

• 综述 •

非化学修饰的药物靶点发现技术在中药研究中的应用

任家乐, 韩晓露, 杨 珍*, 张艳军*

天津中医药大学, 天津 301617

摘要: 中医药是我国的科学和文化瑰宝, 具有数千年的临床用药经验。中医药在复杂疾病及慢性疾病防治方面具有显著优势, 在当前全球肆虐的新型冠状病毒肺炎 (corona virus disease 2019, COVID-19) 防治中也彰显了其优势, 但由于作用机制不清楚等问题严重限制了其推广应用。化学药治疗疾病作用机制明确, 具有成熟的药物靶点发现技术, 主要包括化学修饰技术和非化学修饰技术。中药具有多成分、多靶点的作用特点, 应用化学修饰技术进行作用靶点的研究具有一定的局限性。因此, 主要介绍细胞热位移分析、分子对接技术、药物亲和反应的靶点稳定性和表面等离子共振技术等非化学修饰的药物靶点发现技术的原理、操作流程和应用, 并对其在中药作用机制研究中的潜在优势与不足进行讨论, 以期探索出一种中药作用靶点发现模式, 为中药作用机制的阐明提供参与借鉴, 助推中医药现代化进程。

关键词: 非化学修饰的药物靶点发现技术; 细胞热位移分析; 分子对接技术; 药物亲和反应的靶点稳定性; 表面等离子共振技术
中图分类号: R284 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)17-5513-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.17.029

Application of non-chemical modification drug target discovery techniques in traditional Chinese medicine

REN Jia-le, HAN Xiao-lu, YANG Zhen, ZHANG Yan-jun

Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

Abstract: Traditional Chinese medicine (TCM) is a science and cultural treasure of our country, with thousands of years of clinical experience in medication. TCM has significant advantages in prevention and treatment of complex diseases and chronic diseases, and has also demonstrated its advantages in prevention and treatment of corona virus disease 2019 (COVID-19) that is currently raging around the world, but due to unclear mechanism problem, the promotion and application of TCM have been seriously limited. Mechanism of Western medicine is clear, and it has mature drug target discovery technology, mainly including chemical modification technology and non-chemical modification technology. Due to the characteristics of multi-component, multi-target action of TCM, the application of chemical modification technology in TCM mechanism study has certain limitations. Thus, the principle, operation steps and application of non-chemically modified drug target technology such as cellular thermal shift assay, molecular docking, drug affinity responsive target stability, surface plasmon resonance are introduced in this paper. The potential advantages and disadvantages of such non-chemically modified drug target technologies are discussed in the study on mechanism of TCM, in order to explore a target discovery model of TCM target discovery, provide reference for elucidating the mechanism of TCM, and promote the modernization process of TCM.

Key words: non-chemical modification drug target discovery technique; cellular thermal shift assay; molecular docking; drug affinity responsive target stability; surface plasmon resonance

中药由于其多成分、多靶点的作用特点^[1], 在许多复杂疾病治疗方面表现出显著优势, 且在当前全球肆虐的新型冠状病毒肺炎防治中也彰显了其优势。近年来, 西方国家对传统药物和植物药的普遍

收稿日期: 2022-03-04

基金项目: 天津市教委科研计划项目 (2017KJ132)

作者简介: 任家乐, 硕士研究生, 研究方向为中药药理。E-mail: 1158402404@qq.com

*通信作者: 张艳军, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药药理。E-mail: zyjsunye@163.com

杨 珍, 实验师, 研究方向为中药信息学。E-mail: yzwygb@126.com

重视和注册政策的调整,为中药发展提供了新的机遇,给中药进入国际市场提供了一个良好的契机。但中药成分复杂、作用靶点不清楚等问题限制了其推广应用。目前,中药作用机制多采用中药方剂或主要成分作用于细胞或机体后所引起的整体蛋白质组、转录组以及基因组表达变化的表观性研究,未能通过这些表观信号指标的变化找到药物成分的直接作用靶点,因此并未从真正意义上阐明其作用机制。中药具有多成分、多靶点的作用特点,与化学药单成分、单靶点作用方式相比,作用方式更复杂,因此不能简单搬用化学药的作用靶点发现技术对中药的作用机制进行研究。近年来,非化学修饰的药物靶点发现技术由于不需要对药物结构进行化学修饰,在中药研究中表现出显著优势。本文主要总结了细胞热位移分析(cellular thermal shift assay, CETSA)、分子对接技术、药物亲和反应的靶点稳定性(drug affinity responsive target stability, DARTS)和表面等离子共振技术(surface plasmon resonance, SPR)等非化学修饰的药物靶点发现技术的原理、操作流程和应用,并对其在中药作用机制研究中的潜在优势与不足进行讨论,最终提出了一种中药直接靶点发现模式,以期对中药作用机制的研究提供

参考与借鉴。

1 CETSA

1.1 原理

CETSA 由 Molina 等^[2]于 2013 年首次提出,是一种基于配体诱导的靶蛋白热力学稳定性改变的原理研究药物靶点的方法。具体为将细胞或组织^[3]置于一定温度下加热,非药物结合蛋白质的高级结构会在该温度下发生结构的改变,从而发生受热变性,失去蛋白质分子的功能;结合了药物的靶蛋白,其结构变得稳定,在相同温度下不易变性。通过给药与不给药处理后,在一定温度下对不同样本进行处理,离心、滤过去除不溶性成分,通过银染技术检测上述处理后各组蛋白质情况或利用质谱技术对上述银染检测发现的差异条带蛋白进行鉴定(图 1)。

1.2 操作流程

在 CETSA 方法中,将未给药的细胞和组织与给药组加热至相同的温度,冷却后用细胞裂解液裂解,然后将样品研磨、离心去除不溶性的沉淀,取可溶性蛋白的上清液,利用电泳分离各组蛋白,通过银染法对比不同组间蛋白条带,对差异条带蛋白利用质谱进行分析,结合特异性肽段鉴定,获得药物直接靶点的信息(图 1)。

