu thu được với các mô tả hình thái trong từ điển thực vật thông dụng của Đỗ Tất Lợi năm 2004 và những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam của Võ Văn Chi năm 2004 [63], [64], đúng với tên khoa học đã công bố.

2.2.2 Nghiên cứu đặc điểm vi phẫu

Lựa chọn các bộ phận cây Rau má gồm lá, thân, cuống lá còn tươi, không dập nát, sau đó cắt mẫu: Tiêu bản vi phẫu thân được cắt ngang ở đoạn thân, sử dụng dao lam sạch cắt ngang ở vị trí gân lá trưởng thành của lá cây Rau má làm tiêu bản vi phẫu. Cắt ngang ở đoạn giữa từ thân đến lá chính làm tiêu bản cuống lá. Sau đó chọn những lát cắt lá, cuống lá, thân mỏng và nguyên vẹn đem nhuộm với thuốc nhuộm và làm tiêu bản vi phẫu. Cuối cùng sử dụng kính hiển vi tại Trung tâm Vật lý Chất mềm-Vật lý Sinh học thuộc Trung tâm Phát

triển công nghệ cao thuộc Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Na để quan sát các đặc điểm vi phẫu các bộ phận cây Rau má.

2.2.3 Phương pháp xử lý và chiết xuất dược liệu

Mẫu cây Rau má được rửa sạch sau đó đem sấy khô trong tủ sấy ở nhiệt độ 50 °C, thái nhỏ. Cho mẫu khô vào bình thủy tinh và sử dụng dung môi chiết ethanol 90 % đổ ngập mẫu. Đặt mẫu trong máy siêu âm, để nhiệt độ ở 55 °C trong 3 tiếng. Sau đó, tiến hành lọc mẫu cây Rau má qua giấy lọc thu dịch chiết còn. Quá trình này lặp lại vài lần để hoạt chất trong cây Rau má được chiết kiệt. Kiểm tra bằng sắc ký lớp mỏng (mẫu đạt khi không còn vết màu trên bản mỏng) với thuốc thử H₂SO₄/EtOH 20%. Trộn đều tất cả dịch chiết với nhau, loại bỏ dung môi ethanol trong điều kiện nhiệt độ khoảng 60 °C, áp suất giảm, cuối ta thu được cao toàn phần.

Dựa theo nguyên lý phân bố khác nhau của các chất trong 2 dung môi không trộn lẫn vào nhau: $K = C_A/C_B$, trong đó: K là hệ số phân bố; C_A và C_B là nồng độ của chất tan trong pha A và pha B.

Chiết các phân đoạn: Cao toàn phần của dịch chiết mẫu cây Rau má được lựa chọn, hòa tan lại trong một lượng tối thiểu cồn 90%, và lắc phân đoạn với các dung môi có độ phân cực tăng dần với tỉ lệ 1:1 (3 lần) theo thứ tự *n*-Hexan, EtOAc và BuOH. Các cặn phân đoạn này được dùng để sàng lọc hoạt tính sinh học [65], [66].

Tính hiệu suất chiết của các dung môi sử dụng bằng công thức:

Hiệu suất chiết (%) = khối lượng phân đoạn dịch chiết thu được / khối lượng khô mẫu sử dụng.

2.2.4 Phương pháp định danh loài bằng phương pháp sinh học phân tử

2.2.4.1 Tách chiết DNA tổng số và tinh sạch

Sử dụng phương pháp CTAB cải tiến để tách chiết DNA toàn phần được tách từ thân tươi và lá của mẫu cây Rau [67].

Pha CTAB theo công thức sau: H₂O 73ml, EDTA pH 8.0, 0.5M 2ml, Tris-HCl pH 8.0, 1M 10ml, NaCl 5M 14,34 ml, β-mercaptoethanol 2ml, CTAB 1ml. Đem hỗn hợp ủ ở 65 °C trong 15 phút.

Lấy 100mg mẫu cây Rau má tươi tiến hành nghiền mịn trong cối với nito lỏng. Sau đó, cho mỗi mẫu đã nghiền vào từng ống eppendorf 1.5 mL có ghi tên, thêm 1 mL CTAB 1X đã pha. Đem mẫu đi ủ ở 65 °C trong 90 phút (mỗi

10 phút trộn đều mẫu 1 lần). Tiếp theo, cho thêm 400 μL Chloroform: Isoamylalcohol (24:1), rồi trộn đều. Đem mẫu đi ly tâm 15 phút ở 10000 rpm. Sử dụng ống eppendorf mới thêm 500 μL isopropanol và hút 500 μL phần dung dịch bên trên cho vào, trộn đều và ủ trong 45 phút ở nhiệt độ $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. ly tâm mẫu vừa ủ trong 10 phút 10000 rpm. Loại bỏ dịch nổi giữ phần kết tủa lắng tụ bên dưới. Để rửa sạch mẫu, hêm 1 mL ethanol 70% vào mỗi ống và tiến ly tâm trong 7 phút ở 10000 rpm, sau đó giữ lại kết tủa và loại bỏ phần. Rửa sạch mẫu phần 2, thêm vào mỗi ống 1 mL ethanol 70%, ly tâm trong 7 phút ở 10000 rpm. Sau đó, loại bỏ phần ethanol rồi để mẫu dưới quạt trần trong 1 giờ cho khô. Cuối cùng, bổ sung 200 μL H_2O deion và 1 μL enzyme Rnase vào.

2.2.4.2 Điện di DNA trên gel agarose

Kiểm tra DNA sau khi được tách chiết và tinh sạch bằng cách điện di trên gel agarose 1%. Sử dụng thuốc nhuộm Redsafe để nhuộm Gel (Biobasic, UK), và ghi nhận kết quả.

2.2.4.3 Khuếch đại DNA bằng phản ứng PCR

Thiết kế các cặp môi MatK và RbcL dựa trên thông tin về trình tự gen trên Ngân hàng Gen quốc tế (GenBank) rồi khuếch đại các đoạn trình tự DNA của cây Rau má (Bảng 2.2).

Tối ưu sử dụng điều kiện như sau để thực hiện phản ứng khuếch đại các đoạn gen: 20 μL tổng thể tích bao gồm: 10 μL MasterMix 2X; 1 μL DNA tổng số; 1 μL primer F; 1 μL primer R và 7 μL H_2O với chu trình nhiệt: chu kỳ biến tính (1 chu kỳ) trong 5 phút ở $94\text{ }^{\circ}\text{C}$; 35 chu kỳ(bao gồm: $94\text{ }^{\circ}\text{C}/45$ giây; $55\text{ }^{\circ}\text{C}/50$ giây; $72\text{ }^{\circ}\text{C}/1$ phút) và bước tổng hợp cuối cùng 5 phút ở $72\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sau đó sử dụng gel agarose 1% để kiểm tra sản phẩm PCR .

Bảng 2.1. Thông tin các môi sử dụng

Vùng DNA barcodes	Trình tự môi (5'-3')	Kích thước sản phẩm PCR (bp)
matK_F	ACCGTACTTTTATGTTTACGAGC	850
matK_R	TCCATCTRGAAATMTTRGTTCA	
rbcL_F	GCAAGTGTTGGATTCAAAGCTGGTG	600
rbcL_R	TGGTTGTGAGTTCACGTTCT	

2.2.4.4 *Tinh sạch sản phẩm PCR và giải trình tự*

Sử dụng ethanol 100% để làm sạch sản phẩm PCR. Các đoạn DNA được xác định trình tự trên hệ thống theo nguyên lý của Sanger. Sau khi thu được kết quả giải trình tự, sử dụng công cụ BLAST dùng cho việc nhận diện loài trên hệ thống ngân hàng gene NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

2.2.5 Phương pháp sắc ký bản mỏng

2.2.5.1 *Hoạt hóa bản mỏng*

Trước khi sử dụng cho các bản mỏng vào tủ sấy và sấy ở 115 °C trong 15 phút. Để nguội rồi bảo quản trong hộp kín. Tiến hành cắt bản mỏng, mỗi bản mỏng có độ dài 5 cm.

2.2.5.2 *Chuẩn bị bình khai triển*

Sử dụng bình thủy tinh có nắp đậy kín, hình trụ (bình khai triển). Thành bên trong của bình lót giấy lọc xung quanh, rót vào bình với lượng dung môi vừa đủ rồi lắc, để giấy lọc thấm đều dung môi với mục đích bão hòa dung môi trong bình. Khi còn lại một lớp dày từ 5 mm đến 10 mm lượng dung môi ở đáy bình sau khi thấm đều giấy lọc được gọi là phù hợp.

2.2.5.3 *Chấm chất phân tích lên bản mỏng*

Khối lượng chất đưa lên bản mỏng không quá lớn cũng không quá nhỏ ở dạng dung dịch trong nước, metanol, etc, hay dung môi thích hợp khác (khoảng 0,1-50 mg). Mỗi cây Rau má bao gồm 4 dịch chiết ethanol, n-Hexan, EtOAc, n- BuOH được chấm trên cùng một bản mỏng với các hệ dung môi khác nhau.

2.2.5.4 *Triển khai sắc ký*

Đặt bản mỏng sao cho các vết chấm phải ở trên bề mặt của lớp dung môi khai triển và gần như thẳng đứng với bình triển khai,

Bình khai triển được đậy kín và để yên. Khi dung môi đã triển khai được một đoạn quy định trên bản mỏng, dùng kẹp lấy bản mỏng ra khỏi bình, làm bay hơi dung môi còn đọng lại trên bản mỏng bằng máy sấy rồi hiện vết.

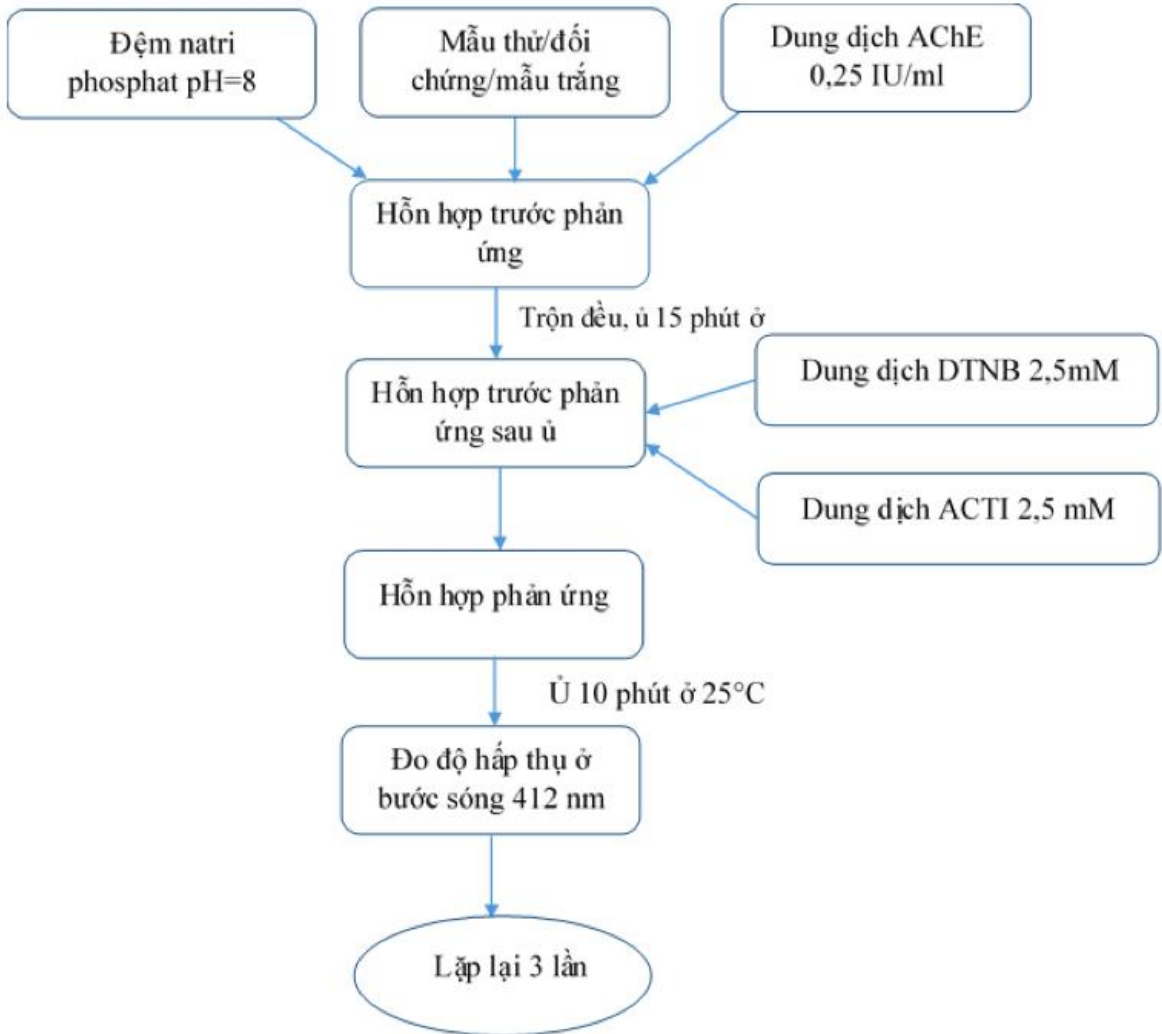
2.2.5.5 *Hiện vết trên bản mỏng*

Hiện vết bằng cả 2 cách phun thuốc thử Vanilin, Cerium(IV) sulfat và soi UV ở bước sóng 254 nm.

2.2.6 Phương pháp đánh giá khả năng ức chế enzym

Đầu tiên thêm mẫu vào các giếng tương ứng của đĩa 96 giếng: dung dịch enzym, dung dịch đệm natri phosphat pH=8, dung dịch mẫu thử hoặc mẫu

chúng. Trộn đều hỗn hợp các dung dịch và ủ trong 15 phút ở 25 °C. Tiếp đó, thêm vào hỗn hợp trên dung dịch cơ chất ACTI và dung dịch thuốc thử DTNB và trộn đều. Ủ hỗn hợp ở 25 °C trong 10 phút, tiếp theo, đo độ hấp thụ của dung dịch bước sóng 412nm bằng máy SpectraMax iD5 Multi-Mode Microplate Readers. Tiến hành lặp lại 3 lần với mỗi thử nghiệm. Sơ đồ quy trình thử nghiệm khả năng ức chế AChE của mẫu Rau má thể hiện ở hình 2.1.



Hình 2.1. Quy trình thử nghiệm khả năng ức chế AChE của mẫu Rau má

Phần trăm ức chế hoạt độ enzym AChE (% I- phần trăm hoạt tính AChE bị ức chế) được tính theo công thức:

$$\%I = \frac{Ac-At}{Ac-Ao} \times 100$$

Trong đó:

Ac: độ hấp thu của mẫu chứng (không chứa 100 μ l dung dịch thử)

Ao: độ hấp thu của mẫu trắng (1000 μ L dung dịch đệm natri phosphat)

At: độ hấp thu của mẫu thử

Sau đó tiến hành tính nồng độ của mẫu ức chế 50% hoạt tính enzym - giá trị IC₅₀ của các mẫu thử từ giá trị I% xác định được

2.2.7 Phương pháp nuôi cấy tế bào

Sử dụng các tế bào thần kinh chuột C6 nuôi trong môi trường DMEM (Dullbecco's modified Minimum Essential Medium), có bổ sung 10% huyết thanh bê tươi và dịch kháng sinh PS (100 μ g streptomycin sunfat/ml, penicillin 100 đơn vị penixilin/ml). Tế bào được nuôi trong tủ nuôi cấy 37 °C, 5% CO₂, môi trường nuôi cấy được thay đổi thường xuyên 2-5 ngày tùy theo sự phát triển của tế bào [68].

2.2.8 Phương pháp sàng lọc hoạt tính kéo dài sợi trục neurite

Các tế bào thần kinh được cấy trên đĩa 24 giếng với mật độ tế bào 8.000 cell/cm². Sau 24h, môi trường nuôi tế bào được thay bằng môi trường có bổ sung huyết thanh trong 6h. Sau đó các hợp chất cần nghiên cứu sẽ được bổ sung với các nồng độ không gây độc tế bào khác nhau từ thấp đến cao. DMSO được sử dụng làm mẫu đối chứng. Sau 24h khi đã thêm các mẫu dịch chiết ở các nồng độ khác nhau vào tế bào C6, đem đĩa tế bào 24 giếng đi chụp ảnh bằng kính hiển vi quang học. Khả năng kéo dài neurite được đánh giá thông qua chiều dài trung bình của các neurite (Các hình ảnh được xử lý bằng phần mềm Adobe Photoshop 7.0) từ 5 ảnh trên mỗi giếng. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần độc lập [69], [70].

