DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2026.03.012

桑辛素对新型冠状病毒RNA聚合酶抑制作用的实验研究及相关类似物活性预测

吴巧娜[1],谢小华[2],刘晶磊[3],王宇佳[4],邸琨[1],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 050011;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 探讨桑辛素对新型冠状病毒RNA聚合酶功能的抑制作用,并对5种与桑辛素结构类似的桑属中药成分进行靶酶抑制活性预测。方法 利用分子对接技术研究桑辛素与新型冠状病毒RNA聚合酶活性位点的结合模式;而后应用细胞水平的RNA聚合酶催化体系检测桑辛素对RNA聚合酶的抑制活性。从桑属中药成分中选取5种与桑辛素结构类似物小分子,应用分子对接方法分别研究它们与RNA聚合酶活性位点处氨基酸的相互作用模式。结果 桑辛素可牢固占据RNA聚合酶NTPs通道而阻碍核苷酸的进入,从而抑制RNA聚合酶的核酸复制功能。细胞水平的药理实验结果证实,桑辛素对RNA聚合酶的抑制活性强于对照药物瑞德西韦。同时,5种桑辛素结构类似物小分子亦可与RNA聚合酶活性位点处结合而具有酶抑制活性。结论 研究发现桑辛素对RNA聚合酶具有较强的抑制活性,其5种结构类似物小分子亦被预测具有较强的RNA聚合酶抑制活性,结果可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;桑辛素;分子对接;药理实验;结构类似物
中图分类号:R285.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2026)03-0067-05

Experimental Study on Inhibitory Pharmacological Effects of Morusin on RNA Polymerase of SARS-CoV-2 and Prediction of Activity of Related Analogs

WU Qiaona[1], XIE Xiaohua[2], LIU Jinglei[3], WANG Yujia[4], DI Kun[1], 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 investigate the inhibitory pharmacological effects of Morusin on the function of the RNA polymerase of SARS-CoV-2, and the target enzyme inhibitory activity of 5 kinds of traditional Chinese medicine ingredients similar to mulberry sinin was predicted. *Methods* Molecular docking technology was used to study the binding mode of Morusin to the active site of the RNA polymerase of SARS-CoV-2. The inhibitory activity of Morusin on RNA polymerase was then tested using a cell-based RNA polymerase catalytic system. Five small molecules with structural analogs of morocinin were selected from the components of Morus traditional Chinese medicine, and their interaction patterns with amino acids at the active site of RNA polymerase were studied using molecular docking methods. *Results* Morusin can firmly occupy the NTPs channel of RNA polymerase and block the entry of nucleotides, thereby inhibiting the nucleic acid replication function of RNA polymerase. Pharmacological experiments at the cellular level confirmed that the inhibitory activity of Morusin on RNA polymerase was stronger than that of the control drug remdesivir. At the same time, the 5 kinds of small molecules of the structural analogs of mulberry can also bind to the active site of RNA polymerase and have enzyme inhibitory activity. *Conclusion* This study has found that Morusin has strong inhibitory activity on RNA polymerase, the five analogs are also predicted to have strong RNA polymerase inhibitory activity, and the results can provide a reference for the development of anti-SARS-CoV-2 drugs.

Keywords: SARS-CoV-2; RNA polymerase; Morusin; molecular dock; pharmacological experiment; analogs

基金项目:国家自然科学基金项目(81672041);河北省卫生健康委员会重点科研攻关计划项目(20231302,20241343)
作者简介:吴巧娜(1984-),女,河北石家庄人,副主任药师,硕士,研究方向:临床药理学及中药活性成分筛选。
通讯作者:苏彦雷(1983-),男,河北石家庄人,副主任药师,硕士研究生导师,研究方向:临床药学及药效活性成分筛选。E-mail:suyanlei0161@163.com。
岑山(1969-),男,北京人,高级研究员,博士研究生导师,研究方向:抗感染新药。E-mail:shancen@imb.pumc.edu.cn。

