

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



NGUYỄN CHÍ DŨNG

**NGHIÊN CỨU ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH KHÁNG PHÂN BÀO
TRÊN DÒNG TẾ BÀO UNG THƯ MCF-7, JURKAT T CỦA CAO CHIẾT
VÀ HOẠT CHẤT TỪ SINH KHỐI, QUẢ THỂ NHÂN NUÔI
CỦA CHŨNG NẤM *Cordyceps neovolkiana* DL0004 VÀ *Isaria cicadae* F0004**

LUẬN ÁN TIẾN SỸ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Thành phố Hồ Chí Minh – Năm 2022

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

NGUYỄN CHÍ DŨNG

**NGHIÊN CỨU ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH KHÁNG PHÂN BÀO
TRÊN DÒNG TẾ BÀO UNG THƯ MCF-7, JURKAT T CỦA CAO CHIẾT
VÀ HOẠT CHẤT TỪ SINH KHÔI, QUẢ THỂ NHÂN NUÔI
CỦA CHŨNG NẤM *Cordyceps neovolkiana* DL0004 VÀ *Isaria cicadae* F0004**

Chuyên ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 9420201

LUẬN ÁN TIẾN SỸ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

1. PGS.TSKH. Ngô Kế Sương
2. TS. Đinh Minh Hiệp

Thành phố Hồ Chí Minh – Năm 2022

LỜI CAM ĐOAN

Tôi cam đoan luận án tiến sỹ ngành Công nghệ Sinh học, với đề tài “Nghiên cứu đánh giá hoạt tính kháng phân bào trên dòng tế bào ung thư MCF-7, Jurkat T của cao chiết và hoạt chất từ sinh khối, quả thể nhân nuôi của chủng nấm *Cordyceps neovolkiana* DL0004 và *Isaria cicadae* F0004” là công trình khoa học do Tôi thực hiện dưới sự hướng dẫn của PGS.TSKH. Ngô Kế Sương và TS. Đinh Minh Hiệp. Những kết quả nghiên cứu của luận án hoàn toàn trung thực và chính xác.

NGHIÊN CỨU SINH

Nguyễn Chí Dũng

LỜI CẢM ƠN

Tôi chân thành kính trọng và biết ơn những người Thầy, Cô, Anh, Chị, đồng nghiệp, đồng môn, gia đình và bạn bè đã giúp đỡ Tôi rất nhiều cả trong học vấn cũng như cuộc sống hằng ngày trước và trong quá trình làm luận án tiến sỹ công nghệ sinh học này. Với tất cả sự chân thành, tôi xin được gửi lời cảm ơn chân thực nhất đến:

Phó Giáo sư, Tiến sỹ Khoa học Ngô Kế Sương đã tận tình chỉ bảo, hướng dẫn những kiến thức và kinh nghiệm quý báu trong nghiên cứu, trong công việc và cuộc sống.

Tiến sỹ Đinh Minh Hiệp đã luôn động viên và hướng dẫn kiến thức và kinh nghiệm nghiên cứu cũng như giúp đỡ nhiệt tình những lúc Tôi gặp khó khăn.

Tiến sỹ Nguyễn Thị Mỹ Nương, Tiến sỹ Dương Thúc Huy và Tiến Sỹ Đặng Hoàng Phú đã luôn hỗ trợ tư vấn giúp đỡ các vấn đề liên quan Luận án.

Thầy cô, nhà khoa học tại Viện Sinh học nhiệt đới và Học viện khoa học và công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ đã tận tụy dạy dỗ trong những năm tôi tham gia chương trình nghiên cứu sinh tại Học viện.

Tập thể các bạn học viên, sinh viên, nghiên cứu sinh nhóm *Cordyceps*, đặc biệt là các Em Vũ Thị Ngân, Trần Tài, Huỳnh Thu, Nguyễn Tài Hoàng, Trần Minh Trang, Nguyễn Hoàng Đăng Khoa, Phạm Thị Mỹ Ninh, Hà Thị Ngọc, Nguyễn Nguyệt Hồng, Mai Kiều Tiên và Hà Thị Bích Hằng đã luôn đồng hành cùng tôi trong suốt thời gian thực hiện Luận án.

Cuối cùng, nhưng rất quan trọng, Tôi muốn gửi lời cảm ơn sâu sắc đến Gia đình, bạn bè luôn hỗ trợ và động viên để Tôi vượt qua khó khăn trong suốt quá trình học tập, là nguồn động lực to lớn để tôi có thể hoàn thành tốt Luận án tiến sỹ.

Thành phố Hồ Chí Minh, ngày 01 tháng 09 năm 2022

NGHIÊN CỨU SINH

Nguyễn Chí Dũng

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT	vi
DANH MỤC CÁC BẢNG	ix
DANH MỤC CÁC HÌNH	x
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN	3
1.1. Tổng quan về nấm <i>Cordyceps</i>	3
1.1.1. Giới thiệu về nấm <i>Cordyceps</i>	3
1.1.2. Tổng quan về <i>Cordyceps neovolkiana</i> và <i>Isaria cicadae</i>	6
1.1.3. Giá trị kinh tế của nấm <i>Cordyceps</i>	9
1.2. Nghiên cứu nuôi cấy <i>Cordyceps</i>	10
1.3. Thành phần hoạt chất và hoạt tính sinh học của nấm <i>Cordyceps</i>	11
1.3.1. Thành phần hoạt chất của <i>Cordyceps</i>	11
1.3.2. Hoạt tính kháng phân bào của <i>Cordyceps</i>	16
CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU - PHƯƠNG PHÁP	24
2.1. Vật liệu nghiên cứu	24
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu	24
2.1.2. Hóa chất	25
2.1.3. Dụng cụ và thiết bị	25
2.2. Phương pháp nghiên cứu	26
2.2.1. Phương pháp thu nhận cao chiết và các hợp chất	26
2.2.2. Phương pháp khảo sát hoạt tính gây độc tế bào và cảm ứng apoptosis của cao chiết và các hợp chất	37

2.3. Phương pháp xử lý số liệu	42
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	43
3.1. Chiết cao từ sinh khối và quả thể <i>C. neovolkiana</i> DL0004 và <i>I. cicadae</i> F0004	43
3.2. Hoạt tính gây độc tế bào của các cao chiết với dòng tế bào ung thư MCF-7 và Jurkat T.....	47
3.2.1. <i>Hoạt tính gây độc của các cao chiết C. neovolkiana DL0004 đối với các dòng tế bào MCF-7 và Jurkat T.....</i>	<i>48</i>
3.2.2. <i>Hoạt tính gây độc của các cao chiết I. cicadae F0004 đối với các dòng tế bào MCF-7 và Jurkat T.....</i>	<i>51</i>
3.2.3. <i>Xác định cao chiết có khả năng gây độc tế bào cao.....</i>	<i>55</i>
3.3. Nghiên cứu cảm ứng apoptosis tế bào MCF-7 và Jurkat T với các cao chiết tiềm năng.....	58
3.3.1. <i>Nghiên cứu cao PE của sinh khối Cordyceps neovolkiana DL0004 cảm ứng apoptosis tế bào ung thư MCF-7 và Jurkat T</i>	<i>58</i>
3.3.2. <i>Kết quả đánh giá khả năng cảm ứng apoptosis của cao EA từ quả thể I. cicadae F0004</i>	<i>67</i>
3.4. Phân chất, tinh sạch và định danh các hợp chất của các cao chiết có tiềm năng kháng phân bào.....	78
3.4.1. <i>Phân chất cao PE của sinh khối C. neovolkiana DL0004 [59], [83]....</i>	<i>78</i>
3.4.2. <i>Phân chất cao EA của quả thể Isaria cicadae F0004 [59].....</i>	<i>83</i>
3.5. Kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư MCF-7 và Jurkat T của các chất	90
3.6. Kết quả khả năng cảm ứng apoptosis tế bào ung thư MCF-7 và Jurkat T của ergone	92
3.6.1. <i>Hình thái tế bào MCF-7 và Jurkat T sau khi nhuộm với AO/EB</i>	<i>93</i>
3.6.2. <i>Phân tích Chu kỳ tế bào bằng phương pháp flow cytometry.....</i>	<i>94</i>

<i>3.6.3. Định lượng tế bào bị cảm ứng apoptosis bằng phương pháp nhuộm Annexin V/PI.....</i>	<i>96</i>
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	100
Kết luận.....	100
Kiến nghị.....	101

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tiếng Anh	Diễn giải
AO	Acridine orange	cridin cam
ATCC	the American Type Culture Collection	Bảo tàng giống chuẩn Hoa kỳ
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor	Nhân tố sinh trưởng nguyên bào sợi
Bu	n-Butanol	
CAT	Enzyme catalase	
CPT	Camptothecin	
DMSO	Dimethyl sulfoxid	
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl	
EA	Ethyl acetate	
EB	Ethidium bromid	
EDTA	Ethylene diamin etetraacetic acid	
ED ₅₀	Effective dose, 50%	Liều lượng hiệu quả
EP	Ergosterol peroxid	
EPS	Exopolysaccharid	Polysaccharid ngoại bào
EPSF	Exopolysaccharid fragment	Phân đoạn polysaccharid ngoại bào

ER	Estrogen	
Et	Ethanol	
FBS	Fetal bovine serum	Huyết thanh thai bò
GPx	Glutathione peroxidase	
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation	Phổ HMBC
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence	Phổ HSQC
IC ₅₀	The half maximal inhibitory concentration	Nồng độ ức chế tối đa một nửa
IFN	Interferon-gamma	
LD ₅₀	Lethal dose, 50%	Liều lượng gây chết một nửa
LPS	Lipopolysaccharid	
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7	Dòng tế bào MCF-7
MDA	Malondialdehyde	
Meth A	Meth A fibrosarcoma	
MIC	The minimum inhibitory concentration	Nồng độ ức chế tối thiểu
MMP2	Matrix metalloproteinase 2	
MTH	Methuselah	Gen Methuselah
MTT	MTT assay	Xét nghiệm phương pháp MTT

NAD	Nicotinamid adenin dinucleotid	
NCI	National Cancer Institute	Viện ung thư Quốc gia Hoa kỳ
NMR	Nuclear magnetic resonance	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân
PARP	Poly ADP-ribose polymerase	
PE	Petroleum ether	Ête dầu hỏa
PHA	Phytohaemagglutinin	
PI	Propidium iodide	
Poly	Polysaccharide	
PPCs	Polysaccharide-peptides	các polysaccharid-peptid
QT	Fruit body	quả thể
ROS	Reactive oxygen species	các gốc tự do có oxy
SK	Mycelium	Sinh khối
SOD	Superoxide dismutase	
SRB	sulforhodamin B	
TCA	Trichloroacetic acid	
TLC	Thin-layer chromatography	Sắc ký bản mỏng
TNF	Tumor necrosis factor	yếu tố hoại tử khối u
W	Water extract	cao nước
WHO	World Health Organization	Tổ chức Y tế Thế giới

DANH MỤC CÁC BẢNG

Trang

Bảng 3.1. Hiệu suất chiết cao trung bình từ sinh khối và quả thể nấm <i>C. neovolkiana</i> DL0004 và <i>I. cicadae</i> F0004	46
Bảng 3.2. Giá trị IC ₅₀ (µg/mL) của các cao chiết từ sinh khối và quả thể nấm <i>C. neovolkiana</i> DL0004 và <i>I. cicadae</i> F0004 gây độc tế bào MCF-7 và Jurkat T	57
Bảng 3.3. Kết quả gây độc tế bào của một số hợp chất cô lập được từ <i>C. neovolkiana</i> DL0004 và <i>I. cicadae</i> F0004 nhân tạo tại nồng độ 100 µg/mL	92

DANH MỤC CÁC HÌNH

Trang

Hình 1.1. Một số quả thể nấm <i>Cordyceps</i> tự nhiên	4
Hình 1.2. Quả thể <i>C. neovolkiana</i> (A) và <i>I. cicadae</i> (B) tự nhiên	6
Hình 1.3. Các loại nucleosid đặc biệt ở <i>Cordyceps</i>	13
Hình 2.1. Quy trình chiết cao phân đoạn	29
Hình 3.1. (A) sinh khối <i>C. neovolkiana</i> DL0004, (B) quả thể <i>C. neovolkiana</i> DL0004, (C) sinh khối <i>I. cicadae</i> F0004, (D) quả thể <i>I. cicadae</i> F0004	45
Hình 3.2. Tỷ lệ ức chế tế bào MCF-7 của cao chiết từ sinh khối và quả thể <i>C. neovolkiana</i> DL0004 tại nồng độ 100 µg/mL	50
Hình 3.3. Tỷ lệ ức chế tế bào Jurkat T của cao chiết từ sinh khối và quả thể <i>C. neovolkiana</i> DL0004 tại nồng độ 100 µg/mL	51
Hình 3.4. Tỷ lệ ức chế tế bào MCF-7 của cao chiết từ sinh khối và quả thể <i>I. cicadae</i> F0004 tại nồng độ 100 µg/mL	54
Hình 3.5. Tỷ lệ ức chế tế bào Jurkat T của cao chiết từ sinh khối và quả thể <i>I. cicadae</i> F0004 tại nồng độ 100 µg/mL	55
Hình 3.6. Hình thái tế bào MCF-7 và Jurkat T nhuộm AO/EB sau khi xử lý với cao chiết PE của sinh khối <i>C. neovolkiana</i> DL0004	61
Hình 3.7. Sự thay đổi tỷ lệ tế bào ung thư MCF-7 các pha của chu kỳ tế bào sau xử lý cao PE từ sinh khối <i>C. neovolkiana</i> DL0004	63

Hình 3.8. Sự thay đổi tỷ lệ tế bào ung thư Jurkat T các pha của chu kỳ tế bào sau xử lý cao PE từ sinh khối <i>C. neovolkiana</i> DL0004	65
Hình 3.9. Tỷ lệ tế bào MCF-7 thay đổi sau xử lý với cao chiết PE từ sinh khối của <i>C. neovolkiana</i> DL0004 và nhuộm Annexin V/PI	66
Hình 3.10. Tỷ lệ tế bào Jurkat T thay đổi sau xử lý với cao chiết PE từ sinh khối <i>C. neovolkiana</i> DL0004 và nhuộm Annexin V/PI	68
Hình 3.11. Hình thái tế bào MCF-7 và Jurkat nhuộm AO/EB khi xử lý với cao EA từ quả thể <i>I. cicadae</i> F0004	70
Hình 3.12. Sự thay đổi tỷ lệ tế bào ung thư MCF-7 các pha của chu kỳ tế bào sau xử lý cao EA từ quả thể <i>I. cicadae</i> F0004	72
Hình 3.13. Sự thay đổi tỷ lệ tế bào ung thư Jurkat T các pha của chu kỳ tế bào sau xử lý cao EA từ quả thể <i>I. cicadae</i> F0004	74
Hình 3.14. Tỷ lệ tế bào ung thư MCF-7 sau xử lý cao EA từ quả thể <i>I. cicadae</i> F0004 và nhuộm Annexin V/PI	76
Hình 3.15. Tỷ lệ tế bào ung thư Jurkat T sau xử lý cao EA từ quả thể <i>I. cicadae</i> F0004 và nhuộm Annexin V/PI	79
Hình 3.16. Hình thái tế bào MCF-7 và Jurkat khi xử lý với ergone	95
Hình 3.17. Tỷ lệ tế bào MCF-7 tại các pha của Chu kỳ tế bào sau xử lý ergone từ cao PE của sinh khối <i>C. neovolkiana</i> DL0004	96

Hình 3.18. Tỷ lệ tế bào Jurkat T tại các pha của Chu kỳ tế bào sau xử lý ergone từ cao PE của sinh khối <i>C. neovolkiana</i> DL0004	98
Hình 3.19. Tỷ lệ tế bào MCF-7 cảm ứng apoptosis bởi ergone từ cao PE của sinh khối <i>C. neovolkiana</i> DL0004	99
Hình 3.20. Tỷ lệ tế bào Jurkat T cảm ứng apoptosis bởi ergone từ cao PE của sinh khối <i>C. neovolkiana</i> DL0004	100

MỞ ĐẦU

Các sản phẩm tự nhiên, với sự đa dạng về thành phần và cấu trúc hóa học đã được nghiên cứu rộng rãi về khả năng kháng ung thư trong hơn nửa thế kỷ gần đây và được xem là một nguồn cung cấp dồi dào các hợp chất có hoạt tính sinh học có tiềm năng chữa bệnh. Ước tính từ năm 1981 đến năm 2019, khoảng 25% các loại thuốc kháng ung thư mới được phê duyệt có nguồn gốc tự nhiên [1]. Đối với *Cordyceps* spp., hơn 200 hợp chất có hoạt tính sinh học bao gồm nucleosid, sterol, peptid mạch vòng, flavonoid, dihydrobenzofuran, polyketid, polysaccharid, alkaloid, ergosterol và polyphenol đã được cô lập và định danh. [2].

Theo tổ chức WHO (2020), ung thư là căn bệnh gây tử vong hàng đầu trên thế giới và tỷ lệ ngày càng tăng nhanh nên việc tìm kiếm các hợp chất mới trong điều trị ung thư đã và đang được nhiều nghiên cứu trên thế giới quan tâm.

Hiện nay, các nghiên cứu đã phát hiện nhiều hợp chất kháng phân bào tiềm năng đối với các dòng tế bào ung thư từ *Cordyceps* spp. như cordycepin, cordypyridon, cordysin A, isariotin, acetoxyscirpenediol, polysaccharid, beauvericin, ergosterol... và các dẫn xuất [3].

Cordyceps là chi đa dạng nhất trong họ Clavicipitaceae về số lượng loài (hơn 750 loài) và phổ ký chủ. Tuy nhiên, chỉ có 04 loài thuộc chi *Cordyceps* và *Isaria* được nghiên cứu và ứng dụng rộng rãi bao gồm *C. sinensis*, *C. militaris*, *I. tenuipes* và *I. cicadae* [2].

Các công trình nghiên cứu và ứng dụng nấm *Cordyceps* chủ yếu được thực hiện trên các chủng nấm được phân lập và có nguồn gốc từ nước ngoài nên hướng ứng dụng thực tế có nhiều hạn chế khi ứng dụng tại Việt Nam. Việc nghiên cứu và ứng dụng các chủng nấm *Cordyceps* của Việt Nam, được phân lập và nuôi cấy tại Việt Nam giúp chủ động hơn trong việc khai thác, bảo tồn và ứng dụng tạo các sản phẩm hữu ích. Việt Nam là Quốc gia có đa dạng các chủng nấm ký sinh côn trùng thuộc chi *Cordyceps* và *Isaria*. Các nghiên cứu tại Việt Nam chủ yếu thực hiện ở mức độ trên cao chiết của các loài nấm *Cordyceps* spp. và còn rất ít các nghiên cứu về cô lập các hợp chất tự nhiên và xác định hoạt tính kháng phân bào của các hợp chất thu nhận được.

Do đó, để đánh giá hoạt tính kháng phân bào trên các dòng tế bào ung thư của các cao chiết và các hoạt chất từ sinh khối hệ sợi và quả thể nấm ký sinh côn trùng phân lập và nuôi trồng tại Việt Nam làm tiền đề cho các nghiên cứu nấm ký sinh côn trùng tại Việt Nam tạo nguồn nguyên liệu cho các ứng dụng thực tế trong dược phẩm, luận án “Nghiên cứu đánh giá hoạt tính kháng phân bào trên dòng tế bào ung thư MCF-7, Jurkat T của cao chiết và hoạt chất từ sinh khối, quả thể nhân nuôi của chủng nấm *Cordyceps neovolkiana* DL0004 và *Isaria cicadae* F0004” với nội dung thực hiện như sau: tạo cao chiết từ sinh khối và quả thể nấm nuôi trồng; sàng lọc cao chiết có độc tính tế bào tiềm năng trên hai dòng tế bào ung thư MCF-7 và Jurkat T; xác nhận đặc tính kháng phân bào của các cao chiết tiềm năng; cô lập và xác định hợp chất có hoạt tính kháng phân bào từ cao chiết tiềm năng là khả thi và cần thiết.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. Tổng quan về nấm *Cordyceps*

1.1.1. Giới thiệu về nấm *Cordyceps*

Theo Holiday (2008) [4], nấm *Cordyceps* được phân loại như sau:

Giới: Fungi

Ngành: Ascomycota

Lớp: Ascomycetes

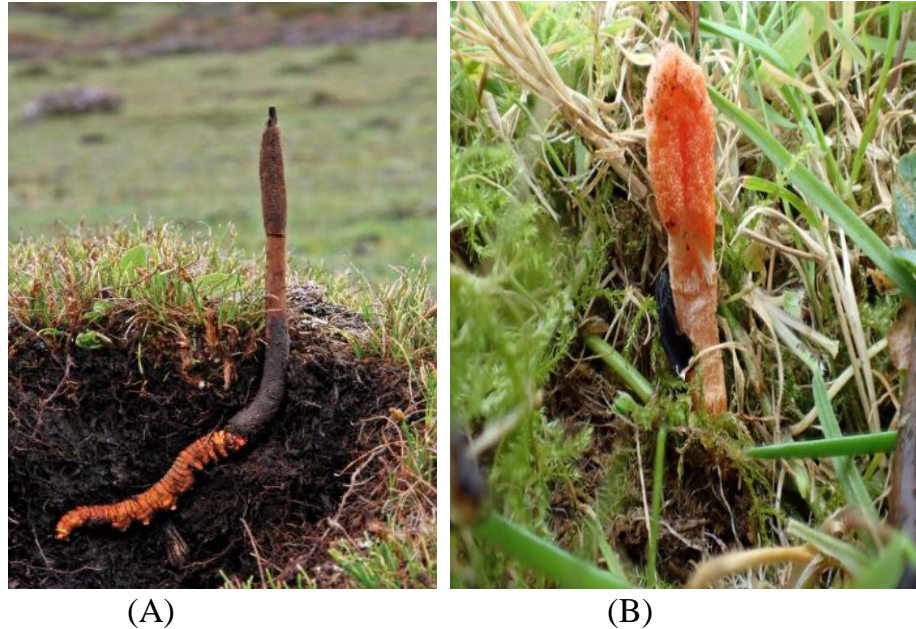
Bộ: Hypocreales

Họ: Clavicipitaceae

Chi: *Cordyceps*

Cordyceps được xếp vào họ Clavicipitaceae dựa vào túi bào tử hình trụ, độ dày đỉnh nang và các nang bào tử. Đặc biệt, *Cordyceps* được đặc trưng bởi quả thể hình cuống và thường ở dạng hình chùy trên bề mặt hay đâm mình hoàn toàn vào chất nền. *Cordyceps* là chi đa dạng nhất trong họ Clavicipitaceae về số lượng loài và phổ ký chủ. Phổ ký chủ của chúng rất rộng, thường thuộc nhóm côn trùng và động vật thuộc lớp chân khớp. Mỗi loài được giới hạn với một vật chủ duy nhất hay một tập hợp các ký chủ có mối liên hệ chặt chẽ với nhau (hình 1.1).

Theo sinh thái học, *Cordyceps* được xem là tác nhân gây bệnh ở động vật chân khớp và các loài nấm thuộc chi *Elaphomyces* [5]. Thông qua đặc điểm hình thái của quả thể và túi bào tử, *Cordyceps* được chia làm 3 giống: *C. subg. cordyceps*, *C. subg. ophiocordyceps* và *C. subg. neocaxitordyceps*.



Hình 1.1. Một số quả thể nấm *Cordyceps* tự nhiên

Chú thích: A) *C. sinensis*; B) *C. militaris*

(Nguồn: <https://www.sciencedirect.com>)

Một số nghiên cứu phát sinh loài khác dựa vào ribosome của DNA đã được tiến hành để kiểm tra và hoàn chỉnh việc phân loại *Cordyceps* nhưng vẫn gặp nhiều hạn chế. Năm 2010, một nhóm các nhà nấm học của Mỹ, Thái Lan và Hàn Quốc đã phối hợp nghiên cứu và sắp xếp lại hệ thống của nhóm nấm *Cordyceps*. Theo kết quả nghiên cứu này, toàn bộ các loài thuộc nhóm nấm *Cordyceps* được phân chia lại thuộc về 3 họ: họ Clavicipitaceae với các chi *Metacordyceps*, *Hypocrella*, *Regiocrella* và *Torrubiella*; họ Cordycipitaceae với chi *Cordyceps*; họ Ophiocordycepsitaceae với 2 chi *Ophiocordyceps* và *Elaphocordyceps* [6].

Năm 2007, nghiên cứu của Sung và cộng sự đã xếp chi *Isaria* thuộc ngành Ascomycota, lớp Sordariomycetes, bộ Hypocreales, họ Cordycipitaceae [7]. Một số chi được quan tâm nhiều nhất hiện nay bởi tính chất dược lý hay khả năng kiểm soát sinh học bao gồm *Cordyceps*, *Beauveria* và *Isaria* [8]. Chi *Isaria* bao gồm các loài nấm ký sinh côn trùng phân bố khá rộng, dễ dàng thu thập. *Isaria* là giai đoạn sinh sản vô tính (giai đoạn hình thành bào tử đỉnh) của chi *Cordyceps* [3].

Trong các loài *Cordyceps* spp., *C. sinensis* là nổi tiếng nhất về giá trị ứng dụng chữa bệnh, bồi bổ sức khỏe con người và nó phân bố chủ yếu ở Nepal, Bhutan, Ấn Độ và Cao nguyên Tây Tạng của Trung Quốc, độ cao từ 3000 m – 5000 m so với mực nước biển. Bên cạnh *C. sinensis* nhiều loài nấm *Cordyceps* spp. khác cũng được phát hiện [9]:

Họ *Clavicipitaceae* gồm có *Metacordyceps liangshanensis*, phân bố chủ yếu ở Trung Quốc và Nepal.

Họ *Cordycipitaceae* gồm có *Cordyceps coccinea* (Được phát hiện tại: Indonesia, Srilanka, Nhật Bản, Công Gô và Nepal), *C. ishikariensis* (Được phát hiện tại: Nhật Bản và Nepal), *C. militaris* (Được phát hiện phổ biến ở khắp quốc gia Nhật Bản), *C. martialis* (Được phát hiện tại: Brazil, Trinidad, Trung Quốc, Bắc Mỹ, Nga, Nhật Bản, Hàn Quốc và Nepal), *C. pruinosa* (Được phát hiện tại: Sri Lanka, Trung Quốc, Công Gô, Nhật Bản, Nga, Hàn Quốc, Mexico, và Nepal), *Cordyceps nevolkiana* và *Cordyceps takaomontana* (Được phát hiện tại: Việt Nam).

Họ *Ophiocordycipitaceae* gồm có *Ophiocordyceps fornicarum* (Được phát hiện tại: Nhật Bản, Nepal, Hàn Quốc và Trung Quốc), *O. gracilis* (Được phát hiện tại: Hoa Kỳ, Algeria, Pháp, Bắc Mỹ, Brazil, Úc, Trung Quốc, Czech, Hàn Quốc, Nepal và Slovakia), *O. kangdingensis* và *O. multiaxialis* (Được phát hiện tại: Trung Quốc và Nepal), *O. nepalensis* (Được phát hiện tại: Nepal), *O. nutans* (Được phát hiện tại: Nhật Bản, Trung Quốc, Công Gô, Hàn Quốc, Liên Bang Nga và Nepal), *C. sinensis* (Phân bố: Nepal, Bhutan, Ấn Độ và Cao Nguyên Tây Tạng), *O. sphecocephala* (Được phát hiện tại: Cuba, Jamaica, Đông Ấn Độ, Argentina, Guadeloupe, Nhật Bản, Indonesia, Bắc Mỹ, Guyana, Trung Quốc, Anh, Czech, Công Gô, Hàn Quốc, Nga, Nepal và Slovakia), *O. tricornis* (Được phát hiện tại: Nhật Bản, Trung Quốc, Hàn Quốc và Nepal), *Ophiocordyceps langbianensis* (Được phát hiện tại: Việt Nam).

1.1.2. Tổng quan về *Cordyceps neovolkiana* và *Isaria cicadae*

Theo hệ thống phân loại của Kobayasi (1982), *Cordyceps neovolkiana* thuộc [10]:

Ngành (phylum): Ascomycota

Phân ngành (subphylum): Pezizomycotina

Lớp (class): Sordariomycetes

Bộ (order): Hypocreales

Họ (familia): Clavicipitaceae

Chi: *Cordyceps*



Hình 1.2. Quả thể *C. neovolkiana* (A) và *C. cicadae* (B) tự nhiên

Nguồn: naro.arcff.go.jp (A) và sciencedirect.com (B)

Theo Sung (2007), *Isaria cicadae* thuộc [3], [7]:

Giới (Kingdom): Fungi

Ngành (phylum): Ascomycota

Phân ngành (subphylum): Pezizomycotina

Lớp (class): Sordariomycetes

Bộ (order): Hypocreales

Họ (familia): Cordycipitaceae

Chi: *Isaria*

Cordyceps neovolkiana (thể vô tính là *Hirsutella neovolkiana*) đã được tìm thấy ở vùng núi Langbiang, tỉnh Lâm Đồng Việt Nam ở độ cao 1.650 m. Về đặc điểm sinh thái, quả thể *C. neovolkiana* có màu vàng rộng 2-3 mm và dài 3-5 cm [11]. Phương pháp luận nghiên cứu hỗ trợ định danh nấm ký sinh côn trùng bằng phân tích phá hệ phân tử vùng ITS1-5.8S-ITS2 đã được ứng dụng vào hỗ trợ định danh được một số mẫu nấm ký sinh côn trùng thu thập từ vùng núi Langbiang, tỉnh Lâm Đồng trong đó đã xác định được loài *C. neovolkiana* [12].

Isaria cicadae (*Cordyceps cicadae*) đã được tìm thấy tại huyện Ea kar, tỉnh Đắk Lắk, quá trình sinh trưởng và phát triển của *I. cicadae* tương tự với các loài thuộc nhóm *Cordyceps* khác: vào mùa thu hay mùa đông bào tử nấm sẽ lây nhiễm vật chủ qua lớp da ngoài (lớp cuticun), hình thành sợi tơ khắp cơ thể côn trùng dẫn đến gây chết côn trùng, đến mùa xuân khi khí hậu ẩm hơn sẽ hình thành nên quả thể nấm từ các khớp hoặc các vị trí nếp da mỏng và phát tán bào tử. *I. cicadae* hình thành quả thể màu trắng đục đến vàng nhạt từ miệng, đầu hoặc đáy của ấu trùng *I. cicadae* dài từ 2,5 -5 cm. Cuống bào tử phân nhánh dày đặc, rộng 3-6 µm bao gồm các nhánh hình vòng xoắn, bào tử hình trụ, thường cong vách tròn. *I. cicadae* F0004 được nuôi cấy nhân tạo thành công sinh khối và quả thể. *I. cicadae* là một trong những loại thuốc y học cổ truyền Trung Quốc lâu đời nhất và nổi tiếng, với những công dụng của nó được ghi nhận từ thế kỷ thứ V. Trong nhiều thế kỷ, *I. cicadae* đã được sử dụng làm thực phẩm, thuốc bổ và thuốc dân gian để điều trị bệnh sốt rét, ung thư, sốt, tiêu đường, các bệnh về mắt, chóng mặt và các bệnh thận mãn tính [3], [13]. Hơn 110 hợp chất được phân lập từ *I. cicadae*, dựa vào cấu trúc các hợp chất thuộc các nhóm chính amino acid, acid hữu cơ, lipid, phospholipid, nucleosid, carbohydrate và các dẫn xuất của chúng [14].

I. cicadae chứa nhiều hợp chất thứ cấp cũng được phát hiện trong sinh khối và quả thể trong đó, inositol, gamma-aminobutyric acid, ornithin và

threonin là hợp chất chính. Trong đó nhiều hợp chất được chứng minh hoạt tính sinh học tương tự với các chủng nấm khác thuộc chi *Cordyceps* như kháng phân bào, kháng oxy hóa, kháng viêm, chống trầm cảm và điều hòa miễn dịch. Các nucleosid chính được tìm thấy từ *I. cicadae* gồm adenosin, guanosin, uridin, inosin, thymidin... và các dẫn xuất [3]. Trong đó, adenosin và các dẫn xuất thể hiện có nhiều hoạt tính như cordycepin có khả năng kháng phân bào, kháng oxy hóa, kháng viêm và điều hòa miễn dịch. Một dẫn xuất khác của adenosin là N- (2-hydroxyethyl) adenosin cũng đã được phân lập và thể hiện hoạt tính kháng oxy hóa và kháng viêm [15]. Cordycepic acid (D-mannitol) phân lập từ bào tử, là một trong những thành phần có hoạt tính cùng adenosin và cordycepin được sử dụng để đánh giá hoạt tính của *Cordyceps* [16]. Nhiều hợp chất thứ cấp khác như phytosphingosin, cordycecine A, betain, oosporein, phytosphingosin, stigmatonic acid cũng được phát hiện trong hệ sợi và bào tử của nấm trong đó oosporein cũng biểu hiện hoạt tính kháng khuẩn, kháng oxy hóa, kháng côn trùng cùng một số nấm và gây độc tế bào. Hercynin và ergothionein – dẫn xuất của histidin - phát hiện trong hệ sợi và quả thể, có khả năng kháng oxy hóa và bảo vệ tế bào; fumimycin cũng được tìm thấy trong hệ sợi và có khả năng kháng khuẩn chống lại *Staphylococcus aureus*, ức chế enzyme peptid deformylase; myriocin được phân lập từ dịch nuôi cấy, sinh khối và bào tử *I. cicadae* thể hiện hoạt động kháng nấm, ức chế tốt *Candida albicans* và có độc tính cao với LD₅₀ 2–10 mg/kg trên chuột [3].

Nghiên cứu Zhu và cộng sự (2020) đã đánh giá hoạt tính chống oxy hóa của polysaccharid thu nhận từ *Cordyceps cicadae*, kết quả cho thấy polysaccharid thể hiện hoạt tính kháng oxy hóa mạnh và kéo dài tuổi thọ của *Drosophila* khỏi tác nhân oxy hóa thông qua tăng biểu hiện của các gen mã hóa cho các enzyme catalase (CAT) và glutathione peroxidase (GSH-Px) và ức chế sự hình thành hợp chất malondialdehyde (MDA). Đồng thời, polysaccharid cũng thay đổi mức độ biểu hiện của các gen liên quan đến quá trình chống oxy hóa CAT, SOD1 và MTH trong ruồi giấm (*Drosophila melanogaster*) [17]. Nghiên cứu của Ren và cộng sự (2014) cũng cho thấy polysaccharid từ *Paecilomyces cicadae* có hoạt động chống oxy hóa mạnh dựa

trên đánh giá khả năng bắt gốc tự do DPPH, superoxid và hydroxyl [18].

1.1.3. Giá trị kinh tế của nấm *Cordyceps*

Từ lâu, *C. sinensis* là loài nấm có giá trị cao và chỉ được giới thượng lưu biết đến và sử dụng nhiều. Trong tự nhiên, *C. sinensis* có số lượng hạn chế do điều kiện tự nhiên bất lợi trên dãy Himalaya trên 3.000 m so với mực nước biển. Tổng sản lượng thu hoạch *C. sinensis* tự nhiên hàng năm tại Tây Tạng ước tính khoảng 7 tấn và chiếm hơn 80% so với tổng lượng thế giới. Gần 20% *C. sinensis* còn lại được thu hoạch từ Cam Túc, Thanh Hải, Tứ Xuyên và Vân Nam của Trung Quốc, Nepal, Bhutan và một số vùng nhỏ ở phía Bắc Ấn Độ. Hiện nay, giá *C. sinensis* ngoài tự nhiên cao hơn vàng (tính theo trọng lượng). Vài năm gần đây, giá tại Bắc Kinh rất cao (112.000 USD/kg). Vào mùa thu hoạch ở Tây Tạng, chỉ trong 4 – 6 tuần trong tháng 5 và 6, nguồn thu từ Đông trùng hạ thảo đóng góp khoảng 225 triệu USD trong tổng sản phẩm trên địa bàn (GRDP) của vùng Tây Tạng, chiếm hơn 40% tổng nguồn thu nhập.

Theo báo cáo Thị trường Đông trùng hạ thảo toàn cầu - Xu hướng và dự báo của ngành đến năm 2027 của tổ chức nghiên cứu thị trường Data Bridge Market Research (2020), thị trường *C. sinensis* dự kiến sẽ tăng trưởng trong giai đoạn từ năm 2020 đến năm 2027. Nghiên cứu thị trường của Data Bridge Market Research dự đoán, thị trường toàn cầu đạt 1.167,50 triệu USD vào năm 2027, tăng trưởng với tốc độ tăng trưởng kép hằng năm là 10,55% trong giai đoạn dự báo từ năm 2020 đến năm 2027. Ngày càng có nhiều bệnh như tim mạch, ung thư, tiểu đường và các bệnh hô hấp có thể được hỗ trợ chữa khỏi nhờ đông trùng hạ thảo đang thúc đẩy sự phát triển của thị trường. Các yếu tố khác như thúc đẩy hiệu năng tập thể dục và giúp chống lão hóa cũng đang thúc đẩy sự tăng trưởng của thị trường đông trùng hạ thảo. Sự phổ biến cao của các rối loạn liên quan đến căng thẳng và rối loạn tự miễn dịch trên khắp thế giới cũng đang thúc đẩy sự phát triển của thị trường. Tuy nhiên, Chi phí cao liên quan đến chiết xuất từ đông trùng hạ thảo và không đủ bằng chứng lâm sàng về phòng trị các bệnh như tiểu đường và ung thư cũng đang hạn chế sự phát triển của thị trường đông trùng hạ thảo trên toàn thế giới.

1.2. Nghiên cứu nuôi cấy *Cordyceps*

Để giải quyết vấn đề thiếu hụt nguồn cung *C. sinensis* tự nhiên, nhiều nghiên cứu đã thành công trong nuôi cấy nhân tạo loài nấm *C. sinensis* hay những loài nấm *Cordyceps* spp. Khác có giá trị dược liệu cao. Điển hình, sinh khối nấm *Hirsutella sinensis* (dạng anamorph hay dạng sợi của *C. sinensis* tự nhiên) được sản xuất và nghiên cứu bằng cách nuôi cấy trên môi trường lỏng đã và đang ngày càng tăng [19]. Đáng chú ý, năm 2015, Cao và cộng sự lần đầu tiên công bố đã nuôi cấy thành công quả thể nấm *C. sinensis* trên môi trường bán rắn nhân tạo ở vùng thấp của cao nguyên Tây Tạng [20]. Gần đây, trung tâm Ligno Biotech Sdn. Bhd. (Selangor, Malaysia) cũng đã nuôi cấy thành công quả thể loài nấm này ở quy mô lớn bằng cách sử dụng môi trường bán rắn với thành phần chính là gạo [21]. Như vậy, sự thành công trong nuôi cấy nhân tạo quả thể nấm này đã cung cấp nhiều sự lựa chọn cho người tiêu dùng và nhà nghiên cứu hiện nay.

Tuy nhiên, nuôi cấy sản xuất sinh khối hệ sợi nấm *C. sinensis* vẫn mang lại nhiều tiềm năng ứng dụng và ưu thế hơn so với nuôi trồng quả thể vì chi phí sản xuất thấp hơn và thời gian thực hiện ngắn hơn rất nhiều. Bên cạnh đó, các nghiên cứu chứng minh rằng thành phần các hoạt chất sinh học trong sinh khối hệ sợi nấm *C. sinensis* (hay *H. sinensis*, thể anamorph của *C. sinensis*) tương tự như quả thể nấm ngoài tự nhiên. Hơn nữa, nuôi cấy sợi nấm không chứa chất bẩn, thuốc trừ sâu, kim loại nặng và các đặc tính không bị suy giảm, vì vậy nó có lợi thế cao so với quả thể nấm tự nhiên trên thị trường [22].

Mặc dù các nhà nghiên cứu đã đạt được một số thành quả nhất định, việc nuôi cấy nhân tạo quả thể nấm *C. sinensis* vẫn còn khó khăn và chưa được thương mại hóa để đáp ứng nhu cầu gia tăng của con người; do đó tìm kiếm và thay thế những chủng nấm *Cordyceps* khác có tiềm năng là vô cùng cần thiết. Vì lẽ đó, các nghiên cứu liên quan đã được thực hiện trên toàn thế giới. Những bằng chứng thực nghiệm và giải thích khoa học chứng minh thành phần hóa học của *C. militaris* là gần tương tự như nấm *C. sinensis*. So với *C. sinensis*, cordycepin được tiết ra bởi nấm *C. militaris* nhân tạo cũng có những tác dụng dược lý tương tự như các sản phẩm từ *C. sinensis* và nhiều sản phẩm nuôi cấy quy mô lớn thu được thành công vào những năm 1980. Sợi nấm có thể phát triển trên môi trường bán rắn cơ chất gạo và sản xuất quả thể dễ dàng

hơn so với *C. sinensis*. Quá trình sản xuất quả thể nấm *C. militaris* là tương tự như các loài nấm ăn khác, có thể được chia thành 2 giai đoạn chính. Giai đoạn 1, chuẩn bị môi trường, giống cấp 1 (mother spawn), giống cấp 2 (planting spawn), trong khi giai đoạn 2 là chuẩn bị cơ chất phát triển cho nuôi cấy quả thể [23].

Bên cạnh *C. sinensis* và *C. militaris*, nhiều loài nấm *Cordyceps* hay nấm ký sinh côn trùng tiềm năng khác cũng được khai thác và ứng dụng như *C. takaomontana*, *I. tenuipes*, *C. nutans*, *I. cicadae*, *C. sobolifera*, ... Tại Việt Nam, năm 2010, Lê Tấn Hưng và cộng sự tiến hành khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ lên sản xuất cordycepin của 15 chủng nấm *C. militaris* [24]. Năm 2009, Phạm Quang Thu (Viện Khoa học Lâm Nghiệp Việt Nam) chủ trì thực hiện đề tài: “Nghiên cứu xây dựng quy trình nuôi trồng nấm Đông trùng hạ thảo (*C. militaris* L. Fr.) có giá trị dược liệu và thương mại cao” [25]. Năm 2015, Trương Bình Nguyên và Đinh Minh Hiệp đã công bố nuôi cấy nhân tạo thành công sinh khối hệ sợi nấm Đông trùng hạ thảo *C. sinensis* tại buổi báo cáo nghiệm thu đề tài ở Sở Khoa học và Công nghệ thành phố Hồ Chí Minh [26]. Nghiên cứu này mở ra một triển vọng mới trong việc ứng dụng loài nấm quý hiếm này trong lĩnh vực y dược và thực phẩm chức năng tại Việt Nam. Hiện nay, các sản phẩm quả thể nấm *C. militaris* rất đa dạng trên thị trường, đáp ứng nhu cầu tiêu dùng trong nước cũng như có khả năng cạnh tranh với những sản phẩm ngoại nhập. Gần đây, chủng nấm *C. takaomontana* DL0038A phân lập tại vùng núi Langiang, tỉnh Lâm Đồng cũng được nuôi cấy tạo quả thể để thử nghiệm hoạt tính sinh học của chúng, đầy tiềm năng và triển vọng trong tương lai.

1.3. Thành phần hoạt chất và hoạt tính sinh học của nấm *Cordyceps*

1.3.1. Thành phần hoạt chất của *Cordyceps*

Mặc dù *C. sinensis* và các loài *Cordyceps* spp. khác được xem như là thực phẩm thông thường, nhưng chúng chứa rất nhiều hoạt chất quý. *Cordyceps* chứa tất cả 18 acid amin thiết yếu, với thành phần chiếm từ 5 – 10% trọng lượng khô. Trong đó, thành phần cao nhất là acid amin glutamat, arginin, acid aspartic, tryptophan và tyrosin. Các vitamin E, K và B (bao gồm B1, B2 và B12) cũng được tìm thấy. Hơn nữa, *Cordyceps* chứa nhiều loại mono-, di- và oligo – polysaccharid và các phức hợp polysaccharid ở dạng cấu

hình alpha và beta gọi là heteropolysaccharid, protein, sterol, nhiều loại nucleosid khác nhau, và đặc biệt chứa nhiều nguyên tố khoáng được hấp thu từ môi trường như K, Na, Ca, Mg, Fe, Cu, Mn, Zn, Pi, Se, Al, Si, Ni, Sr, Ti, Cr, Ga, V, và Zr [4].

a) Polysaccharid

C. sinensis chứa một lượng lớn và đa dạng các loại polysaccharid, có thể chiếm từ 10 -20% trên tổng khối lượng các mẫu thu từ tự nhiên và đặc biệt lên đến 50% và thậm chí cao hơn ở những loài *Cordyceps* nuôi cấy nhân tạo bằng phương pháp lên men bán rắn để nâng cao sản xuất những loại polysaccharid điển hình này. Các loại polysaccharid thành tế bào nấm và exopolysaccharid tiết ra môi trường nuôi cấy hay môi trường đất ngoài tự nhiên được xem là nhóm hoạt chất có hoạt tính dược lý chính của nấm *Cordyceps*. 4 cấu trúc beta-D glucan exopolysaccharid phân lập từ *C. militaris* nuôi cấy bằng phương pháp lên men lỏng có trọng lượng phân tử từ 50 đến 2260 kDa. Đối với *C. sinensis*, hầu hết heteropolysaccharid đều chứa mannose, galactose, và glucose, với thành phần mannose cao nhất, và 1 lượng nhỏ các đường 5 C như arabinose, rhamnose, và xylose. Trọng lượng phân tử của polysaccharid *C. sinensis* dao động từ 7 đến 200 kDa, trong khi polysaccharid *C. militaris* chứa chủ yếu là glucose, galactose và mannose với chỉ có ít rhamnose và xylose với trọng lượng phân tử khoảng 60 kDa.

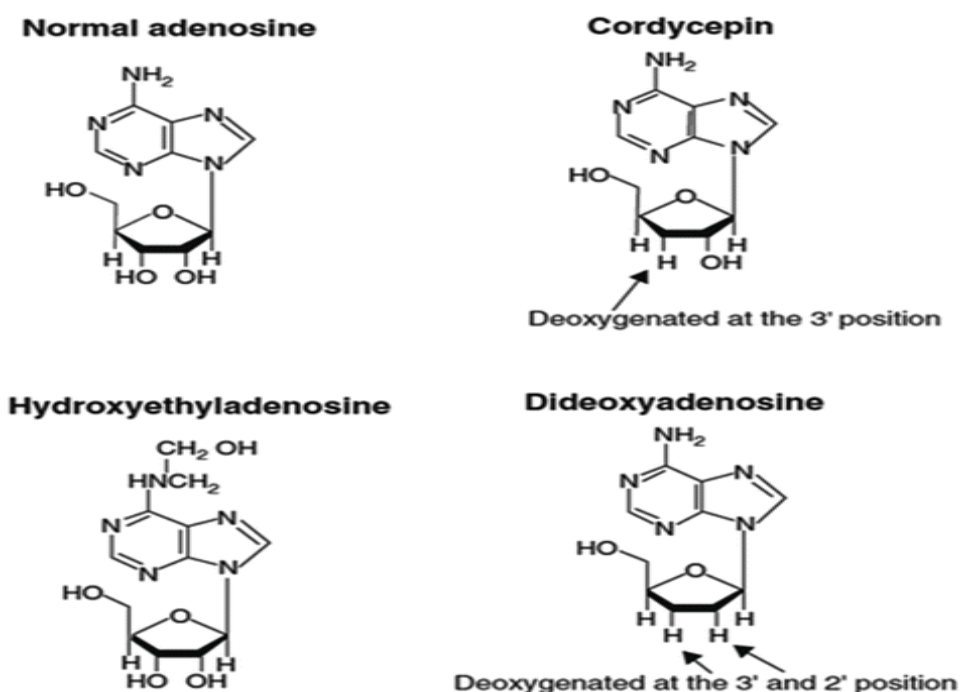
Nhìn chung polysaccharid từ *Cordyceps* là rất khó để phân tích và làm sáng tỏ vì cấu trúc xoắn ba phức tạp của chúng (a triple right-handed helix conformation) với chiều dài và tỷ lệ chuỗi bên pentose và hexose khác nhau. Gần đây, các nhà khoa học đã phát triển một phương pháp phân tích mới để tinh sạch và phân tách những phân đoạn khác nhau của polysaccharid. Những nỗ lực để phân tích làm rõ cấu trúc polysaccharid từ *Cordyceps* vẫn đang được các nhà khoa học quan tâm và theo đuổi. Rất nhiều điều thú vị vẫn chưa được hiểu rõ về cấu trúc bậc 3 của những polysaccharid này, sự gắn của chúng với các vị trí

receptor đặc biệt trên tế bào, cũng như các hoạt động sinh học của nó đối với cơ thể. [4].

b) Protein và các hợp chất chứa nitơ khác

Cordyceps chứa protein, peptid, polypeptid, polyamin, tất cả acid amin thiết yếu và một số dipeptid dạng vòng phổ biến và hiếm, như vòng cyclo-[Gly-Pro], cyclo-[Leu-Pro], cyclo-[Val-Pro], cyclo-[Ala-Leu], cyclo-[Ala-Val] và cyclo-[Thr-Leu]. *Cordyceps* cũng chứa một lượng nhỏ polyamin, như 1,3-diamino propane, cadaverin, spermidin, spermin, và putrescin [4].

Nhiều nucleosid tự do đã được tìm thấy trong *Cordyceps*, như uridin, một vài deoxyuridin đặc biệt, adenosin, dideoxyadenosin, hydroxyethyl adenosin, cordycepin [3'deoxyadenosin], cordycepin triphosphat, guanidin, deoxyguanidin, và các dẫn xuất nucleosid khác.



Hình 1.3. Các loại nucleosid đặc biệt ở *Cordyceps* [4]

Nhiều dẫn xuất nucleosid, như cordycepin, đã cho thấy tác động kháng virus tiềm năng, trong đó kháng lại virus HIV. Cordycepin ức chế quá trình sao chép của virus HIV bằng cách ức chế ribonucleosid triphosphate (rNTP). Ngoài ra, tổng acid amin trong các sản phẩm

Cordyceps nuôi cấy có thể lên đến 10% tính trên tổng khối lượng. Ở *C. sinensis*, 3 acid amin phổ biến trong ấu trùng sợi nấm và quả thể là acid glutamic, acid aspartic và arginin chiếm từ 1.5 – 2.6% [4].

Cordycepin, hay 3'-deoxyadenosin, là một dẫn xuất của adenosin, khác với adenosin ở sự thiếu oxygen ở vị trí 3' của vòng ribose. Cordycepin được tách chiết từ cao chiết nước của *C. sinensis* [27]. Sau đó, thành phần chính của cao butanol *C. militaris* cũng được xác định bằng HPLC. Vì cordycepin tương tự adenosin, nên RNA polymerase không thể phân biệt và khi kết hợp vào một RNA đang phát triển, cordycepin ngăn cản sự kéo dài thêm, do vậy tạo ra một phân tử RNA kết thúc sớm. Cordycepin bằng đường uống ức chế sự phát triển tế bào u ác tính B16-BL6 ở chuột mà không có tác dụng phụ. Nghiên cứu sâu hơn đã chứng minh cordycepin ức chế sự tăng sinh của tế bào B16-BL6 bằng cách tăng cường các receptor adenosin A3 sau đó là con đường tín hiệu Wnt, bao gồm hoạt hóa GSK-3 beta và ức chế D1 vòng. Cordycepin ức chế đáng kể sự phosphoryl hóa Akt và p38 theo cách phụ thuộc liều đáp ứng trong đại thực bào được hoạt hóa bởi LPS. Hơn nữa, cordycepin làm tăng cường biểu hiện TNF-alpha, sự phosphoryl hóa Ikappa B alpha và sự chuyển vị trí nhân các yếu tố nhân kappa B (NF-kappa B). Apoptosis gây ra bởi cordycepin cũng được báo cáo. Trong tế bào MA-20 (1 dòng tế bào ung thư Leydig ở chuột), cordycepin gây ra đứt gãy DNA, làm chậm tiến trình các phase G1 và G₂/M và tăng tiến trình phase subG1 dẫn đến gây ra apoptosis. Ngoài ra, phân tích Western Blot cho thấy cordycepin làm tăng sự biểu hiện của caspase 9, 3 và 7, ngoại trừ caspase 8. Trong một nghiên cứu khác, cordycepin gây ra apoptosis đáng kể đối với dòng tế bào ung thư ở người OEC-11 (Human Oral Squamous Cancer Cells) [28].

Các dẫn xuất của cordycepin cũng cho thấy hoạt tính kháng ung thư hiệu quả. Forodesin, một dẫn xuất của cordycepin, là một chất ức chế của purin nucleosid phosphorylase, nó được xem là một chất tiềm

năng trong điều trị các bệnh nhân tế bào T ác tính và bệnh bạch cầu mạng tính tế bào B [29].

Bên cạnh đó, một số lượng peptid và cyclodipeptin độc đáo đã được tìm thấy trong *Cordyceps*. Trong đó, cordycedipeptid A là một hợp chất phân lập từ môi trường nuôi cấy lỏng *C. sinensis*. Đây là hợp chất cho thấy khả năng kháng ung thư tốt và hoạt tính gây độc tế bào chống lại một số dòng tế bào ung thư như L-929, A357, và tế bào HeLa. Một peptid thú vị khác được chiết xuất từ *C. sinensis* là cordymin, có tác dụng kháng viêm tốt. Ngoài ra, một loại acid amin đặc biệt là myriocin từ *C. sinensis* là một chất chống ức chế miễn dịch mạnh, gấp hơn 100 lần so với chất chuẩn cyclosporin. Và một nhóm các dẫn xuất adenosin khác có tên là cordysin (A-E) trong *Cordyceps* cũng được phát hiện, có hoạt tính kháng viêm cao [4].

c) Sterol

Một lượng lớn và đa dạng các sterol được tìm thấy trong *Cordyceps*, bao gồm sterol phổ biến trong nhiều thành tế bào nấm là ergosterol. Ergosterol rất quan trọng đối với sức khỏe con người, là tiền chất của vitamin D₂. Một số sterol khác cũng được tìm thấy trong *Cordyceps*, như 3-ergosterol, ergosterol peroxid, 3-sitosterol, daucosterol, và campesterol. Hợp chất sterol khác có tên H1-A được tìm thấy từ *C. sinensis* cho thấy có hiệu quả trong điều trị rối loạn tự miễn dịch, là một thử thách lớn đối với y học trong việc sử dụng thuốc hiện nay, là một chủ đề nghiên cứu đáng quan tâm [4].

d) Các thành phần khác

28 acid béo no và không no với chức năng làm giảm lipid máu được xác định từ *C. sinensis*. Các acid béo không no bao gồm C16:1, C17:1, C18:1 và C18:2. Các hợp chất phân cực của cao chiết *C. sinensis* gồm có alcohol và aldehyde. Một vài hợp chất chống ức chế miễn dịch cũng được tìm thấy trong *Cordyceps*, bao gồm cyclosporin từ *C. subsessilis*, nó được tạo ra phổ biến nhất trong nuôi cấy thể vô tính

(anamorph) của *C. subsessilis* (*Tolyptocladium inflatum*). Đặc biệt, *Cordyceps* có chứa một lượng lớn D-manitol, chiếm đến 10% trong mẫu *C. sinensis* tự nhiên và đến 14% trong mẫu nuôi cấy. D-manitol được gọi là acid cordycepic, có nhiều hoạt tính sinh học quan trọng, có thể được tìm thấy trong *C. sinensis*, *C. militaris* và các loài *Cordyceps* khác [4].

1.3.2. Hoạt tính kháng phân bào của *Cordyceps*

Các cao chiết từ sinh khối và quả thể nấm *C. sinensis*, *C. militaris* và một số loài *Cordyceps* khác cho thấy hoạt tính kháng phân bào đáng kể bằng những cơ chế khác nhau như điều hòa hệ thống miễn dịch hay liên quan đến con đường apoptosis tế bào.

a) Hoạt tính kháng phân bào của nấm *C. sinensis*

Nhiều bằng chứng diễn giải hiệu quả của *C. sinensis* như một thuốc điều trị chống ung thư vì nó đóng vai trò như một chất hoạt hóa (activator) đáp ứng miễn dịch. Các cao chiết từ sợi nấm và quả thể nấm *C. sinensis* ảnh hưởng đến hệ miễn dịch theo nhiều cách khác nhau.

Polysaccharid là thành phần hóa học chính được tìm thấy trong *C. sinensis* và đóng vai trò quan trọng cho nhiều đặc tính dược lý của. Polysaccharid đã được chứng minh cả *in vitro* và *in vivo* có tác dụng chống viêm, chống oxy hóa, chống khối u, chống co cứng, điều hòa miễn dịch, hạ đường huyết, sinh tổng hợp steroid và máu nhiễm mỡ. Để loại bỏ hàm lượng protein, chiết xuất exopolysaccharid thô được xử lý bằng thuốc thử Sevag (1-butanol / chloroform 1: 4, v / v). Thẩm tách và làm khô đông lạnh đã hoàn thành bước chuẩn bị exopolysaccharide [30].

Chiết xuất ethanol của *C. sinensis* được phân đoạn bằng cách sử dụng CO₂ siêu tới hạn làm dung môi rửa giải và các phân đoạn này cho thấy khả năng ức chế chọn lọc sự phát triển của tế bào ung thư đại trực tràng và tế bào gan thông qua con đường apoptosis [31].

Các hợp chất tinh khiết được tìm thấy trong *C. sinensis* đã được thử nghiệm và ergosterol và β -sitosterol có tác dụng ức chế đáng kể sự tăng sinh tế bào ung thư. Mặc dù, có thể đi đến kết luận và công bố sterol và các họ hàng của nó là một thành phần kháng ung thư của *C. sinensis* và chiết xuất ethyl acetate của *C. sinensis*, nhưng sự phối hợp giữa các phức hợp khác nhau rất có thể xảy ra trong cơ thể sống và liên quan đến các cơ chế kháng phân bào cũng như các hoạt tính sinh học khác nhau [30].

Cao chiết nước từ *C. sinensis* khô làm tăng thời gian sống trung bình của chuột allengonic nhiễm tế bào ung thư biểu mô cổ trướng Ehrlich (EAC) đến 316% và chuột syngeneic xử lý với Meth A fibrosarcoma (Meth A) đến 312% mà không có hoạt tính gây độc trên EAC hoặc Meth A *in vitro* [32]. Cao chiết nước đã được chứng minh hiệu quả trong việc ngăn ngừa sự di căn khối u ở chuột như một tác nhân hỗ trợ trong hóa trị ung thư [33]. Hoạt động tế bào NK của chuột *in vitro* và *in vivo* tăng cường đáng kể bằng sự tiêm màng bụng (intraperitoneal infection) cao chiết ethanol *C. sinensis* [34]. Cao chiết này làm giảm đáng kể khối lượng và thể tích khối u ở chuột bị tiêm nhiễm tế bào khối u Sarcoma 180. Các cao chiết được chứng minh có biểu hiện tăng cường hoạt động thực bào (phagocytosis) được đo bằng sự giải phóng carbon ở chuột và gây ra sự gia tăng đáng kể hoạt động của acid phosphatase, enzyme lysosomal, đề nghị rằng hoạt tính kháng khối u của chúng có thể liên quan đến chức năng kích thích miễn dịch. Cao chiết ethyl acetate của sợi nấm *C. sinensis* cho thấy có tác dụng mạnh trong kháng khối u của 4 dòng tế bào ung thư, MCF-7, B16, HL-60 và HepG2 [27].

Một số phân đoạn đặc biệt khác của *C. sinensis*, như polysaccharid được chứng minh có khả năng thay đổi đáp ứng miễn dịch. Một polysaccharid tách chiết từ *C. sinensis* có khả năng kích thích các tế bào đơn nhân máu làm ức chế sự tăng sinh tế bào ung thư U937, kết quả tỉ lệ ức chế phát triển lên đến 78-83%. Hơn nữa, phân đoạn này

gây ra khoảng 50% tế bào biệt hóa thành monocyte và đại thực bào biểu hiện esterase không đặc hiệu (NSE-nonspecific esterase) và các kháng nguyên bề mặt CD11b, CD14 và CD68. Hàm lượng interferon-gamma (IFN), TNF-alpha và interleukin (IL)-1 rất thấp trong tế bào đơn nhân máu bình thường nhưng chúng được tăng lên ở lô xử lý với phân đoạn polysaccharid trên. Nghiên cứu trung hòa kháng thể cho thấy tác động diệt tế bào ung thư và biệt hóa trên chủ yếu bắt nguồn từ cytokin, đặc biệt là IFN-gamma và TNF-alpha [35]. Một phân đoạn exopolysaccharid (EPSF) *C. sinensis*, làm tăng khả năng thực bào của đại thực bào và tăng sinh lymphocyte lách ở chuột mang khối u B16 và H22 cũng như ức chế sự phát triển của khối u. EPSF tăng cường sự biểu hiện nhân tố TNF-alpha của đại thực bào và hoạt tính gây độc của các lymphocyte lách. Nó cũng kích thích gia tăng sự biểu hiện mRNA TNF-alpha và IFN-gamma của lymphocyte lách và từ đó làm tăng hoạt động của các tế bào miễn dịch ở chuột mang khối u H22. EPSF cũng có tác động ức chế lên sự biểu hiện oncogene. Hàm lượng các c-Myc, c-Fos và yếu tố tăng trưởng nội mô trong phổi và gan của chuột điều trị với EPSF cho thấy thấp hơn đáng kể so với chuột không xử lý với EPSF [28].

Một nghiên cứu khác cho thấy, khi tế bào đại thực bào dòng R309 bị kích hoạt lipopolysaccharid (LPS) tiếp xúc với cao chiết *C. sinensis*, R309 gây ra mức IL-1 đáng kể. Sự cảm ứng IL-2 được nhận thấy trong các tế bào T dòng LBRM-33-1A5 có sự hiện diện của IL-1 và phytohemagglutinin (PHA). Tuy nhiên, *C. sinensis* cảm ứng với IFN-gamma, làm tăng sự biểu hiện kháng nguyên lớp MHC II trên dòng tế bào ung thư HA22T/VGH, kết quả là hệ thống miễn dịch hiệu quả hơn chống tế bào ung thư so với biểu hiện MHC II giảm [36], [37]. Ở bệnh nhân bệnh bạch cầu leukemia, *C. sinensis* làm tăng hoạt động của tế bào NK và tăng cường sự biểu hiện marker CD16 trên lymphocyte và khả năng gắn vào tế bào ung thư K562. Trong ung thư vú, việc uống *C. sinensis* không làm giảm sự phát triển khối u nhưng làm giảm sự

xuất hiện di căn phổi trong mô hình cắt bỏ phẫu thuật của giai đoạn di căn. Việc giảm sự di căn được giả định là do ảnh hưởng của các nhân tố chuyển hóa đại thực bào lên chu trình tế bào khối u, hoạt hóa tế bào NK và các hoạt động kích thích miễn dịch khác [38].

Mặc dù hoạt tính điều hòa miễn dịch của *C.sinensis* có vai trò quan trọng trong hoạt tính kháng ung thư, nhưng nó chưa được mô tả kỹ và chưa có một cơ chế chính xác. Ngoài ra những con đường biến dưỡng và di truyền khác cũng có liên quan trực tiếp hoặc gián tiếp. Các công trình nghiên cứu mở rộng được thực hiện để đánh giá cơ chế kháng ung thư của nấm *C. sinensis* và cơ chế quan trọng nhất đã được tìm thấy là con đường apoptosis. Thực nghiệm, cao chiết ethyl acetate của sợi nấm *C. sinensis* gây ra những dấu hiệu của apoptosis ở tế bào ung thư leukemia HL-60 (Human premyelocytic leukemia cells), phân mảnh DNA và kết dính nhiễm sắc thể. Hoạt động của caspase-3 và enzyme phân giải protein đặc biệt poly ADP-ribose polymerase được phát hiện trong suốt quá trình khởi phát apoptosis. Kết quả chứng minh, cao chiết này ức chế sự tăng sinh tế bào ung thư thông qua việc gây ra apoptosis tế bào [39]. Ngoài caspase-3, caspase-8 cũng được tìm thấy gây ra apoptosis trên tế bào ung thư Leydig (MA-10) của chuột. Các hoạt chất trong *Cordyceps* gây ra apoptosis tế bào ung thư thông qua cả con đường nội sinh và ngoại sinh (intrinsic and extrinsic pathways). 02 epipolythiodioxopiperazin mới, đặt tên là gliocladicillins A và B, từ nấm *Cordyceps* ức chế sự phát triển các tế bào ung thư HeLa, HepG2, và MCF-7 bằng cách làm ngưng chu trình tế bào tại pha G₂/M và gây ra apoptosis thông qua làm tăng sự điều hòa biểu hiện của p53, p21, và cyclin B và hoạt động của caspase 8, 9 và 3 [40]. Hơn nữa, EPSF (phân đoạn exopolysaccharid) của *C. sinensis* làm giảm hàm lượng Bcl-2 trong phổi và gan [41]. Hoạt tính kháng khối u của *C. sinensis* bằng con đường apoptosis cũng được tìm thấy trên các tế bào ung thư ở người như ung thư trực tràng (human colorectal) (HT-29 và HCT-116), tế bào ung thư gan (Hep-G2, Hep-3B) (Hepatocellular carcinoma cells), và

các dòng tế bào ung thư da (human oral squamous cancer cell line) (OEC-M1) [42]. Tang và cộng sự công bố *C. sinensis* làm giảm angiotensin II gây ra apoptosis tế bào ung thư NRK-52E, nó có thể là một phần của cơ chế tác động bảo vệ sự tổn thương thận ở người bệnh cao huyết áp [43].

Các thành phần kháng oxy hóa của *C. sinensis* cũng có liên quan đến hoạt tính kháng ung thư. Cao chiết ethanol có tác động ức chế peroxide hóa lipid và bảo vệ sự tổn thương DNA ở chuột mang V79. Polysaccharid cũng được chứng minh có tác dụng ức chế sự phát triển khối u trên chuột mang H22 bằng cách làm tăng hoạt tính của enzyme kháng oxy hóa như superoxide dismutase (SOD) của gan, não và huyết tương cũng như glutathione peroxidase (GPx) của gan, não ở chuột mang khối u [44]. Wang và cộng sự báo cáo hoạt tính bắt gốc tự do của *C. sinensis* là có liên quan. Vì các gốc tự do gây ra tổn thương oxy hóa các gen apoptosis, như vậy bằng cách thu dọn gốc tự do, *C. sinensis* bảo vệ các gen này, và gây ra apoptosis của tế bào ung thư [42].

b) Hoạt tính kháng phân bào của nấm C. militaris

Nấm *C. militaris* đã được sử dụng từ lâu ở các nước Đông Á như một thuốc dược liệu tăng cường sức khỏe và hỗ trợ cho các bệnh nhân ung thư. *C. militaris* đã được chứng minh ức chế tốt sự phát triển của khối u, kéo dài sự sống của chuột mang khối u Sarcoma S180, và ức chế sự phát triển và di căn của chuột cấy ghép tế bào ung thư phổi Lewis. Cao nước của *C. militaris* ức chế sự phát triển của tế bào nội tĩnh mạch rốn người (HUVEC – Human Umbilical Vein Endothelial Cells) và các dòng tế bào ung thư người HT1080. Nó cũng làm giảm sự biểu hiện của gen metalloproteinase 2 (MMP2) ở HT1080 và gen bFGF (Basic Fibroblast Growth Factor) ở tế bào HUVECs. Đặc biệt, một protease gây độc, được tinh sạch từ quả thể khô *C. militaris*, có khả năng gây độc chống lại ung thư vú và bàng quang ở người [45].

Giống như *C. sinensis*, cơ chế kháng ung thư quan trọng nhất của *C. militaris* được tìm thấy gây ra bởi apoptosis tế bào. Thực nghiệm, cao chiết nước của *C. militaris* ức chế sự phát triển của dòng ung thư bạch cầu người U937 bằng cách thay đổi đặc điểm hình thái và sự chết tế bào theo apoptosis như sự hình thành các thể apoptosis và đứt gãy DNA. Chuột mang U937 xử lý với cao nước được quan sát thấy làm giảm sự điều hòa của gen kháng apoptosis bcl-2 và hoạt hóa các protease caspase-3 trong tế bào U937. Nhưng cao chiết này không ảnh hưởng đến sự biểu hiện của gen tiền gây apoptosis (pro-apoptotic gene) và hoạt động của caspase-9 [46]. Cao chiết nước của *C. militaris* cũng gây ra apoptosis ở tế bào ung thư HL-60 người và hoạt hóa caspase-3 và enzyme phân giải đặc biệt Poly ADP-ribose polymerase (PARP) được tìm thấy trong suốt giai đoạn apoptosis [46], [47]. Ngoài hoạt hóa caspase-3, cao chiết nước còn có liên quan đến sự ức chế hoạt động của Akt (1 oncogene) ở dòng tế bào ung thư vú người MDA-MB-231 [48]. Một nghiên cứu khác, ức chế sự phát triển và gây ra apoptosis của cao chiết nước xử lý trên dòng tế bào ung thư phổi người A549 có liên quan đến sự hoạt hóa biểu hiện Fas và caspase-8, và phân giải Bid. Hoạt hóa caspase, làm giảm sự điều hòa biểu hiện gen kháng apoptosis bcl-2, và tăng sự điều hòa biểu hiện của các protein Bax tiền apoptosis cũng được tìm thấy khi xử lý các tế bào ung thư với cao chiết này. Ngoài ra, nó tác dụng một ức chế với liều phụ thuộc hoạt động của telomerase thông qua sự giảm điều hòa biểu hiện của enzyme hTERT (Human Telomerase Reverse Transcriptase), c-Myc và Sp1. Dữ liệu cho thấy cao chiết nước này gây ra apoptosis ở tế bào A549 thông qua một đợt tính hiệu của con đường caspase nội bào liên quan đến ty thể và caspase ngoại bào liên quan đến receptor (thụ thể) và làm giảm hoạt động của telomerase thông qua ức chế hoạt động phiên mã hTERT [49].

c) Hoạt tính kháng ung thư của các loài nấm *Cordyceps* khác

Ba phức polysaccharid-peptid khác (PPCs) được sản xuất bởi nấm *Cordyceps sphecocephala* trong nuôi cấy sợi nấm và các hoạt tính

kháng ung thư của chúng được chứng minh trên các dòng tế bào ung thư gan HepG2 (hepatocarcinoma) và u nguyên bào thần kinh SK-N-SH (neuroblastoma cells). Trong nghiên cứu này, apoptosis gây ra bởi PPCs của cả 2 tế bào này được tìm thấy, có liên quan đến các sự kiện nội bào như đứt gãy DNA, hoạt hóa caspase và điều hòa hoạt động của Bcl-2 và Bax và không gây độc với tế bào bình thường đã được báo cáo [50].

