DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2026.08.007

甘草香豆素抑制新型冠状病毒RNA聚合酶的实验研究及香豆素小分子的酶抑制活性预测

吴巧娜[1],邸琨[1],刘莎[1],刘京芳[2],苏彦雷[3],赵建元[4],王宇佳[4],孙殿兴[3],岑山[4],刘倩[5]
(1.石家庄市第三医院,河北 石家庄 050011;2.河北省中医药科学院,河北 石家庄 050030;
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;
5.河北省优抚医院,河北 石家庄 050051)

摘要:目的 研究甘草香豆素单体成分对新型冠状病毒RNA聚合酶的抑制活性,并预测香豆素类小分子对RNA聚合酶的抑制活性。方法 应用细胞水平的新型冠状病毒RNA聚合酶催化反应体系测试甘草香豆素对RNA聚合酶的抑制活性;利用分子对接技术研究香豆素类小分子与新型冠状病毒RNA聚合酶活性位点处氨基酸的相互作用模式。结果 在抑制RNA聚合酶的药理测试实验中,甘草香豆素在10、25、50 μmol/L浓度显示出对靶酶抑制率为(29.68±4.06)%、(58.30±7.65)%、(86.85±5.78)%。甘草香豆素可进入RNA聚合酶活性位点处并与NTPs通道氨基酸的发生分子间相互作用,结合过程释放的自由能为7.6 kcal/mol。香豆素类小分子均可结合于RNA聚合酶的活性位点处并阻碍正常底物核苷酸的进入。结论 甘草香豆素对RNA聚合酶具有明显抑制活性,香豆素类小分子可占据NTPs通道而抑制RNA聚合酶的生物学功能,以香豆素母核结构为模板进行结构修饰是开发抗新型冠状病毒药物的一条路径。

关键词:新型冠状病毒;RNA聚合酶;甘草香豆素;活性测试;分子对接;香豆素类小分子
中图分类号:R285.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2026)08-0033-05

Experimental Study on Inhibition of Novel Coronavirus RNA Polymerase by Glycycoumarin and Prediction of Enzyme Inhibitory Activity of Coumarin Small Molecules

WU Qiaona[1], DI Kun[1], LIU Sha[1], LIU Jingfang[2], SU Yanlei[3], ZHAO Jianyuan[4], WANG Yujia[4], SUN Dianxing[3], CEN Shan[4], LIU Qian[5]
(1. The Third Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang 050011, Hebei, China;
2. Hebei Province Academy of Chinese Medicine Sciences, Shijiazhuang 050030, 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;
5. Youfu Hospital of Hebei Province, Shijiazhuang 050051, Hebei, China)

Abstract: *Objective* To study the inhibitory activity of glycycoumarin against the main RNA polymerase of the novel coronavirus and to predict the inhibitory activity of coumarin small molecules against this target enzyme. *Methods* A cell-based novel coronavirus RNA polymerase catalytic reaction system was used to test the inhibitory activity of glycycoumarin against RNA polymerase. Molecular docking technology was used to study the interaction mode of glycycoumarin and coumarin small molecules with amino acids at the active site of the main RNA polymerase of the novel coronavirus. *Results* In the RNA polymerase inhibition assay, glycycoumarin showed inhibition rates were (29.68±4.06)%, (58.30±7.65)% and (86.85±5.78)% at concentrations of 10, 25, 50 μmol/L, respectively. Glycycoumarin can enter the active site of RNA polymerase and interact with amino acids in the NTPs channel, releasing free energy of 7.6 kcal/mol during the binding process. Coumarin small molecules can bind to the active site of RNA polymerase and hinder the entry of normal substrate nucleotides. *Conclusion* Glycycoumarin has significant inhibitory activity against RNA polymerase. Coumarin small molecules can occupy the NTPs channel and inhibit the biological function of RNA polymerase. Structural modification based on the coumarin parent nucleus is a potential pathway for the development of anti-novel coronavirus drugs.

