

基于活性的蛋白质组学在靶点鉴定和药物发现中的应用

牛乐, 胡梦蝶, 汪 蒨, 张彦萍, 朱东盛
(南京医科大学药学院, 南京 211166)

[摘要] 尽管近年来靶点鉴定和药物发现领域取得了重要进展,但目前仍缺乏有效的疾病治疗靶点。与此同时,在过去几十年里,每年获批的新分子实体数量急剧下降,如何更好地进行药物发现仍有很大的改进空间。基于活性的蛋白质组学分析(activity-based protein profiling, ABPP)是一种直接在真实生物环境中研究复杂蛋白质组功能的化学蛋白质组学方法,主要通过使用化学探针标记蛋白质活性位点的氨基酸残基,被广泛用于靶点鉴定和药物发现。本文总结了ABPP的设计策略,并介绍了ABPP技术在靶点鉴定和药物发现领域的相关应用实例。

[关键词] 基于活性的蛋白质组学;探针;靶点鉴定;药物发现

[中图分类号] R965.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)16-1629-07

Applications of activity-based protein profiling in target identification and drug discovery

NIU Le, HU Meng-die, WANG Lin, ZHANG Yan-ping, ZHU Dong-sheng
(School of Pharmacy, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China)

[Abstract] While significant advancements have been made in recent years in target identification and drug discovery, there is a general lack of validated targets for diseases. In the meantime, the number of new molecular entities approved per year has dramatically declined over the past decades. There is still much room for further improvement to optimize the drug discovery process. Activity-based protein profiling (ABPP) is a chemical proteomic method for functional investigation of complex proteomes directly in native biological systems. ABPP is widely used for target identification and drug discovery by using chemical probes that label active site residues in proteins. This review summarizes the design strategy of ABPP and introduces the related applications of ABPP technology in the field of target identification and drug discovery.

[Key words] activity-based protein profiling; probes; target identification; drug discovery

新药开发极具挑战性,成功上市一款新药需要花费近14年的时间,研发成本大约在9~28亿美元^[1]。传统的药物发现策略主要有基于表型的药

物发现(phenotypic drug discovery)和基于靶点的药物发现(target-based drug discovery)。基于表型的药物发现一般是在建立好的细胞或动物模型上对化合物库中的分子进行筛选,以获得具有特定药效的化合物(见图1)。基于表型的药物发现无法提供活性分子的作用靶标信息,这阻碍了对活性化合物的构效关系研究及潜在不良反应的分析。基于靶点的药物发现是针对某一个与疾病机制高度相关的特定靶点,有针对性地筛选出活性化合物分子(见图1)^[2]。

[基金项目] 国家自然科学基金项目(22107051);江苏省高校自然科学基金研究项目(21KJB350003)

[作者简介] 牛乐,女,硕士研究生,研究方向:药物化学。E-mail: 13773044101@163.com。

[通讯作者] 朱东盛,男,副教授,硕士生导师,研究方向:小分子药物研发及化学蛋白质组学。E-mail: zhuds@njmu.edu.cn。

通过此方法筛选获得的化合物可能影响多种蛋白及信号通路,而不仅是一个靶标蛋白或通路。由于筛选到的化合物分子对单个靶点的调节与生物个体治

疗方法相关性较差,化合物分子在进入体内后不一定能到达靶点所在位置,这种不确定性极大限制了新药研发进程。



图1 药物发现流程

人类基因组计划成功揭示了2万个人类基因,大约编码了50万个蛋白质^[3],但目前发现的有效药物靶点仅600多个。传统的靶点利用基因芯片技术、基因敲除技术、反义寡核苷酸技术、RNA干扰技术、蛋白芯片技术、亲和色谱等技术在基因水平、转

