

点击化学在中药活性成分靶点鉴定中的应用进展

李 根¹, 曹世杰^{2,3}, 张继超^{2,3}, 向雪花¹, 白 钢⁴, 邱 峰^{1,3*}

1. 天津中医药大学中药学院, 天津 301617

2. 天津中医药大学中医药研究院, 天津 300193

3. 天津中医药大学 天津市现代中药重点实验室, 天津 300193

4. 南开大学药学院, 天津 300353

摘 要: 靶点是中药活性成分在体内发挥作用的基础, 靶点确定是中药研发的关键, 然而目前关于中药作用靶点的揭示未能获得突破性进展, 已成为中药现代化进程中的瓶颈问题, 因此, 用于靶点研究的新思路与新技术亟需被开发。近年来, 以点击化学方法为代表的基于活性蛋白质组分析技术为中药活性成分作用靶点的研究提供了新的手段。对近年来点击化学在中药活性成分靶点鉴定领域中的应用进行简要的回顾和总结, 对其应用前景和发展趋势进行前瞻性的展望。

关键词: 点击化学; 靶点鉴定; 中药; 活性成分; 中药研发

中图分类号: R284; R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)04-0984-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.04.029

Applicatoin progress on click chemistry in targets identification of bioactive components from Chinese materia medica

LI Gen¹, CAO Shi-jie^{2,3}, ZHANG Ji-chao^{2,3}, XIANG Xue-hua¹, BAI Gang⁴, QIU Feng^{1,3}

1. School of Chinese Materia Medica, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

2. Institute of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

3. Tianjin State Key Laboratory of Modern Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

4. College of Pharmacy, Nankai University, Tianjin 300353, China

Abstract: The target is the basis for the active ingredients of Chinese materia medica (CMM), which plays an important role in the patients' body. Target identification is the key work for the development of CMM. However, the current studies on the target of CMM are still limited, and it has become a bottleneck in the modernization of CMM. Therefore, new ideas and new technologies are required for the research on targets. Recently, a new method for the study of targets has been provided by the technology of activity-based protein profiling represented by click chemistry. The application of click chemistry in target identification of CMM in recent years is briefly reviewed and summarized, and the trends of application and development of click chemistry are prospected in this review.

Key words: click chemistry; target identification; Chinese materia medica; bioactive components; development of Chinese materia medica

目前世界上已用于临床的单体药物有 1 000 多种, 其中约 48%是由基于中药或天然药物的有效成分研究开发得到的, 实践证明, 从中药或其他天然产物中发现有效成分, 筛选出具有显著药理活性的先导化合物, 结合构效关系及药动学研究进一步结

构修饰, 是一条研制新药的重要途径^[1]。近年来, 基于在结构新颖性、功能多样性以及生物相容性等方面具有的明显优势, 源于中药活性成分的药物已在临床应用于各类疾病, 如免疫性疾病、心血管疾病和恶性肿瘤等, 在新药研发及临床用药中占据重

收稿日期: 2018-12-10

基金项目: 天津市教委科研计划项目 (2018KJ004)

作者简介: 李 根 (1984—), 男, 山西平遥人, 讲师, 研究方向为中药活性成分靶点鉴定。Tel/Fax: (022)59596225 E-mail: ligen0725@163.com

*通信作者 邱 峰, 博士生导师, 教授。Tel/Fax: (022)59596223 E-mail: fengqiu20070118@163.com

要地位^[2]。其中中药活性成分的靶点研究是重要环节。中药活性分子与细胞内靶标相互作用,是其发挥功效的基础,明确其体内作用靶点,有助于药理机制的阐明及毒副作用的尽早发现,进而指导药物化学工作者在分子结构上进行针对性的优化改造,有利于提高药物的安全性及有效性,推动中药的国际化与现代化。然而,目前存在众多中药活性成分靶点及作用机制不明确的问题,阻碍了其进一步的开发应用及国际化进程^[3]。因此,对中药活性成分靶点进行鉴定已迫在眉睫,并具有重要的科学意义。本文主要综述了近年来点击化学(click chemistry)在中药活性成分靶点鉴定应用方面的研究进展。

1 “点击化学”在中药活性成分靶点鉴定中的优势

截至目前,小分子亲和色谱(small molecule affinity chromatography)技术及基于活性蛋白质组分析(activity-based protein profiling, ABPP)技术是应用最为广泛的中药活性成分及其他天然产物靶点鉴定中的常用策略。“靶点钩钓”技术是基于小分子亲和色谱法的常用方法^[4],是指基于药物分子可与蛋白质发生共价结合的原理,将药物分子通过化学反应连接到生物相容的惰性树脂(磁珠或琼脂糖凝胶)上,基于该树脂来钓取能与药物分子发生相互作用的蛋白质,最后经凝胶电泳分离纯化,高分辨质谱分析,进而确定该药物分子的靶蛋白^[5-9]。利用该技术,一系列中药活性成分的靶点被成功鉴定,例如,Tu 课题组分别构建了苏木酮 A 探针^[10]及野菊花内酯探针^[11],依次鉴定出苏木酮 A 的作用靶点

