

天然产物靶点发现策略研究进展及应用

高艳杰^{1,2}, 李杨小涵^{1,2}, 方 朵^{1,2}, 高 改^{1,2}, 谢治深^{1,2}, 张振强^{1,2}, 徐江雁^{1,2}, 张效威^{1,2*}

1. 河南中医药大学中医药科学院, 河南 郑州 450046

2. 中西医防治重大疾病河南省协同创新中心, 河南 郑州 450046

摘 要: 天然产物具有结构多样、生物活性广泛等特点, 已经成为新药开发及先导化合物发现的主要来源。靶点不明确严重阻碍了许多天然产物的研究和开发进程, 靶点解析也因此成为天然产物研究领域亟待突破的瓶颈问题和当前的热点问题。近年来, 围绕天然产物靶点发现开展了大量研究, 并逐步建立起较为系统的方法体系。天然产物靶点发现策略通常可根据是否需要研究对象进行化学修饰, 分为标记策略和非标记策略 2 大类。系统梳理上述 2 类策略框架下的主要靶点发现技术, 重点总结各类方法的作用原理、技术优势、局限性、适用场景及其代表性应用案例, 为天然产物作用机制研究以及靶点发现提供参考与思路。

关键词: 天然产物; 靶点发现; 活性探针; 点击化学; 标记策略; 非标记策略

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2026)16-6566-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.16.028

Research progress and applications of target discovery strategies for natural products

GAO Yanjie^{1,2}, LI Yangxiaohan^{1,2}, FANG Duo^{1,2}, GAO Gai^{1,2}, XIE Zhishen^{1,2}, ZHANG Zhenqiang^{1,2}, XU Jiangyan^{1,2}, ZHANG Xiaowei^{1,2}

1. Academy of Chinese Medical Sciences, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

2. Collaborative Innovation Center of Prevention and Treatment of Major Diseases by Chinese and Western Medicine, Zhengzhou 450046, China

Abstract: Natural products, characterized by structural diversity and broad biological activities, have become a major source for drug discovery and lead compound identification. However, unclear targets have seriously hindered the research and development of many natural products, making target identification a critical bottleneck and a major focus in this field. In recent years, extensive efforts have been devoted to the discovery of natural product targets, and a relatively systematic methodological framework has gradually been established. According to whether chemical modification is required, current target identification strategies for natural products can be broadly classified into two categories: labeled and label-free approaches. This review systematically summarizes the major target identification techniques within these two strategic frameworks, with particular emphasis on their underlying principles, technical advantages, limitations, applicable scenarios, and representative applications, in order to provide references and insights for mechanistic studies and target discovery of natural products.

Key words: natural products; target discovery; activity probes; click chemistry; labeling-based strategies; label-free approaches

天然产物主要来源于动物、植物中, 具有丰富的立体结构、多样的官能团和良好的生物兼容性, 与人工合成的小分子相比, 许多天然产物的三维构象复杂, 结构有较高的新颖性, 能够与生物体内蛋白或调控网络发生相互作用, 因此在现代药物研究

与开发的过程中扮演着重要的角色^[1]。半数以上的抗癌药和抗菌药物源自天然产物, 如紫杉醇^[2-3]、青蒿素^[4]、长春花碱^[5]等体现天然产物在新药研究中的重大作用。靶点是阐明天然产物药效作用及分子机制的重要基础, 明确作用靶点有助于阐明天然产

收稿日期: 2026-04-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82474495); 国家重点研发计划项目 (2020YFE0201800); 河南省高校科技创新人才支持计划 (24HASTIT072); 河南省省级科技研发计划联合基金 (学科类) 项目 (252301420113)

作者简介: 高艳杰, 硕士研究生, 研究方向为中药活性成分靶点发现及机制。E-mail: 15890389358@163.com

*通信作者: 张效威, 副研究员, 从事中药活性成分筛选、靶点发现及作用机制研究。E-mail: zhangxw2020@163.com

物从成分到药效表型之间的因果关系,还可为药效物质基础确认及后续临床转化提供依据。尽管天然产物已被证实具有治疗疾病的潜力,但是靶点不明确制约天然产物在药理作用机制及药效物质基础方面的深入解析,降低其临床转化的可能性,同时制约新药开发的进程。因此天然产物的靶点发现与解析成为当前研究领域关注的重点。近年来围绕天然产物靶点发现已经发展出多种方法,并逐步形成较为系统的研究体系。现阶段相对成熟的天然产物靶点发现方法主要分为标记和非标记策略 2 大类,前者主要以天然产物本身为基础,最大程度保证生物活性的基础上实现靶蛋白的富集、识别;后者则是基于天然产物与蛋白结合后引起的稳定性、酶解敏感性等理化性质变化进行靶点识别,这在一定程度上避免了化学修饰带来的活性干扰^[6-7]。目前,以活性蛋白质组分析(activity-based protein profiling, ABPP)技术、基于底物的新型邻近标记技术(specific pupylation as identity reporter, SPIDER)、蛋白水解靶向嵌合体技术(proteolysis-targeting chimeras, PROTAC)为代表的标记策略,以细胞热位移分析(cellular thermal shift assay, CETSA)、热蛋白质组分析技术(thermal proteome profiling, TPP)、药物亲和反应靶稳定性(drug affinity responsive target stability, DARTS)、有限蛋白水解质谱技术(limited proteolysis mass spectrometry, Lip-MS)、细胞培养中氨基酸稳定同位素标记技术(stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC)、蛋白质氧化速率稳定性(stability of proteins from rate of oxidation, SPROX)为代表的非标记策略均已在天然产物靶点发现研究中得到广泛应用。SILAC 等定量蛋白质组学方法也常与上述策略结合,用于提高靶点筛选和差异蛋白分析的可靠性。2 种策略在应用的过程中各有优势、局限性与适用范围,仅对现有方法进行归纳总结还不能满足对不同类型天然产物靶点识别的需求,因此本文在梳理基本原理的基础上进一步分析每种技术的特点、局限性、适用范围及对相关技术的优化方向和改进思路,为天然药物靶点的发现提供启发和借鉴。

1 基于标记的天然产物靶点发现方法

基于标记的靶点发现方法是将天然产物进行化学修饰构建分子探针或以天然产物为核心,引入不同模块实现对靶蛋白的标记、邻近捕获或功能干预,被富集到的靶蛋白通过蛋白质组学进行解析或

荧光扫描达到鉴定靶蛋白的目的。该类方法可按标记实现机制进一步分为 ABPP、SPIDER、PROTAC 及蛋白质微阵列等类型。

1.1 基于活性探针介导的蛋白质组学技术

ABPP 是一种依赖天然产物活性的化学探针标记方法,该探针由反应基团、连接链、报告基团 3 部分组成。反应基团是能与蛋白质发生相互作用的化学基团,报告基团是用于检测和富集已被探针标记的蛋白质的模块,如荧光基团罗丹明和生物素,连接链则是起到连接反应基团和报告基团的作用,它的长度随探针的选择性和通透性能改变^[8]。随着探针设计的发展,为适应不同天然产物与靶蛋白相互作用的类型,ABPP 逐渐衍生出不同的标记模式。对于本身能够稳定共价结合靶蛋白的分子,可以直接连接生物素或荧光基团实现标记。若直接连接大体积报告基团会难以进入细胞中,影响细胞通透性,此时可先引入小型生物正交手柄炔基,待探针与靶蛋白结合后再利用点击化学接入报告基团。而对于仅能发生弱相互作用或可逆结合的天然产物,则可进一步引入光敏基团,在光照下生成高活性中间体,将瞬时相互作用转化为稳定的共价连接,从而提高靶点捕获效率。