录水平和蛋白水平进行靶标发现和验证^[4](见图2),但存在发现周期长、假阳性等问题。同时由于缺乏有效、灵敏的生化筛选方法,很多疾病相关的靶点仍是未知的。

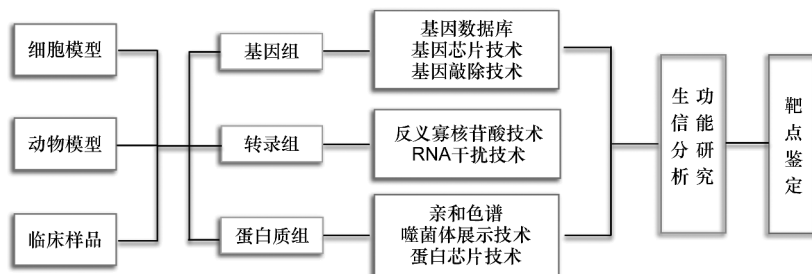


图2 传统靶点鉴定流程

20世纪90年代,Benjamin F. Cravatt和Matthew Bogoy创建了一种能够在全蛋白质组范围内直接表征活性分子与蛋白质相互作用的分析方法^[5],即基于活性的蛋白质组学分析(activity-based protein profiling, ABPP)。ABPP技术已经成为化学蛋白质组学研究极为重要的一部分,其核心是运用活性导向的探针分子在复杂生物样品中特异性地对靶标蛋白进行标记。与传统的蛋白质组学分析技术不同,ABPP的优势在于可以在特定病理或生理过程中对整个蛋白质组进行研究^[6],无需预先纯化生物样品,活性探针能够在细胞、组织或疾病模型中与相应靶点蛋白发生作用,为靶标鉴定和药物发现提供了强有力的支持^[7-8]。

1 ABPP技术的原理及基本工作流程

ABPP技术的核心是设计活性导向的探针分子。探针分子主要由三部分组成,分别是反应基团、

报告基团和连接子。反应基团首先与相应靶标蛋白结合,进而通过报告基团检测或富集蛋白质。报告基团可通过多种方法可视化所标记的蛋白质组。常用的报告基团为荧光团和亲和标签^[9],荧光团有荧光素、罗丹明、CY3/CY5等,亲和标签则主要为生物素。荧光团标记的蛋白通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后进行凝胶荧光扫描检测蛋白(见图3a和图3b)。亲和标签标记的蛋白被特异性富集,通过免疫印迹法检测或者液相色谱串联质谱联用(liquid chromatography-mass spectroscopy/mass spectroscopy, LC-MS/MS)分析探针分子标记的蛋白质身份以及确认结合位点^[10]。传统的报告基团一般体积较大,影响探针分子的透膜性以及蛋白的结合力,且探针对蛋白的标记不是在活细胞中进行,无法反映真实情况下探针和蛋白的相互作用。随着生物正交化学技术的不断发展,传统体积庞大的报