桑辛素是一种双异戊烯基取代的黄酮类化合物，主要存在于桑属药材中，具有抗癌、抗菌、抗炎等多种药理活性[1-11]。在本研究中笔者探索桑辛素与新型冠状病毒 RNA 聚合酶（RNA - dependent RNA polymerase，RdRp）的相互作用，利用分子对接技术、细胞水平 RNA 聚合酶抑制实验证实桑辛素具有较强的 RNA 聚合酶抑制活性，而后从桑属中药化学成分中[12]选取 5 种与桑辛素结构相似的小分子进行基于分子对接的靶酶抑制活性检测，实验结果为未来抗新型冠状病毒药物研发提供重要参考。

1 实验部分

1.1 *实验材料* 桑辛素单体化合物（纯度≥98%）购于成都曼思特生物科技有限公司。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 萤光素酶（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 *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；而后以（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[12-14]。

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检测药理活性* 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[15]，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、桑辛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 提供的方法操作[16]。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 μM，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 μM 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）检测细胞活性，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 *桑辛素类似物与 RNA 聚合酶的分子对接实验* 为进一步探索异戊烯基取代黄酮类化合物与靶酶中三磷酸核苷酸（Nucleoside triphosphates，NTPs）通道的结合情况，从桑属中药成分中[12]选取 5 种与桑辛素结构相似的小分子进行基于分子对接的靶酶抑制活性预测，操作过程见 1.2。文中化合物结构如图 1 所示。

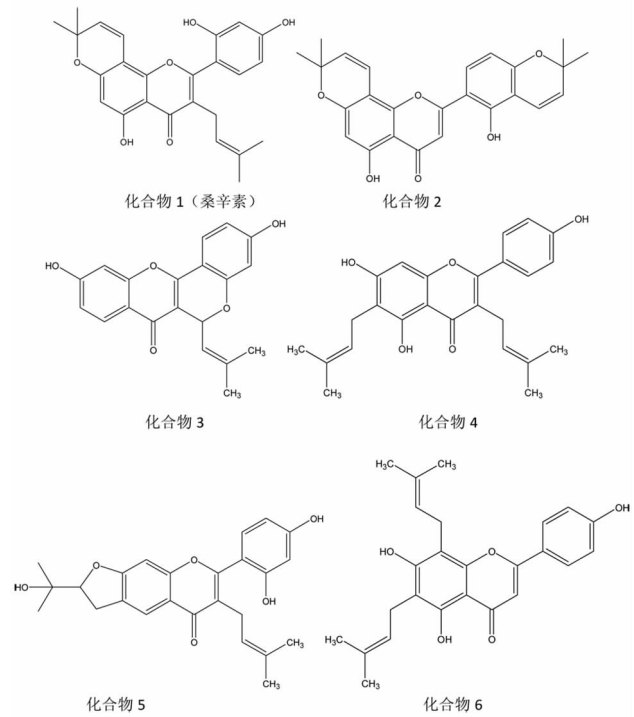


图 1 各化合物的结构式

2 实验结果

2.1 *分子对接实验结果* 实验结果发现，桑辛素可进入至 RdRp 的 NTPs 通道活性位点处，并以非共价结合的方式与通道中 NTPs 结合处的氨基酸（ILE548、SER549、LYS551、ARG553、ARG555、VAL557、SER682、THR687 等）发生分子间相互作用，见插页Ⅻ图 2A、图 2B，ILE548 骨架羰基氧原子与桑辛素 5 位羟基的氢原子形成氢键，键长为 2.227 Å；ARG555 胍基氢原子与桑辛素 2' 氧原子形成氢键，键长为 3.068 Å，分子对接释放的自由能为 8.1 kcal/mol，表明桑辛素可牢固地结合于 NTPs 通道阻碍正常底物的进入而发挥靶酶抑制作用。

