

凌小雅, 孙娜, 孙盼盼, 等. 中药作用靶点发现技术研究进展[J]. 山西农业科学, 2025, 53(6): 1-10.

LING X Y, SUN N, SUN P P, et al. Research advances in target discovery technologies for traditional Chinese medicine[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2025, 53(6): 1-10.

doi:10.26942/j.cnki.issn.1002-2481.2025.06.01

中药作用靶点发现技术研究进展

凌小雅, 孙娜, 孙盼盼, 杨惠珍, 钟佳, 张振彪, 张华, 孙耀贵, 李宏全

(山西农业大学 动物医学学院/中兽医现代化山西省重点实验室, 山西 晋中 030801)

摘要: 中药及其活性成分以其广泛的生物活性和安全有效的治疗潜力, 已成为现代药物研发的关键资源, 展现出多组分、多靶点、多途径协同作用的独特优势。然而, 从药物研发到临床应用的过程是漫长的, 其主要原因之一是药物靶点及作用机制不明确, 其严重制约了中药的现代化和国际化进程。中药直接作用靶点的识别和鉴定, 对于理解中药作用机制、优化药物配伍和推进基于中药活性成分的创新药物研发至关重要。目前, 已发展出多种药物靶点鉴定方法, 包括基于标记策略的分子靶点“钩钩”技术、蛋白质芯片技术, 以及免标记的细胞热位移技术(CETSA)、热蛋白质组分析技术(TPP)、网络药理学等, 这些技术的协同应用不仅大幅提升了中药靶点鉴定的效率和准确性, 更为阐释中药“多成分-多靶点-多途径”的作用模式提供了系统解决方案。文章对近5 a常用及新建立的中药靶点发现技术进行整理归纳, 并对其未来发展趋势、技术融合创新以及在推动中药现代化与国际化中的应用前景进行展望。

关键词: 中药; 活性成分; 靶点发现; 标记法; 非标记法

中图分类号: S853.74 文献标识码: A 文章编号: 1002-2481(2025)06-0001-10

Research Advances in Target Discovery Technologies for Traditional Chinese Medicine

LING Xiaoya, SUN Na, SUN Panpan, YANG Huizhen, ZHONG Jia,

ZHANG Zhenbiao, ZHANG Hua, SUN Yaogui, LI Hongquan

(Shanxi Key Laboratory for Modernization of TCVM/College of Veterinary Medicine,

Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030801, China)

Abstract: Traditional Chinese medicine and its active ingredients have become the key resources for modern drug research and development due to their extensive biological activities and safe and effective therapeutic potential, showing the unique advantages of multi-component, multi-target, and multi-channel synergy. However, the process from drug development to clinical application is long. One of the main reasons is that the drug target and mechanism of action are not clear, which seriously restricts the modernization and internationalization of traditional Chinese medicine. The identification of direct targets of traditional Chinese medicine is crucial for understanding the mechanism of action of traditional Chinese medicine, optimizing drug compatibility, and promoting the development of innovative drugs based on active ingredients of traditional Chinese medicine. To date, various methods for drug target identification have been developed, including label-based techniques such as molecular target “fishing” strategies and protein chip technique, as well as label-free methods like cellular thermal shift assay (CETSA), thermal proteome profiling (TPP), drug affinity responsive target stability (DARTS), limited proteolysis mass spectrometry (LiP-MS), stability of proteins by reduction of oxidation (SPROX), target-responsive accessibility profiling (TRAP), network pharmacology, molecular docking, and molecular dynamics simulation. The synergistic application of these

收稿日期: 2025-07-13

基金项目: 国家重点研发计划(2022YFD1801101); 国家自然科学基金面上项目(32172904); 山西省高等学校青年学术带头人项目(2024Q009); 山西省科技创新人才团队专项(202204051001021)

作者简介: 凌小雅, 博士, 主要从事中兽医现代化研究, E-mail: 18735430346@163.com

通信作者: 李宏全, 教授, 博士生导师, 主要从事中兽医现代化研究, E-mail: livets@163.com

technologies not only greatly improves the efficiency and accuracy of target identification of traditional Chinese medicine but also provides a systematic solution to explain the "multi-component-multi-target-multi-pathway" mode of action of traditional Chinese medicine. In this paper, commonly used and newly established techniques for TCM target discovery in the recent 5 years were reviewed and summarized.

Keywords: traditional Chinese medicine; active ingredients; target discovery; labeling methods; label-free methods

中药作为中华民族的传统医学瑰宝,具有多成分、多靶点、多途径的作用特点。药物靶点是药物与生命体内生物大分子的直接结合部位,药物一般是通过作用于这些生物大分子并调控这些分子的生物学功能,进而发挥疾病预防和治疗的作用^[1]。然而,中药及其活性成分的靶点表征和机制解析一直是制约其现代化发展的瓶颈。中药靶点机制解析是一个复杂且耗时的过程,通常包括中药功能表型分析、中药靶点发现、结合靶点验证以及调控靶点机制研究,逐级深入,其中,中药靶点的发现是锁定药物作用机制的关键一步。

近年来,随着化学生物学、蛋白质组学、网络药理学等技术的快速发展,中药作用靶点的发现技术取得了显著进展,包括基于标记法的靶点垂钓、非标记靶点鉴定技术及网络药理学等,为揭示

中药及其活性成分的作用机制和推动中药国际化提供了重要支持。

1 基于标记法的中药靶点发现策略

基于标记法的中药靶点发现技术是一种系统性识别和验证药物作用目标的方法,该方法通过将中药活性小分子与可检测标签偶联,从而在复杂的生物样本中特异性地标记和捕获潜在的靶点蛋白^[2]。这些探针通常设计为与已知药物具有相似的结合特性,能够在生理条件下与靶蛋白相互作用。随后,通过亲和纯化、质谱分析等技术,可以鉴定这些被标记的蛋白质。这种方法不仅有助于理解中药的作用机制,还能揭示未知的中药靶点,从而加速新药开发过程。技术总结流程图见图 1。

