

SÀNG LỌC TÁC DỤNG KHÁNG VIRUS SARS-COV-2 CỦA CÁC FLAVONOID TỪ DƯỢC LIỆU BẰNG DOCKING PHÂN TỬ

Ngô Thị Quỳnh Mai¹, Lê Thị Yên¹,
Trần Thị Ngân¹, Nguyễn Thị Thu Phương¹

TÓM TẮT

SARS-CoV-2 hay các bệnh do CoV gây ra vẫn thu hút sự quan tâm nghiên cứu của các nhà khoa học. Các hợp chất tự nhiên là nguồn nguyên liệu phong phú cho việc tìm kiếm các chất dẫn đường. Trong nghiên cứu này, 30 flavonoid chính từ dược liệu đã được sàng lọc tác dụng ức chế SARS-CoV-2 thông qua main protease và enzym chuyển dạng chuyển Angiotensin 2 bằng docking phân tử sử dụng phần mềm Autodock Vina. Kết quả cho thấy 30 flavonoid đều có khả năng ức chế protein Mpro của SARS-CoV-2 và thụ thể ACE2 người. Trong đó, các hợp chất thể hiện khả năng liên kết mạnh nhất là: rutin, quercetin 3-O-rhamnoside, cyanidin 3-sophoroside, silibinin A, silibinin B. Rutin có khả năng liên kết mạnh nhất với cả Mpro và ACE2 với năng lượng liên kết lần lượt là -8.6 và -10.9 kcal/mol. Với tác dụng ức chế virus cùng sự sẵn có về nguồn cung cấp dược liệu, các flavonoid này có thể là các chất dẫn đường tiềm năng để nghiên cứu các thuốc điều trị SARS-CoV-2.

Từ khóa: docking phân tử, flavonoid, SARS-CoV-2

SUMMARY

SCREENING FOR SARS-COV-2 INHIBITORS OF FLAVONOIDS FROM HERBS USING MOLECULAR DOCKING

SARS-CoV-2 or other diseases caused by CoV still attract the research interest of scientists. Natural compounds are a rich source of raw materials for the search for guides. In this study, 30 main flavonoids from medicinal plants were screened for their inhibitory effect on SARS-CoV-2 through main protease and Angiotensin 2 converting enzyme by molecular docking using Autodock Vina software. The results showed that all 30 flavonoids could inhibit the Mpro protein of SARS-CoV-2 and the human ACE2 receptor. Among them, the compounds showing the strongest binding ability are: rutin, quercetin 3-O-rhamnoside, cyanidin 3-sophoroside, silibinin A, silibinin B. Rutin has the strongest binding ability with both Mpro and ACE2 with binding energies are -8.6 and -10.9 kcal/mol, respectively. With their virus-inhibiting effects and the availability of medicinal supplies, these flavonoids could be potential leads for researching drugs to treat SARS-CoV-2.

Keywords: molecular docking, flavonoid, SARS-CoV-2

¹Khoa Dược học, Trường Đại học Y Dược Hải Phòng

Chịu trách nhiệm chính: Ngô Thị Quỳnh Mai
Email: ntqmai@hpmu.edu.vn
Ngày nhận bài: 28/2/2024
Ngày phản biện khoa học: 4/3/2024
Ngày duyệt bài: 19/4/2024

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

SARS-CoV-2, hay còn được gọi là 2019-nCoV, là virus gây bệnh COVID 19. Virus này lần đầu tiên được xác định trong đường hô hấp của những bệnh nhân viêm phổi ở Vũ

Hán, Hồ Bắc, Trung Quốc vào tháng 12 năm 2019, sau đó được xác định là một loại β -coronavirus mới (nCoV) [1]. Các mục tiêu tiềm năng của các thuốc điều trị SARS-CoV-2 là spike protein (S), main protease (Mpro), ARN polymerase phụ thuộc ARN, và enzym chuyển Angiotensin 2 (ACE2) [2]. Trong đó, Mpro là một loại enzyme quan trọng hoạt động phối hợp với các thành phần khác để giúp sao chép và phiên mã RNA của virus, cũng là mục tiêu được nghiên cứu nhiều nhất đối với các loại thuốc kháng CoV [3]. ACE2, một protein liên kết màng loại I, được biểu hiện ở nhiều mô bao gồm tim, thận, ruột, phổi [4]. ACE2 được cho là có liên quan đến sự nhân lên của virus, tạo điều kiện thuận lợi cho sự nhân lên của coronavirus trong phổi, giải thích nguyên nhân gây tổn thương thận, suy tim và tổn thương gan ở bệnh nhân nhiễm COVID-19 [5].

