

非标记小分子药物靶点发现技术及其在中药研究中的应用

林园园[#], 喻金浩[#], 卢华秋, 陈 萱, 陈宁波, 周建良^{*}

(杭州师范大学药学院, 浙江 杭州 311121)

摘要: 药物靶点的发现在药物研发中发挥着至关重要的作用, 非标记的药物靶点发现技术因其无需改造药物小分子结构, 能更真实反映小分子药物与靶点互作, 成为药物靶点发现的新途径。中药 (traditional Chinese medicines, TCMs) 具有多成分、多靶点的特性, 其作用靶点及机制的研究备受制约, 鉴于非标记的药物靶点发现技术在TCMs化学成分靶点发现研究中的应用潜力, 本文综述了非标记的药物靶点发现新技术及其在TCMs研究中的应用, 为TCMs化学成分靶点的发现提供参考, 为促进TCMs现代化发展提供新思路。

关键词: 药物靶点发现技术; 非标记; 中药; 复杂样品; 活性成分

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)05-1117-11

Label-free target discovery technology of small molecule drug and its application in traditional Chinese medicines

LIN Yuan-yuan[#], YU Jin-hao[#], LU Hua-qiu, CHEN Xuan, CHEN Ning-bo, ZHOU Jian-liang^{*}

(School of Pharmacy, Hangzhou Normal University, Hangzhou 311121, China)

Abstract: The discovery of drug targets plays a crucial role in drug research. Accurate information of small molecule drug-protein interaction can be provided by label-free target discovery technology without any structural modification at the small molecule. So, the label-free drug target discovery technology had become the powerful tool to discover the targets of drugs. Due to the “multi-component and multi-target” characteristics of traditional Chinese medicines (TCMs), the research on its targets and mechanism had been restricted. Based on potential of the label-free target discovery technology in the research of TCMs, this paper summarized the label-free target discovery technology and its application in TCMs research. It will provide a reference for the discovery of targets of TCMs and a new view for promoting the modernization of TCMs.

Key words: drug target discovery technology; label-free; traditional Chinese medicine; complex sample; active component

药物靶点是指药物与机体内生物大分子的直接结合部位, 主要包括受体、酶、离子通道、转运体和核酸等生物大分子^[1], 药物分子通过作用于药物靶点并调控药物靶点的生物学功能进而发挥其作用^[2]。现代小分子化学新药大部分是基于已知靶点进行设计, 靶点较

为明确, 而中药 (traditional Chinese medicines, TCMs) 具有“多成分-多靶点”的特点, 复杂的物质基础必然对应庞大而复杂的药理机制, 这一直是TCMs发展的关键点及挑战。TCMs活性成分通过作用于疾病网络的关键靶点发挥调控及治疗作用, 找出TCMs中发挥药理作用的活性成分及其作用的关键靶点是阐明TCMs作用机制的关键, 且目前已知的药物靶点非常有限, 在TCMs成分及靶点阐明的过程中, 还可能发现一些潜在的疾病关键靶点, 这必将为对疾病机制的阐释及新药的研发提供重要基础。目前常用的靶点发现技术主

收稿日期: 2022-10-29; 修回日期: 2023-03-15.

基金项目: 国家自然科学基金 (82104544, 82074270); 浙江省自然科学基金 (LY20H290008).

[#]共同第一作者.

^{*}通讯作者 Tel: 86-571-28860237, E-mail: cpuzhou@hznu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-1152

要为标记型-化学蛋白质组学法如基于活性的分子探针靶点发现技术 (activity-based protein profiling, ABPP)、基于非标记的靶点发现技术如基于氧化速率的蛋白质稳定方法 (stability of proteins from rates of oxidation, SPROX)、表面等离子共振 (surface plasmon resonance, SPR) 及分子对接技术等^[1]。其中, 非标记的靶点发现技术因其不改变小分子药物的结构、普适性强、具有精准发现的优点而被广泛应用和发展。基于非标记靶点发现技术主要依赖的是小分子药物与靶点结合后形成稳定的复合物, 对外界某些破坏力的敏感度较于非结合蛋白降低, 例如, 基于小分子药物与靶点结合后形成稳定的复合物对蛋白酶敏感度降低的药物亲和反应的靶点稳定性技术 (drug affinity responsive target stability, DARTS)^[3], 基于小分子药物与靶点结合后形成稳定的复合物对热变性敏感度降低的细胞热位移分析技术 (cellular thermal shift assay, CETSA)^[4], 基于小分子药物与靶点结合后形成稳定的复合物对溶剂、机械应力及离子诱导变性敏感度降低的溶剂诱导蛋白沉淀 (solvent-induced protein precipitation, SIP) 技术、机械应力诱导蛋白沉淀 (mechanical stress induced protein precipitation, MSIPP) 技术及基于离子的蛋白质组综合溶解度改变技术 (ion-based proteome-integrated solubility alteration assays, I-PISA)^[5-7]等。此外, 靶点与小分子药物结合后其空间位阻增加, 目标蛋白质配体结合区中的反应性残基被化学探针标记的能力下降, 基于此特性提出的基于靶点响应性及变化谱技术 (target responsive accessibility profiling, TRAP)^[8], 不仅可以用来发现小分子药物结合的靶蛋白, 同时可以一定程度上揭示药物-靶蛋白结合区域。本文将详细总结基于非标记靶点发现技术及其在TCMs研究中的应用, 以期对TCMs物质基础及靶点的研究提供参考与借鉴。

1 非标记小分子药物靶点发现技术的基本原理

非标记小分子药物靶点发现技术的基本原理是基于药物与靶蛋白结合后, 结合靶蛋白稳定性增强, 具有对抗酶解、热变性、化学试剂/溶剂诱导变性、离子诱导变性、机械诱导变性等特性。基于这种特性, 利用Western blot和液相色谱-串联质谱 (liquid chromatography tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) 等技术进行分离及检测, 对比于不结合药物的游离靶蛋白, 进而实现药物靶蛋白的发现。非标记小分子药物靶点发现技术无需改造小分子配体的结构, 直接使用未经修饰的小分子进行实验, 因此不受小分子化学性质的限制, 可用于识别任何小分子的结合靶点, 且未经修饰的小分子化合物能准确反映其与靶点的相互作用, 具有较

好的准确性。本文系统地介绍了非标记小分子药物靶点发现技术的原理、技术发展及其应用 (图1), 主要归纳了目前已广泛应用的三类非标记靶点发现技术及其他新提出的非标记靶点发现技术: ① DARTS类靶点发现技术; ② CETSA类靶点发现技术; ③ SPROX类靶点发现技术; ④ 其他非标记靶点发现技术的研究现状及其在TCMs研究中的应用; 特别强调了非标记靶点发现技术主要的发展策略。此外, 本文还总结了非标记技术在TCMs中的研究现状, 主要聚焦于非标记靶点发现技术在TCMs的活性成分作用靶点发现方面的研究, 还设想非标记技术在TCMs活性成分发现方面的可能性。非标记靶点发现技术与当前生物、化学及分析技术的总结和整合可能会进一步激发先进的设计和突破, 成为TCMs现代化研究的利器。

2 非标记小分子药物靶点发现技术

2.1 DARTS类靶点发现技术

DARTS技术是基于蛋白质在与配体结合后结构变得更为稳定, 更能抵抗蛋白酶水解的特性, 旨在筛选出细胞裂解液中与小分子药物产生亲和作用的靶蛋白。受到“与转录因子结合的DNA位点对DNA酶产生抗性”这一特性的启发, Lomenick等^[3]在2009年提出“药物分子与靶点蛋白结合后对蛋白酶的水解产生抗性”这一假说, 并进行一系列的验证工作, 在其研究中, 首先利用特定蛋白水解酶对与配体结合的靶蛋白及未与配体结合的靶蛋白在同样条件下进行限制性酶解, 并对水解后的蛋白剩余量进行对比, 发现与配体结合的靶点可对抗蛋白水解酶的水解, 作者将其扩展到细胞裂解液水平, 发现在小分子药物配体的保护下, 细胞裂解液中的靶点蛋白可对抗蛋白水解酶的水解。基于此原理, 作者将药物与细胞裂解液共孵育一定时间后, 加入蛋白水解酶进行消化, 由于药物的结合可以保护靶蛋白使其对蛋白水解酶的敏感性降低, 电泳凝胶分离并染色后, 对比不加药物的消化组, 找出其中受保护的条带, 再通过质谱技术就可鉴定出药物的直接靶标蛋白, 进而用于药物靶点的发现, 其机制和流程如图2所示。

