

# Đánh giá tác dụng hạ acid uric máu của cao chiết petroleum ether từ sinh khối nấm *Ophiocordyceps sinensis*

Huỳnh Thu<sup>1,2,\*</sup>, Lê Phan Quỳnh Như<sup>3</sup>, Đinh Minh Hiệp<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Bộ môn Công nghệ Sinh học, Khoa Kỹ thuật Hóa học, Trường Đại học Bách Khoa Tp. HCM, Việt Nam

<sup>2</sup>Đại học Quốc Gia Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

<sup>3</sup>Khoa Sinh học và Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên Tp. HCM, Việt Nam

<sup>4</sup>Sở Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

## Liên hệ

**Huỳnh Thu**, Bộ môn Công nghệ Sinh học, Khoa Kỹ thuật Hóa học, Trường Đại học Bách Khoa Tp. HCM, Việt Nam

Đại học Quốc Gia Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

Email: huynh\_thu@hcmut.edu.vn

## Lịch sử

- Ngày nhận: 21-9-2023
- Ngày chấp nhận: 27-3-2024
- Ngày đăng: 13-5-2024

## DOI:

<https://doi.org/10.32508/stdjet.v6i4.1211>



## Bản quyền

© ĐHQG Tp.HCM. Đây là bài báo công bố mở được phát hành theo các điều khoản của the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



## TÓM TẮT

*Ophiocordyceps sinensis* là một loại nấm dược liệu quý lâu đời với nhiều hoạt chất có hoạt tính sinh học. Các nghiên cứu trước của chúng tôi đã chứng minh *O. sinensis*, đặc biệt là cao chiết petroleum ether (PE), có tiềm năng hỗ trợ điều trị tăng acid uric nhờ khả năng ức chế xanthine oxidase (XO). Ở nghiên cứu này, khả năng hạ acid uric máu của cao chiết PE được khảo sát trên mô hình chuột tăng acid uric. Mô hình tăng acid uric cấp được thực hiện với liều 250 - 1.000 mg/kg trên chuột bằng kali oxonat. Kết quả cho thấy cao PE của nấm *O. sinensis* không gây chết chuột khi uống ở liều giới hạn 5.000 mg/kg. Kết quả cho thấy cả 3 liều thử nghiệm (250, 500, 1.000 mg/kg) đều có tác dụng hạ acid uric máu.

Mô hình tăng acid uric mạn bằng cách tiêm cách nhật liều kali oxonat giảm dần từ 300 xuống 150 mg/kg. Tỷ lệ tăng acid uric của lô mô hình so với lô chứng sau 7 ngày là 50%, và sau 14 ngày là 36%. Kết quả hạ acid uric trên mô hình tăng acid uric mạn cho thấy liều 1.000 mg/kg và liều 500 mg/kg có tác dụng hạ tốt hơn liều 250 mg/kg. Liều 500 mg/kg làm giảm lượng acid uric 25% sau 7 ngày và 29% sau 14 ngày. Liều 1.000 mg/kg làm giảm lượng acid uric 35% sau 7 ngày và 29% sau 14 ngày. Kết quả xét nghiệm huyết học cho thấy không có sự khác biệt giữa các lô với nhau. Kết quả nhuộm HE cho thấy có sự tổn thương nội quan khi thí nghiệm kéo dài.

**Từ khoá:** cao chiết petroleum ether, đồng trùng hạ thảo, *Ophiocordyceps sinensis*, tác dụng hạ acid uric máu

## GIỚI THIỆU

Tăng acid uric máu là rối loạn chuyển hóa xảy ra khá phổ biến và là nguyên nhân chính dẫn đến bệnh gút và các bệnh liên quan như tăng huyết áp, suy thận, bệnh mạch vành và hội chứng chuyển hóa. Acid uric là sản phẩm của quá trình biến dưỡng liên quan đến enzyme XO, một enzyme quan trọng tham gia vào quá trình dị hóa purin. Enzyme XO hoạt động quá mức sẽ làm tăng lượng acid uric máu. Nếu acid uric không được bài tiết ra ngoài, tích tụ trong máu sẽ tạo thành các tinh thể urat gây tổn thương cho khớp xương, thận hoặc dẫn đến bệnh gout, tăng huyết áp, suy thận, bệnh mạch vành và hội chứng chuyển hóa. Trên thị trường có rất nhiều thuốc sử dụng để điều trị hạ acid uric máu. Tuy nhiên, những loại thuốc này lại gây ra nhiều tác dụng phụ cho người sử dụng như viêm gan, bệnh thận, phản ứng dị ứng và ngộ độc. Vì thế, điều trị tăng acid uric bằng các hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học chiết xuất từ tự nhiên đang là một hướng đi được quan tâm<sup>1,2</sup>.

Nấm *O. sinensis* hay còn có tên gọi dân gian là Đông trùng hạ thảo, là một loại nấm quý sở hữu rất nhiều hoạt tính sinh học<sup>3,4</sup>. *Cordyceps* thuộc một chi trong lớp nấm Ascomycetes (nấm túi), kí sinh trên côn

trùng, chủ yếu là côn trùng và động vật chân đốt khác (nấm entomopathogenic), một số ký sinh trên các loại nấm khác<sup>5-7</sup>. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh *Cordyceps* chứa nhiều hoạt chất như cordycepin, adenosin, hydroxyethyl-adenosin, các nucleoside, ergosterol, polysaccharide, các nguyên tố đa và vi lượng cùng nhiều hoạt chất có hoạt tính sinh học khác<sup>3-6,8-11</sup>.

