



Original Article

Comparing Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibition Effect of Total Extract and Fractions with Alcaloid-Rich Extract of *Huperzia Serrata* (Thunb.) Trevis

Nguyen Thi Thu Hoai¹, Nguyen Thuy Duong¹, Bui Thanh Tung²,
Dao Thi Vui¹, Dang Kim Thu^{2,*}

¹Hanoi University of Pharmacy, 13-15 Le Thanh Tong, Hoan Kiem, Hanoi, Vietnam

²VNU School of Medicine and Pharmacy, Vietnam National University, Hanoi,
144 Xuan Thuy, Cau Giay, Hanoi, Vietnam

Received 24 February 2020

Revised 28 February 2020 Accepted 20 March 2020

Abstract: Herbal extract, rich in natural compounds, has long been used for treating neurological disorders and cognitive deflection, often without significant adverse effects. This study compares AChE and BuChE – inhibition effect of total extracts and fractions of *Huperzia serrata* (Thunb.) Trevis with alcaloid-rich extract. The samples were subjected to supersonic extraction with ethanol 50° as a solvent and fractionally extracted with n-hexane, EtOAc and n-butanol, respectively, and alcaloid-rich extract was collected simultaneously. The Ellman's method was used to assay AChE and BuChE inhibition activity. The study results show that the alcaloid-rich extraction proved to be the superior AChE inhibiting agent; its activity was nearly 4-fold higher than that of the most active *Huperzia serrata* extraction with the IC₅₀ value of 12.61 (9.83 – 16.16) µg/ml, whereas the fractions as well as the total extract did not provide any BuChE inhibition activity and alcaloid-rich extract showed weak ability (IC₅₀ at 76.67 (64.78 – 91.84) µg/ml). Overall, the superior enzyme inhibition effect of alcaloid-rich extract is expected to be a promising approach in preventing and treating neurological disorders such as Alzheimer's.

Keywords: *Huperzia serrata* (Thunb.) Trevis, alcaloid, acetylcholinesterase inhibitors (AChE), butyrylcholinesterase (BuChE), Alzheimer's.

* Corresponding author.

E-mail address: dangkimthu048@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4214>



So sánh tác dụng ức chế Enzym Acetylcholinesterase và Butyrylcholinesterase của cao chiết toàn phần và các phân đoạn chiết với cao chiết giàu alcaloid của Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata* (Thunb.) Trevis.)

Nguyễn Thị Thu Hoài¹, Nguyễn Thùy Dương¹, Bùi Thanh Tùng²,
Đào Thị Vui¹, Đặng Kim Thu^{2,*}

¹Trường Đại học Dược Hà Nội, 13-15 Lê Thánh Tông, Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam

²Khoa Y Dược, Đại học Quốc Gia Hà Nội, 144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 24 tháng 02 năm 2020

Chỉnh sửa ngày 28 tháng 02 năm 2020; Chấp nhận đăng ngày 20 tháng 3 năm 2020

Tóm tắt: 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 sa sút trí nhớ và ít tác dụng phụ. Trong nghiên cứu này, chúng tôi so sánh tác dụng ức chế AChE và BuChE của cao chiết toàn phần và các phân đoạn dịch chiết của Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata* (Thunb.) Trevis.) với cao chiết giàu alcaloid. Các mẫu được chiết xuất siêu âm bằng ethanol 50⁰ và chiết phân đoạn lần lượt với n-hexane, ethyl acetate (EtOAc) và n-butanol (n-BuOH), song song tiến hành chiết lấy cao chiết giàu alcaloid. Phương pháp ức chế AChE và BuChE được tiến hành theo phương pháp đo quang của Ellman. Kết quả cho thấy cao chiết giàu alcaloid thể hiện tác dụng ức chế enzym AChE tốt hơn gấp gần 6 lần so với phân đoạn có tác dụng tốt nhất từ thạch tùng răng cưa với IC₅₀ là 7,93 (5,43-10,98) µg/ml. So sánh tác dụng ức chế enzym BuChE của cao toàn phần và các phân đoạn cao chiết với cao chiết giàu alcaloid cho thấy cao toàn phần và các phân đoạn cao chiết từ thạch tùng răng cưa không cho tác dụng ức chế enzym BuChE trong khi đó cao chiết giàu alcaloid thể hiện tác dụng ức chế enzym BuChE yếu với IC₅₀ là 76,67 (64,78 – 91,84) µg/ml. Kết quả nghiên cứu cho thấy cao chiết giàu alcaloid thể hiện tác dụng ức chế enzym AChE mạnh hơn hẳn cao chiết toàn phần và các phân đoạn cao chiết từ thạch tùng răng cưa, ngoài ra cao chiết giàu alcaloid còn có tác dụng trên enzym BuChE mở ra tiềm năng trong việc phòng ngừa và hỗ trợ điều trị bệnh Alzheimer.

Từ khóa: Thạch tùng răng cưa; *Huperzia serrata* (Thunb.) Trevis.); Alcaloid; Enzym Acetylcholinesterase; Enzym Butyrylcholinesterase, Bệnh Alzheimer.

* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: dangkimthu048@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4214>

1. Đặt vấn đề

Sa sút trí nhớ là một bệnh thoái hóa thần kinh tiến triển liên quan đến tuổi, làm suy yếu khả năng nhớ và nhận thức. Theo Báo cáo Thế Giới về Alzheimer năm 2018, (World Alzheimer Report 2018) có hơn 50 triệu người bị mắc bệnh mất trí nhớ và Alzheimer trên toàn thế giới và con số này dự kiến sẽ tăng lên 152 triệu vào năm 2050 [1]. Hiện nay, cơ chế bệnh sinh của bệnh sa sút trí nhớ chưa được hiểu rõ. Một trong những đặc điểm đáng chú ý của bệnh nhân bị suy giảm trí nhớ là sự sụt giảm đáng kể lượng acetylcholine (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 choline và acetyl. Các rối loạn thần kinh như bệnh sa sút trí nhớ là do nguyên nhân hoạt động quá mức của AChE [2]. Thuyết 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 do đó ngăn cản quá trình thủy phân của ACh [2]. Enzym AChE chủ yếu có trong não, trong khi đó enzym BuChE được cho là có tác dụng điều hòa lượng AChE trong não. Người ta nhận thấy hoạt tính của enzym BuChE tăng đáng kể trong các bệnh Alzheimer và hoạt tính của enzym AChE giảm. Do đó cả 2 enzym này đều là các đích điều trị cho tăng cường sự thiếu hụt cholinergic gây ra suy giảm trí nhớ, rối loạn trong hành vi của bệnh Alzheimer [3]. Thực nghiệm cho thấy khi sử dụng hoạt chất ức chế enzym BuChE cùng với các chất ức chế AChE làm tăng hiệu quả điều trị.

Thực tế, Việt Nam có hơn 12.000 loài thực vật, trong đó có gần 4.000 loài có thể sử dụng trong y học cổ truyền [4]. Trong chi *Huperzia*, có một số cây có tiềm năng ứng dụng cao theo hướng điều trị bệnh Alzheimer, giúp giảm sa sút trí nhớ, nâng cao nhận thức. Trong đó, ở nước ta có dược liệu Thạch tùng răng cưa đã được sử

dụng từ lâu trong y học cổ truyền nhằm tăng cường trí nhớ và giảm các rối loạn thần kinh [5]. Dược liệu này cũng được sử dụng để điều trị nhiễm trùng, nôn ra máu, đái ra máu, sung tấy và các vết thương tích do ngã [5]. Hợp chất huperzin A với hoạt tính ức chế mạnh enzym AChE lần đầu tiên được phân lập từ Thạch tùng răng cưa bởi Liu J.S. và cộng sự vào năm 1986 [6].

Trên thế giới đã có một số nghiên cứu về thành phần hóa học của cây thạch tùng răng cưa và bước đầu nghiên cứu về tác dụng bảo vệ thần kinh của các hợp chất phân lập được [7,8]. Hầu hết các nghiên cứu đều chỉ ra rằng alkaloid là thành phần hóa học chính của loài thạch tùng răng cưa và đây là thành phần được nghiên cứu nhiều nhất về tác dụng bảo vệ thần kinh [9]. Ở Việt Nam, đã có một số nghiên cứu về tác dụng ức chế enzym AChE *in vitro* và đánh giá tác dụng tăng cường trí nhớ với đối tượng nghiên cứu được sử dụng là cao chiết ethanol và phân đoạn chiết. Qua tìm hiểu chúng tôi thấy chưa có nghiên cứu nào tiến hành đánh giá với đối tượng là cao chiết giàu alkaloid của thạch tùng răng cưa. Vì vậy nghiên cứu này được tiến hành nhằm so sánh tác dụng ức chế enzym acetylcholinesterase và enzym butyrylcholinesterase của cao toàn phần và các phân đoạn với cao chiết giàu alkaloid.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu.

2.1. Nguyên liệu

Mẫu nghiên cứu là toàn cây thạch tùng răng cưa được thu hái vào tháng 9 năm 2019 tại Đà Lạt, Lâm Đồng. Mẫu nghiên cứu được giám định thực vật học bởi Khoa Tài nguyên Dược liệu, Viện Dược liệu. Theo kết quả giám định, mẫu thu hái tại Lâm Đồng có tên khoa học là *Huperzia serrata* (Thunb.) Trevis. Dược liệu được rửa sạch, phơi và sấy khô ở 50°C sau đó xay tán thành bột thô. Để nghiên cứu tác dụng dược lý tiến hành chiết xuất lấy cao toàn phần bằng ethanol (EtOH) 50° được dịch chiết, lặp lại 3 lần và gộp dịch chiết sau đó lọc. Cô quay thu hồi cặn tạo thành cao toàn phần để tiến hành thử hoạt tính. Từ cao toàn phần tiến hành chiết phân

đoạn như sau: hòa tan cao trong EtOH 50° được dịch chiết, sau đó chiết lần lượt bằng các dung môi n – hexan, ethyl acetat và n – butanol thu được các phân đoạn dịch chiết. Cô quay thu hồi cần dịch chiết các phân đoạn để tiến hành thử hoạt tính. Bên cạnh đó, cao chiết giàu alcaloid được tiến hành như sau: bột dược liệu thô được thấm ẩm bằng amoniac, sau đó thêm chloroform, siêu âm 3 phút, lọc lấy dịch lọc, lặp lại 3 lần, gộp dịch chiết đem cô quay thu hồi dung môi thu được dịch chiết chloroform. Tiếp tục thêm acid H₂SO₄ 2% tới pH bằng 4-5, lắng, gạn thu được dịch chiết nước acid. Dịch chiết nước acid được kiềm hóa bằng NH₄OH tới pH bằng 9-10 rồi chiết bằng chloroform, lắng, gạn thu được dịch chiết chloroform. Dịch chiết này được cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm tới cần khô thu được cần alcaloid.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp đánh giá tác dụng ức chế enzym acetylcholinesterase/butyrylcholinesterase.