DARTS技术中, 不与配体结合的蛋白质通常在“天然”状态下进行限制性酶解。有研究发现, 对于有些天然状态下紧密折叠的蛋白质, 由于蛋白水解酶无法接触到其特异性酶切位点, 即使与蛋白水解酶孵育数天也无法达到实验所需的消化程度^[9], 目前的技术DARTS就不适用于该类蛋白了, 为了改善这种情况, 有学者提出了脉冲水解法 (pulse proteolysis, PP): 在DARTS技术中引入变性剂辅助蛋白酶切, 即蛋白质酶切是在一系列浓度的变性剂下进行, 蛋白质受到变性剂的影响会发生不同程度的变性和去折叠, 随后将蛋

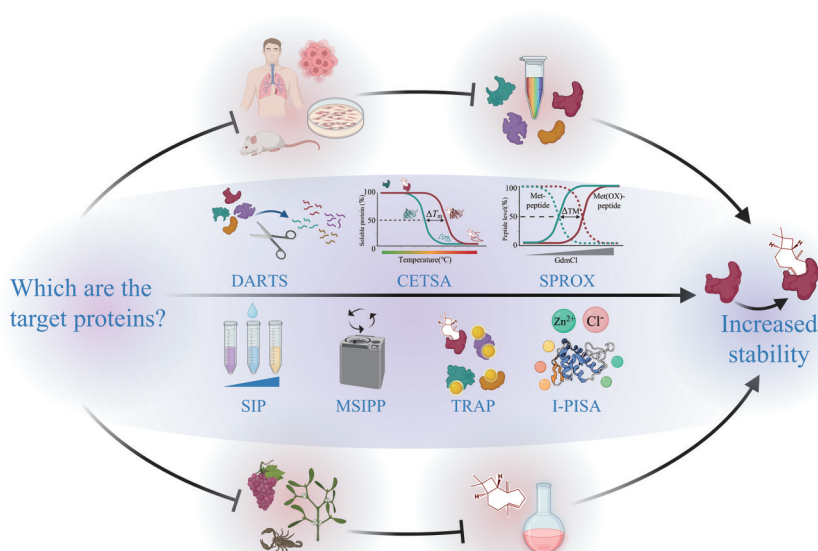


Figure 1 Schematic representation of label-free drug target discovery technology as an emerging platform for target discovery from traditional Chinese medicines (TCMs). DARTS: Drug affinity responsive target stability; SPROX: Stability of proteins from rates of oxidation; CETSA: Cellular thermal shift assay; SIP: Solvent-induced protein precipitation; MSIPP: Mechanical stress induced protein precipitation; I-PISA: Ion-based proteome-integrated solubility alteration assays; TRAP: Target responsive accessibility profiling; TM: Transition midpoint

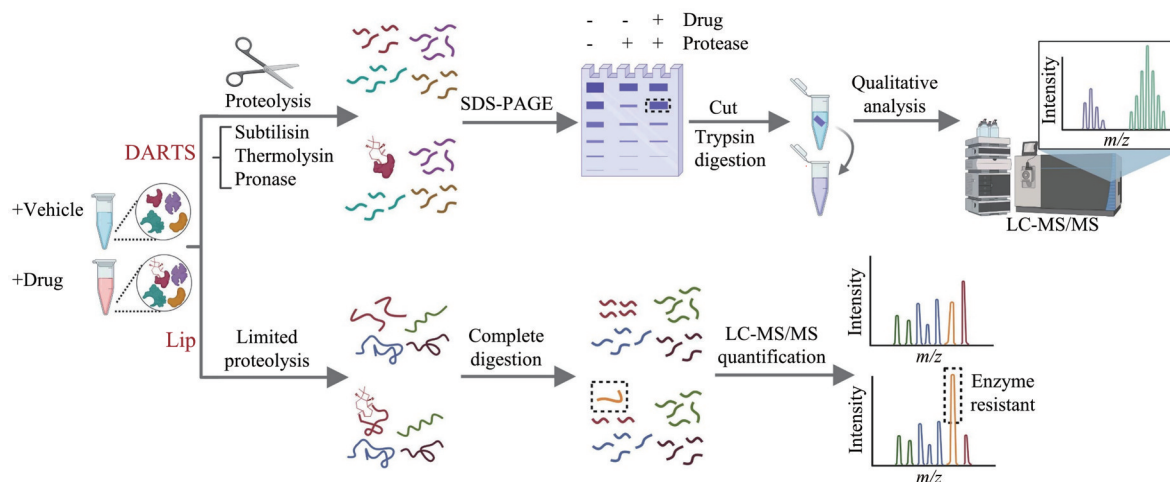


Figure 2 Label-free drug target discovery technology based on DARTS. LC-MS/MS: Liquid chromatography tandem mass spectrometry

白酶添加到上述溶液中进行脉冲水解, 而与小分子配体结合的蛋白质不易被蛋白酶接触到特异性酶切位点, 进而用于小分子化合物靶点的发现^[10,11]。此外, 由于引入了一系列浓度的变性剂, 可以变性剂浓度为自变量, 靶点蛋白变性程度为因变量, 绘制蛋白变性曲线, 用来计算靶点蛋白的折叠自由能。

由于 DARTS 与 PP 技术均使用 Western blot 进行蛋白的分离和定量检测, 再将蛋白泳道胶条切下进行后续的 MS 分析。对于蛋白质种类复杂的生物样品, 某些蛋白质由于分子质量相近而在凝胶上聚集在一起, 低丰度蛋白可能被高丰度蛋白掩盖, 无法准确地切下差异性蛋白条带^[12], 为了解决这些问题, 在 DARTS

与 PP 技术中引入基质辅助激光解吸电离质谱法^[13]、串联质量标签 (tandem mass tag, TMT)^[14]、细胞培养中氨基酸的稳定同位素标记 (stable isotope labeling with amino acids in cell culture, SILAC)^[15]等技术来定量每个样品中完整蛋白质的相对丰度, 此外, 还通过引入二维凝胶电泳^[16]及基于 LC-MS/MS 的定量蛋白质组学策略等分辨率更高的分离方式提高对分子质量相近及低丰度蛋白的分析能力。

DARTS 技术与 PP 技术均用到了限制性酶解法^[17], 旨在研究短时间酶切后样品中剩余的蛋白质, 仅能提供蛋白层面的信息, 不能提供酶切位点相关的结构域信息, 基于此, 有学者提出了一种基于两步消化的限制

性酶解方法,并通过高灵敏度的质谱选择性反应监测技术精确地定量样品组和对照组之间肽段相对强度的差异,从而推断蛋白结构差异,进而提供酶切位点相关的结构域信息,并将其命名为“限制性酶切”(limited proteolysis, Lip)技术^[18,19]。相较于DARTS与PP技术,Lip技术最大的优点是在药物靶点发现的基础上可以提供一定量的结合区域的信息,在药物配体的保护下,靶蛋白在第一步的限制性酶切过程中,与药物结合的蛋白区域由于药物小分子带来的位阻或者由于小分子的结合,此区域处于紧密的折叠状态,均使得限制性蛋白酶不可及,此区域的肽段将会尽可能多的保留到第二次酶解的过程中,经过第二次的充分酶解,相比于靶蛋白未与药物结合的对照组,与药物结合区域有关的肽段能够显示出丰度上的提升,这些肽段信息揭示了药物与靶点的结合域,提供了研究药物作用机制的重要信息(图2)。此外,学者将Lip技术与蛋白质组学的方法相结合揭示了简单生物的代谢物-蛋白质相互作用关系^[20]。还将基于机器学习的框架引入到Lip技术开发了“Lip-Quant”方法来系统研究复杂真核生物(如人类)蛋白质组中的蛋白质-小分子相互作用,将其进一步应用到药物靶蛋白筛选以及药物结合区域的研究之中^[19]。随后该团队将Lip技术拓展到蛋白翻译后修饰、变构催化、蛋白质-蛋白质相互作用、蛋白质聚集等结构蛋白质组学领域^[21]。

