DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2026.07.013

补骨脂素对新型冠状病毒主蛋白酶及RNA聚合酶抑制药理活性的研究

韩鹏飞[1],苏彦雷[2],孙殿兴[2],张晶[3],刘倩[4]
(1.河北省眼科医院,河北 邢台 054000;2.联勤保障部队第九八〇医院,河北 石家庄 050082;
3.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;4.河北省优抚医院,河北 石家庄 050051)

摘要:目的 探索补骨脂素对新型冠状病毒主蛋白酶、RNA聚合酶的抑制活性。方法 获取主蛋白酶、RNA聚合酶的晶体结构,运用分子对接技术研究补骨脂素与二者活性位点处的相互作用模式;利用体外主蛋白酶的荧光偏振模型、细胞水平的新型冠状病毒RNA聚合酶催化反应体系分别测试补骨脂素对主蛋白酶、RNA聚合酶的抑制活性。结果 补骨脂素可进入主蛋白酶、RNA聚合酶的活性位点处并与周围氨基酸发生相互作用,结合过程释放自由能分别为-5.8、-7.8 kcal/mol。在Mpro荧光偏振模型测试实验中补骨脂素在50、100、200 μmol/L浓度均未表现出对靶酶的抑制活性;在抑制RNA聚合酶活性的测试实验中,补骨脂素在10、25、50 μmol/L浓度显示出对靶酶抑制率为7.36%±4.26%、16.82%±6.04%、46.07%±9.01%。结论 小分子补骨脂素对Mpro无抑制活性,对RdRp有一定的抑制活性。

关键词:新型冠状病毒;主蛋白酶;RNA聚合酶;补骨脂素;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(2026)07-0065-05

Study on Inhibitory Pharmacological Activity of Psoralen against SARS-CoV-2 Main Protease and RNA Polymerase

HAN Pengfei[1],SU Yanlei[2],SUN Dianxing[2],ZHANG Jing[3],LIU Qian[4]
(1. Hebei Eye Hospital,Xingtai 054001,Hebei,China;
2. The 980th Hospital of the Joint Logistics Support Force of the Chinese People's Liberation Army,Shijiazhuang 050082,Hebei,China;
3. Institute of Medicinal Biotechnology,Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College,Beijing 100050,China;
4. Youfu Hospital of Hebei Province,Shijiazhuang 050051,Hebei,China)

Abstract:*Objective* To explore the inhibitory activity of psoralen against SARS-CoV-2 main protease(Mpro) and RNA polymerase(RdRp). *Methods* Crystal structures of Mpro and RdRp were obtained. Molecular docking technology was employed to study the interaction mode of psoralen with the active sites of both enzymes. The inhibitory activity of psoralen against Mpro was tested using an in vitro fluorescence polarization model,while the inhibitory activity against RdRp was tested using a cell-level SARS-CoV-2 RNA polymerase catalytic reaction system. *Results* Psoralen could enter the active sites of Mpro and RdRp and interact with surrounding amino acids,with the binding process releasing free energy of -5.8 kcal/mol and -7.8 kcal/mol,respectively. In the Mpro fluorescence polarization model test,psoralen showed no inhibitory activity against the target enzyme at concentrations of 50,100 and 200 μmol/L. In the RdRp inhibition test,psoralen showed inhibition rates of 7.36%±4.26%,16.82%±6.04% and 46.07%±9.01% at concentrations of 10,25 and 50 μmol/L,respectively. *Conclusion* The small molecule psoralen has no inhibitory activity against Mpro,but has certain inhibitory activity against RdRp.

