生物质谱鉴定中药活性成分靶标蛋白质的研究进展

梁祖青^{1,2,3}, 罗群^{1,2,3}, 郑伟^{1,2}, 赵耀^{1,2}, 汪福意^{1,2,3,4*}

1. 中国科学院化学研究所, 北京 100190;

2. 北京分子科学国家实验室; 北京 100190;

3. 中国科学院大学化学科学学院, 北京 100049;

4. 北京质谱中心, 北京 100190

* 联系人, E-mail: fuyi.wang@iccas.ac.cn

收稿日期: 2017-07-19; 接受日期: 2017-09-16; 网络版发表日期: 2017-12-25

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2013CB513803)资助

摘要 传统中药具有毒副作用低, 药物资源广泛, 不易产生耐药性以及多靶点协同作用等优点. 然而, 中药临床应用中存在的作用物质基础不清, 药物吸收、分布和代谢途径不确定, 活性成分作用机制不明确等问题, 在很大程度上限制了中药进一步的临床应用. 因此, 发现和确认中药活性成分的作用靶标, 阐明中药活性成分的药效物质基础和分子作用机制是中药现代化研究中亟待解决的关键科学问题. 基于软电离技术的生物质谱具有高灵敏度、高特异性、高通量、低样品消耗等优势, 已成为现代药物发现领域药物靶标鉴定的有力工具, 在中药活性成分靶标鉴定中也得到越来越多的应用. 本文总结、评述近年来应用生物质谱分析新方法、新技术, 筛选鉴定中药活性成分靶标蛋白的最新研究进展, 旨在阐述生物质谱技术研究中中药活性成分作用机制的基本策略和取得的研究成果, 以期进一步促进生物质谱技术在中药现代化研究领域中的应用.

关键词 中药, 活性成分, 药物靶标蛋白, 生物质谱, 化学蛋白质组学

药物靶标是药物发挥治疗作用, 实现其临床疗效的生物大分子或特有的生物大分子结构域, 主要包括受体、酶、核酸、离子通道蛋白质、基因位点等^[1]. 一项上市药物数据统计表明, 蛋白质约占全部药物靶标的95%以上^[2]. 目前临床上应用的药物1/3以上直接来自于天然产物, 或以天然产物的活性成分为先导结构而发展的衍生物、类似物或全合成化合物^[3]. 中药作为一类重要的天然药物^[4], 因其较低的毒副作用、丰富的天然资源、独特的治疗效果、不易产生耐药

性等特点一直受到国内外学者的关注^[4,5]. 中药活性成分如黄酮、生物碱、萜类、香豆素、蒽醌等都具有抗炎、抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗氧化等多种生物活性, 具有极高的临床应用价值. 虽然关于中药生物活性研究的报道较多, 然而, 大多数中药化学成分复杂, 药效成分的体内吸收、分布、代谢途径不清, 同时又具有“多重靶标”特性, 使得其作用机制研究严重滞后, 限制了中药的进一步开发与应用. 因而, 中药活性成分作用靶标的鉴定对于在分子水平上阐明传

引用格式: 梁祖青, 罗群, 郑伟, 等. 生物质谱鉴定中药活性成分靶标蛋白质的研究进展. 中国科学: 生命科学, 2018, 48: 140–150

Liang Z Q, Luo Q, Zheng W, et al. Progress in identifying target proteins of active ingredients in traditional Chinese medicine by biological mass spectrometry (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2018, 48: 140–150, doi: 10.1360/N052017-00167

统中药的药效物质基础、作用机制、作用特点,以及基于靶标的药物结构优化具有重要意义. 基于软电离技术的生物质谱分析因具有灵敏度高、耗样量少、分析速度快、化学特异性强等优点,已成为药物靶标定性定量研究的强有力工具,在中药活性分子作用机制研究,特别是药物靶标鉴定中受到越来越多的关注. 本文总结、评述近年来采用基于质谱的蛋白质组学技术鉴定中药活性成分靶标蛋白质的研究进展,旨在阐述现代生物质谱技术研究中药活性成分作用机制的基本策略以及取得的成果,以期进一步推动生物质谱技术在中药现代化研究领域中的应用.