2.2 CETSA类靶点发现技术

当小分子配体与靶点蛋白结合时,蛋白自身热稳定性会增强,通过加热靶点蛋白去折叠诱导变性的过

程会延迟发生,基于热位移分析(thermal shift assay, TSA)法测定结合蛋白和游离蛋白变性温度 T_m 并绘制熔解曲线,通过对比配体结合蛋白和游离蛋白的热熔曲线中的 T_m (热熔曲线中点的位移,指占绝对量50%的蛋白因热诱导变性而沉淀的温度),即可判定该蛋白是否为药物的靶点^[22]。研发之初,TSA法只适用于分析纯化蛋白,为了克服这一局限性,2013年Martinez Molina等^[4]将上述蛋白样品拓展到细胞和组织水平,用于发现活细胞和组织中与小分子药物发生结合的靶点蛋白,命名为CETSA技术,其原理与TSA类似,通过测定活细胞或组织水平中结合靶蛋白与游离蛋白的热力学稳定性的变化来发现小分子配体的直接作用靶点。在CETSA技术中,利用药物溶液和等体积的空白溶剂分别处理两组完整细胞样品,孵育后分成多个等份,并进行多个梯度温度点的等时长加热处理,冷却后裂解细胞,随着温度到达蛋白的变性温度,蛋白因结构热变性发生去折叠进而失去水溶性,通过高速离心来分离上清中的可溶性蛋白和沉淀不溶性组分,利用Western blot技术对上清中可溶性蛋白进行分离及定量检测,以加热温度作为自变量,蛋白量作为因变量绘制蛋白热熔曲线,基于药物组与溶剂组中蛋白热熔曲线中点位移的差值(ΔT_m)发现药物靶蛋白,其机制和流程如图3A所示。在此基础上,为了研究药物浓度对配体-靶蛋白之间相互作用的影响,研究者提出了等温剂量响应指纹图谱方法(isothermal dose-response fingerprint CETSA, ITDRF-CETSA), ITDRF-CETSA通过将活细胞或细胞裂解液用不同浓度的药物处理,保持加热时

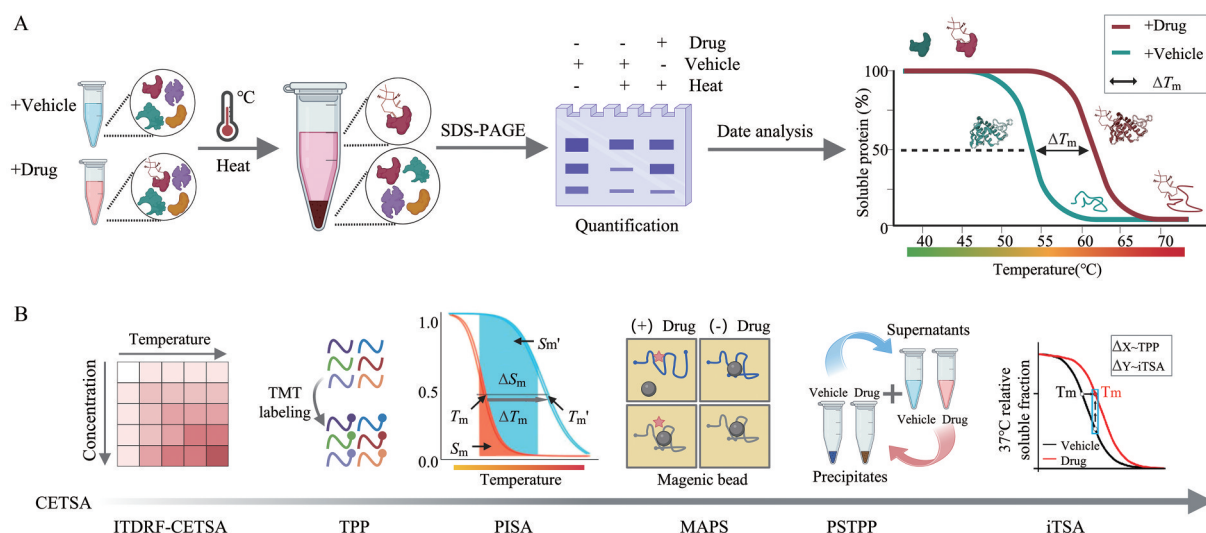


Figure 3 Label-free drug target discovery technology based on CETSA. A: The mechanism and process of CETSA; B: Target discovery techniques derived from CETSA. ITDRF-CETSA: Isothermal dose-response fingerprint CETSA; TPP: Thermal proteome profiling; PISA: Proteome integral solubility alteration; MAPS: Microparticle-assisted precipitation screening; PSTPP: Precipitate-supported TPP; iTSA: Isothermal shift assay

间和温度不变,以蛋白结构受药物保护的程​​度作为指标,来确定药物是否以剂量依赖性方式与靶蛋白结合,不仅可以确定药物的真正靶点,同时还可以推断出靶点蛋白与药物的亲和力(K_d 值)^[23],研究表明通过此方法测得的亲和力与 Kinobeads 竞争性结合实验结果具有良好的一致性。

由于 CETSA 技术主要依赖于 Western blot 及近程放大发光均相检测技术进行检测,抗体的可用性及检测的通量大大限制了其发展,因其不能无偏好地识别出药物的靶蛋白,不利于药物新靶点的发现。基于此,热蛋白质组分析 (thermal proteome profiling, TPP) 技术被提出,TPP 技术将 CETSA 技术与多重定量质谱法相结合,大大提高了蛋白检测的通量及分析速度,因此,TPP 技术又被称为 MS-CETSA 技术^[24],TPP 技术通过在单次 LC-MS/MS 实验中同时监测 10 个不同温度下全蛋白质组的热稳定性变化,可获得大量可溶性蛋白的热熔曲线,不仅可用于药物靶点的发现,还可以用于检测细胞 TCMs 物的脱靶效应,以及药物-靶蛋白的相互作用模式研究^[25]。与 CETSA 技术一样,TPP 技术可以用于完整活细胞及细胞裂解液水平的研究,通过将这两个水平的样品所得结果进行综合分析,可区分药物的直接作用靶点及通过影响上下游信号通路而发挥作用的间接靶点^[26]。除此之外,TPP 也是绘制代谢途径的有效工具,可用于翻译后修饰、蛋白质-蛋白质相互作用的研究及蛋白质基本功能的阐述,进而绘制出更全面的蛋白质相互作用网络,例如在翻译后修饰方面的研究,蛋白质的磷酸化会影响蛋白质的热稳定性,其修饰前后的热稳定性差异可以用 TPP 测量^[27]。

由于 CETSA 及 TPP 技术为了保持蛋白的活性,依赖于使用不含洗涤剂的缓冲液提取细胞蛋白,而无法获得足够的膜蛋白,因此,在 CETSA 和 TPP 实验中引入非变性洗涤剂 (NP-40),扩大了对膜蛋白覆盖率,通过改良后的方法成功识别出毒毛旋花苷 G 的膜蛋白靶点钠钾离子泵^[28]。此外,CETSA 及 TPP 技术在低丰度蛋白质的检测方面存在限制,研究者通过将亚摩尔浓度的亲和纯化蛋白复合物样本作为 TMT 复用器中的等压触发通道引入到突变 TPP(mTPP) 技术中来促进热蛋白质组分析实验中低丰度蛋白质的检测^[29],用来获得基于 TPP 或 mTPP 技术遗漏的蛋白质的热分析数据。许多生物学相关、疾病相关的蛋白质在细胞中的丰度相对较低,该方法在蛋白疾病标志物及低丰度的靶点蛋白发现方面具有很大潜力。