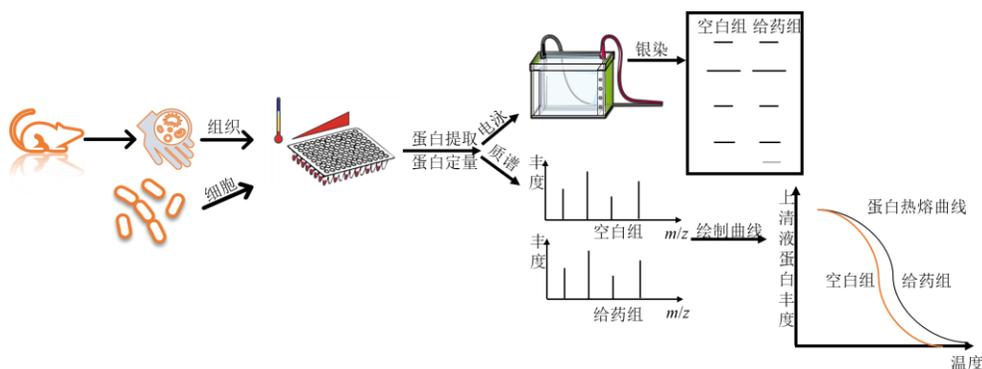


图 1 CETSA 操作流程

Fig. 1 Flowchart of CETSA

1.3 应用

近年来,不同学者在 CETSA 基础上发展了多种药物靶点发现技术,如 2014 年由 Savitski 等^[4]将 CETSA 方法与多重定量质谱法联用,提出的热蛋白质组分析(thermal proteome profiling, TPP),TPP 原理在本质上与 CETSA 方法完全一致,不同之处在于 TPP 方法能够同时检测全蛋白质组在多个温度下的热变性状态,并绘制出完整的熔化曲线,确定每种蛋白质的热位移变化,因此 TPP 又被称为 MS-

CETSA。此外,在 TPP 技术的基础上发展了等温剂量响应指纹图谱方法,该方法是在 CETSA 技术通过描绘不同处理(加热与否)后蛋白的热溶化曲线来获取蛋白质热溶化中点位移温度,通过等温剂量相关的实验确定药物剂量与药物靶蛋白结合之间的关系,从而测定药物分子与靶蛋白相互作用的亲和力^[5]。

CETSA 技术目前在国内外药物靶点研究中得到广泛应用。林兵^[6]对豆豉姜中的活性成分 LC36 抗类风湿关节炎的靶点进行研究,发现丝裂原活化蛋

白激酶激酶 1 和组织蛋白酶 K 是 LC36 抗类风湿关节炎的作用靶点。陈香云^[7]利用 CETSA 技术发现新藤磷酸可以通过抑制去泛素化酶 9X 的活性加速干细胞因子的降解,从而抑制肿瘤细胞的增殖。Savitski 等^[4]利用 CETSA 技术在人类髓性白血病 K562 细胞中发现了蛋白酶抑制剂如丝氨酸酶抑制剂维罗非尼和间变性淋巴瘤激酶抑制剂阿来替尼中的靶标亚铁螯合酶,该酶的失活是产生严重光敏反应的原因。Mateus 等^[8]利用 TPP 法考察大肠杆菌 *Escherichia coli* 的生长周期和抗菌药物的分子作用机制,发现抗菌药物氨苄西林耐受的 β -内酰胺酶同样也是氨苄西林的作用靶点。Dziekani 等^[9]利用 TPP 法发现恶性疟原虫嘌呤核苷酸磷酸化酶是抗疟药物奎宁和甲氟奎的共同结合靶点。Sridharan 等^[10]利用多重定量质谱法与 CETSA 联用,得到了三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 影响蛋白质结构和蛋白质复合物稳定性和溶解度的定量蛋白质组图谱,从而揭示了 ATP 作为底物和变构调节剂的高亲和力相互作用。Vasaturo 等^[11]运用 CETSA 技术发现抗肿瘤活性药物冬凌草甲素与核仁素蛋白具有直接相互作用,表明其可结合核仁素蛋白并抑制其功能。

1.4 潜在优势与不足

CETSA 技术操作简便,受其他因素干扰程度小,能够在活细胞或整体组织水平进行研究,只要保证加热时间和温度恒定,即使在药物成分不明确的情况下也可对其进行作用靶点的研究。由于中药成分复杂且在临床上多以复方形式应用,因此很难对其进行全部分析。故可以在药效剂量下进行体内 CETSA 实验,直接对其作用靶点进行研究,通过快速银染试剂盒发现差异条带蛋白,利用质谱等技术对可能与药物结合的蛋白进行鉴定。近年来,CETSA 技术与高分辨率质谱技术相结合,已广泛应用于植物、人类细胞、大肠杆菌等多种生物体,是目前药物靶点筛选常用的方法之一^[12]。然而,CETSA 技术存在一些缺点,首先,在加热后加入蛋白裂解液等强细胞裂解液会导致细胞膜破裂,而膜上的许多蛋白可能是药物的靶点,因此该方法会导致寻找小分子药物靶点不完全,即使不使细胞膜破裂,加热后也会改变细胞膜的通透性,造成原本不能进入细胞的药物进入细胞结合胞浆内蛋白,导致后续结合蛋白鉴定时假阳性的结果,目前可使用较温和的 NP-40 裂解液代替蛋白裂解液从而保持膜蛋白的