1 中药及其活性成分

中药是在中医基础理论指导下用于预防、诊断、治疗疾病或调节人体机能的药物,在中国具有两千多年的应用历史,其来源包括天然植物、动物、矿物. 根据其功能,中药一般可以分为解表药、清热药、化痰止咳平喘药、祛风湿药、活血化瘀药、芳香化湿药、泻下药、安神药、补益药、利水渗湿药、消食药等. 中药在临床治疗中以其多靶点、毒副作用低、不易产生耐药性、通过调节人体整体功能而发挥作用的特点已在长期的临床实践中显示出独特的优势. 然而,目前中药研究存在的普遍问题是化学成分复杂,中药材质量控制标准难以统一,药物在体内吸收、分布、代谢途径多数不明确,药物作用物质基础不清,分子靶标难以明确等. 20世纪90年代罗国安和王义明^[6]提出“以现代科学技术切入中药现代化”的策略,随后1997年提出“中药复方有效组分理念及研究方法”^[7],

1999年王永炎领衔的中医学界第一个国家重大基础研究发展计划(“973”计划)项目“中药方剂关键科学问题的基础研究”启动,逐渐兴起了中药现代化的研究热潮^[8-10]. 王永炎和张伯礼^[11]提出中药方剂的发展方向是组分中药,即采用现代技术手段研究中药的化学成分,明确其活性成分及其作用机制,促进中药进一步的临床应用.

中药活性成分是指中药提取物中,在疾病的诊断、治疗、症状缓解或疾病预防中具有药理活性或其他直接作用,或者能影响机体功能的化学物质. 根据中药的定义,中药来源主要包括植物、动物及少部分矿物质. 中药在临床应用中大多使用复方,即将不同来源的药材遵循特有的理法方药理论,按照君臣佐使配伍使用. 其中植物药材占大多数,小部分来源于动物组织或者脏器,或加工过的矿物质. 来源于药用植物的中药活性成分主要包括黄酮、多糖、挥发油、生物碱、甾体、皂苷、萜、脂肪酸和酚酸等,是中药发挥其药效作用的物质基础.

2 药物靶标及其鉴定方法

药物靶标是指存在于组织细胞内与药物分子具有特异性相互作用,并能使药物发挥其预期生物活性的生物分子,95%以上为蛋白质,包括酶、受体蛋白质、离子通道蛋白质、调节因子、核受体等(图1)^[1,2]. 药物靶标蛋白质的鉴定既是药物研发的关键科学问题,也是化学生物学,特别是化学基因组学研究中最具挑战性的前沿科学问题^[12,13],由此催生了许多由现代分析技术派生的药物靶标蛋白鉴定新方法和新技术,其

图1 基于生物功能的药物靶标分类. 改编自参考文献^[2]

中化学蛋白质组学是发展较为成熟、应用最为广泛的药物靶标蛋白鉴定技术^[14-16]。针对药物靶标蛋白鉴定的化学蛋白质组学研究主要有两种策略: 即活性蛋白质谱(activity-based protein profiling, ABPP)技术和以小分子化合物为中心的化学蛋白质组(compound-centric chemical proteomics, CCCP)技术^[16]。由Barglow和Cravatt^[17]发展和建立的ABPP技术最初是采用定向活性位点的化学探针监测复杂生物体系中一组或几组生物酶的活性, 揭示在病理、生理过程中酶的生物功能。ABPP技术应用于药物靶标蛋白鉴定时, 药物分子通过化学修饰与荧光基团或生物素分子联接, 构建能直接与潜在的靶蛋白共价结合, 或基于光交联反应与靶蛋白共价结合的化学探针。化学探针与细胞裂解液或全蛋白提取液孵育后, 与探针共价结合的蛋白质复合物通过凝胶电泳或亲和色谱技术分离富集后进行鉴定^[16]。CCCP技术同样由靶标蛋白分离和鉴定两个步骤构成。靶标蛋白分离富集方法主要包括光催化亲和和微球技术^[18]、琼脂糖亲和和微球技术^[19]、靶标垂钓技术(fishing-rod strategy)^[12,20]等。这类亲和分离技术的核心是将与小分子药物化学结构类似, 或直接通过化学修饰获得的药物分子衍生物通过共价结合方式固定在固体基质(如磁性微球或琼脂糖微球)上构建药物分子亲和探针^[19,21,22]; 然后, 将亲和探针与细胞裂解液或细胞全蛋白提取液孵育, 捕获能与药物分子相互作用的蛋白质(靶标蛋白); 最后, 采用离心分离或磁分离, 洗脱后进行鉴定(图2)。无论是ABPP还是CCCP技术, 药物靶标蛋白的鉴定则以基于质谱的蛋白质组学技术最为常见^[12,13,23]。