在 CETSA 及 TPP 技术中,为保证数据的可信度,通常需要至少 10 个温度点的样品,若增加重复次数或不同处理条件,样品数量将达到几十甚至几百个,虽然

TPP 通过多重定量质谱法实现了高通量分析,这庞大的分析通量依然是一个巨大的挑战。基于此,研究者们提出了“合并为一锅”策略,命名为蛋白质组整体溶解度改变技术 (proteome integral solubility alteration, PISA)^[30-32],并将其与 TPP 联用,称为 PISA-T。此策略通过将多个加热温度点的样品等量混合成为单个合并样品,再进行分析,并将 CETSA 测定热融曲线的“位移变化”转变为“积分变化”,这种策略不仅减少了分析样品数量,增加了筛选靶蛋白的特异性,同时也减小了实验误差,但样品的合并减小了单个样品的差异值,一定程度上导致原有筛选灵敏度的降低^[30]。

CETSA 及 TPP 技术通过分析蛋白质组样品在高温处理下的可溶性上清蛋白进行药物靶蛋白筛选,而变性沉淀的部分一直未受到重视。配体稳定靶点识别技术 (target identification by ligand stabilization, TILS) 将研究对象转变为加热之后产生的不可溶沉淀部分,成为 CETSA 及 TPP 技术的补充方法,但低效的样品处理程序阻碍了沉淀的分析,近来研究报道了一种微球辅助的热致沉淀分析方法 (microparticle-assisted precipitation screening, MAPS),通过在加热之前向体系中引入足量的微球材料,未结合小分子配体的蛋白质结构展开后将聚集在微粒表面,而结合小分子配体的蛋白质结构展开需要相对较高温度,通过分析聚集在微粒表面蛋白的差异来识别小分子药物的靶点。在样品前处理步骤中,MAPS 技术采用快速、高通量的 SP3 (single-pot solid-phase-enhanced sample preparation, SP3) 法并在微粒的表面运行。根据该方法,将沉淀在微粒上的蛋白质进行洗涤、还原、烷基化、消化及除盐处理,整个样品制备过程均在微粒表面进行,不涉及任何样品转移,样品损失较少,更加适用于微量样品。在数据处理方面,开发了灵敏度更高的处理方法,不再依赖于绘制热融曲线,而是以通过比较有或无小分子配体存在的整体稳定性差异,并整合多个温度点的数据,进而放大了热稳定性变化的差异,相较于 TPP 技术,MAPS 具有更高的特异性^[33]。此外,近来有学者将 TPP 热处理得到的上清和沉淀中含有配体诱导的蛋白稳定性转移的互补信息进行有机整合,开发了一种沉淀支持的 TPP (precipitate-supported TPP, PSTPP) 分析方法,用于在蛋白质组水平上对蛋白质-药物相互作用进行无偏和全面的分析。在 PSTPP 技术中,只使用蛋白质沉淀显著的温度来诱导蛋白质变性,并利用上清组分和沉淀组分中包含的互补信息来提高筛选的特异性和灵敏度。此外,还提出了一种新的基于深度学习的图像识别算法来识别目标蛋白,克服了热融曲线拟合策略存在的问题^[34]。

由于CETSA及TPP技术均需多个温度点,研究者开发了等温位移分析(isothermal shift assay, iTSA)^[35],此方法可在单一温度点下进行热稳定性测定,通过增加样品的重复次数,可使靶蛋白鉴定的统计学可信度达到与CETSA/TPP相似的效果,iTSA具有更高的通量选择、更简单的实验设计及工作流程,相较于CETSA/TPP,iTSA是一种更高效的方法,但由于该方法中增加的样品重复次数,此方法并不能大幅度减少所需分析的样品数,且可能会因温度过于单一导致错误识别,例如识别出脱靶后结合的蛋白^[36]。

CETSA类靶点发现技术是目前应用最为广泛的非标记靶点发现技术,且在近年来得到快速的发展,图3B将近年来基于CETSA衍生出的几种靶点发现技术进行了梳理。

2.3 SPROX类靶点发现技术

蛋白质的变性通常伴随着蛋白质整体构象的改变,其高级结构的改变主要包括展开和去折叠,这些结构的变化会改变某些受保护的活性氨基酸的表面暴露情况或可及性,这些残基的表面可及性可以通过特定的化学修饰反应来评估。SPROX是一种可以用来测量蛋白质和蛋白质配体复合物的热力学稳定性的技术,大多数疏水甲硫氨酸残基(Met)埋藏在蛋白质的核心内部,Met氧化的基线水平较低,在一系列浓度的化学变性剂盐酸胍等的存在下,蛋白变性结构展开后,Met将会暴露出,其中靶蛋白经过药物孵育结合,展开暴露的Met数量相对较少。再使用过氧化氢等氧化剂对Met进行氧化生成砒类,淬灭氧化反应后,通过“自下而上”蛋白组学样品前处理方法进行酶解等处理,再由蛋白组学定量分析对含砒类肽段定量(反映了含有Met的多肽的氧化程度),以变性剂浓度作为自变量,Met肽段氧化程度作为因变量绘制氧化曲线,通过对

比药物处理组与空白对照组中氧化曲线的中点位移(transition midpoint, TM)差值(ΔTM),来判断该肽段所属蛋白是否为药物的作用靶点。SPROX不仅可以检测到靶蛋白与药物配体结合后的整体生物物理性质的变化,也可部分揭示药物配体结合域的信息,其流程及机制如图4所示。此外,基于变性剂浓度对氧化反应速率的依赖性可用来计算蛋白质折叠/展开反应的折叠自由能($\Delta G(f)$)和 m 值($\Delta\Delta G(f)/\Delta[\text{Den}]$)。通过测量游离蛋白与配体结合蛋白的 $\Delta G(f)$ 和 m 值也可用来评价蛋白质与配体的结合亲和力(结合自由能($\Delta\Delta G(f)$)和 K_d)^[37,38]。

虽然,常规的“自下而上”蛋白组学可以满足SPROX技术中肽段的定量需求,考虑到SPROX多个处理组别的样品定量的需求,学者将多重定量质谱法与SPROX进行联用^[39,40],大大提升了SPROX技术的测定通量及准确度,比如,将SPROX技术联用TMT,量化了人类细胞提取物中约3000个蛋白质中约10000个独特区域的稳定性^[40]。此外,学者还将(isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ)-SPROX与SILAC技术进行联用,用于蛋白质-配体结合相互作用的大规模分析^[41]。

由于SPROX技术是通过测定蛋白结构展开后暴露的Met的氧化速率,不含Met的蛋白显然是不适合的,针对此局限性,开发了基于赖氨酸残基标记的S-甲基硫代乙酸酯(S-methyl thioacetimidate, SMTA)^[42]及基于色氨酸残基标记的二甲基(2-羟基-5-硝基苄基)磺基溴酰胺[dimethyl (2-hydroxy-5-nitrobenzyl) sulfonium bromide, HNSB]策略^[43],与SPROX一样,SMTA与HNSB标记策略不仅可用来研究化学变性剂诱导的蛋白质和蛋白配体配合物在溶液中的平衡展开/再折叠特性,也可以用来评价蛋白质与配体的结合亲和力,且扩大了化学修饰中的肽和蛋白质的覆盖范围,常将