1.1.1 生物素标记 生物素标记是将具有生物活性的天然产物与生物素进行化学偶联构建探针,探针与细胞内的蛋白质会发生结合,随后利用具有亲和性的亲和素如链霉亲和素珠进行富集,采用蛋白质鉴定方法分析富集物,从而筛选出与天然产物发生相互作用的靶蛋白^[9](图 1-a)。如天然产物芹菜素具有靶向衰老细胞的能力,合成生物素标记的芹菜素以识别过氧化物还原蛋白 6(peroxiredoxin-6, PRDX6)为细胞衰老过程中发挥作用的关键靶点^[10]。类似的还有金属硫蛋白 2A 被鉴定出是青蒿琥酯的直接结合蛋白来对抗帕金森病,这一结果为青蒿琥酯在帕金森病治疗中的应用展现出了潜在的前景。生物素标记还帮助研究者发现膜联蛋白 A2 为高良姜素的靶点,进而揭示高良姜素治疗白癜风的作用机制^[11]。天然产物引入生物素形成生物素探针,本质上保留了天然产物的生物活性及结构,但生物素的引入存在一定的局限性,直接连在天然产物上的荧光基团或生物素相对分子质量较大影响探针进入细胞中,此时需要更改标记手段,选择体积较小、不会干扰天然产物活性的报告基团,如炔基进行化学修饰。生物素是一种结构比较复杂的杂环化合物,

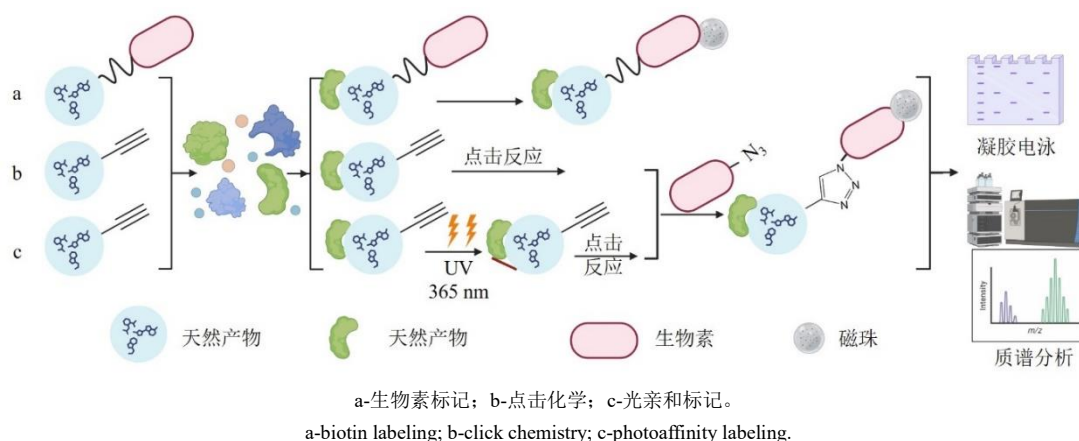


图 1 活性探针标记策略

Fig. 1 Activity-based probe labeling strategies

具有一定的空间位阻, 将其连接到天然产物骨架上会改变天然产物的三维结构导致天然产物生物活性完全丧失。此外, 生物素对于弱结合的靶蛋白难以捕捉且对膜蛋白的富集效率较低。

1.1.2 点击化学 为了解决将荧光基团或生物素直接连接在探针上可能会影响天然产物活性的局限性, 增加靶点的捕获效率、扩大 ABPP 的应用范围, 研究者在探针设计过程中引入了炔基, 发展成点击化学策略。该策略在天然产物上引入小型基团炔基构建成为探针与蛋白质孵育, 在点击化学反应下引入生物素可以将探针标记的蛋白质从复杂蛋白质中分离出来, 结合质谱分析能够高效、准确地鉴定出靶蛋白^[12] (图 1-b)。炔基相当于一个微小的化学手柄, 能够轻松穿透细胞膜进入细胞中, 所以适合用在活细胞或细胞裂解液中。野马追内酯 B 与炔基连接制备成探针后, 该探针与野马追内酯 B 一样, 能够显著抑制三阴性乳腺癌细胞的增殖和迁移, 并诱导细胞凋亡。液相色谱-串联质谱法 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) 鉴定结果提示支链氨基酸转氨酶 1 (branched-chain amino acid transaminase 1, BCAT1) 可作为后续实验验证的靶点, 进一步的研究结果证明野马追内酯 B 可抑制 BCAT1 催化活性, 减少促进肿瘤细胞生长的支链氨基酸含量和相关代谢产物, 改变线粒体的能量代谢状态, 从而发挥抗癌作用^[13]。He 等^[14]对辣椒素进行化学修饰在其基础上引入炔基构建了抗关节炎的分子探针, 富集到 PRDX2 这一靶点蛋白。辣椒素能选择性作用于 172 位半胱氨酸并与其形成二硫键, 抑制其抗氧化功能, 导致活性氧升高, 激活核因子 E2 相关因子 2/血红素加氧酶-1 通

路, 同时抑制蛋白激酶 B 磷酸化, 促进凋亡。此外, 雷公藤红素^[15]、二氢咖啡酸^[16]等天然产物均借助此方法发现其作用靶点并发挥相应的治疗作用。尽管点击化学在天然产物发现方面具有重要作用, 但仍具有一定的局限性。如天然产物必须与靶蛋白共价结合之后才能进行点击反应, 对于非共价结合、弱结合的则需要选择光亲和标记, 使天然产物与靶蛋白产生强结合。而且铜催化叠氮化物-炔基环加成反应对某些细胞系有潜在的毒性, 细胞毒性是由特定催化剂 (如 Cu^{2+}) 介导的活性氧物质的产生引起的, 无铜点击反应体系的反应条件有待开发, 以减少对细胞的潜在刺激。

1.1.3 光亲和标记 点击化学策略依靠天然产物引入反应基团通过共价结合实现标记, 而光亲和标记策略则是利用特定波长照射光反应基团 (如二苯甲酮、双吡丙啶、芳基叠氮等) 瞬时产生高活性中间体 (碳或卡宾) 与邻近化学键形成不可逆的共价交联结合, 这是将可逆的结合转化为永久的共价连接, 为靶点发现提供更稳定、可靠的结合信息, 因此该策略备受广泛关注^[17] (图 1-c)。光亲和标记策略适用于天然产物与靶蛋白无法共价结合形成稳定的结合。光亲和标记可以双重筛选靶点蛋白, 再利用 LC-MS/MS 得到可靠的数据。光亲和标记策略适用于小分子与靶蛋白的结合力较弱, 或相互作用时间短暂容易脱靶, 传统方法难以稳定捕获。据已有文献报道, 可点击的光亲和标记探针在溶酶体整合膜蛋白-2 (lysosomal integral membrane protein-2, LIMP-2) 这一关键靶点发现上发挥了关键作用, 汉防己甲素通过抑制 LIMP-2 的胞外结构域破坏其转运功能进而影响溶酶体脂质代谢, 减少了激活溶

酶体双孔通道所必需的鞘氨醇的供应,从而阻断了钙信号的传导,提示汉防己甲素和 LIMP-2 在抗病毒治疗中的治疗潜力^[18]。果糖-1,6-二磷酸(fructose-1,6-bisphosphate, FBP)是糖酵解途径中关键的代谢物,近年来被广泛研究, Li 等^[19]构建 FBP 光亲和探针,该探针在细胞中鉴定到直接靶点醛脱氢酶 2 (aldehyde dehydrogenase 2, ALDH2) 为其直接靶点, FBP 通过抑制 ALDH2 活性引起细胞内活性氧水平上调和线粒体碎片化。在最近的一项研究中, Chiu 等^[20]在 *N*-酰基磷脂酰乙醇胺 (*N*-acylphosphatidylethanolamine, NAPE) 引入双吡啶胺基团构建了光亲和探针,利用竞争性蛋白质组分析和生物成像方法发现 NAPE 的作用靶点为跨膜蛋白 147 (cluster of differentiation 147, CD147) 和 CD44。由此可见,光亲和标记在天然产物靶点发现方面受到广泛应用。值得注意的是,光亲和标记中紫外光可能会干扰活细胞的生理状态诱导细胞凋亡、破坏 DNA,光反应基团会引起蛋白质非特异性结合,还会发生与预期相悖的蛋白质聚集或降解。未来可以开发可见光或红外光激活光反应基团,减少对蛋白的影响。因此,开发可见光或近红外光响应的新型光反应基团,以降低光照对细胞和蛋白质体系的影响有望成为未来的重要方向。