2.2 *体外药理实验检测结果* 质粒 pCOVID19 - nsp12、pCOVID19 - nsp7、pCOVID 19 - nsp8 转染 HRK293T 细胞后表达出相应蛋白，于细胞内组成高效的介导 RNA 复制的新型冠状病毒 nsp7/nsp8/nsp12 体系[17-18]。质粒 pCoV - Gluc 的 DNA 首先被宿主细胞 DNA 依赖的 RNA 聚合酶识别并转录出一条正链性质的 RNA，而后在 nsp7/nsp8/nsp12 体系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，宿主细胞内核糖体对正链 RNA 进行翻译，最终使 Gluc 的表达水平升高。在 Gluc 的表达过程中新型冠状病毒 RNA 聚合酶体系起到了“放大器”的扩增作用，故靶向抑制 RNA 聚合酶可使 Gluc 的表达减少。实验发现桑辛素和瑞德西韦对 RNA 聚合酶体系具有抑制作用，并呈现出一定的剂量依赖性，具体数据见表 1。在 10 μM 浓度下，桑辛素的酶抑制活性明显强于瑞德西韦，细胞毒性稍大于瑞德西韦。

2.3 *桑辛素类似物与靶酶的分子对接结果* 结果表明，化合物 2 - 6 均以非共价键形式结合于 NTPs 通道中，与 NTPs 通道中 ALA547、ILE548、SER549、LYS551、ARG553、ARG555、VAL557、ASP618、ASP623、SER682、THR687 等氨基酸产生疏水、静电、氢键等相互作用，见插页Ⅻ图 3 - 图 7，化合物 2 - 6 在与 RNA 聚合酶结合过程中释放的自由能分别为 9.3、8.3、

7.3、8.4、7.9 kcal/mol。化合物 2－6 与 RNA 聚合酶之间的结合模式与桑辛素相同，化合物 2、3、5 的结合能力强于桑辛素，提示可能对 RNA 聚合酶的抑制活性亦强于桑辛素。笔者认为桑属中药含有较强的 RNA 聚合酶抑制剂活性，可能在临床治疗中发挥较强抗新型冠状病毒药理作用。

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

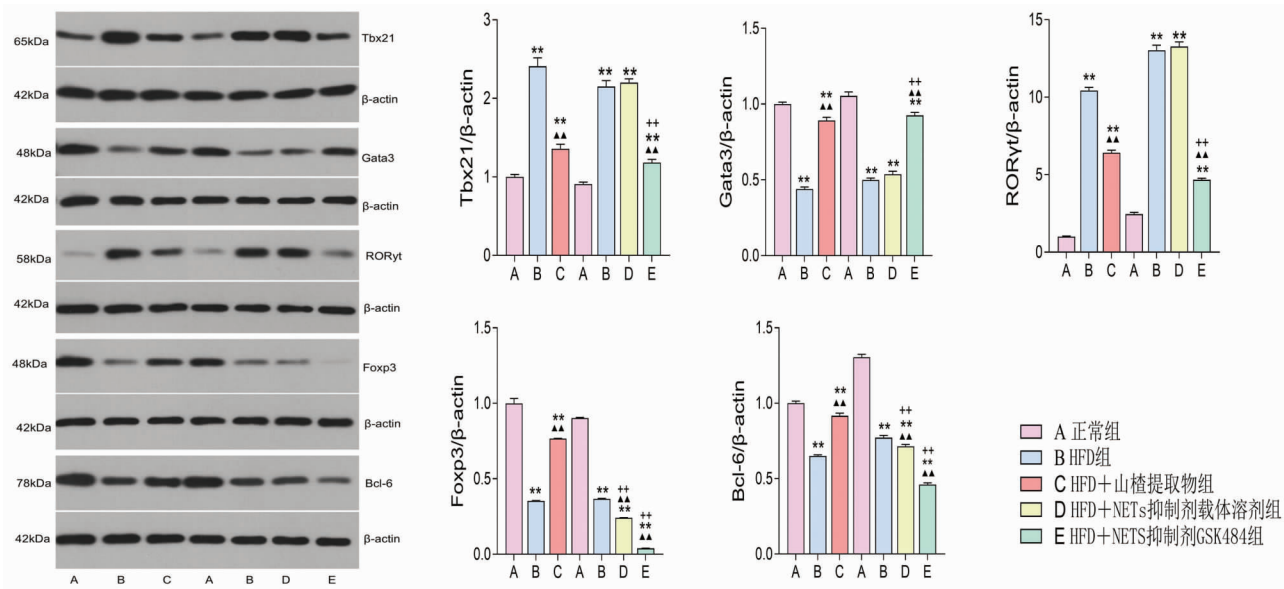
项目	化合物浓度梯度	瑞德西韦	桑辛素
测试样品	浓度Ⅰ/(μmol/L)	－	50
	浓度Ⅱ/(μmol/L)	25	25
	浓度Ⅲ/(μmol/L)	10	10
试验测定对 RdRp 抑制率/(%)	浓度Ⅰ	－	94.13±0.12
	浓度Ⅱ	74.01±3.54	93.88±0.08
	浓度Ⅲ	68.10±3.78	90.20±1.49
细胞活性测定	浓度Ⅰ	－	45.87±0.10
	浓度Ⅱ	77.25±0.76	57.87±1.04
	浓度Ⅲ	79.82±1.33	73.86±1.65

