

Đánh giá hoạt tính ức chế acetylcholinesterase *in silico* của hoạt chất từ Thạch tùng vảy (*Huperzia squarrosa* Forst.)

Hồ Thị Thạch Thúy, Võ Thị Bích Ngọc, Lý Hồng Hương Hạ, Phạm Cảnh Em*
Trường Đại học Quốc tế Hồng Bàng

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: *Huperzia squarrosa* (họ Lycopodiaceae) là nguồn hợp chất sinh học có tiềm năng bảo vệ thần kinh, đặc biệt trong tăng cường trí nhớ. **Mục tiêu:** Nghiên cứu sàng lọc các hợp chất từ *Huperzia squarrosa* để đánh giá khả năng ức chế AChE, so sánh ái lực liên kết và tương tác phân tử với Donepezil. **Phương pháp:** Docking phân tử *in silico* được thực hiện trên 26 hợp chất từ *Huperzia squarrosa*, phân tích ái lực liên kết và các tương tác (hydrogen, tĩnh điện, kỵ nước) so với donepezil. **Kết quả:** Lycoposerramine U N-oxide (-10.4 kcal/mol), 8-acetoxylfawcettimine (-10.2 kcal/mol), huperzin U, huperzinine N-oxide, 4-epilycopodine và 8,15-dihydrohuperzine A (-10.1 kcal/mol) đã thể hiện ái lực liên kết mạnh với AChE, dù thấp hơn donepezil (-11.8 kcal/mol). Lycoposerramine U N-oxide tạo liên kết hydrogen với TYR124 (2.58 Å), TRP86 (2.79 Å), π -cation với TYR341 (3.81 Å), và π - σ với TYR337 (3.88 Å). 8-Acetoxylfawcettimine hình thành liên kết hydrogen với GLY121 (2.70 Å), SER203 (2.43 Å) và sáu tương tác π -alkyl (4.1-4.95 Å). Huperzinine N-oxide thể hiện tương tác tĩnh điện với ASP74 (4.28 Å) và năm tương tác kỵ nước (3.68-5.49 Å). Các hợp chất *Huperzia* nhắm mục tiêu vào các gốc chính TRP86 và TYR337 tương tự như donepezil. **Kết luận:** Lycoposerramine U N-oxide và 8-acetoxylfawcettimine là các chất ức chế AChE triển vọng, cần nghiên cứu thêm *in vitro* và *in vivo* để phát triển liệu pháp Alzheimer.

Từ khóa: *Huperzia squarrosa*, *in silico*, anti-acetylcholinesterase

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Alzheimer được xem như một triệu chứng của quá trình lão hoá mà đặc trưng của bệnh là sự suy thoái trí nhớ và sự mất trí nhớ toàn bộ xảy ra khi bệnh tiến triển. Những nghiên cứu về căn bệnh đã xác định mối tương quan đáng kể giữa sự hiện diện của chất trung gian dẫn truyền thần kinh acetylcholin, vốn cần cho việc hình thành và lưu giữ trí nhớ, với sự tiến triển của bệnh Alzheimer. Acetylcholin tồn tại càng lâu trong não thì các tế bào não có thể gọi nhắc trí nhớ càng lâu [1]. Ngày nay, một trong những phương pháp điều trị hiệu quả là sử dụng các chất có tác dụng ức chế acetylcholinesterase (AChE) như donepezil, galantamin và rivastigmin.

Huperzin A được chiết xuất từ cây Thạch tùng răng đã gây được rất nhiều chú ý bởi các công dụng của nó trong điều trị chứng bệnh mất trí nhớ [2 - 8]. Các nghiên cứu khoa học hiện đại đã chỉ ra rằng huperzin A có khả năng ức chế enzym acetylcholinesterase [2, 3, 7, 8], loại enzym quan trọng trong quá trình gây ra bệnh mất trí nhớ. Huperzin A đã được công nhận là một loại thuốc điều trị mất trí nhớ hiệu quả ở Trung Quốc và hiện nay đã được cục quản lý thuốc và thực phẩm Mỹ (FDA) công nhận là 1 loại thực phẩm chức năng cho các bệnh nhân bị Alzheimer. Huperzin A đã

được chứng minh bởi nhiều công trình nghiên cứu rằng nó có thể làm tăng khả năng ghi nhớ và lưu trữ thông tin của não cũng như cải thiện sự sa sút về trí tuệ của các bệnh nhân ở Trung Quốc. Huperzin A cũng có khả năng bảo vệ khác như điều chỉnh tiền chất β -amyloid protein, qua đó chống lại sự oxy hóa, sự tự chết của tế bào thần kinh theo quá trình apoptosis, rối loạn chức năng của ti thể và có khả năng chống viêm nhiễm. Những khả năng bảo vệ các tế bào thần kinh của huperzin A đã giúp ích rất nhiều cho các bệnh nhân Alzheimer [2 - 9].

Thạch tùng răng có tên khoa học là *Huperzia serrata* (Thunb. ex Murray) Trevis thuộc họ Thạch tùng (Lycopodiaceae). Trong y học cổ truyền Trung Quốc, Thạch tùng được sử dụng để điều trị sưng phù nề tâm thần phân liệt. Theo các tài liệu cổ, Thạch tùng được sử dụng trong dân gian ở Việt Nam dùng để điều trị các tổn thương, nôn ra máu, trĩ, đình nhọt, viêm da và rần cấn. Cùng với *Huperzia serrata*, các thực vật khác thuộc họ Lycopodiaceae có thể chứa hợp chất huperzin A như là *Huperzia crispata* (Ching) Ching, *Huperzia miyoshiana* (Makino) Ching và một số loài khác. Trong khi đó ở Việt Nam, một số cây thuộc họ Lycopodiaceae cũng có thể là nguồn thực vật cung

Tác giả liên hệ: Phạm Cảnh Em

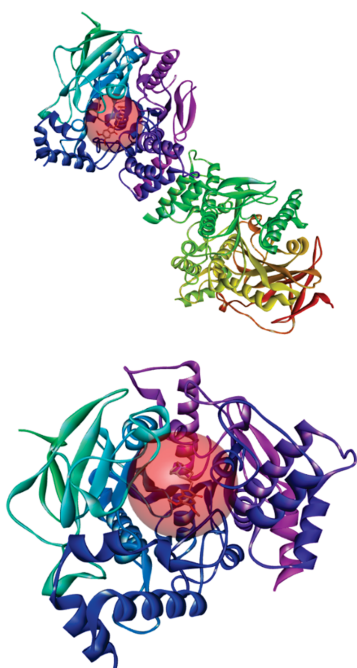
Email: empc@hiu.vn

cấp các hợp chất tự nhiên theo hướng tác dụng sinh học cải thiện trí nhớ như *Huperzia squarrosa* (Forst.) Trevis (Râu rồng/ Thạch tùng vảy) và *Lycopodiella cernua* (L.) Pic. Serm. (Thạch tùng nghiền) [10 - 13].