1.2 SPIDER

SPIDER 是一种功能依赖性标记策略。在

SPIDER 反应体系中,需外源加入突变型链霉菌亲和素-C 端谷氨酸型原核泛素样蛋白融合体 (mutant streptavidin-C-terminal glutamate form of prokaryotic ubiquitin-like protein fusion protein, SA_m-Pup^E) 和蛋白酶体辅助因子 A (proteasome accessory factor A, PafA), 由于 SA_m 对生物素具有极强亲和力,所以当靶蛋白与生物素标记的天然产物发生结合后, SA_m-Pup^E 会结合到生物素标记的天然产物上, Pup^E 就会被带到天然产物与靶蛋白复合物附近。在 PafA 催化下 Pup^E 与邻近靶蛋白表面的赖氨酸残基发生共价连接,从而实现靶蛋白的捕获,见图 2。该过程将天然产物与蛋白质之间的非共价结合相互作用转换为 SA_m-Pup^E 与靶蛋白的共价连接,进而能稳定地用于后续靶蛋白的富集、鉴定和分析。该技术适用于活细胞表面蛋白筛选,引入生物素不会影响天然产物的自身活性。基于 SPIDER 技术成功鉴定出了来那度胺的靶蛋白^[21],为识别天然产物利用 SPIDER 技术寻找相互作用的靶点提供了支持。能够使用 SPIDER 技术的前提是靶蛋白上需要有可修饰的赖氨酸残基,而且还主要取决于结核分枝杆菌类泛素化连接酶与蛋白之间的距离不能太远,通常在几十纳米左右,对于距离较远或动态变化的蛋白质就不能使用 SPIDER 技术进行标记,这会导致可能无法有效捕获靶蛋白^[21]。

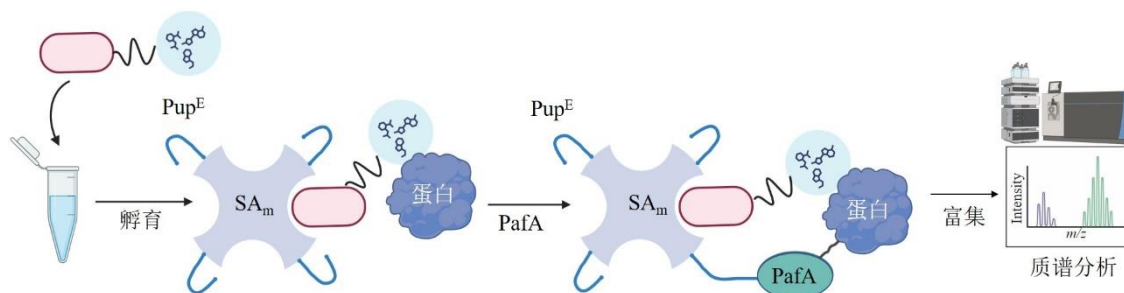


图 2 SPIDER 流程图

Fig. 2 Schematic illustration of SPIDER workflow

1.3 PROTAC

PROTAC 在近年来不断发展,为寻找靶点提供了一条全新的思路。PROTAC 是异源双功能分子,由 2 个配体组成,2 个配体间由 1 个柔性连接体连接,1 个配体用于募集 E3 连接酶,另 1 个则是与靶蛋白结合进行降解靶蛋白,PROTAC 能够同时特异性地结合靶蛋白和 E3 连接酶使之形成三元复合物。在 E3 泛素连接酶的介导下,泛素由 E2 泛素结合酶

转移至靶蛋白,使靶蛋白发生多聚泛素化修饰,最终蛋白酶体实现靶蛋白的降解^[22]。相较于依赖亲和力或共价结合的方法,PROTAC 不依赖于天然产物的活性而是将与天然产物结合的潜在靶蛋白降解,蛋白降解会放大结合信号,因此分析 PROTAC 处理后特异性下调的蛋白便能找到与天然产物结合的靶点^[23],见图 3。Chen 等^[24]根据 PROTAC 鉴定 RNA 外切核酸酶 4 为 3-氟-10-羟基进化二胺的直接靶点,

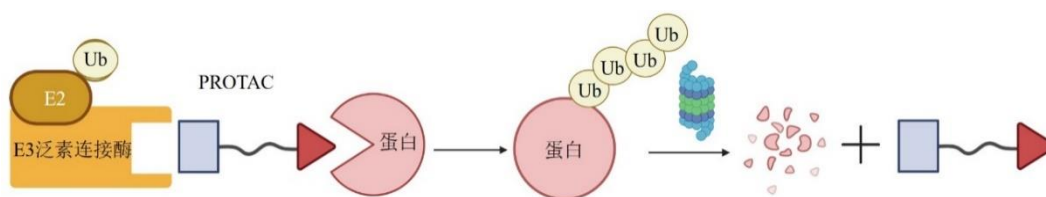


图 3 PROTAC 流程图

Fig. 3 Schematic illustration of PROTAC workflow

这凸显了 PROTAC 在天然产物中的优越性,加快了天然产物的开发。雷公藤红素借助 PROTAC 构建文库并实现高效降解,成功识别到核因子- κ B 抑制蛋白激酶 β 亚基、磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 3-激酶催化亚基 α 和蛋白磷酸酶 2A 细胞抑制因子,提高了靶点识别的准确性^[25]。Sun 等^[26]构建了以褪黑素为基础的异双功能蛋白降解分子,确定组蛋白乙酰转移酶 p300 为 (melatonin, MLT) 的直接作用靶点,为后面机制研究提供了重要线索^[26]。鉴于此,该技术可能在天然产物弱亲和力和靶点鉴定方面具有极大的潜力。但 PROTAC 技术并非对所有天然产物都适用,对于结构改造位点不明确、构效关系尚不清楚,或完全未知靶点的天然产物,它的改造存在较大难度,甚至可能不适用。若天然产物结构中没有供 E3 泛素连接酶连接的位点,则对该天然产物不适用。目前 E3 泛素连接酶开发有限,这在一定程度上限制了靶点灵活性且相对分子质量较大,细胞透膜性差的限制^[27]。未来,改善 PROTAC 分子结构提高通透性、系统性开发和鉴定新型 E3 配体,将成为推动 PROTAC 技术升级的关键方向。

1.4 蛋白质微阵列

蛋白质微阵列也称为蛋白质芯片,该技术采用高通量点样方法将人类重组蛋白固定在微阵列上,然后用亲和标签标记具有生物活性天然产物,并与蛋白质微阵列一起孵育,随后扫描微阵列的荧光可以识别与天然产物相互作用的靶蛋白。Ye 等^[28]利用蛋白质微阵列查看重组蛋白结合情况发现雷公藤红素优先结合信号传导及转录激活蛋白 (signal transducer and activator of transcription, STAT), STAT3 被确定为关键靶点,可保护血管紧张素 II 介导的有害心脏重塑。冬凌草乙素具有抗癌作用,为了确定冬凌草乙素在肝癌细胞中的作用靶点,Zhao 等^[29]使用 HuProt™ 人类蛋白质组芯片筛选出 Kelch 样 ECH 相关蛋白 1 (Kelch like ECH associated protein 1, Keap1),发现冬凌草乙素可能与 Keap1 结合进而影响磷酸甘油酸变位酶家族成员 5,在肝细胞癌中