Tác dụng ức chế enzym AChE/BuChE (Sigma Aldrich, Singapore) của mẫu thử được tiến hành theo phương pháp được mô tả bởi Ellman và cộng sự (1961) [10] dựa trên nguyên tắc sau: Cơ chất acetylthiocholin iodid (ACTI) hoặc butyrylthiocholin iodid (BuChI) (Sigma Aldrich, Singapore) bị thủy phân nhờ xúc tác của AChE/BuChE tạo thiocholin. Sản phẩm thiocholin phản ứng với thuốc thử acid 5-5'-dithiobis-2-nitrobenzoic (DTNB) (Sigma Aldrich, Singapore) 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/BuChE.

Tiến hành phương pháp đánh giá tác dụng ức chế enzym AChE: hỗn hợp phản ứng bao gồm 120 µL dung dịch đệm natri phosphat (pH 8,0); 20 µL dung dịch thử ở các nồng độ khác nhau và 20 µL dung dịch enzym AChE 0,25 IU/mL. Trộn đều và đem ủ 15 phút tại 25°C. Các dịch chiết được thử và chất chuẩn dương được hòa tan

trong 1% dimethyl sulfoxid (DMSO). Sau đó, thêm 20 µL DTNB 1,25 mM và 20 µL ACTI 1,25 mM trộn đều. Sau đó, dung dịch được đo độ hấp thụ mỗi phút trong vòng 10 phút ở bước sóng 412 nm. Tất cả các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Donepezil (Sigma Aldrich, Singapore) được sử dụng làm chứng dương. Đánh giá kết quả thông qua phần trăm ức chế hoạt độ enzym AChE (I%) được tính theo Công thức 1.

Tiến hành phương pháp đánh giá tác dụng ức chế enzym BuChE: Hỗn hợp phản ứng bao gồm 120 µL dung dịch đệm natri phosphat (pH 8,0); 20 µL dung dịch thử ở các nồng độ khác nhau và 20 µL dung dịch enzym BuChE 0,5 IU/mL. Trộn đều và đem ủ 15 phút tại 25°C. Các dịch chiết được thử và chất chuẩn dương được hòa tan trong 1% dimethyl sulfoxid (DMSO). Sau đó, thêm 20 µL of DTNB 2,5 mM và 20 µL BuCTI 2,5 mM trộn đều. Sau đó, dung dịch được đo độ hấp thụ mỗi phút trong vòng 10 phút ở bước sóng 412 nm. Tất cả các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Rivastigmin (Sigma Aldrich, Singapore) được sử dụng làm chứng dương. Đánh giá kết quả thông qua phần trăm ức chế hoạt độ enzym BuChE (I%), được tính theo Công thức 1.

Công thức tính phần trăm ức chế hoạt độ enzym AChE/BuChE (% I):

$$I\% = \frac{\Delta ODo/phút - \Delta ODt/phút}{\Delta ODo/phút} \times 100\% \quad (1)$$

Trong đó:

%I: phần trăm hoạt tính AChE/BuChE bị ức chế;

ΔODO/phút: thay đổi mật độ quang mỗi phút của giếng trắng (không chứa 20 µL dung dịch thử);

ΔODt/phút: thay đổi mật độ quang mỗi phút của giếng có chất ức chế enzym AChE/BuChE.

2.3. Xử lý số liệu

Các số liệu nghiên cứu được xử lý thống kê theo phần mềm GraphPad Prism 7, Microsoft excel 2013. Số liệu được biểu diễn dưới dạng khoảng tin cậy 95% của giá trị IC₅₀. Trong đó IC₅₀ là nồng độ ức chế 50% đối tượng thử.

