

中药活性成分直接作用靶点鉴定研究方法及应用

魏君楠, 戴建业*

兰州大学药学院, 甘肃 兰州 730000

摘要: 中药因其确切的临床疗效受到越来越多的关注。随着对中药活性成分的深入研究, 现已发现很多具有独特活性和药效的潜在创新药物。然而, 如何进一步对其药效机制进行挖掘、发现全新的机制和靶点, 成为创新中药研究的关键。中药活性成分靶点鉴定一直是研究者们所探寻的重要课题。随着化学生物学技术尤其是化学蛋白质组学技术的发展, 越来越多的方法被建立并用于中药活性成分的靶点鉴定。简单来说, 这些方法大致可被分为标记法和非标记法。标记法是通过将中药活性成分改造为活性探针, 进而探寻它们的作用靶标蛋白; 而非标记法主要是基于中药活性成分和靶标蛋白结合后会影响靶标蛋白的热稳定性等生物物理性质从而识别可能的作用靶点。主要针对这 2 大类靶点鉴定方法进行归纳整理, 从方法原理、大致操作流程、应用、优缺点等方面进行阐述, 为中药活性成分靶点鉴定提供一定的参考, 以期助力中药创新研究。

关键词: 中药活性成分; 靶点鉴定; 标记法; 非标记法; 活性探针

中图分类号: R285.52 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2021)17-5378-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.17.030

Research method and application for identifying direct target of bioactive components from traditional Chinese medicine

WEI Jun-nan, DAI Jian-ye

College of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

Abstract: Chinese herbal medicine has been paid more and more attention because of its exact clinical efficacy. With the in-depth study of the bioactive components of Chinese herbal medicine, many potential innovative drugs with unique activity and efficacy have been discovered. However, how to further explore the pharmacodynamic mechanism and discover new mechanisms and targets has become the key to the original innovative research of Chinese herbal medicine. The target identification of bioactive components in Chinese herbal medicine has always been an important topic that researchers have been exploring. With the development of chemical biology technology, especially chemical proteomics technology, more and more methods have been established for the identification of bioactive components in Chinese herbal medicine. These methods mainly include labeling and non-labeling methods. The labeling method is to transform the bioactive components into active probes, and then explores their target proteins, while the non-labeling method is mainly based on the biophysical properties such as the thermal stability of target proteins which will be affected by the combination of bioactive components of Chinese herbal medicine and target proteins, so as to identify possible targets. In this paper, these two kinds of target identification methods are summarized and elaborated from the aspects of principle, general operation process, application, advantages and disadvantages, etc., which provide a certain reference for the target identification of bioactive components, and expect to help the original innovative research of Chinese herbal medicine.

Key words: active components of Chinese herbal medicine; target identification; labeling method; label-free method; active probes

药物的原始创新研究一直备受关注。中药作为瑰宝, 应该成为药物原始创新研究的宝库。如何将经过长期临床验证的具有完整理论体系的中华文化 现有临床用药经验以及理论转化为药物创新的动

收稿日期: 2021-08-06

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFC17063005); 甘肃省科技计划重点项目 (20JR10RA586); 中央高校基本业务项目 (lzujbky-2021-kb40); 陇原青年创新创业人才项目

作者简介: 魏君楠 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向为化学生物学。E-mail: weijn19@lzu.edu.cn

*通信作者: 戴建业, 沈阳药科大学 72 期药物制剂专业校友, 陇原青年创新创业人才, 教授, 博士生导师, 研究方向为药效评价以及分子机制研究。E-mail: daijy@lzu.edu.cn

力,成为中医药研究者必须面对的问题。中药具有多成分、多靶点的特点,而中药活性成分是中药中具有医疗效用或生理活性的单体化合物,是中药研发的重要来源。靶点是中药活性成分发挥作用的基础^[1]。中药活性成分通过靶向作用于体内的生物大分子,调节其生物活性,进而调控靶点分子下游的细胞信号通路,扰动疾病网络,从而预防和治疗疾病^[2],因此明确中药活性成分作用靶点是中药研发的关键。中药具有广泛的适应症,若可以精确关联中药活性成分及其适应症,再对中药活性成分进行深入的机制研究及靶点注释,将“中药-活性成分-靶点”串联起来,将有望突破现有知识体系的限制,发现全新机制和靶点,推动原始创新药物研究,为疾病治疗提供新策略。

原始创新药物研究的关键是发现全新的机制和靶点,而对具有已知药效的中药活性成分直接作用靶点进行鉴定将具有事半功倍的效果。一直以来,中药及其活性成分的靶点鉴定是学者们持续关注且致力探索的领域,但鉴于未知小分子-蛋白相互研究方法的缺失,中药活性成分靶点鉴定面临严峻挑战。随着化学生物学、生物物理学等技术的发展,药物靶标识别和机制的阐明取得了重大进展,对揭示中药药效机制以及与全新靶点的理性设计至关重要^[3]。目前中药活性成分靶点主要是蛋白靶点,活性成分蛋白靶点鉴定的方法可分为标记法和非标记法。本文将从这 2 个方面展开解析,为中药活性分子靶点鉴定的研究提供借鉴。

1 基于标记法对活性成分靶点进行鉴定

标记法是通过化学改造,将中药活性成分改造成具有标记能力的探针,进而通过荧光成像或富集技术,对其作用靶点蛋白进行鉴定。最传统的方法是亲和色谱-蛋白质组学联用法,其大致流程为对活性成分进行结构改造,引入生物素与细胞裂解液共孵育,当药物与其靶标蛋白形成稳定结合后,利用一定固载方式(如琼脂糖珠等)进行富集,最后通过变性或竞争实验将结合蛋白洗脱下来进行鉴定。对于亲和色谱法来说,主要存在 2 个缺陷:第 1 个是需要区分真正的高亲和力靶标蛋白质与低亲和力但丰度高的蛋白质;第 2 个是洗脱过程依赖经验,洗涤条件过强会大大减少鉴定到的靶点数,而洗脱条件过弱则会出现假阳性结果,同时琼脂糖珠上的非特异性吸附也会造成假阳性结果^[4]。由此,化学和生物学家们一直在发展同时适用于低丰度或者结

合力相对弱的靶点鉴定方法,其中最突出、实用的是基于活性的蛋白质分析(activity-based protein profiling, ABPP)^[5]。ABPP 由美国 Scripps 研究所 Cravatt 课题组首次提出,该方法的核心是设计 1 个可以在蛋白质组水平上与蛋白活性中心共价或非共价反应的“活性分子探针(activity-based probe, ABP)”。