Các nghiên cứu ở Việt Nam về Thạch tùng chủ yếu tập trung vào chiết xuất thông thường và phân lập các hợp chất thực vật. Hơn nữa, ứng dụng cách tiếp cận hiện đại trong đánh giá hoạt tính điều trị Alzheimer của cao Thạch tùng vảy còn hạn chế ở Việt Nam và trên thế giới. Nghiên cứu docking phân tử để xác định các hợp chất tiềm năng để điều trị bệnh Alzheimer từ 15 hợp chất trong *Huperzia squarrosa* đã được thực hiện trên các đích tác dụng khác nhau như AChE, butyrylcholinesterase (BuChE), monoamine oxidase A (MAO A), enzyme phân cắt β -secretase (BACE 1) và thụ thể *N*-methyl-*D*-aspartate (NMDA) [10], tuy nhiên cơ chế tác động (loại tương tác và vị trí acid amin tương tác) của các hoạt chất *Huperzia squarrosa* trên AChE chưa được thể hiện rõ khi so sánh với thuốc đối chiếu cũng như một số hợp chất tiềm năng khác trong *Huperzia squarrosa* chưa được đánh giá. Do đó, mục đích của nghiên cứu là đánh giá hoạt tính và cơ chế ức chế acetylcholinesterase *in silico* của các hoạt chất từ cao chiết Thạch tùng vảy (*Huperzia squarrosa* Forst. - HS) ở Việt Nam trong hỗ trợ điều trị Alzheimer.

Bảng 1. Thông số “grid box” của đích tác dụng AChE

Đích tác dụng	Kích thước (Å)			Trung tâm (Å)		
	x	y	z	x	y	z
AChE	30	30	30	-44.8497	9.50621	-81.3212



Hình 1. Cấu trúc và vị trí tác động của AChE

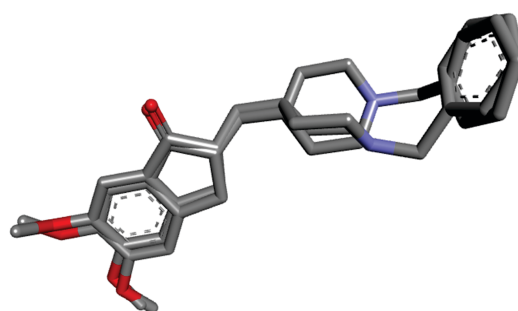
2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Chuẩn bị ligand

Cấu trúc của các thành phần hoạt chất của của Thạch tùng vảy (HS) được tải xuống từ cơ sở dữ liệu PubChem của NLM (Thư viện Y khoa Quốc gia - National Library of Medicine). Cấu trúc của các ligand mới được vẽ bằng ChemBioDraw Ultra 19. Năng lượng của các ligand này được tối thiểu hóa bằng phần mềm ChemBio3D Ultra 19 [14, 15].

2.2. Chuẩn bị đích tác dụng

Cấu trúc tinh thể của đích tác dụng acetylcholinesterase (AChE, ID PDB: 7E3H) được lấy từ ngân hàng dữ liệu protein (rcsb.org). Tất cả các phân tử nước và ligand được loại bỏ khỏi đích tác dụng [14, 15]. Sau đó, đích tác dụng được thêm vào hydrogen phân cực (*only polar hydrogen*) và điện tích Kollman. Thông số hộp lưới (*grid box*) được thiết lập gồm kích thước và tọa độ trung tâm để bao phủ toàn bộ vị trí tác động của AChE sử dụng phần mềm AutoDock Tools (Bảng 1). Vị trí tác động của AChE được xác định dựa trên ligand đồng kết tinh (donepezil) (Hình 1). Kết quả redocking cho thấy RMSD < 2 Å góp phần xác nhận giá trị mô hình (Hình 2). Cấu trúc, vị trí tác động và redocking trên AChE được thể hiện ở Hình 1 và 2.

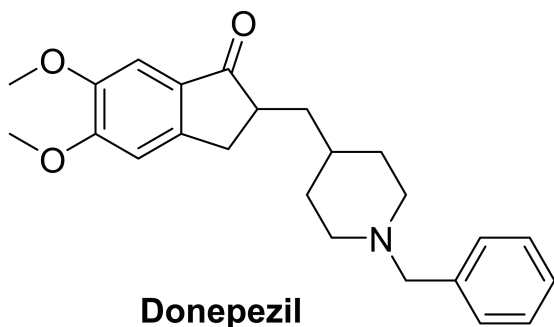


Hình 2. Kết quả redocking của donepezil đồng kết tinh trên AChE (RMSD = 1.1032 Å)

2.3. Docking phân tử

Các ligand được gắn kết với đích tác dụng để xác định các thông số lắp ghép bằng phần mềm AutoDock Vina (trường lực AMBER) với sự trợ giúp của việc lắp ghép ligand dựa trên hộp lưới “*grid box*”. Việc trình bày bằng hình ảnh về sự

tương tác giữa các ligand và đích tác dụng được thực hiện bằng phần mềm BIOVIA Discovery Studio 2021 và PyMOL. Kết quả tương tác với của các ligand sẽ được so sánh với thuốc đối chiếu donepezil có cơ chế tác động AChE. Cấu trúc của thuốc đối chiếu donepezil cho đích tác dụng AChE được thể hiện ở Hình 3.