质谱, 顾名思义就是将样品转化为运动的气态离子, 经过质量分析器后按质荷比(m/z)大小排列获得的谱图, 相应的技术及仪器分别称为质谱技术、质谱仪。质谱仪一般由进样系统、离子源、质量分析器、检测器及数据处理系统等5个部分组成。20世纪80年代后期以电喷雾电离(electron spray ionization, ESI)和基质辅助激光解吸/电离(matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI)为代表的软电离技术的出现, 使与生命活动密切相关的分子, 如蛋白质、多肽、DNA等的质谱分析成为可能, 由此诞生了生物质谱这一新的生物物理技术。

生物质谱鉴定蛋白质和蛋白质复合物的方法主要包括自下而上(bottom-up)和自上而下(top-down)两种

策略。自下而上方法首先将蛋白质(或蛋白质混合物)酶解成肽段, 经纳升液相色谱分离后导入质谱仪进行一级质谱/二级质谱分析, 然后结合数据库检索鉴定蛋白质序列。自下而上质谱分析是蛋白质组学研究中较为成熟的大规模蛋白质鉴定技术^[24]; 自上而下方法则将完整的蛋白质(或蛋白质混合物)经过液相色谱分离或直接引入质谱仪进行二级(或多级)质谱分析, 鉴定蛋白质序列, 其优势在于可对蛋白质的翻译后修饰以及大规模蛋白质异构体进行精确的测序分析^[25], 其挑战之处是大分子量蛋白质的二级质谱数据解析困难。鉴于此, middle-down技术应运而生, 即将大分子量蛋白质通过限制性酶解水解为几条分子量相对较小的大肽, 然后通过大肽的二级或多级质谱分析鉴定蛋白质序列^[26]。药物靶标蛋白的鉴定方法以自下而上的质谱分析更为常见^[27]。

基于质谱的化学蛋白质组学技术鉴定小分子药物靶标蛋白的最大优势是质谱分析的对象源自特定细胞群(如某一亚型的肿瘤细胞)的全体天然蛋白质, 包括所有丰度水平的内源性蛋白和其翻译后修饰亚型、天然结合伴侣, 以及与疾病相关的基因突变体等, 这使得质谱分析获得的结果能尽可能客观地反映药物与蛋白质相互作用的真实环境。但是, 细胞全蛋白提取液的复杂性, 加之以药物分子(或其类似物)构建的亲合探针对于蛋白质的非特异性吸附, 使质谱分析的背景信号较高, 而且质谱定性分析不能区分与药物分子直接结合和间接结合的蛋白质。本研究组的策略是在构建药物分子亲和探针(即阳性探针)的同时, 构建不含药物分子(或诱饵基团)的阴性探针。然后, 将阳性探针和阴性探针从等量全蛋白提取液中捕获的蛋白质分别酶解, 并以轻重同位素试剂标记, 等量混合后进行质谱相对定量分析(图2), 这样可以很好地消除亲和探针与蛋白质的非特异性结合带来的假阳性结果^[20,21]。

3 中药活性成分靶标蛋白质的鉴定

近年来, 随着中药现代化研究的深入, 以及化学蛋白质组学和化学基因组学等相关技术的日趋成熟, 已有多数典型的中药活性成分单体, 如三氧化二砷^[9,10]、青蒿素^[28-30]等的作用靶标被成功鉴定。结合系统生物学和生物信息学技术, 化学蛋白质组学技术也被应用于中药复方活性成分的蛋白质靶标鉴定和研究。如陈

图2 功能化亲和探针捕获与质谱分析联合鉴定中药活性成分靶标蛋白质的流程示意图

竺和陈赛娟研究组^[10]通过化学蛋白质组学的方法揭示了复方黄黛片在治疗急性早幼粒细胞白血病(acute promyelocytic leukemia, APL)时的多靶点协同效应的机制. Li等人^[31]采用多组学技术研究补肾益肺方治疗慢性阻塞性肺病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)的分子机制,发现补肺益肾方同样是通过脂代谢、氧化应激、细胞连接和炎症响应等多个信号通路的调节作用发挥其药效作用. 但是,鉴于中药复方靶标蛋白质鉴定的复杂性和不确定性,中药活性成分靶标蛋白质的鉴定以针对结构确定的单体成分的研究为主. 根据中药的组成特点,将根据中药活性成分化学结构特征分别对其药物靶标蛋白鉴定的研究进展进行简要概述.