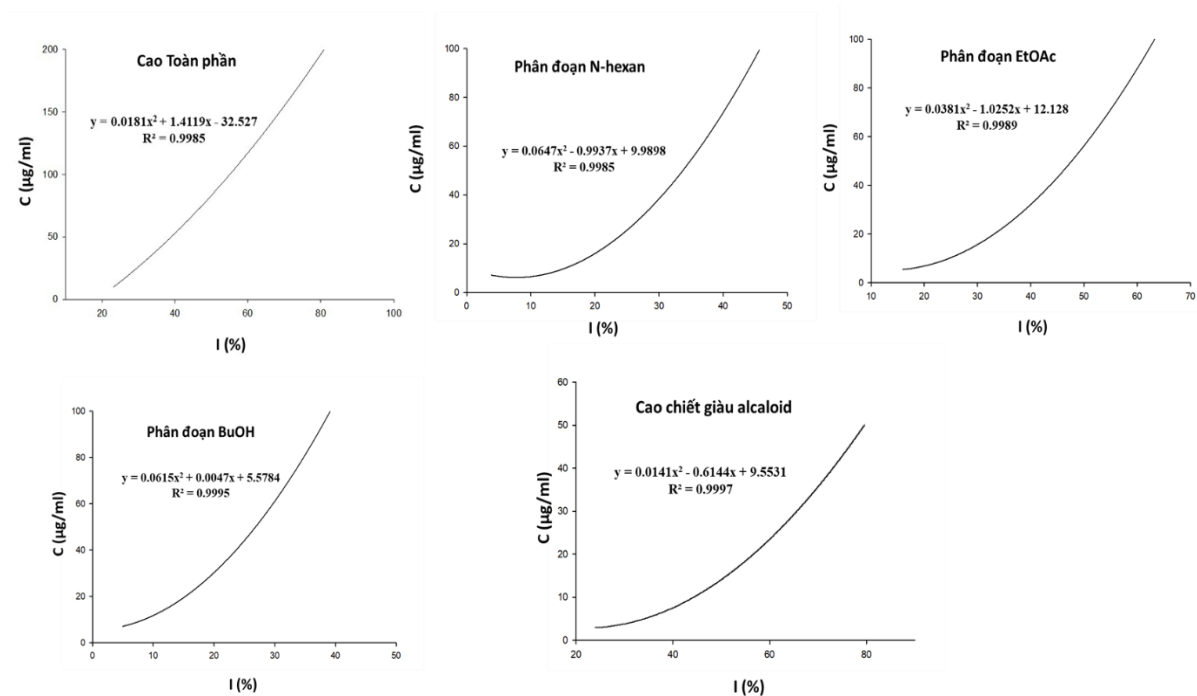
3. Kết quả

3.1. Kết quả đánh giá tác dụng ức chế enzym AChE của cao chiết toàn phần, các phân đoạn chiết và cao chiết giàu alcaloid của Thạch tùng răng cưa

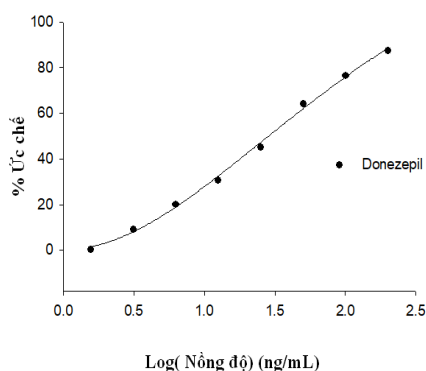
Hoạt tính ức chế AChE *in vitro* của cao chiết toàn phần, các phân đoạn chiết, cao chiết giàu

alcaloid và chất đối chứng donezepil được thể hiện ở Hình 1, 2.

Dựa vào đồ thị nồng độ và phần trăm ức chế, ta xác định giá trị IC₅₀ (nồng độ ức chế 50%) của các mẫu, chất chuẩn donepezil cho khả năng ức chế AChE. Kết quả thu được ở Bảng 1.



Hình 1. Đồ thị biểu diễn khả năng ức chế AChE *in vitro* của cao chiết toàn phần, các phân đoạn chiết và cao chiết giàu alcaloid của thạch tùng răng cưa.



Hình 2. Đồ thị biểu diễn khả năng ức chế AChE *in vitro* của donezepil.

Bảng 1. Giá trị IC₅₀ khả năng ức chế enzym AChE của cao chiết toàn phần, các phân đoạn chiết và cao chiết giàu alcaloid của thạch tùng răng cưa và chất chuẩn

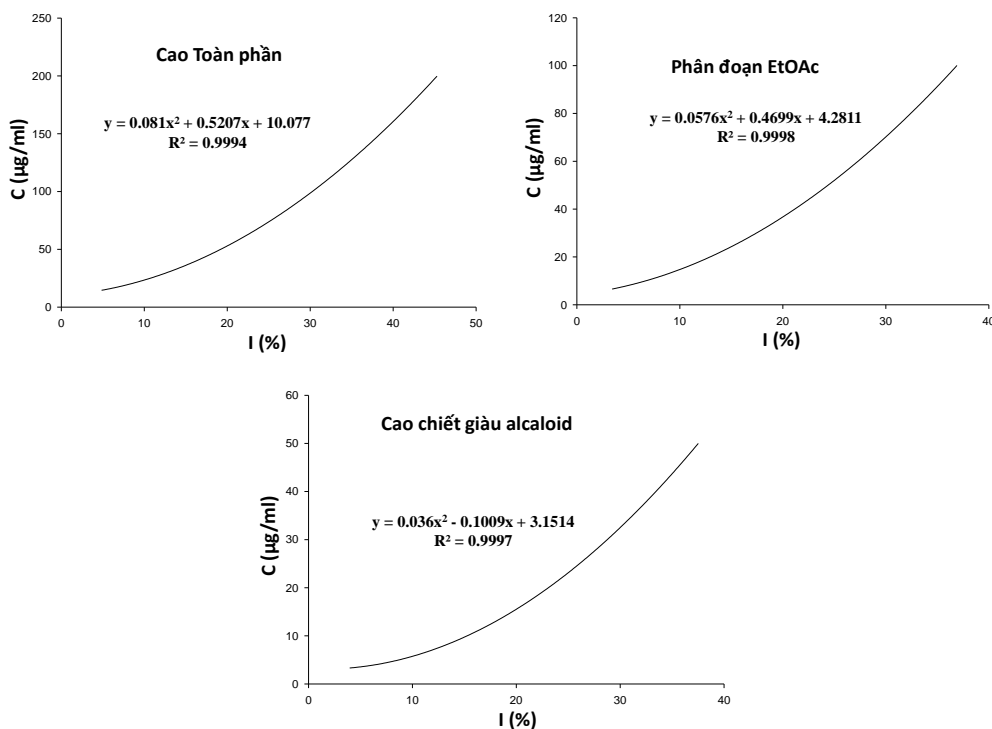
Mẫu thử	Donepezil	Cao toàn phần	Phân đoạn n-hexan	Phân đoạn EtOAc	Phân đoạn BuOH	Cao chiết giàu Alc
IC ₅₀ (µg/ml)	0,282 (0,26-0,31)	57,88 (11,79-151,7)	112,0 (89,56-147,1)	45,83 (33,23 -63,68)	155,6 (142,6 -171,3)	7,93 (5,43-10,98)