完整^[13-14]。其次,非特异性蛋白质的干扰是该方法面临的一个困扰,一些低丰度的靶向蛋白可能会被高丰度的非靶向蛋白所淹没,即使用“鸟枪法”定量蛋白组学也很难检测出低丰度的靶向蛋白。此外,将中药或复方给药进行分析后只能得到中药/复方整体的作用靶点,并不能获得成分-靶点一一对应的信息,如果采用中药单成分进行研究,由于中药成分复杂且无法全部获得,需多次重复实验才能获得成分直接作用的靶点信息,因此单独使用该方法进行中药直接靶点的研究尚存在不足,需与其他方法联用获得中药的确切作用靶点。

2 分子对接技术

2.1 原理

近年来,分子对接技术被广泛用于中药成分作用靶点的研究。在靶点结构已知的情况下,可采用分子对接技术研究小分子化合物与大分子生物受体间的相互作用,预测中药成分的作用靶点^[15-16]。根据蛋白质与酶结合的假说原理分为 2 种^[17],其一为“锁-钥”学说,于 1894 年首次提出,该原理简单易懂,配体与受体之间既要满足能量匹配,同时也要满足互补匹配原则,但对配体与受体在结合前后三维结构发生改变时,该原理并不能很好的解释;其二为诱导契合学说,该方法于 1958 年首次提出,底物与酶相互作用时,酶的构象会随着底物结构的改变发生诱导,两者相互契合,进而形成酶-底物复合物,当药物与酶发生解离时,酶的构象又重新恢复到最初构象。常用的分子对接方法有 3 种:刚体对接,即在对接过程中均不考虑配体、受体的构象^[18];半柔体对接,指在对接过程中,仅考虑配体的多个构象,将受体视为刚性结构;柔体对接,在对接过程中同时考虑配体和受体的多个构象,该方法精度很高,但此方法要求较大的计算量和较长的时间,而且对计算机要求较高。目前,有多种软件可进行分子对接研究,常用的软件有 AutoDock、Dock、sybyl、Discovery Studio 等^[19]。

2.2 操作流程

分子对接技术的具体流程:首先获得蛋白结构,并对其进行加氢、去水、定义活性位点等前处理;然后,对筛选的小分子添加力场,计算小分子的多个构象;随后利用分子对接模块计算药物小分子与蛋白活性位点的相互作用结合能^[20];最后,通过综合分析药物小分子与活性位点关键氨基酸相互作用及软件打分情况,预测药物小分子的作用靶点(图 2)。

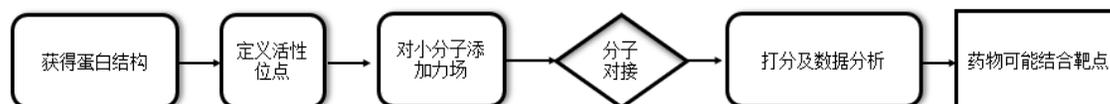


图 2 分子对接技术简要流程图

Fig. 2 A brief flowchart of molecular docking

2.3 应用

目前, 分子对接技术已广泛用于中药活性成分及作用靶点的研究。李婧等^[21]通过分子对接技术发现柴胡皂苷 E、B1、D、F、B2、C2、A 和甘草酸等多种成分与 SARS 冠状病毒 2 型 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 3CL 水解酶 (Mpro) 蛋白均具有较好的亲和力, 为抗 SARS-CoV-2 药物研究及处方筛选提供参考。沈霞等^[22]采用分子对接技术利用 AutoDock 4.2 软件筛选连翘作用于 IL-6 的抗炎成分, 最后证实齐墩果酸、桦木酸和桦木酮酸具有显著的抗炎作用。王芳芳等^[23]通过分子对接技术研究车前草活性成分的抗炎机制, 筛选出排名前 7 的抗炎活性成分, 包括桃叶珊瑚苷、车前草苷 B 等, 这与报道的药理实验结果一致。郑春松等^[24]利用 Discovery Studio 进行分子对接, 发现羌活治疗骨关节炎的关键靶点为白细胞介素 (interleukin, IL)-1 β 、IL-6 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α), 且与靶点主要结合的活性成分为香豆素苷类化合物香柑酚-O- β -D-吡喃葡萄糖苷等。Yadav 等^[25]利用分子对接软件 Scigress Explorer 发现沉香木油的有效成分沉香螺旋醇、沉香雅槛蓝醇和茅苍术醇与炎症靶标 IL-1、IL-6、TNF- α 和环氧合酶-1 有很好的结合力, 具有较好的抗炎潜力。谷宇等^[26]利用分子对接软件 Discovery Studio 确定大黄中的 revandchinone 4、羌活中的二十三烷酸和二十四烷酸以及秦艽中的褐煤酸甲酯这 4 个成分为靶标 5-脂氧合酶 (5-lipoxygenase, 5-LOX) 和白三烯 A4 水解酶 (leukotriene A4 hydrolase, LTA4H) 的双效抑制剂, 为大黄、羌活和秦艽 3 味中药具有确切抗炎活性提供了证据。

2.4 潜在优势与不足

中药多成分、多靶点的作用特点使其作用机制的研究变得异常复杂。分子对接具有高效、快速、低成本的优点, 近年来在中药研究中得到广泛应用。随着计算机性能的不提高, 利用分子对接技术可快速、批量预测中药成分的作用靶点。此外, 利用

分子对接技术对中药成分作用靶点进行研究, 可获得成分-靶点一对一的关系。但是分子对接结果仅为预测结果, 后期需要实验验证才能确定中药成分的作用靶点。在药效剂量下进行体内的 CETSA 实验只能获得中药成分潜在靶点的信息, 但具体哪些成分作用于哪些靶点并不清楚, 故可在 CETSA 的基础上, 利用分子对接技术预测中药成分潜在的药物靶点, 以及作用于特定靶点的中药成分。

