

## 中药药效物质识别与作用靶标的表征确证技术研究进展

袁露萍, 方文秀<sup>#</sup>, 李梦颖, 吴 优, 许晓莹, 秦路平\*, 王小艳\*

浙江中医药大学, 浙江 杭州 310000

**摘要:** 中药复杂体系中药效物质的识别及与作用靶标相互作用的表征确证, 是困扰中药现代化研究的瓶颈难题。近年来, 多种分子互作表征技术被成功应用于中药研究领域, 用来识别和表征中药的关键药效物质与疾病作用靶点的分子间相互作用。这些研究结果为探索疾病发生发展的病理基础、诠释中药关键药效物质与其作用靶点精准互作的药效机制提供理论依据。通过对表面等离子体共振、等温滴定量热、生物膜干涉和微量热泳动4种主要的分子互作表征技术的原理、优势特点与应用进展进行综述, 为中药现代化研究提供方法策略的参考依据。

**关键词:** 中药药效物质; 药物靶点; 分子间相互作用; 表面等离子体共振; 等温滴定量热; 生物膜干涉; 微量热泳动

**中图分类号:** R284      **文献标志码:** A      **文章编号:** 0253-2670(2023)10-3370-08

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.10.033

## Research progress on technologies of characterization and identification on active substances and targets of traditional Chinese medicine

YUAN Lu-ping, FANG Wen-xiu, LI Meng-ying, WU You, XU Xiao-ying, QIN Lu-ping, WANG Xiao-yan  
Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310000, China

**Abstract:** The identification of active substances in complex system of traditional Chinese medicine (TCM) and the characterization and confirmation of the interaction with the targets are the bottleneck problems plaguing the modernization research of TCM. In recent years, a variety of molecular interaction characterization techniques have emerged and been successfully applied to identify and characterize the intermolecular interactions between key active substances and their disease targets in field of TCM research. These research results will provide a theoretical basis for exploring the pathological basis of the occurrence and development of the disease and interpreting the pharmacodynamic mechanism of accurate interaction between the key pharmacodynamic substances of TCM and their action targets. The principles, advantages, and application advances of four major molecular interaction characterization techniques, such as surface plasmon resonance, isothermal titration calorimetry, bio layer interferometry and microscale thermophoresis, were reviewed, to provide reference for methodological strategies in research of TCM modernization.

**Key words:** traditional Chinese medicinal active substance; drug target; intermolecular interaction; surface plasmon resonance; isothermal titration calorimetry; bio layer interferometry; microscale thermophoresis

中药药效物质是中药发挥药效作用的物质基础。但由于中药的药效作用普遍具有多成分、多靶点、多途径的特点, 使得中药药效物质的识别、作用靶标的发现表征及确证异常困难。并且, 临床上常以多味中药配伍形成复方后应用于疾病的治疗, 这样复杂的基质体系, 使其更具挑战。中药发展的难点在于<sup>[1]</sup>: (1) 中药的药效物质可能是通过介导

体内间接途径发挥药效作用, 这些成分的体内直接作用靶点较难明确; (2) 中药可能含有一些功效强但含量低的药效物质, 这些微量药效物质的识别很难通过传统的分离检测手段得以实现; (3) 中药复方中的药效物质可能是由复方中多味药材共同煎煮过程中经多种成分相互作用发生物理化学反应而产生某些新物质, 这些新物质的发现较难明确。

收稿日期: 2022-12-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81973571); 浙江中医药大学远志优青(2019)

作者简介: 袁露萍, 硕士研究生, 研究方向为中药药效物质与疾病靶点蛋白互作表征及功效验证。E-mail: ylp0528208254@163.com

\*通信作者: 王小艳(1981—), 博士, 副研究员, 从事中药药效物质识别与靶标挖掘及确证研究。E-mail: xy.wang@zcmu.edu.cn

秦路平(1966—), 博士, 教授, 从事中药资源开发利用研究。E-mail: lpqin@zcmu.edu.cn

#共同第一作者: 方文秀, 硕士研究生, 研究方向为疾病靶点蛋白的重组表达纯化及分子互作表征。E-mail: fwx55068305@163.com

因此,如何准确、灵敏、高效地从中药的复杂基质中识别出关键药效物质并确证其作用靶标,是探讨中药作用机制、提高中药质量标准、开发中药新颖用途等关乎中药现代化研究与应用的关键性瓶颈问题<sup>[2]</sup>。

药物作用于机体发挥药理效应的本质是药物分子与靶标受体间发生分子间相互作用。目前,随着多学科知识技术的不断交叉创新,陆续涌现出多种用于表征分子间相互作用的技术手段,如表面等离子体共振技术(surface plasmon resonance, SPR)、等温滴定量热技术(isothermal titration calorimetry, ITC)、生物膜层干涉技术(bio layer interferometry, BLI)、微量热泳动技术(microscale thermophoresis, MST)等。本文通过对上述4种分子互作表征技术的原理、方法特点及在中药研究中的应用进展进行综述,为中药药效物质识别及与作用靶标相互作用的表征确证,提供方法策略上的参考或启示。

