

Khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa và kháng viêm của cao chiết nấm Vân Chi đỏ *Pycnoporus sanguineus* phân lập tại Việt Nam

Evaluation of antioxidant and anti-inflammatory activities of ethanol extract from *Pycnoporus sanguineus* isolated in Vietnam

Nguyễn Thị Phương^{1*}, Ngô Nguyên Vũ¹

¹Viện Kỹ thuật công nghệ cao NTT - Trường Đại học Nguyễn Tất Thành, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

*Tác giả liên hệ, Email: nguyennphuong@ntt.edu.com

THÔNG TIN

DOI:10.46223/HCMCOUJS.tech.vi.18.1.2357.2023

Ngày nhận: 23/06/2022

Ngày nhận lại: 20/09/2022

Duyệt đăng: 10/10/2022

Từ khóa:

cao chiết; kháng oxy hóa; kháng viêm; *Pycnoporus sanguineus*; tiền quả thể

Keywords:

fungi extract; antioxidant; anti-inflammatory; *Pycnoporus sanguineus*; primordia

TÓM TẮT

Pycnoporus sanguineus được giới thiệu là một loài nấm mang một loạt các hoạt tính sinh học và kháng khuẩn được coi là hoạt tính nổi bật nhất. Trong khi đó, hoạt tính kháng viêm và kháng oxy hóa của nấm *P. sanguineus* vẫn chưa được quan tâm nghiên cứu. Có một vài nghiên cứu nói về khả năng kháng oxy hóa và kháng viêm của *P. sanguineus* thông qua đánh giá tiềm năng của cao chiết và hợp chất từ hệ sợi nấm mà chưa có nghiên cứu chứng minh các hoạt tính của cao chiết nấm tiền quả thể. Do vậy, nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá khả năng kháng oxy hóa bằng phương pháp DPPH và kháng viêm của *P. sanguineus* tiền quả thể trên mô hình tế bào Raw264.7 kích thích bởi lipopolysaccharide. Kết quả cho thấy, hoạt tính kháng oxy hóa của cao chiết *P. sanguineus* rất tốt với IC₅₀ là 30.0 ± 0.54 µg/ml. Cao chiết *P. sanguineus* cũng thể hiện hoạt tính kháng viêm tốt, tại nồng độ cao chiết 12.5 và 25 µg/ml, nồng độ nitric oxide tạo ra giảm đáng kể so với đối chứng không sử dụng cao chiết. Như vậy, với tiềm năng kháng oxy hóa và kháng viêm, nấm *P. sanguineus* giai đoạn tiền quả thể phân lập tại Việt Nam có thể làm nguồn nguyên liệu để cô lập các hợp chất có hoạt tính kháng oxy hóa và kháng viêm trong tương lai.

ABSTRACT

Pycnoporus sanguineus, also known as Van Chi mushroom in Vietnam, has been highlighted in a wide range of bioactivities, in which anti-bacterial activity is considered to be the most prominent activity and widely researched. The other bioactivities of *P. sanguineus* including anti-inflammatory and antioxidant have not been studied with interest. To date, the antioxidant and anti-inflammatory properties of *P. sanguineus* were reported as the capacity of the extracts or compounds from fungal biomass instead of demonstrating the bioactivities of the mushroom at the primordia formation stage. Therefore, the study was carried out to assess the antioxidant ability by the DPPH method and the anti-inflammatory activity of *P. sanguineus* on Raw264.7 cell inflammation induced by lipopolysaccharide. The results showed good antioxidant

activity of *P. sanguineus* extracts with IC₅₀ of $30.0 \pm 0.54 \mu\text{g/ml}$. *P. sanguineus* extract had good anti-inflammatory activity with nitric oxide production significantly decreased at concentrations of 12.5 and 25 $\mu\text{g/ml}$ compared to the negative control. Thus, with good antioxidant and anti-inflammatory abilities, primordia of *P. sanguineus* isolated in Vietnam can serve as a source of raw materials for isolating compounds with antioxidant and anti-inflammatory activities in future studies.

1. Giới thiệu

Pycnoporus sanguineus hay còn gọi là nấm Vân Chi đỏ ở Việt Nam được xếp vào họ Polyporaceae, tức họ nấm lỗ. Về mặt hình thái, nấm *P. sanguineus* là loại nấm mũ, có vân màu cam đỏ đặc trưng. Được mô tả là loài nấm phân hủy gỗ, *P. sanguineus* thường được tìm thấy dễ dàng ở các thân cây gỗ mục (Télez-Télez & ctg., 2016). Một trong các hoạt tính được quan tâm bậc nhất ở *P. sanguineus* là khả năng phân hủy gỗ. Đã có nhiều nghiên cứu chứng minh *P. sanguineus* là đại diện nấm mũ được chứng minh là tiềm năng phân hủy lignocellulose (Gauna, Larran, Feldman, Permingeat, & Perotti, 2020), lignin (Feng, Zhai, & Wang, 2014; Singh, Sulaiman, & Hashim, 2015) và cellulose (Rosa & ctg., 2009; Rosa, Nancy, Claudia, Lourdes, & Jorge, 2011). Hướng sử dụng enzyme ngoại bào như laccase, mangan peroxydase và lignin peroxydase trong xúc tác các phản ứng oxy hóa khử được coi là biện pháp hiệu quả trong việc xử lý thuốc nhuộm (Marim & ctg., 2016).