3.1 黄酮类活性成分靶标蛋白质的鉴定

黄酮类活性成分是指该类化合物基本母核为2-苯基色原酮,且其中两个苯环通过碳原子连接,基本骨架为C₆-C₃-C₆. 黄芩是临床中广泛使用的一种传统中药,

主要含有黄芩素、汉黄芩素、黄芩苷和汉黄芩苷等黄酮类活性成分^[32]. 研究表明,黄芩具有抗菌、利尿、抗炎、解热、抗病毒以及抗肿瘤等多种生物活性^[33-37]. Dong等人^[38]研究发现,黄芩苷通过抑制PDGFR-ERK信号通路,增加p27蛋白质表达,进而阻止血管内膜增生造成的损伤. 迄今为止,已有多篇关于黄芩苷^[38-40]和黄芩素^[41]与特定蛋白质之间相互作用的研究报道. Young研究组^[39]采用基于质谱的化学蛋白质组学方法研究黄芩苷在脂多糖诱导的鼠炎症反应作用的蛋白质组,发现黄芩苷通过作用于多种蛋白质发挥治疗作用,其中ANXA2等可能是黄芩苷抗炎作用的靶标. Dong等人^[40]研究发现,黄芩苷通过诱导蓖麻毒素蛋白质形成多聚体,抑制蓖麻毒素对小鼠(*Mus musculus*)的毒性. 他们进一步的研究表明,黄芩苷上的羟基通过与蓖麻毒素蛋白质上的氨基酸形成氢键,诱导蛋白质形成多聚体,进而降低该蛋白的毒性,达到解除蓖麻毒素毒性的作用. Zhang等人^[42]研究发现,黄芩苷通过调节SOCS3通路对模型动物自身免疫性脑脊髓炎发挥治

疗作用. 最近, Dan研究组^[43]一项关于黄芩苷在治疗皮肤癌作用的化学蛋白质组学研究中, 发现黄芩苷可以与核仁磷酸蛋白质发生(nucleophosmin, NPM)相互作用. *NPM1*基因沉默显著增强黄芩苷的抗肿瘤活性, 提示NPM可能是黄芩苷在癌症治疗中发挥重要作用的重要靶标. 本课题组基于点击化学反应构建了一种黄芩苷的磁性纳米亲和探针, 从人胚肾细胞HEK293全蛋白提取液中捕获蛋白, 质谱分析表明黄芩苷能与NPM1特异性结合. 进一步的定量分析结果表明, 除NPM1外, 黄芩苷对物质和能量代谢相关蛋白质(细胞色素C、延长因子Tu)、炎症相关蛋白(热休克蛋白质、钙磷脂结合蛋白), 以及细胞凋亡相关蛋白(Caspase-14)和转录因子(RFA1)等表现出不同的反应活性, 与中药活性成分多靶点作用特性相一致^[21].

3.2 苯丙素类活性成分靶标蛋白质的鉴定

牛蒡子属于菊科植物牛蒡子属牛蒡(*Arctium lappa* L.), 它的成熟果实入药, 作为解表药中发散风热的一种中药, 主要用于治疗风热感冒、咽喉肿痛、痈肿疫毒等症^[44]. 牛蒡子苷及牛蒡子苷元是从牛蒡子中提取分离而来的一类苯丙素类化合物, 是牛蒡子中起主要药理作用的活性成分. 牛蒡子苷在体内可以转化为牛蒡子苷元, 研究表明牛蒡子苷元具有解热、抗菌、抗肿瘤、抗炎等多种药理作用^[45]. Cheng等人^[46]通过基于UPLC/Q-TOF-MS筛选清肺丸的抗炎活性成分, 发现牛蒡子苷元是其中的抗炎活性成分. 牛蒡子苷元还能缓解气道收缩、松弛气道平滑肌, Zhao等人^[47]研究表明, 牛蒡子苷元主要通过影响钙的跨膜流动发挥药效作用. 此外, Ishihara等人^[48]研究发现, 牛蒡子苷元通过