3 DARTS

3.1 原理

DARTS 的概念最早由 Lomenick 等^[27]于 2009 年提出, 其原理为靶蛋白与药物小分子结合后对蛋白酶的敏感性降低。直观地说, 与药物结合后的小分子不易被蛋白酶水解, 与对照组相比, 通过银染技术检测差异蛋白条带, 采用质谱等技术对银染检测发现的差异条带蛋白进行鉴定。

3.2 操作流程

DARTS 实验的操作流程: 首先培养可能含有目的靶点的细胞, 该细胞尽量包含较全的蛋白, 收集足量细胞, 提取蛋白, 然后蛋白定量, 调整蛋白液浓度; 分组、药物处理及孵育, 最后通过银染等技术对比不同组间的蛋白条带; 对差异条带蛋白利用质谱进行分析, 结合特异性肽段鉴定, 获得药物直接靶点的信息 (图 3)。一些关键的试剂如蛋白酶、细胞裂解液和缓冲液的选择是决定 DARTS 实验成功与否的关键, 合适的蛋白酶种类以及浓度是 DARTS 操作的关键点, 目前常用于 DARTS 技术的蛋白酶有枯草杆菌蛋白酶^[28]、嗜热菌蛋白酶^[29-31]和链霉菌蛋白酶^[32-34]。

3.3 应用

目前, 国内外已对该方法进行广泛研究。Tanabe 等^[35]利用 DARTS 技术发现苦参碱可作用于热休克蛋白 90 (heat shock protein 90, HSP90), 同时能增强 HSP90 的伴侣活性。Kost 等^[29]利用 DARTS 技术证实 p68RNA 螺旋酶是 RX-5902 的一个细胞靶点, 从而达到治疗癌症的目的。Chin 等^[36]发现作为三羧

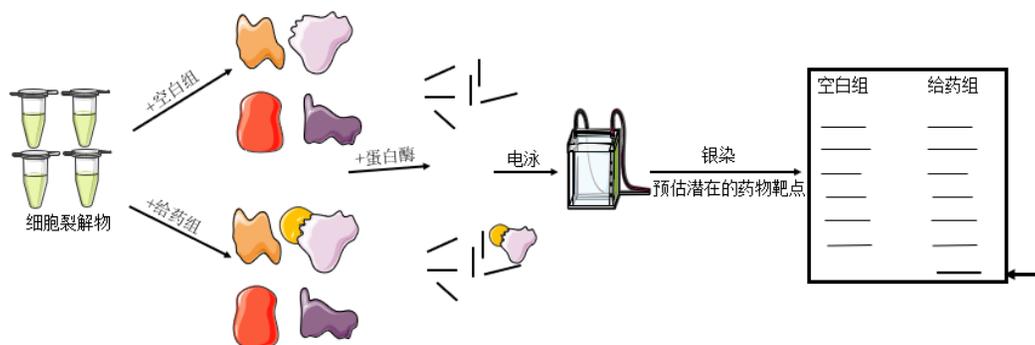


图3 DARTS 操作流程

Fig. 3 Flowchart of DARTS

酸循环中的重要中间代谢产物， α -酮戊二酸 (α -ketoglutarate, α -KG)可延长线虫的寿命，DARTS 技术证实 α -KG 的作用靶标为 ATP 合成酶的 β 亚基， α -KG 可以使 ATP 合成能力下降，减少了氧的消耗，揭示了 α -KG 介导长寿的机制。Yang 等^[37]联合运用 DARTS 技术和免疫沉淀液相色谱/质谱分析，发现骨碎补的有效成分柚皮素及体内代谢物可与脑神经元上的脑衰反应调节蛋白 2 结合，从而促进神经元的生长，改善阿尔茨海默病的症状。Kim 等^[38]利用 DARTS 实验表明异泽兰黄素具有稳定钙调蛋白免受蛋白水解酶的作用，从而揭示了其与钙调蛋白之间的相互作用。Robinson 等^[39]利用高通量筛选方法得出双硫仑具有抑制多种三阴性乳腺癌细胞生长的作用，并用 DARTS 技术揭示了其直接作用靶标为 IO 基序因子 IQGAP1 和 MYH9，Fleta-Soriano 等^[40]发现黏细菌代谢产物 Ratjadone A 具有体外抑制人免疫缺陷病毒感染的作用，并利用 DARTS 技术揭示了其可通过结合核输出蛋白 1 (RanGTPase-dependent export mediators, Exportin1)/染色体区域稳定蛋白 1 (chromosome region maintenance 1, CRM1)，抑制 CRM1 蛋白表达调节因子-病毒颗粒蛋白表达调节因子 (CRM1-regulator of virion protein expression, CRM1-Rev-ES) 复合物的形成，干扰 Exportin1/CRM1 对 Rev 蛋白中亮氨酸富集区信号的识别，从而抑制人免疫缺陷病毒非剪接或部分剪接的 mRNA 基因组的核输出。

3.4 潜在优势与不足

DARTS 技术具有操作简便、不需要对研究的小分子进行修饰等优势，为目前常用的寻找小分子药物靶点的方法之一。但是，由于 DARTS 技术使用体外提取的蛋白对药物靶点进行研究，因此无法

真实反映药物在体内的作用情况，这也是其与 CETSA 技术最大的区别^[41]。在中药作用机制研究中 DARTS 既可以同 CETSA 技术一样作为筛选药物靶点的手段，也可以在分子对接技术预测药物作用于蛋白之后进行单成分或中药提取物作用靶点的验证。

4 SPR

4.1 原理

SPR 最早由瑞典科学家 Liedberg 等首次提出，借助电磁波在金属和电介质交界面上激励形成影响电磁波传播的谐振波的现象以研究 2 种物质相互作用的情况^[42-46]，通过测定共振角的变化以检测生物分子间的相互作用，用于探索分子间有无结合以及相互作用的亲和力、结合/解离的快慢。原理为当一束光照射到玻璃表面的金属膜发生全反射且入射光波向量与金属膜内表面电子的振荡频率一致时，金属电子吸收光能发生共振，从而使反射光的强度达到最小 (图 4)^[47]。