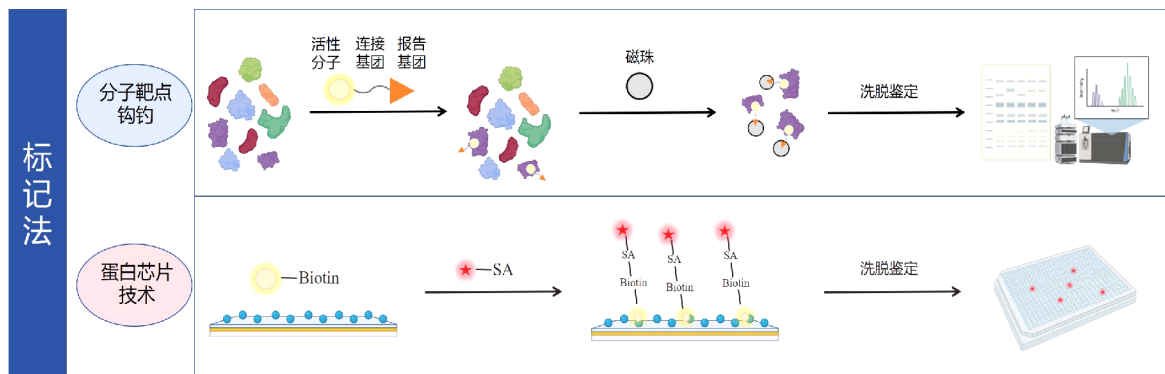


图 1 基于标记法的中药靶点发现

Fig.1 Target discovery of traditional Chinese medicine based on labeling methods

1.1 分子靶点“钩钓”技术

分子靶点“钩钓”技术是识别药物靶点的重要手段之一,应用十分广泛,发展相对成熟。基于药物分子可与蛋白质发生特异性结合的原理,将药物分子连接上报告标签作为“钩钓”探针,利用探针在复杂的蛋白体系中(如细胞裂解液或组织提取物)捕获靶蛋白,进而富集靶蛋白至固相微球表面,使之得以分离、纯化、鉴定^[1]。

该技术经典的工作流程包括探针的设计与合成、靶点富集和蛋白质鉴定。其中,探针的设计与

合成是该技术的核心,也是靶点鉴定的首要步骤。通常情况下,探针由 3 部分组成,即活性基团、报告基团和连接基团,其中活性基团来自母体药物分子,应保持药理活性和结合蛋白质靶点的能力;报告基团用于靶点富集和检测,目前常用的报告标签包括生物素、荧光基团等;连接基团用于连接活性基团和报告基团^[3]。合成的探针应满足如下条件:一是探针应保留药物分子的药理活性,以确保后续靶点识别的准确性;二是探针应便于靶点识别与富集^[3]。将符合条件的小分子探针与细胞裂

解液进行孵育用于靶点结合,然后利用报告基团的特性检测和富集靶蛋白,利用凝胶电泳和高分辨质谱等方法进行蛋白鉴定,最后,设计表面等离子共振(SPR)、微量热泳动(MST)等实验验证靶点信息,并通过干扰、过表达等适当的生物学功能实验验证相应的药理作用。这种以活性小分子探针为核心的靶点发现技术也称为基于活性的蛋白质组(Activity-based protein profiling, ABPP)。

基于ABPP法已成功对多个中药活性小分子的作用靶点进行了研究。白术内酯Ⅱ能够改善肥胖诱导的胰岛素抵抗,ZHENG等^[4]设计合成生物素标记白术内酯Ⅱ探针,将探针与肝细胞裂解液一起孵育,之后通过链霉亲和素磁珠进行富集,通过LC-MS/MS进行蛋白质鉴定,确定124种蛋白质为潜在靶点,其中,引入竞争性结合的策略,在探针与裂解液孵育前加入白术内酯Ⅱ竞争性结合靶蛋白,与探针组相比,58种蛋白质被白术内酯Ⅱ竞争,DGKQ在124种蛋白质中质谱强度最高,且与探针的结合被白术内酯Ⅱ显著抑制,MST测定二者结合解离常数为 $(1.75 \pm 1.21) \mu\text{mol/L}$,证实了白术内酯Ⅱ直接靶向DGKQ,白术内酯Ⅱ激活DGKQ酶活性及AMPK/PGC1 α /UCP-1来促进体质量减轻。生物素标记药物后基于生物素与链霉亲和素的亲和力富集靶蛋白实现了靶蛋白的直接获取与纯化,通过竞争性ABPP的策略,大大降低假阳性率。小檗碱直接靶向NEK7蛋白,并特异性阻断NEK7-NLRP3相互作用发挥抗炎活性^[5],芹菜素直接靶向PRDX6,抑制HSPA8激活并干扰其与衰老细胞中ATM和p38MAPK的相互作用,减少衰老细胞对组织稳态的影响^[6]。

随着生物正交化学的发展,研究者将点击化学(Click chemistry)的概念引入到药物靶点鉴定研究中,利用点击化学反应(叠氮-炔烃环加成反应)的高度选择性和高效性来标记和识别与药物相互作用的蛋白质或其他生物分子^[7]。以结构简单的炔烃或叠氮基修饰药物小分子合成探针,与生物样本中的靶蛋白共价结合,加入含互补基团(叠氮基或炔烃)的报告分子(如荧光标签、生物素)进行原位标记,通过亲和层析(如链霉亲和素磁珠)分离靶点复合物,结合质谱鉴定靶点蛋白。WEI等^[8]引入炔烃基团设计合成了5种葫芦素B探针以探究葫芦素B抗结膜黑色素瘤的作用靶点,通过抗增殖活性检测,选择与葫芦素B效果相近的BP-2

进行靶点富集,并使用无活性的BP-4作为阴性对照,使用葫芦素B进行竞争性结合,将探针加入到结膜黑色素瘤细胞中以结合靶蛋白,裂解细胞后加入新鲜预混的点击化学反应混合物,包含生物素-N₃和CuSO₄,进行点击化学反应,然后通过链霉亲和素小量制备柱亲和层析富集靶蛋白,硝酸银染色结构显示75 ku处存在蛋白质富集,筛选LC-MS/MS分析(阴性=0, BP-2>CuB)及免疫荧光与BP-2细胞定位一致的GRP78作为候选靶点,进行结合验证和功能验证,证实葫芦素B靶向抑制GRP78-FOXO1-KIF20A通路诱导结膜黑色素瘤细胞周期停滞。应用点击化学靶点发现策略,LI等^[9]揭示了咖啡酸通过共价靶向ACOD1抑制PERK-NF- κ B通路改善神经炎症的机制,ZHAO等^[10]揭示了小白菊内酯通过靶向USP10抑制细胞增殖的抗乳腺癌机制。