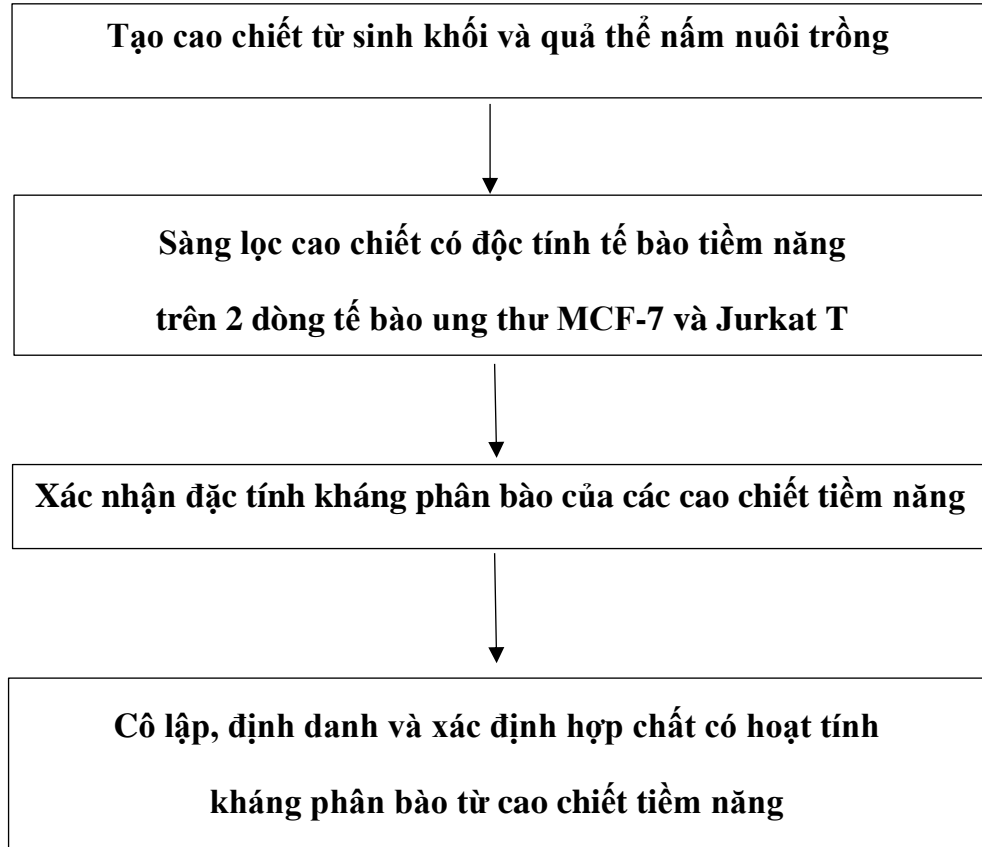
Một glucan ngoại bào không tan trong nước (CO-1) được tách chiết từ việc tủa môi trường nuôi cấy *C. ophioglossoides* và CO-1 này ức chế mạnh sự phát triển của khối u dạng rắn Sarcoma 180 [51]. Tác dụng của polysaccharid gắn protein (SN-C) tách chiết từ *C. ophioglossoides* lên sự phát triển của các khối u ở chuột được nghiên cứu và nó cho thấy ngăn chặn sự phát triển của Sarcoma 180 cấy ghép dưới màng bụng chuột. SN-C cũng cho thấy tác động gây độc đáng kể đến các tế bào ung thư nuôi cấy nhưng không ảnh hưởng đến DTH (Delayed-type Hypersensitivity) ở chuột bình thường [52]. O1 galactosaminoglycan gắn protein (CO-N) phân tách từ SN-C ức chế sự phát triển của Sarcoma 180 và kéo dài sự sống của chuột mang ung thư biểu mô Ehrlich. CO-N cũng ức chế sự phát triển của khối u vú MM46 khi tiêm tĩnh mạch với liều thấp [53]. Extracellular polysaccharid (EPS) và cao polysaccharid nội bào intracellular polysaccharide (IPS) tách chiết từ nấm *C. takaomontana* có khả năng ức chế sự phát triển của tế bào ung thư SK-N-SH thông qua apoptosis. Trong đó, liều lượng sử dụng khi xử lý với IPS là 2mg/mL trong 72 giờ. Nghiên cứu này đề nghị IPS có thể là một loại dược chất chống lại tế bào u nguyên bào thần kinh (Neuroblastoma cells – SK-N-SH) [54].

Đối với *C. neovolkiana* (*Hirsutella neovolkiana*), các nghiên cứu về phân chất, xác định hoạt tính kháng phân bào cũng như các hoạt tính sinh học khác còn ít được nghiên cứu. Sangeetha (2017) đã phân tích phổ NMR proton của cordycepin được tạo ra bởi cả sinh khối *C. sinensis* và *C. neovolkiana* cho thấy các đỉnh carbon anomeric ở 3,4

ppm, có thể so sánh với phổ NMR proton của cordycepin tiêu chuẩn. Với khả năng có hàm lượng cordycepin nhất định, *C. neovolkiana*, có thể có hoạt tính kháng ung thư [55]. Cao chiết methanol của phần cơ thể côn trùng *I. cicadae* ngăn chặn sự nhân lên của các tế bào đơn nhân ở người. Ergosterol peroxide được phân lập từ *I. cicadae* ngăn chặn sự tăng sinh và các tín hiệu hoạt hóa trong các tế bào lympho T nguyên phát của người. Các thành phần của *I. cicadae* cũng chứng minh hoạt động chống khối u. Ví dụ, các hợp chất beauvericin chiết xuất từ *I. cicadae* cho thấy khả năng gây độc tế bào đáng kể đối với các tế bào HepG2 và HepG2 / ADM có khả năng kháng nhiều loại thuốc. Polysaccharid từ *I. cicadae* ngăn chặn sự phát triển của tế bào ung thư mô liên kết S180 *in vitro*. Dịch chiết từ nước của *C. cicadae* ức chế sự nhân lên của tế bào ung thư biểu mô tế bào gan MHCC97H thông qua cảm ứng bắt giữ pha G₂/M thay vì thông qua cảm ứng apoptosis. Sắc nước và ngâm rượu là hai phương pháp lâu đời được sử dụng để bào chế thuốc cổ truyền. Thông qua phương pháp đo tế bào theo dòng chảy, cho thấy cao chiết ethanol *I. cicadae* thúc đẩy quá trình apoptosis, làm tăng nồng độ Ca²⁺ trong tế bào và bắt giữ chu kỳ tế bào trong pha S. Những tác động này liên quan đến sự mất tiềm năng xuyên màng của ty thể và sự căng thẳng bất thường của lưới nội chất. Kết quả xét nghiệm immunoblot cho thấy tác động của cao chiết ethanol *I. cicadae* được thực hiện qua trung gian của các cơ quan điều hòa chính trong các con đường truyền tín hiệu của quá trình chết rụng, chu kỳ tế bào và căng thẳng lưới nội chất chứng tỏ khả năng sử dụng các thành phần có nguồn gốc từ *C. cicadae* làm nguồn thuốc chống ung thư [56].

CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU - PHƯƠNG PHÁP

Các nghiên cứu được triển khai theo sơ đồ sau đây:



2.1. Vật liệu nghiên cứu

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

Chủng *Cordyceps neovolkiana* DL0004 thu nhận từ Langbiang, tỉnh Lâm Đồng, Việt Nam, được thu nhận, phân lập, định danh và cung cấp bởi Tiến sỹ Trương Bình Nguyên, Đại học Đà Lạt. Chủng *I. cicadae* F0004 thu nhận tại thị trấn EaKnop, huyện EaKar, tỉnh Đắk Lắk, Việt Nam. Chủng *I. cicadae* F0004 được cung cấp bởi Trung tâm Nghiên cứu và Ứng dụng sinh học. Sinh khối và quả thể của 02 chủng được nuôi cấy nhân tạo tại phòng thí nghiệm Sinh hóa, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại học Quốc gia Thành Phố Hồ Chí Minh.

2.1.2. Hóa chất

Hóa chất sử dụng trong phân chất:

Dung môi exan, chloroform, ethyl acetate, methanol, aceton, acid acetic, nước cất, vanilin, acid sulfuric, ...

Môi trường nuôi cấy tế bào (E'MEM):

Bột môi trường E'MEM; L-glutamin 2mM; NaHCO₃ 0,225%; HEPES 20mM; amphotericin-B 0,025 ug/mL; penicillin G 100 UI/mL; streptomycin 100 ug/mL; huyết thanh bào thai bò (FBS) 10% (v/v); phenol red 8 mg/L.

Hóa chất sử dụng các test apoptosis:

Môi trường E'MEM; ethanol 70%; đệm phosphate buffered saline (PBS); bovine serum albumin (BSA) 0,1%; acridin orange (AO); ethidium bromid (EB); popidium iodid (PI); vinblastin; bộ kit FITC annexin V apoptosis detection Kit (BD Pharmingen™, 556570) (Hoa Kỳ).

2.1.3. Dụng cụ và thiết bị

Becher 25 - 1000 mL; bình định mức 10 - 1000 mL; pipetman 10 - 100 µL, 100 - 1000 µL, pipet 1 - 5 mL và đầu típ tương ứng; eppendorf 0,5 mL, 1 mL, 1,5 mL, 2 mL; erlen 100 mL, 250 mL; bình lóng 250 mL, 500 mL, 1L, 2 L; hộp nhựa thể tích 500 mL; cột sắc ký thủy tinh; bản mỏng sắc ký; silica gel 230 - 400 mesh (37 - 63 µm) Himedia (Ấn Độ); ống mao quản; nồi chuẩn bị môi trường; nồi hấp khử trùng Hirayama (Nhật Bản); tủ cấy vi sinh, tủ hút Ascent® Max – Esco (Indonesia); máy khuấy từ; tủ sấy Shinsaeng (Hàn Quốc); tủ sấy dụng cụ Memmert (CHLB Đức); máy đo độ ẩm MX-50 (Nhật Bản); cân kỹ thuật Pioneer TM Ohaus (Hoa Kỳ); cân kỹ thuật BOECO (CHLB Đức); máy cô quay; máy cộng hưởng từ hạt nhân Bruker Avance (Thụy Sĩ); máy đọc OD ELISA reader Biotek (Hoa Kỳ); tủ nuôi tế bào; máy lắc đĩa; BD Accuri C6 Plus flow cytometer (BD Biosciences) (Hoa Kỳ); máy đo quang Spectro UV-Vis RS (Hoa Kỳ); một số thiết bị khác.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp thu nhận cao chiết và các hợp chất

a). Phương pháp nuôi cấy nhân tạo sinh khối và quả thể nấm *Cordyceps*

Quy trình nuôi tạo sinh hệ sợi và quả thể được tiến hành lần lượt: tạo giống cấp 1 từ ống giống gốc → tạo giống cấp 2 từ đĩa petri giống cấp 1 → nuôi các môi trường và điều kiện khác nhau tạo hệ sợi (môi trường lỏng bề mặt) hoặc nuôi tạo quả thể (môi trường bán rắn).

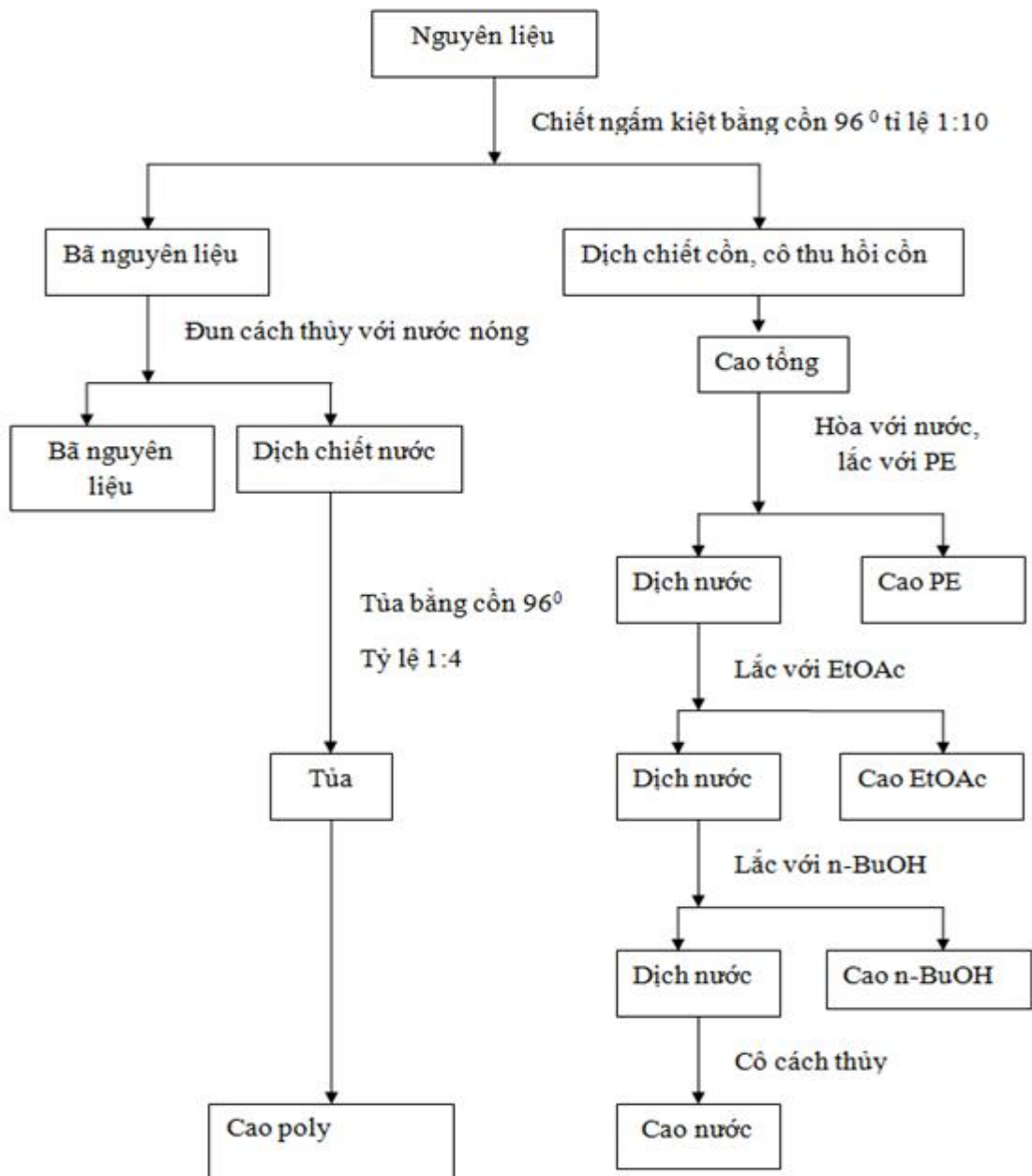
Giống cấp 1: Được nuôi bằng môi trường PGA trên đĩa petri sau khi hấp khử trùng 15 phút ở 121°C. Giống được ủ ở 20 ± 2°C trong 15 ngày, khi tơ nấm lan đều bề mặt thạch và không bị nhiễm sẽ tiến hành cấy giống cấp 2.

Giống cấp 2: Được nuôi bằng môi trường PG trong chai thủy tinh 250 ml sau khi hấp khử trùng 121°C, 20 phút. Giống được ủ ở 20 ± 2°C trong 7 ngày, tơ lan đều môi trường dịch và không bị vón cục. Giống cấp 2 sẽ được dùng để nuôi sinh khối và quả thể.

Môi trường nuôi sinh khối: Giống cấp 2 của chủng *C. neovolkiana* DL0004 và *I. cicadae* F0004 sau khi 7 ngày nuôi sẽ tiến hành chuyển sang nuôi trên môi trường lỏng, thành phần gồm: dịch nấu khoai tây (200 g/L); đường saccharose (50 g/L); peptone (6 g/L); cao nấm men (4 g/L); KH₂PO₄ (0,5 g/L); MgSO₄ (0,2 g/L); nước cất đủ 1 lít. Môi trường được hấp khử trùng sau đó cấy giống và phân phối vào dụng cụ nuôi. Sinh khối nấm có thể thu hoạch sau 40 ngày [57].

Môi trường nuôi quả thể: Quả thể nấm *C. neovolkiana* DL0004 và *I. cicadae* F0004 được nuôi trên môi trường bán rắn thành phần gồm: gạo (28,5 g/hộp); kê (9,5g/hộp); nhộng tằm (2 g/hộp); glucose (40 g/L); peptone (5 g/L); KH₂PO₄ (1,5 g/L); MgSO₄ (1,5 g/L). Môi trường được hấp khử trùng sau đó cấy giống cấp 2 khoảng 5-7 ml. Ủ tối trong 15 ngày tạo điều kiện phát triển hệ sợi nấm. Khi hệ sợi đã phát triển, nấm được mang ra ánh sáng nhằm kích thích phát triển quả thể. Sau 45 ngày có thể thu hoạch [58].

b) Phương pháp thu nhận cao chiết



Hình 2.1. Quy trình chiết cao phân đoạn *Cordyceps*

Quy trình chiết cao được thực hiện theo phương pháp của Nguyễn Kim Phi Phụng (2007) [59]. Sinh khối và quả thể khô được chiết ngấm kiệt với dung môi ethanol (Et) thu được cao Et, cao polysaccharide từ

bã sinh khối/quả thể (Poly) và từ dịch nuôi cấy (EPS) được thu nhận bằng phương pháp tủa với ethanol 96% lạnh, cao phân đoạn petroleum ether (PE), ethyl acetate (EA), n-butanol (Bu), nước (W) được thu nhận bằng phương pháp chiết lỏng – lỏng. Quy trình cụ thể gồm các bước sau:

Chiết ngấm kiệt thu nhận cao tổng

Quy trình tiến hành:

- Nguyên liệu sinh khối hoặc quả thể nấm đã sấy khô được xay nhỏ và ngâm với ethanol 96% tỷ lệ 1:10 (1 g nguyên liệu: 10 ml dung môi) trong 24 giờ. Thu nhận dịch chiết bằng phương pháp nhỏ giọt đến hết. Sau đó bổ sung thêm ethanol đúng tỷ lệ 1:10, tiếp tục ngâm 48 giờ. Quy trình được lặp lại đến khi dung môi không còn hòa tan được các chất trong nguyên liệu. Dịch chiết được đuổi dung môi bằng máy cô quay ở nhiệt độ thấp hơn 50°C.

- Hiệu suất chiết cao:

$$H = \frac{M_{cao} * \text{độ ẩm cao}}{M_{nguyên\ liệ\ u} * \text{độ ẩm nguyên liệ\ u}} * 100 \%$$

H: hiệu suất chiết cao (%)

M cao: khối lượng cao chiết (g)

M nguyên liệu: khối lượng nguyên liệu ban đầu (g)

Kết quả dự kiến: thu được cao ethanol và bã nguyên liệu chứa polysaccharide.

Thu nhận cao polysaccharide bằng phương pháp tủa cồn lạnh

Quy trình tiến hành:

- Thu nhận cao Poly: bã sinh khối sau khi chiết ngấm kiệt sẽ được sấy khô, tiếp tục chiết ngấm dầm với nước cất ở nhiệt độ 60-70°C tỷ lệ 1:1 trong 2 giờ, sau đó thu dịch chiết. Quá trình lặp lại đến khi dịch chiết không còn chứa hợp chất, cô quay hoặc để dịch chiết trong bể ổn nhiệt ở 65°C để giảm thể tích đến 1/10 thể tích ban đầu. Dịch thu được

sẽ rửa bằng ethanol 96° lạnh với tỷ lệ 1 dịch/4 ethanol trong 24 giờ, sau đó ly tâm thu rửa và sấy khô, giã nhuyễn.

- Thu nhận cao EPS: Dịch nuôi cấy sau khi thu nhận sinh khối nấm sẽ được lọc cạn, cô quay dịch này ở 60°C giảm thể tích đến tỷ lệ 1/10. Dịch sau cô quay được rửa bằng ethanol 96° lạnh, tỷ lệ 1 dịch/4 ethanol, giữ trong tủ lạnh ở 4°C trong 24 giờ. Ly tâm, thu rửa và sấy ở 50°C đến khi bay hết dung môi. Nghiền nhỏ rửa ta được cao EPS

Hiệu suất chiết cao Poly

$$H = \frac{M_{cao} * \text{độ ẩm cao}}{M_{nguyên liệu} * \text{độ ẩm nguyên liệu}} * 100\%$$

Trong đó:

H: hiệu suất chiết cao (%)

M cao: khối lượng cao

M nguyên liệu: khối lượng nguyên liệu ban đầu (g)

Hiệu suất rửa cao EPS: $H = m/V$ (g/l)

Trong đó:

H: Hiệu suất rửa cao EPS (g/l)

m: Khối lượng cao EPS (g)

V: Thể tích dịch môi trường nuôi cấy (l)

Thu nhận cao chiết phân đoạn bằng phương pháp chiết lỏng-lỏng:

Quy trình tiến hành:

- Cao Et đã chiết được hòa tan trong nước cất 2 lần tỉ lệ 1 cao: 1 nước, trộn đều để cao hòa tan tối đa. Dây dung môi có độ phân cực tăng dần là PE, EA, Bu và nước (W) được sử dụng để phân đoạn cao chiết.

- Cho hỗn hợp cao chiết vào bình lỏng, bổ sung dung môi PE vào tỷ lệ 1:1, lắc đều và để lắng, các hợp chất hòa tan trong PE sẽ tách lớp và nổi phía trên. Thu dịch nổi lớp trên, phần dịch bên dưới tiếp tục chiết với PE cho đến khi không thu nhận được chất.

Dịch chiết được cô quay dưới 50°C để đuổi dung môi thu được phân đoạn cao PE.

- Dịch ở lớp dưới tiếp tục chiết tương tự với dung môi EA thu phân đoạn cao EA, Bu thu được phân đoạn cao Bu.

- Dịch còn lại cho bay hơi dung môi và nước thu được phân đoạn cao nước.

Hiệu suất chiết cao

$$H = \frac{M_{\text{cao phân đoạn}} * D}{M_{\text{nguyên liệu}} * d} * \frac{\text{khối lượng cao tổng}}{\text{khối lượng cao tổng chiết phân đoạn}} * 100\%$$

Trong đó:

$M_{\text{cao phân đoạn}}$: khối lượng cao phân đoạn

$M_{\text{nguyên liệu}}$: khối lượng nguyên liệu đem chiết

D: độ ẩm cao chiết%

d: độ ẩm nguyên liệu%.

Kết quả dự kiến: thu được cao PE, EA, Bu và cao nước (W) của sinh khối và quả thể 02 chủng nấm nghiên cứu.

c) Phương pháp cô lập và xác định cấu trúc các hợp chất từ các loại cao chiết

Quy trình thực nghiệm:

Sinh khối nấm thu được từ quá trình nuôi nhân tạo, phơi khô, xay nhỏ. Sau đó, ngâm dầm trong ethanol ở nhiệt độ phòng. Lấy dịch cô quay thu hồi dung môi ở áp suất thấp thu được cao ethanol.

Lấy cao ethanol thô tiến hành chiết cao phân đoạn thu được cao phân đoạn ethyl acetate có khối lượng. Sau đó tiến hành sắc ký cột cao methanol với hệ dung môi phù hợp, thu được các phân đoạn. Tiến hành sắc ký cột các phân đoạn cao, cô lập và định danh các chất thu được.

Phương pháp thu nhận hợp chất bằng phương pháp sắc ký

Các cao chiết có tiềm năng gây độc tế bào ung thư từ nội dung 1

được tiến hành chạy các phương pháp sắc ký: sắc ký lớp mỏng, sắc ký cột hấp thu, sắc ký cột sephadex... để thu nhận các hợp chất hữu cơ trong cao chiết.

Sắc ký lớp mỏng (TLC)

Quy trình sắc ký lớp mỏng:

Chuẩn bị bản và pha tĩnh: Trong thực nghiệm, bản mỏng được sử dụng là Kieselgel Merck 60 F254 (20×20). Tấm nhôm được phủ với pha tĩnh là silica gel ($\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ở dạng cứng và xốp) được bổ sung chất kết dính polymer và chỉ thị màu huỳnh quang với bước sóng 254 nm, độ dày bản mỏng khoảng 175 - 225 μm .

Đưa mẫu lên bản mỏng: Dùng pipet hoặc ống nhỏ giọt đưa mẫu lên bản. Vạch xuất phát phải cách mép dưới bản khoảng 1,0 - 1,5 cm và cách bề mặt dung môi từ 0,5 - 1 cm để tránh mẫu bị hòa tan trong dung môi. Các vết ở bìa cũng phải cách 2 rìa bên bản 1 cm để tránh hiệu ứng bờ. Thể tích hay lượng mẫu đưa lên bản có ý nghĩa quan trọng đối với quá trình sắc ký, khoảng 0,1 - 50 μg , nếu lượng mẫu lớn các vết sắc ký có thể kéo vệt hay chồng lấp nếu chỉ số Rf gần nhau, nếu lượng mẫu quá thấp sẽ không phát hiện được.

Chạy sắc ký: Bình sắc ký có thể là chậu, hũ, lọ thủy tinh... có nắp đậy kín. Dung môi được sử dụng gồm: hexane, ethyl acetate, acetic acid, chloroform, acetone, methanol, ethanol, acid acetic, nước cất.... Lượng dung môi trong bình sao cho các vết mẫu nằm trên bề mặt dung môi. Đưa bản mỏng vào bình sắc ký, đậy kín bình và để chạy ở nhiệt độ phòng. Chạy sắc ký đến khi dung môi cách đỉnh bản mỏng 1-2 cm thì dừng, lấy bản ra khỏi bình làm khô dung môi và quan sát các vết xuất hiện.

Hiện sắc đồ: Các vết chất hữu cơ trên bản mỏng được hiện hình bằng đèn UV bước sóng 254 nm, phun hiện màu bằng thuốc thử vanillin/ H_2SO_4 ở nhiệt độ 105°C.

Sắc ký hấp phụ trên cột

Sắc ký cột dựa trên sự khác nhau về độ phân cực của các cấu tử trong hỗn hợp cần tách. Sắc ký hấp phụ trên cột với pha tĩnh là chất hấp phụ – thường là oxit nhôm, silica gel, CaCO_3 , than hoạt tính.... Pha động là các dung môi rửa cột, dung môi được chạy qua chất hấp phụ và kéo theo các chất trong hỗn hợp cần tách. Các chất có độ phân cực khác nhau sẽ hòa tan khác nhau trong pha động, chất hòa tan càng tốt trong pha động sẽ di chuyển càng nhanh ra khỏi cột. Sắc ký hấp phụ cột hở được tiến hành ở điều kiện áp suất khí quyển. Hạt pha tĩnh có kích thước tương đối lớn (50 - 150 μm), được nạp trong cột thủy tinh. Mẫu chất được đặt trên đầu cột trên pha tĩnh, pha động là dung môi được liên tục rót vào đáy cột. Nhờ trọng lực, dung môi di chuyển từ trên xuống đi ngang qua pha tĩnh. Dung môi giải ly ra khỏi cột ở phần dưới cột, được thu vào những lọ nhỏ đặt ngay ống dẫn ra của cột. Nếu pha tĩnh làm từ silica gel pha thuận, hợp chất không phân cực được giải ly ra khỏi cột trước và với loại silica gel loại đảo thì ngược lại. Thực nghiệm, silica pha thuận được sử dụng là Silica gel 230 - 400 mesh (37 - 63 μm).

Quy trình sắc ký cột:

Xác định hệ dung môi ly giải: Tùy vào đặc tính của cao chiết A sẽ đề xuất khảo sát hệ dung môi phù hợp sử dụng cho sắc ký cột bằng phương pháp sắc ký bản mỏng.

Thực hiện sắc ký một lần đối với mỗi hệ dung môi trên bản mỏng, trên sắc ký đồ lớp mỏng, hệ dung môi được chọn chạy sắc ký cột dựa vào các tiêu chí sau:

- Các vết có di chuyển, có tách nhau, không bị kéo thành vệt dài.
- Các vết cần tách có R_f khoảng 0,3 - 0,6. Đối với cao chiết thô, chọn hệ dung môi giải ly là dung môi có thể đẩy vết ít phân cực nhất của cao chiết lên với $R_f = 0,5$, với hỗn hợp mẫu từ 2 - 3 hợp chất nên chọn dung môi có thể đẩy hợp chất cần quan tâm lên vị trí $R_f = 0,2 - 0,3$.

Nạp chất hấp thu vào cột

Các khảo sát thực nghiệm cho thấy muốn tách chất tốt thì trọng lượng chất hấp thu phải lớn hơn 25-50 lần trọng lượng của mẫu cần sắc ký. Với các hợp chất khó tách riêng thì lượng chất hấp thu từ 100-200 lần lượng mẫu còn các hợp chất dễ tách thì sử dụng lượng chất hấp thu ít hơn. Hiệu quả phân tách còn phụ thuộc vào kích thước cột với tỷ lệ chiều cao chất hấp phụ: đường kính trong của cột khoảng 10:1. Cân lượng silicagel tương ứng với cột, hòa với dung môi (tùy vào dung môi hòa tan cao chiết) ngâm khoảng 2 giờ và đổ từ từ vào cột, đáy cột lót một miếng bông nhỏ để silicagel khỏi chảy ra khỏi cột. Sau khi nạp xong, cho dung môi chảy qua chất hấp phụ liên tục, chờ silicagel nén chặt để cân bằng cột.

Một số lưu ý trong quá trình nạp chất hấp thu vào cột: lượng dung môi sử dụng phải vừa đủ để hỗn hợp không được quá sệt khiến bột khí sẽ bị bắt giữ trong cột. Trong quá trình nạp cột, không được để đầu cột bị khô, luôn phải có dung môi ở trên đầu cột. Kích thước hạt không nên quá mịn tránh gây tắc cột.

Đặt mẫu chất lên đầu cột sắc ký

Khối lượng cao chiết A được hòa tan trong dung môi, trộn với silica gel để đồng nhất mẫu, sau đó sấy trở thành dạng bột khô. Đặt mẫu bột khô này lên đầu cột, để thấm ướt bột silicagel và cho vào cột. Sau đó, cho một lớp silica gel dày khoảng 0,5 cm đổ nhẹ lên mặt thoáng của chất hấp thu để bảo vệ mặt cột. Cho dung môi vào cột bắt đầu quá trình sắc ký

Thu mẫu và kiểm tra quá trình ly giải:

Dung môi giải ly được đựng trong hũ thủy tinh nhỏ với thể tích phù hợp, đũa dung môi và tiến hành sắc ký lớp mỏng với hệ dung môi tương ứng khi chạy cột, các hũ thủy tinh nhỏ có các vết giống nhau thì gom chung thành một phân đoạn. Quá trình tiếp diễn đến khi trên bản mỏng xuất hiện vết thấp nhất khi thử chọn hệ và lượng chất đã ra khoảng 70-80% thì ngừng bằng cách xả cột với dung môi có độ phân

cực cao như aceton, methanol. Sắc ký cột được tiến hành nhiều lần để thu được hợp chất sạch. Trong thực nghiệm, do số lượng chất trong cao chiết lớn, để sàn lọc và giảm thời gian thu nhận các chất, sau khi chạy sắc ký lớp mỏng và sắc ký cột lần để phân đoạn cao chiết cấp 2, chúng tôi tiến hành khảo sát hoạt tính gây độc tế bào MCF-7 của các phân đoạn này. Nếu phân đoạn có hoạt tính gây độc cao sẽ chọn để tiếp tục phân chất. Chất sau khi thu nhận sẽ được xác định cấu trúc hóa học bằng phương pháp cộng hưởng từ hạt nhân NMR. Các hợp chất được pha trong các dung môi phù hợp đã được deuterium (một đồng vị phóng xạ của hydrogen) với độ tinh khiết 99,5%, hòa tan tốt các chất cần đo và không phản ứng hóa học với mẫu.

Phương pháp xác định cấu trúc hóa học của hợp chất bằng phương pháp cộng hưởng từ hạt nhân NMR

Các hợp chất sạch được xác định cấu trúc hóa học bằng phương pháp cộng hưởng từ hạt nhân NMR xác định khung sườn carbon và hydrogen của hợp chất nhờ sử dụng từ trường và sóng radio. Chất cần đo phổ được hòa trong dung môi phù hợp và bắn phổ $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$. Các thiết bị ghi phổ $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz), $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz) tại phòng Phân tích Trung tâm trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh.

Phổ $^1\text{H-NMR}$

Phổ ^1H giúp xác định khung hidro của hợp chất, nguyên tắc cơ bản để nhận biết các tín hiệu cộng hưởng là các loại proton khác nhau sẽ cho các tín hiệu cộng hưởng khác nhau và các proton tương đương sẽ cho cùng một tín hiệu cộng hưởng, đối với hợp chất đối xứng chỉ nửa số tín hiệu cộng hưởng xuất hiện trên phổ nên cần khối phổ để xác định.

Một nhược điểm của phổ ^1H là các proton linh động như phenol, alcohol (Ph-OH, R-OH), thiol (R-SH), amin (R-NH-), carboxylic acid (R-CO-OH), amid (R-CO-NH-) có thể không xuất hiện. Để xác định một tín hiệu có phải là của proton linh động có thể dựa vào phổ HSQC.

Phần lớn các loại proton cộng hưởng trong vùng 0–12 ppm, sự khác nhau của độ dịch chuyển hóa học giúp xác định được loại proton nào ví dụ như gốc methyl hydrogen ($-\text{CH}_3$) có độ dịch chuyển 0,8-1,0 ppm; methylene hydrogen ($-\text{CH}_2$) có $\delta = 1,2-1,5$ ppm, aromatic hydrogen (Ar-H) có $\delta = 6,5-8,5$ ppm.... Ngoài ra, dựa vào cường độ tích phân của mũi cộng hưởng có thể xác định số lượng proton gây ra tín hiệu cộng hưởng đó.

Để xác định tương tác của các tín hiệu hydro của hợp chất có thể dựa vào sự tách spin-spin (sự ghép cặp) và hằng số ghép của các tín hiệu. Mỗi proton đều chịu một từ trường ngoài do máy áp đặt còn chịu ảnh hưởng bởi từ trường tại chỗ do sự che chắn của các điện tử xung quanh đặc biệt nếu có các proton kề bên, từ trường nhỏ của proton này sẽ tác động và gây ra hiện tượng che mũi hấp thu, số lượng mũi bị che sẽ tuân theo quy luật $n+1$, có nghĩa là một proton khảo sát có n phân tử kề bên thì sẽ cho tín hiệu là $n+1$ mũi trên phổ và các mũi có diện tích tỷ lệ theo nguyên tắc Pascal.

Khoảng cách giữa các mũi đa trong các tín hiệu của hai loại proton được gọi là hằng số ghép (coupling constant), hai proton ghép từ với nhau thì hằng số ghép sẽ bằng nhau ký hiệu là J , đơn vị đo tính bằng Hertz. Hai proton ghép từ với nhau thì khoảng cách này sẽ bằng nhau. Hai proton ghép nhau sẽ có cùng hằng số ghép J nên nếu quan sát thấy có hai mũi đa có cùng giá trị hằng số ghép, có thể hai nhóm proton này ở kề bên nhau trong phân tử. Hằng số ghép không thay đổi theo từ trường của máy do ảnh hưởng từ của 1 proton lên trên 1 proton khác tùy thuộc vào bản chất của nối hóa trị nối liền hai proton. Hằng số ghép của hydro trên vòng thơm với vị trí ghép orthro khoảng 6-8, vị trí ghép meta khoảng 1-3 và vị trí para khoảng 0-1 Hz.

Phổ ^{13}C -NMR

Để xác định được khung carbon của hợp chất, ta có thể sử dụng phương pháp quang phổ hạt nhân để đo tín hiệu cộng hưởng của phân

tử carbon, tuy nhiên ^{12}C không có spin hạt nhân nên không thể quan sát bằng NMR. Đồng vị của C là ^{13}C có spin hạt nhân nhưng hiện diện trong tự nhiên chỉ 1,1% nên tín hiệu của phổ là trung bình của hàng trăm hay ngàn lần ghi phổ. Phần lớn sự cộng hưởng của ^{13}C hiện diện trong vùng từ 0 đến 220 ppm so với tín hiệu của TMS tại 0 ppm. Trên phổ ^{13}C NMR (ngoại trừ trường hợp có sự đối xứng) mỗi một nét gạch là một nguyên tử carbon khác nhau, từ đó giúp biết được số nguyên tử carbon khác nhau trong phân tử. Mỗi loại carbon cho 1 tín hiệu trong khoảng độ dịch chuyển nhất định, do đó dựa vào độ dịch chuyển của từng tín hiệu trên phổ có thể xác định được loại nhóm chức carbon. Cụ thể phổ ^{13}C cung cấp các thông tin sau:

- Số lượng các tín hiệu khác nhau cho biết số loại carbon có trong phân tử. Nếu phân tử không có tính đối xứng, mỗi carbon cho một tín hiệu cộng hưởng. Nếu trong phân tử có tính đối xứng, 2 carbon tương đương nhau sẽ cho cùng một tín hiệu cộng hưởng.
- Dựa vào khối phổ (cho biết công thức phân tử $\text{C}_x\text{H}_y\text{O}_z\text{N}_t\dots$) so sánh số tín hiệu trên phổ ^{13}C NMR với số lượng carbon trong công thức phân tử.
- Độ dịch chuyển hoá học (δ_{C}) cho biết carbon của nhóm định chức nào: alkane, alkene, alcohol, amin, aldehyde, ketone, ester, carboxylic acid....
- Chiều cao tương đối giữa các tín hiệu (khi ghi phổ có định lượng carbon) giúp biết tín hiệu đó tương đương với bao nhiêu carbon.

Sau khi tiến hành đo phổ, kết quả phổ ^1H -NMR và ^{13}C -NMR được phân tích bằng phần mềm MestReNova 11.0 để xác định công thức cấu tạo của các hợp chất. Tất cả phổ được ghi tại phòng Phân tích Trung tâm, trường Đại học Khoa học Tự nhiên thành phố Hồ Chí Minh. Các chất thu nhận (chất R) được xác định cấu trúc trong cao chiết A, tiến hành phân tích hoạt tính và khảo sát hoạt tính gây độc tế trên dòng tế bào ung thư MCF-7 và Jurkat T.

Kết quả dự kiến: thu nhận và xác định được công thức cấu tạo một số hợp chất từ cao chiết có hoạt tính gây độc tế bào cao trên hai dòng tế bào ung thư MCF-7 và Jurkat T.

2.2.2. Phương pháp khảo sát hoạt tính gây độc tế bào và xử lý apoptosis của cao chiết và các hợp chất

a) *Phương pháp khảo sát hoạt tính gây độc tế bào bằng SRB* [60], [61]

Quy trình SRB: Quy trình SRB cung cấp từ phòng thí nghiệm Sinh học Phân tử, bộ môn Di truyền, Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.

Môi trường nuôi cấy tế bào

Sử dụng dòng tế bào ung thư MCF-7, (thế hệ thứ 4-20) do ATCC (Hoa Kỳ) cung cấp, được nuôi cấy trong môi trường E'MEM có bổ sung L-glutamin (2 mM) (Sigma), HEPES (20 mM) (Sigma), amphotericin B (0,025 µg/ml) (Sigma), penicillin G (100 UI/ml) (Sigma), streptomycin (100 µg/ml) (Sigma), 10% (v/v) huyết thanh bào thai bò FBS (Fetal Bovine Serum) (Sigma) và ủ ở 37°C, có 5% CO₂ đạt độ bão hòa khoảng 70-80%.

Thiết kế thực nghiệm:

Thí nghiệm được thực hiện trên đĩa 96 giếng theo sơ đồ như sau:

- Đối chứng âm: tế bào với dung môi hòa tan chất thử DMSO 0,5%, nước cất 2 lần.
- Đối chứng dương: Camptothecin nồng độ 0,01 ppm đối với dòng tế bào MCF-7
- Thí nghiệm: với mỗi mẫu cao chiết và tại mỗi nồng độ thử nghiệm, gồm có 2 giếng không có tế bào chỉ có môi trường nuôi cấy chứa chất thử ở các nồng độ khảo sát (giếng blank) và 2 giếng (mẫu thử + dịch huyền phù tế bào).

Quy trình khảo sát SRB

Chuẩn bị mẫu: mẫu được pha loãng trong DMSO 5% (với mẫu tan trong DMSO) hoặc trong nước (với các mẫu tan trong nước) để được dung dịch mẹ có nồng độ 5000 µg/ml. Mẫu cao được bảo quản ở 4°C.

Sử dụng môi trường nuôi cấy E'MEM 10% FBS để pha loãng dung dịch mẹ này thành nồng độ cần thử nghiệm. Một số mẫu làm nhiễm khuẩn và tạo tủa trong môi trường nuôi cấy nên sau khi mẫu hòa tan trong DMSO, pha loãng đến nồng độ yêu cầu trong môi trường nuôi cấy rồi lọc vô khuẩn bằng màng lọc 0,22 µm.

Chuẩn bị tế bào: Tế bào đã được chuẩn bị và nuôi trong tủ ấm, độ bao phủ đạt từ 70-80%.

Tách tế bào bằng trypsin/EDTA, tính mật độ tế bào, pha dịch huyền phù tế bào ban đầu với môi trường theo để đạt nồng độ khoảng 10^4 tế bào/100 µl.

Đưa 100 µl dịch tế bào vào mỗi giếng và kiểm tra mức độ trải đều của dịch tế bào trong giếng. Đặt vào tủ ấm ủ trong 24 giờ để phát triển đến pha cân bằng.

Xử lý tế bào với cao chiết:

Pha loãng cao trong tủ vô trùng, thêm 100 µl cao với các nồng độ khác nhau vào giếng chứa tế bào, trộn đều. Ủ 48 giờ.

Cố định tế bào: Bổ sung 50 µl TCA (trichloroacetic acid) 50% lạnh vào mỗi giếng; đặt trong tủ lạnh từ 1-3 giờ; loại dịch; rửa 5 lần bằng nước (200 µl/giếng), để khô ở nhiệt độ phòng trong 12-24 giờ.

Nhuộm protein nội bào với SRB: bổ sung 100 µl SRB 0,2% vào mỗi giếng, để ở nhiệt độ phòng trong 20 phút; rửa đĩa 4 lần với acid acetic 1% (200 µl/giếng); thấm đĩa trên giấy để loại acid acetic còn lại, để khô 12-24 giờ.

Đọc kết quả: bổ sung 200 µl Tris-base 10 mM vào mỗi giếng; lắc đĩa trên máy lắc đến khi SRB cố định được hòa tan hết (10 phút); ghi nhận giá trị OD tại bước sóng 492 và 620 nm bằng máy đọc ELISA reader.

Các thí nghiệm được lặp lại ba lần và kết quả được trình bày dưới dạng giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn.

Xử lý kết quả

- Tính giá trị OD = OD₄₉₂ - OD₆₂₀ (1)
- Tính OD₄₉₂ (hoặc OD₆₂₀) = OD_{tb} - OD_{blank} (2)
- Tính tỷ lệ (%) gây độc tế bào theo công thức:

$$\%I = \left(1 - \frac{OD_{tn}}{OD_c}\right) * 100\%$$

OD₄₉₂: OD đo ở bước sóng 492nm

- OD₆₂₀: OD đo ở bước sóng 620nm

- OD_{tb}: giá trị OD của giếng có chứa tế bào

- OD_{blank}: giá trị OD của giếng blank (không có tế bào)

- OD_{tn}: giá trị OD của mẫu thử tính từ công thức (1) và (2)

- OD_c: giá trị OD của mẫu chứng (control) tính từ công thức (1) và (2)

Nếu% gây độc lớn hơn 50% thì kết luận cao chiết có khả năng gây độc và tiếp tục tiến hành xác định giá trị IC₅₀.

Kết quả dự kiến: xác định hoạt tính gây độc tế bào đối với 02 dòng tế bào MCF-7 và Jurkat T của các cao chiết của sinh khối và quả thể *C. neovolkiana* DL0004 và *I. cicadae* F0004 và các hợp chất thu nhận được từ cao chiết có hoạt tính gây độc tế bào cao.

b) Phương pháp khảo sát khả năng apoptosis

Các cao chiết và hợp chất có tiềm năng gây độc tế bào sẽ được đánh giá khả năng gây apoptosis tế bào MCF-7 và Jurkat T với nồng độ tại IC₅₀. Thí nghiệm được thực hiện tại phòng thí nghiệm Sinh học Phân tử, bộ môn Di truyền, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.

Các cao chiết chất được cảm ứng với dòng tế bào ung thư MCF-7

và Jurkat T. Để xác định có sự apoptosis, tế bào ung thư được phân tích đặc điểm chu kỳ tế bào bằng phương pháp flow cytometry, phân tích kiểu hình tế bào phương pháp nhuộm kết hợp AO/EB, và phát hiện và định lượng bằng phương pháp nhuộm annexin V/PI.

Phân tích kiểu hình tế bào bằng phương pháp nhuộm AO/EB.

Quy trình thực hiện:

- Các tế bào MCF-7 được nuôi với mật độ 2×10^5 tế bào / đĩa 35 mm, ủ tại 37°C , 5% CO_2 trong 24 giờ.
- Các tế bào sau đó được xử lý với cao chiết với nồng độ tại IC_{50} . Chứng âm là dung môi pha cao với cùng thể tích, chứng dương là camptothecin 0,01 ppm.
- Sau 48 giờ cảm ứng, các tế bào được rửa 1 lần bằng PBS 1X
- Thêm 25 μL thuốc nhuộm acridin cam và ethidium bromid (AO/EB) (100/300 $\mu\text{g}/\text{mL}$).
- Hình thái tế bào được quan sát và chụp hình bằng kính hiển vi huỳnh quang ở độ phóng đại 400X.

Phân tích chu kỳ tế bào bằng phương pháp flow cytometry

- Quy trình thực hiện như sau:
- Phương pháp chuẩn bị tế bào tương tự Phương pháp khảo sát hoạt tính gây độc tế bào bằng SRB đã trình bày đã trình bày ở mục trên.
- Các tế bào MCF-7 và Jurkat T được nuôi với mật độ 3×10^4 tế bào / giếng trong các đĩa 96 giếng. Sau 24 giờ tăng trưởng, các tế bào được ủ với nồng độ cao chiết tại giá trị IC_{50} , mẫu đối chứng là dung môi pha mẫu.
- Sau 24 giờ hoặc 48 giờ xử lý, các tế bào sau đó được thu hoạch, ly tâm tốc độ 200G trong 5 phút ở 4°C , thu phần cặn tế bào và hòa trong 1 ml PBS + 0,1% BSA lạnh (lặp lại 2 lần) thu được 1 ml dịch tế bào. Chia 2 phần, 500 μl tế bào (2.5×10^5 tế bào) để tiến hành phân tích Chu kỳ tế bào và 500 μl tế bào tiến hành thí nghiệm định lượng apoptosis bằng phương pháp annexin V/PI.

- Thêm vào 500 μl tế bào (2.5×10^5 tế bào) 5 ml 70% ethanol trong ít nhất 2 giờ để cố định tế bào. Ly tâm hỗn hợp tốc độ 300G trong 10 phút ở 4°C , thu cặn tế bào và huyền phù vào 1 ml PBS lạnh. Tiếp tục ly tâm lần 2 tốc độ 300G trong 10 phút ở 4°C thu cặn tế bào.
- Bổ sung 100 μl thuốc nhuộm PI ủ 30 phút trong tối ở nhiệt độ phòng.
- Sau khi nhuộm, bổ sung thêm 200 μl PBS và tiến hành flow cytometry.
- Kết quả được trình bày dưới dạng $\text{TB} \pm \text{SD}$, các kết quả được so sánh và đánh giá sự khác biệt bằng phần mềm thống kê Prism9.0.0.121.

Định lượng tế bào bị apoptosis bằng phương pháp nhuộm annexin V/PI

Quy trình thực hiện như sau:

- Phương pháp chuẩn bị và xử lý tế bào thực hiện tương tự mục trên. Thực nghiệm có 3 nghiệm thức gồm tế bào không xử lý với mẫu, tế bào xử lý với dung môi pha mẫu và tế bào xử lý với mẫu cao chiết. Thời gian xử lý 24 giờ và 48 giờ.
- 500 μl tế bào ($2,5 \times 10^5$ tế bào) thu nhận sau khi xử lý với cao (thực hiện tương tự mục trên) được ly tâm với tốc độ 200G trong 5 phút tại 4°C , thu nhận cặn tế bào và huyền phù trong 250 μl Binding buffer 1X. Hút lần lượt 100 μl cho vào 2 tube.
- Tube 1 bổ sung 400 μl binding buffer 1X và tiến hành chạy flow cytometry phân tích tế bào (mẫu không nhuộm).
- Tube 2 bổ sung 5 μl PI và 5 μl FITC, ủ 15 phút trong tối ở nhiệt độ phòng. Bổ sung 400 μl binding buffer 1X và tiến hành chạy flow cytometry. Bộ kit FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit (BD Pharmingen™, 556570) sử dụng annexin V kết hợp với FITC phát quang màu xanh, sự kết hợp này giúp cho phép phân biệt tế bào apoptosis sớm (Annexin V+/PI-), tế bào apoptosis muộn (Annexin V+/PI+), tế bào hoại

tử (Annexin V-/PI +), và tế bào sống (Annexin V-/PI -).

2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được thể hiện dưới dạng trung bình độ lệch chuẩn, các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm GraphPad Prism 9.0.0.121. Giá trị có $p < 0,05$ được chấp nhận là có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Chiết cao từ sinh khối và quả thể *C. neovolkiana* DL0004 và *I. cicadae* F0004

Tiến hành chuẩn bị nguyên liệu đủ số lượng và ổn định chất lượng cho quá trình chiết cao, chiết cao phân đoạn, cô lập hợp chất chính và khảo sát các hoạt tính kháng phân bào trên các dòng tế bào ung thư, các chủng nấm *C. neovolkiana* DL0004 và *I. cicadae* F0004 được lựa chọn để tiến hành nuôi thu sinh khối và quả thể.

Để tạo sinh khối nấm, rót 200 ml môi trường nuôi vào hộp nhựa trắng trong dung tích 700 ml và tiến hành nuôi 1.000 hộp/ mỗi chủng nấm *C. neovolkiana* DL0004 và *I. cicadae* F0004 bằng phương pháp nuôi lỏng tĩnh, sau 35 ngày tiến hành thu hoạch và được sinh khối khô trung bình mỗi hộp của 02 chủng nấm *C. neovolkiana* DL0004 và *I. cicadae* F0004 lần lượt là 1,76 gram/ hộp và 2,63 gram/ hộp (*Phụ lục tóm tắt quy trình nuôi Cordyceps thu sinh khối*).

Để tạo quả thể nấm, (cho 200 gram môi trường nuôi vào hộp nhựa dung tích 700 ml và tiến hành nuôi 1.000 hộp/ mỗi chủng nấm *C. neovolkiana* DL0004 và *I. cicadae* F0004 bằng phương pháp nuôi bán rắn, sau 45 ngày tiến hành thu hoạch và được khối lượng quả thể khô trung bình mỗi hộp của 02 chủng nấm *C. neovolkiana* DL0004 và *I. cicadae* F0004 lần lượt là 0,52 gram/ hộp và 1,37 gram/ hộp (*Phụ lục tóm tắt quy trình nuôi Cordyceps thu quả thể*).



Hình 3.1. (A) Sinh khối *C. neovolkiana* DL0004, (B) quả thể *C. neovolkiana* DL0004, (C) sinh khối *I. cicadae* F0004, (D) quả thể *I. cicadae* F0004

Năng suất nấm thu được với 02 chủng nấm *C. neovolkiana* DL0004 và *I. cicadae* F0004 có sự khác biệt giữa phương pháp nuôi thu sinh khối hệ sợi và thu quả thể. Trong đó năng suất sinh khối của cả 02 chủng nấm đều cao hơn năng suất quả thể vì trong phương pháp nuôi thu nhận quả thể thì phần đế nấm không thu hoạch. Bên cạnh đó, năng suất *I. cicadae* F0004 cao hơn nhiều so với *C. neovolkiana*

DL0004 ở cả quả thể và sinh khối. Sự khác biệt về năng suất nấm quả thể và sinh khối cùng một chủng nấm cũng như sự khác biệt về năng suất nấm các chủng nấm khác nhau có thể do vật chất di truyền hoặc do dinh dưỡng (khoáng, C/N,..., điều kiện môi trường (ánh sáng, nhiệt độ, độ ẩm, pH, ...)) của các chủng nấm khác nhau.

Bảng 3.1. Hiệu suất chiết cao trung bình từ sinh khối và quả thể nấm *C. neovolkiana* DL0004 và *I. cicadae* F0004

Loại Cao chiết	Hiệu suất chiết cao (%)	
	<i>C. neovolkiana</i> DL0004	<i>I. cicadae</i> F0004
SK Et	41,07 ± 2,37	29,05 ± 1,22
SKPE	10,50 ± 1,74	9,02 ± 0,35
SK EA	1,12 ± 0,08	1,13 ± 0,04
SK Bu	4,07 ± 0,35	2,98 ± 0,11
SK W	18,57 ± 0,93	10,10 ± 0,61
SK Poly	9,80 ± 0,64	9,77 ± 0,72
SK EPS (g/l)	2,96 ± 0,14	1,67 ± 0,04
QT Et	16,69 ± 1,33	23,31 ± 0,95
QT PE	3,53 ± 0,63	9,71 ± 0,53
QT EA	0,78 ± 0,07	1,41 ± 0,05
QT Bu	2,87 ± 0,15	2,87 ± 0,09
QT W	8,99 ± 0,67	6,31 ± 0,32
QT Poly	13,80 ± 1,36	9,52 ± 0,41

Sinh khối và quả thể thu được sẽ được chiết cao với các dung môi có độ phân cực khác nhau. Mục đích chiết cao nhằm cô lập các hợp chất hữu cơ trong sinh khối và quả thể *C. neovolkiana* DL0004 và *I. cicadae* F0004 và dễ dàng bảo quản mẫu nghiên cứu. Trong nghiên cứu này, phương pháp chiết ngâm kiệt và phương pháp chiết lỏng - lỏng để thu nhận các cao chiết khác nhau đã được áp dụng.

Kết quả (bảng 3.1.) cho thấy các cao chiết từ sinh khối đạt hiệu suất cao hơn so với hiệu suất của các cao chiết từ quả thể.

Đối với cao sinh khối và quả thể *C. neovolkiana* DL0004, tỷ lệ cao ethanol từ sinh khối (SK Et) là 41,07% và cao hơn nhiều so với tỷ lệ cao ethanol từ quả thể (QT Et) là 16,69%. Điều này cho thấy, có nhiều chất hòa tan trong cao SK Et. Tương tự như vậy, kết quả trong cao nước và cao PE là 18,57%, 10,50% trong sinh khối và 8,99%, 3,53% ở quả thể, tương ứng. Đáng chú ý, cao chiết EA chiếm tỷ lệ thấp cả trong sinh khối (1,12%) và quả thể (0,78%). Sinh khối và quả thể của *C. neovolkiana* DL0004 đều chứa các hợp chất hữu cơ không phân cực và phân cực. Đặc biệt, các hợp chất phân cực và không phân cực chiếm phần lớn bởi chiết xuất từ dung môi butanol (cao Bu), dung môi là nước (cao W) và cao Poly thu nhận từ chiết xuất bã của sinh khối và quả thể sau khi chiết với các dung môi: ethanol (Et), petroleum ether (PE), ethyl acetate (EA), butanol (Bu), nước (W). Các cao chiết này sẽ là nguyên liệu để đánh giá khả năng gây độc tế bào, thành phần hóa học và cấu trúc và khả năng gây apoptosis hai dòng tế bào ung thư MCF-7 và Jurkat T.

Đối với *I. cicadae* F0004, sinh khối và quả thể chứa nhiều hợp chất có độ phân cực đa dạng, trong đó các hợp chất có độ phân cực thấp và cao chiếm chủ yếu: Cao PE sinh khối 9,02% và quả thể là 9,71%, cao W sinh khối 10,1% và quả thể 6,31%. Phân đoạn có độ phân cực trung bình là cao EA và cao Bu chiếm tỉ lệ thấp, trong đó EA có hiệu suất thấp nhất ở cả sinh khối (1,13%) và quả thể (1,41%). Kết quả cũng cho thấy nấm *I. cicadae* F0004 nuôi cấy nhân tạo chứa nhiều polysaccharid ở cả sinh khối (9,77%) và ở quả thể (9,52%).

Kết quả chiết cao từ 02 chủng *C. neovolkiana* DL0004 và *I. cicadae* F0004 nuôi cấy sinh khối và quả thể đã thu được 26 loại cao chiết có hiệu suất khác nhau (bảng 3.1). Hiệu suất chiết cao có sự khác biệt rất lớn ở các phân đoạn, điều này chứng

tổ thành phần hóa học của các chủng *C. neovolkiana* DL0004 và *I. cicadae* F0004 nuôi cấy nhân tạo khác nhau. Hiệu suất chiết cao từ sinh khối và cao từ quả thể của các chủng cũng có sự khác biệt rõ ràng, hứa hẹn thành phần hóa học đa dạng của sinh khối và quả thể các chủng nấm nuôi cấy. Dựa trên nguyên tắc các chất tan trong nước và dung môi, sinh khối và quả thể *C. neovolkiana* DL0004 và *I. cicadae* F0004 được dùng để chiết các loại cao chiết sau: cao Et, cao PE, cao EA, cao Bu, cao W và cao Poly từ quả thể. Đối với sinh khối nấm, kết quả nghiên cứu còn thu thêm được cao Polysacchrid ngoại bào (EPS). Cao Et là nguyên liệu để chiết các phân đoạn khác nên các chất có trong cao phân đoạn cũng sẽ hiện diện trong cao ethanol nên để định tính một hợp chất nào đó có trong nguyên liệu người ta thường thử trên cao ethanol đầu tiên. Các nghiên cứu cho thấy, các chủng nấm *Cordyceps* spp. chứa nhiều hoạt chất có khả năng hòa tan trong ethanol như cordycepin, cordceplic acid, ergostery-1-3-O- β -D glucopyranosid, perlolyrin, các dẫn xuất của cordysin (A-E),...[30].

Ethanol là dung môi phổ biến nên cao ethanol thường được kiểm tra hoạt tính đầu tiên. Park và cộng sự (2017) cũng chứng minh dịch chiết từ ethanol của *Cordyceps* có thể giảm kích thước và khối lượng của khối u trên mô hình chuột chuột bị ung thư bạch cầu [62]. Sau khi chiết xong, một phần cao tổng sẽ được đem đi chiết phân đoạn để phân tách các chất hiện diện trong cao tổng thành các chất có thể hòa tan trong các dung môi có độ phân cực khác nhau, để dễ dàng cho việc xác định hoạt tính và tinh sạch xác định các chất sau này. Ở nghiên cứu này, cao ethanol lần lượt sử dụng bốn dung môi có độ phân cực tăng dần PE < EA < Bu < W để chiết cao phân đoạn. PE là dung môi đầu tiên được sử dụng trong chiết lỏng - lỏng để hòa tan hầu hết các chất kém phân cực có trong cao ethanol. Cao PE ở nhiệt độ phòng tương đối lỏng và sệt nhưng độ ẩm thấp bởi đây phân đoạn chứa các acid béo. *Cordyceps* có hàm lượng các acid béo không bão hòa chiếm khoảng 57,84%, chính lượng acid béo này đã làm cho cao ở trạng thái lỏng. Các chất tan được trong PE phần lớn là các acid béo và các steroid như ergosterol. Ergosterol là nguồn cung cấp vitamin D2 và tạo nên một số hormon do đó có vai trò quan trọng đối với con người. Năm 2018, Juanjuan đã phân lập từ các cao chiết của *C. militaris* được các chất: ergosterol, adenosin, cordycepin, ergosterol peroxid, acid Các polysaccharid-peptid, tetracosanoic 2,3-dihydroxypropylester, mannitol và procoagulant [63].

Đồng thời theo Wu và cộng sự (2007), đã xác định trong dịch chiết EA của *Cordyceps* có sự hiện diện của adenosin, cordycepin, ergosterol, đường...[27]. Đây là những thành phần có hoạt tính sinh học cao. Sau khi thu được cao EA, dịch còn lại tiếp tục chiết với Bu bão hòa, đây là một dung môi ít phân cực hơn so với EA. Đồng thời hàm lượng chất tan trong Bu cũng cao hơn EA. Nước là một dung môi phân cực hòa tan nhiều chất và không hòa tan hoàn toàn, tách lớp khi trộn chung với PE, EA, Bu. Đây là dung môi đầu tiên được dùng trong chiết phân đoạn. Nhưng vì độ phân cực quá cao nên cao nước được thu nhận cuối cùng trong chiết phân đoạn theo phương pháp lỏng - lỏng. Tuy nước là một dung môi thông dụng, không độc hại và hòa tan khá nhiều chất nhưng lại rất dễ bị nhiễm khuẩn nên cần được hút ẩm tốt và bảo quản lạnh cẩn thận.

Các polysaccharid nội bào này đã được chứng minh là có khả năng chống oxy hóa, kháng khuẩn và nhiều tác dụng khác... [64]. Dịch môi trường thu được sau khi nuôi cấy được cô quay và rửa với ethanol để thu cao Poly. Tùy vào đáp ứng với môi trường nuôi mà lượng exopolysaccharid được tạo ra khác nhau. Sheng và cộng sự, 2011 cũng đã chứng minh EPS có khả năng điều hòa miễn dịch và kháng phân bào. Chúng có khả năng tăng sinh lympho ở lách, tăng các yếu tố hoại tử khối u ((TNF- α), interferon (IFN- γ) interleukin-2 (IL-2) [65]. Do đó, việc có thể tạo ra được một lượng lớn exopolysaccharid là tiềm năng để nghiên cứu và ứng dụng.

Kết quả thu được 26 cao chiết từ sinh khối và quả thể của 02 chủng *C. neovolkiana* DL0004 và *I. cicadae* F0004 có hiệu suất chiết cao khác nhau, điều này có thể do đặc tính của giống hoặc có thể do môi trường, kỹ thuật nuôi cấy nhân tạo. Các cao chiết này sẽ được đánh giá khả năng gây độc đối với 02 dòng tế bào ung thư MCF-7 và Jurkat T, phân chất, định danh một số chất và xác định khả năng gây apoptosis 02 dòng tế bào ung thư MCF-7 và Jurkat T.

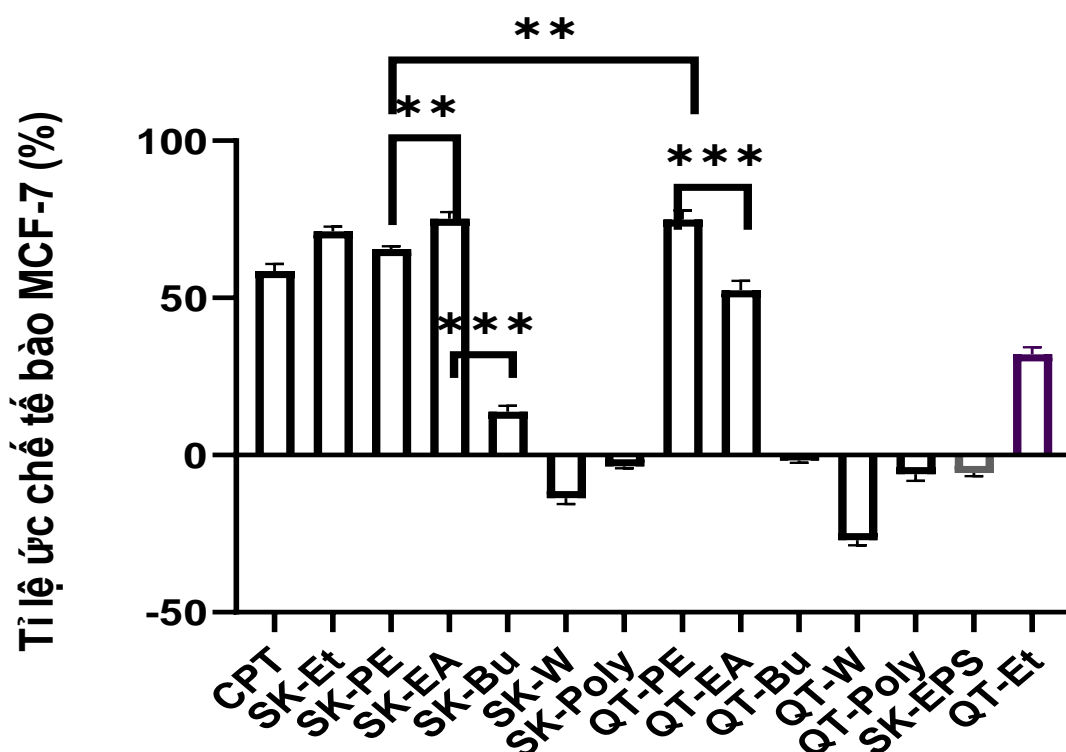
3.2. Hoạt tính gây độc tế bào của các cao chiết với dòng tế bào ung thư MCF-7 và Jurkat T

Các cao chiết xuất từ các loài *Cordyceps* spp.: *C. sinensis*, *C. militaris*, và *C. takaomontana*, *I. tenuipes* ... đã cho thấy khả năng gây độc tế bào và tiềm năng kháng phân bào [66]. Các cao chiết và các chất thu nhận từ *I. cicadae* F0004 và *C.*

neovolkiana DL0004 cũng có thể có tiềm năng gây độc tế bào và kháng phân bào. Chính vì vậy, việc xác định Hoạt tính gây độc tế bào của các cao chiết từ sinh khối và quả thể thu nhận từ *I. cicadae* F0004 và *C. neovolkiana* DL0004 đối với dòng tế bào MCF-7 và Jurkat T là một phần trong quá trình tìm kiếm các cao chiết và hợp chất tiềm năng kháng phân bào.

3.2.1. Hoạt tính gây độc của các cao chiết *C. neovolkiana* DL0004 đối với các dòng tế bào MCF-7 và Jurkat T

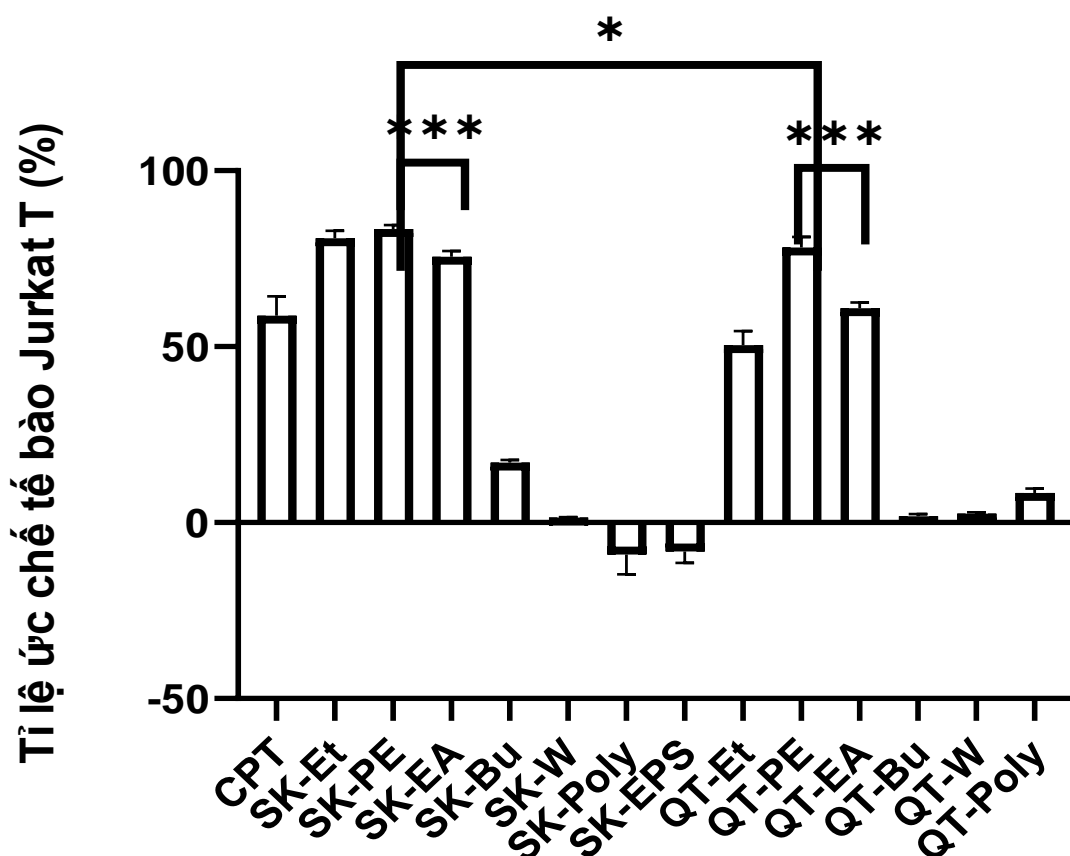
Nghiên cứu này được tiến hành để kiểm tra và so sánh hoạt tính gây độc tế bào của các cao chiết từ sinh khối và quả thể nhân tạo *C. neovolkiana* DL0004 với dòng tế bào ung thư MCF-7 (đặc trưng của dòng tế bào “bám dính” (adhesion)) và dòng tế bào Jurkat T (đặc trưng của dòng tế bào “lơ lửng” (suspension)) ở nồng độ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bằng phương pháp thử nghiệm SRB.



Hình 3.2. Tỷ lệ ức chế tế bào MCF-7 của cao chiết từ sinh khối và quả thể *C. neovolkiana* DL0004 tại nồng độ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$

(Chú thích: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$)

Kết quả cho thấy các cao chiết từ Et, PE và EA có khả năng gây độc tế bào cao (trên 50%) nhưng hoạt tính khác nhau giữa các cao chiết từ sinh khối và quả thể. Cụ thể, cao chiết Et và EA của sinh khối sợi nấm có hoạt tính gây độc tế bào mạnh hơn (71,05%, 75,14%) so với quả thể (31,61%, 52,19%) tương ứng. Trong khi đó, khả năng độc tế bào của quả thể cao hơn sinh khối với cao PE, tương ứng là 74,97% và 65,85% (hình đồ 3.2). Các cao Bu từ sinh khối và quả thể có tỷ lệ ức chế tế bào ung thư không đáng kể (nhỏ hơn 20%), có nghĩa là hơn 80% các tế bào MCF-7 vẫn còn sống khi được xử lý bằng cao Bu. Đáng chú ý là cao nước (W) và cao Poly có khả năng kích thích sự tăng sinh tế bào của cả mẫu cao từ sinh khối và quả thể.



