

## KHẢO SÁT KHẢ NĂNG CẢI THIẾN SUY GIẢM TRÍ NHỚ CỦA CAO CHIẾT TỪ SINH KHỐI *Cordyceps* spp. TRÊN CHUỘT NHẮT

Đặng Hoàng Quyên<sup>1\*</sup>, Trần Phi Hoàng Yến<sup>2</sup>, Võ Thị Xuyên<sup>3</sup>,  
Đình Minh Hiệp<sup>4</sup>, Trương Bình Nguyên<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Trung tâm Công nghệ sinh học tp. Hồ Chí Minh, \*dhquyendl@gmail.com

<sup>2</sup>Trường Đại học Y Dược tp. Hồ Chí Minh

<sup>3</sup>Trường Đại học Văn Lang

<sup>4</sup>Sở Khoa học và Công nghệ tp. Hồ Chí Minh

<sup>5</sup>Trường Đại học Đà Lạt

**TÓM TẮT:** Sau nghiên cứu sàng lọc hoạt tính kháng acetylcholinesterase (AChE) của 60 cao chiết từ sinh khối 10 chủng *Cordyceps* spp., 3 cao chiết có hoạt tính kháng AChE cao, đó là cao Polysaccharide DL0004 (51,80±1,41%), cao n-butanol (n-BuOH) DL0006 (55,71±2,72%), cao n-BuOH DL0015 (71,08±1,47%) được tiếp tục thử nghiệm khả năng cải thiện suy giảm trí nhớ trên chuột với hai mô hình thử nghiệm chống suy giảm trí nhớ ngắn hạn: mô hình mê cung chữ Y (Y-maze) và mô hình khám phá vật thể lạ (novel object recognition). Chuột được uống cao ở 2 liều 100 mg/kg và 200 mg/kg 3 ngày trước khi tiêm trimethyltin (TMT) liều 2,4 mg/kg tiêm phúc mô (i.p). Sau khi tiêm TMT 7 ngày, chuột được mang đi thử nghiệm trên các mô hình. Kết quả thử nghiệm trên mô hình mê cung chữ Y cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tỷ lệ phần trăm tở hợp giữa các lô TMT và lô DL0004.1 (p<0,01), TMT và DL0004.2 (p<0,05), TMT và DL0015.1 (p<0,01), TMT và DL0006.1 (p<0,05), TMT và DL0006.2 (p<0,05). Với mô hình khám phá vật thể lạ, kết quả cho thấy có sự khác biệt về tỷ lệ phần trăm khám phá vật thể lạ/quen có ý nghĩa thống kê khi so sánh giữa các lô TMT và DL0004.1 (p<0,001), TMT và DL0004.2 (p<0,05), TMT và DL0006.2 (p<0,05), TMT và DL0015.1 (p<0,001).

*Từ khóa:* *Cordyceps*, acetylcholinesterase, galantamine, suy giảm trí nhớ, trimethyltin.

### MỞ ĐẦU

Hiện nay, suy giảm trí nhớ khá phổ biến ở người cao tuổi, khoảng 50-60% tổng số trường hợp đối với những người trên 65 tuổi bị bệnh Alzheimer (AD) [7]. AD là một dạng thoái hóa thần kinh tiến triển không thuận nghịch với các triệu chứng suy giảm trí nhớ, mất phương hướng, mất chức năng nhận thức, thay đổi tính cách và rối loạn hành vi [1]. Việc điều trị AD dựa chủ yếu theo giả thuyết cholinergic với đề xuất nguyên nhân gây bệnh là do sự gia tăng hoạt động của AChE và giảm nồng độ chất dẫn truyền thần kinh acetylcholine [3, 5]. Do đó, các nghiên cứu về hoạt tính kháng AChE cũng như các nghiên cứu dược lý tìm hiểu về khả năng bảo vệ các tế bào thần kinh chống AD của các loại dược liệu hoặc các hợp chất tổng hợp đang được quan tâm. Theo nghiên cứu của Mi et al. (2007) [6], acid (4-hydroxy-3-methoxycinnamic-acid) chiết xuất từ *Allium tuberosum* Rottl., một loại hương liệu được trồng rộng rãi ở Đông Á, có tác dụng chống suy giảm nhận thức và kích hoạt choline