Kết quả nghiên cứu cho thấy cao chiết toàn phần thể hiện tác dụng ức chế enzym AChE tốt với giá trị IC₅₀ là 57,88 (11,79 – 151,7) µg/ml. Trong các phân đoạn chiết từ cao chiết toàn phần thì chỉ có phân đoạn EtOAc thể hiện tác dụng ức chế enzym AChE tốt nhất với giá trị IC₅₀ là 45,83 (33,23 – 63,68) µg/ml, các phân đoạn n-hexan và BuOH thể hiện tác dụng ức chế enzym AChE yếu với giá trị IC₅₀ > 100 µg/ml. Tiến hành đánh giá tác dụng ức chế enzym AChE của cao chiết giàu alcaloid cho thấy cao chiết giàu alcaloid của thạch tùng răng cưa thể hiện tác dụng ức chế rất tốt với giá trị IC₅₀ là 7,93 (5,43-10,98) µg/ml.

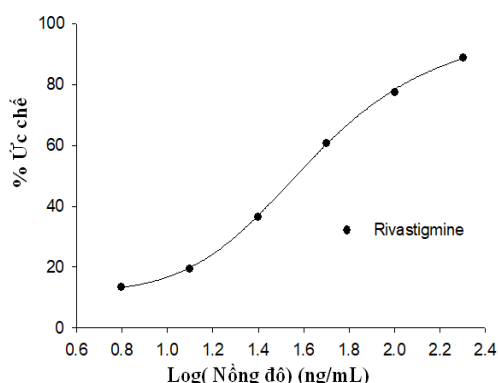
Song song với các mẫu thử, tiến hành tương tự với mẫu chứng là donepezil thu được giá trị IC₅₀ là 0,282 (0,26 - 0,31) µg/ml.

3.2. Kết quả đánh giá tác dụng ức chế enzym BuChE của cao chiết toàn phần, các phân đoạn chiết và cao chiết giàu alcaloid của Thạch tùng răng cưa

Hoạt tính ức chế BuChE *in vitro* của cao chiết toàn phần, các phân đoạn chiết, cao chiết giàu alcaloid và chất đối chứng rivastigmin được thể hiện ở Hình 3, 4.



Hình 3. Đồ thị biểu diễn khả năng ức chế BuChE *in vitro* của cao chiết toàn phần, các phân đoạn chiết và cao chiết giàu alcaloid của Thạch tùng răng cưa.



Hình 4. Đồ thị biểu diễn khả năng ức chế BuChE *in vitro* của rivastigmin.

Bảng 2. Giá trị IC₅₀ khả năng ức chế enzym BuChE của cao chiết toàn phần, các phân đoạn chiết và cao chiết giàu alcaloid của thạch tùng răng cưa và chất chuẩn.

Mẫu thử	Rivastigmin	Cao toàn phần	Phân đoạn n-hexan	Phân đoạn EtOAc	Phân đoạn BuOH	Cao chiết giàu Alc
IC ₅₀ (µg/ml)	0,361 (0,34-0,385)	221,8 (200,5-247,3)	-	169,6 (157,7 -186,5)	-	76,67 (64,78 -91,84)

Dựa vào đồ thị nồng độ và phần trăm ức chế, ta xác định giá trị IC₅₀ (nồng độ ức chế 50%) của các mẫu, chất chuẩn rivastigmin cho khả năng ức chế BuChE. Kết quả thu được ở Bảng 2.

Kết quả nghiên cứu cho thấy cao chiết toàn phần và các phân đoạn chiết gần như không thể hiện tác dụng ức chế enzym BuChE. Tiến hành đánh giá tác dụng ức chế enzym BuChE của cao chiết giàu alc cho thấy cao chiết giàu alc của Thạch tùng răng cưa thể hiện tác dụng ức chế enzym BuChE yếu với giá trị IC₅₀ là 76,67 (64,78 – 91,84) µg/ml. Song song với các mẫu thử, tiến hành tương tự với mẫu chứng là rivastigmin thu được giá trị IC₅₀ là 0,361 (0,34-0,385) µg/ml.

3. Bàn luận

Một trong các giả thuyết quan trọng để giải thích nguyên nhân của bệnh alzheimer là giả thuyết liên quan đến cholinergic. Đây là giả thuyết có lâu nhất, trong đó các thuốc điều trị hiện có hầu hết đều dựa trên giả thuyết này, đề

xuất rằng nguyên nhân gây bệnh alzheimer là do giảm tổng hợp chất dẫn truyền thần kinh trung ương acetylcholine [11]. Chết tế bào trong vùng não trước dẫn đến thiếu hụt các chất dẫn truyền thần kinh trung ương bao gồm acetylcholine (ACh), serotonin và norepinephrine. Các nghiên cứu cho thấy sự thiếu hụt trong các chất dẫn truyền thần kinh chịu trách nhiệm cho việc suy giảm nhận thức và mất trí nhớ ở bệnh nhân alzheimer [2]. Sự thoái hóa của tế bào thần kinh cholinergic và giảm nồng độ ACh ở vỏ não, vùng đồi hải mã, và vùng não trước đóng một vai trò quan trọng trong sinh bệnh học của alzheimer. Enzym acetylcholinesterase (AChE) là một enzym có tác dụng thủy phân chất dẫn truyền thần kinh ACh. Một số phương pháp điều trị khác nhau có mục tiêu làm tăng dẫn truyền cholinergic bằng cách tăng lượng AChE, ngăn chặn quá trình thủy phân bởi chất ức chế AChE, kích thích các thụ thể nicotinic và muscarinic hoặc sử dụng các chất có tác dụng tương tự cholinergic [12]. Bằng phương pháp Ellman chúng tôi nghiên cứu thấy cao toàn phần, các phân đoạn cao chiết và cao chiết alcaloid đều có