3 结论

笔者既往研究发现黄酮类小分子可抑制 RNA 聚合酶而起到抗新型冠状病毒作用[19]并进行了细胞水平实验验证[13－14,20]，但其不具有抑制新型冠状病毒主蛋白酶活性[21]，桑辛素由于增加了异戊烯基取代与靶酶脂溶性空腔的相互作用从而相应提升了主蛋白酶抑制活性[22]，此外，本研究发现桑辛素可牢固地结合于 RNA 聚合酶的活性位点而发挥酶功能抑制活性，在 10 μM 浓度下桑辛素的靶酶抑制率为(90.20±1.49)%，活性明显强于瑞德西韦。新型冠状病毒核酸外切酶 NSP14/NSP10 复合物具有核酸校对功能会降低瑞德西韦等核苷酸类似物型抑制剂的抑制活性[15,23－24]，而本实验药理模型中未引入核酸外切酶 NSP14/NSP10 体系，故认为测得瑞德西韦的抑制活性可能较真实值偏高，而桑辛素不涉及核酸外切酶 NSP14/NSP10 介导的核苷酸类抑制剂的耐药机制，测得的靶酶抑制活性较可能与实际中细胞水平的抗新型冠状病毒药理活性值接近。桑辛素结构类似物小分子 2－5 在分子对接实验中亦表现出较强靶酶结合能力，提示其可能具有较突出的抗新型冠状病毒活性，桑属中药材在临床抗新型冠状病毒感染治疗中具有重要作用。随着奈玛特韦、莫努匹拉韦、瑞德西韦等靶酶抑制剂的临床应用，耐药株亦不断被报道[25－27]，未来在分子对接指导下，以桑辛素等异戊烯基取代黄酮类化合物结构为基础进行改造修饰，开发可同时抑制主蛋白酶和 RNA 聚合酶的强效抗病毒的双靶点抑制剂具有积极意义。