此外,将中药活性小分子偶联到固相载体也可以实现药物靶点的“钩钩”。ZENG等^[11]制备了偶联松果菊苷的环氧树脂珠以富集靶点,发现松果菊苷靶向改构CK2,通过Wnt/ β -catenin依赖性机制促进线粒体融合。中兽医现代化山西省重点实验室前期合成野黄芩苷磁纳米亲和探针,通过垂钓确定了野黄芩苷抗ZEA致小鼠颗粒细胞凋亡的作用靶点为Wnt5a, SER90是野黄芩苷与Wnt5a结合的关键位点,通过体内外试验证实野黄芩苷靶向Wnt/ β -catenin信号通路调控ZEA诱导的卵巢损伤^[12];利用生物素标记苦参碱活性探针发掘了苦参碱抗PRRSV的靶点HSPA8、HSP90AB1等^[13]及苦参碱抗犬乳腺肿瘤的靶点BTF3等^[14]。

1.2 蛋白质芯片技术

蛋白质芯片(Protein chip)由载体和载体蛋白组成,可直接用于检测药物小分子与靶点蛋白相互作用的芯片,在高通量研究小分子与蛋白相互作用方面展现出了巨大的潜力。基于蛋白质芯片研究药物靶点的基本思路是在芯片上固定不同种类的重组蛋白,将含有药物分子的样品溶液与芯片孵育,通过荧光标记或其他检测手段确定与药物小分子结合的蛋白质信息,最终发现潜在的药物靶点。MA等^[15]研究证实,芍药苷可减轻 α -萘基异硫氰酸酯诱导的胆汁淤积模型中的肝损伤,利用生物素标记的芍药苷处理HuProt™人类蛋白质组微阵列芯片发现了芍药苷与GSDMD的高亲和

力,揭示了芍药苷可通过直接结合 GSDMD 来抑制细胞焦亡。ZHAO 等^[16]将生物素标记的野黄芩苷与 HuProt™ 人类蛋白质组芯片孵育,然后利用 Cy5-链霉亲和素(Cy5-SA)来鉴定野黄芩苷的潜在蛋白靶点,发现野黄芩苷可结合 IDH1 增强其酶活性,抑制肿瘤细胞中的糖酵解,激活免疫调节,发挥抗肝癌作用。但由于蛋白芯片表面已完全脱离细胞环境,表征的仅是药物分子与蛋白质之间的纯粹简单的化学作用,后续还需依托细胞、动物试验进行确证。

2 非标记中药靶点发现技术

非标记中药靶点发现技术的核心在于直接识别并表征生物系统中的活性分子,而无需依赖外源性的标记物,主要基于活性小分子通过高亲和力与靶点蛋白结合后使靶点蛋白的理化性质发生变化的原理^[17]。这些技术不仅能够更真实地反映药物与靶点之间的相互作用,还能减少因标记过程带来的假阳性或假阴性结果,从而提高筛选的准确性。技术总结流程见图 2。

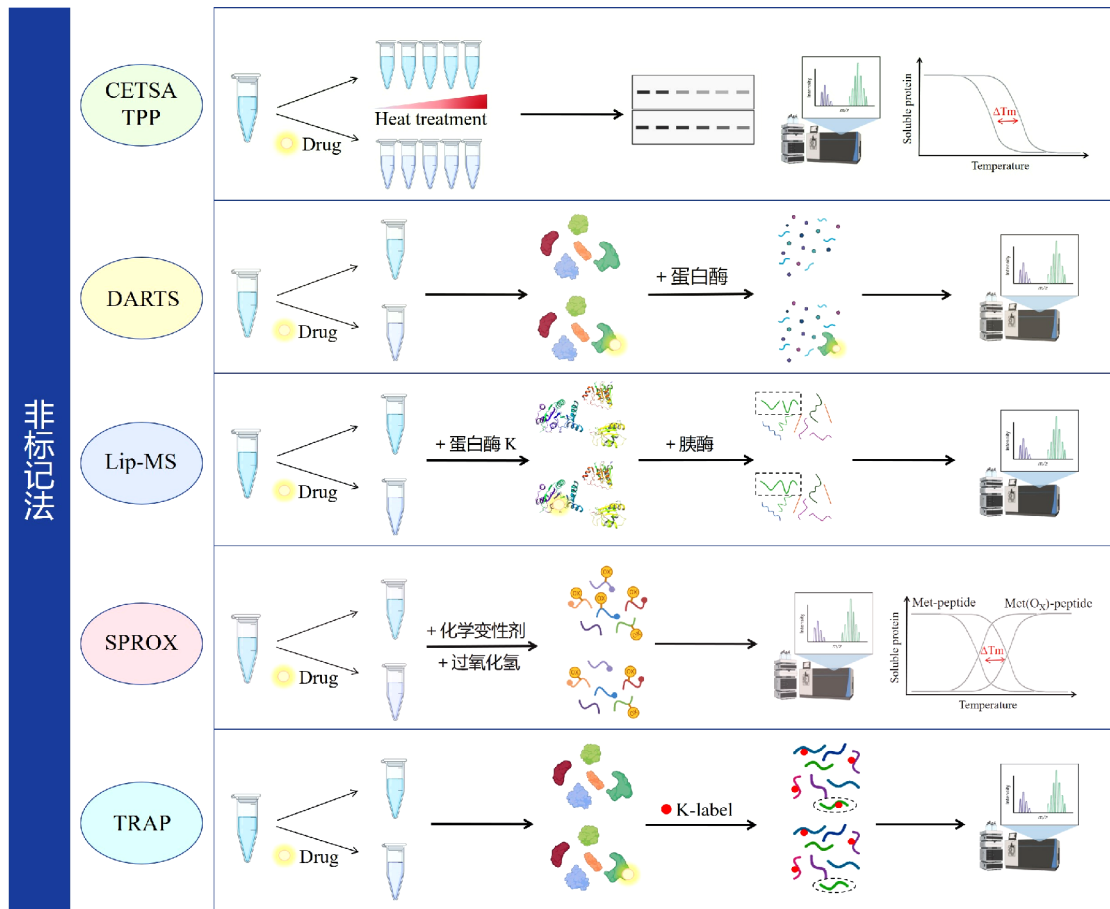


图 2 非标记的中药靶点发现

Fig.2 Label-free target discovery of traditional Chinese medicine

2.1 基于热稳定性的 CETSA 和 TPP 策略

MOLINA 等^[18]基于配体诱导的靶点蛋白热稳定性改变原理开发出细胞热位移技术(Cellular thermal shift assay, CETSA),当药物与靶蛋白结合时,会改变蛋白的构象稳定性,使其对热变性的抵抗能力增强,热变性曲线右移(即“热位移”);通过加热使未结合药物的蛋白变性沉淀,而药物结合的蛋白因稳定性提高仍保持可溶状态,通过定

