

HAI HỢP CHẤT ERGOSTEROL PHÂN LẬP ĐƯỢC TỪ MẪU NẤM *GANODERMA LUCIDUM* (LEYSS EX. FR.) KARST

Nguyễn Hải Đăng¹, Phạm Thanh Bình¹, Nguyễn Thị Thắm¹, Bùi Mai Anh¹,
Nguyễn Phương Đại Nguyễn², Nguyễn Tiến Đạt^{1,*}

¹Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam,
18-Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

²Bộ môn Sinh học, Khoa Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, Trường Đại học Tây Nguyên,
567 Lê Duẩn, Buon Mê Thuột, Đắk Lắk, Việt Nam

Abstract

A phytochemical investigation of the methanol extract of *Ganoderma lucidum* fruiting bodies led to the isolation of ergosterol (1) and ergosterol peroxide (2). Their structures were identified by means of spectroscopic methods including ESI-MS and NMR. Compound 2 showed strong cytotoxicity against EGFR-TKI-resistant human lung cancer A549 and H1975 cell lines at 100 μ M. In addition, Compound 2 significantly inhibited the nitric oxide production in LPS-induced RAW264.7 cells. This paper is the first report on the effect of *G. lucidum* extract, ergosterol and ergosterol peroxide against EGFR-TKI-resistant human lung cancers.

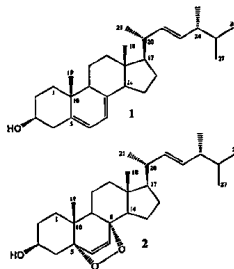
Keywords: *Ganoderma lucidum*, ergosterol peroxide, nitric oxide production, cytotoxicity, EGFR-TKI-resistance

1. MỞ ĐẦU

Nấm linh chi có tên khoa học là *Ganoderma lucidum* (Leyss Ex. Fr.) Karst, thuộc họ nấm lim (*Ganodermataceae*). Nấm linh chi phân bố nhiều nơi ở nước ta như: Tuyên Quang, Bắc Cạn, Thái Nguyên, Tây Nguyên, Lâm Đồng và phân bố khắp nơi trên thế giới, nổi tiếng như nấm linh chi Hàn Quốc. Đây là loại dược liệu đã được nghiên cứu nhiều và thành phần hóa học và nó có tác dụng tốt như giúp khí huyết lưu thông, làm tăng sức cho tế bào giúp hấp thụ oxy tốt hơn, làm tăng sự miễn dịch của cơ thể và kéo dài quá trình lão hóa của cơ thể... [1]. Thành phần hóa học của nấm linh chi thì chứa nhiều steroid, triterpenoid, ngoài ra còn có các acid amin, protein, saponin, dầu béo và nhiều men [1, 2]. Đây là những thành phần quan trọng đóng góp vào các hoạt tính sinh học của nấm linh chi như kháng viêm, kháng khuẩn, oxy hóa, diệt khối u và giảm mỡ máu [2].

Dựa theo kết quả sàng lọc tác dụng gây độc tế bào ung thư và ức chế sự sản sinh nitric oxide (NO), cao chiết tổng MeOH của thể quả nấm linh chi thể hiện hoạt tính khá rõ rệt. Bước đầu nghiên cứu thành phần hoá học chúng tôi đã phân lập được hai hợp chất ergosterol (1) và ergosterol peroxide (2) (Hình 1). Bài báo này mô tả quá trình phân lập, xác

định cấu trúc và tác dụng gây độc tế bào, khả năng ức chế sản sinh NO của hai hợp chất 1 và 2.



Hình 1: Cấu trúc hoá học của hợp chất 1 và 2

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Thiết bị

Điểm nóng chảy được đo trên máy Mel-Temp 3.0 (ThermoScientific). Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ghi bằng máy Bruker AM 500 FT-NMR spectrometer với chất nội chuẩn là TMS. Phổ khối

3 phun mù điện tử do trên hệ máy Agilent 1260 s Single Quadrupole LC/MS Systems (Agilent nologies, USA).

Mẫu nghiên cứu

Thế quả nấm linh chi *Ganoderma lucidum* thu hái tại Vườn Quốc gia Chu Mom Ray tỉnh Kon Tum vào tháng 6/2014. Mẫu được TS. Nguyễn Ngọc Đại Nguyễn, trường ĐH Tây Nguyên giám định khoa học. Mẫu tiêu bản (M-186.2014) lưu trữ tại Bộ môn Sinh học, Khoa Khoa học Thiên nhiên và Công nghệ, Trường Đại học Tây Nguyên.