告基团逐渐被正交反应基团如端炔或者叠氮取代,蛋白被探针分子捕捉后通过“点击”(click)反应等方法连接上荧光团或亲和标签(见图 3c 和图 3d)^[11]。

常用的连接子有脂肪链或 PEG 链,其主要功能是为反应基团与报告基团提供充分的空间距离、有利于靶标结合、减少非特异性结合等。

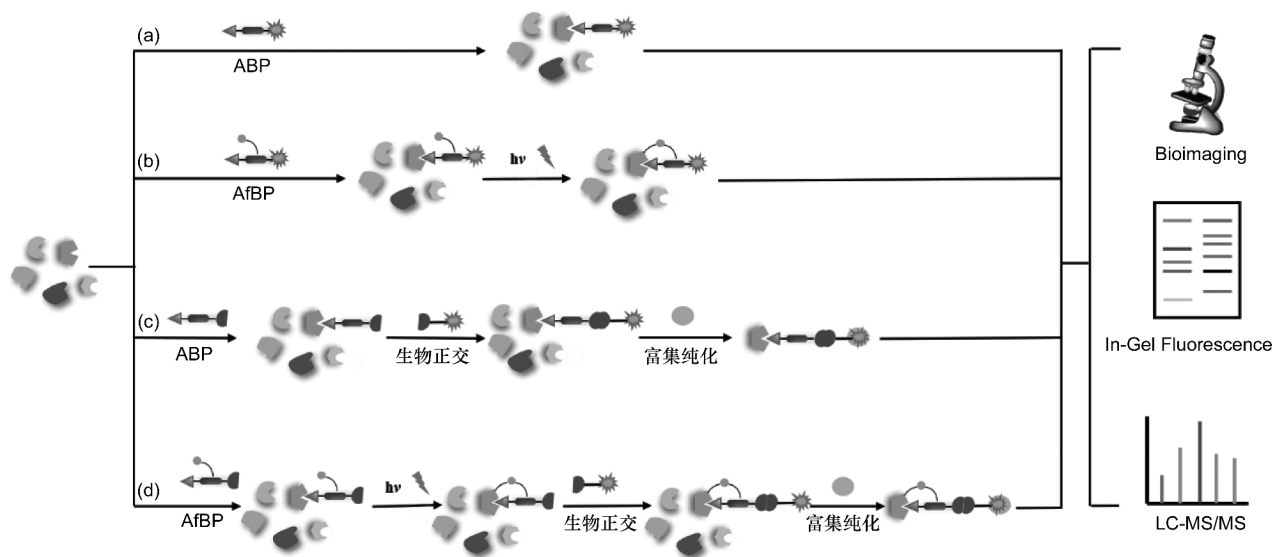


图 3 ABPP 的基本工作流程

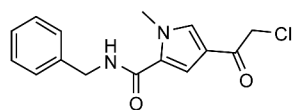
按照蛋白与小分子探针相互作用类型不同,探针可以分为基于活性的探针分子(activity-based probes, ABPs)和基于亲和性的探针分子(affinity-based probes, AFBPs)。基于活性的探针分子能够与靶标蛋白的亲核氨基酸残基(如半胱氨酸、赖氨酸、丝氨酸等)发生共价结合,这类探针分子的反应基团通常含有亲电基团,可以与靶标蛋白的活性位点共价结合^[12]。对于无法进行共价修饰的蛋白,需要开发与 ABPs 靶向方式不同的探针。光交联基团在紫外光照射下会产生高能自由基,继而与蛋白形成共价键。含有光交联基团的探针分子被称为“基于亲和性的探针”(AFBPs)^[13-15](见图 3d)。常用的光交联剂有偶氮丙啶、苯甲酮、芳基叠氮化合物等^[16]。

2 ABPP 技术的应用

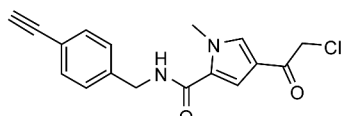
2.1 ABPP 技术在靶点鉴定中的应用 药物靶点的鉴定可以建立活性药物与细胞表型之间的联系,阐明药物的作用机制。ABPP 技术可以在复杂生物

环境中直接鉴定标记的蛋白以及潜在的功能位点。下文对具体实例进行介绍。

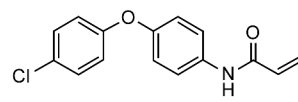
去泛素酶(deubiquitinases, DUBs)是一类催化泛素(ubiquitin, Ub)水解的蛋白酶家族,发挥调节蛋白质降解的功能,充分了解 DUBs 在细胞中的生物功能对开发新型靶向治疗药物至关重要。Ward 等^[17]通过高通量筛选发现了系列 DUB 抑制剂,以化合物 **1**(见图 4)作为苗头化合物设计合成的带有炔基的化合物 **2**(见图 4)作为活性分子探针用于研究靶标蛋白。胶内荧光扫描(in-gel fluorescence)结果显示化合物 **1** 能够剂量依赖性地减弱探针标记的蛋白条带强度。质谱分析发现化合物 **2** 在人骨肉瘤细胞中标记了 12 种泛素特异性蛋白酶(ubiquitin-specific protease, USP),这些 USPs 在 P53 信号通路、癌症转移及中枢缺氧中扮演重要的角色。化合物 **2** 为探索 DUB 酶家族的生物学功能及 DUB 抑制剂的作用机制提供了有力的分析工具。