4.2 操作流程

操作流程：首先对芯片表面进行预处理，设置系统温度，用纯水冲洗管道，通过 HBS-EP 缓冲液平衡系统至基线稳定；其次使用氨基偶联试剂盒中不同 pH 的醋酸钠缓冲液稀释靶标蛋白，确定合适的蛋白偶联 pH；使用筛选得到的最合适的 pH 偶联缓冲液稀释靶标蛋白至一定浓度，应用蛋白固定自动化程序进行氨基偶联最后结合实验以及动力学测定，计算分离率和结合常数，最终确定待测药物的直接靶点及与之相结合的成分^[48]。

4.3 应用

近年来，SPR 技术在免疫球蛋白 G 抗体与其抗原相互反应的测定、微生物检测^[49-54]、免疫生化物质检

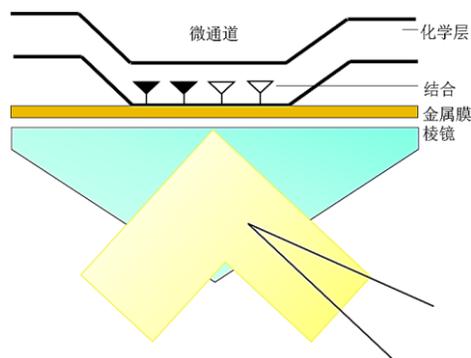


图4 SPR原理

Fig. 4 Theory of SPR

测^[55-58]、中药活性成分筛选及作用靶点研究中得到广泛应用。Yue 等^[59]通过反向对接技术预测灵芝酸 D 能与 14-3-3 蛋白家族的亚型蛋白结合，并利用 SPR 传感器对其结合能力进行验证，得到 21 个能够与灵芝酸 D 结合的蛋白。Jiang 等^[60]首先对基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloprotein-9, MMP-9) 的催化激酶结构域 (MMP-9 CD) 进行表达，将纯化的 MMP-9 CD 固定在 SPR 芯片表面，对丹酚酸 A 与其他 7 种酚酸类化合物进行 SPR 检测，证明 MMP-9 是丹酚酸 A 的结合位点。Zheng 等^[61]将脂质 A 固定在 SPR 芯片上，利用 SPR 生物传感器筛选 60 种中药提取物中的活性成分，得出京尼平苷可作为治疗脓毒症先导化合物的结论。研究发现牛蒡子主要成分牛蒡子苷元可通过增加足细胞黏附来保护高糖所致的细胞损伤，首先利用 DARTS 技术发现牛蒡子苷元可通过激活蛋白磷酸酶 2A 缓解炎症反应以保护肾脏，再利用 SPR 技术确认牛蒡子苷元与蛋白磷酸酶 2A 的结合能较强 ($K_D=0.062 \mu\text{mol/L}$)^[62-63]。邵欣欣等^[64]将炎症反应递质半胱氨酰白三烯合成的限速酶 5-LOX，通过分子对接和药效团构建模块进行计算机虚拟筛选后，再利用 SPR 技术确认 17 种中药的 11 个黄酮类小分子能与 5-LOX 结合。何田等^[65]利用液相色谱-荧光检测方法筛选出苯乙醇苷等 17 种化合

物，再通过 SPR 技术确认齐墩果酸、牛蒡子苷等 10 个特异性结合化合物为乳腺癌新靶标 14-3-3 τ 蛋白的特异性结合化合物。

4.4 潜在优势与不足

与传统的相互作用相比，SPR 技术的优势在于进样量小，可检测样品数量多，方法灵敏且精确度高，无需标记样品，可实时监测，且在大多数情况下不需对样品进行预处理，结果可信度强^[66-67]。在中药靶点研究中，其最大的优点是可以获得药物-蛋白一对一的作用关系。但是，在低浓度、小分子样品的检测和药物在体内非特异性蛋白分子结合的研究中存在一定的限制^[68-69]。其次，SPR 技术仅对距离传感器金属表面几百纳米内的折射率变化具有检测效应。此外，使用 SPR 技术时需要中药成分标准品和蛋白溶液作为参照物，而中药标准品、蛋白溶液成本高、不易制备，因此限制了其在中药成分作用靶点广泛研究中的应用。但如果对特定成分、特定靶点进行研究，可获得较准确的信息，因此可将其与其他技术结合验证中药成分的作用靶点。

5 结语与展望

中药由于其组成成分较多，往往一种成分会同时作用于多个靶点或多种有效成分作用于一种靶点，并且单一方法在中药靶点发现中存在着各自的优势和不足 (表 1)，因此仅仅使用上述单一方法并不能找到准确的靶点，并且可能会造成目标靶点寻找的遗漏或出现假阳性结果。笔者提出一种方法：首先使用 CETSA 技术检测体内活性成分或利用 DARTS 技术检测体外成分，再利用快速银染技术检测不同处理后差异蛋白条带，结合质谱技术对差异条带蛋白进行鉴定，获得潜在的作用靶点，再用分子对接技术将中药成分与上述获得的潜在作用靶点进行分子对接研究，得到成分-靶点潜在一对一关系，最后利用 DARTS 技术与 Western blotting 联用或 SPR 技术对单一成分进行靶点确证 (图 5)。综合

表 1 常用非化学修饰的药物靶点发现技术的比较

Table 1 Comparison on commonly used non-chemical modification drug target discovery techniques

技术	共同点	优势	不足
CETSA、DARTS	可发现中药的直接靶点 (结合靶点) 或	可批量获得中药成分的直接靶点	不能批量获得成分-靶点一一对应关系；成本相对较高
分子对接技术	结合成分	速度快、成本低，可获得靶点-成分一对一关系	仅预测结果，需实验验证
SPR		可获得靶点-成分一对一关系	不能批量获得中药直接靶点；成本相对较高

