国家项目点击

DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2025.11.006

根皮素对新型冠状病毒RNA聚合酶抑制活性的实验研究及类似物活性预测

邸琨[1],谢小华[2],赵田华[3],吴巧娜[1],王宇佳[4],苏彦雷[3],孙殿兴[3],岑山[4]
(1.石家庄市第三医院,河北 石家庄 050082;2.河北省人民医院,河北 石家庄 050051;
3.联勤保障部队第九八〇医院,河北 石家庄 050082;4.中国医学科学院,北京协和医学院医药生物技术研究所,北京 100050)

摘要:目的 探索根皮素对新型冠状病毒RNA聚合酶的抑制活性,并预测3种根皮素类似物小分子的靶酶抑制活性。方法 运用分子对接手段研究根皮素与RNA聚合酶活性位点处的结合模式;利用细胞水平的新型冠状病毒RNA聚合酶nsp7/nsp8/nsp12催化反应体系检测根皮素对RNA聚合酶的抑制活性。选择3种与根皮素结构类似的中药小分子进行靶酶抑制活性预测,应用分子对接方法研究它们与靶酶活性位点间的结合模式。结果 根皮素及其类似物均可较好地结合于RNA聚合酶的活性位点处,占据NTPs通道而阻碍核苷酸底物的进入,进而抑制RNA聚合酶主导的核酸复制。细胞水平上的抑制RNA聚合酶活性测试实验结果表明,根皮素对新型冠状病毒RNA聚合酶具有明显的抑制活性,虽然活性弱于瑞德西韦,但其细胞毒性亦低于瑞德西韦;同时,预测根皮素类似物亦可抑制RNA聚合酶而具有抗新型冠状病毒药理作用。结论 研究证实根皮素具有RNA聚合酶抑制活性,并预测根皮素类似物小分子亦具有RNA聚合酶抑制活性,结果可进一步为抗新型冠状病毒药物研发提供参考。

关键词:新型冠状病毒;RNA聚合酶;根皮素;类似物;分子对接;活性测试
中图分类号:R285.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2025)11-0028-05

Pharmacological Investigation of Inhibitory Activity of Phloretin on RNA Polymerase of Novel Coronavirus

DI Kun[1],XIE Xiaohua[2],ZHAO Tianhua[3],WU Qiaona[1],WANG Yujia[4],SU Yanlei[3],SUN Dianxing[3],CEN Shan[4]
(1. The Third Hospital of Shijiazhuang,Shijiazhuang 050011,Hebei,China,
2. Hebei General Hospital,Shijiazhuang 050051,Hebei,China;
3. The 980th Hospital of The Joint Logistics Support Force of The Chinese People's Liberation Army,Shijiazhuang 050082,Hebei,China;
4. Institute of Medicinal Biotechnology,Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College,Beijing 100050,China)

Abstract:*Objective* To explore the inhibitory activity of phloretin on the RNA polymerase of the novel coronavirus,and predict the target enzyme inhibitory activity of three small analogs molecules. *Methods* Molecular docking was employed to investigate the binding mode of phloretin with the active site of RNA polymerase. The inhibitory activity of phloretin on RNA polymerase was evaluated using a cell-based assay system for the catalytic reaction of the novel coronavirus RNA polymerase nsp7/nsp8/nsp12. Three small molecules from traditional Chinese medicine which was similar to the structure of rhizobin were selected to predict the inhibitory activity of the targeted enzyme,and the binding mode between them and the target enzyme activity site was studied by molecular docking method. *Results* Phloretin exhibited favorable binding to the active site of RNA polymerase,occupying the NTPs channel and obstructing the entry of nucleotide substrates,thereby inhibiting RNA polymerase-directed nucleic acid replication. The results of pharmacological testing for the inhibition of RNA polymerase at the cellular level demonstrated that phloretin possesses significant inhibitory activity against the novel coronavirus RNA polymerase,albeit with weaker activity compared to remdesivir. However,phloretin exhibited lower cytotoxicity compared to remdesivir. It is predicted that phloretin analogs can also inhibit RNA polymerase and have pharmacological effects against novel coronavirus. *Conclusion* This study reveals the RNA polymerase inhibitory activity of phloretin,and predict that the small molecules of the rhizetin analogs also have RNA polymerase inhibitory activity,providing a potential reference for the development of anti-novel coronavirus drugs.