发挥药理作用。蛋白质微阵列中每种蛋白都有机会与药物发生结合增加了靶点识别的范围,实现高通量筛选,这打破了结合细胞内高丰度蛋白的弊端。但膜蛋白或具有复杂翻译后修饰的那些蛋白质可能不被微阵列所识别。

2 非标记策略靶点发现方法

尽管标记的靶点发现方法已发展得较为成熟,并且在天然产物靶点研究领域取得显著进展,但此类方法需要对天然产物进行一定的化学修饰。然而化学修饰可能会改变天然产物构效关系进而影响生物活性及其生物学功能。甚至有些天然产物缺乏合适的可修饰的位点,不能完成探针构建,从而限制标记的方法在靶点发现中的应用。基于上述局限性,非标记策略就应运而生。非标记策略依据原理不同可分为基于蛋白热稳定性变化的方法如 CETSA、TPP,基于蛋白酶敏感性的方法如 DARTS、Lip-MS、SPROX 等。

2.1 基于蛋白热稳定性变化的非标记策略

2.1.1 CETSA 技术 CETSA 是一种经典的非标记靶点识别方法,其原理是天然产物与靶蛋白结合后改变靶蛋白的热稳定性,与天然产物结合的靶蛋白其热稳定性显著提高,这是因为蛋白质在热诱导下会发生解折叠并迅速沉淀,而细胞中剩余可溶性蛋白的含量与保持天然折叠状态的蛋白质量密切相关,当天然产物与靶蛋白结合后,蛋白整体能态降低、构象更加稳定,从而具有更高的解折叠能垒,表现出更强的热稳定性,见图 4-a。由此可知 CETSA 适用于对温度变化敏感的天然产物。Zhang 等^[30]利用 CETSA 发现三磷酸腺苷柠檬酸裂解酶 (adenosine triphosphate citrate lyase, ACLY) 可能是异银杏黄酮的一个必要靶点,其抑制 ACLY 会减少肝脏脂质合成,从而改善高胆固醇血症和动脉粥样硬化。Lai 等^[31]利用 CETSA 找到丹参酮作用靶点补体 C3,诱导小胶质细胞吞噬标记突触,发挥抗抑郁作用。CETSA 不需要对天然产物进行标记就可以直接测定小分子是否在细胞中与靶点蛋白存在相互作用。

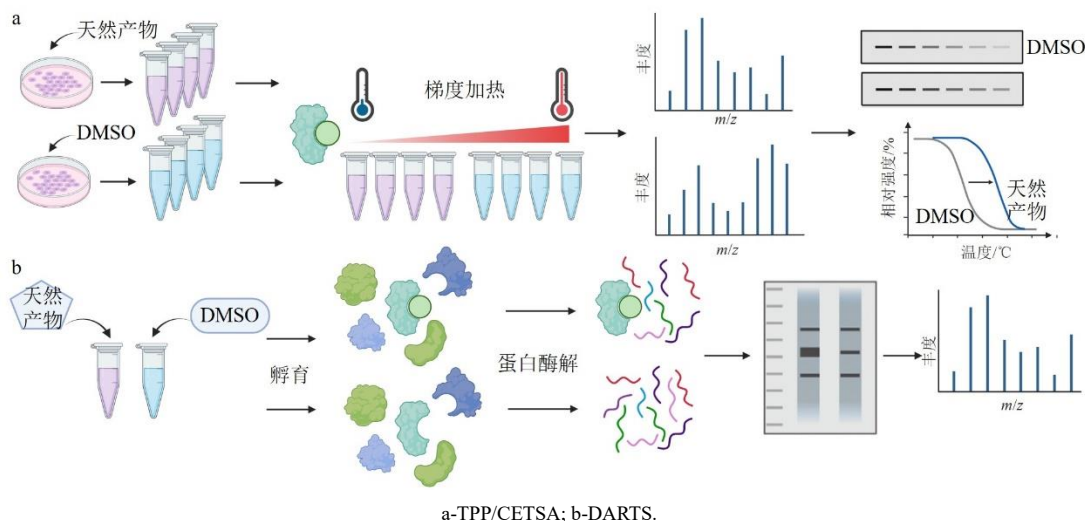


图 4 热稳定性与蛋白酶保护效应策略

Fig. 4 Schematic illustration of thermal stability and protease protection-based strategies

2.1.2 热蛋白质组学技术 CETSA 与 LC-MS/MS 技术相结合, 逐渐发展为 TPP 技术, 它能够在全蛋白质组学水平识别直接作用靶点从而进行无偏的鉴定, 见图 4-a。Li 等^[32]利用 TPP 技术将来源于天然产物的藁本内酯与细胞孵育, 收集细胞裂解液后进行热激, 根据相关筛选条件在多种蛋白质中确定早期生长反应因子 1 (early growth response factor 1, EGR1) 为直接作用靶点, 后续研究进一步发现藁本内酯与 EGR1 的 His386 位点结合并抑制 EGR1 核转位与转录活性, 从而阻断 EGR1-整合素和基质金属蛋白酶 17-肿瘤坏死因子- α 信号通路, 实现抗炎和修复肠道屏障的双重疗效, 有效缓解实验性结肠炎。Li 等^[33]利用 TPP 技术确定烟酰胺磷酸核糖转移酶 (nicotinamide phosphoribosyltransferase, NAMPT) 是一种菲并咪唑里西啶生物碱 (PF403) 的直接作用靶点, 之后又进行靶点的结合验证、基因敲低、功能抑制等证明 PF403 直接结合并抑制 NAMPT 酶活, 降低烟酰胺腺嘌呤二核苷酸水平, 从而抑制胶质瘤生长。虽然 TPP 技术在整个蛋白质组范围内可以分析蛋白质与天然产物之间的相互作用, 具有稳定性好、不需要抗体孵育的优点, 但无法识别对温度不敏感的蛋白, 整个过程耗时长且工作量大, 对膜蛋白的检测也有限, 所以需要联合使用其他对膜蛋白敏感的方法来寻找靶点。

2.2 基于蛋白酶敏感性变化的非标记策略

2.2.1 DARTS 技术 DARTS 技术基于蛋白酶消化原理, 其核心机制在于天然产物与靶蛋白结合后诱导蛋白质发生构象变化, 从而使结合后的蛋白相较

于未结合状态的蛋白对蛋白水解降解表现出更强的抵抗力, 由此该方法也称为蛋白稳定性实验, 见图 4-b。川续断皂苷是川续断属植物, 具有抗血栓、抗炎、抗氧化、抗肿瘤、骨保护等作用。Dong 等^[34]对川续断皂苷抗骨质疏松性骨折的能力进行探索, 采用 DARTS 技术发现川续断皂苷与 Piezo1 直接结合, 并激活该蛋白所涉及的细胞外调节蛋白激酶 1/2-YAP 通路, 促进 LEPR⁺ BMSCs 的成骨分化, 从而发挥骨质疏松性骨折的治疗作用。来源于黄芪的黄芪甲苷 II 因其抗炎、抗氧化和抗凋亡特性而备受关注。Yuan 等^[35]利用 DARTS 技术在人少突胶质 MO3.13 细胞中发现黄芪甲苷 II 的关键结合靶点是 p75 神经营养因子受体, 其发挥作用的方式是抑制其下游的 β -连环蛋白/DNA 结合抑制因子 2 信号轴驱动少突胶质前体细胞分化成熟并促进髓鞘再生。以上研究表明 DARTS 在天然产物识别方面是一种有价值的策略。但 DARTS 需要进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 所以一些丰度低的蛋白被检测出来的几率会很小。此外, 酶的类型也会影响该技术的准确性^[36], 因此, 需要优化蛋白酶种类、酶解条件及样品前处理流程, 降低实验偏差并增强结果的准确性与重复性以改善 DARTS 的局限性。