Flavonoid là một nhóm các sản phẩm tự nhiên có cấu trúc polyphenol, có mặt trong nhiều dược liệu y học cổ truyền và các dạng thuốc bào chế hiện đại. Một số flavonoid đã được chứng minh có tác dụng ức chế chống lại coronavirus bằng cách liên kết với các mục tiêu virus quan trọng trong quá trình xâm nhập và/hoặc nhân lên của virus, cũng như hoạt động điều hòa miễn dịch và chống viêm. Do đó đây được coi là một nhóm hoạt chất tiềm năng cho phát triển các thuốc điều trị [6]. Tuy nhiên, do số lượng lớn các chất cần nghiên cứu, kỹ thuật docking phân tử là một công cụ quan trọng có thể cải thiện đáng kể hiệu quả và giảm chi phí trong việc nghiên cứu thuốc mới [7].

Vì những lý do trên, đề tài “Sàng lọc tác dụng kháng virus SARS-COV-2 của các flavonoid từ dược liệu bằng docking phân tử” được thực hiện với mục tiêu sàng lọc tác dụng kháng virus SARS-COV-2 của 30

flavonoid phổ biến từ dược liệu bằng docking phân tử.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

30 flavonoid chính trong các dược liệu thuộc Danh mục dược liệu thiết yếu (Thông tư số 19/2018/TT-BYT ngày 30/8/2018). Từ các dược liệu thuộc Danh mục thuốc thiết yếu, lựa chọn các cây thuốc có flavonoid là thành phần chính, xác định flavonoid chính trong các dược liệu đã tìm được.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Mô phỏng tương tác của các flavonoid với các protein mục tiêu bằng docking phân tử với phần mềm Vinadock để đánh giá khả năng ức chế hoạt động của virus thông qua các protein này. Sử dụng các phần mềm sau: ChemBio3D 14.0, Discovery Studio 2021 Client (<http://mglttools.scripps.edu/downloads>), MGLTools - 1.5.7 (<http://mglttools.scripps.edu/downloads>), Autodock Vina 4.2 (<https://vina.scripps.edu/downloads/>).

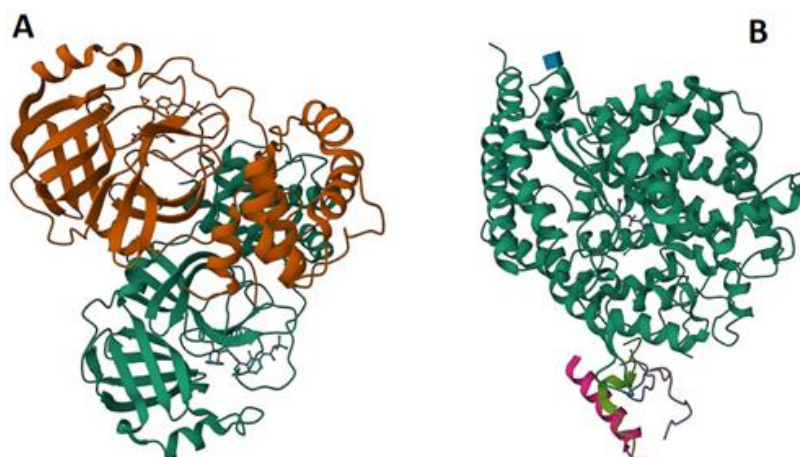
Các bước tiến hành như sau:

Bước 1. Chuẩn bị phối tử bằng phần mềm Discovery Studio 2021 Client và lưu file dưới dạng pdbqt. Cấu trúc của 3D 30 flavonoid (Apigenin, Baicalein, Brazilin, Carthamidin, Chrysin, Cyanidin, Cyanidin 3_sophorosit, Hesperetin, Homoplantagin, Hyperin, Kaempferol, Luteolin, Mulberrin, Myricetin, Oroxylin A, Puerarin, Quercetin, Quercetin 3_O_rhamnoside, Rhamnocitrin, Rutin, Scutellarein, Silibinin A, Silibinin B, Silicristin, Sinensetin, Tangeretin, Tectoridin, Tectorigenin, Vitexin, Wogonin) được tải về từ PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Bước 2. Cấu trúc X-ray của Mpro (6Y2G) và enzyme chuyển ACE2 (1R4L)

được lấy từ ngân hàng dữ liệu protein (protein data bank: <https://www.rcsb.org>) Chuẩn bị protein bằng phần mềm Discovery

Studio 2021 Client và Autodock Vina, thêm hydrogen vào protein, lưu dưới dạng pdbqt.