Ở các nghiên cứu trước, chúng tôi đã chứng minh khả năng ức chế sự hoạt động enzyme XO của *O. sinensis*<sup>12,13</sup>. Theo đó, 250 µg/ml cao chiết PE từ *O. sinensis* có khả năng ức chế 26,21 ± 0,52 % enzyme XO, hoạt tính cao nhất trong các phân đoạn<sup>12</sup>. Bên cạnh đó, ở mô hình chuột gây tăng acid uric bằng liều kali oxonat 300 mg/kg, cao EtOH 500 mg/kg có tác dụng hạ acid uric máu so với lô chứng bệnh là 16,67 %<sup>12</sup>. Do đó, nhằm cung cấp các số liệu về tác dụng hạ acid uric máu của *O. sinensis*, chúng tôi tiếp tục đánh giá tác dụng hạ acid uric máu của cao chiết PE từ sinh khối nấm *O. sinensis* trên mô hình tăng acid uric cấp tính và mạn tính thực nghiệm trên chuột.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

**Trích dẫn bài báo này:** Thu H, Như L P Q, Hiệp D M. **Đánh giá tác dụng hạ acid uric máu của cao chiết petroleum ether từ sinh khối nấm *Ophiocordyceps sinensis*.** *Sci. Tech. Dev. J. - Eng. Tech.* 2023; 6(4):2089-2098.

### Vật liệu nghiên cứu

Nấm *O. sinensis* được cung cấp từ TS. Trương Bình Nguyên và công ty Cổ phần Nguyên Long, Lâm Đồng và được nuôi cấy trên môi trường lỏng tinh trong thời gian 40 ngày (Hình 1) tại Phòng thí nghiệm thuộc Bộ môn Sinh Hoá, Khoa Sinh học và Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – ĐHQG-HCM. Thành phần môi trường nuôi cấy gồm: 200 g khoai tây, 6 g peptone, 4 g cao nấm men, 50 g saccharose.

Chuột nhắt trắng chủng *Swiss albino* 7-8 tuần tuổi, trọng lượng trung bình 18- 22 g, giống đực, khỏe mạnh được cung cấp bởi Viện Pasteur TP. Hồ Chí Minh. Chuột được nuôi giữ ổn định 7 ngày trước khi làm thí nghiệm trong điều kiện phòng thí nghiệm, yên tĩnh, thoáng khí, nhiệt độ từ 20-30 °C, độ ẩm 60-75%. Chuồng nuôi có kích thước phù hợp, có chỗ để thức ăn, nước uống, thoáng, sạch sẽ, để làm vệ sinh. Trong các mô hình khảo sát, chuột được cho uống nước cất hoặc thuốc thử nghiệm vào một giờ nhất định trong vòng 5 ngày trước khi làm thử nghiệm. Trước khi dùng nước cất hoặc thuốc thử nghiệm 5 giờ, chuột không được ăn nhưng được uống nước bình thường. Hóa chất: Dung môi ethanol 96% (EtOH), petroleum ether (PE), n - butanol (BuOH), ethylacetate (EtOAc), dimethyl sulfoxide (DMSO) mua từ hãng Xilong, Trung Quốc. Kali oxonat mua từ hãng Sigma – Aldrich, allopurinol 300mg mua từ CTCP XNK Y tế Domesco, Việt Nam.

### Phương pháp chiết cao

Cao PE được chiết theo phương pháp chiết lỏng-lỏng<sup>10,13</sup>. Sinh khối nấm được sấy khô, xay nhỏ, sau đó chiết với EtOH bằng phương pháp ngâm kiệt, dịch chiết được cô quay để thu được cao EtOH (cao tổng). Cao EtOH được hòa trong nước, sau đó được tách thành nhiều phân đoạn bằng phương pháp chiết lỏng - lỏng với các dung môi khác nhau có độ phân cực tăng dần theo thứ tự petroleum ether (cao PE), ethyl acetat (cao EtOAc), n-butanol (cao BuOH) và nước (cao nước). Các dịch chiết sau đó được cô quay dưới dung môi để thu được các cao chiết phân đoạn, cao chiết được giữ bảo quản ở nhiệt độ -20 °C.

### Khảo sát tác dụng hạ acid uric máu của cao PE

#### Khảo sát độc tính cấp đường uống

Chuột thí nghiệm được cho khảo sát để xem xét ảnh hưởng và khác biệt giữa lô nước cất và DMSO 0,5%. Chuột được chia thành 2 lô, mỗi lô 6 chuột: Lô 1 (Lô chứng): chuột uống nước muối sinh lý liều 0,2 ml/10g thể trọng, lô 2 (Lô mô hình): chuột uống DMSO 0,5%

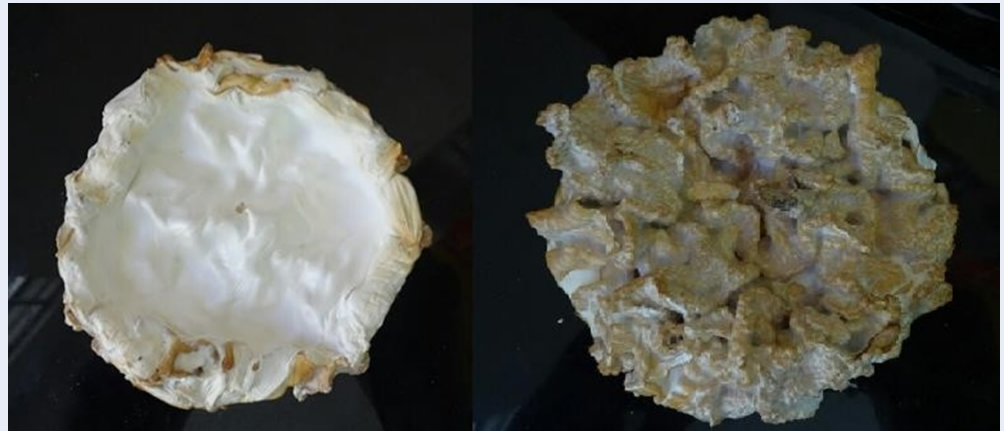
liều 0,2 ml/10g thể trọng. Theo dõi chuột và ghi nhận các triệu chứng như bình thường, không chết hoặc trước khi chết (gãi mồm liên tục, chạy hoảng loạn, ngã xiêu vẹo, co giật, run rẩy, ra mồ hôi, tím tái ở tai, chân, đuôi, tư thế nằm đứng, ...). Sau 1 giờ, lấy máu đuôi chuột, ly tâm, hút huyết thanh và xét nghiệm acid uric để so sánh sự thay đổi giữa 2 lô.