Keywords: novel coronavirus; RNA polymerase; glycycoumarin; activity assay; molecular docking; coumarin small molecules

甘草香豆素是一种从豆科植物甘草中分离得到的香豆素类化合物,有抗肿瘤、保肝、抗炎、抗菌、抗病毒等多种药理活性[1-4]。课题组于2020年初预测香豆素类化合物可抑制新型冠状病毒RNA聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)活性,具有抗新型冠状病毒作用[5],选取化学单体甘草香豆素进行验证其对RdRp抑制性的药理作用,并阐释其他部分香豆素小分子(化学结构见图1)与RdRp的分子间结合模式,现将实验过程报道如下,为抗新型冠状病毒抑制剂开发提供实验参考。

1 实验部分

1.1 实验材料 甘草香豆素单体购于北京倍特仁康生物医药

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(20231303,20241370);河北省中医药管理局科研计划项目(2024256)
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,硕士,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,博士,研究方向:抗感染新药开发。E-mail:shancen@imb.pumc.edu.cn。

科技有限公司(纯度≥95%),化合物瑞德西韦购于上海吉尔生化有限公司(纯度≥95%),余试剂器材及实验操作过程同文献[6]。

1.2 RNA聚合酶活性测试 质粒pCoV-Gluc、pCOVID19-nsp12、pCOVID19-nsp7、pCOVID 19-nsp8以1∶20∶60∶60的比率转染HEK293T细胞[7],12 h后将细胞重新接种于96孔板中(10^4个细胞/孔),然后用包括瑞德西韦、甘草香豆素在内的培养液进行倍比稀释加入孔中,培育24 h后,按照Gasussia荧光素酶活性检测的方法检测荧光值,结果为3次独立实验的平均值。细胞活力检测采用CCK-8法,实验操作同文献[6]。

1.3 分子对接实验 分子对接过程及参数设置同文献[8-9],新型冠状病毒RNA聚合酶的晶体三维结构(ID:7BV2)从PDB数据库下载获得,通过加氢、计算电荷、合并非极性氢处理后存为pdbqt文件;为限定小分子配体的运动,以受体(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,最后进行图形处理。

2 实验结果

2.1 RNA聚合酶抑制性药理实验测试 质粒pCOVID19-nsp12、pCOVID19-nsp7、pCOVID 19-nsp8转染HRK293T细胞后表达出相应蛋白,并于细胞内组成功能高效的介导RNA复制的nsp12-nsp7-nsp8聚合酶体系[10-11]。转录出的Gluc RNA链被nsp12-nsp7-nsp8识别并进行扩增,最终使Gluc蛋白表达增加。抑制核酸复制核心元件nsp12则可降低Gluc蛋白的生成量。实验发现瑞德西韦和甘草香豆素均对RNA聚合酶体系具有明显的抑制作用,并呈现出相关的剂量依赖性,具体结果数据见表1。新型冠状病毒非结构蛋白14(Non-structural protein 14,nsp14)发挥核酸外切酶功能,可降低瑞德西韦等核苷酸类抑制剂的生物学活性[7,12],本实验的HRK293T细胞内为引入核酸内切酶,故测得瑞德西韦的活性值应该较真实值略高,推测在25 μmol/L浓度下,甘草香豆素的靶酶抑制活性可能与瑞德西韦相当。

2.2 分子对接实验结果 在实验中发现,甘草香豆素以非共价键结合方式占据NTPs通道,主要与LYS545、ARG555、SER682、THR687、ASN691等发生相互作用(见插页Ⅷ图2),分子对接过程产生的自由能为-7.6 kcal/mol,可有效阻碍核苷酸类底物进入靶酶活性位点区域,起到对靶酶生物学功能的抑制作用。

化合物1~8均进入至RdRp的NTPs通道活性位点处,并与通道周围氨基酸(ARG555、ILE589、GLY590、THR591、SER681、SER682、ALA688、ASN691、LEU758等)发生相互作用(见插页Ⅸ图3),分子对接过程产生的自由能分别为-5.9、-6.9、-7.1、-6.7、-6.7、-6.0、-5.9、-7.2 kcal/mol,化合物2的4位羟基氧原子与GLY590骨架氮上氢原子形成氢键(键长2.132 Å),化合物6的7位羟基氢原子与SER682骨架