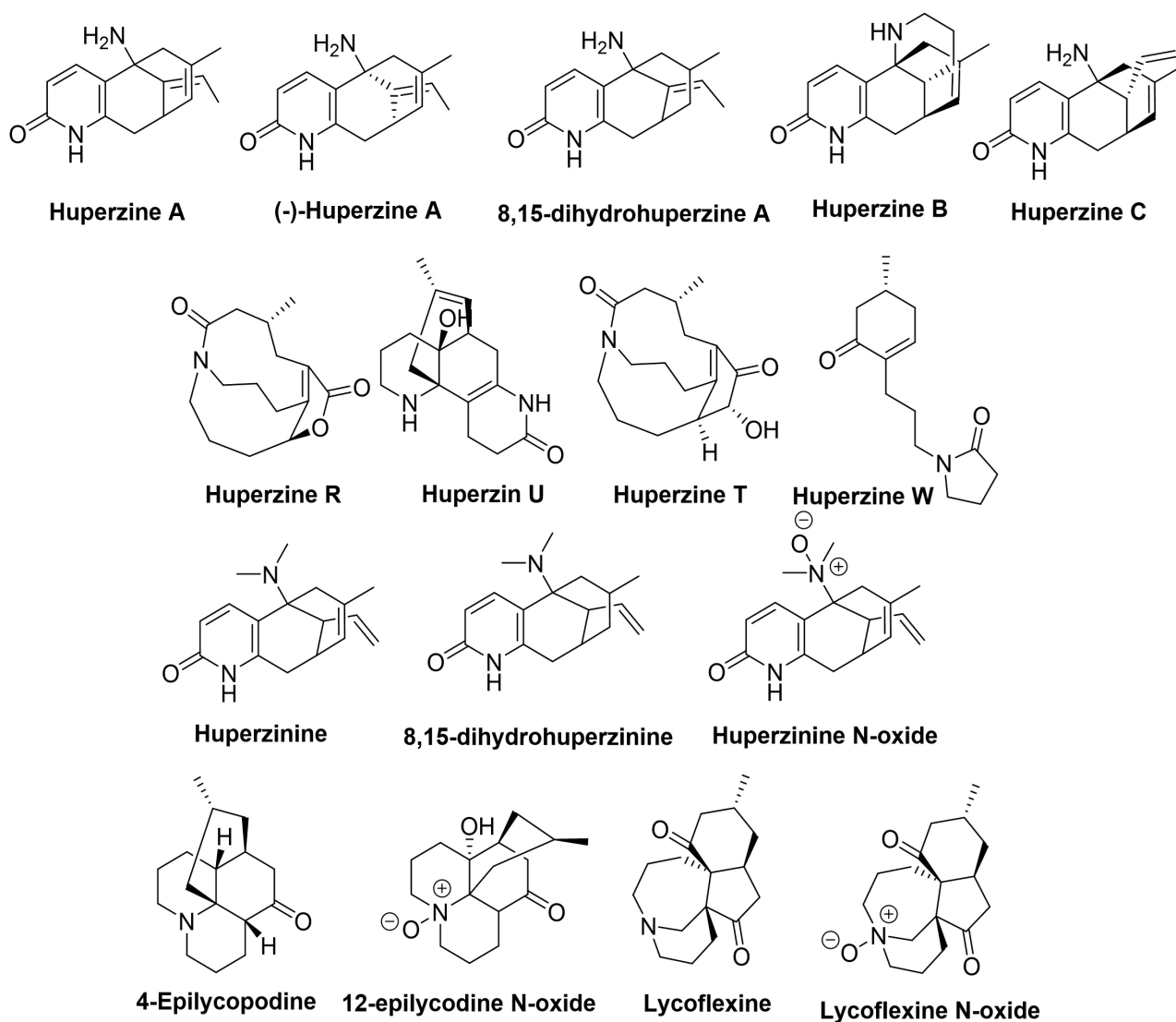


Hình 3. Cấu trúc thuốc đối chiếu donepezil cho đích tác dụng AChE

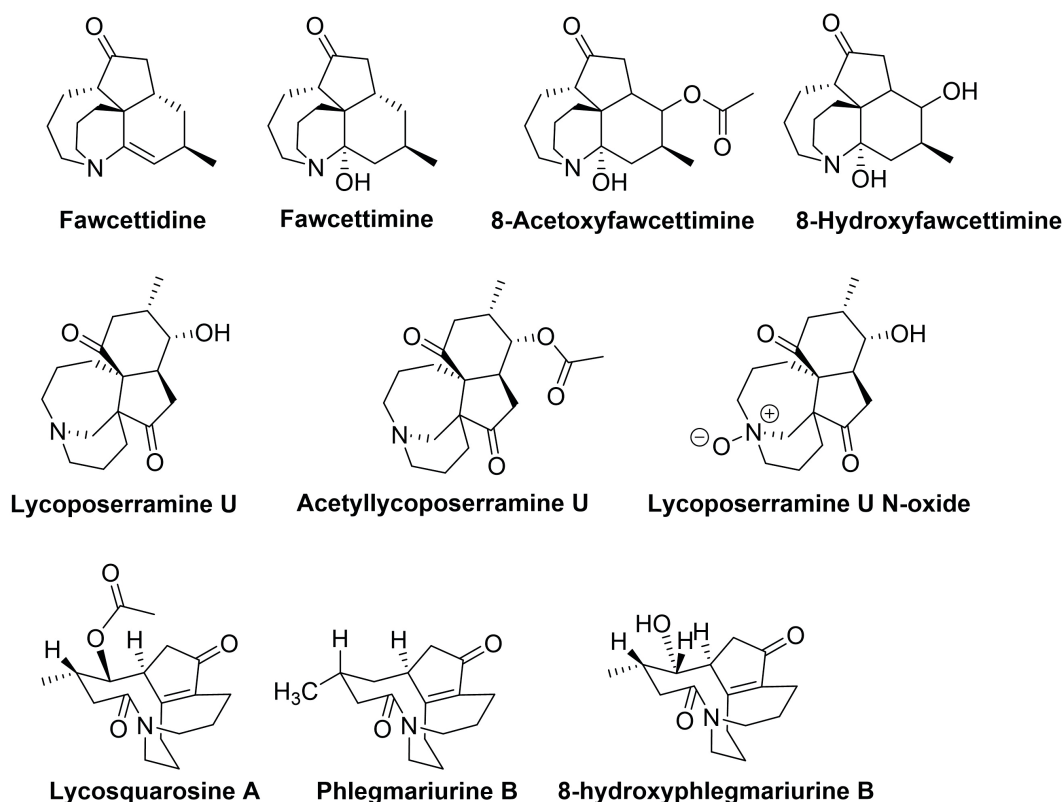
3. KẾT QUẢ

3.1. Sàng lọc các hợp chất hoạt tính trong Thạch tùng vảy

Dựa trên các nghiên cứu phân lập, phân tích LC-MS và thử nghiệm *in vitro*, 26 hoạt chất (phytocompound) của Thạch tùng vảy được xác định có tiềm năng trong điều trị Alzheimer [5 - 13]. Alkaloid là nhóm hợp chất đặc trưng của *Huperzia squarrosa*, với các alkaloid chính như huperzine A, huperzine B, và lycopodine. Huperzine A là hợp chất được nghiên cứu nhiều nhất do tiềm năng trong điều trị bệnh Alzheimer. Hàm lượng alkaloid tổng dao động từ 0.5 - 2% (theo khối lượng khô) tùy thuộc vào dung môi và phương pháp chiết xuất. Các hợp chất alkaloid này được đánh giá tương tác với hai thụ thể AChE bằng phương pháp docking phân tử. Danh sách hợp chất được trình bày ở Bảng 2 bao gồm các alkaloid lycopodin, lycodin, fawcettimin và nhóm có cấu trúc khác tương tự như phlegmarin. Cấu trúc các hoạt chất tiềm năng được thể hiện ở Hình 4 và 5.