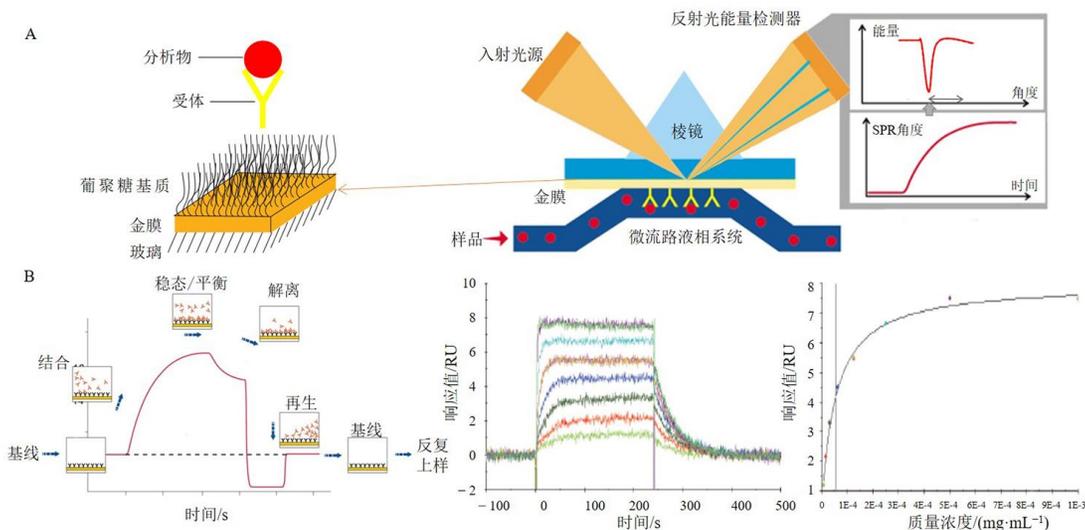
## 1 SPR 技术

### 1.1 SPR 的技术原理与方法特点

SPR 是一种无需标记的、表征分子间互作的光学检测技术,能够对分子间相互作用的动态过程进行实时监测、快速表征,并实现定量分析。

SPR 检测系统的核心元件、检测原理与表征方法<sup>[3-4]</sup>见图1。传感芯片是以表面涂有一层薄金膜的玻璃片为载体,通常金膜上覆盖有葡聚糖基质用于

固定分子。光在棱镜与金属膜表面形成的消逝波会扰动等离子波,两波相遇则发生共振,入射光的大部分能量被表面等离子波吸收,导致检测到的反射光强会大幅度减弱,能量几乎为零。在反射光强的响应曲线中,可以看到一个小的尖峰,此时对应的入射光波长为共振波长,对应的入射角为 SPR 角。当光波长一定时,SPR 角会随着传感芯片表面的折射率变化而变化,而此折射率的变化与芯片表面结合的相对分子质量成正比。因此,可以通过监测 SPR 角的动态变化获得在芯片表面发生的分子间相互作用的特异信号。表征时,将靶点蛋白受体通过氨基偶联等方式固定在传感芯片表面;将药物分子配制成一定浓度的溶液作为分析物,通过微射流卡盘流到传感芯片表面。随着药物分子开始与靶点蛋白受体发生结合,SPR 信号会迅速增加;当分析物连续输送到传感芯片上,受体上结合位点的数量减少,结合效应趋于饱和时,SPR 信号趋于稳态平衡;当不再将分析物引入分析系统时,结合复合物发生解离,SPR 信号降低。由此,通过监测 SPR 角信号的动态变化,从结合、解离反应的表征中得到两分子间的结合常数(association constant,  $K_a$ )和解离常数(dissociation constant,  $K_d$ ),二者之比即为两分子间的平衡解离常数(dissociation equilibrium constant,  $KD$ ),该值反映出药物与靶点的分子间相互作用力大小及特异性等信息。



A-SPR 技术的检测原理 B-SPR 技术的表征方法  
A-detection principle of SPR B-characterization methods of SPR

图 1 SPR 技术的检测原理和表征方法

Fig. 1 Detection principle and characterization methods of SPR

## 1.2 SPR 技术在中药药效物质识别与作用靶标表征确证中的应用

**1.2.1 中药单味药研究中 SPR 技术的应用** 王岱东等<sup>[5]</sup>和 Mohanan 等<sup>[6]</sup>研究发现肿瘤免疫调节的潜在靶点, 程序性死亡-1 受体 (programmed death-1, PD-1) 是由程序性细胞死亡蛋白 1 基因编码的 268 个氨基酸残基组成的膜蛋白。PD-1 和其配体 PD-L1 结合, 启动 T 细胞的程序性死亡, 使肿瘤细胞获得免疫逃逸。而 PD-1 抑制剂则可通过克服患者体内的免疫抑制, 重新激活患者自身的免疫细胞杀伤肿瘤, 是一种全新的抗肿瘤免疫治疗策略。因此, 以 PD-1 为靶点的免疫调节对抗肿瘤、抗感染、抗自身免疫性疾病及器官移植存活等具有重要意义。中药为寻找有效的 PD-1 抑制剂提供了重要的线索和巨大的化合物宝库。王岱东等<sup>[5]</sup>通过液质联用分析从人参中鉴定出人参皂苷 Rc、人参皂苷 Ro 等 9 个皂苷类成分, 并运用 SPR 技术从中识别出人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 和人参皂苷 Re, 且这 3 个成分均具有与 PD-1 靶点结合活性, 进一步分别表征出它们的结合能力, 即 KD 大小由高到低依次为人参皂苷 Rb<sub>1</sub> > 人参皂苷 Re > 人参皂苷 Rg<sub>1</sub>; 以此为基础, 对活性化学成分进行细胞药理实验验证, 为阐释人参调节免疫和抗肿瘤的药效机制提供依据。

