

2. Ngô Văn Thu (1990), *Hóa học saponin*, Đại học Y Dược Tp. Hồ Chí Minh, tr. 91-121.
3. Nguyễn Hoàng, Hà Văn Hoán (1988), "Điều tra trữ lượng cây nân nghệ (*Dioscorea collettii* Hook f.)", *Cổng trình nghiên cứu khoa học Y Dược*, tr. 90.
4. Yadollah Yamini, et al. (2002), "Effects of different parameters on supercritical fluid extraction of steroid drugs from spiked matrices and tablets", *Talanta*, 58, pp. 1003-1010.
5. Bộ môn Công nghiệp Dược (2010), *Các phương pháp chiết xuất hiện đại*, Trường Đại học Dược Hà Nội, tr. 12 - 22.
6. Phạm Hoàng Hộ (1999), *Cây cỏ Việt Nam*, tập III, NXB Trẻ, TP. Hồ Chí Minh, tr. 751.

7. Wu, Z. Y. & P. H. Raven, eds (2000), *Flora of China*, Vol. 24, Science Press, Beijing and Missouri Botanical Garden Press, St. Louis., pp. 276.
8. Zhang A. D., et al. (1993) "Di wu zhang chao lin jie zao qu de shi yan ji shu", *Journal of Nanjing Institute of Chemical Technology*, 15(1), pp. 85-94.
9. Seyyed M. Ghoreishi, et al. (2012), "Response surface optimization of essential oil and diosgenin extraction from *Tribulus terrestris* via supercritical fluid technology", *Chemical Engineering Technology*, 35(1), pp. 133-141.
10. Xiao-shun Shu, et al. (2004), "Supercritical fluid extraction of saponins from tubers of *Smilax China*", *Fitoterapia*, 75, pp. 656 - 661.

(Ngày nhận bài: 21/01/2016 - Ngày phản biện: 02/10/2016 - Ngày duyệt đăng: 01/11/2016)

Tác dụng ức chế enzym acetylcholinesterase của các phân đoạn dịch chiết thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata*)

Nguyễn Thị Kim Thu¹, Nguyễn Thanh Hải², Bùi Thanh Tùng²

¹Bệnh viện Đa khoa Quốc gia

²Khoa Y Dược, ĐH Quốc gia Hà Nội

E-mail: nguyenthuthu2308@yahoo.com

Summary

The aerial parts of *Huperzia serrata* were extracted with ethanol 96% and fractionated with *n*-hexane, ethyl acetate and *n*-butanol. These obtained fractions were evaluated in term of the acetylcholinesterase (AChE) inhibitory activity by Ellman's colorimetric method. The EtOAc fractions proved the strongest in AChE inhibitory activity, followed by BuOH fractions and the Hexane ones were the weakest. The EtOAc fractions inhibited AChE activity in a dose dependent manner with an IC_{50} value of $89.96 \pm 3.42 \mu\text{g/mL}$. Detailed kinetic analysis indicated that EtOAc fractions were mixed inhibition type with K_i was $228.41 \pm 5.3 \mu\text{g/mL}$. Our findings suggested that the *Huperzia serrata* may be a promising source of AChE inhibitors for Alzheimer's disease.

Keywords: *Huperzia serrata*, acetylcholinesterase inhibitory, extraction, fraction.

Đặt vấn đề

Alzheimer là bệnh rối loạn thần kinh có biểu hiện mất trí nhớ, rối loạn chức năng nhận thức, rối loạn hành vi và có những hoạt động bất thường trong cuộc sống hàng ngày. Người cao tuổi là những đối tượng chính bị mắc bệnh Alzheimer và có đặc điểm rối loạn con đường sinh hóa khác nhau. Bệnh nhân bị Alzheimer có sự sụt giảm đáng kể lượng acetylcholin (ACh). ACh là một chất dẫn truyền thần kinh trung ương, truyền tín hiệu trong các khe synapsis. ACh bị thủy phân do enzym acetylcholinesterase (AChE), thành cholin và acetyl. Nguyên nhân gây các rối loạn thần kinh như bệnh Alzheimer là do hoạt động quá mức của

AChE^[1]. Thuốc cholinergic và các thuốc điều trị các bệnh liên quan đến rối loạn thần kinh chủ yếu làm tăng lượng ACh trong não, có tác dụng cải thiện khả năng nhận thức. Các chất ức chế AChE như tacrin, donepezil, rivastigmin và galantamin là những thuốc được sử dụng trong điều trị Alzheimer, mặc dù có rất nhiều tác dụng phụ. Cơ chế của các hoạt chất này là ức chế enzym AChE, ức chế quá trình thủy phân của ACh. Đây là một đích trong trong việc phát hiện các loại thuốc mới nhằm điều trị bệnh Alzheimer^[2].