化合物1



化合物2



DKM3-30

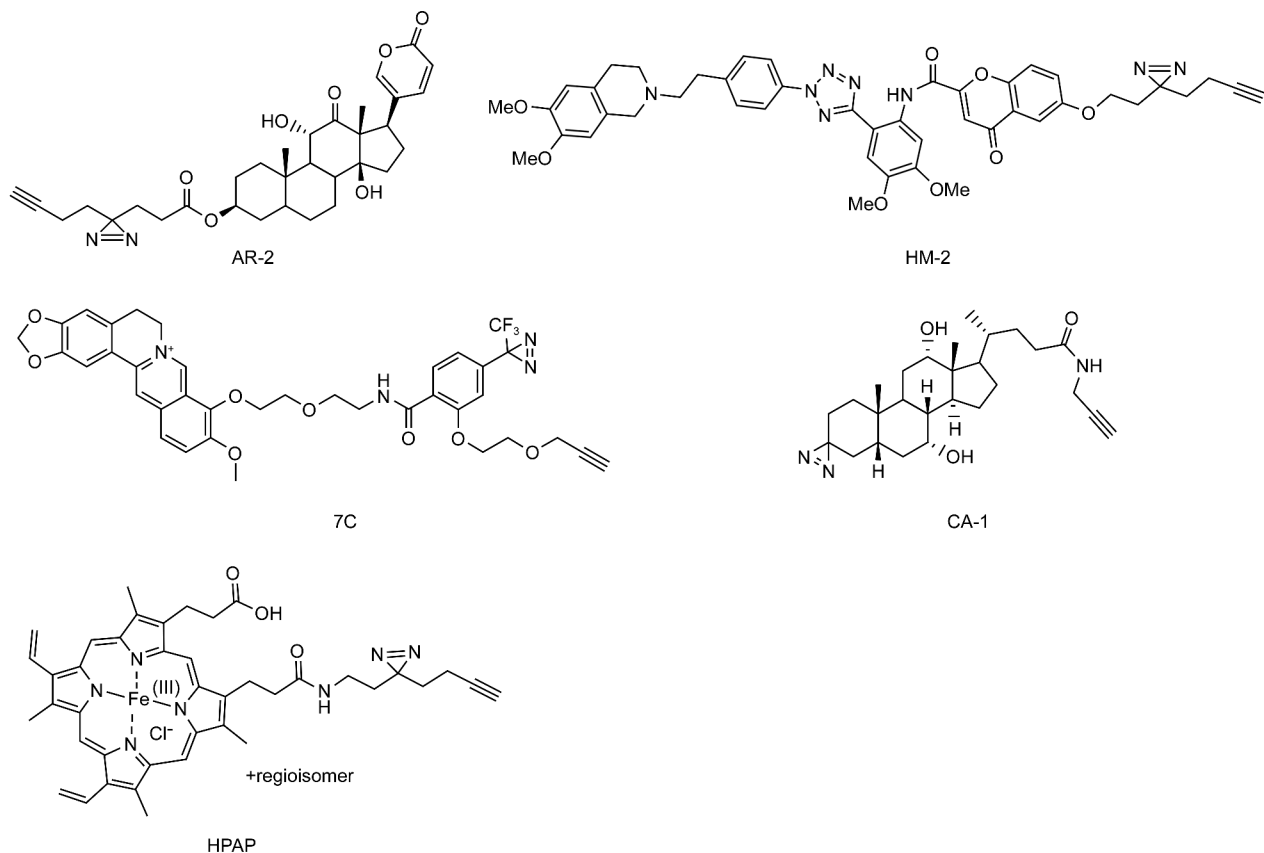


图4 靶点鉴定实例中涉及化合物及探针分子

为了能够更有效地筛选出治疗结直肠癌的新靶点, Bateman 等^[18]利用半胱氨酸反应性共价片段库, 在 SW620 结直肠癌细胞系中进行化合物筛选, 获得含有丙烯酰胺的化合物 DKM3-30 (见图 4), 该化合物能够明显抑制 SW620 结直肠癌细胞的增殖。接着通过同位素标记串联正交蛋白水解-ABPP (isotopic tandem orthogonal proteolysis-ABPP, isoTOP-ABPP) 寻找化合物 DKM3-30 的直接作用靶标, 分别使用 DMSO 和化合物 DKM3-30 处理 SW620 细胞, 然后使用通用型半胱氨酸反应性探针炔基碘乙酰胺 (IAyne) 与化合物竞争性结合靶标蛋白, 最后进行质谱分析, 结果表明 DKM3-30 共价修饰网状蛋白 4 (reticulon, RTN4) 的 C1101 位置。RTN4 是内质网管状网络形成的关键媒介, 其在结直肠癌中发挥的作用尚不明确, 该研究将共价配体化合物库的筛选与 isoTOP-ABPP 技术相结合, 开发了一个抗结直肠癌的丙烯酰胺类化合物 DKM3-30, 并鉴定出其靶点 RTN4。

沙地蟾蜍素具有抗癌作用, 但其作用靶点仍不明确。Ma 等^[19]基于沙地蟾蜍素设计了光亲和探针

AR-2 (见图 4), 将探针 AR-2 与 HeLa 细胞共培养, 经紫外照射激发光交联等操作, 进行 LC/MS-MS 验证及火山图分析鉴定出新的靶点, 分别为多聚 ADP 核糖聚合酶 1 [poly(ADP-ribose) polymerase 1, PARP1]、Ras 相关蛋白 Rab6A/6B/39A 及抗药蛋白 (sorcin, SRI)。通过免疫沉淀、免疫印迹和细胞热转移实验再次验证 PARP1 是沙地蟾蜍素的直接作用靶点, 通过小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 转染实验发现, PARP1 的敲低明显降低了沙地蟾蜍素的抗增殖活性, 因此证明了 PARP1 是沙地蟾蜍素新的功能性靶标。

HM30181 是第 3 代 P-糖蛋白多药耐药基因抑制剂, 临床试验发现其具有一定毒性和不良反应, 可能与其脱靶效应有关。为鉴定 HM30181 在细胞中潜在的作用靶标, Ma 等^[19]基于 HM30181 设计合成了含炔基的光交联探针 HM-2 (见图 4), 探针与细胞孵育后用紫外光照射, 经过 LC-MS/MS 鉴定出 ATP 结合蛋白亚家族 1 (ATP-binding cassette sub-family B member 1, ABCB1) 是 HM-2 的靶蛋白之一。其他可能的靶标包括核仁蛋白 (nucleolar protein 2, NOP2)、

三磷酸腺苷依赖解旋酶 DDX5 (ATP-dependent RNA helicase DDX5)、内质网高尔基中间区室 1 (endoplasmic reticulum golgi intermediate compartment 1, ERGIC1)、Rab6A/6B 和钙黏蛋白 (cadherin, UCDH), 这些靶标与肿瘤的发生、侵袭、增殖和转移等密切相关。