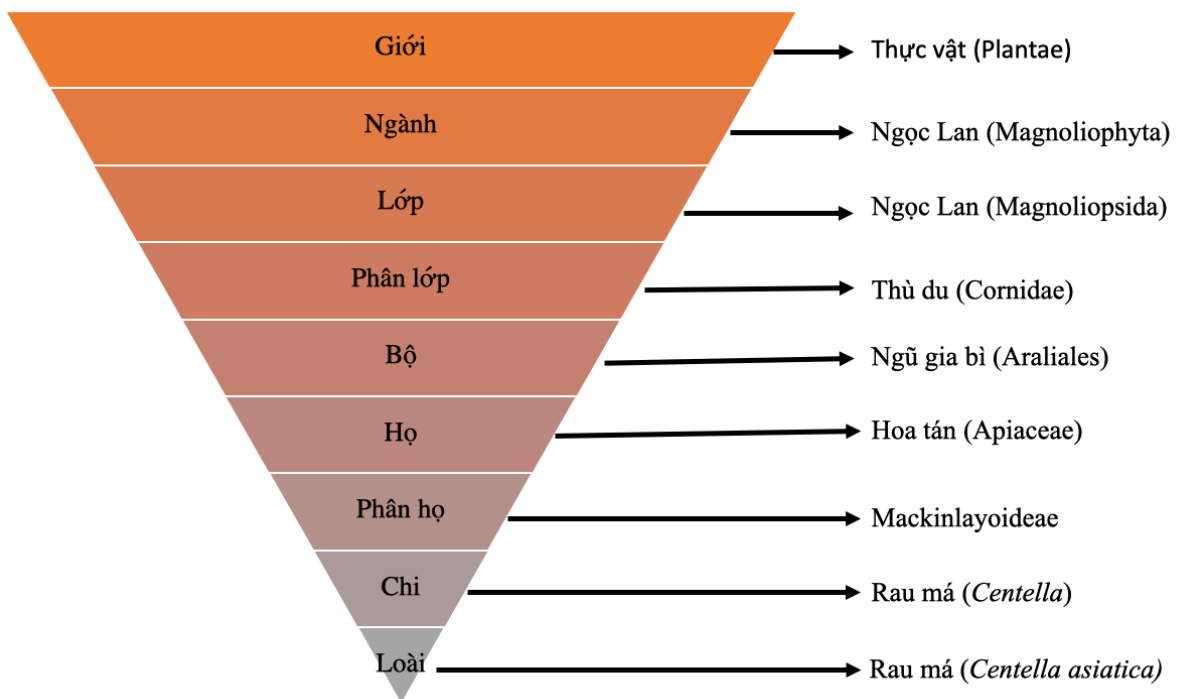
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 KẾT QUẢ ĐỊNH DANH MẪU CÂY RAU MÁ

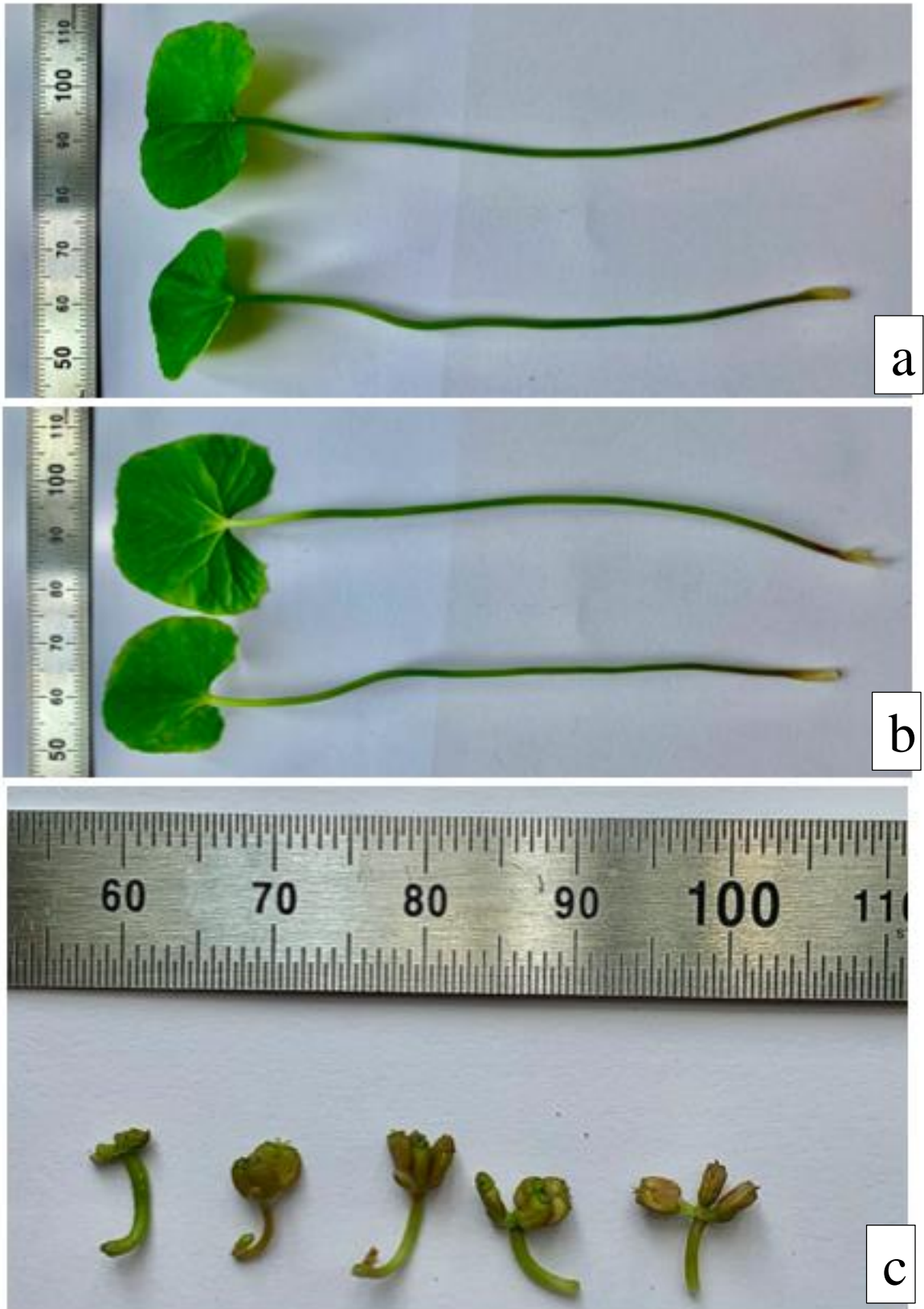
3.1.1 Mô tả đặc điểm hình thái

Mẫu cây Rau má được đối chứng với Từ điển thực vật thông dụng của Đỗ Tất Lợi năm 2004 và những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam của Võ Văn Chi năm 2004 [63], [64], có thể phân loại mẫu cây Rau má thu hoạch tại Sapa như bảng 3.1:

Bảng 3.1. Vị trí phân loại cây Rau má (*Centella asiatica*) [71]



Hình 3.1. Hình ảnh toàn cây Rau má



Hình 3.2. Hình ảnh lá và hoa cây Rau má

Chú thích: a. Mặt trước lá; b. Mặt sau lá; C. Hoa Rau má

Mẫu cây Rau má thu hoạch được có hình thái như sau:

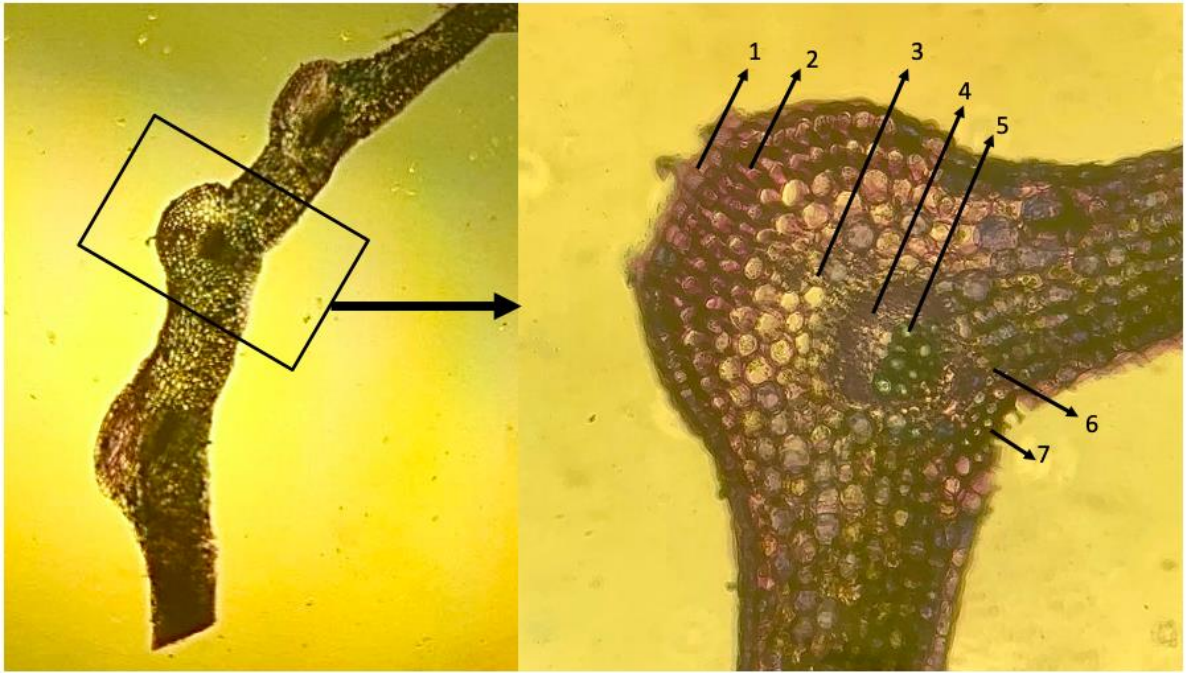
Bảng 3.2. Bảng miêu tả hình thái mẫu cây Rau má nghiên cứu

STT	Bộ phận cây	Đặc điểm
1	Lá	Tụ tập từ 2 đến 5 lá ở 1 mấu hoặc mọc so le. Phiến lá hình thận hoặc hình tròn, mép khía tai bèo. Lá rộng từ 2cm đến 6cm, gốc lá rộng, ngọn lá tròn, cuống lá tròn, đường kính từ 1mm đến 2mm, dài từ 6mm đến 12cm, trong rỗng, có màu xanh tím hoặc xanh lá, ở đáy cuống lá có hình bẹ phình ra ôm lấy thân, gân lá hình chân vịt.
2	Thân	Thân bò, mọc lan rộng trên đất, phân nhánh nhiều. Thân chia thành các đốt, có đường kính từ 1mm đến 1,5mm, mỗi đốt thân dài từ 8cm đến 12cm, có màu xanh tím hoặc xanh đậm. Thân lúc non thường nhẵn hoặc phủ lông mềm.
3	Rễ	Mọc từ các mấu của thân
4	Hoa	Mọc từ các mấu của thân, có từ 3 đến 5 hoa rất nhỏ ở mỗi mấu, hoa dài từ 3mm đến 5mm, lưỡng tính, đài tiêu giảm, cánh hoá phớt đỏ hoặc trắng, hình trứng hoặc tròn, rộng từ 1mm đến 2mm. Bầu nhụy 1 ô gồm 2 lá noãn dính với nhau ở phía trong. Nhị 5, chỉ nhị dài, xen giữa các cánh hoa.
5	Quả	Tròn dẹt, đường kính từ 2mm đến 3mm, mang theo vôi nhụy, có nhiều rãnh dọc, hạt dính chặt với vỏ quả

3.1.2 Đặc điểm vi phẫu

3.1.2.1 Vi phẫu lá

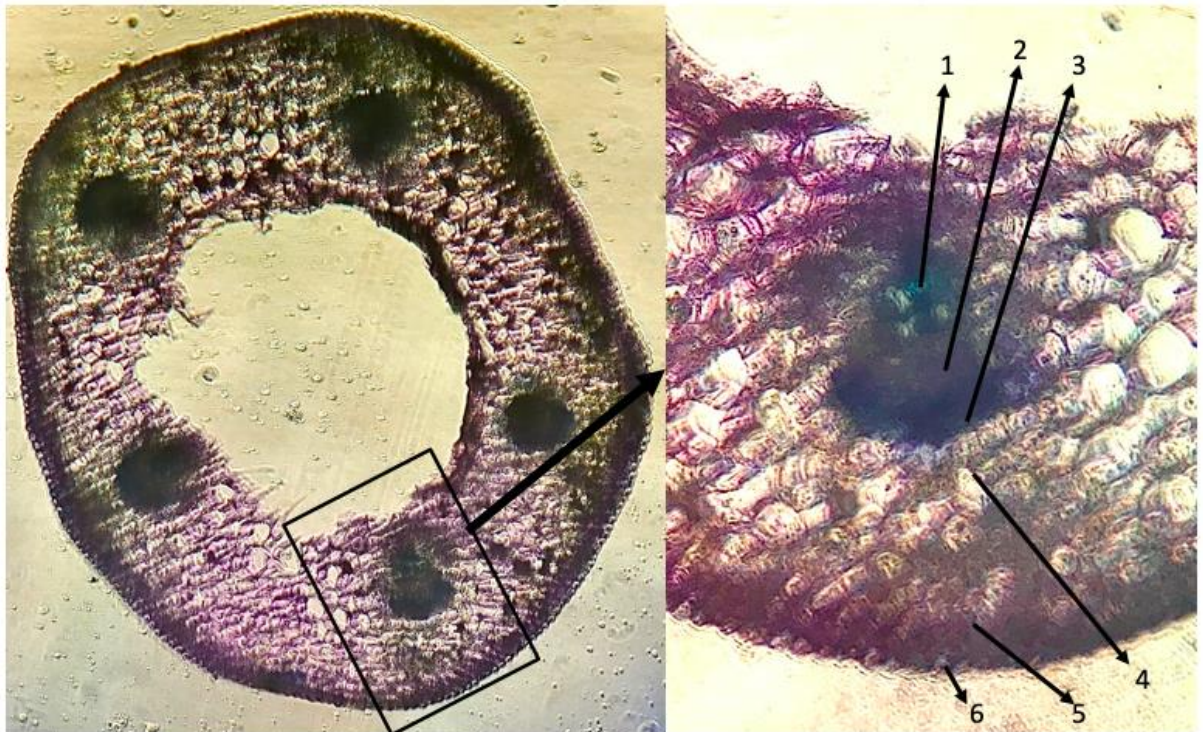
Miêu tả về vi phẫu lá cây Rau má: Các tế bào biểu bì nhỏ, hình chữ nhật. Gân giữa ở dưới lồi, trên hơi lõm. Hơi đi sâu vào phần gân giữa là các tế bào mô dậu. Nằm ngay dưới mô dậu là mô khuyết bao gồm nhiều lớp tế bào có vách uốn lượn, hình thuôn dài. Phần gỗ được các phần cung libe ôm lấy. Libe gồm nhiều lớp tế bào sắp xếp lộn xộn, kích thước nhỏ. Mạch gỗ hình tròn hoặc tương đối tròn có kích thước không đều. Mô mềm gỗ có vách cellulose, hình đa giác. Bên dưới lớp biểu bì là mô dày, gồm từ 3 đến 4 lớp tế bào có kích thước không đều, hình đa giác.