Keywords:SARS-CoV-2;main protease;RNA polymerase;psoralen;molecular docking;activity test

基金项目:国家自然科学基金项目(81672041);河北省卫生健康委员会重点科研攻关计划项目(20241370);河北省中医药管理局科研计划项目(2024256)

作者简介:韩鹏飞(1987-),男,河北邢台人,主管药师,学士,研究方向:中药临床药学及活性成分。
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,硕士,研究方向:中药活性成分研究及临床药学(呼吸专业)。E-mail:suyanlei0161@163.com。
张晶(1981-),女,河北石家庄人,高级研究员,硕士研究生导师,博士,研究方向:微生物与生化药学。E-mail:jingjing-506@hotmail.com。

新型冠状病毒的大流行对世界经济及人类健康产生了深远的影响,抗病毒药物研发仍是亟需解决的时代课题。RNA依赖的RNA聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase,RdRp)和主蛋白酶(main protease,Mpro)被确认为抗新型冠状病毒的最有效靶点[1-5],二者在活性位点均存在与底物结合的空腔,如Mpro存在着与底物氨基酸残基结合的S1-S4及S1′空腔,然而假如应用特定的小分子化合物"堵塞"其中一个关键空腔亦或者两个相邻空腔则必将会干扰Mpro与底物的识别与结合,同样RNA聚合酶中狭窄的底物分子三磷酸核苷酸(nucleotide triphosphate,TNPs)通道亦可能被小分子占据,同时作用于

双靶点的抗新型冠状病毒小分子应该具有更高效的抗病毒治疗效果。补骨脂素是一种结构较为简单的香豆素类小分子，分子量仅186.16，含有3个杂原子，具有抗炎、抗骨质疏松、抗病毒、神经保护、抗肿瘤、雌激素样等多种药理作用[6-14]，有着良好的临床应用潜力。本研究探索小分子化合物补骨脂素与RdRp、Mpro活性位点处的结合情况，并利用主蛋白酶的荧光偏振模型、细胞水平的新型冠状病毒RNA聚合酶催化反应体系分别检测补骨脂素对主蛋白酶、RNA聚合酶的抑制活性，实验过程报道如下。

1 方法

1.1 实验材料 补骨脂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 补骨脂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主蛋白酶晶体三维结构（ID：6LU7）、RNA聚合酶的晶体三维结构（ID：7BV2），分别用Mgtools1.5.6处理，通过加氢、计算电荷、合并非极性氢后保存成pdbqt文件。

以主蛋白酶的活性位点（center x = -11.228，center y = 12.86，center z = 68.162）为中心，构建一个40×60×40的盒子，通过Vina运算生成pdbqt文件。而后应用Pymol 1.7.2.1软件打开生成的pdbqt文件，并打开6LU7蛋白结构，保存成复合物pdb文件，并进行相关作图处理[15]。

以RNA聚合酶的活性位点（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Pymol1.7.2.1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[16]。

1.3 荧光偏振模型测试补骨脂素对主蛋白酶抑制活性 具体实验操作过程同文献[17]。将补骨脂素用DMSO溶解而后用反应液稀释至测试浓度Ⅰ~Ⅴ（即400、200、100、25 μmol/L）进行药理活性测试实验。阳性对照化合物奈玛特韦（PF-07321332）的测试浓度Ⅰ~Ⅱ为100、50 μmol/L。

1.4 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：pCoV-Gluc、pCOVID19-nsp12、pCOVID19-nsp7、pCOVID 19-nsp8质粒以1∶20∶60∶60的比率转染HEK293T细胞[18]，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、补骨脂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。抑制率（%）=［1-（实验组平均值/对照组平均值）］×100%。所示结果是3次独立实验的平均值。