Trong nghiên cứu y sinh, *P. sanguineus* được chứng minh mang lại hiệu quả cao trong hoạt tính làm giảm mỡ máu trên mô hình chuột tiểu đường (Rech & ctg., 2020), hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm (Jaszek & ctg., 2015; Mendoza, Dulay, Valentino, & Reyes, 2020; Smânia & ctg., 1995; Smânia, Smânia, & Loguercio-Leite, 1998), kháng virus (Smânia & ctg., 2003), kháng oxy hóa (Borderes, Costa, Guedes, & Tavares, 2011), kháng viêm (Chen & ctg., 2020; Jouda & ctg., 2018; Lu, Lin, Hsu, & Lin, 2010) và hoạt tính kháng ung thư (Achenbach & Blümm, 1991; Boukes, Koekemoer, van de Venter, & Govender, 2017; Mendoza & ctg., 2020; Mateusz & ctg., 2021; Ren, Liu, Zhu, Yang, & Fu, 2006; Smânia & ctg., 2003; Yang & ctg., 2020). Trong đó, hoạt tính kháng khuẩn được coi là hoạt tính nổi bật và được quan tâm nghiên cứu nhiều nhất ở nấm *P. sanguineus*. Các hoạt tính khác của nấm *P. sanguineus* như hoạt tính kháng viêm vẫn chưa được quan tâm nghiên cứu, đặc biệt là các nghiên cứu ở Việt Nam.

Trong khi đó, có nhiều bệnh lý nghiêm trọng liên quan đến các phản ứng viêm ở cơ thể người như đột quỵ (Schmid-Schönbein & Hugli, 2005), bệnh tim thiếu máu cục bộ (Entman & ctg., 1991), bệnh đái tháo đường (Calabro, Chang, Willerson, & Yeh, 2005), bệnh viêm xương khớp (Benito, Veale, FitzGerald, Van Den Berg, & Bresnihan, 2005). Thêm vào đó, có những bằng chứng cho rằng phản ứng viêm ở cơ thể có liên quan đến sự hiện diện số lượng lớn của các yếu tố oxy hóa như các gốc tự do, gây ra bệnh lý cao huyết áp (Suematsu, Suzuki, Delano, & Schmid-Schönbein, 2002).

Việc tìm ra các hợp chất có nguồn gốc từ tự nhiên có hoạt tính kháng viêm đóng vai trò rất quan trọng trong nghiên cứu điều trị các bệnh liên quan đến phản ứng viêm ở người. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm bước đầu sàng lọc khả năng kháng viêm và kháng oxy hóa của nấm Vân Chi đỏ *P. sanguineus* phân lập ở Việt Nam.

2. Cơ sở lý thuyết

Nghiên cứu về thành phần cao chiết thô petroleum ether, ethyl acetate và methanol từ *P. sanguineus* tại Trung Quốc cho thấy nấm có chứa các hợp chất thuộc nhóm steroid, terpenoid và

glycoside (Ren & ctg., 2006). Trong khi đó, các hợp chất thuộc nhóm terpenoid và steroid là các nhóm hợp chất có hoạt tính sinh học cao trong đó có hoạt tính kháng oxy hóa (Gonzalez-Burgos & Gomez-Serranillos, 2012; Grabmann, 2005; Mooradian, 1993) và kháng viêm (Jeong & Bae, 2014; Rios, Recio, Maññez, & Giner, 2000).

Hoạt tính kháng oxy hóa của nấm *P. sanguineus* được chứng minh qua nghiên cứu của Borderes và cộng sự (2011). Sử dụng phương pháp DPPH, cao chiết từ hệ nấm sợi được chứng minh là có hoạt tính kháng oxy hóa với IC_{50} là 1.62 mg/mL (Borderes & ctg., 2011) và 4.21 mg/mL (Gambato & ctg., 2016). Hiệu quả kháng oxy hóa được nâng cao hơn với cao chiết từ nấm phân lập ở Việt Nam ở giai đoạn quả thể với IC_{50} là 196.68 μ g/mL ở nghiên cứu của Tran, Duong, và Bui (2020).

Hoạt tính kháng viêm của nấm *P. sanguineus* chưa được nghiên cứu ở nước ta, đặc biệt là nghiên cứu về hoạt tính kháng viêm của nấm ở giai đoạn tiền quả thể hoặc quả thể. Trên thế giới, có một số nghiên cứu báo cáo về vai trò kháng viêm của nấm *P. sanguineus* như nghiên cứu của Lu và cộng sự (2010) sử dụng dòng tế bào BV-2 được sử dụng làm mô hình viêm để sàng lọc các hợp chất bảo vệ thần kinh từ sợi nấm *P. sanguineus*. Một hợp chất được phân lập cho thấy sự ức chế đáng kể việc sản xuất nitric oxide (NO) ở tế bào BV-2 kích thích bởi lipopolysaccharide (LPS) (Lu & ctg., 2010).

Nghiên cứu của Chen và cộng sự (2020) cho thấy hoạt tính kháng viêm của cao chiết ethanol từ hệ nấm sợi *P. sanguineus* đã được khảo sát trong mô hình viêm đại tràng thực nghiệm do dextran sulfat sodium (DSS) gây ra (Chen & ctg., 2020). Nghiên cứu hoạt tính kháng viêm của hoạt chất tách chiết từ nấm *P. sanguineus* đã được chứng minh trên mô hình Raw264.7 (Jouda & ctg., 2018). Nghiên cứu cũng chỉ ra con đường tác động của hoạt chất gây ra tình trạng kháng viêm trên mô hình tế bào Raw264.7. Tuy nhiên, nghiên cứu này chỉ thực hiện trên đơn chất tách chiết từ việc nuôi tơ nấm trên môi trường gạo trong 30 ngày, mà chưa đánh giá khả năng kháng viêm của cao chiết tại thời điểm thu nhận sinh khối nấm.