Dược liệu từ lâu đã được sử dụng trong phòng ngừa và điều trị các bệnh khác nhau, trong đó có các chứng rối loạn thần kinh. Đây là một nguồn

cung cấp các hoạt chất tự nhiên phong phú có khả năng điều trị bệnh Alzheimer và ít tác dụng phụ. Galantamin là một alkaloid ức chế enzym cholinesterase phân lập từ cây hoa tuyết điểm (*Galanthus caucasicus*) đã được sử dụng trong điều trị Alzheimer [3]. Y học cổ truyền sử dụng cây thạch tùng rừng cưa để chữa các bệnh bầm máu, rách cơ, sốt và tâm thần phân lập. Huperzin, một alkaloid, là một thành phần chính của thạch tùng rừng cưa. Ở nước ta, loài cây này được tìm thấy ở vùng núi cao như Sa Pa (Lào Cai) và Đà Lạt (Lâm Đồng). Trên thế giới đã có một số nghiên cứu liên quan đến tác dụng điều trị Alzheimer của thạch tùng rừng cưa. Tuy nhiên tại Việt Nam thì chưa có đánh giá nào về tác dụng ức chế enzym AChE của thạch tùng rừng cưa trồng tại Việt Nam. Do đó, trong nghiên cứu này chúng tôi đánh giá khả năng bảo vệ thần kinh của thạch tùng rừng cưa trồng tại Việt Nam để điều trị Alzheimer và các bệnh thoái hóa thần kinh khác thông qua khả năng ức chế AChE của các dịch chiết từ lá và thân của thạch tùng rừng cưa.

Nguyên liệu và phương pháp

Nguyên liệu

Nguyên liệu dùng trong nghiên cứu bao gồm lá và thân cây thạch tùng rừng cưa được thu mua tại Sa Pa, Lào Cai vào tháng 6 năm 2015. Mẫu được xác định tên khoa học là *Huperzia serrata* (Thunb. ex Murray) Trevis bởi PGS.TS. Nguyễn Thanh Hải, Khoa Y Dược, ĐHQG Hà Nội. Mẫu nghiên cứu hiện được lưu giữ tại Khoa Y Dược, ĐHQG Hà Nội. Mẫu được liệu (1 kg) được ngâm trong ethanol 96% (3 lần, mỗi lần 3 L) ở nhiệt độ phòng. Dịch chiết được lọc qua giấy lọc và gộp lại, cô dịch chiết bằng cất quay dưới áp suất giảm thu được 87,5 g cặn ethanol. Hòa cặn với khoảng 50 mL nước cất rồi chiết phần đoạn lần lượt với n-hexan, ethyl acetat và n-butanol (mỗi dung môi 3 lần mỗi lần 600 mL). Cặn từ dịch chiết ethyl acetat (11,8 g), n-butanol (9,1 g), n-hexan (5,9 g).

Hóa chất, dung môi

5,5'-Dithio-bis-(2-nitro) benzoic acid (DTNB) (Himedia, Ấn Độ), acetylthiocholin iodid (Sigma, Singapore), acetylcholinesterase (Sigma, Singapore), berberin chlorid (Himedia, Ấn Độ). Các dung môi công nghiệp bao gồm n-hexan, ethyl acetat (EtOAc), n-butanol, ethanol (EtOH) và nước cất (H₂O) (Shouguang, Trung Quốc).

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp đánh giá khả năng ức chế enzym AChE

Phương pháp đo quang in vitro dùng để đánh giá hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase được xây dựng và sử dụng trong nghiên cứu lần đầu tiên bởi tác giả Ellman vào năm 1961 [4]. Nguyên tắc của phương pháp như sau: Cơ chất acetylthiocholin iodid (ATCI) bị thủy phân nhờ xúc tác của AChE tạo thiocholin. Sản phẩm thiocholin phản ứng với thuốc thử acid 5-5'-dithiobis-2-nitrobenzoic (DTNB) tạo thành hợp chất acid 5-thio-2-nitro benzoic có màu vàng. Lượng hợp chất màu được tạo thành này tỷ lệ thuận với hoạt độ của AChE. Dựa vào xác định độ hấp thụ của mẫu thử ở 412 nm để đánh giá hoạt tính của AChE.