Hình 3.3. Vi phẫu lá cây Rau má

Chú thích: 1. Tế bào biểu bì dưới; 2. Mô khuyết; 3. Mô dậu; 4. Bó libe; 5. Mạch gỗ; 6. Mô dày. 7. Tế bào biểu bì trên;

3.1.2.2 Vi phẫu cuống

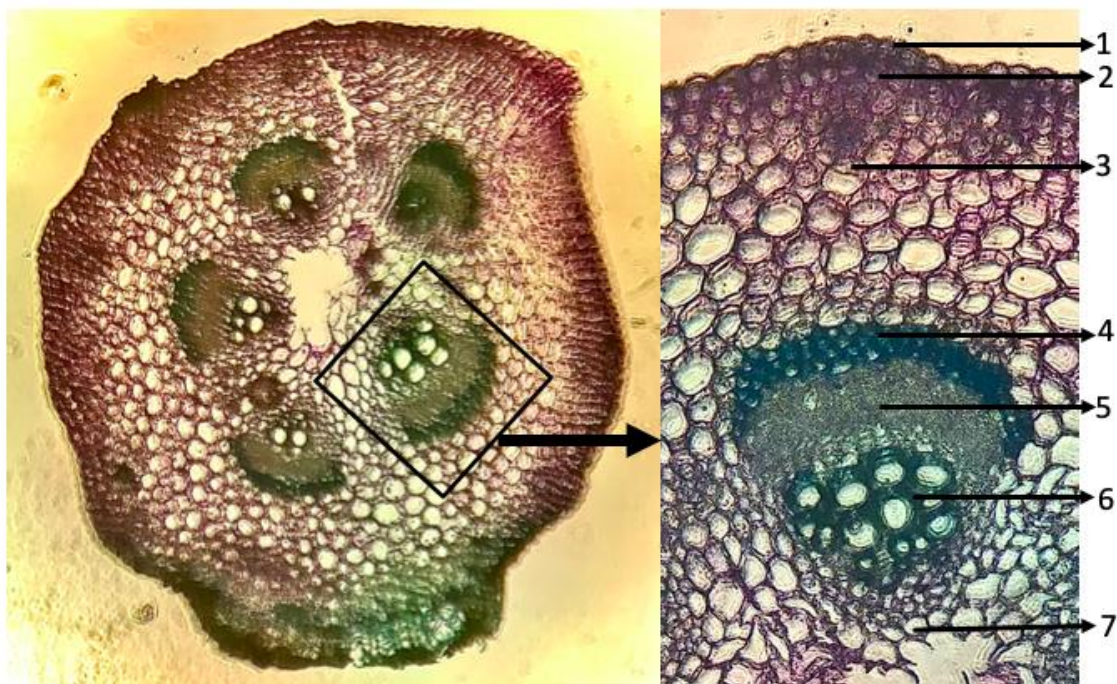


Hình 3.4. Vi phẫu cuống lá cây Rau má

Chú thích: 1. Mạch gỗ; 2. Mô cứng; 3. Libe; 4. Mô mềm; 5. Mô dày; 6. Biểu bì.

Miêu tả về vi phẫu cuống lá cây Rau má: Các bó libe gỗ sắp xếp dạng vòng, mỗi bó gồm một đám mạch gỗ lớn và mô cứng. Mô mềm bao gồm các tế bào to, màng mỏng, hình tròn hoặc gần tròn, ở giữa rỗng. Mô dày gồm các tế bào kích thước không đều, có từ 1 đến 3 lớp tế bào đa giác và nằm sát dưới biểu bì. Tiết diện gần tròn hơi khuyết ở mặt trên. Tế bào biểu bì hình chữ nhật, có các lỗ khí nằm rải rác.

3.1.2.3 Vi phẫu thân



Hình 3.5. Vi phẫu thân cây Rau má

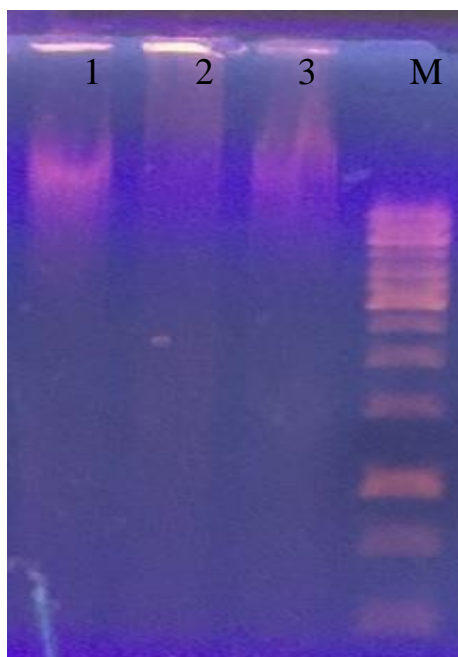
Chú thích: 1. Tế bào biểu bì; 2. Mô dày; 3. Mô mềm; 4. Libe; 5. Trụ bì hóa mô cứng; 6. Mạch gỗ; 7. Mô mềm ruột

Miêu tả về vi phẫu thân cây Rau má: Tế bào biểu bì hình chữ nhật có kích thước không đều xếp thành 1 hàng. Mô mềm ruột gồm các tế bào kích thước to, hình đa giác, không đều, thành mỏng. Mạch gỗ hình đa giác gần tròn hoặc tròn, to, mô mềm gỗ có kích thước nhỏ. Ngay dưới biểu bì là 1-4 lớp tế bào mô dày có thành dày. Mô mềm gồm các tế bào có hình đa giác gần tròn hoặc tròn, gồm 5-8 lớp, vách hơi uốn lượn. Trụ bì hóa mô cứng thành cụm trên libe gồm các tế bào hình đa giác có từ 2 đến 5 lớp. Libe gồm các tế bào đa giác có 5-6 lớp, xếp lộn xộn và kích thước nhỏ, vách uốn lượn.

Để tiếp tục khẳng định kết quả phân loại cây Rau má thu hoạch tại Sapa, luận văn tiếp tục thực hiện thí nghiệm về định danh loài bằng các phương pháp sinh học phân tử.

3.1.3 Tách chiết DNA tổng số và nhân dòng các đoạn gen

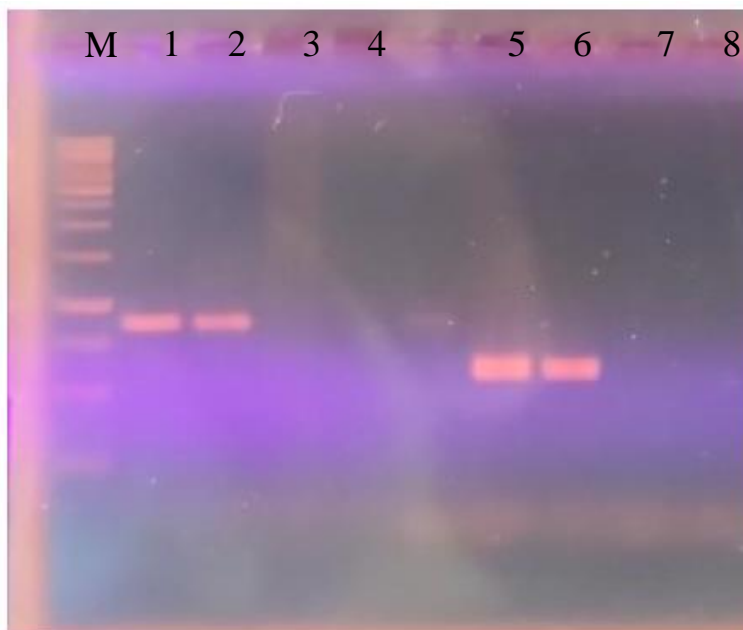
Sau khi tách chiết và tinh sạch, kiểm tra sản phẩm DNA tổng số bằng cách điện di trên gel agarose nồng độ 1%. Kết quả cho thấy trên giếng điện di chỉ xuất hiện một băng DNA sắc nét, có trọng lượng phân tử cao, chứng tỏ các mẫu DNA thu được đạt được chất lượng tốt, đảm bảo yêu cầu để thực các bước nghiên cứu tiếp theo (Hình 3.6).



Hình 3.6. Hình ảnh điện di DNA tổng số của mẫu cây Rau má

Chú thích: M. Marker 1kb hãng Biolabs; 1-3. Mẫu cây Rau má

Sau khi được xác định mức độ hấp thụ tử ngoại DNA tổng số của các mẫu (OD) bằng máy đo quang phổ, DNA tổng số của các mẫu được pha loãng để làm khuôn cho PCR với các cặp mồi đặc hiệu đã được thiết kế (Bảng 2.2). Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1% cho thấy các cặp mồi *rbcL* và *matK* đã được sử dụng thành công trong việc nhân bản, khuếch đại các đoạn gen mong muốn từ DNA của mẫu cây Rau má. Các sản phẩm PCR này được tinh sạch sử dụng cho phản ứng xác định trình tự gen (Hình 3.7).



Hình 3.7. Kết quả điện di sản phẩm PCR các vùng *RbcL*, *matK* của cây Rau má

Chú thích: M. Marker 1kb hãng Biolabs; 1-2. Mồi *MatK*; 3,4,7,8. Đối chứng âm; 5-6. Mồi *RbcL*

Mẫu cây Rau má sau khi được làm sạch tiến hành tách DNA để giải trình tự xác định tên khoa học của cây, kết quả thể hiện dưới đây:

Giải trình tự gen mẫu cây Rau má thu hoạch tại Sapa với mồi *MatK_F* (ký hiệu RM.SP,MatKF) có trình tự sau sửa lỗi bằng phần mềm Bioedit như sau:

>RM.SP.MatKF:

```

ATTTCTGCATATACGCCCAAATCGGTCAATAATATCAGAATCTGATAAAT
CGGCCCAAACCACCTTACTAATAGGATGCCCAAACATGTTACAAAATTTTCGCT
TTAGCCAATGATGCAATCAGAGGAATAATTGGAATAAGAGTATCGAACTTATT
AATAGTATTATCAATTAGAAATGAATTTTCTAGCATTGACCGCGTACCATTGA
AGGGTTTAGCCGTGCACTTGATAGATAGCCCAGAAAGTCGAGCGAATAATTAG
ATAATTGGTTTATACAGATCCTTCTCGGTTGAGACCACAGGTAAAAATGACAT
TGCCATAAATTAACAAAGTAATATACCCATTTTTTCATCAAAGAGGCGTCCCT
TTTGATGTGAGAATTGATTTTCCTTGATACCTAACGTAATGCATGAAAGGATCC
TTCAATAACCATAGATTGACTTGAAAAGCCTTAGCAAAGACTTCTCCAAGATG
TTCTATTTTTCCATAGAAATATACTCGTTCAAGAAGGGTTCTAGAAGATGTTGA
GCGTAAATGAGAAGATTGGTTGCGGAAAAAGACGAAGATGGATTCGTATTCA
CATAGATAAGAATTATATAGGAAGAAGAAGAATCTTTGAGATCTTTTTGAAAA
AGAAGAAGTGGCTTTATTTGAAGTATTCCAATTACGATACTCGTAGAGAAGGA
GTCGTAATAAATGCAAAGAAGAAGCATTTTTAACCAGTAGCGAAGAATTGA
ACCAATATTCCCAGATGGAAA

```

Sau khi giải trình tự mẫu DNA với mồi *MatK-F*, so sánh kết quả trình tự mẫu cây Rau má với trình tự đã công bố trên ngân hàng gen thế giới bằng cách sử dụng công cụ NCBI/Blast để (hình 3.8).

Sequences producing significant alignments									
Download Select columns Show 100									
select all 100 sequences selected									
GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer									
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession	
Centella asiatica chloroplast_complete genome	Centella asiatica	1395	1395	99%	0.0	99.74%	154771	MN854377.1	
Centella asiatica voucher CMPR8787 maturase K (matK) gene, partial cds: chloroplast	Centella asiatica	1395	1395	99%	0.0	99.74%	858	MN886299.1	
Centella asiatica voucher PS1212MT04 maturase K (matK) gene, partial cds: chloroplast	Centella asiatica	1395	1395	99%	0.0	99.74%	803	GQ434230.1	
Centella asiatica voucher PS1212MT01 maturase K (matK) gene, partial cds: chloroplast	Centella asiatica	1395	1395	99%	0.0	99.74%	785	GQ434229.1	
Centella asiatica voucher PS1212MT05 maturase K (matK) gene, partial cds: chloroplast	Centella asiatica	1391	1391	99%	0.0	99.74%	798	GQ434231.1	
Centella asiatica voucher Trotta950361 maturase K (matK) gene, partial cds: chloroplast	Centella asiatica	1389	1389	99%	0.0	99.61%	814	MH621592.1	
Centella virgata maturase K (matK) gene, partial cds: chloroplast	Centella virgata	1369	1369	98%	0.0	99.60%	813	KP110015.1	
Centella lanata maturase K (matK) gene, partial cds: chloroplast	Centella lanata	1358	1358	98%	0.0	99.33%	813	KP110012.1	
Centella asiatica chloroplast gene for maturase K, partial cds, isolate: CHULA-012	Centella asiatica	1332	1332	94%	0.0	100.00%	747	LC461754.1	
Centella asiatica isolate shawpc0933K maturase K (matK) gene, partial cds: chloroplast	Centella asiatica	1330	1330	94%	0.0	100.00%	786	JN407217.2	
Centella restioides maturase K (matK) gene, partial cds: chloroplast	Centella restioides	1327	1327	96%	0.0	99.32%	796	KP110013.1	
Centella asiatica isolate OSBAR 000593 maturase K (matK) gene, partial cds: chloroplast	Centella asiatica	1325	1325	94%	0.0	99.86%	738	MH552079.1	
Centella asiatica isolate shawpc1021K maturase K (matK) gene, partial cds: chloroplast	Centella asiatica	1325	1325	93%	0.0	100.00%	782	JN407219.2	
Centella asiatica isolate shawpc0944K maturase K (matK) gene, partial cds: chloroplast	Centella asiatica	1319	1319	93%	0.0	100.00%	775	JN407218.1	
Centella asiatica voucher TuTY1530 maturase K (matK) gene, partial cds: chloroplast	Centella asiatica	1317	1317	93%	0.0	100.00%	777	MH768044.1	
Centella asiatica voucher US:Suissa158 maturase K (matK) gene, partial cds: chloroplast	Centella asiatica	1310	1310	92%	0.0	100.00%	766	MH748933.1	
Centella villosa maturase K (matK) gene, partial cds: chloroplast	Centella villosa	1310	1310	94%	0.0	99.45%	779	KP110014.1	
Centella difformis maturase K (matK) gene, partial cds: chloroplast	Centella difformis	1310	1310	94%	0.0	99.45%	779	KP110011.1	
Centella asiatica voucher LTM030 maturase K (matK) gene, partial cds: chloroplast	Centella asiatica	1308	1308	93%	0.0	99.86%	756	JQ024945.1	
Centella asiatica voucher HXX18428 maturase K (matK) gene, partial cds: chloroplast	Centella asiatica	1304	1304	92%	0.0	100.00%	766	MH768043.1	

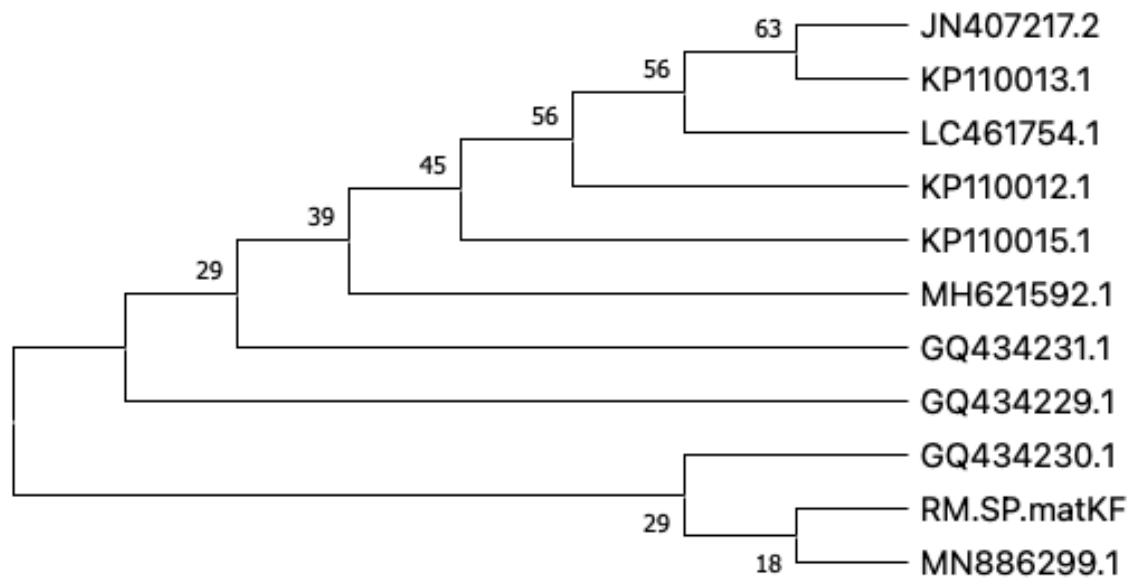
Hình 3.8. Kết quả so sánh trình tự bằng NCBI_BLAST sử dụng môi MatK_F

Bảng 3.3. Kết quả tóm tắt Blast search trình tự gen RM.SP.MatKF

STT	Ký hiệu chủng	Tên loài trên genbank	Độ bao phủ (%)	Tỷ lệ tương đồng (%)
1	MN886299.1	<i>Centella asiatica</i>	99	99.74
2	GQ434230.1	<i>Centella asiatica</i>	99	99.74
3	GQ434229.1	<i>Centella asiatica</i>	99	99.74
4	GQ434231.1	<i>Centella asiatica</i>	99	99.74
5	MH621592.1	<i>Centella asiatica</i>	99	99.61
6	KP110015.1	<i>Centella virgata</i>	98	99.60
7	KP110012.1	<i>Centella lanata</i>	98	99.33
8	LC461754.1	<i>Centella asiatica</i>	94	100
9	JN407217.2	<i>Centella asiatica</i>	94	100
10	KP110013.1	<i>Centella restioides</i>	96	99.32

Kết quả cho thấy trình tự gen thu được tương đồng với trình tự loài *Centella asiatica* (L.) Urban (ký hiệu chủng: MN886299.1) đã công bố với tỷ lệ tương đồng lên tới 99.74%.