Hình 3.3. Tỷ lệ ức chế tế bào Jurkat T của cao chiết từ sinh khối và quả thể

C. neovolkiana DL0004 tại nồng độ 100 $\mu\text{g/mL}$

Tương tự như các tế bào ung thư MCF-7, ba cao chiết từ Et, PE và EA có hoạt tính gây độc tế bào cao với dòng tế bào Jurkat T. Tuy nhiên, hoạt tính độc tế bào của cao chiết từ sinh khối là mạnh hơn (khoảng 80%) và cao nhất ở cao chiết PE (81,2%), tiếp theo là cao chiết Et (80,78%) và cao chiết EA (78,90%). Hoạt tính gây độc tế bào ung thư Jurkat T của ba cao chiết từ quả thể *C. neovolkiana* DL0004 tương ứng là 77,87%, 61,54% và 50,53%. Bên cạnh đó, cao chiết từ Bu, W và cao Poly không ảnh hưởng đáng kể hoặc kích thích sự phát triển của các tế bào (hình 3.3). Dựa trên kết quả của hoạt tính gây độc tế bào ung thư của các cao chiết, cao chiết từ sinh khối và quả thể của Et, PE, và EA được chọn để tiếp tục xác định giá trị IC_{50} của chúng đối với các tế bào ung thư MCF-7 và Jurkat T. Các tế bào được xử lý bằng các cao chiết ở các nồng độ khác nhau từ 0-100 $\mu\text{g/mL}$. Kết quả cho thấy cao chiết PE của sinh khối sợi nấm *C. neovolkiana* DL0004 có hoạt tính gây độc tế bào cao nhất trên dòng tế bào MCF-7 và Jurkat T với IC_{50} tương ứng là $26,94 \pm 1,62 \mu\text{g/mL}$ và $15,50 \pm 0,19 \mu\text{g/mL}$. Ngoài ra, cao chiết Et từ sinh khối sợi nấm có hoạt tính gây độc tế bào cao trên Jurkat T với IC_{50} $17,88 \pm 0,78 \mu\text{g/mL}$. Giá trị IC_{50} của các cao chiết khác cũng được xác định ở nồng độ 0-100 mg / mL, đặc biệt trên MCF-7: $37,60 \pm 2,27 \mu\text{g/mL}$ với cao chiết từ sinh khối hệ sợi Et; $78,13 \pm 3,27 \mu\text{g/mL}$ với sinh khối EA; $76,30 \pm 1,20 \mu\text{g/mL}$ với cao cao chiết từ quả thể PE, và trên các dòng tế bào Jurkat T: $35,68 \pm 0,29 \mu\text{g/mL}$ với cao chiết từ sinh khối EA; $37,18 \pm 1,39 \mu\text{g/mL}$ với cao chiết từ quả thể PE và $64,36 \pm 5,99 \mu\text{g/mL}$ với cao chiết từ quả thể EA.

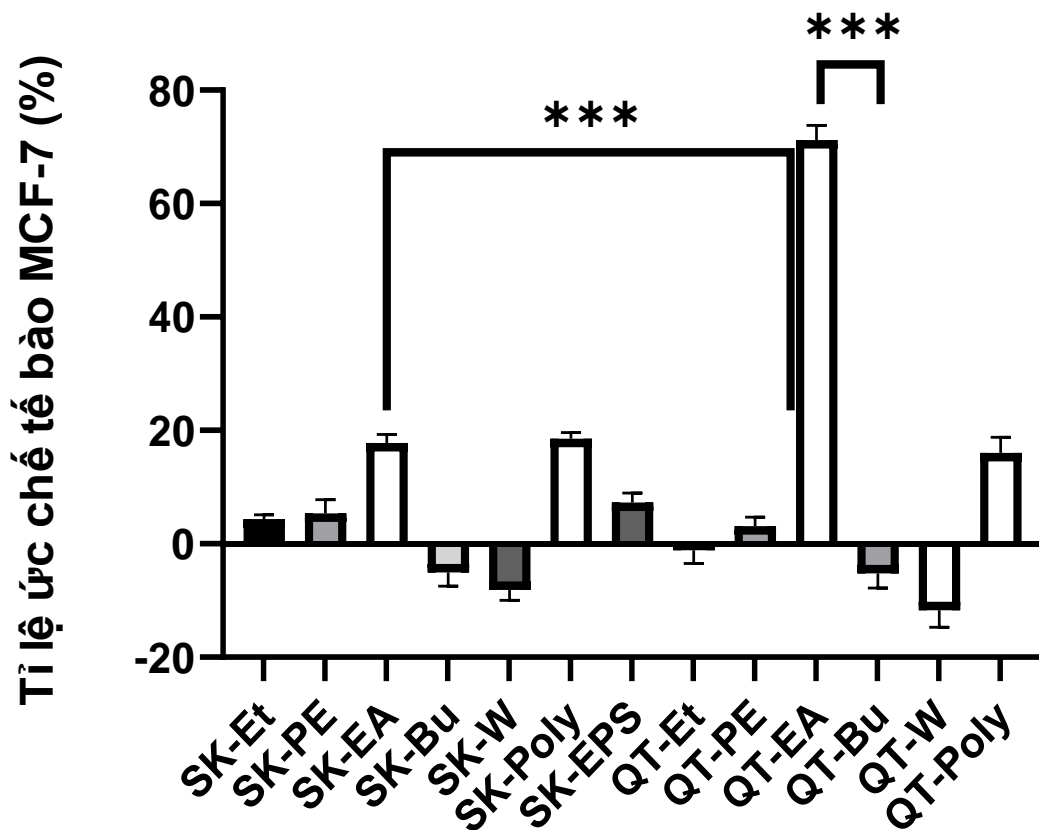
Nghiên cứu về các giá trị y học của *C. neovolkiana* vẫn chưa được thực hiện nhiều trên thế giới cũng như tại Việt Nam. Kết quả thử nghiệm SRB cho thấy rằng cao chiết Et, PE và EA từ sinh khối và quả thể của *C. neovolkiana* DL0004 có hoạt tính gây độc tế bào đa dạng. Cả cao chiết từ sinh khối và quả thể *C. neovolkiana* DL0004 đều có khả năng ức chế tế bào ung thư MCF-7 và Jurkat T. Tuy nhiên, có sự khác biệt giữa cao chiết từ sinh khối và quả thể do sự khác biệt về thành phần dinh dưỡng, điều kiện môi trường nuôi cấy và thu hoạch. Điều này chứng tỏ rằng, đối với cao chiết từ sinh khối và quả thể *C. neovolkiana* DL0004, các hợp chất gây độc tế bào là ít phân cực và hòa tan

trong dung môi PE và EA. Tất cả ba cao chiết từ sinh khối Et, PE và EA đều có hoạt tính gây độc tế bào cao hơn cao chiết từ sinh khối và quả thể *C. neovolkiana* DL0004 với hai dòng tế bào MCF-7 và Jurkat T. Ngoài ra, kết quả cho thấy, cao chiết từ sinh khối và quả thể *C. neovolkiana* DL0004 có hoạt tính gây độc tế bào với dòng tế bào ung thư Jurkat T cao hơn so với dòng tế bào ung thư MCF-7.

Kết quả tương tự như nghiên cứu của Liu (2014) trên *Cordyceps militaris*: cao chiết từ hệ sợi có hoạt tính kháng phân bào với 06 dòng tế bào ung thư của con người tốt hơn quả thể, với phạm vi IC_{50} từ $25,03 \pm 1,37$ đến $39,81 \pm 0,54$ $\mu\text{g/mL}$. Nghiên cứu cũng chứng minh rằng sợi nấm nuôi cấy chứa lượng protein, chất béo thô, polysaccharid và khoáng chất cao hơn đáng kể. Cao chiết PE từ sinh khối có hoạt tính cao nhất với IC_{50} $26,94 \pm 1,62$ $\mu\text{g/mL}$ với dòng tế bào MCF-7, $15,50 \pm 0,19$ $\mu\text{g/mL}$ với dòng tế bào Jurkat T và cao Et cũng có hoạt tính mạnh trên Jurkat T với giá trị IC_{50} $17,88 \pm 0,78$ $\mu\text{g/mL}$ [67].

Từ kết quả về hoạt tính gây độc hai dòng tế bào ung thư MCF-7 và Jurkat T đối với các chiết từ sinh khối và quả thể *C. neovolkiana* DL0004 có sự khác biệt rất lớn giữa các cao chiết, các cao EA và PE có độ phân cực thấp lại có khả năng gây độc hai dòng tế bào ung thư MCF-7 và Jurkat T cao hơn các cao chiết. Điều này có thể dự đoán, các chất có hoạt tính gây độc tế bào ung thư MCF-7 và Jurkat T của các chiết từ sinh khối và quả thể *C. neovolkiana* DL0004 có tính phân cực thấp.

3.2.2. Hoạt tính gây độc của các cao chiết *I. cicadae* F0004 đối với các dòng tế bào MCF-7 và Jurkat T

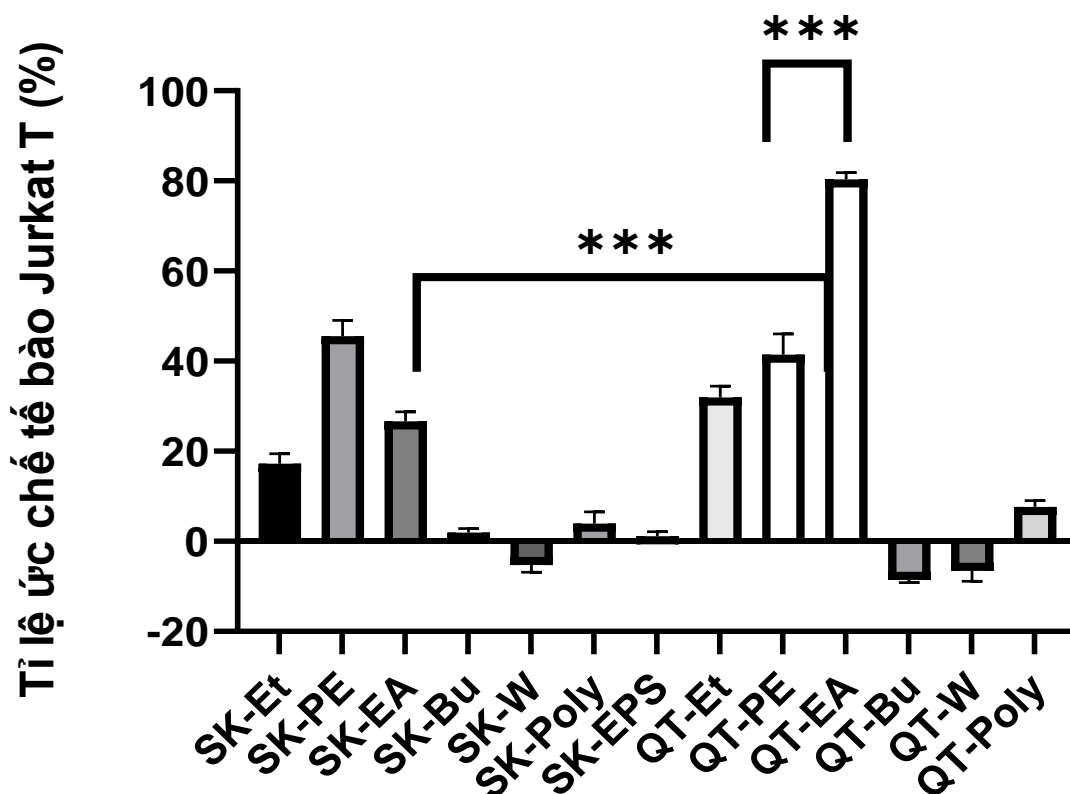


Hình 3.4. Tỷ lệ ức chế tế bào MCF-7 của cao chiết từ sinh khối và quả thể *I. cicadae* F0004 tại nồng độ 100 $\mu\text{g/mL}$

Tiến hành đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư của cao chiết từ sinh khối và quả thể *I. cicadae* F0004 ở nồng độ 100 $\mu\text{g/mL}$ với chứng dương là camptothecin. Các cao chiết có tỷ lệ phần trăm gây độc tế bào MCF-7 lớn hơn 50% được tiến hành xác định giá trị IC_{50} . Hình 3.4, cho thấy, cả cao chiết sinh khối và quả thể nấm *I. cicadae* F0004 đều có các cao chiết có khả năng gây độc tế bào ung thư MCF-7 ở nồng độ 100 $\mu\text{g/mL}$ thấp trừ cao chiết EA của quả thể *I. cicadae* F0004. Cụ thể các cao sinh khối *I. cicadae* F0004 với tỷ lệ phần trăm gây độc tế bào ung thư MCF-7 lần lượt là cao Et (5,70%), cao PE (6,15%), cao EPS (7,56%), cao EA (18,35%) và cao Poly (18,37%); các cao chiết từ quả thể có tỷ lệ gây độc tế bào ung thư MCF-7 thấp là cao PE (3,69%), cao poly (17,04%) riêng cao EA của quả thể có tiềm năng gây độc cao với phần trăm gây độc 71,89%. Các cao chiết còn lại không có khả năng

ức chế sự tăng sinh của tế bào ung thư MCF-7. Kết quả cũng cho thấy, cao chiết từ quả thể có hoạt tính cao hơn so với các cao chiết từ sinh khối, sự khác nhau này có thể do điều kiện nuôi cấy khác nhau và quá trình hình thành quả thể nhiều hợp chất thứ cấp có khả năng gây độc tế bào ung thư được tổng hợp so với sinh khối. Các cao chiết từ sinh khối và quả thể *I. cicadae* F0004 có sự khác nhau về tiềm năng gây độc tế bào MCF-7 nhưng cao chiết có hoạt tính cao đều có độ phân cực trung bình cụ thể là cao EA lần lượt 18,35% và 71,89%. Các cao chiết có độ phân cực thấp (PE) và độ phân cực cao (nước) có phần trăm gây độc dưới 5% hoặc không có khả năng gây độc tế bào.

Kết quả này có sự tương đồng với các nghiên cứu gây độc tế bào ung thư MCF-7 của chủng nấm *C. takaomontana* DL0038A. Cao EA từ quả thể của chủng nấm này thể hiện hoạt tính gây độc tế bào ung thư MCF-7 cao với tỷ lệ gây độc $82,90 \pm 1,67$ tại nồng độ $100 \mu\text{g/mL}$ [68], [69].



Hình 3.5. Tỷ lệ ức chế tế bào Jurkat T của cao chiết từ sinh khối và quả thể *I. cicadae* F0004 tại nồng độ $100 \mu\text{g/mL}$

Bên cạnh đó, từ kết quả (hình 3.5), nhận thấy, các cao chiết có khả năng gây độc cao trên dòng tế bào ung thư Jurkat T ở nồng độ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sau 48 giờ cảm ứng, cụ thể là các cao chiết EA của quả thể *I. cicadae* F0004 với phần trăm gây độc tế bào tương ứng là $81,31 \pm 1,06\%$, chứng tỏ các hợp chất phân cực nhẹ của quả thể *I. cicadae* F0004 được chiết xuất với dung môi EA đóng vai trò quan trọng đối với khả năng gây độc tế bào ung thư Jurkat T. Cao PE và Et của cả cao từ sinh khối và cao từ quả thể *I. cicadae* F0004 có khả năng gây độc tế bào, trong đó cao PE có hoạt tính cao hơn với phần trăm tương ứng là sinh khối *I. Cicadae* F0004 đạt $46,37 \pm 2,26\%$ và cao PE từ quả thể IC đạt $42,28 \pm 2,63\%$. Các cao chiết còn lại (Bu, W, EPS, Poly) không có khả năng gây độc tế bào trên dòng tế bào ung thư Jurkat T thử nghiệm, với nồng độ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sau 48 giờ cảm ứng. Theo nghiên cứu của Xie và cộng sự (2019), cao Et từ *C. cicadae* đã ức chế sự tăng sinh của dòng tế bào ung thư dạ dày SGC-7091 [56].

Kết quả sau 48 giờ xử lý theo phương pháp SRB cho thấy, cao EA từ quả thể *I. cicadae* F0004 có hoạt tính gây độc cao đối với tế bào ung thư Jurkat T. Phần lớn các nghiên cứu được thực hiện trên chiết xuất của *C. sinensis* sử dụng ethanol, methanol hoặc nước nóng làm dung môi chiết chủ yếu thu các thành phần phân cực của *Cordyceps*. Mặc dù, ethyl axetat là dung môi ít phân cực nhất trong số ba dung môi nói trên, nhưng cũng đã thu hút được nhiều sự chú ý hơn và đã trở nên phổ biến. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng cao chiết ethyl acetate của sợi nấm *C. sinensis* là một chất ức chế mạnh sự gia tăng của tế bào ung thư. Việc chuẩn bị các chất chiết theo một trình tự tuần tự bắt đầu từ dung môi không phân cực đến phân cực. Bột sợi nấm khô lần đầu tiên được chiết xuất bằng cách sử dụng PE, EA, Et và nước với tỷ lệ 1:10 (w / v) cho mỗi dung môi [30].

Để tiến hành các bước tiếp theo, cần nhìn tổng quát dựa trên các tiêu chí: cao chiết được coi là có hoạt tính gây độc tế bào cao đối với tế bào *in vitro* với $\text{IC}_{50} \leq 20 \mu\text{g}/\text{mL}$ (được xem là cao chiết có hoạt tính cao và có tiềm năng làm nguyên liệu chế tạo thuốc kháng ung thư); IC_{50} trong khoảng 21 - 200

$\mu\text{g/mL}$ (hoạt độ trung bình), IC_{50} trong khoảng 201 - 500 $\mu\text{g/mL}$ (hoạt độ yếu), và $\text{IC}_{50} > 501 \mu\text{g/mL}$ (không có hoạt tính) theo tiêu chuẩn của Viện ung thư quốc gia Hoa Kỳ (NCI) [70]; chủng nấm phải cho cho năng suất và chất lượng ổn định; năng suất sinh học nuôi sinh khối và quả thể có thể tạo đủ nguồn nguyên liệu để cô lập chất, khảo sát các hoạt tính kháng phân bào.

3.2.3. Xác định cao chiết có khả năng gây độc tế bào cao

Bảng 3.2. Giá trị IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) của các cao chiết từ sinh khối và quả thể nấm *C. neovolkiana* DL0004 và *I. cicadae* F0004 gây độc tế bào MCF-7 và Jurkat T

Chủng nấm	Tên cao	MCF-7	Jurkat T
<i>C. neovolkiana</i> DL00004	SK Et	$37,6 \pm 2,27$	$17,88 \pm 0,78$
	SK PE	$26,94 \pm 1,62$	$15,5 \pm 0,19$
	SK EA	$78,13 \pm 3,27$	$35,68 \pm 0,29$
	QT PE	$76,13 \pm 1,20$	$37,18 \pm 1,39$
<i>I. cicadae</i> F0004	QT EA	$17,15 \pm 1,68$	$10,37 \pm 0,61$

Bảng 3.2, cho thấy, cao PE từ sinh khối *C. neovolkiana* DL0004 có giá trị IC_{50} lần lượt với MCF-7 và Jurkat T là $26,94 \pm 1,62$ và $15,5 \pm 0,19$ ($\mu\text{g/mL}$) và cao EA từ quả thể *I. cicadae* F0004 có giá trị IC_{50} lần lượt với MCF-7 và Jurkat T là $17,15 \pm 1,68$ và $10,37 \pm 0,61$ ($\mu\text{g/mL}$) là các cao chiết có hoạt tính gây độc tế bào ung thư MCF-7 và Jurkat T *in vitro* tiềm năng.

Nhiều hợp chất thứ cấp từ *C. cicadae* (*I. cicadae*) có hoạt tính gây độc cao trên tế bào người và động vật đặc biệt tế bào ung thư. Beauvericin cùng các dẫn xuất A, E, J thu nhận từ cả trong quả thể và sinh khối nấm đều thể hiện độc tính cao với dòng tế bào ung thư như HepG2 với giá trị IC_{50} trong khoảng $2,40 \pm 0,37$ đến $14,48 \pm 1,68 \mu\text{M}$ [71]. Aspergilliamid là dẫn xuất của amino gây độc cho tôm với giá trị LC_{50} 71,09 nM. Stipitatonin acid thể hiện khả năng diệt khuẩn, diệt côn trùng và ức chế một số loại nấm. Nhiều hợp chất khác

cũng được xác định từ *I. cicadae* nhưng chưa xác định hoạt tính sinh học như cycloheximid acid A (19), 2-(3-carboxy-2-hydroxypropyl)-3-methyl-2-cyclopentenone, 5-(2-hydroxyethyl)-2-furanacetic acid và lichenicolin A [72].

Đặc biệt, nghiên cứu của Yang và cộng sự năm (2019) đã phân lập được 13 hợp chất thứ cấp từ chủng nấm dung hợp từ *C. militaris* và *I. cicadae* nhưng chưa nghiên cứu về hoạt tính của chúng gồm 2 hợp chất mới là 2-(5-(3-oxobutyl) furan-2-yl) acetic acid và cordycepone, 11 hợp chất đã phân lập trước đó cephalosporolid E, cephalosporolid J, methyl 2-(5-(3-hydroxybutyl) furan-2-yl) acetate, 2-(5-(3-hydroxybutyl) furan-2-yl) acetic acid, α -furoic acid, (22E,24R)-ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol (ergosterol), 3-benzyl-6-isopropyl-2,5-piperazinedione và 3-isobutyl-6-isobutylpiperazine-2,5-dione [73].

Đã có nhiều nghiên cứu thực hiện trên bào tử, sinh khối và quả thể cho thấy *I. cicadae* các cao chiết và hợp chất có nhiều hoạt tính sinh học như tăng cường miễn dịch, kháng viêm, kháng oxy hóa, bảo vệ thần kinh và kháng tế bào ung thư. Xu và cộng sự (2021) cho thấy polysaccharid ức chế sự tăng sinh của tế bào ung thư cổ tử cung HeLa khi xử lý với nồng độ 5 $\mu\text{g/mL}$ -1600 $\mu\text{g/mL}$. Polysaccharid cũng ức chế biểu hiện cyclin E, cyclin A, CDK2, giảm điều hòa biểu hiện của protein p53 và hoạt hóa dòng thác caspase, tăng biểu hiện thụ thể chế dẫn tới dừng Chu kỳ tế bào tại pha S và gây ra quá trình apoptosis [74].

Xie và cộng sự (2018) đã đánh giá hoạt tính kháng phân bào của cao chiết ethanol của *C. cicadae*, kết quả cho thấy cao ethanol ức chế sự phân bào của tế bào ung thư dạ dày SGC-7901 sau 48 giờ xử lý với giá trị IC_{50} 121,4 $\mu\text{g/mL}$ bằng cách làm dừng Chu kỳ tế bào tại pha S và kích hoạt quá trình apoptosis khi tăng biểu hiện các protein Fas, caspase-8, caspase-3, caspase-6 và sự phân cắt PARP, đồng thời giảm biểu hiện protein antiapoptosis Bcl-2 [75]. Năm 2018, nghiên cứu của He và cộng sự cho thấy, ergosterol peroxid (EP) từ dịch lên men của *I. cicadae* đã ngăn chặn sự di cư và xâm chiếm, kích hoạt quá trình apoptosis và điều chỉnh chu kỳ tế bào của các tế bào ung thư biểu mô thận RCC thông qua nhiều cơ chế, bao gồm ngăn chặn sự phát triển

của tế bào, sự xâm chiếm, di cư và xâm chiếm, bắt giữ chu kỳ tế bào, làm suy giảm các con đường β -catenin và gây ra apoptosis [76]. Sun và cộng sự (2017) đã thu nhận được adenosin, N6-(2-hydroxyethyl)-adenosin, acid cordycepic, cordycepin, beauvericin và myriocin từ bào tử *I. cicadae* và chứng minh bào tử gây độc tế bào ung thư MCF-7 và HeLa với $IC_{50} = 109,14 \pm 4,37$ và $78,16 \pm 5,19$ bằng cách kích hoạt apoptosis của các tế bào MCF-7 và HeLa, qua con đường phụ thuộc caspase [16]. Zhu và cộng sự (2014) đã chứng minh ergosterol peroxid (EP) từ *C. cicadae* giúp giảm xơ hóa do EP có thể ngăn chặn sự kích hoạt nguyên bào sợi do TGF- β 1 gây ra trong NRK-49F [77].

Các chất tan được trong petroleum ether phần lớn là các acid béo và các steroid như ergosterol. Ergosterol là nguồn cung cấp vitamin D2 và tạo nên một số hormon do đó có vai trò quan trọng đối với con người. Nguyễn Thanh Thảo (2012), đã xác định hàm lượng ergosterol trung bình trong mẫu sinh khối *Cordyceps neovolkiana* là 0,002% thấp hơn so với một số nghiên cứu về ergosterol của một số loài *Cordyceps* trên thế giới và xác định có sự hiện diện của adenosin trong cao Et của *Cordyceps neovolkiana*. [78]. Đồng thời theo Wu và cộng sự (2007), đã xác định trong cao chiết Et của *C. sinensis* có sự hiện diện của adenosin, cordycepin, ergosterol, đường và đó là những thành phần có hoạt tính sinh học cao [27].

Kết quả hoạt tính gây độc tế bào ung thư *in vitro* NIH3T3 và KA31T cho thấy, cao chiết PE của nhựa cây Một dược (*Commiphora myrrha* hay *Commiphora. molmol*) có hoạt tính gây độc tế bào cao nhất trong số tất cả các cao chiết được thử nghiệm kháng tế bào ung thư NIH3T3 và KA31T, với giá trị IC_{50} tương ứng là 5 và 10 $\mu\text{g/mL}$. Trong số các cao chiết khác nhau của nhựa cây *C. molmol*, cao chiết PE có hoạt tính gây độc tế bào cao nhất đối với hai dòng tế bào ung thư NIH3T3 và KA31T của chuột. Quá trình chiết cao phân đoạn sinh học của cao chiết PE đã phân lập được 09 furanosesquiterpenoit (1-9). Trong đó, 1 (γ -elemene lacton) và 2 (eudesma-1,3,7 (11) -trien-8,12-olid) gây độc tế bào nhiều nhất với dòng tế bào ung thư NIH3T3, chất (7) và chất (9) gây độc tế bào vừa phải ở KA31T, và các chất 3–6 có hoạt tính gây độc tế bào yếu ở cả hai dòng tế bào NIH3T3 và KA31T.

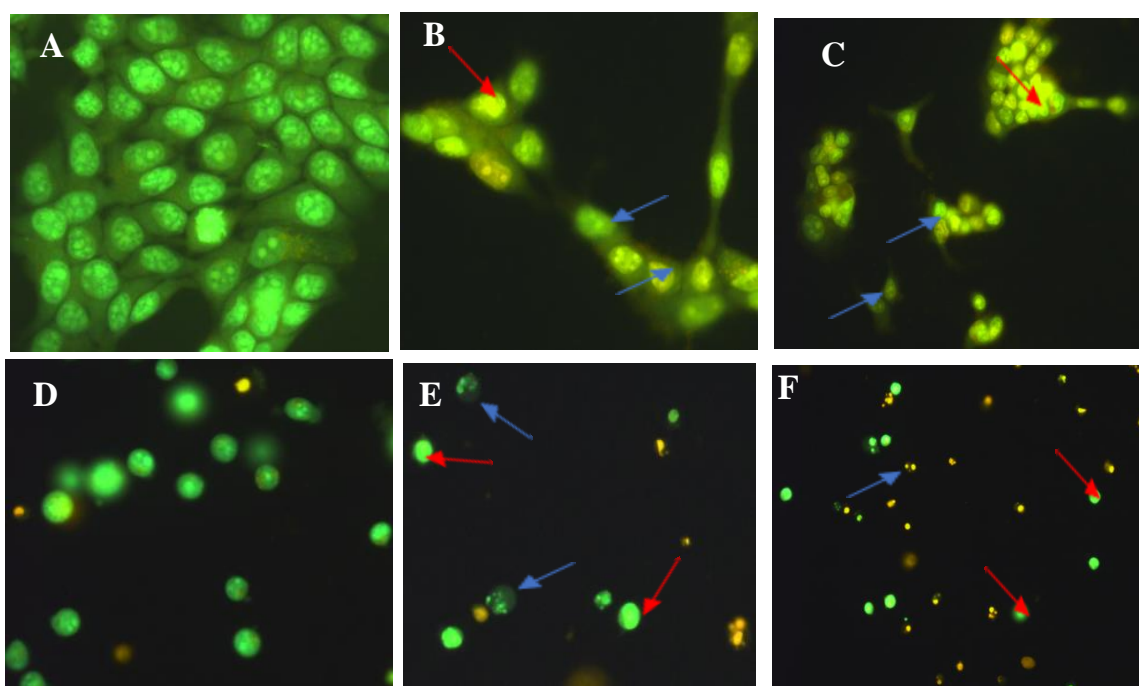
[79]. Cao chiết EA của *C. sinensis* đã được chứng minh là có tác dụng ức chế mạnh đối với các dòng tế bào ung thư khác nhau và hoạt tính kháng khối u *in vivo* cũng đã được phát hiện ở chuột (C57BL/6J) gây ra u hắc tố B16 [27]. Zhang và cộng sự. lần đầu tiên công bố một nghiên cứu về tác dụng của các chiết xuất *C. sinensis* khác nhau kháng lại sự gia tăng của tế bào bệnh bạch cầu tủy cấp tính ở người (HL-60) [39].

Theo Peter Xin (2013), các chất chiết xuất từ cao PE, EA, Et và nước được thử nghiệm MTT để đánh giá khả năng tăng sinh tế bào cũng như xác định khả năng gây độc tế bào của các cao chiết khác nhau trên dòng tế bào HL-60. Hoạt động của Caspase-3 cũng như sự phân cắt poly ADP-ribose polymerase (PARP) cũng được phân tích; cả hai đều là đặc điểm của quá trình apoptosis của tế bào. Trong quá trình apoptosis, việc kích hoạt caspase-3 cho phép phân cắt enzyme hạt nhân, PARP, và sau đó ngăn cản nó sửa chữa DNA. Mặc dù tất cả bốn chiết xuất đều thể hiện sự ức chế đáng kể sự phát triển của tế bào, nhưng cao chiết EA đã chứng tỏ khả năng vượt trội với ED₅₀ (liều hiệu quả trung bình; liều lượng cần thiết cho hiệu ứng định lượng ở 50% tế bào) là $\leq 25 \mu\text{g} / \text{mL}$. Cao chiết etyl axetat tiếp tục gây ấn tượng với khả năng kích hoạt caspase-3 theo liều lượng và thời gian. Điều này được dự đoán rằng, có khả năng cao chiết EA có chứa ergosterol, glycosid và polysaccharid [30].

3.3. Nghiên cứu xử lý apoptosis tế bào MCF-7 và Jurkat T với các cao chiết tiềm năng

3.3.1. Nghiên cứu cao PE của sinh khối *Cordyceps neovolkiana* DL0004 xử lý apoptosis tế bào ung thư MCF-7 và Jurkat T

a) Hình thái tế bào MCF-7 và Jurkat sau khi nhuộm với AO/EB



Hình 3.6. Hình thái tế bào MCF-7 và Jurkat T nhuộm AO/EB sau khi xử lý với cao chiết PE của sinh khối *C. neovolkiana* DL0004

➡ : Tế bào nhân bị phân mảnh ➡ : Tế bào có nhân cô đặc

A: Tế bào MCF-7 đối chứng **B:** Xử lý cao PE 48 giờ **C:** Xử lý cao CPT 48 giờ

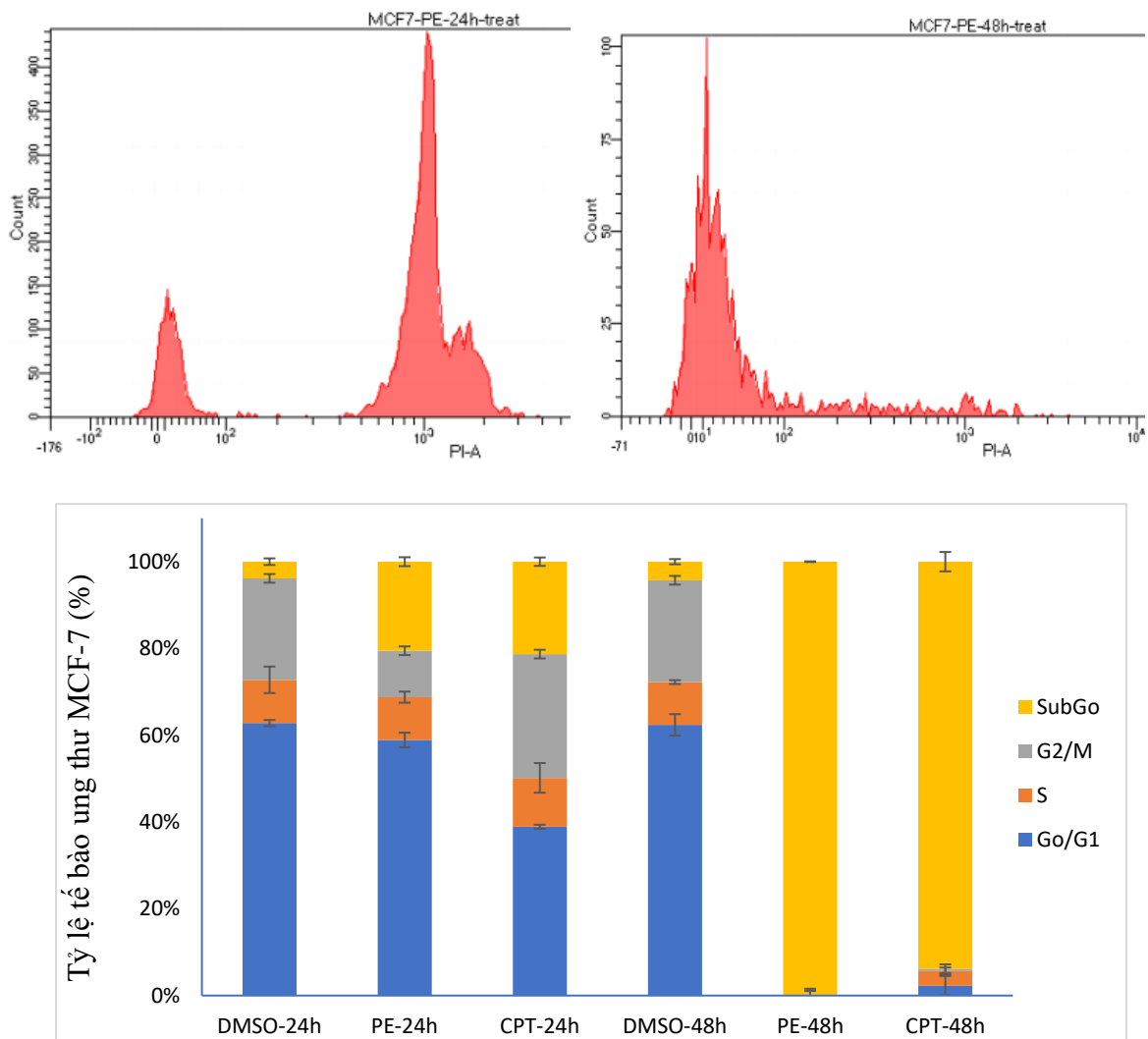
D: Tế bào Jurkat T đối chứng **E:** Xử lý cao PE 48 giờ **F:** Xử lý cao CPT 48 giờ

Cao PE từ sinh khối *C. neovolkiana* DL0004 được thử nghiệm để đánh giá khả năng apoptosis tế bào ung thư MCF-7 và Jurkat T với nồng độ tại giá trị IC_{50} lần lượt $26,94 \pm 1,62 \mu\text{g/mL}$ và $15,55 \pm 0,19 \mu\text{g/mL}$ bằng 3 phương pháp nhuộm kết hợp AO/EB phân tích kiểu hình tế bào, phương pháp flow cytometry phân tích chu kỳ tế bào và phương pháp nhuộm annexin V/PI định lượng tế bào bị apoptosis. Kết quả cho thấy, sau 48 giờ xử lý, quần thể tế bào MCF-7 bị ức chế tăng sinh, xuất hiện các tế bào có kiểu hình nhân bị cô đặc màu xanh lục sáng mạnh và kiểu hình nhân phân mảnh - đặc trưng của tế bào bị apoptosis. Tỷ lệ tế bào có dấu hiệu apoptosis thấp trong quần thể, điều này cho thấy cao

PE từ sinh khối của chủng nấm *C. neovolkiana* DL0004 có khả năng apoptosis của tế bào ung thư MCF-7 thấp. Quần thể tế bào Jurkat sau khi xử lý với cao chiết 48 giờ được nhuộm kết hợp thuốc nhuộm AO và EB xuất hiện nhiều tế bào có kiểu hình apoptosis so với đối chứng. Tế bào apoptosis sớm có nhân cô đặc phát huỳnh quang màu xanh lục đậm. Nhiều tế bào có nhân bị phân mảnh và bị nhuộm đồng thời với 2 thuốc nhuộm cho màu cam cho thấy các tế bào đi vào giai đoạn cuối quá trình apoptosis. Tỷ lệ tế bào có kiểu hình bị apoptosis cao trong quần thể tế bào cho thấy cao PE có khả năng cảm ứng mạnh quá trình apoptosis của tế bào Jurkat T. Đối với lô đối chứng tế bào có nhân to, không co xoắn nhuộm màu xanh lục nhạt, không có dấu hiệu apoptosis.

b) Phân tích Chu kỳ tế bào bằng phương pháp flow cytometry

Tế bào MCF-7 và Jurkat T sau khi xử lý với cao chiết PE từ sinh khối từ chủng nấm *C. neovolkiana* DL0004 tại nồng độ IC_{50} trong 24 giờ và 48 giờ được nhuộm với thuốc thử PI và phân tích Chu kỳ tế bào bằng phương pháp flow cytometry. Số liệu được so sánh sự khác biệt bằng ứng dụng Prism 9.0.0.121 (hình 3.7).



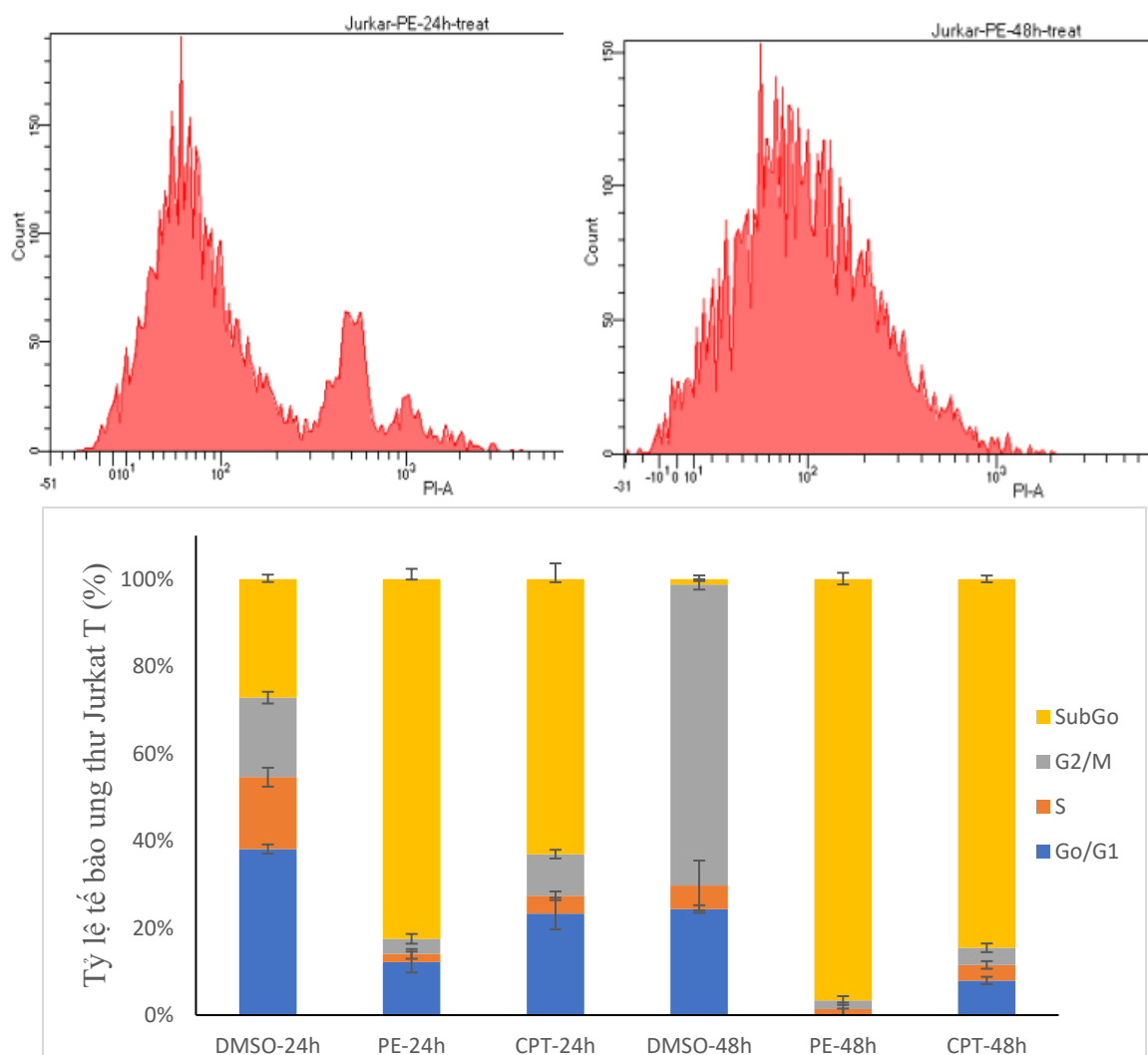
Hình 3.7. Sự thay đổi tỷ lệ tế bào ung thư MCF-7 các pha của chu kỳ tế bào sau xử lý cao PE từ sinh khối *C. neovolkiana* DL0004

Kết quả (hình 3.7), cho thấy, sau 24 giờ xử lý với cao chiết PE từ sinh khối *C. neovolkiana* DL0004, tỷ lệ tế bào ung thư MCF-7 tại các Chu kỳ tế bào trong quần thể tế bào có sự thay đổi. Cụ thể, tỷ lệ tế bào tại pha G_2/M giảm từ 12,69%, tỷ lệ tế bào pha Sub G_0 tăng 16,68% so với đối chứng, trong khi đó tỷ lệ tế bào tại pha G_0/G_1 và pha S không có sự khác biệt ($p < 0,05$). Kết quả này cho thấy cao PE có khả năng dừng Chu kỳ tế bào MCF-7 tại pha S và đưa tế bào vào pha Sub G_0 . Sau 48 giờ xử lý với cao chiết PE, tế bào MCF-7 bị ức chế Chu kỳ tế

bào hoàn toàn, tất cả tế bào đều bị đưa vào pha Sub G₀ và đi vào quá trình apoptosis.

Chu kỳ tế bào của tế bào Jurkat T sau khi xử lý với cao PE từ sinh khối *C. neovolkiana* DL0004 với nồng độ tại giá trị IC₅₀ được đánh giá bằng phương pháp flow cytometry. Kết quả (hình 3.8), sau 24 giờ xử lý, tỷ lệ tế bào ở pha G₀/G₁ giảm $25,86 \pm 4,74\%$ so với đối chứng, tương tự tỷ lệ pha S và pha G₂/M giảm lần lượt từ $12,29 \pm 1,53$ và $12,04 \pm 1,15\%$ so với đối chứng. Trong khi đó, tỷ lệ tế bào pha Sub G₀ tăng $58,99 \pm 5,03\%$. Điều này cho thấy, cao PE có khả năng ức chế tế bào Jurkat T đi vào Chu kỳ tế bào tại pha G₁ và đưa tế bào vào pha nghỉ hoặc gây chết tế bào. Khi tăng thời gian xử lý tế bào lên 48 giờ, toàn bộ tế bào tại các pha G₀/G₁, S và pha G₂/M đều giảm mạnh so với đối chứng, tất cả tế bào đều vào pha Sub G₀ (tăng $98,78 \pm 0,13\%$). Kết quả trên cho thấy, cao PE có khả năng ức chế Chu kỳ tế bào tăng dần theo thời gian tại pha G₁ và sau thời gian 48 giờ, cao PE ức chế hoàn toàn Chu kỳ tế bào của tế bào Jurkat T.

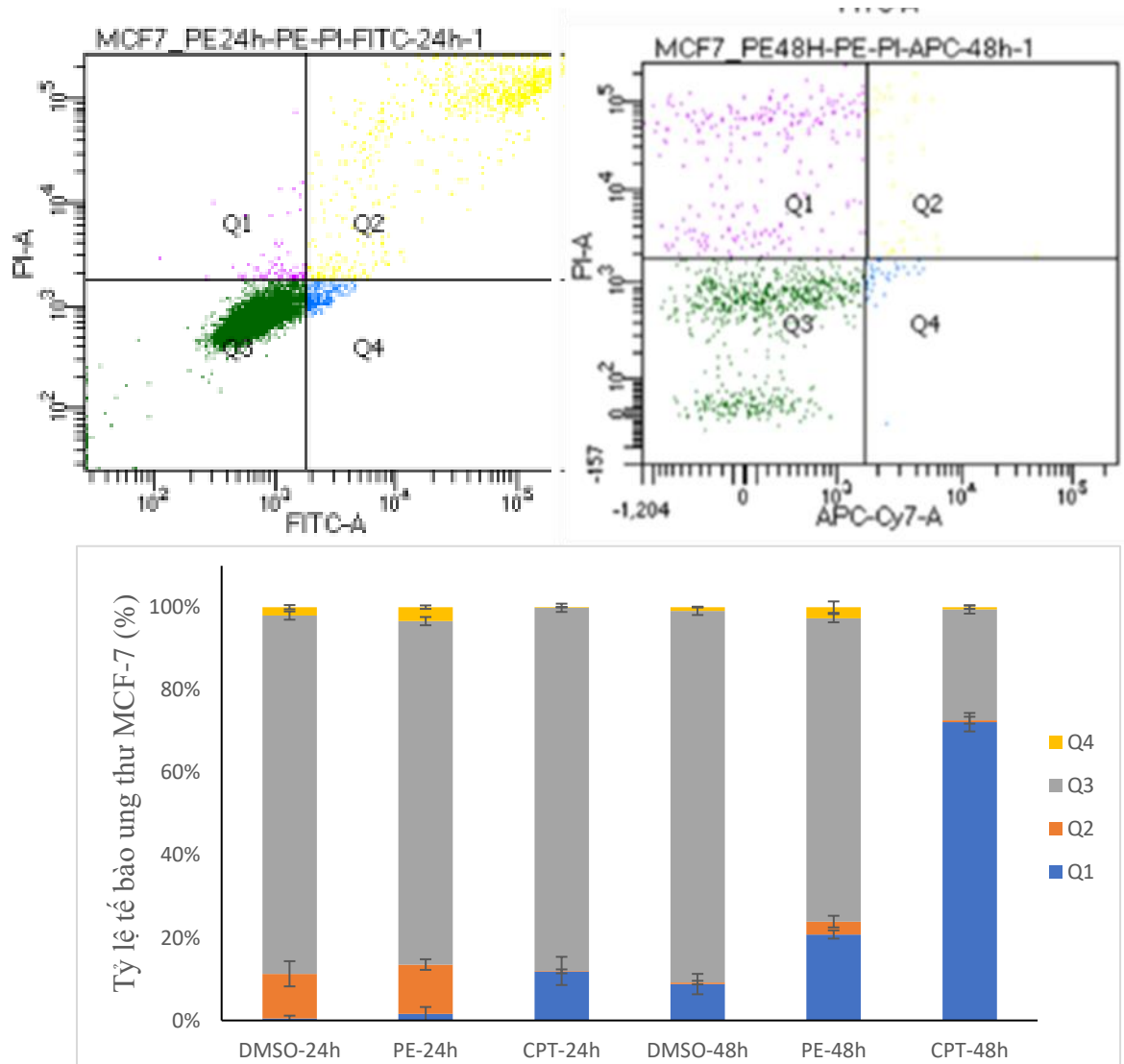
Từ kết quả phân tích Chu kỳ tế bào của tế bào ung thư MCF-7 và Jurkat T sau khi xử lý với cao chiết PE từ sinh khối nấm *C. neovolkiana* DL0004 cho thấy, cao PE có khả năng ức chế Chu kỳ tế bào của 2 dòng tế bào này. Sau 24 giờ, tế bào MCF-7 bị dừng Chu kỳ tế bào tại pha S và tế bào Jurkat bị dừng tại pha G₁. Tuy nhiên, khi tăng thời gian xử lý lên 48 giờ, cả 2 dòng tế bào đều bị ức chế hoàn toàn Chu kỳ tế bào, tất cả tế bào đều đi vào pha Sub/G₀ ở trạng thái nghỉ hoặc bị apoptosis.



Hình 3.8. Sự thay đổi tỷ lệ tế bào ung thư Jurkat T các pha của chu kỳ tế bào sau xử lý cao PE từ sinh khối *C. neovolkiana* DL0004

c) Định lượng tế bào apoptosis bằng phương pháp nhuộm Annexin V/PI

Quần thể tế bào ung thư MCF-7 và Jurkat T bị kích hoạt quá trình apoptosis được định lượng bằng phương pháp nhuộm Annexin V/PI và phân tích bằng flow cytometry ở 2 mốc thời gian là 24 giờ và 48 giờ.



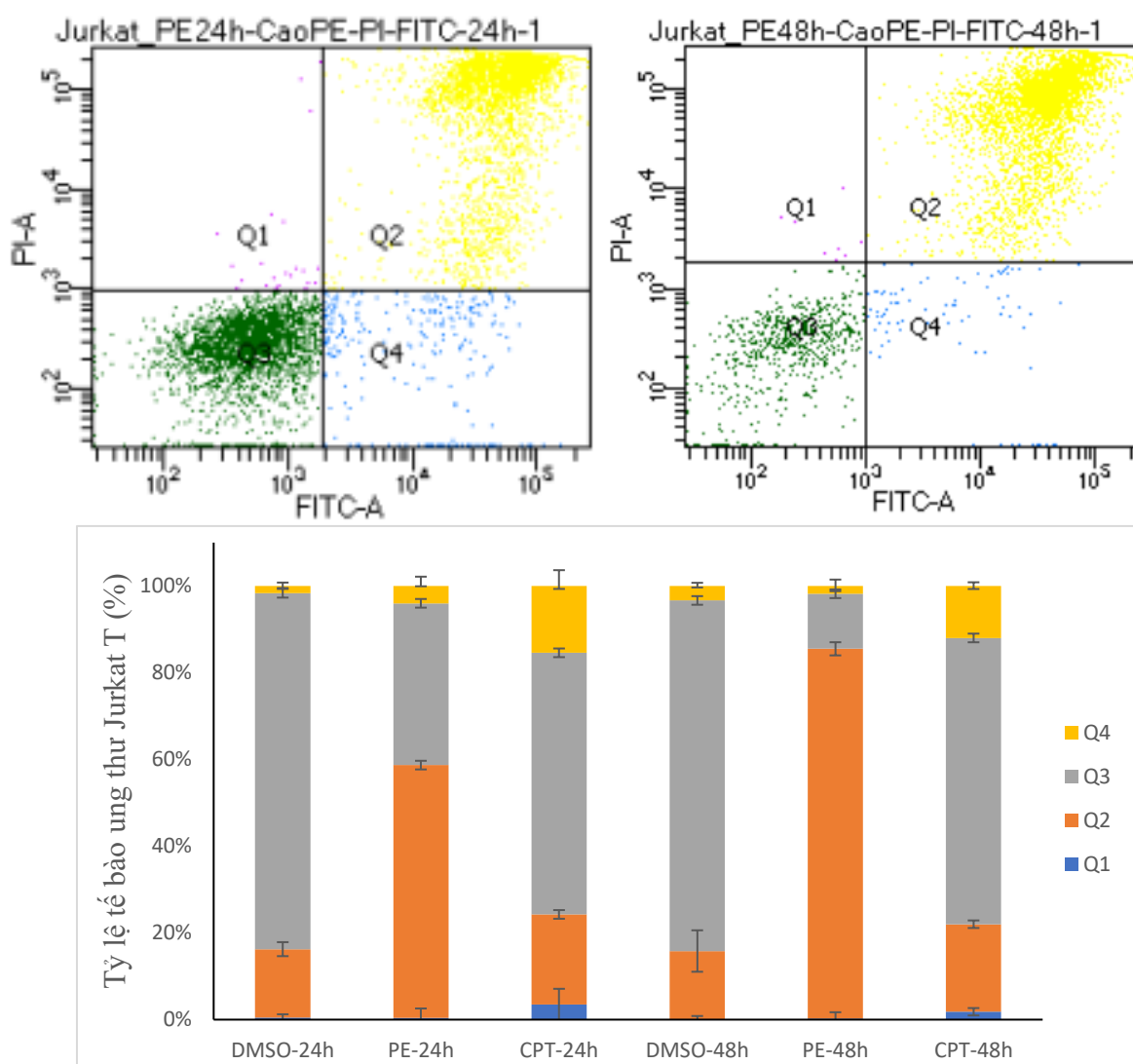
Hình 3.9. Tỷ lệ tế bào MCF-7 thay đổi sau xử lý với cao chiết PE từ sinh khối *C. neovolkiana* DL0004 và nhuộm Annexin V/PI

Kết quả (hình 3.9) cho thấy, sau 24 giờ xử lý cao chiết tỷ lệ tế bào bị apoptosis sớm (Q4), apoptosis muộn (Q2), tế bào bị hoại tử (Q1) và tế bào sống thay đổi không đáng kể so với đối chứng ($p < 0,05$). Sau 48 giờ xử lý, tỷ lệ tế bào MCF-7 apoptosis muộn tăng nhưng không đáng kể từ $2,76 \pm 0,96\%$ so với đối chứng, tỷ lệ tế bào apoptosis sớm thay đổi không đáng kể. Đồng thời, tỷ lệ tế bào bị hoại tử (Q1) tăng $12,0 \pm 2,94\%$ và tỷ lệ tế bào sống giảm $16,53 \pm 5,21\%$. Điều này cho

thấy, cao chiết PE gây chết tế bào ung thư MCF-7 đồng thời theo cả 2 cơ chế apoptosis và hoại tử.

Hình 3.10 cho thấy, sau 24 giờ xử lý với cao chiết PE, tỷ lệ tế bào ung thư Jurkat T bị hoại tử thay đổi không đáng kể với đối chứng, tỷ lệ tế bào sống (Q3) giảm mạnh từ $68,67 \pm 3,11\%$. Tế bào bị apoptosis muộn (Q2) tăng mạnh $42,46 \pm 5,52\%$. Sau 48 giờ xử lý cao chiết PE, tỷ lệ tế bào bị hoại tử vẫn không khác biệt so với đối chứng, tỷ lệ tế bào sống giảm so với đối chứng và so với xử lý 24 giờ. Tỷ lệ tế bào apoptosis sớm giảm so với đối chứng và so với xử lý 24 giờ. Trong khi đó, quần thể tế bào apoptosis muộn tăng $69,46 \pm 1,72\%$ so với đối chứng. Điều này cho thấy cao chiết PE từ sinh khối nấm *C. neovolkiana* DL0004 cảm ứng mạnh quá trình apoptosis của tế bào Jurkat theo thời gian, sau 48 giờ hầu hết tế bào đi vào quá trình apoptosis muộn. Tế bào jurkat T không bị ức chế theo cơ chế hoại tử. Kết quả này có sự tương đồng với kết quả phân tích Chu kỳ tế bào sau xử lý với cao chiết khi hầu hết tế bào bị dừng Chu kỳ tế bào và đi vào pha SubG₀.

Từ kết quả phân tích định tính và định lượng tế bào MCF-7 và Jurkat bị kích hoạt apoptosis sau khi xử lý với cao chiết PE sau 24 giờ và 48 giờ cho thấy, cao PE từ sinh khối nấm *C. neovolkiana* DL0004 có khả năng dừng Chu kỳ tế bào và kích hoạt quá trình apoptosis của cả 2 dòng tế bào tại nồng độ khảo sát. Trong đó, cao PE kích hoạt quá trình apoptosis tế bào Jurkat T tốt hơn so với tế bào MCF-7. Đồng thời cao PE từ sinh khối nấm *C. neovolkiana* DL0004 cũng ức chế sự tăng sinh tế bào MCF-7 theo cơ chế hoại tử.



Hình 3.10. Tỷ lệ tế bào Jurkat T thay đổi sau xử lý với cao chiết PE từ sinh khối *C. neovolkiana* DL0004 và nhuộm Annexin V/PI

Các thành phần hóa học và các hoạt động kháng khối u của các phân đoạn cao PE, từ nấm mốc gốc (*Pyropolyporus fomentarius*), đã được nghiên cứu. Khi phân tích sắc ký khí-khối phổ (GC-MS), 09 thành phần chính đã được xác định trong phân này. Trong ông nghiệm, PE cho thấy khả năng gây độc tế bào chống lại các tế bào sarcoma S180 (S180) của chuột phụ thuộc vào liều lượng và thời gian và các tác động gây độc tế bào có liên quan đến quá trình apoptosis. Sự mất điện thế màng ty thể và sự tạo ROS nội bào tăng lên rất nhiều ở nhóm được điều trị bằng chiết xuất PE *Pyropolyporus fomentarius*,

cho thấy quá trình apoptosis tế bào do chiết xuất PE gây ra với tế bào S180, có thể phụ thuộc vào ty thể và ROS. Nghiên cứu *in vivo* cho thấy chiết xuất PE nấm móng guốc cũng có hiệu quả trong việc ức chế sự phát triển của khối u do tế bào S180 gây ra và có độc tính với cơ quan miễn dịch thấp hơn [80].

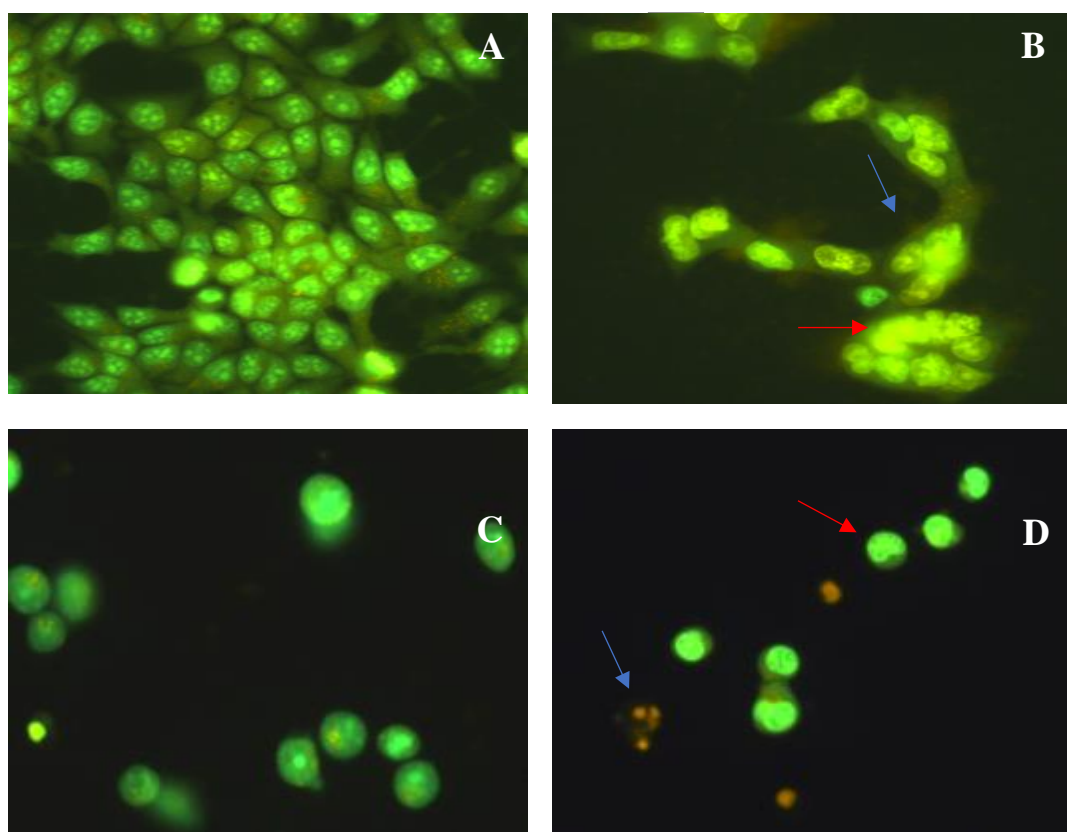
3.3.2. Kết quả đánh giá khả năng cảm ứng apoptosis của cao EA từ quả thể *I. cicadae* F0004

Cao EA từ quả thể *I. cicadae* F0004 có hoạt tính gây độc tế bào MCF-7 và Jurkat T cao, với IC₅₀ lần lượt là $17,15 \pm 1,68$ $\mu\text{g/mL}$ và $10,37 \pm 0,61$ $\mu\text{g/mL}$ được đánh giá khả năng cảm ứng apoptosis của tế bào MCF-7 và Jurkat T. Dựa trên sự đặc trưng của tế bào khi bị apoptosis, ba phương pháp được sử dụng để định tính và định lượng tế bào bị cảm ứng apoptosis: phương pháp nhuộm kết hợp AO/EB phân tích đặc điểm nhân và màng tế bào giúp phân biệt tế bào thường với tế bào bị apoptosis và hoại tử, phương pháp flow cytometry phân tích chu kỳ tế bào dựa vào sự thay đổi của nhân tế bào trong các chu kỳ khác nhau và phương pháp nhuộm annexin V/PI giúp định lượng tế bào bị apoptosis.

a) Hình thái tế bào ung thư MCF-7 và Jurkat sau khi nhuộm với AO/EB.

Sau khi tế bào ung thư MCF-7 được xử lý với cao chiết với nồng độ tại IC₅₀ 17,74 $\mu\text{g/mL}$ trong 48 giờ được nhuộm với AO và EB. Kết quả cho thấy số lượng tế bào ung thư MCF-7 giảm mạnh so với đối chứng. Các tế bào có biểu hiện kiểu hình bị apoptosis, nhân tế bào bị cô đặc có màu xanh lục sáng mạnh, nhân bị phân mảnh và hình thành thể apoptosis có màu xanh nhạt. Tuy nhiên, tỷ lệ tế bào có kiểu hình apoptosis thấp (hình 3.11). Qua kết quả phân tích kiểu hình bằng phương pháp nhuộm AO/EB cho thấy cao chiết EA từ quả thể *I. cicadae* F0004 có dấu hiệu cảm ứng apoptosis tế bào ung thư MCF-7 sau 48 giờ xử lý tuy nhiên dấu hiệu chưa rõ ràng, số lượng tế bào thể hiện đặc trưng apoptosis thấp. Do đó, cần kết hợp với kết quả các phương pháp phân tích chu kỳ tế bào và nhuộm annexin V/PI để khẳng định khả năng cảm ứng apoptosis của cao chiết.

Tương tự, quần thể tế bào ung thư Jurkat T ở mẫu đối chứng có hình thái bình thường nhuộm màu xanh trải đều, nhân lớn. Ở lô tế bào xử lý với cao EA từ quả thể *I. cicadae* F0004, nhân tế bào bắt đầu co lại, nhiễm sắc chất cô đặc với màu xanh sáng đặc trưng của tế bào ở giai đoạn apoptosis sớm. Đồng thời nhiều tế bào có màu vàng cam do màng tế bào bị tổn thương, xuất hiện hiện tượng nhân phân mảnh và các thể apoptosis có thể quan sát rõ, chứng tỏ tế bào đã vào giai đoạn apoptosis muộn.



Hình 3.11. Hình thái tế bào MCF-7 và Jurkat nhuộm AO/EB khi xử lý với cao EA từ quả thể *I. cicadae* F0004

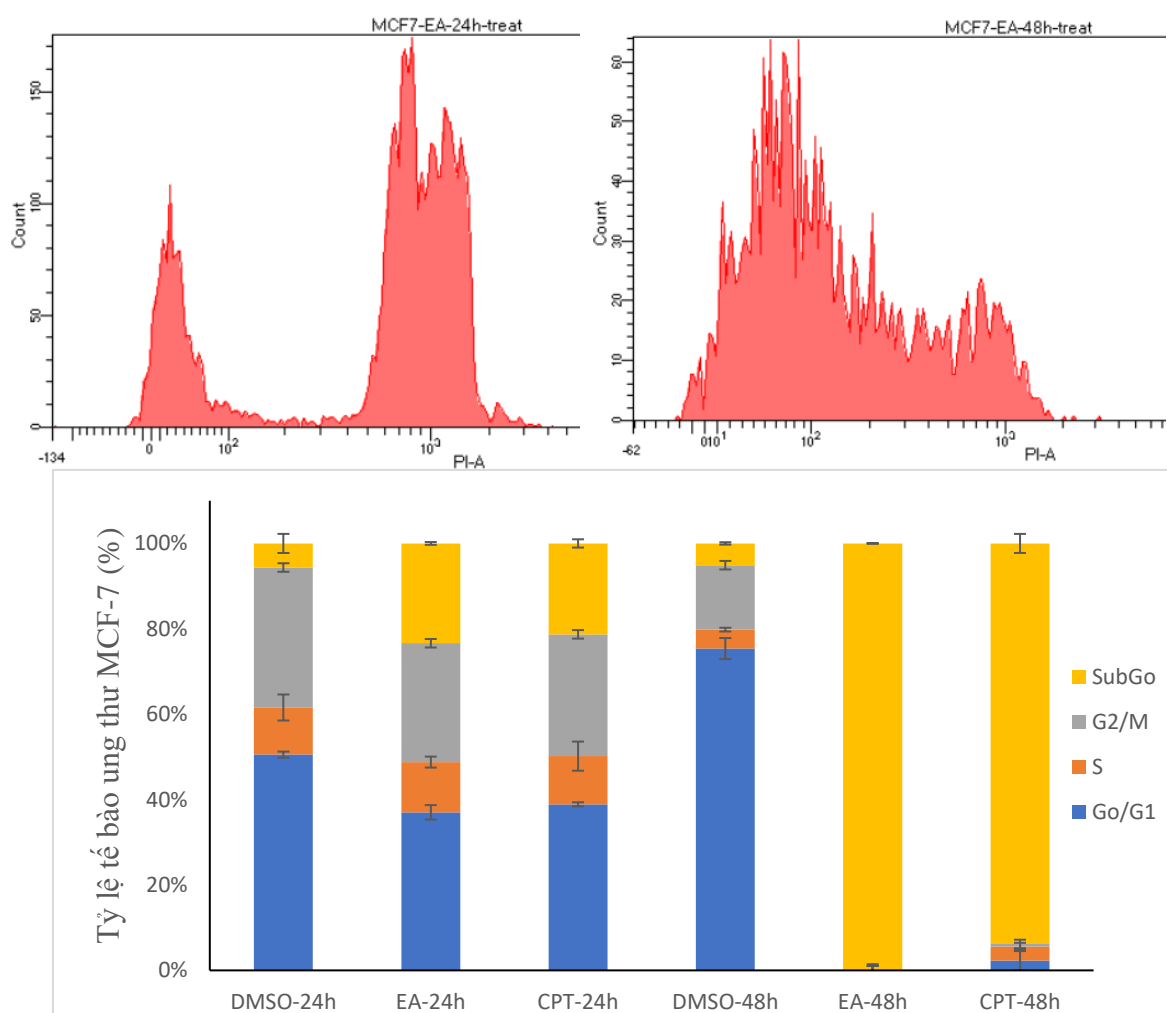
- A:** Tế bào MCF-7 đối chứng **B:** Tế bào MCF-7 xử lý cao EA
C: Tế bào Jurkat T đối chứng **D:** Tế bào Jurkat T xử lý cao EA
→ : Tế bào nhân bị phân mảnh → : Tế bào có nhân cô đặc

Bằng kết quả về kiểu hình tế bào thu được chứng tỏ cao EA từ quả thể *I. cicadae* F0004 có cảm ứng apoptosis tế bào ung thư MCF-7 và Jurkat T.

b) Phân tích chu kỳ tế bào bằng phương pháp flow cytometry

Thuốc nhuộm propidium iodid (PI) nhuộm DNA nhờ liên kết chen giữa các cặp acid nucleic. Khi nhuộm DNA với PI cho phép phân biệt được tế bào ở các chu kỳ tế bào khác nhau như G₀/G₁, S phase, G₂/M và sub G₀ do khả năng liên kết PI khác nhau. Hỗn hợp DNA-PI được phân tách bằng phương pháp flow cytometry nhờ cường độ tín hiệu huỳnh quang phát ra khác nhau của từng tế bào và biểu hiện trên biểu đồ histogram theo tương quan giữa hàm lượng DNA/tế bào và số tế bào có cùng hàm lượng DNA tương ứng.

Tế bào MCF-7 và Jurkat T được xử lý với cao chiết tại nồng độ IC₅₀ trong 24 giờ và 48 giờ, sau đó nhuộm với PI và được phân tích Chu kỳ tế bào bằng flow cytometry.



Hình 3.12. Sự thay đổi tỷ lệ tế bào ung thư MCF-7 các pha của chu kỳ tế bào sau xử lý cao EA từ quả thể *I. cicadae* F0004

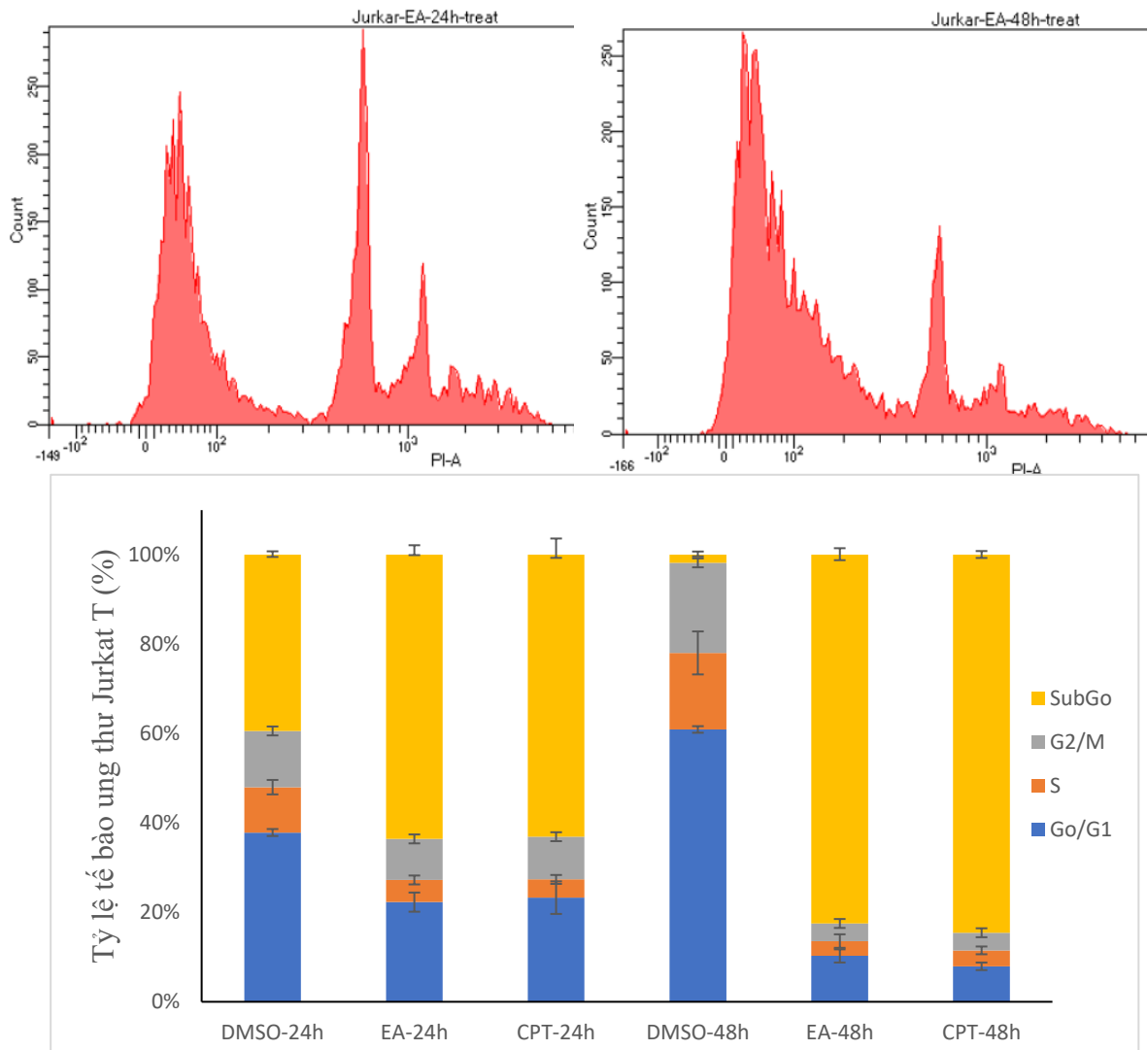
Sau 24 giờ xử lý với cao EA, tỷ lệ tế bào MCF-7 tại pha G_0/G_1 giảm $13,52 \pm 3,92\%$ so với với đối chứng. Tỷ lệ tế bào pha $SubG_0$ tăng $17,74 \pm 2,56\%$, tỷ lệ tế bào ở pha S và G_2/M không có sự khác biệt lớn so với đối chứng. Kết quả này cho thấy cao EA từ quả thể *I. cicadae* F0004 có khả năng ức chế sự phân bào tế bào MCF-7 sau 24 giờ xử lý. Cao chiết EA từ quả thể *I. cicadae* F0004 dừng Chu kỳ tế bào tại pha G_1 , đưa tế bào MCF-7 vào pha G_0 hoặc làm chết tế bào ($SubG_0$). Sau 48 giờ xử lý với cao chiết, tế bào tại cả 3 giai đoạn G_0/G_1 , S và G_2/M đều giảm, tất cả tế bào đều đi vào pha $SubG_0$ ($94,86 \pm 0,0,28\%$), tế bào chết hoặc đi vào pha G_0 . Tỷ lệ tế bào MCF-7 sau xử lý 48 giờ đi vào

SubG₀ tăng mạnh so với khi xử lý 24 giờ. Kết quả sau 24 giờ và 48 giờ xử lý với cao EA từ quả thể *I. cicadae* có F0004 cho thấy, tế bào MCF-7 bị kháng phân bào tăng dần theo thời gian bằng cách gây dừng Chu kỳ tế bào tại pha G₁. Tế bào MCF-7 sau 48 giờ tế bào bị ức chế hoàn toàn tại IC₅₀, tế bào đi vào pha subG₀.