Tiến hành phương pháp: Các dịch chiết được thử và chất chuẩn dương (berberin chlorid) được hòa tan trong dimethyl sulfoxid (DMSO). Hỗn hợp phản ứng bao gồm 140 μ L dung dịch đệm natri phosphat 0,1 M (pH 8,0); 20 μ L dung dịch thử ở các nồng độ khác nhau và 20 μ L dung dịch enzym AChE 0,25 IU/mL. Trộn đều và đem ủ 15 phút tại 25°C. Sau đó, thêm 10 μ L dung dịch DTNB 2,5 mM và 10 μ L ATCI 2,5 mM và trộn đều. Tiếp tục ủ hỗn hợp trong 10 phút ở 25°C. Sau đó, dung dịch được đo độ hấp thụ ở bước sóng 412 nm. Tất cả các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Phần trăm ức chế hoạt độ enzym AChE (% I) được tính theo công thức:

$$\% I = \frac{Ac - At}{Ac - Ao} \times 100$$

Trong đó:

%: phần trăm hoạt tính AChE bị ức chế

A_c: độ hấp thụ của mẫu chứng (không chứa 20 μ L dung dịch thử).

A_t: độ hấp thụ của mẫu thử.

A_o: độ hấp thụ của mẫu trắng (200 μ L dung dịch đệm natri phosphat 0,1 M).

Giá trị ức chế enzym AChE IC₅₀ của các mẫu thử được tính dựa vào đồ thị log (liều dùng) vs. % ức chế.

Phương pháp xác định đặc điểm động học ức chế enzym AChE

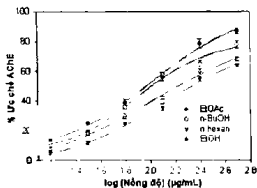
Động học ức chế enzym AChE của phần đoạn dịch chiết EtOAc được tiến hành theo phương pháp mô tả trước đây. Hỗn hợp phản ứng gồm 140 μ L dung dịch đệm natri phosphat 0,1 M (pH 8,0); 20 μ L dung dịch thử ở các nồng độ phân đoạn dịch chiết EtOAc (0; 0,125; 0,25 và 0,5 mg/mL) và 20 μ L dung dịch enzym AChE 0,25 IU/mL. Trộn đều và đem ủ 15 phút tại 25°C. Sau đó, thêm 10 μ L dung dịch DTNB 2,5 mM và 10 μ L với các nồng độ khác nhau của cơ chất ATCI (5; 2,5; 1,25 mM) và trộn đều. Tiến hành đo độ hấp thụ dung dịch được ở bước sóng 412 nm trong vòng 5 phút. Tất cả các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Sử dụng các đồ thị 1/[ATCI] và 1/V (1/nồng độ phản ứng) (đồ thị

Lineweaver – Burk) để xác định kiểu động học ức chế enzym. Hằng số ức chế Ki được xác định là điểm giao của các đường [nồng độ phân đoạn dịch chiết EtOAc] vs. $1/V$ (1/tốc độ phản ứng) (đồ thị Dixon - Dixon plot).

Xử lý số liệu

Các số liệu nghiên cứu được xử lý thống kê theo phương pháp t-test student sử dụng phần mềm SigmaPlot 10 (Systat Software Inc, Mỹ). Số liệu được biểu diễn dưới dạng $X \pm SD$. Sự khác biệt có ý nghĩa khi $p < 0,05$.

Kết quả và bàn luận



Hình 1: Đồ thị biểu diễn khả năng ức chế hoạt độ enzym AChE của các phân đoạn dịch chiết từ thạch tùng rừng cưa. Giá trị IC_{50} của các phân đoạn dịch chiết được tính dựa vào đồ thị và chuyển từ log [$\mu\text{g/mL}$] sang $\mu\text{g/mL}$.