Keywords:novel coronavirus;RNA polymerase;phloretin;analogs;molecular docking;activity test

基金项目:国家自然科学基金项目(81672041);河北省卫生健康委重点科研攻关计划项目(20231303)
作者简介:邸琨(1984-),女,河北石家庄人,副主任药师,硕士,研究方向:临床药理学及药效成分筛选。
通讯作者:孙殿兴(1961-),男,河北石家庄人,主任医师,博士研究生导师,博士,研究方向:传染病学诊治及药理活性成分筛选。E-mail:sundianxing@hotmail.com。
岑山(1969-),男,北京人,高级研究员,博士研究生导师,博士,研究方向:抗感染新药。E-mail:shancen@imb.pumc.edu.cn。

根皮素是一种广泛存在于多种食用及药用植物中的二氢查尔酮类化合物，具有抗菌、抗癌、降血糖、降血压、抗炎、降尿酸等多种药理活性[1-14]，安全性高[15]，同时合成工艺简单[16]，倘若其具有抗新型冠状病毒活性将在未来对新型冠状病毒感染的临床治疗具有重要意义。笔者通过分子对接虚拟筛选、细胞水平的新型冠状病毒 RNA 依赖的 RNA 聚合酶（RNA - dependent RNA polymerase，RdRp）活性抑制实验发现根皮素对靶酶具有一定的抑制活性，而后应用相同分子模拟方法预测了 3 种结构类似物小分子的靶酶抑制活性，现报道如下。

1 实验部分

1.1 *实验材料* 根皮素购于成都曼思特生物科技有限公司（纯度≥98%）。293T 细胞购自 ATCC；DMEM 高糖细胞培养基购自美国 Life Technologies 公司；胎牛血清购自美国 Gibco 公司；Vigofect 转染试剂购自威格拉斯生物技术有限公司；CCK - 8 细胞活性测定试剂盒购自诺唯赞生物科技股份有限公司；Gaussia 荧光素酶（Gluc）底物腔肠素 h（coelenterazine - h）购自美国 Promega 公司。Centro XS3 LB 963 酶标仪购自德国 Berthold 公司；EnSpire 2300 多功能酶标仪购自美国 PerkinElmer 公司。

1.2 *根皮素与靶酶的分子对接实验* 从 PDB 数据库下载获得新型冠状病毒 RNA 聚合酶的晶体三维结构（ID：7BV2），用 Mgtools 1.5.6 处理蛋白结构，通过加氢、计算电荷、合并非极性氢后保存成 pdbqt 文件。以靶蛋白的活性位点（center x = 92.517，center y = 92.906，center z = 101.245）为中心，构建一个 60 × 60 × 60 的盒子，通过 Vina 运算生成 pdbqt 文件。运用 Pymol 1.7.2.1 软件打开生成的 pdbqt 文件，并打开 7BV2 蛋白结构，保存成复合物 pdb 文件，并进行相关作图处理[17-18]。

1.3 *利用细胞水平的新型冠状病毒 RNA 聚合酶催化反应体系行药理活性检测* 质粒转染及细胞给药处理：HEK293T 细胞使用 pCoV - Gluc、pCOVID19 - nsp12、pCOVID19 - nsp7、pCOVID 19 - nsp8 质粒以 1∶20∶60∶60 的比率进行转染[19]，使用的转染试剂为 Vigofect，转染后 12 h，将细胞重新接种于 96 孔板中（10^4 个细胞/孔），然后用包括瑞德西韦、根皮素在内的培养液进行倍比稀释加入孔中，于 24 h 后，按照 Gasussia 荧光素酶活性检测的方法检测荧光值。所示结果是 3 次独立实验的平均值。