中药小檗碱 (berberine, BRR) 能够抑制 c-JNK 激酶 (c-Jun N-terminal protein kinases) 磷酸化从而缓解免疫相关症状, 但是 BRR 在 JNK 信号通路中的直接作用靶标蛋白未知, 为了探究 BRR 在与 JNK 相关疾病中的作用靶标, Zeng 等^[20] 基于小檗碱开发了光亲和性探针 7C (见图 4), 经过 LC/MS-MS 分析发现 41 种蛋白被探针标记, 作者优先研究了 JNK 通路上游蛋白丝裂原激活蛋白激酶 7 (mitogen-activated protein kinase 7, MSP2K7), 通过 Pull down 实验及竞争性 ABPP 实验, 证明了 BRR 与 MSP2K7 具有相互作用。

胆汁酸是一类具有重要生理作用的内源性代谢物, 可以防止肠道菌群过度生长, 具有抗菌作用, 然而部分致病病原体仍能在胆汁酸应激下存活, 对于其耐受胆汁酸的作用靶点和机制还不明确, Liu 等^[21] 基于初级胆汁酸 (cholic acid, CA) 设计合成光交联探针 CA-1 (见图 4), 将其与细菌蛋白质组共孵育, 通过 ABPP 实验发现, CA-1 标记的蛋白质被 CA 显著竞争。通过对标记的蛋白进行富集、酶解、稳定同位素二甲基化定量标记及质谱检测, 鉴定出 587 个与 CA 相互作用的蛋白, 对这些蛋白进行基因本体 (gene ontology, GO) 生物学数据分析发现组氨酸激酶可能与细菌耐受胆汁酸有关。继而利用基因敲除等实验发现组氨酸激酶 EnvZ 敲除的大肠杆菌在胆汁酸的作用下存活能力显著减弱, 当外源补充组氨酸激酶 EnvZ, 细菌耐受胆汁酸的能力得到恢复, 证明了组氨酸激酶可能是细菌耐受胆汁酸的关键蛋白靶标。

血红素是人类细胞中的关键辅助因子, 参与血液中氧气的转运, 血红素作为一种信号分子, 一般通过与伴侣蛋白结合来传递信号, 但是目前血红素的结合蛋白并不完全清楚。Homan 等^[22] 基于血红素设计了光亲和性探针 HPAP (见图 4), 通过 SDS-PAGE 方法评估了 HPAP 对细胞内蛋白的标记能力, 发现探针 HPAP 对蛋白的标记具有浓度依赖性, 并且标记的蛋白可以被血红素有效竞争, 说明探针

HPAP 能够很好地标记血红素结合蛋白。接着通过 ABPP 实验在 HEK293T, K562 以及原代 PBMCs 这 3 种细胞系中鉴定了 378 个血红素特异性结合蛋白。其中 19 个蛋白已经被 Uniport 数据库标注为血红素作用蛋白。作者选取了其中 6 个结合蛋白通过免疫沉淀实验进一步确证了血红素结合蛋白, 并发现血红素是其中一个靶蛋白白细胞介素-1 受体相关激酶 1 (interleukin-1 receptor-associated kinase 1, IRAK1) 的变构激活配体, 可以显著激活 IRAK1 的酶活性。该研究加深了人们对血红素信号调节功能的理解, 为血红素在疾病治疗中提供了新的思路。

2.2 ABPP 技术在药物发现中的应用 ABPP 技术另外一个重要应用是药物筛选。与传统的药物筛选方法相比, ABPP 技术无需分离纯化靶标蛋白, 可以在复杂的生物样品中进行蛋白质标记, 有利于筛选出特异性较高的活性分子。利用 ABPP 等技术, 小分子化合物通过与靶标蛋白的活性位点结合, 竞争性阻断/加强活性探针分子对靶标蛋白的标记, 使探针标记信号减弱/增强, 从而筛选出对靶标蛋白具有抑制或者激活作用的活性小分子化合物。该方法不仅适用于已知的靶标蛋白, 还适用于未知靶标蛋白。通过 ABPP 策略发现先导化合物的方法已经被广泛使用。下文对具体实例进行介绍。