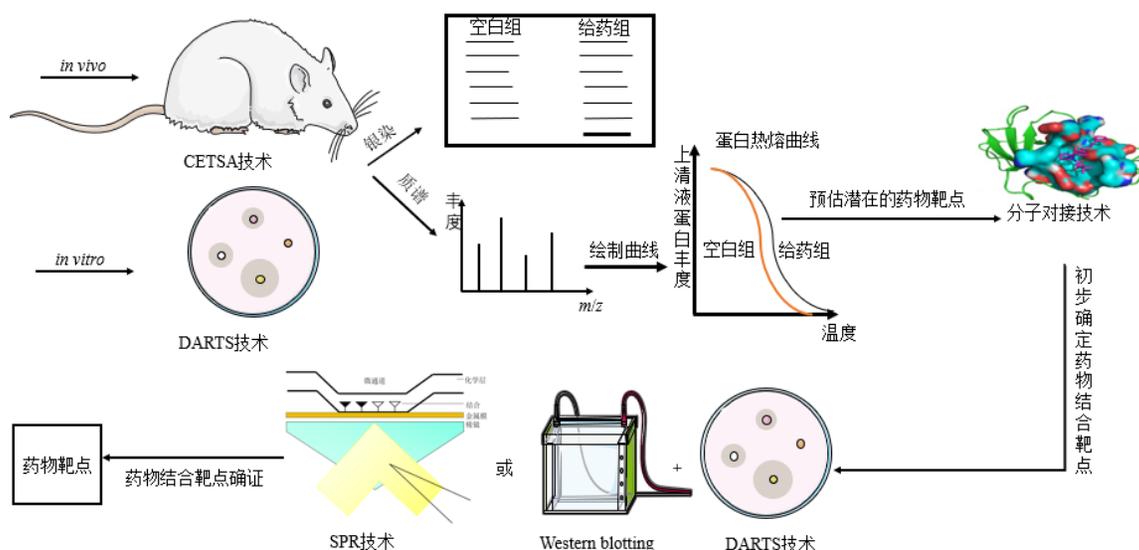


图 5 非化学修饰的药物靶点发现技术联用寻找中药潜在药物靶点的流程

Fig. 5 Process of combination of non-chemical modification drug target discovery techniques in finding potential drug targets in TCM

应用上述非化学修饰药物靶点发现技术，可充分发挥各自的优势，避免各自的不足，最终，明确中药成分的直接靶点，为中药作用机制的阐明提供参考与借鉴，助推中医药现代化进程。

中药具有成分复杂，在临床上多以复方形式应用且具有多成分、多靶点、多层次和多环节的作用特点，因此，化学修饰的药物靶点发现技术在中药作用机制研究中具有一定局限性。非化学修饰的药物靶点发现技术由于不需对化学成分进行结构修饰、易于操作且具有通用性，更适合于具有多成分、多靶点特色的中药研究，本文主要介绍了几种非化学修饰的药物靶点技术的原理、操作流程、应用及在中药作用机制研究中的潜在优势与不足，由于单独使用一种小分子靶点发现技术不能排除假阳性的产生，故提出一种综合应用几种技术以解决中药作用靶点的研究模式，以期对中药作用机制的研究提供参考与借鉴。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 王勇, 李春, 仇琪, 等. 中药复方多成分多靶点协同增效药理药效评价体系 [J]. 中国科学: 生命科学, 2016, 46(8): 1029-1032.
 [2] Molina D M, 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.

[3] 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.
 [4] Savitski M M, Reinhard F B M, Franken H, et al. Tracking cancer drugs in living cells by thermal profiling of the proteome [J]. *Science*, 2014, 346(6205): 1255-1258.
 [5] 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.
 [6] 林兵. 豆豉姜抗类风湿性关节炎物质基础及作用机制研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2014.
 [7] 陈香云. 新藤黄酸靶向 USP9x 抑制骨肉瘤生长的机制研究 [D]. 上海: 上海交通大学, 2018.
 [8] Mateus A, Bobonis J, Kurzawa N, et al. Thermal proteome profiling in bacteria: Probing protein state *in vivo* [J]. *Mol Syst Biol*, 2018, 14(7): e8242.
 [9] Dzienkan J M, Yu H, Chen D, et al. Identifying purine nucleoside phosphorylase as the target of quinine using cellular thermal shift assay [J]. *Sci Transl Med*, 2019, 11(473): eaau3174.
 [10] Sridharan S, Kurzawa N, Werner T, et al. Proteome-wide solubility and thermal stability profiling reveals distinct regulatory roles for ATP [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1155.