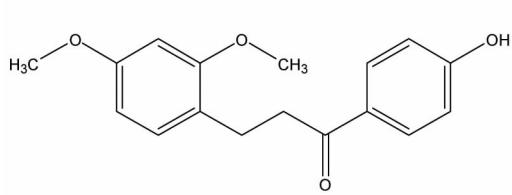
Gluc 活性测定：Gasussia 荧光素酶活性检测按照 TANNOUS BA 提供的方法操作[20]。首先将腔肠菌素 - h 的原液溶于无水乙醇中，调整浓度至 1.022 mmol/L。每次测定前，将原液在 PBS 中稀释至 16.7 μmol/L，并在室温下于暗处孵育 30 min。进行发光分析时，向白色不透明 96 孔板的每孔中添加 10 μL 上清液，并进样 60 μL 16.7 μmol/L 腔肠菌素 - h，然后用 Berthold Centro XS3 LB 963 微板光度计测量发光共 0.5 s。抑制率（%）=［1 -（实验组平均值/对照组平均值）］×100%。

细胞活性测定：用 CCK - 8 试剂盒（CCK - 8 Cell counting kit，Vazyme）检测活性测定，具体方法参考产品说明书。将 1 μL 每种测试化合物添加至 HEK293T 细胞中并孵育 24 h。然后向每孔中添加 10 μL CCK - 8 试剂，并在含 5% 二氧化碳条件下于 37 ℃孵育 30 ~ 90 min。用 Enspire 2300 Multiable 读数器（PekinElmer）测量 450 nm 处的吸光值，计算细胞活性率。所示结果是 3 次独立实验的平均值。

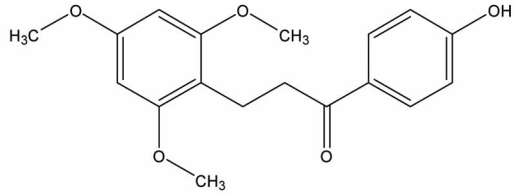
1.4 *根皮素类似物与靶酶的分子对接实验* 以根皮素结构为基础，从中药化学成分库中筛选得到结构类似化合物 1 ~ 3，为根皮素结构类似物，如图 1 所示，验证根皮素类似物与 RdRp 活性位点的结合能力，方法及步骤同 1.2。

2 实验结果

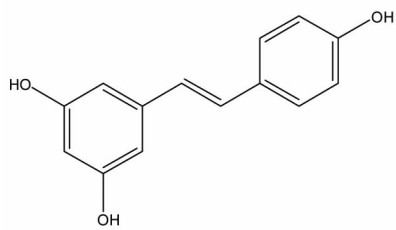
2.1 *根皮素与 RNA 聚合酶的分子对接* 研究结果发现，根皮素进入至 RdRp 的底物三磷酸核苷酸（Nucleoside triphosphates，NTPs）通道活性位点处，并以非共价结合的方式与 NTPs 结合处的氨基酸（THR456、MET542、ARG555、ASP623、THR687、ALA688、ASN691、SER759 等）发生分子间相互作用，见插页 Ⅴ 图 2，THR456 残基上羟基氧原子与根皮素 4′羟基氢原子形成氢键，键长为 2.867Å；ARG555 胍基伯胺氢原子与根皮素羰基氧原子形成氢键，键长为 2.765Å；ASN691、SER759 残基分别与根皮素羰基邻位羟基形成氢键相互作用，键长分别为 2.648Å、



化合物 1（龙血素 A）



化合物 2（龙血素 B）



化合物 3（白藜芦醇）

图 1 根皮素结构类似物的化学结构

2.912Å。分子对接过程中释放的自由能为7.5 kcal/mol。结果表明,根皮素可竞争性占据RdRp中NTPs通道的活性位点而阻碍正常底物NTPs的进入,从而对RdRp核酸复制的生物学功能起到干扰作用。

2.2 体外药理实验检测结果 实验中质粒pCOVID19-nsp12、pCOVID19-nsp7、pCOVID 19-nsp8体系转染HRK293T细胞后,于细胞内表达出相应蛋白,组成高效的介导RNA复制的nsp7/nsp8/nsp12体系[21-22]。pCoV-Gluc转染至细胞后被宿主细胞RNA聚合酶识别首先合成一条正链的mRNA,而后在nsp7/nsp8/nsp12体系(RNA依赖性RNA聚合酶,RdRp)的作用下转录出负链vRNA,进而再由nsp7/nsp8/nsp12体系进一步转录成正链性质的RNA,最终大量表达Gluc,在Gluc的表达过程中nsp7/nsp8/nsp12体系起到了"放大器"的扩增作用,故靶向抑制nsp12可使Gluc的表达减少。实验发现根皮素和瑞德西韦对nsp7/nsp8/nsp12体系具有抑制作用,并呈现出一定的剂量依赖性,瑞德西韦的活性明显强于根皮素,而根皮素的细胞毒性比瑞德西韦小,具体数据见表1。