Kết quả thu được tương đồng với kết quả nghiên cứu của Sun và cộng sự (2017). Tỷ lệ phần trăm tế bào MCF-7 trải qua quá trình apoptosis sau khi cảm ứng với nồng độ 0, 40, 80 và 160 µg/mL cao chiết nước của bột bào tử vô tính *I. cicadae* (bao gồm cả giai đoạn tiền apoptosis và apoptosis muộn) là $1,50 \pm 0,34\%$; $27,10 \pm 0,59\%$; $36,50 \pm 1,20\%$ và $45,20 \pm 1,07\%$; tương tự như vậy, tỷ lệ apoptosis của tế bào Hela là $0,60 \pm 0,19\%$; $22,0 \pm 0,67\%$; $31,60 \pm 1,58\%$ và $92,70 \pm 3,25\%$. *I. cicadae* thúc đẩy quá trình apoptosis của tế bào MCF-7 và Hela phụ thuộc vào nồng độ cảm ứng [20].

Theo Gyoung (2010), cao chiết butanol của *C. pruinosa* ức chế sự tăng sinh tế bào và gây ra quá trình apoptosis ở tế bào HeLa phụ thuộc vào liều lượng, phân mảnh DNA. Phân tích Western blot cho thấy quá trình apoptosis trong tế bào HeLa phụ thuộc vào caspase-3- và caspase -9. Sự phân cắt của enzyme poly-ADP ribose polymerase (PARP) và sự giải phóng cytochrome c từ ty thể vào tế bào đã tăng lên đáng kể và tỷ lệ protein Bcl-2 / Bax giảm xuống. Apoptosis gây ra bởi cao chiết butanol của *C. pruinosa* không bị ngăn chặn bởi các chất chống oxy hóa khác nhau [81].

Điều này có thể chứng tỏ cao chiết từ *I. cicadae* có khả năng cảm ứng apoptosis trên nhiều dòng tế bào ung thư khác nhau, cụ thể là Jurkat T, MCF-7 và Hela.



Hình 3.13. Sự thay đổi tỷ lệ tế bào ung thư Jurkat T các pha của chu kỳ tế bào sau xử lý cao EA từ quả thể *I. cicadae* F0004

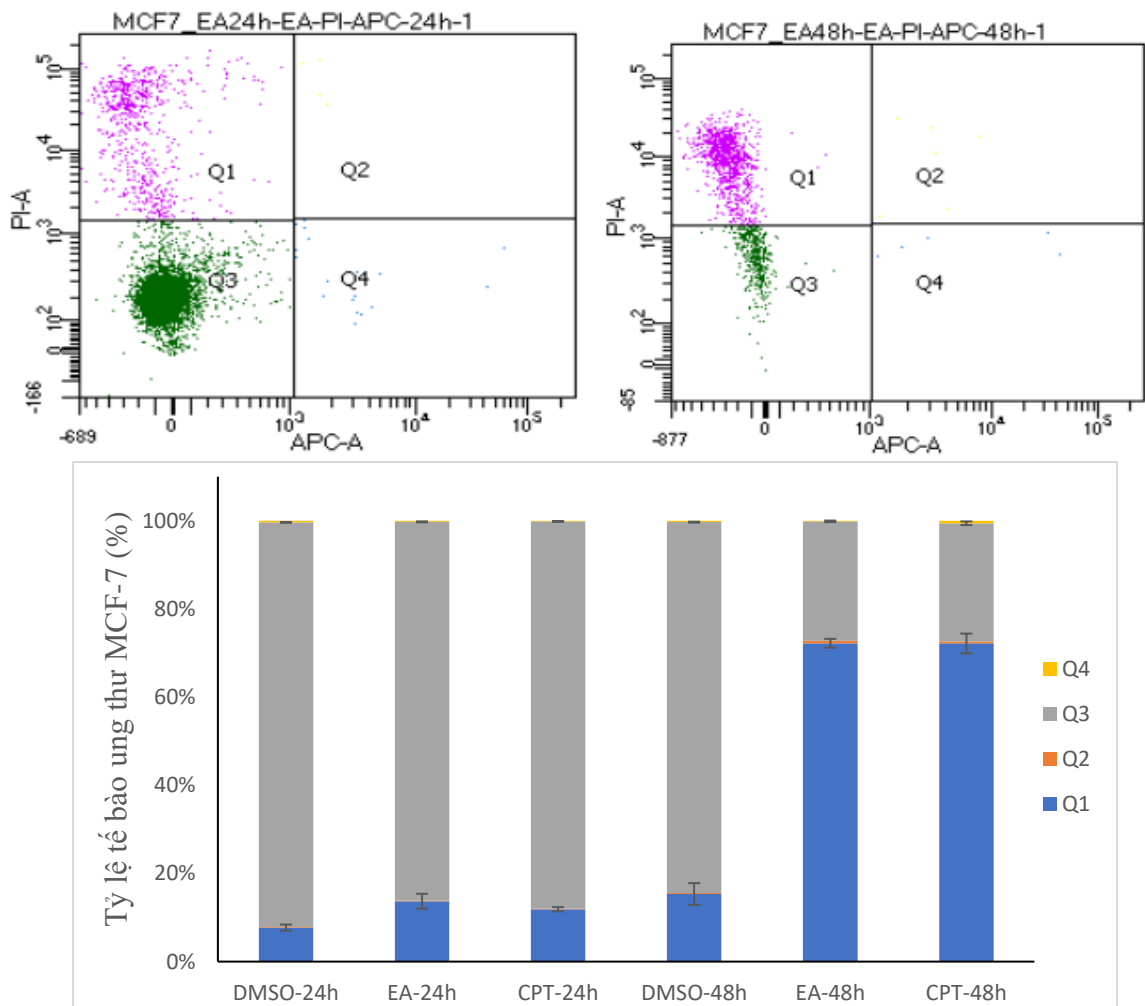
Đối với tế bào Jurkat T, kết quả cho thấy sau 24 giờ xử lý, tỷ lệ tế bào ở pha G_0/G_1 , pha S và pha G_2/M của cao chiết EA giảm thấp hơn đối chứng lần lượt giảm $14,27 \pm 0,41$, $5,9 \pm 0,62\%$ và $2,47 \pm 1,15\%$ so với đối chứng. Ở pha sub- G_0 , phần trăm tế bào tăng $26,64 \pm 1,36\%$. Sau 48 giờ cảm ứng với cao EA từ quả thể *I. cicadae* F0004, phần trăm tế bào ở pha G_0/G_1 , pha S và pha G_2/M bị chết lần lượt giảm tương ứng là $50,66 \pm 1,62\%$, $13,80 \pm 7,29\%$ và $16,21 \pm 7,89\%$ so với đối chứng. Tỷ lệ tế bào chết ở pha sub- G_0 khi bị xử lý với cao chiết EA từ quả thể *I.*

cicadae có F0004 đạt $80,68 \pm 2,21\%$ so với đối chứng. Kết quả phân tích flow cytometry cho thấy quần thể tế bào ung thư Jurkat khi xử lý với cao chiết EA đều tập trung ở đỉnh sub-G₀, có khuynh hướng tăng tỷ lệ tế bào ở sub-G₀ theo thời gian. Trong khi đó, ở lô tế bào không xử lý với cao chiết EA từ quả thể *I. cicadae* F0004, tế bào đã bắt đầu đi vào pha S. Sau quá trình dùng phân bào, tế bào đã khởi phát con đường apoptosis, DNA bị phân cắt, làm tỷ lệ tế bào ở sub-G₀ trên biểu đồ histogram tăng mạnh, tỷ lệ tế bào ở pha G₀/G₁ giảm. Điều này cho thấy cao chiết EA có khả năng gây kháng phân bào trên dòng tế bào ung thư Jurkat bằng cách bắt giữ Chu kỳ tế bào ở pha G₁, tại điểm checkpoint G₀/G₁ và kích hoạt apoptosis.

Theo Hongqing (2019), cao chiết nấm *C. cicadae* kháng lại sự tăng sinh của các tế bào từ hạch bạch huyết SGC-7901 và gây ra sự phát triển của các đặc điểm hình thái bất thường phụ thuộc vào liều lượng. Kết quả phân tích chu kỳ tế bào chỉ ra, rằng xử lý cao chiết nấm *C. cicadae* làm cho quá trình apoptosis tế bào và ngưng chu kỳ tế bào S. Ngoài ra, cao chiết nấm *C. cicadae* kích hoạt quá trình khử cực MMP và quá tải Ca²⁺ trong bào tương của tế bào SGC-7901. Phân tích Western blot đã chứng minh rằng cao chiết nấm *C. cicadae* làm tăng hoạt động Bax, AIF, caspase-8, caspase-6 và caspase-3 và giảm hoạt động Bcl-2. Việc giải phóng cytochrome-c từ ty thể có liên quan đến rối loạn chức năng ty thể, nguyên nhân là do sự kích hoạt thụ thể Fas trên bề mặt tế bào và sự phân cắt PARP. Ngừng tại pha S do cao chiết nấm *C. cicadae* gây ra có liên quan đến sự điều hòa tăng của mức biểu hiện E2F1, cyclin A2, cyclin E và p53 và sự điều hòa giảm của sự biểu hiện CDK2. Ngoài ra, Cao chiết nấm *C. cicadae* làm tăng sự biểu hiện của các protein liên quan đến căng thẳng mạng lưới nội chất, chẳng hạn như calpain-1, caspase-12 và caspase-9. Kết quả phân tích HPLC cho thấy cao chiết nấm *C. cicadae* chứa adenin, uridin, adenosin và N⁶-(2-Hydroxyethyl)-adenosin [56].

c) Kết quả định lượng tế bào apoptosis bằng phương pháp nhuộm annexin V/PI

Khi tế bào trải qua quá trình apoptosis, màng tế bào bị lỏng lẻo, enzyme scramblase xúc tác đưa phosphatidylserin (PS) lên bề mặt ngoài màng plasma và hoạt động như tín hiệu cho quá trình đại thực bào. Để phát hiện tế bào bị apoptosis, kháng thể annexin V đặc hiệu cho protein PS sử dụng kết cùng PI có thể phát hiện và định lượng tế bào bị apoptosis sớm (Annexin V+/PI -), tế bào apoptosis muộn (Annexin V+/PI+), các tế bào bị hoại tử (annexin V- /PI+) và tế bào sống (Annexin V-/ PI-). Tế bào MCF-7 và Jurkat T được xử lý với cao EA từ quả thể *I. cicadae* trong 24 giờ và 48 giờ tại IC₅₀ (hình 3.14).



Hình 3.14. Tỷ lệ tế bào ung thư MCF-7 sau xử lý cao EA từ quả thể *I. cicadae* F0004 và nhuộm Annexin V/PI

Sau 24 giờ xử lý, các tế bào MCF-7 bị apoptosis sớm (Q4) và apoptosis muộn (Q2) đều thấp dưới 0,5% và không có sự khác biệt với đối chứng. Tỷ lệ tế bào hoại tử có màng lỏng lẻo được nhuộm PI (Q1) tăng so với đối chứng 5,99%. Tỷ lệ tế bào sống không liên kết với annexin hay bị nhuộm bởi PI cao (Q3) giảm so với đối chứng 5,85%. Kết quả này cho thấy cao EA từ quả thể *I. cicadae* có khả năng gây độc tế bào MCF-7 theo cơ chế hoại tử sau 24 giờ xử lý. Khi tăng thời gian xử lý chất lên 48 giờ, tỷ lệ tế bào bị hoại tử và tế bào sống có sự thay đổi rõ rệt ($p < 0,05$), cụ thể tỷ lệ tế bào hoại tử (Q1) tăng $56,88 \pm 12\%$ so với đối chứng. Tế bào sống (Q3) giảm từ $85,95 \pm 1,73\%$ (24 giờ) xuống $27,12 \pm 1,15\%$ và giảm 57,04% so với đối chứng. Trong khi đó, tỷ lệ tế bào tạo liên kết với annexin không có sự khác biệt so với đối chứng và mẫu xử lý 24 giờ về mặt thống kê. Kết quả sau khi xử lý với cao 24 giờ và 48 giờ trên cho thấy cao EA từ quả thể *I. cicadae* F0004 có khả năng gây hiện tượng hoại tử.

Dựa trên kết quả 3 phương pháp nhuộm AO/EB, phân tích Chu kỳ tế bào và nhuộm annexin V/PI, cao EA từ quả thể *I. cicadae* DL004 có khả năng gây độc tế bào ung thư MCF-7 theo thời gian, sau 48 giờ tế bào bị ức chế hoàn toàn. Tuy nhiên, cao EA từ quả thể *I. cicadae* DL004 không gây cảm ứng apoptosis tế bào MCF-7 tại nồng độ và thời gian khảo sát. Tế bào ung thư MCF-7 không sự biểu hiện các đặc trưng của tế bào bị apoptosis như nhân cô đặc và phân mảnh, màng tế bào biểu hiện các protein phosphatidylserin ra bề mặt ngoài tế bào. Đồng thời, kết quả cho thấy tỷ lệ tế bào có màng không toàn vẹn tăng mạnh sau 48 giờ xử lý nên tế bào ung thư MCF-7 có thể chết do cơ chế hoại tử.

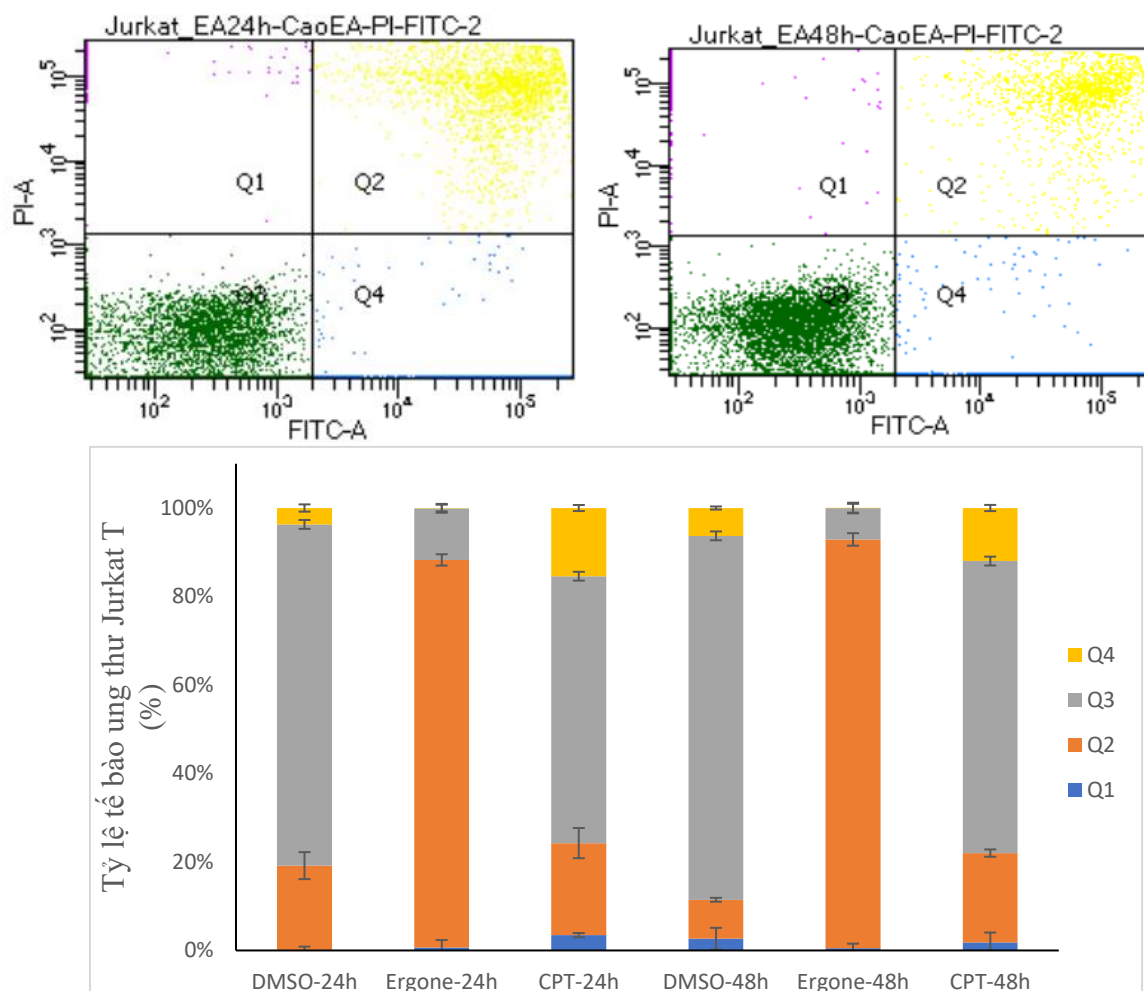
Tế bào ung thư Jurkat T được xử lý với cao chiết EA *I. cicadae* F0004 từ quả thể (10,37 $\mu\text{g}/\text{mL}$ trong 24 giờ và 48 giờ), ủ với Annexin V/PI và được phân tích bằng phương pháp flow cytometry.

Dựa vào kết quả hình 3.14 cho thấy, sau 24 giờ sau khi xử lý tế bào với cao EA từ quả thể *I. cicadae* F0004 và thuốc nhuộm Annexin

V/PI, phần trăm tế bào ở giai đoạn apoptosis muộn tăng $12,69 \pm 3,44\%$ so với đối chứng; phần trăm tế bào ở giai đoạn apoptosis sớm tăng $4,15 \pm 1,45\%$ so với đối chứng. Sau 48 giờ xử lý, phần trăm tế bào ở giai đoạn apoptosis muộn tăng $5,73 \pm 1,06\%$ so với đối chứng; tỷ lệ phần trăm tế bào ở giai đoạn apoptosis sớm tăng $11,72 \pm 1,04\%$ so với đối chứng.

Từ những kết quả trên nhận thấy, cao EA từ quả thể *I. cicadae* F0004 có khả năng cảm ứng apoptosis. Khi tăng thời gian xử lý cao chiết lên 48 giờ, tỷ lệ phần trăm tế bào đi vào apoptosis không có sự khác biệt so với xử lý 24 giờ.

Nghiên cứu của Xie và cộng sự (2019) cho thấy cao ethanol của *C. cicadae* có khả năng cảm ứng apoptosis và dừng Chu kỳ tế bào của tế bào ung thư dạ dày SGC – 7901 [6]. Điều này cho thấy, *I. cicadae* có cơ chế gây độc tế bào ung thư khác nhau trên các dòng tế bào ung thư.



Hình 3.15. Tỷ lệ tế bào ung thư Jurkat T sau xử lý cao EA từ quả thể

I. cicadae F0004 và nhuộm Annexin V/PI

Theo Xingguo (2020), để tế bào chết do chiết xuất ethanol của *C. militaris* gây ra là apoptosis hay hoại tử, đã tiến hành nhuộm Annexin V và 7-AAD. Các tế bào được xử lý với các nồng độ khác nhau (MDA-MB-231 và MCF-7: 25 hoặc 50 $\mu\text{g} / \text{ml}$, 4T1-neu-HA: 10 hoặc 25 $\mu\text{g} / \text{ml}$ và TUBO-HA: 50 hoặc 200 $\mu\text{g} / \text{ml}$) của chiết xuất ethanol của *C. militaris* trong 72 giờ và sau đó nhuộm bằng APC-Annexin V và 7-AAD. Các tế bào nhuộm màu được phân tích bằng phương pháp flow cytometry. Kết quả cho, thấy các đốm chấm đại diện cho nhuộm Annexin V / 7-AAD. Các tế bào nhuộm đơn 7-AAD không được phát hiện, và hầu hết các tế bào nhuộm màu là Annexin V đơn hoặc Annexin V và 7-AAD nhuộm kép. Những dữ liệu này cho thấy chiết xuất ethanol của *C. militaris* gây ra apoptotic ở các tế bào ung thư vú ở người

và chuột. Ngoài ra, các tế bào Annexin V dương tính tăng lên khi tăng liều chiết xuất ethanol của *C. militaris*. Để xác nhận rằng chiết xuất ethanol của *C. militaris* gây ra apoptotic, mức độ PARP và protein caspase 3/7 được đo bằng phương pháp western blot. Trong cả hai tế bào MCF7 và MDA-MB-231, mức độ phân cắt của protein PARP và protein caspase 3/7 đã tăng lên phụ thuộc vào liều lượng [82].

3.4. Phân chất, tinh sạch và định danh các hợp chất của các cao chiết có tiềm năng kháng phân bào

Cao PE của sinh khối *C. neovolkiana* DL0004 và cao EA của quả thể *Isaria cicadae* F0004 có khả năng gây độc tế bào mạnh và có khả năng cảm ứng apoptosis với 02 dòng tế bào ung thư MCF-7 và Jurkat T được chọn để tiến hành phân lập, định danh một số hợp chất cũng như tiếp tục khảo sát hoạt tính gây độc tế bào và cảm ứng apoptosis tế bào ung thư MCF-7 và Jurkat T với các hợp chất tiềm năng.

3.4.1. Phân chất cao PE của sinh khối *C. neovolkiana* DL0004 [59], [83]

Cao PE (7,2 g) được phân đoạn bằng sắc ký cột pha thường sử dụng hệ dung môi n-hexane–EtOAc–acetone (10:1:1–4:1:1) như chất rửa giải thu được 08 phân đoạn PE1, PE2, PE3, PE4, PE5, PE6, PE7, PE8. Phân đoạn PE3 (710,0 mg) được tái sắc ký cột sử dụng pha động n-hexane–EtOAc–acetone (10:1:1) tạo 03 hợp chất: 1 (3,9 mg), 2 (41 mg) và 6 (140 mg). Phân đoạn PE7 (210,0 mg) được chạy cột Sephadex và rửa giải với methanol và thu được 03 phân đoạn: PE7.1, PE7.2 và PE7.3. Tinh sạch phân đoạn PE7.3 (87 mg) bằng C18 sắc ký cột pha đảo với hệ dung môi rửa giải methanol – nước (10:1) thu được 02 hợp chất: 3 (11mg) và 4 (3,5 mg) (*sơ đồ phân chất và biện luận chi tiết được trình bày tại phụ lục*).

Tiến hành định danh các hợp chất:

Hợp chất (CN1), tồn tại dạng bột vô định hình màu trắng; Phổ ¹H-NMR của hợp chất CN1 thể hiện ba tín hiệu cộng hưởng của proton olefin liên hợp tại δ_H 6.66 (1H, *d*, *J* = 9.5 Hz), 6.10 (1H, *d*, *J* = 9.5 Hz) và 5.64 (1H, *s*). Ngoài ra, phổ ¹H-NMR còn có tín hiệu của hai proton olefin ở δ_H 5.32 (*dd*, 7.5, 15.0) và 5.28 (*dd*, 7.5, 15.0), sáu tín hiệu của nhóm methyl ở vùng trường

cao δ_H 1.09 (3H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-21), δ_H 1.02 (3H, *s*, H-19), δ_H 1.01 (3H, *s*, H-18), δ_H 0.96 (3H, *d*, $J = 7.0$ Hz, H-28), δ_H 0.87 (3H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-27) và δ_H 0.85 (3H, *d*, $J = 7$ Hz, H-26) giúp dự đoán hợp chất CN1 là steroid có khung sườn là ergostane.

Phổ ^{13}C -NMR kết hợp với HSQC cho thấy có 28 carbon. Trong đó có tín hiệu cộng hưởng của một carbon ketone liên hợp ở δ_C 198.1, 07 tín hiệu carbon olefin gồm hai carbon tứ cấp ở δ_C 164.1 và 156.0, các carbon methin olefin =CH- ở δ_C 136.2, 134.2, 133.2, 125.4 và 123.7. Từ những tín hiệu NMR này, dự đoán CN1 có khung sườn ergostane với bốn liên kết đôi và một nhóm ketone liên hợp.

Proton methyl H-19 cho tương quan HMBC với carbon olefin tứ cấp ở δ_C 164.1, carbon methin >CH- ở δ_C 45.5, carbon tứ cấp ở δ_C 37.5 và carbon methylene -CH₂- ở δ_C 34.9. Ngoài ra còn có một proton olefin =CH- (δ_H 5.64, *s*, H-4) cho tương quan HMBC với C-10 (δ_C 37.5) và carbon methylen ở δ_C 34.7. Từ đó xác định được nối đôi tại C4-C5.

Từ những dữ liệu NMR này, kết hợp so sánh với số liệu NMR của ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one cho thấy có sự tương đồng nên cấu trúc hợp chất CN1, có thể kết luận hợp chất (1) là ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one [84].

Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one hay còn gọi là ergone (C₂₈H₄₄O₃), Dehydroergosterol là một steroid được cô lập từ một số loại nấm: *Penicillium commune*, *Aspergillus ochraceus*, *Cordyceps sinensis*, *Polyporus umbellatus* và *Xylaria* sp. [85], [86].

Lee và cộng sự (2005) đã chiết tách Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one từ cao Et của nấm *Polyporus umbellatus* và thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào trên 4 dòng tế bào là HT-29, HeLa 229, Hep3B, và AGS. Giá trị IC₅₀ lần lượt của 4 dòng tế bào tương ứng là 5,0; 7,2; 26,3, và 22,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [87].

Zhao và cộng sự (2011) đã chứng minh ergosta chiết tách từ nấm *Polyporus umbellatus* có khả năng bắt giữ chu kỳ tế bào tại pha G₂/M trên dòng tế bào HepG2. Các tế bào được xử lý với ergosta cho thấy các dấu hiệu

điển hình của quá trình apoptosis: bắt giữ chu kỳ tế bào tại pha G₂/M, nhiễm sắc chất ngưng tụ, hạt nhân phân mảnh và tiếp xúc với phosphatidylserin. Hơn nữa, PARP bị phân cắt; caspase-3, -8, -9 được kích hoạt; điều hòa tăng Bax và điều hòa giảm Bcl-2 đã được quan sát thấy trong các tế bào HepG2 được xử lý với ergone [88].

Ergosta-4,6,8 (14), 22-tetraen-3-one (ergone) đã được chứng minh khả năng ngăn chặn sự tiến triển của tổn thương và xơ hóa thận trên mô hình suy thận mãn tính của chuột do adenin gây ra [89].

Hợp chất (CN2), bột màu trắng vô định hình, Phổ ¹H-NMR hợp chất CN2 cho thấy sự xuất hiện của 6 nhóm tín hiệu –CH₃ đặc trưng của khung sườn sterol tại δ_H 0.84 (s, H₃-18), δ_H 0.88 (s, H₃-19), δ_H 0.82 (d, H₃-26), δ_H 0.80 (d, H₃-27), δ_H 0.91 (d, H₃-28), δ_H 0.99 (d, H₃-21). Ngoài ra phổ ¹H-NMR cũng cho thấy sự hiện diện của nối đôi tại C-22 và C-23 của khung sườn ergosterol tại δ_H 5.20 (J₁ = 15.5, J₂ = 7.5) và δ_H 5.15 (J₁ = 15.5, J₂ = 8.0), và tín hiệu H-3 đặc trưng của khung sterol tại δ_H 3.97.

Phổ ¹³C-NMR cho thấy sự tồn tại của 28 carbon của khung ergosterol. So sánh dữ liệu phổ của hợp chất CN2 với ergosterol và hợp chất CN3 cho thấy có sự tương đồng giữa các tín hiệu ở nhân A, C, D và dây hydrocarbon, chứng tỏ sự thay đổi nhóm thế chỉ xảy ra trên nhân B của hợp chất này.

Tiếp tục phân tích phổ ¹H-NMR, 2 tín hiệu proton alkene H-6 (δ_H 6.50) và H-7 (δ_H 6.20) cho thấy 2 proton này ghép *cis* với nhau bởi hằng số ghép J = 8.5 Hz và ở vị trí β so với oxygen. So sánh phổ ¹³C-NMR của (2) với ergosterol thấy có sự biến mất của 2 cặp carbon tứ cấp alkene ở vị trí C-5 và C-8 cùng với sự xuất hiện của 2 cặp carbon tứ cấp liên kết với oxy tại C-5 (δ_C 82.3) và C-8 (δ_C 79.6) giúp xác định thay đổi cấu trúc của nhân B của hợp chất CN2. Từ dữ liệu quang phổ suy ra là 3-hydroxy-5,7-epidioxyergosta-6,22-diene hay còn gọi là ergosterol peroxid (C₂₈H₄₄O₃) [87].

Ergosterol peroxid cũng đã được cô lập từ *I. tenuipes* *C. sinensis* và *C. Cicadae* có hoạt tính kháng phân bào. Ergosterol peroxid chiết xuất từ

Sarcodon aspratus (Berk.) ức chế tăng sinh tế bào dòng tế bào HL60 ở nồng độ lớn hơn 10 μ M [90].

Govindharaj và cộng sự (2019), đã chiết tách ergosterol peroxid từ thực vật biển (Marine Basidiomycetes) *Fulvifomes sp.* đã chứng minh khả năng gây độc tế bào và cảm ứng apoptosis trên dòng tế bào MCF-7 ở nồng độ EP 40 và 80 μ g/ml [91].

Hợp chất (CN3), bột màu trắng vô định hình, Phổ $^1\text{H-NMR}$ cho thấy 06 tín hiệu của các nhóm methyl tại: δ_{H} 0.54 (*s*, H₃-18), δ_{H} 0.91 (*s*, H₃-19), δ_{H} 0.80 (*d*, H₃-26), δ_{H} 0.79 (*d*, H₃-27), δ_{H} 0.89 (*d*, H₃-28), δ_{H} 1.00 (*d*, H₃-21). Trong đó có một nhóm methyl chuyển dịch về vùng từ trường rất cao tại δ_{H} 0.54 (*s*, H₃-18) đặc trưng cho khung sườn sterol. Trên phổ $^1\text{H-NMR}$ xuất hiện 02 tín hiệu ở vùng từ trường thấp của 2 proton olefin tại δ_{H} 5.24 (*dd*, $J_1 = 15.5$ Hz, $J_2 = 7.0$ Hz) và δ_{H} 5.20 ($J_1 = 15.5$ Hz, $J_2 = 8.0$ Hz), phân tích sự chẻ mũi của 2 proton này cho thấy sự tồn tại của 2 proton olefin ghép *trans* với nhau ở lân cận với 2 nhóm methin khác, qua đó xác định sự tồn tại của nối đôi tại C-22, C-23 của khung sườn sterol. Phổ $^1\text{H-NMR}$ còn cho thấy sự hiện diện của nhóm oxymethin H-3 tại δ_{H} 3.77 mũi *multiplet* đặc trưng cho H-3 khung sterol.

So sánh tất cả các tín hiệu carbon của hợp chất CN3 với ergosterol cho thấy có sự tương đồng của tất cả các tín hiệu, ngoại trừ tín hiệu carbon của nhân B, chứng tỏ sự thay đổi nhóm thế của CN3 so với ergosterol chỉ xảy ra trên vòng B của hợp chất này. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ còn cho thấy ngoài sự xuất hiện của liên kết đôi tại C-22 và C-23, hợp chất CN3 còn mang một liên kết đôi khác tại C-7 (δ_{C} 119.5) và C-8 (δ_{C} 139.7) trên nhân B.

Trên nhân B, phổ HMBC cho thấy proton 5-OH (δ_{H} 3.63) có sự tương quan với carbon C-5 (δ_{C} 74.5), C-6 (δ_{C} 72.2) và C-10 (δ_{C} 36.7), proton H₃-19 (δ_{H} 0.9, δ_{C} 19.8) có sự tương quan với các carbon C-5 (δ_{C} 74.5) và C-10 (δ_{C} 36.7). Ngoài ra proton 6-OH (δ_{H} 4.50), 5-OH (δ_{H} 3.63) cho tương quan HMBC với C-5, giúp xác định các vị trí C-5 và C-6 liên kết với oxygen. Bên cạnh đó, tương quan HMBC của H-7 (δ_{H} 5.10) tới C-5 và C-6 giúp củng cố vị trí của liên kết đôi tại C-7. Từ dữ liệu quang phổ suy ra là ergosta-7,22E-diene-

3beta,5alpha,6beta-triol hay còn gọi là cerevisterol (C₂₈H₄₆O₃) [92]. Đây là lần đầu tiên cerevisterol được tìm thấy trong *C. neovolkiana*. Cerevisterol (ergosta-7, 22E-diene-3β5α, 6β- triol) được chiết xuất từ hai loại nấm phân hủy gỗ là *Trametes gibbosa* và *Trametes elegans*. Cerevisterol được phân lập đã ức chế sự phát triển của *S. typhi*, *S. aureus* và *A. niger* với MIC là 25 µg/mL mỗi loại và 50 µg/mL và kháng *E. faecalis* [93].

Hợp chất (CN4), bột màu trắng vô định hình, Phổ ¹H-NMR hợp chất CN4 cũng cho thấy sự xuất hiện của 6 nhóm tín hiệu -CH₃ đặc trưng của khung sườn sterol tại δ_H 0.87 (*s*, H₃-18), δ_H 0.89 (*s*, H₃-19), δ_H 0.86 (*d*, H₃-26), δ_H 0.86 (*d*, H₃-27), δ_H 0.94 (*d*, H₃-28), δ_H 1.03 (*d*, H₃-21). Ngoài ra phổ ¹H-NMR cũng cho thấy sự hiện diện của nối đôi tại C-22 và C-23 của khung sườn ergosterol tại δ_H 5.25 (*J*₁ = 15.5, *J*₂ = 7.5) và δ_H 5.27 (*J*₁ = 15.5, *J*₂ = 8.0), và tín hiệu H-3 đặc trưng của khung sterol tại δ_H 3.75.

Phổ ¹³C-NMR cho thấy sự tồn tại của 28 carbon của khung ergosterol. So sánh dữ liệu phổ của hợp chất CN4 với ergosterol và hợp chất CN3 cho thấy có sự tương đồng giữa các tín hiệu ở nhân A, D và dây hydrocarbon, chứng tỏ sự thay đổi nhóm thế chỉ xảy ra trên nhân B, C của hợp chất này, sự thay đổi rõ nhất là ở carbon số 7 và carbon số 14 có sự thay đổi liên kết và bậc carbon.

Tiếp tục phân tích phổ ¹H-NMR trên nhân B, không có một tín hiệu của proton alkene nào xuất hiện mà xuất hiện tín hiệu δ_H 3.32 (*d*, H₃-6), δ_H 4.34 (*d*, H₃-7) và tín hiệu proton 7-OH δ_H (3.76). So sánh phổ ¹H-NMR của CN4 với CN3 thấy tín hiệu proton nhóm OH ở vị trí C-5, C-6 cũng biến mất. Khi so sánh phổ ¹³C-NMR của CN4 với ergosterol thấy có sự biến mất của các carbon tứ cấp của alkane vị trí C-5 và C-7, nhưng xuất hiện tín hiệu carbon tứ cấp ở C-8 (δ_C 127.6) và C-14 (δ_C 151.1). Chứng tỏ CN4 trên nhân C có liên kết đôi ở vị trí C-8(14), trên nhân B có 7-ol và 5,6-epoxy.

Từ những dữ kiện phổ phân tích như trên hợp chất CN4 và so sánh với dữ liệu phổ hợp melithasterol B (C₂₈H₄₄), các đặc điểm về hóa lý và phổ, có thể kết luận hợp chất (4) là melithasterol B [94]. Đây cũng là lần đầu tiên hợp

chất melithasterol B được tìm thấy trong *C. neovolkiana*. melithasterol B và ergosterol peroxid đã được tìm thấy trong thành phần của *Beauveria* sp. – loài nấm tiềm năng có khả năng kháng lại nhiều loài côn trùng gây hại nông nghiệp. Mùi hợp chất được phân lập từ *Beauveria* sp. thể hiện khả năng diệt *Bemisia tabaci* [95].

Hợp chất (CN5), bột màu trắng vô định hình, Phổ ¹H-NMR cho thấy 6 tín hiệu của nhóm methyl H₃-18 (δ_H 0.63, s), H₃-19 (δ_H 0.95, s), H₃-26 (δ_H 0.83, d, 7.5 Hz), H₃-27 (δ_H 0.84, d, 7.0 Hz), H₃-28 (δ_H 0.92, d, 6.5 Hz), H₃-21 (δ_H 1.03, d, 6.5 Hz). Trong đó nhóm H₃-18 chuyển dịch về vùng từ trường rất cao đặc trưng cho khung sườn ergostane, suy ra là ergosterol hay còn gọi là pro vitamin D₂ (C₂₈H₄₄O) [96].

Ergosterol là chất phổ biến ở các loài nấm *Cordyceps* spp. và là chất chuyển hóa thứ cấp của nấm dược liệu, có nhiều hoạt tính kháng viêm và kháng phân bào. Misgiati và cộng sự (2021) đã chứng minh ergosterol chiết tách từ phân đoạn n-hexane của nấm thái dương (*Agaricus blazei* Murill) có khả năng gây độc tế bào ung thư MCF-7 với giá trị IC₅₀ 43,10 µg/ml. Cơ chế hoạt động của ergosterol là tăng cảm ứng apoptosis thông qua ức chế chu kỳ tế bào ở pha G₂/M [97].

Li và cộng sự (2015) đã chiết xuất ergosterol từ nấm *Amauroderma* và thử nghiệm hoạt tính ức chế sự phát triển của tế bào ung thư biểu mô vú ở người (MDA-MB-231, MDA-MB-468, SK-BR-3, và MCF-7) và tế bào ung thư vú ở chuột (4T1). Ergosterol chiết xuất từ nấm có tác dụng ức chế sự xâm lấn tế bào ung thư ở nồng độ 20 µg/ml [98].

3.4.2. Phân chất cao EA của quả thể *Isaria cicadae* F0004 [59]

Cao EA từ quả thể *I. cicadae* F0004 (7g) được tiến hành phân đoạn bằng sắc ký cột pha thường với các dung môi hữu cơ gồm hexan, chloroform, ethyl acetat và methanol. Cao EA được hòa tan hoàn toàn trong acetone, hấp phụ bằng silicagel và nạp cột với dung môi hexan, thu nhận dung môi qua cột, cô quay thu nhận phân đoạn hexan (H), chạy sắc ký đến khi dung môi thu được không còn chất thì đổi dung môi với độ phân cực cao hơn chloroform. Tiến

hành tương tự với ethyl acetat và methanol. Kết quả thu được 4 phân đoạn tương ứng với các dung môi chạy sắc ký là hexan (H), chloroform (C), ethyl acetat (E) và methanol (M). Phân đoạn C sau được hòa tan bằng dung môi chloroform xuất hiện tủa, lọc tủa thu được phân đoạn C1. Phần dịch hòa tan tốt trong chloroform gọi là phân đoạn C2 (*Sơ đồ phân chất trình bày phụ lục*)

Phân đoạn C1 và C2 được chọn để tiếp tục phân chất. Bằng phương pháp tủa với hexan và chloroform, từ phân đoạn C2 tinh sạch thu được hợp chất IC3.

Tiến hành định danh các hợp chất:

Chất (IC1), chất rắn không màu, vô định hình, hòa tan trong dung môi chloroform:aceton, khi giải ly với hệ dung môi chloroform:methanol (95:5) 3 lần cho 1 vết hiện hình dưới đèn UV và không hiện hình với thuốc thử vanilin/ethanol 5%. Phổ $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) và phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$). Phổ $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) xuất hiện 2 tín hiệu đôi của 2 proton olefin tại δ_{H} 5,4 (1H, *d*, 7,6 Hz, H-5) và δ_{H} 7,4 (1H, *d*, 7,6 Hz, H-6). Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ cho thấy hợp chất IC1 có 4 tín hiệu carbon trong đó 2 carbon nối đôi với oxy với δ_{C} 151,7 (C-2), δ_{C} 164,8 (C-4), 1 carbon gắn carbon δ_{C} 100,1 (C-5) và 1 carbon gắn nitơ δ_{C} 142,6 (C-6). Từ tất cả các phân tích trên và so sánh số liệu phổ $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ của IC1 với tài liệu tham khảo Ngô Hải Đăng và cộng sự (2011), cho thấy IC1 là pyrimidin-2,4-(1H, 3H)-dione hay uracil ($\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2$) [99].

Uracil: là một dẫn xuất pyrimidin phổ biến và tự nhiên và một trong bốn nucleotid trong acid nucleic của RNA. Các dẫn xuất uracil là một trong những chất được nghiên cứu nhiều nhất về hóa dược. Các dẫn xuất của uracil có nhiều hoạt tính, cụ thể như kháng phân bào, kháng virus, kháng khuẩn, chống ký sinh trùng hoặc có thể hoạt động như hạ đường huyết [100].

Chất (IC2), chất rắn vô định hình, không màu, không hiện hình dưới đèn UV và có màu nâu khi hiện hình với thuốc thử vanilin/ ethanol 5%. Phổ $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO} - d_6$) và phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $\text{DMSO} - d_6$) được đo trong dung môi DMSO. Phổ $^1\text{H-NMR}$ xuất hiện các tín hiệu proton

của nhóm oxy-methin và oxy-methylene, trong vùng từ 3,30 đến 4,80 cho thấy hợp chất IC2 là một hợp chất đường đơn. Ngoài ra còn có một tín hiệu proton mũi ba của nhóm CH₃ tại δ_H 1,12 với hằng số ghép 7,1 Hz). Phổ ¹³C-NMR cho thấy hợp chất IC2 có 7 tín hiệu carbon bao gồm 1 tín hiệu carbon anomer của đường tại δ_C 108,7 (C-1), 4 tín hiệu carbon oxy-methin tại δ_C 85,7 (C-2), 72,7 (C-3) và 76,7 (C-4), 2 tín hiệu carbon oxymethylene tại 64,7 (C-5) và 64,0 (C-6) và 1 tín hiệu carbon nhóm CH₃ với δ_C 15,9 (C-7). Từ dữ liệu trên, hợp chất IC2 được dự đoán là một đường β -D-ribofuranose có 1 nhóm thế ethyl. So sánh dữ liệu phổ ¹H-NMR, ¹³C-NMR của hợp chất IC2 với nghiên cứu của Natsumi Inada và cộng sự năm 2015 [101].

1-O-Ethyl- β -D-ribofuranose hay còn gọi là ethyl pentofuranosid (C₇H₁₄O₅), là một trong những siRNA, có thể ức chế biểu hiện protein của mRNA, làm bất hoạt gen mục tiêu [102].

Chất (IC3), chất rắn vô định hình, màu trắng, hiện hình dưới đèn UV, hóa nâu khi hiện hình với thuốc thử vanilin/ethanol 5%, tủa trong hexan và tan tốt trong chloroform. Phổ ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃-d₁) và phổ ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃-d₁). Phổ ¹H-NMR của hợp chất IC3 cho thấy 6 tín hiệu proton methyl bao gồm 2 tín hiệu proton mũi đơn tại δ_H 0,63 (3H, *s*, H-18), δ_H 0,95 (3H, *s*, H-19) và 4 tín hiệu proton mũi đôi tại δ_H 0,83 (3H, *d*, 7,2 Hz, H-26), δ_H 0,84 (3H, *d*, 7,2 Hz, H-27), δ_H 0,92 (3H, *d*, 6,9 Hz, H-28), 1,04 (3H, *d*, 6,7 Hz, H-22). Ngoài ra, có các 4 tín hiệu proton olefin tại δ_H 5,57 (1H, *dd*, 5,8 và 2,5 Hz, H-6), δ_H 5,38 (1H, *dt*, 5,6 và 2,8 Hz, H-7), δ_H 5,20 (2H, *m*, H-22, 23) và 1 tín hiệu proton CH-O tại δ_H 3,64 (1H, *m*, H-3). Phổ ¹³C-NMR của hợp chất IC3 cho thấy 28 tín hiệu carbon, trong đó có 6 tín hiệu carbon nối đôi tại δ_C 116,5 (C-7), δ_C 119,8 (C-6), δ_C 132,2 (C-23), δ_C 135,7 (C-22), δ_C 139,9 (C-5), δ_C 141,5 (C-8), 1 tín hiệu carbon C-O tại δ_C 70,7 (C-3), 6 tín hiệu carbon methyl tại δ_C 12,2 (C-18), δ_C 16,5 (C-19), δ_C 17,8 (C-28), δ_C 19,8 (C-26), δ_C 20,1 (C-27), δ_C 21,3 (C-21) và các tín hiệu carbon CH, CH₂ còn lại. So sánh dữ liệu phổ ¹H-NMR, ¹³C-NMR của hợp chất IC3 với tài liệu tham khảo cho thấy IC3 là ergosterol (C₂₈H₄₄O) [98], [99].

Ergosterol là chất chuyển hóa thứ cấp của nấm dược liệu, có nhiều hoạt tính kháng viêm và kháng phân bào. Misgiati và cộng sự (2021) đã chứng minh ergosterol chiết tách từ phân đoạn n-hexan của nấm thái dương có khả năng gây độc tế bào ung thư MCF-7 với giá trị IC_{50} 43,10 $\mu\text{g/ml}$. Cơ chế hoạt động của ergosterol là tăng cảm ứng apoptosis thông qua ức chế chu kỳ tế bào ở pha G₂/M [97].

Li và cộng sự (2015) đã chiết xuất ergosterol từ nấm *Amauroderma* và thử nghiệm hoạt tính ức chế sự phát triển của tế bào ung thư biểu mô vú ở người (MDA-MB-231, MDA-MB-468, SK-BR-3, và MCF-7) và tế bào ung thư vú ở chuột (4T1). Ergosterol chiết xuất từ nấm có tác dụng ức chế sự xâm lấn tế bào ung thư ở nồng độ 20 $\mu\text{g/ml}$ [98].

Chất (IC4), trạng thái bột màu trắng, tan trong dung môi aceton và methanol, sắc ký lớp mỏng cho một vết duy nhất với hệ dung ly chloroform : Aceton (95:5), không hiện hình bằng thuốc thử vanilin / ethanol 5%. Phổ ¹H-NMR (C500 MHz, Acetone-*d*₆) và phổ ¹³C-NMR (125 MHz, acetone-*d*₆). Phổ ¹H-NMR (acetone-*d*₆) có 2 tín hiệu tại vùng thơm của 2 cặp hydro đối xứng δ_{H} 6,92 (2H, *d*, 8,8 Hz, H-2,6), và δ_{H} 7,91 (2H, *d*, 8,8 Hz, H-3,5), cho thấy đây là vòng thơm mang 02 nhóm thế vị trí 1 và 4. Phổ ¹³C-NMR (acetone-*d*₆) có 05 tín hiệu carbon bao gồm 04 tín hiệu carbon vòng thơm tương ứng vòng thơm có 02 cặp carbon đối xứng: δ_{C} 161,7 (C-O, C-4) và δ_{C} 121,8 (C-COOH, C-1), δ_{C} 115,05 (C-2, 6), δ_{C} 131,5 (C-3, 5), tín hiệu tại δ_{C} 166,69 là tín hiệu của nhóm carboxyl C-7. Từ tất cả các phân tích trên và so sánh dữ liệu phổ ¹H-NMR, ¹³C-NMR của hợp chất IC4 với tài liệu tham khảo cho thấy IC4 là *p*-hydroxybenzoic acid (C₇H₆O₃) [100], [102].

Wang và cộng sự (2018) chứng minh *p*-hydroxybenzoic acid khi xử lý độc lập có tỷ lệ ức chế tế bào MCF-7 thấp, nhưng khi kết hợp với adriamycin thì làm tăng gây độc và apoptosis trên MCF-7 [103].

Ngoài ra, Spilioti và cộng sự (2014) đã nghiên cứu thành phần acid phenolic có trong mật ong Hy Lạp và hoạt tính kháng phân bào và tăng mỡ máu. Kết quả cho thấy, mật ong Hy Lạp rất giàu phenolic acid, đặc biệt là

protocatechuic acid và p-hydroxybenzoic acid, bên cạnh đó còn thể hiện các hoạt động chống oxy hóa, ức chế tế bào ung thư tuyến tiền liệt PC-3 và ung thư vú MCF-7 của hỗn hợp các chất bao gồm protocatechuic acid và p-hydroxybenzoic acid [104].

Chất (IC5), chất vô định hình màu trắng, tan trong dung môi acetone và methanol, sắc ký lớp mỏng cho một vết duy nhất với hệ dung ly chloroform:Aceton (8:2), hiện hình dưới đèn UV và không hiện hình với thuốc thử vanilin / ethanol 5%. Phổ $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Acetone- d_6) và phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, Acetone- d_6). Phổ $^1\text{H-NMR}$ (acetone- d_6) có các tín hiệu tại vùng thơm δ_{H} 6,89 (1H, d, 8,3 Hz, H-5), δ_{H} 7,47 (1H; dd; 8,3 và 2,1 Hz, H-6) và δ_{H} 7,53 (1H, d, 2,0 Hz, H-2) cho thấy đây là vòng thơm mang 03 nhóm thế vị trí 1, 3, 4. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (acetone- d_6) có 07 tín hiệu carbon bao gồm 6 tín hiệu carbon vòng thơm tại δ_{C} 123,1 (C-1), δ_{C} 117,4 (C-2), δ_{C} 145,5 (C-3), δ_{C} 150,6 (C-4), δ_{C} 115,6 (C-5) và δ_{C} 123,5 (C-6). Từ tất cả các phân tích trên và so sánh dữ liệu phổ $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất IC5 với tài liệu tham khảo cho thấy IC5 là 3,4-dihydroxybenzoic acid hay còn gọi là protocatechuic acid ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_4$) [102].

Yin và cộng sự (2009) đã chứng minh protocatechuic acid có khả năng chống ung thư thông qua tăng quá trình apoptosis hoặc ngăn chặn sự xâm lấn và di căn của các tế bào ung thư vú ở người MCF-7, ung thư phổi A549, tế bào ung thư gan HepG2, tế bào HeLa, tế bào ung cổ tử cung và tế bào ung thư tuyến tiền liệt LNCaP [105].

Theo kết quả nghiên cứu của Steng và cộng sự (2000), protocatechuic acid chiết xuất từ quả cây búp giấm đã cảm ứng quá trình apoptosis trên tế bào bệnh bạch cầu ở người thông qua giảm phosphoryl hóa khối u nguyên bào võng mạc (RB) và biểu hiện Bcl-2. Tỷ lệ tế bào chết tăng lên theo nồng độ và thời gian xử lý (70% ở 2 mM, tại 48 giờ), protocatechuic acid có tác dụng chống tăng sinh thông qua phản ứng phosphoryl hóa và phân hủy RB; ức chế protein Bcl-2 trong tế bào ung thư [106].

Lin và cộng sự (2007) đã chứng minh protocatechuic acid gây ra apoptosis thông qua con đường JNK/p38 MAPK, con đường Fas/FasL được cảm ứng, tăng chuyển vị Bax và giảm Bcl-2 trên tế bào ung thư biểu mô dạ dày [107].

Chất (IC6), chất rắn vô định hình, màu trắng, tan trong aceton, hiện hình dưới đèn UV và không hiện hình khi nung với thuốc thử 5% vanilin/ethanol. Phổ $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OCD}_3-d_6$), phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $\text{CD}_3\text{OCD}_3-d_6$). Phổ $^1\text{H-NMR}$ (acetone- d_6) có 4 tín hiệu vùng thơm với δ_{H} 9,11 (1H, s, 2,3 Hz, H-2), δ_{H} 8,7 (1H, dd, 4,8 và 1,7 Hz, H-6), δ_{H} 8,3 (1H, dt, 7,95 và 2,0 Hz, H-4), δ_{H} (1H, dd, 7,95 và 4,81 Hz, H-5). Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (Acetone- d_6) xuất hiện 6 tín hiệu trong đó 1 tín hiệu carbon nhóm COOH với δ_{C} 167,6 và 5 tín hiệu carbon vòng thơm δ_{C} 149,7 (C-2), δ_{C} 130,7 (C-3), δ_{C} 135,9 (C-3), δ_{C} 124,2 (C-4), δ_{C} 152,9 (C-5). Từ tất cả các phân tích trên và so sánh dữ liệu phổ $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất IC6 với tài liệu tham khảo hợp chất IC6 có công thức của hợp chất IC6 là 3-pyridinecarboxylic acid hay còn gọi là nicotinic acid ($\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$) [108]. Nicotinic acid còn có tên khác là niacin, acid pyridin-3-carboxylic, thuộc nhóm vitamin B ưa nước. Niacin là một thành phần của nicotinamid adenin dinucleotid (NAD). Nó là tiền chất cho rất nhiều hợp chất, các dẫn xuất của niacin đã được thương mại hóa, kháng khuẩn đến thuốc điều trị ung thư, sử dụng trong y sinh, sản xuất mỹ phẩm, thuốc trừ sâu và thuốc diệt cỏ trong ngành công nghiệp hóa chất nông nghiệp.

Bằng phương pháp sắc ký và phương pháp cộng hưởng từ hạt nhân NMR, 6 hợp chất được thu nhận và xác định cấu trúc từ phân đoạn C của cao EA từ quả thể *I. cicadae* gồm: uracil (IC1), 1-O-ethyl- β -D-ribofuranose (IC2), ergosterol (IC3), *p*-hydroxybenzoic acid (IC4), protocatechuic acid (IC5) và nicotinic acid (IC6). Trong đó, hợp chất IC1, IC3 và IC6 đã được phân lập trước đó từ chủng nấm *C. Cicadae* (thể hữu tính của *I. cicadae*), 03 hợp chất còn lại, lần đầu tiên được cô lập, tinh sạch và định danh từ *I. cicadae*. Các hợp chất uracil, 1-O-ethyl- β -D-ribofuranose và ergosterol đều được chứng minh có hoạt tính sinh học quan trọng như: kháng oxy hóa, hỗ trợ miễn

dịch,... Ergosterol là sterol có vai trò quan trọng trong màng tế bào đã được tìm thấy trong nhiều loại nấm và là tiền vitamin D2 ở người.

Theo Zhu (2015), mười bốn hợp chất đã biết cũng được phân lập, bao gồm: uracil, uridin, 2'-deoxyuridin, 2'-deoxyinosin, guanosin, 2'-deoxyguanosin, thymidin, adenosin, 2'-deoxyadenosin; acid amin tryptophan, phenylalanin, tyrosin, N-acetylnoradrenalin, 3', 4'-dihydroxyphenyl và N-acetyl-2"-amino-etylen được phân lập từ *C. cicadae* [109].

Theo Jia-hui (2017), đã phân lập từ sợi nấm và bào tử *C. cicadae* nuôi cấy nhân tạo được các chất: ergosterol (1), ergosterol peroxid (2), 9,11-dehydroergosterol peroxid (3), 3 β , 5 α , 9 α -trihydroxy- (22E, 24R) -ergosta-7,22-dien-6-one (4), 3 β , 5 α , 9 α , 14 α -tetrahydroxy- (22E, 24R) -ergosta-7,22-dien-6-one (5), 5 α , 6 α -epoxy- (22E, 24R) -ergosta-8 (14), 22-diene-3 β , 7 α -diol (6), 3 β , 5 α , 6 β - (22E, 24R) -ergosta-7,22-dien-3,5,6-triol (7), 3 β , 5 α , 6 α -6-metoxiergosta- (22E, 24R) -7,22-diene-3,5-diol (8), 4-hydroxy-17R-metylcysterol (9), cùng với dẫn xuất resorcinol, 5-n-nonadecylresorcinol (10), một cyclodesipeptid, beauvericin (11), và một nucleosid, N6- (2-hydroxyethyl) adenosin (12) [110].

Cao PE từ sinh khối *C. neovolkiana* DL0004 đã được phân lập và định danh 05 chất: (CN1) ergone, (CN2) ergosterol peroxid, (CN3) cerevisterol, (CN4) melithasterol B, (CN5) ergosterol. Cao EA từ quả thể *I. Cicadae* F0004 đã phân lập và định danh được 06 đã được phân lập và định danh 06 chất: (IC1) uracil, (IC2) 1-O-Ethyl- β -D-ribofuranose, (IC3) ergosterol, (IC4) *p*-hydroxybenzoic acid, (IC5) protocatechuic acid, (IC6) nicotinic acid. Trong đó, cả 02 loại cao PE từ sinh khối *C. neovolkiana* DL0004 và Cao EA từ quả thể *I. Cicadae* F0004 đều phân lập và định danh được hợp chất ergosterol, là một thành phần quan trọng của màng tế bào nấm.

3.5. Kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư MCF-7 và Jurkat T của các chất

Bảng 3.3. Kết quả gây độc tế bào của một số hợp chất cô lập được từ *C. neovolkiana* DL0004 và *I. cicadae* F0004 nhân tạo tại nồng độ 100 µg/mL

Cao chiết	Tên hợp chất	Tỷ lệ gây độc MCF-7 (%)	Tỷ lệ gây độc Jurkat T (%)
EA <i>I. cicadae</i> F0004 QT	p-hydroxybenzoic acid	6,93 ± 2,39	21,42 ± 5,13
	protocatechuic acid	5,78 ± 3,69	18,91 ± 3,35
PE <i>C. neovolkiana</i> DL0004 SK	ergone	92,08 ± 0,73	80,55 ± 1,04
	cerevisterol	18,08 ± 6,32	17,29 ± 6,01
	ergosterol peroxid	73,83 ± 0,99	77,12 ± 2,19
	melithasterol B	40,58 ± 0,85	18,92 ± 3,22

Đối với cao PE từ sinh khối *C. neovolkiana* DL0004, xác định IC₅₀ gây độc hai dòng tế bào MCF-7 và Jurkat T với 02 chất ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one và ergosterol peroxid. Kết quả cho thấy cả ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one và ergosterol peroxid đều có khả năng ức chế hai dòng tế bào ung thư MCF-7 và Jurkat T. Ergosterol peroxid có IC₅₀ gây độc hai dòng tế bào MCF-7 và Jurkat T lần lượt là 46,83 ± 3,92 và 40,52 ± 3,52 µg/mL. Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one có IC₅₀ gây độc hai dòng tế bào MCF-7 và Jurkat T lần lượt là 17,24 ± 1,31 và 39,30 ± 1,53 µg/mL. Theo Lee và cộng sự (2005), ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one từ nấm Trư linh (*Polyporus umbellatus*) có hoạt tính ức chế các dòng tế bào ung thư lần lượt Hep3B (5,0 ± 0,41 (µg/mL) (12,7 µM)), HT-29 (7,2 ± 0,17 (µg/mL) (18,4 µM)), HeLa229 26,3 ± 0,93 (µg/mL) (67 µM) và AGS 22 ± 0,16 (µg/mL) (56,1 µM) [111]. Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one sẽ được chọn để nghiên cứu khả năng cảm ứng apoptosis ở dòng tế bào MCF-7 và Jurkat T.

Đối với cao EA từ quả thể *I. cicadae* F0004, p-hydroxybenzoic acid và protocatechuic acid có hoạt tính tương đồng nhau, trong đó, p-hydroxybenzoic acid hoạt tính có sự biến động mạnh. Protocatechuic acid là hợp chất phenolic acid thông dụng đã được phân lập nhiều trong thực phẩm và trái cây như gạo lứt (*Oryza sativa* L.), hành tây (*Allium cepa* L.), quả mận (*Prunus domestica* L.), nho (*Vitis vinifera*) hay các loại hạt như hạnh nhân (*Prunus amygdalus*). Protocatechuic acid cũng được tìm thấy trong các loại thảo dược như hoa hồi (*Illicium verum*), hương thảo (*Rosmarinus officinalis* L.) và đã được chứng minh có nhiều hoạt tính sinh học như kháng khuẩn, kháng virus, kháng viêm, bảo vệ gan, bảo vệ tế bào thần kinh và thận, đặc biệt là kháng tế bào ung thư [112]. Kết quả (bảng 3.3.) cho thấy, protocatechuic acid không có khả năng gây độc tế bào MCF-7 tại nồng độ 100 µg/mL. Kết quả này tương tự nghiên cứu của Yin và cộng sự (2009), khi xử lý với protocatechuic acid 48 giờ với nồng độ từ 2-8 µM/L ảnh hưởng không đáng kể đến sự tăng sinh của tế bào MCF-7. Tuy nhiên có dấu hiệu cảm ứng apoptosis các tế bào MCF-7 thông qua biểu hiện tăng phân mảnh DNA, tăng hàm lượng caspase-3 [113]. Nghiên cứu của Owumi và cộng sự (2019) cho thấy, protocatechuic acid làm giảm rõ rệt sự gia tăng interleukin-1 β , yếu tố hoại tử khối u alpha và hoạt tính caspase-3 và caspase-8 ở chuột cống. Kết quả nghiên cứu của Xie và cộng sự (2018) cho thấy, protocatechuic acid cũng ức chế sự tăng sinh các dòng tế bào ung thư buồng trứng OVCAR-3, SKOV-3 và A2780 sau 72 giờ xử lý với IC₅₀ lần lượt 10,7, 14,8, and 14,9 µM thông qua cơ chế apoptosis [75]. Protocatechuic acid cũng có khả năng gây độc tế bào ung thư biểu mô dạ dày AGS với IC₅₀ khoảng 7.3 mM thông qua cơ chế apoptosis khi hoạt hóa tín hiệu con đường JNK/p38 MAPK [107]. Nghiên cứu của Tseng và cộng sự (2000) cũng cho thấy, protocatechuic acid gây cảm ứng apoptosis tế bào ung thư bạch cầu HL-60 tại nồng độ 0,75 mM sau 24 giờ xử lý [106]. Các nghiên cứu này cho thấy protocatechuic acid có khả năng gây độc tế bào ung thư khác nhau thông qua cơ chế cảm ứng apoptosis tại các nồng độ khác nhau. Do đó, để đánh giá khả năng cảm ứng apoptosis tế bào MCF-7 của protocatechuic acid ở nồng độ cao hơn, tôi tiến hành xác định IC₅₀ của protocatechuic acid đối với tế bào MCF-7 và Jurkat T và đánh giá khả năng cảm ứng apoptosis của protocatechuic acid tại IC₅₀.

Các hợp chất được tiến hành đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư MCF-7 và Jurkat T tại nồng độ 100 $\mu\text{g/mL}$. Kết quả (bảng 3.3) cho thấy cả 2 hợp chất *p*-hydroxybenzoic acid và protocatechuic acid đều cho hoạt tính thấp so với cao EA, điều này chứng tỏ 2 hợp chất này không phải thành phần quyết định hoạt tính gây độc tế bào ung thư MCF-7 và Jurkat T trong cao EA. Các hợp chất quyết định hoạt tính chưa phân lập được có thể do hàm lượng thấp. Kết quả giá trị IC_{50} gây độc tế bào MCF-7 và Jurkat T của protocatechuic acid lần lượt là 920,1 $\mu\text{g/mL}$ (5,97 mM) và 485,48 $\mu\text{g/mL}$ (3,15 mM). Kết quả có sự tương đồng với nghiên cứu trước của Wang và cộng sự (2018), *p*-hydroxybenzoic không gây độc tế bào MCF-7 với nồng độ từ 0-20 μM . Tuy nhiên, nghiên cứu này cũng cho thấy khi sử dụng kết hợp *p*-hydroxybenzoic với adriamycin tăng hiệu của adriamycin với các tế bào ung thư MCF-7 kháng adriamycin [103]. *p*-hydroxybenzoic là dẫn xuất của benzoic acid, được tìm thấy trên nhiều loại thực vật như lúa mạch, dâu tây, nho đen, đào, cà rốt, hành tây, hạt ca cao, việt quất... [113]. *p*-hydroxybenzoic cũng được chứng minh có hoạt tính kháng oxy hóa, kháng vi sinh vật, kháng nấm... [114]. Do đó, dù không thể hiện hoạt tính gây độc tế bào ung thư MCF-7 nhưng *p*-hydroxybenzoic là thành phần có nhiều hoạt tính sinh học giá trị trong quả thể nấm *I. cicadae* F0004.

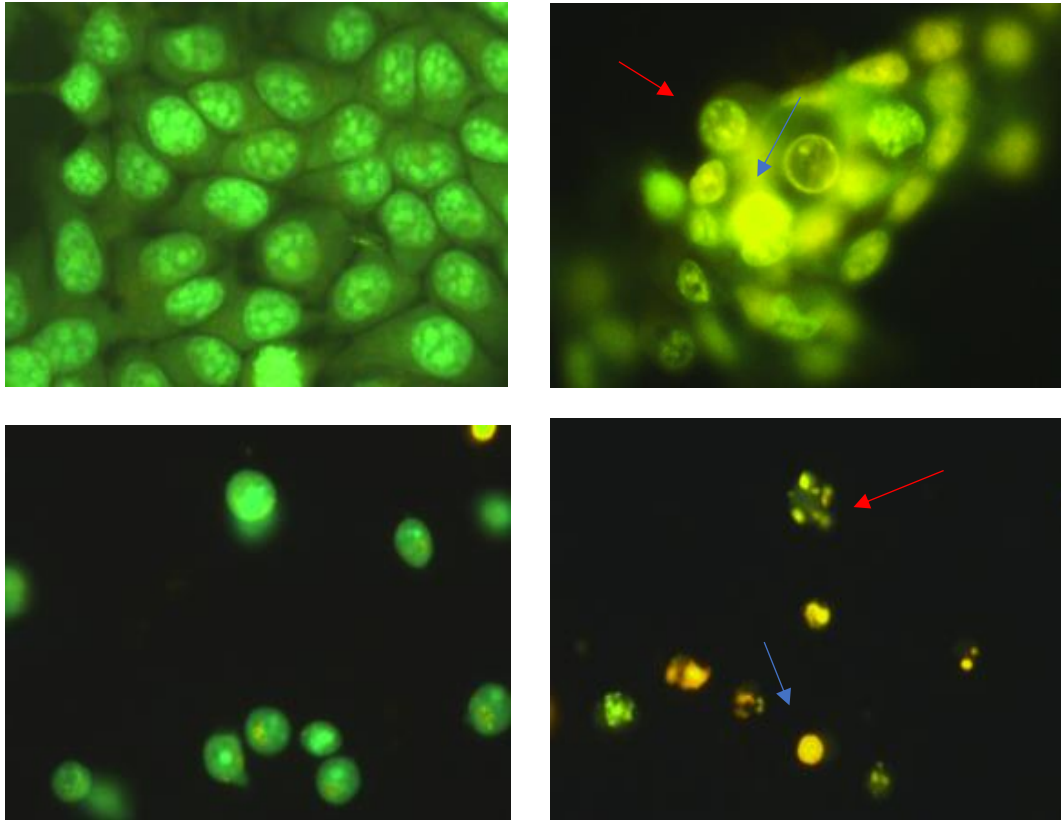
Để tiến hành các bước tiếp theo, cần nhìn tổng quát dựa trên các tiêu chí: cao chiết được coi là có hoạt tính gây độc tế bào cao đối với tế bào *in vitro* với $\text{IC}_{50} \leq 20$ $\mu\text{g/mL}$ (được xem là cao chiết có hoạt tính cao và có tiềm năng làm nguyên liệu chế tạo thuốc kháng ung thư); $\text{IC}_{50} = 21 - 200$ $\mu\text{g/ml}$ (hoạt độ trung bình), $\text{IC}_{50} = 201 - 500$ $\mu\text{g/ml}$ (hoạt độ yếu), và $\text{IC}_{50} > 501$ $\mu\text{g/ml}$ (không có hoạt tính) theo tiêu chuẩn của Viện ung thư quốc gia Hoa Kỳ (NCI) [70]. Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one (ergone) có IC_{50} gây độc hai dòng tế bào MCF-7 và Jurkat T lần lượt là $17,24 \pm 1,31$ và $39,30 \pm 1,53$ $\mu\text{g/mL}$ được chọn để tiếp tục khảo sát đặc tính và khả năng cảm ứng apoptosis trên hai dòng tế bào ung thư tế bào MCF-7 và Jurkat T.

3.6. Kết quả khả năng cảm ứng apoptosis tế bào ung thư MCF-7 và Jurkat T của ergone

Apoptosis là sự chết theo chu trình của tế bào, nhằm đáp ứng các tín hiệu phát triển hoặc loại bỏ của tế bào, giúp đảm bảo kích thước và hình dạng của các mô, cơ quan và loại bỏ các tế bào bị hư hỏng hoặc bị nhiễm bệnh mà không gây viêm nhiễm,

ảnh hưởng tới mô và cơ quan khác trong cơ thể. Việc cảm ứng quá trình apoptosis của tế bào ung thư là một giải pháp tiềm năng để điều trị bệnh ung thư.