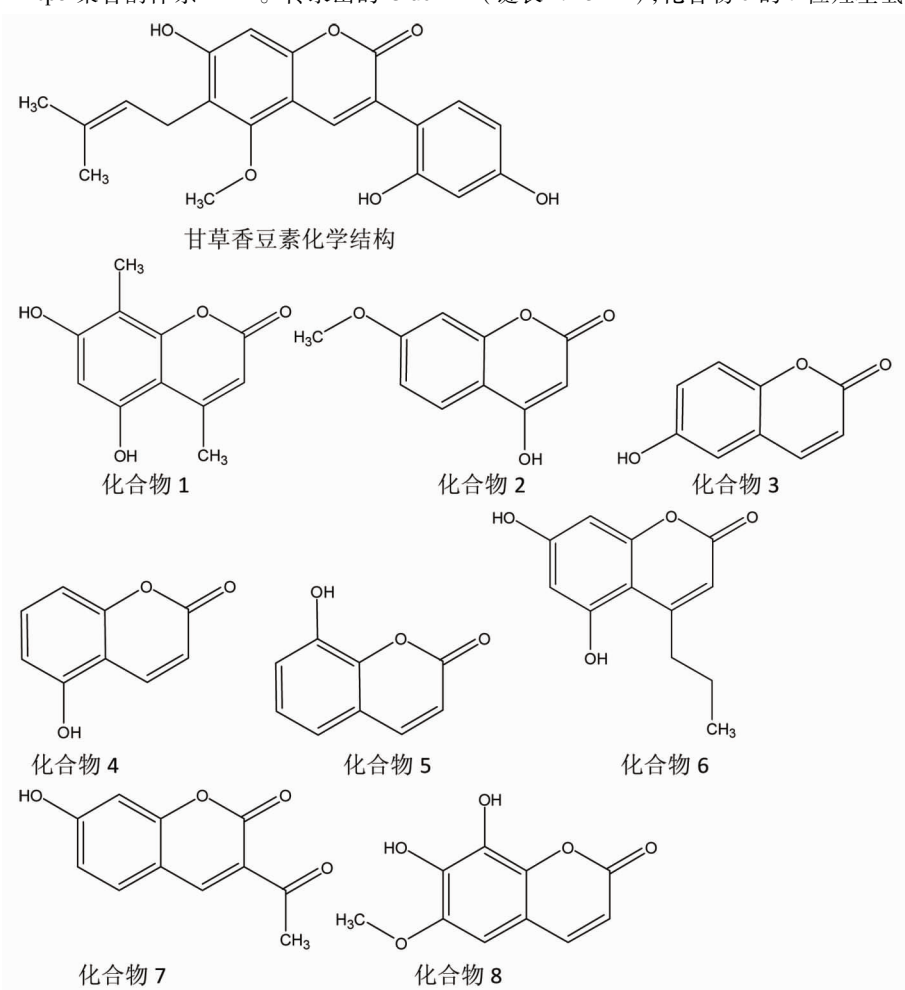


图1 甘草香豆素及部分香豆素小分子的化学结构

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

项目名称	化合物浓度梯度	瑞德西韦	甘草香豆素
受试样品	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	－	86.85±5.78
	浓度Ⅱ	74.01±3.54	58.30±7.65
	浓度Ⅲ	68.10±3.78	29.26±2.48
细胞活性测定	浓度Ⅰ	－	72.14±2.32
	浓度Ⅱ	77.25±0.76	79.98±4.12
	浓度Ⅲ	79.82±1.33	84.37±3.42

羰基氧原子形成氢键(键长 2.078 Å),化合物 7 的 7 位羟基氢原子与 TYR456 残基上氧原子形成氢键(键长 2.369 Å)。化合物 6 与活性位点处的结合自由能与文献[5]中化合物 23 的相近,说明 4 位烃链取代无法提高靶酶抑制活性。化合物 1～8 均可占据 RdRp 活性位点产生抑制作用,但香豆素母核结构上 2、4、8 位疏水取代可能会使靶酶抑制活性下降。