量可溶性蛋白的残留量,推断药物与靶点的结合。基于 Western blot 的 CETSA 实验流程包括:药物处理细胞、细胞裂解、加热以变性和沉淀蛋白、离心去除变性蛋白、收集可溶性蛋白进行凝胶电泳、Western blot 印迹分析^[19]。该方法操作简单、成本低,在常规分子生物学实验室即可完成,但是,基于 Western blot 的 CETSA 方法只能鉴定或者确证少数已知的靶蛋白,不适合大规模的靶点筛选,因

此,CETSA常联合其他靶点发现技术对药物靶点进行确证,或联合质谱技术来检测大量蛋白质的热稳定性变化,即热蛋白质组分析(Thermal proteome profiling, TPP)^[20],亦称MS-CETSA技术。

ZHANG等^[21]利用TPP技术鉴定藤黄酸诱导前列腺癌细胞焦亡的靶点,将细胞裂解液在65℃加热3min,检测蛋白质组相对丰度,与DMSO对照组相比,藤黄酸处理组1038个蛋白质丰度升高,其中,CNPY3蛋白表现出较高的热稳定性,随后用SPR、MST证明了CNPY3是藤黄酸的细胞靶点,该蛋白对于藤黄酸诱导的DU145细胞焦亡至关重要。XU等^[22]经TPP技术检测发现,白术内酯1处理后,PSMD4蛋白热稳定性增强,MST证实二者具有高亲和力,白术内酯1以PSMD4依赖性方式促进免疫蛋白酶体的活性,促进抗原递呈并增强结直肠癌免疫治疗的疗效。TPP方法表明,雷公藤内酯通过与HnRNP A2/B1的潜在相互作用来调节肿瘤细胞活性^[23];瑞香苷A通过与细胞分裂周期蛋白42相互作用阻断经典的促纤维化 β -catenin信号通路,从而发挥抗肾纤维化的作用^[24]。

2.2 药物亲和反应靶点稳定性技术(DARTS)

药物亲和反应靶点稳定性技术(Drug affinity responsive target stability, DARTS)的原理是药物与靶蛋白的特异性结合改变蛋白构象,从而保护靶蛋白免受蛋白酶水解,药物与靶蛋白结合后,加入蛋白酶消化,消化结束后,靶蛋白在药物处理组中的蛋白水平高于对照组。其一般步骤为:蛋白提取与定量、蛋白与药物小分子孵育、蛋白酶消化、终止反应、电泳分离与染色、质谱检测^[25]。YUAN等^[26]为了解析黄芪甲苷II发挥神经保护作用的机制,使用DARTS法寻找黄芪甲苷II的靶点,将黄芪甲苷II与细胞裂解液室温孵育结合靶蛋白后,加入不同比例蛋白酶酶解处理,终止酶解反应后进行质谱鉴定,发现黄芪甲苷II处理导致蛋白酶对43~55ku的蛋白质进行差异消化,设定与不加药物处理组相比阈值 >1.5 的标准,筛选了5个潜在的膜蛋白靶点,差异最大的为p75NTR,通过亲和力测定和下游信号通路探究,证实黄芪甲苷II通过与p75NTR结合并抑制 β -catenin/Id2/MBP信号轴来增强OPCs分化和髓鞘再生。利用DARTS策略还鉴定出,苦豆碱抑制非小细胞肺癌细胞增殖的靶点为VPS4A^[27],乌头碱造成心脏毒

性的直接靶点为cPLA2^[28]。然而,DARTS对高亲和力和高丰度的药物结合有效,其灵敏度受到限制,是该技术的局限性之一。

2.3 有限酶切法(LiP-MS)

有限酶切结合质谱法(Limited proteolysis mass spectrometry, LiP-MS),简称有限酶切法,与DARTS相似,利用了小分子结合蛋白后蛋白酶敏感性降低的原理,其工作流程为非变性条件下提取蛋白、广谱性蛋白酶(如蛋白酶K)对蛋白-小分子复合物进行有限的蛋白酶切、终止酶解反应、胰酶酶解、终止酶解反应、质谱分析^[29]。LiP-MS技术最大的优点是在药物靶点发现的基础上可以提供小分子结合位点信息,在药物分子的结合下,靶蛋白在第1步限制性酶切的过程中因小分子位阻或构象变化被保留,经过第2次充分酶解,相较于未与药物结合的对照组,与药物结合区域有关的肽段能显示出丰度上的提升,这些肽段信息提供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^[30]。

ZHANG等^[31]通过LiP-MS研究杜鹃素促进同源重组修复的靶点,在存在、不存在杜鹃素处理的情况下,将蛋白酶K加入到细胞裂解液中,进行10min有限的蛋白水解以产生结构特异性的蛋白质片段,终止蛋白酶K的酶解反应后,加入胰蛋白酶消化16h完全消化,反应结束后进行质谱鉴定,10种蛋白质发生了显著变化,其中,蛋白PRKDC、UCHL3参与DNA修复的调节,通过SPR亲和力检测和CETSA的结合验证,确认UCHL3是杜鹃素的靶点,杜鹃素直接激活UCHL3,在体细胞核转移介导下促进DNA修复和重编程。CHEN等^[32]利用LiP-MS法确定了二氢硫辛酰胺s-乙酰基转移酶Dlat是贯叶金丝桃素的直接分子靶点,贯叶金丝桃素通过Dlat-AMPK信号轴触发脂肪组织产热,从而抑制肥胖。YANG等^[33]应用LiP-MS技术发现虎杖苷可特异性靶向结合HSP90 α ,进而干扰HSP90 α -NLRP3相互作用,抑制NLRP3炎性小体的激活,发挥治疗急性胰腺炎和其他NLRP3相关炎症性疾病的潜力。

2.4 蛋白质氧化速率稳定性技术(SPROX)