3.6.1. Hình thái tế bào MCF-7 và Jurkat T sau khi nhuộm với AO/EB



Hình 3.16. Hình thái tế bào MCF-7 và Jurkat khi xử lý với ergone

A: Tế bào MCF-7 đối chứng **B:** Tế bào MCF-7 xử lý ergone

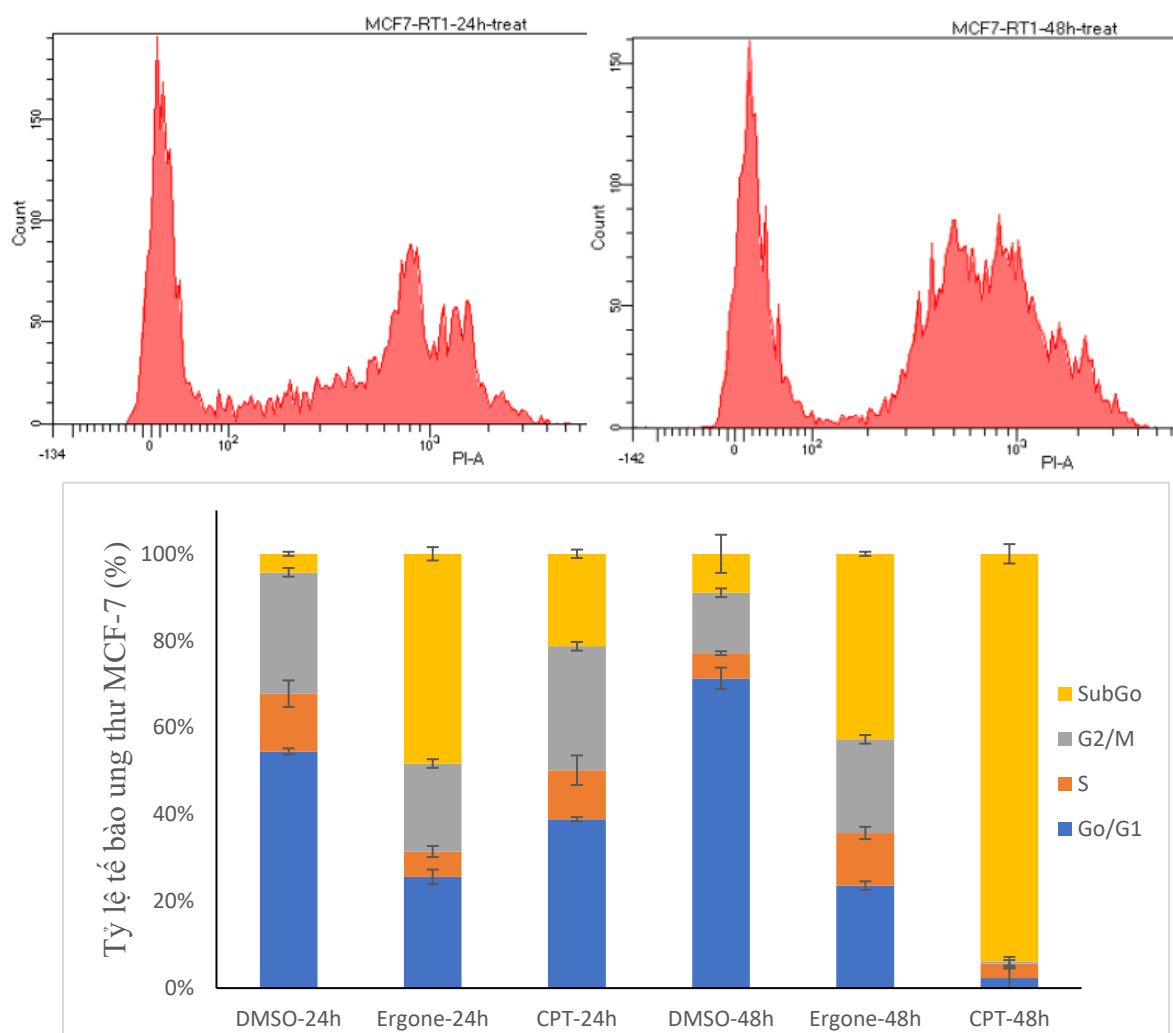
C: tế bào Jurkat đối chứng **D:** Tế bào Jurkat xử lý ergone

➡ : Tế bào nhân cô đặc ➡ : Tế bào có nhân bị phân mảnh

Hình thái tế bào ung thư Jurkat T và MCF-7 được xử lý với chất ergone đối chứng thể hiện ở hình 3.16. Kết quả cho thấy ở lô tế bào ung thư Jurkat T xử lý với chất ergone, nhân tế bào bắt đầu co lại, nhiễm sắc chất cô đặc với màu xanh sáng đặc trưng của tế bào ở giai đoạn apoptosis sớm. Nhiều tế bào có màu vàng cam do màng tế bào bị tổn thương, xuất hiện hiện tượng nhân phân mảnh và các thể apoptosis có thể quan sát rõ chứng tỏ tế bào đã vào giai đoạn apoptosis muộn. Bên cạnh đó có những tế bào màu đậm, nhân không phân mảnh chứng tỏ tế bào có bị hoại tử. Còn ở mẫu tế bào đối chứng, tế bào

có hình thái bình thường, bắt thuốc nhuộm màu xanh trái đều, nhân to thể hiện không cảm ứng apoptosis. Ở lô tế bào ung thư MCF-7 xử lý với chất ergone, có hiện tượng apoptosis sớm (nhiễm sắc chất cô đặc, tế bào có màu xanh sáng) và hiện tượng apoptosis muộn (tế bào có màu vàng cam, xuất hiện hiện tượng nhân phân mảnh và các thể apoptosis). Còn ở mẫu tế bào đối chứng, tế bào có hình thái bình thường, thuốc nhuộm màu xanh trái đều, nhân to không cảm ứng apoptosis.

3.6.2. Phân tích Chu kỳ tế bào bằng phương pháp flow cytometry



Hình 3.17. Tỷ lệ tế bào MCF-7 tại các pha của Chu kỳ tế bào sau xử lý ergone từ cao PE từ sinh khối *C. neovolkiana* DL0004

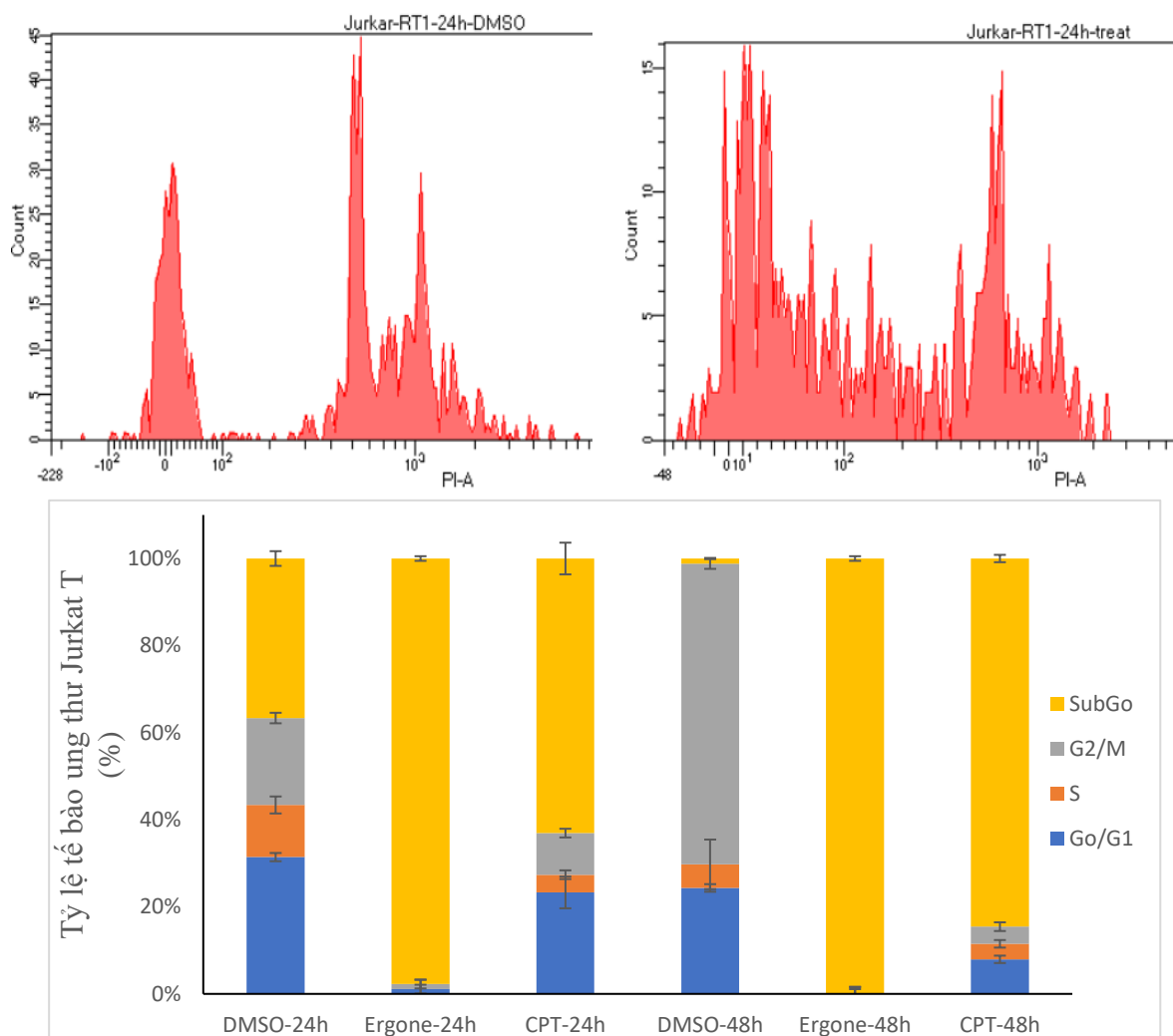
Đối với dòng tế bào MCF-7, hình 3.17 cho thấy, sau 24 giờ xử lý, quần thể tế bào MCF-7 chủ yếu ở pha sub-G₀ ($44,02 \pm 2,00\%$). Bên cạnh đó, các pha

G₀/G₁ pha S và pha G₂/M đều giảm lần lượt $28,91 \pm 0,82\%$, $7,43 \pm 0,31\%$ và $7,67 \pm 3,13\%$. Quần thể tế bào MCF-7 ở 48 giờ ghi nhận tỷ lệ tế bào ở pha sub-G₀ tăng $33,75 \pm 4,87\%$, điều này chứng tỏ ergone có khả năng gây apoptosis tế bào MCF-7 ở thời điểm 24 giờ và 48 giờ không tăng theo thời gian.

Đối với tế bào Jurkat T, Kết quả phân tích bằng flow cytometry cho thấy quần thể tế bào ung thư Jurkat T khi xử lý với ergone, tỷ lệ tế bào pha sub-G₀ sau 24 giờ xử lý tăng $63,28 \pm 1,12\%$ so với đối chứng. Trong khi đó, các pha G₀/G₁, pha S và pha G₂/M đều giảm tương ứng $31,32 \pm 0,49\%$, $12,01 \pm 4,21\%$ và $19,94 \pm 2,60\%$. Sau quá trình dừng phân bào, tế bào đã khởi phát con đường apoptosis, DNA bị phân cắt đặc hiệu, làm tỷ lệ tế bào ở sub-G₀ tăng mạnh, tỷ lệ tế bào ở pha G₀/G₁ giảm. Kết hợp với kết quả phân tích kiểu hình bằng phương pháp nhuộm kép AO/EB và kết quả định lượng tế bào apoptosis bằng thuốc nhuộm Annexin V/PI cho thấy chất ergone có khả năng cảm ứng kháng phân bào trên dòng tế bào ung thư Jurkat T bằng cách bắt giữ Chu kỳ tế bào ở pha G₁, tại điểm G₀/G₁ và hệ quả là cảm ứng apoptosis.

Wang và cộng sự (2020) đã chiết xuất ergosta-4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-one (ergone) từ *Leucocalocybe mongolica* từ cao chiết PE (cao chiết phân đoạn từ cao Et) và khảo sát khả năng cảm ứng apoptosis trên dòng tế bào HepG2, MCF-7, HeLa, A549 và chuột mang khối u H22. Kết quả cho thấy ergone có khả năng cảm ứng apoptosis ($32,68 \pm 1,65\%$) trên dòng tế bào HepG2 và ức chế hình thành mạch máu đối với chuột mang khối u tế bào H22 bằng cách cảm ứng tăng IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF- α và làm giảm VEGF trong máu phụ thuộc vào liều lượng so với nhóm đối chứng [115]. Fernando và cộng sự (2016), đã chiết tách được ergosta-4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-one từ cao chiết MeOH từ *Fulviformes fastuosus* thu nhận tại Sri Lanka và khảo sát hoạt tính gây độc tế bào và phân tích kiểu hình tế bào apoptosis bằng phương pháp nhuộm kép AO/EB trên 3 dòng tế bào HepG2, Muscle rhabdomyosarcoma (RD) và Rat Wistar. Ở nồng độ 5 mM, hiện tượng chủ yếu xảy ra là nhiễm sắc chất ngưng tụ, hạt nhân bị phân mảnh, xuất hiện các thể apoptosis và số lượng tế bào apoptosis tăng dần theo liều [116]. Như vậy ergone có tiềm năng gây kháng phân bào bằng cách cảm ứng apoptosis ở nhiều dòng tế bào ung thư

khác nhau. Ở các dòng tế bào ung thư khác nhau, apoptosis được cảm ứng qua các cơ chế khác nhau.

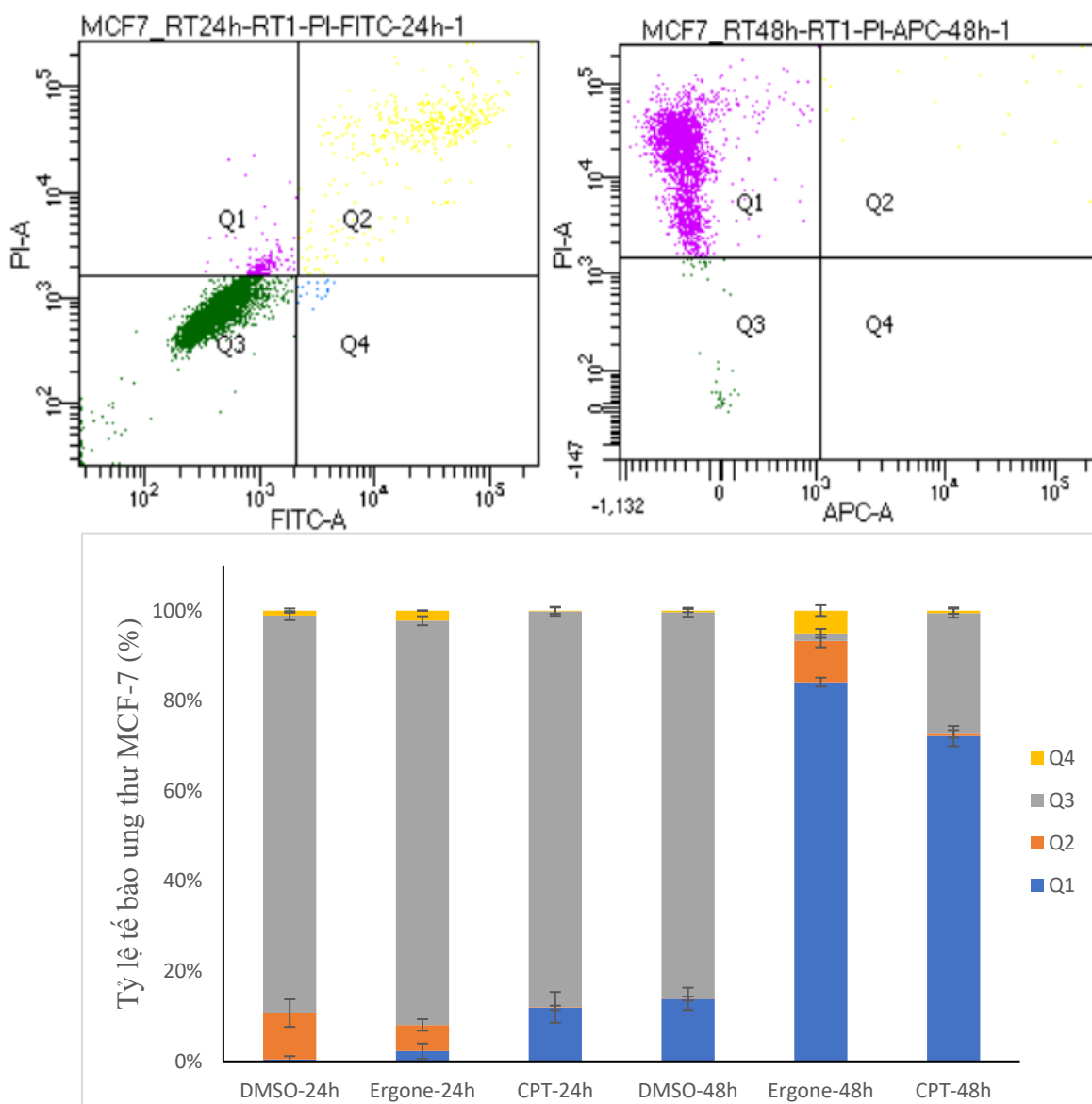


Hình 3.18. Tỷ lệ tế bào Jurkat T tại các pha của Chu kỳ tế bào sau xử lý ergone từ cao PE từ sinh khối *C. neovolkiana* DL0004

3.6.3. Định lượng tế bào bị cảm ứng apoptosis bằng phương pháp nhuộm Annexin V/PI

Dựa vào kết quả hình 3.19 cho thấy, sau 24 giờ xử lý với ergone, tỷ lệ tế bào ung thư MCF-7 cảm ứng apoptosis sớm và apoptosis muộn không đáng kể. Sau 48 giờ xử lý, phần trăm tế bào chết tăng mạnh, đạt $83,25 \pm 2,29\%$. Tỷ lệ tế bào cảm ứng apoptosis sớm và apoptosis muộn không có sự khác biệt

đáng kể. Từ kết quả trên nhận thấy, ergone có khả năng cảm ứng apoptosis đối với dòng tế bào ung thư MCF-7 ở nồng độ IC₅₀ (17,24 µg/mL).

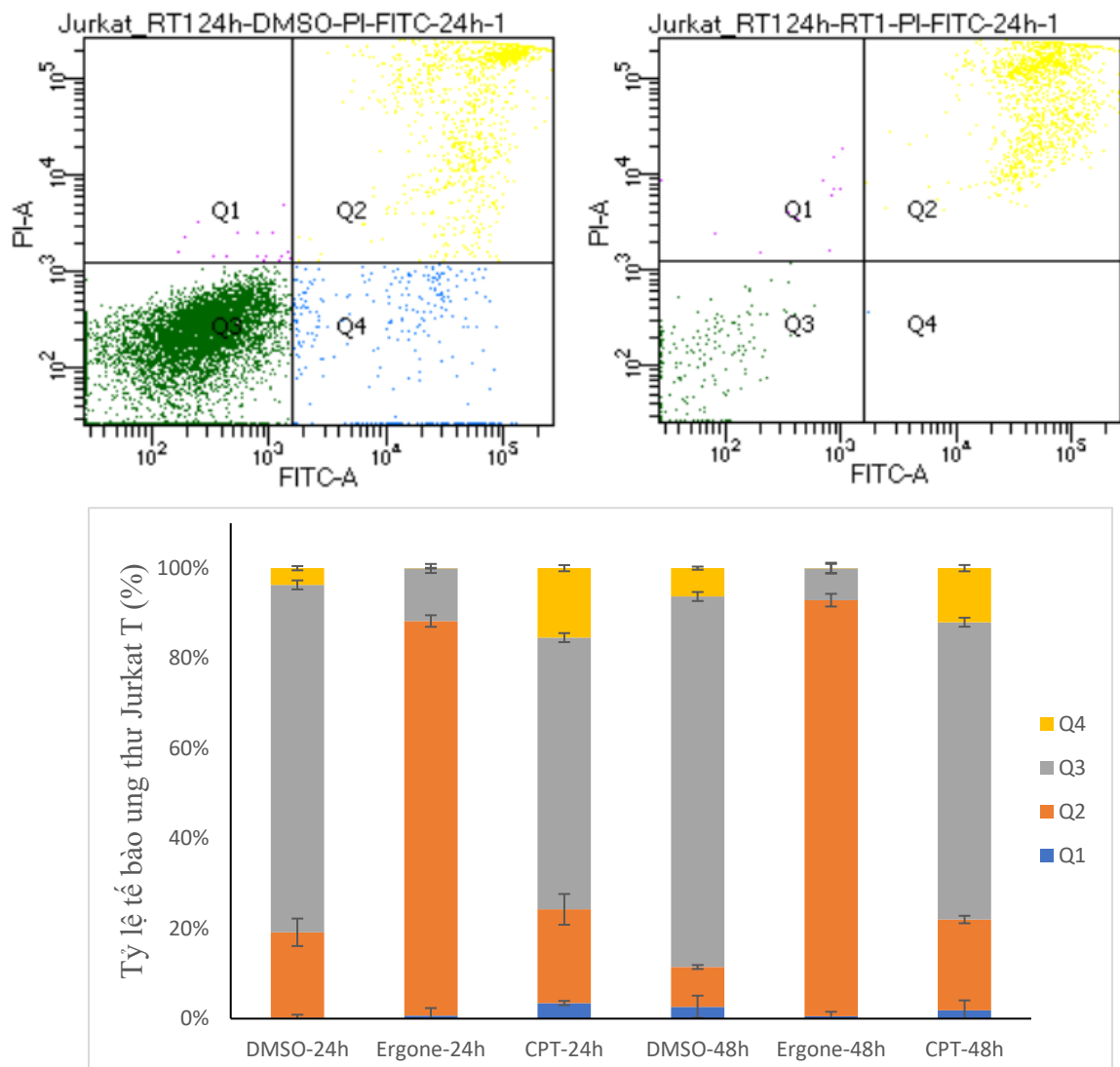


Hình 3.19. Tỷ lệ tế bào MCF-7 cảm ứng apoptosis bởi ergone

từ cao PE của sinh khối *C. neovolkiana* DL0004

Đối với tế bào Jurkat T, để định lượng tế bào apoptosis, quần thể tế bào ung thư Jurkat T được nhuộm Annexin V/PI và phân tích bằng flow cytometry ở mốc thời gian là 24 giờ. Dựa vào kết quả hình 3.20 cho thấy, 24 giờ sau khi xử lý tế bào với ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one, tỷ lệ tế bào ở giai đoạn apoptosis muộn tăng $68,62 \pm 3,87\%$ so với đối chứng; tỷ lệ tế bào ở giai đoạn apoptosis sớm không đáng kể. Tỷ lệ tế bào sống giảm $65,47 \pm 3,98\%$. Từ kết

quả trên nhận thấy, ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one có khả năng cảm ứng apoptosis mạnh ở dòng tế bào ung thư Jurkat T ở nồng độ IC_{50} (39,30 $\mu\text{g/mL}$).



Hình 3.20. Tỷ lệ tế bào Jurkat T cảm ứng apoptosis bởi ergone từ cao PE của sinh khối *C. neovolkiana* DL0004

Zhao và cộng sự (2011) đã chứng minh Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one chiết xuất từ *Polyporus umbellatus* có khả năng bắt giữ chu kỳ tế bào tại pha G_2/M bằng cách cảm ứng apoptosis trên dòng tế bào HepG2 phụ thuộc caspase. Giá trị IC_{50} thu được bằng phương pháp MTT lần lượt ở các mốc thời gian 6 giờ, 12 giờ và 24 giờ là $15,6 \pm 2,30$; $11,8 \pm 2,9$ và $10,0 \pm 2,4$ $\mu\text{g/mL}$.

Sau khi xử lý với ergone, nhiễm sắc chất ngưng tụ, hạt nhân bị phân mảnh và phosphatidylserin được biểu hiện trên màng [88].

Từ những kết quả thu nhận được có thể khẳng định hợp chất ergone được cô lập từ cao EA từ quả thể chủng nấm *C. neovolkiana* DL0004 phân lập và nuôi cấy nhân tạo tại Việt Nam có khả năng kháng phân bào và cảm ứng apoptosis đối với hai dòng tế bào ung thư Jurkat T và MCF-7 bằng cách dừng chu kỳ tế bào tại pha G₀/G₁.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Kết luận

Xác định được 03 loại cao chiết có hoạt tính gây độc tế bào cao, bao gồm: cao EA từ sinh khối *C. neovolkiana* DL0004 ức chế tế bào MCF-7 và Jurkat T tương ứng các giá trị IC_{50} lần lượt là $78,13 \pm 3,27$ và $35,68 \pm 0,29$ $\mu\text{g/mL}$; cao PE từ sinh khối *C. neovolkiana* DL0004 ức chế tế bào MCF-7 và Jurkat T tương ứng các giá trị IC_{50} lần lượt là $26,94 \pm 1,62$ và $15,50 \pm 0,19$ $\mu\text{g/mL}$; cao EA từ quả thể *I. cicadae* F0004 ức chế tế bào MCF-7 và Jurkat T tương ứng các giá trị IC_{50} lần lượt là $17,15 \pm 1,68$ $\mu\text{g/mL}$ và $10,37 \pm 0,61$ $\mu\text{g/mL}$;

Cao chiết PE từ sinh khối *C. neovolkiana* DL0004 và cao chiết EA từ quả thể *I. cicadae* F0004 có khả năng cảm ứng apoptosis hai dòng tế bào ung thư MCF-7 và Jurkat T;

Đã cô lập và định danh được 11 hợp chất từ 02 cao có hoạt tính kháng phân bào cao, bao gồm: 05 hợp chất từ cao PE từ sinh khối *C. neovolkiana* DL0004 (ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one, ergosterol peroxid, cerevisterol, melithasterol B và ergosterol) và 06 hợp chất từ cao EA từ quả thể của *I. cicadae* F0004 (uracil; 1-*O*-ethyl- β -D-ribofuranose; ergosterol; p-hydroxybenzoic acid; protocatechuic acid và nicotinic acid). Trong đó, 1-*O*-Ethyl- β -D-ribofuranose; p-hydroxybenzoic acid và protocatechuic acid là 03 chất lần đầu tiên được công bố trên đối tượng *I. cicadae*.

Ergone từ cao PE của sinh khối *C. neovolkiana* DL0004 có tiềm năng kháng phân bào cao và có khả năng cảm ứng apoptosis hai dòng tế bào ung thư MCF-7 và Jurkat T.

Kiến nghị

Khảo sát hoạt tính kháng phân bào của các cao chiết từ sinh khối và từ quả thể 02 chủng nấm trên các dòng tế bào ung thư khác.

Cô lập và định danh thêm các hợp chất từ các cao phân đoạn.

Nghiên cứu xác định cơ chế kháng phân bào trên tế bào, gen và biểu hiện protein của cao chiết và hợp chất thể hiện hoạt tính kháng phân bào tiềm năng trên các dòng tế bào ung thư.

Thử nghiệm khả năng ức chế ung thư của các cao chiết và hợp chất trên mô hình động vật.

Nghiên cứu đánh giá độc tính của các hợp chất tiềm năng trên dòng tế bào thường, nghiên cứu đánh giá độc tính cấp trên chuột trước khi có nghiên cứu sâu hơn hoặc mở rộng đối tượng dòng tế bào ung thư khác.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ

Các bài báo đăng trên các tạp chí khoa học trong nước

1. Doan Minh Quan, **Nguyen Chi Dung**, Dinh Minh Hiep (2015), *Extraction of ergosterol and characterization of anti-mitotic activity of petroleum-ether extracts from biomass of Cordyceps spp. isolated in Vietnam*, Tạp chí Khoa học và Công nghệ (ISSN 0866-708X), Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, tập 53, số 6B, trang 97-104
2. **Chi-Dung Nguyen**, Thu Huynh, Minh-Hiep Dinh (2017), *Screening for some biological activities of cultured Cordyceps neovolkiana*, Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ (ISSN 1859-0128), Đại học Quốc gia TP.HCM, tập 20, số K3, trang 106-112
3. **Nguyen Chi Dung**, Pham Thi My Ninh, Dinh Minh Hiep (2018), *A comparison of the cytotoxic activity of extracts from fruiting bodies and mycelial biomass of Cordyceps neovolkiana (DL004) fungus*, Vietnam Journal of Science and Technology (ISSN 2525-2518), Vietnam Academy of Science and Technology, 56(4A):53-60

Các bài báo đăng trên các tạp chí khoa học quốc tế

1. **Chi-Dung Nguyen**, Thi-My-Ninh Pham, Thi-Bich-Hang Ha, Thi-Phuong Nguyen, Huu-Hung Nguyen, Hoang-Vinh-Truong Phan, Thuc-Huy Duong, Minh-Hiep Dinh (2021), *Chemical constituents of Cordyceps neovolkiana DL0004*, Chemistry of Natural Compounds (ISSN 0009-3130), 57(2):392-394 (DOI: 10.1007/s10600-021-03369-z).
2. **Nguyen Chi Dung**, Ha Thi Ngoc, Pham Thi My Ninh, Dang Hoang Phu, Dinh Minh Hiep, Ngo Ke Suong (2021), *Studying on cytotoxic activity of ethyl acetate extracts and isolated substances from cultured Isaria cicadae F0004 in Vietnam against the MCF-7 cell lines and Jurkat cell lines*, IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. 947 012037 (ISSN 1755-1315), doi:10.1088/1755-1315/947/1/012037.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] H. Min, et al., *Natural Products in Cancer Therapy: Past, Present and Future*, Natural Products and Bioprospecting, 2021, 11, 5–13.
- [2] O. Opeyemi Joshua, et al., *The genus Cordyceps: An extensive review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology*, Fitoterapia, 2018, 129, 293-316.
- [3] Z. Xiaofeng, et al., *Secondary metabolites (SMs) of Isaria cicadae and Isaria tenuipes*, RSC advances, 2019, 9(1), 172-184.
- [4] H. John, et al., *Medicinal value of the caterpillar fungi species of the genus Cordyceps (Fr.) Link (Ascomycetes). A review*, International journal of medicinal mushrooms, 2008, 10 (3), 219-234.
- [5] K. Kandikattu, et al., *Evaluation of anti-inflammatory activity of canthium parviflorum by in-vitro method*, Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology, 2013, 1 (5), 729 - 730.
- [6] Y. Rongmin, et al., *Structural characterization and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of cultured Cordyceps militaris*, Carbohydrate Polymers, 2007, 70 (4), 430-436.
- [7] S. Gi-Ho, et al., *Phylogenetic classification of Cordyceps and the clavicipitaceous fungi*, Studies in mycology, 2007, 57, 5-59.
- [8] Đỗ Thị Thiên Lý, Phạm Nữ Kim Hoàng, Phan Hữu Hùng and Nguyễn Viết Trường, *Bước đầu nghiên cứu chi nấm Isaria tại núi Langbiang thuộc cao nguyên Lâm Viên*, Hội nghị khoa học toàn quốc về sinh thái và tài nguyên sinh vật lần thứ 6, 2015, Hà Nội.
- [9] S. Bhushan, *Diversity of Cordyceps fungi in Nepal*, Nepal Journal of Science and Technology, 2011, 12, 103-110.
- [10] Y. Kobayasi, et al., *Monograph of the genus Torribiella*, Bulletin of the National Science Museum, Tokyo, Ser. B. 8: 43–78.
- [11] Lê Thùy Liên, Phạm Nữ Kim Hoàng, Đỗ Thị Thiên Lý, Lê Huyền Ái Thúy,

- Đình Minh Hiệp, Trương Bình Nguyên, *Phát hiện loài nấm ký sinh côn trùng Cordyceps neovolkiana tại núi Langbiang - Đà Lạt, Việt Nam*. Tạp chí Công nghệ sinh học, 2010, 8 (3A), 1007-1013.
- [12] Lê Huyền Ái Thúy, Đình Minh Hiệp, Trương Bình Nguyên, Lao Đức Thuận, Trương Kim Phượng, Đỗ Ngọc Nam, *Xây dựng phương pháp luận nghiên cứu hỗ trợ định danh nấm ký sinh côn trùng bằng phân tích phá hệ phân tử vùng ITS1-5.8S-ITS2*, Tạp chí Khoa học Trường Đại học Mở TP.HCM, 2014, 1 (40), 3-13.
- [13] L. Ling, et al., *Potential therapeutic effects of Cordyceps cicadae and Paecilomyces cicadae on adenine-induced chronic renal failure in rats and their phytochemical analysis*, Drug Design, Development and Therapy, 2018, 19 (13), 103-117.
- [14] L. Yuzhen, et al., *Omics data reveal the unusual asexual-fruited nature and secondary metabolic potentials of the medicinal fungus Cordyceps cicadae*, BMC genomics, 2017, 18(1), 1-15.
- [15] A. Mi-Young, et al., *Antioxidant activity of N-hydroxyethyl adenosine from Isaria sinclairii*, International Journal of Industrial Entomology, 2008, 17(2), 197-200.
- [16] S. Yan-Fan, et al., *Isaria cicadae conidia possess antiproliferative and inducing apoptosis properties in gynaecological carcinoma cells*, Mycology, 2017, 8 (4), 327-334.
- [17] Z. Yiling, et al., *Antioxidant and anti-aging activities of polysaccharides from Cordyceps cicadae*, International journal of biological macromolecules, 2020, 157, 394-400.
- [18] R. Xueyong, et al., *Optimization of the solid-state fermentation and properties of a polysaccharide from Paecilomyces cicadae (Miquel) Samson and its antioxidant activities in vitro*, PLoS One, 2014, 9 (2), 1-12.

- [19] D. Caiong, et al., *Application of Box-Behnken design in optimisation for polysaccharides extraction from cultured mycelium of Cordyceps sinensis*. Food and bioproducts processing, 2009, 87 (2), 139-144.
- [20] C. Li, et al., *Fruiting body production of the medicinal Chinese caterpillar mushroom, Ophiocordyceps sinensis (Ascomycetes), in artificial medium*, International journal of medicinal mushrooms, 2015, 17 (11), 1107-1112.
- [21] F. Shin Yee, et al., *Safety assessment of cultivated fruiting body of Ophiocordyceps sinensis evaluated through subacute toxicity in rats*, Journal of Ethnopharmacology, 2017, 206, 236-244.
- [22] K. Y. Fei, et al., *Isolation, culture and characterization of Hirsutella sinensis mycelium from caterpillar fungus fruiting body*, 2017, PloS one, 12(1), 1 -21.
- [23] Y. Kai, et al., *The artificial cultivation of medicinal caterpillar fungus, Ophiocordyceps sinensis (Ascomycetes): a review*, International journal of medicinal mushrooms, 2013, 15(5), 425 - 434.
- [24] Lê Tấn Hưng, Võ Thị Hạnh, Lê Thị Bích Phượng, Trần Thanh Phong, Trương Thị Hồng Vân, Somsak Sivichai, *Nấm côn trùng tại vườn Quốc Gia Cát Tiên: Nguồn tài nguyên quý cho các ứng dụng sinh học*. Hội nghị Khoa học kỷ niệm 35 năm Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 2010, Hà Nội.
- [25] Phạm Quang Thu, *Nghiên cứu xây dựng quy trình nuôi trồng nấm Đông trùng hạ thảo Cordyceps militaris (L.: Fr.) Link có giá trị dược liệu và thương mại cao*, Báo cáo nghiệm thu thuộc Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam, 2009, Hà Nội.
- [26] Trương Bình Nguyên và Đinh Minh Hiệp, *Nghiên cứu quy trình nuôi cấy sinh khối hệ sợi và khảo sát một số hoạt tính sinh học của các cao chiết từ sinh khối nấm Đông trùng hạ thảo (Cordyceps sinensis)*, Báo cáo nghiệm thu đề tài Sở Khoa học và Công nghệ TP.HCM, 2015, Thành phố Hồ Chí Minh.
- [27] W. Jian Yong, *Inhibitory effects of ethyl acetate extract of Cordyceps sinensis mycelium on various cancer cells in culture and B16 melanoma in C57BL/6 mice*, Phytomedicine, 2007, 14(1), 43-49.

- [28] Y. Jinyu, et al., *Effects of exopolysaccharide fraction (EPSF) from a cultivated Cordyceps sinensis fungus on c-Myc, c-Fos, and VEGF expression in B16 melanoma-bearing mice*, Pathology-Research and Practice, 2005, 201(11), 745-750.
- [29] G. Varsha, et al., *Pharmacology and mechanism of action of forodesine, a T-cell targeted agent*, Seminars in oncology, 2007, 34(5), 8 – 12.
- [30] C. Peter Xin, et al., *Properties of Cordyceps Sinensis: A review*, J Funct Foods. 2013, 5(2): 550–569.
- [31] M.G. Shashidhar, et al., *Bioactive principles from Cordyceps sinensis: A potent food supplement – A review*, Journal of Functional Foods, 2013, 5, 1013-1030.
- [32] Y. Junji, et al., *Antitumor activity of an extract of Cordyceps sinensis (Berk.) Sacc. against murine tumor cell lines*, The Japanese journal of experimental medicine, 1989, 59(4), 157-161.
- [33] N. Kazuki, et al., *Combined effects of Cordyceps sinensis and methotrexate on hematogenic lung metastasis in mice*, Receptors and Channels, 2003, 9(5), 329-334.
- [34] X. Ren-he, et al., *Effects of Cordyceps sinensis on natural killer activity and colony formation of B16 melanoma*, Chinese medical journal, 1992, 105(2), 97-101.
- [35] C. Yu-Jen, et al., *Effect of Cordyceps sinensis on the proliferation and differentiation of human leukemic U937 cells*, Life Sciences, 1997, 60(25), 2349-2359.
- [36] C. Jen-Hwey, et al., *Cordyceps sinensis increases the expression of major histocompatibility complex class II antigens on human hepatoma cell line HA22T/VGH cells*, The American journal of Chinese medicine, 1998, 26(02), 159-170.
- [37] K. Takashi, et al., *Effects of two basidiomycete species on interleukin 1 and interleukin 2 production by macrophage and T cell lines*. Immunobiology,

2010, 215 (7), 516-520.

- [38] Y. Taek, et al., *Innate immune stimulation of exo-polymers prepared from Cordyceps sinensis by submerged culture*, Applied microbiology and biotechnology, 2008, 80(6), 1087-1093.
- [39] Z. Qiaoxia, et al., *Induction of HL-60 apoptosis by ethyl acetate extract of Cordyceps sinensis fungal mycelium*, Life sciences, 2004, 75(24) 2911-2919
- [40] C. Yali, et al., *Ecology-based screen identifies new metabolites from a Cordyceps-colonizing fungus as cancer cell proliferation inhibitors and apoptosis inducers*, Cell Proliferation, 2009, 42(6), 838-847.
- [41] Z. Weiyun, et al., *Effects of the exopolysaccharide fraction (EPSF) from a cultivated Cordyceps sinensis on immunocytes of H22 tumor bearing mice*, Fitoterapia, 2008, 79 (3), 168-173.
- [42] W. Bu-er, et al., *Free radical scavenging and apoptotic effects of Cordyceps sinensis fractionated by supercritical carbon dioxide*, Food and Chemical Toxicology, 2005, 43(4), 543-552.
- [43] T. Xiang Ao, et al., *Effect of Cordyceps sinensis extract on Klotho expression and apoptosis in renal tubular epithelial cells induced by angiotensin II*, Journal of Central South University. Medical sciences, 2009, 34(4), 300-307.
- [44] C. Jiaping, et al., *Morphological and genetic characterization of a cultivated Cordyceps sinensis fungus and its polysaccharide component possessing antioxidant property in H22 tumor-bearing mice*, Life Sciences, 2006, 78(23), 2742-2748.
- [45] P. Byung Tae, et al., *Antifungal and anticancer activities of a protein from the mushroom Cordyceps militaris*, The Korean Journal of Physiology & Pharmacology, 2009, 13(1), 49-54.
- [46] P. Cheol, et al., *Growth inhibition of U937 leukemia cells by aqueous extract of Cordyceps militaris through induction of apoptosis*, Oncology reports, 2005, 13(6), 1211-1216.

- [47] L. Haemi, et al., *Induction of apoptosis by Cordyceps militaris through activation of caspase-3 in leukemia HL-60 cells*, Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2006, 29(4), 670-674.
- [48] J. Cheng-Yun, et al., *Induction of apoptosis by aqueous extract of Cordyceps militaris through activation of caspases and inactivation of Akt in human breast cancer MDA-MB-231 Cells*, Journal of microbiology and biotechnology, 2008, 18(12), 1997-2003.
- [49] P. Sang-Eun, *Induction of apoptosis and inhibition of telomerase activity in human lung carcinoma cells by the water extract of Cordyceps militaris*, Food and Chemical Toxicology, 2009, 47(7), 1667-1675.
- [50] O. Jung Young, et al., *Apoptosis of human hepatocarcinoma (HepG2) and neuroblastoma (SKN-SH) cells induced by polysaccharides-peptide complexes produced by submerged mycelial culture of an entomopathogenic fungus Cordyceps sphecocephala*, Journal of microbiology and biotechnology, 2008, 18 (3), 512-519.
- [51] Y. Haruki, et al., *Structure and antitumor activity of an alkali-soluble polysaccharide from Cordyceps ophioglossoides*, Carbohydrate research, 1984, 125 (1), 107-115.
- [52] O. Tsukasa, et al., *Antitumor activity of protein-bound polysaccharide from Cordyceps ophioglossoides in mice*. Japanese journal of cancer research: Gann, 1986, 77 (12), 1256-1263.
- [53] O. Tsukasa, et al., *Isolation of galactosaminoglycan moiety (CO-N) from protein-bound polysaccharide of Cordyceps ophioglossoides and its effects against murine tumors*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1989, 37 (4), 1019-1022.
- [54] L. Sung Hak, et al., *Production of polysaccharides by submerged mycelial culture of entomopathogenic fungus Cordyceps takaomontana and their apoptotic effects on human neuroblastoma cells*. Korean journal of chemical engineering, 2009, 26 (4), 1075-1083.

- [55] C. Sangeetha, et al., *Identification of 3'-deoxyadenosine (Cordycepin) from the medicinal mushrooms, Ophiocordyceps spp.*, International Journal of Chemical Studies 2017, 5(3), 788-792.
- [56] X. Hongqing, et al., *Ethanol extract of Cordyceps cicadae exerts antitumor effect on human gastric cancer SGC-7901 cells by inducing apoptosis, cell cycle arrest and endoplasmic reticulum stress*, Journal of ethnopharmacology, 2019, 231, 230-240.
- [57] M. Mina, et al., *Production of cordycepin by surface culture using the medicinal mushroom Cordyceps militaris*, Enzyme and Microbial Technology, 2006, 39, 641-646.
- [58] W. Ting-chi, et al., *Optimization of Solid-state Fermentation for Fruiting Body Growth and Cordycepin Production by Cordyceps militaris*, Chiang Mai Journal Science, 2014, 41(4), 858-872.
- [59] Nguyễn Kim Phi Phụng, *Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ*, NXB Đại học Quốc gia TP, Hồ Chí Minh, 2007, 80 -147.
- [60] T.P. Konstantinos, et al., *Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay*, Journal of immunological methods, 1997, 208 (2), 151-158.
- [61] Nguyen My Nuong, et al., *Nam Dia long, a Vietnamese folk formula, induces apoptosis in MCF-7 cells through various mechanisms of action*, BMC Complementary and Alternative Medicine, 2017, 17 (1), 522
- [62] P. Jae Gwang, et al., *Anticancer Efficacy of Cordyceps militaris Ethanol Extract in a Xenografted Leukemia Model*, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2017, Korea.
- [63] Z. Juanjuan, et al., *Procoagulant constituents from Cordyceps militaris*, Food Science and Human Wellness, 2018, 7 (4), 282-286.
- [64] S. Sapan Kurma, et al., *Optimized extraction, composition, antioxidant and antimicrobial activities of exo and intracellular polysaccharides from submerged culture of Cordyceps cicadae*. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2016, 15, 446.

- [65] . S. Lu, et al., *An exopolysaccharide from cultivated Cordyceps sinensis and its effects on cytokine expressions of immunocytes*, Applied Biochemistry and Biotechnology, 2011, 163 (5), 669-678.
- [66] Z. Xuanwei, et al., *Cordyceps fungi: natural products, pharmacological functions and developmental products*, Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2009, 61 (3), 279-291.
- [67] L. Xiaoli, et al, *Composition and antitumor activity of the mycelia and fruiting bodies of Cordyceps militaris*, Journal of Food and Nutrition Research, 2014, 2, 74-79
- [68] N.C. Dung, et al., *A comparison of the cytotoxic activity of extracts from artificial fruiting bodies and mycelial biomass of fungus Cordyceps takaomontana DL0038A*, Journal of Biology, 2018, 40 (2), 17-22.
- [69] N.C. Dung, et al., *A comparison of the cytotoxic activity of extracts from fruiting bodies and mycelial biomass of Cordyceps neovolkiana (DL004) fungus*, Vietnam Journal of Science and Technology, 2018, 56 (4A) 53-60.
- [70] S. Theera, et al., *Phytochemical Screening and Cytotoxicity of Crude Extracts of Vatica diospyroides Symington Type LS*, Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2013, 12 (1), 71-76.
- [71] Lê Huyền Ái Thúy, Đinh Minh Hiệp, Trương Bình Nguyên, Lao Đức Thuận, Trương Kim Phượng, Đỗ Ngọc Nam, *Xây dựng phương pháp luận nghiên cứu hỗ trợ định danh nấm ký sinh côn trùng bằng phân tích phổ hệ phân tử vùng ITS1-5.8S-ITS2*, Tạp chí Khoa học Trường Đại học Mở TP.HCM, 2014, 1 (40), 3-13.
- [72] Z. Shu-Wei, et al., *Cyclopentenone and furan derivative from the mycelia of Cordyceps cicadae*, The Journal of antibiotics, 2008, 61 (1), 43-45.
- [73] Y. Ning-Ning, et al, *Chemical study of the strain Cordyceps spp. from cell fusion between Cordyceps militaris and Cordyceps cicadae*, Journal of Asian natural products research, 2019, 21 (5), 449-455.
- [74] X. Jiao, et al., *Cordyceps cicadae polysaccharides inhibit human cervical*

cancer HeLa cells proliferation via apoptosis and cell cycle arrest, Food and Chemical Toxicology, 2021, 148.

- [75] X. Zhoufan et al., *Protocatechuic acid inhibits the growth of ovarian cancer cells by inducing apoptosis and autophagy*, Phytotherapy Research, 2018, 32 (11), 2256-2263.
- [76] H. Linfun, et al., *Anticancer action and mechanism of ergosterol peroxide from paecilomyces cicadae fermentation broth*, International journal of molecular sciences, 2018, 19 (12).
- [77] Z. Rong, et al., *Ergosterol peroxide from Cordyceps cicadae ameliorates TGF- β 1-induced activation of kidney fibroblasts*, Phytomedicine, 2014, 21 (3), 372-378
- [78] Nguyễn Thanh Thảo (2012), "Khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa, kháng phân bào in vitro của một số cao chiết từ sinh khối hai loài nấm Cordyceps sưu tập tại Đà Lạt", Đại học khoa học tự nhiên thành phố Hồ Chí Minh.
- [79] A.N. Seif-Eldin, et al., *Differential cytotoxic activity of the petroleum ether extract and its furanosesquiterpenoid constituents from Commiphora molmol resin*, Zeitschrift für Naturforschung, 2015, 70, (3-4), 2015, 87-92.
- [80] Z. Yanhua, et al., *Compositions and Anti-Tumor Activity of Pyropolyporus fomentarius Petroleum Ether Fraction In Vitro and In Vivo*, PLoS One, 2014, 9(10), 1 - 11.
- [81] K. Ho Gyoung et al., *Cordyceps pruinosa extracts induce apoptosis of HeLa cells by a caspase dependent pathway*, Journal of Ethnopharmacology, 2010, 128, 2, 342-351.
- [82] Q. Xingguo, et al., *Cordyceps militaris Induces Immunogenic Cell Death and Enhances Antitumor Immunogenic Response in Breast Cancer*, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2020, 20, 1-11.
- [83] Nguyen Chi-Dung, et al., *Chemical Constituents of Cordyceps neovolkiana DL0004*, Chemistry of Natural Compounds, 2021, 57, 392–394.
- [84] K. B. Stuart, et al., *Cicadapeptins I and II: new Aib-containing peptides from*

- the entomopathogenic fungus Cordyceps heteropoda*, Journal of Natural Products, 2005, 68, 50–55.
- [85] Dang Ngoc Quang, Dang Dinh Bach, *Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one from Vietnamese Xylaria sp. possessing inhibitory activity of nitric oxide production*, Natural Product Research, 2008, 22 (10), 901-906.
- [86] Z. Ying-Yong, et al., *Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one isolated from Polyporus umbellatus prevents early renal injury in aristolochic acid-induced nephropathy rats*, Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2011, 63 (12), 1581–1586.
- [87] H. Kneifel, et al., *Ophiocordin, an antifungal antibiotic of Cordyceps ophioglossoides*, Archives of Microbiology, 1977, 113 (1–2), 121-30.
- [88] Z. Ying-Yong, et al., *Ergosta-4, 6, 8 (14), 22-tetraen-3-one induces G₂/M cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells*, Biochimica et Biophysica Acta, 2011, 1810 (4), 384-390.
- [89] Z. Ying-Yong, et al., *Effect of ergosta-4, 6, 8 (14), 22-tetraen-3-one (ergone) on adenine-induced chronic renal failure rat: a serum metabonomic study based on ultra performance liquid chromatography/high-sensitivity mass spectrometry coupled with MassLynx i-FIT algorithm*, Clinica chimica acta, 2012, 413 (19-20), 1438-1445
- [90] T. Toshiyuki, et al., *Ergosterol peroxide, an apoptosis-inducing component isolated from Sarcodon aspratus (Berk.) S. Ito*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 2005, 69(1), 212-215.
- [91] G. Mano, et al., *Effect of marine basidiomycetes fulvifomes sp.-derived ergosterol peroxide on cytotoxicity and apoptosis induction in MCF-7 Cell Line*, Journal of Fungi, 2019, 5 (16), 1-12
- [92] H. Aminul, *Isolation of Bioactive Secondary Metabolites from the Endophytic Fungus of Ocimum basilicum*. Pharmaceutical Sciences., 2005, 4 (2), 127.
- [93] A. Theresa, et al., *Antimicrobial and Resistance Modifying Activities of Cerevisterol Isolated from Trametes Species*, Current Bioactive Compounds,

2020, 16 (2), 115-123.

- [94] Y. Jian-Min, et al., *Sterols from the fungus Lactarium volemus*, *Phytochemistry*, 2001, 56 (8), 801-806.
- [95] A. Ran, et al., *Isolation, purification and identification of biological compounds from Beauveria sp. and their evaluation as insecticidal effectiveness against Bemisia tabaci*, *Scientific reports*, 2021, 11(1), 1-11.
- [96] H. Siegfried, et al., *Identification of Lichen Substance*, Springer, 1997, 391, Berlin.
- [97] M. Misgiati, et al., *Ergosterol Isolated from Agaricus blazei Murill N-Hexane Extracts as Potential Anticancer MCF-7 Activity*, *Pharmacognosy Journal*, 2021 13(2), 418-426.
- [98] L. Xiangmin, et al., *Ergosterol purified from medicinal mushroom Amauroderma rude inhibits cancer growth in vitro and in vivo by up-regulating multiple tumor suppressors*, *Oncotarget*, 2015, 6(19), 17832-17846.
- [99] Ngô Hải Đăng, cs., *khảo sát thành phần hóa học của trái khổ qua (momordica charantia l.)*, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 2011, 19a, 53-59.
- [100] P. Aleksandra, et al., *In search of uracil derivatives as bioactive agents. Uracils and fused uracils: Synthesis, biological activity and applications*, *European journal of medicinal chemistry*, 2015, 97, 582-61.
- [101] I. Natsumi, et al, *Synthesis of small interfering RNAs containing acetal-type nucleoside analogs at their 3'-ends and analysis of their silencing activity and their ability to bind to the Argonaute2 PAZ domain*, *European journal of medicinal chemistry*, 2015, 103, 460-472.
- [102] L.E. Ochuko, et al, *Anti-diabetic effect of the ethyl acetate fraction of Clerodendrum volubile: protocatechuic acid suppresses phagocytic oxidative burst and modulates inflammatory cytokines*, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2017, 86, 307-315.
- [103] W. Xu-Na, et al, *4-Hydroxybenzoic acid (4-HBA) enhances the sensitivity of*

human breast cancer cells to adriamycin as a specific HDAC6 inhibitor by promoting HIPK2/p53 pathway, Biochemical and biophysical research communications, 2018, 504 (4), 812-819.

- [104] E. Spilioti, et al., *Phenolic acid composition, antiatherogenic and anticancer potential of honeys derived from various regions in Greece*, PloS one, 2014, 9 (4).
- [105] Y. Mei-Chin, et al., *Apoptotic effects of protocatechuic acid in human breast, lung, liver, cervix, and prostate cancer cells: potential mechanisms of action*, Journal of agricultural and food chemistry, 2009, 57 (14), 6468-6473.
- [106] T. Tsui-Hwa, *Induction of apoptosis by hibiscus protocatechuic acid in human leukemia cells via reduction of retinoblastoma (RB) phosphorylation and Bcl-2 expression*, Biochemical Pharmacology, 2020, 60 (3), 307-315.
- [107] L. Hui-Hsuan, et al., *Apoptotic effect of 3, 4-dihydroxybenzoic acid on human gastric carcinoma cells involving JNK/p38 MAPK signaling activation*, International Journal of Cancer., 2007, 120 (11), 2306-2316.
- [108] B.C. Leigh, et al, *Characterization and structure by NMR and FTIR spectroscopy, and molecular modeling of chromium (III) picolinate and nicotinate complexes utilized for nutritional supplementation*, Journal of inorganic biochemistry, 1997, 66(2), 119-130.
- [109] C. Zhi-Bo et al., *Chemical Constituents of Cordyceps cicadae*, Natural Product Communications, 2015, 10, 12, 2145 – 2146.
- [110] W. Jia-hui, et al., *Chemical Constituents from Mycelia and Spores of Fungus Cordyceps cicadae*, Chinese Herbal Medicines, 2017, 9, 2, 188-192.
- [111] L.Wi-Young, et al., *Cytotoxic Activity of Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one from the Sclerotia of Polyporus umbellatus*, Bulletin of the Korean Chemical Society, 2005, 26 (9) 1464-1466.
- [112] K. Sahil, et al., *A review on protocatechuic acid and its pharmacological potential*, International Scholarly Research Notices, 2014.
- [113] D. Raveena, et al. *A Literature Review on the Synthesis of para-*

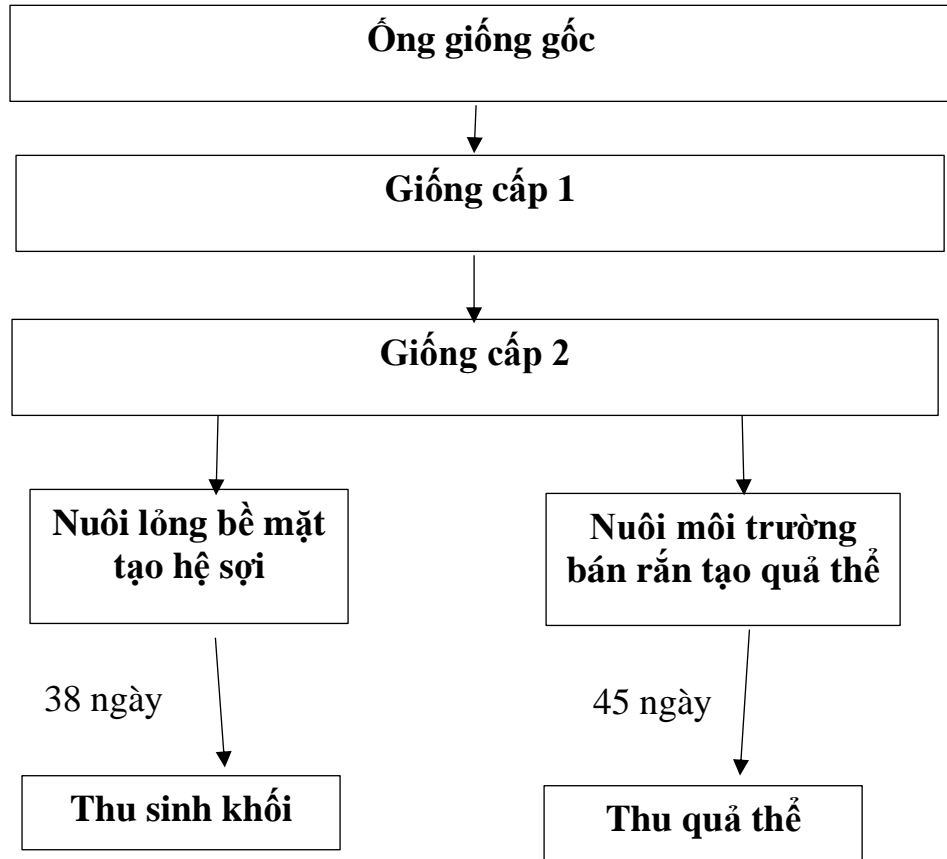
hydroxybenzoic Acid, International Journal For Research & Development In Technology, 2017, 8, 179-183

- [114] A.H. Sandrina, et al, *Antimicrobial and demelanizing activity of Ganoderma lucidum extract, p-hydroxybenzoic and cinnamic acids and their synthetic acetylated glucuronide methyl esters*, Food and chemical toxicology, 2013, 58, 95-100.
- [115] W. Xiaoyan, et al., *Investigation of the possible mechanism of polysaccharides extracted from Leucocalocybe mongolica in exerting antitumor effects in H22 tumor-bearing mice*, Journal of Food Biochemistry, 2021, 45 (4), 163.
- [116] F. Dilusha, et al., *Cytotoxic effects of ergone, a compound isolated from Fulviformes fastuosus*, BMC complementary and alternative medicine, 2016, 16(1), 1-11.

PHỤ LỤC

Phụ lục 1: Quy trình nhân nuôi *Cordyceps* thu sinh khối và quả thể

Sơ đồ Quy trình nhân nuôi *Cordyceps* thu sinh khối và quả thể:



Chủng nấm *C. neovolkian* DL0004 và *I. cicadae* F0004 được tiến hành nhân nuôi: tạo giống cấp 1 từ ông giống gốc → tạo giống cấp 2 từ đĩa petri giống cấp 1 → nuôi các môi trường và điều kiện khác nhau tạo hệ sợi (môi trường lỏng bề mặt) hoặc nuôi tạo quả thể (môi trường bán rắn).

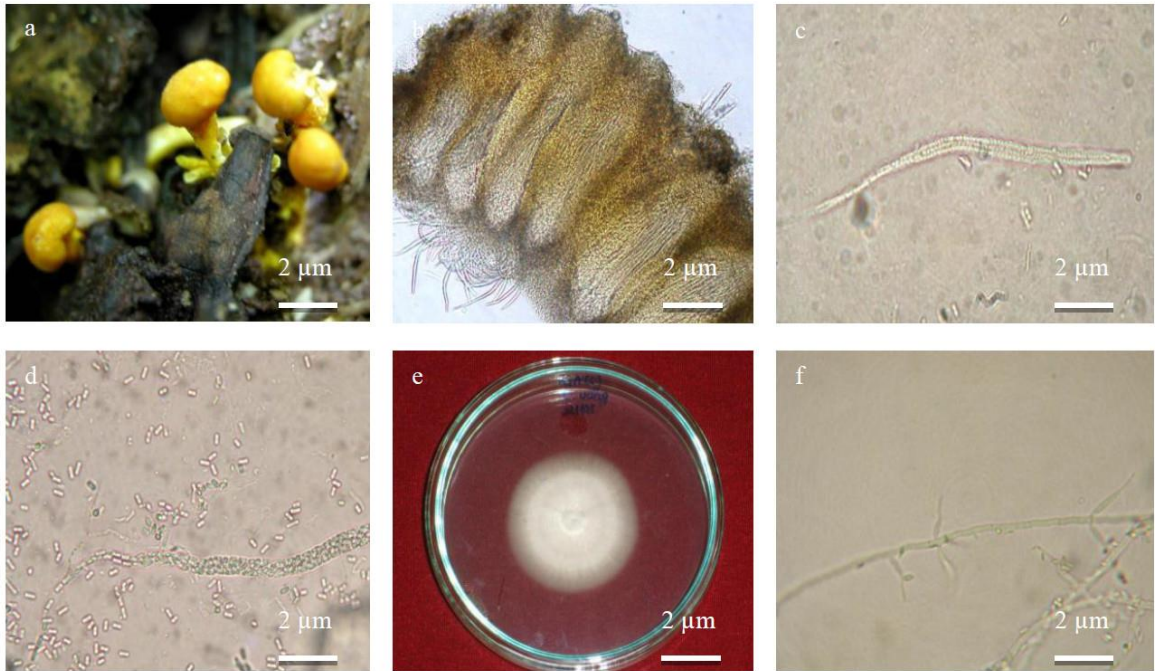
Giống cấp 1: Được nuôi bằng môi trường PGA trên đĩa petri sau khi hấp khử trùng 15 phút ở 121°C. Giống được ủ ở $20 \pm 2^\circ\text{C}$ trong 15 ngày, khi tơ nấm lan đều bề mặt thạch và không bị nhiễm sẽ tiến hành cấy giống cấp 2.

Giống cấp 2: Được nuôi bằng môi trường PG trong chai thủy tinh 250 ml sau khi hấp khử trùng 121°C, 20 phút. Giống được ủ ở $20 \pm 2^\circ\text{C}$ trong 7 ngày, tơ lan đều môi trường dịch và không bị vón cục. Giống cấp 2 sẽ được dùng để nuôi sinh khối và quả thể.

Quy trình nhân nuôi thu sinh khối: Giống cấp 2 của chủng *C. neovolkiana* DL0004 và *I. cicadae* F0004 sau khi 7 ngày nuôi sẽ tiến hành chuyển sang nuôi trên môi trường lỏng, thành phần gồm: dịch nấu khoai tây (200 g/L); đường saccharose (50 g/L); peptone (6 g/L); cao nấm men (4 g/L); KH_2PO_4 (0,5 g/L); MgSO_4 (0,2 g/L); nước cất đủ 1 lít. Môi trường được cho vào hộp nhựa PP có nắp đậy trắng trong L621 với kích thước đường kính đáy 80 mm, đường kính miệng hộp 120 mm, thể tích 700 ml, hấp khử trùng ở 121°C , áp suất 1,5 atm, 30 phút, sau đó để nguội, cấy giống và phân phối vào hệ thống nuôi. Giữ nhiệt độ khoảng $18 - 22^\circ\text{C}$ độ ẩm không khí 80-85%, theo dõi sự lan tơ 2 lần/ tuần. Sinh khối nấm có thể thu hoạch sau 38 - 42 ngày. Tiến hành thu sinh khối nổi trên bề mặt và dịch nuôi cấy phía dưới. Dịch nuôi cấy tiếp tục cô quay để thu cao EPS. Hệ sinh khối nổi trên bề mặt được thu hoạch và sấy khô, chiết các cao phân đoạn khác nhau và cô lập thu các hợp chất.

Quy trình nhân nuôi thu quả thể: Quả thể nấm *C. neovolkiana* DL0004 và *I. cicadae* F0004 được nuôi trên môi trường bán rắn thành phần gồm: gạo (28,5 g/hộp); kê (9,5g/hộp); nhộng tằm (2 g/hộp); glucose (40 g/L); peptone (5 g/L); KH_2PO_4 (1,5 g/L); MgSO_4 (1,5 g/L). Môi trường được hấp khử trùng sau đó cấy giống cấp 2 khoảng 5-7 ml. Môi trường nuôi được phân phối vào các hộp nhựa PP có nắp đậy trắng trong L621 với kích thước đường kính đáy 80 mm, đường kính miệng hộp 120 mm, thể tích 700 ml, độ ẩm cơ chất 62 – 65%, hấp khử trùng ở 121°C , áp suất 1,5 atm, 30 phút, sau đó để nguội, cấy giống và ủ tối trong 15 ngày tạo điều kiện phát triển hệ sợi nấm. Khi hệ sợi đã phát triển, các hộp nấm được chuyển lên kệ nuôi 05 tầng, mỗi tầng cách nhau 45 cm, chiều rộng kệ 60 cm, cường độ ánh sáng 300 – 400 lux, độ ẩm không khí 80 – 85%. Kiểm tra tính trạng hệ thống nuôi 2 lần/ ngày. Sau 45 ngày, quan sát quả thể và có thể thu hoạch. Quả thể thu hoạch và sấy khô sử dụng chiết cao, cao phân đoạn và phân lập, định danh các chất.

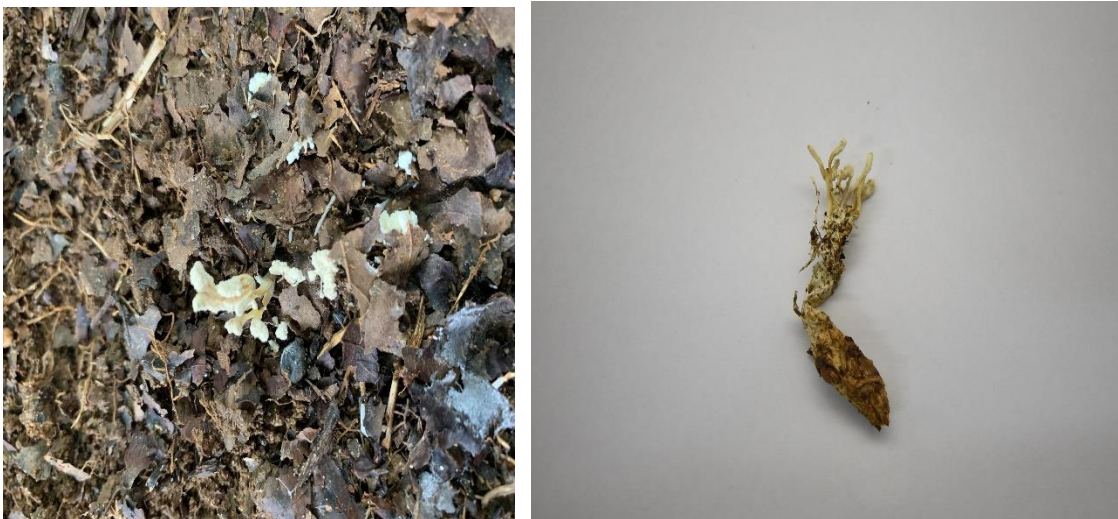
Hình phân lập định danh chủng *C. neovolkiana* DL0004



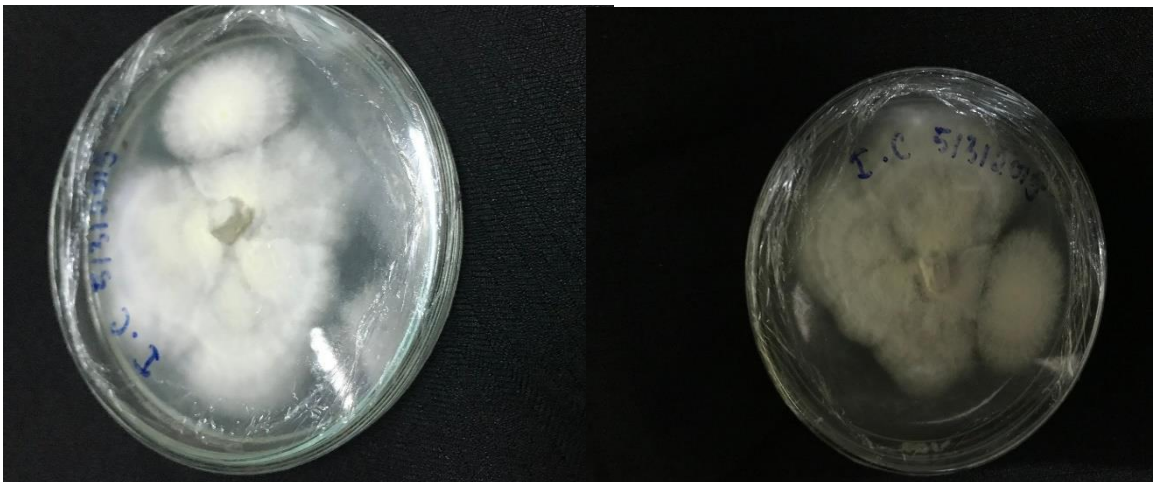
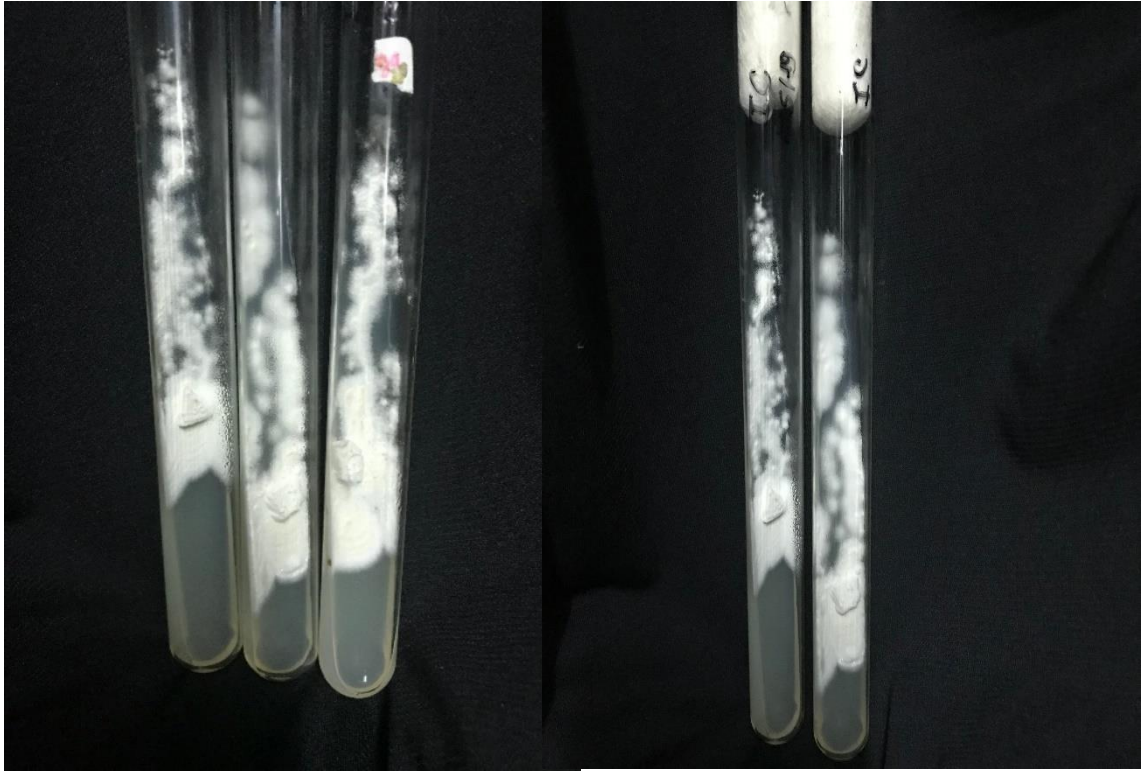
Hình thái giải phẫu mẫu nấm *C. neovolkiana* DL0004.