为肌苷 5-磷酸脱氢酶 2 (IMPDH2),菊花内酯发挥抗炎作用的靶蛋白为热休克蛋白 70 (HSP70),从靶点源头上揭示了中药活性成分的作用机制。

“靶点钩钓”策略是一种可操作性非常强的靶点鉴定技术,有力推动了中药药理机制的阐明,加快了中药现代化进程。该策略使用过程中如需引入位阻较大的亲和标签,则可能导致化合物的活性降低甚至丧失。随着生物正交化学反应的发展,由 Sharpless 于 2001 年提出的铜催化的叠氮-炔点击反应(click reaction)使这一问题得到了有效缓解,成为近年来应用最为广泛、研究最为热门的基于活性蛋白质组分析的靶点鉴定策略之一^[12]。

点击化学又称“链接化学”或“动态组合化学”,旨在通过小单元的拼接,来快速、可靠地完成各种类型分子的化学合成。该反应尤其强调开辟以碳-杂原子键(C-X-C)合成为基础的组合化学新方法,其代表反应为铜催化的叠氮-炔基的环加成反应。点击化学反应有如下优点:(1)可在细胞内发生,利于原位直接找到药物作用靶点;(2)合成反应快速、副产物对细胞无毒害;(3)操作简单、条件温和、对水与氧等环境不敏感。科学家们通过有机合成的方式在活性分子上引入炔烃等生物正交基团,在不影响其药理活性的前提下合成得到功能化衍生物,随后将该功能化衍生物与细胞共孵育,使其与靶标蛋白结合,最后利用点击反应再将叠氮修饰的报告基团(生物素或荧光)连接到探针-靶标蛋白复合物上,进而对靶标进行检测、富集和鉴定(图 1)^[13]。

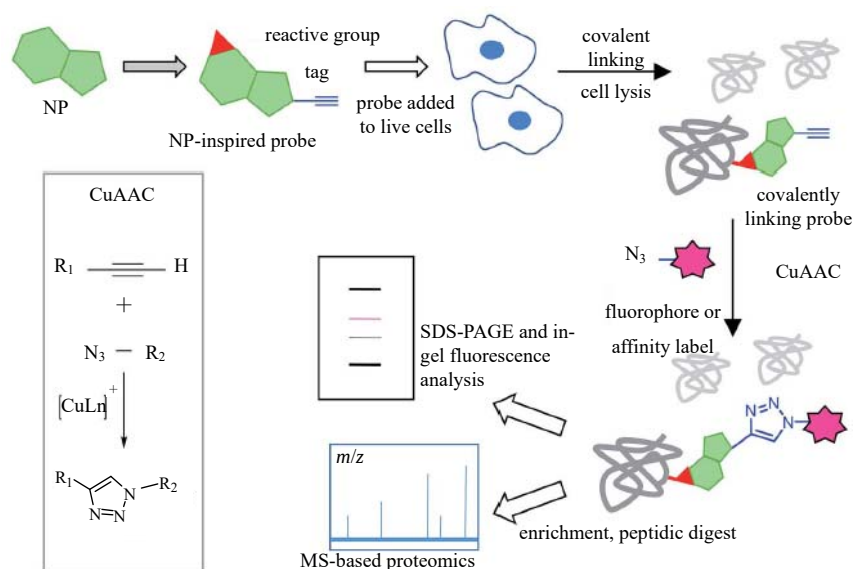


图 1 基于点击化学的天然产物靶点鉴定的方法

Fig. 1 Identification of natural products targets based on click chemistry

2 基于点击化学进行靶点鉴定的具体步骤与方法

采用点击化学的方式进行靶点鉴定, 通常需要 3 个步骤, 具体包括: (1) 小分子探针的设计与合成, 随后将该探针与细胞共孵育后实现与靶蛋白的

特定定位点发生共价结合; (2) 通过点击化学反应, 将已与靶蛋白发生共价结合的分子探针与报告基团相连 (图 2); (3) 对所识别的靶标进行纯化、富集和鉴定^[14]。

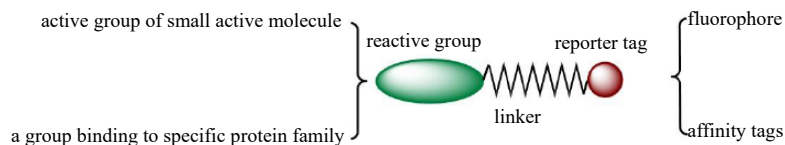


图 2 基于点击化学将分子探针的活性基团与报告基团的连接

Fig. 2 Connection of active group and reporter group of molecular probe based on click chemistry