蛋白质氧化速率稳定性(Stability of proteins by reduction of oxidation, SPROX)技术也是利用小分子结合诱导靶蛋白稳定性增强的原理,主要依赖于蛋白质中甲硫氨酸(Met)氧化的水平来测量蛋

白质的热力学稳定性。在一系列浓度的化学变性剂盐酸胍等的存在下,加入过氧化氢等氧化剂对 Met 进行氧化生成砷类,淬灭氧化反应后由蛋白组学定量分析含砷类肽段(反映了含有 Met 多肽的氧化程度),靶蛋白经过药物孵育结合后,展开暴露的 Met 数量相对较少,通过对比药物处理组与空白对照组中 Met 肽段的氧化水平来判断该肽段所属蛋白是否为药物的作用靶点^[34]。DEARMOND 等^[35]利用 SPROX 技术在酵母中成功鉴定了白藜芦醇的多个靶点,包括细胞溶质醛脱氢酶和与翻译相关的蛋白。但是,蛋白质的稳定性不限于氧化状态,试验中氧化还原的条件控制也较复杂。

2.5 靶标响应可及性分析 (TRAP)

靶标响应可及性分析 (Target-responsive accessibility profiling, TRAP) 是一项新兴的非标记药物靶点鉴定技术,由中国药科大学郝海平教授和叶慧研究员团队建立^[36]。其主要原理是:药物分子与靶蛋白结合后,由于空间位阻或变构效应,导致靶蛋白结合区域的活性赖氨酸残基的暴露程度(可及性)发生变化,使用甲醛(HCHO)和硼烷吡啶复合物共价标记暴露的赖氨酸残基,形成赖氨酸二甲基化(Dimethylation)修饰,通过质谱定量比较药物处理组与对照组的标记肽段丰度差异,筛选出因药物结合导致标记水平显著变化的肽段为候选靶点。为了阐明雷公藤红素缓解高脂饮食诱导的代谢综合征的机制,ZHU 等^[37]通过 TRAP 法发现雷公藤红素作用靶点,分别用雷公藤红素和 DMSO 处理细胞 1 h 后提取细胞蛋白,添加甲醛和硼烷吡啶复合物在室温下共价标记蛋白质赖氨酸残基,之后通过质谱鉴定赖氨酸二甲基化蛋白质水平,结果显示,雷公藤红素处理组腺苷酸环化酶相关蛋白 1(CAP1)蛋白强度显著降低,雷公藤红素与 CAP1 结合并抑制 CAP1 与抵抗素之间的相互作用,从而抑制 cAMP-PKA-NF- κ B 信号通路并改善高脂肪饮食诱导的小鼠代谢综合征。基于 TRAP 技术,环黄芪醇抗肿瘤的靶点被鉴定为 CTSB,环黄芪醇直接靶向 CTSB 减少肿瘤细胞上 MHC-I 的降解从而增强 CD8 T 细胞介导的抗肿瘤免疫,揭示了补气药黄芪“扶正抗癌”的科学内涵^[38];水飞蓟宾对抗铁死亡的靶点被鉴定为 ACSL4,通过抑制 ACSL4 酶活性,从而减轻 ACSL4 介导的铁死亡^[39];沙地蟾蜍素抗肿瘤的靶点被鉴定为 HSP90 β ,沙地蟾蜍素靶向降低

HSP90 β -STAT3-PD-L1 轴的活性,调节免疫发挥抗结肠癌的作用^[40]。

3 其他中药靶点发现技术

随着生物信息学和计算生物学的快速发展,网络药理学、分子对接、分子动力学模拟已成为药物靶点发现领域的重要工具。这一技术的核心概念是利用生物信息学、化学信息学和机器学习等方法,结合已知的化合物-靶点相互作用数据,构建预测模型以识别新的药物靶点或优化现有药物的靶向性。

3.1 网络药理学

网络药理学是一种基于系统生物学、基因组学、蛋白质组学等研究领域,通过计算分析与体内和体外试验相结合,整合大量信息,发现新药物靶点和分子机制的方法。在中药研究领域,网络药理学被应用于药物靶点预测、疾病基因预测、药物功能预测、中药成分网络构建以及药物-靶点-疾病网络构建与分析等^[41],适用于中药“多成分、多靶点、多通路”的复杂机制研究。2021 年,世界中医药学会联合会认证通过了《网络药理学评价方法指南》,利用网络药理学方法预测中药药效物质的基础和作用机制早已成为近年来研究的热点。

目前,许多研究都采用网络药理学和试验验证的方法阐释中药及中药活性成分的靶点和药理机制。郝江花等^[42]利用网络药理学数据库分别搜索了苦参碱的药物靶点和炎症的疾病靶点,取交集后构建蛋白相互作用网络(Protein-protein interaction, PPI),筛选得到 IGF I、MAPK8、CASP3、NR3C1 等为苦参碱抗炎的潜在靶点。吴雅琳等^[43]基于网络药理学研究思路,获得了中药苦参的抑菌活性成分网络,并预测了 32 个苦参抑菌潜在靶点,构建了“中药-成分-疾病-靶点”网络图,得出苦参主要通过槲皮素、木犀草素、刺芒柄花素等主要药效成分作用于 AKT1、TNF、TP53 等靶点,通过 IL-17、TNF、C 型凝集素受体等信号通路发挥抑菌作用。ZHAO 等^[44]利用网络药理学预测筛选得到了与分子靶点“钩钩”结果相同的 HSP 蛋白作为苦参碱抗 PRRSV 作用靶点,并进行了试验验证。WANG 等^[45]利用网络药理学方法结合动物试验解析了白藜芦醇靶向自噬信号通路中的 AMPK 缓解结晶二氧化硅致慢性肺部炎症和肺纤维化的机制。DU 等^[46]采用网络药理学分析黄芪苷与阿