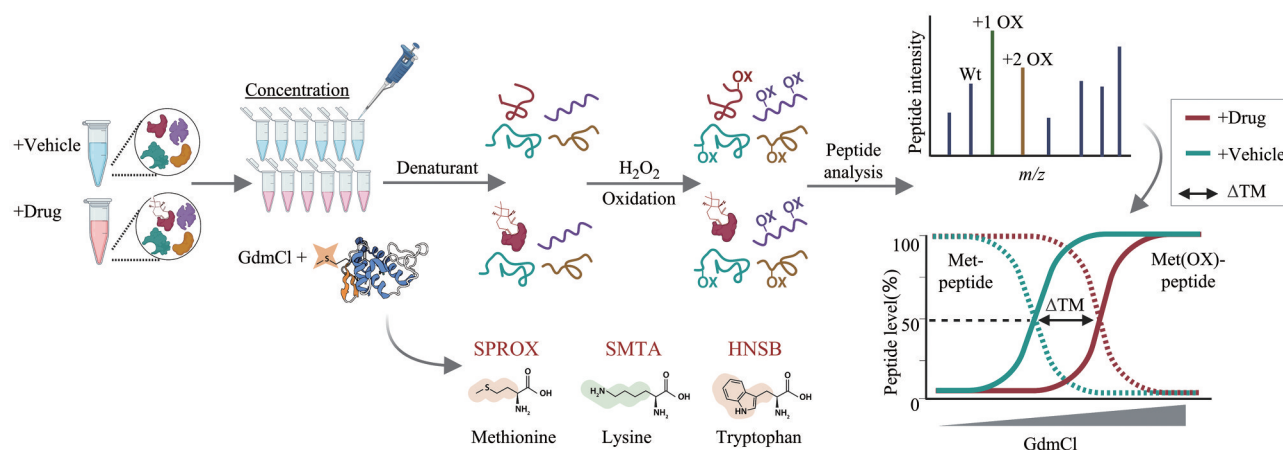


Figure 4 Label-free drug target discovery technology based on SPROX. SMTA: S-Methyl thioacetimidate; HNSB: Dimethyl (2-hydroxy-5-nitrobenzyl) sulfonium bromide

SMTA/HNSB 标记策略整合到 SPROX 中进一步扩大肽和蛋白质的覆盖范围^[43]。

为了获得更高的蛋白组覆盖率, 另一种策略是基于 SPROX 技术的化学变性剂, 结合 TPP 技术中使用的蛋白质沉淀策略来进行小分子药物靶点的发现, 称之为化学变性和蛋白质沉淀 (chemical denaturation and protein precipitation, CPP) 技术^[44], 通过化学变性剂将蛋白结构进行去折叠和展开, 再稀释化学变性剂的浓度并离心使展开的蛋白沉淀, 随后对可溶性或沉淀蛋白进行定量分析, 用于蛋白质-药物相互作用的大规模分析, 相较于 SPROX, CPP 技术可对蛋白进行无差别的变性沉淀, 且均可对变性诱导变性后的可溶性及沉淀蛋白进行定量分析, 因而可获得更高的蛋白组覆盖, 且具有更低的错误发现率。

2.4 其他非标记靶点发现技术

2.4.1 溶剂诱导蛋白沉淀技术

丙酮、乙醇、甲醇和乙腈等溶剂通常用于沉淀蛋白质, 而小分子配体-蛋白质复合物具有较低的能量状态, 因此小分子配体-蛋白质复合物中的蛋白相较于游离蛋白质更能抵抗溶剂诱导的变性沉淀。基于这一原理, 结合稳定同位素二甲基标记的蛋白质组学, 提出了 SIP 技术, 其流程及机制如图 5 所示。利用 SIP 技术成功地检测细胞裂解物中甲氨蝶呤、SNS-032 和星形孢菌素的已知蛋白质靶标, 验证了 SIP 方法的可行性, 并利用 SIP 方法, 成功鉴定了 HSP90 家族的三种已知蛋白和几种潜在的脱靶蛋白^[5]。

2.4.2 机械应力诱导蛋白沉淀技术

与热应力类似, 机械应力也可以诱导蛋白质沉淀。在机械应力作用下, 蛋白质会随着蛋白质构象的变化而逐渐沉淀, 从而在微粒表面聚集, 小分子配体-蛋白质复合物中的蛋白相较于游离蛋白质更能抵抗机械应力诱导的变性沉淀, 通过对比微粒表面聚集的蛋白的差异, 开发了一种用于药物靶点发现的 MSIPP 方法。其流程及机制如图 5 所示。基于 MSIPP 技术成功地发现了细胞裂解物中甲氨蝶呤、雷替曲塞的已知蛋白质靶标, 验证了 MSIPP 方法的可行性, 这也是首次通过非标记的药物

靶点发现技术证明二氢叶酸还原酶是雷替曲塞的直接作用靶点^[6]。

2.4.3 基于离子的蛋白质组综合溶解度改变技术

现有的基于温度的蛋白质沉淀靶点发现方法, 存在许多限制因素, 比如, 有些蛋白并不会随着温度的升高发生去折叠产生沉淀, 热熔曲线并不总是理想的 S 形, 使得 T_m 的测定复杂化, 近两年新提出的一些等温蛋白沉淀法 (如 SIP、MSIPP) 仅适用于裂解液实验。基于此局限性, 有研究提出了 I-PISA 技术。某些阴离子、阳离子可以改变蛋白质溶解度, 进而导致蛋白质沉淀, 称之为基于离子的蛋白质沉淀方法。I-PISA 技术将基于离子的蛋白质沉淀方法与 PISA 分析相结合, 利用了蛋白结合药物后结构更加稳定, 能够一定程度上抵抗离子诱导沉淀的特性, 通过对比药物孵育和溶剂孵育的裂解液得到的上清液中各蛋白的丰度, 将药物孵育组显著增高的蛋白认定为潜在靶蛋白, 其流程及机制如图 5 所示。I-PISA 法对于细胞裂解液和完整细胞均适用, 且可以检测微量蛋白的溶解度变化^[7]。

2.4.4 靶点响应性及可及性变化谱技术

靶蛋白与小分子配体结合后, 小分子配体结合域与靶蛋白的活性口袋紧密结合, 其诱导变构区域的氨基酸残基的可及性发生显著变化, 该变化能够被还原烷基化等化学共价标记反应所捕捉, 再利用质谱定量蛋白质组学手段对细胞内的全蛋白组进行分析, 能够获得真实生物体系内小分子孵育后全体蛋白组的可及性变化信息, 从中筛选出小分子诱导可及性变化最显著的蛋白即为小分子靶蛋白^[8], 其流程及机制如图 6 所示。TRAP 技术能够普适性的运用于多个小分子配体的高通量靶标发现, 能够提供部分的配体结合位点的信息, 并适用于与小分子存在弱结合的靶标发现。

3 非标记靶点发现技术在 TCMs 小分子作用靶点发现中的应用

TCMs 具有“多成分-多靶点”的特点, 其中活性成分靶点的确证一直是 TCMs 发展的瓶颈问题。随着非标记靶点发现技术的快速发展, 越来越多的 TCMs 活性成分

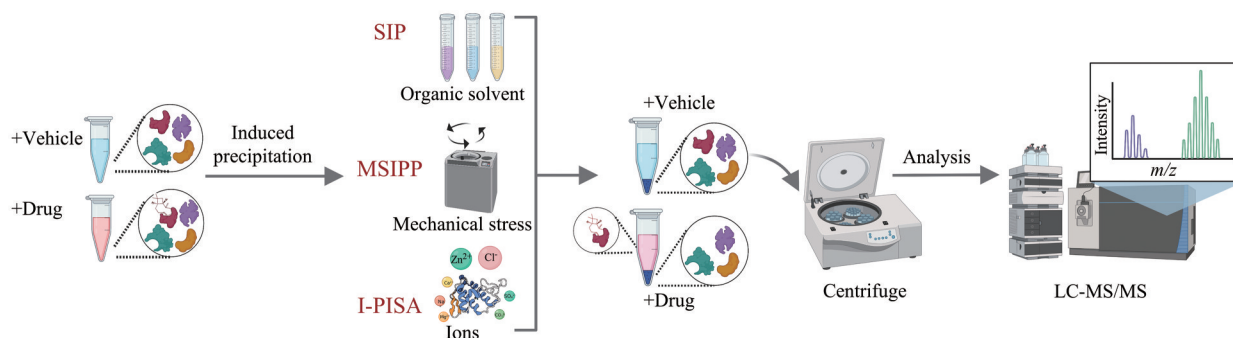


Figure 5 Label-free drug target discovery technology based on SIP, MSIPP and I-PISA