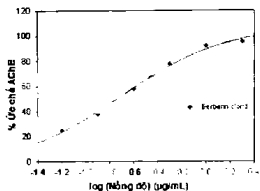
AChE chủ yếu có trong hệ thần kinh trung ương và vai trò chính là thủy phân ACh, thành choline. Bệnh lý học của Alzheimer liên quan đến sự thiếu hụt ACh trong não. Ức chế AChE là một trong các đích quan trọng để điều trị các chứng rối loạn thần kinh và để tìm kiếm các hợp chất mới trong điều trị Alzheimer [9]. Tác dụng ức chế enzym AChE của các phân đoạn dịch chiết được nghiên cứu bằng phương pháp Ellman's. Phương pháp này sử dụng cơ chất là acetylthiocholin iodid. Khi acetylthiocholin iodid bị thủy phân do enzym AChE tạo ra thiocholin và chất này phản ứng với 5-5'-diithiobis-2-nitrobenzoic (DTNB) tạo ra sản phẩm màu vàng. Bảng 1 tóm tắt giá trị IC_{50} của các phân đoạn dịch chiết và berberin clorid. Tác dụng ức chế AChE của các phân đoạn dịch chiết tăng dần theo nồng độ. Phân đoạn dịch chiết EtOAc và n-BuOH cho thấy có khả năng ức chế cao nhất với IC_{50} là $89,96 \pm 3,42$ và $101,81 \pm 5,14 \mu\text{g/mL}$ so với chứng dương berberin clorid là $0,201 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$. Phân đoạn n-hexan có tác dụng ức chế enzym AChE thấp nhất với IC_{50} là $204,77 \pm 4,15 \mu\text{g/mL}$. Một số nghiên cứu cũng sử dụng berberin clorid

Khả năng ức chế enzym AChE của các phân đoạn dịch chiết từ thạch tùng rừng cưa

Kết quả nghiên cứu được thể hiện qua bảng 1, hình 1 và 2.

Bảng 1: Giá trị IC_{50} của các phân đoạn dịch chiết từ thạch tùng rừng cưa và berberin clorid

Mẫu thử	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
EtOH	$153,82 \pm 5,21$
n-hexan	$204,77 \pm 4,15$
EtOAc	$89,96 \pm 3,42$
n-BuOH	$101,81 \pm 5,14$
Berberin clorid	$0,201 \pm 0,05$



Hình 2: Đồ thị biểu diễn khả năng ức chế hoạt độ enzym AChE của berberin clorid. Giá trị IC_{50} berberin clorid được tính dựa vào đồ thị và chuyển từ log [$\mu\text{g/mL}$] sang $\mu\text{g/mL}$.

làm chuẩn dương để đánh giá khả năng ức chế AChE. Inganinan và CS. cho thấy berberin có thể ức chế AChE với IC_{50} là $0,58 \mu\text{M}$ tương đương với $0,194 \mu\text{g/mL}$ [6]. Giá trị này gần tương đồng với giá trị IC_{50} berberin clorid của chúng tôi.

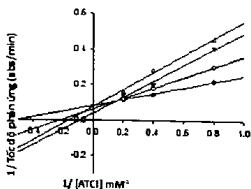
Động học ức chế enzym AChE của dịch chiết từ thạch tùng rừng cưa

Động học ức chế enzym AChE của dịch chiết từ thạch tùng rừng cưa chưa được công bố trước đây. Ngoài ra, do phân đoạn dịch chiết EtOAc có giá trị IC_{50} cao nhất trong các phân đoạn dịch chiết nên chúng tôi sử dụng phân đoạn dịch chiết này để nghiên cứu động học ức chế enzym AChE. Đồ thị Lineweaver-Burk mô tả động học ức chế enzym của phân đoạn dịch chiết EtOAc. Hình 3 cho thấy kiểu ức chế là kiểu ức chế hỗn hợp (trong đồ thị Lineweaver-Burk thì hệ số góc $= Km/V_{max}$, điểm giao trục ox $= -1/Km$). Hằng số Ki được xác định là giá trị tuyệt đối từ điểm giao trên trục ox của 3 đường trên đồ thị Dixon, được vẽ theo $1/(tốc độ phản ứng)$ theo nồng độ phân đoạn dịch chiết EtOAc. Giá trị Ki được xác định theo đồ thị hình 4 là $0,2284 \pm 0,0053 \text{ mg/mL}$ hay $228,4 \pm 5,3 \mu\text{g/mL}$.

Kiểu ức chế hỗn hợp là kiểu ức chế đặc trưng của dược liệu, nguyên nhân là do có chứa một loạt các hợp chất có nhiều con đường tác dụng khác nhau^[7]. Cơ chế ức chế cho thấy phân đoạn dịch chiết EtOAc có thể cạnh tranh với ATCI để gắn vào vị trí liên kết cơ chất của AChE hoặc kết hợp với AChE hoặc kết hợp với phức hợp AChE-ATCI. Trong trường hợp ATCI ở nồng độ cao, phân đoạn dịch chiết có thể liên kết vào vị trí khác của AChE. Điều này được khẳng định khi quan sát trên đồ thị thấy giá trị K_{max} tăng và V_{max} giảm khi nồng độ phân đoạn dịch chiết EtOAc tăng.