Khảo sát độc tính cấp đường uống theo phương pháp của Litchfield – Wilcoxon.<sup>12,14</sup>. Chuột được cho nhịn đói 12 giờ trước khi thí nghiệm. Cho chuột uống cao PE pha trong DMSO 0,5% ở liều tối đa mà thuốc có thể bơm qua kim tiêm (liều 5.000 mg/kg thể trọng chuột). Cao thuốc được đưa vào dạ dày chuột bằng một kim cong đầu tù qua đường miệng, theo dõi tình trạng chuột. Số lần dùng thuốc: dùng một lần duy nhất trong ngày trong khoảng thời gian từ 8-9 giờ sáng. Quan sát số chuột chết trong 72 giờ và các dấu hiệu khác trong vòng 7 ngày. Chuột chết được mổ để đánh giá tổn thương đại thể.

### Phương pháp tạo mô hình chuột tăng acid uric cấp và khảo sát hoạt tính hạ uric của cao PE

Kali oxonat là chất ức chế uricase, enzyme có vai trò chuyển acid uric thành hợp chất allantoin dễ tan khiến nồng độ acid uric máu hạ xuống. Do đó, kali oxonat được sử dụng để tạo mô hình chuột gây tăng acid uric<sup>12,15,16</sup>. Chia ngẫu nhiên chuột thành 5 lô, mỗi lô 6 con. Ở ngày thí nghiệm thứ 5, chuột ở lô chứng được tiêm màng bụng với nước cất 0,1 ml/10 g thể trọng, các lô còn lại được tiêm kali oxonat nồng độ 200 – 600 mg/kg (0,1 ml/10 g thể trọng). Sau khi tiêm 2 giờ, lấy máu đuôi chuột, ly tâm thu huyết thanh, xét nghiệm để định lượng nồng độ acid uric.

Sau khi gây mô hình thành công tiếp tục tiến hành đánh giá tác dụng hạ acid uric huyết thanh trong mô hình chuột tăng acid uric cấp thực nghiệm của cao chiết. Từ liều độc tính cấp đã khảo sát, chúng tôi sử dụng liều có tác dụng dược lý là 1/10  $D_{max}$  và sử dụng liều giới hạn trên 1/5  $D_{max}$  và giới hạn dưới 1/20  $D_{max}$ . Trong quá trình thí nghiệm, các mẫu thử sẽ được pha loãng với liều phù hợp và cho chuột uống vào buổi sáng khoảng 8-9 giờ với liều 0,1 ml/10 g thể trọng/ngày<sup>12,17</sup>. Ngày thứ 5, chuột được tiêm kali oxonat nồng độ 400 mg/kg một giờ trước khi uống thuốc lần cuối. Lô đối chiếu sẽ được uống thuốc allopurinol 10 mg/kg thể trọng. Sau khi uống thuốc 1 giờ, lấy máu đuôi chuột để định lượng nồng độ acid uric máu.



Hình 1: Sinh khối nấm *O. sinensis* phơi khô

### **Khảo sát tác dụng hạ acid uric huyết thanh trong mô hình chuột tăng acid uric mạn thực nghiệm**

Mô hình chuột tăng acid uric mạn tính được thực hiện bằng cách tiêm cách nhật liều kali oxonat giảm dần (từ 300 mg/kg xuống 150 mg/kg) theo mô tả của Dung LTM và cộng sự<sup>18</sup>. Sau khi tiêm 1 giờ, chuột được cho uống cao liều 0,1 ml/10g thể trọng chuột.

Từ liều  $D_{max}$  có được từ thí nghiệm độc tính cấp, thí nghiệm thực hiện trên 3 liều: 1/5  $D_{max}$  (giới hạn trên), 1/10  $D_{max}$  (liều dược lý) và 1/20  $D_{max}$  (giới hạn dưới). Chuột được cho uống các cao thử hoặc thuốc hàng ngày trong 7-14 ngày. Lấy máu đuôi chuột ở các thời điểm ngày 7 và ngày 14 để định lượng acid uric trong huyết thanh. Sau khi uống thuốc 2 giờ, lấy máu đuôi chuột xét nghiệm huyết học hoàn toàn, ly tâm thu huyết thanh, xét nghiệm để định lượng nồng độ acid uric. Tiến hành mổ nội quan chuột để quan sát vi thể gan, thận, dạ dày.

### **Nhuộm tế bào bằng phương pháp nhuộm HE**

Nhuộm HE (hematoxylin- eosin) là phương pháp nhuộm hai màu liên tiếp. Nhuộm nhân theo nguyên tắc tăng dần, nhuộm bào tương theo nguyên tắc giảm dần. Hematoxylin, thuốc nhuộm cơ bản sẽ cho nhân màu xanh do trong nhân có acid nucleic. Trong khi đó eosin, thuốc nhuộm có tính acid sẽ làm cho bào tương màu hồng vì thế kết quả sẽ cho ra nhân tế bào màu xanh đến xanh đen, bào tương tế bào màu hồng đến đỏ, hồng cầu hồng động, sợi tạo keo hồng nhạt. Quan sát dưới kính hiển vi sự thay đổi sự phân bố, hình dạng, màu sắc của tế bào, bào tương để nhận định, đánh giá mức độ tổn thương của cơ quan chuột. Chúng tôi thực hiện giải phẫu gan, thận, dạ dày chuột,

cố định bằng formol 10% và gửi Bộ môn Giải Phẫu trường Đại học Y dược TP.HCM đọc kết quả.

### **Phương pháp thống kê**

Kết quả được biểu diễn dưới dạng  $M \pm SE$  (M: giá trị trung bình của từng lô, SE: sai số chuẩn). Xử lý thống kê dựa vào phép kiểm One-Way ANOVA bằng phần mềm Excel để đánh giá sự khác biệt về trị số acid uric của các lô thử nghiệm trong cùng một thời điểm. Kết quả thử nghiệm đạt ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95% khi  $p < 0,05$  so với lô chứng.

## **KẾT QUẢ**

### **Hiệu suất chiết cao phân đoạn**

Kết quả cho thấy hiệu suất chiết cao EtOH ban đầu thu được là 24,31%. Cao EtOH được hòa tan trong nước và tiếp tục chiết bằng phương pháp chiết lỏng - lỏng với các dung môi hữu cơ có độ phân cực tăng dần để thu được các cao chiết phân đoạn. Kết quả thu được cho thấy hiệu suất chiết cao PE đạt hiệu suất 9,6%, cao EtOAc đạt hiệu suất 2,6%, cao BuOH đạt hiệu suất 6,15% và cuối cùng cao nước đạt 7,61%.