2.1 小分子探针的设计与合成

在分子探针的设计环节, 重要的是要确保该探针与其母体化合物保持相似的生物活性。目前应用的小分子探针, 大多是在母体化合物的结构中引入炔基或叠氮得到的, 虽然两者都属于小基团, 但如果在母体化合物的活性位点引入该基团, 则会导致生物活性的降低甚至消失^[15]。因此, 在小分子探针合成之前, 需要对母体化合物的构效关系进行研究, 确保在母体化合物的非活性位点引入炔基或叠氮基团后, 得到的小分子探针的生物活性与母体相似。

最近研究表明, 炔基自身也具有潜在的生物活性, 可以对某些特定的酶产生抑制作用。例如, 丙炔胺可以是黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD) 依赖性酶的抑制剂, 在单胺氧化酶存在的条件下, FAD 辅因子通过与酶的活性位点-半胱氨酸残基共价结合形成复合物, 然后与丙炔胺发生共价结合从而抑制该酶的活性^[16]。此外, 末端炔基可以对 P450 酶产生一定的抑制作用, 末端炔基可以被 P450 酶氧化产生活性中间体——乙烯酮酶, 形成迈克尔加成的受体, 然后会迅速受到相邻的酶亲核进攻, 发生共价结合, 该发现已作为重要参考用于 P450 相关酶的分子探针的设计过程中^[17-18]。因此, 虽然炔基在大多数情况下是高度生物正交的, 但它们也是可以在体内与酶发生相互作用的, 分子探针合成之后需要通过药理学评价, 对其活性进行验证, 确保其与母体具有类似的生物活性。

2.2 报告基团

小分子探针合成并与靶蛋白共价结合后, 需要引入报告基团以便对探针所结合蛋白的富集进行检测。目前, 比较常用的报告基团有 2 种类型: (1) 荧光基团, 如罗丹明、荧光素等, 可与聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 结合, 对结合蛋白实现可

视化操作^[19]; (2) 亲和标签, 如生物素, 用于富集和鉴定结合蛋白^[20]。生物素作为靶标识别中最常用的报告基团, 被其标记的蛋白质易于链霉亲和素磁珠富集。由于设计合成的小分子探针通常是带有炔基或叠氮化物的点击式化学探针, 这些探针可以与它们的补体 (叠氮化物与炔基) 进行生物“点击”反应^[21]。因此, 通过各种形式的点击化学反应, 可以将已与靶蛋白共价结合的小分子探针与叠氮化物或炔基修饰的报告基团相连。由于炔基或叠氮化物属于较小基团, 引入该基团后除对分子探针生物活性影响小之外, 还使合成膜透性的探针成为可能, 以便在活细胞水平进行操作, 与连有较大的报告标签的探针相比具有明显的优势。

2.3 靶蛋白的鉴定与验证

在对所识别的靶蛋白进行鉴定之前, 需要通过聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 对富集的蛋白与对照条带之间进行对比, 通过考马斯亮蓝染色, 然后将具有差异化的条带通过质谱进行分析, 对比蛋白数据库, 找到有关的目标靶蛋白。目前质谱技术已经日益成熟, 但未能实现对完整的蛋白进行鉴定, 一般需要利用糜蛋白酶或者胰蛋白酶等特异性蛋白酶对待测蛋白进行酶解, 得到多肽片段, 然后进行鉴定, 间接达到鉴定蛋白的效果。目前, 鉴定该多肽片段方法主要有 2 种, 分别是肽指纹图谱分析 (peptide mass fingerprint)^[22]和肽序列标签分析 (peptide sequence tags)^[23], 其中前者主要通过检测获得的质谱数据与已经建立的数据库中的肽谱进行比对, 进而确定靶蛋白的名称; 后者也称为鸟枪蛋白质组学 (shotgun proteomics), 主要通过二级或多级质谱得到多肽的一级质谱以及多肽进一步裂解的图谱, 进而推测出酶解多肽的氨基酸序列, 最后通过数据库检索对靶蛋白进行鉴定。

在靶蛋白鉴定完成后需要进行靶标验证, 包含 2 方面的工作: (1) 活性分子与捕获的靶蛋白之间直接结合的证据; (2) 活性分子通过与靶蛋白相互作用是否能获得目标表型的生物或药理学功能。在基于点击化学的靶点垂钓中, 获得的靶蛋白的数目可能是数个、数十个甚至更多。首先需要通过多种空白或阴性对照实验, 对所识别的靶蛋白进行优化。然后, 采用酶联免疫 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、荧光极化以及核磁等方法进行结合验证。同时要通过活性配体的结合确定是否能对靶标进行活性调节, 验证该靶蛋白是否能具有目标表型的生物或药理学功能^[13]。目前主要通过干扰核糖核酸 (siRNA) 技术敲降所确定的靶点, 通过信号通路研究以及生物学整体效应进行验证。