tác dụng ức chế enzym AChE theo cách thức phụ thuộc vào nồng độ chất thử, tác dụng ức chế tăng dần theo nồng độ thử. Mẫu chứng dương donezepin thể hiện tác dụng ức chế enzym AChE tốt với giá trị IC_{50} là 0,282 (0,26 - 0,31) $\mu\text{g/ml}$, kết quả nghiên cứu này tương đồng với các nghiên cứu trước đây khi Hachiro Sugimoto và cộng sự (năm 2002) đã chỉ ra IC_{50} của donezepin là 6,7 nM (khoảng 0,25 $\mu\text{g/ml}$), từ đó cho thấy phương pháp tiến hành của chúng tôi là phù hợp [13]. Trong cao chiết toàn phần và các phân đoạn chiết, phân đoạn EtOAc thể hiện khả năng ức chế enzym AChE cao nhất với IC_{50} là 45,83 (33,23 – 63,68) $\mu\text{g/ml}$ sau đó tới cao toàn phần với IC_{50} là 57,88 (11,79 – 151,7) $\mu\text{g/ml}$, phân đoạn n-hexan và phân đoạn BuOH thể hiện tác dụng ức chế enzym yếu. Tiến hành nghiên cứu cao chiết giàu alcaloid từ thạch tùng răng cưa cho thấy, cao chiết này có khả năng ức chế enzym AChE mạnh gấp gần 6 lần phân đoạn có tác dụng mạnh nhất với IC_{50} là 7,93 (5,43-10,98) $\mu\text{g/ml}$. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với nghiên cứu trước đây. Tại Việt Nam, nghiên cứu của Nguyễn Thị Kim Thu và cộng sự đã đánh giá được tác dụng ức chế enzym AChE *in vitro* của các phân đoạn dịch chiết từ lá và thân của Thạch tùng răng cưa thu hái tại Sapa, Lào Cai [14]. Kết quả cho thấy phân đoạn dịch chiết EtOAc có tác dụng ức chế enzym AChE mạnh nhất với IC_{50} là $89,96 \pm 3,42$ $\mu\text{g/ml}$. Năm 2015, Takuya Ohb và cộng sự đã chỉ ra rằng, cao chiết giàu alcaloid từ Thạch tùng răng cưa tại Nhật Bản có khả năng ức chế enzym AChE với giá trị IC_{50} là 5,96 $\mu\text{g/ml}$ [7]. Việc cao chiết giàu alcaloid thể hiện tác dụng ức chế enzym AChE mạnh hơn cao chiết toàn phần và các phân đoạn chiết là do alcaloid là thành phần hóa học chính của loài Thạch tùng răng cưa. Trong đó, chủ yếu là các lycopodium alcaloid có cấu trúc đa dạng với nhiều khung độc đáo, được chia thành 4 lớp dựa vào cấu trúc khung carbon và con đường sinh tổng hợp: lycopodin, lycodin, fawcettimin và miscellaneous [15]. Ngoài ra, thành phần hóa học của thạch tùng răng cưa còn chứa một số hợp chất thuộc nhóm triterpenoid, flavonoid [16]. Tuy nhiên, các lycopodium alcaloid vẫn là nhóm chất được chiết tách, phân lập và nghiên cứu

hiều nhất với các tác dụng sinh học quan trọng như ức chế enzym acetylcholinesterase, trong đó nổi bật là hợp chất Huperzin A [9]. HupA là chất có hoạt tính ức chế AChE mạnh và có cơ chế tương tự các thuốc hiện hành dùng để điều trị alzheimer như rivastigmine, donepezil và galantamine. Thử nghiệm lâm sàng cho thấy HupA có rất ít tác dụng phụ liên quan đến kháng cholinergic ngoại vi như chóng mặt, buồn nôn, các triệu chứng viêm dạ dày ruột, nhức đầu, và giảm nhịp tim. Đây là một ưu điểm của HupA so với các chất ức chế AChE khác dùng để điều trị alzheimer [17]. HupA có nhiều tác dụng bao gồm ức chế các yếu tố gây chết rụng tế bào, như protein caspase-3, Bax và p53; và điều hòa sự biểu hiện và bài tiết yếu tố tăng trưởng thần kinh (Nerve growth factor - NGF) [18]. HupA tăng cường khả năng học tập và nhớ của chuột nhờ kích hoạt con đường PKC/MAPK, γ -secretases, enzym beta-site APP cleaving (BACE), và phosphoryl hóa GSK-3 β [19]. Tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh của HupA liên quan với đến giảm mảng bám amyloid và nồng độ oligomeric A β ở vỏ não và vùng hồi hải mã [20]. HupA (0,1 và 1 μM) cũng là chất đối kháng thụ thể N-methyl-D-aspartate (NMDA) và kênh kali [21]. Thử nghiệm lâm sàng pha 2 của HupA ở bệnh nhân bị bệnh Alzheimer từ mức độ nhẹ đến trung bình cho thấy HupA ở liều 200 μg không chứng minh được sự cải thiện nhận thức nhưng với liều 400 μg có thể cải thiện được nhận thức [22].