尔兹海默症及神经炎症的关系,预测并证实了黄芪苷改善神经炎症的功效,解释了黄芪苷的多靶点机制,其中,COX2可能是其关键直接靶点。

3.2 分子对接和分子动力学模拟

分子对接(Molecular docking)和分子动力学模拟(Molecular dynamics simulation)是计算机药物设计中的两大核心技术,广泛应用于药物靶点预测、作用机制研究和先导化合物优化等领域。分子对接是一种基于结构的虚拟筛选方法,通过计算小分子化合物与靶点蛋白的结合模式和结合自由能,预测其潜在的相互作用^[47]。分子动力学模拟则是一种更为深入的计算方法,基于物理力场的计算方法,通过模拟蛋白质-配体复合物在原子水平上的动态行为,揭示其结合过程中的构象变化和能量变化^[48]。在网络药理学研究中,分子对接和分子动力学模拟常被用于验证药物与靶点蛋白的相互作用,为网络药理学提供分子水平的相互作用证据,增强预测结果的可信度,例如,通过分子对接,将网络药理学获取的双氢青蒿素治疗哮喘的172个潜在靶点群缩小至10个核心靶点^[49]。

高通量分子对接和分子动力学模拟也直接应

用于靶点筛选和新药研究。Fumigaclavine C(FC)是从红海榄茶饮真菌中分离筛选出来的一种天然活性吲哚生物碱具有降脂活性,为了筛选FC的作用靶点,高亚欣等^[50]选取调控肝脏脂质代谢途径中的蛋白作为受体进行分子对接,发现FC能靶向结合FABP1和CPT1蛋白,FABP1和CPT1可能是FC改善非酒精性脂肪肝病的作用靶点。

4 总结与展望

标记法具有高特异性的优势,借助药物活性探针可兼容复杂样本体系的靶点富集,使用组织样本能更接近体内环境,但其不足之处在于需要对药物或蛋白进行修饰,可能影响药物活性或靶点结合性能^[51];而非标记法解决了药物活性受影响的问题,但其依赖于靶蛋白稳定性改变、构象改变等理化性质的变化,容易受间接效应的干扰,同时很难排除药-靶复合体中其他蛋白的影响,假阳性率较高。表1列举了文章综述的中药靶点发现案例,表2总结比较了文章综述的各种中药靶点发现技术,选择合适的靶点筛选方法能够事半功倍。

表1 代表性中药靶点

Tab.1 Targets representing traditional Chinese medicine

中药活性成分 Active ingredients of traditional Chinese medicine	靶向领域 Targeting areas	靶点 Targets
白术内酯II Atractylenolide II	肥胖	DGKQ
小檗碱 Berberine	炎症相关疾病	NEK7
芹菜素 Apigenin	衰老	PRDX6
葫芦素B Cucurbitacin B	结膜黑色素瘤	GRP78
咖啡酸 Caffeic acid	癫痫	ACOD1
小白菊内酯 Parthenolide	乳腺癌	USP10
野黄芩苷 Scutellarin	卵巢损伤	Wnt5a
苦参碱 Matrine	猪繁殖与呼吸综合征	HSPA8、HSP90AB1
苦参碱 Matrine	犬乳腺肿瘤	BTF3
芍药苷 Paeoniflorin	肝损伤	GSDMD
野黄芩苷 Scutellarin	肝癌	IDH1
藤黄酸 Gambogic acid	前列腺癌	CNPY3
白术内酯I Atractylenolide I	结直肠癌	PSMD4
黄芪甲苷II Astragaloside II	神经保护	p75NTR
苦豆碱 Aloperine	非小细胞肺癌	VPS4A
杜鹃素 Farrerol	同源重组修复	UCHL3
贯叶金丝桃素 Hyperforin	肥胖	Dlat
虎杖苷 Polydatin	急性胰腺炎	HSP90α
雷公藤红素 Celastrol	高脂饮食诱导的代谢综合征	CAP1
水飞蓟宾 Silibinin	铁死亡	ACSL4

表 2 中药靶点鉴定技术比较

Tab.2 Comparison of traditional Chinese medicine target identification techniques

分类 Category	技术名称 Technical name	原理 Principle	优势 Advantages	不足 Shortcomings	适用范围 Applications
标记法 Labeling method	分子靶点“钩钩”技术	化学标记药物分子,结合靶蛋白后富集分析	高特异性,可直接捕获靶点	探针合成复杂,难以鉴定弱亲和力和靶点	小分子靶点鉴定;已知活性位点药物靶点鉴定;复杂样本中的靶点鉴定
标记法 Labeling method	蛋白质芯片技术	在芯片上固定多种靶点,通过检测结合反应进行分析	高通量	依赖蛋白固定化技术,假阳性率高	靶点初步筛选
非标记法 Label-free	细胞热位移技术 (CETSA)	通过热稳定性变化检测药物与靶点的结合	接近体内环境,流程简单	灵敏度低	细胞水平靶点鉴定
非标记法 Label-free	热蛋白质组分析 (TPP)	通过热稳定性变化检测药物与靶点的结合	接近体内环境,高通量	存在假阳性风险,成本高,设备昂贵	大规模靶点发现
非标记法 Label-free	药物亲和反应靶点稳定性技术(DARTS)	通过药物与靶点结合后的稳定性变化进行分析	成本低	特异性不高,易受其他因素影响	小分子药物靶点鉴定
非标记法 Label-free	有限酶切法 (Lip-MS)	通过酶切分析结合位点信息	高灵敏度,可指示结合位点信息	操作复杂,需高精度质谱分析	靶点结合位点研究;蛋白质-药物相互作用
非标记法 Label-free	蛋白质氧化速率稳定性技术(SPROX)	通过氧化速率变化分析药物与靶点的结合	高灵敏度	对氧化条件敏感	低丰度靶点鉴定
非标记法 Label-free	靶标响应可及性分析 (TRAP)	通过靶点构象改变致可及性变化分析药物与靶点的结合	高特异性	操作复杂,成本高	小分子药物靶点鉴定
其他 Other	网络药理学	通过计算模型分析药物与靶点的相互作用	高通量虚拟筛选,整合多组学数据	假阳性率高,依赖数据质量和算法模型	靶点预测和机制假设

靶点鉴定是一个复杂且耗时的过程,需要多层次、多角度相互佐证,可联合应用多种靶点发现技术提高靶点的可靠性。筛选出候选中药靶点后,仍需进行包括药-靶免疫荧光共定位、SPR或MST结合解离常数测定等结合检测。值得一提的是,CETSA-WB技术因其流程简单也被广泛应用于靶点结合的验证。靶点调控机制解析往往涉及酶活性检测、干扰、过表达、免疫沉淀等,结合下游信号通路的测定将靶点与表型关联。

中药具有多组分、多靶点、多途径的作用特点,现有的技术初步支撑了多靶点-多途径的机制解析,但尚不能完成靶点互作网络构建及多组分中药协同效应解析。鉴于天然产物在药物研发中的巨大潜力,未来需综合运用多种技术,推动多维度技术融合,如空间组学、AI动态模拟等,同时推动智能解析平台的建设,将中药靶点研究成果整合分析,推动实验-计算-实验-临床的闭环验证,实现用现代科学语言阐释中药的作用机制,从而推动现代科学技术与传统医学的结合,提升中药在全球医药领域的竞争力。

参考文献:

- [1] 曾克武,屠鹏飞. 中药作用靶点方法学研究进展[J]. 中国科学:化学,2018,48(11):1420-1428.
ZENG K W, TU P F. Recent progress on the methodology for target study of traditional Chinese medicine[J]. Scientia Sinica

Chimica,2018,48(11):1420-1428.