### **Tác dụng hạ acid uric máu của cao PE**

#### **Kết quả khảo sát độc tính cấp đường uống**

Cao chiết PE không tan tốt trong nước nên DMSO 0,5% được sử dụng làm dung môi hòa tan cao PE. Thí nghiệm này nhằm đánh giá ảnh hưởng của dung môi DMSO đến chuột. Kết quả cho thấy nồng độ acid uric máu trung bình trong chuột không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở lô uống DMSO 0,5% và lô nước cất ( $p > 0,05$ ), với nồng độ uric trung bình ở lô DMSO và lô nước cất lần lượt là  $0,76 \pm 0,20$  mg/dl và  $0,75 \pm 0,21$  mg/dl. Vì vậy, trong các thí nghiệm tiếp theo, cao PE được hòa tan với DMSO 0,5%.

Chuột uống cao chiết PE ở liều 5.000 mg/kg được theo dõi trong 1h, 2h, 1 ngày, 2 ngày, 3 ngày, 5 ngày, 7 ngày. Kết quả cho thấy trong suốt thời gian khảo sát, chuột sinh hoạt bình thường, không có triệu chứng trước khi chết như gãi mồm liên tục, chạy hoãn loạn, ngã xiêu vẹo, co giật, run rẩy, ra mồ hôi, tím tái ở tai, chân, đuôi, tư thế nằm đứng... Điều này chứng tỏ cao PE chiết xuất từ nấm *O. sinensis* không có độc tính ở nồng độ khảo sát. Như vậy, liều 5.000 mg/kg được chọn là  $D_{max}$  (liều cao nhất có thể cho uống qua đường miệng mà không làm chuột chết), từ đó suy ra liều dùng cho thực nghiệm có tác dụng dược lý là liều  $1/10 D_{max}$  (liều 500 mg/kg), sử dụng thêm 2 liều giới hạn là  $1/5 D_{max}$  và  $1/20 D_{max}$  để thử tác dụng hạ acid uric trên mô hình tăng acid uric cấp và mạn tính.

### **Kết quả hạ acid uric của cao PE trên mô hình tăng acid uric cấp**

Để tạo mô hình tăng acid uric cấp, các liều kali oxonat 200 mg/kg, 300 mg/kg, 400 mg/kg và 600 mg/kg được khảo sát. Kết quả cho thấy từ liều 200 mg/kg đến liều 400 mg/kg có tỉ lệ tăng acid uric so với lô chứng và đạt ngưỡng cao nhất ở liều 400 mg/kg (lần lượt là 24,59%, 40,52% và 65,81%). Tuy nhiên, liều 600 mg/kg lại có tỉ lệ tăng so với lô chứng giảm hẳn (44,96%). Phân tích kết quả Anova cho thấy có sự khác biệt về nồng độ acid uric giữa 6 lô với nhau, sự khác nhau này có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ,  $n=6$ ). Dựa vào kết quả này, liều hiệu quả để gây mô hình tăng acid uric cấp tính là 400 mg/kg với tỉ lệ tăng là 65,81%. Sau khi tạo mô hình tăng acid uric cấp tính thành công, tác dụng hạ acid uric máu của cao PE chiết xuất từ *O. sinensis* được khảo sát theo mô hình uống dự phòng. Kết quả nồng độ acid uric máu của các lô chuột thí nghiệm được trình bày ở Bảng 1.

Lô chuột uống allopurinol và lô chuột uống cao PE đều làm giảm nồng độ uric máu sau 4 ngày uống dự phòng, cụ thể lô allopurinol giảm 52,59%, lô cao PE 1.000 mg/kg giảm 35,34%, lô cao PE 500 mg/kg giảm 34,48%, và lô cao PE 250 mg/kg làm giảm 26,72% so với lô bệnh. Nồng độ uric máu ở 3 lô uống cao PE không có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê giữa các lô ( $p > 0,05$ ,  $n=6$ ).

### **Kết quả hạ acid uric của cao PE trên mô hình tăng acid uric mạn**

Lô mô hình tiêm kali oxonat có lượng acid uric tăng 50% (ngày 7) và 36,36% (ngày 14), kết quả đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng, do đó kali oxonat tiêm nhật liều trong 14 ngày có khả năng làm tăng hàm lượng acid uric trong máu. Phù hợp để tạo mô hình gây tăng acid uric mạn tính trên đối tượng chuột thí nghiệm.

Kết quả so sánh giữa lô bệnh và lô sử dụng cao PE 1000 mg/kg, 500 mg/kg cho thấy cao PE 1.000 mg/kg và 500 mg/kg đều có tác dụng hạ acid uric máu khi cho uống 7 ngày hay kéo dài đến 14 ngày đạt ý nghĩa thống kê khi so sánh với lô bệnh (Bảng 2). Trong khi, liều 250 mg/kg có nồng độ acid uric máu giảm ở ngày thứ 7, tuy nhiên khi cho uống tiếp tục đến ngày 14 thì nồng độ acid uric tăng. Allopurinol thường được sử dụng làm giảm acid uric cấp nên chúng tôi chỉ cho chuột uống vào các ngày 7 và 14. Kết quả hàm lượng uric máu của lô cho uống allopurinol là tương tự nhau vào các ngày 7 và 14 ở mô hình tăng uric mạn và tương tự với mô hình cấp. Khả năng hạ uric máu của các nồng độ cao chiết với nhau và với allopurinol cho thấy tác dụng liều cao chiết ở các nồng độ khác nhau là tương tự nhau ở ngày 7, liều 1.000 mg/kg và 500 mg/kg có tác dụng tốt hơn liều 250 mg/kg khi sử dụng kéo dài đến ngày 14.