3 点击化学在中药活性成分靶点鉴定中的应用

近年来, 点击化学的方法逐渐被广泛应用于天然产物领域的靶点鉴定中, 科学家们在蛋白质组层面解析了具有重要药理活性的中药活性分子及其他天然产物的作用靶标。依据反应条件的不

同, 目前已用于中药活性成分靶点鉴定的点击化学的类型包括铜催化的点击化学反应、环张力诱导的叠氮-炔基环加成反应以及光催化四氮唑-烯炔环加成反应等。

3.1 铜催化的点击化学

目前, 在靶点鉴定研究领域内使用最为广泛的点击化学为铜离子催化的叠氮和末端炔基之间的环加成反应 (copper catalyzed azide-alkyne cycloaddition, CuAAC), 是生物正交反应的典型代表。2002 年, Sharpless 课题组和 Meldal 课题组研究发现铜离子催化作用下的叠氮和炔基之间的环加成反应具有很快的反应速率, 相对于无金属催化的环加成反应快 1×10^6 倍以上^[24-25], 迄今为止这一反应已经在生物体系中得到了广泛的应用, 基于该方法, 科学家们首先合成了一系列基于中药活性分子的探针 (图 3), 随后采用点击化学的方法对其靶点进行了鉴定, 在蛋白质组层面解析了其作用靶标, 如芒果苷^[26]、穿心莲内酯^[27]、牛蒡子苷元^[28]、姜黄素^[29]、青蒿素^[30-31]、甘草次酸^[32]及鹤草酚^[33]等。

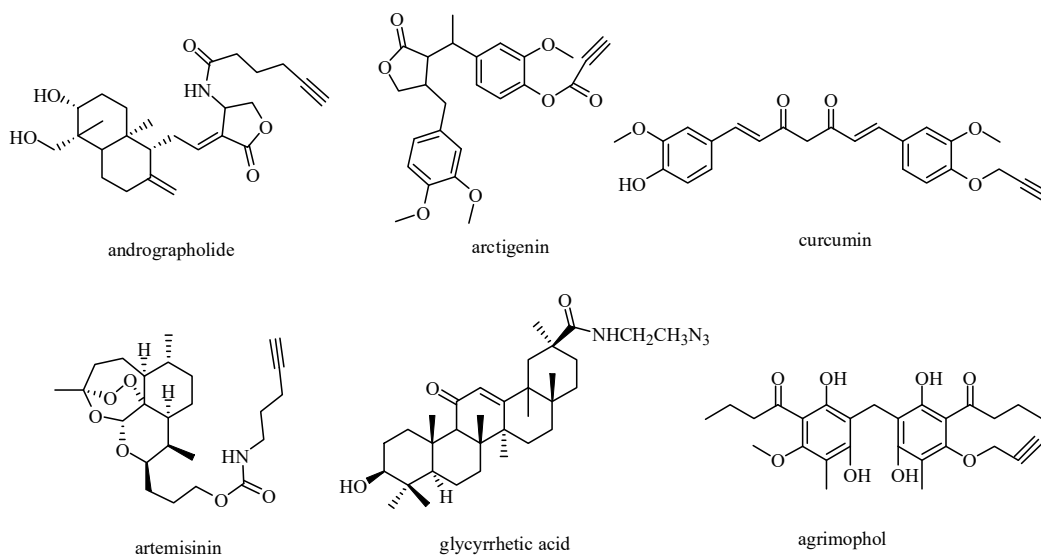


图 3 用于靶点蛋白鉴定的基于中药活性成分活性的生物正交探针

Fig. 3 Representative bio-orthogonal probes for target proteins identification based on active components of CMM

其中, Wang 等^[26]利用点击化学反应, 将芒果苷与磁球进行连接, 随后将脂多糖诱导的小鼠肺炎模型中的炎症组织进行裂解, 将连接有芒果苷的磁球与炎症组织裂解后的蛋白结合, 最后通过质谱分析找到芒果苷发挥抗炎作用的靶点 Hspa5 和 Ywhae (图 4); Lin 课题组^[27]将炔基引入穿心莲内酯得到小分子探针, 然后采用点击化学结合同位素标记相对

和绝对定量 (isobaric tags for relative and absolute quantification, iTRAQ) 技术对其作用靶点进行了鉴定; 崔庆新^[28]制备了叠氮修饰的聚乙烯醇磁球和炔基化修饰的牛蒡子苷元, 通过点击化学反应, 针对人支气管上皮细胞开展了捕获牛蒡子苷元靶蛋白的研究, 结果显示, 牛蒡子苷元抗炎靶点可能为磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 (PDPK1); Wang 等^[29]以叠氮修