参考文献

[1] 范浩，綦彬，任国庆，等. 桑辛素对乳头状甲状腺癌 TPC－1 细胞凋亡的影响[J]. 医学研究与战创伤救治，2023，36(3)：235－240.
[2] 赵一萍. 水杨酸与紫外线处理桑枝对其提取物抗氧化与抑制 α－葡萄糖苷酶活性的影响[D]. 重庆：西南大学，2021.
[3] 刘伟. 桑辛素抑制黑色素瘤细胞增殖及促凋亡机制研究[D]. 石家庄：河北医科大学，2021.
[4] 陈辰，许子寒，王力. 桑辛素对喉癌干细胞干性表型调控的作用研究[J]. 四川大学学报(医学版)，2020，51(5)：650－657.
[5] CHO A R，PARK W Y，LEE H J，et al. Antitumor effect of morusin via G1 arrest and antiglycolysis by AMPK activation in hepatocellular cancer[J]. International Journal of Molecular Sciences，2021，22(19)：10619.
[6] HAO K，DAI Q，WU J L，et al. Morusin enhances the antitumor activity of MAPK pathway inhibitors in BRAF－mutant melanoma by inhibiting the feedback activation of STAT3[J]. European journal of cancer (Oxford，England：1990)，2022，165：58－70.
[7] HAFEEZ A，KHAN Z，ARMAGHAN M，et al. Exploring the therapeutic and anti－tumor properties of morusin：a review of recent advances[J]. Front Mol Biosci，2023，10：1168298.
[8] LIU W，JI Y，WANG F，et al. Morusin shows potent antitumor activity for melanoma through apoptosis induction and proliferation inhibition[J]. BMC Cancer，2023，23(1)：602.
[9] JIA Y，HE W，ZHANG H，et al. Morusin ameliorates IL－1β－induced chondrocyte inflammation and osteoarthritis via NF－κB signal pathway[J]. Drug Des Devel Ther，2020，14：1227－1240.
[10] YANG C，DENG X，WU L，et al. Morusin protected ruminal epithelial cells against lipopolysaccharide－induced inflammation through inhibiting EGFR－AKT/NF－κB signaling and improving barrier functions[J]. Int J Mol Sci，2022，23(22)：14428.
[11] YILDIRIM K，BOZKURT S，BASIBUYUK H H，et al. Anti－tuberculosis activity of morusin：a promising flavonoid from white mulberry[J]. Int J Tuberc Lung Dis，2024，28(1)：37－41.
[12] 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.
[13] 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.
[14] 陈超，王鹏飞，张娜郡，等. 基于 GC－MS 和 HPLC 测定沙棘籽油中脂肪酸、甾醇和黄酮类成分[J]. 辽宁中医杂志，2023，50(11)：186－190.
[15] ZHAO J，GUO S S，YI D，et al. A cell－based assay to discover inhibitors of SARS－CoV－2 RNA dependent RNA polymerase[J]. Antiviral research，2021，190：105078.
[16] TANNOUS B A. Gaussia luciferase reporter assay for monitoring biological processes in culture and in vivo[J]. Nat Protoc，2009，4(4)：582－591.
[17] 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.
[18] SARMA H，JAMIR E，SASTRY G N. 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.
[19] 彭安堂，苏彦雷，刘倩，等. 基于分子对接技术精细分析中药化学成分与新型冠状病毒 RNA 聚合酶之间的结合模式[J]. 中华中医药学刊，2021，39(4)：94－101，280－285.
[20] 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.
[21] 王绛辉，张晶，段绪红，等. 黄酮类化合物抑制新型冠状病毒主蛋白酶的研究[J]. 中华中医药学刊，2023，41(4)：13－16，262.
[22] 张培红，赵洁，张欣欣，等. 桑辛素对新型冠状病毒主蛋白酶抑制作用的研究[J]. 中华中医药学刊，2023，41(10)：9－11，259.
[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 & Differentiation，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] HIROTSU Y，KOBAYASHI H，KAKIZAKI Y，et al. Multidrug－resistant mutations to antiviral and antibody therapy in an immunocompromised patient infected with SARS－CoV－2[J]. Med，2023，4(11)：813－824.
[26] SHANNON A，CANARD B. Kill or corrupt：Mechanisms of action and drug－resistance of nucleotide analogues against SARS－CoV－2[J]. Antiviral Res，2023，210：10551.
[27] DUAN Y，ZHOU H，LIU X，et al. Molecular mechanisms of SARS－CoV－2 resistance to nirmatrelvir[J]. Nature，2023，622(7982)：376－382.