表1 实验中测得样品对RdRp抑制率及CCK-8细胞活性检测结果

	化合物浓度梯度	瑞德西韦	根皮素
测试样品	浓度Ⅰ(μmol/L)	-	50
	浓度Ⅱ(μmol/L)	25	25
	浓度Ⅲ(μmol/L)	10	10
试验测定对RdRp抑制率	浓度Ⅰ	-	58.87±6.78
	浓度Ⅱ	74.01±3.54	24.32±1.54
	浓度Ⅲ	68.10±3.78	5.36±2.23
细胞活性测定	浓度Ⅰ	-	68.49±3.88
	浓度Ⅱ	77.25±0.76	81.11±3.18
	浓度Ⅲ	79.82±1.33	90.04±1.37

2.3 根皮素类似物与靶酶的分子对接结果 化合物1-3与RNA聚合酶之间的结合模式与根皮素相同,均可处于NTPs通道中阻碍底物核苷酸的进入,亦是与靶酶活性位点处氨基酸如THR456、MET542、ARG553、ARG555、VAL557、ILE589、ASP623、THR687、ALA688、ASN691、LEU758、SER759等发生疏水、静电、氢键相互作用(见插页Ⅴ图3-图5),最终形成对靶酶的竞争性抑制作用。化合物1~3与在与活性位点结合过程中释放的自由能分别为6.6、6.8、7.7 kcal/mol,小分子化合物1~3均可对靶酶的生物学功能起到抑制作用,依据分子对接过程中释放的自由能数值,笔者认为化合物3对RNA聚合酶的抑制活性与根皮素相当或者比之稍强。

3 结论

笔者以新型冠状病毒RNA聚合酶为靶点,运用分子对接技术研究发现根皮素可较好地结合于靶酶TNPs进入通道而起到对靶酶生物学功能的抑制作用,利用细胞水平新型冠状病毒nsp7/nsp8/nsp12催化反应体系检测根皮素对RNA聚合酶的抑制活性,发现根皮素在3个浓度梯度下表现出了对RNA聚合酶抑制作用,且呈现剂量依赖性,但药理活性相较瑞德西韦弱。同样研究了3个根皮素类似物小分子与RNA聚合酶的相互作用,结果支持小分子化合物1~3均可起到抑制RNA聚合酶药理作用,其中化合物3的抑制活性可能强于根皮素。此外,在新型冠状病毒感染细胞的实际生命周期活动中其核酸外切酶NSP14/NSP10复合物会降低瑞德西韦等核苷酸类似物型抑制剂的抑制活性[23-24],而本实验模型中未引入核酸外切酶NSP14/NSP10,故可以认为测得瑞德西韦的抑制活性数据可能较真实感染细胞中偏高,而根皮素不涉及核酸外切酶NSP14/NSP10的清除机制,测得抑制活性数据与真实值较接近,此外,根皮素的细胞毒性相对较小提示可以增加给药剂量提高血药浓度,故根皮素进一步在动物水平的抗新型冠状病毒测试实验仍值得期待。结构简单小分子化合物在自然界中广泛存在,廉价易得,且不涉及瑞德西韦等核苷酸类似物的诱导耐药机制,证明其可以起到显著的抗新型冠状病毒药理作用[17-18,25-28],对于临床治疗具有重要现实意义。本研究发现4个结构简单且类似的小分子可结合于新型冠状病毒RNA聚合酶的NTPs通道,其中根皮素在细胞水平实验证明具有切实的RNA聚合酶抑制活性;根皮素为结构柔性的简单小分子类化合物,亦可以骈接部分结构以增强与RNA聚合酶(甚至主蛋白酶)活性位点的结合作用从而提高酶抑制活性,以其结构为基础的进一步结构修饰工作亦值得展开。