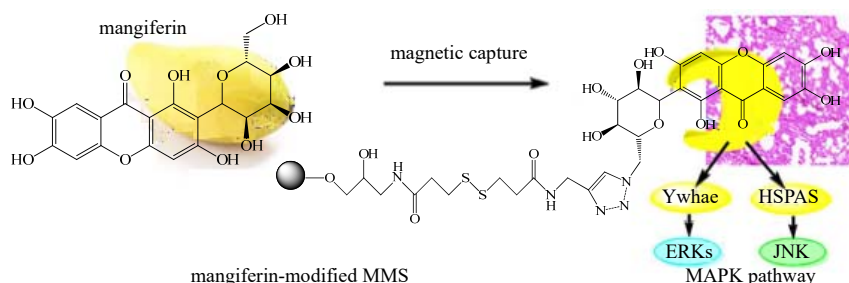


图 4 基于铜催化点击化学的芒果苷作用靶点的鉴定

Fig. 4 Identification of mangiferin targets based on CuAAC

饰的姜黄素为小分子探针,通过点击化学的方式对姜黄素的抗癌靶点进行了鉴定;Wang 等^[30]和 Zhou 等^[31]利用炔基修饰的探针采用点击化学的方式分别解析了青蒿素抗癌以及抗疟相关的靶标蛋白;Nathan 课题组^[33]将炔基引入鹤草酚的结构中,随后采用点击化学的策略确定了 v3852 为其结核分枝杆菌中的结合蛋白。

3.2 环张力诱导的叠氮-炔基环加成反应

最近,为了避免使用铜离子带来的细胞毒性,一些新型点击反应被开发并用于中药活性成分靶点鉴定相关研究中,如环张力诱导的叠氮-炔基环加成反应 (strain promoted azide-alkynecycloaddition, SPAAC)。

该反应无需催化剂就能发生反应,也被称为无铜点击化学 (copperfree click chemistry) 反应^[34-40],目前该方法已被应用于青蒿素的研究中。Ismail 课题组^[41]为了研究青蒿素抗疟疾的作用机制,寻找其直接作用靶点,设计了铜催化的叠氮化物-炔基环加成和环张力诱导的叠氮化物-炔基环加成 2 种点击化学方法,并进行比较,实验结果显示环张力诱导的叠氮-炔基环加成反应有更高的灵敏性 (图 5)。

3.3 光催化四氮唑-烯炔环加成反应

四氮唑-烯炔之间在光催化作用下的环加成反应是一类新型光点击化学反应 (photoclick reaction),在紫外光的照射下,四氮唑会迅速产生

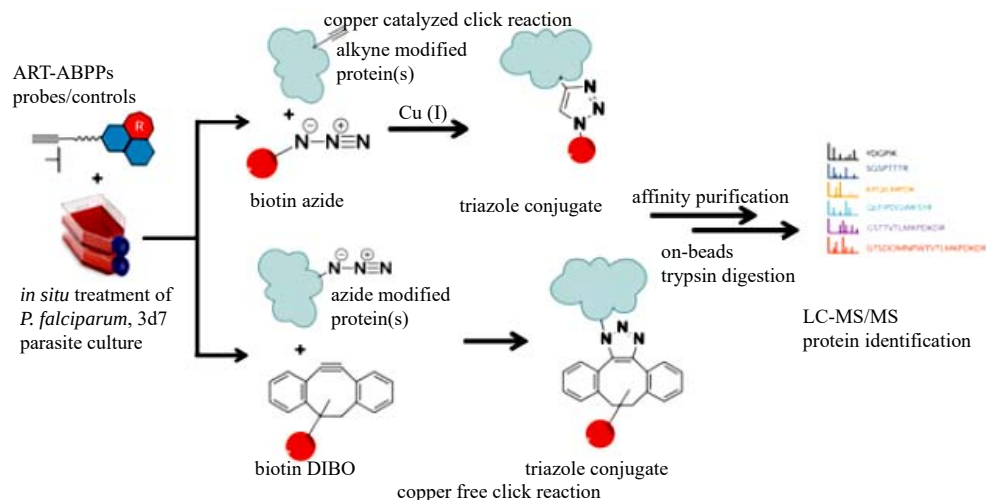


图 5 基于铜催化点击化学及无铜点击化学的青蒿素作用靶点的鉴定

Fig. 5 Identification of artemisinin targets based on CuAAC and SPAAC

1,3-偶极子这一活泼中间体,进而与烯炔进行环加成反应,生成稳定的连接产物 (图 6)^[42-44]。该反应过程中,四氮唑修饰的化合物在反应前处于荧光淬灭的状态,环加成反应结束后其荧光会自行恢复,这一特征有利于靶点的观察。Lin 课题组最近发现,在激光 (405 nm) 照射下,延胡索酸类似物与修饰的四氮唑之间能迅速发生 1,3-偶极环加成反应,将