Hình 4. Cấu trúc các hoạt chất huperzine, huperzinine, lycopodine, lycoflexine của Thạch tùng vảy



Hình 5. Cấu trúc hoạt chất fawcettimine, lycoposerramine, lycosquarosine, phlegmariurine B của Thạch tùng vảy

Bảng 2. Hợp chất hoạt tính tiềm năng cho hoạt tính anti-Alzheimer của Thạch tùng vảy

STT	Hoạt chất	STT	Hoạt chất
1	Huperzine A	14	12-Epilycodine N-oxide
2	(-)-Huperzine A	15	Lycoflexine
3	8,15-dihydrohuperzine A	16	Lycoflexine N-oxide
4	Huperzine B	17	Fawcettidine
5	Huperzine C	18	Fawcettimine
6	Huperzine R	19	8-Acetoxyfawcettimine
7	Huperzine U	20	8-Hydroxyfawcettimine
8	Huperzine T	21	Lycoposerramine U
9	Huperzine W	22	Acetyllycoposerramine U
10	Huperzinine	23	Lycoposerramine U N-oxide
11	8,15-Dihydrohuperzinine	24	Lycosquarosine A
12	Huperzinine N-oxide	25	Phlegmariurine B
13	4-Epilycopodine	26	8-Hydroxyphlegmariurine B

3.2. Hoạt tính ức chế acetylcholinesterase (AChE)

AChE là một enzyme quan trọng trong hệ thần kinh, chịu trách nhiệm thủy phân acetylcholine (ACh) - một chất dẫn truyền thần kinh thiết yếu cho chức năng nhận thức. Trong bệnh Alzheimer, ức chế AChE là chiến lược điều trị chính nhằm tăng nồng độ ACh tại khe synapse, từ đó cải thiện triệu chứng suy giảm nhận thức. Ái lực liên kết của các hoạt chất

với AChE được đo bằng năng lượng tự do liên kết (ΔG , đơn vị kcal/mol). Đây là một chỉ số quan trọng để đánh giá tiềm năng ức chế của các hoạt chất này. Giá trị ΔG càng âm (tức là càng nhỏ), ái lực liên kết càng cao, cho thấy khả năng tương tác mạnh hơn với vị trí tác động của AChE. Kết quả nghiên cứu đã thể hiện ái lực liên kết của 29 hợp chất, bao gồm các phytocompound và thuốc đối chiếu như donepezil

và rasagiline với AChE (Bảng 3).

Các hợp chất có ái lực liên kết với AChE dao động từ -8.2 kcal/mol (acetyllycoposerramine U) đến -11.9 kcal/mol (donepezil, đích tác dụng). Trong đó, các hợp chất như lycoposerramine U *N*-oxide (-10.4 kcal/mol), 8-acetoxylfawcettimine (-10.2 kcal/mol), huperzin U (-10.1 kcal/mol), huperzine *N*-oxide (-10.1 kcal/mol) và 4-epilycopodine (-10.1 kcal/mol) thể hiện ái lực liên kết cao (> 7 kcal/mol), chỉ đứng sau donepezil (-11.8 kcal/mol) và donepezil (ligand đồng kết tinh) (-11.9 kcal/mol). Những hợp chất này cho thấy khả năng liên kết mạnh với vị trí xúc tác của AChE, có thể tương tự hoặc gần với hiệu quả của donepezil - một chất ức chế AChE chuẩn được sử dụng lâm sàng. Đặc biệt, lycoposerramine U *N*-oxide và 8-acetoxylfawcettimine nổi bật với ái lực vượt trội so với nhiều hợp chất huperzine khác, cho thấy tiềm năng trở thành ứng viên thuốc mới. Các hợp chất này có thể tương tác hiệu quả với các vùng chính của AChE như vị trí xúc tác hoặc vùng ngoại biên thông qua liên kết hydrogen và tương tác kỵ nước.

Nhóm hợp chất huperzine và dẫn xuất

Các dẫn xuất huperzine như huperzine B (-9.8 kcal/mol), huperzine R (-9.8 kcal/mol), huperzine T (-9.8 kcal/mol), (-)-huperzine A (-9.5 kcal/mol), huperzine A (-9.3 kcal/mol), huperzine C (-8.9 kcal/mol) và huperzine W (-8.3 kcal/mol) cho thấy ái lực liên kết tốt nhưng thấp hơn donepezil. Trong số này, huperzine B, R và T có ái lực cao hơn so với huperzine A, một hợp chất đã được nghiên cứu rộng rãi nhờ khả năng ức chế AChE và tiềm năng bảo vệ thần kinh. Sự khác biệt về ái lực trong nhóm huperzine có thể liên quan đến các sửa đổi cấu trúc hóa học chẳng hạn như sự hiện diện của nhóm *N*-oxide hoặc các nhóm chức khác, làm tăng hoặc giảm khả năng tương tác với các vùng liên kết của AChE. Ví dụ, huperzine *N*-oxide (-10.1 kcal/mol) có ái lực cao hơn đáng kể so với huperzine (-9.5 kcal/mol) cho thấy nhóm *N*-oxide có thể tăng cường tương tác với enzym.