**1.2.2 中药复方研究中 SPR 技术的应用** He 等<sup>[7]</sup>研究发现血府逐瘀汤在传统中医典籍记载中具有活血祛瘀、行气止痛之功效, 临床上可用于治疗以气滞血瘀证导致的斑秃病。该复方由桃仁、红花、当归等 11 味中药组成; 方中含有苦杏仁苷、羟基红花黄色素 A、山柰素、阿魏酸、梓醇、马鞭草苷、β-蜕皮酮、桔梗皂苷 D、芍药苷、柚皮苷、新橙皮苷、甘草苷、甘草酸、柴胡皂苷 A 和柴胡皂苷 D 等丰富的化学成分, 并联合运用计算机模拟分子对接和 SPR 技术, 预测并表征获得了方中所含化学成分马鞭草苷、甘草苷、山柰素和苦杏仁苷分别与斑秃病相关靶点白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、IL-1β、肿瘤坏死因子-α 和骨桥蛋白的药靶两分子间相互作用的亲和力大小, 为识别血府逐瘀汤中关键药效物质、阐释其干预斑秃病的药效作用机制提供了科学依据。

此外, 有大量研究将系统药理数据挖掘、计算机分子对接、超高效液相色谱质谱联用等多种技术与 SPR 联合, 成功地应用于防治新型冠状病毒肺炎、恶性肿瘤等疾病的相关中药药效物质识别与其

作用靶标的发现、表征及确证<sup>[8-11]</sup>。

## 2 ITC 技术

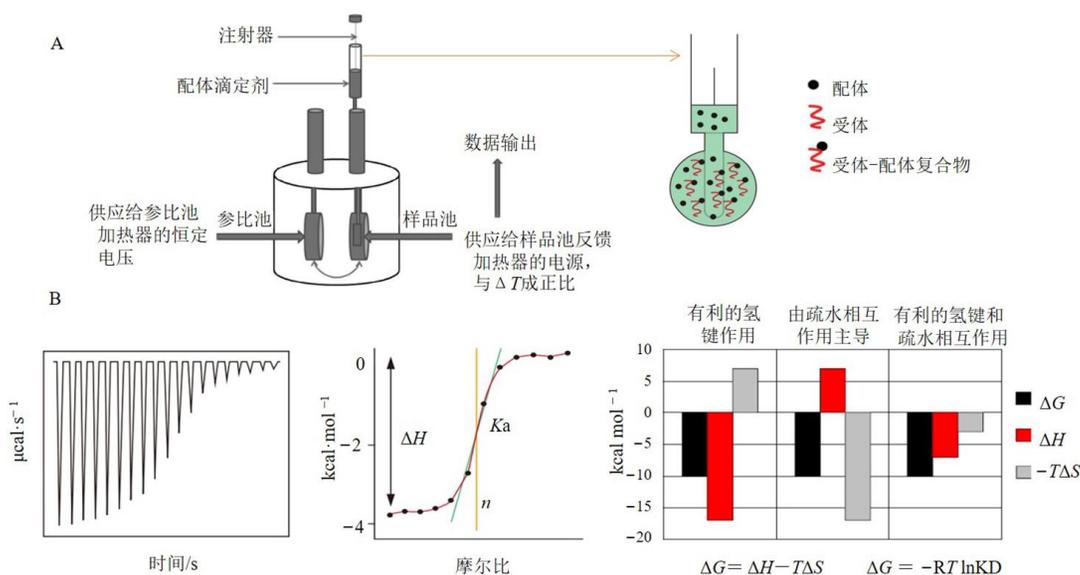
### 2.1 ITC 的技术原理与方法特点

ITC 是一种无需标记的、高灵敏度、高自动化操作的微量量热仪, 可连续、准确地监测出分子间相互作用过程发生的热量变化, 表征出结合过程的量热曲线, 提供亲和力和热力学的全面信息, 有助于了解分子间相互作用力的性质、探索其热力学驱动因素。

ITC 检测系统的核心元件、检测原理与表征方法<sup>[12-13]</sup>见图 2, 在微量量热仪中有 2 个加样池 (对比池和样品池), 2 池以绝热装置隔开。在完全相同的温度下, 将靶蛋白受体溶液加入到样品池中, 再将药物分子配体溶液连续滴加到样品池中; 配体与受体两分子的结合量与仪器检测到的热量变化成正比; 随着配体和受体间摩尔比逐渐增加, 受体的结合位点越来越被饱和, 配体结合的次数也随之减少, 导致结合产生的热量变化也趋于缓和, 直到最终样品池中的配体相对于受体达到过量, 结合反应趋于饱和。表征时, 从以时间尺度记录热量变化的量热曲线, 和以配体和受体的摩尔比作为横坐标、热量变化为纵坐标绘制出的热量积分图中, 拟合获得 2 分子的结合模型、Ka、结合焓变 ( $\Delta H$ )、熵变 ( $\Delta S$ )、结合位点数 ( $N$ )、反应吉布斯自由能 ( $\Delta G$ ) 等热力学和 KD 等全面信息。