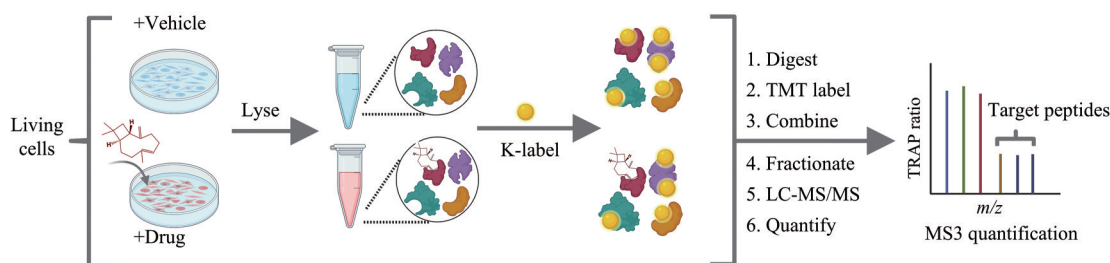


Figure 6 Label-free drug target discovery technology based on TRAP

的靶点得以确证。本文对近年非标记靶点发现技术用于TCMs活性成分靶点发现的应用研究进行了总结,除了单独用于TCMs活性成分的靶点发现以外^[45],非标记靶点发现技术在TCMs研究中的应用大概分为以下四类。

3.1 与分子对接技术或SPR技术相结合对TCMs活性成分的作用靶点进行研究

单一的靶点发现技术往往存在着自身不足,可能会有假阳性的结果出现,往往需要像SPR技术及分子对接技术对发现的靶点进一步确证,表1^[46-51]总结了近几年非标记靶点发现技术结合SPR技术及分子对接技术对TCMs活性成分靶点发现的代表性研究。

3.2 与ABPP分子探针相结合对TCMs活性成分的作用靶点进行研究

ABPP是基于活性的分子探针在蛋白质组的水平上或活细胞内原位标记、捕获、富集和鉴定具有特定生理活性的靶蛋白质的方法,ABPP技术先将分子探针加入到复杂的蛋白质组进行共孵育,然后分离并富集与小分子探针特异性结合的蛋白质,最后通过高灵敏度的质谱或生物化学等方法进行鉴定,从而获取与分子探针有直接相互作用的靶蛋白的生物化学信息,ABPP技术通过原位标记、捕获及富集可直接探测到

靶蛋白的活性中心,并进行下拉等富集操作,减少了非靶点蛋白的干扰,减轻了蛋白分析时的压力,对丰度低的蛋白较为友好,这是非标记靶点发现技术所缺乏的。但ABPP技术的实施要求每个小分子化合物设计相应的分子探针,有一定技术难度且普适性较差,尤其对于成分复杂的TCMs来说适用性不佳,且经过结构修饰后分子探针与靶蛋白的相互作用不能真实反映小分子化合物与靶蛋白的互作,这些限制是可以与非标记靶点发现技术结合进行优势互补。表2^[52-57]总结了近几年非标记靶点发现技术结合ABPP技术对TCMs活性成分靶点发现的代表性研究。

3.3 应用两种及以上的非标记靶点发现技术对TCMs活性成分的作用靶点进行研究

非标记靶点发现技术普适性强,非常适用于成分复杂的TCMs小分子化合物靶点的发现,但非标记靶点发现技术通过探测靶蛋白与小分子化合物结合后特定物理性质的变化,小分子化合物与靶蛋白结合后,这些物理性质的变化不一定会全部凸显,有一定假阳性率,将不同的非标记靶点发现技术相结合,可减少假阳性发生率,提高靶点发现准确性。此外,非标记靶点发现技术在药物-靶蛋白互作的阐释程度方面也有所差

Table 1 Target discovery of TCMs active components based on label-free target discovery technology combined with SPR/molecular docking technology

Cell line	Target protein	Compound	TCMs
Human embryonic kidney 293T	Protein phosphatase 2A	Arctigenin	<i>Fructus arctii</i> ^[46]
HeLa	Importin-β1	Magnolol	<i>Magnolia officinalis</i> ^[47]
Jurkat	Nucleolin	Oridonin	<i>Rabdosia rubescens</i> (Hemsl.) Hara ^[48]
Madin-Darby canine kidney	Neuraminidase	Isoimperatorin	<i>Angelica dahurica</i> ^[49]
A549	Quinone oxidoreductase 2	Curcumin	<i>Rhizoma Curcuma</i> ^[50]
H9c2	Collagen I	Protocatechualdehyde	<i>Radix Salviae Miltiorrhiae</i> ^[51]

Table 2 Target discovery of TCMs active components based on label-free target discovery technology combined with activity-based protein profiling (ABPP) technology

Cell line	Target protein	Compound	TCMs
CNE-2	Nucleolin	Curcumol	<i>Curcuma wenyujin</i> Y. H. Chen et C. Ling ^[52]
RAW 264.7	High mobility group protein 1	Celastrol	<i>Tripterygium wilfordii</i> Hook. f. ^[53]
HeLa	Vacuolar-type H ⁺ -translocating ATPase	Toosendanin	<i>Melia toosendan</i> Sieb. et Zucc ^[54]
Duke University 145	SHP-2 tyrosine phosphatase	Geranylneringenin	<i>Artocarpus altilis</i> (Parkinson) Fosberg ^[55]
Duke University 145	Signal transducer and activator of transcription 3	2-Hydroxycinnamaldehyde	<i>Cinnamomum cassia</i> ^[56]
MLE-12; MH-S	Interferon gene	Icaritin	<i>Epimedium brevicornu</i> Maxim. ^[57]

Table 3 Target discovery of TCMs active components based on two or more label-free target discovery technology

Cell line	Target protein	Compound	TCMs
Rat PC12 pheochromocytoma cells	Apoptosis regulator Bax	Icariin	<i>Epimedium brevicornu</i> Maxim. ^[58]
SH-SY5Y human neuroblastoma cells	Dynamin-related protein 1	Andrographolide	<i>Andrographis paniculata</i> ^[59]
BV-2 murine microglial cells	Anti-silencing factor 1a	Artone	<i>Artemisia giraldii</i> ^[60]
HepG2; Huh7	T-cell factor	Bruceine D	<i>Brucea javanica</i> ^[61]
Primary neonatal rat ventricular myocytes	Pyruvate kinase isoform M2	Protocatechuic aldehyde	<i>Radix Salviae Miltiorrhiae</i> ^[62]
A549	Cellular-mesenchymal epithelial transition factor	Dictamnine	<i>Dictamnus dasycarpus</i> Turcz. ^[63]

异, 将不同水平的技术相结合, 可进行更全面的分析。表 3^[58-63]总结了近几年结合两种及以上非标记靶点发现技术对 TCMs 活性成分靶点发现的代表性研究。

3.4 TCMs 复杂体系中活性成分及靶点的筛选

非标记技术可直接揭示药物小分子与靶点的相互作用, 因此可用于像基于计算机虚拟技术的筛选及基于 SPR 技术的筛选技术一样对 TCMs 活性成分进行基于靶点的依次筛选。鉴于非标记技术在靶点发现过程中强大的分析能力得以从细胞裂解液等复杂体系中发现小分子药物的作用靶点, 受此启发, 学者将非标记技术对 TCMs 复方制剂速效救心丸中活性成分的筛选及靶点的发现进行了尝试^[64], 首先通过对临床治疗状态的统计与分析, 得出速效救心丸通过扩张胸主动脉而增加心脏排血量来治疗心血管疾病, 进一步通过 CETSA 技术结合基于 iTRAQ 的差异蛋白质组学分析确定了速效救心丸致使血管扩张的潜在靶蛋白, 将这些靶点相关的信号通路进一步与扩张胸主动脉相关的信号通路进行比对, 鉴定出 CaMKII 蛋白是速效救心丸发挥治疗作用的靶蛋白, 通过对速效救心丸中的化学成分进行基于 CaMKII 蛋白靶点的依次筛选, 发现速效救心丸中川芎内酯为 CaMKII 蛋白靶点的拮抗剂, 且进一步揭示了川芎内酯发挥作用的机制。这次基于非标记技术对 TCMs 复杂体系的活性成分及靶点筛选的尝试将是非标记技术在 TCMs 研究中的一个重要方向。