- [11] Vasaturo M, Cotugno R, Fiengo L, *et al.* The anti-tumor diterpene oridonin is a direct inhibitor of nucleolin in cancer cells [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 16735.
- [12] Xu T Y, Zhang S L, Dong G Q, *et al.* Discovery and characterization of novel small-molecule inhibitors targeting nicotinamide phosphoribosyltransferase [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 10043.
- [13] Bantscheff M, Eberhard D, Abraham Y, *et al.* Quantitative chemical proteomics reveals mechanisms of action of clinical ABL kinase inhibitors [J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(9): 1035-1044.
- [14] 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.
- [15] 朱锐灵, 沈悦, 马飞鸿, 等. 分子对接技术在中药抗炎活性成分筛选和作用机制研究中的应用 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2018, 32(6): 497-506.
- [16] 陈丽霞, 程理, 郑梦竹, 等. 基于蛋白质结构的天然产物活性筛选研究进展 [J]. *药学进展*, 2018, 42(1): 39-51.
- [17] 吴坚, 薛晓燕, 王丽芳, 等. 分子对接方法应用与发展 [J]. *亚太传统医药*, 2013, 9(12): 80-81.
- [18] Ewing T J, Makino S, Skillman A G, *et al.* DOCK 4.0: Search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases [J]. *J Comput Aided Mol Des*, 2001, 15(5): 411-428.
- [19] 陈世林. 支持虚拟筛选的数据库管理工具的研究与实现 [D]. 兰州: 兰州大学, 2010.
- [20] McIntosh-Smith S, Price J, Sessions R B, *et al.* High performance *in silico* virtual drug screening on many-core processors [J]. *Int J High Perform Comput Appl*, 2015, 29(2): 119-134.
- [21] 李婧, 马小兵, 沈杰, 等. 基于文献挖掘与分子对接技术的抗新型冠状病毒中药活性成分筛选 [J]. *中草药*, 2020, 51(4): 845-850.
- [22] 沈霞, 孙延芳, 王昊. 基于虚拟筛选的连翘抗炎作用的物质基础研究 [J]. *陕西中医*, 2016, 37(1): 110-112.
- [23] 王芳芳, 潘竞先, 欧阳飏. 基于分子对接的车前草抗炎机制研究 [J]. *中医药学报*, 2012, 40(2): 78-81.
- [24] 郑春松, 严培晶, 付长龙, 等. 从化合物-靶点作用网络的角度证实羌活抗炎镇痛的作用 [J]. *风湿病与关节炎*, 2017, 6(8): 10-14.
- [25] Yadav D K, Mudgal V, Agrawal J, *et al.* Molecular docking and ADME studies of natural compounds of agarwood oil for topical anti-inflammatory activity [J]. *Curr Comput Aided Drug Des*, 2013, 9(3): 360-370.
- [26] 谷宇, 张栩, 陈艳昆, 等. 基于分子模拟技术筛选大黄、羌活、秦艽的 5-LOX、LTA4H 抑制剂 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(23): 4494-4502.
- [27] Lomenick B, Hao R, Jonai N, *et al.* Target identification using drug affinity responsive target stability (DARTS) [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(51): 21984-21989.
- [28] Ceccacci S, Deitersen J, Mozzicafreddo M, *et al.* Carbamoyl-phosphate synthase 1 as a novel target of phomoxanthone A, a bioactive fungal metabolite [J]. *Biomolecules*, 2020, 10(6): E846.
- [29] Kost G C, Yang M Y, Li L W, *et al.* A novel anti-cancer agent, 1-(3,5-dimethoxyphenyl)-4-[(6-fluoro-2-methoxyquinoxalin-3-yl)aminocarbonyl]piperazine (RX-5902), interferes with β -catenin function through Y593 phospho-p68 RNA helicase [J]. *J Cell Biochem*, 2015, 116(8): 1595-1601.
- [30] Conejero-Lara F, Mateo P L. Presence of a slow dimerization equilibrium on the thermal unfolding of the 205-316 thermolysin fragment at neutral pH [J]. *Biochemistry*, 1996, 35(11): 3477-3486.
- [31] Gong F, Peng X, Sang Y, *et al.* Dichloroacetate induces protective autophagy in LoVo cells: Involvement of cathepsin D/thioredoxin-like protein 1 and Akt-mTOR-mediated signaling [J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4: e913.
- [32] Karpus W J, Reynolds N, Behanna H A, *et al.* Inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis by a novel small molecular weight proinflammatory cytokine suppressing drug [J]. *J Neuroimmunol*, 2008, 203(1): 73-78.
- [33] Kobet R A, Pan X P, Zhang B H, *et al.* *Caenorhabditis elegans*: A model system for anti-cancer drug discovery and therapeutic target identification [J]. *Biomol Ther*, 2014, 22(5): 371-383.
- [34] Lomenick B, Olsen R W, Huang J. Identification of direct protein targets of small molecules [J]. *ACS Chem Biol*, 2011, 6(1): 34-46.
- [35] Tanabe N, Kuboyama T, Tohda C. Matrine directly activates extracellular heat shock protein 90, resulting in axonal growth and functional recovery in spinal cord injured-mice [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 446.
- [36] Chin R M, Fu X D, Pai M Y, *et al.* The metabolite α -ketoglutarate extends lifespan by inhibiting ATP synthase and TOR [J]. *Nature*, 2014, 510(7505): 397-401.
- [37] Yang Z Y, Kuboyama T, Tohda C. A systematic strategy for