注：＊与正常对照组比较，$P<0.05$；＊＊与正常对照组比较，$P<0.01$；▲与 HFD 组比较，$P<0.05$；▲▲与 HFD 组比较，$P<0.01$；#与 HFD + 山楂提取物组比较，$P<0.05$；##与 HFD + 山楂提取物组比较，$P<0.01$；+ 与 HFD + NETs 抑制剂载体溶剂组比较，$P<0.05$；+ + 与 HFD + NETs 抑制剂载体溶剂组比较，$P<0.01$。

图 6 山楂提取物和 NETs 抑制剂对血脂异常小鼠外周血单个核细胞 Tbx21、Gata3、RORγt、Foxp3、Bcl－6 蛋白表达的影响

桑辛素对新型冠状病毒 RNA 聚合酶抑制作用的实验研究及相关类似物活性预测

（正文见 67－69 页）

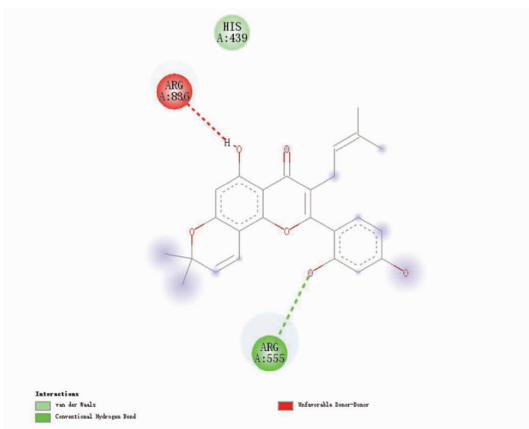


图 2A 桑辛素与 RdRp 活性位点的相互作用