Chiết và phân lập chất

Mẫu nấm sau khi thu hái về được phơi khô; bằm rạn, xay nhỏ (850 g) và ngâm chiết với môi metanol (1,5 L x 3 lần) ở nhiệt độ phòng. Dịch chiết sau đó được cất loại dung môi dưới chân giảm thu được 40 g cặn chiết metanol. Cặn này được hòa tan với nước (600 ml) rồi chiết đoạn lần lượt với *n*-hexan và etyl axetat thu các cặn chiết *n*-hexan (3,34 g) và etyl axetat (4 g). Tiến hành sắc ký cặn etyl axetat trên cột gel và rửa giải với hệ dung môi gradient (0% 100% metanol trong diclometan) thu được 6 đoạn (GEB2.1 → GEB2.6). Phân đoạn 2.1 xuất hiện chất kết tinh, đem rửa giải bằng tan thu được hợp chất sạch 1 (200 g). Tiếp tục xử phân đoạn GEB2.4 trên cột silica gel với hệ môi *n*-hexan-axeton (5/1 v/v) thu được phân đoạn GEB11.4, từ phân đoạn này sắc ký trên cột gel với hệ dung môi rửa giải *n*-hexan-etyl axetat (3/1 v/v) thu được hợp chất sạch 2 (13,0 mg).

Ergosterol (1): tinh thể hình kim màu trắng; 166-168 °C. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ_H (3H, s, H-18), 0.82 (3H, d, J = 6.7 Hz, H-27), (3H, d, J = 6.7 Hz, H-26), 0.91 (3H, d, J = 6.8 Hz, H-28), 0.94 (3H, s, H-19), 1.03 (3H, d, J = 6.5 Hz, H-21), 3.63 (1H, m, H-3), 5.15-5.24 (2H, m, H-23), 5.38 (1H, dd, J = 2.5, 10.5 Hz, H-7), 5.56 (dd, J = 2.5, 10.5 Hz, H-6). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): xem Bảng 1. ESI-MS (positive): m/z [M - H]⁻.

Ergosterol peroxide (2): Chất kết tinh hình nón trắng; đnc. 180-182 °C. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 0.81 (3H, s, H-18), 0.82 (6H, d, H-26), (3H, d, H-27), 0.88 (3H, s, H-19), 0.91 (3H, d, J = 6.5 Hz, H-28), 1.00 (3H, d, J = 6.5 Hz, H-21), (2H, m, H-11b, 17), 1.32 (1H, m, H-12b), 1.36 (3H, m, H-16b), 1.40 (1H, m, H-15b), 1.46 (1H, m, H-11a), 1.48 (1H, m, H-9), 1.50 (1H, m, H-11a), (1H, m, H-2b), 1.55 (1H, m, H-14), 1.59 (1H,

m, H-15a), 1.69 (1H, m, H-1b), 1.76 (1H, m, H-16a), 1.84 (1H, m, H-2a), 1.91 (1H, m, H-4b), 1.93 (1H, m, H-1a), 1.94 (1H, m, H-12a), 2.02 (1H, m, H-20), 2.11 (1H, m, H-4a), 3.96 (1H, m, H-3), 5.15 (1H, dd, J = 7.5, 15.0 Hz, H-22), 5.21 (1H, dd, J = 7.5, 15.0 Hz, H-23), 6.24 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-6), 6.50 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-7). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): xem Bảng 1. ESI-MS (positive): m/z 427 [M - H]⁻.

2.4. Đánh giá tác dụng gây độc tế bào ung thư

Các dòng tế bào ung thư phối kháng thuốc gồm EGFR-TKI-A549 và EGFR-TKI-H1975 được nuôi cấy trong môi trường RPMI 1640 có bổ sung 10% huyết thanh bò (FBS), 100 U/ml penicillin, và 100 µg/ml streptomycin ở 37 °C trong tủ ẩm 5% CO₂. Các tế bào được cấy chuyển vào trong phiên 96 giếng (mật độ tế bào 2 × 10⁴ tế bào/giếng) và được xử lý với các nồng độ khác nhau của mẫu thử. Sau 48h ủ, thêm 10 µL MTT nồng độ 5 mg/mL vào các giếng và ủ tiếp 4h. Sau đó gạn bỏ môi trường và hòa tan, tinh thể formazan được hòa tan trong 100 µL isopropanol và giá trị mật độ quang (OD) được đo bằng máy microplate reader (Molecular Devices Co., Menlo Park, CA) ở bước sóng 570 nm [3].