Cho đến nay, đã có một vài nghiên cứu nói về khả năng kháng viêm của *P. sanguineus* thông qua đánh giá tiềm năng hợp chất tách chiết từ sinh khối nấm, hoặc hệ sợi nấm mà chưa có nghiên cứu chứng minh hoạt tính của quả thể hoặc tiền quả thể. Do vậy, nghiên cứu được thực hiện nhằm xác định khả năng kháng viêm của *P. sanguineus* giai đoạn tiền quả thể trên mô hình tế bào Raw264.7. Ngoài ra, hoạt tính kháng oxy hóa của cao chiết tổng từ nấm *P. sanguineus* giai đoạn tiền quả thể cũng được báo cáo trong nghiên cứu này.

3. Phương pháp nghiên cứu

3.1. Vật liệu

Sinh khối nấm Vân Chi đỏ *Pycnoporus sanguineus* phân lập ở Bình Dương, Việt Nam được nuôi trên giá thể thóc và mùn cưa đến giai đoạn tiền quả thể được cung cấp bởi đề tài tiền đề của nhóm nghiên cứu Viện Kỹ thuật Công nghệ cao NTT, trường Đại học Nguyễn Tất Thành (Truong & Ngo, 2020). Theo đó, sau khi định danh bằng phương pháp hình thái và giải trình tự, mẫu tơ nấm *P. sanguineus* được cấy vào các túi cơ chất chứa 50% thóc và 50% mùn cưa với độ ẩm 60%. Các túi cơ chất được ủ trong tối trong 30 ngày cho đến khi tơ nấm phủ kín cơ chất và nuôi trong điều kiện túi cơ chất mở, có ánh sáng mặt trời trong 30 ngày tiếp theo để thúc đẩy phát triển sinh khối tiền quả thể và hình thành sắc tố (**Hình 1**). Thời gian hình thành tiền quả thể là 07 ngày tính từ thời điểm xuất hiện mầm quả thể.



Hình 1. Hình ảnh nấm *P. sanguineus* giai đoạn tiền quả thể

3.2. Phương pháp

3.2.1. Tách chiết cao thô từ nấm *P. sanguineus*

Nấm *P. sanguineus* sau nuôi cấy trên giá thể mùn cưa và thóc ở giai đoạn tiền quả thể được xay nhỏ bằng máy xay. Sau đó, cao chiết nấm được tách chiết trong dung môi ethanol (EtOH) và ủ ở 28°C trong 10 ngày. Dịch chiết sau đó được ly tâm bỏ cặn và cô quay đuổi dung môi. Cao thô trong dung môi EtOH của *P. sanguineus* sau đó được đông khô để loại nước và tiếp tục làm khô đến khối lượng không đổi bằng bình hút ẩm. Bằng phương pháp sấy và cân đến khối lượng không đổi, độ ẩm của cao chiết được xác định là 0.31%. Bột cao thô được bảo quản ở nhiệt độ -20°C. Hiệu suất tách chiết (chưa trừ độ ẩm) được tính theo công thức:

$$H (\%) = \frac{\text{khối lượng cao chiết thô}}{\text{khối lượng nấm ban đầu}} \times 100 \quad (1)$$

Cao chiết EtOH từ nấm *P. sanguineus* được pha trong dung môi dimethyl sulfoxide (DMSO) ở nồng độ 40 mg/ml. Các cao chiết sau khi hòa tan được lọc vô trùng với kích thước lỗ lọc là 0.22µm và trữ ở điều kiện -20°C cho tới khi sử dụng.

3.2.2. Định tính thành phần hóa học của cao chiết

Cao chiết *P. sanguineus* được định tính một số thành phần terpenoid, polyphenol và flavonoid dựa trên tính chất hóa học của các hợp chất này. Quy trình định tính các nhóm hợp chất terpenoid, polyphenol, flavonoid được thực hiện theo các nghiên cứu trước (Chittasupho & Athikomkulchai, 2018; Das & ctg., 2014; Wesp & Brode, 1934).

3.2.3. Hoạt tính kháng oxy hóa

DPPH là phương pháp được sử dụng để đánh giá khả năng loại gốc tự do chỉ thị cho khả năng kháng oxy hóa của cao chiết *P. sanguineus*. Phương pháp được dựa trên phản ứng khử 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) thành 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazin (DPPH - H), được thể hiện qua việc làm giảm màu của DPPH. Thử nghiệm được thực hiện như mô tả của Brand-Williams Cuvelier, và Berset (1995). Thí nghiệm được lặp lại 03 lần với đối chứng dương là Vitamin C (Ascorbic acid, Sigma Aldrich). Nồng độ đối chứng dương Vitamin C được sử dụng trong phản ứng là 1, 2, 4, 8, 16, 32 µg/ml. Mẫu cao chiết được khảo sát ở nồng độ 0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 và 100 µg/ml. Các mẫu cao chiết và đối chứng được đo mật bước sóng 517nm bằng thiết bị đo mật độ quang JenWay Genova Plus. Khả năng ức chế gốc tự do DPPH của cao chiết *P. sanguineus* được xác định thông qua phần trăm phân cắt gốc DPPH (I%) tính theo công thức sau:

$$I \% = \frac{A_1 - (A_2 - A_3)}{A_1} \times 100\% \quad (2)$$

A₁: Giá trị mật độ quang của Methanol trong DPPH

A₂: Giá trị mật độ quang của mẫu thử sau phản ứng với DPPH

A₃: Giá trị mật độ quang của mẫu nền (chỉ chứa cao chiết trong Methanol, không chứa DPPH)

3.2.4. Hoạt tính kháng viêm của cao chiết *P. sanguineus*

Dòng tế bào Raw264.7 được nuôi trong môi trường DMEM có bổ sung 10% huyết thanh thai bò (FBS), 100 µg/ml kháng sinh penicillin và streptomycin và ủ ở 37°C, 5% CO₂. Mỗi giếng của đĩa 96 giếng (Corning) được thêm vào 104 tế bào. Sau đó, đĩa tế bào được ủ ở tủ ấm (37°C, 5% CO₂) trong 24 giờ làm mô hình cho thử nghiệm MTT và thử nghiệm giải phóng NO.