acetyltransferase do TMT gây ra. Các thử nghiệm mê cung chữ Y và thử nghiệm tránh né thụ động (Passive avoidance test) trên chuột kiểm tra biểu hiện trí nhớ hoạt động tức thời và chức năng nhận thức đều cho kết quả tích cực. Kim et al. (2011) [2] nghiên cứu trên methoxsalen (8-methoxy-2',3',6,7-furocoumarin) và kết quả chất này có tác dụng đảo ngược suy giảm trí nhớ gây ra bởi TMT trên cả 2 thử nghiệm mê cung chữ Y và tránh né thụ động. *Gastrodia elata* (Tianma), một loại thuốc cổ truyền ở Trung Quốc thường được sử dụng để điều trị đau đầu, co giật, cao huyết áp và tim mạch. Manisha et al. (2011) [4] đã tiến hành các thử nghiệm trí nhớ trên chuột, mô hình mê cung nước (Radial arm water maze) và mô hình khám phá vật thể lạ cho kết quả có sự tăng cường nhận thức trên chuột ở lô Tianma so với lô đối chứng.

*Cordyceps* được biết đến là một dược liệu cổ truyền quý hiếm với nhiều tác dụng dược lý. Tuy nhiên, các nghiên cứu trên *Cordyceps* về tác dụng chống suy giảm trí nhớ vẫn còn hạn

ché. Do đó, tiếp theo nghiên cứu sàng lọc hoạt tính kháng AChE trên 60 cao chiết từ sinh khối 10 chủng nấm *Cordyceps* đã cho kết quả với 3 cao chiết có hoạt tính kháng AChE cao trên 50% ở nồng độ 3 mg/ml [8]. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm khảo sát khả năng bảo vệ tế bào não chống suy giảm trí nhớ trên chuột nhắt của 3 cao chiết trên, sử dụng mô hình gây suy giảm trí nhớ ngắn hạn dùng TMT.

Trimethyltin (TMT) là một chất có độc tính rất cao đối với thần kinh, biểu hiện độc tính đầu tiên có thể quan sát rõ ở chuột như gây run toàn thân với liều từ 2,2 mg/kg đến 3,2 mg/kg tùy theo từng giống chuột. Độc tính này là do sự tổn thương tế bào thần kinh, trong đó có sự tác động lên hệ thống Glutamat và GABAergic. Sự giảm hấp thu và giảm tổng hợp glutamat làm cạn kiệt các neuron glutamat, cũng sự giảm taurin não, gây run ở động vật. Vì vậy, nghiên cứu tiến hành đánh giá khả năng bảo vệ của các cao chiết *Cordyceps* trên độc tính của TMT.

Galantamine có tác dụng kháng AChE, điều hòa thụ thể nicotine, tăng lượng acetylcholine ở synap [9]. Trong điều trị AD ở châu Âu đã cho những kết quả cải thiện nhận thức đáng kể. Trong nghiên cứu này, galantamine được sử dụng làm đối chứng dương trong các thử nghiệm.

#### VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Sử dụng 3 cao chiết *Cordyceps* gồm Polysaccharide DL0004, n-BuOH DL0006 và n-BuOH DL0015, được chiết từ *Cordyceps* spp. tại Trung tâm Sâm và Dược liệu tp. Hồ Chí Minh.

Chuột nhắt trắng loài *Swiss albino*, 25-30 g, 5-6 tuần tuổi, giống đực, khỏe mạnh, do Viện Pasteur thành phố Hồ Chí Minh cung cấp.

Mô hình mê cung chữ Y (Y-maze): mô hình được làm bằng nhựa PBS, có 3 nhánh A, B C tạo thành mê cung hình chữ Y (hình 1); mô hình khám phá vật thể lạ (Novel object recognition): được làm bằng meca, màu đen, dạng hình hộp chữ nhật, có 5 mặt, kích thước 20''× 20''×18'' (dài × rộng × cao) (hình 2).