Từ các trình tự tham khảo thu được và trình tự nghiên cứu, tiếp tục xây dựng cây phân loại bằng phần mềm MegaX, cây phân loại thể ở hình 3.9.



Hình 3.9. Cây phân loại trình tự gen *RM.SP.MatKF* với các trình tự tham khảo trên genbank

Với dữ liệu lấy về từ NCBI ta dùng phần mềm MEGA6 ta xây dựng được cây phả hệ như trên, cây phả hệ trên thể hiện mối quan hệ di truyền của 10 loài có độ bao phủ và tỷ lệ tương đồng nhất với mẫu nghiên cứu, các loài trên cùng thuộc chi *Centella* và được chia thành 2 nhánh lớn:

- Nhánh lớn thứ nhất gồm: *RM.SP.MatKF*; *MN886299.1*; *GQ434230.1*
- Nhánh lớn thứ 2 chia thành các nhánh nhỏ bao gồm các loài còn lại.

Giải trình tự gen mẫu cây Rau má thu hoạch tại Sapa với môi *RbcL-F* (ký hiệu *RM.SP.RbcLF*) có trình tự sau sửa lỗi bằng phần mềm Bioedit như sau:

>*RM.SP.RbcLF*

```
CTGCCGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACACTGTGTGGACCGACGGACTT
ACCAGCCTTGATCGTTACAAAGGGCGATGCTACGGAATCGAGCCCGTTCCTGG
AGAAGAAAATCAATTTATTGCTTATGTAGCTTACCCATTAGACCTTTTTGAAGA
AGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTTGGTAATGTATTTGGGTTCAA
AGCCCTGCGTGCCCTACGTCTGGAAGATCTGCGAATCCCTGTTGCTTATGTGAA
AACTTTCCAAGGCCCGCCTCATGGTATCCAAGTTGAAAGAGATAAATTGAACA
AGTATGGTCGTCCCTGTTGGGATGTACTATTAACCTAAATTGGGGTTATCCG
CTAAAAACTACGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTCCGCGGTGGACTTGATTTT
ACCAAAGACGATGAGAACGTGAACTCACAACCAA
```

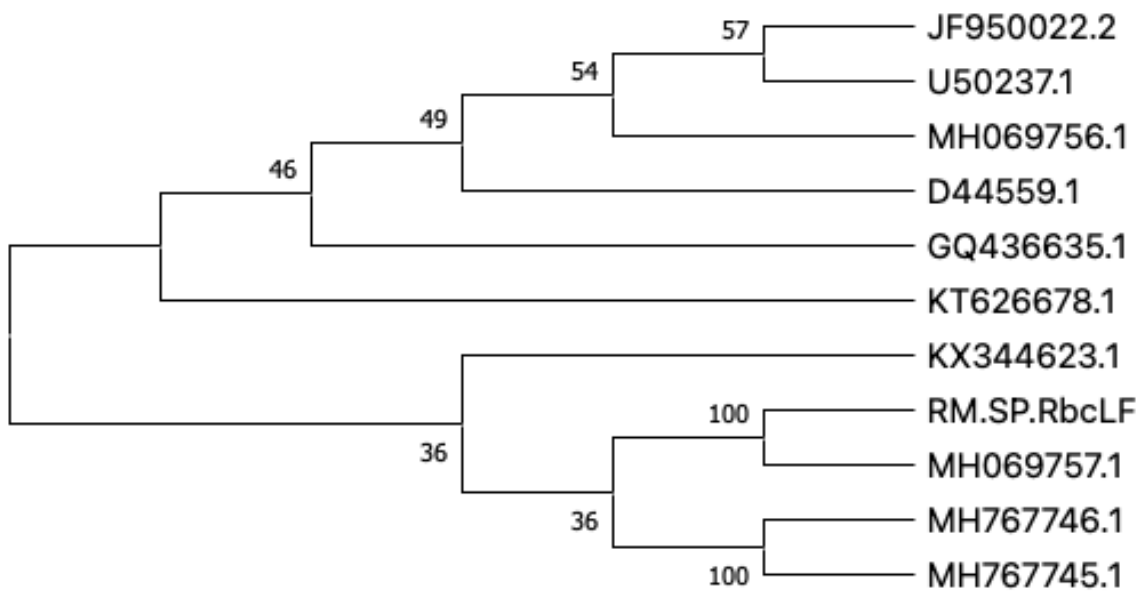
Sau khi giải trình tự mẫu DNA với môi *RM.SP.RbcLF*, tiếp tục so sánh kết quả trình tự mẫu cây Rau má với trình tự đã công bố trên ngân hàng gen thế giới bằng cách sử dụng công cụ NCBI/Blast để (hình 3.10).

Sequences producing significant alignments		Download	Select columns	Show	100				
Description		Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Centella asiatica chloroplast, complete genome	Centella asiatica	841	841	99%	0.0	99.78%	154771	MN854377.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Centella asiatica voucher A2878 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene...	Centella asiatica	841	841	99%	0.0	99.78%	605	MH069757.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Centella asiatica voucher TuTY1530 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) g...	Centella asiatica	841	841	99%	0.0	99.78%	1248	MH767746.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Centella asiatica voucher HXX18428 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) g...	Centella asiatica	841	841	99%	0.0	99.78%	1247	MH767745.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Centella asiatica isolate SBB-1370 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase (rbcL) gene, partial cds:...	Centella asiatica	841	841	99%	0.0	99.78%	621	KX344623.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Centella uniflora voucher CHR:625866 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL)...	Centella uniflora	841	841	99%	0.0	99.78%	1046	KT626678.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Centella asiatica voucher PS1212MT01 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL)...	Centella asiatica	841	841	99%	0.0	99.78%	703	GQ436635.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Centella asiatica chloroplast gene for ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial...	Centella asiatica	841	841	99%	0.0	99.78%	1244	D44559.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Centella asiatica voucher A2401 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene...	Centella asiatica	835	835	99%	0.0	99.56%	605	MH069756.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Centella asiatica voucher P6849 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene...	Centella asiatica	833	833	98%	0.0	100.00%	573	JF950022.2
<input checked="" type="checkbox"/>	Micropleura renifolia ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene, chloroplast...	Micropleura renif...	815	815	99%	0.0	98.69%	1437	U50237.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Centella erecta ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene, chloroplast gene...	Centella erecta	813	813	99%	0.0	98.25%	1437	U50233.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Oplopanax elatus voucher CPG00007 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL)...	Oplopanax elatus	791	791	99%	0.0	97.82%	1296	KX527035.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Heptapleurum heptaphyllum chloroplast, complete genome	Heptapleurum h...	791	791	99%	0.0	97.82%	156685	KT748629.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Macropanax dispermus isolate BB0970 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL)...	Macropanax dis...	791	791	99%	0.0	97.82%	607	KR529633.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Heteropanax fragrans isolate J430 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gen...	Heteropanax fra...	791	791	99%	0.0	97.82%	632	KR529424.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Brassaiopsis glomerulata isolate BB1032 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbc...	Brassaiopsis glo...	791	791	99%	0.0	97.82%	597	KR528869.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Brassaiopsis glomerulata isolate BB0851 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbc...	Brassaiopsis glo...	791	791	99%	0.0	97.82%	611	KR528868.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Brassaiopsis glomerulata isolate BB0850 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbc...	Brassaiopsis glo...	791	791	99%	0.0	97.82%	605	KR528867.1

Hình 3.10. Kết quả so sánh trình tự bằng NCBI_BLAST sử dụng môi RbcL_F

Bảng 3.4. Kết quả tóm tắt Blast search trình tự gen RM.SP.RbcLF

STT	Ký hiệu chủng	Tên loài trên genbank	Độ bao phủ (%)	Tỷ lệ tương đồng (%)
1	MH069757.1	<i>Centella asiatica</i>	99	99.78
2	MH767746.1	<i>Centella asiatica</i>	99	99.78
3	MH767745.1	<i>Centella asiatica</i>	99	99.78
4	KX344623.1	<i>Centella asiatica</i>	99	99.78
5	KT626678.1	<i>Centella uniflora</i>	99	99.78
6	GQ436635.1	<i>Centella asiatica</i>	99	99.78
7	D44559.1	<i>Centella asiatica</i>	99	99.78
8	MH069756.1	<i>Centella asiatica</i>	99	99.56
9	JF950022.2	<i>Centella asiatica</i>	98	100
10	U50237.1	<i>Micropleura renifolia</i>	99	98.69



Hình 3.11. Cây phân loại trình tự gen *RM.SP.RbcLF* với các trình tự tham khảo trên genbank

Sử dụng trình tự gen thu được với môi RbcL-F, đề tài tiếp tục xây dựng cây phả hệ trên thể hiện mối quan hệ di truyền của 10 loài có độ bao phủ và tỷ lệ tương đồng nhất với mẫu nghiên cứu, trong đó có 9 loài cùng thuộc chi *Centella*, 1 loài thuộc chi *Micropleura*. Nhìn vào cây phả hệ thấy được các loài so sánh được chia thành 2 nhánh lớn:

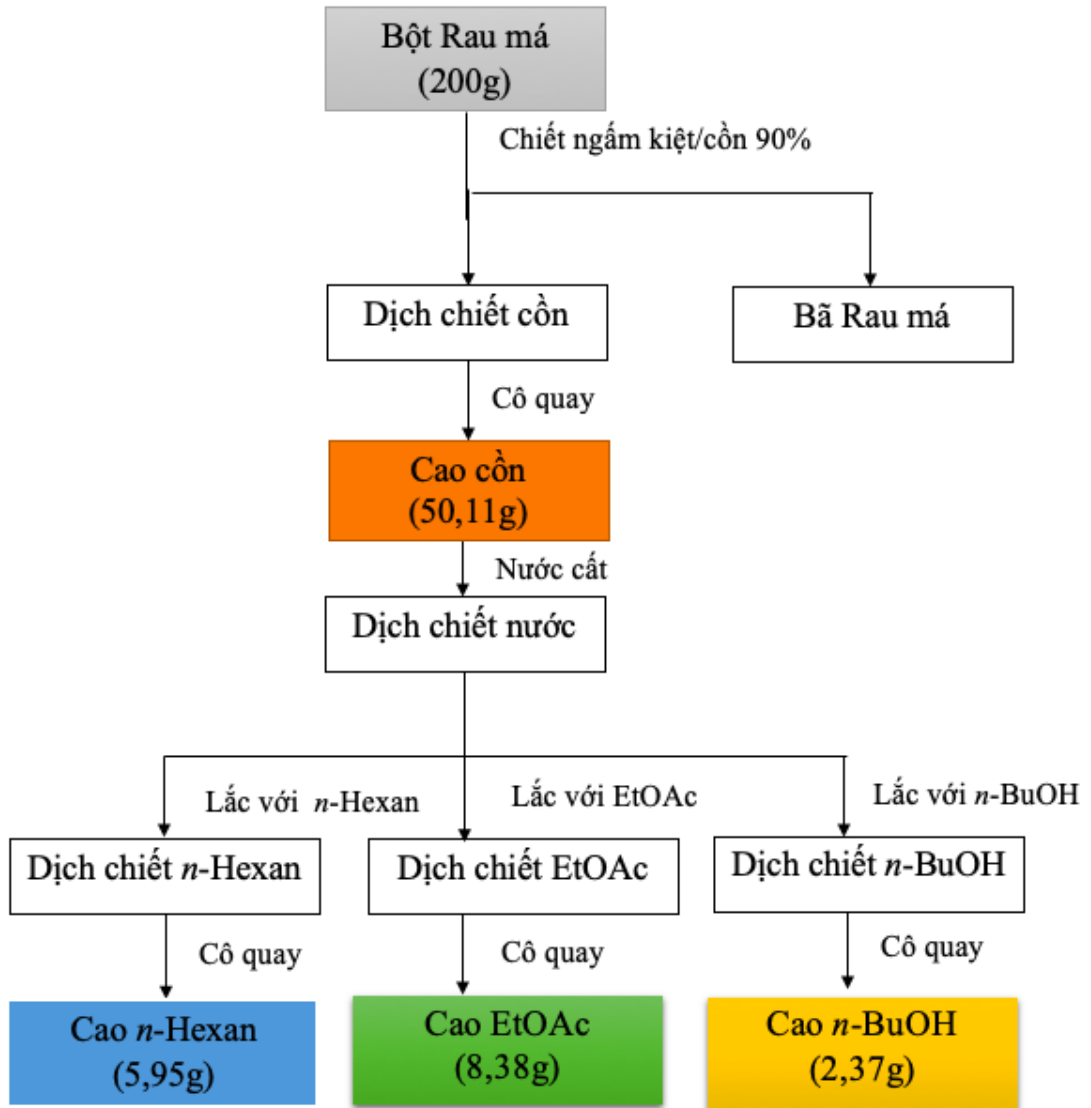
- Nhánh lớn thứ nhất gồm: MH069757.1; MH767746.1; MH767745.1; KX344623.1 và mẫu Rau má nghiên cứu RM.SP.RbcLF
- Nhánh lớn thứ 2 chia thành các nhánh nhỏ bao gồm các loài còn lại.

Kết quả cho thấy trình tự gen của mẫu cây Rau má nghiên cứu thu được sau khi giải trình tự với môi RbcL-F tương đồng với trình tự loài *Centella asiatica* (L.) Urban (ký hiệu chủng: MH069757.1) đã công bố với tỷ lệ tương đồng lên tới 99.78%. Cùng với kết quả giải trình tự gen mẫu nghiên cứu với môi MatK-F cho thấy đây là cơ sở tin cậy để khẳng định tên khoa học của cây Rau má được thu hái ở Sa Pa, Lào Cai vào tháng 4/2021 là: *Centella asiatica* (L.) Urban thuộc họ Hoa tán (Apiaceae). Kết quả này phù hợp và bổ sung cho việc phân loại mẫu cây Rau má dựa vào các đặc điểm hình thái.

3.2 KẾT QUẢ ĐIỀU CHẾ CÁC PHÂN ĐOẠN DỊCH CHIẾT

3.2.1 Điều chế các phân đoạn dịch chiết

Luận văn đã lựa chọn phương pháp chiết lỏng-lỏng đơn giản và phù hợp, thường sử dụng nhiều cho việc điều chế các phân đoạn dịch chiết của cây dược liệu. Tóm tắt quy trình thu cao phân đoạn, chiết xuất theo sơ đồ hình 3.12.