Khả năng gây độc tế bào Raw264.7 của cao chiết *P. sanguineus*. Khả năng gây độc tế bào RAW 264.7 của cao chiết được thực hiện tương tự như thử nghiệm MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) báo cáo ở nghiên cứu trước (Nguyen, Duong, & Nguyen, 2022). Theo đó, nồng độ sử dụng trong thí nghiệm của mẫu cao chiết và đối chứng dương doxorubicin (DOX, Kabi, Đức) là 0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 và 100 µg/ml. Thời gian xử lý tế bào với chất thử nghiệm là 48 giờ. Phương pháp được lặp lại 03 lần tại mỗi nồng độ của cao chiết. Sau khi xử lý với dung dịch MTT (5 mg/ml) sau 48 giờ thử nghiệm, độ hấp thụ quang học ở bước sóng 570nm của các giếng thử nghiệm được đo bằng máy đọc ELISA (Biotek). Đồ thị thể hiện phần trăm số tế bào chết được vẽ bằng phần mềm Prism v5.0.

Tỷ lệ ức chế (I% - tỉ lệ tế bào chết) được tính theo công thức sau:

$$I (\%) = 100 - \left[100 * \left(\frac{A-C}{B-C} \right) \right] \quad (3)$$

Với A là OD_{570nm} của mẫu thử nghiệm

B là OD_{570nm} của đối chứng âm DMSO

C là OD_{570nm} của đối chứng trắng

Thử nghiệm giải phóng nitric oxide (NO). Mô hình tế bào Raw264.7 được kích hoạt phản ứng viêm bằng lipopolysaccharide (LPS) 1 µg/ml và thử nghiệm khả năng giảm viêm bằng các nồng độ 12.5 và 25 µg/ml của cao chiết *P. sanguineus*. Đĩa thử nghiệm được ủ ở 37°C, 5% CO₂ trong 24 giờ. Sau đó, 50 µl Griess Reagent (Sigma Aldrich) được thêm vào 50 µl dung dịch ở mỗi giếng và ủ trong 10 phút ở 37°C, 5% CO₂. Đĩa thử nghiệm tiếp theo được đo OD_{540nm} bằng máy đọc đĩa ELISA (Biotek). Đường chuẩn NO được xây dựng dựa trên chất chuẩn là NaNO₂.

4. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

4.1. Kết quả tách chiết cao thô từ nấm *P. sanguineus* giai đoạn tiền quả thể

Mẫu tai nấm tươi (39.3g) được tách chiết trong dung môi EtOH bằng phương pháp ngâm kiệt trong 07 ngày ở 28°C. Dịch chiết được thu nhận và cô quay đuôi dung môi đến khối lượng không đổi. Hiệu suất tách chiết cao chiết EtOH khoảng 4.59 % (chưa trừ ẩm). Cao chiết sau đó được đánh giá nhóm chức có hoạt tính sinh học.

4.2. Định tính các hợp chất thuộc nhóm terpenoid, polyphenol và flavonoid trong cao chiết

Cao chiết thô được xác định các nhóm chức terpenoid, polyphenol và flavonoid bằng phản ứng màu. Cao chiết phản ứng với dung dịch FeCl₃ tạo dung dịch có màu xanh đen, điều này cho thấy cao chiết có chứa thành phần polyphenol. Tương tự, cao chiết phản ứng với Zn/dung dịch HCl và phản ứng Salkowski cho màu hồng đỏ, cho thấy cao chiết có chứa thành phần flavonoid và terpenoid tương ứng (**Bảng 1**). Các nhóm hóa học này đều có thể mang hoạt tính sinh học quan trọng bao gồm kháng oxy hóa (Gonzalez-Burgos & Gomez-Serranillos, 2012; Grabmann, 2005)

và kháng viêm (Hussain & ctg., 2016; Yahfoufi, Alsadi, Jambi, & Matar, 2018). Vì có chứa các thành phần này, cao chiết từ nấm *P. sanguineus* giai đoạn tiền quả thể được mong đợi có hoạt tính kháng viêm và kháng oxy hóa cao.

Bảng 1

Kết quả định tính các thành phần nhóm chức trong cao chiết *P. sanguineus*

Nhóm hợp chất	Phản ứng	Định tính
Polyphenol	Muối FeCl ₃	+
Flavonoid	Kim loại kẽm và dung dịch HCl	+
Terpenoid	Salkowski	+

4.3. Hoạt tính kháng oxy hóa

Hoạt tính kháng oxy hóa của cao chiết nấm *P. sanguineus* và Vitamin C được xác định dựa vào nồng độ cao chiết/hợp chất phân cắt 50% gốc tự do - IC₅₀. Giá trị IC₅₀ được xác định trong **Bảng 2** thể hiện hoạt tính kháng oxy hóa của cao chiết *P. sanguineus* rất tốt nhưng yếu hơn Vitamin C khoảng 03 lần.