### 2.2 ITC 技术在中药药效物质识别与作用靶标表征确证中的应用

苦参具有清热利湿、利尿解毒、改善肝功能等多种药效<sup>[14]</sup>, 其主要成分氧化苦参碱 (oxymatrine, OMT) 的关键作用靶点尚不明晰。血清白蛋白是脊椎动物血浆中含量丰富的蛋白质之一, 具有结合、运输内源与外源性物质、维持血液胶体渗透压、清除自由基、抑制血小板聚集等重要生理功能<sup>[15]</sup>。徐香玉等<sup>[16]</sup>运用 ITC 技术表征发现 OMT 和牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 可发生分子间相互作用时有 2 类主要结合位点。当 2 分子在第 1 类位点结合时, 宏观热力学表现为以熵驱动为主的焓-熵协同驱动过程, 微观上是以分子间疏水相互作用为主要驱动力, 并且通过分析获得第 1 类结合过程的平衡常数  $K_1 = (2.14 \pm 0.31) \times 10^5$ 、标准摩尔  $\Delta H_1 = (-1.07 \pm 0.50) \text{ kJ/mol}$ 、标准摩尔  $\Delta G_1 = (-30.4 \pm 0.4) \text{ kJ/mol}$  和最大  $N_1 = 10.0 \pm 0.2$  等具体信息; 当 2 分子在第 2 类位点相结合时, 宏观热力学



A-ITC 技术的检测原理 B-ITC 技术的表征方法  
A-detection principle of ITC B-characterization methods of ITC

图 2 ITC 技术的检测原理与表征方法

Fig. 2 Detection principle and characterization methods of ITC

学则表现为熵驱动过程,微观上则是以静电相互作用力为主要驱动力,第 2 类结合过程的平衡常数  $K_2 = (6.84 \pm 0.32) \times 10^3$ , 标准摩尔  $\Delta H_2 = (1.91 \pm 0.03)$  kJ/mol, 标准摩尔  $\Delta G_2 = (-21.9 \pm 0.4)$  kJ/mol, 最大  $N_2 = 25.0 \pm 0.3$ 。根据得出的不同结合位点相互作用的热力学差异,进一步结合圆二色谱结果分析,明确这 2 类结合过程中 OMT 与 BSA 的相互作用均可影响靶点蛋白质的二级结构、并导致不同结构单元相对含量变化等微观机制。

丹参是活血化瘀之良药,但其药效物质及作用靶点仍需深入挖掘。凝血酶是一种丝氨酸蛋白酶,可催化纤维蛋白原转化为纤维蛋白,使血液凝固而止血,是现代药物研究中抗凝防栓的关键靶点<sup>[17]</sup>。王佳宇<sup>[18]</sup>运用 ITC 技术表征发现丹参中的丹酚酸 A、丹酚酸 D、异阿魏酸、阿加曲斑与凝血酶发生分子间相互作用时  $\Delta G < 0$ , 提示这些分子间的相互作用均可以自发发生;其中阿加曲斑与凝血酶的  $K_a$  最高,丹酚酸 A 次之;此外,通过结合  $\Delta H$  与  $\Delta S$  的数据分析,提示这 5 个化学成分与凝血酶的结合以离子键的形式发生。值得注意的是,丹酚酸 D 与异阿魏酸混合时与受体蛋白的  $K_a$  大于各自单独滴定的  $K_a$  之和,且 ITC 表征曲线不符合 Independent 模型,提示丹酚酸 D 与异阿魏酸分别与凝血酶的不同位点发生相互作用。

此外,雷公藤具有抗炎、抗肿瘤、调节免疫、抗病毒等多种药理作用,Peng 等<sup>[19]</sup>应用 ITC 技术深入探讨活性成分雷公藤红素与热休克蛋白 90 相互作用的分子基础,解释了雷公藤红素在治疗癌症和改善退行性神经疾病方面的作用机制。这些研究结果为揭示中药药效物质与其作用靶标的药靶互作机制提供了信息丰富的实验证据。

### 3 BLI 技术

#### 3.1 BLI 的技术原理与方法特点

BLI 通过实时监测生物传感器表面的光干涉信号,将其转化为响应信号,以表征获得 2 分子结合过程中发生相互作用的参数信息,具有耐受粗样品、非标记、快速简便、数据可靠等优点。

BLI 检测系统的核心元件、检测原理与表征方法<sup>[20]</sup>见图 3,生物传感器由末端外添加特殊光学层的玻璃光纤制成,为分子的固定提供表面化学基质。当分析物与固定在生物传感器表面上的分子结合时,会引起光学层厚度增加,反射光的路径长度增长,导致干涉光谱曲线发生改变,并产生向右的位移。同理,当 2 分子解离时,分析物从生物传感器表面解离到溶液中,使得干涉光谱曲线向左位移。2 分子发生结合,引起光干涉信号的改变。表征时,以干涉光谱曲线的偏移距离和反应发生的时间绘制得出 BLI 传感图。通过 BLI 传感图,可在各种结合