Hình 3.12. Sơ đồ chiết xuất phân đoạn mẫu cây Rau má

Lựa chọn dung môi thân thiện, thường được sử dụng trong việc điều chế các phân đoạn dịch chiết của cây Rau má là ethanol 90%. Quy trình chiết như sau: cây Rau má sau khi sơ chế (200 gram) được cho vào bình thủy tinh. Dung môi chiết cồn 90% được cho vào ngập cây Rau má 2-3 cm [lần 1 là 3V (0,9 L), lần 2-3 là 2V (0,6 L)]. Mẫu cây Rau má được ngâm 3 giờ trong máy siêu âm ở nhiệt độ 55 °C. Sau đó, tiến hành lọc bã cây Rau má qua giấy lọc, chiết kiệt đến

khi dịch chiết không còn chất. Dịch chiết được gom lại, trộn đều, cô quay dưới áp suất giảm đến kiệt.

Từ 200g bột Rau má, thu được cao chiết cồn (EtOH) có khối lượng 50,11g và chiếm 25,06% khối lượng khô. Trong nghiên cứu của Mathew và cộng sự năm 2014 đã sử dụng methanol để chiết xuất phân đoạn dược liệu cây Rau má, cao chiết thu được có khối lượng 63,5mg/g, tức chiếm 6,35% khối lượng khô [72]. Kết quả cho thấy chiết suất được liệu sử dụng dung môi ethanol cho hiệu suất cao; phương pháp đơn giản, ít dùng dung môi hữu cơ.

Chiết phân bố lỏng-lỏng với 3 dung môi EtOAc, *n*-Hexan và *n*-Butanol thu được 3 phân đoạn tương ứng như bảng 3.5, trong đó khối lượng phân đoạn dịch chiết EtOAc cao nhất đạt 8,38g sau đó là phân đoạn dịch chiết *n*-Hexan có khối lượng 5,95g, cuối cùng là phân đoạn dịch chiết *n*-Butanol có khối lượng 2,37g.

Bảng 3.5. Khối lượng các phân đoạn dịch chiết của cây Rau má

Tên	<i>n</i> -Hexan		EtOAc		<i>n</i> -Butanol	
	Khối lượng (g)	Hiệu suất chiết (%)	Khối lượng (g)	Hiệu suất chiết (%)	Khối lượng (g)	Hiệu suất chiết (%)
Cây Rau má	5,95	2,98	8,38	4,19	2,37	1,19

3.2.2 Kiểm tra thành phần phân đoạn dịch chiết bằng sắc ký bản mỏng

Tiến hành sắc ký bản mỏng các dịch chiết cây Rau má với các hệ dung môi:

F1 = CH₂Cl₂ – MeOH (9:1)

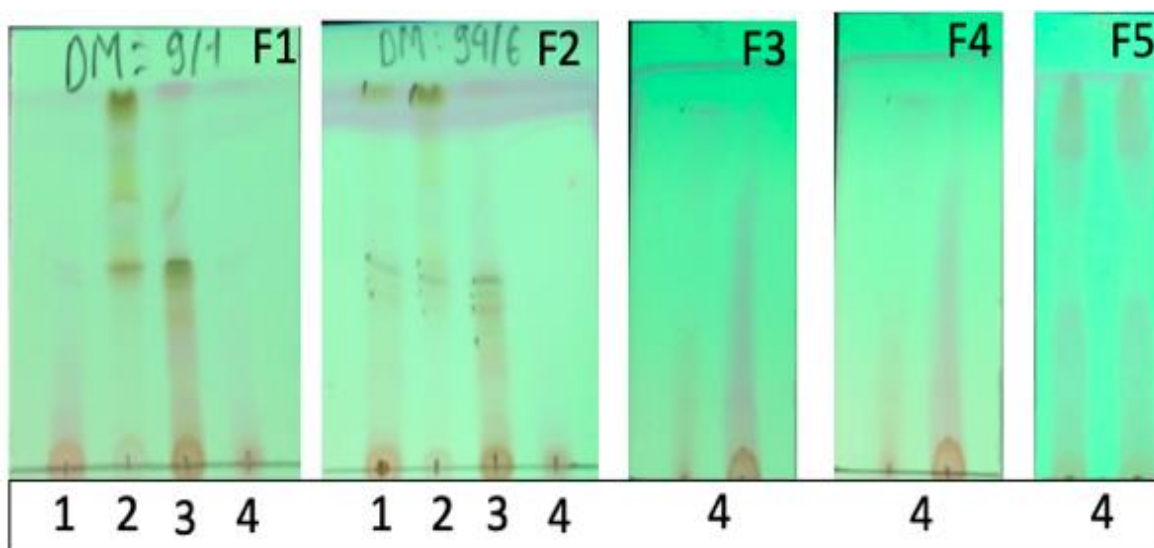
F2 = CH₂Cl₂ – MeOH (94:6)

F3 = CH₂Cl₂ – MeOH – Acid acetic (7:3: 1 giọt)

F4 = CH₂Cl₂ – MeOH – Acid acetic (6:4: 1 giọt)

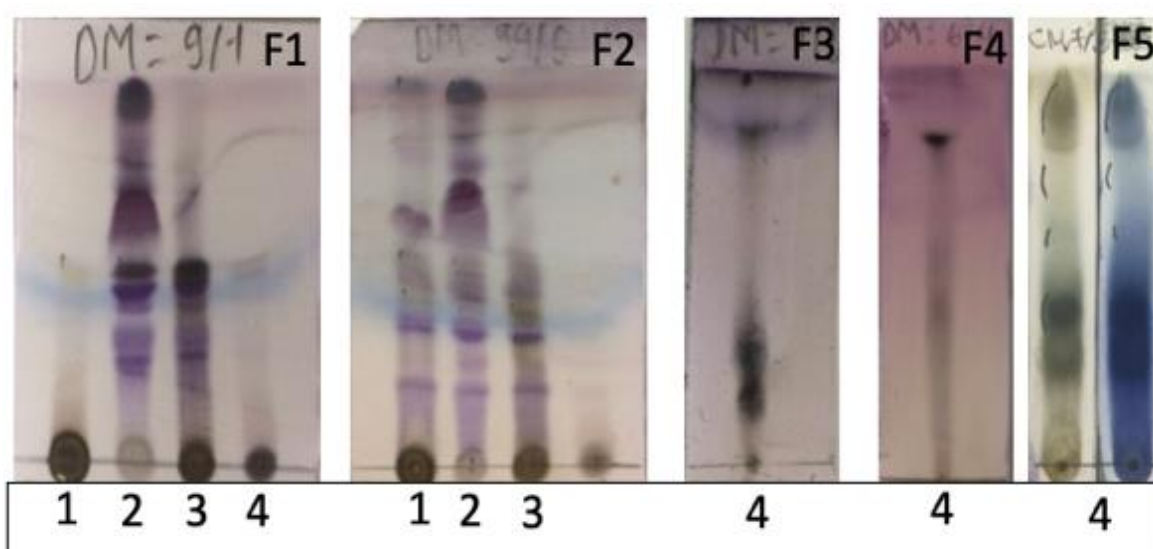
F5 = CH₂Cl₂ – MeOH – Acid acetic (7:3: 2 giọt)

Phát hiện: UV 254 nm; phun TT Vanilin, Cerium(IV) sulfate sấy ở 105 °C đến khi hiện màu, quan sát dưới ánh sáng thường.



Hình 3.13. Sắc kí đồ thăm dò hệ dung môi cho các dịch chiết cây Rau má với bước sóng UV 254nm

Chú thích: 1. Phân đoạn EtOH; 2. Phân đoạn *n*-Hexan; 3. Phân đoạn EtOAc; 4. Phân đoạn *n*-BuOH



Hình 3.14. Sắc kí đồ thăm dò hệ dung môi cho các dịch chiết cây Rau má với thuốc thử vanilin và Cerium(IV) sulfat

Chú thích: 1. Phân đoạn EtOH; 2. Phân đoạn *n*-Hexan; 3. Phân đoạn EtOAc; 4. Phân đoạn *n*-BuOH

Từ 5 hệ dung môi thăm dò thì hệ dung môi F2 = $\text{CH}_2\text{Cl}_2 - \text{MeOH}$ (94:6) cho kết quả tách tốt nhất đối với cặn *n*-Hexan; EtOAc. Các vết không bắt UV 254nm, hiện vanilin màu tím thường đặc trưng là nhóm chất triterpene hoặc sterol có trong cặn *n*-Hexan và cặn EtOAc, vết gọn và R_f thích hợp, vì vậy F2 được chọn làm hệ dung môi phát hiện vết trên sắc ký bản mỏng. Với cặn

Butanol phân cực hệ F2 = CH₂Cl₂ – MeOH (94:6) gần như chứa đầy được các nhóm chất phân cực lên. Do đó, cần tăng độ phân cực, hệ dung môi CH₂Cl₂ – MeOH – Axit axetic (7:3: 2 giọt) được lựa chọn để phân tách. Qua khảo sát thấy có sự phân tách. Cặn butanol có chứa các nhóm chất có hệ liên hợp pi-tanin, Flavoloid bắt UV 254 nm và khá phân cực.

Bảng 3.6. Kết quả định tính sơ bộ thành phần hoá học có trong các phân đoạn dịch chiết cây Rau má

Tên	Vanilin	Cerium(IV) sulfate	UV 254 nm
EtOH	+ (hiện vanilin màu vàng nhạt – thể hiện nhóm chất có hệ liên hợp pi)	+	+
n-Hexan	+ (hiện vanilin màu tím – thể hiện nhóm chất có triterpene hoặc sterol)	+	+
EtOA	+ (hiện vanilin màu tím – thể hiện nhóm chất có triterpene hoặc sterol)	+	+
Butanol	+ (hiện vanilin màu xanh-thể hiện nhóm chất có hệ liên hợp pi- tanin, Flavoloid)	+	+

3.3 KẾT QUẢ SÀNG LỌC HOẠT TÍNH ỨC CHẾ ENZYME ACETYLCHOLINESTERASE

3.3.1 Lựa chọn phân đoạn dịch chiết có khả năng ức chế hoạt tính enzyme acetylcholinesterase

Các phân đoạn dịch chiết *n*-BuOH, EtOH, EtOAc, *n*-Hexan được dùng để đánh giá khả năng ức chế hoạt tính enzyme acetylcholinesterase.

Thành phần hỗn hợp phản ứng được trình bày ở bảng 3.7.

Bảng 3.7. Thành phần hỗn hợp phản ứng

STT	Thành phần	Mẫu trắng của mẫu thử	Mẫu thử (A_t)	Mẫu trắng của chứng dương (μ l)	Mẫu chứng dương (A_c) (μ l)
1	AChE 0,25 IU/ml	0	100	0	100
2	Đệm natri phosphat pH= 8	800	700	800	700
3	Berberin clorid	0	0	100	100
4	Mẫu thử	100	100	0	0
5	DTNB 2,5 mM	50	50	50	50
6	ACTI 2,5 mM	50	50	50	50
Tổng thể tích		1000	1000	1000	1000

Hỗn hợp phản ứng bao gồm 100 μ l dung dịch enzym AChE 0,25 IU/ml, 100 μ l dung dịch thử ở các nồng độ khác nhau, 700 μ l dung dịch đệm natri phosphate (pH= 8,0). Sau đó sử dụng cuvet 1 cm, trộn đều và đem ủ tại 25 °C trong 15 phút. Sử dụng methanol để hoà tan chất chuẩn dương (Berberin chlorid) và các dịch chiết được thử. Sau đó, thêm 50 μ l ACTI 2,5mM, 50 μ l DTNB 2,5 mM, trộn đều. Ủ hỗn hợp ở 25 °C trong 10 phút. Sau đó, đo độ hấp thụ của dung dịch ở bước sóng 412 nm. Lặp lại 3 lần với tất cả các thí nghiệm.

Để khẳng định chính xác hơn khả năng ức chế enzyme acetylcholinesterase của các phân đoạn dịch chiết, tiến hành sàng lọc hoạt tính ức chế enzyme của cây Rau má ở nồng độ 1000 μ g/ml dựa trên giá trị I%. Kết quả I% được sắp xếp theo thứ tự từ bé đến lớn, được trình bày như trong bảng 3.8.

Bảng 3.8. Kết quả khảo sát I% của 4 cao chiết, ở nồng độ 1000 μ g/ml

STT	Tên mẫu	OD Lần 1	OD Lần 2	OD Lần 3	OD Trung bình	I%
1	Đối chứng dương Berberin	1.42	1.32	1.37	1.37	-

2	EtOAc	0.81	0.81	0.81	0.81	41.19
3	EtOH	0.82	0.77	0.85	0.82	42.90
4	<i>n</i> -Hexan	0.82	0.91	0.77	0.83	44.74
5	<i>n</i> -BuOH	0.83	0.80	0.84	0.86	47.83

Từ bảng 3.8 cho thấy giá trị I% của tất cả các phân đoạn dịch chiết đều trên 40%, hai phân đoạn dịch chiết *n*-Hexan và *n*-BuOH cho giá trị I% cao lần lượt: 44.74% và 47.83%. Do đó, hai phân đoạn dịch chiết *n*-Hexan và *n*-BuOH được lựa chọn để đánh giá khả năng ức chế hoạt tính enzyme acetylcholinesterase.

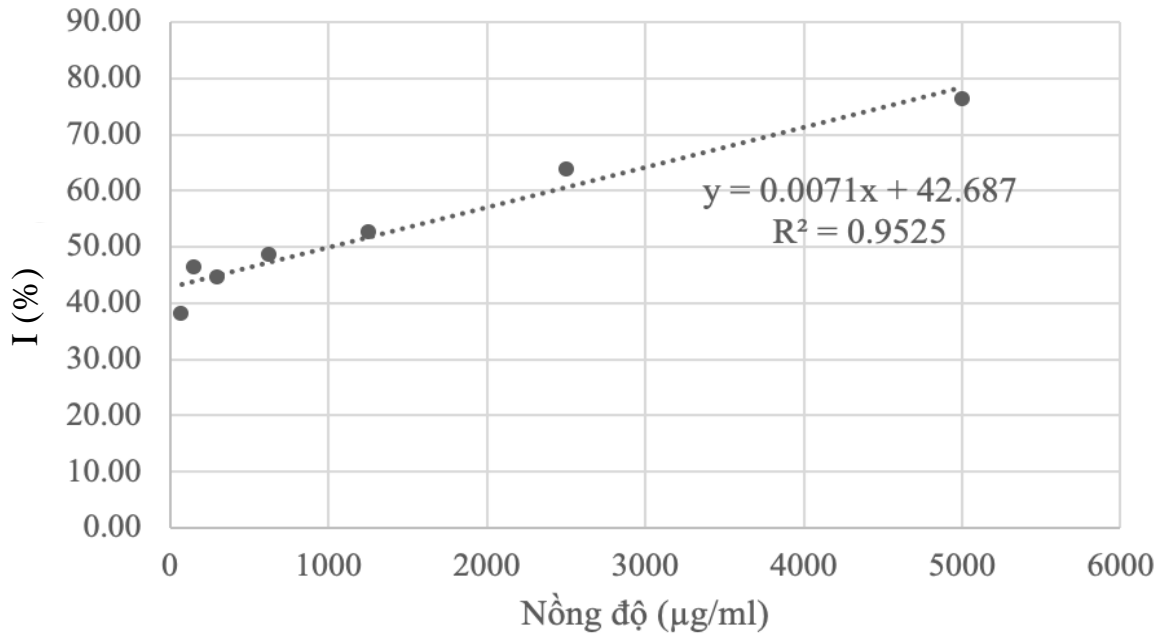
3.3.2 Đánh giá tác dụng ức chế enzyme acetylcholinesterase của phân đoạn dịch chiết *n*-Hexan và *n*-BuOH

Hai phân đoạn dịch chiết *n*-Hexan và *n*-BuOH tiếp tục được lựa chọn để phân tích sâu hơn về khả năng ức chế hoạt tính enzyme acetylcholinesterase tại 6 nồng độ khác nhau và được so sánh với chất chuẩn dương Berberin clorid dựa trên việc xây dựng đường chuẩn và tính IC₅₀.