2 结果

2.1 分子对接实验结果 补骨脂素为结构简单的小分子化合物，分子对接实验结果显示：补骨脂素可以分别进入主蛋白酶、RNA聚合酶的活性位点处，以疏水、范德化力等非共价结合方式作用于靶标蛋白活性位点。补骨脂素与主蛋白酶的活性位点处HIS41、MET49、CYS145、HIS164、MET165、GLU166、ASP187、ARG188、GLN189等氨基酸发生相互作用（见插页Ⅻ图1-图2），处于S1、S1′、S3空腔范围内，其8位碳原子距离PRO168骨架氮原子距离10.042Å，5位碳原子距离THR25残基碳原子7.144Å，结构中尚可增加基团取代向多个结合空腔延伸而增强与主蛋白酶的相互作用，然而，依据此结果补骨脂素不能有效抑制Mpro，并未与设想中“封堵”某一关键空腔（如S1、S1′或S4等）一致，但抑或者此实验结果仅表示补骨脂素与主蛋白酶活性位点相互作用的一种状态而并非全部状态，尚存在其他多种未知结合模式。补骨脂素与Mpro活性位点在分子对接过程释放自由能为5.8 kcal/mol。补骨脂素与RNA聚合酶活性位点处ILE589、GLY590、THR591、ALA688、LEU758等氨基酸发生相互作用（见插页Ⅻ图3-图4），分子对接过程释放自由能为7.6 kcal/mol，其羰基氧原子距离ASP623残基末端碳原子10.973 Å，8位碳原子距离ARG555残基末端氮原子12.349Å，说明补骨脂素在化学结构上还可以增加大基团取代以增加与RNA聚合酶活性位点处氨基酸的相互作用。

2.2 酶学水平的药理活性测试结果 应用主蛋白酶的荧光偏振模型对化合物进行测试，阳性对照物PF-07321332及补骨脂素在各浓度梯度测得抑制率数据见表1，发现小分子补骨脂素在各测试浓度均未对主蛋白酶产生抑制作用。

表1 测试样品补骨脂素对Mpro的抑制率 单位：%

测试样品	浓度Ⅰ	浓度Ⅱ	浓度Ⅲ	浓度Ⅳ
PF-07321332	90	74	—	—
补骨脂素	-1	-3	-3	-2

2.3 体外药理实验检测结果 在本实验中，利用质粒中的基因在HRK293T细胞表达出蛋白nsp12、nsp7、nsp8并组建成高效的介导RNA复制的新型冠状病毒nsp12-nsp7-nsp8体系[19-20]，进而对Gluc的RNA序列进行扩增最终使得Gluc蛋白表达增加，靶向抑制nsp12可使Gluc的表达减少。实验发现瑞德西韦和补骨脂素均对nsp12-nsp7-nsp8体系具有抑制作用，补骨脂素的抑制活性明显较瑞德西韦弱，二者均呈现出了一定的剂量依赖性，补骨脂素的细胞毒性比瑞德西韦小，具体实验数据见表2。

表2 测得样品对RdRp抑制率及CCK-8细胞活性检测结果（$\bar{x} \pm s$）

测试样品	化合物浓度梯度/（μmol/L）		RdRp抑制率/（%）	细胞活性/（%）
瑞德西韦	浓度Ⅰ	-	-	-
	浓度Ⅱ	25	74.01±3.54	77.25±0.76
	浓度Ⅲ	10	68.10±3.78	79.82±1.33
补骨脂素	浓度Ⅰ	50	46.07±9.01	67.02±1.26
	浓度Ⅱ	25	16.82±6.04	83.51±4.84
	浓度Ⅲ	10	7.36±4.26	91.18±3.63

3 讨论

随着Mpro抑制剂奈玛特韦、RdRp抑制剂瑞德西韦、莫努匹拉韦等药品的临床应用耐药株也不断涌现[21-25]，研究不同结构的抗病毒药物避免耐药具有积极的现实意义。Mpro、RdRp的活性位点处均存在多处结合空腔，笔者设想“堵塞”任一空腔均可能干扰或阻碍靶酶对底物的识别与结合，从而对靶酶生物学功能起到抑制作用。笔者运用分子对接技术研究了小分子补骨脂素与Mpro、RdRp活性位点处氨基酸的相互作用，发现其在Mpro活性位点处的结合作用较弱，可能无法对Mpro的功能产生有效的干扰，而其在RdRp活性位点处的结合作用可起到一定的靶酶功能抑制作用，分子对接结果在药理学实验中得到了证实，同样也说明小分子化合物易于实现对RdRp的抑制作用。补骨脂素在代谢过程中可形成5-或8-位羟化产物[26-27]，羟化后略增强了与靶酶活性位点处的结合能力，抑制活性应该增加，5-羟基补骨脂素、8-羟基补骨脂素与RdRp结合后释放的自由能分别为7.9、8.2 kcal/mol，二者结合构象发生反转，即新增加的羟基均背对并远离氨基酸GLY590。见插页Ⅻ图5。结构简单的小分子化合物补骨脂具有一定的RNA聚合酶抑制活性，羟化的代谢物应该增强了RNA聚合酶抑制活性，此外，结合报道中的分子在受体活性位点处的结合模式，今后在补骨脂素结构上增加杂原子取代基，以增强与Mpro、RdRp活性位点的相互作用，应该是其提升抗病毒活性的一条途径。