### **Kết quả công thức máu**

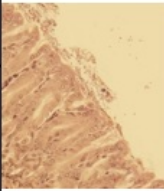
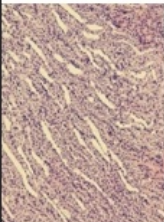
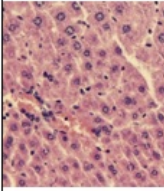
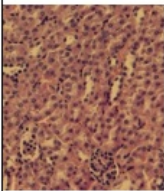
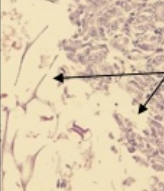
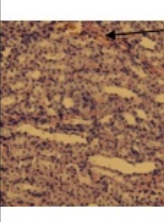
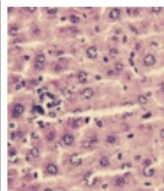
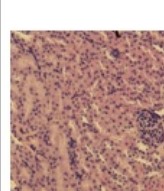
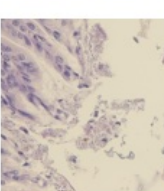
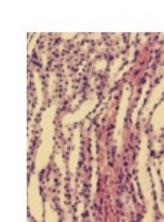
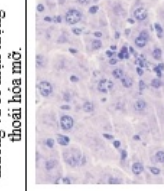
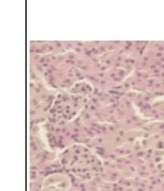
Phân tích công thức máu sẽ cho biết số lượng các tế bào máu và các thành phần liên quan của máu ngoại vi (Bảng 3). Thông qua công thức máu có thể sàng lọc những bệnh lý đặc trưng bởi những thay đổi nghiêm trọng về số lượng tế bào máu, theo dõi diễn biến của một số bệnh như: bệnh bạch cầu (máu trắng), u bạch huyết, các bệnh liên quan tới máu, bệnh mạn tính... Phân tích Anova cho thấy không có sự khác biệt giữa 3 thông số huyết học giữa các lô: số lượng hồng cầu, số lượng bạch cầu, số lượng tiểu cầu trong một thể tích máu.

### **Kết quả nhuộm HE**

Kết quả nhuộm HE được trình bày trong Hình 2. Kết quả nhuộm HE cho gan, dạ dày, thận của 6 lô thể hiện có sự khác biệt giữa lô chứng và các lô còn lại. Lô gây mô hình, lô sử dụng allopurinol và lô sử dụng cao đều gây ra tổn thương cho nội quan. Mức độ viêm và tổn thương ở các lô không có sự khác biệt nhau quá nhiều (ngoại trừ thận của lô 250 mg/kg có mức độ tổn thương nhẹ nhất so với các lô), chứng tỏ thuốc allopurinol và cao PE có thể hạ acid uric nhưng không có tác dụng bảo vệ và hồi phục những tổn thương do kali oxonat gây ra cho nội quan chuột.

## **THẢO LUẬN**

Nấm Đông trùng hạ thảo *O. sinensis* là loài nấm được liệu quý hiếm và là đối tượng được quan tâm nghiên cứu nhiều. Hiện tại, nhóm nghiên cứu chúng tôi cũng đã công bố nhiều công trình liên quan đến hoạt chất và hoạt tính của loài nấm này như hoạt tính kháng oxy hóa, kháng viêm, hoạt tính kháng phân bào và

	Mô dạ dày	Mô thân	Mô gan	Mô thận
Lô chứng	 <p>Viêm nhẹ: xuất hiện tế bào lympho, vùng tế bào chất chưa bị thoái hóa, vẫn còn mịn màng</p>	 <p>Bình thường: vùng tụy đẹp, không có máu, không xuất hiện lympho</p>	 <p>Viêm nặng: tế bào lympho dày đặc trên vùng quan sát, xuất hiện vùng viêm, nhân to nhỏ bất thường và có hiện tượng thoái hóa mỡ.</p>	 <p>Triệu chứng loét dạ dày: lớp niêm mạc bong tróc ra rất nhiều, có máu và xuất hiện lympho gây viêm</p> <p>Viêm: có máu trong ống thận 1 và ống thận 2</p>
Lô bệnh	 <p>Triệu chứng loét dạ dày: lớp niêm mạc bong tróc ra rất nhiều, có máu và xuất hiện lympho gây viêm</p>	 <p>Triệu chứng loét dạ dày: lớp niêm mạc bong tróc ra rất nhiều, có máu và xuất hiện lympho gây viêm</p>	 <p>Viêm nặng: xuất hiện nhiều tế bào lympho, dày đặc trên vùng quan sát, có xuất hiện vùng viêm, nhân to nhỏ bất thường và có hiện tượng thoái hóa mỡ.</p>	 <p>Viêm nặng: có triệu chứng loét dạ dày vì lớp niêm mạc bong tróc ra rất nhiều, có máu và xuất hiện lympho gây viêm</p> <p>Viêm nặng: có máu trong ống thận 1, ống thận 2, và cả cầu thận</p>
Lô allopurinol	 <p>Triệu chứng loét dạ dày: lớp niêm mạc bong tróc ra rất nhiều, có máu và xuất hiện lympho gây viêm</p>	 <p>Viêm nặng: có máu trong vùng tụy</p>	 <p>Viêm nặng: có hiện tượng thoái hóa mỡ nặng, trong các mao mạch có máu, có xuất hiện tế bào lympho.</p>	 <p>Viêm nhẹ: có hiện tượng xuất huyết, ống thận 1, 2 vẫn còn đẹp</p>

Hình 2: Kết quả nhuộm HE

**Bảng 1: Kết quả hạ acid uric máu trong mô hình chuột tăng acid uric cấp thực nghiệm**

	Lô chứng	Lô bệnh	Lô đối chiếu	Lô 1.000 mg/kg	Lô 500 mg/kg	Lô 250 mg/kg
Nồng độ acid uric trung bình (mg/dl)	0,72 ± 0,23	1,16 ± 0,12	0,55 ± 0,10	0,75 ± 0,22	0,76 ± 0,24	0,85 ± 0,19
Tỷ lệ tăng acid uric của lô bệnh so với lô chứng (%)	-	61,11	-	-	-	-
Tỷ lệ giảm acid uric so với lô bệnh (%)	-	-	52,59	35,34	34,48	26,72