- Đối với phân đoạn *n*-Hexan:

Bảng 3.9. Kết quả đo OD của mẫu Rau má dịch chiết n-Hexan ở 7 nồng độ khác nhau

Nồng độ (µg/ml)	OD Lần 1	OD Lần 2	OD Lần 3	OD Trung bình	I%
Đối chứng dương Berberin	1.42	1.32	1.37	1.37	–
5000	0.96	0.96	0.95	0.96	76.44
2500	0.90	0.88	0.85	0.88	63.71
1250	0.81	0.81	0.79	0.80	52.34
625	0.76	0.79	0.77	0.78	48.22
312,5	0.76	0.77	0.73	0.75	44.56
156,25	0.76	0.76	0.77	0.77	46.25
78,125	0.72	0.70	0.72	0.71	38.03

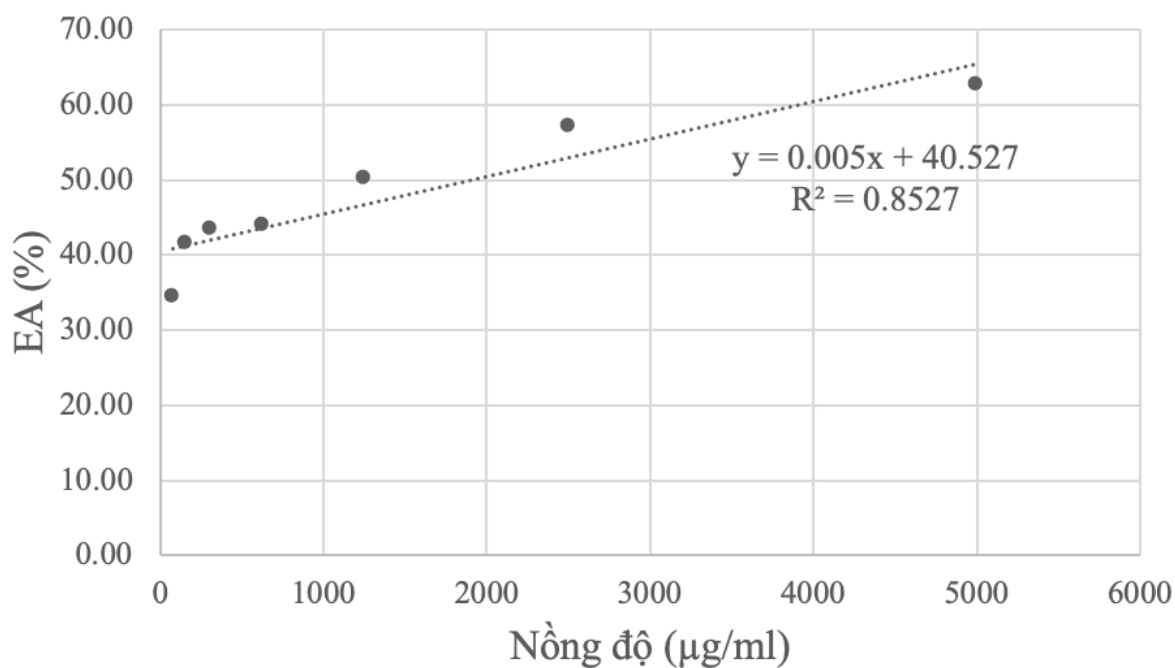


Hình 3.15. . Đồ thị biểu diễn sự tương quan giữa I% và nồng độ mẫu Rau má dịch chiết n-Hexan

- Đối với phân đoạn n-BuOH:

Bảng 3.10. Kết quả đo OD của mẫu Rau má dịch chiết n-BuOH ở 7 nồng độ khác nhau

Nồng độ (µg/ml)	OD Lần 1	OD Lần 2	OD Lần 3	OD Trung bình	I%
Đối chứng dương Berberin	14.21	13.24	13.68	13.71	–
5000	0.92	0.88	0.80	0.87	62.52
2500	0.86	0.84	0.81	0.84	57.16
1250	0.78	0.81	0.78	0.79	50.17
625	0.76	0.76	0.74	0.75	44.00
312.5	0.75	0.75	0.74	0.75	43.41
156.25	0.74	0.74	0.73	0.74	41.62
78.125	0.69	0.69	0.68	0.69	34.34

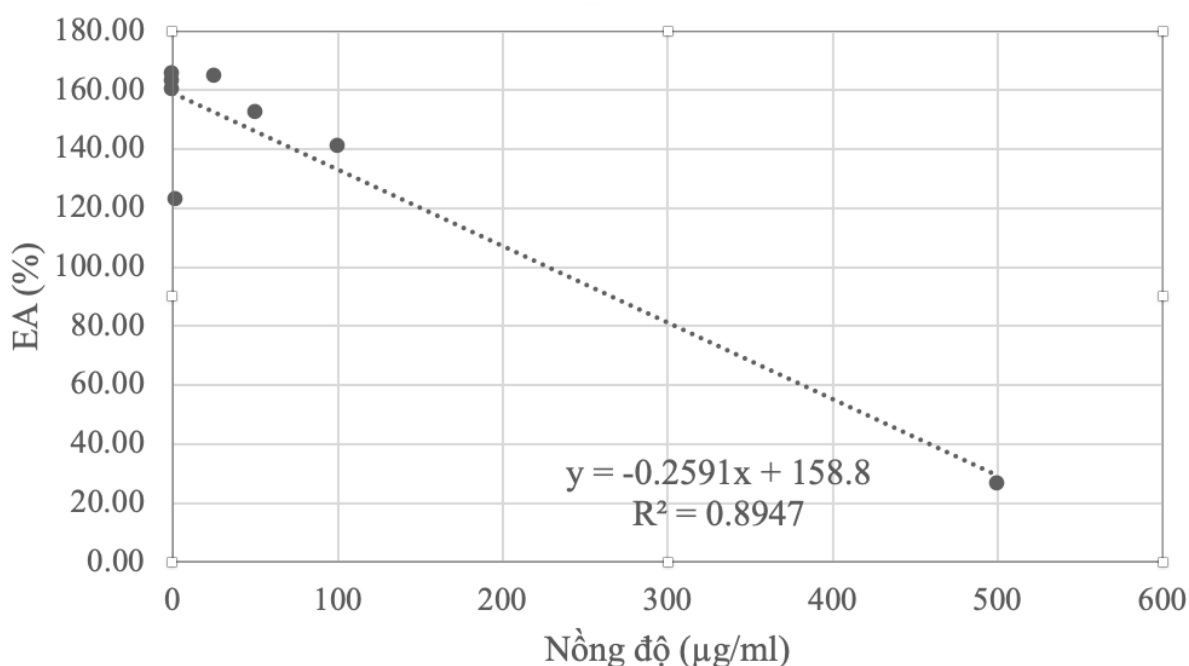


Hình 3.16. Đồ thị biểu diễn tương quan giữa I% và nồng độ mẫu Rau má dich chiết n-BuOH

- Đối với đối chứng dương Berberin clorid:

Bảng 3.11. Kết quả đo OD của đối chứng dương Berberin clorid ở 8 nồng độ khác nhau

Nồng độ (µg/ml)	OD Lần 1	OD Lần 2	OD Lần 3	OD Trung bình	I%
500	0.64	0.64	0.63	0.64	26.52
100	1.42	1.32	1.37	1.37	140.63
50	1.44	1.42	1.48	1.45	152.65
25	1.49	1.47	1.61	1.52	164.24
1.25	1.29	1.30	1.17	1.25	122.38
0.625	1.49	1.51	1.54	1.51	162.52
0.312	1.50	1.51	1.48	1.50	160.13
0.156	1.50	1.55	1.55	1.53	165.85



Hình 3.17. Đồ thị biểu diễn sự tương quan giữa I% và nồng độ đối chứng dương Berberin chloride

Từ đồ thị biểu diễn sự tương quan giữa nồng độ của các mẫu cây Rau má và I% cũng như nồng độ của đối chứng dương Berberin, ta có phương trình tuyến tính hoạt tính dạng $y = ax + b$. Thay $y = 50$ ta được kết quả IC_{50} như bảng 3.12 và hình 3.17.

Bảng 3.12. Kết quả xác định giá trị IC_{50} của các phân đoạn dịch chiết và Berberin clorid

Mẫu	Phương trình hồi quy	IC_{50} (µg/ml)
Berberin clorid	$y = -0,2591x + 158,8$	419,9
<i>n</i>-BuOH	$y = 0,005x + 40,527$	1894,6
<i>n</i>-Hexan	$y = 0,0071x + 42,687$	1029,9

Kết quả ở bảng 3.12 cho thấy các mẫu phân đoạn dịch chiết đều có tác dụng ức chế AChE ở mức độ khác nhau. Phân đoạn *n*-Hexan mẫu Rau má có tác dụng ức chế enzyme AChE với IC_{50} là 1030 µg/ml và dịch chiết *n*-BuOH mẫu Rau má có tác dụng ức chế enzyme AChE với IC_{50} là 1894,6 µg/ml. Phân đoạn *n*-Hexan của dịch chiết cây Rau má có tác dụng ức chế enzyme AChE cao nhất trong các phân đoạn có thể do phân đoạn này chứa các hợp chất khác nhau có hoạt tính sinh học, đặc biệt là nhóm chất saponin triterpene như asiaticoside và madecassoside. Kết quả tác dụng ức chế enzym AChE là do tác dụng hiệp

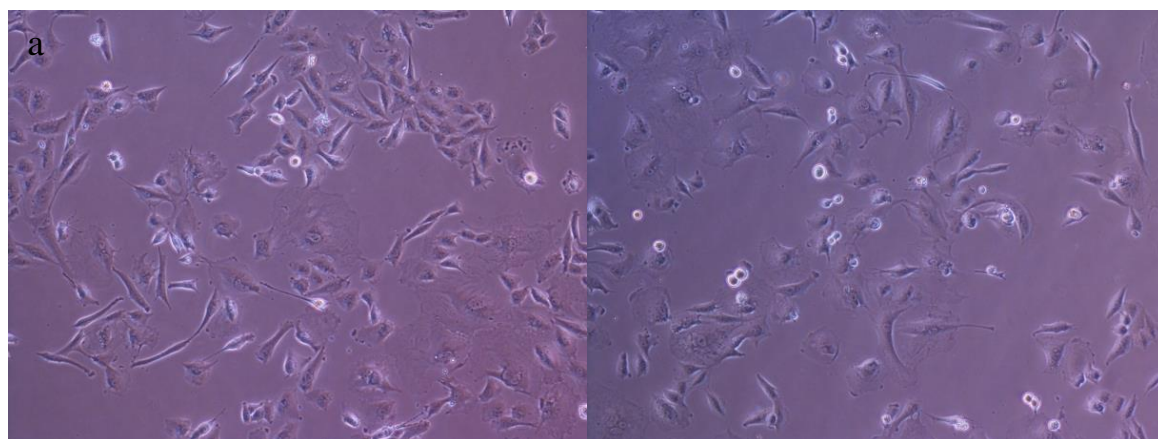
đồng của các hợp chất này trong phân đoạn dịch chiết *n*-Hexan. Do đó, các nghiên cứu sâu hơn cần được tiếp tục để phân lập và xác định các hợp chất có hoạt tính trong dịch chiết cây Rau má cụ thể là phân đoạn *n*-Hexan và làm rõ hơn cơ chế tác dụng của các hợp chất này.

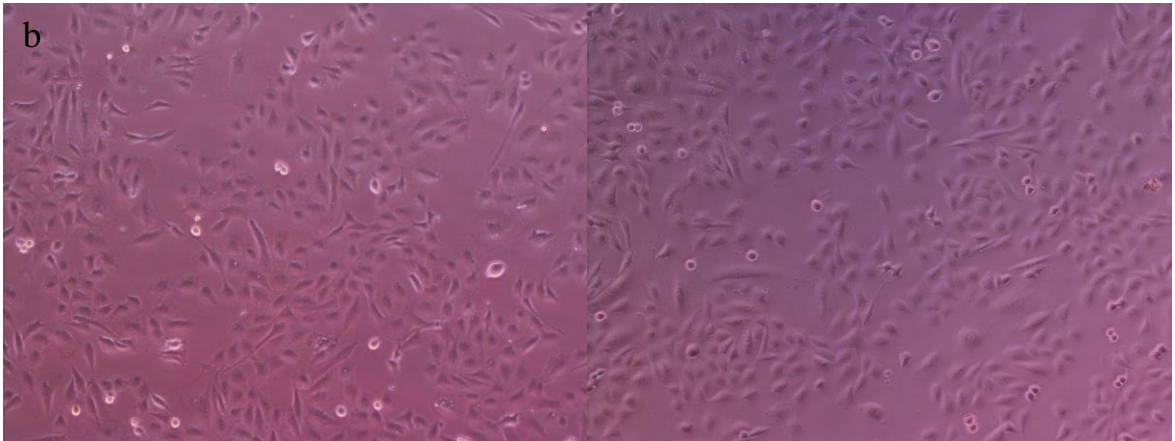
3.4 SÀNG LỌC HOẠT TÍNH KÉO DÀI SỢI TRỤC NEURITE

Bốn dịch chiết *n*-BuOH, EtOAc, *n*-Hex, EtOH được bổ sung vào môi trường nuôi cấy tế bào thần kinh, với 2 nồng độ bổ sung là 5 μ g/ml và 10 μ g/ml. DMSO được sử dụng để làm mẫu đối chứng. Đánh giá khả năng kéo dài neurite thông qua chiều dài trung bình của các neurite. Kết quả thể hiện ở bảng 3.13 và hình 3.19.

Bảng 3.13. Kích thước sợi trục neurite của tế bào thần kinh dưới tác động của các phân đoạn dịch chiết cây Rau má và mẫu đối chứng (DMSO)

STT	Tên mẫu	Kích thước sợi trục neurite (μ m)
1	DMSO	1,27
2	<i>n</i> -BuOH 5 μ g/ml	1,34
3	<i>n</i> -BuOH 10 μ g/ml	1,12
4	EtOAc 5 μ g/ml	1,35
5	EtOAc 10 μ g/ml	1,35
6	<i>n</i> -Hex 5 μ g/ml	1,46
7	<i>n</i> -Hex 10 μ g/ml	1,31
8	EtOH 5 μ g/ml	1,35
9	EtOH 10 μ g/ml	1,07





Hình 3.18. Hình ảnh tế bào thần kinh dưới tác động của DMSO và phân đoạn dịch chiết *n*-Hex 5µg/ml

Chú thích: a. DMSO, b. *n*-Hex 5µg/ml

Kết quả cho thấy, các phân đoạn dịch chiết EtOAc 5µM, EtOAc 10µM, *n*-BuOH 5µM, *n*-Hex 5µM, *n*-Hex 10µM, EtOH 5µM cho thấy khả năng kéo dài sợi trục neuron tốt. Đặc biệt việc sử dụng phân đoạn dịch chiết *n*-Hex ở nồng độ 5µM cho độ dài sợi trục neurite được kéo dài cao nhất là 1,46µm (đối chứng DMSO: 1,27µm) tăng 15% so với mẫu đối chứng DMSO.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Kết luận:

Đã định danh cây rau bằng bằng chỉ phân tử và kết luận tên khoa học của cây Rau má được thu hái ở Sa Pa, Lào Cai vào tháng 4/2021 là: *Centella asiatica*.

Đã tách chiết được các hợp chất từ cây rau má. Phân đoạn Etyl acetate cho khối lượng cao nhất (8,38g chiếm 4,19% khối lượng khô).

Tác dụng ức chế enzym AChE của các phân đoạn dịch chiết từ cây Rau má cũng đã được nghiên cứu trong đề tài. Kết quả cho thấy phân đoạn dịch chiết *n*-Hexan có tác dụng ức chế enzym AChE cao nhất có giá trị IC_{50} là 1030 $\mu\text{g/ml}$.

Các phân đoạn dịch chiết cây Rau má cũng đã được đánh giá khả năng kéo dài sợi trục neurite tế bào thần kinh. Phân đoạn dịch chiết *n*-Hexan nồng độ 5 μM có khả năng kéo dài sợi trục neuron cao nhất là 1,46 μm tăng 15% so với mẫu đối chứng DMSO.