ABP 主要包括 2 部分:第 1 部分是反应基团即活性基团,反应基团是活性分子探针的核心,决定了在蛋白质组学中与其反应的蛋白种类以及氨基酸残基,对于某些反应基团可以选择性地与蛋白质组中某一类蛋白酶的活性中心结合,并与其中执行重要功能的亲核氨基酸发生共价反应,将探针与靶标蛋白牢牢地结合在一起^[6];但对于无法和靶标蛋白共价结合的探针,就需要引入光交联基团将非共价作用转化为共价作用,这种技术称为光亲和标记(photoaffinity Labeling, PAL)^[7]。PAL 基本思路是在化合物中引入光交联基团^[8],常用的光交联基团包括二苯甲酮、芳香叠氮、双吡丙啶^[9]。通过 PAL 技术可以帮助标记细胞或者细胞裂解液中低丰度或与探针亲和力较弱的靶标蛋白,也可以标记膜上受体等通常方法不易鉴定的蛋白质^[10]。第 2 部分是报告基团,报告基团主要包括罗丹明、荧光素等荧光基团以及生物素。罗丹明等荧光基团可以实现对靶标蛋白的可视化、高通量检测;生物素可以通过与链霉亲和素(streptavidin, SA)反应实现对靶标蛋白的富集,然后进行生物质谱分析。此外,将 ABPP 与细胞培养中氨基酸稳定同位素标记、同位素二甲基化标记等技术联用,可以实现对照组和实验组间的直接蛋白定量^[11]。

在基于标记法对活性成分靶点进行鉴定的过程中最重要的是对活性成分的结构进行修饰,化合物活性探针的构建主要包括通过引入生物素标签构建活性成分探针、通过引入炔基或叠氮构建活性成分探针以及针对活性氨基酸残基的分子探针。

1.1 通过引入生物素标签构建活性成分探针

该方法的大致思路是通过活性成分结构进行修饰,引入生物素分子标签作为报告基团构建靶标-化合物-标签,用 SA 进行富集从而实现活性成分靶标的富集以及鉴定。生物素广泛存在于动植物的组织中,生物素分子主要由 2 部分组成:一部分是与亲和素结合的咪唑酮环,另一部分是噻吩环,噻吩环的 C-2 位上连有戊酸侧链,可以通过对戊酸侧链

的改造从而将其引入到活性成分中。亲和素是从卵白蛋白中提取的一种由 4 个相同亚基组成的碱性糖蛋白,生物素和亲和素之间存在天然的特异性强相互作用,此外 1 个生物素可以与 4 个亲和素结合,这一特点可以用于构建 1 个多层次信号放大系统^[12]。但由于亲和素带有 1 个糖链侧链,容易和细胞表面的多糖发生非特异性亲和,因此又开发出 SA,SA 由完全相同的 4 条肽链组成,1 个生物素仍然可以和 4 个 SA 结合,但是其没有糖基侧链,从而避免了与膜表面的多糖发生特异性结合^[13]。该法极大地减少了后续实验操作步骤,还可以通过改变小分子与生物素之间的连接基团,有效地调整探针的脂溶性以及水溶性。

Zhu 等^[14]报道了雷公藤红素可以通过抑制抵抗性炎症改善高脂饮食诱导的代谢综合征,其通过对雷公藤红素结构进行修饰在其羧基端引入生物素,构建 Cel-biotin 分子探针,之后和标记的核糖核酸亲和纯化(tagged RNA affinity purification, TRAP)技术联用,发现雷公藤红素可以与腺苷酸环化酶相关蛋白 1(cyclase associated protein 1, CAP1)结合,抑制 CAP1 与抵抗素的相互作用,从而抑制环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)-蛋白激酶 A(protein kinase A, PKA)-核转录因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)信号通路,改善高脂饮食诱导的小鼠代谢综合征。Zhao 等^[15]合成了生物素化的雷公藤甲素和荧光菁标记的雷公藤甲素,以富集和可视化雷公藤甲素靶标蛋白,发现雷公藤甲素可以靶向过氧化物酶 I(peroxiredoxin I, Prx I)。Prx I 是一种具有双重功能的蛋白质,既作为抗氧化酶又作为分子伴侣,在肿瘤和炎症发展中起着重要作用。雷公藤甲素可以与在维持 Prx I 的十聚体结构和伴侣活性中起关键作用的 83 和 173 位半胱氨酸特异性地结合,触发 Prx I 的高相对分子质量低聚物的解离,从而以剂量相关性的方式抑制其伴侣活性,但不抑制其过氧化物酶活性。Dong 等^[16]在 ainsliadimer A 羟基位引入生物素进行靶标蛋白的钓取,ainsliadimer A 含有 α,β -不饱和烯酮,可以与靶标蛋白中的半胱氨酸残基上巯基发生迈克尔加成反应从而实现小分子和靶标蛋白的共价结合;通过生物素-ainsliadimer A 探针富集到了 I κ B 激酶抑制剂 α/β (inhibitor of I κ B kinase α/β , IKK α/β)蛋白,ainsliadimer A 可以选择性地与 IKK α/β 46 位半胱氨酸残基结合,通过变构效应抑制它们的活性,从

而抑制 NF- κ B 信号通路,进而诱导癌细胞死亡并抑制体内肿瘤生长以及内毒素介导的炎症反应。Liu 等^[17]对腺花香茶菜中的活性二萜化合物腺花素进行结构改造,在其活性羟基端引入了生物素构建腺花素探针,利用此探针钓取到靶标蛋白过氧化物酶(Prx I 和 Prx II),腺花素通过靶向 Prx I 和 Prx II 的半胱氨酸,抑制该过氧化物酶活性提高细胞内过氧化氢水平,激活细胞外信号调节激酶,上调 CCAAT/增强子结合蛋白 β 转录水平,从而诱导急性早幼粒细胞白血病细胞的分化并抑制肿瘤生长。Statsuk 等^[18]对海洋天然产物 bistramide A 进行结构修饰引入生物素,通过 SA 基质进行靶点富集,质谱分析发现肌动蛋白(actin)是 bistramide A 的细胞受体,可以直接与单体 G-actin 以 1:1 比例结合从而破坏 actin 的细胞骨架,抑制 actin 聚合,在体外解聚合丝状 F-actin,从而抑制细胞增殖。

1.2 通过引入炔基或叠氮构建活性成分探针

通过对化合物结构进行修饰引入长链生物素来进行靶标蛋白的富集,其缺点在于生物素相对分子质量较大,会在一定程度上影响化合物的脂溶性使其不易进入细胞,此外也会因空间位阻较大影响化合物与靶标蛋白的结合。为了减小生物素等报告基团对化合物的影响实现生理条件下的标记,点击化学-ABPP(click chemistry-ABPP, CC-ABPP)应运而生,该技术的原理为在尽可能小地改变化合物生理活性的前提下引入相对分子质量较小的炔基或者叠氮,利用铜催化的叠氮-炔基环加成反应(copper catalyzed azide-alkyne cycloaddition, CuAAC)或者环张力诱导的叠氮-炔基环加成反应(strain promoted azide-alkyne cycloaddition, SPACC)等生物正交反应,将生物素、荧光素等其他报告基团连接在探针上实现对化合物靶标蛋白的富集以及可视化,这种方式使得探针能够更好地模拟小分子在细胞内的作用模式^[19]。