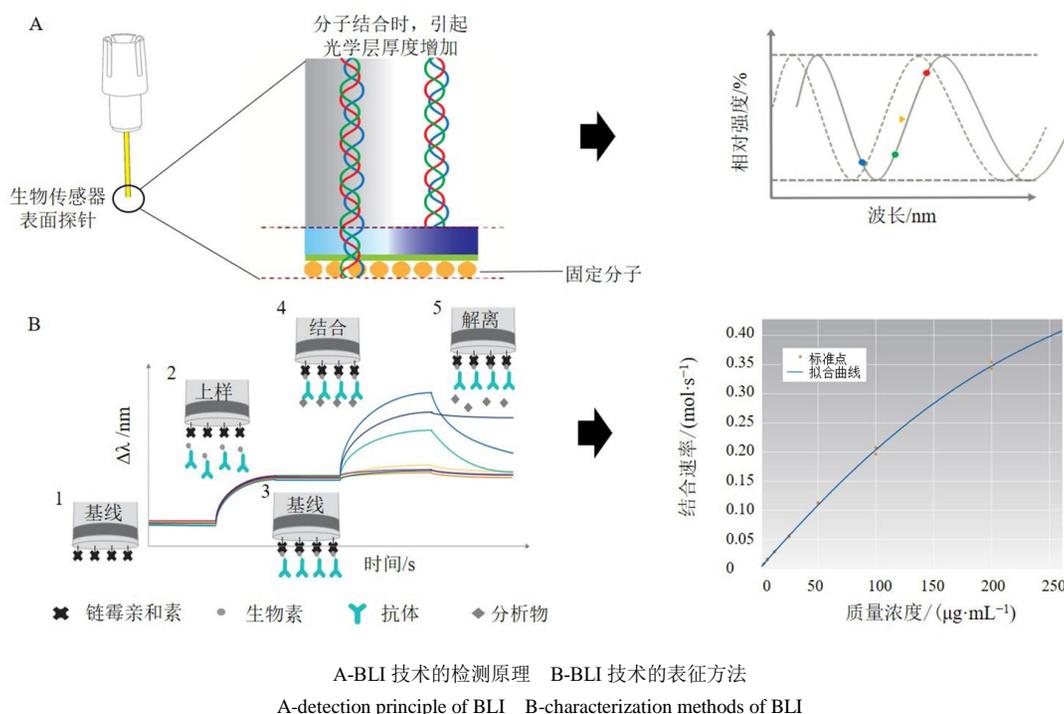


图 3 BLI 技术的检测原理与表征方法

Fig. 3 Detection principle and characterization methods of BLI

模型的基础上拟合出 2 分子相互作用的  $K_a$ 、 $K_d$ 、 $KD$  和起始结合速率等数值。

### 3.2 BLI 技术在中药药效物质识别与作用靶标表征确证中的应用

BLI 技术耐受粗样品的优势，更适于中药复方提取液等这类复杂粗放样品的药效物质识别与靶点互作机制的研究。开心散是由人参、远志、石菖蒲、茯苓 4 味中药配伍组成，主要用于治疗痰阻导致的老年性痴呆等症<sup>[21]</sup>。 $\beta$ -淀粉样蛋白 (amyloid  $\beta$ -protein,  $A\beta$ ) 是通过淀粉样前体蛋白经  $\beta$ -和  $\gamma$ -分泌酶裂解而成的多肽。人体中常见的亚型是  $A\beta_{1-40}$  和  $A\beta_{1-42}$ ，其中  $A\beta_{1-42}$  的神经毒性更强，容易聚集成纤维化的沉淀，最终在脑中形成老年斑。Guo 等<sup>[22]</sup>应用 BLI 结合超高效液相色谱质谱分析技术，实时监测出开心散提取液（依次增加质量浓度为 125~4000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）与被生物素标记的  $A\beta_{1-42}$  的结合及解离能力，并表征获得二者的  $K_a=115 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{s})$ 、 $K_d=2.60\times 10^{-2} \text{ 1/s}$ 、 $KD=170 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。进而，取 BLI 得到的解离液进行液相色谱联用高分辨质谱分析，结果发现与  $A\beta$  具有很强结合能力的中药成分主要有来源于茯苓的猪苓酸 C、去氢土莫酸和土莫酸。

组分复方是现代中药的一种新颖形式。BLI 技术也同样适用于这类相对粗放分析物的研究。丹参-人

参组分复方是由丹参总酚酸、人参总皂苷和人参多糖这 3 种有效组分配伍而成。该组分复方对人肺癌 A549 细胞具有选择性抑制其增殖的作用，能诱导肺癌细胞凋亡和降低肺癌细胞骨架面积，但可保护正常细胞的作用<sup>[23]</sup>。为进一步明确该组分复方的作用靶点，李变英等<sup>[24]</sup>应用 BLI 技术平行表征了组分复方及 3 种单独组分与通过噬菌体展示技术筛选得到的目标多肽的亲合力，结果表明与目标多肽相互作用的亲合力，组分复方最高 ( $KD=4.57\times 10^{-8} \text{ mol/L}$ )，人参多糖 ( $KD=7.23\times 10^{-8} \text{ mol/L}$ ) 和丹参总酚酸 ( $KD=7.66\times 10^{-8} \text{ mol/L}$ ) 次之，而人参总皂苷没有典型的结合和解离效应，该研究结果表明丹参-人参组分复方与目标多肽结合的主要贡献成分是人参多糖和丹参总酚酸，这为现代中药靶向治疗肺癌的研究提供了更精准的实验依据。