- a. thể bó ngoài tự nhiên; b. thể chén; c. thể túi; d. bào tử túi;
e. khuẩn lạc phát triển trên môi trường PGA; f. thể bình**

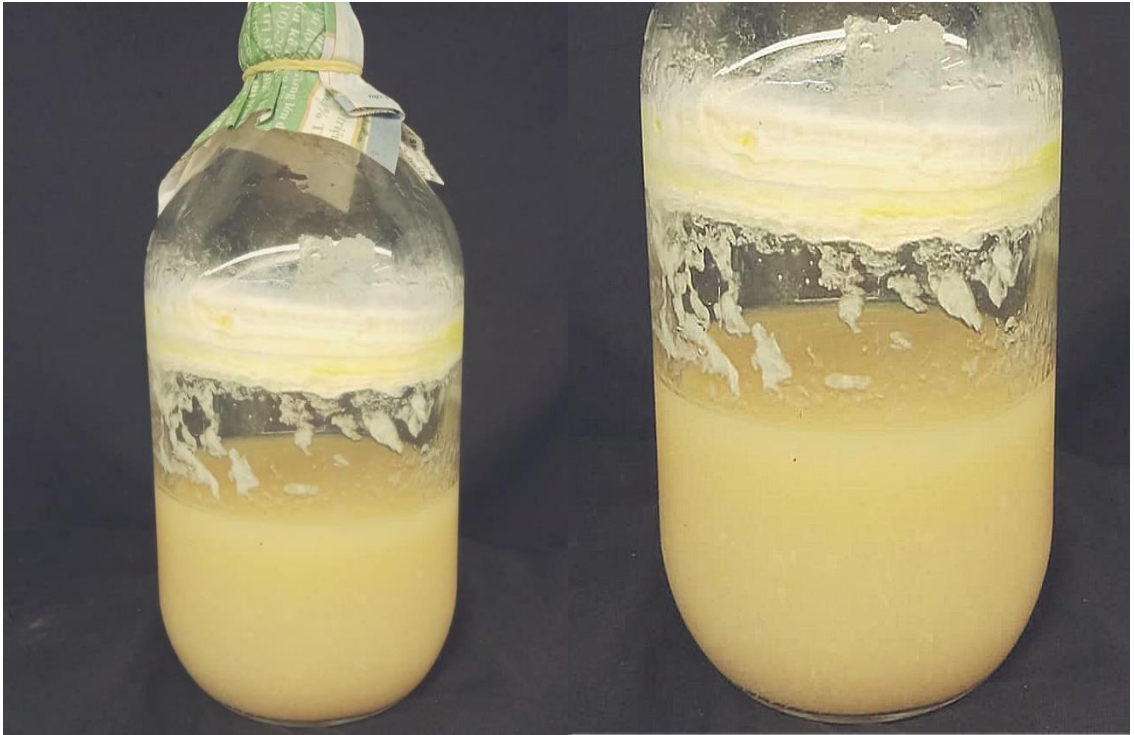
Hình Thu nhận chủng *I. cicadae* F0004



Hình giống gốc *I. cicadae* F0004



Hình giống cấp 1 chủng *I. cicadae* F0004



Hình giồng cấp 2 chủng *I. cicadae* F0004



Hình nuôi chủng *I. cicadae* F0004 thu sinh khối



Hình nuôi chủng *I. cicadae* F0004 thu quả thể



Kệ nuôi cấy thu quả thể *Cordyceps*



Kệ nuôi cấy thu quả thể *Cordyceps*

Phụ lục 2: Các mô hình thử nghiệm kháng ung thư hiện nay

Có nhiều phương pháp sàng lọc tiền lâm sàng khác nhau cho các chất có hoạt tính kháng ung thư hiện nay như các dòng tế bào ung thư người *in vitro* (*in vitro* human cancer cell lines), mô hình cấy ghép khối u *in vivo* (*in vivo* tumor xenograft model), hoặc mô hình chuột biến đổi gen (genetically engineered mouse model). Việc sử dụng các phương pháp sàng lọc tiền lâm sàng một cách thận trọng có hiệu quả với các chất kháng ung thư tiềm năng có thể giúp làm giảm tỷ lệ thất bại trong giai đoạn thử nghiệm lâm sàng.

Phương pháp sàng lọc in vitro

Việc sàng lọc quy mô lớn sử dụng các hệ thống động vật như đã thực hiện trong quá khứ là rất phi đạo đức, mà hiện nay chúng được quy định chặt chẽ trên thế giới. Ủy ban vì mục đích kiểm soát và giám sát các thí nghiệm trên động vật ở Ấn Độ quy định việc sàng lọc sử dụng động vật và đã nhấn mạnh 4 tôn chỉ 4Rs: thay thế (Replacement), giảm (Reduction), cải tiến (Refinement) và phục hồi (Rehabilitation) động vật sử dụng trong thử nghiệm. Do vậy, đánh giá *in vivo* của các thuốc kháng ung thư thường phải phải có những thử nghiệm trước đó như trên tế bào *in vitro* hoặc trên các thử nghiệm dựa trên mục tiêu (Target-based high-throughput assays).

Tiền sàng lọc các dòng tế bào

Sàng lọc dựa trên tế bào trong nghiên cứu ung thư bao gồm các dòng tế bào ung thư người cố định; về mặt quản lý, hệ thống thử nghiệm phù hợp nhất vì đặc tính tự nhiên bất tử và phát triển sinh sản nhiều. Một bảng danh sách gồm 60 dòng tế bào ung thư người khác nhau từ 9 loại ung thư khác nhau (ung thư bạch cầu, ung thư phổi tế bào không nhỏ, ung thư ruột kết, ung thư não, ung thư ác tính liên quan đến melanin, ung thư buồng trứng, ung thư thận, ung thư tuyến tiền liệt và ung thư vú) thiết lập bởi sàng lọc cơ bản *in vitro* NCI (National Cancer Institute). Ở đó, các hợp chất được thử nghiệm ở nhiều nồng độ khác nhau để xác định sự liên quan đến sự ức chế phát triển và gây độc tế bào chống lại các dòng tế bào ung thư này. Sàng lọc được thiết kế và thực hiện theo nhiều cách, cho mỗi một hợp chất thử nghiệm, tính phức tạp của liều đáp ứng cho mỗi dòng tế bào tạo ra một đặc tính điển hình hay “fingerprint”- dấu vân tay của đáp ứng tế bào có thể được khai thác trong thuật toán

nhận diện mô hình (Pattern Recognition Algorithms). Thuận toán này có thể giúp giả định các cơ chế hoạt động của một chất thử nghiệm hoặc có thể giúp quyết định liệu mô hình đáp ứng là duy nhất (mới) hay là song song trùng khớp với đáp ứng của một chất chuẩn bất kỳ nào đó gây ra trong cơ sở dữ liệu.

Vào năm 1995, để loại bỏ các chất không hoạt tính và tìm ra các chất tiềm năng từ một hỗn hợp chất ban đầu, NCI áp dụng một thử nghiệm tiền sàng lọc *in vitro* nó bao gồm các dòng ung thư vú MCF-7, ung thư phổi H460, và ung thư não SF268. Tiền sàng lọc này được sử dụng để kiểm tra sự hiện diện của tính chất gây độc của 1 thuốc ở nồng độ 10^{-4} M và có thể loại bỏ các phân đoạn lớn không hoạt tính nhưng vẫn giữ các chất có hoạt tính đối với thử nghiệm đa liều cho 60 dòng tế bào. Hiệu quả sàng lọc 60 dòng tế bào được tăng lên với sự thất thoát giới hạn thông tin các chất khoảng 50% có thể được loại bỏ mà không làm giảm đáng kể khả năng nhận biết các chất kháng ung thư. Nghiên cứu về ung thư đang tăng lên, nhu cầu tìm những mô hình để nghiên cứu cũng phát triển theo. Trong đó, có mô hình được sử dụng để sàng lọc ban đầu là các dòng tế bào mà tiêu biểu là hai tế bào Jurkat và tế bào ung thư vú MCF-7. MCF-7 là một trong các dòng tế bào ung thư vú được con người nghiên cứu nhiều nhất trên thế giới. Chúng được thu nhận từ một người phụ nữ bị ung thư vú di căn và tràn dịch màng phổi. Sau khi phân lập và nuôi cấy tạo dòng tế bào liên tục tạo ra dòng tế bào MCF-7 sau đó nó ngày càng phổ biến và được ứng dụng nhiều trong nghiên cứu kháng phân bào. MCF-7 có nhiều thuận lợi trong nghiên cứu các thụ thể estrogen (ER) alpha. MCF-7 là một trong số ít tế bào biểu hiện ER, thụ thể có mặt trong hầu hết các loại ung thư vú trên người. Bình thường để duy trì sự biểu hiện của thụ thể estrogen alpha trong môi trường nuôi cấy là khá khó khăn. Tuy nhiên các thụ thể dương tính ER trong MCF-7 chủ yếu là do ngẫu nhiên, không sử dụng các kỹ thuật di truyền. MCF-7 là mô hình để nghiên cứu phát triển của các kháng thể của ER trong các liệu pháp hormone trên các bệnh nhân ung thư vú. Do đó, tế bào MCF-7 được xem như mô hình nghiên cứu estrogen trong cả *in vitro* và *in vivo*. Cơ chế chính xác mà estrogen kích thích tế bào MCF-7 phát triển vẫn đang được nghiên cứu. MCF-7 đang được sử dụng như mô hình để nghiên cứu sự kháng các loại thuốc điều trị ung thư như hormone hay tamoxifen. Hiện nay, đây vẫn là dòng tế bào được nghiên cứu với nhiều bài báo khoa học chỉ sau tế bào HeLa, đóng vai trò quan trọng trong các nghiên cứu điều trị ung thư. Dòng tế bào MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7) là

dòng tế bào ung thư vú được phân lập đầu tiên năm 1970 từ một bệnh nhân nữ 69 tuổi mắc bệnh ung thư vú, đã di căn lên ngực và tràn dịch màng phổi. Dòng tế bào ung thư MCF-7 được sử dụng phổ biến trong các nghiên cứu về ung thư chỉ sau tế bào HeLa, có độ chính xác cao trong các thí nghiệm *in vitro*. Tế bào MCF-7 không có tính đồng đều về bộ gen, do đó các kết quả nghiên cứu có thể khác nhau trên các biến thể khác nhau. Trong đề tài này, dòng tế bào ung thư MCF-7 (ATCC-HTB-22) sử dụng được cung cấp bởi tổ chức American Type Culture Collection (ATCC) Hoa Kỳ và lưu giữ tại phòng thí nghiệm Sinh học phân tử, bộ môn Di truyền, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại học Quốc gia Thành Phố Hồ Chí Minh. Tế bào T là tế bào quan trọng để hiểu rõ về miễn dịch. Trong đó, có các con đường tín hiệu của T cell receptors (TCR) và các dòng tế bào T biến đổi. Một trong những mô hình được nghiên cứu là dòng tế bào Jurkat leukaemic T-cell line. Tế bào Jurkat T là một trong các dòng tế bào bạch cầu thu được từ các nghiên cứu tầm soát ở trung tâm nghiên cứu ung thư Fred Hutchinson, Hoa Kỳ. Chúng có khả năng tạo interleukin-2 (IL2) sau khi được xử lý bởi phytohaemagglutinin (PHA). Tuy nhiên dòng tế bào này có thể bị nhiễm mycoplasma nặng. Trong quá trình nuôi chọn lọc sẽ tìm ra các dòng có thể chống lại sự xâm nhiễm. Kết quả đã tạo được dòng tế bào Jurkat E6-1 được xem như tiêu chuẩn trong các dòng tế bào T miễn dịch nuôi cấy. Tế bào Jurkat thường được sử dụng làm mô hình nghiên cứu các con đường tín hiệu trên tế bào T. Dòng tế bào ung thư Jurkat T được sử dụng trong đề tài là dòng tế bào ung thư Jurkat, Clone E6-1 (ATCC® TIB-152™), từ ATCC, bảo quản và nuôi cấy tại phòng thí nghiệm Sinh học Phân tử, Bộ môn Di truyền, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại học Quốc gia Thành Phố Hồ Chí Minh.

Xác định sự phát triển tế bào

Sự phát triển tế bào có thể được xác định bởi các phương pháp được chấp nhận khác nhau mà sử dụng sự ngăn chặn các thuốc nhuộm nhất định bởi màng tế bào sống. Lựa chọn một phương pháp cụ thể phụ thuộc vào các yếu tố như số lượng tế bào tối thiểu yêu cầu, độ nhạy, tốc độ, và dễ dàng thực hiện. Các phương pháp thích hợp khác nhau cho nghiên cứu gây độc tế bào là thử nghiệm MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazodium), thử nghiệm SRB (sulforhodamin B), thử nghiệm PI (propidium iodid), và thử nghiệm luciferase (luciferase assay).

Thử nghiệm MTT

Đây là phương pháp sử dụng sớm nhất trong tất cả các phương pháp được phát triển bởi Mosmann 1983, ở đó một muối tetrazolium không màu được chuyển hóa thành chất formazan không tan có màu tỷ lệ với các tế bào sống. Formazan có thể được hòa tan trong dimethyl sulfoxid (DMSO) hoặc acidic isopropanol và được định lượng bằng quang phổ. Muối tetrazolium là một chất nhận electron, nó bị khử thành formazan có màu bằng cách nhận electron từ NADH, NADPH và các chất oxy hóa khác hoặc các coenzyme thích hợp. Sự khử MTT xảy ra ở nhiều địa điểm tế bào bao gồm ty thể. Thử nghiệm MTT đơn giản, nhanh và thuận tiện, nhưng điểm bất lợi của phương pháp này là bị ảnh hưởng bởi các yếu tố khác như nồng độ D-glucose trong môi trường nuôi cấy ở thời điểm đánh giá quang phổ. Hơn nữa, động học sản xuất formazan khác nhau ở từng tế bào cụ thể và sự định lượng tính gây độc của thuốc bị ảnh hưởng bởi khoảng thời gian phơi nhiễm với MTT. Do vậy, nó cần chuẩn hóa các điều kiện thử nghiệm cho từng dòng tế bào cũng như giảm thiểu ảnh hưởng của chúng lên kết quả thử nghiệm. Điều đó bao gồm tối ưu hóa mật độ nuôi cấy tế bào và thời gian thử nghiệm theo cách như vậy nó sẽ không gây ra sự cạn kiệt nguồn dinh dưỡng trong môi trường, và nồng độ cũng như thời gian phơi nhiễm MTT cũng nên được chuẩn hóa.

Thử nghiệm Sulforhodamin B (SRB)

Phương pháp SRB là một phương pháp nhanh, nhạy và không tốn kém, sử dụng một thuốc nhuộm anion màu hồng sáng, nó liên kết tĩnh điện với các acid amin cơ bản của các tế bào bị xử lý với acid trichloroacetic. Chất nhuộm liên kết protein được chiết xuất với Tris base (tris (hydroxymethyl) aminomethane), sau đó rửa sạch các thuốc nhuộm không liên kết, và do đó, hàm lượng protein có thể được định lượng gián tiếp bằng quang phổ. Phương pháp này thích hợp cho một phòng thí nghiệm thông thường cũng như cho một sàng lọc các thuốc kháng ung thư quy mô lớn. Ưu điểm của xét nghiệm SRB là phản ứng bền, không quan trọng thời gian (ổn định) và có thể so sánh với các phương pháp huỳnh quang khác. Mặc dù phương pháp tốn nhiều công này (một số bước rửa) mang lại lợi ích thiết thực cho việc kiểm tra các loại thuốc chống ung thư, nhưng kết quả thu được bằng xét nghiệm SRB không khác biệt nhiều so với các kết quả thu được bằng xét nghiệm MTT.

Thử nghiệm Propidium Iodid (PI)

Ethidium bromid và PI là hai loại thuốc nhuộm huỳnh quang dạng cation, chúng đi qua các màng tế bào chết và gắn vào DNA. Sự gắn này làm tăng sự hấp thu huỳnh quang (PI mạnh mẽ hơn); do đó, huỳnh quang chỉ được thấy ở nhân các tế bào chết. Các thuốc nhuộm này ổn định sau khi hấp thụ, và khả năng tồn tại có thể được xác định ngay cả sau vài ngày và do đó chính xác hơn và đáng tin cậy hơn. Các tế bào được ủ với PI, và số lượng các tế bào chết được đánh giá bằng phát hiện huỳnh quang sau đó (đo lần 1). Đo lần 2 sẽ được thực hiện sau khi ủ băng các tế bào trong 24 giờ ở -20°C . Sau đó, PI sẽ gắn được vào DNA của tất cả các tế bào và sự khác biệt trong hai phép đo sẽ cho số lượng các tế bào sống. Thử nghiệm này đơn giản, nhanh chóng mà không trải qua bước rửa và chỉ có 150-500 tế bào trên mỗi giếng là đủ để thử nghiệm thuốc. Một điểm hạn chế của thử nghiệm này là PI cũng liên kết với ARN kép có thể có trong tế bào chết, nhưng điều này có thể được khắc phục bằng cách sử dụng enzym RNAase trong quá trình khảo nghiệm.

Thử nghiệm Luciferase

Adenosin triphosphate nucleotid (ATP) là chất cung cấp năng lượng tự do cần thiết cho tất cả các tế bào để duy trì sự sống và thực hiện các chức năng chuyên biệt và hàm lượng ATP tế bào chất giảm trong trường hợp bị thương hoặc giảm oxy trong máu. Do đó, bằng cách đo lượng ATP, người ta có thể xác định được trạng thái sống của tế bào. Sau khi phá tế bào, ATP tế bào được giải phóng để phản ứng với luciferin và luciferase và kết quả là tạo ra sự phát quang hóa học lượng tử cao. Cường độ của ánh sáng phát ra tương quan tuyến tính với nồng độ ATP với các điều kiện tối ưu. Thử nghiệm Luciferase cho thấy sự nhạy và khả năng lặp lại tốt hơn trong nhiều ngày khi so sánh với khảo nghiệm MTT và có thể phát hiện tế bào sống đến 2000 tế bào/giếng, trong khi xét nghiệm MTT, tối thiểu 25000 tế bào/giếng. Hạn chế của phương pháp này là làm nguội mẫu có thể ảnh hưởng đến sự phát hiện của độ phát quang.

Các phương pháp khác để xác định khả năng sống của tế bào vẫn có, nhưng tính hữu dụng của chúng bị giới hạn bởi một số vấn đề xảy ra với chúng, ví dụ trong trường hợp thử nghiệm loại thuốc nhuộm xanh trypan, các tế bào phải được tính trong vòng 3-5 phút vì số lượng tế bào chết tăng theo thời gian, và trong xét nghiệm lactate

dehydrogenase, kết quả có thể bị sai lệch nếu chất kiểm tra chỉ ảnh hưởng đến các hoạt động nội bào.

Sàng lọc tế bào đơn lớp là phương pháp thuận tiện nhất và được áp dụng thường xuyên cho các nghiên cứu độc tính tế bào nhưng vẫn có những bất lợi nhất định vì không bắt chước tính phức tạp của sự phát triển ba chiều trong cơ thể *in vivo*. Các loại thuốc như chất ức chế truyền tín hiệu, kháng thể, thuốc khử sinh học, peptid chống lão hoá hoặc các phân tử nhỏ, và kháng telomerase không thể được đánh giá đúng bởi các phương pháp tế bào đơn lớp. Các kỹ thuật như nuôi cấy tế bào hai chiều (two-dimensions) trên các matrix hoặc ba chiều (three-dimensions) bằng cách đóng gói (encapsulation) bắt chước các thuộc tính vật lý và sinh học của môi trường *in vivo* thích hợp hơn đang dần thay thế các sàng lọc tế bào đơn lớp. Tuy nhiên, những kỹ thuật này vẫn còn ở giai đoạn mới mẻ và cho đến khi có sẵn đầy đủ hoặc các sàng lọc tế bào được thiết kế đặc biệt hoặc các thử nghiệm sinh hóa phù hợp nhất cho các loại thử nghiệm được đề cập ở trên để sàng lọc thuốc kháng ung thư.

Phương pháp sàng lọc in vivo

Các sàng lọc dòng tế bào, mặc dù cung cấp kết quả nhanh hơn theo cách có hiệu quả về chi phí và thời gian nhưng chỉ có các hợp chất gây độc tế bào có thể được xác định bằng các phương pháp này. Nhiều chất chống ung thư mới (các thuốc kìm hãm tế bào đích bằng các phân tử – cytostatic drugs) sẽ được xem là không phù hợp bằng các sàng lọc này. Hơn nữa, hoạt tính gây độc tế bào trong ống nghiệm chỉ là một trong nhiều yếu tố đóng vai trò quan trọng trong hiệu quả lâm sàng của một hợp chất nhất định. Các yếu tố như tính chất hóa lý, dược động học và đánh giá độc tính cũng quan trọng không kém cùng với hiệu quả của thuốc chống ung thư. Bất kể ái lực của chất với mục tiêu của nó, độ tan trong nước kém, sinh khả dụng không đầy đủ, và sự mất ổn định về chuyển hóa có thể dẫn đến sự thất bại của hợp chất trong thử nghiệm lâm sàng. Hơn nữa, sàng lọc dòng tế bào *in vitro* là không đủ để đánh giá các tác động off-target, có thể góp phần vào hiệu lực hoặc độc tính, của một tác nhân mới. Mô hình khối u *in vivo* được sử dụng trong phát triển thuốc tiền lâm sàng thể hiện các đích cho các thuốc chống ung thư thế hệ mới và đều tập trung và dựa vào bệnh và tế bào mục tiêu (target). Các mô hình khối u *in vivo* bao gồm các khối u người cấy mô hoặc cấy ghép hoặc những con chuột biến đổi gen được lai tạo đặc biệt.

Các mô hình khối u *in vivo* được chứng minh là có hiệu quả lâm sàng dự đoán khi so sánh với các thử nghiệm *in vitro* bởi vì nhiều chỉ số như được động học, hiệu quả, và chỉ số điều trị của người dùng thuốc được đánh giá đồng thời.

Mô hình cấy ghép khối u

Năm 1969, Rygaard và Povelsen lần đầu tiên báo cáo sự phát triển của khối u người trong chuột "nude" bị suy giảm miễn dịch. Quá trình phát triển khối u được xác định rõ ràng thông qua quan sát, đo đạc và sinh thiết sau khi ghép mô người với những con chuột "nude". Mô khối u của người có thể được cấy ghép ở dạng nguyên vẹn hoặc ở dạng huyền phù tế bào thu được từ khối u người. Mô khối u có thể được cấy ghép phẫu thuật hoặc tiêm vào các mô dưới da của thân, cơ liên sườn, hoặc đúng vị trí với bất kỳ cơ quan nào (thường tương tự như cơ quan con người mà các mô khối u được thu nhận) của chuột trụi lông.

Cấy ghép dưới da (subcutaneous implantations) được thực hiện dễ dàng hơn so với cấy ghép đúng vị trí (orthotopic implantations) tương ứng với cơ quan và đã cho thấy duy trì gần giống với các đặc điểm mô bệnh học, tế bào học, và sinh hóa điển hình của khối u ban đầu. Tuy nhiên, chúng không tái tạo vị trí chính của các ung thư ở người và mất tiềm năng xâm lấn và di căn. Sau khi cấy ghép khối u người ở những con chuột "nude" phụ thuộc vào nhiều yếu tố khác nhau như vị trí cấy ghép, cung cấp máu cho vị trí cấy ghép, sự hiện diện của nang xơ xung quanh khối u người và các loại tế bào của khối u người cấy ghép. Các khối u phát triển ở đúng vị trí tương ứng có lợi điểm là di căn xảy ra ở tần số cao hơn nhiều và sự xâm lấn dường như rõ ràng hơn so với mô hình cấy ghép dưới da. Việc ghép tế bào khối u người dưới da hoặc đúng vị trí ở chuột "nude" hoặc trong những con chuột suy giảm miễn dịch kết hợp nghiêm trọng có sẵn cho tất cả các loại khối u chính và đã trở thành mô hình chính cho việc sàng lọc kháng ung thư *in vivo* và phát triển thuốc. Các khối u phát triển trong các cơ quan nội tạng (mô hình cấy đúng vị trí - orthotopic) thường không thể tiếp cận được đối với các phép đo kích cỡ liên tiếp; do đó, những con chuột phải bị hy sinh để đo thể tích khối u điều đó chỉ cho phép đo một điểm. Hạn chế của mô hình bệnh lý có liên quan đến lâm sàng có thể được khắc phục bằng cách sử dụng các kỹ thuật hình ảnh hiện có. Trong khi mô hình cấy ghép khối u người dưới da là phù

hợp để đánh giá các thuốc gây độc tế bào hoặc cytostatic, mô hình orthotopic cung cấp các đánh giá thích hợp nhất cho các chất ức chế đặc hiệu di căn hoặc xâm lấn.

Một trong những đóng góp chính của mô hình này là mức độ hiệu quả của một loại thuốc chống ung thư ở bệnh nhân có thể được so sánh với các hiệu ứng trong mô hình cấy ghép (*in vivo*) thu được với khối u của bệnh nhân và với các dòng tế bào song song được thiết lập tốt (*in vitro*). So sánh các đáp ứng thuốc nhiều mô hình cấy ghép được phát triển từ các loại u khác nhau và từng bệnh nhân cho thấy mô hình cấy ghép có thể đúng 90% so với dự đoán đáp ứng lâm sàng. Một phân tích hồi cứu của 39 hợp chất sàng lọc cho kết quả của cả hai nghiên cứu cấy ghép và thử nghiệm lâm sàng giai đoạn II đã cho thấy ít nhất 33% mô ghép được thử nghiệm cho các hoạt động tiền lâm sàng dự đoán có hiệu lực không ít hơn hai loại khối u khác nhau trong thử nghiệm giai đoạn II và một số các hợp chất được sàng lọc hiện đang được sử dụng trong hóa trị liệu chuẩn như paclitaxel và doxorubicin. Mô hình cấy ghép khối u người là một mô hình dự báo tốt về hoạt động lâm sàng cho các thuốc chống ung thư và rất hữu ích trong việc đánh giá dược động học và dược động học của thuốc và nó cũng cung cấp một nguồn tái tạo và dễ tiếp cận các tế bào khối u đích của người.

Mặc dù có rất nhiều ưu điểm của mô hình cấy ghép, chúng ta cần phải thận trọng và nhớ rằng các biến số ảnh hưởng đến kết quả nghiên cứu được thực hiện trên các mô hình này, ví dụ nguồn gốc khối u, tình trạng đích/thụ thể của khối u, vị trí cấy ghép, kích cỡ khối u lúc khởi đầu điều trị, tốc độ tăng trưởng và đặc điểm của các khối u, liều, công thức, tần suất và đường dùng, và các điểm kết thúc thử nghiệm. Hơn nữa, cấy ghép nên được mô tả ở cấp độ phân tử cho một mục tiêu cụ thể trước khi sử dụng như các nghiên cứu về sự nhạy hóa học thường được thực hiện trong các mô hình được mô tả tốt nhằm thể hiện tế bào đích (targets) mà hợp chất mới nên hành động.

Mô hình chuột ung thư tạo ra từ biến đổi gen

Mô hình chuột ung thư tạo ra từ biến đổi gen (GEM) là một bộ sưu tập đa dạng các con chuột biến đổi gen, trong đó sự phát triển của khối u xảy ra *in situ* ở trong các ngăn mô thích hợp. Vào đầu những năm 1980, các tế bào ung thư (oncogens) tế bào/virus đã được đưa vào dòng tế bào chuột lần đầu tiên và các con chuột chuyển gen này tỏ ra dễ bị ung thư. Việc điều khiển các dòng tế bào chuột đến việc ức chế

các gen ức chế khối u (TSGs), sự biểu hiện gen chống lại TSGs, hoặc các tế bào ung thư biểu hiện vượt mức ở một mô cụ thể dẫn đến sự phát triển của ung thư phổi, ung thư xương, ung thư hạch bạch huyết, ung thư tuyến yên, ung thư vú, và nhiều loại mô hình ung thư khác.

Các mô hình GEM có thể được chia thành hai loại: mô hình GEM tế bào mầm (germline), trong đó các loại ung thư phát triển thành dạng không được kiểm soát (tự phát) và các mô hình GEM có điều kiện, trong đó có khả năng kiểm soát không gian – thời gian của sự khởi phát khối u cùng với việc sử dụng mô cụ thể, ligand (ligand-regulated), và các công nghệ dựa trên virus. Các phương pháp tiếp cận mô hình GEM Germline liên quan đến việc thay thế chromatin tế bào gốc phôi của tế bào nội sinh. Sự gián đoạn sinh học của TSGs ở chuột thường dẫn đến sự chết phôi thai, giúp hiểu rõ vai trò của những gen này trong sự phát triển của chuột bình thường. Mặc dù sự chết phôi thai có thể được khắc phục bằng cách phát triển các alen dị nguyên, sự đột biến germline có mặt khắp cơ thể con chuột dẫn đến các khiếm khuyết phát triển, các tác động không mong muốn bên ngoài các mô quan tâm hoặc sự tổn thương từ các sản phẩm gen liên quan hoặc những con đường gần tương tự. Các mô hình GEM có điều kiện được phát triển bằng cách sử dụng các recombinase có vị trí đặc trưng (SSRs) để kiểm soát sự đột biến không gian – thời gian (spatiotemporal) của bộ gen. Các SSRs xúc tác việc xóa bỏ hoặc đảo ngược các trình tự gắn chèn giữa một cặp các phân tử DNA lặp lại đảo ngược dẫn đến một sản phẩm gen không có chức năng hoặc không ổn định. Kiểm soát thời gian có thể đạt được với một SSR được điều hòa bởi ligand, trong đó SSR vẫn không hoạt động trước khi đặt vào ligand. Điều này cải thiện độ chính xác của mô hình trong việc mô phỏng ung thư ở người.

Ngày nay, mặc dù các mô hình GEM bắt chước bệnh của con người một cách chính xác hơn và có liên quan hơn đến việc khám phá ra thuốc dựa trên mục tiêu và sẽ giúp các nhà điều tra xác định được loại thuốc mới tối ưu hơn, mô hình GEM có những vấn đề riêng của chúng như kinh phí cao, phương pháp nuôi cấy phức tạp, kinh nghiệm hạn chế, sự xâm nhập biến đổi, và độ trễ của khối u. Hơn nữa, rất khó để theo dõi động học khối u và biểu hiện không sinh lý của các gen đột biến.

Phụ lục 3: Chiết cao, cao phân đoạn, phân lập định danh các hợp chất chính

Phương pháp chiết ngấm kiệt được sử dụng phổ biến nhờ kỹ thuật đơn giản và không yêu cầu nhiều trang thiết bị. Dung môi được chảy qua bột nguyên liệu, khi chảy qua các khe hở dung môi sẽ tiếp xúc và tạo điều kiện để các hợp chất trong nguyên liệu hòa tan và bị kéo theo dung môi. Sau đó dung môi được thêm mới để tiếp tục hòa tan nguyên liệu và đẩy dung môi cũ ra ngoài, nguyên liệu luôn được tiếp xúc với dung môi. Quá trình lặp lại cho đến khi chiết kiệt hoạt chất. Ethanol hòa tan tốt hầu hết các hợp chất phân cực và không phân cực nên thường dùng phổ biến trong chiết ngấm kiệt. Ethanol không làm trương nở dược liệu và kháng vi khuẩn, nấm mốc phát triển nên dễ dàng trong việc bảo quản cao chiết. Ngoài ra ethanol có nhiệt độ sôi thấp nên khi cô quay đuổi dung môi không gây phân hủy các hợp chất trong cao. Thu nhận cao polysaccharid bằng phương pháp tủa cồn lạnh: Ethanol nồng độ cao được dùng làm dung môi để thu được các carbohydrate do giúp hình thành mối liên kết nội phân tử giữa các polyme tan trong nước thông qua cạnh tranh nước. Hằng số điện môi của ethanol (20) thấp hơn nhiều so với nước (80) ở 25°C, việc thêm ethanol có thể làm giảm hằng số điện môi của dung dịch polysaccharid và gây ra những thay đổi về hình dạng trong polymer, do đó cho phép các phân tử tổng hợp và kết tủa.

Thu nhận cao chiết phân đoạn bằng phương pháp chiết lỏng-lỏng: phương pháp chiết lỏng-lỏng dựa vào khả năng hòa tan của các chất vào các dung môi có độ phân cực khác nhau. Chất có độ phân cực cao sẽ hòa tan tốt trong dung môi phân cực, chất phân cực trung bình hòa tan trong dung môi phân cực trung bình và chất không phân cực tan trong dung môi không phân cực. Do đó, khi dùng hai dung môi không hòa tan và có độ phân cực khác nhau sẽ phân tách được các hợp chất có độ phân cực tương ứng. Dung môi chứa các hợp chất quan tâm sẽ được phân tách và thu nhận khỏi dịch ban đầu. Cô quay đuổi dung môi thu nhận được cao.

Nước là dung môi phân cực và từ lâu đã được sử dụng trong lĩnh vực hóa thực phẩm, một phần do tính không độc hại và tính xâm lấn của nó. Cấu trúc phân tử lưỡng cực và có thể hòa tan các ion tự định hướng theo lực hút tĩnh điện giữa ion và phân tử nước. Phần lớn các nghiên cứu được thực hiện trên chiết xuất của *C. sinensis* sử dụng ethanol, methanol hoặc nước nóng làm dung môi chiết xuất chủ yếu do thực hành phổ biến và khả năng chiết xuất các thành phần phân cực của chúng. Etyl axetat,

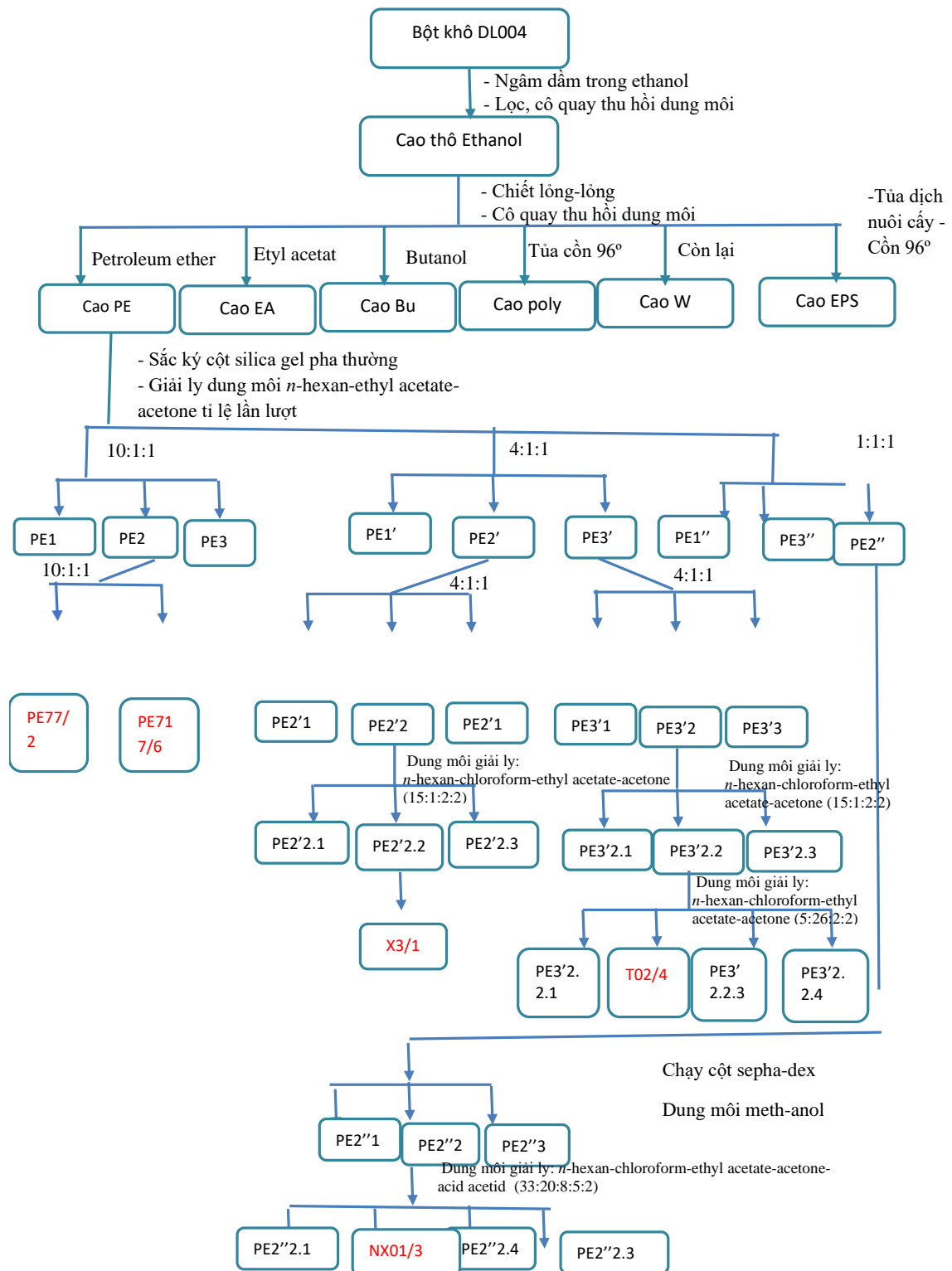
mặc dù là dung môi ít phân cực nhất trong số ba dung môi nói trên, đã thu hút được nhiều sự chú ý hơn từ cuối và đã trở nên phổ biến. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng ethyl acetate chiết xuất sợi nấm *C. sinensis* là một chất ức chế mạnh sự gia tăng của tế bào ung thư. Việc chuẩn bị các chất chiết xuất theo một trình tự tuần tự bắt đầu từ dung môi không phân cực đến phân cực. Bột sợi nấm khô lần đầu tiên được chiết xuất bằng cách sử dụng PE, EA, Et và nước với tỷ lệ 1:10 (w / v) cho mỗi dung môi. Quá trình chiết xuất bao gồm việc sử dụng máy lắc quỹ đạo ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ ngoại trừ trường hợp chiết bằng nước nóng trong đó đĩa nóng và thanh khuấy được sử dụng trong khoảng thời gian 3 giờ. Sau mỗi vòng chiết, dịch chiết được lọc và chuyển dung môi đến khô để thu được dịch chiết thô.

Trong những năm gần đây, chiết xuất bằng CO₂ siêu tới hạn đã nổi lên như một công nghệ thay thế có ứng dụng rộng rãi trong các ngành công nghiệp hóa chất và thực phẩm. Quá trình này không liên quan đến bất kỳ dung môi hữu cơ độc hại nào để chiết xuất và được thực hiện ở điều kiện nhẹ hơn, làm cho nó trở thành dung môi tốt nhất để chiết xuất các hợp chất có hoạt tính sinh học (đặc biệt là không phân cực) ở dạng tinh khiết nhất. Chiết xuất ethanol của *C. sinensis* được phân đoạn bằng cách sử dụng CO₂ siêu tới hạn làm dung môi rửa giải và các phân đoạn này cho thấy khả năng ức chế chọn lọc sự phát triển của tế bào ung thư đại trực tràng và tế bào gan thông qua con đường apoptosis.

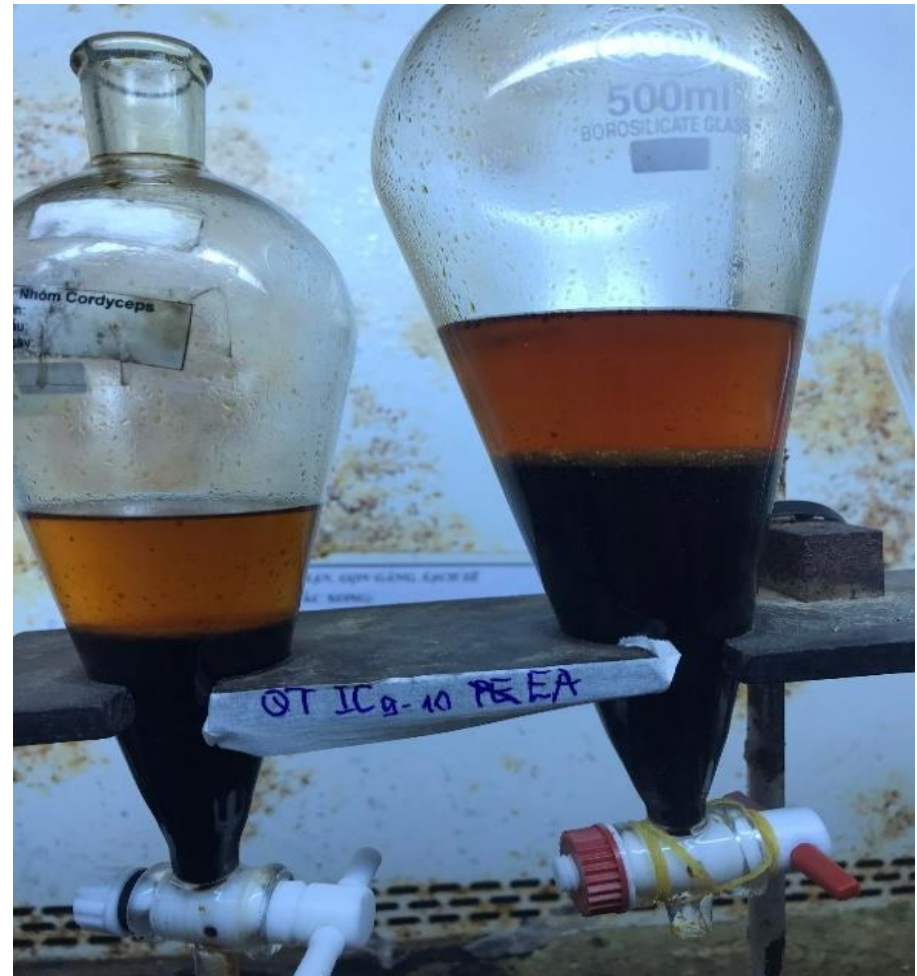
Phương pháp thu nhận hợp chất bằng phương pháp sắc ký: Sự sắc ký là một phương pháp vật lý để tách hỗn hợp gồm nhiều loại hợp chất ra riêng thành từng loại hợp chất dựa vào tính ái lực khác nhau của những loại hợp chất đối với hệ thống gồm pha động và pha tĩnh. Khả năng phân tách của các hợp chất phụ thuộc vào hệ số phân chia. Khi đạt đến trạng thái cân bằng, các hợp chất sẽ phân bố vào mỗi pha với một tỉ lệ nồng độ cố định, tỉ lệ này khác nhau tùy vào tính chất động học của hợp chất và của 2 pha. Mỗi hợp chất sẽ di chuyển ngang qua pha tĩnh với vận tốc khác nhau, nhờ vậy kỹ thuật sắc ký có thể tách riêng các loại hợp chất. Sắc ký lớp mỏng (TLC): Sắc ký lớp mỏng hay còn gọi là sắc ký phẳng, dựa vào hiện tượng hấp thu trong đó pha động- là một dung môi hoặc hỗn hợp các dung môi, di chuyển ngang qua pha tĩnh- là một chất hấp thu trợ như silica gel hoặc oxid alumin. Sự tách của các chất dựa vào sự khác nhau về tính phân cực, hay là dựa vào sự hiện hữu lưỡng cực trong

cấu trúc của phân tử. Tốc độ di chuyển của các chất phụ thuộc vào lực tương tác tĩnh điện của pha tĩnh với chất và tùy thuộc vào độ hòa tan của mẫu chất trong dung môi.

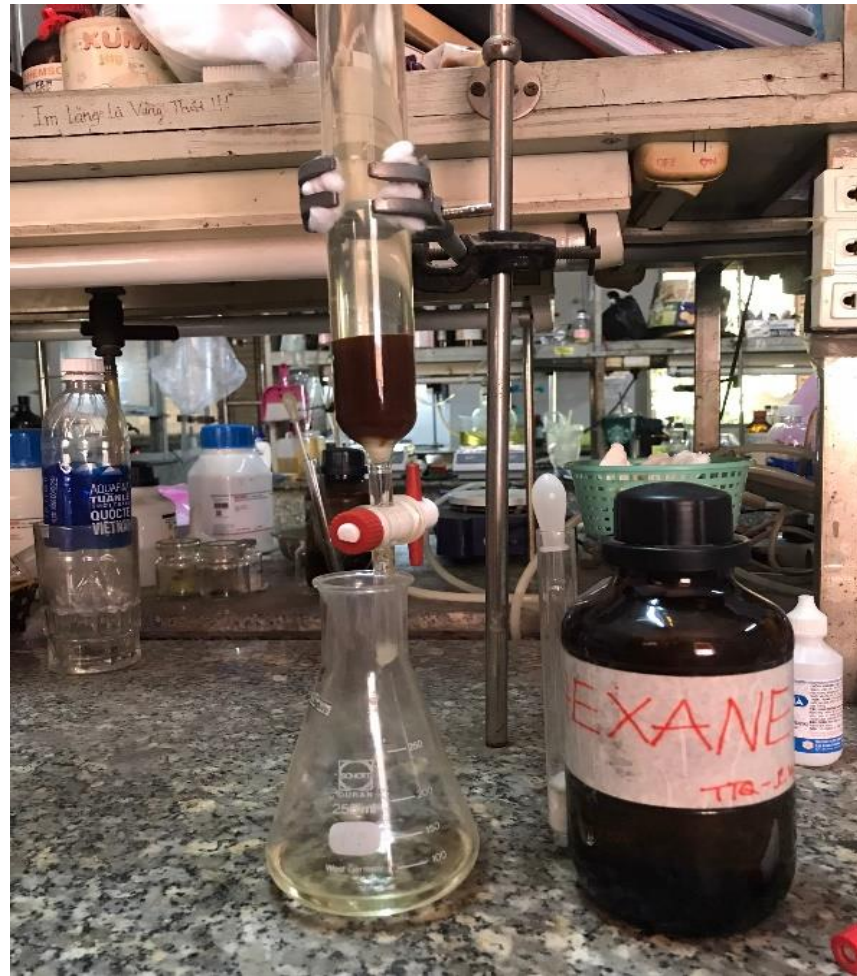
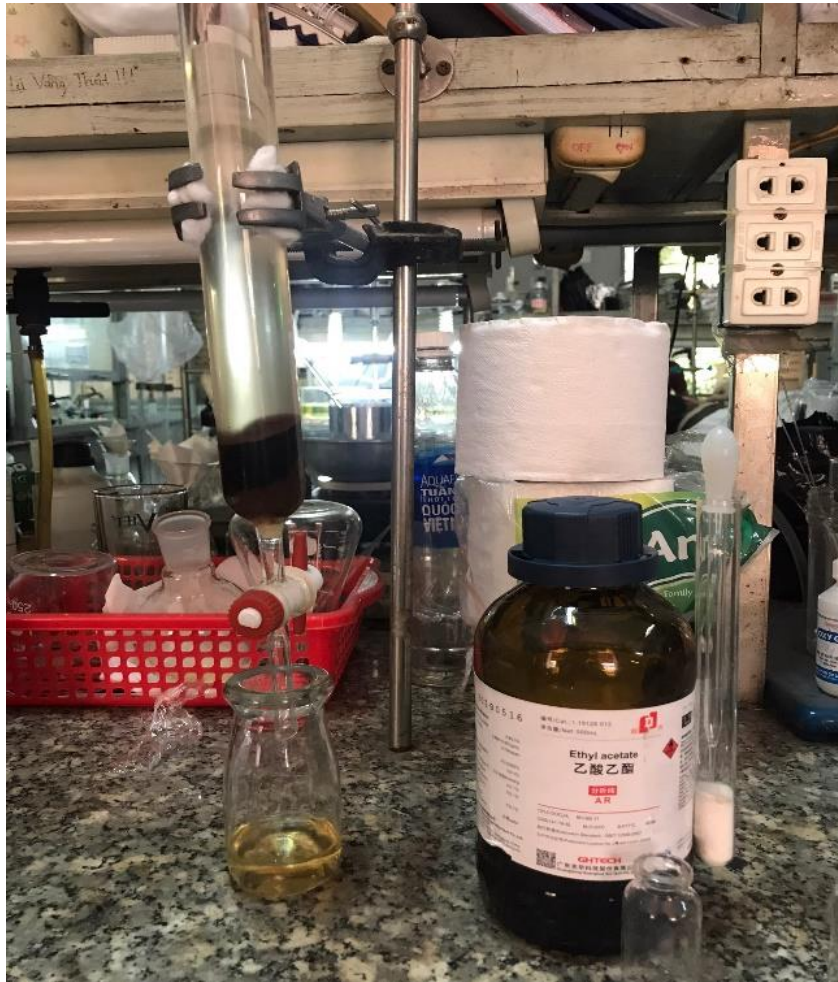
Phương pháp xác định cấu trúc hóa học của hợp chất bằng phương pháp cộng hưởng từ hạt nhân NMR: phương pháp dựa trên hiện tượng cộng hưởng từ hạt nhân, trong mỗi hạt nhân mang điện tích dương sẽ tự xoay chuyển xung quanh trục của nó, và sự xoay chuyển này tạo ra một từ trường và sẽ tương tác với từ trường ở bên ngoài. Khi không có sự hiện diện của từ trường, các spin hạt nhân định hướng hỗn loạn theo vô số phương, khi có sự hiện diện của từ trường các spin hạt nhân định hướng với chiều của từ trường và mỗi hạt nhân sẽ có năng lượng khác nhau. Khi được chiếu bởi một sóng radio năng lượng thấp có tần số thích hợp, hạt nhân hấp thu năng lượng, sẽ nhảy từ spin trạng thái năng lượng thấp lên trạng thái spin năng lượng cao hơn được gọi là cộng hưởng từ hạt nhân. Sau khi trở lại trạng thái cân bằng lúc đầu, bộ phận phát hiện tín hiệu của máy NMR sẽ đo mức năng lượng phóng thích này và chuyển đổi Fourier để biến tín hiệu thời gian thành tín hiệu về tần số ghi thành các mũi pic khác nhau tương ứng với mỗi loại spin tạo thành một phổ NMR, dựa vào các tín hiệu này có thể xác định được khung sườn carbon và hydrogen. Một trong những nỗ lực đầu tiên nhằm xác định cấu trúc nucleosid và bazơ nitơ của *C. sinensis* đã được thực hiện bởi Shiao và cs (1994) và sử dụng HPLC pha đảo. Rửa giải theo thang nồng độ bằng cách sử dụng hệ hai dung môi bao gồm 2,5% methanol và 20% methanol trong 0,01M amoni photphat cho thấy sự hiện diện của các nucleosid và base nitơ chính, uracil, guanin, uridin, guanosin và adenosin. Shiao và cs (1994) đã thành công trong quy trình HPLC pha đảo của các loài đồng trùng hạ thảo khác nhau và các loài thuộc chi *Paecilomyces*, làm tiền đề cho việc phân biệt giữa các loài khác nhau và sử dụng các chất chuyển hóa làm chất đánh dấu để kiểm tra chất lượng sản phẩm. HPLC pha đảo được sử dụng bởi Chen và cs (2009) để xác định ba hợp chất chống ung thư từ các phần hoạt động của ethyl axetat thô chiết xuất từ *C. sinensis*. Các thông số pha động được sử dụng để phát hiện các hợp chất này khác nhau nên cần ba lần chạy riêng biệt lặp lại. Trong quá trình phân lập gliocladicillin A, 50–55% axetonitril trong nước chạy trong 5 phút và nồng độ của axetonitril được giữ không đổi ở 55% trong 25 phút còn lại với thời gian ghi nhận đỉnh quan sát được là 14,3 phút. Gliocladicillin B được quan sát ở thời gian lưu là 19,5 phút sử dụng 60–85% methanol làm pha động trong 40 phút.



Hình sơ đồ chiết cao phân đoạn và tách chất từ cao PE SK *C. neovolkiana* DL0004



Một số hình ảnh về chiết cao, cao phân đoạn



Một số hình ảnh về chiết cao, cao phân đoạn



Một số hình ảnh về chiết cao, cao phân đoạn

**Phụ lục 4: Kết quả phổ và so sánh định danh các chất từ cao PE SK C.
neovolkiana DL0004**

4.1. Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one (RT1, CN1)

Vị trí carbon	CN1 ((CD ₃) ₂ CO)		Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one (CDCl ₃) [22]	
	δ_H (ppm) (<i>J</i> -Hz)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) (<i>J</i> -Hz)	δ_C (ppm)
1	2.07 (<i>m</i>) 1.80 (<i>m</i>)	34.9	2.04 (<i>ddd</i> , 2.2, 5.2, 13.2) 1.80 (<i>m</i>)	34.1
2	2.50 (<i>m</i>) 2.32 (<i>m</i>)	34.7	2.52 (<i>m</i>) 2.44 (<i>m</i>)	34.1
3		198.1		199.5
4	5.64 (<i>s</i>)	123.7	5.74 (<i>s</i>)	123.0
5		164.1		164.5
6	6.10 (<i>d</i> , 9.5)	125.4	6.03 (<i>d</i> , 9.6)	124.5
7	6.66 (<i>d</i> , 9.5)	134.2	6.61 (<i>d</i> , 9.6)	134.0
8		125.4		124.4
9	2.14 (<i>m</i>)	45.5	2.13 (<i>m</i>)	44.3
10		37.5		36.7
11	1.68 (<i>m</i>) 1.76 (<i>m</i>)	19.7	1.61 (<i>m</i>) 1.71 (<i>m</i>)	19.0
12	2.11 (<i>m</i>) 1.33 (<i>m</i>)	36.6	2.08 (<i>td</i> , 3.3, 12.9) 1.29 (<i>m</i>)	35.6
13		44.7		44.0
14		156.0		156.1
15	2.53 (<i>m</i>) 2.40 (<i>m</i>)	25.8	2.48 (<i>m</i>) 2.38 (<i>m</i>)	25.3
16	1.83 (<i>m</i>) 1.56 (<i>m</i>)	28.4	1.82 (<i>m</i>) 1.50 (<i>m</i>)	27.7
17	1.28 (<i>m</i>)	56.7	1.25 (<i>m</i>)	55.7
18	1.01 (<i>s</i>)	19.3	0.96 (<i>s</i>)	18.9
19	1.02 (<i>s</i>)	16.9	1.00 (<i>s</i>)	16.6
20	2.21 (<i>m</i>)	40.1	2.15 (<i>m</i>)	39.3
21	1.09 (<i>d</i> , 6.5)	21.6	1.06 (<i>d</i> , 6.9)	21.2
22	5.28 (<i>dd</i> , 7.5, 15.0)	136.2	5.22 (<i>dt</i> , 7.4, 15.1)	135.0
23	5.32 (<i>dd</i> , 7.5, 15.0)	133.2	5.25 (<i>dt</i> , 8.2, 15.1)	132.5
24		43.8	1.87 (<i>dd</i> , 6.8, 13.2)	42.9
25		33.9	1.49 (<i>t</i> , 5.5)	33.1
26	0.85 (<i>d</i> , 7.0)	20.3	0.85 (<i>d</i> , 6.6)	20.0
27	0.87 (<i>d</i> , 6.5)	20.0	0.88 (<i>d</i> , 6.6)	19.6
28	0.96 (<i>d</i> , 7.0)	18.1	0.93 (<i>d</i> , 6.9)	17.6

RT1-Acetone-1H



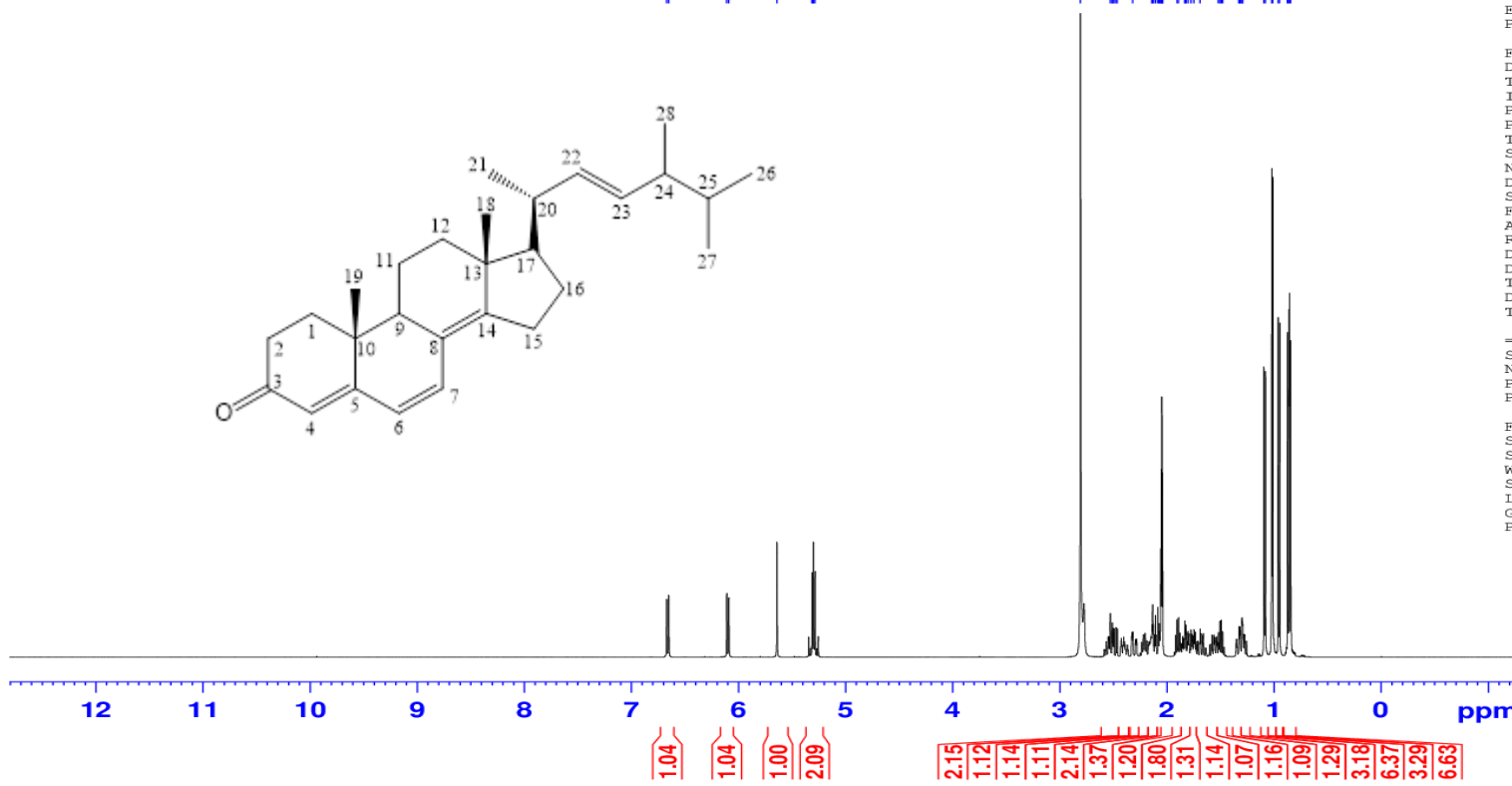
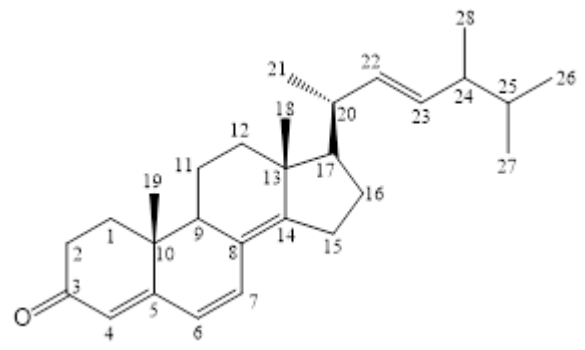
6.672
6.653
6.111
6.092
5.643
5.315
5.303
5.301
5.288
2.808
2.530
2.511
2.506
2.495
2.477
2.466
2.321
2.142
2.135
2.129
2.110
2.086
2.075
2.071
2.059
2.054
2.050
2.046
2.041
2.041
1.907
1.895
1.835
1.830
1.825
1.806
1.778
1.750
1.692
1.521
1.507
1.495
1.482
1.329
1.321
1.316
1.301
1.298
1.293
1.096
1.083
1.023
1.014
0.963
0.949
0.875
0.862
0.859
0.845

```
Current Data Parameters
NAME      110TIN_RT1
EXPNO    10
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20190428
Time     15.09
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm PABBI 1H/
PULPROG  zg30
TD       65536
SOLVENT  Acetone
NS       16
DS       2
SWH      10000.000 Hz
FIDRES   0.152588 Hz
AQ       3.2767999 sec
RG       97.76
DW       50.000 usec
DE       6.50 usec
TE       304.5 K
D1       1.00000000 sec
TDO      1

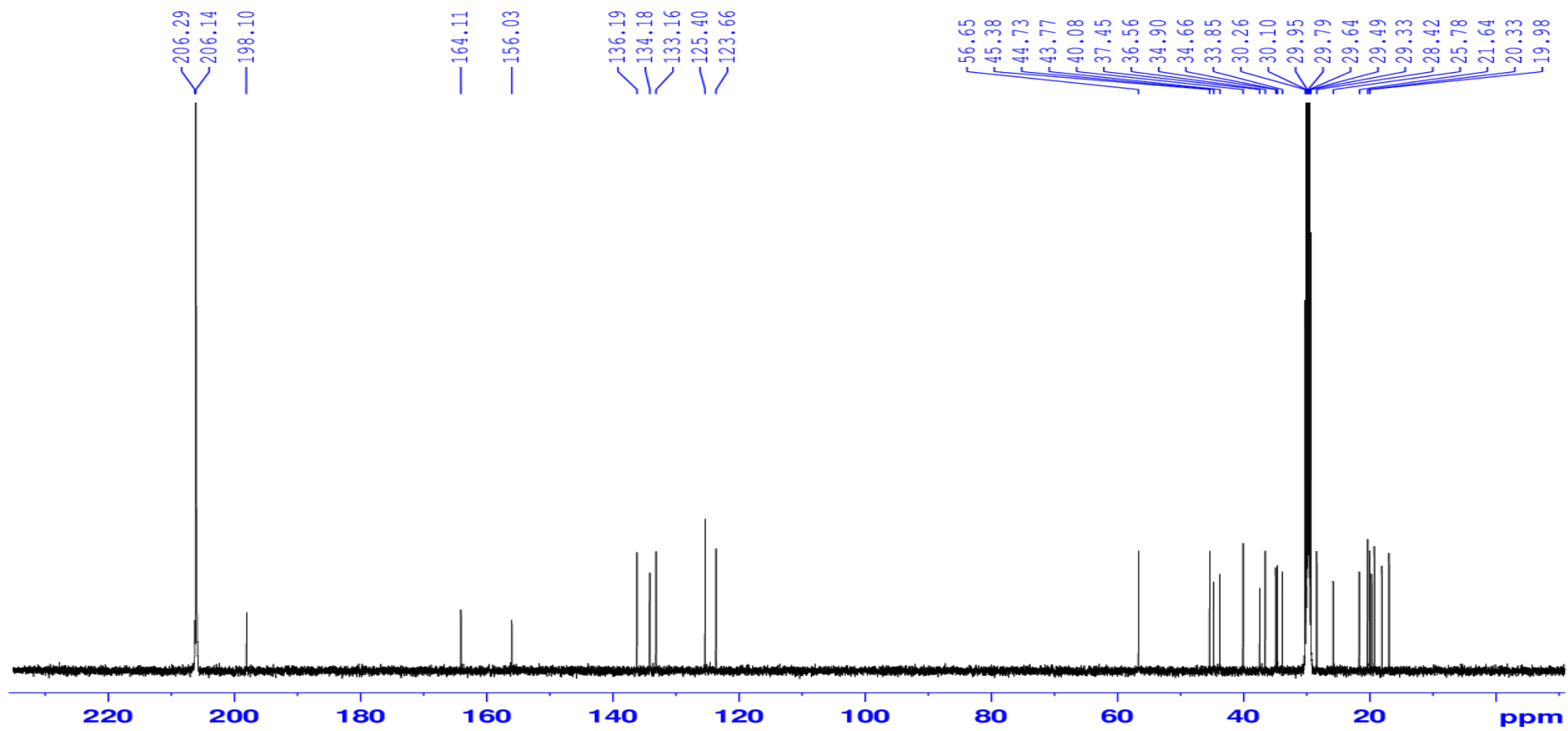
===== CHANNEL f1 =====
SFO1     500.2049890 MHz
NUC1     1H
P1       7.90 usec
PLW1     13.19999981 W

F2 - Processing parameters
SI       65536
SF       500.2019086 MHz
WDW      EM
SSB      0
LB       0.30 Hz
GB       0
PC       1.00
```



Hình: Phổ ¹H-NMR chất RT1 (1)

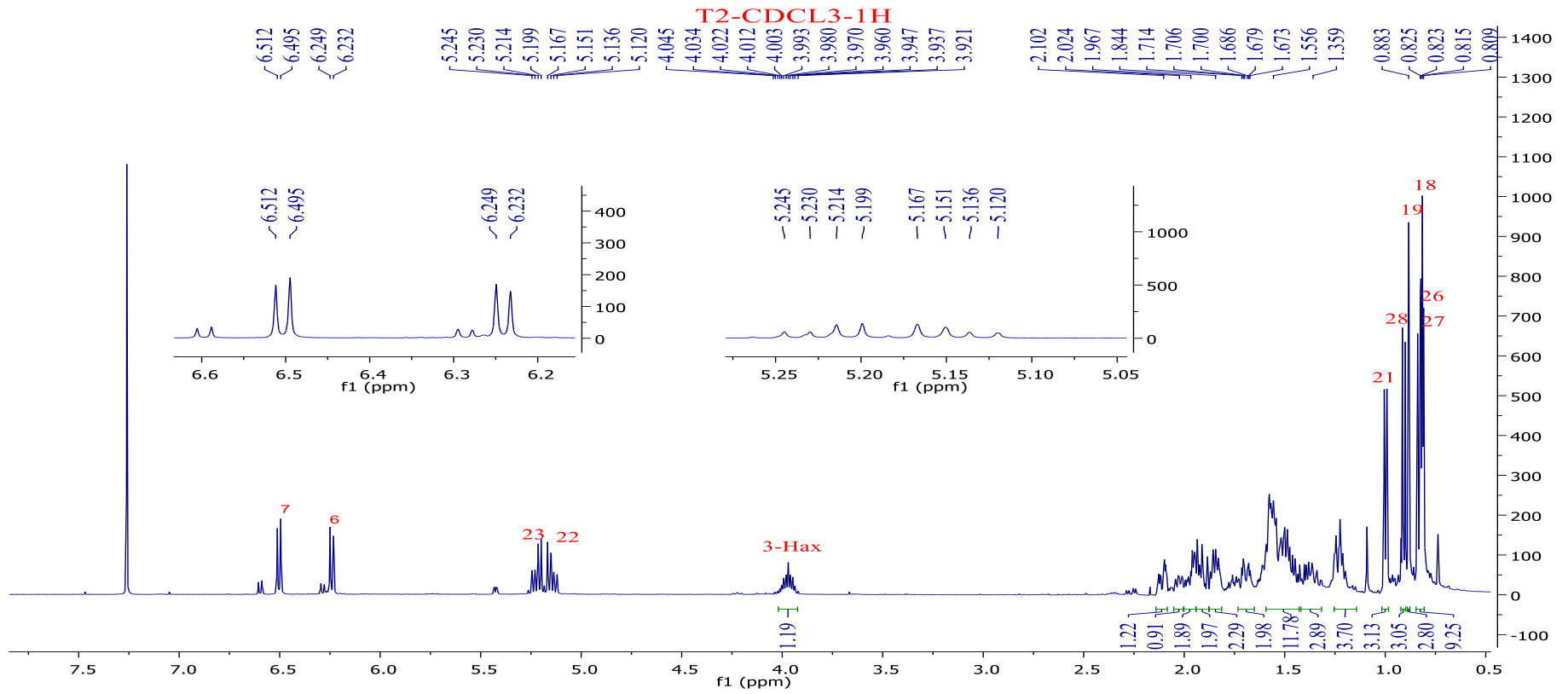
RT1-AcetoneD6-C13CPD



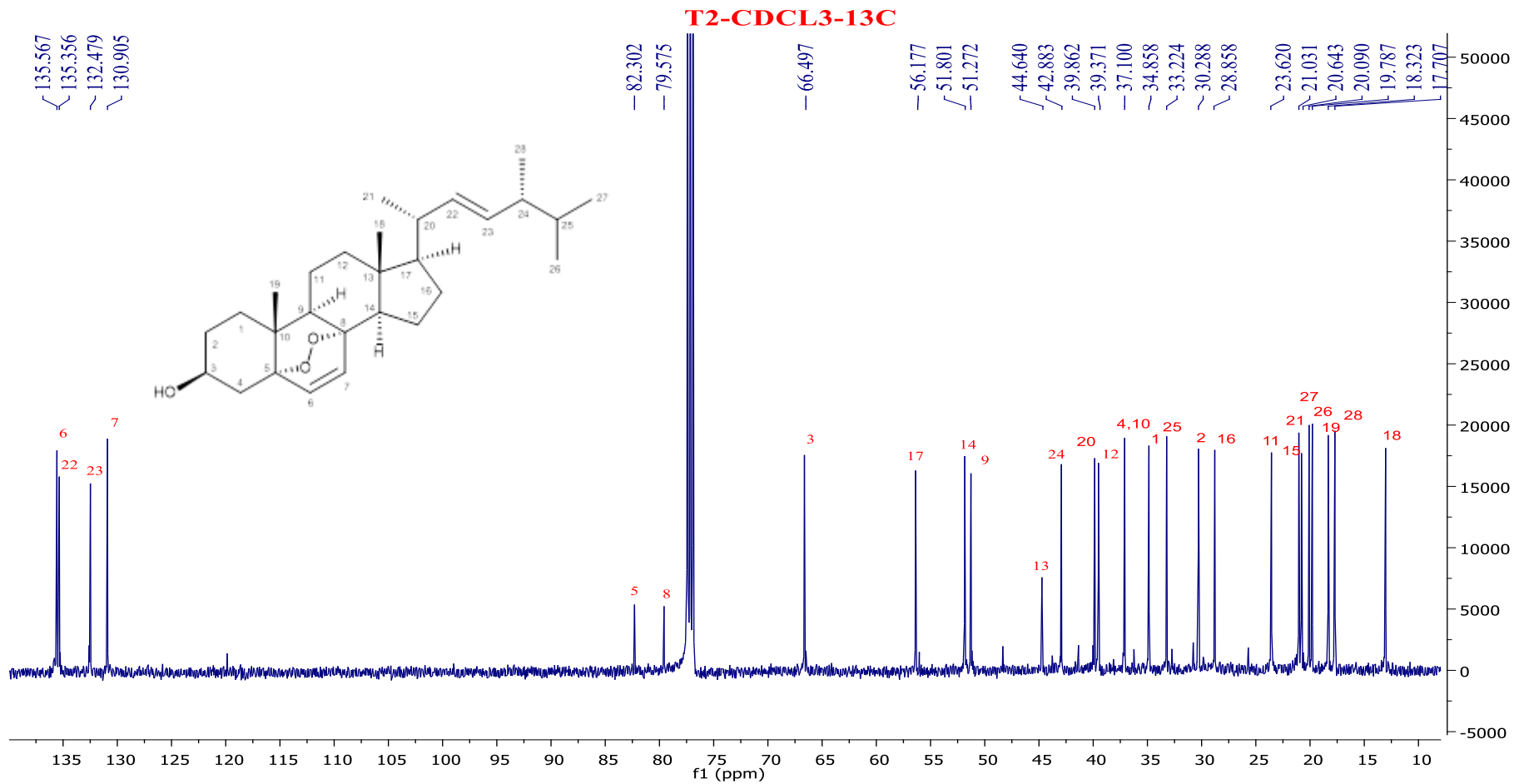
Hình: Phổ ^{13}C -NMR chất RT1 (1)