Hình 1. Cấu trúc 3D của (A) Mpro (6Y2G) và (B) enzyme chuyển ACE2 (1R4L)

Bước 3. Docking phân tử: Các tệp .pdbqt của protein và phối tử được sử dụng để thực hiện docking. Vị trí liên kết được xác định bởi một hình hộp chữ nhật 3 chiều (gridbox). Do 2 protein 6Y2G và 1R4L đã có phối tử liên kết sẵn, tọa độ hộp lưới được đặt trung tâm (center) tại vị trí của phối tử ban đầu và điều chỉnh kích thước để bao phủ hoàn toàn phối tử. Thực hiện docking bằng phần mềm Autodock Vina. Năng lượng và vị trí liên kết được tính toán và sử dụng để đánh giá độ bền liên kết giữa protein-phối tử.

Bước 4. Phân tích kết quả: Sau khi thu được năng lượng liên kết và vị trí gắn kết của phối tử - protein, biểu diễn hình ảnh tương tác bằng phần mềm Discovery Studio 2021 Client.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

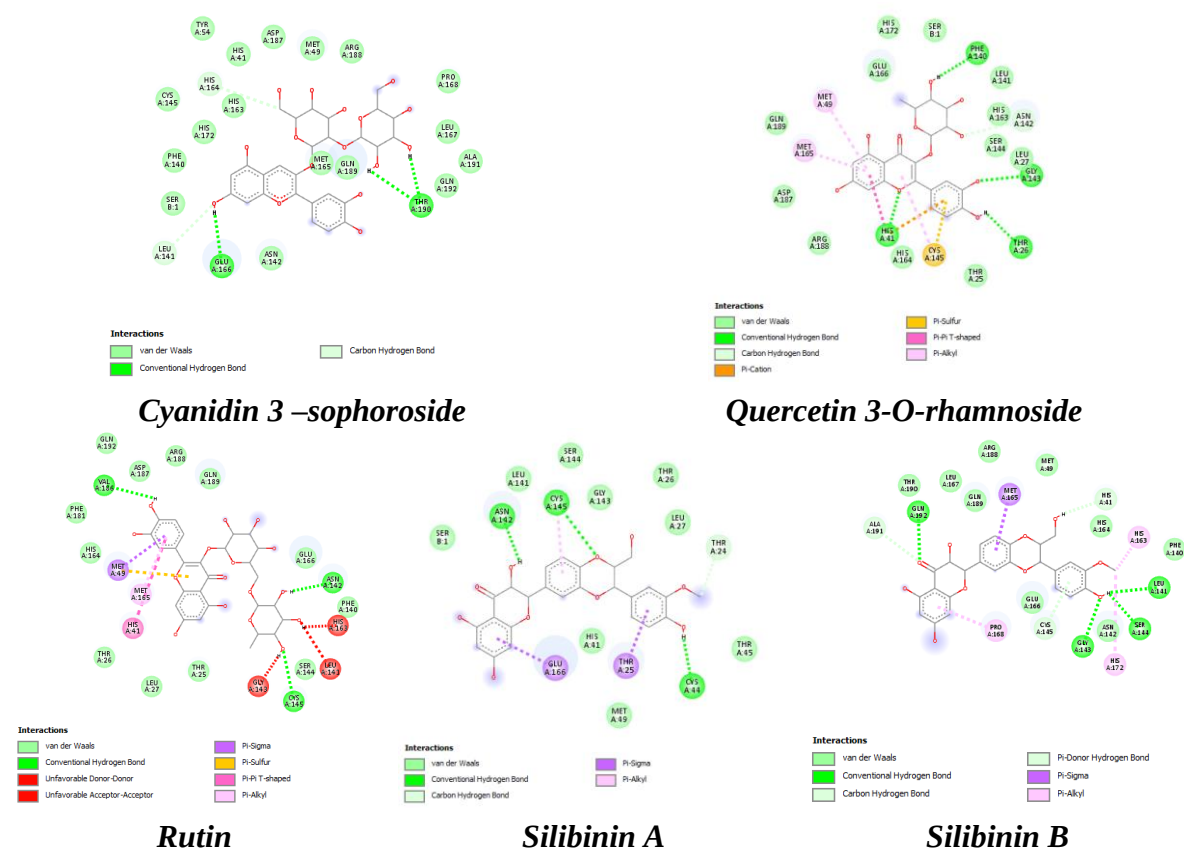
3.1. Kết quả docking phân tử của Mpro (6Y2G) với các flavonoid