3 结论

新型冠状病毒依然在世界范围内广泛传播,影响着人们的生产和生活[13－17],并随着抗病毒药物的临床应用不断涌现出新的耐药变异毒株[18－24],故开发新型抗病毒药物分子具有重要现实意义。笔者既往研究发现小分子香豆素类化合物可以抑制新型冠状病毒 RdRp 而具有抗病毒作用,本次实验利用 HEK293T 细胞内表达、组装的新型冠状病毒 nsp12－nsp7－nsp8 体系检测甘草香豆素对靶酶的抑制活性,实验结果证明甘草香豆素对 RNA 聚合酶具有明显的靶酶抑制活性且呈现出相关的浓度依赖性,并推测其在 25 μmol/L 浓度下对 RNA 聚合酶的抑制活性与同浓度的瑞德西韦相当。甘草香豆素及香豆素类小分子化合物 1～8 均竞争性占据 RNA 聚合酶活性位点表现出酶抑制活性,香豆素母核结构上 2 位、4 位、8 位疏水取代可能会使化合物与靶酶活性位点的结合能力减弱,6 位烃链取代可能有助于靶酶抑制活性提升,未来可围绕香豆素母核进行结构修饰,进一步验证寻找高活性的 RNA 聚合酶抑制剂。

参考文献

[1] PENG T, LONG B, YANG X L, et al. Total syntheses and anti－inflammatory studies of three natural coumarins: glycycoumarin, glycyrin, and 3－O－methylglycyrol[J]. Molecules, 2024, 29(16): 3942.

[2] YUMEI T, SHUIPING O, LINHU Y, et al. Pharmacological Activities and Pharmacokinetics of Glycycoumarin[J]. Revista brasileira de farmacognosia : orgao oficial da Sociedade Brasileira de Farmacognosia, 2022, 33(3): 11－13.

[3] 吴新玉, 成蕾, 邓艳, 等. 异戊烯基香豆素类化合物抑制 A549 细胞增殖作用及其构效关系[J]. 现代药物与临床, 2022, 37(10): 2190－2196.

[4] 宋鑫华. 甘草香豆素预防和治疗肝癌的作用及机制研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2018.

[5] 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.

[6] 邸琨, 谢小华, 赵田华, 等. 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[J]. 中华中医药学刊, 2025, 43(11): 28－31, 263.

[7] 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.

[8] 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.

[9] 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.

[10] 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.

[11] 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.

[12] 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.

[13] STEINER S, KRATZEL A, BARUT G T, et al. SARS－CoV－2 biology and host interactions[J]. Nat Rev Microbiol, 2024, 22(4): 206－225.

[14] VANDERSMISSEN G, VERBEECK J, HENCKENS P, et al. Sick leave due to SARS－CoV－2 infection[J]. Occup Med, 2024, 74(7): 486－492.

[15] NESTERUK I. Should we ignore SARS－CoV－2 disease?[J]. Epidemiol Infect, 2024, 152: e57.

[16] ULUDAĞ M, INCITTI R, GAO X, et al. Global surveillance of emerging SARS－CoV－2 variants[J]. Bull World Health Organ, 2024, 102(6): 374.

[17] MACHKOVECH H M, HAHN A M, GARONZIK WANG J, et al. Persistent SARS－CoV－2 infection: significance and implications[J]. Lancet Infect Dis, 2024, 24(7): e453－e462.

[18] NOORUZZAMAN M, JOHNSON KEE, 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: 7999.

[19] 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.

[20] IKETANI S, MOHRI H, CULBERTSON B, et al. Multiple pathways for SARS－CoV－2 resistance to nirmatrelvir[J]. Nature, 2023, 613(7944): 558－564.

[21] CHAKRABORTY C, BHATTACHARYA M, SHARMA AR. Emerging mutations in the SARS－CoV－2 variants and their role in antibody escape to small molecule－based therapeutic resistance[J]. Curr Opin Pharmacol, 2022, 62: 64－73.

[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] STEVENS L J, PRUIJSSERS A J, LEE H W, et al. Mutations in the SARS－CoV－2 RNA－dependent RNA polymerase confer resistance to remdesivir by distinct mechanisms[J]. Sci Transl Med, 2022, 14(656): eabo0718.

[24] SHIMAZU H, WADA D, MARUYAMA S, et al. Clinical experience of treatment of immunocompromised individuals with persistent SARS－CoV－2 infection based on drug resistance mutations determined by genomic analysis: a descriptive study[J]. BMC Infect Dis, 2023, 23(1): 780.