此外，BLI 技术也被应用于从复杂分析物中垂钓出靶点蛋白的研究。人参皂苷作为中药人参的主要有效成分，对脑神经起保护作用，具有减轻兴奋性毒性反应、抗氧化和抗神经炎症、诱导神经干细胞分化以及维持线粒体稳定等方面的作用<sup>[25]</sup>，但该中药成分在脑内的作用靶点尚不清楚。陈飞燕等<sup>[26]</sup>以直接亲和法用人参总皂苷“垂钓”出了脑内靶点蛋白 14-3-3，该蛋白是机体内参与信号转导、细胞

周期调控、凋亡和细胞应激反应等重要细胞生命过程的物质基础；进而采用 BLI 技术分别表征“垂钓”出的蛋白 14-3-3 与人参总皂苷和人参皂苷单体间的相互作用，结果确认的靶蛋白 14-3-3 与人参总皂苷存在明确的分子相互作用，且仅有原人参二醇 ( $KD=7.8 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ ) 和原人参三醇 ( $KD=5.62 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ ) 2 个人参皂苷单体与“垂钓”出的脑内靶点蛋白 14-3-3 有一定程度的相互作用，为人参总皂苷药效作用靶点的发现及后续的确证提供了有力的实验依据。

#### 4 MST 技术

##### 4.1 MST 的技术原理与方法特点

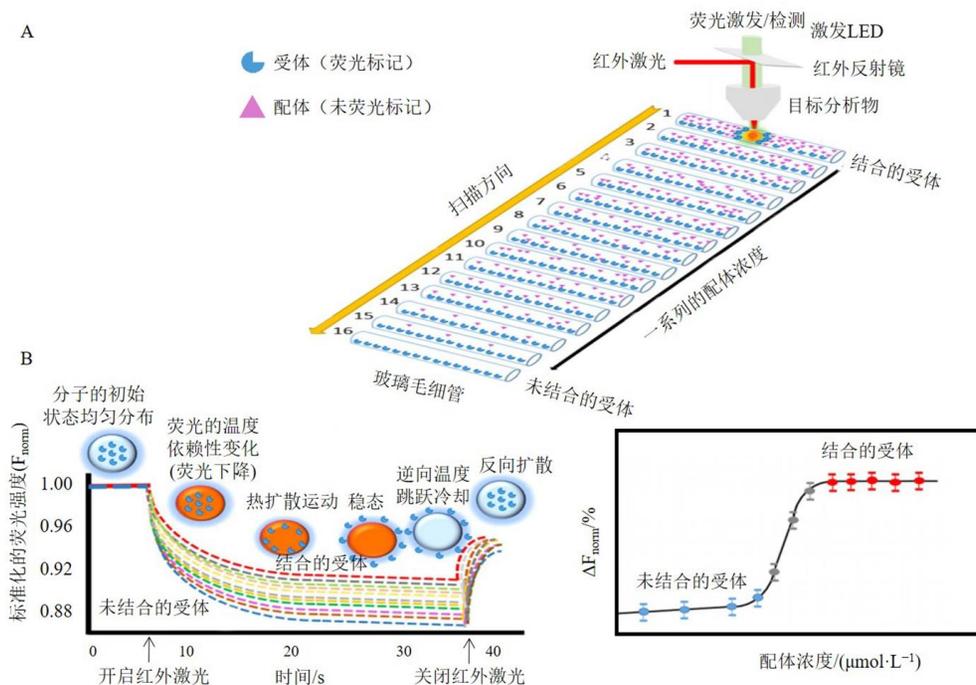
MST 是一种实时监测在有温度梯度的环境中的分子定向泳动，用于表征获得生物分子发生结合的 KD 等参数，具有样品无需固定化、检测时间短、检测灵敏度高、操作方便简单等优点。

MST 检测系统的核心元件、检测原理与表征方法<sup>[27-28]</sup>见图 4，目标分析物被置于薄毛细管腔中。红外激光聚焦到毛细管中心，产生温度梯度。当粒子在具有温度梯度的气体中时，处于较高温度的分子要比处于较低温度的分子以更高的动能与粒子发生碰撞，导致粒子在热流力的作用下从高温部分向

低温部分移动。并且，这种在微观温度梯度场中的定向移动，受分子大小、水化层、电荷改变等因素的影响。在这种热泳现象中，仪器探测到热泳动的特性改变，而产生高度敏感的 MST 信号变化。表征时，首先将受体经荧光标记后，和目标分析物同时放入到薄毛细管中；随后，MST 仪器内部发出红外激光引起局部温差致使管内分子发生定向移动；荧光标记受体的荧光强度在温度梯度中随时间发生变化，当依次将配体的系列浓度与标准化的荧光强度拟合合成曲线，即可获得分子间相互作用的 KD 值。

##### 4.2 MST 技术在中药药效物质识别与作用靶标表征确证中的应用

二氢杨梅素主要存在于显齿蛇葡萄、苦荞麦、北非雪松等中药中，可用于治疗酒精中毒、非酒精性脂肪肝病、糖尿病、骨质疏松症等<sup>[29]</sup>。杨梅素则具有缓解焦虑和提高认知能力的作用，并可能预防阿尔茨海默病等神经退行性疾病<sup>[30]</sup>。而运输药物小分子的牛乳铁蛋白常被认为是靶向脑病、肝病及肺病的靶点蛋白。Huang 等<sup>[31]</sup>应用 MST 技术结合多光谱和分子对接分析，表征出牛乳铁蛋白靶点分别与这 2 个中药活性成分相互作用的 KD [与二氢杨