Kết quả mô phỏng bằng docking phân tử cho thấy các flavonoid đều gắn vào vùng

hoạt động của Mpro (6Y2G) với năng lượng liên kết thấp, từ -6.5 kcal/mol với wogonin đến -8.6 kcal/mol với rutin. Các hợp chất có năng lượng liên kết thấp nhất lần lượt là: rutin (-8.6 kcal/mol), homoplantagin (-8.5 kcal/mol), quercetin 3-O-rhamnoside (-8.4 kcal/mol), vitexin (-8.3 kcal/mol), cyanidin 3-sophoroside (-8.1 kcal/mol), silibinin A (-8.1 kcal/mol), silibinin B (-8.1 kcal/mol). Một số chất có khả năng liên kết bền vững nhất trong số 30 flavonoid được phân tích hình ảnh tương tác với protein bằng phần mềm Discovery Studio 2021 Client. Kết quả cho thấy các flavonoid đều gắn vào vùng hoạt động của Mpro chủ yếu bằng các liên kết hydro, Van der Waals, carbon-hydrogen. Ngoài ra ở các trung tâm hoạt động còn có sự tham gia của các liên kết pi-carbon, pi-alkyl, pi-pi T shaped, pi-sigma... để giải phóng năng lượng và làm chặt hơn tương tác giữa ligand-enzym.

Bảng 1. Năng lượng liên kết của một số flavonoid với protein Mpro và ACE2

STT	Flavonoid	Mpro		ACE2	
		Năng lượng liên kết (kcal/mol)	Vị trí tương tác	Năng lượng liên kết (kcal/mol)	Vị trí tương tác
1	Cyanidin 3 -sophorosit	-8.1	GLU A:166, THR A:190	-10	HIS A:345, PRO A:346, HIS A:505, ARG A:273, ASP A:368
2	Homoplantagin	-8.5	ASN A:142, GLU A:166, CYS A:145, HIS: 163, HIS A:164, LEU A:141	-9.5	LYS A:363, ARG A:273
3	Mulberrin	-7.9	HIS A:41, GLU A:166, PHE A:140	-9	ASP A:368, THR A:371
4	Puerarin	-7.9	PHE A:140, GLU A:166	-9.2	GLU A:145, ASN A:149
5	Quercetin 3 -O-rhamnoside	-8.4	THR A:26, HIS A:41, PHE A:140	-10.1	ASN A:149, ARG A:273
6	Rutin	-8.6	ASN A:142, CYS A:145, VAL A:186	-10.9	LYS A:363, ASP A:367, ASN A:149, GLU A:145, ARG A:273, TYR A:515
7	Silibinin A	-8.1	CYS A:44, ASN A:142, CYS A:145	-10.3	LYS A:363, ARG A:518
8	Silibinin B	-8.1	GLY A:143, SER A:144, LEU A:141, GLN A:192	-10.7	LYS A:363, ASN A:149, ASP A:368, CYS A:361, THR A:371, GLN A:442
9	Silicristin	-7.8	ASN A:142, GLU A:166	-10	THR A:365, ASP A:269, ARG A:518, GLU A:145, HIS A:345, HIS A:505, ARG A:273
10	Vitexin	-8.3	SER A:144	-9.4	ASN A:149, LYS A:363