Wang 等^[20]在青蒿素上连接 1 个炔基,合成了 1 个与青蒿素有相同活性和结合位点的探针,用以检测青蒿素在治疗疟疾过程中的靶标蛋白和具体作用机制,共寻找到 124 个相关靶点蛋白,涉及疟原虫体内的各种通路;发现激活青蒿素的铁离子来源于血红素结合铁而非游离铁离子,青蒿素主要作用于疟原虫生命活动的后期而非初期。此外,合成了 1 个具有炔基的姜黄素探针,采用点击化学结合同位素标记相对的绝对定量(isobaric tags for relative and

absolute quantification, iTRAQ) 技术解析了姜黄素抗结肠癌的靶标蛋白, 从人结肠癌 HCT116 细胞中确定了 197 个蛋白作为姜黄素结合靶点, 这些靶点广泛分布于细胞核、线粒体和质膜中, 参与代谢过程、调控、刺激反应和细胞过程等多种生物学功能, 提示姜黄素通过作用于真核翻译起始因子 2 (eukaryotic translation initiation factor 2, EIF2)、EIF4/p70 核糖体蛋白 S6 激酶 (p70 ribosomal protein S6 kinase, p70S6K)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 信号通路和线粒体功能障碍通路等多个关键的生物学通路发挥抗癌作用, 进一步验证表明姜黄素可以通过下调细胞蛋白合成, 诱导自噬、激活溶酶体和增加活性氧产生, 从而导致细胞死亡^[21]。Dai 等^[22]针对黄芩中的主要成分黄芩苷改善饮食诱导的肥胖 (diet-induced obese, DIO) 和肝脂肪变性的靶标蛋白开展了深入研究, 通过对黄芩苷的结构修饰引入了二苯甲酮作为光交联基团, 以炔基为手臂构建了黄芩苷探针, 利用此探针确定了脂肪酸氧化控制酶肉毒碱棕榈酰基转移酶 1 (carnitine palmitoyltransferase 1, CPT1) 为黄芩苷的关键靶点, 黄芩苷选择性直接激活肝脏 CPT1, 加速脂质流入线粒体进行氧化, 从而改善 DIO 和肝脂肪变性。衣康酸是一种参与病原体巨噬细胞相互作用的抗炎代谢物, Qin 等^[23]开发了一种特异性的生物正交探针衣康酸酯炔, 用于炎性巨噬细胞中衣康酸结合的定量和位点特异性化学蛋白质组学分析, 在炎性巨噬细胞中鉴定了 1926 个衣康酸蛋白靶点, 包括 199 个超敏蛋白靶点; 此外, 位点特异性分析发现了 1131 个半胱氨酸位点, 包括参与炎症反应和宿主防御的关键蛋白。Zhao 等^[24]将炔基引入到鹤草酚中, 与叠氮生物素发生点击化学反应并被 SA 捕获, 找到了鹤草酚杀死结核分枝杆菌作用的关键靶点 Rv3852; Rv3852 是一个可预测的、体外结合 DNA 的膜蛋白, 等温滴定量热法证实鹤草酚与 Rv3852 之间存在配体-蛋白相互作用, 导致 Rv3852 的 DNA 结合功能被破坏从而杀死结核分枝杆菌。

1.3 针对活性氨基酸残基的分子探针

由于要参与催化反应, 蛋白酶活性中心的氨基酸残基通常是内在化学性质较为活泼的氨基酸^[6], 针对不同的氨基酸残基相继开发出具有专一性的小分子探针, 此外探针中不同类别的活性碳亲电体在蛋白质组中也显示出迥然不同的氨基酸偏好。

Weerapana 等^[25]合成了一些带有不同亲电基团的分子探针, 不同种类的碳亲电试剂在蛋白质组中表现出明显不同的氨基酸标记谱。2-氯-N-(6,5-炔基)乙酰胺和 1-辛烯-7-炔-3-酮探针的反应性非常有限, 它们选择性地标记蛋白质组中的半胱氨酸残基, 2-氯-N-(6,5-炔基)乙酰胺可以和半胱氨酸上的巯基发生亲核取代; 1-辛烯-7-炔-3-酮含有 α,β 不饱和酮, 可以和巯基发生迈克尔加成反应。相比之下, 十一碳-10-炔-1-醇-苯磺酸盐探针对天冬氨酸、谷氨酸、半胱氨酸、酪氨酸和组氨酸残基等氨基酸进行了独特的标记。

由于巯基的高亲核性和氧化还原活性, 蛋白质上的半胱氨酸残基具有多种催化和调节功能, 定量研究半胱氨酸反应性的蛋白质组学可以为复杂蛋白质组中功能半胱氨酸残基的翻译后修饰状态提供有价值的信息。碘乙酰胺-炔是 ABPP 研究中应用最广泛的硫醇反应探针, 该探针可以和半胱氨酸残基上的巯基共价结合, 利用该探针可以对蛋白质组中的反应型半胱氨酸进行鉴定。Weerapana 等^[26]利用碘乙酰胺探针描述了一种基于同位素标记的小分子亲电试剂的定量反应谱, 来全面表征蛋白质组中的半胱氨酸功能和活性。利用此探针在活细胞中标记到了大量高反应活性的半胱氨酸, 在检测到的 890 个人类蛋白中共标记了 8910 个半胱氨酸中的 1082 个, 在蛋白质组中这些高反应活性的半胱氨酸对其蛋白发挥重要的催化和/或调节功能。Abo 等^[27]对碘乙酰胺探针进一步优化合成了一种笼状溴甲基酮亲电试剂 caged-BK 探针, 该探针通过紫外光照控制亲电试剂的活化, 利用该探针监测了人表皮癌 A431 细胞在表皮生长因子刺激下细胞活性氧释放时半胱氨酸的反应性变化, 为识别不同半胱氨酸修饰相关反应性变化研究提供了一个的强大工具。Qin 等^[28]报道了用于代谢聚糖标记的过氧乙酰化非天然单糖如四酰化 N-叠氮乙酰甘露糖胺, 可以与各种细胞内蛋白质上的半胱氨酸发生化学反应, 为开发基于半胱氨酸糖基化的半胱氨酸分析策略提供了机会。

丝氨酸水解酶是在真核生物和原核生物中发现的最大和最多样化的一类酶, 丝氨酸水解酶占哺乳动物中所有蛋白质的 1%, 在凝血、消化、神经系统信号传导、炎症和癌症等病理生理过程中发挥重要作用。此外, 丝氨酸水解酶在细菌和病毒中也发挥着重要作用^[29]。Liu 等^[5]设计了 1 个带有氟磷酸反应基团的分子探针, 氟磷酸可以和丝氨酸水解酶

活性中心的丝氨酸残基羟基发生亲核取代。*N*-羧基琥珀酰亚胺氨基甲酸酯是丝氨酸水解酶抑制剂，其中氨基甲酸酯作为反应基团可以与丝氨酸水解酶中心的丝氨酸残基发生共价反应，它依赖于活性位点丝氨酸残基羟基的强亲核性。Niphakis 等^[30]合成了一系列氨基甲酸酯的衍生物探针来探究其在蛋白质组中的反应活性以及选择性，发现它们都可以选择性地与小鼠体内不同的丝氨酸水解酶活性中心的丝氨酸残基发生共价反应。Gu 等^[31]研究了基于磺酰氟化物的化学探针在植物和动物蛋白质组上的标记，该探针可以标记丝氨酸蛋白酶活性中心丝氨酸以及谷胱甘肽转移酶中的酪氨酸残基。