参考文献

[1] ZHU W, CHEN C Z, GORSHKOV K, et al. RNA-dependent RNA polymerase as a target for COVID-19 drug discovery[J]. SLAS Discov, 2020, 25(10): 1141-1151.

[2] WANG Y Y, ANIRUDHAN V, DU R K, et al. RNA-dependent RNA polymerase of SARS-CoV-2 as a therapeutic target[J]. J Med Virol, 2021, 93(1): 300-310.

[3] VICENTI I, ZAZZI M, SALADINI F. SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA polymerase as a therapeutic target for COVID-19[J]. Expert Opin Ther Pat, 2021, 31(4): 325-337.

[4] JIN Z M, DU X Y, XU Y C, et al. Structure of mpro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors[J]. Nature, 2020, 582(7811): 289-293.

[5] MACDONALD E A, FREY G, NAMCHUK M N, et al. Recognition of divergent viral substrates by the SARS-CoV-2 main protease[J]. ACS Infect Dis, 2021, 7(9): 2591-2595.

[6] 苏清君，李鹏，边朝辉，等. 补骨脂素通过炎症和Ras/Raf1介导对类风湿关节炎大鼠的保护作用[J]. 世界中医药，2021，16(21)：3180-3184，3190.

[7] 王健，张驰. 基于Wnt/β-连环素通路探讨补骨脂素对骨质疏松症大鼠的影响[J]. 世界中医药，2022，17(12)：1697-1702.

[8] MA X N, LI H, GONG Y, et al. Psoralen inhibits hepatitis B viral replication by down-regulating the host transcriptional machinery of viral promoters[J]. Virol Sin, 2022, 37(2): 256-265.

[9] 杨阔，高茸，马亚中，等. 补骨脂素药理作用及肝毒性机制的研究进展[J]. 中草药，2021，52(1)：289-298.

[10] 瞿晶田，王家龙，柴士伟，等. 补骨脂素和补骨脂酚舒张血管的作用机制研究[J]. 中国药房，2019，30(24)：3364-3368.

[11] 冯媛媛，周利红，刘宁宁，等. 补骨脂素对人结肠癌细胞侵袭转移及β-catenin/TCF_4-MMP-9信号通路的影响[J]. 中华中医药杂志，2021，36(12)：7033-7037.

[12] 刘生元，舒庆，赵新，等. 补骨脂素对人非小细胞肺癌A549细胞增殖和迁移的作用及机制研究[J]. 临床医学研究与实践，2022，7(23)：5-8.

[13] HUANG Y, CHEN L, WU Y, et al. Anti-tumor effect of paclitaxel enhanced by psoralen at the cellular level[J]. Medicinal Plant, 2023, 14(6): 27-30.

[14] 张艳，江振洲，张陆勇. 补骨脂素对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的改善作用[J]. 中国药科大学学报，2021，52(5)：596-602.

[15] 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.

[16] 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.

[17] 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.

[18] 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]. Antivir Res, 2021, 190: 105078.

[19] 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.

[20] 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.

[21] NOORUZZAMAN M, JOHNSON K E E, RANI R, et al. Emergence of transmissible SARS-CoV-2 variants with decreased sensitivity to antivirals in immunocompromised patients with persistent infections[J]. Nat Commun, 2024, 15(1): 7999.

[22] TAMURA T J, CHOUDHARY M C, DEO R, et al. Emerging SARS-CoV-2 resistance after antiviral treatment[J]. JAMA Netw Open, 2024, 7(9): e2435431.