Bảng 2

Khả năng loại bỏ gốc tự do DPPH của cao chiết *P. sanguineus*

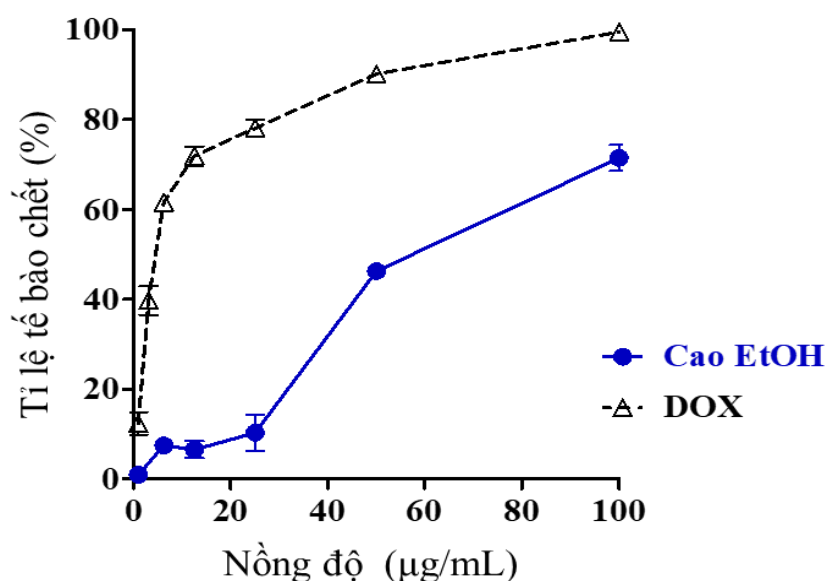
Mẫu thử nghiệm	IC ₅₀ (trung bình cộng ± độ lệch chuẩn - µg/ml)
Vitamin C	10.32 ± 0.02
Cao chiết	30.0 ± 0.54

Dựa trên giá trị nồng độ bắt phân cắt được 50% gốc tự do (IC₅₀) của cao chiết nấm, hoạt tính kháng oxy hóa của cao chiết nấm giai đoạn tiền quả thể ở nghiên cứu này được đánh giá là rất tốt so với các cao chiết thu nhận từ hệ sợi nấm và quả thể ở các nghiên cứu trước (Borderes & ctg., 2011; Tran & ctg., 2020). Sự khác biệt ở hiệu quả kháng oxy hóa của nấm ở nghiên cứu này so với kết quả của Borderes có thể do nguồn cao chiết từ sợi tơ nấm trong nghiên cứu của Borderes không chứa nhiều hợp chất có hoạt tính kháng oxy hóa bằng nấm ở giai đoạn quả thể/tiền quả thể hoặc do nguồn chủng nấm khác nhau. Tuy nhiên, sự so sánh này được coi là chưa đủ dữ kiện khi nghiên cứu của tác giả Borderes và cộng sự (2011) không sử dụng Vitamin C làm đối chứng dương. Hoạt tính kháng oxy hóa của cao chiết từ chủng nấm ở đề tài này cũng tốt hơn cao chiết từ chủng nấm tại Cần Thơ, Việt Nam (Tran & ctg., 2020). Điều này khẳng định tiềm năng kháng oxy hóa của cao chiết từ nấm *P. sanguineus* thu nhận ở Bình Dương, Việt Nam giai đoạn tiền quả thể.

4.4. Hoạt tính kháng viêm của cao chiết *P. sanguineus*

4.4.1. Khả năng gây độc tế bào Raw264.7 của cao chiết *P. sanguineus*

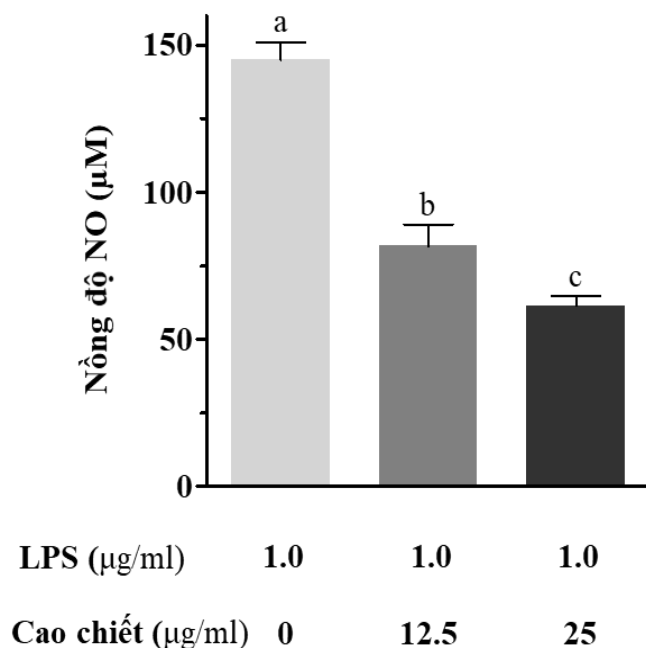
Kết quả gây độc tế bào Raw264.7 của cao chiết *P. sanguineus* được thực hiện bằng thử nghiệm MTT. Theo đó, cao chiết *P. sanguineus* được đánh giá thông qua giá trị IC₅₀ (khả năng gây chết 50% tế bào). Kết quả cho thấy, IC₅₀ của cao chiết trên tế bào Raw264.7 là 47.5 ± 2.4 µg/mL. Thông qua biểu đồ gây chết **Hình 2**, chúng tôi chọn nồng độ cao chiết cho thử nghiệm hoạt tính kháng viêm là 25 và 12.5 µg/mL để đảm bảo điều kiện nồng độ cao chiết không quá ảnh hưởng lên mật độ tế bào sống.