Kiến nghị:

Cần có các hướng nghiên cứu chi tiết hơn phân đoạn dịch chiết cây Rau má về thành phần hóa học để phân tách được hoạt chất quý có tiềm năng trong việc hỗ trợ các bệnh liên quan đến suy giảm trí nhớ. Tiến hành khảo sát các hoạt tính sinh học khác của cây Rau má như: kháng khối u, kháng vi khuẩn và nấm, độc tính tế bào,...

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. WHO, 2020, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>.
2. Ma X., Tan C., Zhu D., Gang D.R., Xiao P., 2007, Huperzine A from *Huperzia* species-An ethnopharmacological review, *Journal of Ethnopharmacology*, 113(1), pp. 15-34.
3. Houghton P.J., Ren Y., Howes M.J. 2006, Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Natural Product Reports*, 23(2), pp. 181.
4. Le Minh Tuan, Lam Thi My Linh, 2019, study on acetylcholinesterase inhibitory activity of 40 an giang medicinal plants in alzheimer disease treatment, *AGU International Journal of Sciences*, 7(4), tr. 20-32.
5. Đỗ Tất Lợi, 2007, Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam, NXB Hồng Đức, tr. 631-633.
6. Đỗ Huy Bích và cs, 2003, Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam tập II, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội, tr. 582-586.
7. Võ Văn Chi, 2006, Từ điển Cây thuốc Việt Nam, tập II, NXB Y học, tr. 367-369.
8. Samant S.S., Pant S., 2006, Diversity, distribution pattern and conservation status of the plants used in liver diseases/ailments in Indian Himalayan Region, *Journal of Mountain Science*, 3(1), pp. 28-47.
9. Bộ Y tế, 2018, Dược điển Việt Nam V Tập II, NXB Y học, tr. 1299-1300.
10. Nguyễn Ngọc Hạnh, Lê Ngọc Thanh, 2011, Nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu Rau má, *Tạp chí Dược học số 428*, tr. 27-30.
11. Kingston A., Comas-Herrera A., Jagger C., Forecasting the care needs of the older population in England over the next 20 years: estimates from the Population Ageing and Care Simulation (PACSim) modelling study, *Lancet Public Heal*, 3(9), pp. 447-455.
12. Chiu M.J., Chen T.F., Yip P.K., Hua M.S., Tang L.Y., 2006, Behavioral and Psychologic Symptoms in Different Types of Dementia, *J. Formos. Med. Assoc.*, 105(7), pp. 556-562.
13. Dickson D.W., 2001, Neuropathology of Alzheimer's disease and other dementias, *Clin. Geriatr. Med.*, 17(2), pp. 209-228.
14. Fratiglioni L., De Ronchi D., Agüero-Torres H., 1999, Worldwide Prevalence and Incidence of Dementia, *Drugs Aging*, 15(5), pp. 365-375.

15. Reitz C., Brayne C., Mayeux R., 2011, Epidemiology of Alzheimer disease, *Nat. Rev. Neurol.*, 7(3), pp. 137-152.
16. Zhu C.W., Sano M., 2006, Economic considerations in the management of Alzheimer's disease, *Clin. Interv. Aging*, 1(2), pp. 143-154.
17. O'Brien J. T., Thomas A., 2015, Vascular dementia, *Lancet*, 386(10004), pp. 1698-1706.
18. Kon T., Tomiyama M., Wakabayashi K., 2020, Neuropathology of Lewy body disease: Clinicopathological crosstalk between typical and atypical cases, *Neuropathology*, 40(1), pp. 30-39.
19. David W., Ian M., 2007, Dementia with Lewy bodies, *Seminars in Neurology*, 27(1), pp. 042-047.
20. Enz A., Amstutz R., Boddeke H., Gmelin G., Malanowski J., 1993, Chapter 53: Brain selective inhibition of acetylcholinesterase: a novel approach to therapy for Alzheimer's disease, 98, pp. 431-438.
21. Tripathi A., Srivastava U., 2008, Acetylcholinesterase :A Versatile Enzyme of Nervous System, *Ann. Neurosci.*, 15(4), pp. 106-111.
22. Silman I., Sussman J.L., 2008, Acetylcholinesterase: How is structure related to function?, *Chem. Biol. Interact.*, 175(1-3), pp. 3-10.
23. Shohami E., Kaufer D., Chen Y., Seidman S., Cohen O., Ginzberg D., Melamed-Book N., Yirmiya R., Soreq H., 2000, Antisense prevention of neuronal damages following head injury in mice, *J. Mol. Med.*, 78(4), pp. 228-236.
24. Shapira M., 2000, A transcription-activating polymorphism in the ACHE promoter associated with acute sensitivity to anti-acetylcholinesterases, *Hum. Mol. Genet.*, 9(9), pp. 1273-1281.
25. Sternfeld M., Shoham S., Klein O., Flores-Flores C., Evron T., Idelson G.H., Kitsberg D., Patrick J.W, Soreq H., 2000, Excess 'read-through' acetylcholinesterase attenuates but the 'synaptic' variant intensifies neurodeterioration correlates, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97(15), pp. 8647-8652.
26. Siek G.C., Katz L.S., Fishman E. B., Korosi T. S., Marquis J.K., 1990, Molecular forms of acetylcholinesterase in subcortical areas of normal and Alzheimer disease brain, *Biol. Psychiatry*, 27(6), pp. 573-580.
27. Jann M.W., Shirley K.L., Small G.W., 2002, Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Cholinesterase Inhibitors, *Clin. Pharmacokinet.*, 41(10),

- pp. 719-739.
28. Moss D.E., Perez R.G., Kobayashi H., 2016, Cholinesterase Inhibitor Therapy in Alzheimer's Disease: The Limits and Tolerability of Irreversible CNS-Selective Acetylcholinesterase Inhibition in Primates, *J. Alzheimer's Dis.*, 55(3), pp. 1285-1294.
 29. Howard A.K., Thornton A.E., Altman S., Honer W.G., 2002, Donepezil for memory dysfunction in schizophrenia, *J. Psychopharmacol.*, 16(3), pp. 267-270.
 30. Tenovuo O., 2005, Central acetylcholinesterase inhibitors in the treatment of chronic traumatic brain injury-clinical experience in 111 patients, *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry*, 29(1), pp. 61-67.
 31. Petersson J., Gordh T.E., Hartvig P., Wiklund L., 1986, A double-blind trial of the analgesic properties of physostigmine in postoperative patients, *Acta Anaesthesiol. Scand.*, 30(4), pp. 283-288.
 32. Ballard C.G., 2002, Advances in the Treatment of Alzheimer's Disease: Benefits of Dual Cholinesterase Inhibition, *Eur. Neurol.*, 47(1), pp. 64-70.
 33. Greig N.H., Utsuki T., Yu Q., Zhu X., Holloway H.W., Perry T., Lee B., Ingram D.K., Lahiri D.K., 2001, A New Therapeutic Target in Alzheimer's Disease Treatment: Attention to Butyrylcholinesterase, *Curr. Med. Res. Opin.*, 17(3), pp. 159-165.
 34. Luo J., Chen S., Min S., Peng L., 2018, Reevaluation and update on efficacy and safety of neostigmine for reversal of neuromuscular blockade, *Ther. Clin. Risk Manag.*, 14, pp. 2397-2406.
 35. Gutierrez A., Corey-Bloom J., Thomas E.A., Desplats P., 2020, Evaluation of Biochemical and Epigenetic Measures of Peripheral Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) as a Biomarker in Huntington's Disease Patients, *Front. Mol. Neurosci.*, 12.
 36. Mirowska-Guzel D., Mach A., Gromadzka G., Czlonkowski A., Czlonkowska A., 2008, BDNF A196G and C270T gene polymorphisms and susceptibility to multiple sclerosis in the polish population. Gender differences, *J. Neuroimmunol.*, 193(1-2), pp. 170-172.
 37. Nagahara A.H., Merrill D.A., Coppola G., Tsukada S., Schroeder B.E., Shaked G.M., Wang L., Blesch A., Kim A., Conner J.M., Rockenstein E., Chao M.V., Koo E.H., Geschwind D., Masliah E., Chiba A.A., Tuszynski

- M.H., 2009, Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease, *Nat. Med.*, 15(3), pp. 331-337.
38. Pandini G., Pandini G., Satriano C., Pietropaolo A., Gianì F., Travaglia A., Mendola D.L., Nicoletti V.G., Rizzarelli E., 2016, The Inorganic Side of NGF: Copper(II) and Zinc(II) Affect the NGF Mimicking Signaling of the N-Terminus Peptides Encompassing the Recognition Domain of TrkA Receptor, *Front. Neurosci.*, 10.
39. LIU F., Xuan A., Chen Y., Zhang J., Xu L., Yan Q., Long D., 2014, Combined effect of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor on neuronal differentiation of neural stem cells and the potential molecular mechanisms, *Mol. Med. Rep.*, 10(4), pp. 1739-1745.
40. Hsieh J., Nakashima K., Kuwabara T., Mejia E., Gage F.H., 2004, Histone deacetylase inhibition-mediated neuronal differentiation of multipotent adult neural progenitor cells, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 101(47), pp. 16659-16664.
41. Jepsen K., Solum D., Zhou T., McEvelly R.J., Kim H., Glass C.K., Hermanson O., Rosenfeld M.G., 2007, SMRT-mediated repression of an H3K27 demethylase in progression from neural stem cell to neuron, *Nature*, 450(7168), pp. 415-419.
42. Tomioka T., Maruoka H., Kawa H., Yamazoe R., Fujiki D., Shimoke K., Ikeuchi T., 2014, The histone deacetylase inhibitor trichostatin A induces neurite outgrowth in PC12 cells via the epigenetically regulated expression of the *nur77* gene, *Neurosci. Res.*, 88(39-48).
43. Ozarowski M., Mikolajczak P.L., Piasecka A., Kachlicki P., Kujawski R., Bogacz A., Bartkowiak-Wieczorek J., Szulc M., Kaminska E., Kujawska M., Jodynys-Liebert J., Gryszczynska A., Opala B., Lowicki Z., Seremak-Mrozikiewicz A., Czerny B., 2016, Influence of the *Melissa officinalis* Leaf Extract on Long-Term Memory in Scopolamine Animal Model with Assessment of Mechanism of Action, *Evidence-Based Complement. Altern. Med.*, 2016(1-17).
44. E. F. João *et al.*, 2017, Effects of lemon balm (*Melissa officinalis*) on behavioral deficits and memory impairment of rats surviving sepsis, *J. Med. Plants Res.*, 11(8), pp. 153-160.
45. Akhondzadeh S., 2003, *Melissa officinalis* extract in the treatment of patients

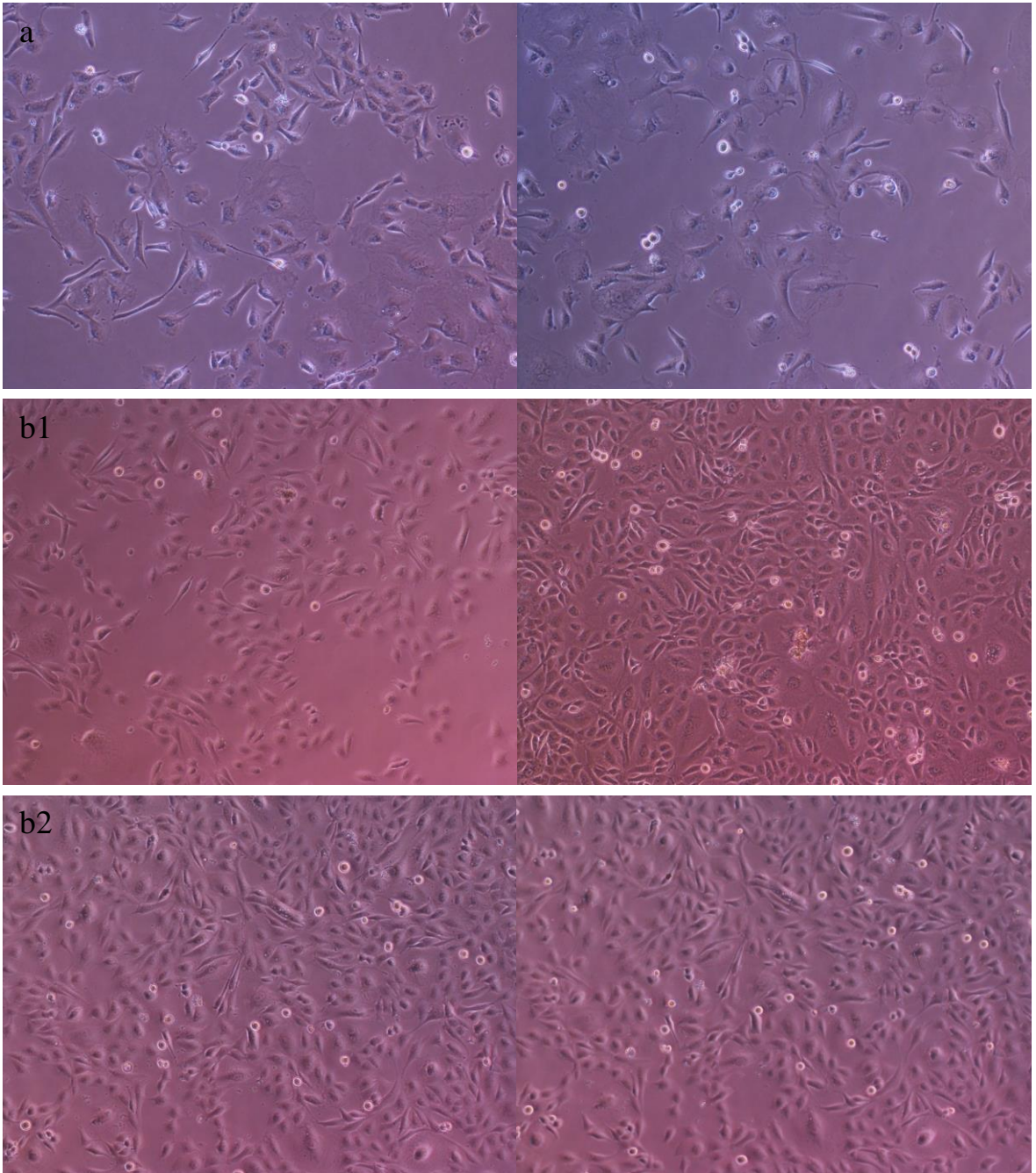
- with mild to moderate Alzheimer's disease: a double blind, randomised, placebo controlled trial, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 74(7), pp. 863-866.
46. Kennedy D., Scholey A.B., Tildesley N.T., Perry E., Wesnes K., 2002, Modulation of mood and cognitive performance following acute administration of *Melissa officinalis* (lemon balm), *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 72(4), pp. 953-964.
47. Đỗ Huy Bích, Bùi Xuân Chương, Đỗ Trung Đàm, Nguyễn Thượng Dong, Phạm Văn Hiến, Phạm Duy Mai, Phạm Kim Mãn, Đoàn Thị Thu, Nguyễn Tập và Trần Hoàn, 2004, *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, Nxb khoa học và kỹ thuật Hà Nội, (2), tr. 125-137, 858-859.
48. Chakravarthi K., Avadhani R., 2014, Enhancement of Hippocampal CA3 Neuronal Dendritic Arborization by *Glycyrrhiza glabra* root extract Treatment in Wistar Albino Rats, *J. Nat. Sci. Biol. Med.*, 5(1), p. 25.
49. Yu X.Q., Xue C.C., Zhou Z.W., Li C.G., Du Y.M., Liang J., Zhou S.F., 2008, In vitro and in vivo neuroprotective effect and mechanisms of glabridin, a major active isoflavan from *Glycyrrhiza glabra* (licorice), *Life Sci.*, 82(1-2), pp. 68-78.
50. Qiu J., Chen X., Netrusov A.I., Zhou Q., Guo D., Liu X., He H., Xin X., Wang Y., Chen L., 2017, Screening and Identifying Antioxidative Components in *Ginkgo biloba* Pollen by DPPH-HPLC-PAD Coupled with HPLC-ESI-MS2, *PLoS One*, 12(1), p. e0170141.
51. Shi C., Zhao L., Zhu B., Li Q., Yew D.T., Yao Z., Xu J., 2009, Protective effects of *Ginkgo biloba* extract (EGb761) and its constituents quercetin and ginkgolide B against β -amyloid peptide-induced toxicity in SH-SY5Y cells, *Chem. Biol. Interact.*, 181(1), pp. 115-123.
52. Manigandan V., Gurudeeban S., Satyavani K., Ramanathan T., 2014, Molecular Docking Studies of *Rhizophora mucronata* Alkaloids Against Neuroinflammatory Marker Cyclooxygenase 2, *Int. J. Biol. Chem.*, 8(2), pp. 91-99.
53. VAKIL R.J., 1955, *Rauwolfia Serpentina* in the Treatment of High Blood Pressure, *Circulation*, 12(2), pp. 220-229.
54. Subathra M., Shila S., Devi M.A., Panneerselvam C., 2005, Emerging role of *Centella asiatica* in improving age-related neurological antioxidant status, *Exp. Gerontol.*, 40(8-9), pp. 707-715.