参考文献

[1] 刘锋,陆殷明,陶文静,等.姜黄素与根皮素联合作用对大肠杆菌的抑菌效果[J].中国食品学报,2023,23(8):75-83.
[2] 刘娟.根皮素对光滑念珠菌的抗真菌活性及毒力因子作用的研究[D].石家庄:河北医科大学,2023.
[3] 刘锋,吴娴,徐燕,等.姜黄素与根皮素联合作用对金黄色葡萄球菌的抑菌作用研究[J].中国畜牧杂志,2023,59(4):241-246.
[4] 杨君,马亚南,陆莉莉,等.根皮素对人胃癌细胞系SGC-7901的影响及作用机制[J].江苏医药,2023,49(3):217-221,227.
[5] 周立强,李世豪,刘力,等.根皮素调控有氧糖酵解激活AMPK-P53信号通路抑制结肠癌细胞生长[J].中药新药与临床药理,2020,31(5):515-522.
[6] RUAN Q Q,WEN C M,JIN G H,et al. Phloretin-induced STAT3 inhibition suppresses pancreatic cancer growth and progression via enhancing Nrf2 activity[J]. Phytomedicine,2023,118:154990.
[7] KAPOOR S,PADWAD Y S. Phloretin induces G2/M arrest and apoptosis by suppressing the β-catenin signaling pathway in colorectal carcinoma cells[J]. Apoptosis,2023,28(5):810-829.
[8] TULI H S,RATH P,CHAUHAN A,et al. Phloretin,as a potent anticancer compound:from chemistry to cellular interactions[J]. Molecules,2022,27(24):8819.
[9] 韦运钦,蔡玉兰,阳琰,等.木姜叶柯提取物二氢查尔酮治疗2型糖尿病及其并发症的研究进展[J].中国中药杂志,2025,50(3):658-671.
[10] 鞠晓雨,魏茜雪,王兰.根皮素调节YAP/TAZ信号通路对HPV阳性宫颈癌细胞恶性进展的影响[J].中国病原生物学杂志,2024,19(9):1057-1060,1065.
[11] NAKHATE K T,BADWAIK H,CHOUDHARY R,et al. Therapeutic potential and pharmaceutical development of a multitargeted flavonoid phloretin[J]. Nutrients,2022,14(17):3638.
[12] SHELKE V,KALE A,KULKARNI Y A,et al. Phloretin:a comprehensive review of its potential against diabetes and associated complications[J]. J Pharm Pharmacol,2024,76(3):201-212.

DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2025.11.007

补阳还五汤联合针刺治疗重症监护病房获得性肌无力对患者免疫功能及肌力恢复的影响

董丽宏,王怡洁,赵海燕,朱晓琳,何辰
(昆明医科大学第一附属医院,云南 昆明 650032)

摘要:目的 研究补阳还五汤联合针刺治疗重症监护病房(intensive care unit,ICU)获得性肌无力对患者免疫功能及肌力恢复的影响。方法 选取ICU获得性肌无力患者72例,随机数表法均分为两组,每组36例,两组患者均接受常规康复干预,同时对照组采用针灸治疗,观察组采用补阳还五汤联合针刺治疗。比较两组患者的恢复时间、肌力、日常活动能力、免疫功能指标、不良反应情况。结果 观察组机械通气时间、ICU住院时间、总住院时间均短于对照组[(5.97±2.10)d、(16.32±3.77)d、(32.67±3.18)d vs(7.45±1.84)d、(18.90±4.06)d、(35.29±4.06)d],差异有统计学意义($P<0.05$);治疗前两组肌力、日常活动能力、免疫功能指标差异无统计学意义($P>0.05$),治疗后2、4周,观察组肌力评定量表(medical research council scale,MRC)评分低于对照组[(76.85±6.92)分、(86.90±5.83)分 vs(72.03±5.11)分、(82.76±6.47)分],差异有统计学意义($P<0.05$);观察组Barthel指数(modified Barthel index,MBI)评分低于对照组[(74.34±5.68)分、(90.25±5.36)分 vs(68.21±6.10)分、(86.03±6.33)分],差异有统计学意义($P<0.05$);治疗后观察组白细胞介素(interleukin,IL)-6、IL-8、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α,TNF-α)及胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor 1,IGF-1)水平优于对照组[(22.51±2.64)pg/mL、(43.74±5.60)pg/mL、(29.49±2.85)pg/mL、(117.50±10.49)ng/mL vs(26.08±3.05)pg/mL、(47.09±6.11)pg/mL、(33.01±2.48)pg/mL、(105.63±11.20)ng/mL],差异有统计学意义($P<0.05$);观察组不良反应发生率8.33%(3/36)、对照组13.89%(5/36),差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 补阳还五汤联合针刺治疗ICU获得性肌无力效果满意,能增强肌力,改善日常生活能力,调节免疫平衡,促进患者更快康复,是安全可靠的治疗方案。