2.5. Đánh giá tác dụng ức chế sự sản sinh NO

Tế bào RAW264.7 được cấy vào một phiên 96 giếng với mật độ khoảng 2 × 10⁵ tế bào/giếng và ủ trong 3h, sau đó được xử lý trước với các mẫu thử có nồng độ khác nhau trong 30 phút. Tiếp tục bổ sung chất kích hoạt lipopolysaccharide (LPS) nồng độ 1 µg/mL vào một số giếng, còn một số giếng không bổ sung để làm mẫu đối chứng rồi ủ trong 24h. Sau 24h lấy 100 µL dịch ủ tế bào trong mỗi giếng chuyển sang một phiên 96 giếng khác và thêm vào 100 µL thuốc thử Griess. Mật độ quang của dung dịch này được đo trên máy microplate (Molecular Devices Co., Menlo Park, CA) ở bước sóng 570 nm [4].

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hợp chất 1 thu được dưới dạng chất kết tinh hình kim màu trắng, trên phổ khối lượng phân tử mù điện tử xuất hiện tín hiệu tại m/z 395 [M - H]⁻. Trên phổ ¹H-NMR trên vùng trường mạnh xuất hiện tín hiệu đặc trưng của 6 nhóm methyl tại δ_H 0,63 (3H, s, H-18), 0,82 (3H, d, J = 6,7 Hz, H-27), 0,84 (3H, d, J = 6,7 Hz, H-26), 0,91 (3H, d, J = 6,8 Hz, H-28), 0,94 (3H, s, H-19), 1,03 (3H, d, J = 6,5 Hz, H-21). Ngoài ra còn xuất hiện tín hiệu của 4 proton olefin tại δ_H 5,15-5,24 (2H, m, H22, 23), 5,38 (1H, dd, J =

2,5, 10,5 Hz, H-7), 5,56 (1H, dd, $J = 2,5, 10,5$ Hz, H-6), một proton nhóm metin chịu ảnh hưởng của hiệu ứng thuận từ nên cộng hưởng ở vùng trường thấp hơn so với các nhóm metin thông thường khác tại δ_H 3,63 (H-3) do nó gắn trực tiếp với nhóm hút điện tử mạnh như nhóm (-OH). Trên phổ ^{13}C -NMR và DEPT xuất hiện tín hiệu của 28 nguyên tử cacbon bao gồm 6 nhóm methyl, 7 nhóm methylen, 11 nhóm metin và 4 nhóm nguyên tử cacbon không chứa hidro. Trong đó tại vùng trường thấp xuất hiện tín hiệu 4 nguyên tử cacbon trong hai nối đôi dạng (-CH=C<) tại δ_C 139,9 (C-6)/119,6 (C-7) và 116,4 (C-7)/141,2 (C-8), một liên kết đôi khác dạng (>HC=CH<) tại δ_C 135,6 (C-8)/132,2 (C-9). Trên vùng trường trung bình xuất hiện một tín hiệu của nhóm oxi metin tại δ_C 70,5 (C-3) và vùng trường mạnh xuất hiện của 6 tín hiệu của các nhóm methyl tại δ_C 12,1 (C-18), 16,3 (C-19), 21,1 (C-21), 19,9 (C-26), 19,6 (C-27), 17,5 (C-28). Từ những dữ kiện phân tích trên và so sánh với tài liệu tham khảo cho thấy số liệu phổ hợp chất 1 phù hợp hoàn toàn tất cả các vị trí với hợp chất ergosterol [5].