Bảng 3. Ái lực liên kết của các hoạt chất trong Thạch tùng vảy trên AChE

STT	Phytocompound	Ái lực liên kết AChE (kcal/mol)
1	Lycoposerramine U <i>N</i> -oxide	-10.4
2	8-Acetoxylfawcettimine	-10.2
3	Huperzin U	-10.1
4	Huperzine <i>N</i> -oxide	-10.1

STT	Phytocompound	Ái lực liên kết AChE (kcal/mol)
5	4-Epilycopodine	-10.1
6	8,15-dihydrohuperzine A	-9.8
7	Huperzine B	-9.8
8	Huperzine R	-9.8
9	Huperzine T	-9.8
10	Lycoflexine <i>N</i> -oxide	-9.8
11	Lycoflexine	-9.7
12	Fawcettidine	-9.6
13	(-)-Huperzine A	-9.5
14	Huperzine	-9.5
15	12-Epilycodine <i>N</i> -oxide	-9.4
16	Phlegmariurine B	-9.4
17	8-Hydroxyphlegmariurine B	-9.4
18	Huperzine A	-9.3
19	Fawcettimine	-9.3
20	8-Hydroxyfawcettimine	-9.3
21	Lycosquarosine A	-9.2
22	Huperzine C	-8.9
23	8,15-Dihydrohuperzine	-8.9
24	Lycoposerramine U	-8.7
25	Huperzine W	-8.3
26	Acetyllycoposerramine U	-8.2
27	Donepezil	-11.8
28	Donepezil (đích tác dụng)	-11.9
29	Rasagiline	-8.6



Hình 6. Vị trí tương tác của các ligand tiềm năng trên AChE

Nhóm hợp chất lycoposerramine, lycoflexine và fawcettimine

Các hợp chất như lycoposerramine U *N*-oxide (-10.4

kcal/mol), lycoflexine *N*-oxide (-9.8 kcal/mol), lycoflexine (-9.7 kcal/mol), fawcettidine (-9.6 kcal/mol), fawcettimine (-9.3 kcal/mol) và 8-hydroxyfawcettimine (-9.3 kcal/mol) cũng cho thấy ái lực liên kết đáng kể. Đặc biệt, lycoposerramine U *N*-oxide nổi bật với ái lực cao nhất trong số các hoạt chất thử nghiệm, gần tương đương với các dẫn xuất huperzine tốt nhất. Tuy nhiên, lycoposerramine U (-8.7 kcal/mol) và acetyllycoposerramine U (-8.2 kcal/mol) có ái lực thấp hơn đáng kể, cho thấy sự acetyl hóa hoặc thiếu nhóm *N*-oxide có thể làm giảm khả năng liên kết. Tương tự, fawcettimine và 8-hydroxyfawcettimine có ái lực tương đương huperzine A nhưng 8-acetoxylfawcettimine (-10.2 kcal/mol) lại vượt trội cho thấy nhóm acetoxyl có thể cải thiện tương tác với AChE.

So sánh với thuốc đối chiếu

Donepezil (-11.8 kcal/mol) và donepezil (đích tác dụng) (-11.9 kcal/mol) là các hợp chất có ái lực liên kết cao nhất và đã chứng minh tiềm năng như chất ức chế AChE chuẩn trong điều trị Alzheimer. Trong khi đó, rasagiline (-8.6 kcal/mol) là một chất ức chế monoamine oxidase B (MAO-B), có ái lực thấp hơn đáng kể với AChE, điều này phù hợp với cơ chế tác động chính của thuốc này không nhắm vào AChE. Các hoạt chất như lycoposerramine U *N*-oxide và 8-

acetoxylfawcettimine với ái lực gần với donepezil, cho thấy tiềm năng cạnh tranh trong các nghiên cứu phát triển thuốc, đặc biệt nếu các hoạt chất này có thêm các đặc tính như khả năng chống oxy hóa hoặc tương tác với các mục tiêu bệnh lý khác.

Tiềm năng của các hoạt chất HS

Các hợp chất như lycoposerramine U *N*-oxide, 8-acetoxylfawcettimine và huperzin U có ái lực liên kết cao, cho thấy chúng là ứng viên tiềm năng để phát triển thành chất ức chế AChE mới. Những hợp chất này có thể mang lại lợi ích tương tự hoặc vượt trội so với huperzine A, vốn đã được nghiên cứu rộng rãi nhờ nguồn gốc tự nhiên và khả năng xuyên qua hàng rào máu não. Việc khám phá các hoạt chất thực vật (phytocompound) có ái lực cao cũng mở ra cơ hội phát triển các liệu pháp dựa trên hợp chất tự nhiên, có thể ít gây tác dụng phụ hơn so với các thuốc tổng hợp.

Vị trí tương tác của các ligand tiềm năng (lycoposerramine U *N*-oxide, 8-acetoxylfawcettimine, huperzin U, huperzinine *N*-oxide và 4-epilycopodine) trên AChE được thể hiện ở Hình 6.