**Bố trí thí nghiệm:** với mỗi mô hình chuột được chia thành các lô, mỗi lô 9 con:

Lô đối chứng Sal: chỉ tiêm nước muối sinh lý, tiêm phúc mô (i.p);

Lô TMT: chỉ tiêm TMT i.p liều 2,4 mg/kg, chờ 7 ngày;

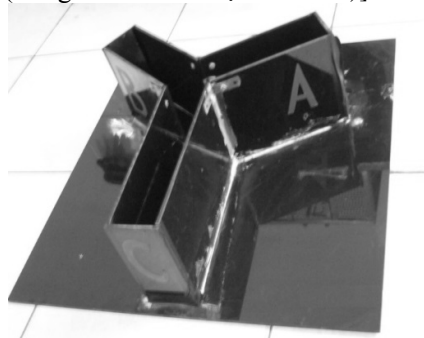
Lô Gal: cho uống galantamine liều 10 mg/kg 3 ngày trước khi tiêm TMT i.p liều 2,4 mg/kg, chờ 7 ngày;

Lô DL0004.1 và Lô DL0004.2: chuột được cho uống cao Polysaccharide DL0004 ở liều 100; 200 mg/kg 3 ngày trước khi tiêm TMT i.p liều 2,4 mg/kg, chờ 7 ngày;

Lô DL0006.1 và Lô DL0006.2: chuột được cho uống cao n-BuOH DL0006 ở liều 100; 200 mg/kg 3 ngày trước khi tiêm TMT i.p liều 2,4 mg/kg, chờ 7 ngày;

Lô DL0015.1 và Lô DL0015.2: chuột được cho uống cao n-BuOH DL0015 ở liều 100; 200 mg/kg 3 ngày trước khi tiêm TMT i.p liều 2,4 mg/kg, chờ 7 ngày.

**Thử nghiệm mê cung chữ Y:** tiến hành theo mô hình của Trần Phi Hoàng Yến (2007) [10]. Tính toán theo tỷ lệ: Phần trăm tổ hợp =  $[\text{Số tổ hợp}/(\text{Tổng số nhánh chuột đi vào}-2)] \times 100$ .



Hình 1. Mô hình mê cung chữ Y



Hình 2. Mô hình khám phá vật thể lạ

*Thử nghiệm mô hình khám phá vật thể lạ (Novel object recognition):* tiến hành theo mô hình của Trần Phi Hoàng Yên (2007) [10]. Thử nghiệm được đánh giá bằng phần trăm khám phá (%) vật thể quen (familiar) và vật thể lạ (novel): phần trăm khám phá (%):  $T_A/\sum T_{AB}$  với T là thời gian chuột khám phá các vật thể.

*Xử lý số liệu:* sử dụng phương pháp phân tích phương sai 1 yếu tố và Fisher's PLSD test.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Mô hình mê cung chữ Y

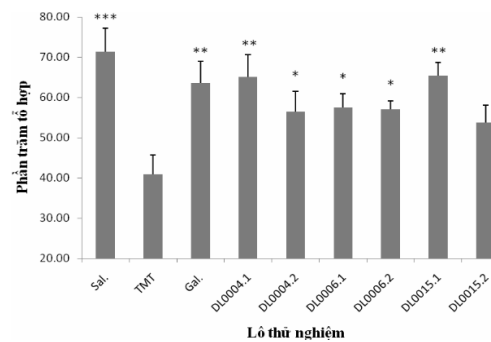
Kết quả sự thay đổi về tỷ lệ phần trăm tổ hợp khi chuột di chuyển vào các nhánh A, B, C trong thử nghiệm mê cung chữ Y giữa các lô thử nghiệm được trình bày trong bảng 1 và hình 3.

*Bảng 1.* Tỷ lệ (%) tổ hợp khi chuột di chuyển vào các nhánh A, B, C trong thử nghiệm mê cung chữ Y giữa các lô thử nghiệm

Lô	Tỷ lệ (%) tổ hợp	
	Mean (n=9)	SE (standard error)
Sal.	71,32	5,79
TMT	40,91	4,73
Gal.	63,53	5,41
DL0004.1	65,06	5,48
DL0004.2	56,49	5,09
DL0006.1	57,44	3,49
DL0006.2	57,05	2,11
DL0015.1	65,35	3,26
DL0015.2	53,80	4,30