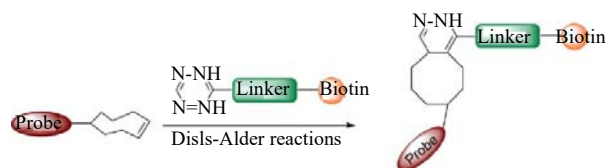


图 6 光催化四氮唑-烯炔环加成反应

Fig. 6 Inverse-electron demand Diels-Alder reactions between strained alkene and tetrazine

延胡索酸修饰的紫杉醇与含有四氮基团的类染料同时加入细胞中,通过光催化作用下的四氮唑-烯烃之间的点击化学反应可实现对微管的实时观察^[45-46]。

4 点击化学进行靶点鉴定的辅助技术

近年来,生化仪器与技术的兴起为靶点鉴定工作提供了更多的便利。例如,高分辨蛋白质谱技术的广泛应用有利于对蛋白质组进行高通量的定量鉴定。此外,将定量质谱技术应用于靶点鉴定过程,可进一步提升鉴定的准确性及效率。目前应用最为广泛的定量质谱技术有如下几种:串联质量标记(tandem mass tag, TMT)技术^[47]、同位素标签相对与绝对定量(isobaric tags for relative and absolute quantification, ITRAQ)技术^[48]及基于活细胞中氨基酸稳定同位素标记(stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC)技术^[49]等,目前 SILAC 已成为主流技术应用于中药活性成分及其他天然产物靶点鉴定中。此外,随着结构生物学与计算化学的不断发展,越来越多的靶点鉴定方法被科学家们尝试建立,可以对点击化学的靶点鉴定结果进行预测或验证。例如,反向分子对接(inverse docking)技术^[50],该方法以化学修饰后的活性小分子化合物为探针,通过软件搜寻已有数据库内结合力高的蛋白,进一步研究探针与靶蛋白之间的相互作用,进而对药物潜在的靶点进行预测^[51-52]。

5 结语

中药在我国具有上千年的悠久历史,是我国传统文化的瑰宝,然而,中药存在“多靶点、多成分”的作用模式,关于中药活性成分的靶点鉴定是具有挑战性的难题,制约了中药现代化及国际化进程,因此,中药活性成分的靶点鉴定及相关研究在中药研发领域具有重要的科学意义和实用价值。近年来,点击化学在靶点鉴定方面取得了飞速的发展,该方法的应用可以更加明确地揭示中药活性成分的作用靶点,为作用机制以及可能的毒副作用研究奠定基础,从而为从分子水平上进行中药研发提供重要的理论指导,有效解决中医药现代化进程中的瓶颈问题。作为一种简单、高效的有效手段,点击化学在中药来源的天然药物开发过程中有着重要的学术意义和广阔的应用前景。

点击化学虽然具有许多优势,但也存在一定的局限性,如一些中药活性成分与靶点之间并非是牢固的共价结合,而是微弱、瞬时的相互作用,采用目前的点击化学方式难以发现此类中药活性成分的

作用靶点,对此,需要开发具有更高灵敏度的方法。因此,深入研究该技术,进一步开发新的点击化学反应,将会挖掘出更大的价值,对中医药的发展产生重要的推动作用。

参考文献

- [1] 郭颖,郭宗儒. 个性化操作:天然产物的结构改造[J]. 中国新药杂志, 2014, 23(7): 753-758.
- [2] 周怡青,肖友利. 活性天然产物靶蛋白的鉴定[J]. 化学学报, 2018, 76(3): 177-189.
- [3] 杨燕,田成旺. 现代中药发展的几个关键问题[J]. 中草药, 2016, 47(18): 3346-3350.
- [4] 曾克武,廖理曦,屠鹏飞,等. 基于靶点“钩钓”策略的肉苁蓉苯乙醇苷药理靶点鉴定及功效解析[J]. 中草药, 2018, 49(1): 173-178.
- [5] Liu C X, Yin Q Q, Zhou H C, et al. Adenanthin targets peroxiredoxin I and II to induce differentiation of leukemic cells[J]. *Nat Chem Biol*, 2012, 8(5): 486-493.
- [6] Dong T, Li C, Wang X, et al. Ainsliadimer A selectively inhibits IKK alpha/beta by covalently binding a conserved cysteine[J]. *Nat Commun*, 2015, 6(3): 6522-6534.
- [7] Li D, Li C, Li L, et al. Natural product kongensin A is a non-canonical HSP90 inhibitor that blocks RIP3-dependent necroptosis[J]. *Cell Chem Biol*, 2016, 23(2): 257-266.
- [8] Kong L M, Deng X, Zuo Z L, et al. Identification and validation of p50 as the cellular target of eriocalyxin B[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(22): 11354-11364.
- [9] Liu L, Hua Y, Wang D, et al. A sesquiterpene lactone from a medicinal herb inhibits proinflammatory activity of TNF-alpha by inhibiting ubiquitin-conjugating enzyme UbcH5[J]. *Chem Biol*, 2014, 21(10): 1341-1350.
- [10] Liao L X, Song X M, Wang L C, et al. Highly selective inhibition of IMPDH2 provides the basis of antineuroinflammation therapy[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2017, 114(29): 5986-5994.
- [11] Wang L C, Liao L X, Lv H N, et al. Highly selective activation of heat shock protein 70 by allosteric regulation provides an insight into efficient neuroinflammation inhibition[J]. *Ebiomedicine*, 2017, 23(9): 160-172.
- [12] Kolb H, Finn M, Sharpless K B. Click chemistry: Diverse chemical function from a few good reactions[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2001, 40(11): 2004-2012.
- [13] Wright M, Sieber S. Chemical proteomics approaches for identifying the cellular targets of natural products[J]. *Nat Prod Rep*, 2016, 33(5): 681-708.
- [14] Chen X, Wong Y, Wang J, et al. Target identification with