4.2. Ergosterol peroxid (CN2)

Vi trí	CN2 ⁽³⁾		Ergosterol peroxid ⁽⁴⁾	
	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
1		34.9		34.7
2		30.3		30.2
3	3.97 (<i>m</i>)	66.6	3.97 (<i>m</i>)	66.5
4		37.1		37.0
5		82.3		79.5
6	6.20 (<i>d</i> , 8.5)	135.6	6.24 (<i>d</i> , 8.4)	130.8
7	6.50 (<i>d</i> , 8.5)	130.9	6.50 (<i>d</i> , 8.4)	135.5
8		79.6		82.2
9		51.3		51.7
10		36.2		37.0
11		20.8		20.7
12		39.5		39.4
13		44.7		44.6
14		51.8		51.1
15		23.6		23.4
16		28.8		28.7
17		56.4		56.2
18	0.84 (<i>s</i>)	13.0	0.82 (<i>s</i>)	12.9
19	0.88 (<i>s</i>)	18.3	0.88 (<i>s</i>)	18.2
20		39.9		39.8
21	0.99 (<i>d</i> , 6.5)	21.0	1.00 (<i>d</i> , 6.5)	20.9
22	5.15 (<i>dd</i> , 15.5, 8.0)	132.5	5.14 (<i>dd</i> , 15.3, 7.8)	132.3
23	5.20 (<i>dd</i> , 15.5, 7.5)	135.4	5.22 (<i>dd</i> , 15.3, 7.0)	135.2
24		42.9		42.8
25		33.2		33.1
26	0.82 (<i>d</i> , 7.0)	18.3	0.82 (<i>d</i> , 6.3)	19.7
27	0.80 (<i>d</i> , 7.0)	20.1	0.83 (<i>d</i> , 6.5)	20.0
28	0.91 (<i>d</i> , 6.5)	17.7	0.91 (<i>d</i> , 6.8)	17.6



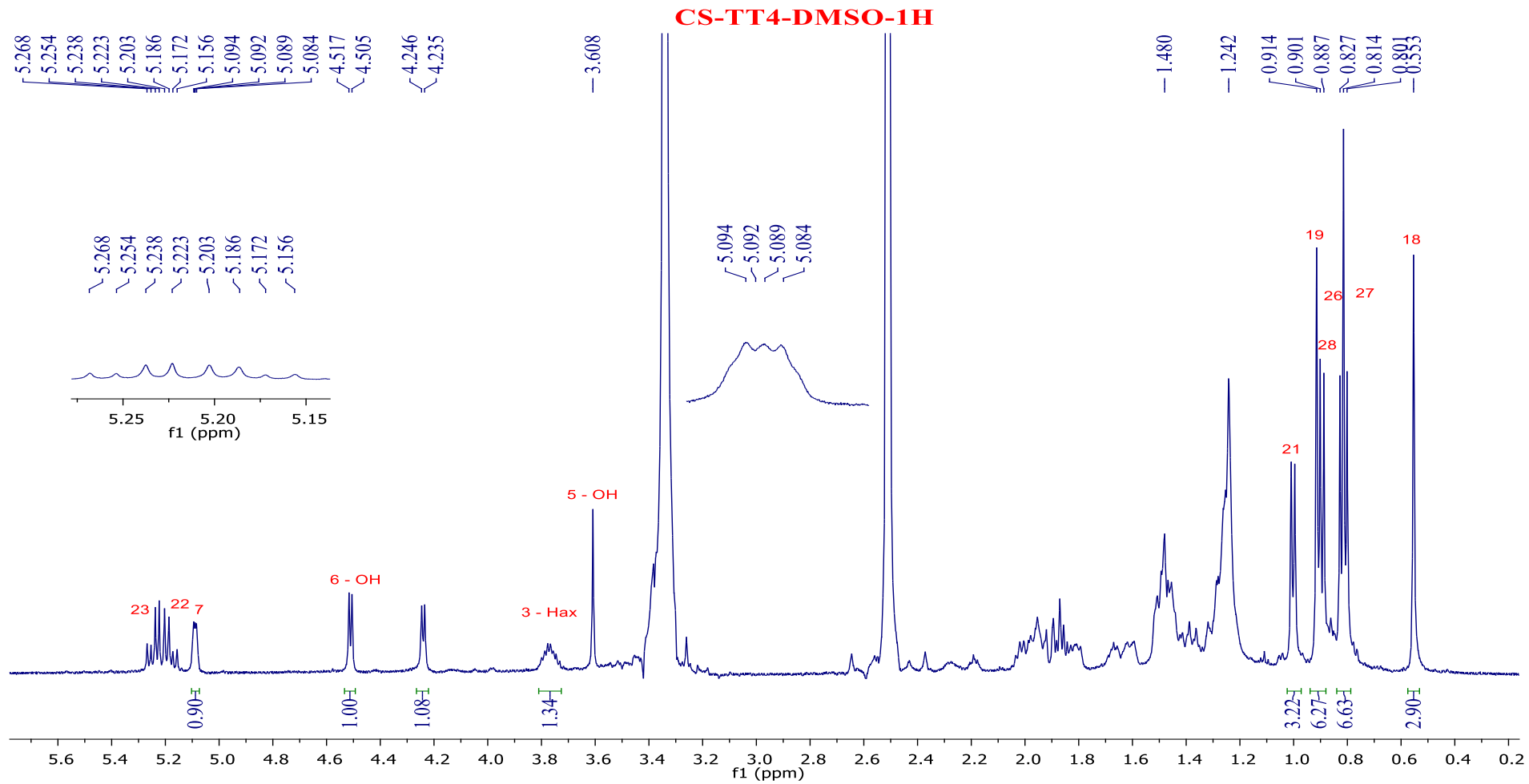
Hình: Phổ $^1\text{H-NMR}$ chất CN2 (2)



Hình: Phổ ^{13}C -NMR chất CN2 (2)

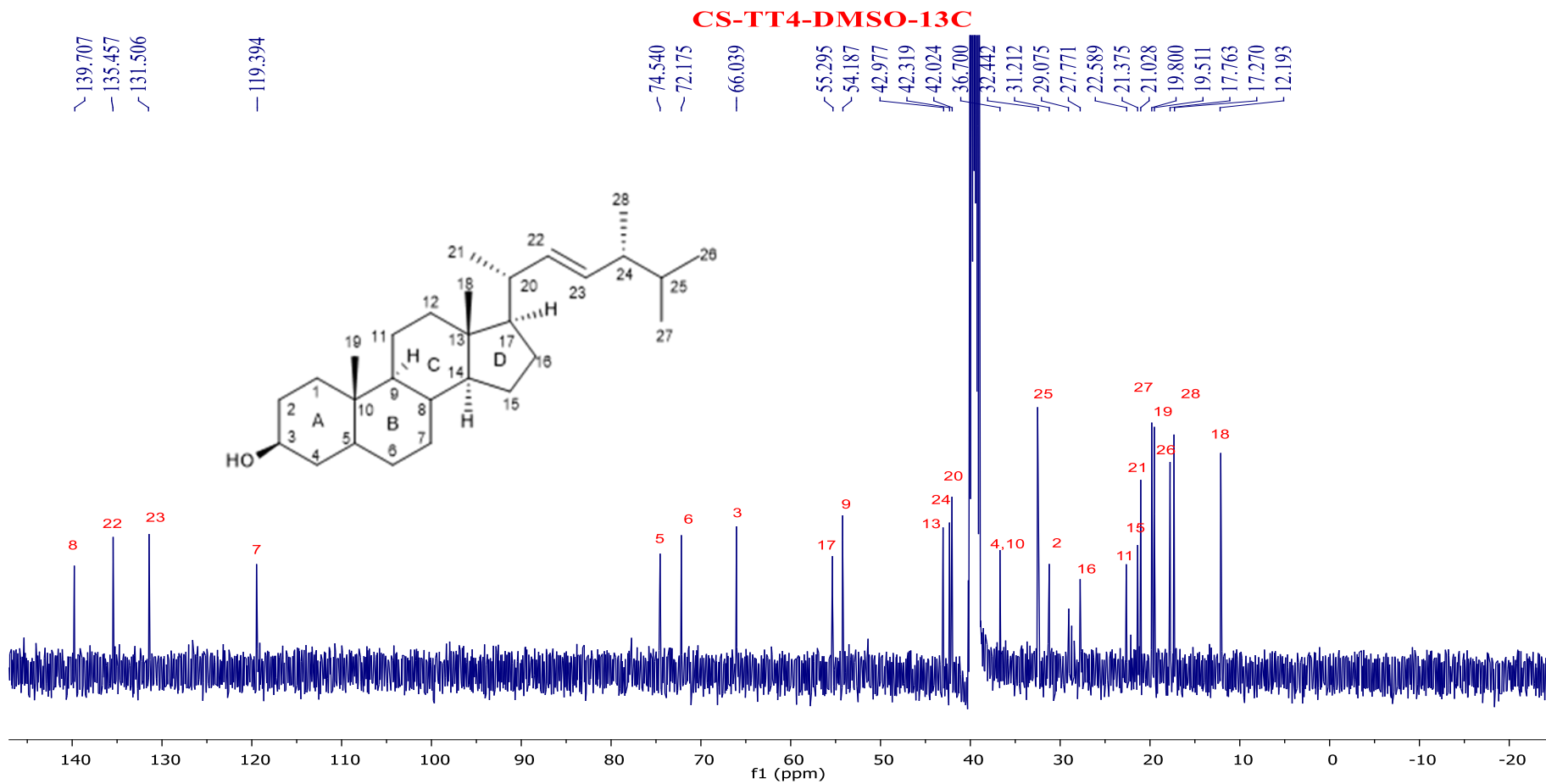
4.3. Ergosterol (CN3)

Vị trí	CN3 (1)		CN4 (2)		Ergosterol
	d_H (ppm)	d_C (ppm)	d_H (ppm)	d_C (ppm)	d_H (ppm)
1		33.4		32.6	
2		31.2		28.0	
3	3.77 (<i>m</i>)	66.0	3.75 (<i>m</i> , H-3 α)	68.7	3.63 (<i>m</i>)
4		36.7		40.7	
5		74.5		67.1	
6	3.34 (<i>m</i>)	72.2	3.32 (<i>d</i> ,)	62.2	5.39 (<i>m</i>)
7	5.25 (<i>dd</i> , 15.5, 7.0)	119.5	4.34 (<i>d</i> ,)	65.3	5.57 (<i>m</i>)
8		139.7		127.6	
9		54.2		40.1	
10		36.5		36.7	
11		22.6		19.9	
12		40.2		37.6	
13		43.0		43.6	
14		51.4		151.1	
15		21.4		25.3	
16		27.8		33.3	
17		55.4		57.9	
18	0.54 (<i>s</i>)	12.1	0.87 (<i>s</i>)	18.5	0.82 (<i>s</i>)
19	0.91 (<i>s</i>)	19.5	0.89 (<i>s</i>)	16.8	0.84 (<i>s</i>)
20		42.0		40.2	2.26 (<i>m</i>)
21	1.00 (<i>d</i> , 6.5)	21.0	1.03 (<i>d</i> , 6.5)	21.7	1.04 (<i>d</i>)
22	5.20 (<i>dd</i> , 15.5, 8.0)	131.5	5.25 (<i>m</i>)	136.5	5.17 (<i>m</i>)
23	5.24 (<i>dd</i> , 15.5, 7.0)	135.4	5.27 (<i>m</i>)	132.7	5.21 (<i>m</i>)
24		42.3		43.8	
25		32.5		33.9	
26	0.8 (<i>d</i> , 6.5)	17.8	0.86 (<i>d</i> , 6.5)	19.9	0.91 (<i>d</i>)
27	0.79 (<i>d</i> , 6.5)	19.8	0.86 (<i>d</i> , 6.5)	20.4	0.94 (<i>d</i>)
28	0.89 (<i>d</i> , 7.0)	17.3	0.94 (<i>d</i> , 6.5)	18.0	0.86 (<i>d</i>)

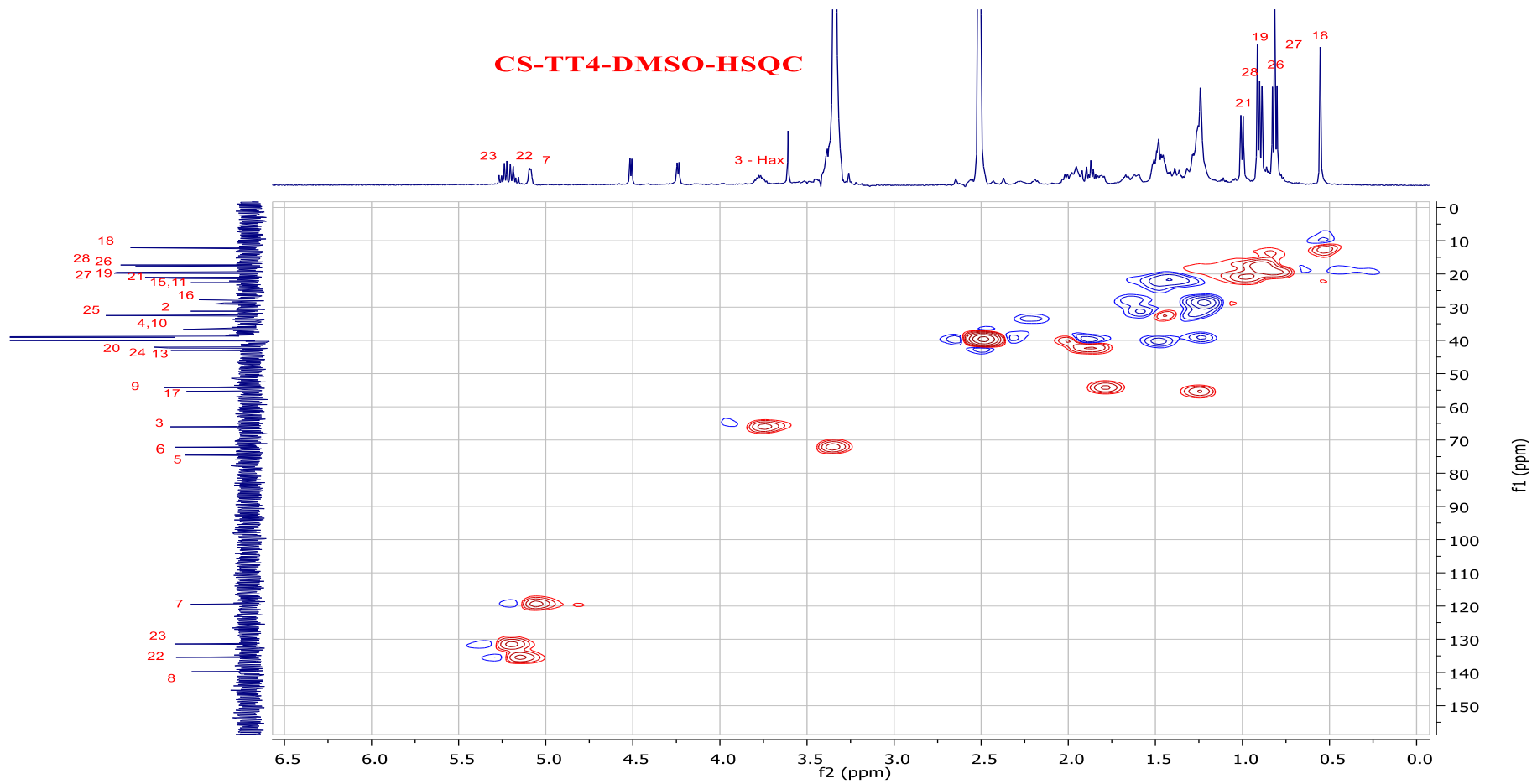


CN3 (3)

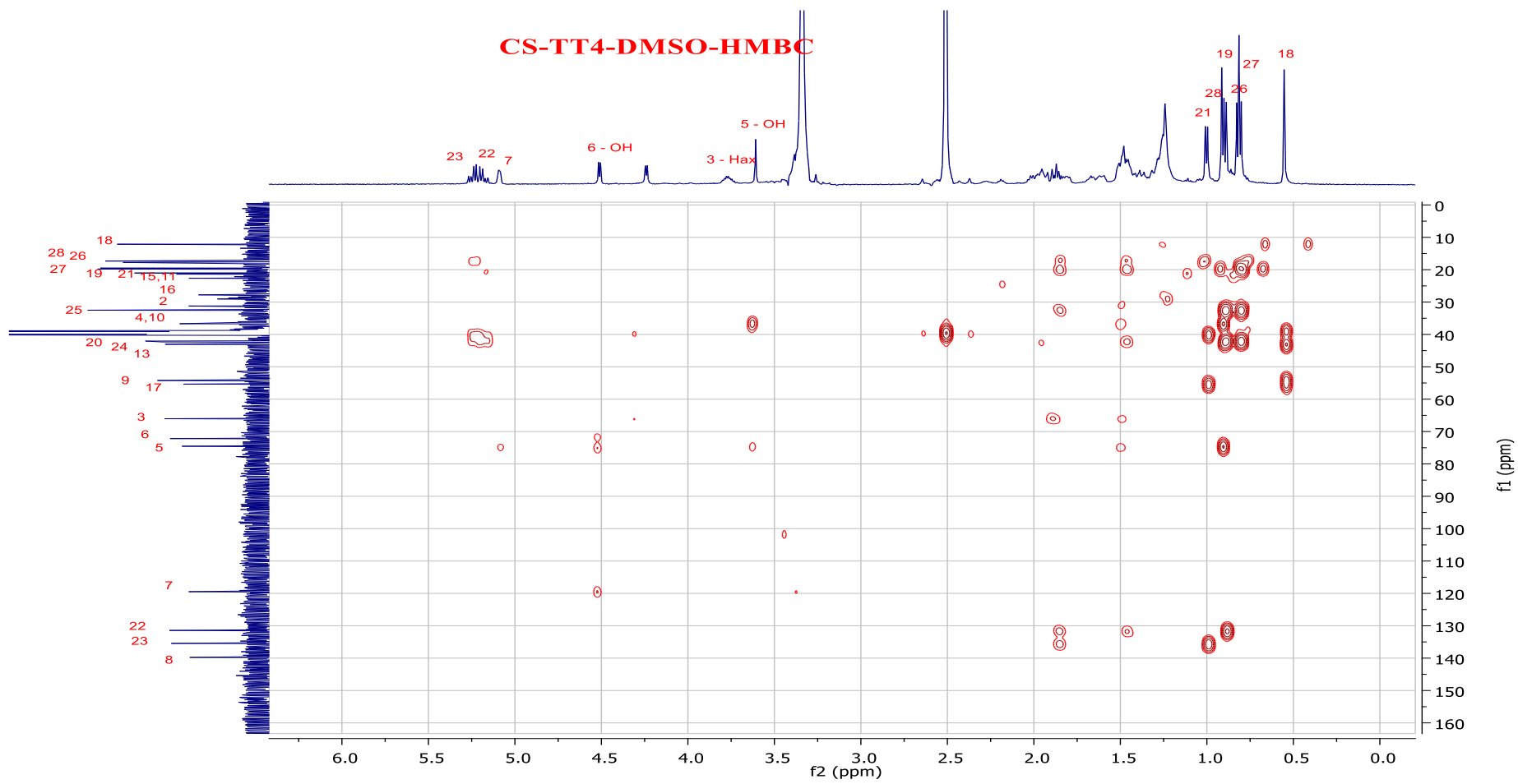
Hình: Phổ $^1\text{H-NMR}$ chất



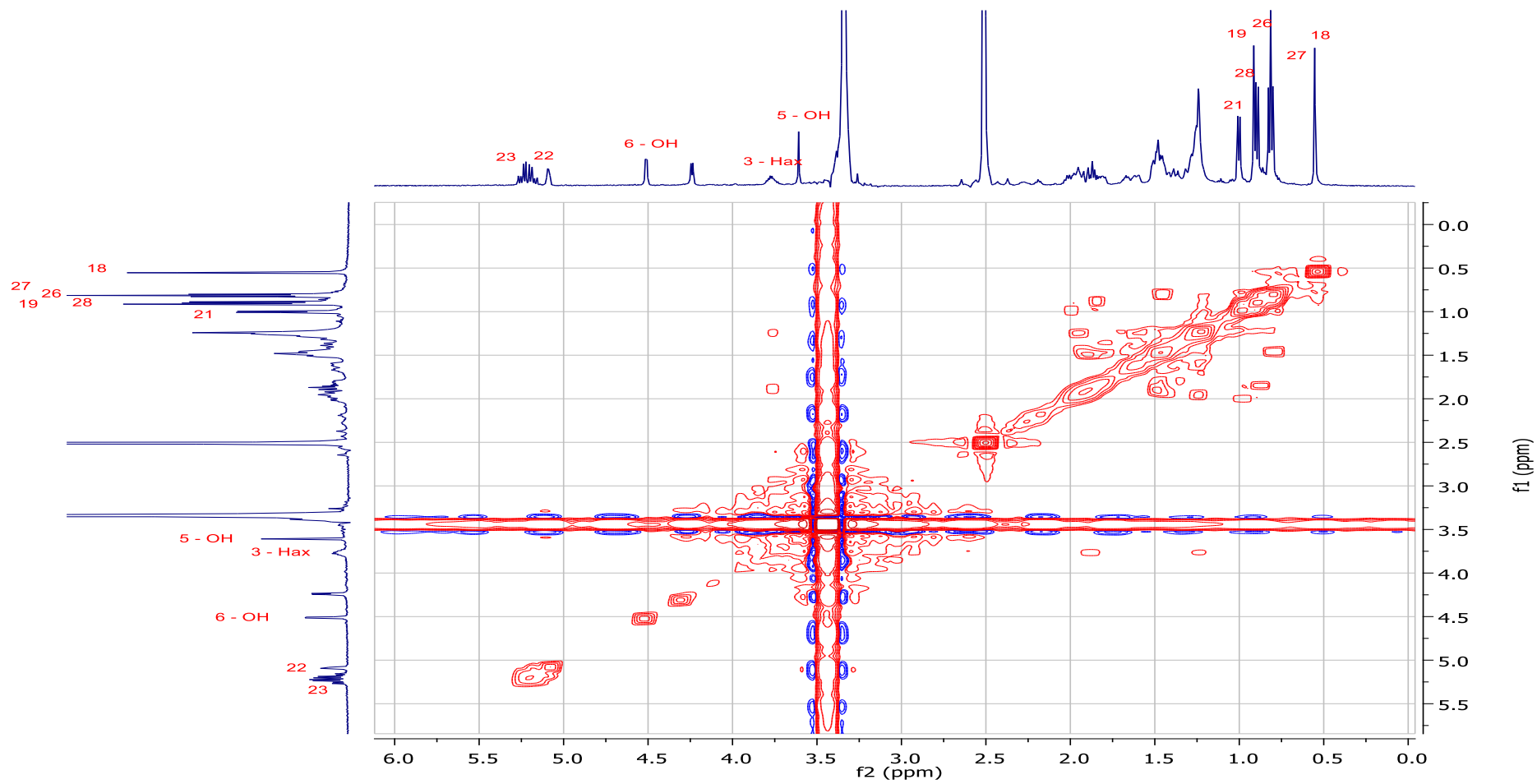
Hình: Phổ ^{13}C -NMR chất CN3 (3)



Phổ HSQC của (3)

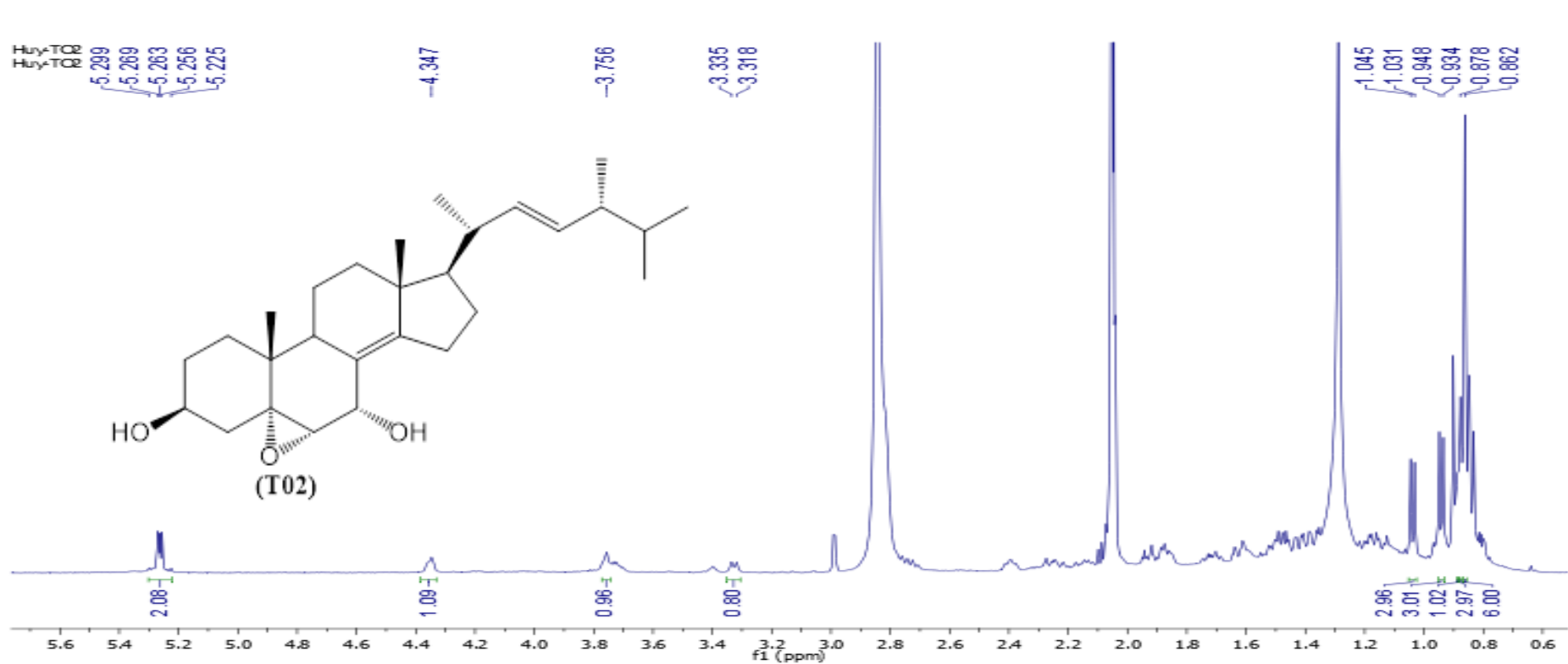


Phổ HMBC của (3)

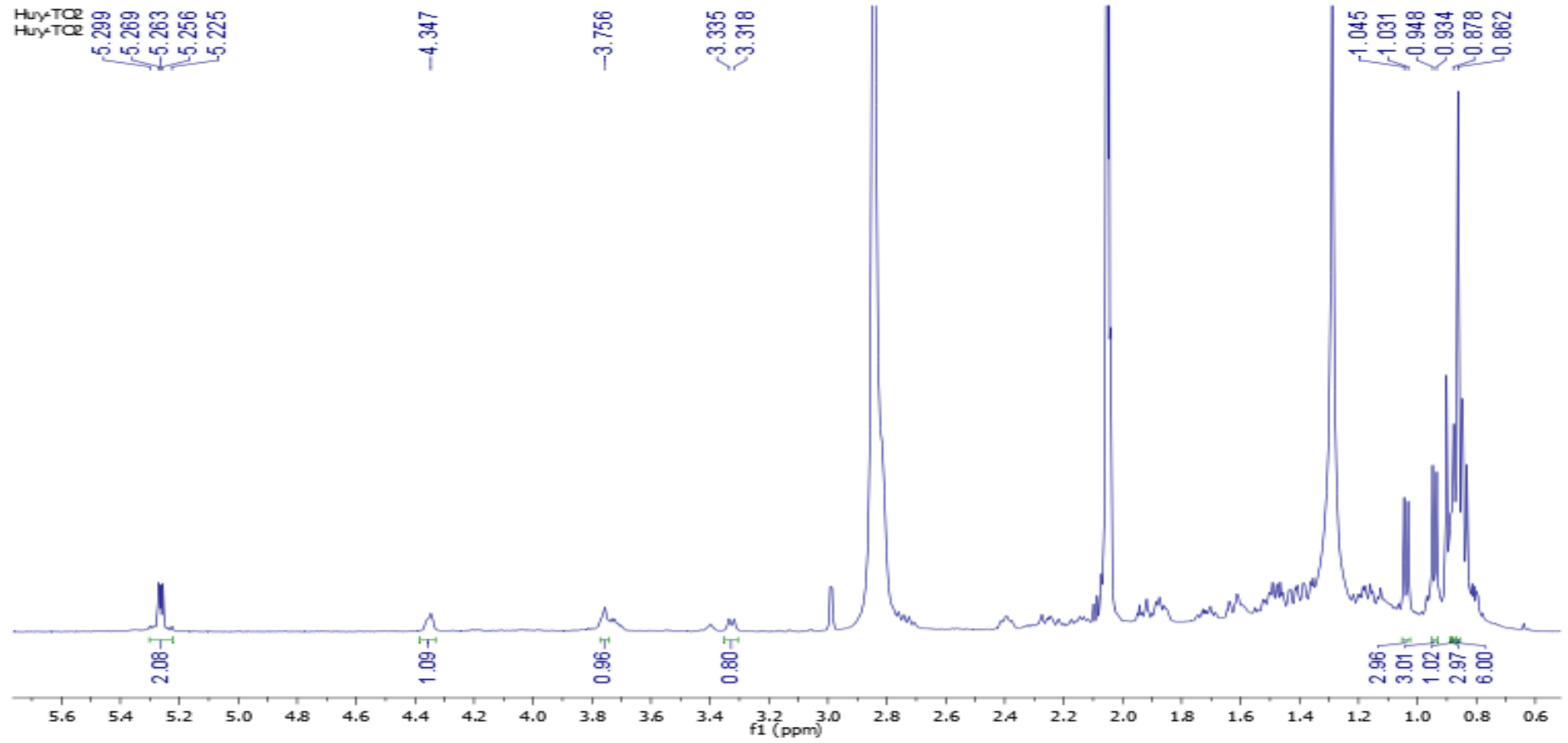


Phổ COSY của (3)

4.4. Melithasterol B (4)



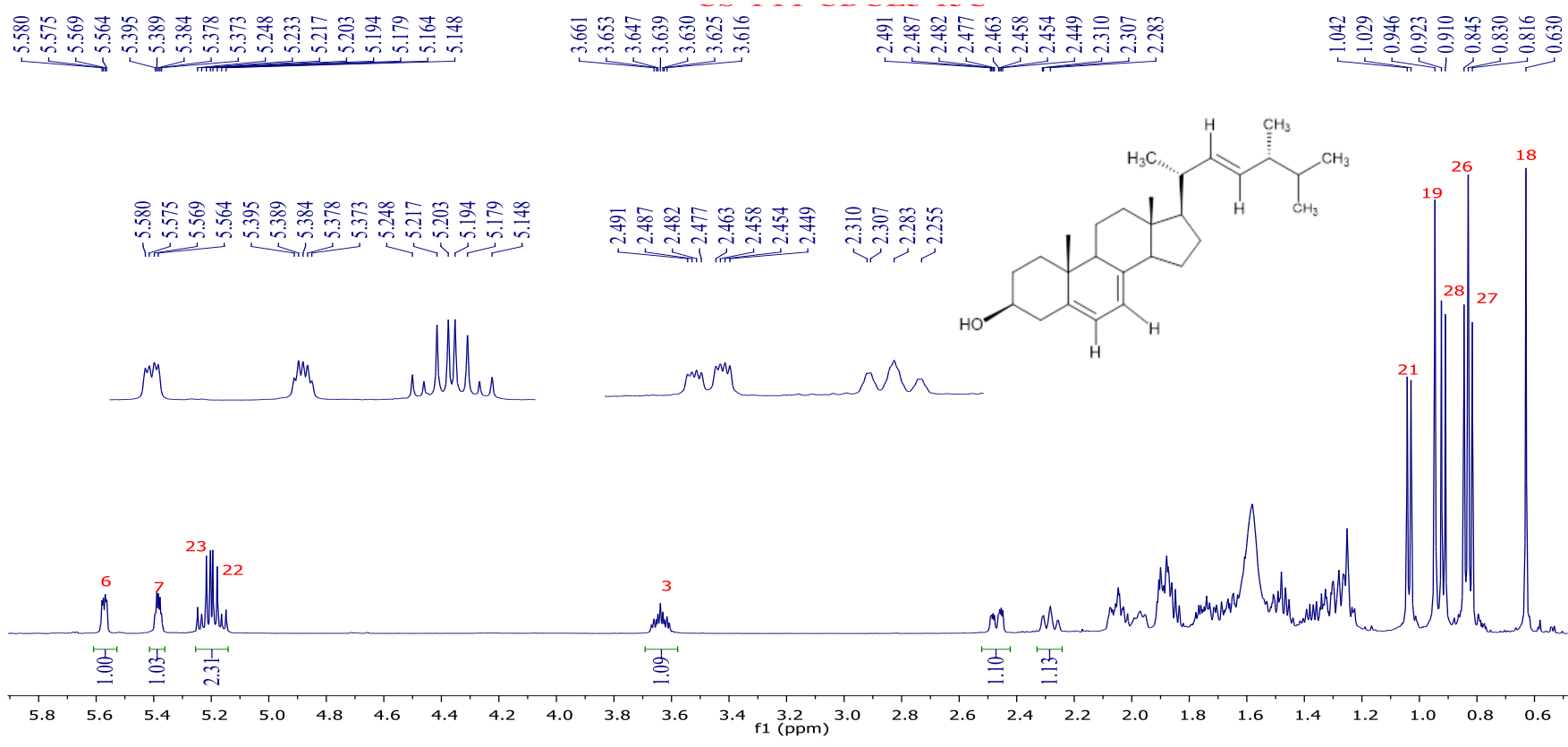
Hình: Phổ ¹H NMR của (4)



Hình: Phổ ^{13}C NMR của (4)

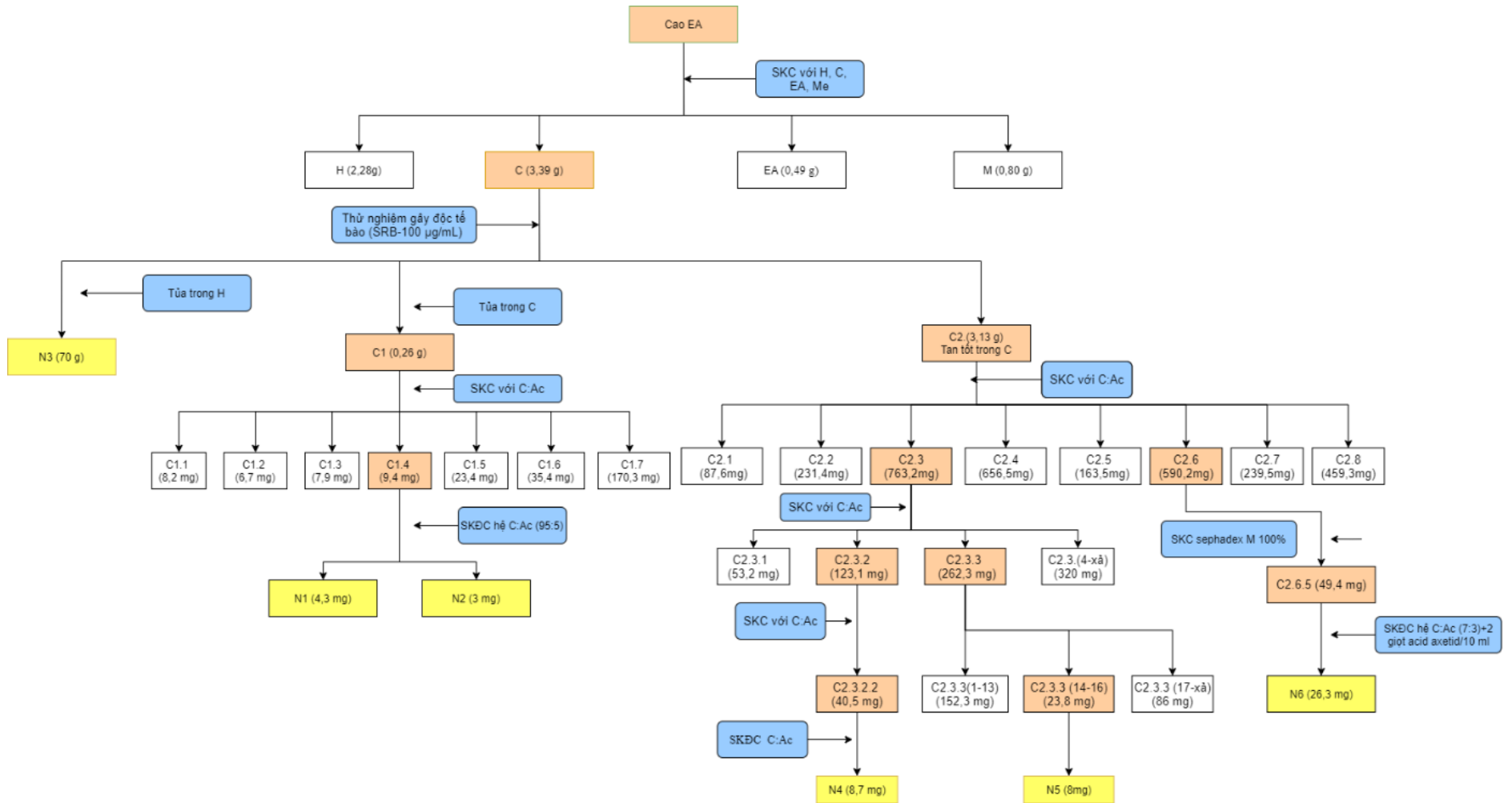
4.5. Ergosterol (CN5)

N	Ergosterol 3- <i>O</i> - β -D-glucopyranosid (**)		CN5 (***)	Ergosterol (***)
	δ_H, J (Hz)	δ_C	δ_H, J (Hz)	δ_H, J (Hz)
1		38.0		
2		30.6		
3	4.06 (<i>m</i>)	76.8	3.64 (<i>m</i>)	3.63 (<i>m</i>)
4		38.0		
5		140.2		
6	6.64 (<i>m</i>)	120.1	5.57 (<i>m</i>)	5.57 (<i>m</i>)
7	6.46 (<i>m</i>)	117.0	5.38 (<i>m</i>)	5.39 (<i>m</i>)
8		141.0		
9		46.4		
10		37.5		
11		21.3		
12		39.3		
13		43.0		
14		54.8		
15		23.4		
16		28.7		
17		55.8		
18	0.66 (<i>s</i>)	12.2	0.63 (<i>s</i>)	0.82 (<i>s</i>)
19	0.95 (<i>s</i>)	16.4	0.95 (<i>s</i>)	0.84 (<i>s</i>)
20		40.8		2.26 (<i>m</i>)
21	1.09 (<i>d</i> , 6.8)	21.4	1.03 (<i>d</i> , 6.5)	1.04 (<i>d</i>)
22	5.24 (<i>dd</i> , 15.6, 7.6)	136.1	5.17 (<i>dd</i> , 15.0, 7.5)	5.17 (<i>dd</i>)
23	5.30 (<i>dd</i> , 15.6, 7.6)	132.5	5.23 (<i>dd</i> , 15.5, 7.5)	5.21 (<i>dd</i>)
24		43.1		
25		33.4		
26	0.88 (<i>d</i> , 6.8)	19.9	0.83 (<i>d</i> , 7.5)	0.91 (<i>d</i>)
27	0.89 (<i>d</i> , 6.8)	20.1	0.84 (<i>d</i> , 7.0)	0.94 (<i>d</i>)
28	0.99 (<i>d</i> , 6.8)	17.9	0.92 (<i>d</i> , 6.5)	0.86 (<i>d</i>)
1'	5.05 (<i>d</i> , 7.3)	102.6		
2'	4.06 (<i>m</i>)	75.3		
3'	4.29 (<i>m</i>)	78.5		
4'	4.29 (<i>m</i>)	71.7		
5'	3.99 (<i>m</i>)	78.2		
6'	5.30 (<i>m</i>)	62.9		
6'	4.58 (<i>m</i>)			



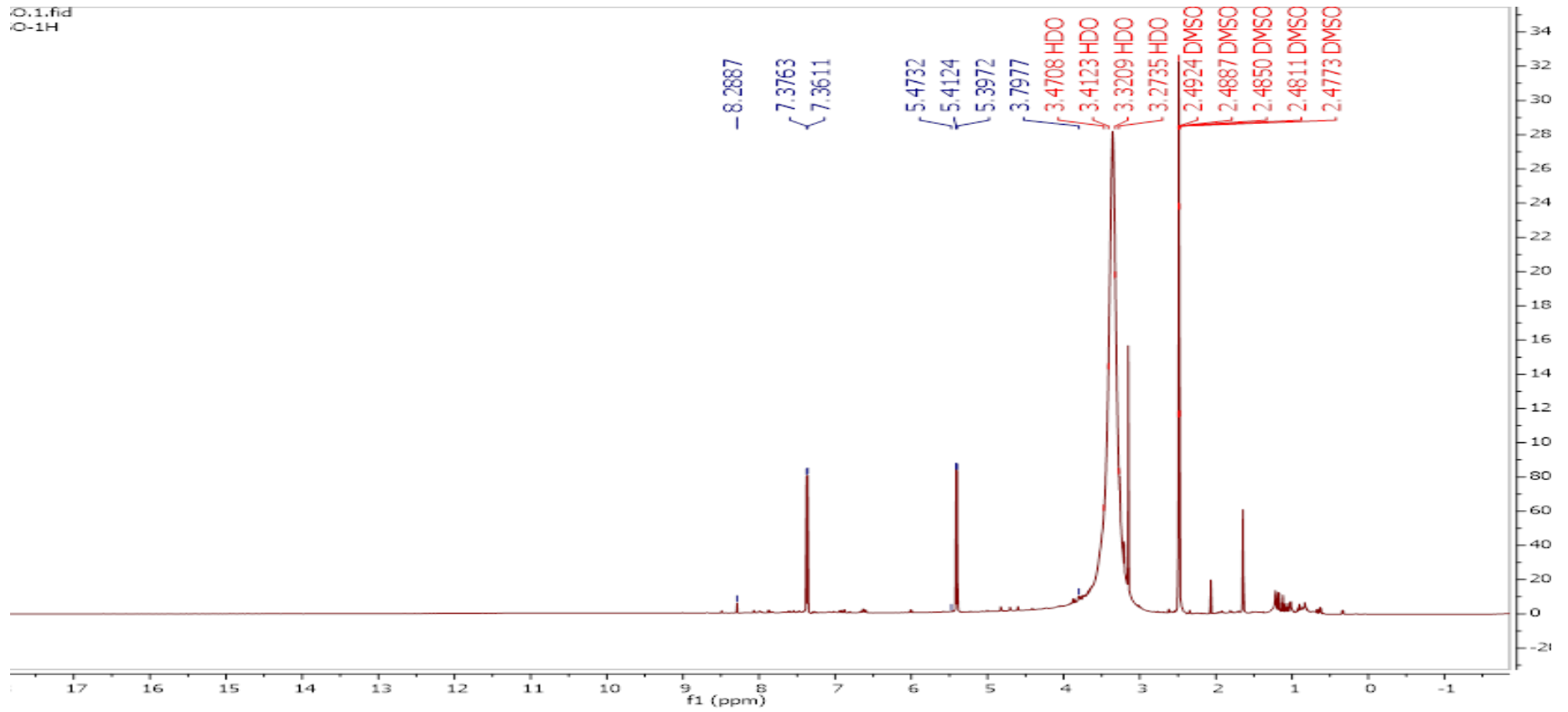
Hình: Phổ ¹H NMR của (CN5)

Phụ lục 5: Sơ đồ tách chất từ cao EA từ quả thể *I. cicadae* F0004



Phụ lục 6: Hình phổ, so sánh và định danh các chất từ cao QT EA của *I. cicadae* F0004

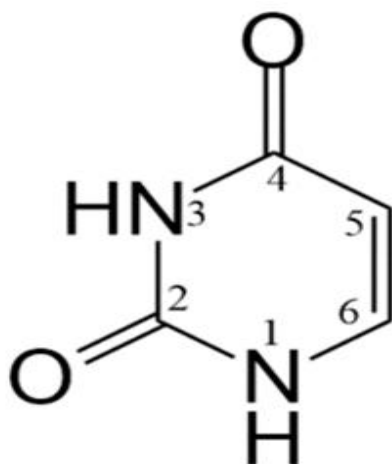
6.1. Uracil (IC1)



Hình: Phổ ¹H chất IC1

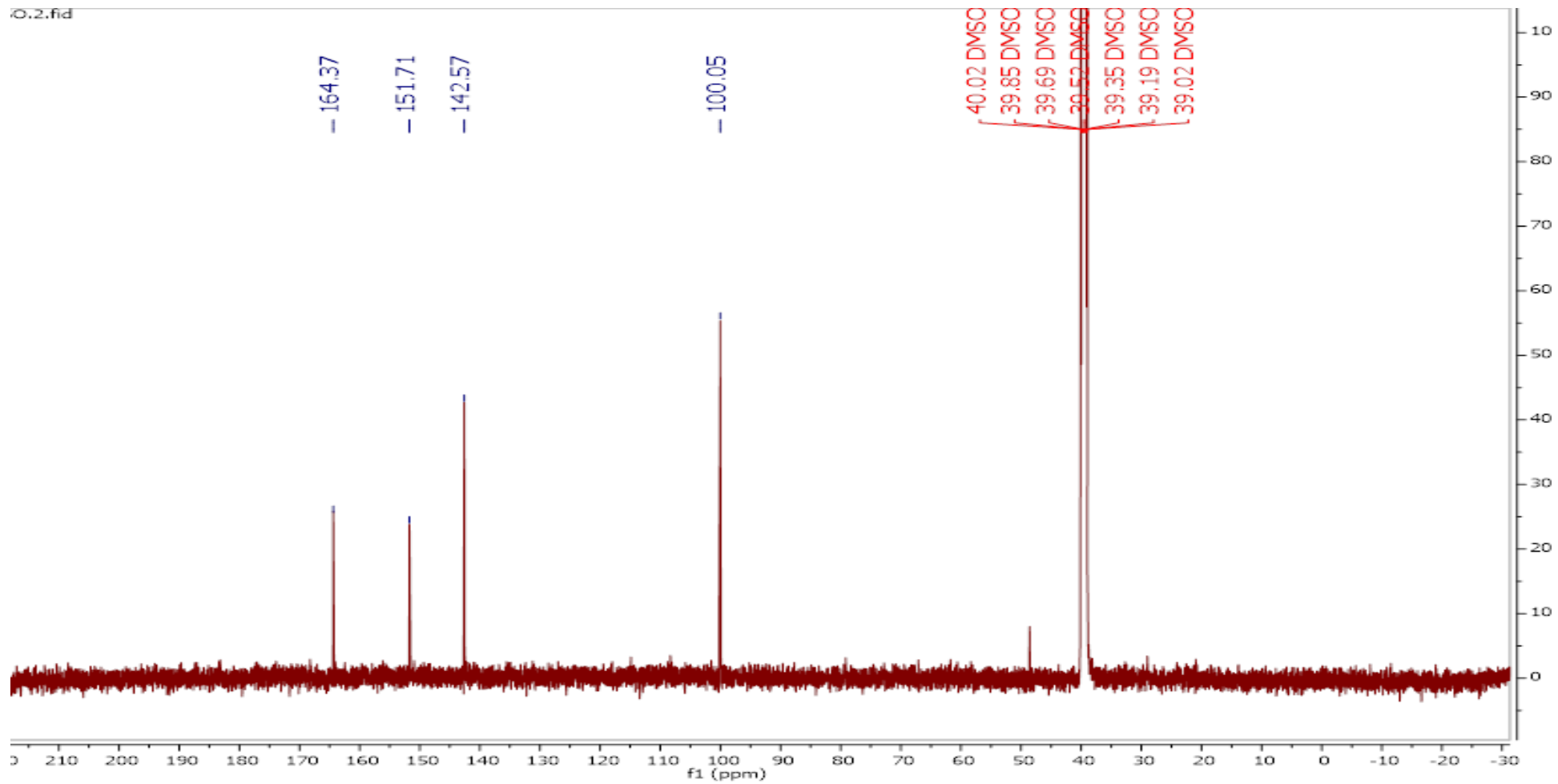
Bảng so sánh kết quả phổ ^1H NMR và ^{13}C NMR của IC1 và uracil

	N1 (DMSO)		Uracil (DMSO)	
	δ_{H} , J (Hz)	δ_{C}	δ_{H} , J (Hz)	δ_{C}
2		151,7		151,4
4		164,8		164,3
5	5,42 (1H, <i>d</i> , 7,6)	100,1	5,44 (1H, <i>d</i> , 7,5)	100,2
6	7,38 (1H, <i>d</i> , 7,6)	142,6	7,37 (1H, <i>d</i> , 7,5)	142,1



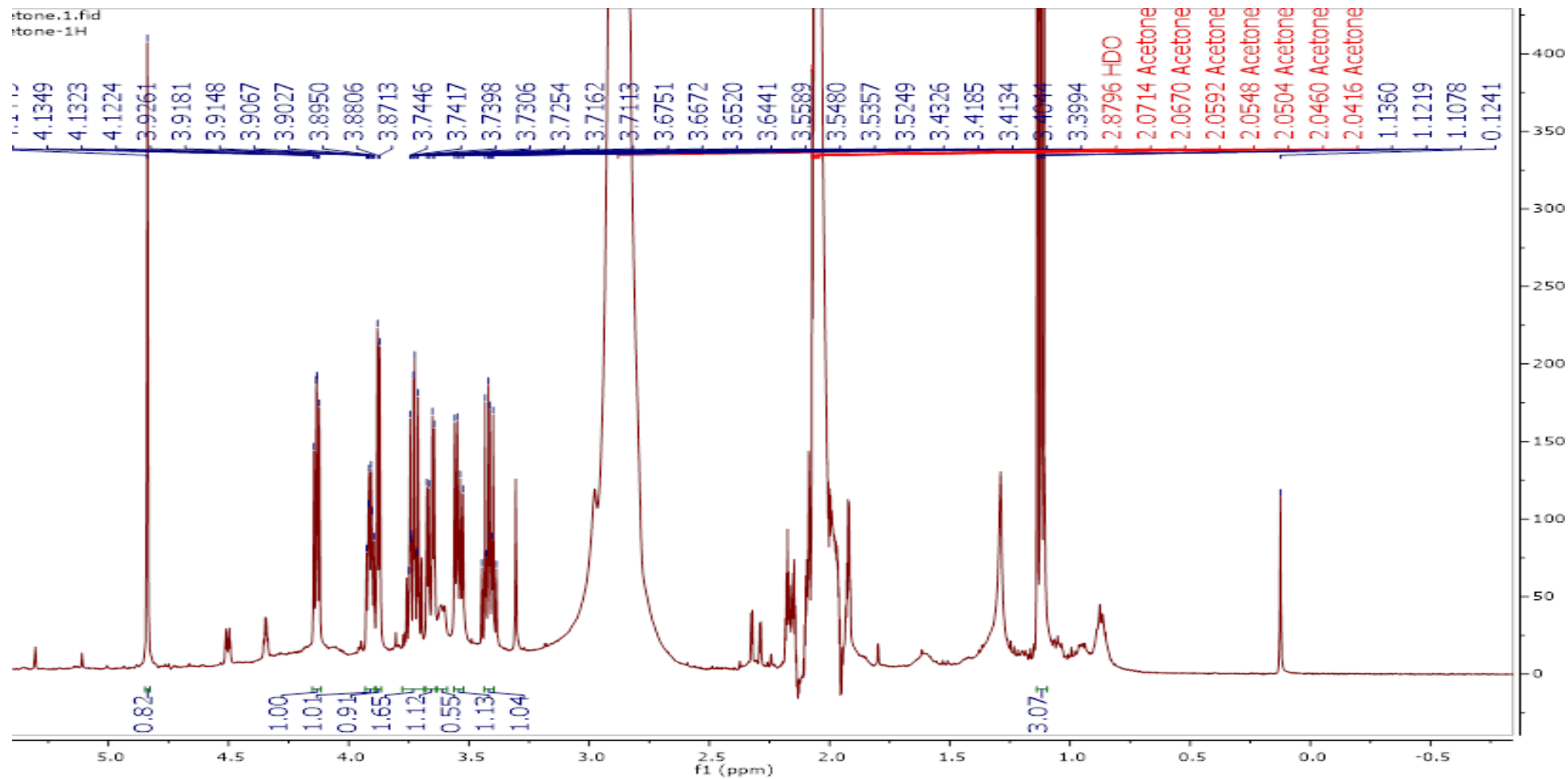
Hình cấu trúc uracil

0.2.fid



Hình: Phổ ^{13}C chất IC1

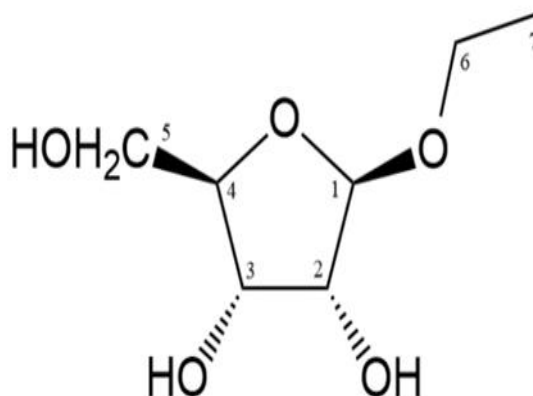
6.2. Chất 1-O-Ethyl- β -D-ribofuranose (IC2)



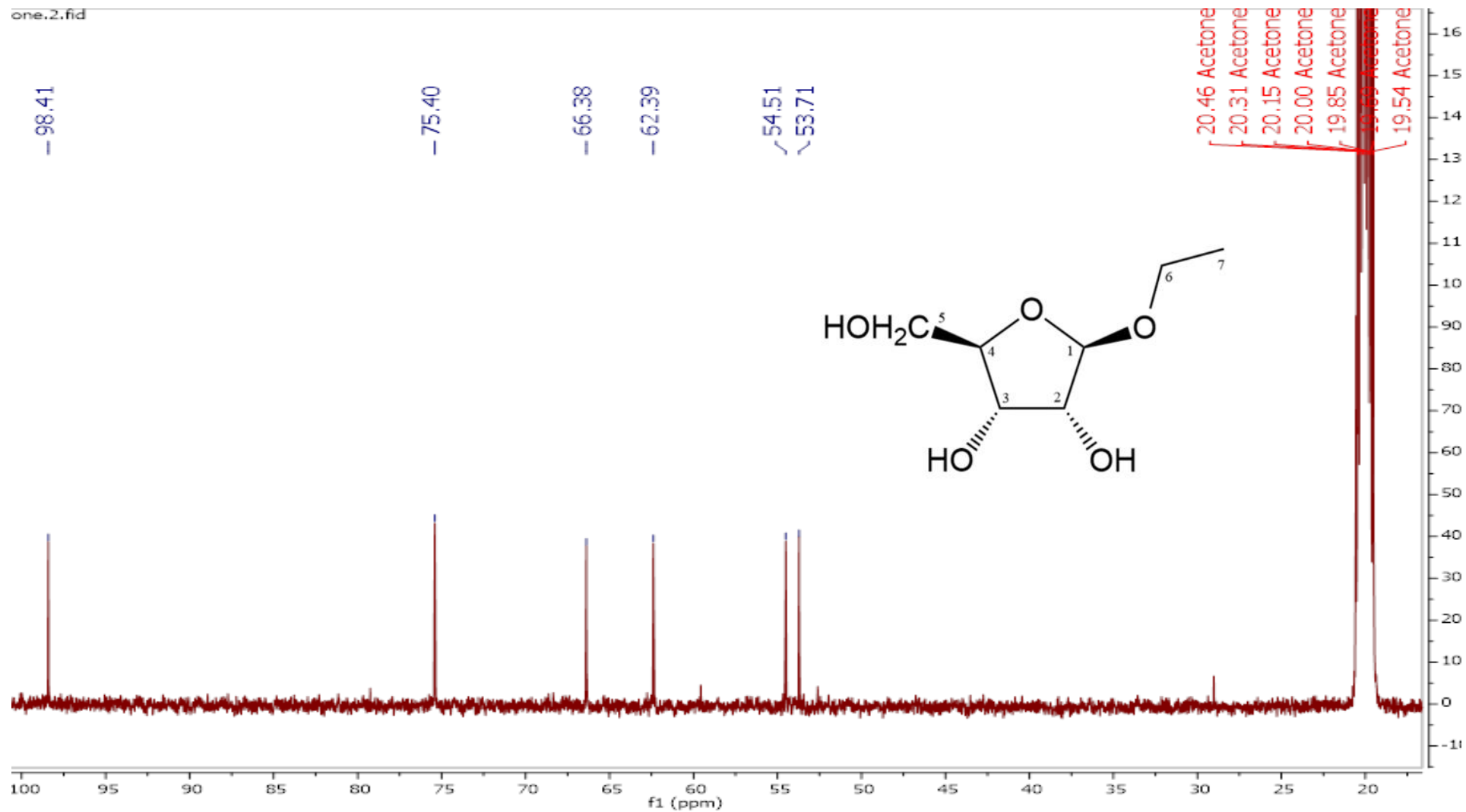
Hình: Phổ ^1H chất IC2

Bảng 4. 1: So sánh kết quả phổ ^1H NMR và ^{13}C NMR của hợp chất IC2 (DMSO) và 1-O-Ethyl- β -D-ribofuranose

	IC2 (DMSO)		1-O-Ethyl- β -D-ribofuranose (CDCl_3)	
	δ_H , J (Hz)	δ_C	δ_H , J (Hz)	δ_C
1	4,83 (1H; <i>d</i> ; 4,7)	108,7	4,3 (1H; <i>d</i> ; 5,5)	107,4
2	4,13 (2H; <i>dd</i> ; 6,3 - 5,0)	85,7	4,03–4,06 (2H; <i>m</i>)	84,3
3	3,88 (2H; <i>d</i> ; 4,7)	72,7	4,03–4,06 (2H; <i>m</i>)	71,4
	3,91 (1H; <i>td</i> ; 5,75 - 3,92)	76,7	3,73–3,79 (1H; <i>m</i>)	75,7
5a	3,66 (1H; <i>dd</i> ; 11,54 - 3,95)	64,7	3,67 (1H; <i>dd</i> ; 5,0 - 11,4)	64,3
5b	3,54 (1H; <i>dd</i> ; 11,58 - 5,42)		3,73–3,79 (1H; <i>m</i>)	
6a	3,42 (2H; <i>dq</i> ; 9,6 - 7,1)	64,0	3,52 (1H; <i>dq</i> ; 7,4 8,3)	63,3
6b	3,73 (1H, <i>m</i>)		3,73–3,79 (1H, <i>m</i>)	
7	1,12 (3H, <i>t</i> , 7,1)	15,9	1,2 (3H, <i>t</i> , 7,1)	15,2

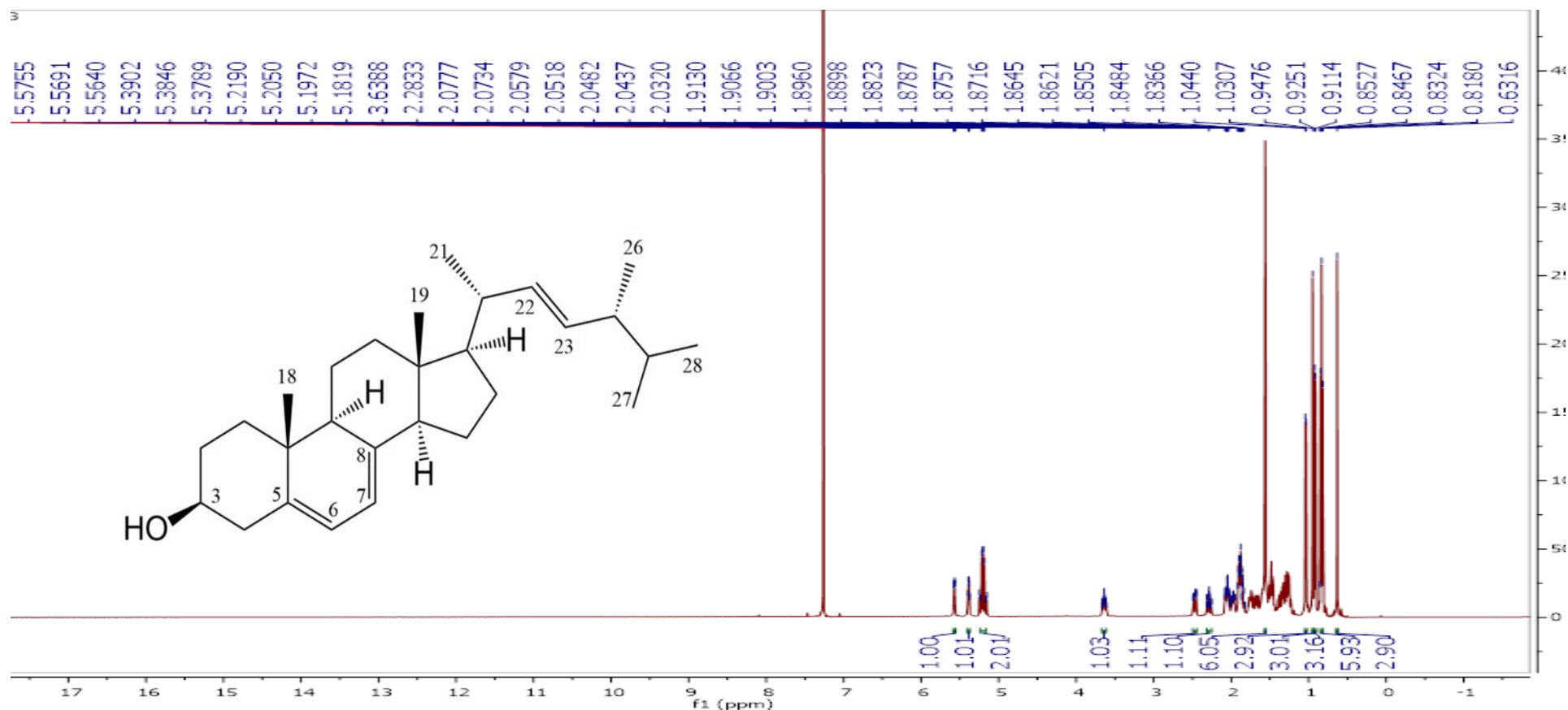


Hình cấu trúc IC2



Hình: Phổ ¹³C chất IC2

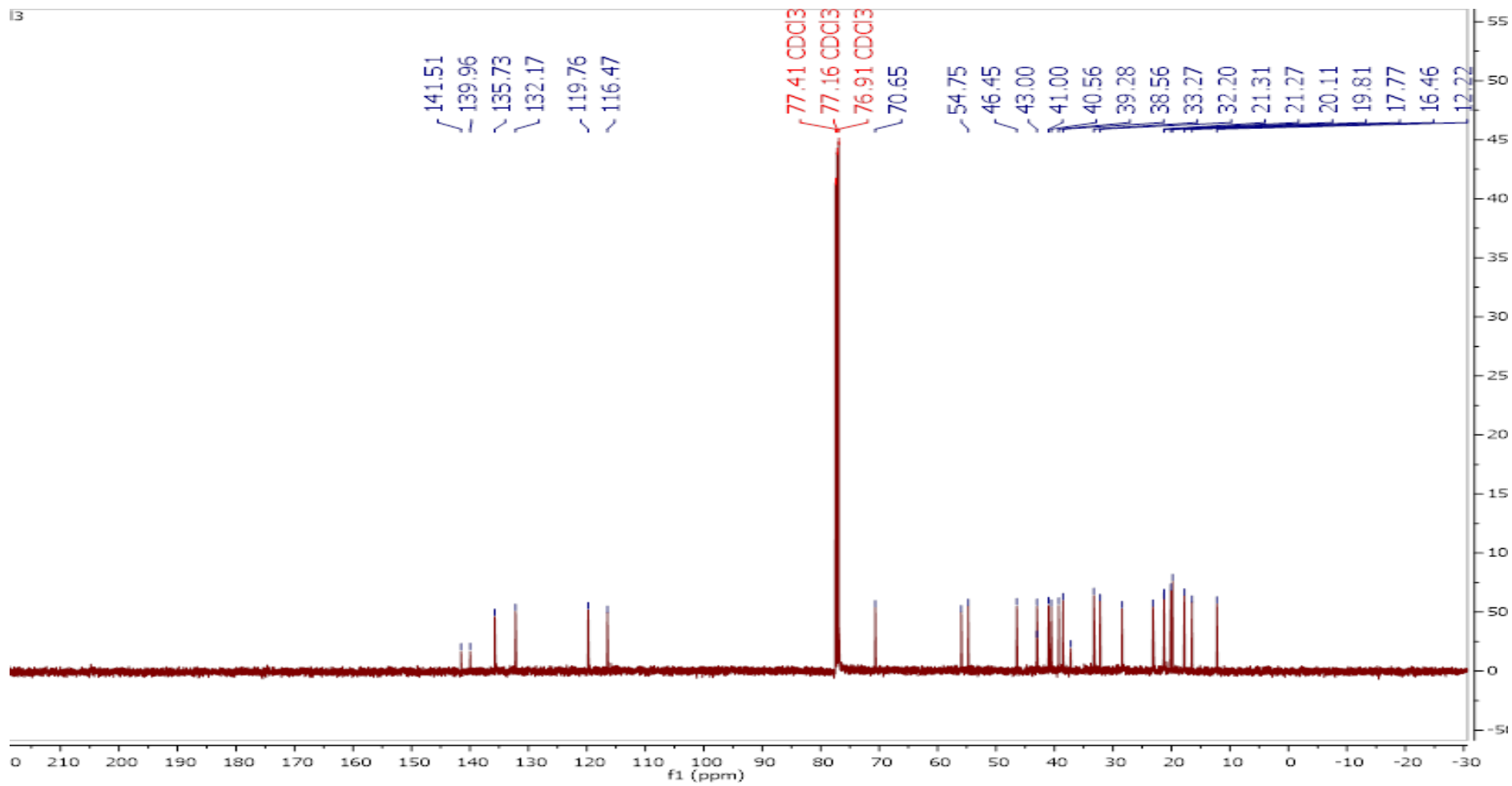
6.3. Ergosterol (IC3)



Hình: Phổ ¹H chất IC3

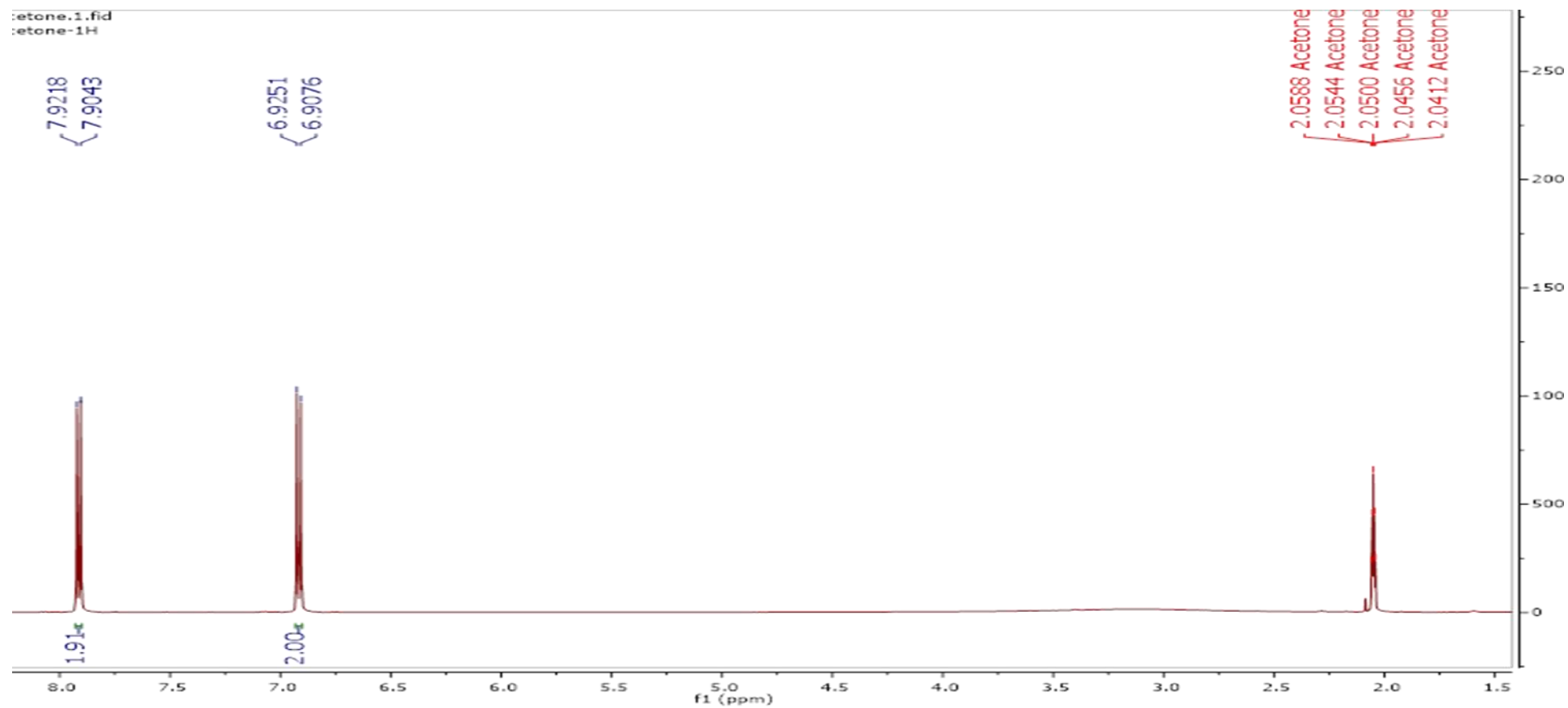
Bảng so sánh kết quả phổ ^1H NMR và ^{13}C NMR của đơn chất IC3 (CDCl_3) và ergosterol

	IC3(CDCl_3)		Ergosterol	
	δ_H , J (Hz)	δ_C	δ_H , J (Hz)	δ_C
1		38,6		39,0
2		32,2		33,0
3	3,64 (1H, <i>m</i>)	70,7	3,67 (1H, <i>m</i>)	69,9
4		41,0		42,0
5		139,9		140,8
6	5,57 (1H, <i>m</i>)	119,8	5,56 (1H, <i>m</i>)	119,6
7	5,38 (1H, <i>m</i>)	116,5	5,39 (1H, <i>m</i>)	117,1
8		141,5		141,3
9		46,5		46,6
10		37,2		37,5
11		39,3		39,4
12		21,3		21,4
13		43,0		43,0
14		54,8		54,8
15		23,2		23,4
16		28,4		28,7
17		55,9		55,9
18	0,63 (3H, <i>s</i>)	12,2	0,63 (3H, <i>s</i>)	12,2
19	0,95 (3H, <i>s</i>)	16,5	0,94 (3H, <i>s</i>)	16,6
20		40,6		40,8
21	1,04 (3H, <i>d</i> , 6,7)	21,3	1,04(3H, <i>d</i> , 6,6)	21,4
22	5,20 (2H, <i>m</i>)	135,7	5,20 (1H, <i>m</i>)	136,1
23	5,20 (2H, <i>m</i>)	132,2	5,20 (1H, <i>m</i>)	132,2
24		43,0		43,1
25		33,3		33,4
26	0,83 (3H, <i>d</i> , 7,2)	19,8	0,82 (3H, <i>d</i> , 6,8)	19,9
27	0,84 (3H, <i>d</i> , 7,2)	20,1	0,84 (3H, <i>d</i> , 6,8)	20,2
28	0,92 (3H, <i>d</i> , 6,9)	17,8	0,92 (3H, <i>d</i> , 6,8)	17,9