- discovering a therapeutic drug for Alzheimer's disease and its target molecule [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 340.
- [38] Kim Y J, Kim S, Jung Y, *et al.* Eupatilin rescues ciliary transition zone defects to ameliorate ciliopathy-related phenotypes [J]. *J Clin Invest*, 2018, 128(8): 3642-3648.
- [39] Robinson T J, Pai M, Liu J C, *et al.* High-throughput screen identifies disulfiram as a potential therapeutic for triple-negative breast cancer cells: Interaction with IQ motif-containing factors [J]. *Cell Cycle*, 2013, 12(18): 3013-3024.
- [40] Fleta-Soriano E, Martínez J P, Hinkelmann B, *et al.* The myxobacterial metabolite ratjadone A inhibits HIV infection by blocking the Rev/CRM1-mediated nuclear export pathway [J]. *Microb Cell Fact*, 2014, 13: 17.
- [41] Chang J, Kim Y, Kwon H J. Advances in identification and validation of protein targets of natural products without chemical modification [J]. *Nat Prod Rep*, 2016, 33(5): 719-730.
- [42] 林钟劝, 张波. 表面等离子共振生物传感技术及其在临床实验诊断中的应用 [J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(5): 585-587.
- [43] Homola J. Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species [J]. *Chem Rev*, 2008, 108(2): 462-493.
- [44] Šakanovič A, Hodnik V, Anderluh G. Surface plasmon resonance for measuring interactions of proteins with lipids and lipid membranes [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 2003: 53-70.
- [45] Willets K A, van Duyne R P. Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing [J]. *Annu Rev Phys Chem*, 2007, 58: 267-297.
- [46] Canoa P, Simón-Vázquez R, Popplewell J, *et al.* A quantitative binding study of fibrinogen and human serum albumin to metal oxide nanoparticles by surface plasmon resonance [J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 74: 376-383.
- [47] 尹磊森. 表面等离子共振技术在中医药研究中应用进展 [J]. 世界中医药, 2020, 15(11): 1555-1558.
- [48] 李鹏飞, 龚真莉, 杜晓华, 等. 基于表面等离子体共振 (SPR) 技术实时分析 RGD 基序与整联蛋白的相互作用 [J]. 畜牧兽医学报, 2021, 52(1): 256-261.
- [49] Zhang D C, Yan Y R, Li Q, *et al.* Label-free and high-sensitive detection of salmonella using a surface plasmon resonance DNA-based biosensor [J]. *J Biotechnol*, 2012, 160(3/4): 123-128.
- [50] Mazumdar S D, Barlen B, Kämpfer P, *et al.* Surface plasmon resonance (SPR) as a rapid tool for serotyping of *Salmonella* [J]. *Biosens Bioelectron*, 2010, 25(5): 967-971.
- [51] Jyoung J Y, Hong S, Lee W, *et al.* Immunosensor for the detection of *Vibrio cholerae* O1 using surface plasmon resonance [J]. *Biosens Bioelectron*, 2006, 21(12): 2315-2319.
- [52] Mendes R K, Carvalho R F, Stach-Machado D R, *et al.* Surface plasmon resonance immunosensor for early diagnosis of Asian rust on soybean leaves [J]. *Biosens Bioelectron*, 2009, 24(8): 2483-2487.
- [53] Taylor A D, Ladd J, Yu Q M, *et al.* Quantitative and simultaneous detection of four foodborne bacterial pathogens with a multi-channel SPR sensor [J]. *Biosens Bioelectron*, 2006, 22(5): 752-758.
- [54] Park T J, Hyun M S, Lee H J, *et al.* A self-assembled fusion protein-based surface plasmon resonance biosensor for rapid diagnosis of severe acute respiratory syndrome [J]. *Talanta*, 2009, 79(2): 295-301.
- [55] Vachali P, Li B X, Nelson K, *et al.* Surface plasmon resonance (SPR) studies on the interactions of carotenoids and their binding proteins [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2012, 519(1): 32-37.
- [56] Dutra R F, Kubota L T. An SPR immunosensor for human cardiac troponin T using specific binding avidin to biotin at carboxymethyl-dextran-modified gold chip [J]. *Clin Chimica Acta*, 2007, 376(1/2): 114-120.
- [57] Fang X Y, Tie J, Xie Y H, *et al.* Detection of gastric carcinoma-associated antigen MG7-Ag in human sera using surface plasmon resonance sensor [J]. *Cancer Epidemiol*, 2010, 34(5): 648-651.
- [58] Hardy G J, Lam Y, Stewart S M, *et al.* Screening the interactions between HIV-1 neutralizing antibodies and model lipid surfaces [J]. *J Immunol Methods*, 2012, 376(1/2): 13-19.
- [59] Yue Q X, Cao Z W, Guan S H, *et al.* Proteomics characterization of the cytotoxicity mechanism of ganoderic acid D and computer-automated estimation of the possible drug target network [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2008, 7(5): 949-961.
- [60] Jiang B H, Li D F, Deng Y P, *et al.* Salvianolic acid A, a novel matrix metalloproteinase-9 inhibitor, prevents cardiac remodeling in spontaneously hypertensive rats [J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e59621.
- [61] Zheng X C, Yang D, Liu X, *et al.* Identification of a new anti-LPS agent, geniposide, from *Gardenia jasminoides*

- Ellis, and its ability of direct binding and neutralization of lipopolysaccharide *in vitro* and *in vivo* [J]. *Int Immunopharmacol*, 2010, 10(10): 1209-1219.
- [62] 马松涛, 刘冬恋, 牛锐, 等. 牛蒡子苷治疗糖尿病肾病的随机双盲安慰剂多中心 III 期临床试验 [J]. 中国临床药理学杂志, 2011, 27(1): 15-18.
- [63] Zhong Y F, Lee K, Deng Y Y, *et al.* Arctigenin attenuates diabetic kidney disease through the activation of PP2A in podocytes [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 4523.
- [64] 邵欣欣, 陈聪, 王振国, 等. 靶向 5-LOX 中药黄酮类化合物的活性筛选及其作用方式和共性规律研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(9): 1506-1514.
- [65] 何田, 贾玮娟, 王弯弯, 等. 基于荧光光谱、表面等离子体共振、分子对接技术的天然产物中 14-3-3 τ 蛋白抑制剂的筛选 [J]. 国际药学研究杂志, 2019, 46(8): 582-590.
- [66] 李秀丽, 陈艳玲, 赵军丽, 等. 表面等离子体共振生物传感器研究进展 [J]. 药物分析杂志, 2005, 25(11): 1399-1403.
- [67] 安娜, 郑子繁, 董美, 等. 基于表面等离子体共振的核酸传感器研究进展 [J]. 中国农业科技导报, 2019, 21(5): 55-61.
- [68] Maalouf R, Fournier-Wirth C, Coste J, *et al.* Label-free detection of bacteria by electrochemical impedance spectroscopy: Comparison to surface plasmon resonance [J]. *Anal Chem*, 2007, 79(13): 4879-4886.
- [69] Rasooly A, Herold K E. Biosensors and biodetection: Methods and protocols. Preface [J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 503: v-ix.

[责任编辑 崔艳丽]