**Bảng 2: Kết quả hạ acid uric máu trong mô hình chuột tăng acid uric mạn thực nghiệm**

	Lô chứng		Lô mô hình		Lô allopurinol		Lô 1000 mg/kg		Lô 500 mg/kg		Lô 250 mg/kg	
	Ngày 7	Ngày 14	Ngày 7	Ngày 14	Ngày 7	Ngày 14	Ngày 7	Ngày 14	Ngày 7	Ngày 14	Ngày 7	Ngày 14
Nồng độ acid uric trung bình (mg/dl)	0,78 ± 0,08	0,77 ± 0,12	1,17 ± 0,16	1,05 ± 0,16	0,59 ± 0,07	0,58 ± 0,11	0,87 ± 0,14	0,82 ± 0,13	0,76 ± 0,12	0,75 ± 0,19	0,75 ± 0,08	1,01 ± 0,32

hoạt tính ức chế XO<sup>12,19,20</sup>. Cụ thể là tại nồng độ 100 µg/ml, cao PE và EtOAc ức chế 21,21 ± 0,36 % và 16,28 ± 0,20 % hoạt tính của XO. Khi tăng nồng độ thì hoạt tính ức chế cũng tăng theo, tại nồng độ 250 µg/ml, cao EtOH ức chế 15,44 ± 0,19%, phân đoạn EtOAc ức chế 15,75 ± 0,28 % và phân đoạn PE, ức chế 26,21 ± 0,52 %<sup>13</sup>. Cao EtOH là cao tổng, sau khi chiết xuất, cao EtOH được hòa tan trong nước và tiếp tục chiết bằng phương pháp chiết lỏng - lỏng với các dung môi hữu cơ có độ phân cực tăng dần để thu được các cao chiết phân đoạn. Kết quả thu được cho thấy hiệu suất chiết cao PE đạt hiệu suất 9,6%, cao EtOAc đạt hiệu suất 2,6%, cao BuOH đạt hiệu suất 6,15% và cuối cùng cao nước đạt 7,61%. Ở công bố trước của nhóm trên mô hình chuột gây tăng acid uric bằng liều kali oxonat 300 mg/kg vào năm 2017, cao EtOH ở nồng độ 500 mg/kg có tác dụng hạ acid uric máu 16,67% so với lô chứng bệnh<sup>12</sup>. Bên cạnh đó, cao PE đạt hiệu suất chiết cao nhất chứng tỏ trong sinh khối của *O. sinensis* chứa một lượng lớn các chất kém phân cực (vì PE là dung môi kém phân cực nhất, hòa tan các chất kém phân cực) và vì trong *O. sinensis* có chứa các chất không phân cực như ergosterol, Δ-3 ergosterol, ergosterol peroxide, 3-sitosterol<sup>5,6</sup>. Kết quả của công bố trước đã chứng minh cao PE có tỷ lệ cao trong *O. sinensis* và hoạt tính ức chế XO cao. Kết quả của công bố này tiếp tục đưa ra bằng chứng về tác dụng hạ acid uric trên chuột ở cả mô hình cấp và mạn tính.

Bên cạnh đó, nhộng trùng thảo *Cordyceps militaris* cũng có khả năng ức chế XO và hạ acid uric máu<sup>21,22</sup>.

Tuy nhiên, ở *C. militaris*, cao EtOAc có hoạt tính ức chế XO (giá trị IC<sub>50</sub> = 62.82 µg/ml) cao hơn so với các cao phân đoạn còn lại<sup>21</sup>. Cao chiết nước của *C. militaris* cũng có khả năng hạ acid uric máu trên mô hình chuột tăng acid uric (gây bởi potassium oxonate), cao chiết nước cũng gây vài tác động nhỏ lên các cơ quan chức năng của chuột<sup>22</sup>. Theo nhóm nghiên cứu này, cordycepin được xem là chất đóng vai trò chính trong việc hạ acid uric máu, cordycepin làm giảm lượng serum acid uric, điều hòa uric acid transporter 1 (URAT1) ở thận<sup>21,23</sup>. Đáng lưu ý hơn, hoạt chất cordycepin không gây tác động bất lợi lên các cơ quan chức năng ở chuột<sup>23</sup>. Cordycepin là một purine alkaloid có trọng lượng phân tử là 251,24 Da, công thức hóa học là C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>, có cấu trúc 3'-deoxyadenosine<sup>3</sup>. Đây là hoạt chất sinh học chính ở các loài *Cordyceps* giúp hạn chế tác động của các virus gây hại, kháng viêm, kháng oxy hóa, kháng ung thư, điều hòa quá trình apoptosis ở tế bào ung thư, điều hòa quá trình miễn dịch tế bào<sup>3,5</sup>. Hàm lượng cordycepin trong *O. sinensis* là từ 0.006 đến 6.36 mg/g sinh khối, hàm lượng cordycepin trong *C. militaris* nuôi cấy thấp hơn và có thể lên đến 2.28 mg/g sinh khối<sup>3</sup>. Tuy nhiên, ngoài cordycepin, hoạt tính hạ acid uric máu trong *Cordyceps* còn được gây ra nhờ các hợp chất sinh học khác, ví dụ như polysaccharide<sup>24</sup>.

## KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu *in vivo* cho thấy, ở mô hình gây tăng acid uric cấp tính và mạn tính, cao chiết PE từ

**Bảng 3: Kết quả công thức máu**

	Lò chứng	Lò bệnh	Lò allopurinol	Lò 1.000 mg/kg	Lò 500 mg/kg	Lò 250 mg/kg
Số lượng tiểu cầu	922,67 ± 94,57	953,17 ± 112,93	895,67 ± 56,78	824,67 ± 113,97	849,17 ± 51,24	848,33 ± 43,50
Số lượng hồng cầu	7,69 ± 0,26	7,38 ± 0,18	7,94 ± 0,21	7,73 ± 0,19	7,62 ± 0,36	7,93 ± 0,60
Số lượng bạch cầu	8,80 ± 0,69	7,90 ± 1,35	9,10 ± 1,65	8,50 ± 1,25	8,28 ± 0,68	7,92 ± 1,13

sinh khối nấm *O. sinensis* có khả năng hạ acid uric máu. Tác dụng hạ acid uric của cao PE cho thấy sau 14 ngày điều trị với 3 nồng độ cao khảo sát. Theo đó, liều 1.000 mg/kg và liều 500 mg/kg có khả năng hạ acid uric so với lô mô hình đạt ý nghĩa thống kê. Liều 250 mg/kg thì hạ acid uric tốt sau 7 ngày, và sau 14 ngày không đạt kết quả tốt như so sánh với 7 ngày. Sau 14 ngày, các thông số về số lượng hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu không có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê. Quan sát vi thể bằng phương pháp nhuộm HE cho thấy có sự viêm gan, thận, dạ dày sau 14 ngày sử dụng thuốc, allopurinol và cả cao PE.