4 总结与展望

TCMs 在我国有着悠久的临床实践历史, 也是新药开发的重要宝库。由于 TCMs 成分复杂, 且具有多成分、多靶点、多通路及协同作用的特点, TCMs 的药效物质、作用靶点及作用机制等基础研究一直进展缓慢, 成为制约 TCMs 现代化、产业化和国际化进程的瓶颈。阐明 TCMs 活性成分-靶蛋白靶点的相互作用是 TCMs 现代研究的重中之重, 阐明过程中所使用的方法和技术是利器, 非标记靶点发现技术无需对小分子进行结构修饰, 可以最大程度地测定小分子与靶蛋白真实的互作, 且无结构修饰所面临的技术难点, 普适性强, 非常适合成分复杂的 TCMs 活性成分及其作用靶点的研究, 且基于 TCMs 多成分的特点, 有利于发现

新治疗靶点。但非标记靶点发现技术有其自身的局限性, 像依赖于 Western blot 的 DARTS 及 CETSA 技术, 容易丢失低丰度靶蛋白的信息, 而其改进技术 Lip 及 TPP 是基于蛋白组学技术, 从组学产生的大量数据中找到小分子化合物的靶点信息并非易事, 尤其是对复杂的 TCMs 组分, 所以, 将非标记靶点发现技术与其他药物-靶点和相互作用研究技术相结合是一个很好的解决方案。随着质谱技术及分子生物学技术的发展, 这种结合将会越来越深入, 进一步为 TCMs 活性成分-靶蛋白靶点的相互作用研究提供技术支持。此外, TCMs 药效物质和其作用靶点是同时发挥作用的, 基于非标记靶点发现技术在 TCMs 复杂体系中活性成分及靶点方向的研究是一次很好的尝试, 本文认为将非标记靶点发现技术应用于 TCMs 药效物质和其作用靶点的同步发现将是一个非常有吸引力的方向, 这将为对 TCMs 的药效物质、作用靶点及作用机制等基础研究提供重要的方法基础和技术支持。

作者贡献: 林园园、喻金浩负责文献检索及论文撰写; 周建良负责文章选题、指导写作; 卢华秋、陈萱、陈宁波负责修改及校对文章。

利益冲突: 所有作者声明本文不存在任何利益冲突。

References

- [1] Zeng KW, Tu PF. Recent progress on the methodology for target study of traditional Chinese medicine [J]. *Sci Sin Chim (中国科学·化学)*, 2018, 48: 1420-1428.
- [2] Bagal SK, Brown AD, Cox PJ, et al. Ion channels as therapeutic targets: a drug discovery perspective [J]. *J Med Chem*, 2013, 56: 593-624.
- [3] Lomenick B, Hao R, Jonai N, et al. Target identification using drug affinity responsive target stability (DARTS) [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106: 21984-21989.
- [4] 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: 84-87.
- [5] Zhang X, Wang Q, Li Y, et al. Solvent-induced protein precipitation for drug target discovery on proteomic scale [J]. *Anal Chem*, 2020, 92: 1363-1371.

- [6] Lyu J, Wang Y, Ruan C, et al. Mechanical stress induced protein precipitation method for drug target screening [J]. *Anal Chim Acta*, 2021, 1168: 338612.
- [7] Christian MB, Pierre S, Roman AZ. Ion-based proteome-integrated solubility alteration assays for systemwide profiling of protein-molecule interactions [J]. *Anal Chem*, 2022, 94: 7066-7074.
- [8] Yan W, Wang D, Wan N, et al. Living cell-target responsive accessibility profiling reveals silibinin targeting ACSL4 for combating ferroptosis [J]. *Anal Chem*, 2022, 94: 14820-14826.
- [9] Hills RD Jr, Brooks CL 3rd. Hydrophobic cooperativity as a mechanism for amyloid nucleation [J]. *J Mol Biol*, 2007, 368: 894-901.
- [10] Chiwook P, Susan M. Pulse proteolysis: a simple method for quantitative determination of protein stability and ligand binding [J]. *Nat Methods*, 2005, 2: 207-212.
- [11] Rogério VT, Antônio FM, Diógenes S, et al. Santos pulse proteolysis and precipitation for target identification [J]. *J Proteome Res*, 2016, 15: 2236-2245.
- [12] Lomenick B, Olsen RW, Huang J. Identification of direct protein targets of small molecules [J]. *ACS Chem Biol*, 2011, 6: 34-46.
- [13] Makowski L, Bardhan J, Gore D, et al. WAXS studies of the structural diversity of hemoglobin in solution [J]. *J Mol Biol*, 2011, 408: 909-921.
- [14] Zeng LF, Shin WH, Zhu XL, et al. Discovery of nicotinamide adenine dinucleotide binding proteins in the escherichia coli proteome using a combined energetic-and structural-bioinformatics-based approach [J]. *J Proteome Res*, 2017, 16: 470-480.
- [15] Jagat A, Michael C. SILAC-pulse proteolysis: a mass spectrometry-based method for discovery and cross-validation in proteome-wide studies of ligand binding [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2014, 25: 2073-2083.
- [16] Liu PF, Kihara D, Park C. Energetics-based discovery of protein-ligand interactions on a proteomic scale [J]. *J Mol Biol*, 2011, 408: 147-162.
- [17] Schopper S, Kahraman A, Leuenerger P, et al. Measuring protein structural changes on a proteome-wide scale using limited proteolysis-coupled mass spectrometry [J]. *Nat Protoc*, 2017, 12: 2391-2410.
- [18] Feng Y, de Franceschi G, Kahraman A, et al. Global analysis of protein structural changes in complex proteomes [J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32: 1036-1044.
- [19] Piazza I, Beaton N, Bruderer R, et al. A machine learning-based chemoproteomic approach to identify drug targets and binding sites in complex proteomes [J]. *Nat Commun*, 2020, 11: 4200.
- [20] Piazza I, Kochanowski K, Cappelletti V, et al. A map of protein-metabolite interactions reveals principles of chemical communication [J]. *Cell*, 2018, 172: 358-372.
- [21] Cappelletti V, Hauser T, Piazza I, et al. Dynamic 3D proteomes reveal protein functional alterations at high resolution *in situ* [J]. *Cell*, 2021, 184: 545-559.
- [22] Pantoliano MW, Petrella EC, Kwasnoski JD, et al. High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery [J]. *J Biomol Screen*, 2001, 6: 429-440.
- [23] 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: 2100-2122.
- [24] Savitski MM, Reinhard FBM, Franken H, et al. Tracking cancer drugs in living cells by thermal profiling of the proteome [J]. *Science*, 2014, 346: 1255784.
- [25] Zainab N, Seong BA, Mark SB, et al. Mass spectrometry-based protein identification in proteomics-a review [J]. *Brief Bioinform*, 2021, 22: 1620-1638.
- [26] Franken H, Mathieson T, Childs D, et al. Thermal proteome profiling for unbiased identification of direct and indirect drug targets using multiplexed quantitative mass spectrometry [J]. *Nat Protoc*, 2015, 10: 1567-1593.
- [27] Mateus A, Määttä TA, Savitski MM. Thermal proteome profiling: unbiased assessment of protein state through heat-induced stability changes [J]. *Proteome Sci*, 2016, 15: 13.
- [28] Reinhard FBM, Eberhard D, Werner T, et al. Thermal proteome profiling monitors ligand interactions with cellular membrane proteins [J]. *Nat Methods*, 2015, 12: 1129-1131.
- [29] Peck Justice SA, McCracken NA, Victorino JF, et al. Boosting detection of low-abundance proteins in thermal proteome profiling experiments by addition of an isobaric trigger channel to TMT multiplexes [J]. *Anal Chem*, 2021, 93: 7000-7010.
- [30] Gaetani M, Sabatier P, Saei AA, et al. Proteome integral solubility alteration: a high-throughput proteomics assay for target deconvolution [J]. *J Proteome Res*, 2019, 18: 4027-4037.
- [31] Liu YK, Chen HY, Chueh PJ, et al. A one-pot analysis approach to simplify measurements of protein stability and folding kinetics [J]. *BBA-Proteins Proteom*, 2019, 1867: 184-193.
- [32] Cabrera A, Wiebelhaus N, Quan B, et al. Comparative analysis of mass-spectrometry-based proteomic methods for protein target discovery using a one-pot approach [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2019, 31: 217-226.
- [33] Lyu J, Ruan C, Zhang X, et al. Microparticle-assisted precipitation screening method for robust drug target identification [J]. *Anal Chem*, 2020, 92: 13912-13921.
- [34] Ruan CF, Ning WH, Liu Z, et al. Precipitate-supported thermal proteome profiling coupled with deep learning for comprehensive screening of drug target proteins [J]. *ACS Chem Biol*, 2022, 17: 252-262.
- [35] Ball KA, Webb KJ, Coleman SJ, et al. An isothermal shift assay for proteome scale drug-target identification [J]. *Commun Biol*, 2020, 3: 75.
- [36] West GM, Tucker CL, Xu T, et al. Quantitative proteomics approach for identifying protein-drug interactions in complex mixtures using protein stability measurements [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107: 9078-9082.