夏枯草活性成分抗肿瘤作用机制的研究进展

（正文见 188－194 页）

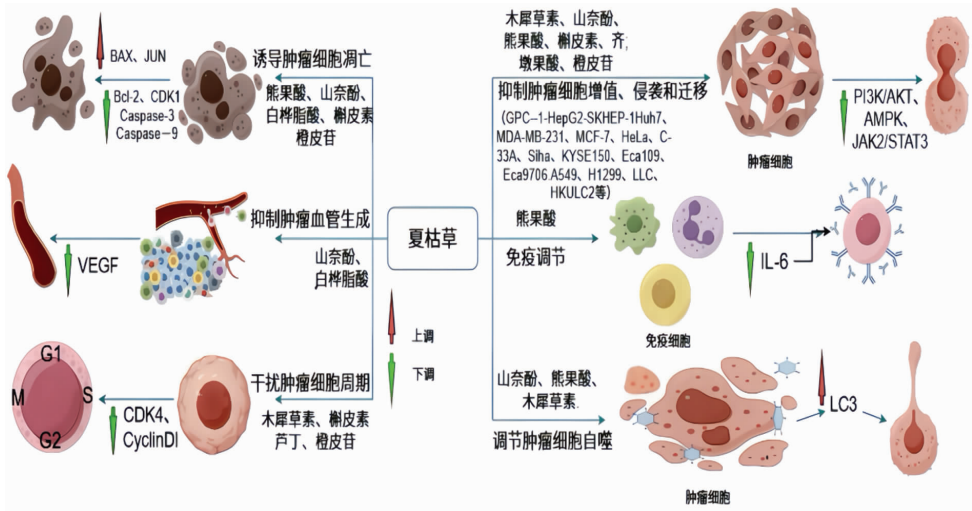
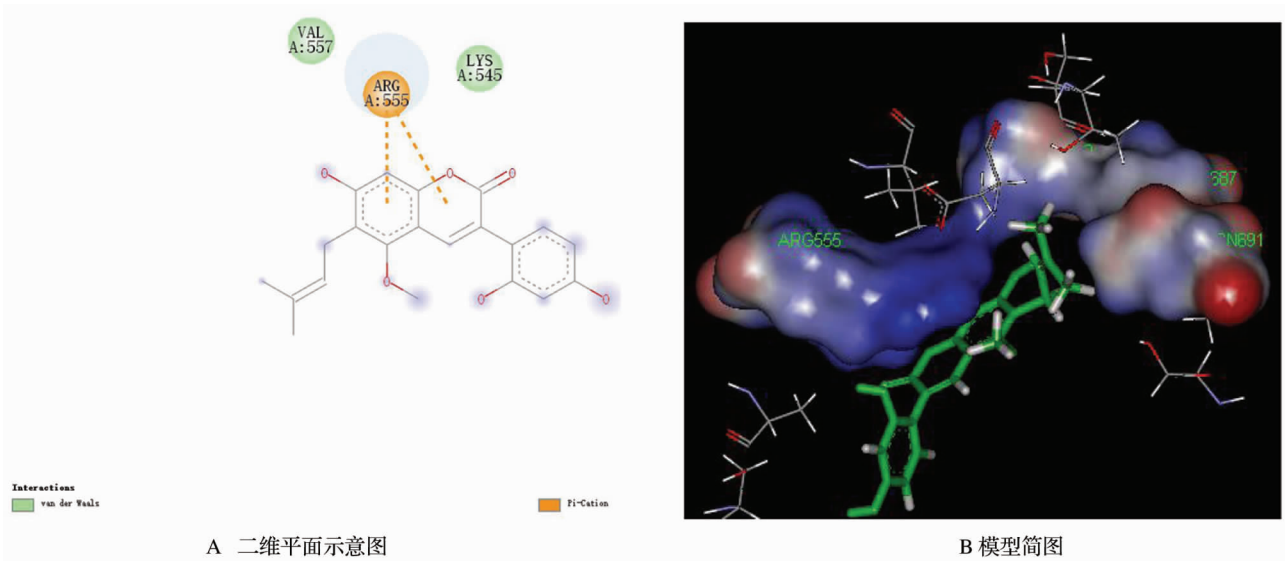