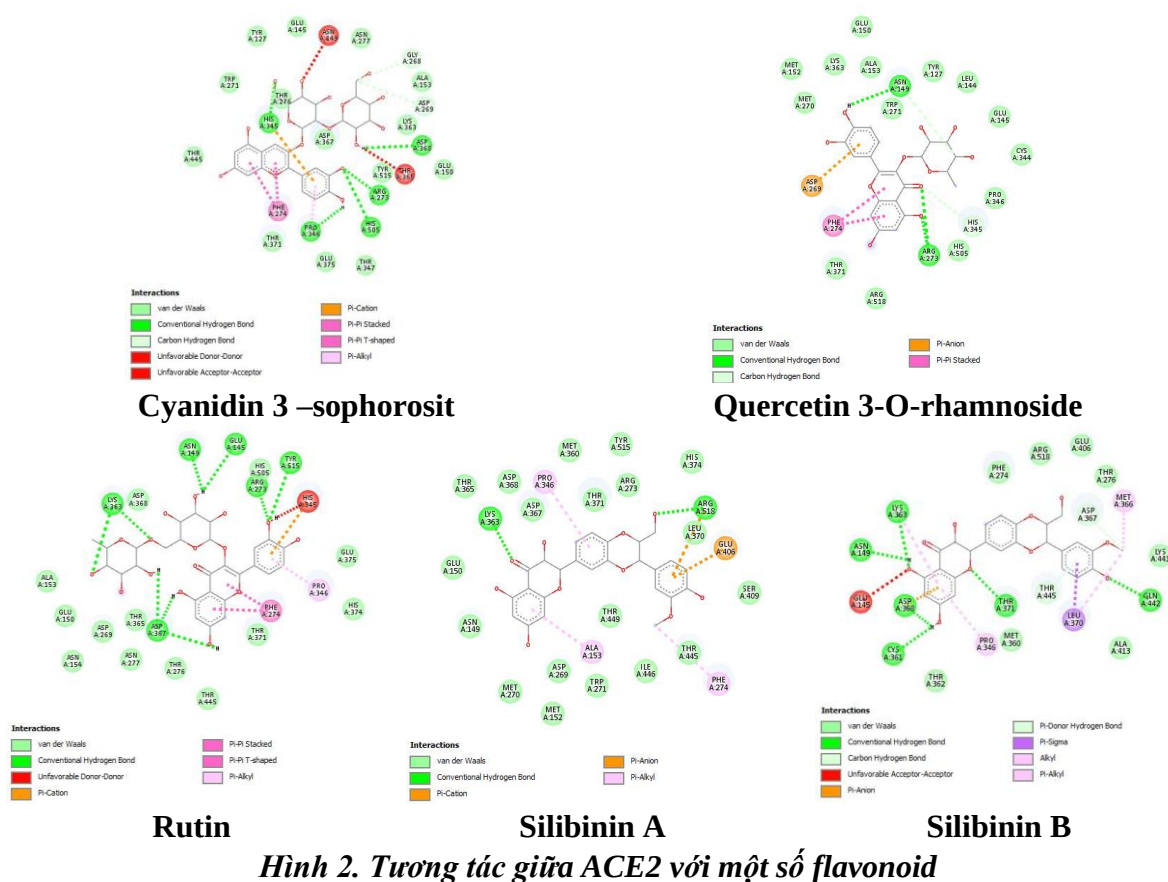


Hình 1. Tương tác giữa Mpro với một số flavonoid

3.2. Kết quả docking phân tử của ACE2 (1R4L) với các flavonoid

Kết quả từ Bảng 1 cho thấy năng lượng liên kết của ACE2 (1R4L) với các flavonoid nằm trong khoảng từ -8.2 (tangeretin) đến -10.9 (rutin), thấp hơn so với năng lượng liên kết với Mpro. Trong đó, 10 hợp chất cho năng lượng liên kết thấp nhất là: rutin (-10.9 kcal/mol), silibinin B (-10.7 kcal/mol), silibinin A (-10.3 kcal/mol), quercetin 3-O-rhamnoside (-10.1 kcal/mol), cyanidin 3-sophoroside (-10 kcal/mol), silicristin (-10 kcal/mol).