2.2.2 Lip-MS 技术 Lip-MS 技术通过天然产物与靶蛋白结合后, 靶蛋白能抵抗蛋白酶的有限蛋白酶切, 使其在酶解后的残留丰度相应增强从而被检测出来。Hu 等^[37]借助 Lip-MS 将棕榈酸诱导的小鼠正常肝 AML12 细胞裂解物与天然产物桉木酮孵育, 然后使用蛋白酶 K、胰蛋白酶和 LC-MS/MS 进行有

限的蛋白水解, 确认钙调蛋白为桉木酮促进线粒体脂肪酸 β 氧化改善代谢功能障碍相关脂肪性肝病的直接靶点。为了寻找贯叶金丝桃素 (hyperforin, HPF) 刺激脂肪组织产热以促进体质量减轻的靶点, Chen 等^[38]在 LiP-MS 的检测下确定二氢硫辛酰胺 s -乙酰基转移酶为 HPF 的直接作用靶点。但不是所有的天然产物都可以使用 LiP-MS 来寻找靶点, 如天然产物与靶点结合后其构象不会改变, 结合位点距离酶切位点较远, 靶蛋白丰度较低或为膜蛋白, 这些情况下均不适合使用该方法。

2.3 以肽段为中心的蛋白质局部稳定性探测方法 (peptide-centric local stability assay, PELSA)

PELSA 技术依托高浓度胰蛋白酶在天然状态下快速酶解蛋白, 并结合质谱检测肽段丰度变化, 从而实现天然产物结合蛋白和结合区域的解析。与 TPP 等需要观察整体蛋白热稳定性变化的方法相比, PELSA 可提供肽段水平的结合区域信息, 并对低亲和力或弱相互作用蛋白具有较高检测灵敏度, 因此可在一定程度上弥补 TPP 难以定位结合位点的不足。简言之, PELSA 的原理是比较天然产物处理组 and 对照组的肽段丰度变化, 天然产物与靶蛋白结合后会形成构象稳定的蛋白区域使其稳定性增强不易被蛋白酶识别, 导致相应肽段的生成受到抑制。未与天然产物结合的靶蛋白则被酶切产生肽段。通过比较肽段丰度差异可筛选发生局部稳定性变化的靶蛋白并且确定结合区域^[39]。更重要的是该

方法不需要对天然产物进行修饰, 肽段也是在天然状态下自然生成, 不依赖亲和力大小, 可以在细胞裂解液中发现与天然产物结合发生局部稳定性变化的蛋白质^[40]。据文献报道, 黄芩黄酮 II 直接靶点 SLC1A4 的发现也使用了此方法^[41]。但该方法对肽段覆盖度和质谱检测深度要求较高并且不同蛋白的酶解条件可能需要优化, 若结合区域对应肽段未被有效检测, 则难以准确定位结合位点。

2.4 SPROX

SPROX 是一种基于蛋白质氧化速率变化来鉴定天然产物靶点的技术, 即蛋白质与天然产物共孵育, 在化学变性剂诱导下使蛋白展开, 再利用过氧化氢氧化暴露的甲硫氨酸残基, 通过定量质谱技术对选择性氧化的甲硫氨酸进行定量, 检测相互作用的靶蛋白^[42], 与天然产物结合的靶蛋白抗氧化能力增强, 减少蛋白质解折叠, 见图 5。前期关于该项技术的研究发现, UDP-葡萄糖-4-差向异构酶是环孢菌素 A 的靶点^[43], Liu 等^[44]利用 SILAC-SPROX 技术对乳腺癌细胞系进行了大规模蛋白折叠稳定性分析, 识别出数百个亚型特异性的稳定性差异蛋白, 且约 70% 的命中蛋白在表达水平上无显著差异, 表明热力学稳定性剖面可作为表达谱的互补手段用于生物标志物发现与病理机制研究。使用 SPROX 发现的直接相互作用的靶蛋白需要再结合其他实验进行验证^[45]。但该方法有一定的局限性, 如只能用于检测含甲硫氨酸的肽段。

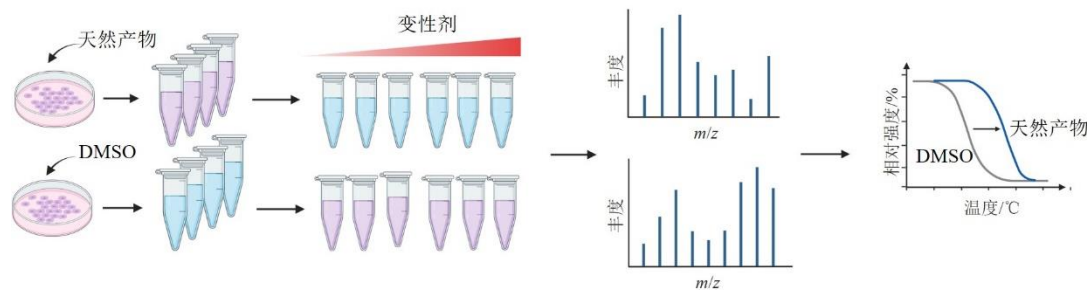


图 5 SPROX 流程图

Fig. 5 Schematic illustration of SPROX workflow

2.5 基于蛋白稳定性的非标记策略

2.5.1 pH 依赖蛋白沉淀法 (pH dependent protein precipitation, pHDPP)

pHDPP 是一种非修饰药物靶点蛋白质组学鉴定新方法, 主要依靠调节溶液的酸碱度至蛋白质的等电点, 使其溶解度降低并沉淀。该方法的核心原理是破坏蛋白质表面的水化层和电荷排斥作用。天然产物与蛋白结合之后会对酸

性试剂所引起的蛋白变性有更强的耐受力^[46-47]。有研究者筛选 4 种改变 pH 值的变性剂如抗坏血酸、柠檬酸等, 二氢青蒿素广泛用于疟疾的治疗, 据文献报道二氢青蒿素在治疗肿瘤方面有一定的效果, 但其抗肿瘤的机制及其靶点不全面, 所以应用 pHDPP 筛选靶点, 根据一定的筛选条件和评估方法, ALDH7A1 成为二氢青蒿素直接结合的最佳靶

点^[46]。pHDPP 有效解决了天然产物无法修饰的难题。但是使用酸可能会改变天然产物中的酸碱平衡,影响其与靶蛋白的相互作用,最终筛选出来的靶点仍需要其他实验来验证该方法在这些药物靶向蛋白发现方面是否具有同样效果。

2.5.2 溶剂诱导蛋白沉淀法(solvent-induced protein precipitation, SIP) SIP 利用有机溶剂诱导未能与天然产物结合的蛋白沉淀,而与天然产物结合的靶蛋白因稳定性增强,在一定程度上表现出更强的抗溶剂沉淀能力,随后通过蛋白质组学分析筛选潜在靶蛋白^[48]。蛋白质在与天然产物结合后会增加对有机溶剂诱导变性沉降的抵抗能力,比较给药组与对照组未被沉降的蛋白质来发现可能与天然产物结合的靶点。Li 等^[49]使用 SIP 结合蛋白质组学筛选出鸟苷酸结合蛋白 5 蛋白为青藤碱的直接结合靶点,为炎症疾病如类风湿关节炎的治疗靶点提供了依据。类似地,还有通过 SIP 确定了苦参素的直接靶点可溶性环氧化物水解酶^[50]、核因子- κ B 必需调节蛋白/ κ B 抑制蛋白激酶 β 复合体是紫草素发挥抗癌活性的可能靶点^[51]。