Qua hình 3, sự khác biệt về tỷ lệ phần trăm tổ hợp có ý nghĩa thống kê giữa lô đối chứng (Sal.) và TMT ( $p<0,001$ ), chứng tỏ có sự suy giảm trí nhớ ở lô TMT. Sự khác biệt về tỷ lệ phần trăm tổ hợp có ý nghĩa thống kê giữa lô TMT và lô chứng dương Gal. ( $p<0,01$ ), chứng tỏ mô hình có độ tin cậy cao. Sự khác biệt về tỷ lệ phần trăm tổ hợp có ý nghĩa thống kê giữa lô TMT và lô DL0004.1 ( $p<0,01$ ), TMT và DL0004.2 ( $p<0,05$ ), TMT và DL0015.1 ( $p<0,01$ ), TMT và DL0006.1 ( $p<0,05$ ), TMT và DL0006.2 ( $p<0,05$ ). Từ kết quả trên, chúng tôi thấy rằng cao Polysaccharide DL0004 liều 100 mg/kg và 200 mg/kg, n-BuOH DL0006 liều 100 mg/kg và 200 mg/kg, n-BuOH DL0015 liều 100

mg/kg có tác dụng cải thiện trí nhớ trên chuột trong thử nghiệm mê cung chữ Y.



*Hình 3.* Sự thay đổi về tỷ lệ (%) tổ hợp khi chuột di chuyển vào các nhánh A, B, C trong thử nghiệm mê cung chữ Y giữa các lô thử nghiệm

Khác biệt có ý nghĩa so với lô TMT: \*( $p<0,05$ ), \*\*( $p<0,01$ ); \*\*\*( $p<0,001$ ).

Giữa lô DL0015.2 và TMT có sự khác biệt về tỷ lệ phần trăm tổ hợp nhưng sự khác biệt này không có ý nghĩa, cao n-BuOH DL0015 liều 200 mg/kg không có tác dụng cải thiện trí nhớ trên chuột trong thử nghiệm mê cung chữ Y.

Chưa có sự gia tăng tuyến tính giữa liều và khả năng làm tăng tỷ lệ phần trăm tổ hợp của các cao polysaccharide DL0004 và n-BuOH DL0006. Điều này chứng tỏ chưa chọn được liều tối ưu có tác dụng trong thử nghiệm này.

### Mô hình khám phá vật thể lạ

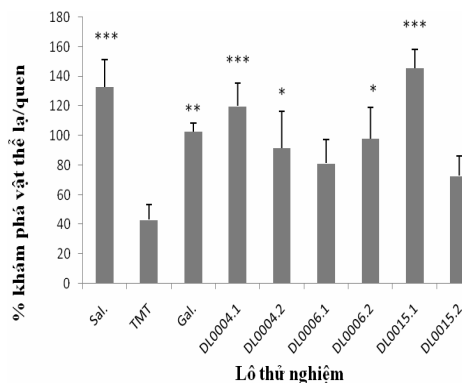
Kết quả sự thay đổi tỷ lệ phần trăm khám phá vật thể lạ/quen giữa các lô thử nghiệm được trình bày trong bảng 2 và hình 4. Hình 4 cho thấy, ở lô đối chứng Sal. có sự thay đổi về tỷ lệ phần trăm khám phá vật thể lạ/quen cao hơn 100%. Chuột ở lô Sal. có xu hướng thích khám phá vật thể lạ hơn vật thể quen. Riêng lô TMT sự thay đổi về tỷ lệ phần trăm khám phá vật thể lạ/quen dưới 50%, chuột ở lô này không có xu hướng khám phá vật thể lạ. Sự khác biệt về tỷ lệ phần trăm khám phá vật thể lạ/quen có ý nghĩa thống kê khi so sánh giữa lô Sal. và TMT ( $p<0,001$ ) chứng tỏ chuột ở lô TMT có sự suy giảm trí nhớ.

Sự khác biệt về tỷ lệ phần trăm khám phá vật thể lạ/quen có ý nghĩa thống kê khi so sánh

giữa lô TMT và Gal. ( $p < 0,01$ ), galantamine có tác dụng chống suy giảm trí nhớ chứng tỏ độ tin cậy của mô hình. Sự khác biệt về tỷ lệ phần trăm khám phá vật thể lạ/quen có ý nghĩa thống kê khi so sánh giữa các lô TMT và DL0004.1 ( $p < 0,001$ ), TMT và DL0004.2 ( $p < 0,05$ ), TMT và DL0006.2 ( $p < 0,05$ ), TMT và DL0015.1 ( $p < 0,001$ ). Như vậy ở các lô này có tác dụng cải thiện trí nhớ cho chuột trên mô hình khám phá vật thể lạ.