关键词:补阳还五汤;针刺;重症监护病房;获得性肌无力;免疫功能;肌力
中图分类号:R277.7;R246.6 **文献标志码:**A **文章编号:**1673-7717(2025)11-0031-04

基金项目:国家自然科学基金地区科学基金项目(81960109);云南省科技厅昆明医科大学联合专项(202001AY070001-205)
作者简介:董丽宏(1976-),女,云南昆明人,主任医师,硕士,研究方向:重症医学。

[13] 李潭,孙一涵,李国峰. 根皮素对脂多糖诱导的$RAW_{264.7}$细胞的体外抗炎作用机制[J]. 中国免疫学杂志,2021,37(7):812-818.
[14] 王宇,汪鋆植,王丹阳,等. 海棠茶水提物对黄嘌呤氧化酶的影响[J]. 中成药,2022,44(4):1322-1325.
[15] 李穆琼,范引科,李晰,等. 根皮苷及根皮素对小鼠的半数致死量测定[J]. 中国药师,2013,16(3):466-468.
[16] 黄璐琦,刘国都,杨健,等. 一种根皮素的合成方法:CN202210295869[P]. 北京,2022-06-03.
[17] 苏彦雷,刘倩,王君平,等. 黄芩素抗奥密克戎毒株BA.2.2活性的研究[J]. 中华中医药学刊,2022,40(8):14-16,259.
[18] 王利华,孙成宏,邸琨,等. 黄酮类单体抗奥密克戎毒株药理活性研究[J]. 中华中医药学刊,2023,41(1):18-20,261.
[19] ZHAO J Y,GUO S S,YI D R,et al. A cell-based assay to discover inhibitors of SARS-CoV-2 RNA dependent RNA polymerase[J]. Antiviral Res,2021,190:105078.
[20] TANNOUS B A. Gaussia luciferase reporter assay for monitoring biological processes in culture and in vivo[J]. Nat Protoc,2009,4(4):582-591.
[21] 海洋,谢建平. SARS-CoV-2 NSP7和NSP8的研究进展[J]. 生物信息学,2021,19(3):149-158.
[22] SARMA H,JAMIR E,NARAHARI SASTRY G. Protein-protein interaction of RdRp with its co-factor NSP8 and NSP7 to decipher the interface hotspot residues for drug targeting:a comparison between SARS-CoV-2 and SARS-CoV[J]. J Mol Struct,2022,1257:132602.
[23] RONA G,ZEKE A,MIWATANI-MINTER B,et al. The NSP14/NSP10 RNA repair complex as a Pan-coronavirus therapeutic target[J]. Cell Death Differ,2022,29(2):285-292.
[24] NAIDU S A G,MUSTAFA G,CLEMENS R A,et al. Plant-Derived Natural Non-Nucleoside Analog Inhibitors (NNAIs) against RNA-Dependent RNA Polymerase Complex (nsp7/nsp8/nsp12) of SARS-CoV-2[J]. J Diet Suppl,2023,20(2):254-283.
[25] 常红,刘倩,李方龙,等. 大黄素抗奥密克戎毒株BA.2.2药理活性的研究[J]. 中华中医药学刊,2022,40(9):17-19,261.
[26] 常红,许寅聪,段绪红,等. 异黄酮类化合物抗奥密克戎毒株作用的研究[J]. 中华中医药学刊,2022,40(12):20-22,276.
[27] 王利华,刘军,邸琨,等. 木犀草苷抗奥密克戎毒株药理活性的研究[J]. 中华中医药学刊,2023,41(7):26-28,269.
[28] ZANDI K,MUSALL K,OO A,et al. Baicalein and baicalin inhibit SARS-CoV-2 RNA-dependent-RNA polymerase[J]. Microorganisms,2021,9(5):893.