赖氨酸残基侧链含有氨基具有亲核性，且赖氨酸存在于许多功能位点如酶活性位点和介导蛋白质相互作用的位点，因此赖氨酸是蛋白质氨基酸中共价配体开发的潜在候选物。赖氨酸也经常作为乙酰化、甲基化、泛素化等蛋白质结构和功能的翻译后调控位点。Shannon 等^[32]探索了一组通过亲核芳香取代机制发挥作用的芳基卤化物的蛋白质反应性，这些亲电试剂的反应活性可以通过改变芳基环上的取代基来微调，邻氯硝基苯具有高度的半胱氨酸选择性，而二氯三嗪有利于与赖氨酸的反应。蛋白激酶在信号转导途径中起着核心作用，所有的蛋白激酶的活性中心都含有 1 个保守的亲核性赖氨酸位点，这类酶催化磷酸从三磷酸腺苷（adenosine triphosphate, ATP）转移并共价结合到特定蛋白质分子中某些丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸残基的羟基上，从而改变蛋白质、酶的构象和活性^[33]。Patricelli 等^[34]合成了 1 个磷酸酰基探针，该探针可以和蛋白激酶的 ATP 结合位点进行选择性共价反应，从标记的蛋白质组中捕获生物素化肽片段，然后使用基于质谱的分析平台进行测序和鉴定。

除了上述针对半胱氨酸、丝氨酸、赖氨酸的特定分子探针，对于其他活泼的氨基酸残基也相继开发出了一些探针。Hahn 等^[35]对磺酰氟化物探针进行改进，将离去基团氟改为三氮唑使该探针对酪氨酸的选择性提高至其他亲核氨基酸的 5 倍。Bach 等^[36]使用光活化的 2,5-二取代四唑，以优异的选择性定量细菌蛋白质组中 8971 个天冬氨酸和谷氨酸。Ma 等^[37]描述了一种新的反应性探针 3-苯基-2*H*-氮丙啶，它能够在体外和原位条件下高效地对蛋白质中的羧基进行化学选择性修饰，即可用于标记天冬氨酸和谷氨酸。Lin 等^[38]以氧氮环丙烷为反应基团

在一系列生物相容性的反应条件下实现高度选择性、快速和稳定的蛋氨酸标记，从而识别整个蛋白质组中高反应活性的蛋氨酸残基。

2 基于非标记法对活性成分靶点进行鉴定

非标记法是基于中药活性成分和靶标蛋白结合后会影响到靶标蛋白的热稳定性、氧化速率等生物物理性质，进而识别中药活性成分可能作用靶点。相较于标记法，非标记法不需要对活性成分进行结构修饰。非标记法主要包括药物亲和反应的靶点稳定性（drug affinity responsive target stability, DARTS）分析、氧化速率蛋白稳定性（stability of proteins from rates of oxidation, SPROX）分析、蛋白质热稳定性分析（cellular thermal shift assay, CETSA）和热蛋白组分析（thermal proteome profiling, TPP）。

2.1 DARTS

Lomenick 于 2009 年首次提出 DARTS 技术，其主要利用药物结合时靶标蛋白对蛋白酶降解的敏感性降低这一特性，不需要对药物结构进行修饰且不依赖药物的活性，依赖于药物分子和其蛋白质靶点之间的亲和性，因此能够精确地找到药物的直接结合靶点。Lomenick 等^[39]进一步验证了 DARTS 技术的可行性，以免疫抑制药物雷帕霉素和 FK506 的靶点 FKBP12 作为研究对象，枯草杆菌蛋白酶作为工具酶，观察 FKBP12 与药物结合后的抗水解作用，发现靶标蛋白和药物结合后靶标蛋白的稳定性增强。DARTS 技术的大致流程是细胞裂解、蛋白定量、加入小分子药物与裂解液共同孵育、蛋白酶水解，最后采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）、蛋白二维电泳（2D-PAGE）、胶染色技术、凝胶或非凝胶质谱技术、亲核色谱等多种方法对结合蛋白进行检测或鉴定。

Kim 等^[40]采用 DARTS 技术验证了姜黄素与 APN 的相互作用，链霉蛋白酶处理 2 min 后 APN 的稳定性明显降低，而姜黄素处理过的 APN 稳定性保持不变；还发现老刺木精可以直接作用于血管内皮生长因子受体 2，从而抑制胶质母细胞瘤细胞生长。Hwang 等^[41]报道了抗抑郁药物舍曲林是自噬诱导剂，采用 DARTS 技术研究了电压依赖性阴离子通道蛋白 1（voltage-dependent anion channel 1, VDAC1）与舍曲林的直接相互作用，发现舍曲林处理后，VDAC1 对链霉蛋白酶的稳定性增加，且成剂量相关性；而 ACTB 与舍曲林无结合亲和力，其蛋白水解敏感性无变化。表明舍曲林特异性地结合

到 VDAC1, 通过结合并拮抗线粒体 VDAC1, 导致细胞 ATP 降低, 激活 AMPK 并抑制其下游 mTOR-RPS6KB1 信号通路诱导细胞自噬。Huang 等^[42]通过 DARTS、等温滴定量热法等技术发现蝙蝠葛苏林碱可以直接靶向热休克蛋白 90 (heat shock protein 90, Hsp90) 并破坏其与 β -catenin 的相互作用, 从而增加泛素介导的 β -catenin 蛋白酶体降解。Huang 等^[43]以 ES2 和 AtEXO70A1 为例展示了如何通过 DATRS 技术来测试小分子与纯化候选靶标蛋白的相互作用。木香烃内酯是一种天然倍半萜内酯, 具有抗炎、抗氧化等多种药理活性。Liu 等^[44]利用 scPDB 蛋白结构库进行高通量反向虚拟筛选, 发现周期蛋白依赖性激酶 2 (Cyclin-dependent kinase 2, CDK2) 是木香烃内酯最特异的结合蛋白; 进一步通过 CETSA 和 DARTS 技术证实了木香烃内酯与 CDK2 可以结合, 木香烃内酯通过直接靶向 CDK2, 抑制小胶质细胞介导的神经炎症。但 DARTS 技术的限制因素为质谱检测的灵敏度, 对于许多低丰度的靶标蛋白来说不易将目标蛋白可视化, 此外进化选择上有些蛋白很难被蛋白酶消化^[39]。

2.2 SPROX

SPROX 技术主要基于蛋白质和蛋白质配体的热力学稳定性, 即在化学变性剂 (如盐酸胍或尿素) 浓度增加的情况下利用过氧化氢氧化蛋白质中的甲硫氨酸 (氧化产物为甲硫氨酸亚砷或甲硫氨酸砷), 用电喷雾或基质辅助激光解吸/电离质谱法测定特定氧化时间下甲硫氨酸的氧化程度与变性剂浓度的函数, 未氧化产物、氧化产物变性剂关系曲线的交点为迁移中点, 由于蛋白质和其配体结合后蛋白稳定性提高, 与对照组相比, 在相同浓度的氧化产物下需要更多的变性剂, 从而导致迁移中点右移^[45]。SPROX 优点在于不需要纯化蛋白, 且可以与串联质谱标签 (tandem mass tags, TMT)、细胞培养条件下稳定同位素标记技术 (stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC) 相结合, 通过标记蛋白质氨基酸来确定肽的相对含量, 以此扩大 SPROX 在全蛋白质组上的覆盖率^[46-47]。