Hình 2. Biểu đồ gây độc tế bào Raw264.7 của cao chiết EtOH từ nấm *P. sanguineus*. Các số liệu được trình bày là trung bình cộng (Mean) của 03 lần lặp lại và độ lệch chuẩn (SD)

4.4.2. Hoạt tính kháng viêm của cao chiết *P. sanguineus*

Khả năng kháng viêm của nấm *P. sanguineus* giai đoạn tiền quả thể được phân tích dựa trên sự ức chế lượng NO giải phóng ra do tế bào RAW 264.7 bị viêm khi được xử lý bằng LPS. Tại nồng độ cao chiết 12.5 µg/ml, nồng độ NO tạo ra giảm đáng kể so với đối chứng không sử dụng cao chiết. Tương tự, ở nồng độ 25 µg/ml, cao chiết cũng thể hiện hoạt tính kháng viêm trong việc làm giảm mức độ NO tạo ra có ý nghĩa thống kê so với đối chứng (**Hình 3**). Kết quả này cho thấy *P. sanguineus* giai đoạn tiền quả thể có khả năng kháng viêm trên mô hình *in vitro*. Kết quả này khẳng định thêm vai trò kháng viêm của *P. sanguineus*, tương tự như ở các nghiên cứu chứng minh cao chiết EtOH có tác dụng kháng viêm trên mô hình chuột (Chen & ctg., 2020), polysaccharide có tác dụng kháng viêm *in vitro* mô hình tế bào BV-2 (Lu & ctg., 2010) và hợp chất Lambertellin cô lập từ *P. sanguineus* chủng MUCL 51321 được chứng minh có tác dụng kháng viêm trên mô hình tế bào RAW 264.7 thông qua con đường MAPK and NF-κB (Jouda & ctg., 2018). Nghiên cứu của Jouda và cộng sự (2018) cho thấy hợp chất Lambertellin cô lập từ *P. sanguineus* có vai trò kháng viêm tốt, được chứng minh khi Lambertellin ở nồng độ 10µM làm giảm lượng NO tạo ra khoảng hai lần so với đối chứng. Kết quả này tương tự như kết quả kháng viêm của cao chiết *P. sanguineus* ở nồng độ 25 µg/mL được trình bày trong nghiên cứu này. Jouda và cộng sự (2018) cũng lần đầu tiên cô lập được một hợp chất mới ergosta-5,7,22-trien-3-ol từ *P. sanguineus*, tuy nhiên, hợp chất Lambertellin không thể hiện hoạt tính kháng viêm ở mô hình tế bào Raw 264.7. Nghiên cứu của Lu và cộng sự (2010) cũng là một minh chứng cho thấy cao chiết từ *P. sanguineus* có hiệu quả kháng viêm rất tốt. Nghiên cứu chứng minh cao chiết ethanol, cao chiết ethyl acetate, cao chiết butanol đều thể hiện hoạt tính kháng viêm trên mô hình BV-2 khi làm giảm lượng NO sinh ra. Trong nghiên cứu của tác giả Lu, duy chỉ có cao chiết nước không thể hiện hoạt tính kháng viêm. Tuy nhiên, cao chiết được sử dụng trong nghiên cứu của Lu được tách chiết từ hệ sợi nấm nuôi cấy lỏng.



Hình 3. Hoạt tính kháng viêm của cao chiết *P. sanguineus* trên mô hình tế bào RAW 264.7. Các chữ cái khác nhau trên cột biểu thị khác biệt có ý nghĩa thống kê bằng kiểm định ANOVA

Theo Rohr, Levin, Mentaberry, và Wirth (2013), *P. sanguineus* biểu hiện các gen mã hóa enzyme liên quan đến con đường sinh tổng hợp terpenoid, ngoài ra, các gen mã hóa sáu chuỗi tổng hợp terpene khác được tìm thấy ở *P. sanguineus* (Rhor & ctg., 2013). Như vậy, sự biểu hiện các gen mã hóa enzyme tổng hợp monoterpene, sesquiterpene, triterpene và lanosterol cho phép dự đoán sự có mặt của các hợp chất terpenoid ở *P. sanguineus*.

Mặt khác, terpenoid đã được chứng minh có một phổ rộng các hoạt tính sinh học bao gồm kháng oxy hóa (Gonzalez-Burgos & Gomez-Serranillos, 2012; Grabmann, 2005) và kháng viêm (Jeong & Bae, 2014; Rios & ctg., 2000; Wu & ctg., 2011; Yadav, Prasad, Sung, Kannappan, & Aggarwal, 2010). Do vậy, chúng tôi nghi ngờ hoạt tính kháng oxy hóa và kháng viêm của cao chiết *P. sanguineus* là do tác dụng của terpenoid có trong cao chiết. Tuy nhiên, để khẳng định mối liên quan này thì cần có thử nghiệm kháng oxy hóa và kháng viêm của các hợp chất terpenoid cô lập từ nấm *P. sanguineus* trong tương lai.

5. Kết luận & gợi ý

Cao chiết nấm *P. sanguineus* giai đoạn tiền quả thể phân lập tại Bình Dương, Việt Nam thể hiện hoạt tính kháng oxy hóa rất tốt với IC_{50} là 30.0 ± 0.54 µg/ml (đối chứng dương là Vitamin C có IC_{50} là 10.32 ± 0.02 µg/ml). Cao chiết *P. sanguineus* cũng thể hiện hoạt tính kháng viêm tốt, tại nồng độ cao chiết 12.5 và 25 µg/ml, nồng độ NO giải phóng giảm đáng kể so với đối chứng không sử dụng cao chiết. Như vậy, cao chiết từ nấm *Pycnoporus sanguineus* có tác dụng kháng oxy hóa và kháng viêm tốt. Điều này mở ra hướng đi sắp tới cho nghiên cứu về các hợp chất chịu trách nhiệm kháng oxy hóa và kháng viêm của nấm *P. sanguineus*.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ NTTU trong đề tài mã số 2021.01.162.