- quantitative activity based protein profiling (ABPP) [J]. *Proteomics*, 2017, 17(2): 3-4.
- [15] Lehmann J, Wright M H, Sieber S A. Making a long journey short: Alkyne functionalization of natural product scaffolds [J]. *Chem Eur J*, 2016, 22(14): 4666-4678.
- [16] Krysiak J M, Kreuzer J, Macheroux P, et al. Activity-based probes for studying the activity of flavin-dependent oxidases and for the protein target profiling of monoamine oxidase inhibitors [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2012, 51(28): 7035-7040.
- [17] Ekkebus R, van Kasteren S R, Kulathu Y, et al. On terminal alkynes that can react with active-site cysteine nucleophiles in proteases [J]. *J Am Chem Soc*, 2013, 135(8): 2867-2870.
- [18] Lanning B R, Whitby L R, Dix M M, et al. A road map to evaluate the proteome-wide selectivity of covalent kinase inhibitors [J]. *Nat Chem Biol*, 2014, 10(9): 760-767.
- [19] Wang C, Chen N. Activity-based protein profiling [J]. *Acta Chim Sin*, 2015, 73(1): 657-668.
- [20] Ziegler S, Pries V, Hedberg C, et al. Target identification for small bioactive molecules: Finding the needle in the haystack [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2013, 52(10): 2744-2792.
- [21] Zhao X, Li G, Liang S. Several affinity tags commonly used in chromatographic purification [J]. *J Anal Methods Chem*, 2013, 2013: 1-8.
- [22] Li Y Y, Zhuang Y P. fmpRPMF: A web implementation for protein identification by robust peptide mass fingerprinting [J]. *IEEE ACM Trans Comput Biol Bioinform*, 2018, 15(5): 1728-1731.
- [23] Wilson D, Daly N L. Nuclear magnetic resonance seq (NMRseq): A new approach to peptide sequence tags [J]. *Toxins*, 2018, 10(11): 437-447.
- [24] Lewis W, Green L, Grynszpan F, et al. Click chemistry in situ: Acetylcholinesterase as a reaction vessel for the selective assembly of a femtomolar inhibitor from an array of building blocks [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2002, 41(6): 1053-1057.
- [25] Lewis W, Magallon F, Fokin V, et al. Discovery and characterization of catalysts for azide-alkyne cycloaddition by fluorescence quenching [J]. *J Am Chem Soc*, 2004, 126(30): 9152-9153.
- [26] Wang J, Nie Y, Bai G, et al. Identification of target proteins of mangiferin in mice with acute lung injury using functionalized magnetic microspheres based on click chemistry [J]. *J Agric Food Chem*, 2015, 63(45): 10013-10021.
- [27] Wang J, Tan X, Lin Q, et al. A quantitative chemical proteomics approach to profile the specific cellular targets of andrographolide, a promising anticancer agent that suppresses tumor [J]. *Mol Cell Proteom*, 2014, 13(3): 876-886.
- [28] 崔庆新. 基于化学生物学的中药有效成分牛蒡子苷元等的靶点及体内分布研究 [D]. 天津: 南开大学, 2014.
- [29] Wang J, Zhang J, Lin Q, et al. In situ proteomic profiling of curcumin targets in HCT116 colon cancer cell line [J]. *Sci Rep*, 2016, 6(2): 1-8.
- [30] Wang J, Zhang C, Lin Q, et al. Haem-activated promiscuous targeting of artemisinin in *Plasmodium falciparum* [J]. *Nat Comm*, 2015, 6(12): 1-11.
- [31] Zhou Y, Li W, Xiao Y. Profiling of multiple targets of artemisinin activated by hemin in cancer cell proteome [J]. *ACS Chem Biol*, 2016, 11(4): 882-888.
- [32] Hou J, Shi Q, Bai G, et al. A novel approach for fluorescent visualization of glycyrrhetic acid on a cell with a quantum dot [J]. *Biochemistry*, 2014, 7(1): 25-30.
- [33] Zhao N, Sun M, Burns-Huang K, et al. Identification of Rv3852 as an agrimophol-binding protein in mycobacterium tuberculosis [J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): 1-16.
- [34] Sletten E, Sletten C. A hydrophilic azacyclooctyne for Cu-free click chemistry [J]. *Org Lett*, 2008, 10(14): 3097-3099.
- [35] Ning X, Temming R, Dommerholt J, et al. Protein modification by strain-promoted alkyne-nitrone cycloaddition [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2010, 49(17): 3065-3067.
- [36] Debets M, Berkel S, Schoffelen S, et al. Azadibenzocyclooctynes for fast and efficient enzyme PEGylation via copper-free (3+2) cycloaddition [J]. *Chem Commun*, 2010, 46(1): 97-99.
- [37] Dommerholt J, Schmidt S, Temming R, et al. Readily accessible bicyclononynes for bioorthogonal labeling and three-dimensional imaging of living cells [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2010, 49(49): 9422-9425.
- [38] Jewett J, Sletten E, Bertozzi C. Rapid Cu-free click chemistry with readily synthesized biarylazacyclooctynones [J]. *J Am Chem Soc*, 2010, 132(11): 3688-3690.
- [39] Sletten E, Nakamura H, Jewett J. Bertozzi difluorobenzocyclooctyne: Synthesis, reactivity, and stabilization by beta-cyclodextrin [J]. *J Am Chem Soc*, 2010, 132(33): 11799-11805.
- [40] Almeida G, Sletten E, Nakamura H, et al. Thiacycloalkynes for copper-free click chemistry [J].