Geer Wallace 等^[48]将 iTRAQ 与 SPROX 技术联用, 对低氧培养条件下的人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞裂解液进行了与 manassantin A 的相互作用分析, 共鉴定出 28 个蛋白, 为后期阐明 manassantin A 的作用机制奠定了基础。格尔德霉素是一种天然产物, 具有良好的抗癌活性。Hsp90 是格尔德霉素已

知的靶点, 格尔德霉素可直接与 Hsp90 N 端 ATP 结合域结合, 抑制 Hsp90 ATP 酶活性, 文献报道的解离常数 (K_d) 值从纳摩尔到微摩尔差异较大, Xu 等^[49]利用 SPROX 技术测量格尔德霉素与人乳腺癌 MCF-7 细胞裂解液中未纯化的 Hsp90 的结合亲和力, 证实 K_d 值取决于 SPROX 分析前格尔德霉素与裂解液平衡的时间。Liu 等^[50]利用 SPROX 技术分析了 MCF-7 细胞分别与 BT-474 细胞、MDA-MB-468 细胞的蛋白质稳定性差别, 证明热力学稳定性差异可以区分不同的乳腺癌亚型。SPROX 技术的限制因素在于只能检测含有甲硫氨酸的蛋白质与小分子的结合, 此外并不是所有的甲硫氨酸残基都表现出不同的氧化速率, 因此不能完全确证蛋白质和配体相互作用^[51]。

2.3 CETSA

Martinez Molina 等^[52]基于配体诱导的靶标蛋白热稳定性改变原理开发出 CETSA 技术, 随着温度的升高, 蛋白热稳定性降低, 而小分子和靶标蛋白结合后会改变靶标蛋白的热稳定性。该方法的大致流程为将多个等量的细胞裂解液或者组织匀浆液与小分子孵育, 然后加热至不同温度进行热变性; 冷却后, 将样品离心, 从沉淀蛋白中分离可溶性组分; 通过 Western blotting 法对可溶性部分中的目标蛋白进行定量, 或基于质谱方法根据其溶解曲线分析可溶性蛋白的热稳定性, 从而确证小分子与靶标蛋白的结合。传统的热位移分析技术只能使用纯化的蛋白质, 而 CETSA 的样本可以为细胞裂解液、完整细胞以及组织匀浆液等, 极大地扩大了样品检测范围, 使检测更方便快捷。

Nagasawa 等^[53]开发了一种将 CETSA 和基于 2D-PAGE 的蛋白质组学分析相结合的改进方法即 2DE-CETSA, 通过 2DE-CETSA 分析了一种靶标未知的化合物 NPD10084, 该化合物对大肠癌细胞具有较好的体内外抗增殖活性, 并确定了丙酮酸激酶肌亚型 2 (pyruvate kinase M2, PKM2) 作为候选靶标蛋白。NPD10084 可以通过阻断 PKM2 和 β -catenin 或 STAT3 间的蛋白-蛋白相互作用, 进而抑制下游信号通路。BH3 模拟物类抗肿瘤药物是一类靶向 B 淋巴细胞瘤 2 (B-cell lymphoma 2, Bcl-2) 家族抗凋亡成员蛋白的新型抗肿瘤药物, 可以模仿唯 BH3 域蛋白的 BH3 结构域与 Bcl-2 家族抗凋亡成员结合并使其释放促凋亡因子。Guo 等^[54]使用 CETSA 技术评估了不同 BH3 模拟物 (ABT-737、ABT-199、

A-1210477) 对 Bcl-2 和髓样细胞白血病-1 (myeloid cell leukemia-1, Mcl-1) 的靶标结合能力, 并验证了该方法可以提供与体外结合实验一致的亲和力排序和选择性。Ishii 等^[55]利用 CETSA 技术成功监测了脑和脾脏样本中受体相互作用蛋白激酶 1 (receptor interacting protein kinase 1, RIPK1) 抑制剂与体内 RIPK1 直接结合, 证明 CETSA 可以作为动物和临床研究的有力工具。O-GlcNAc 糖基化修饰参与基因转录、信号转导、细胞周期调控等多种细胞生命活动, 并与 II 型糖尿病、老年神经退行性疾病、癌症等多种疾病密切相关; N-乙酰氨基葡萄糖转移酶能够特异地催化蛋白质发生 O-GlcNAc 糖基化修饰。Drake 等^[56]用 CETSA 技术检测了 N-乙酰氨基葡萄糖转移酶对 Nod2 和 Nod1 细胞稳定性的影响, 该技术也将成为研究翻译后修饰的有力工具。CETSA 技术的限制因素在于: ①较大的蛋白质包括蛋白质复合物更可能产生较弱或没有配体诱导反应, 在这方面的局限性仍需充分证实; ②加热会影响细胞膜的通透性, 可以通过减少加热时间、选择合适的加热方式、增加对照实验来解决; ③小分子的孵育时间会影响小分子识别靶标蛋白, 如果此化合物参与快速响应信号通路, 可能会影响靶标蛋白翻译后的状态, 进而影响抗体对靶标蛋白的检测, 可以使用基于质谱方法来检测靶标蛋白; ④检测需要的药物浓度较高, 在发现新靶点的过程中明显通量不足, 常被用作靶点的验证^[57]。

2.4 TPP

TPP 将 CETSA 技术和基于多重定量质谱相结合, 可以监测药物作用过程中整个蛋白组蛋白质热稳定性的变化, 增加了在靶点和脱靶识别以及生物识别上的应用, 实现对靶标蛋白的高通量检测。其大致操作流程为将细胞或裂解液在有无化合物条件下处理, 然后将样本平均分成 10 份, 在 10 个温度下分别加热, 用 PBS 溶液提取可溶部分, 再用胰蛋白酶处理样本并用 TMT10 进行标记, 最后混合所有样本进行液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 分析, 得到的报告离子强度用于拟合曲线并计算每个蛋白质的特定熔解温度 (T_m), 从而找到稳定性差异蛋白^[58]。除了化合物之外, 核酸、蛋白间的相互作用或翻译后修饰都会影响靶标蛋白热稳定性。这种方法不仅仅能够检测细胞或组织中的蛋白质-配体相互作用, 还可以检测不同状态下细胞蛋白质组的热稳定性。该方法适用于体外、原位和体内检测, 已

成功应用于药物靶点和脱靶识别、蛋白质代谢物和蛋白质相互作用的研究。因此, TPP 提供了一种独特的视角, 在蛋白质组水平上了解蛋白质的状态和相互作用, 从而为研究基本的生物过程及其潜在机制打下了坚实的基础^[59]。