Tài liệu tham khảo

- Achenbach, H., & Blümm, E. (1991). Investigation of the Pigments of *Pycnoporus sanguineus*-*Pycnosanguin* and New Phenoxazin- 3- ones. *Archiv der Pharmazie*, 324(1), 3-6.
- Benito, M. J., Veale, D. J., FitzGerald, O., Van Den Berg, W. B., & Bresnihan, B. (2005). Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 64(9), 1263-1267.
- Borderes, J., Costa, A., Guedes, A., & Tavares, L. B. B. (2011). Antioxidant activity of the extracts from *Pycnoporus sanguineus* mycelium. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(6), 1167-1174.
- Boukes, G., Koekemoer, T., van de Venter, M., & Govender, S. (2017). Cytotoxicity of thirteen South African macrofungal species against five cancer cell lines. *South African Journal of Botany*, 113, 62-67.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.-E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Calabro, P., Chang, D. W., Willerson, J. T., & Yeh, E. T. (2005). Release of C-reactive protein in response to inflammatory cytokines by human adipocytes: Linking obesity to vascular inflammation. *Journal of the American College of Cardiology*, 46(6), 1112-1113.
- Chen, X., Li, M., Li, D., Luo, T., Xie, Y., Gao, L., ... Lai, X. (2020). Ethanol extract of *Pycnoporus sanguineus* relieves the dextran sulfate sodium-induced experimental colitis by suppressing helper T cell-mediated inflammation via apoptosis induction. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 127(7), Article 110212.
- Chittasupho, C., & Athikomkulchai, S. (2018). Nanoparticles of *Combretum quadrangulare* leaf extract induce cytotoxicity, apoptosis, cell cycle arrest and anti-migration in lung cancer cells. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 45(1), 378-387.
- Das, B., Al-Amin, M., Russel, S., Kabir, S., Bhattacharjee, R., & Hannan, J. (2014). Phytochemical screening and evaluation of analgesic activity of *Oroxylum indicum*. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 76(6), Article 571.
- Entman, M. L., Michael, L., Rossen, R. D., Dreyer, W. J., Anderson, D. C., Taylor, A. A., & Smith, C. W. (1991). Inflammation in the course of early myocardial ischemia. *The FASEB Journal*, 5(11), 2529-2537.
- Feng, N., Zhai, H., & Wang, C. (2014). Identification and lignin degradation of *Pycnoporus sanguineus* strain NFZH-1 with an endogenous mediator. *Chemistry and Industry of Forest Products*, 34(5), 1-7.
- Gambato, G., Todescato, K., Pavão, E. M., Scortegagna, A., Fontana, R. C., Salvador, M., & Camassola, M. (2016). Evaluation of productivity and antioxidant profile of solid-state cultivated macrofungi *Pleurotus albidus* and *Pycnoporus sanguineus*. *Bioresource Technology*, 207, 46-51.
- Gauna, A., Larran, A. S., Feldman, S. R., Permingeat, H. R., & Perotti, V. E. (2020). Secretome characterization of the lignocellulose-degrading fungi *Pycnoporus sanguineus* and *Ganoderma applanatum*. *bioRxiv*, 113(5), 877-890.
- Gonzalez-Burgos, E., & Gomez-Serranillos, M. (2012). Terpene compounds in nature: A review of their potential antioxidant activity. *Current Medicinal Chemistry*, 19(31), 5319-5341.

- Grabmann, J. (2005). Terpenoids as plant antioxidants. *Vitamins & Hormones*, 72, 505-535.
- Hussain, T., Tan, B., Yin, Y., Blachier, F., Tossou, M. C., & Rahu, N. (2016). Oxidative stress and inflammation: What polyphenols can do for us? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016(4), 1-9.
- Jaszek, M., Osinska-Jaroszuk, M., Sulej, J., Matuszewska, A., Stefaniuk, D., Maciag, K., ... Grzywnowicz, K. (2015). Stimulation of the antioxidative and antimicrobial potential of the blood red bracket mushroom *Pycnoporus sanguineus* (higher Basidiomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 17(8), 701-712.
- Jeong, G.-S., & Bae, J.-S. (2014). Anti-inflammatory effects of triterpenoids; naturally occurring and synthetic agents. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, 11(3), 316-329.
- Jouda, J. B., Njoya, E. M., Mbazona, C. D., Zhou, Z., Lannang, A. M., Wandji, J., ... Wang, F. (2018). Lambertellin from *Pycnoporus sanguineus* MUCL 51321 and its anti-inflammatory effect via modulation of MAPK and NF- κ B signaling pathways. *Bioorganic Chemistry*, 80, 216-222.
- Lu, M.-K., Lin, H.-O., Hsu, F.-L., & Lin, Y.-L. (2010). Anti-inflammatory principles of cultivated *Pycnoporus sanguineus*. *Journal Chinese Medical*, 21(3), 75-83.
- Marim, R. A., Oliveira, A. C. C., Marquezoni, R. S., Servantes, J. P. R., Cardoso, B. K., Linde, G. A., ... Valle, J. S. (2016). Use of sugarcane molasses by *Pycnoporus sanguineus* for the production of laccase for dye decolorization. *Genetics and Molecular Research*, 15(4), 1-9.
- Mateusz, Z. A. P., Paduch, R., Jaszek, M., Frant, M., Stefaniuk, D., Matuszewska, A., & Grzywnowicz, K. (2021). Chemopreventive activity of bioactive fungal fractions isolated from milk-supplemented cultures of *Cerrena unicolor* and *Pycnoporus sanguineus* on colon cancer cells. *3 Biotech*, 11(1), 1-13.
- Mendoza, W. C., Dulay, R. M. R., Valentino, M. J. G., & Reyes, R. G. (2020). Mycelial biomass and biological activities of Philippine mushroom *Pycnoporus sanguineus* in time-course submerged culture. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 8(5), 88-93.
- Mooradian, A. D. (1993). Antioxidant properties of steroids. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 45(6), 509-511.
- Nguyen, P. T., Duong, H. T., & Nguyen, H. H. (2022). Cytotoxic activity related to survivin mRNA levels by *Combretum quadrangulare* Kurz extract against liver and breast cancer cells. *Ho Chi Minh City Open University Journal of Science-Engineering and Technology*, 12(1), 55-64.
- Rech, G., da Silva, L. L., da Silva, K., Silva, T. M., Fontana, R. C., Salvador, M., ... Camassola, M. (2020). Lipid- lowering effect of Pinus sp. sawdust and *Pycnoporus sanguineus* mycelium in streptozotocin- induced diabetic rats. *Journal of Food Biochemistry*, 44(8), 1-12.
- Ren, G., Liu, X., Zhu, H., Yang, S., & Fu, C. (2006). Evaluation of cytotoxic activities of some medicinal polypore fungi from China. *Fitoterapia*, 77(5), 408-410.
- Rios, J., Recio, M., Mañáñez, S., & Giner, R. (2000). Natural triterpenoids as anti-inflammatory agents. *Studies in Natural Products Chemistry*, 22(C), 93-143.
- Rohr, C. O., Levin, L. N., Mentaberry, A. N., & Wirth, S. A. (2013). A first insight into *Pycnoporus sanguineus* BAFC 2126 transcriptome. *PloS One*, 8(12), 1-14.