- [2] 魏君楠,戴建业. 中药活性成分直接作用靶点鉴定研究方法及应用[J]. 中草药,2021,52(17):5378-5388.
WEI J N, DAI J Y. Research method and application for identifying direct target of bioactive components from traditional Chinese medicine[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs,2021,52(17):5378-5388.
- [3] 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 Transduction and Targeted Therapy,2020,5:72.
- [4] ZHENG Z G, XU Y Y, LIU W P, et al. Discovery of a potent allosteric activator of DGKQ that ameliorates obesity-induced insulin resistance via the Sn-1, 2-DAG-PKCε signaling axis[J]. Cell Metabolism,2023,35(1):101-117.
- [5] ZENG Q X, DENG H B, LI Y H, et al. Berberine directly targets the NEK7 protein to block the NEK7-NLRP3 interaction and exert anti-inflammatory activity[J]. Journal of Medicinal Chemistry,2021,64(1):768-781.
- [6] 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]. Advanced Science,2025,12(20):2412950.
- [7] PARKER C G, PRATT M R. Click chemistry in proteomic investigations[J]. Cell,2020,180(4):605-632.
- [8] WEI J L, CHEN X, LI Y Y, et al. Cucurbitacin B-induced G2/M cell cycle arrest of conjunctival melanoma cells mediated by GRP78-FOXM1-KIF20A pathway[J]. Acta Pharmaceutica Sinica.B,2022,12(10):3861-3876.
- [9] LI G J, HUANG L, GU D, et al. Activity-based chemical proteomics reveals caffeic acid ameliorates pentylentetrazol-induced seizures by covalently targeting aconitate decarboxyl-

- ase 1[J]. *Cell Communication and Signaling*, 2025, 23(1):62.
- [10] ZHAO W S, CHEN K F, LIU M, et al. Investigation of targets and anticancer mechanisms of covalently acting natural products by functional proteomics[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2023, 44(8):1701-1711.
- [11] ZENG K W, WANG J K, WANG L C, et al. Small molecule induces mitochondrial fusion for neuroprotection *via* targeting CK2 without affecting its conventional kinase activity[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2021, 6:71.
- [12] SUN N, HASEEB A, SUN P P, et al. Scutellarin targets Wnt5a against Zearalenone-induced apoptosis in mouse granulosa cells *in vitro* and *in vivo*[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2024, 464:132917.
- [13] LING X Y, CAO Z G, SUN P P, et al. Target discovery of matrine against PRRSV in Marc-145 cells *via* activity-based protein profiling[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(14):11526.
- [14] FENG Z J, SUN N, NOOR F, et al. Matrine targets BTF3 to inhibit the growth of canine mammary tumor cells[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 25(1):540.
- [15] MA X, ZHANG W W, CHEN Y, et al. Paeoniflorin inhibited GSDMD to alleviate ANIT-induced cholestasis *via* pyroptosis signaling pathway[J]. *Phytomedicine*, 2024, 134:156021.
- [16] CUI Z, LI C F, LIU W, et al. Scutellarin activates IDH1 to exert antitumor effects in hepatocellular carcinoma progression [J]. *Cell Death & Disease*, 2024, 15:267.
- [17] FENG F, ZHANG W Y, CHAI Y F, et al. Label-free target protein characterization for small molecule drugs: recent advances in methods and applications[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2023, 223:115107.
- [18] MOLINA D M, JAFARI R, IGNATUSHCHENKO M, et al. Monitoring drug target engagement in cells and tissues using the cellular thermal shift assay[J]. *Science*, 2013, 341:84-87.
- [19] 王莉, 刘景芳, 李维林, 等. 基于细胞热漂移测定(CETSA)技术鉴定活细胞内药物靶标的标准操作流程[J]. *微生物学报*, 2023, 63(6):2488-2501.
- WANG L, LIU J F, LI W L, et al. A standard operating procedure for identification of drug targets in living cells based on cell thermal shift assay (CETSA)[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(6):2488-2501.
- [20] TU Y B, TAN L H, TAO H X, et al. CETSA and thermal proteome profiling strategies for target identification and drug discovery of natural products[J]. *Phytomedicine*, 2023, 116:154862.
- [21] ZHANG X W, LI L, LIAO M, et al. Thermal proteome profiling strategy identifies CNPY3 as a cellular target of gambogic acid for inducing prostate cancer pyroptosis[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2024, 67(12):10005-10011.
- [22] XU H C, VAN DER JEUGHT K, ZHOU Z L, et al. Atractylenolide I enhances responsiveness to immune checkpoint blockade therapy by activating tumor antigen presentation[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2021, 131(10):e146832.
- [23] CHEN P, ZHAO P C, HU M L, et al. HnRNP A2/B1 as a potential anti-tumor target for triptolide based on a simplified thermal proteome profiling method using XGBoost[J]. *Phyto-medicine*, 2023, 117:154929.
- [24] HU X R, GAN L, TANG Z W, et al. A natural small molecule mitigates kidney fibrosis by targeting Cdc42-mediated GSK-3 β / β -catenin signaling[J]. *Advanced Science*, 2024, 11(13):2307850.
- [25] 孙思彤, 王曼姝, 王硕, 等. 药物亲和靶蛋白稳定性筛选技术在中药成分靶点鉴定中的应用[J]. *沈阳药科大学学报*, 2023, 40(9):1236-1244.
- SUN S T, WANG M S, WANG S, et al. Application of drug affinity responsive target stability technology in target identification of traditional Chinese medicine components[J]. *Journal of Shenyang Pharmaceutical University*, 2023, 40(9):1236-1244.
- [26] YUAN J F, TAO Y L, WANG M X, et al. Astragaloside II, a natural saponin, facilitates remyelination in demyelination neurological diseases *via* p75^{NTR} receptor mediated β -catenin/Id2/MBP signaling axis in oligodendrocyte precursor cells[J/OL]. *Journal of Advanced Research*[2025-10-16]. DOI: 10.1016/j.jare.2025.04.028.
- [27] GUO W N, ZHOU H F, WANG J B, et al. Aloperine suppresses cancer progression by interacting with VPS4A to inhibit autophagosome-lysosome fusion in NSCLC[J]. *Advanced Science*, 2024, 11(31):2308307.
- [28] WEI J X, FAN S M, YU H X, et al. A new strategy for the rapid identification and validation of the direct targets of aconitine-induced cardiotoxicity[J]. *Drug Design, Development and Therapy*, 2021, 15:4649-4664.
- [29] 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.
- [30] 林园园, 喻金浩, 卢华秋, 等. 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[J]. *药学学报*, 2023, 58(5):1117-1127.
- LIN Y Y, YU J H, LU H Q, et al. Label-free target discovery technology of small molecule drug and its application in traditional Chinese medicines[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2023, 58(5):1117-1127.
- [31] ZHANG W N, WANG M Z, SONG Z W, et al. Farrerol directly activates the deubiquitinase UCHL3 to promote DNA repair and reprogramming when mediated by somatic cell nuclear transfer[J]. *Nature Communications*, 2023, 14:1838.
- [32] 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 Metabolism*, 2021, 33(3):565-580.e7.
- [33] YANG J S, JIAO C Y, LIU N N, et al. Polydatin-mediated inhibition of HSP90 α disrupts NLRP3 complexes and alleviates acute pancreatitis[J]. *Research*, 2024, 7:0551.
- [34] 马婕, 刘强. 无化学修饰的小分子药物靶蛋白鉴定技术及其应用进展[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(4):1131-1138.
- MA J, LIU Q. Identification techniques of small molecule drug target proteins without chemical modification and its applications: a review[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(4):1131-1138.
- [35] DEARMOND P D, XU Y, STRICKLAND E C, et al. Ther-