总之,与标记策略相比,非标记方法能够较好保留天然产物原有结构,适用于不易改造或活性易受修饰影响的化合物,但其结果仍需结合多种方法和功能实验进一步验证。

3 天然产物复杂体系的靶点识别

天然产物复杂体系通常包括植物提取物、有效部位、中药复方等,具有成分种类多、含量差异大、结构类型复杂、作用靶点分散及生物效应多等特点。此外,复杂体系中的不同成分之间还可能存在着协同、拮抗关系,这也会增加靶点捕获的难度。因此,单一靶点识别策略往往难以满足复杂体系研究对准确性和系统性的要求,多策略联合已成为提高天然产物复杂体系靶点发现可靠性的重要研究思路。多策略联合能够有效避免单一方法在灵敏度、特异性和适用范围等方面的局限,还可实现候选靶点的交叉筛选,以提高靶点识别的准确性、可靠性。

在复杂天然产物体系的靶点研究中,定量蛋白质组学与非标记热稳定性分析的联用是一种较为有效的策略。SILAC 是一种经典的稳定同位素标记定量蛋白质组学技术,通过使用天然同位素(轻标)和稳定同位素(重标)标记的必需氨基酸取代细胞培养基中的相应氨基酸,使稳定同位素标记的氨基酸掺入到细胞新合成的蛋白质中,替代原有氨基

酸,再通过质谱对稳定同位素标记的蛋白质进行精确定量^[52-53]。在面对天然产物复杂体系时,可以将 SILAC 与 TPP 联合使用,重标同位素标记的细胞裂解液用于靶点捕获,轻标同位素标记的细胞裂解液作为空白对照,利用 TPP 进行梯度加热等操作,从而有助于在全蛋白质组水平识别潜在直接作用靶点。Zhuo 等^[54]在研究石蒜碱治疗结肠癌时通过 SILAC 技术使细胞中的蛋白质带上可区分的轻、重质量标签,设置对照组和给药组后,结合 TPP 技术使其在不同温度下热激,随后对蛋白质进行分析,比较药物组与对照组的蛋白质热稳定性差异从候选蛋白中筛选出异柠檬酸脱氢酶 1 作为石蒜碱的直接结合靶点。由此可见,SILAC 和 TPP 技术联用可为天然产物靶点识别提供较高通量的筛选手段。对于成分更加复杂的提取物或复方体系,该策略也可用于从整体蛋白质组层面捕捉与药物干预相关的稳定性改变蛋白,为后续成分归属和靶点验证提供候选范围。但 SILAC 仅适用于体外细胞且实验周期长;标记通道少,不适合多样本分析^[55]。

针对复杂体系中候选靶点数量多、真假靶点难以区分的问题,计算预测与实验捕获的联合应用具有重要价值。人工智能(artificial intelligence, AI)^[56]、虚拟筛选^[57]和网络药理学^[58]可根据化合物结构、疾病靶点、蛋白互作和通路信息,初步构建成分-靶点-通路网络,为复杂体系中潜在活性成分和候选靶点的筛选提供方向。Peng 等^[59]在利用 LiP-MS 缩小靶点范围的同时,同步开展了 AI 虚拟筛选工作,借助 Galaxy Sagittarius 靶点预测算法,对血根碱的直接作用蛋白进行系统的计算模拟,最终确定丙酮酸激酶 M2 为直接靶点。然而 AI 技术在天然产物靶点发现中主要依赖已有数据库和模型训练数据,预测结果容易受到数据偏倚、结构相似性推断和算法可解释性不足的影响,限制其应用的范围。此外,现有模型在生物学和药学意义上的可解释性仍显不足,未来仍需通过可视化和机制验证提高模型的可靠性^[60]。Xu 等^[61]选择创新的天然产物虚拟筛选-交互-表型策略,整合虚拟筛选、ABPP 和代谢组学,以识别天然产物的靶点,并以丹参治疗缺血性中风为案例阐释了多策略协同带来的准确性及全面性。Brand 等^[62]先是利用计算机进行靶点预测,预测到 15 个潜在靶蛋白,随后结合 SPIDER 技术富集,最后进行交叉比对,发现花生四烯酸 5-脂氧合酶是唯一同时被 2 种方法共同命中的候选靶点,从而被优

先锁定为最可能的直接作用靶标。计算预测结果作为前期筛选依据, 根据实际也要进一步结合实验技术进行验证。

多组学分析可用于揭示复杂体系作用后的整体生物学响应。转录组、蛋白质组和代谢组能够从基因表达、蛋白丰度和通路调控等层面反映天然产物复杂体系的综合效应, 有助于发现关键通路、核心调控节点和药效相关网络^[1]。如对于中药复方或植物提取物而言, 多组学分析可用于判断其主要影响炎症反应、能量代谢、氧化应激、细胞死亡等过程, 并为后续靶点验证提供优先级^[63]。有研究者采用多组学技术定义了胆管癌的独特分子亚型并确定 TNK1 为治疗靶点, 为胆管癌提供了一个新的干预方向, 也提示多组学技术在复杂疾病和临床决策中具有重要应用价值^[64]。但需要注意的是, 多组学筛选得到的差异分子多数属于药物作用后的响应结果, 并不一定是直接结合靶点。因此, 多组学结果应与靶点捕获技术、分子互作实验和验证实验相结合, 避免将下游响应蛋白误认为直接靶点。

在复杂天然产物体系中, 成分干扰和假阳性是影响靶点识别准确性的重要因素, 高丰度成分或反应性较强的成分, 可能与蛋白发生非特异性结合, 影响蛋白稳定性、酶切结果和质谱信号, 使得非关键作用蛋白没有被识别。此外, 复杂天然产物体系中成分组成多样, 不同成分之间可能存在信号叠加、相互干扰等现象。因此, 复杂天然产物体系的靶点识别应建立多层级验证策略, 通过候选靶点筛选、结合验证和功能确认相结合的方式, 提高结果的准确性, 并降低成分干扰和假阳性风险。

由此可见, 复杂天然产物体系的靶点识别不应停留于单一技术筛选层面, 而应针对其成分复杂、作用途径多样和结果验证困难等特点, 建立综合性的研究策略。

4 结语与展望

天然产物具有多样的化学结构和丰富的生物活性, 在新药研发过程中具有重要价值。目前, 标记策略和非标记策略均已广泛用于天然产物靶点发现研究, 但不同方法各有其适用范围和局限性, 因此应结合天然产物的结构特征及具体研究目的进行合理选择。对于经化学修饰后仍能保持生物活性的天然产物, 可优先采用生物素标记、点击化学和光亲和标记等方法; 而对于修饰后活性明显降低或丧失的天然产物, 非标记策略则更具优势。但这