- Rosa, Q. C., Edgar, B. L., Edgar, D. G., Alfredo, M., Jorge, F. M., & Claudia, M. A. (2009). Characterization of cellulolytic activities of *Bjerkandera adusta* and *Pycnoporus sanguineus* on solid wheat straw medium. *Electronic Journal of Biotechnology*, 12(4), 5-6.
- Rosa, Q. C., Nancy, P. M., Claudia, M. A., Lourdes, A. U., & Jorge, F. M. (2011). Evaluation of different lignocellulosic substrates for the production of cellulases and xylanases by the basidiomycete fungi *Bjerkandera adusta* and *Pycnoporus sanguineus*. *Biodegradation*, 22(3), 565-572.
- Schmid-Schönbein, G. W., & Hugli, T. E. (2005). A new hypothesis for microvascular inflammation in shock and multiorgan failure: Self-digestion by pancreatic enzymes. *Microcirculation*, 12(1), 71-82.
- Singh, P., Sulaiman, O., & Hashim, R. (2015). Biodegradation study of *Pycnoporus sanguineus* and its effects on structural and chemical features on oil palm biomass chips. *Journal of Lignocellulose*, 1(3), 210-227.
- Smânia, A., Marques, C., Smânia, E., Zanetti, C., Carobrez, S., Tramonte, R., & Loguercio-Leite, C. (2003). Toxicity and antiviral activity of cinnabarin obtained from *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 17(9), 1069-1072.
- Smânia, A., Monache, F. D., Smânia, E., Gil, M., Benchetrit, L., & Cruz, F. (1995). Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. *Journal of Ethnopharmacology*, 45(3), 177-181.
- Smânia, E. d. F. A., Smânia J., A., & Loguercio-Leite, C. (1998). Cinnabarin synthesis by *Pycnoporus sanguineus* strains and antimicrobial activity against bacteria from food products. *Revista de Microbiologia*, 29(4), 317-320.
- Suematsu, M., Suzuki, H., Delano, F. A., & Schmid-Schönbein, G. W. (2002). The inflammatory aspect of the microcirculation in hypertension: oxidative stress, leukocytes/endothelial interaction, apoptosis. *Microcirculation*, 9(4), 259-276.
- Télliez-Télliez, M., Villegas, E., Rodriguez, A., Acosta-Urdapilleta, M., O'Donovan, A., & Diaz-Godinez, G. (2016). Mycosphere Essay 11: Fungi of *Pycnoporus*: Morphological and molecular identification, worldwide distribution and biotechnological potential. *Mycosphere*, 7(10), 1500-1525.
- Tran, T. D., Duong, C. X., & Bui, D. T. M. (2020). Antioxidant activity of fruiting body extracts from *Pycnoporus sanguineus* mushroom. *Vietnam Journal of Science and Technology*, 58(2), 143-151.
- Truong, T. N. T., & Ngo, V. N. (2020). Phân lập, định danh và khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết sinh khối nấm thuộc chi *Pycnoporus* (Isolation, identification and investigation of antibacterial activity of biomass crude extract from *Pycnoporus fungi*). *Journal of Science and Technology*, 3(3), 46-51.
- Wesp, E. F., & Brode, W. R. (1934). The absorption spectra of ferric compounds. I. The ferric chloride-phenol reaction. *Journal of the American Chemical Society*, 56(5), 1037-1042.
- Wu, C.-R., Hseu, Y.-C., Lien, J.-C., Lin, L.-W., Lin, Y.-T., & Ching, H. (2011). Triterpenoid contents and anti-inflammatory properties of the methanol extracts of *ligustrum* species leaves. *Molecules*, 16(1), 1-15.

- Yadav, V. R., Prasad, S., Sung, B., Kannappan, R., & Aggarwal, B. B. (2010). Targeting inflammatory pathways by triterpenoids for prevention and treatment of cancer. *Toxins*, 2(10), 2428-2466.
- Yahfoufi, N., Alsadi, N., Jambi, M., & Matar, C. (2018). The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols. *Nutrients*, 10(11), 1-23.
- Yang, W., Chen, X., Li, Y., Guo, S., Wang, Z., & Yu, X. (2020). Advances in pharmacological activities of terpenoids. *Natural Product Communications*, 15(3), 1-13.
- Zimbardi, A. L., Camargo, P. F., Carli, S., Neto, S. A., Meleiro, L. P., Rosa, J. C., ... Furriel, R. P. (2016). A high redox potential laccase from *Pycnoporus sanguineus* RP15: Potential application for dye decolorization. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(5), 672-695.