蛋白水解靶向嵌合体技术 (proteolysis-targeting chimeras, PROTAC) 是一种利用泛素-蛋白酶体系统降解靶标蛋白的药物发现策略, 该技术用 E3 泛素连接酶的配体来募集 E3 泛素连接酶进而使靶标蛋白泛素化^[23]。在 600 多种 E3 泛素连接酶中仅有部分 E3 泛素连接酶的小分子配体被开发出来, 如泊马度胺、来那度胺等。其中 E3 泛素连接酶环指蛋白 4 (ring finger protein 4, RNF4) 能够识别类泛素化修饰 (SUMOylated) 的蛋白, 而目前仍没有 RNF4 的小分子配体被开发出来。Ward 等^[24] 利用基于凝胶的 ABPP 技术从半胱氨酸共价分子库筛选靶向配体。通过使用碘乙酰胺-罗丹明 (IA-rhodamine) 标记法发现了几个苗头化合物, 其中化合物 TRH 1-23 (见图 5) 具有较高的选择性。通过构效关系研究获得 TRH 1-23 的类似物 CCW 16 (见图 5), 并以 CCW 16 作为 RNF4 的配体连接溴结构域蛋白 4 (bromodomain-containing protein 4, BRD4) 抑制剂 JQ-1 母核设计合成了相应的 PROTAC 降解剂, 该降解剂在 231MFP 乳腺癌细胞能够有效降解 BRD4 蛋白。

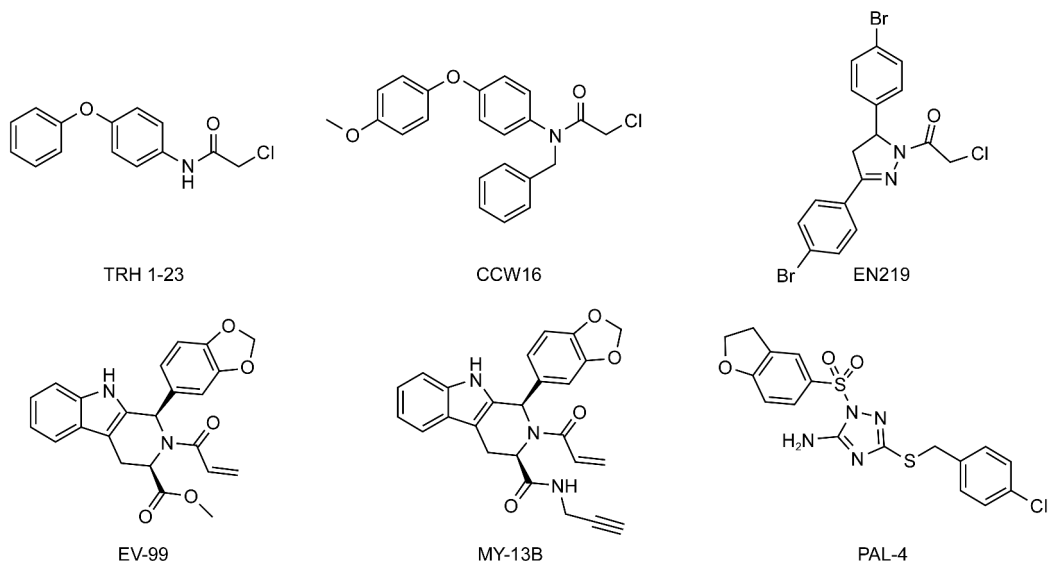


图 5 药物发现实例中涉及的化合物及探针分子

抗癌天然产物 nimbolide 能够与 E3 泛素连接酶环指蛋白 114 (ring finger protein 114, RNF114) 半胱氨酸位点 C8 发生共价反应,因此可作为 RNF114 的配体应用于蛋白降解,但由于其分子量较大、化学稳定性较差、合成修饰困难等缺点,限制了其进一步的应用。Luo 等^[25]开发了一类结构简单且具有类药性的骨架作为 nimbolide 的模拟物。首先以重组 RNF114 蛋白为模型,通过基于凝胶的竞争性 ABPP 技术对 318 个具有半胱氨酸反应活性的配体进行筛选,发现含有氯乙酰胺官能团的 EN219 (见图 5) 能够最大限度地竞争碘乙酰胺-罗丹明 (IA-rhodamine) 探针与 RNF114 的结合。EN219 与重组 RNF114 蛋白共孵育后经 LC-MS/MS 分析发现 EN219 能够共价结合在 RNF114 的 C8 位点上。通过竞争性 isoTOP-ABPP 实验验证了 EN219 在 231MFP 细胞中与 RNF114 的 C8 位点结合。EN219 作为靶向 E3 连接酶 RNF114 的新型共价配体,骨架简单,能够模拟复杂天然产物 nimbolide 的功能。

Toll/白细胞介素受体结构域的蛋白 1 (sterile alpha toll/interleukin receptor motif containing-1, SARM1) 是一种烟酰胺腺嘌呤二核苷酸水解酶 (nicotinamide adenine dinucleotide hydrolase, NADase),能够调控轴突变性,是针对神经退行性疾病的重要靶点^[26]。Feldman 等^[27]通过基于质谱的 ABPP 策略对具有立体选择性的亲电化合物文库进行筛选,发现了化合物 EV-99 (见图 5) 是 SARM1 的共价抑制剂,且与 SARM1 的 C311 位点结合。接着合成了 EV-99 的炔