根皮素对新型冠状病毒 RNA 聚合酶抑制活性的实验研究及类似物活性预测

（正文见 28－31 页）

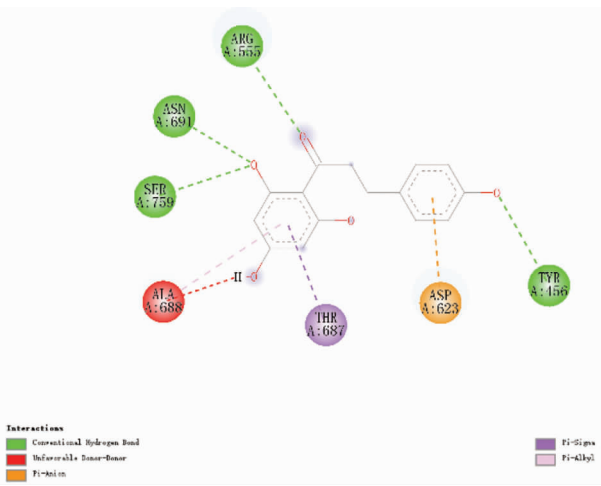


图 2　根皮素与 RdRp 活性位点处氨基酸的相互作用

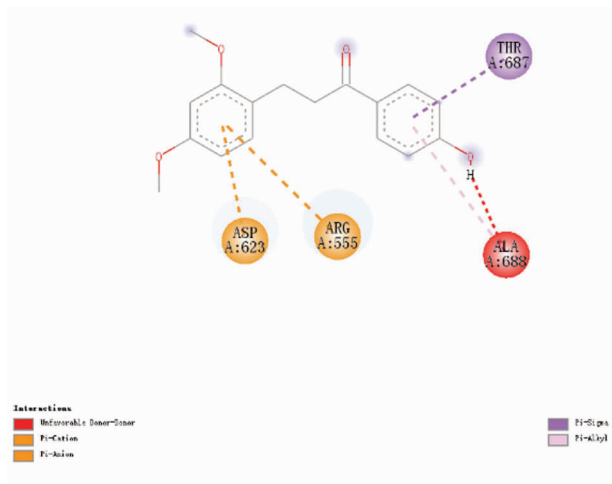


图 3　龙血素 A 与 RdRp 活性位点处氨基酸的相互作用

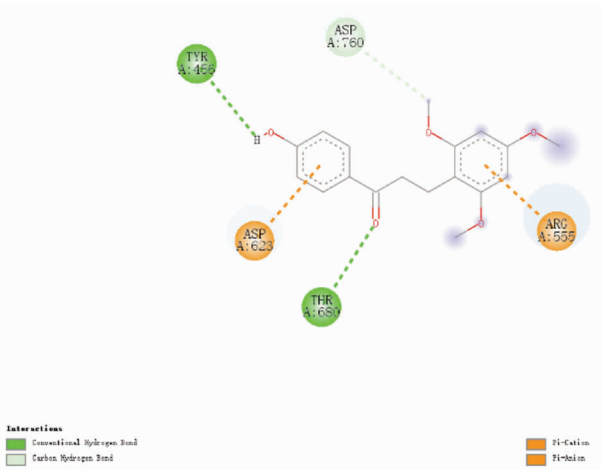


图 4　龙血素 B 与 RdRp 活性位点处氨基酸的相互作用

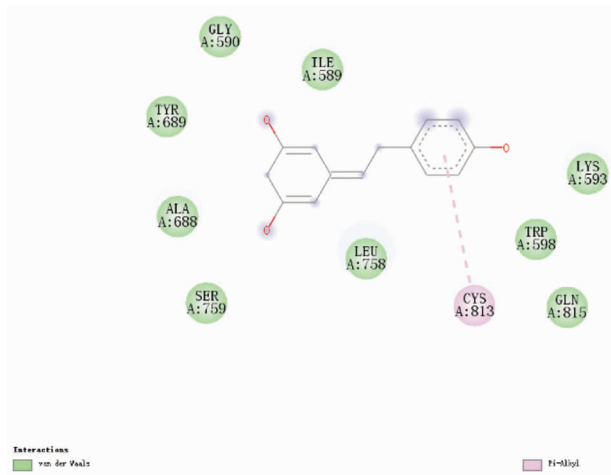


图 5　白藜芦醇与 RdRp 活性位点处氨基酸的相互作用