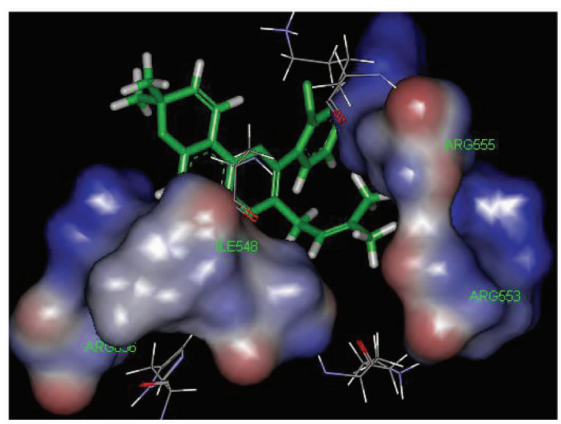


图 2B 桑辛素与 RdRp 活性位点的相互作用

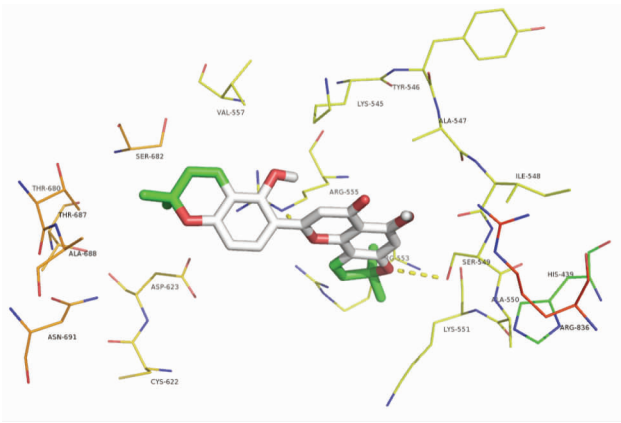


图 3　化合物 2 与 RdRp 活性位点的相互作用

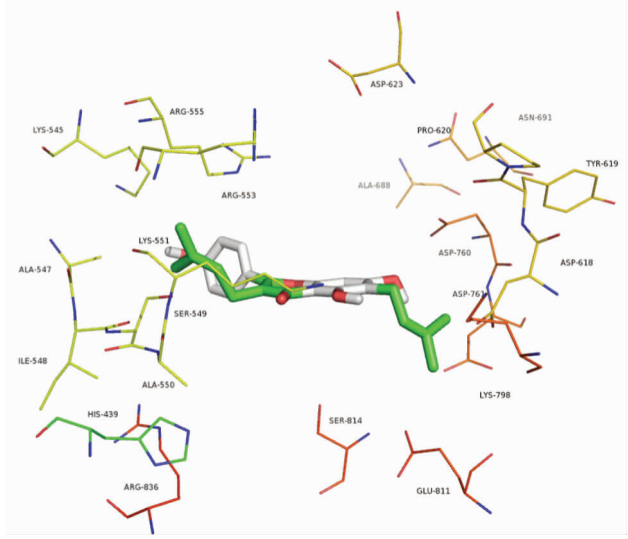


图 4　化合物 3 与 RdRp 活性位点的相互作用

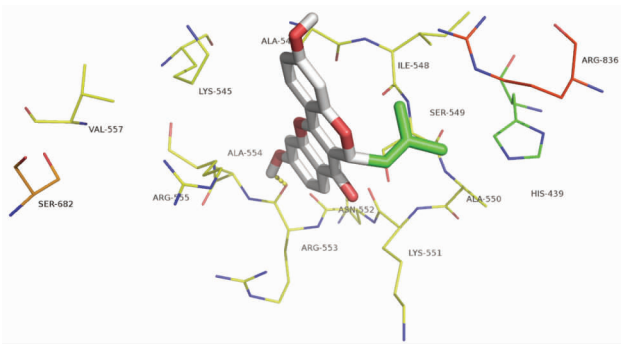


图 5　化合物 4 与 RdRp 活性位点的相互作用

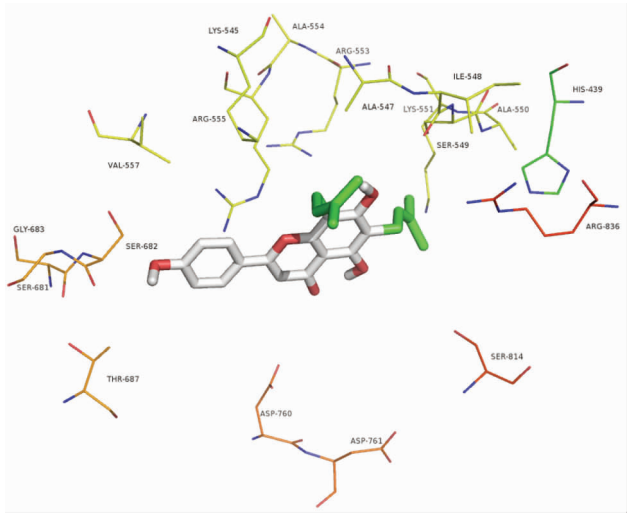


图 6　化合物 5 与 RdRp 活性位点的相互作用

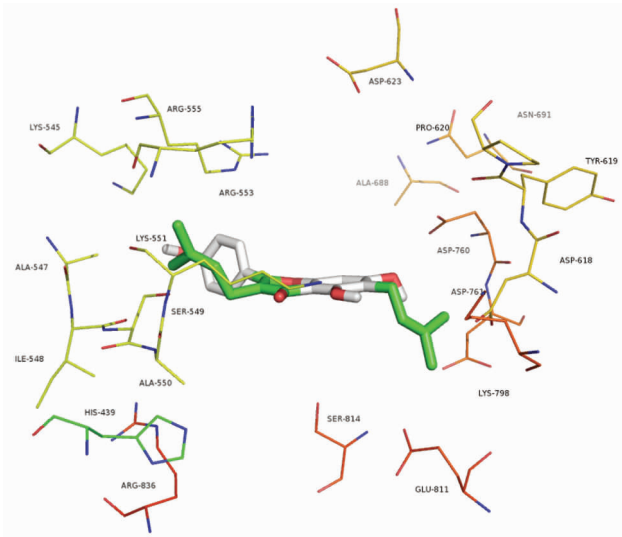


图 7　化合物 6 与 RdRp 活性位点的相互作用