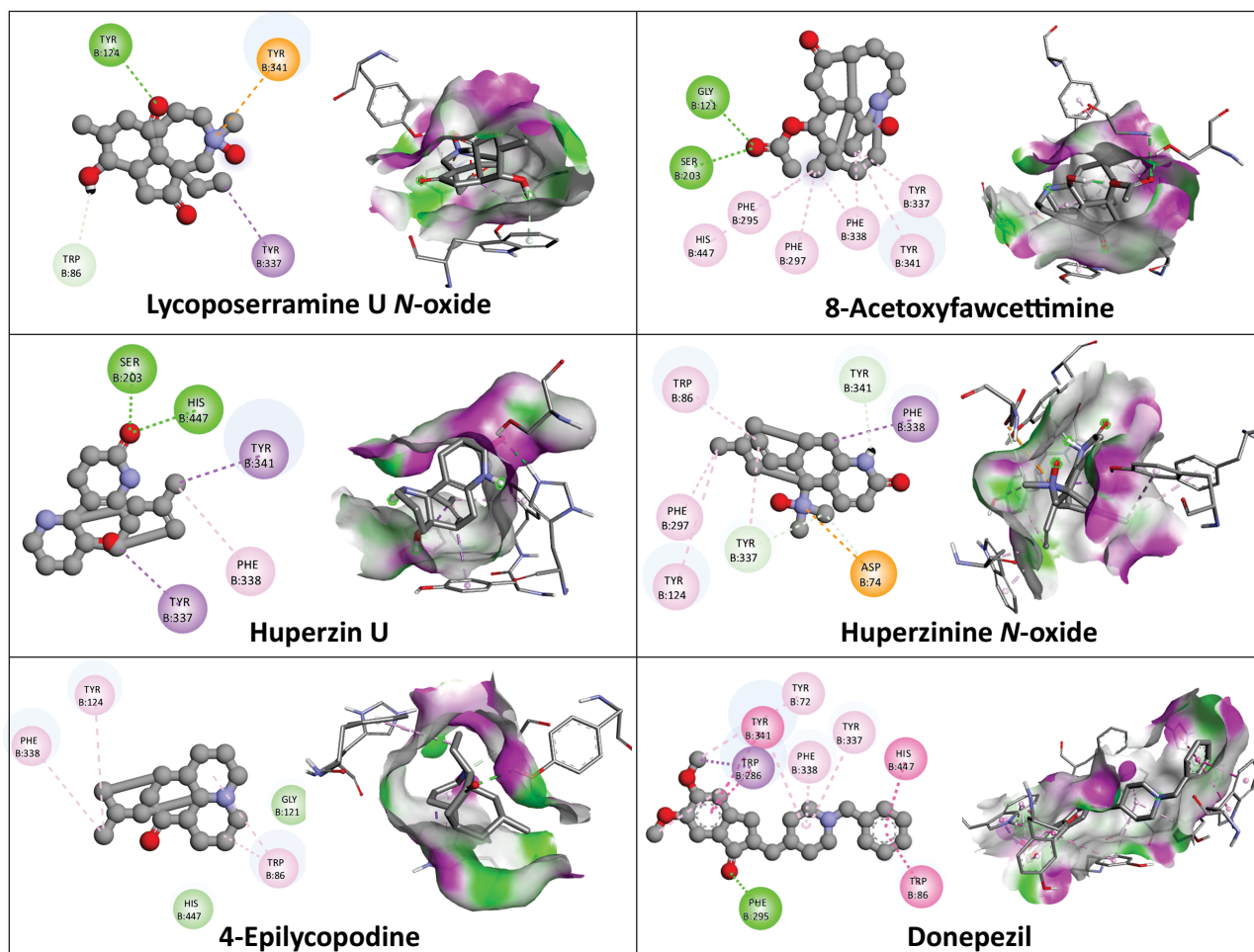
Các loại tương tác cụ thể của hoạt chất tiềm năng và thuốc đối chiếu với AChE được thể hiện ở Bảng 4 và Hình 7.

Bảng 4. Tương tác của hoạt chất tiềm năng và thuốc đối chiếu với AChE

Ligand	Ái lực (Kcal/mol)	Độ dài (Å)	Kiểu	Loại	AA
Lycoposerramine U <i>N</i> -oxide	-10.4	2.58	Hydrogen	Hydrogen mạnh	TYR124
		3.81	Tĩnh điện	π -Cation	TYR341
		2.79	Hydrogen	π -Donor hydrogen	TRP86
		3.88	Kỵ nước	π - σ	TYR337
8-Acetoxy fawcettimine	-10.2	2.70	Hydrogen	Hydrogen mạnh	GLY121
		2.43	Hydrogen	Hydrogen mạnh	SER203
		4.78	Kỵ nước	π -Alkyl	PHE295
		4.54	Kỵ nước	π -Alkyl	PHE297
		4.45	Kỵ nước	π -Alkyl	TYR337
		4.85	Kỵ nước	π -Alkyl	PHE338
		4.14	Kỵ nước	π -Alkyl	PHE338
		4.81	Kỵ nước	π -Alkyl	TYR341
		4.95	Kỵ nước	π -Alkyl	HIS447
Huperzin U	-10.1	2.02	Hydrogen	Hydrogen mạnh	SER203
		2.40	Hydrogen	Hydrogen mạnh	HIS447

Ligand	Ái lực (Kcal/mol)	Độ dài (Å)	Kiểu	Loại	AA
Huperzin U	-10.1	3.36	Kỵ nước	π - σ	TYR337
		3.39	Kỵ nước	π - σ	TYR341
		4.68	Kỵ nước	π -Alkyl	PHE338
Huperzine N-oxide	-10.1	4.28	Tĩnh điện	Lực hút	ASP74
		3.68	Hydrogen	Carbon-hydrogen	ASP74
		3.42	Hydrogen	Carbon-hydrogen	TYR337
		2.70	Hydrogen	π -Donor hydrogen	TYR341
		3.79	Kỵ nước	π - σ	PHE338
		3.68	Kỵ nước	π -Alkyl	TRP86
		3.77	Kỵ nước	π -Alkyl	TRP86
		5.49	Kỵ nước	π -Alkyl	TYR124
		5.09	Kỵ nước	π -Alkyl	PHE297
		4.56	Kỵ nước	π -Alkyl	TYR337
4-Epilycopodine	-10.1	2.16	Hydrogen	Hydrogen mạnh	TYR124
		3.60	Hydrogen	Carbon-hydrogen	GLY121
		3.45	Kỵ nước	π - σ	TRP86
		4.07	Kỵ nước	π -Alkyl	TRP86
		5.45	Kỵ nước	π -Alkyl	PHE338
		4.80	Kỵ nước	π -Alkyl	HIS447
Donepezil	-11.8	1.80	Hydrogen	Hydrogen mạnh	PHE295
		3.69	Kỵ nước	π - σ	TRP286
		4.25	Kỵ nước	π - π Stacked	TRP86
		3.66	Kỵ nước	π - π Stacked	TRP86
		5.45	Kỵ nước	π - π Stacked	TRP286
		4.12	Kỵ nước	π - π Stacked	TRP286
		5.06	Kỵ nước	π - π Stacked	TYR341
		5.47	Kỵ nước	π - π Stacked	HIS447
		4.52	Kỵ nước	π -Alkyl	TYR72
		5.10	Kỵ nước	π -Alkyl	TRP286
		4.06	Kỵ nước	π -Alkyl	TRP286
		5.16	Kỵ nước	π -Alkyl	TYR337
		5.39	Kỵ nước	π -Alkyl	PHE338
		4.98	Kỵ nước	π -Alkyl	TYR341

AA - acid amin, Tương tác kỵ nước (π - σ , π - π stacked, amide- π stacked, alkyl, π -alkyl)



Hình 7. Mô hình 2D và 3D về sự tương tác của các hợp chất tiềm năng và Donepezil với AChE