**Bảng 2.** Sự thay đổi tỷ lệ (%) khám phá vật thể lạ/quen giữa các lô trong mô hình khám phá vật thể lạ

Tỷ lệ khám phá vật thể lạ/quen (%)		
Lô	Mean (n=9)	SE (standard error)
Sal.	132,81	18,57
TMT	43,10	10,41
Gal.	102,65	5,68
DL0004.1	119,81	15,62
DL0004.2	91,53	24,68
DL0006.1	81,20	15,91
DL0006.2	97,76	21,00
DL0015.1	145,54	12,45
DL0015.2	72,67	13,53



**Hình 4.** Sự thay đổi tỷ lệ (%) khám phá vật thể lạ/quen giữa các lô thử nghiệm trong mô hình khám phá vật thể lạ

Khác biệt có ý nghĩa so với lô TMT: \*( $p < 0,05$ ); \*\*( $p < 0,01$ ); \*\*\* ( $p < 0,001$ ).

So sánh lô TMT với các lô DL0006.1 và DL0015.2, sự khác biệt về tỷ lệ phần trăm khám phá vật thể lạ/quen không có ý nghĩa thống kê.

Như vậy, ở các lô này không có tác dụng cải thiện trí nhớ trên chuột với mô hình khám phá vật thể lạ.

So sánh sự khác biệt tỷ lệ phần trăm khám phá vật thể lạ/quen giữa các lô Gal. với DL0004.1, DL0004.2, DL0006.2, DL0015.1, sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê. Do đó, kết luận tác dụng chống suy giảm trí nhớ trên chuột của các lô này tương đương lô Gal. ở mô hình khám phá vật thể lạ.

Khi so sánh giữa 2 lô DL0015.1 và DL0004.1 có thấy sự khác biệt tỷ lệ (%) khám phá vật thể lạ/quen không có ý nghĩa thống kê, do đó kết luận tác dụng của cao n-BuOH DL0015 so với cao Polysaccharide DL0004 ở liều 100 mg/kg là tương đương trên mô hình khám phá vật thể lạ.

Qua 2 mô hình thử nghiệm trí nhớ ngắn hạn cho thấy, khi tiêm TMT liều 2,4 mg/kg sau 7 ngày, chuột có sự biểu hiện suy giảm trí nhớ. Đối với các cao phân đoạn, ở mỗi mô hình có tác dụng khác nhau. Trên mô hình mê cung chữ Y, sự khác biệt không rõ bằng mô hình khám phá vật thể lạ. Các cao chiết ở mỗi liều có tác dụng nhất định và không nhận thấy tác dụng chống suy giảm trí nhớ tăng lên khi gia tăng liều lượng (khi so sánh 2 liều 100 mg/kg và 200 mg/kg). Điều này chứng tỏ chưa có sự chọn lựa tối ưu liều cao chiết thử nghiệm.

## KẾT LUẬN

Trong hai thử nghiệm trí nhớ ngắn hạn, chuột được uống cao 3 ngày trước khi tiêm TMT liều 2,4 mg/kg, cho thấy có sự cải thiện trí nhớ so với lô TMT khi chuột được uống cao Polysaccharide DL0004 với 2 liều 100 mg/kg và 200 mg/kg, cao n-BuOH DL0006 với liều 200 mg/kg và cao n-BuOH DL0015 với liều 100 mg/kg. Kết quả này cho thấy, một số cao chiết của *Cordyceps* spp. có tác dụng cải thiện tình trạng suy giảm trí nhớ ngắn hạn ở chuột.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Adams R. L., Crai P. L., Parsons O. A., 1984. Neuropsychology of dementia. Neurologic Clinics, 4: 387-405.
- Kim J. K., Choi S. J., Bae H., Kim C. R.,