- [37] West GM, Tang L, Fitzgerald MC. Thermodynamic analysis of protein stability and ligand binding using a chemical modification-and mass spectrometry-based strategy [J]. *Anal Chem*, 2008, 80: 4175-4185.
- [38] Sun J, Prabhu N, Tang J, et al. Recent advances in proteome-wide label-free target deconvolution for bioactive small molecules [J]. *Med Res Rev*, 2021, 41: 2893-2926.
- [39] Geer MA, Fitzgerald MC. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* ATP-interactome using the iTRAQ-SPROX technique [J]. *J Am Soc Mass Spectr*, 2015, 27: 233-243.
- [40] Walker EJ, Bettinger JQ, Welle KA, et al. Global analysis of methionine oxidation provides a census of folding stabilities for the human proteome [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116: 6081-6090.
- [41] Geer Wallace MA, Kwon DY, Weitzel DH, et al. Discovery of manassantin A protein targets using large-scale protein folding and stability measurements [J]. *J Proteome Res*, 2016, 15: 2688-2696.
- [42] Xu Y, Falk IN, Hallen MA, et al. Mass spectrometry- and lysine amidination-based protocol for thermodynamic analysis of protein folding and ligand binding interactions [J]. *Anal Chem*, 2011, 83: 3555-3562.
- [43] Xu Y, Strickland EC, Fitzgerald MC. Thermodynamic analysis of protein folding and stability using a tryptophan modification protocol [J]. *Anal Chem*, 2014, 86: 7041-7048.
- [44] Meng H, Ma R, Fitzgerald MC. Chemical denaturation and protein precipitation approach for discovery and quantitation of protein-drug interactions [J]. *Anal Chem*, 2018, 90: 9249-9255.
- [45] Yan W, Feng Q, Li Y, et al. Integrated network pharmacology and DSS-induced colitis model to determine the anti-colitis effect of *Rheum palmatum* L. and *Coptis chinensis* Franch in granules [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 300: 115675.
- [46] Zhong Y, Lee K, Deng Y, et al. Arctigenin attenuates diabetic kidney disease through the activation of PP₂A in podocytes [J]. *Nat Commun*, 2019, 10: 4523.
- [47] Cassiano C, Esposito R, Tosco A, et al. Chemical proteomics-guided identification of a novel biological target of the bioactive neolignan magnolol [J]. *Front Chem*, 2019, 7: 53.
- [48] Asaturo 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: 16735.
- [49] Lai Y, Han T, Zhan S, et al. Antiviral activity of isoimperatorin against influenza A virus *in vitro* and its inhibition of neuraminidase [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 657826.
- [50] Zhang J, Zhou Y, Li N, et al. Curcumin overcomes TRAIL resistance of non-small cell lung cancer by targeting NRH: quinone oxidoreductase 2 (NQO2) [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2020, 7: 2002306.
- [51] Wan YJ, Guo Q, Liu D, et al. Protocatechualdehyde reduces myocardial fibrosis by directly targeting conformational dynamics of collagen [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 855: 183-191.
- [52] Wang J, Wu J, Li X, et al. Identification and validation nucleolin as a target of curcumin in nasopharyngeal carcinoma cells [J]. *J Proteomics*, 2018, 182: 1-11.
- [53] Liu DD, Luo P, Gu L, et al. Celastrol exerts a neuroprotective effect by directly binding to HMGB1 protein in cerebral ischemia-reperfusion [J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18: 174.
- [54] Dong Y, Zhu G, Wang SF, et al. Toosendanin, a novel potent vacuolar-type H⁺-translocating ATPase inhibitor, sensitizes cancer cells to chemotherapy by blocking protective autophagy [J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18: 2684-2702.
- [55] Jin Y, Yoon YJ, Jeon YJ, et al. Geranylgeraniol (CG902) inhibits constitutive and inducible STAT3 activation through the activation of SHP-2 tyrosine phosphatase [J]. *Biochem Pharmacol*, 2017, 142: 46-57.
- [56] Yoon YJ, Kim YH, Lee YJ, et al. 2'-Hydroxycinnamaldehyde inhibits proliferation and induces apoptosis *via* signal transducer and activator of transcription 3 inactivation and reactive oxygen species generation [J]. *Cancer Sci*, 2019, 110: 366-378.
- [57] Tu S, Mao D, Shi M, et al. Icaritin ameliorates extracellular microparticles-induced inflammatory pre-metastatic niche *via* modulating the cGAS-STING signaling [J]. *Phytother Res*, 2022, 36: 2127-2142.
- [58] Zhao SY, Liao LX, Tu PF, et al. Icaritin inhibits AGE-induced injury in PC12 cells by directly targeting apoptosis regulator bax [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 7940808.
- [59] Geng J, Liu W, Gao J, et al. Andrographolide alleviates Parkinsonism in MPTP-PD mice *via* targeting mitochondrial fission mediated by dynamin-related protein 1 [J]. *Br J Pharmacol*, 2019, 176: 4574-4591.
- [60] Zhang XW, Feng N, Wang LC, et al. Small-molecule arone protects from neuroinflammation in LPS-activated microglia BV-2 cells by targeting histone-remodeling chaperone ASF1a [J]. *Biochem Pharmacol*, 2020, 177: 113932.
- [61] Huang R, Zhang L, Jin J, et al. Bruceine D inhibits HIF-1 α -mediated glucose metabolism in hepatocellular carcinoma by blocking ICAT/ β -catenin interaction [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11: 3481-3492.
- [62] Wu X, Liu L, Zheng Q, et al. Protocatechualdehyde protects cardiomyocytes against ischemic injury *via* regulation of nuclear pyruvate kinase M₂ [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11: 3553-3566.
- [63] Yu J, Zhang L, Peng J, et al. Dictamnine, a novel c-Met inhibitor, suppresses the proliferation of lung cancer cells by downregulating the PI3K/AKT/mTOR and MAPK signaling pathways [J]. *Biochem Pharmacol*, 2022, 195: 114864.
- [64] Chen WW, Gong KK, Yang LJ, et al. *Scutellaria barbata* D. Don extraction selectively targets stemness-prone NSCLC cells by attenuating SOX2/SMO/GLI1 network loop [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 265: 113295.