Nhiều nghiên cứu cho rằng enzym BuChE có tác dụng điều hòa lượng AChE trong não. Người ta nhận thấy hoạt tính của enzym BuChE tăng đáng kể trong các bệnh Alzheimer và hoạt tính của enzym AChE giảm. Trên lâm sàng cho thấy, sử dụng thuốc ức chế 2 enzym AChE và BuChE cho hiệu quả điều trị cao hơn [23]. Vì vậy trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành đánh giá tác dụng ức chế enzym BuChE của cao chiết toàn phần, các phân đoạn chiết để so sánh với cao chiết giàu alcaloid. Kết quả nghiên cứu cho thấy, cao chiết toàn phần và các phân đoạn gần như không thể hiện tác dụng ức chế enzym BuChE trong khi đó cao chiết giàu alcaloid lại thể hiện tác dụng với IC_{50} là 76,67 (64,78 – 91,84) $\mu\text{g/ml}$. Mẫu chứng dương rivastigmin thể hiện tác dụng

ức chế enzym BuChE tốt với giá trị IC_{50} thu được 0,361 (0,34-0,385) $\mu\text{g/ml}$, kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu đã tiến hành khi Hachiro Sugimoto và cộng sự (năm 2002) đã chỉ ra IC_{50} của rivastigim là 31 nM (khoảng 0,78 $\mu\text{g/ml}$) từ đó cho thấy phương pháp tiến hành của chúng tôi phù hợp. Takuya Ohb và cộng sự đã chỉ ra rằng, cao chiết giàu alcaloid thạch tùng răng cưa tại Nhật Bản không thể hiện tác dụng ức chế BuChE *in vitro* ở dải nồng độ 0,1-10 $\mu\text{g/ml}$ [7]. Có thể do nghiên cứu này tiến hành đánh giá tác dụng ức chế BuChE *in vitro* ở dải nồng độ thấp nên chưa xác định được IC_{50} . Hiện nay, tại Việt Nam chưa có nghiên cứu nào về đánh giá tác dụng ức chế enzym BuChE của cao chiết toàn phần, phân đoạn chiết hay cao chiết giàu alcaloid của Thạch tùng răng cưa. Người ta cũng tiến hành đánh giá tác dụng ức chế enzym BuChE của HupA và cho thấy HupA gần như không có tác dụng đối với enzym BuChE ở nồng độ có tác dụng ức chế AChE, tỷ lệ IC_{50} (BuChE)/ IC_{50} (AChE) của HupA lên tới 907,7 [24]. Việc cao chiết giàu alcaloid thể hiện tác dụng ức chế enzym BuChE có thể do trong cao chiết chứa các alcaloid khác có tác dụng trên enzym BuChE. Để làm rõ tác dụng này, chúng ta có thể tiến hành phân lập các chất trong cao chiết giàu alcaloid và đánh giá tác dụng ức chế enzym BuChE nhằm tìm ra chất có tác dụng tốt nhất. Mặc dù kết quả nghiên cứu chưa chỉ ra hoạt chất cụ thể và cơ chế tác dụng của hợp chất nhưng cũng góp phần bổ sung cho cơ sở dữ liệu về những chất có tác dụng ức chế enzym AChE và BuChE đồng thời là căn cứ cho những nghiên cứu tìm kiếm các hợp chất mới trong thạch tùng răng cưa có tác dụng trong hỗ trợ phòng và điều trị bệnh alzheimer.

Kết luận

Nghiên cứu đã đánh giá và so sánh được tác dụng ức chế enzym AChE và BuChE của cao chiết toàn phần và các phân đoạn chiết với cao chiết giàu alcaloid. Kết quả cho thấy cao chiết giàu alcaloid thể hiện tác dụng ức chế enzym AChE và BuChE mạnh hơn hẳn so với cao chiết toàn phần và các phân đoạn cao chiết với giá trị IC_{50} lần lượt là $14,08 \pm 0,93$ $\mu\text{g/ml}$ và $88,11 \pm$

1,64 $\mu\text{g/ml}$. Kết quả này mở ra các hướng nghiên cứu sâu hơn về thành phần hóa học của cao chiết giàu alcaloid để phân tách được hoạt chất tinh khiết có tiềm năng và cơ chế tác dụng của hoạt chất hỗ trợ nghiên cứu phòng và điều trị các bệnh liên quan đến alzheimer và các rối loạn thần kinh trong tương lai.

Lời cảm ơn

Đề tài này được tài trợ bởi Đại học Quốc gia Hà Nội, mã số đề tài QG.19.57.