4. BÀN LUẬN

Lycoposerramine U *N*-oxide, 8-acetoxyfawcettimine, huperzin U, huperzine *N*-oxide và 4-epilycopodine có ái lực liên kết cao dao động từ -10.1 đến -10.4 kcal/mol, tuy thấp hơn donepezil (-11.8 kcal/mol) nhưng vẫn thể hiện tương tác mạnh với vị trí tác động của AChE. Lycoposerramine U *N*-oxide (-10.4 kcal/mol) hình thành ba liên kết chính gồm hai liên kết hydrogen mạnh với TYR124 (2.58 Å) và TRP86 (2.79 Å, π -donor hydrogen) cùng một liên kết tĩnh điện π -cation với TYR341 (3.81 Å), kết hợp với tương tác kỵ nước π - σ tại TYR337 (3.88 Å). 8-acetoxyfawcettimine (-10.2 kcal/mol) tạo hai liên kết hydrogen mạnh với GLY121 (2.70 Å) và SER203 (2.43 Å) cùng sáu tương tác kỵ nước π -Alkyl với các gốc PHE295, PHE297, TYR337, PHE338, TYR341 và HIS447 (4.14 - 4.95 Å), thể hiện mạng lưới tương tác đa dạng và ổn định. Huperzin U và 4-epilycopodine (-10.1 kcal/mol) cũng hình thành các liên kết hydrogen mạnh với SER203 (2.02 Å), HIS447 (2.40 Å) hoặc TYR124 (2.16 Å) và tương tác kỵ nước với TRP86, TYR337, PHE338 và HIS447. Huperzine *N*-oxide (-10.1 kcal/mol) nổi bật với liên kết tĩnh điện (lực

hút) tại ASP74 (4.28 Å), hai liên kết carbon-hydrogen với ASP74 (3.68 Å) và TYR337 (3.42 Å), một liên kết π -donor hydrogen với TYR341 (2.70 Å) và năm tương tác kỵ nước với TRP86, TYR124, PHE297, TYR337 và PHE338 (3.68 - 5.49 Å). Trong khi đó, donepezil tạo một liên kết hydrogen mạnh với PHE295 (1.80 Å) và mười một tương tác kỵ nước chủ yếu là π - π Stacked với TRP86, TRP286, TYR341, HIS447 và π -alkyl với TYR72, TRP286, TYR337, PHE338, TYR341 (4.06-5.47 Å), cho thấy sự ổn định vượt trội nhờ mạng lưới tương tác đa dạng. Các hợp chất từ *Huperzia squarrosa* tuy có ái lực thấp hơn nhưng vẫn cho thấy tiềm năng ức chế AChE thông qua sự đa dạng của liên kết hydrogen, tĩnh điện và kỵ nước, đặc biệt với các gốc acid amin quan trọng như TRP86, TYR337 và TYR341 tương tự như donepezil.

So sánh với nghiên cứu tương tự, các hợp chất tiềm năng nhất của HS đều thể hiện ái lực cao khoảng từ -10 đến -11 kcal/mol tương tự nghiên cứu hiện tại [10], cho thấy khả năng tương tác mạnh với vị trí xúc tác của AChE. Tuy nhiên, sự khác biệt đáng kể nằm ở nguồn gốc enzyme khi nghiên cứu đã công bố sử dụng mô hình từ cá đuối điện

(*Tetronarce californica*, PDB: 1EVE), vốn có cấu trúc tương đồng nhưng không hoàn toàn giống với enzyme người, dẫn đến sự biến thiên trong ái lực liên kết (phạm vi -5.9 đến -10.9 kcal/mol với 15 hợp chất) và hoạt chất tiềm năng nhất gồm lycoflexine *N*-oxide (-10.9 kcal/mol), huperzine B (-10.2 kcal/mol) và phlegmariurine B (-10.2 kcal/mol), trong khi đó, nghiên cứu hiện tại thực hiện trên enzyme người (*Homo sapiens*, PDB: 7E3H) mang tính liên quan lâm sàng cao hơn và các hợp chất này chỉ thể hiện ái lực liên kết khoảng -9.4 đến 9.8 kcal/mol.

Tóm lại, so sánh với donepezil, các hợp chất từ *Huperzia squarrosa* có ái lực liên kết thấp hơn nhưng vẫn thể hiện tiềm năng đáng kể nhờ các tương tác đa dạng. Donepezil vượt trội nhờ mạng lưới 11 tương tác kỵ nước, đặc biệt là các liên kết π - π Stacked với TRP86 và TRP286, cùng một liên kết hydrogen mạnh với PHE295 (1.80 Å), đảm bảo sự ổn định cao trong vị trí tác động của AChE. Trong khi đó, lycoposerramine U *N*-oxide và huperzine *N*-oxide tận dụng các liên kết tĩnh điện (π -cation và lực hút) để tăng cường tương tác, còn 8-acetoxylfawcettimine và 4-epilycopodine dựa vào số lượng lớn tương tác kỵ nước π -alkyl để ổn định phức hợp. Các hợp chất này tương tác mạnh với TRP86 và TYR337, hai gốc acid amin quan trọng

trong vị trí tác động của AChE tương tự như donepezil, đã cho thấy khả năng ức chế enzyme bổ sung hoặc thay thế. Những phát hiện này nhấn mạnh tiềm năng của *Huperzia squarrosa* trong việc cung cấp các hợp chất tự nhiên để phát triển liệu pháp điều trị bệnh Alzheimer.

5. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã tiến hành sàng lọc các hoạt chất trong cao chiết thạch tùng vảy và xác định 26 hoạt chất có tiềm năng hoạt tính ức chế AChE. Các hợp chất như lycoposerramine U *N*-oxide, 8-acetoxylfawcettimine và huperzin U có ái lực liên kết cao, cho thấy các hợp chất này là ứng viên tiềm năng để phát triển thành chất ức chế AChE mới. Ngoài ra, các hợp chất huperzine *N*-oxide, 4-epilycopodine và 8,15-dihydrohuperzine A cũng thể hiện ái lực tốt (> 10 kcal/mol) với AChE. Những hợp chất này có thể mang lại lợi ích tương tự hoặc vượt trội so với huperzine A, vốn đã được nghiên cứu rộng rãi nhờ nguồn gốc tự nhiên và khả năng xuyên qua hàng rào máu não.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được Trường Đại học Quốc tế Hồng Bàng cấp kinh phí thực hiện dưới mã số đề tài GVTC18.42.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] G. Ezio, "Cholinergic function and Alzheimer's disease," *International journal of geriatric psychiatry*, vol. 18(S1), pp. S1-S5, 2003.
- [2] S. Anukanon, P. Pongpamorn, W. Tiyaibhorn, J. Chatwichien, W. Niwetmarin, R.B. Sessions, S. Ruchirawat, N. Thasana, "In Silico-guided rational drug design and semi-synthesis of C(2)-functionalized Huperzine a derivatives as acetylcholinesterase inhibitors," *ACS Omega*, vol. 6(30), pp. 19924-19939, 2021.
- [3] Y. Ashani, J.O. Peggins, B.P. Doctor, "Mechanism of inhibition of cholinesterases by huperzine A," *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 184(2), pp. 719-726, 1992.
- [4] DL. Bai, XC. Tang, XC. He, "Huperzine A, a potential therapeutic agent for treatment of Alzheimer's disease," *Current Medicinal Chemistry*, vol. 7(3), pp. 355-374, 2000.
- [7] A.I. Calderón, J. Simithy-Williams, R. Sanchez, A. Espinosa, I. Valdespino, M.P. Gupta, "Lycopodiaceae from Panama: a new source of