[23] FLYNN J M, HUANG Q Y J, ZVORNICANIN S N, et al. Systematic analyses of the resistance potential of drugs targeting SARS-CoV-2 main protease[J]. ACS Infect Dis, 2023, 9(7): 1372-1386.

[24] MOGHADASI S A, HEILMANN E, KHALIL A M, et al. Transmissible SARS-CoV-2 variants with resistance to clinical protease inhibitors[J]. Sci Adv, 2023, 9(13): eade8778.

[25] KABINGER F, STILLER C, SCHMITZOVÁ J, et al. Mechanism of molnupiravir-induced SARS-CoV-2 mutagenesis[J]. Nat Struct Mol Biol, 2021, 28(9): 740-746.

[26] 李嘉，左莉华，裴健颖，等. 基于UHPLC-Q-Orbitrap HRMS技术的补骨脂素在大鼠体内代谢产物的鉴定及代谢途径的分析[J]. 沈阳药科大学学报，2021，38(10)：1024-1032.

[27] YANG A H, CHEN J X, MA Y T, et al. Studies on the metabolites difference of psoralen/isopsoralen in human and six mammalian liver microsomes in vitro by UHPLC-MS/MS[J]. J Pharm Biomed Anal, 2017, 141: 200-209.

酒炙当归炮制历史沿革、化学成分、药理作用研究进展

（正文见 40－44 页）

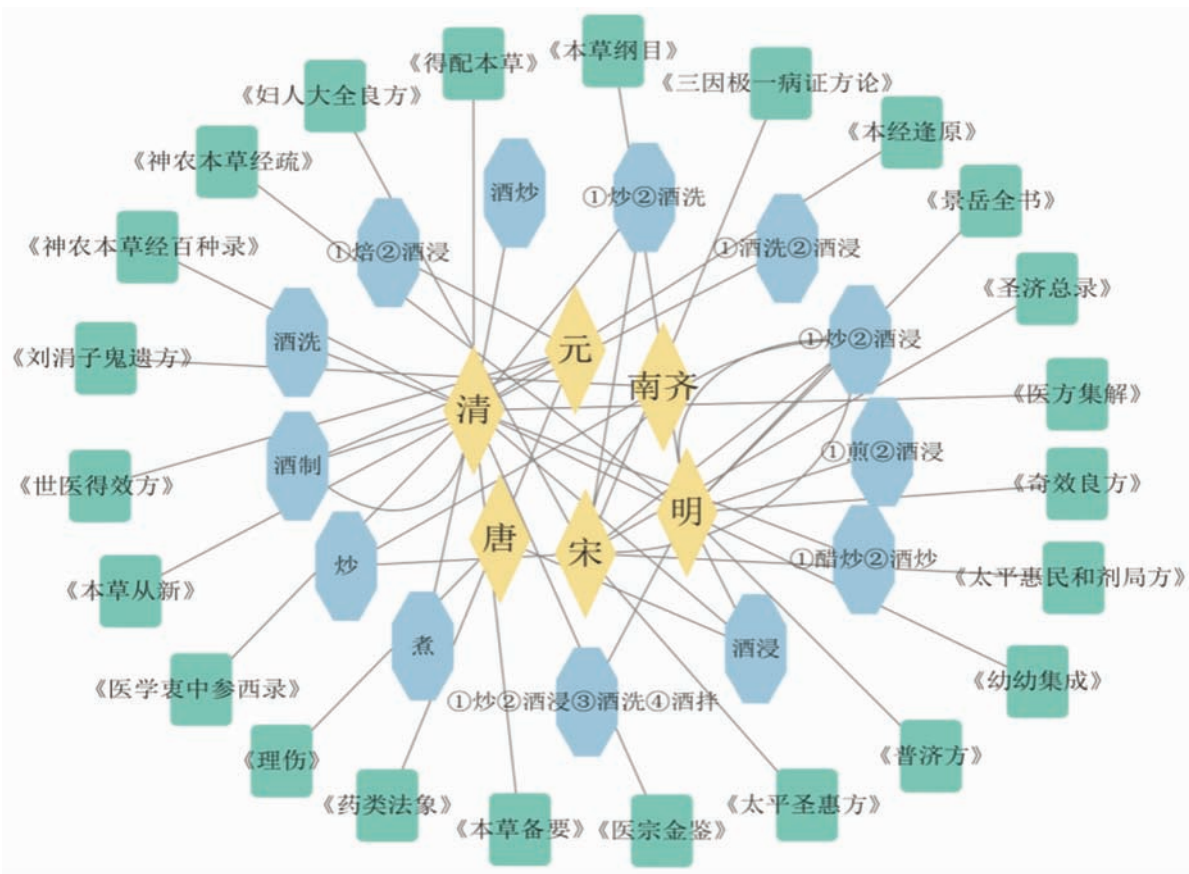