天然产物 vioprolide A~D 对人急性淋巴母细胞白血病细胞表现出强大的毒性, Kirsch 等^[60]利用 TPP 技术发现了人外周血白血病 T 细胞 Jurkat 中 vioprolide A 的靶标蛋白核仁蛋白 14 (nucleolar protein 14, NOP14), 该蛋白在核糖体生物发生中起重要作用; 并通过一系列蛋白质组学和生物学实验进一步证实了 NOP14 是 vioprolide A 的特异性靶标。Lu 等^[61]发现氯马斯汀可与恶性疟原虫 TCP-1 环复合物或含有 TCP-1 的伴侣蛋白 (TRiC/CCT) 结合, 通过 TPP 技术发现氯马斯汀使 8 个恶性疟原虫 TRiC 亚基不稳定; 利用 SPROX 技术进一步证明氯马斯汀会改变疟原虫 TRiC δ 亚基的热力学稳定性。Conophylline 是从山茱萸中提取的一种长春花生物碱, Kakegawa 等^[62]通过 TPP 技术鉴定出谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase4, GPX4) 是 conophylline 的结合蛋白, conophylline 通过靶向 GPX4 诱导脂质活性氧积累和自噬。Reinhard 等^[63]扩展了 TPP 使用方法实现对人类细胞中跨膜蛋白小分子相互作用的检测, 将人慢性骨髓性白血病细胞 K562 加热至 70 °C, 然后用 SDS、NP-40、CHAPS、CHAPSO、DDM、 β -辛基葡萄糖苷、Brij 35 或 Pluronic F127 进行提取, 并通过 PAGE 分析, 结果表明 0.4% NP-40 足以溶解许多膜蛋白, 且在亲和蛋白组学研究中不影响蛋白-药物亲和性的准确测定。

3 总结与展望

基于现代科学技术阐明中药药效机制及其作用靶点, 是贯彻“传承精华, 守正创新”的关键, 也是实现我国原始药物创新的重要途径。因此, 寻找中药活性成分直接作用靶点是医学、药学、化学、生物学等领域的学者共同关心的主题, 但鉴于技术瓶颈, 相关研究推进困难。化学生物学等技术的兴起为中药活性成分直接作用靶点鉴定提供了方法。蛋白质作为生物功能直接的执行者, 更是成为学者们关注的重要药物靶点。因此, 本文系统综述了基于化学生物学技术尤其是化学蛋白质组学技术的中药活性成分直接作用靶点鉴定方法, 以期为研究者提供借鉴。

具体来说, 根据是否使用探针标记, 广泛应用于中药活性成分以及天然产物的作用靶点鉴定方法可以被分为标记法及非标记法 2 大类。标记法的应用门槛较高, 不适用于改造后活性丧失、化学合成困难以及微量的活性成分研究。应用活性氨基酸残基探针进行研究时, 只能针对与氨基酸残基具有共价结合能力的活性成分, 同时结合工具探针使用。但标记法也具备明显的优势, 可以直接标记直接靶

标蛋白, 并通过后续蛋白变性的方法排除间接靶标蛋白, 大大降低了靶点鉴定过程中的假阳性结果。非标记法的结果可信度不如标记法, 同时很难排除药物结合蛋白所在复合体中其他蛋白的影响。但非标记法可以对任意活性成分 (包括微量活性成分) 甚至多成分进行靶点鉴定。因此, 将标记法与非标记法的主流技术原理整合在图 1, 学者们在选择靶点鉴定方法时, 可以根据其优缺点自主选择。

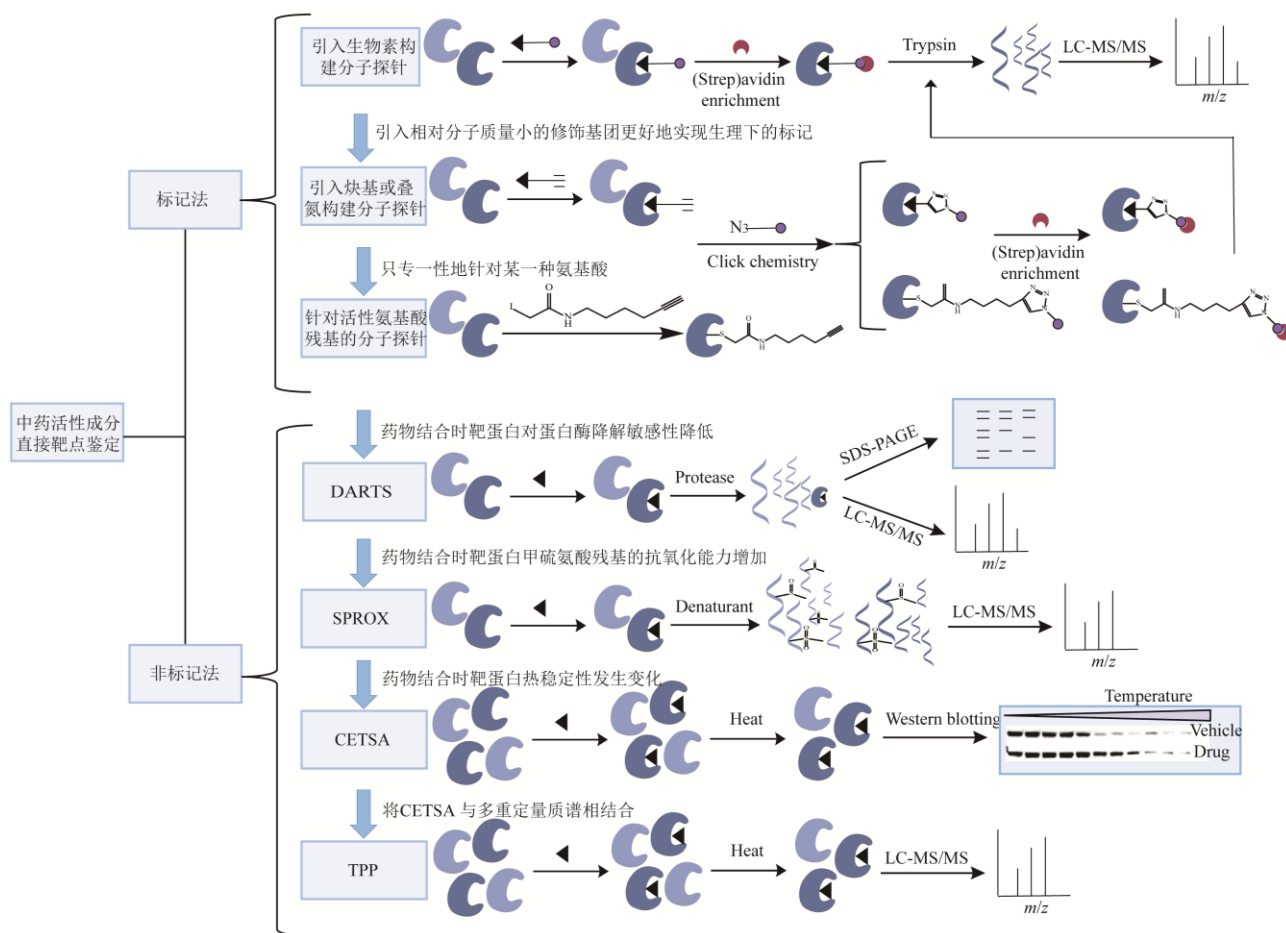


图 1 中药活性成分直接作用靶点鉴定的研究方法以及流程图

Fig. 1 Research method and flow chart for identifying direct target of bioactive components from Chinese herbal medicine

虽然中药活性成分靶点鉴定对于新药研发以及阐明中药药效机制至关重要, 但是更应该在所鉴定的靶点中寻找与药物表型关联最大的靶点, 并通过后续应用生物物理学、分子生物学技术对所鉴定的靶点进行验证。在明确了活性成分的靶点以及药效机制后, 再通过对活性成分进行结构修饰改善先导化合物的理化性质、药效学性质、药动学性质以及安全性等, 从而得到成药性更高的先导化合物, 可以极大地缩短新药研发进程。