并不意味着二者处于相互对立的方法, 标记策略具有靶蛋白富集能力强、结果直观等优势, 但依赖探针设计或天然产物的位点情况, 可能受到构效关系改变的影响; 非标记策略能够避免化学修饰对天然产物活性的干扰, 但在特异性、灵敏度及假阳性控制方面存在一定局限。因此, 2 类方法具有明显互补性, 联合应用有助于提高靶点识别的可靠性。对于多成分、多靶点的天然产物复杂体系, 靶点识别不宜依赖单一技术, 而应通过多策略联合逐步缩小研究范围。首先, 可结合成分分析和广谱筛选锁定关键成分群, 利用标记或非标记策略交叉筛选潜在靶蛋白, 从不同层面提高靶点识别的可靠性。然而, 不同技术方法最终均可能获得多个高置信度候选蛋白, 因此还需结合候选靶点与疾病的相关性、蛋白检测和蛋白的可获得性及文献证据, 对其进行综合评估和优先排序, 最终确定适合深入验证的核心靶点。此外, 天然产物靶点发现研究不应止步于靶点的筛选, 还应重视后续结合验证和功能验证, 进一步确认该靶点在天然产物药效发挥过程中的作用, 由此形成从靶点筛选到结合验证再到功能验证的研究体系^[65]。随着 AI 在天然产物研究领域的快速发展, 其在天然产物靶点发现中的应用已不再局限于候选靶点预测, 而是逐渐向研究策略优化和方法选择决策延伸。AI 不仅可用于天然产物潜在作用靶点的预测与筛选, 还可进一步整合已报道的天然产物结构特征、官能团类型及其适用的靶点发现技术, 建立基于结构特征的技术选择模型^[66]。因此, 在获得新的天然产物后可借助该模型结合其结构特征和可修饰基团, 初步筛选适宜的靶点发现策略, 以提高方法选择的针对性和研究效率。总之, 天然产物靶点发现研究应从单一方法筛选转向多策略协同筛选。只有将靶点发现、结合验证和靶点功能验证有机结合, 才能更准确地揭示天然产物的真实作用机制。未来, 随着蛋白质组学、多组学技术和计算预测等方法的不断融合, 天然产物靶点发现将其药效物质基础阐释、作用机制研究及创新药物开发提供更有力的技术支撑。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Atanasov A G, Zotchev S B, Dirsch V M, *et al.* Natural products in drug discovery: Advances and opportunities [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20(3): 200-216.
- [2] Curtis M J. New drug discovery and development from

- natural products [J]. *Pharmacol Ther*, 2024, 263: 108733.
- [3] Newman D J, Cragg G M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019 [J]. *J Nat Prod*, 2020, 83(3): 770-803.
- [4] 代国年, 孙凯瑞, 周雅馨, 等. 基于铁死亡的青蒿素衍生物多病靶向治疗研究进展 [J]. *中草药*, 2025, 56(17): 6389-6403.
- [5] Li C X, Wood J C, Vu A H, *et al*. Single-cell multi-omics in the medicinal plant *Catharanthus roseus* [J]. *Nat Chem Biol*, 2023, 19(8): 1031-1041.
- [6] Wang S Y, Zhang Y, Yu R Z, *et al*. Labeled and label-free target identifications of natural products [J]. *J Med Chem*, 2024, 67(20): 17980-17996.
- [7] 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.
- [8] Heal W P, Tam Dang T H, Tate E W. Activity-based probes: Discovering new biology and new drug targets [J]. *Chem Soc Rev*, 2011, 40(1): 246-257.
- [9] Wright M H, Sieber S A. Chemical proteomics approaches for identifying the cellular targets of natural products [J]. *Nat Prod Rep*, 2016, 33(5): 681-708.
- [10] Zhang H W, Xu Q X, Jiang Z R, *et al*. Targeting senescence with apigenin improves chemotherapeutic efficacy and ameliorates age-related conditions in mice [J]. *Adv Sci*, 2025, 12(20): 2412950.
- [11] Cheng Y F, Wang G Q, Yang X X, *et al*. Artesunate alleviates Parkinson's disease by targeting astrocyte MT2A to attenuate dopamine neuronal cuproptosis [J]. *Pharmacol Res*, 2025, 219: 107895.
- [12] Moses J E, Moorhouse A D. The growing applications of click chemistry [J]. *Chem Inform*, 2007, 38(44): 200744237.
- [13] Huang L, Li G J, Zhang Y, *et al*. Small-molecule targeting BCAT1-mediated BCAA metabolism inhibits the activation of SHOC2-RAS-ERK to induce apoptosis of Triple-negative breast cancer cells [J]. *J Adv Res*, 2025, 75: 723-738.
- [14] He H K, Hao M J, Luo P, *et al*. Inhibition peroxiredoxin-2 by capsaicin ameliorates rheumatoid arthritis via ROS-mediated apoptosis in fibroblast-like synoviocytes [J]. *MedComm*, 2025, 6(6): e70209.
- [15] Luo P, Zhang Q, Shen S, *et al*. Mechanistic engineering of celastrol liposomes induces ferroptosis and apoptosis by directly targeting VDAC2 in hepatocellular carcinoma [J]. *Asian J Pharm Sci*, 2023, 18(6): 100874.
- [16] Li G J, Li H Y, Wang P L, *et al*. Chemo-proteomics reveals dihydrocaffeic acid exhibits anti-inflammation effects via transaldolase 1 mediated PERK-NF- κ B pathway [J]. *Cell Commun Signal*, 2025, 23(1): 65.
- [17] Chen X, Wang Y T, Ma N, *et al*. Target identification of natural medicine with chemical proteomics approach: Probe synthesis, target fishing and protein identification [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5: 72.
- [18] Chan W C, Zhao Q, Wong K H, *et al*. Tetrandrine regulates NAADP-mediated calcium signaling through a LIMP-2-dependent and sphingosine-mediated mechanism [J]. *Nat Commun*, 2025, 16: 6308.
- [19] Li T, Wang A H, Zhang Y L, *et al*. Chemoproteomic profiling of signaling metabolite fructose-1,6-bisphosphate interacting proteins in living cells [J]. *J Am Chem Soc*, 2024, 146(22): 15155-15166.
- [20] Chiu D C, Cho Y T, Lin H N, *et al*. Photoaffinity labeling reveals a role for the unusual triply acylated phospholipid *N*-acylphosphatidylethanolamine in lactate homeostasis [J]. *J Am Chem Soc*, 2025, 147(37): 33386-33394.
- [21] Jiang H W, Chen H, Zheng Y X, *et al*. Specific pupylation as IDENTITY reporter (SPIDER) for the identification of protein-biomolecule interactions [J]. *Sci China Life Sci*, 2023, 66(8): 1869-1887.
- [22] Gu S S, Cui D R, Chen X Y, *et al*. PROTACs: An emerging targeting technique for protein degradation in drug discovery [J]. *BioEssays*, 2018, 40(4): 1700247.
- [23] Hughes G R, Dudey A P, Hemmings A M, *et al*. Frontiers in PROTACs [J]. *Drug Discov Today*, 2021, 26(10): 2377-2383.
- [24] Chen S Q, Bi K J, Liang H X, *et al*. PROTAC derivatization of natural products for target identification and drug discovery: Design of evodiamine-based PROTACs as novel REXO4 degraders [J]. *J Adv Res*, 2024, 63: 219-230.
- [25] Ni Z H, Shi Y, Liu Q L, *et al*. Degradation-based protein profiling: A case study of celastrol [J]. *Adv Sci*, 2024, 11(25): 2308186.
- [26] Sun Y, Liu S, Chen L, *et al*. AI-driven discovery of dual antiaging and anti-AD therapeutics via PROTAC target deconvolution of a super-enhancer-regulated axis [J]. *Sci Adv*, 2025, 11(47): eadz9283.
- [27] Kannt A, Đikić I. Expanding the arsenal of E3 ubiquitin ligases for proximity-induced protein degradation [J]. *Cell Chem Biol*, 2021, 28(7): 1014-1031.
- [28] Ye S J, Luo W, Khan Z A, *et al*. Celastrol attenuates angiotensin II-induced cardiac remodeling by targeting STAT3 [J]. *Circ Res*, 2020, 126(8): 1007-1023.
- [29] Zhao B X, Liang Z H, Zhang L S, *et al*. Ponicidin promotes