图 1　当归历代炮制沿革网络图

补骨脂素对新型冠状病毒主蛋白酶及 RNA 聚合酶抑制药理活性的研究

（正文见 65－67 页）

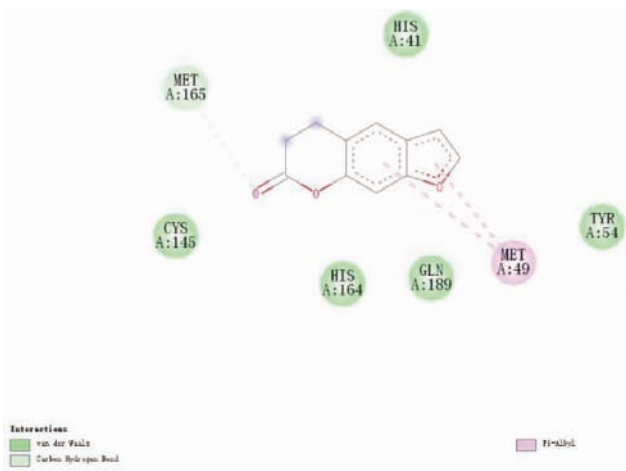


图 1　补骨脂素与 Mpro 活性位点处氨基酸的相互作用

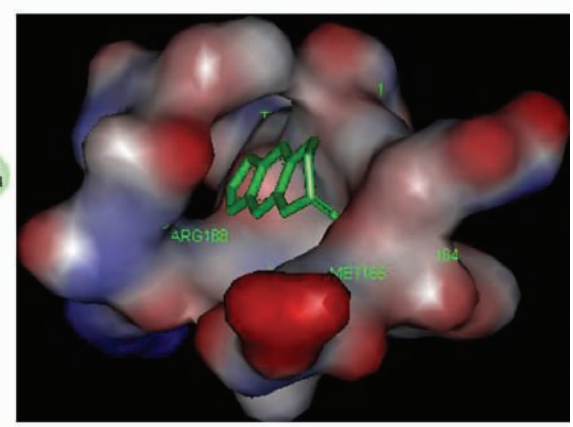


图 2　补骨脂素与 Mpro 活性位点结合简图

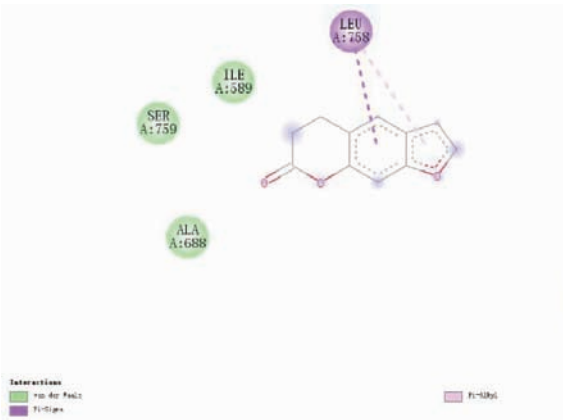


图 3 补骨脂素与 RdRp 活性位点处氨基酸的相互作用

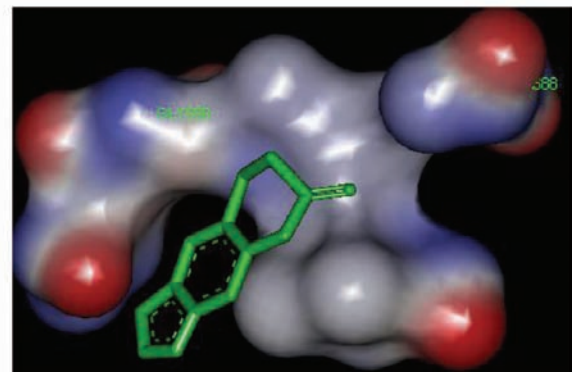
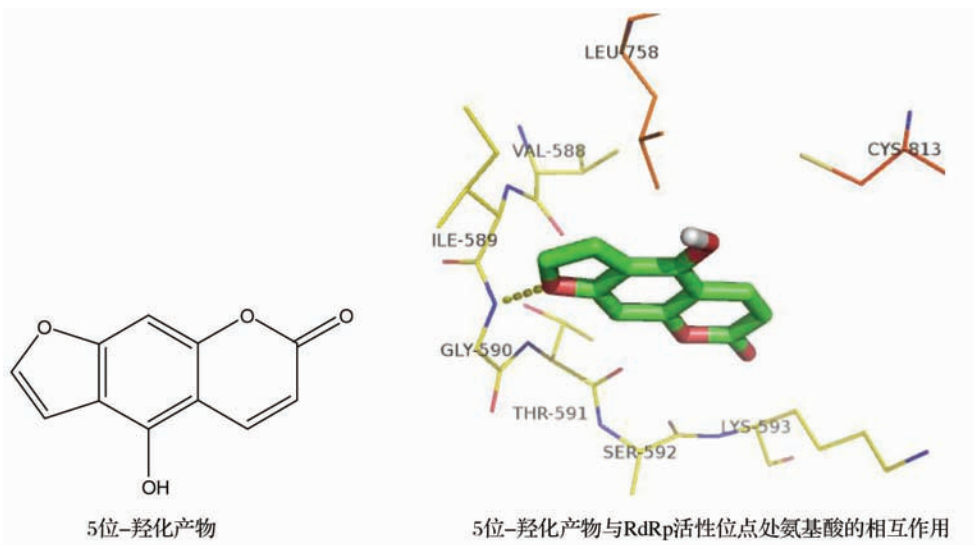


图 4 补骨脂素与 RdRp 活性位点结合简图



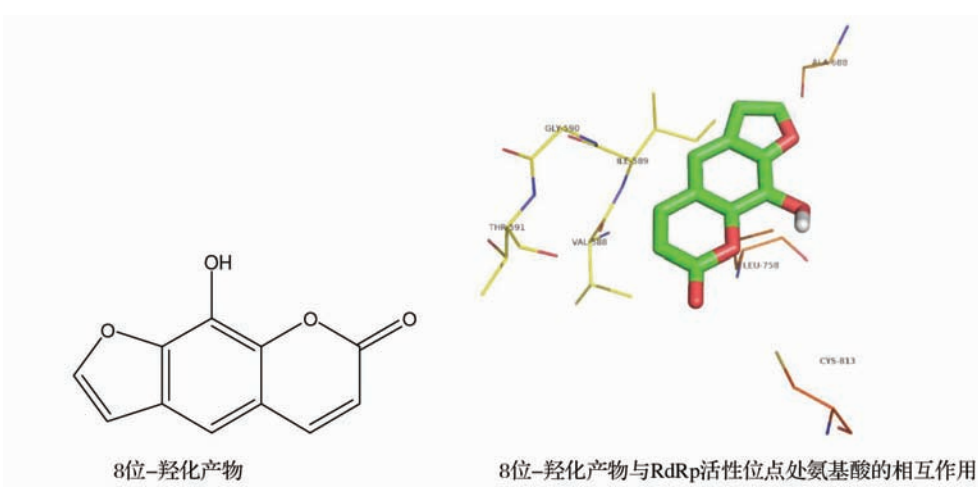


图 5 补骨脂素羟化产物及其与 RNA 聚合酶的结合模式