- modynamic analysis of protein-ligand interactions in complex biological mixtures using a shotgun proteomics approach[J]. *Journal of Proteome Research*, 2011, 10(11):4948-4958.
- [36] TIAN Y, WAN N, ZHANG H Q, et al. Chemoproteomic mapping of the glycolytic targetome in cancer cells[J]. *Nature Chemical Biology*, 2023, 19(12):1480-1491.
- [37] ZHU Y Y, WAN N, SHAN X N, et al. Celastrol targets adenylyl cyclase-associated protein 1 to reduce macrophage-mediated inflammation and ameliorates high fat diet-induced metabolic syndrome in mice[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2021, 11(5):1200-1212.
- [38] DENG G L, ZHOU L S, WANG B L, et al. Targeting cathepsin B by cycloastragenol enhances antitumor immunity of CD8 T cells *via* inhibiting MHC-I degradation[J]. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 2022, 10(10):e004874.
- [39] YAN W C, WANG D X, WAN N, et al. Living cell-target responsive accessibility profiling reveals silibinin targeting ACSL4 for combating ferroptosis[J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94(43):14820-14826.
- [40] SHANG Z H, FAN Y P, XI S Y, et al. Arenobufagin enhances T-cell anti-tumor immunity in colorectal cancer by modulating HSP90 β accessibility[J]. *Phytomedicine*, 2024, 128:155497.
- [41] ZHAO L, ZHANG H, LI N, et al. Network pharmacology, a promising approach to reveal the pharmacology mechanism of Chinese medicine formula[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2023, 309:116306.
- [42] 郝江花, 孙娜, 孙盼盼, 等. 基于网络药理学和分子对接分析苦参碱抗 PRRSV 的作用机制[J]. *畜牧兽医学报*, 2021, 52(3):809-819.
- HAO J H, SUN N, SUN P P, et al. A study on mechanism of matrine against PRRSV based on network pharmacology and molecular docking[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2021, 52(3):809-819.
- [43] 吴雅琳, 曹志刚, 孙盼盼, 等. 基于网络药理学研究苦参抑菌活性成分及其作用机制[J]. *动物营养学报*, 2023, 35(9):6055-6071.
- WU Y L, CAO Z G, SUN P P, et al. Network pharmacology study on antibacterial active ingredients and mechanism of *Sophora flavescens Radix*[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2023, 35(9):6055-6071.
- [44] ZHAO Y X, LING X Y, ZHANG H, et al. Network pharmacology and experimental validation to reveal the target of matrine against PRRSV[J]. *iScience*, 2023, 26(4):106371.
- [45] WANG Y H, LI N, HU J H, et al. A network pharmacology approach-based decoding of Resveratrol's anti-fibrotic mechanisms[J]. *Phytomedicine*, 2024, 135:156092.
- [46] DU R, PEI H Y, HE Z M, et al. Astragalin improves cognitive disorder in Alzheimer's disease: based on network pharmacology and molecular docking simulation[J]. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 2024, 30(8):e14799.
- [47] ZHANG B H, LI H, YU K Q, et al. Molecular docking-based computational platform for high-throughput virtual screening [J]. *CCF Transactions on High Performance Computing*, 2022, 4(1):63-74.
- [48] MILARDI D, PAPPALARDO M. Molecular dynamics: new advances in drug discovery[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2015, 91:1-3.
- [49] ZHANG J Y, LIN J T. Efficacy of artesunate in asthma: based on network pharmacology and molecular docking[J]. *Journal of Thoracic Disease*, 2023, 15(4):1658-1674.
- [50] 高亚欣, 伍慧红, 凌开兴, 等. 分子对接模拟筛选 Fumigaclavine C 改善非酒精性脂肪性肝病的作用靶点[J]. *广西科技大学学报*, 2025, 36(2):101-110.
- GAO Y X, WU H H, LING K X, et al. Molecular docking simulation screening of Fumigaclavine C targets for amelioration of non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Journal of Guangxi University of Science and Technology*, 2025, 36(2):101-110.
- [51] ZOU M J, ZHOU H Y, GU L T, et al. Therapeutic target identification and drug discovery driven by chemical proteomics[J]. *Biology*, 2024, 13(8):555.