Từ 30 flavonoid ban đầu, lựa chọn 5 hợp chất có năng lượng liên kết thấp nhất, biểu diễn hình ảnh tương tác bằng phần mềm Discovery Studio 2021 Client. Qua Hình 3.4 về tương tác 2D giữa phối tử-protein, ta có thể thấy các hợp chất tương tác với các amino acid với nhiều loại liên kết khác nhau. Rutin là chất có năng lượng liên kết thấp nhất và đồng thời cũng có số lượng liên kết hydro cao nhất là 9 liên kết với các acid amin: LYS A:363, ASP A:367, ASN A:149, GLU A:145, ARG A:273, TYR A:515, ngoài ra còn có các liên kết van der Waals, Pi-Pi T shaped, Pi-Pi stacked, Pi-alkyl.



IV. BÀN LUẬN

4.1. Về mô hình docking

Kết quả docking bằng Autodock Vina cho thấy, các ligand đều có xu hướng gắn với các protein ở vị trí hoạt động. Vị trí gắn của các flavonoid với protein Mpro tại các acid amin PHE140, ASN142, CYS145, GLY143, SER144 [8] và ACE2 tại ARG273, HIS505, HIS345, PRO346, THR371, TYR515 [9] có sự tương đồng với các nghiên cứu đã công bố. Kết quả này cho thấy việc áp dụng phương pháp sàng lọc ảo bằng docking phân tử có khả năng ứng dụng để nghiên cứu tương tác giữa các chất trong ngân hàng các hợp chất tự nhiên hoặc tổng hợp với các protein này. Các phương pháp in silico có thể cho phép sàng lọc ảo hàng triệu

hợp chất trong thời gian ngắn, do đó giảm chi phí ban đầu cho việc xác định các hợp chất dẫn đường và cải thiện cơ hội tìm kiếm các ứng cử viên thuốc điều trị mong muốn [7]. Tuy nhiên, kết quả sàng lọc phụ thuộc vào chức năng tính toán của phần mềm docking. Bên cạnh đó, một protein có thể tồn tại trong chuyển động liên tục giữa các trạng thái hình dạng khác nhau, trong khi với các phần mềm docking, các thụ thể này luôn ở trạng thái cứng (rigid). Do đó, sẽ có sự khác biệt giữa mô phỏng và thực tế diễn ra trong cơ thể sinh vật [10]. Do đó, phương pháp sàng lọc in silico mặc dù có rất nhiều lợi thế nhưng không thể thay thế hoàn toàn cho các phương pháp thực nghiệm. Để phát triển một thuốc hoàn chỉnh cần tiến hành nhiều bước

nghiên cứu thực nghiệm cũng như nghiên cứu lâm sàng để đảm bảo tính an toàn cũng như hiệu quả điều trị.

4.2. Về kết quả tương tác flavonoid-protein

Kết quả cho thấy rằng tất cả các flavonoid trong nghiên cứu này đều liên kết với protein Mpro của virus và thụ thể ACE2 của con người ở một mức độ nào đó. Các phối tử đều gắn kết tại vị trí hoạt động của protein. Điều đó cho thấy rằng các flavonoid được nghiên cứu đều có tiềm năng trở thành các chất ức chế Mpro và ACE2 tốt. Có sự khác nhau về khả năng gắn kết giữa các phối tử, tuy nhiên cũng thấy sự tương đồng về mức độ liên kết của các flavonoid với 2 protein này khi các chất có liên kết bền vững với Mpro thì cũng liên kết bền vững với ACE2. Cả 5 chất có năng lượng liên kết với Mpro ≤ -8.0 kcal/mol thì cũng có năng lượng liên kết với ACE2 ≤ -10.0 kcal/mol. Các hợp chất thể hiện khả năng gắn kết tốt với cả hai protein là: cyanidin 3-sophorosit, quercetin 3-O-rhamnoside, rutin, silibinin A và silibinin B. Rutin thể hiện năng lượng liên kết thấp nhất với cả hai protein. Rutin cũng đã được chứng minh là thành phần quan trọng trong tác dụng ức chế sự nhân lên của virus của bài thuốc cổ truyền Trung Quốc Xuefu Zhuyu [11]. Silibinin, một flavonolignan từ cây Kế sữa (*Silybum marianum*) đã được chứng minh có khả năng giảm triệu chứng của các trường hợp mắc COVID nặng theo cơ chế hạn chế bão cytokin và giảm tế bào T thông qua con đường ức chế trực tiếp STAT3, chất chính điều chỉnh tín hiệu gây viêm và phản ứng miễn dịch [12].