基化探针 MY-13B (见图 5) 及其对映异构体的炔基探针,并结合突变位点等实验证明了 EV-99 对 C311 具有位点特异性和立体选择性。通过凝胶 ABPP 实验进一步发现活性更佳化合物 MY-9B 和 WX-02-37。本研究通过多种 ABPP 技术发现了 SARM1 全新的变构共价调节剂,为变构抑制剂的发现奠定了基础。

溶血磷脂类酶 1 (lysophospholipase-like 1, LYPLAL1) 是丝氨酸水解酶家族的成员之一,研究发现 LYPLAL1 的缺失可能会影响葡萄糖的产生,导致代谢功能障碍,因此开发能够激活 LYPLAL1 的药物对治疗代谢性疾病具有重要意义。氟磷酸 (fluorophosphate, FP) 探针是广谱丝氨酸水解酶的共价配体, Kok 等^[28]利用带有罗丹明标签的 FP 探针从化合物库中进行分子筛选,发现化合物 PAL-4 (见图 5) 具有激活 LYPLAL1 的潜在作用。为进一步验证 PAL-4 在细胞中的选择性,利用 FP 炔基探针考察 PAL-4 在 HepG2 细胞的结合情况,质谱结果表明 PAL-4 对 LYPLAL1 的结合具有选择性,而对其他 49 种丝氨酸水解酶没有结合作用。PAL-4 是第 1 个被报道的使用 ABPP 技术发现的酶激动剂,对发现其他酶家族激动剂具有重要的指导意义。

3 总结与展望

ABPP 技术是新兴的化学蛋白质组学方法之一,它是基于活性的探针分子在复杂生物体系中探究活性分子与靶标蛋白的相互作用以及考察靶蛋白在生理、病理以及药理过程中发挥的功能^[29]。ABPP 不

仅应用于识别和鉴定靶标蛋白及结合位点,而且也用于先导化合物的筛选与发现。但是 ABPP 技术目前也存在一些挑战。首先, A β FP 探针上的光交联基团激发后会与邻近的任一蛋白发生非特异性交联,所以构建特异性且标记效率高的活性探针分子是 ABPP 技术有待解决的关键问题^[30]。其次, ABP 探针分子能够共价修饰蛋白活性位点的亲核氨基酸残基如半胱氨酸,但仍迫切需要开发更多能够选择性修饰亲核性较弱的氨基酸残基如组氨酸、色氨酸的活性探针分子。同时,细胞内各种复杂的生理活动及细胞对外界环境的反应主要是以蛋白质之间的相互作用为纽带,然后形成复杂的信号转导网络系统,蛋白质相互作用与多种疾病如肿瘤、神经退行性疾病、免疫疾病等的发生发展密切相关,目前 ABPP 技术对蛋白复合物相互作用方面的标记还存在不足。最后,利用 ABPP 技术研究的靶点大多数是蛋白质,针对其他重要靶点如 RNA 和 DNA 等, ABPP 技术目前应用较少。我们相信随着蛋白质组学技术的快速发展, ABPP 技术作为有效的分析手段将更广泛地应用于靶点鉴定和药物发现领域中。

[参 考 文 献]