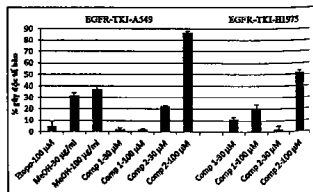
Bảng 1: Số liệu phổ ^{13}C NMR của hợp chất 1 và 2

C	1	2	C	1	2
1	38.5	34.7	15	23.0	20.6
2	32.1	30.1	16	28.2	28.6
3	70.5	66.4	17	56.0	56.2
4	40.9	36.9	18	12.1	12.8
5	139.9	82.1	19	16.3	18.1
6	119.6	135.4	20	40.2	39.7
7	116.4	130.7	21	21.1	20.8
8	141.2	79.4	22	135.6	135.2
9	46.5	51.1	23	132.2	132.3
10	37.2	37.0	24	42.9	42.7
11	21.2	23.3	25	33.2	33.0
12	39.3	39.3	26	19.9	19.6
13	43.0	44.5	27	19.6	19.9
14	54.7	51.6	28	17.5	17.5

Hợp chất 2 thu được dưới dạng chất kết tinh hình nón màu trắng. Trên phổ 1H -NMR trên vùng trường mạnh xuất hiện tín hiệu đặc trưng của 6 nhóm methyl tại δ_H 0,81 (3H, s, H-18), 0,82 (6H, d, H-26), 0,84 (3H, d, H-27), 0,88 (3H, s, H-19), 0,91 (3H, d, $J = 6,5$ Hz, H-28) và 1,00 (3H, d, $J = 6,5$ Hz, H-21). Ngoài ra còn xuất hiện tín hiệu của hai cặp proton olefin của liên kết đôi dạng -CH=CH- tại δ_H 5,15 (1H, dd, $J = 7,5, 15,0$ Hz, H-22)/5,21 (1H, dd, $J = 7,5, 15,0$ Hz, H-23) và δ_H 6,24 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-6), 6,50 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-7), một proton nhóm metin cũng chịu ảnh hưởng của hiệu ứng thuận từ nên cộng hưởng ở vùng trường thấp hơn so với các nhóm metin thông thường khác tại

δ_H 3,96 (H-3) do nó gắn trực tiếp với nhóm hút điện tử mạnh như nhóm (-OH). So sánh với hợp chất 1, trên phổ ^{13}C -NMR và DEPT của hợp chất 2 cũng xuất hiện những hiện tượng của 28 nguyên tử cacbon với giá trị cũng gần tương đương với hợp chất 1, bao gồm 6 nhóm methyl, 7 nhóm methylen, 11 nhóm metin và 4 nhóm nguyên tử cacbon không chứa hidro. Trong đó tại vùng trường thấp cũng xuất hiện tín hiệu cacbon olefin: tín hiệu 2 cặp nguyên tử cacbon nối đôi dạng (-CH=CH-) tại δ_C 135,4 (C-6)/130,7 (C-7) và 135,2 (C-22)/132,3 (C-23). Trên vùng trường trung bình xuất hiện một tín hiệu của oxi metin tại δ_C 66,4 (C-3) và hai tín hiệu cacbon gần bằng cầu peroxit tại δ_C 82,1 (C-5), 79,4 (C-8) và vùng trường mạnh xuất hiện của 6 tín hiệu của các nhóm methyl tại δ_C 12,8 (C-18), 18,1 (C-19), 20,8 (C-21), 19,6 (C-26), 19,9 (C-27), 17,5 (C-28). Trên phổ HMBC có những tương tác chính: H-3 tương tác với C-2, 4 và 5; Ha-4 với C-5 và 6; H-6 với C-5; H-7 với C-8; H-19 với C-1, 5, 9 và 10; H-18 với C-12, 13, 14 và 17; H-21 với C-17, 20 và 22; H-26 với C-25 và 27. Từ những dữ kiện phân tích trên và so sánh với tài liệu tham khảo cho thấy số liệu phổ hợp chất 2 phù hợp hoàn toàn tất cả các vị trí với hợp chất ergosterol peroxide [6].

Cao chiết tổng nấm linh chi *Ganoderma lucidum* và các hợp chất 1 và 2 được đánh giá khả năng gây độc tế bào trên hai dòng dòng tế bào ung thư phổi kháng thuốc gồm EGFR-TKI-A549 và EGFR-TKI-H1975. Kết quả chỉ ra trong Hình 2 cho thấy hợp chất 1 không có tác dụng đối với cả 2 dòng tế bào trong khi hợp chất 2 có tác dụng mạnh ở nồng độ 100 μ M. Đáng chú ý đối với dòng A549, hợp chất 2 ức chế đến 86% (Hình 2).