A-MST 技术的检测原理 B-MST 技术的表征方法

A-detection principle of MST B-characterization methods of MST

图 4 MST 技术的检测原理和表征方法

Fig. 4 Detection principle and characterization methods of MST

梅毒素  $KD = (109.80 \pm 4.96) \mu\text{mol/L}$ , 与杨梅素  $KD = (17.65 \pm 0.34) \mu\text{mol/L}$ , 提示牛乳铁蛋白对较大亲和力的杨梅素的转运能力强于较小亲和力的二氢杨梅素, 导致杨梅素在机体内的吸收和生物利用度更高。此外, MST 技术成功应用于现代中药的研究案例也多见其他报道<sup>[32-34]</sup>, 丰富了可用于中药药效物质与其靶标分子间相互作用研究的方法策略。

## 5 结语与展望

本文介绍了 SPR、ITC、BLI、MST 等用于表征分子间相互作用的分析技术。这 4 种技术分别基于不同的检测原理, 可提供多个角度的数据信

息, 各具特色、优点与不足(表 1)。SPR 技术的生物传感器特异性高、灵敏度高, 因此, 更适合于通常与靶点蛋白亲和力较低的中药成分小分子化合物的分析表征; BLI 技术对分析样本的纯度要求较低, 因此, 更适合于耐受中药复方提取液、中药组分溶液等这类粗放样品的分析表征; ITC 技术最大的优势在于提供亲和力和热力学信息, 因此, 更适合全面深入地解析药靶分子间发生相互作用的力学及热力学等机制; MST 技术最大的优势在于, 分析样品的用量少, 因此, 更适合于微量样品的分析表征。

表 1 SPR、ITC、BLI、MST 4 种技术的比较

Table 1 Comparison of four technologies SPR, ITC, BLI and MST

技术	检测原理	获得信息	优点	不足
SPR	SPR 角的动态变化	$K_a$ 、结合速率、解离速率	高灵敏度、实时动态监测、无需样品标记	芯片与化合物的非特异性吸附、样品溶剂和缓冲液折光率的差异导致假阳性信号
ITC	热量动态变化	$K_a$ 、结合焓变、 $\Delta S$ 、结合位点数	获得热力学信息、样品用量小、可表征弱结合、高灵敏度、无需样品标记	对温度、缓冲液和 pH 值敏感
BLI	光干涉信号变化	$K_a$ 、结合速率、 $K_d$	耐受粗样品、对二甲亚砜等有机溶剂不敏感、无需样品标记、检测速度快	应用范围有局限, 依赖于分析条件
MST	热泳动特性变化	$K_a$ 、结合焓变、 $\Delta S$	对样品稳定性要求不高、操作方便、样品用量少、检测速度快、高灵敏度、无需样品标记	对样品兼容性的要求高、检测过程中干扰因素过多

综上所述, 根据不同分析样本的特点和研究目的, 选择一种或几种适宜的分子互作技术进行交叉验证, 全面表征及确证中药药效物质与靶蛋白两分子间发生的药靶相互作用, 以期阐明中药的药效作用机制、揭示中药的药效科学内涵、促进中药的现代新药研发, 这是中医药守正创新研究的关键路径。

**致谢:** 浙江中医药大学中医药科学院科研中心提供的平台支持。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

- [1] 马清林, 杜丽东, 臧凯宏, 等. 网络药理学在复方中药研究中的应用及其存在的问题 [J]. 中国当代医药, 2019, 26(26): 21-24.
- [2] 易欢, 段龙强, 耿焱. 中药复方药效物质基础研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2021, 17(8): 210-213.
- [3] Nguyen H H, Park J, Kang S, et al. Surface plasmon resonance: A versatile technique for biosensor applications [J]. *Sensors*, 2015, 15(5): 10481-10510.

- [4] 李锋, 陈园园, 魏佳韵, 等. 表面等离子共振技术在毒品研究中的应用及展望 [J]. 中国药物依赖性杂志, 2020, 29(6): 406-410.
- [5] 王岱东, 屠鹏飞, 黄亚卓, 等. 人参中 PD-1 小分子抑制剂的筛选及活性验证 [J]. 药学学报, 2020, 55(10): 2428-2434.
- [6] Mohanan P, Subramaniyam S, Mathiyalagan R, et al. Molecular signaling of ginsenosides Rb<sub>1</sub>, Rg<sub>1</sub>, and Rg<sub>3</sub> and their mode of actions [J]. *J Ginseng Res*, 2018, 42(2): 123-132.
- [7] He X, Duan X L, Liu J S, et al. The antiinflammatory effects of Xuefu Zhuyu Decoction on C3H/HeJ mice with alopecia areata [J]. *Phytomedicine*, 2021, 81: 153423.
- [8] Pan B Y, Fang S B, Zhang J, et al. Chinese herbal compounds against SARS-CoV-2: Puerarin and quercetin impair the binding of viral S-protein to ACE2 receptor [J]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2020, 18: 3518-3527.
- [9] Letko M, Marzi A, Munster V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses [J]. *Nat Microbiol*, 2020, 5(4):