Với khả năng ức chế cả hai protein, các flavonoid được lựa chọn nghiên cứu đã thể hiện hoạt động ức chế đa mục tiêu tiềm năng chống lại SARS-CoV-2 bằng cách liên kết với các mục tiêu virus thiết yếu cần thiết trong quá trình xâm nhập và nhân lên của virus. Các phối tử liên kết với Mpro làm ức chế khả năng tách polyprotein để tạo ra các protein không cấu trúc (Non-structure Protein, NSP), từ đó ngăn cản tạo thành phức hợp sao chép-phiên mã, ức chế sự nhân lên của virus. Bằng cách gắn với thụ thể ACE2, các hợp chất làm thay đổi/gián đoạn quá trình liên kết của protein S với thụ thể ACE2 ở miền liên kết (receptor-binding domain, RBD), ngăn cản sự xâm nhập và lây nhiễm của SARS-CoV-2. Các flavonoid trong nghiên cứu này đều là hoạt chất chính có trong các dược liệu Hòe hoa, Phúc bồn tử, Cốc tinh thảo, Diếp cá, Cúc gai, Kế sữa. Với tác dụng ức chế virus cùng với sự sẵn có về nguồn cung cấp dược liệu, flavonoid có thể là các chất dẫn đường tiềm năng để nghiên cứu các thuốc điều trị COVID 19.

V. KẾT LUẬN

Cả 30 flavonoid đều cho thấy khả năng ức chế với protein Mpro của SARS-CoV-2 và thụ thể ACE2 ở người. Trong đó, các hợp chất thể hiện khả năng liên kết mạnh nhất là: rutin, quercetin 3-O-rhamnoside, cyanidin 3-sophorosit, silibinin A, silibinin B.

VI. KIẾN NGHỊ

Thực hiện thêm các nghiên cứu in vitro và in vivo để làm sáng tỏ tác dụng của các hoạt chất đã sàng lọc trước khi tiến hành các thử nghiệm lâm sàng để phát triển các thuốc điều trị SARS-CoV-2.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Guo, Y.-R., et al.**, The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak—an update on the status. *Military medical research*, 2020. 7: p. 1-10.
2. **Zhou, P., et al.**, A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 2020. 579(7798): p. 270-273.
3. **Shamsi, A., et al.**, Potential drug targets of SARS-CoV-2: From genomics to therapeutics. *Int J Biol Macromol*, 2021. 177: p. 1-9.
4. **Basu, A., A. Sarkar, and U. Maulik**, Molecular docking study of potential phytochemicals and their effects on the complex of SARS-CoV2 spike protein and human ACE2. *Scientific Reports*, 2020. 10(1): p. 17699.
5. **Hoffmann, M., et al.**, SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *cell*, 2020. 181(2): p. 271-280. e8.
6. **Alzaabi, M.M., et al.**, Flavonoids are promising safe therapy against COVID-19. *Phytochemistry Reviews*, 2022. 21(1): p. 291-312.
7. **Fan, J., A. Fu, and L. Zhang**, Progress in molecular docking. *Quantitative Biology*, 2019. 7(2): p. 83-89.
8. **Sajid Jamal, Q.M., A.H. Alharbi, and V. Ahmad**, Identification of doxorubicin as a potential therapeutic against SARS-CoV-2 (COVID-19) protease: a molecular docking and dynamics simulation studies. *J Biomol Struct Dyn*, 2022. 40(17): p. 7960-7974.
9. **Towler, P., et al.**, ACE2 X-ray structures reveal a large hinge-bending motion important for inhibitor binding and catalysis. *J Biol Chem*, 2004. 279(17): p. 17996-8007.
10. **Liu, J. and R. Wang**, Classification of current scoring functions. *Journal of chemical information and modeling*, 2015. 55(3): p. 475-482.
11. **Xing, Y., et al.**, Traditional Chinese medicine network pharmacology study on exploring the mechanism of Xuebijing Injection in the treatment of coronavirus disease 2019. *Chin J Nat Med*, 2020. 18(12): p. 941-951.
12. **Speciale A., et al.**, Silibinin as potential tool against SARS-Cov-2: In silico spike receptor-binding domain and main protease molecular docking analysis, and in vitro endothelial protective effects. *Phytother Res*. 2021. 35(8):4616-4625.