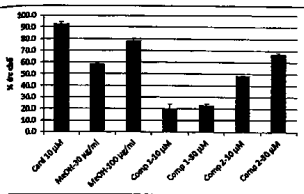


Hình 2: Tác dụng gây độc tế bào của mẫu cao chiết MeOH và chất 1-2 (Etoposide được sử dụng làm chất so sánh).

Kết quả này cũng phù hợp với nhận định trước đó rằng ergosterol peroxide là một hoạt chất rất tiềm năng trong việc tiêu diệt các tế bào ung thư kháng thuốc [7]. Đây cũng là nghiên cứu đầu tiên về ảnh hưởng của cao chiết nấm linh chi cũng như

ergosterol peroxide đến các dòng ung thư phổi kháng thuốc EGFR-TKI.

Ngoài ra khả năng ức chế sự sản sinh NO liên quan đến cơ chế gây viêm của hai hợp chất 1 và 2 cũng được thử nghiệm trên đại thực bào RAW264.7 được kích thích bởi LPS. Hợp chất 1 có tác dụng yếu trong khi hợp chất 2 có hoạt tính ức chế rõ rệt ở nồng độ 10 và 30 μM (Hình 3).



Hình 3: Tác dụng ức chế sản sinh NO của mẫu cao chiết MeOH và chất 1-2 (Cardamonin được sử dụng làm chất so sánh).

4. KẾT LUẬN

Hai hợp chất ergosterol (1) và ergosterol peroxide (2) được phân lập từ thể quả nấm linh chi *Ganoderma lucidum* thu hái tại Vườn Quốc gia Chu Mom Ray. Hợp chất 2 thể hiện khả năng diệt 2 dòng tế bào ung thư phổi kháng thuốc EGFR-TKI-A549 và EGFR-TKI-H1975 ở nồng độ 100 μM . Ở nồng độ 10 và 30 μM , hợp chất 2 cũng ức chế rõ rệt sự sản sinh NO.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt nam tài trợ (đề tài mã số VAST.UDCN.02/14-15). Nhóm nghiên cứu cảm ơn Viện Hoá học đã giúp đo phổ cộng hưởng từ hạt

Liên hệ: Nguyễn Tiến Đạt

Viện Hoá sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam
Email: ngtiend@imb.vast.vn

nhân và GS. Jeong-Hyung Lee, trường ĐHQG Kangwon, Hàn Quốc đã cung cấp các dòng tế bào.

REFERENCES

1. Võ Văn Chí. *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, Nxb. Y học Hà Nội, 1318-1319 (2012).
2. Xia Q, Zhang H, Sun X, Zhao H, Wu L, Zhu D, Yang G, Shao Y, Zhang X, Mao X, Zhang L and She G. *A comprehensive review of the structure elucidation and biological activity of triterpenoids from Ganoderma spp*, *Molecules*, 19, 17478-17535 (2014).
3. Dat NT, Phung TXB, Le TPQ, Chau VM, Hoang TH, Lee JJ. *Cytotoxic prenylated flavonoids from Morus alba*. *Fitoterapia*, 81, 1224-1227 (2010).
4. Pham BN, Pham TB, Nguyen HD, Tran TT, Chu HH, Chau VM, Lee JH, Nguyen TD. *A new anti-inflammatory β -carboline alkaloid from the hairy-root cultures of Eurycoma longifolia*. *Nat Prod Res*. (in press 2015)
5. Shirane N, Murabayashi A, Masuko M, Uomori A, Yoshimura Y, Seo S, Uchida and Takeda K. *Effect on ergosterol biosynthesis of a fungicide SSF-190, in Botrytis cinerea*. *Phytochemistry*, 29, 2513-20 (1990).
6. Wojciech K, Eliza M, Piotr S, Jery K, Marian O, Franciszek H. *Isolation and quantitative determination of ergosterol peroxide on carious edible mushroom species*, *Food chemistry*, 113, 351-355 (2009).
7. Wu QP, Xie YZ, Deng Z, Li XM, Yang W, Jiao CW, Fang L, Li SZ, Pan HH, Yee AJ, Lee DY, Li C, Zhang Z, Guo J, Yang BB. *Ergosterol peroxide isolated from Ganoderma lucidum abolishes microRNA miR-378-mediated tumor cells on chemoresistance*. *PLoS One*, 7, e44579 (2012).