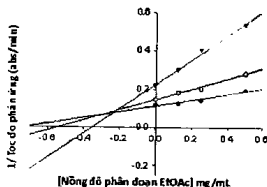
Kết quả nghiên cứu này cũng phù hợp với những nghiên cứu tác dụng ức chế enzym AChE của thạch tùng rừng cưa đã được công bố. Một trong các hợp chất chính của thạch tùng rừng cưa là huperzin A. Đây là một chất ức chế mạnh, đặc hiệu và thuận nghịch với enzym AChE. Đã có nhiều nghiên cứu cho thấy huperzin A có thể làm tăng cường khả năng nhận thức trên một số mô hình

động vật khác nhau^[8,9]. Nghiên cứu mới đây của Ohba T. và CS. đã chứng minh dịch chiết từ thạch tùng rừng cưa của Nhật Bản và thành phần hoạt chất huperzin A cải thiện đáng kể suy giảm nhận thức trên mô hình *in vivo* ở chuột do scopolamin gây ra. Trong thí nghiệm này, chuột được cho uống dịch chiết thạch tùng rừng cưa (30 mg/kg/ngày) trong vòng 7 ngày đã cải thiện đáng kể khả năng nhận thức nhờ ức chế AChE^[10]. Trong một nghiên cứu khác, Jiang Wei và cộng sự đã phân lập được một số hợp chất có cấu trúc dạng huperzin và cho thấy hợp chất huperzin E có khả năng ức chế hoạt độ AChE cao với IC_{50} là 6,71 μM ^[11]. Trong các phân đoạn dịch chiết của chúng tôi thì phân đoạn EtOAc và BuOH là các phân đoạn có hàm lượng các hoạt chất cấu trúc huperzin cao hơn so với các phân đoạn khác, đặc biệt là phân đoạn EtOAc. Điều này giải thích tác dụng ức chế enzym AChE cao nhất của phân đoạn EtOAc so với các phân đoạn khác.



Hình 3: Đồ thị Lineweaver-Burk cho phân đoạn dịch chiết EtOAc.

Kí hiệu: •, 0; ○, 0,125; ▼, 0,25; ▲, 0,5 mg/mL phân đoạn dịch chiết EtOAc. Nồng độ cơ chất ATCI được sử dụng là 5; 2,5; 1,25 mM.



Hình 4: Đồ thị Dixon cho phân đoạn dịch chiết EtOAc để xác định hằng số ức chế K_i .

Kí hiệu: •, 1,25; ○, 2,5; ▼, 5 mM ATCI. Nồng độ phân đoạn EtOAc được sử dụng là 0; 0,125; 0,25; 0,5 mg/mL. Hằng số K_i được xác định là giá trị tuyệt đối từ điểm giao trên trục ox của 3 đường.

Kết luận

Nghiên cứu đã đánh giá được tác dụng ức chế enzym AChE của các phân đoạn dịch chiết từ lá và thân của thạch tùng rừng cưa trồng tại Lào Cai. Kết quả cho thấy phân đoạn dịch chiết EtOAc có tác dụng ức chế enzym AChE cao (IC_{50} 89,96 $\pm$ 3,42 $\mu g/mL$) và kiểu ức chế động học enzym hỗn hợp. Kết quả này gợi ý cho việc nghiên cứu sâu hơn về thành phần hóa học của phân đoạn dịch chiết EtOAc để phân tách được hoạt chất tinh khiết có tiềm năng trong phòng, điều trị các bệnh liên quan đến Alzheimer và rối loạn thần kinh.

Tài liệu tham khảo

1. Bachman D., Wolf P. A., Linn R., Knoefel J., Cobbs J., Belanger A., et al. (1992), "Prevalence of dementia and probable senile dementia of the Alzheimer type in the Framingham Study", *Neurology*, 42(1), 115.
2. Francis P. T., Palmer A. M., Snape M., Wilcock G. K. (1999), "The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress", *J. of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 66(2), 137-147.
3. Heinrich M., Teoh H. L. (2004), "Galanthamine from snowdrop—the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge", *J. of Ethnopharmacology*, 92(2), 147-162.