Tài liệu tham khảo

- [1] Dos Santos Picanco, Leide C et al., Alzheimer's disease: A review from the pathophysiology to diagnosis, new perspectives for pharmacological treatment, Current medicinal chemistry 25(26) (2018) 3141 - 3159. <https://doi.org/10.2174/0929867323666161213101126>.
- [2] B.M. McGleenon, K.B. Dynan, A.P. Passmore, Acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease, British journal of clinical pharmacology 48(4) (1999) 471-480. <https://10.1046/j.1365-2125.1999.00026.x>.
- [3] Agneta Nordberg, Clive Ballard, Roger Bullock, Taher Darreh-Shori, Monique Somogyi, A review of butyrylcholinesterase as a therapeutic target in the treatment of Alzheimer's disease, The primary care companion for CNS disorders 15(2) (2013). <https://10.4088/PCC.12r01412>.
- [4] N.M. Ha, V.V. Dung et al., Report on the review of Vietnam's wildlife trade policy, 2007.
- [5] D.H. Bich, et al., Medicinal plants and medicinal animals in Viet Nam. Science and Technics Publishing House 1 (2011) 896-897 (in Vietnamese).
- [6] Jia-Sen Liu, Yuan-Long Zhu, Chao-Mei Yu, You-Zuo Zhou, Yan-Yi Han, Feng-Wu Wu, Bao-Feng Qi, The structures of huperzine A and B, two new alkaloids exhibiting marked anticholinesterase activity. Canadian Journal of Chemistry 64(4) (1986) 837-839. <https://doi.org/10.1139/v86-137>.
- [7] Takuya Ohba, Yuta Yoshino et al., Japanese Huperzia serrata extract and the constituent, huperzine A, ameliorate the scopolamine-induced cognitive impairment in mice, Bioscience biotechnology and biochemistry 79(11) (2015)

- 1838-1844.
<https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1052773>.
- [8] Ju-Yeon Park, Hyuck Kim et al., Ethanol Extract of *Lycopodium serratum* Thunb. Attenuates Lipopolysaccharide-Induced C6 Glioma Cells Migration via Matrix Metalloproteinase-9 Expression, *Chinese Journal of Integrative Medicine* 24(11) (2018) 860-866.
<https://doi.org/10.1007/s11655-017-2923-9>.
- [9] M. Maridass, G. Raju, Investigation of phytochemical and antimicrobial activity of *Huperzia* species, *Pharmacologyonline* 3 (2009) 688-692.
- [10] George.L.Ellman, K.Diane Courtney, et al., A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochemical Pharmacology* 7(2) (1961) 88-95.
[https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9).
- [11] Paul T Francis, et al., The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 66(2) (1999) 137-147.
<http://dx.doi.org/10.1136/jnnp.66.2.137>.
- [12] Prerna Upadhyaya, Vikas Seth, Mushtaq Ahmad, Therapy of Alzheimer's disease: An update, *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 4(6) (2010) 408-421.
- [13] Hachiro Sugimoto, Hiroo Ogura, et al., Research and development of donepezil hydrochloride, a new type of acetylcholinesterase inhibitor, *The Japanese journal of pharmacology* 89(1) (2002) 7-20.
- [14] N.T.K. Thu, et al., Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibition effect of fractions extract of *Huperzia serrata* (Thunb.) Trevis. *The journal of Pharmeceutical* 56(11) 49-53 (in Vietnamese).
- [15] Xiaoqiang Ma, Changheng Tan, et al, Is there a better source of huperzine A than *Huperzia serrata*? Huperzine A content of Huperziaceae species in China. *J Agric Food Chem*, 53(5) (2005)1393-8.
<https://doi.org/10.1021/jf048193n>.
- [16] Ya-Bing Yang, Xue-Qiong Yang, et al., A New Flavone Glycoside from *Huperzia serrata*. *Chinese Journal of Natural Medicines* 6(6) (2008) 408-410.
- [17] G.T. Ha, R.K. Wong, Y. Zhang, Huperzine a as potential treatment of Alzheimer's disease: an assessment on chemistry, pharmacology, and clinical studies, *Chemistry & biodiversity* 8(7) (2011) 1189-1204.
<https://doi.org/10.1002/cbdv.201000269>.
- [18] H.Y. Zhang, X.C. Tang, Neuroprotective effects of huperzine A: new therapeutic targets for neurodegenerative disease, *Trends in pharmacological sciences* 27(12) (2006) 619-625.
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2006.10.004>.
- [19] Y. Wang, X.C. Tang, H.Y. Zhang, Huperzine A alleviates synaptic deficits and modulates amyloidogenic and nonamyloidogenic pathways in APPswe/PS1dE9 transgenic mice, *Journal of neuroscience research* 90(2) (2012) 508-517.
<https://doi.org/10.1002/jnr.22775>.
- [20] C.Y. Wang, et al., Huperzine A activates Wnt/ β -catenin signaling and enhances the nonamyloidogenic pathway in an Alzheimer transgenic mouse model, *Neuropsychopharmacology* 36(5) (2011) 1073-1089. <https://doi.org/10.1038/npp.2010.245>.
- [21] R.K. Gordon, et al., The NMDA receptor ion channel: a site for binding of Huperzine A, *Journal of applied toxicology* 21(S1) (2001) S47-S51.
<https://doi.org/10.1002/jat.805>.
- [22] M. Rafii, et al., A phase II trial of huperzine A in mild to moderate Alzheimer disease, *Neurology* 76(16) (2011) 1389-1394.
<https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318216eb7b>.
- [23] N.H. Greig, et al., A new therapeutic target in Alzheimer's disease treatment: attention to butyrylcholinesterase, *Current medical research and opinion* 17(3) (2001)1 59-165.
- [24] A. Ferreira, et al., Huperzine A from *Huperzia serrata*: a review of its sources, chemistry, pharmacology and toxicology, *Phytochemistry reviews* 15(1) (2016) 51-85.
<https://doi.org/10.1007/s11101-014-9384-y>.