图 1　夏枯草抗肿瘤的作用机制

甘草香豆素抑制新型冠状病毒 RNA 聚合酶的实验研究及香豆素小分子的酶抑制活性预测

（正文见 33－35 页）



A　二维平面示意图　　B 模型简图

图 2　甘草香豆素与 RdRp 结合图

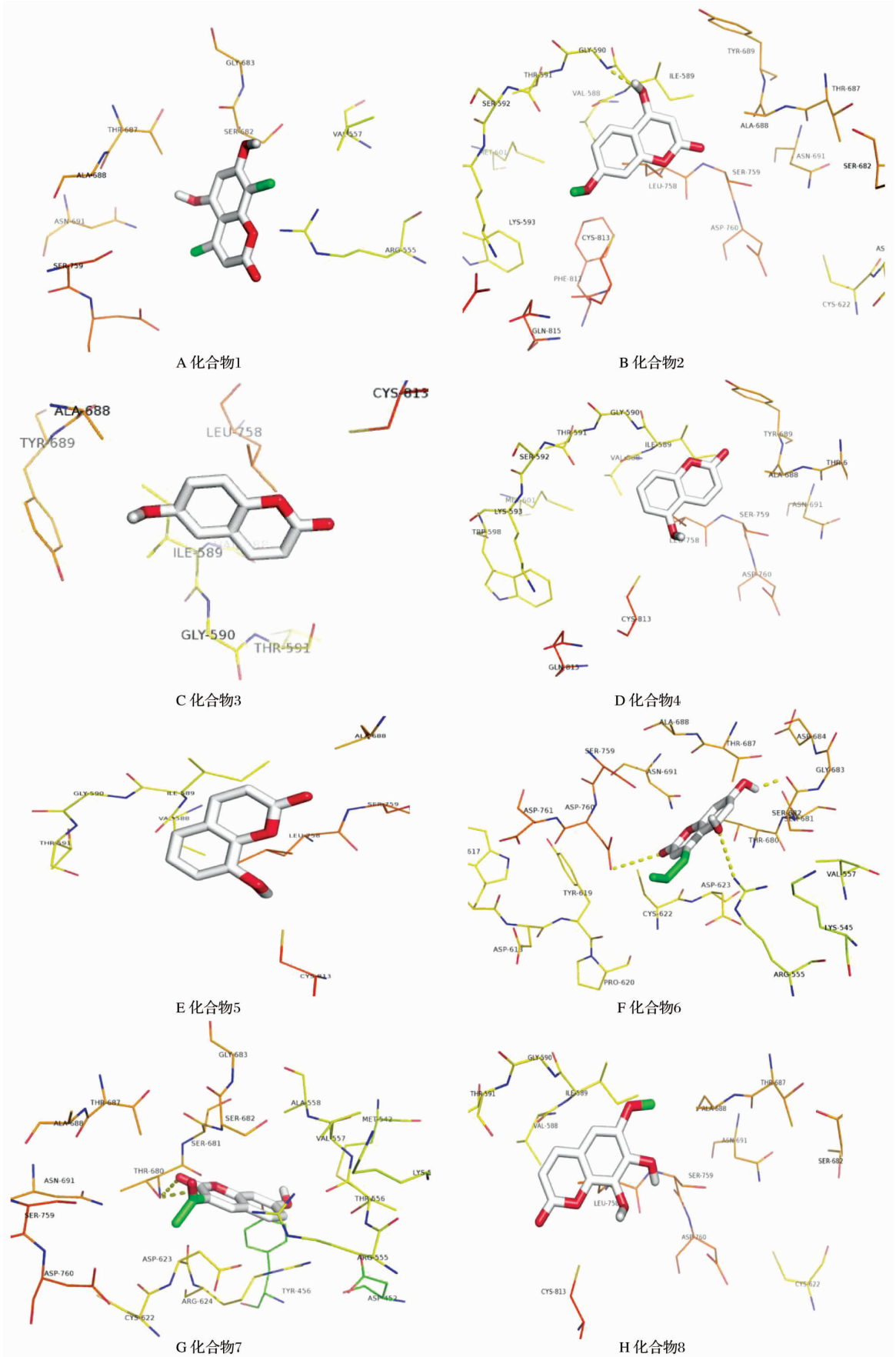


图 3 化合物与 RdRp 活性位点相互作用