在用标记法鉴定中药活性成分靶点时除了上述

提到的还包括噬菌体展示等技术, 此外 Epoxy-activated Sepharose 6B beads、AffiGel、Toyopearl、AQUAFIRMUS、SG beads 等亲和基质也可以用于某些化合物靶标蛋白的鉴定^[64]。非标记法还包括降解标签、RNA 干扰、CRISPR/CAS9 基因编辑技术、Connectivity Map 等基于基因组学以及生物信息学分析的方法^[65], 通过多种方法结合实现化合物靶点鉴定。

综上所述, 现阶段学者们已经应用标记法及非标记法对中药活性成分和天然产物靶点鉴定进行了

一定的研究。但是任何靶点的鉴定都需要进一步的活性相关性研究,从而确定所鉴定靶点对其药效的关键性。随着科技的发展,未来会建立越来越多用于鉴定化合物靶点的方法,这些方法将共同推进对中药以及其活性成分的研究,推动原始创新药物研究以及中医药研究的科学化进程。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 李根, 曹世杰, 张继超, 等. 点击化学在中药活性成分靶点鉴定中的应用进展 [J]. 中草药, 2019, 50(4): 984-991.
- [2] 曾克武, 屠鹏飞. 固相亲合载体应用于中药复杂体系直接作用靶点研究的现状与挑战 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(19): 3645-3649.
- [3] Wang J G, Wong Y K, Liao F L. What has traditional Chinese medicine delivered for modern medicine? [J]. *Expert Rev Mol Med*, 2018, 20: e4.
- [4] Schirle M, Bantscheff M, Kuster B. Mass spectrometry-based proteomics in preclinical drug discovery [J]. *Chem Biol*, 2012, 19(1): 72-84.
- [5] Liu Y, Patricelli M P, Cravatt B F. Activity-based protein profiling: The serine hydrolases [J]. *PNAS*, 1999, 96(26): 14694-14699.
- [6] 王初, 陈南. 基于活性的蛋白质组分析 [J]. 化学学报, 2015, 73(7): 657-668.
- [7] Brunner J. New photolabeling and crosslinking methods [J]. *Annu Rev Biochem*, 1993, 62: 483-514.
- [8] Dubinsky L, Krom B P, Meijler M M. Diazirine based photoaffinity labeling [J]. *Bioorg Med Chem*, 2012, 20(2): 554-570.
- [9] Sakurai K, Ozawa S, Yamada R, et al. Comparison of the reactivity of carbohydrate photoaffinity probes with different photoreactive groups [J]. *ChemBioChem*, 2014, 15(10): 1399-1403.
- [10] Sakurai K, Yamada R, Okada A, et al. Selective fluorescence detection of small-molecule-binding proteins by using a dual photoaffinity labeling system [J]. *ChemBioChem*, 2013, 14(4): 421-425.
- [11] 杨婉琪, 张崇敬. 基于分子原型和分子探针的药用活性分子蛋白作用靶标研究 [J]. 药学报, 2020, 55(7): 1439-1452.
- [12] Lesch H P, Kaikkonen M U, Pikkarainen J T, et al. Avidin-biotin technology in targeted therapy [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2010, 7(5): 551-564.
- [13] Lim K H, Huang H, Pralle A, et al. Stable, high-affinity streptavidin monomer for protein labeling and monovalent biotin detection [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2013, 110(1): 57-67.
- [14] Zhu Y Y, Wan N, Shan X N, et al. Celastrol targets adenylyl cyclase-associated protein 1 to reduce macrophages-mediated inflammation and ameliorates high fat diet-induced metabolic syndrome in mice [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(5): 1200-1212.
- [15] Zhao Q, Ding Y, Deng Z S, et al. Natural products triptolide, celastrol, and withaferin A inhibit the chaperone activity of peroxiredoxin I [J]. *Chem Sci*, 2015, 6(7): 4124-4130.
- [16] Dong T, Li C, Wang X, et al. Ainsliadimer A selectively inhibits IKK α/β by covalently binding a conserved cysteine [J]. *Nat Commun*, 2015, 6(1): 1-12.
- [17] 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.
- [18] Statsuk A V, Bai R, Baryza J L, et al. Actin is the primary cellular receptor of bistramide A [J]. *Nat Chem Biol*, 2005, 1(7): 383-388.
- [19] Speers A E, Cravatt B F. Profiling enzyme activities *in vivo* using click chemistry methods [J]. *Chem Biol*, 2004, 11(4): 535-546.
- [20] Wang J, Zhang C J, Chia W N, et al. Haem-activated promiscuous targeting of artemisinin in *Plasmodium falciparum* [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 10111.
- [21] Wang J, Zhang J, Zhang C J, et al. *In situ* proteomic profiling of curcumin targets in HCT116 colon cancer cell line [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 22146.
- [22] Dai J, Liang K, Zhao S, et al. Chemoproteomics reveals baicalin activates hepatic CPT1 to ameliorate diet-induced obesity and hepatic steatosis [J]. *PNAS*, 2018, 115(26): E5896-E5905.
- [23] Qin W, Zhang Y L, Tang H, et al. Chemoproteomic profiling of itaconation by bioorthogonal probes in inflammatory macrophages [J]. *J Am Chem Soc*, 2020, 142(25): 10894-10898.
- [24] 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): e0126211.
- [25] Weerapana E, Simon G M, Cravatt B F. Disparate proteome reactivity profiles of carbon electrophiles [J]. *Nat Chem Biol*, 2008, 4(7): 405-407.
- [26] Weerapana E, Wang C, Simon G M, et al. Quantitative reactivity profiling predicts functional cysteines in proteomes [J]. *Nature*, 2010, 468(7325): 790-795.
- [27] Abo M, Weerapana E. A caged electrophilic probe for