## LỜI CẢM ƠN

Chúng tôi xin cảm ơn Trường Đại học Bách Khoa, ĐHQG - HCM đã hỗ trợ cho nghiên cứu này. Nhóm nghiên cứu cũng vô cùng cảm ơn TS. Trương Bình Nguyên và công ty cổ phần Nguyên Long, Lâm Đồng đã cung cấp chủng nấm *O. sinensis* cho nghiên cứu này.

## XUNG ĐỘT LỢI ÍCH

Nhóm nghiên cứu cam đoan không có xung đột lợi ích trong bản thảo nghiên cứu này

## ĐÓNG GÓP CỦA CÁC TÁC GIẢ

Huỳnh Thư: định hướng nội dung và phương pháp nghiên cứu, thực hiện nội dung nghiên cứu, tổng hợp số liệu, chuẩn bị và hoàn tất bản thảo. Lê Phan Quỳnh Như: thực hiện nội dung nghiên cứu, xử lý số liệu. Đinh Minh Hiệp: định hướng nội dung và phương pháp nghiên cứu, hướng dẫn nghiên cứu.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Chen L, Luo Z, Wang M, Cheng J, Li F, Lu H, et al. The efficacy and mechanism of Chinese herbal medicines in lowering serum uric acid levels: A systematic review. *Front Pharmacol*. 2021 Jan 25;11:PMID: 33568990. Available from: <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.578318>.
- Xu L, Lu LL, Gao JD. Traditional Chinese herbal medicine plays a role in the liver, kidney, and intestine to ameliorate hyperuricemia according to experimental studies. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2021 Nov 28;2021:1-13;PMID: 34876914. Available from: <https://doi.org/10.1155/2021/4618352>.
- Liu Y, Guo ZJ, Zhou XW. Chinese Cordyceps: Bioactive components, antitumor effects and underlying mechanism-A review. *Molecules*. 2022 Oct 1;27(19);PMID: 36235111. Available from: <https://doi.org/10.3390/molecules27196576>.
- Ashraf SA, Elkhalfifa AEO, Siddiqui AJ, Patel M, Awadelkareem AM, Snoussi M, et al. Cordycepin for health and wellbeing: A potent bioactive metabolite of an entomopathogenic Cordyceps medicinal fungus and its nutraceutical and therapeutic potential. *Molecules*. 2020 Jun 12;25(12);PMID: 32545666. Available from: <https://doi.org/10.3390/molecules25122735>.
- Qu SL, Li SS, Li D, Zhao PJ. Metabolites and their bioactivities from the genus Cordyceps. *Microorganisms*. 2022 Jul 24;10(8):1489;PMID: 35893547. Available from: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10081489>.

- Zhou X, Gong Z, Su Y, Lin J, Tang K. Cordyceps fungi: natural products, pharmacological functions and developmental products. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2009 Mar 1;61(3):279-91. <https://doi.org/10.1211/jpp61030002.p.19222900>.
- Tien-Luyen V, Van-Hanh T, Hoang-Luan T, Bich-Thao NT, Minh-Hiep D, Binh-Nguyen T, et al. Discovery of entomopathogenic fungi Cordyceps takaomontana at Langbian mountain, Lam Dong, Viet Nam. *Journal of Science Ho Chi Minh City Open University*. 2015 Apr 24;1(13):14-20;.
- Han X, Liu LH, Fang XY, Jiang ST, Zhao H, Qian ZM, et al. Cordythiazole A, the first member of thiazole alkaloids from Chinese Cordyceps, with  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity. *J Nat Med*. 2023 Sep 29;77(4):986-91;PMID: 37515674. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11418-023-01732-8>.
- Thi TT Van, Khoa T Van, Son LL, Minh TT, Chau NDG, Kiet TT, et al. Phenolic content and antioxidant activity of Ophiocordyceps sobolifera extract for renal injury prevention. *Process Biochemistry*. 2022 Oct;121:322-9;Available from: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.07.010>.
- Thư H, Đại Nghiệp N, Thị Xuyên V, Minh Hiệp Đ, Bình Nguyên T. Nghiên cứu khả năng kháng oxy hóa của cao chiết từ một số chủng nấm Cordyceps sp. phân lập tại Việt Nam. *Tạp chí Công nghệ Sinh học Việt Nam*. 2012;10(4A):1041-6;.
- Thanh-Vy HT, Thư H, Minh-Hiệp D, Binh-Nguyen T. Screening for the antibacterial activity of cultured Cordyceps spp. *Journal of Science and Technology*. 2014;52(5B):552-8;.
- Thư H, Thị N, Lan K, Hiệp ĐM. Khảo sát khả năng ức chế xanthine oxidase và hạ acid uric máu chuột của cao cồn chiết xuất từ Ophiocordyceps sinensis. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*. 2017;15(4A):151-7;.
- Anh Tung V, Thu H, Trong Hieu N, Ngọc Hong Cam D, Minh Hiep D. Nghiên cứu hoạt tính ức chế xanthine oxidase của một số cao chiết từ nấm dược liệu. *VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology*. 2017 Oct 10;33(2S):192-8;Available from: <https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.4634>.
- Đỗ Trung Đàm. Phương pháp xác định độc tính cấp của thuốc. Nhà xuất bản Y học Hà Nội; 1996. 7-22 p;.
- Kong LD, Yang C, Ge F, Wang HD, Guo YS. A Chinese herbal medicine Ermiao wan reduces serum uric acid level and inhibits liver xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase in mice. *J Ethnopharmacol*. 2004 Aug;93(2-3):325-30;PMID: 15234772. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.04.008>.
- Thùy Dương N. Nghiên cứu tác dụng trên bệnh gút thực nghiệm của cây hy thiêm (*Siegesbeckia orientalis* L., Asteraceae) [Luận án Tiến sĩ Dược học]. Viện Dược liệu; 2012;.
- Nga ĐTQ, Dung NP. Tác dụng chống oxy hóa, hạ acid uric máu và lợi tiểu của cao chiết diệp hạ châu - râu mèo trên thực nghiệm. *Tạp chí Y học TP Hồ Chí Minh*. 2014;18:227-34;.
- Dung LTM, Hương NTT. Nghiên cứu tác dụng hạ acid uric máu của cao chiết từ lá Đại Bi (*Blumea balsamifera* L. (DC), Asteraceae). *Tạp chí Y học TP Hồ Chí Minh*. 2012;16(1):169-74;.
- Minh Trang T, Thi Xuan Phuong N, Thi Lai N, Thi Thuy Hang L, Thu H, Minh Hiep D. Preparation of a sulfated exopolysaccharide (S-EPS) from Ophiocordyceps sinensis fungus and its antioxidant effects. *Science and technology development journal: natural sciences*. 2018;2;.
- Nguyen QV, Vu TT, Tran MT, Ho Thi PT, Thu H, Le Thi TH, et al. Antioxidant activity and hepatoprotective effect of exopolysaccharides from cultivated Ophiocordyceps sinensis against CCl4-induced liver damages. *Nat Prod Commun*. 2021;16(2);Available from: <https://doi.org/10.1177/1934578X21997670>.
- Quy T, Xuan T. Xanthine oxidase inhibitory potential, antioxidant and antibacterial activities of Cordyceps militaris (L.) link fruiting body. *Medicines*. 2019 Jan 29;6(1):20;PMID: 30699961. Available from: <https://doi.org/10.3390/medicines6010020>.
- Yong T, Zhang M, Chen D, Shuai O, Chen S, Su J, et al. Actions of water extract from Cordyceps militaris in hyperuricemic mice induced by potassium oxonate combined with hypoxanthine. *J Ethnopharmacol*. 2016 Dec;194:403-11;PMID:



27717908. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.10.001>.
23. Yong T, Chen S, Xie Y, Chen D, Su J, Shuai O, et al. Cordycepin, a characteristic bioactive constituent in *Cordyceps militaris*, ameliorates hyperuricemia through URAT1 in hyperuricemic mice. *Front Microbiol.* 2018 Jan 25;9;PMID: 29422889. Available from: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00058>.
24. Ma L, Zhang S, Yuan Y, Gao J. Hypouricemic actions of exopolysaccharide produced by *Cordyceps militaris* in potassium oxonate-induced hyperuricemic mice. *Curr Microbiol.* 2014 Dec 3;69(6):852-7;PMID: 25086583. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00284-014-0666-9>.

# Evaluation of the hypouricemic effect of petroleum ether extract from *Ophiocordyceps sinensis* biomass

Thu Huynh<sup>1,2,\*</sup>, Nhu Quynh Phan Le<sup>3</sup>, Hiep Minh Dinh<sup>4</sup>

## ABSTRACT

*Ophiocordyceps sinensis* is a long-traditional medicinal mushroom with many bioactivities. Our previous studies have demonstrated that *O. sinensis*, especially petroleum ether (PE) extract, has the potential to support the treatment of hyperuricemia by inhibiting xanthine oxidase (XO) activity. In this study, the ability of PE extract to lower the content of blood uric acid was investigated in a hyperuricemia model. The acute hyperuricemia model was conducted at a dose of 250 - 1,000 mg/kg using potassium oxonate on mice. The results showed that the PE extract of *O. sinensis* did not cause death to mice at a dose of 5,000 mg/kg. The results showed that all three tested doses (250, 500, 1,000 mg/kg) were effective in lowering the concentration of blood uric acid. The model of chronic hyperuricemia was revealed using doses of potassium oxonate from 300 to 150 mg/kg every other day. The rates of uric acid increased in the model group compared to the control group after 7 days was 50%, and after 14 days was 36%. The results of lowering the uric acid contents on the model of chronic hyperuricemia showed that the dose of 1,000 mg/kg and 500 mg/kg had a better effect than the dose of 250 mg/kg. The uric acid contents were reduced 25% after 7 days and 29% after 14 days by the dose of 500 mg/kg, respectively. A dose of 1,000 mg/kg reduced uric acid contents by 35% after 7 days and 29% after 14 days, respectively. The results of hematology test exhibited no differences between experiments. The HE staining results showed damages in internal organs when the experiments was prolonged.

**Key words:** DongChong XiaCao, hypouricemic effect, petroleum ether extract, *Ophiocordyceps sinensis*

<sup>1</sup>Department of Biotechnology, Faculty of Chemical Engineering, Ho Chi Minh University of Technology (HCMUT), 268 Ly Thuong Kiet Street, District 10, Ho Chi Minh City 72607, Vietnam

<sup>2</sup>Vietnam National University Ho Chi Minh City, Linh Trung Ward, Thu Duc District, Ho Chi Minh City 71351, Vietnam

<sup>3</sup>Faculty of Biology and Biotechnology, Ho Chi Minh University of Science (HCMUS), 227 Nguyễn Văn Cừ, District 5, Ho Chi Minh City 700000, Vietnam

<sup>4</sup>Department of Agriculture and Rural Development of Ho Chi Minh City, No.176, Hai Ba Trung Street, District 1, HCMC, Viet Nam

## Correspondence

**Thu Huynh**, Department of Biotechnology, Faculty of Chemical Engineering, Ho Chi Minh University of Technology (HCMUT), 268 Ly Thuong Kiet Street, District 10, Ho Chi Minh City 72607, Vietnam

Vietnam National University Ho Chi Minh City, Linh Trung Ward, Thu Duc District, Ho Chi Minh City 71351, Vietnam

Email: huynh\_thu@hcmut.edu.vn

**Cite this article :** Huynh T, Le N Q P, Dinh H M. Evaluation of the hypouricemic effect of petroleum ether extract from *Ophiocordyceps sinensis* biomass. *Sci. Tech. Dev. J. – Engineering and Technology* 2023, 6(4):2089-2098.