Hình Phổ ^{13}C chất IC3

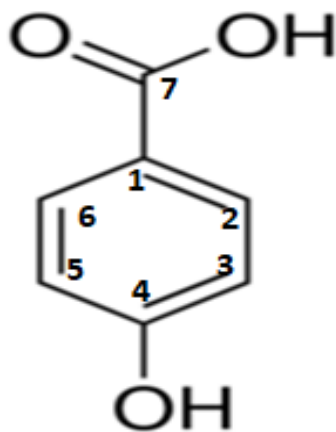
6.4. p-hydroxybenzoic acid (IC4)



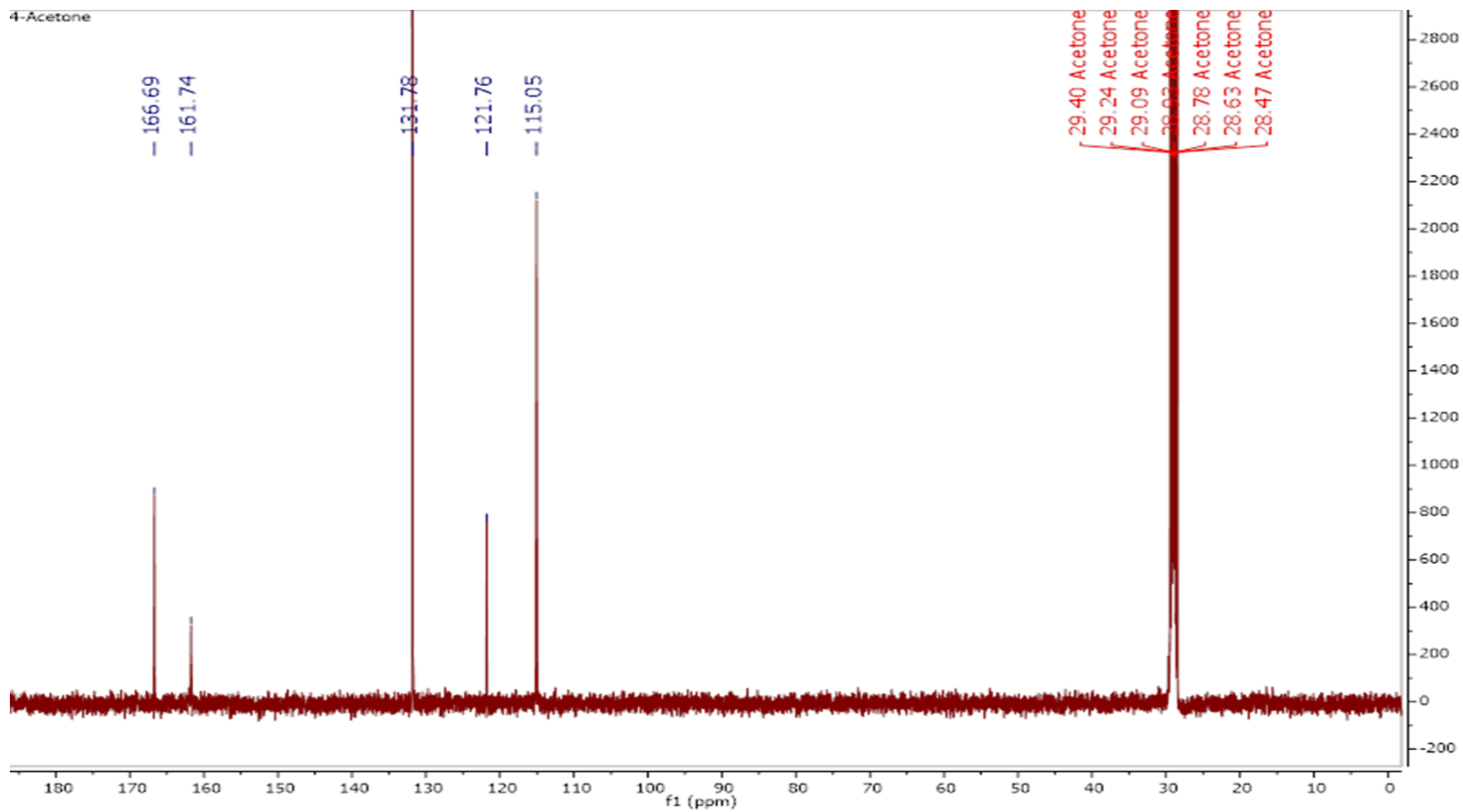
Hình: Phổ ^1H chất IC4

Bảng so sánh kết quả phổ ^1H NMR và ^{13}C của đơn chất IC4 (Acetone- d_6) và p-hydroxybenzoic acid (DMSO)

	N4 (Aceton- d_6)		p-hydroxybenzoic acid (DMSO)	
	δ_{H} , J (Hz)	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1		121,8		121,4
2	6,92 (2H, <i>d</i> , 8,8)	115,1	6,85 (2H, 8,8)	115,1
3	7,91 (2H, <i>d</i> , 8,8)	131,8	7,83 (2H, 8,8)	131,4
4		161,7		161,6
5	7,91 (2H, <i>d</i> , 8,8)	131,8	7,83 (2H, 8,8)	131,4
6	6,92 (2H, <i>d</i> , 8,8)	115,1	6,85 (2H, 8,8)	115,1
1-COOH		166,7		167,1

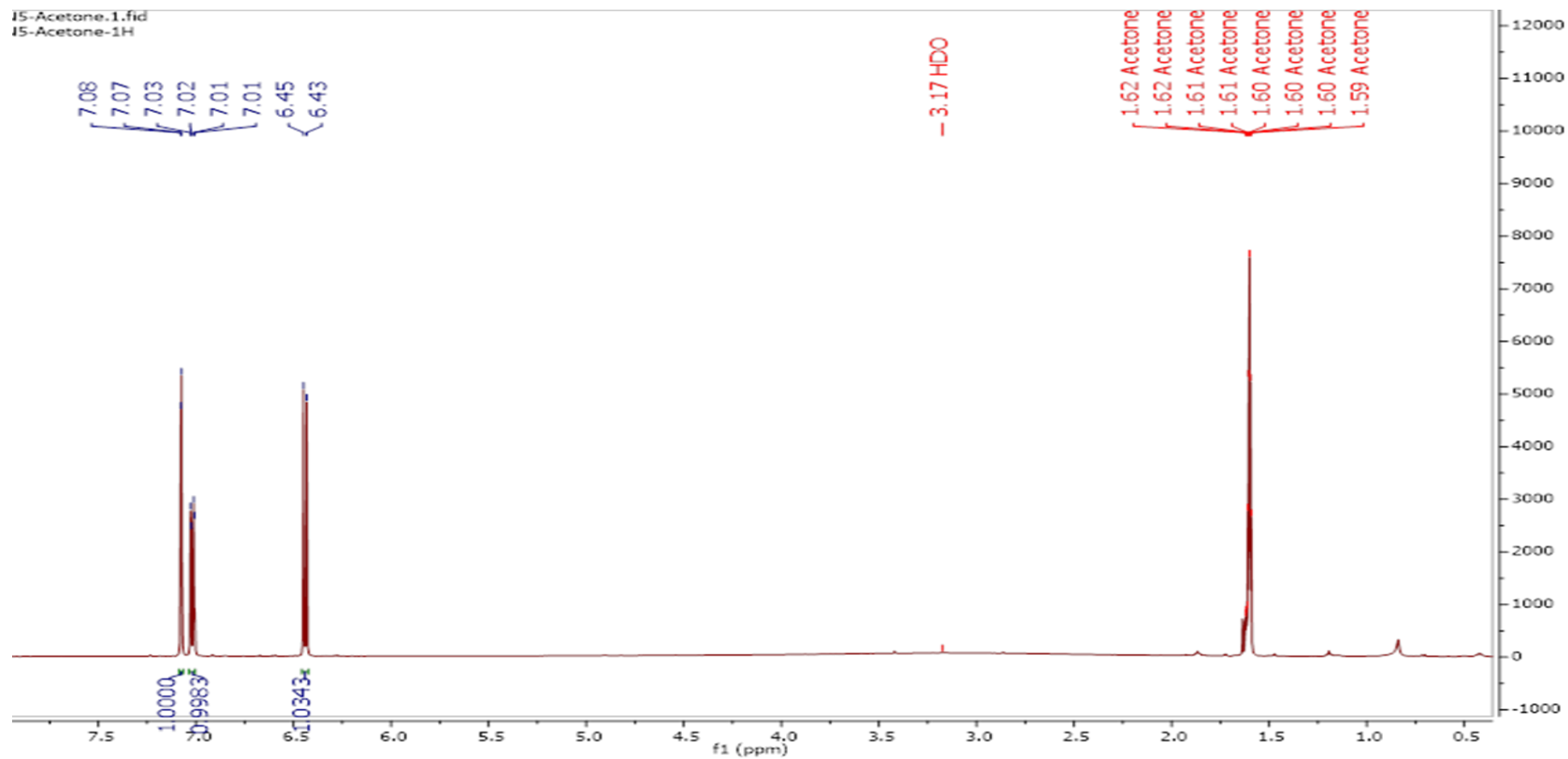


Hình cấu trúc IC4



Hình: Phổ ^{13}C chất IC4

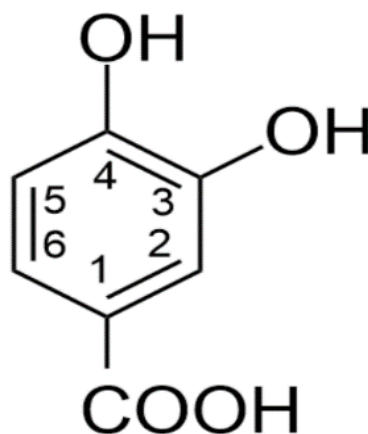
6.5. protocatechuic acid (IC5)



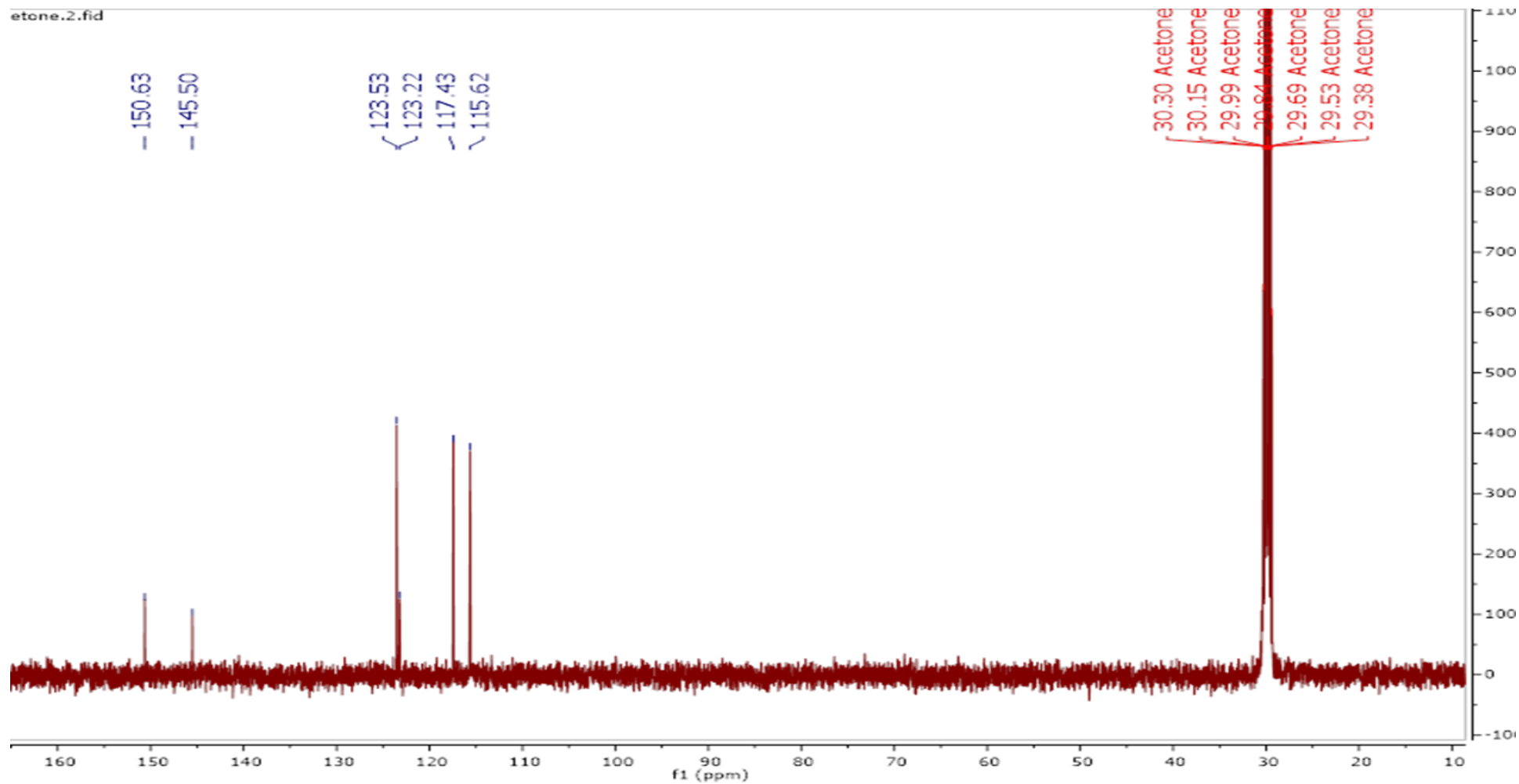
Hình phổ ¹H chất IC5

Bảng so sánh kết quả phổ ^1H NMR và ^{13}C của đơn chất N5 (Aceton- d_6) và protocatechuic acid (Aceton - d_6)

	IC5 (Aceton- d_6)		Protocatechuic acid (Aceton)	
	δ_H , J (Hz)	δ_C	δ_H	δ_C
1		123,1		123,7
2	7,53 (1H; <i>d</i> ; 2,0)	117,4	7,42 (1H, <i>d</i>)	117,7
3		145,5		145,8
4		150,6		150,8
5	6,89 (1H; <i>d</i> ; 8,3)	115,6	6,76 (1H, <i>d</i> , 8,0)	115,5
6	7,47 (1H; <i>dd</i> ; 8,3-2,1)	123,5	7,40 (1H, <i>dd</i> , 8,0, 2,0)	123,6
1-COOH		167,8		170,5

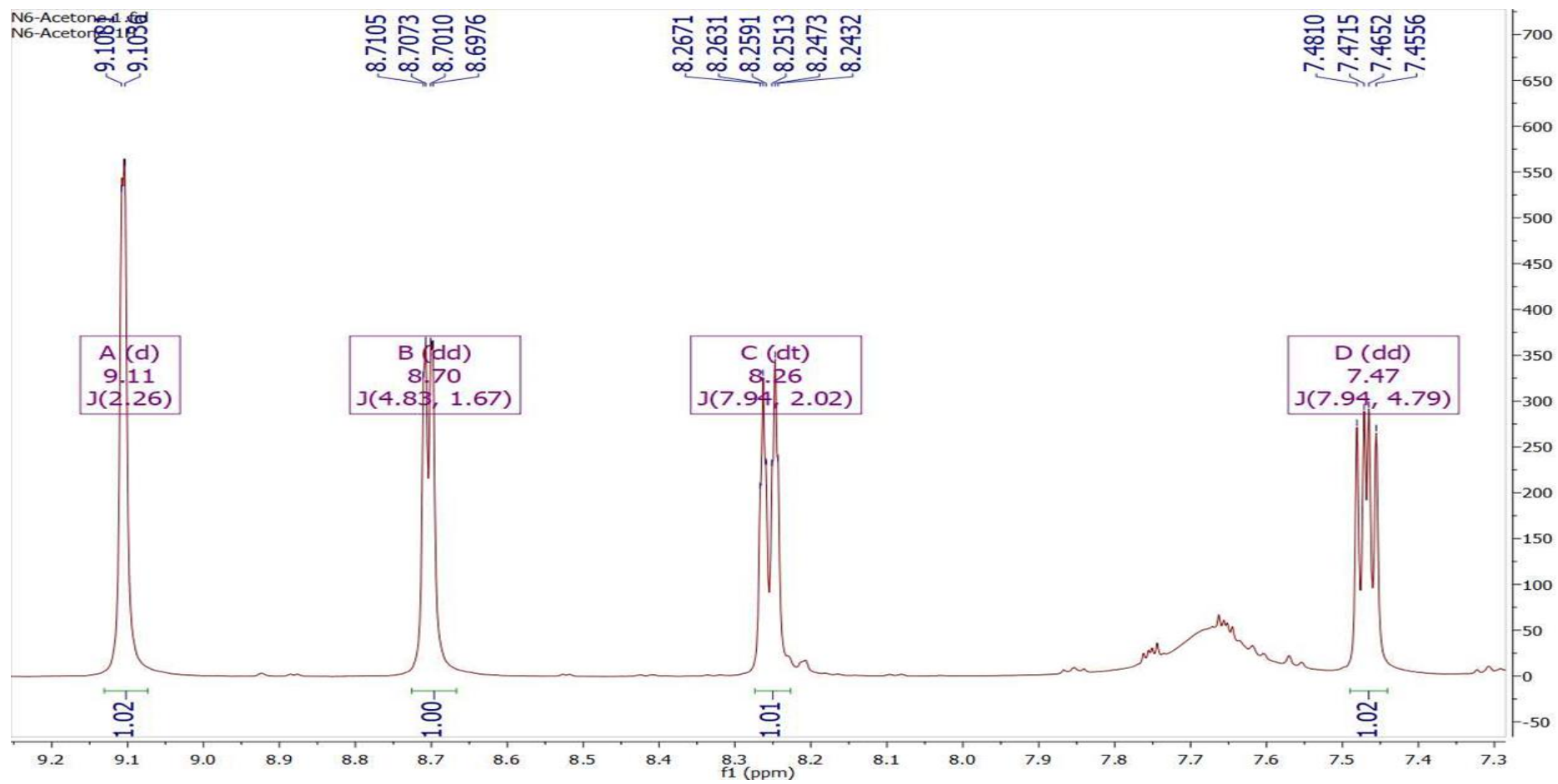


Hình cấu trúc hợp chất IC5



Hình phổ ¹³C chất IC5

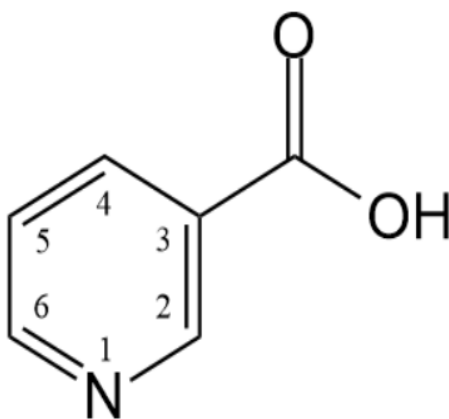
6.6. nicotinic acid (IC6)



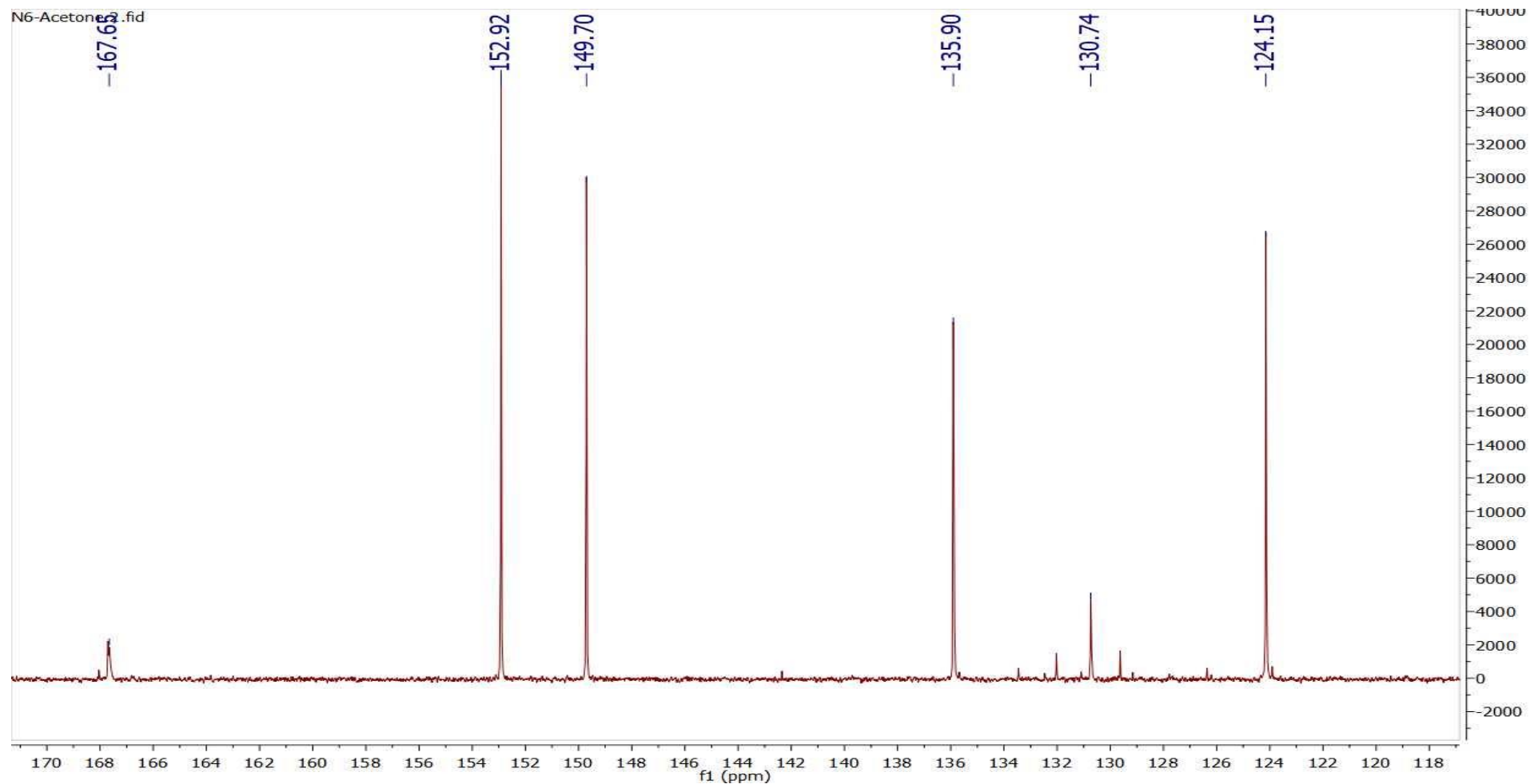
Hình phổ ^1H chất IC6

Bảng so sánh dữ liệu phổ NMR của đơn chất IC6 (aceton – d₆) và nicotinic acid (DMSO - d₆)

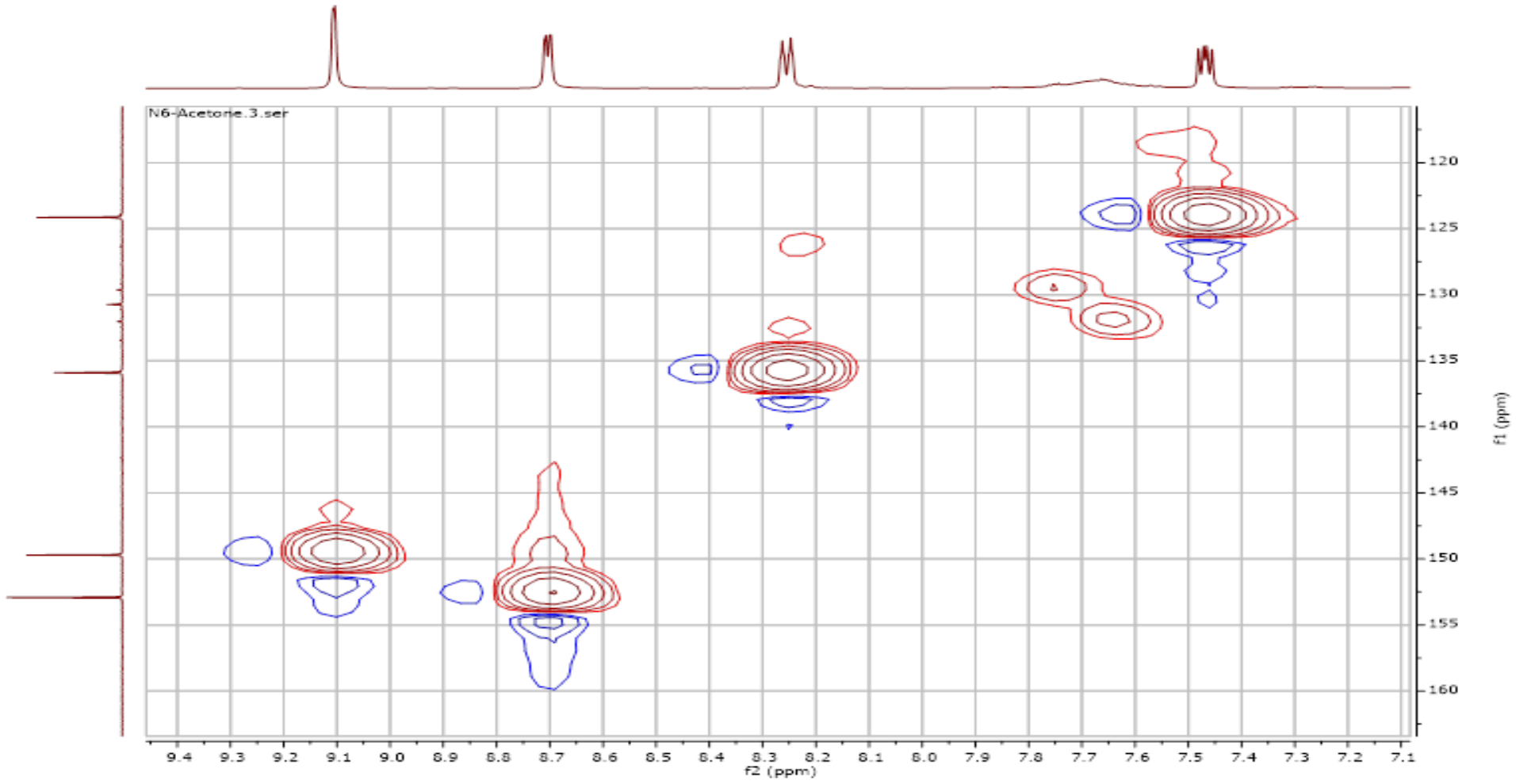
No	N6			Nicotinic acid	
	δ_H , J (Hz)	HMBC H \rightarrow C	δ_C	δ_H	δ_C
2	9,11 (1H, <i>d</i> , 2.3)	3, 4 ,6, 7	149,7	9,07(1H)	149,9
3			130,7		136,5
4	8,26 (1H, <i>dt</i> , 7,9 2,0)	2, 6, 7	135,9	8,28 (1H)	136,7
5	7,47 (1H, <i>dd</i> , 7.9 4.8)	3, 6	124,2	7,52 (1H)	123,6
6	8,7 (1H, <i>dd</i> , 4.8 1.7)	2, 4, 5	152,9	8,79 (1H)	152,9
7			167,6		165,91



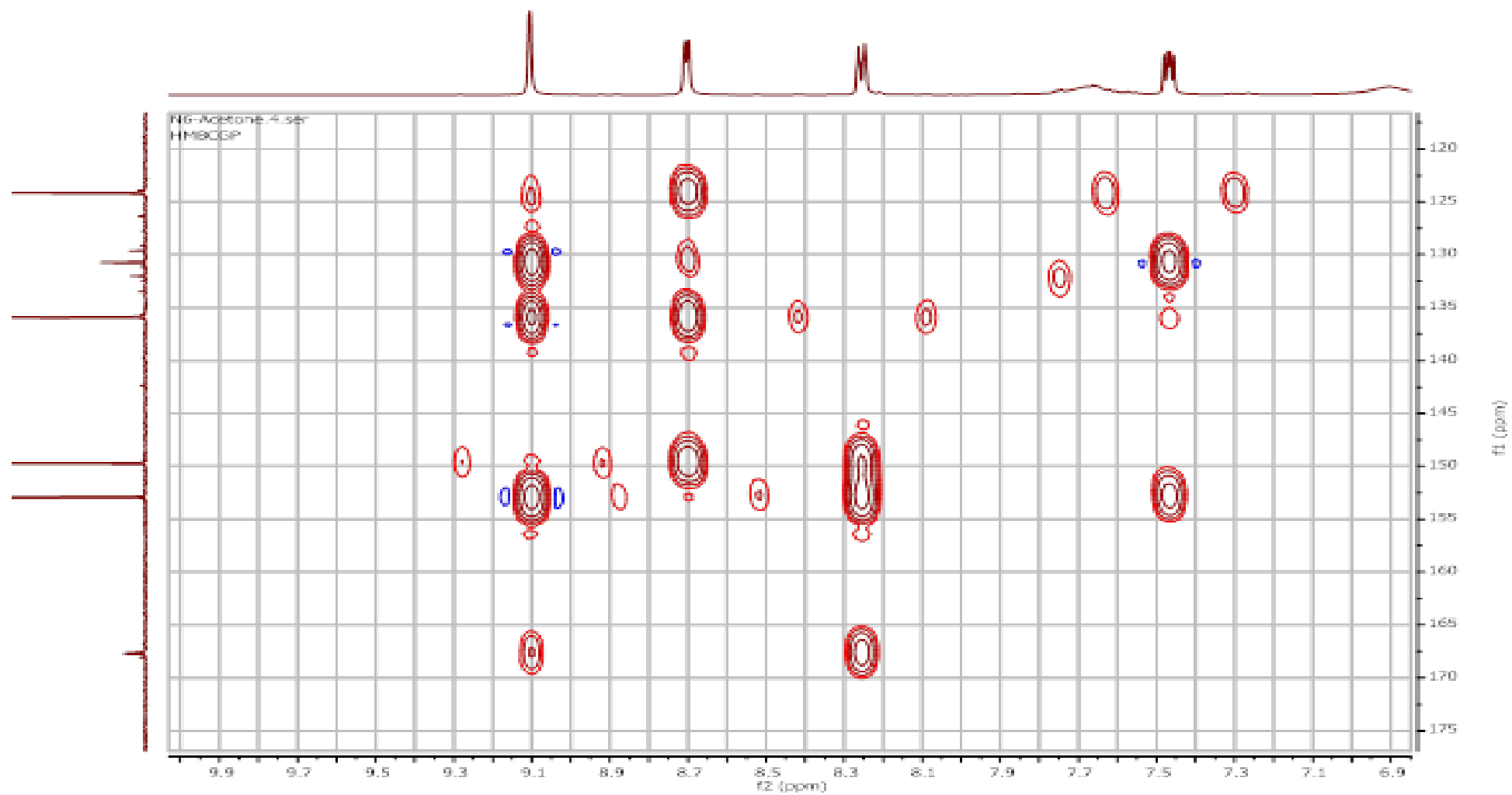
Hình cấu trúc hợp chất IC6



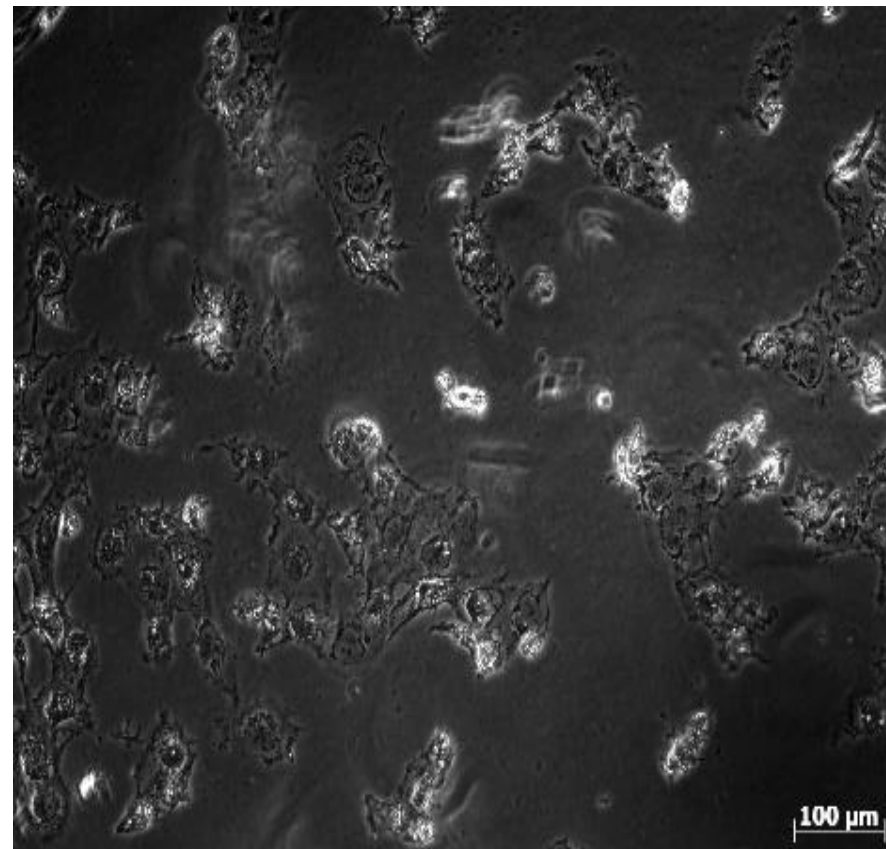
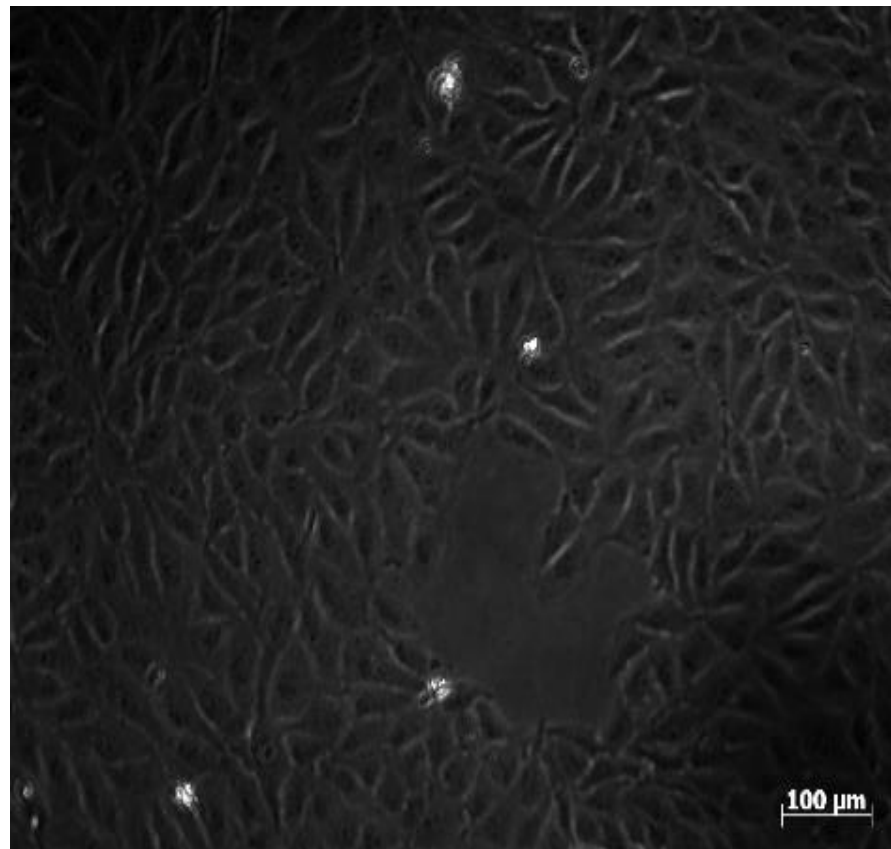
Hình phổ ^{13}C chất IC6



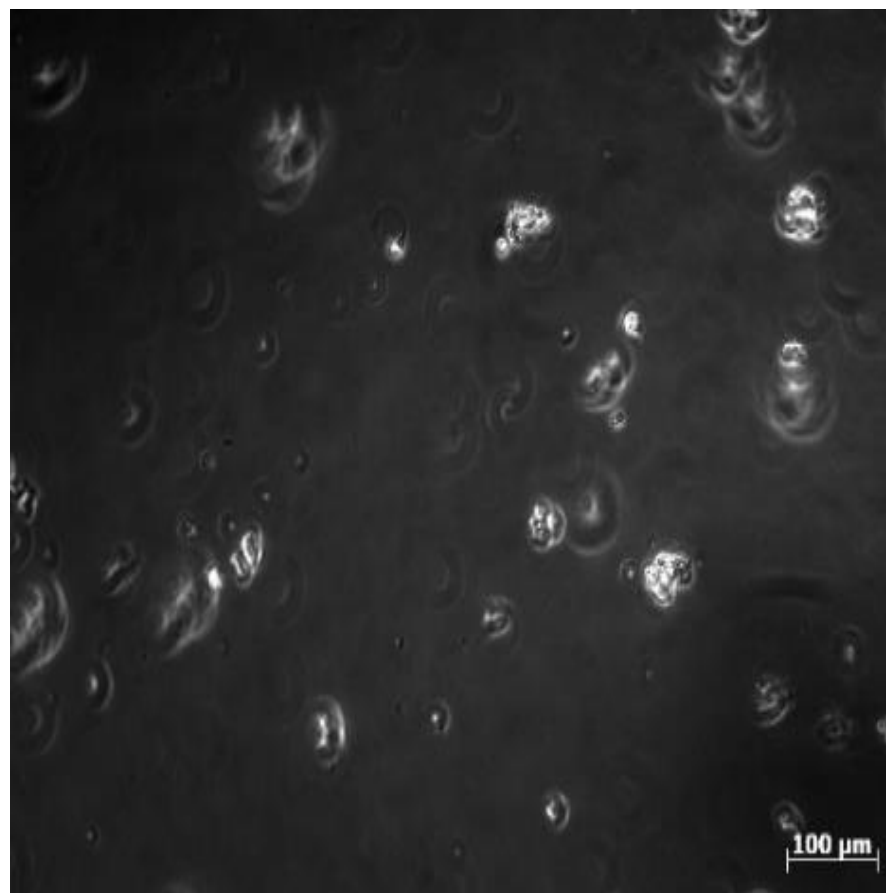
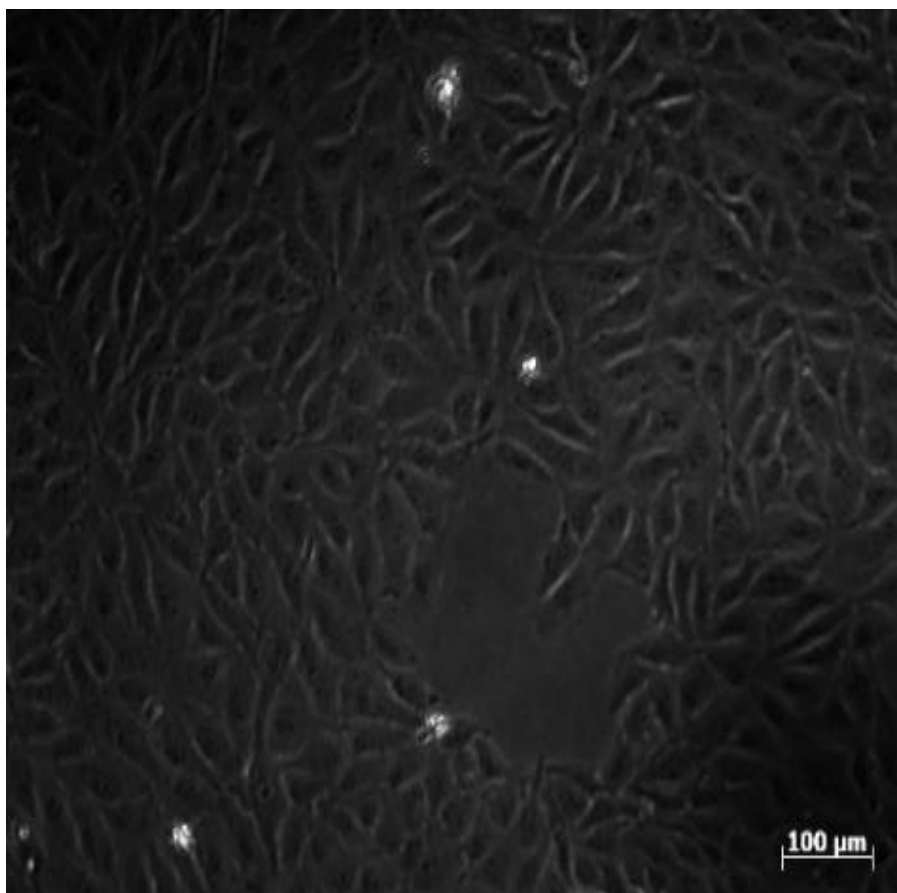
Hình phổ HSQC chất IC6



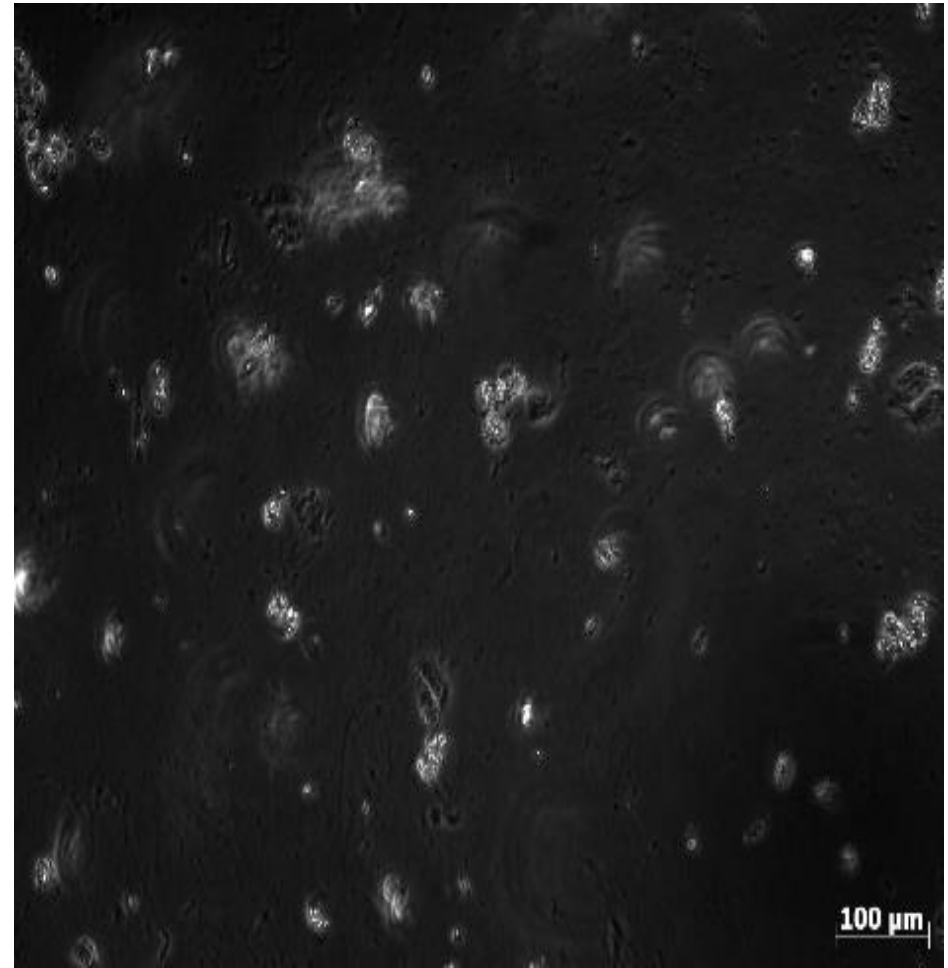
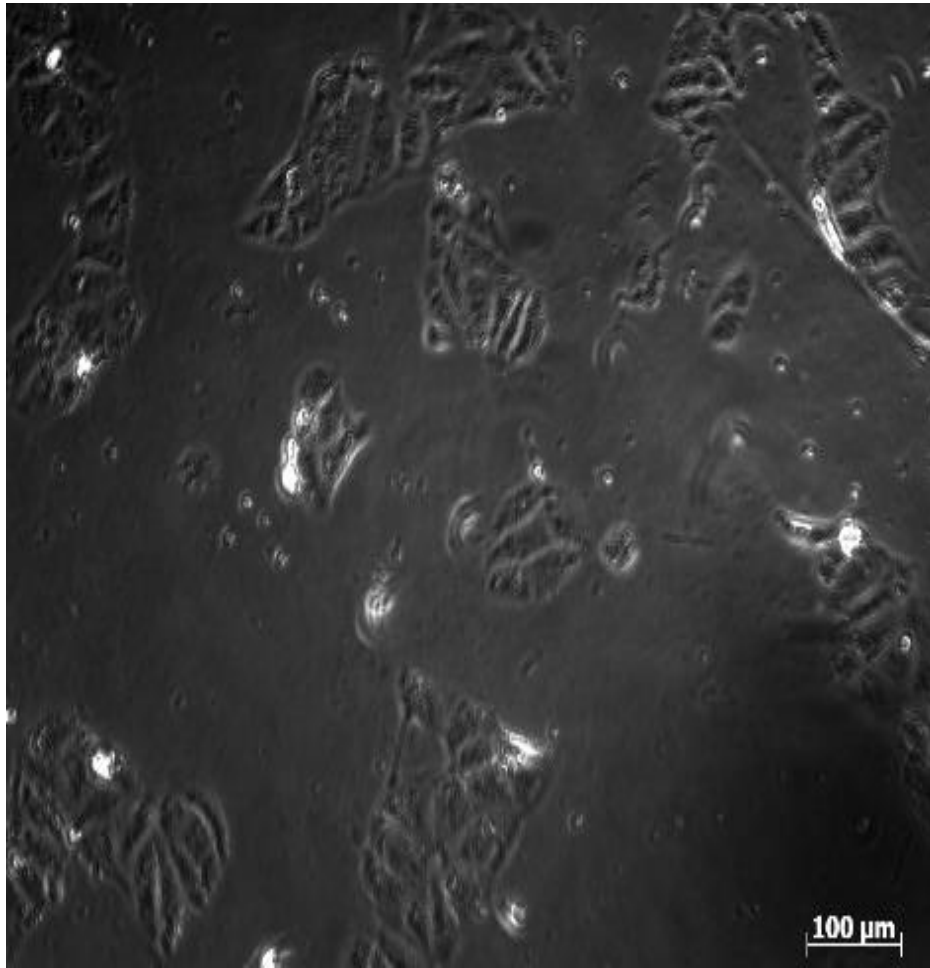
Hình phổ HMBC chất IC6



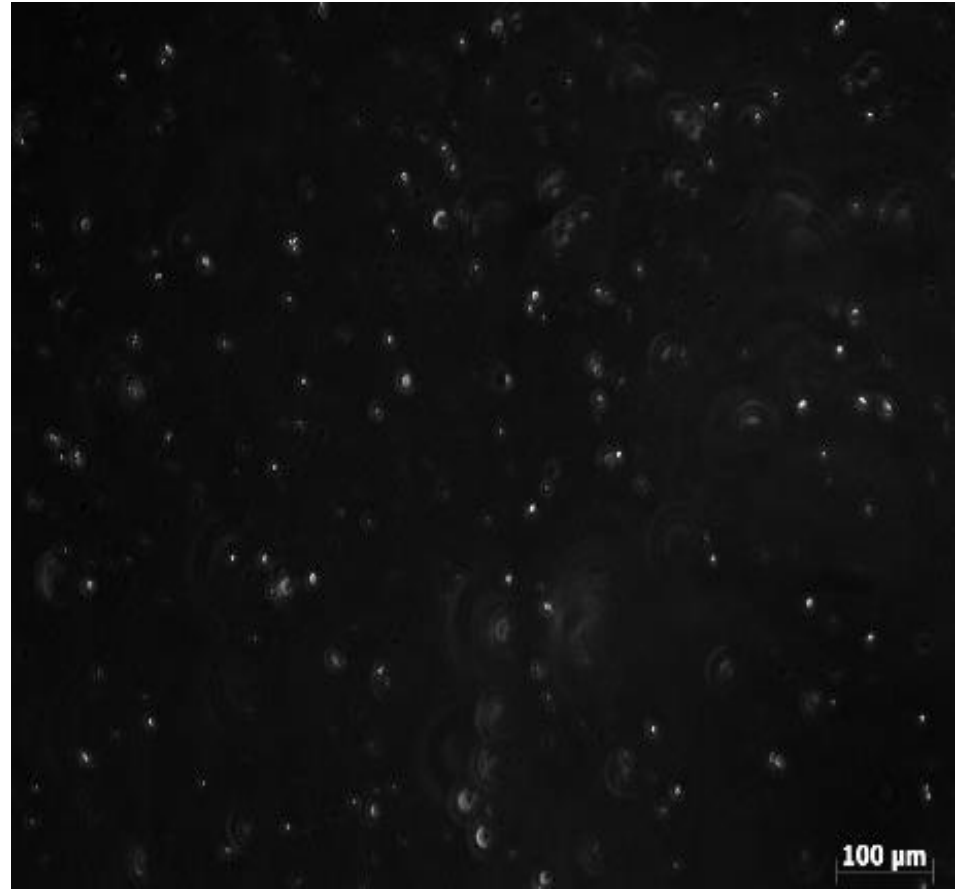
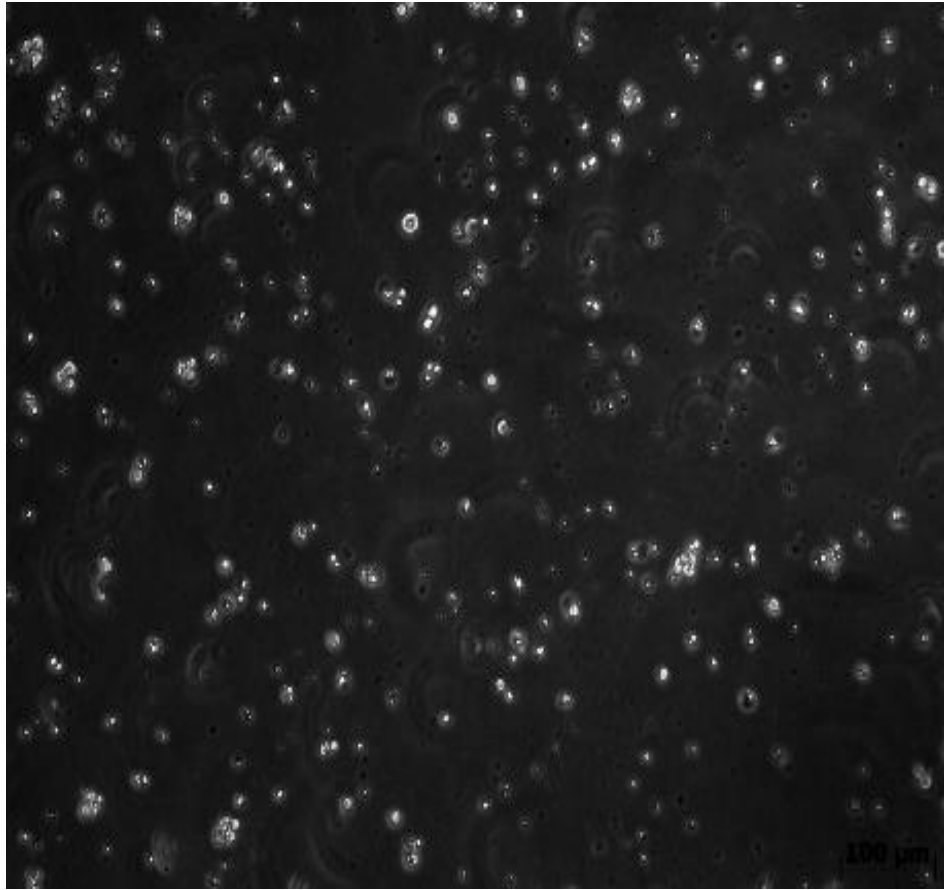
Hình xử lý tế bào MCF-7 với cao PE từ sinh khối *C. neovolkiana* DL0004 sau 24 giờ và 48 giờ



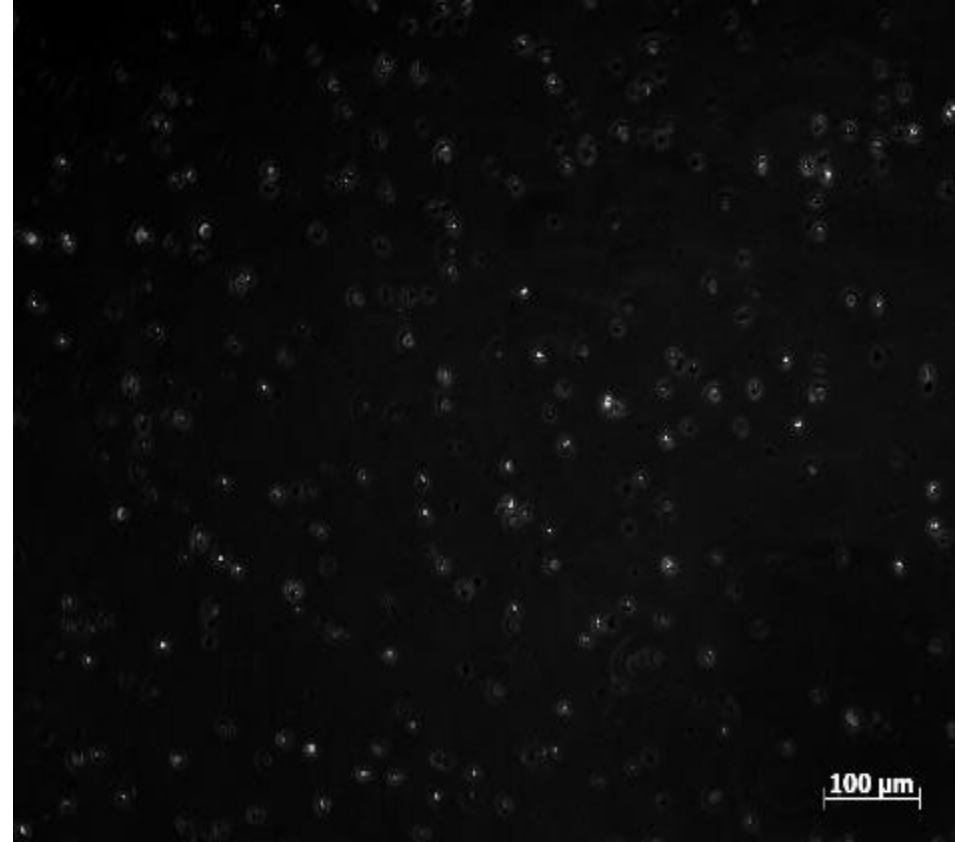
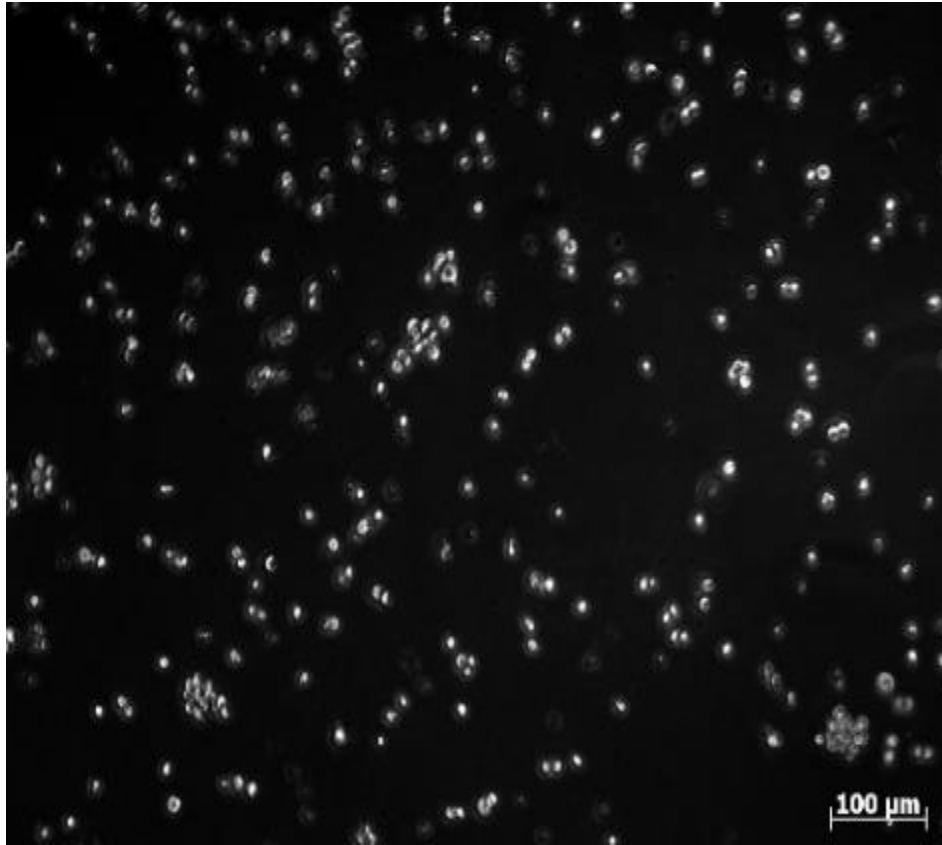
Hình xử lý tế bào MCF-7 với ergone cô lập từ cao PE từ sinh khối *C. neovolkiana* DL0004 sau 24 giờ và 48 giờ



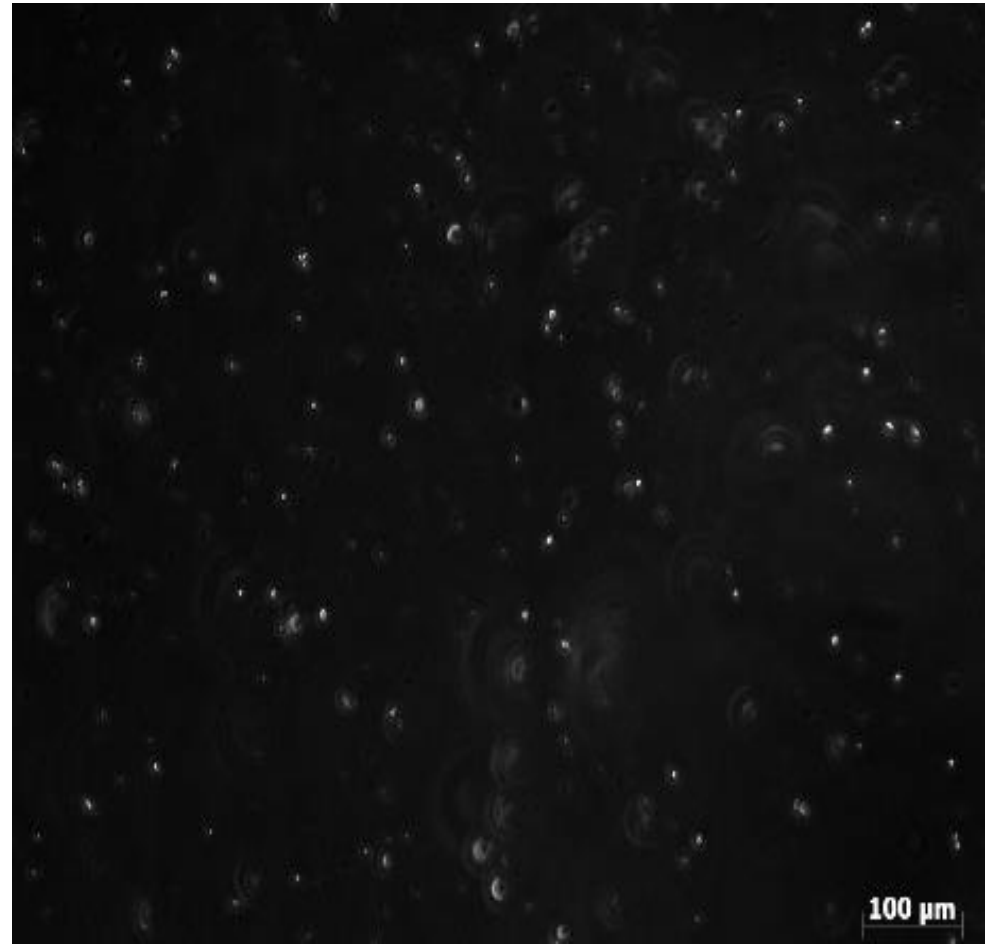
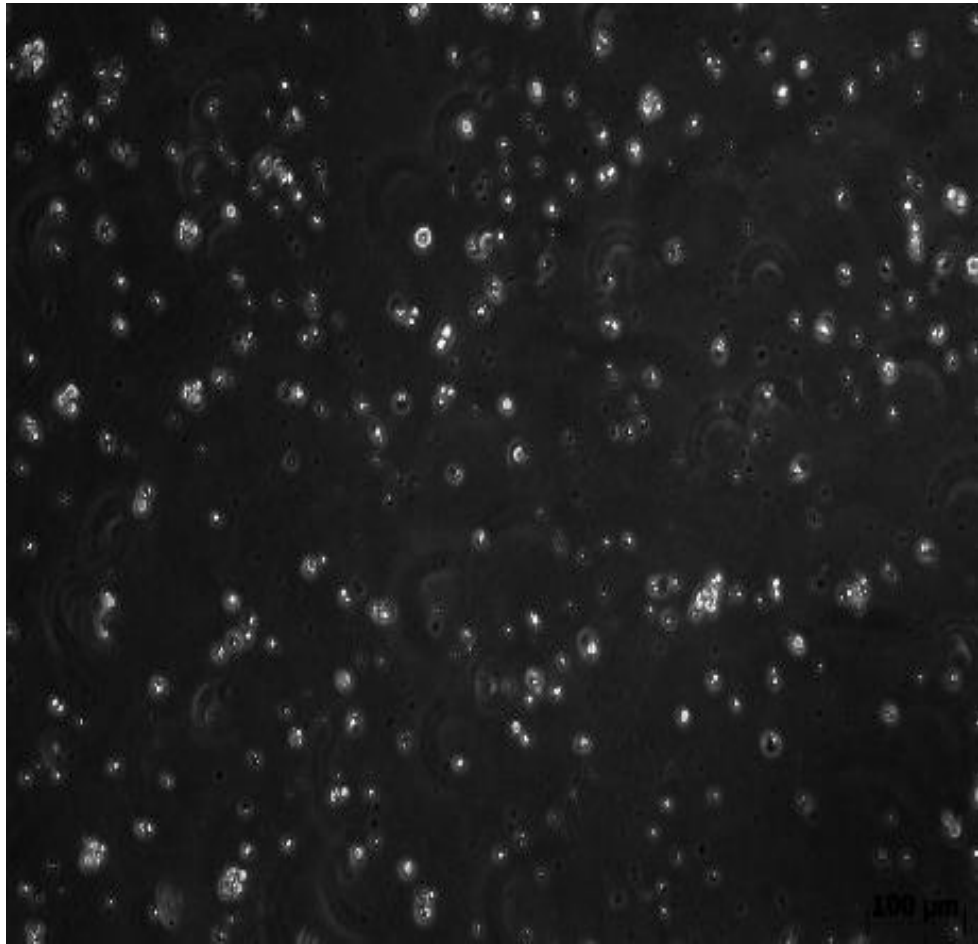
Hình xử lý tế bào MCF-7 với cao EA từ quả thể *I. cicadae* F0004 sau 24 giờ và 48 giờ



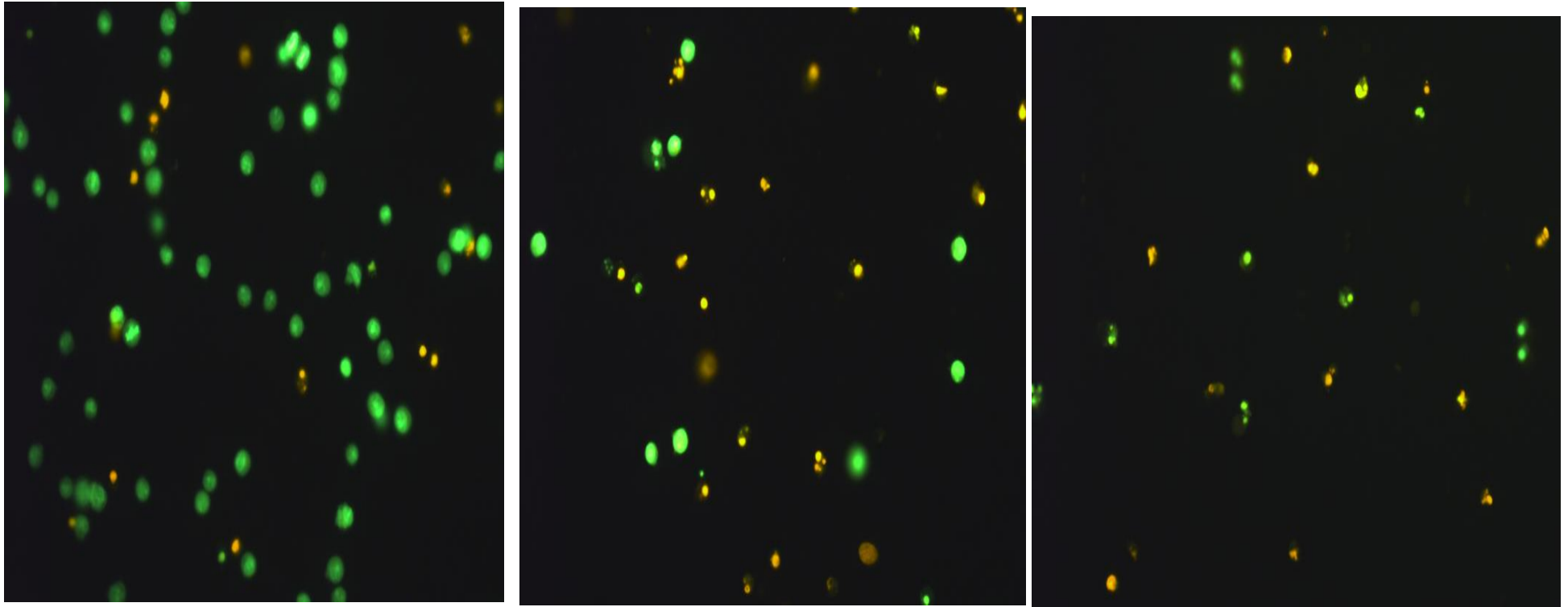
Hình xử lý tế bào Jurkat T với cao PE từ sinh khối *C. neovolkiana* DL0004 sau 24 giờ và 48 giờ



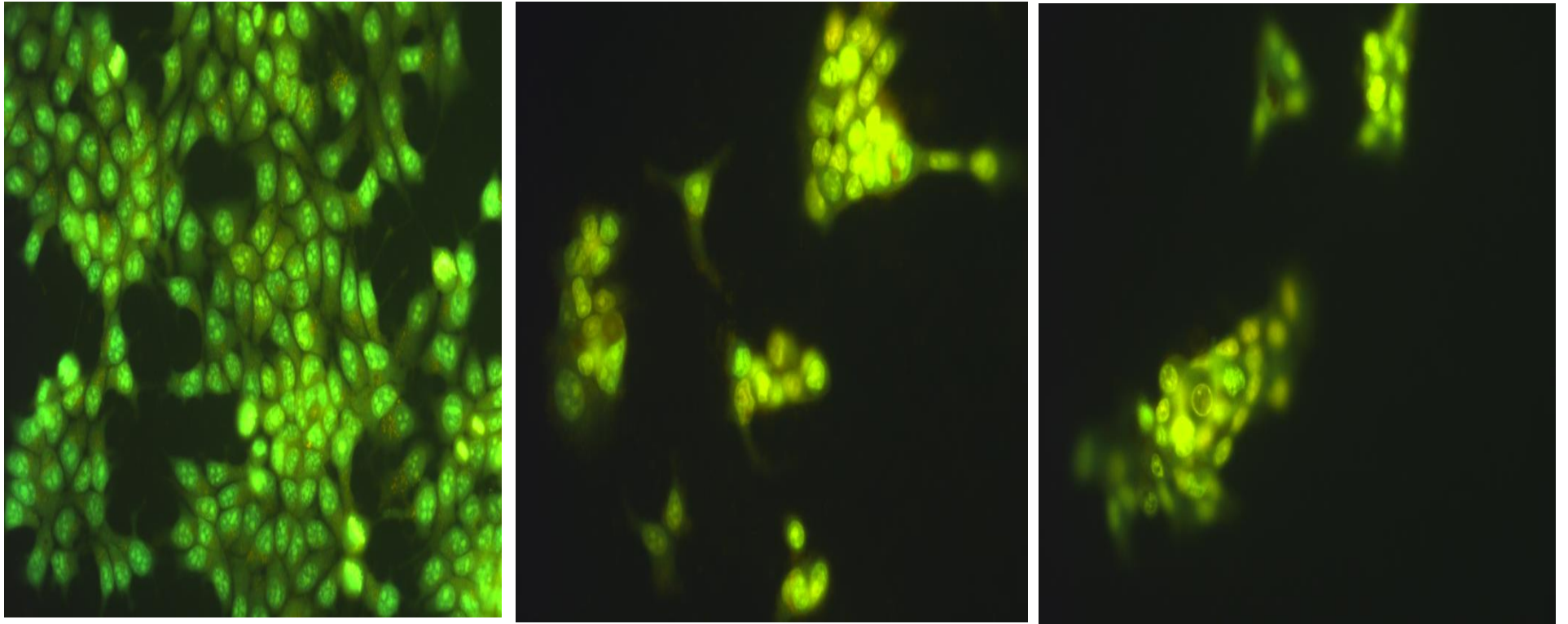
Hình đối chứng âm và xử lý tế bào Jurkat T với ergone cô lập từ cao PE của sinh khối *C. neovolkiana* DL0004 sau 24 giờ



Hình xử lý tế bào Jurkat T với cao EA từ quả thể *I. cicadae* F0004 sau 24 giờ và 48 giờ



Hình nhuộm AO/EB sau 48 giờ với tế bào Jurkat T với các mẫu lần lượt từ trái sang phải của đối chứng âm, CPT (đối chứng dương) và ergone cô lập từ cao PE của sinh khối *C. neovolkiana* DL0004



Hình nhuộm AO/EB sau 48 giờ với tế bào MCF-7 với các mẫu lần lượt từ trái sang phải của đối chứng âm, CPT (đối chứng dương) và ergone cô lập từ cao PE của sinh khối *C. neovolkiana* DL0004