- acetylcholinesterase inhibitors," *Nat Prod Res.*, vol. 27(4-5), pp. 500-505, 2013.
- [6] B.R. Coleman, R.H. Ratcliffe, S.A. Oguntayo, X. Shi, D.P. Doctor, R.K. Gordon, M.P. Nambiar, "[+]-Huperzine A treatment protects against *N*-methyl-D-aspartate-induced seizure/status epilepticus in rats," *Chemico-biological interactions*, vol. 175(1-3), pp. 387-395, 2008.
- [7] D.R. Alicia, J.J. Gickas, K.C. Dunican, "Role of huperzine a in the treatment of Alzheimer's disease," *Annals of Pharmacotherapy*, vol. 43(3), pp. 514-518, 2009.
- [8] E. Saskia, P. Eyer, F. Worek, "Reversible inhibition of acetylcholinesterase by carbamates or huperzine A increases residual activity of the enzyme upon soman challenge," *Toxicology*, vol. 233(1-3), pp. 180-186, 2007.
- [9] H.E. Steinunn, J.W. Jaroszewski, E.S. Olafsdottir, "Acetylcholinesterase inhibitory activity of lycopodane-type alkaloids from the Icelandic *Lycopodium annotinum* ssp. *Alpestre*,"

Phytochemistry, vol. 71(2-3), pp. 149-157, 2010.

[10] B.T. Tung, T.T.T. Hang, N.B. Kim, N.H. Nhung, V.K. Linh, D.K. Thu, "Molecular docking and molecular dynamics approach to identify potential compounds in *Huperzia squarrosa* for treating Alzheimer's disease," *J Complement Integr Med.*, vol. 19(4), pp. 955-965, 2022.

[11] N.N. Chuong, N.T.T. Huong, T.M. Hung, T.C. Luan, "Anti-cholinesterase activity of *lycopodium* alkaloids from Vietnamese *Huperzia squarrosa* (Forst.) Trevis," *Molecules*, vol. 19(11), pp. 19172-19179, 2014.

[12] H. Cao, T.T. Chai, X. Wang, M.F.B. Morais-Braga, J.H. Yang, F.C.. Wong, R Wang, H. Yao, J. Cao, L. Cornara, B. Burlando, Y. Wang, J. Xiao, H.D.M. Coutinho, "Phytochemicals from fern species: potential for medicine applications," *Phytochem*

Rev., vol. 16(3), pp. 379-440, 2017.

[13] B.T. Tung, N.T. Hai, D.K. Thu, "Antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities *in vitro* of different fraction of *Huperzia squarrosa* (Forst.) Trevis extract and attenuation of scopolamine-induced cognitive impairment in mice," *J Ethnopharmacol.*, vol. 198, pp. 24-32, 2017.

[14] E. C. Pham, B.N.T. Le, A.M. Ngo, L.B. Vong, T.N. Truong, "Symmetrical di-substituted phenylamino-s-triazine derivatives as anticancer agents: *in vitro* and *in silico* approach," *RSC Adv.*, vol. 15(13), pp. 9968-9984, 2025. DOI: 10.1039/d4ra08508f.

[15] E. Ca Pham, H.H.L. Hong, "Anticancer activity of phytochemicals of black ginger (*Kaempferia parviflora* Wall. Ex Baker): *In silico* approach," *Chemical Physics Impact*, vol. 11, p. 100903, 2025. DOI: 10.1016/j.chphi.2025.100903.

Evaluation of *in silico* acetylcholinesterase inhibitory activity of phytochemicals from *Huperzia squarrosa* Forst.

Ho Thi Thach Thuy, Vo Thi Bich Ngoc, Ly Hong Huong Ha, Pham Canh Em

ABSTRACT

Background: *Huperzia squarrosa* (Lycopodiaceae) is a valuable source of bioactive compounds with potential neuroprotective effects for memory enhancement. **Objectives:** This study aimed to screen bioactive compounds from *Huperzia squarrosa* for AChE inhibitory activity, evaluating their binding affinities and molecular interactions compared to donepezil. **Methods:** *In silico* docking screened 26 compounds from *Huperzia squarrosa* for interactions with AChE, analyzing binding affinities and interaction types (hydrogen bonds, electrostatic, hydrophobic) compared to donepezil. **Results:** Lycoposerramine U N-oxide (-10.4 kcal/mol), 8-acetoxylawcettimine (-10.2 kcal/mol), huperzin U, huperzine N-oxide, 4-epilycopodine, and 8,15-dihydrohuperzine A (-10.1 kcal/mol) showed robust binding affinity against AChE, though less than donepezil (-11.8 kcal/mol). Lycoposerramine U N-oxide formed hydrogen bonds with TYR124 (2.58 Å) and TRP86 (2.79 Å), a π -cation interaction with TYR341 (3.81 Å), and π - σ with TYR337 (3.88 Å). 8-Acetoxylawcettimine exhibited hydrogen bonds with GLY121 (2.70 Å) and SER203 (2.43 Å), and six π -alkyl interactions (4.1-4.95 Å). Huperzine N-oxide showed electrostatic interaction with ASP74 (4.28 Å) and five hydrophobic interactions (3.68-5.49 Å). *Huperzia* compounds targeted key residues TRP86 and TYR337, similar to donepezil. **Conclusion:** Lycoposerramine U N-oxide and 8-acetoxylawcettimine are promising AChE inhibitors, warranting further *in vitro* and *in vivo* studies for Alzheimer's therapy development.

Keywords: *Huperzia squarrosa*, *in silico*, anti-acetylcholinesterase

Received: 10/7/2025

Revised: 19/9/2025

Accepted for publication: 15/10/2025