- hepatocellular carcinoma mitochondrial apoptosis by stabilizing Keap1-PGAM5 complex [J]. *Adv Sci*, 2024, 11(38): e2406080.
- [30] Zhang Z D, Chen M J, Xu Y T, *et al.* A natural small molecule isoginkgetin alleviates hypercholesterolemia and atherosclerosis by targeting ACLY [J]. *Theranostics*, 2025, 15(10): 4325-4344.
- [31] Lai H Q, Fan P L, Zhang P X, *et al.* Targeting complement C3 with Tanshinone I decreases microglia-mediated synaptic engulfment to exert antidepressant effects [J]. *Theranostics*, 2025, 15(16): 8150-8175.
- [32] Li Y Y, Wu Y Q, Liang J, *et al.* Ligustilide suppresses macrophage-mediated intestinal inflammation and restores gut barrier via EGR1-ADAM17-TNF- α pathway in colitis mice [J]. *Research*, 2025, 8: 864.
- [33] Li F F, Zhang Z X, Shi Q Y, *et al.* Thermal proteome profiling (TPP) reveals NAMPT as the anti-glioma target of phenanthroindolizidine alkaloid PF403 [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2025, 15(4): 2008-2023.
- [34] Dong R C, Wei J, Tian S, *et al.* Asperosaponin VI promotes osteoporotic fracture healing by targeting Piezo1 to enhance the coupling of LEPR⁺ BMSCs and PODXL⁺ ECs [J]. *Phytother Res*, 2025, 39(7): 3148-3166.
- [35] Yuan J F, Tao Y L, Wang M X, *et al.* Astragaloside II, a natural saponin, facilitates remyelination in demyelination neurological diseases via p75NTR receptor mediated β -catenin/Id2/MBP signaling axis in oligodendrocyte precursor cells [J]. *J Adv Res*, 2026, 80: 577-591.
- [36] 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.
- [37] Hu S R, Liang X F, Qin Y M, *et al.* Alnustone ameliorates metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease by facilitating mitochondrial fatty acid β -oxidation via targeting calmodulin [J]. *Adv Sci*, 2025, 12(31): e11984.
- [38] Chen S Z, Liu X X, Peng C, *et al.* The phytochemical hyperforin triggers thermogenesis in adipose tissue via a Dlat-AMPK signaling axis to curb obesity [J]. *Cell Metab*, 2021, 33(3): 565-580.e7.
- [39] Wang K Y, Li Y N, Ma Y N, *et al.* Probing ligand-induced local stability shifts: A sensitive approach to identify target proteins and binding sites at the proteomic scale [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2025, 87: 102602.
- [40] Li K J, Chen S J, Wang K Y, *et al.* A peptide-centric local stability assay enables proteome-scale identification of the protein targets and binding regions of diverse ligands [J]. *Nat Meth*, 2025, 22(2): 278-282.
- [41] Zhao J, Ma Y B, Xia R H, *et al.* Skullcapflavone II inhibits SLC1A4-mediated L-serine uptake and promotes mitochondrial damage in gastric cancer [J]. *Adv Sci*, 2025, 12(45): e17225.
- [42] West G M, Tang L J, 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.
- [43] West G M, Tucker C L, Xu T, *et al.* Quantitative proteomics approach for identifying protein-drug interactions in complex mixtures using protein stability measurements [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(20): 9078-9082.
- [44] 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.
- [45] Strickland E C, Geer M A, Tran D T, *et al.* Thermodynamic analysis of protein-ligand binding interactions in complex biological mixtures using the stability of proteins from rates of oxidation [J]. *Nat Protoc*, 2013, 8(1): 148-161.
- [46] Zhang X L, Wang K Y, Wu S J, *et al.* Highly effective identification of drug targets at the proteome level by pH-dependent protein precipitation [J]. *Chem Sci*, 2022, 13(42): 12403-12418.
- [47] Zhang X L, Ruan C F, Wang Y, *et al.* Integrated protein solubility shift assays for comprehensive drug target identification on a proteome-wide scale [J]. *Anal Chem*, 2023, 95(37): 13779-13787.
- [48] Zhang X L, Wang Q, Li Y N, *et al.* Solvent-induced protein precipitation for drug target discovery on the proteomic scale [J]. *Anal Chem*, 2020, 92(1): 1363-1371.
- [49] Li J M, Deng H S, Yao Y D, *et al.* Sinomenine ameliorates collagen-induced arthritis in mice by targeting GBP5 and regulating the P2X7 receptor to suppress NLRP3-related signaling pathways [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2023, 44(12): 2504-2524.
- [50] Sun C P, Zhou J J, Yu Z L, *et al.* Kurarinone alleviated Parkinson's disease via stabilization of epoxyeicosatrienoic acids in animal model [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2022, 119(9): e2118818119.
- [51] Yu Z L, Gao J, Zhang X L, *et al.* Characterization of a small-molecule inhibitor targeting NEMO/IKK β to suppress colorectal cancer growth [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7: 71.
- [52] Mann M. Functional and quantitative proteomics using SILAC [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7(12): 952-958.
- [53] 田俊生, 赵云昊, 令狐婷, 等. 以抑郁症葡萄糖分解代谢障碍机制解析为例探究稳定同位素示踪代谢组学的

- 研究思路与策略 [J]. 药学报, 2023, 58(7): 1725-1731.
- [54] Zhuo F F, Li L, Liu T T, *et al.* Lycorine promotes IDH1 acetylation to induce mitochondrial dynamics imbalance in colorectal cancer cells [J]. *Cancer Lett*, 2023, 573: 216364.
- [55] 欧阳玥, 孙晓红, 闫静, 等. 稳定同位素标记技术在生物分子相对定量分析研究中的应用与进展 [J]. 科学通报, 2013, 58(27): 2762-2778.
- [56] Muldowney M W, Duncan K R, Elsayed S S, *et al.* Artificial intelligence for natural product drug discovery [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2023, 22(11): 895-916.
- [57] Simoben C V, Babiaka S B, Moumbock A F A, *et al.* Challenges in natural product-based drug discovery assisted with *in silico*-based methods [J]. *RSC Adv*, 2023, 13(45): 31578-31594.
- [58] 廖韵诺, 赵凯丽, 郭宏伟. 中药网络药理学的研究应用与挑战 [J]. 中草药, 2024, 55(12): 4204-4213.
- [59] Peng Y C, He Z J, Yin L C, *et al.* Sanguinarine suppresses oral squamous cell carcinoma progression by targeting the PKM2/TFEB axis to inhibit autophagic flux [J]. *Phytomedicine*, 2025, 136: 156337.
- [60] Chen W, Liu X S, Zhang S Y, *et al.* Artificial intelligence for drug discovery: Resources, methods, and applications [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2023, 31: 691-702.
- [61] Xu R, Yu H Y, Wang Y C, *et al.* Natural product virtual-interact-phenotypic target characterization: A novel approach demonstrated with *Salvia miltiorrhiza* extract [J]. *J Pharm Anal*, 2025, 15(2): 101101.
- [62] Brand S, Roy S, Schröder P, *et al.* Combined proteomic and *in silico* target identification reveal a role for 5-lipoxygenase in developmental signaling pathways [J]. *Cell Chem Biol*, 2018, 25(9): 1095-1106.
- [63] Zhu X, Yao Q, Yang P S, *et al.* Multi-omics approaches for in-depth understanding of therapeutic mechanism for traditional Chinese medicine [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 1031051.
- [64] Mun D G, Jessen E, Tomlinson J L, *et al.* Multiomics combined with machine learning defines unique molecular subtypes of cholangiocarcinoma and identifies TNK1 as a therapeutic target [J]. *Hepatology*, 2026, 84(2): 396-410.
- [65] Li G, Peng X L, Guo Y J, *et al.* Currently available strategies for target identification of bioactive natural products [J]. *Front Chem*, 2021, 9: 761609.
- [66] Saldívar-González F I, Aldas-Bulos V D, Medina-Franco J L, *et al.* Natural product drug discovery in the artificial intelligence era [J]. *Chem Sci*, 2022, 13(6): 1526-1546.

[责任编辑 赵慧亮]