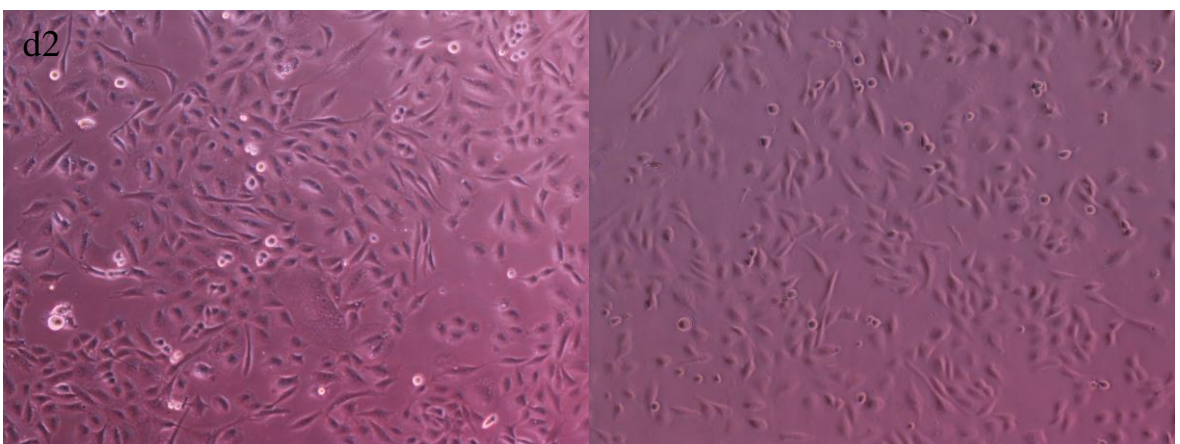
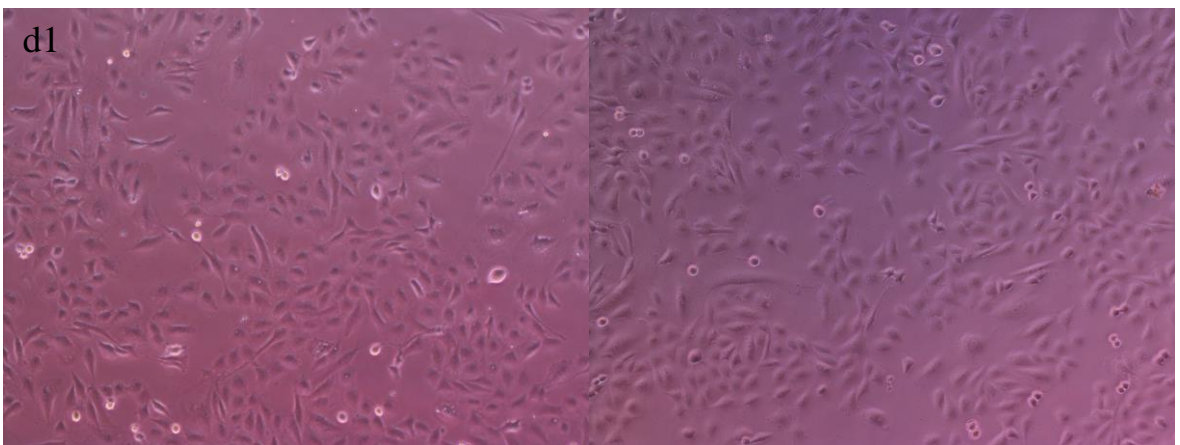
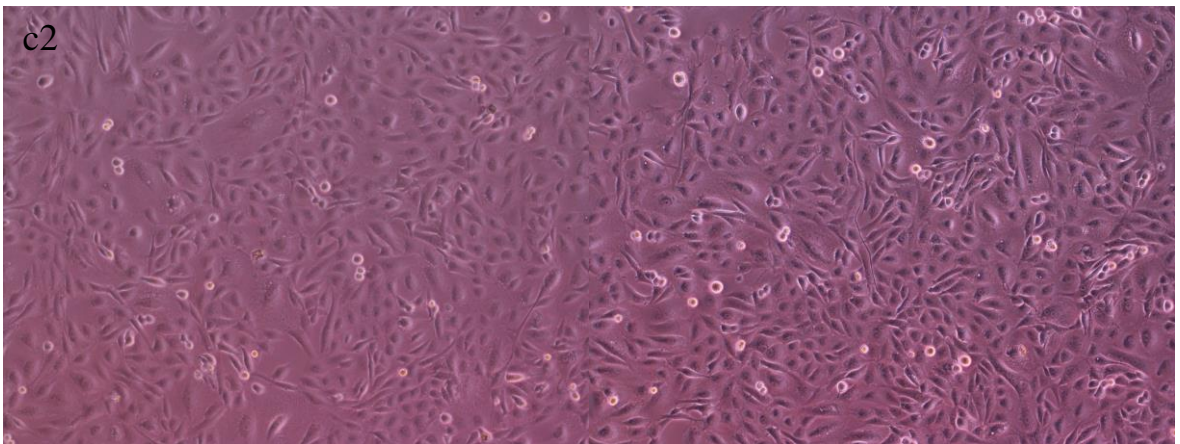
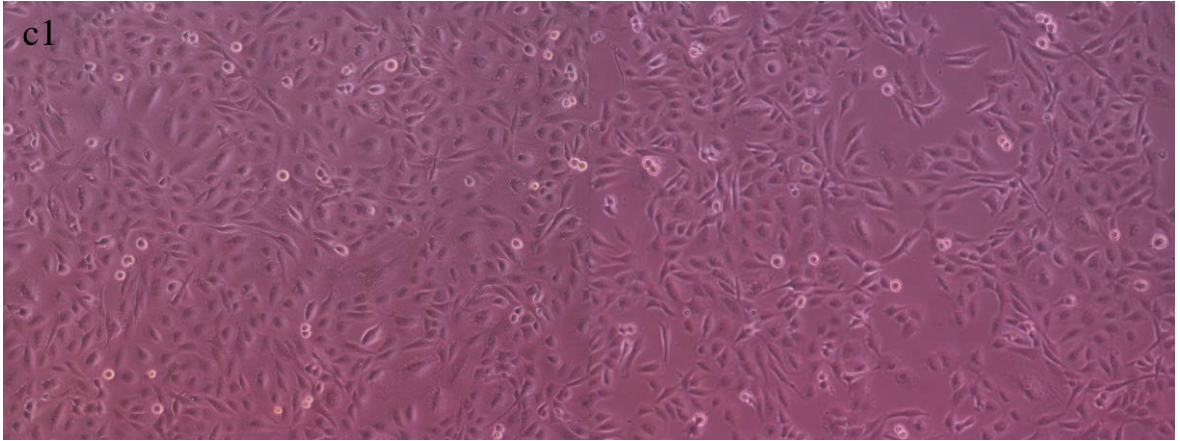
55. Lee M.K., Kim S.R., Sung S.H., Lim D., Kim H., Choi H., Park H.K., Je S., Ki Y.C., Asiatic acid derivatives protect cultured cortical neurons from glutamate-induced excitotoxicity., *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, 108(1-2), pp. 75-86.
56. Trần Thị Loan; Nguyễn Thành Hải, Đỗ Thị Vui, 2020, “Đánh giá tác dụng của cao ethanol rễ Đan sâm trên mô hình chuột nhắt bị suy giảm trí nhớ bằng scopolamin,” *Nghiên cứu Dược Thông tin thuốc*, vol. tập 11.
57. Trần Mỹ Tiên; Nguyễn Thị Thu Hương, “Nghiên cứu một số tác dụng dược lý của lá sâm Việt Nam,” *tạp chí dược liệu*, 2004.
58. Bùi Thanh Tùng, Phan Kế Sơn, Đặng Kim Thu, Nguyễn Thanh Hải, Nguyễn Xuân Bách, Nguyễn Thị Kim Thu, 2017, Đánh giá tác dụng ức chế enzym acetylcholinesterase in vitro của các phân đoạn dịch chiết Hoàng liên ô rô, *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN Khoa học Y Dược*, vol. 33(2), pp. 20-26.
59. Đặng Hoàng Quyên; Trần Phi Hoàng yển, V. T. X. Đ. M. Hiệp; Trương, and B. Nguyễn, “Khảo sát hoạt tính kháng cholinesterase của các cao chiết từ sinh khối của một số chủng nấm Cordyceps sp. phân lập tại Việt Nam., *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 10(4A), pp. 1033-1039.
60. Quyen D.H., Yen T.T.H., Xuyen V.T., Hiep D.M., Nguyen T.B., 2014, Study on the ability of extracts from Cordyceps spp. biomass to prevent memory impairment in mice, *TAP CHI SINH HOC*, 36(1).
61. Le T.T.M., Hoang A.T.H., Nguyen N.P., Le T.T.B., Trinh H.T.T., Vo T.T.B., Quyen D.V., 2020, A novel huperzine A-producing endophytic fungus *Fusarium* sp. Rsp5.2 isolated from *Huperzia serrate*, *Biotechnol. Lett.*, 42(6), pp. 987-995.
62. Le T.T.M., Hoang A.T.H., Le T.T.B., Vo T.T.B., Quyen D.V., Chu H.H., 2019, Isolation of endophytic fungi and screening of Huperzine A-producing fungus from *Huperzia serrata* in Vietnam, *Sci. Rep.*, 9(1), pp. 16152.
63. Võ Văn Chi, 2004, Từ điển thực vật thông dụng, *NXB Khoa học và Kỹ thuật*.
64. Đỗ Tất Lợi, 2004, Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam, *Nhà xuất bản Y học*.
65. Dược điển Việt Nam V, 2017, Chuyên luận dược liệu, *Nhà xuất bản Y học*.
66. Giáo trình Dược liệu, 2005, Kỹ thuật chung về thu hái, phơi sấy, chế biến sơ bộ và bảo quản dược liệu, *Nhà xuất bản Y học*.

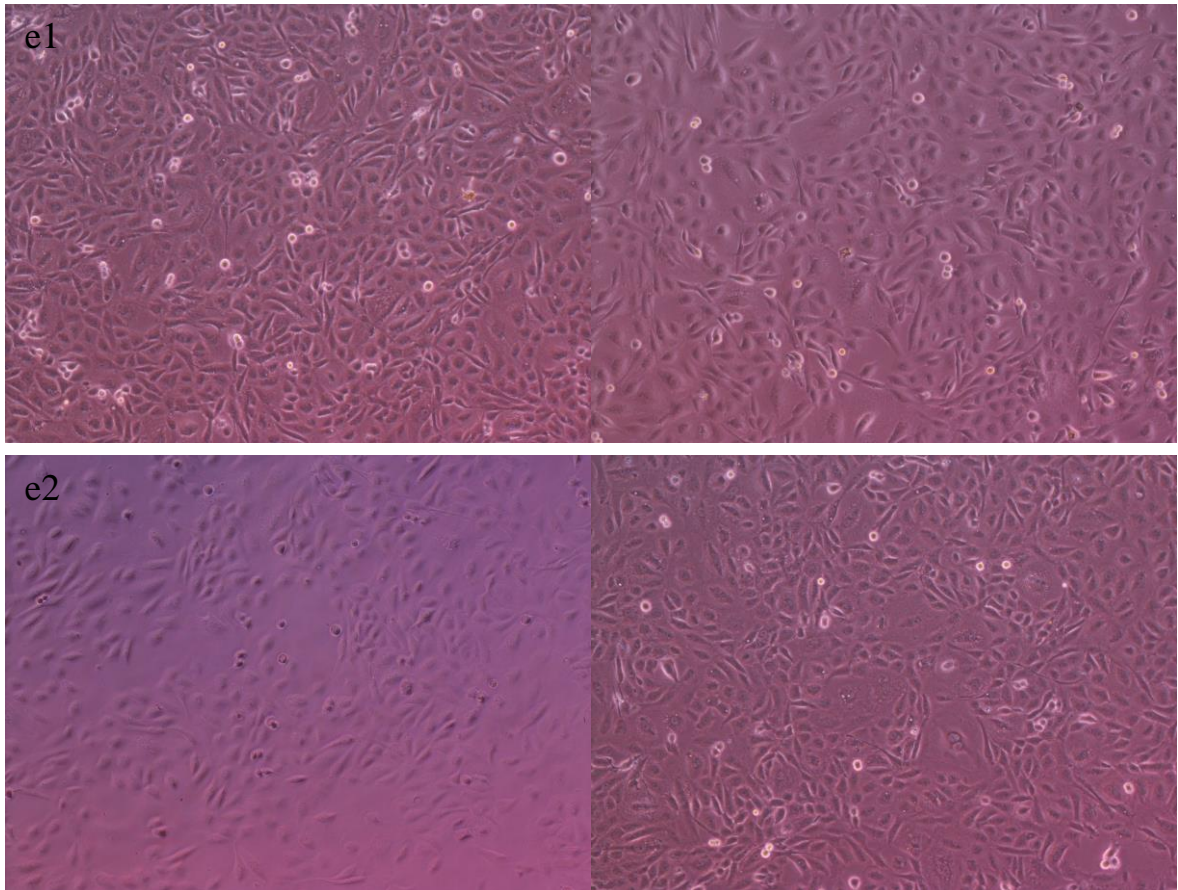
67. Doyle J., 1991, DNA Protocols for Plants, *Molecular Techniques in Taxonomy*, pp. 283-293.
68. Yang Y., Park S.Y., Nguyen T.T., Yu Y.H., Nguyen T.V., Sun E.G., Udeni J., Jeong M.H., Pereira I., Moon C., Ha H.H., Kim K.K., Hur J.S., H.Kim., 2015, Lichen Secondary Metabolite, Physciosporin, Inhibits Lung Cancer Cell Motility, *PLoS One*, 10(9), pp. e0137889.
69. Reddy R.G., 1, Veeraval L., Maitra S., Chollet-Krugler M., Tomasi S., Lohézic-Le Dévéhat F., Boustie J., Chakravarty S., 2016, Lichen-derived compounds show potential for central nervous system therapeutics, *Phytomedicine*, 23(12), pp. 1527-1534.
70. Taş İ., Han J., Park S.Y., Yang Y., Zhou R., Gamage C.D.B., Nguyen T.V., Lee J.Y., Choi Y.J., Yu Y.H., Moon K.S., Kim K.K., Ha H.H., Kim S.K., Hur J.S., Kim H., 2019, Physciosporin suppresses the proliferation, motility and tumorigenesis of colorectal cancer cells, *Phytomedicine*, 56(10-20).
71. Lê Đình Bích, Trần Văn Ôn, 2007, Thực vật học, NXB Y học, tr. 293-296.
72. Mathew M., Subramanian S., 2014, In vitro screening for anti-cholinesterase and antioxidant activity of methanolic extracts of ayurvedic medicinal plants used for cognitive disorders, *PLoS One*, 9(1), pp. e8680

PHỤ LỤC

Hình ảnh tế bào thần kinh dưới tác động của các phân đoạn dịch chiết cây Rau má và DMSO:







Chú thích: a. DMSO, b1. *n*-BuOH 5 μ g/ml, b2. *n*-BuOH 10 μ g/ml, c1. EtOAc 5 μ g/ml, c2. EtOAc 10 μ g/ml, d1. *n*-Hex 5 μ g/ml, d2. *n*-Hex 10 μ g/ml, e1. EtOH 5 μ g/ml, e2. EtOH 10 μ g/ml.