- Cho H. Y., Kim Y. J., Lim S. T., Kim C. J., Kim H. K., Peterson S., Shin D. H., 2011. Effects of methoxsalen from *Poncirus trifoliata* on acetylcholinesterase and trimethyltin-induced learning and memory impairment. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75(10): 1984-1989.
3. Levy M. L., Cummings J. L., Kahn-Rose R., 1999. Neuropsychiatric symptoms and cholinergic therapy for Alzheimer's disease. *Gerontology*, 45(Suppl. 1): 15-22.
4. Manisha M., Junjie H., Yin Y. L., Doreen S. K. C., Xiaoyan L., Jiang M. H., Klaus H., 2011. *Gastrodia elata* modulates amyloid precursor protein cleavage and cognitive functions in mice. *BioScience Trends*, 5(3): 129-138.
5. Messer W. S., 2002. Cholinergic agonists and the treatment of Alzheimer's disease, *Curr. Top Med. Chem.*, 2(4): 353-358.
6. Mi J. K., Soo J. C., Seung-taik L., Hye K. K., Ho J. H., Eun-Ki K., Woo J. J., Hong Y. C., Young J. K., Dong H. S., 2007. Ferulic acid supplementation prevents trimethyltin-induced cognitive deficits in mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71: 1063-1068.
7. Paul T. F., Alan M. P., Michael S., Gordon K. W., 1999. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J. Neurol. Neurosurg Psychiatry*, 66: 137-147.
8. Đặng Hoàng Quyên, Trần Phi Hoàng Yến, Võ Thị Xuyến, Đinh Minh Hiệp, Trương Bình Nguyên, 2012. Khảo sát hoạt tính kháng cholinesterase của các cao chiết từ sinh khối của một số chủng nấm *Cordyceps* sp. phân lập tại Việt Nam. *Tạp chí Công nghệ sinh học*, 10(4A): 1033-1039.
9. Woodruff-Pak D. S., Vogel R. W., Wenk G. L., 2001. Galantamine: Effect on nicotinic receptor binding, acetylcholinesterase inhibition, and learning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98(4): 2089-2094.
10. Tran Phi Hoang Yen, 2007. Essential role interleukin-6 gene in the trimethyltin-induced neurotoxicity and memory impairment. Department of Pharmacy, Graduate school Kangwon National University.

### STUDY ON THE ABILITY OF EXTRACTS FROM *Cordyceps* spp. BIOMASS TO PREVENT MEMORY IMPAIRMENT IN MICE

Dang Hoang Quyên<sup>1</sup>, Tran Phi Hoang Yen<sup>2</sup>, Vo Thi Xuyen<sup>3</sup>,  
Đinh Minh Hiệp<sup>4</sup>, Trương Bình Nguyên<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Biotechnology center of Ho Chi Minh city

<sup>2</sup>University of Medicine and Pharmacy of Ho Chi Minh city

<sup>3</sup>Van Lang University

<sup>4</sup>Department of Science and Technology Hochiminh city

<sup>5</sup>Da Lat University

#### SUMMARY

Following screening acetylcholinesterase (AChE) inhibitory activity of 60 extracts from biomass of 10 *Cordyceps* spp. strains, 3 extracts with high AChE inhibitor activity, viz. polysaccharide DL0004 extract (51.80±1.41%), n-BuOH DL0006 extract (55.71±2.72%) and n-BuOH DL0015 extract (71.08±1.47%) were further tested for their ability to improve memory impairment in mice using two short-term memory impairment models: Y-maze model (Y-maze) and Novel Object Recognition model. *Cordyceps* was extracted at a dose of 100 mg/kg and 200 mg/kg three days before the intraperitoneal (i.p) injection of 2.4 mg/kg trimethyltin (TMT); and seven days later, the mice were tested on the models. Results on the Y-maze model showed that there was a statistically significant difference in combinatorial percentage among different

combinations: DL0004.1 and TMT ( $p<0.01$ ), TMT and DL0004.2 ( $p<0.05$ ), TMT and DL0015.1 ( $p<0.01$ ), TMT and DL0006.1 ( $p<0.05$ ), TMT and DL0006.2 ( $p<0.05$ ). For Novel Object Recognition model, the results also showed difference with statistical significance in the ratio of novel recognition to familiar recognition among comparison combinations: TMT and DL0004.1 ( $p<0.001$ ), TMT and DL0004.2 ( $p<0.05$ ), TMT and DL0006.2 ( $p<0.05$ ), TMT and DL0015.1 ( $p<0.001$ ).

*Keywords:* *Cordyceps*, acetylcholinesterase, galantamine, memory impairment, trimethyltin.

*Ngày nhận bài:* 15-7-2013