- Angew Chem Int Ed*, 2012, 51(10): 2443-2447.
- [41] Ismail H, Barton V, Phanchana M, *et al.* Artemisinin activity-based probes identify multiple molecular targets within the asexual stage of the malaria parasites *Plasmodium falciparum* 3D7 [J]. *P Natl Acad Sci*, 2016, 113(8): 2080-2085.
- [42] Li Z, Qian L, Li L, *et al.* Tetrazole photoclick chemistry: Reinvestigating its suitability as a bioorthogonal reaction and potential applications [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2016, 55(6): 2002-2006.
- [43] Song W, Wang Y, Lin Q. Selective functionalization of a genetically encoded alkene-containing protein via "photoclick chemistry" in bacterial cells [J]. *J Am Chem Soc*, 2008, 130(30): 9654-9655.
- [44] Yu Z, Pan Y, Lin Q, *et al.* Genetically encoded cyclopropene directs rapid, photoclick-chemistry-mediated protein labeling in mammalian cells [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2012, 51(42): 10600-10604.
- [45] An P, Yu Z, Lin Q. Design of oligothiophene-based tetrazoles for laser-triggered photoclick chemistry in living cells [J]. *Chem Commun*, 2013, 49(85): 9920-9922.
- [46] Yu Z, Q Lin. Design of spiro [2.3] hex-1-ene, a genetically encodable double-strained alkene for superfast photoclick chemistry [J]. *J Am Chem Soc*, 2014, 136(11): 4153-4156.
- [47] Prakash A S, Kabli A M, Bulleid N. Mix-and-match proteomics: Using advanced iodoacetyl tandem mass tag multiplexing to investigate cysteine oxidation changes with respect to protein expression [J]. *Anal Chem*, 2018, 90(24): 14173-14180.
- [48] Wang J, Wong Y K, Zhang J. Drug target identification using an iTRAQ-based quantitative chemical proteomics approach-based on a target profiling study of andrographolide [J]. *Proteomics*, 2017, 586(12): 291-309.
- [49] Sobota R M. Analysis of the global changes in SH₂ binding properties using mass spectrometry supported by quantitative stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC) technique [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1555(1): 419-428.
- [50] 涂 浩, 屈素君, 段 丽, 等. 基于计算机辅助设计的竹节参总皂苷改善 HepG2 细胞脂质代谢的作用及机制研究 [J]. 中草药, 2018, 49(8): 1835-1840.
- [51] 任文明. 基于活性分子设计的小分子探针及生物学研究 [D]. 上海: 中国科学院上海药物研究所, 2016.
- [52] Arvind N, Nitisha B, Bharti S, *et al.* Kumar inverse docking based screening and identification of protein targets for cassiarin alkaloids against *Plasmodium falciparum* [J]. *Syud Pharm J*, 2018, 26(4): 546-567.