- [1] SIMOENS S, HUYS I. R&D costs of new medicines: a landscape analysis[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2021, 8: 760762.
- [2] 丁娇丽, 张志鹏, 刘婧, 等. 基于组蛋白去乙酰化酶设计的多靶点抗肿瘤药物研究进展[J]. *中国新药杂志*, 2021, 30(3): 236-245.
- [3] LOVELL JT, GRIMWOOD J. The first complete human genome[J]. *Nature*, 2022, 606(7914): 468-469.
- [4] 张晓磊, 张文博, 胡良海. 药物靶标蛋白筛选的化学蛋白质组学研究进展[J]. *中国科学: 生命科学*, 2018, 48(2): 160-170.
- [5] LIU Y, PATRICELLI MP, CRAVATT BF. Activity-based protein profiling: the serine hydrolases[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(26): 14694-14699.
- [6] 周怡青, 肖友利. 活性天然产物靶标蛋白的鉴定[J]. *化学学报*, 2018, 76(3): 177-189.
- [7] 袁枝花, 于潇, 段雅迪, 等. 蛋白质组学在中药作用靶点研究中的方法和应用[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(5): 1034-1038.
- [8] 朱月, 董曦, 王姗, 等. 活性蛋白质组技术应用于中药活性分子靶点的研究进展[J]. *药物评价研究*, 2020, 43(4): 779-784.
- [9] 王初, 陈南. 基于活性的蛋白质组分析[J]. *化学学报*, 2015, 73(7): 657-668.
- [10] BENNS HJ, WINCOTT CJ, TATE EW, et al. Activity- and reactivity-based proteomics: recent technological advances and applications in drug discovery[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2021, 60: 20-29.
- [11] 李根, 曹世杰, 张继超, 等. 点击化学在中药活性成分靶点鉴定中的应用进展[J]. *中草药*, 2019, 50(4): 984-991.
- [12] TAMURA T, HAMACHI I. Chemistry for covalent modification of endogenous/native proteins: from test tubes to complex biological systems[J]. *J Am Chem Soc*, 2019, 141(7): 2782-2799.
- [13] GAO CL, HOU GG, LIU J, et al. Synthesis and target identification of benzoxepane derivatives as potential anti-neuroinflammatory agents for ischemic stroke[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2020, 59(6): 2429-2439.
- [14] ZHU DS, GUO HJ, CHANG Y, et al. Cell- and tissue-based proteome profiling and dual imaging of apoptosis markers with probes derived from venetoclax and idasanutlin[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2018, 57(30): 9284-9289.
- [15] CHANG Y, ZHU DS, GUO HJ, et al. Crenolanib-derived probes suitable for cell- and tissue-based protein profiling and single-cell imaging[J]. *Chem Bio Chem*, 2019, 20(14): 1783-1788.
- [16] 孙瑞, 高银佳, 史海斌. 光交联技术的生物应用研究进展[J]. *中国光学*, 2018, 11(3): 444-458.
- [17] WARD JA, MCLELLAN L, STOCKLEY M, et al. Quantitative chemical proteomic profiling of ubiquitin specific proteases in intact cancer cells[J]. *ACS Chem Biol*, 2016, 11(12): 3268-3272.
- [18] BATEMAN LA, NGUYEN TB, ROBERTS AM, et al. Chemo-proteomics-enabled covalent ligand screen reveals a cysteine hotspot in reticulon 4 that impairs ER morphology and cancer pathogenicity[J]. *Chem Commun (Camb)*, 2017, 53(53): 7234-7237.
- [19] MA N, ZHANG ZM, LEE JS, et al. Affinity-based protein profiling reveals cellular targets of photoreactive anticancer inhibitors[J]. *ACS Chem Biol*, 2019, 14(12): 2546-2552.
- [20] ZENG QX, WEI W, FAN TY, et al. Capture and identification of dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 7 as a direct proteomic target of berberine to affect the c-JunN-terminal kinase pathway[J]. *CCS Chem*, 2022, 4(5): 1535-1544.
- [21] LIU BW, ZHUANG ST, TIAN RZ, et al. Chemoproteomic profiling reveals the mechanism of bile acid tolerance in bacteria[J]. *ACS Chem Biol*, 2022, 17(9): 2461-2470.
- [22] HOMAN RA, JADHAV AM, CONWAY LP, et al. A chemical proteomic map of heme-protein interactions[J]. *J Am Chem Soc*, 2022, 144(33): 15013-15019.
- [23] 梁倩倩, 曹亚权, 杨鹏, 等. PROTACs 靶向蛋白质降解技术及其在合理药物设计中的应用[J]. *中国新药杂志*, 2019, 28(4): 442-450.
- [24] WARD CC, KLEINMAN JI, BRITAIN SM, et al. Covalent ligand screening uncovers a RNF4 E3 ligase recruiter for targeted protein degradation applications[J]. *ACS Chem Biol*, 2019, 14(11): 2430-2440.
- [25] LUO M, SPRADLIN JN, BOIKE L, et al. Chemoproteomics-enabled discovery of covalent RNF114-based degraders that mimic natural product function[J]. *Cell Chem Biol*, 2021, 28(4): 559-566. e15.
- [26] 陈锐, 周非非. 轴突退变与退行性脊髓型颈椎病发病机制的相关研究进展[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2022, 32(6): 558-563.
- [27] FELDMAN HC, MERLINI E, GUIJAS C, et al. Selective inhibitors of SARM1 targeting an allosteric cysteine in the autoregulatory ARM domain[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2022, 119(35): e2208457119.
- [28] KOK BP, GHIMIRE S, KIM W, et al. Discovery of small-molecule enzyme activators by activity-based protein profiling[J]. *Nat Chem Biol*, 2020, 16(9): 997-1005.
- [29] 王玉团, 邢晨. 基于蛋白质组学技术的半夏和水半夏的研究与分析[J]. *中国现代应用药学*, 2021, 38(14): 1708-1711.
- [30] 郭建军, 周文, 苏文俏. 质谱在蛋白质生物标志物发现中的应用策略[J]. *中国现代应用药学*, 2022, 39(23): 3183-3188.

编辑:蒋欣欣/接受日期:2022-11-03