- 562-569.
- [10] Wang Q H, Zhang Y F, Wu L L, *et al.* Structural and functional basis of SARS-CoV-2 entry by using human ACE2 [J]. *Cell*, 2020, 181(4): 894-904.e9.
- [11] Chen L D, Lv D Y, Chen X F, *et al.* Biosensor-based active ingredients recognition system for screening STAT3 ligands from medical herbs [J]. *Anal Chem*, 2018, 90(15): 8936-8945.
- [12] 余丹丹, 邬瑞光. 等温滴定量热技术在药物研究中的应用 [J]. *中草药*, 2018, 49(22): 5463-5467.
- [13] 孙小婷, 靳岚, 凌沛学. 表面等离子共振和等温滴定量热技术及其在蛋白质相互作用中的应用 [J]. *药物生物技术*, 2012, 19(6): 540-545.
- [14] 马雪宁, 杨素清, 张君成, 等. 苦参药理作用研究进展 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2023, 25(1): 152-156.
- [15] Arques S. Human serum albumin in cardiovascular diseases [J]. *Eur J Intern Med*, 2018, 52: 8-12.
- [16] 徐香玉, 孙祥军, 刘敏, 等. 氧化苦参碱与牛血清白蛋白相互作用的热力学研究 [J]. *化学学报*, 2009, 67(18): 2155-2158.
- [17] 韩彦琪, 武琦, 林娟, 等. 丹红化瘀口服液对视网膜中央静脉阻塞症关键靶点的调节作用 [J]. *中草药*, 2022, 53(6): 1634-1642.
- [18] 王佳宇. 柱后活性筛选丹参中直接抗凝血酶有效成分的研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2017.
- [19] Peng B, Gu Y J, Wang Y, *et al.* Mutations Y493G and K546D in human HSP90 disrupt binding of celastrol and reduce interaction with Cdc37 [J]. *FEBS Open Bio*, 2016, 6(7): 729-734.
- [20] Wallner J, Lhota G, Jeschek D, *et al.* Application of biolayer interferometry for the analysis of protein/liposome interactions [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 72: 150-154.
- [21] 王瑾, 周小江, 胡园, 等. 开心散药效物质基础和药理作用机制的研究进展 [J]. *中草药*, 2020, 51(18): 4780-4788.
- [22] Guo M S, Zhu F D, Qiu W Q, *et al.* High-throughput screening for amyloid- $\beta$  binding natural small-molecules based on the combinational use of biolayer interferometry and UHPLC-DAD-Q/TOF-MS/MS [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12(4): 1723-1739.
- [23] 颜晓静, 杨焯, 毕蕾, 等. 丹参-人参组分配伍对肺癌 A549 增殖、凋亡和骨架的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(22): 4436-4441.
- [24] 李变英, 陈飞燕, 陈建平, 等. T7 噬菌体展示人肺癌 cDNA 文库筛选丹参-人参组分复方靶点研究 [J]. *中成药*, 2016, 38(4): 745-750.
- [25] Selkoe D J, Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years [J]. *EMBO Mol Med*, 2016, 8(6): 595-608.
- [26] 陈飞燕, 欧阳柳凤, 江玉翠, 等. 人参总皂苷亲和“垂钓”脑内蛋白质靶点的研究 [J]. *中药药理与临床*, 2016, 32(3): 41-45.
- [27] Wang Q, Wang J, Song S X, *et al.* Microscale thermophoresis in the investigation of biomolecular interactions [J]. *J Chinese Pharm Sci*, 2020, 29(9): 656-665.
- [28] El Deeb S, Al-Harrasi A, Khan A, *et al.* Microscale thermophoresis as a powerful growing analytical technique for the investigation of biomolecular interaction and the determination of binding parameters [J]. *Methods Appl Fluoresc*, 2022, 10(4): 042001.
- [29] 周海云, 王文清, 施春阳, 等. 二氢杨梅素药理及药物相互作用研究进展 [J]. *中草药*, 2018, 49(14): 3411-3418.
- [30] 王潞, 周云英. 杨梅素抗感染、抗炎及抗氧化活性研究进展 [J]. *中草药*, 2019, 50(3): 778-784.
- [31] Huang J Y, He Z Y, Cheng R Q, *et al.* Assessment of binding interaction dihydromyricetin and myricetin with bovine lactoferrin and effects on antioxidant activity [J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2020, 243: 118731.
- [32] Zhang S J, Zhang J X, Wei D F, *et al.* Dengzhan Shengmai Capsules and their active component scutellarin prevent cognitive decline in APP/PS1 mice by accelerating A $\beta$  aggregation and reducing oligomers formation [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 121: 109682.
- [33] Gu M J, Zhou Y F, Liao N K, *et al.* Chrysophanol, a main anthraquinone from *Rheum palmatum* L. (rhubarb), protects against renal fibrosis by suppressing NKD2/ NF- $\kappa$ B pathway [J]. *Phytomedicine*, 2022, 105: 154381.
- [34] Deng Y, Guo W J, Li G C, *et al.* Protocatechuic aldehyde represses proliferation and migration of breast cancer cells through targeting C-terminal binding protein 1 [J]. *J Breast Cancer*, 2020, 23(1): 20-35.

[责任编辑 赵慧亮]