- global analysis of cysteine reactivity in living cells [J]. *J Am Chem Soc*, 2015, 137(22): 7087-7090.
- [28] Qin W, Qin K, Fan X, *et al.* Artificial cysteine S-glycosylation induced by per-O-acetylated unnatural monosaccharides during metabolic glycan labeling [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2018, 57(7): 1817-1820.
- [29] Long J Z, Cravatt B F. The metabolic serine hydrolases and their functions in mammalian physiology and disease [J]. *Chem Rev*, 2011, 111(10): 6022-6063.
- [30] Niphakis M J, Cognetta A B, Chang J W, *et al.* Evaluation of NHS carbamates as a potent and selective class of endocannabinoid hydrolase inhibitors [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2013, 4(9): 1322-1332.
- [31] Gu C, Shannon D A, Colby T, *et al.* Chemical proteomics with sulfonyl fluoride probes reveals selective labeling of functional tyrosines in glutathione transferases [J]. *Chem Biol*, 2013, 20(4): 541-548.
- [32] Shannon D A, Banerjee R, Webster E R, *et al.* Investigating the proteome reactivity and selectivity of aryl halides [J]. *J Am Chem Soc*, 2014, 136(9): 3330-3333.
- [33] Hanks S K, Hunter T. The eukaryotic protein kinase superfamily: Kinase (catalytic) domain structure and classification [J]. *FASEB J*, 1995, 9(8): 576-596.
- [34] Patricelli M P, Szardenings A K, Liyanage M, *et al.* Functional interrogation of the kinome using nucleotide acyl phosphates [J]. *Biochemistry*, 2007, 46(2): 350-358.
- [35] Hahn H S, Toroitich E K, Borne A L, *et al.* Global targeting of functional tyrosines using sulfur-triazole exchange chemistry [J]. *Nat Chem Biol*, 2020, 16(2): 150-159.
- [36] Bach K, Beerkens B L H, Zanon P R A, *et al.* Light-activatable, 2,5-disubstituted tetrazoles for the proteome-wide profiling of aspartates and glutamates in living bacteria [J]. *ACS Cent Sci*, 2020, 6(4): 546-554.
- [37] Ma N, Hu J, Zhang Z M, *et al.* 2H-azirine-based reagents for chemoselective bioconjugation at carboxyl residues inside live cells [J]. *J Am Chem Soc*, 2020, 142(13): 6051-6059.
- [38] Lin S, Yang X, Jia S, *et al.* Redox-based reagents for chemoselective methionine bioconjugation [J]. *Science*, 2017, 355(6325): 597-602.
- [39] Lomenick B, Jung G, Wohlschlegel J A, *et al.* Target identification using drug affinity responsive target stability (DARTS) [J]. *Curr Protoc Chem Biol*, 2011, 3(4): 163-180.
- [40] Kim Y, Sugihara Y, Kim T Y, *et al.* Identification and validation of VEGFR2 kinase as a target of voacangine by a systematic combination of DARTS and MSI [J]. *Biomolecules*, 2020, 10(4): 508.
- [41] Hwang H Y, Shim J S, Kim D, *et al.* Antidepressant drug sertraline modulates AMPK-MTOR signaling-mediated autophagy via targeting mitochondrial VDAC1 protein [J]. *Autophagy*, 2020: 1-17.
- [42] Huang X H, Yan X, Zhang Q H, *et al.* Direct targeting of HSP90 with daurisorline destabilizes β -catenin to suppress lung cancer tumorigenesis [J]. *Cancer Lett*, 2020, 489: 66-78.
- [43] Huang L, Wang D, Zhang C. Drug affinity responsive target stability (DARTS) assay to detect interaction between a purified protein and a small molecule [J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2213: 175-182.
- [44] Liu Y C, Feng N, Li W W, *et al.* Costunolide plays an anti-neuroinflammation role in lipopolysaccharide-induced BV₂ microglial activation by targeting cyclin-dependent kinase 2 [J]. *Molecules*, 2020, 25(12): 2840.
- [45] West G M, Tang L, Fitzgerald M C. Thermodynamic analysis of protein stability and ligand binding using a chemical modification-and mass spectrometry-based strategy [J]. *Anal Chem*, 2008, 80(11): 4175-4185.
- [46] Walker E J, Bettinger J Q, Welle K A, *et al.* Global analysis of methionine oxidation provides a census of folding stabilities for the human proteome [J]. *PNAS*, 2019, 116(13): 6081-6090.
- [47] Tran D T, Adhikari J, Fitzgerald M C. Stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC)-based strategy for proteome-wide thermodynamic analysis of protein-ligand binding interactions [J]. *Mol Cell Proteom*, 2014, 13(7): 1800-1813.
- [48] Geer Wallace M A, Kwon D Y, Weitzel D H, *et al.* Discovery of manassantin A protein targets using large-scale protein folding and stability measurements [J]. *J Proteome Res*, 2016, 15(8): 2688-2696.
- [49] Xu Y R, Geer Wallace M A G, Fitzgerald M C. Thermodynamic analysis of the geldanamycin-Hsp90 interaction in a whole cell lysate using a mass spectrometry-based proteomics approach [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2016, 27(10): 1670-1676.
- [50] Liu F, Meng H, Fitzgerald M C. Large-scale analysis of breast cancer-related conformational changes in proteins using SILAC-SPROX [J]. *J Proteome Res*, 2017, 16(9): 3277-3286.
- [51] Lomenick B, Olsen R W, Huang J. Identification of direct protein targets of small molecules [J]. *ACS Chem Biol*, 2011, 6(1): 34-46.
- [52] Martinez Molina D, Jafari R, Ignatushchenko M, *et al.* Monitoring drug target engagement in cells and tissues

- using the cellular thermal shift assay [J]. *Science*, 2013, 341(6141): 84-87.
- [53] Nagasawa I, Muroi M, Kawatani M, *et al.* Identification of a small compound targeting PKM2-regulated signaling using 2D gel electrophoresis-based proteome-wide CETSA [J]. *Cell Chem Biol*, 2020, 27(2): 186-196.
- [54] Guo Z, Song T, Xue Z, *et al.* Using CETSA assay and a mathematical model to reveal dual Bcl-2/Mcl-1 inhibition and on-target mechanism for ABT-199 and S1 [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2020, 142: 105105.
- [55] Ishii T, Okai T, Iwatani-Yoshihara M, *et al.* CETSA quantitatively verifies *in vivo* target engagement of novel RIPK1 inhibitors in various biospecimens [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 13000.
- [56] Drake W R, Hou C W, Zachara N E, *et al.* New use for CETSA: Monitoring innate immune receptor stability via post-translational modification by OGT [J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2018, 50(3): 231-240.
- [57] Jafari R, Almqvist H, Axelsson H, *et al.* The cellular thermal shift assay for evaluating drug target interactions in cells [J]. *Nat Protoc*, 2014, 9(9): 2100-2122.
- [58] Savitski M M, Reinhard F B, Franken H, *et al.* Tracking cancer drugs in living cells by thermal profiling of the proteome [J]. *Science*, 2014, 346(6205): 1255784.
- [59] Mateus A, Kurzawa N, Becher I, *et al.* Thermal proteome profiling for interrogating protein interactions [J]. *Mol Syst Biol*, 2020, 16(3): e9232.
- [60] Kirsch V C, Orgler C, Braig S, *et al.* The cytotoxic natural product vioprolide A targets nucleolar protein 14, which is essential for ribosome biogenesis [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2020, 59(4): 1595-1600.
- [61] Lu K Y, Quan B, Sylvester K, *et al.* *Plasmodium* chaperonin TRiC/CCT identified as a target of the antihistamine clemastine using parallel chemoproteomic strategy [J]. *PNAS*, 2020, 117(11): 5810-5817.
- [62] Kakegawa J, Ohtsuka S, Yokoyama M, *et al.* Thermal proteome profiling reveals GPX4 as the target of the autophagy inducer conophylline [J]. *Mol Pharmacol*, 2021, doi: 10.1124/molpharm.121.000243.
- [63] Reinhard F B, Eberhard D, Werner T, *et al.* Thermal proteome profiling monitors ligand interactions with cellular membrane proteins [J]. *Nat Methods*, 2015, 12(12): 1129-1131.
- [64] 屠鹏飞, 曾克武, 廖理曦, 等. 天然活性小分子靶标蛋白识别方法学研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(1): 6-13.
- [65] 李玉斌, 吕超, 张卫东. 非标记的天然产物靶点识别和确证方法及应用 [J]. 药学报, 2019, 54(1): 82-88.

[责任编辑 李亚楠]