抑制热休克转录因子活化的水平以及热休克蛋白的合成, 发挥解热作用. 虽然牛蒡子的临床应用已有悠久的历史, 但是具有多种药效作用的分子机制仍然不是十分明确. 针对这一科学问题, Cui等人^[49]发展了一种功能化的牛蒡子磁性纳米亲和探针, 结合同位素代谢标记技术, 应用质谱分析研究发现了牛蒡子苷元的多个潜在靶标蛋白. 进一步通过分子对接分析, 他们发现牛蒡子苷元抗炎的药效靶标是HSPA8, GAPDH, PPIA等蛋白质. 他们的研究还发现, 牛蒡子苷元(arctigenin)通过对PDK1/Akt/PDE4D信号通路的调节作用发挥其治疗哮喘的功效(图3)^[50].

3.3 萜类及挥发油类活性成分靶标蛋白质的鉴定

萜类化合物是一类由甲戊二羟酚衍生而成, 基本骨架具有两个或二个以上异戊单元结构特征的化合物, 主要包括单萜、倍半萜、二萜、三萜等结构. 甘草是临床上具有悠久历史的一味中药, 具有皮质激素样的抗炎作用. 甘草的主要抗炎活性成分为甘草酸和甘草次酸, 甘草酸是一种五环三萜类化合物. Yu等人^[51]采用生物素-链霉亲和素化学标记方法对甘草酸进行标记, 采用点击化学的原理在细胞中成功捕获、鉴定了甘草酸的靶标蛋白-蛋白激酶C. 葫芦苦素E(cucurbitacin E)是中药瓜蒌中的主要有效成分, 也是一种萜类化合物. Ho等人^[52]研究表明, 葫芦苦素E对原发性肝癌有很好的治疗效果, 同时对KB及HeLa细胞有很强的细胞毒性. 他们通过基于质谱的化学蛋白质组学研究发现, 葫芦苦素E可以与丝状肌动蛋白中的Cys257特异性结合, 表明肌动蛋白可能是葫芦苦素E的作用靶标.

图3 牛蒡子苷元通过抑制PDK1/Akt/PDE4D信号通路缓解哮喘症状的分子机制示意图. 改编自参考文献^[50]

青蒿素是从植物黄花蒿中提取分离出来的一种抗疟活性成分, 属于倍半萜内酯化合物。屠呦呦研究员发现青蒿素, 有效降低疟疾患者的死亡率, 由此获得2015年诺贝尔生理学或医学奖^[53]。最近, Wang等人^[29]、Ismail等人^[30]分别应用化学蛋白质组学分析技术成功鉴定了124个与青蒿素结合的蛋白, 其技术路线如图4所示。他们应用与青蒿素结构和活性相似的衍生物构建分子探针, 该探针既可用于细胞成像定位靶标分子在细胞内的分布, 也可用作亲和探针捕获青蒿素的靶标蛋白, 进行质谱分析鉴定。采用基因本体论(gene ontology, GO)对鉴定的蛋白质的功能分析表明, 大部分青蒿素结合蛋白均参与疟原虫的多种生物过程, 如羧酸代谢、细胞生物胺代谢、核苷代谢和核糖核苷生物合成等(图5), 表明青蒿素是通过与细胞内多种蛋白质的相互作用协同发挥抗疟作用。

此外, Zhou等人^[28]研究青蒿素抗肿瘤的靶标时发现, 青蒿素同样是通过与细胞内多种蛋白质稳定结合发挥抗肿瘤作用。紫杉醇是一种临床上广泛应用的抗癌药物, 是源自红豆杉的一种四环三萜类化合物。Kley^[54]利用噬菌体展示技术, 筛选紫杉醇的药效靶标, 发现紫杉醇基于与Bcl-2蛋白的结合发挥其抗癌作用。青蒿素和紫杉醇等作为中药活性单体开发研究的成功典范, 指明了中药现代化研究的一个新方向, 即通过对中药活性单体的系统研究, 鉴定其作用靶标, 明确其药效机制, 提升传统中药在临床上的应用。

3.4 生物碱类活性成分靶标蛋白质的鉴定

生物碱是一类含氮的碱性有机化合物, 是药用植

物中常见的活性成分。常见的生物碱活性成分有喜树碱、长春碱、苦参碱、秋水先碱、麻黄碱等。喜树是一种常用的中药, 含有多种活性成分, 其中喜树碱是其抗癌的主要活性成分。早期的研究发现, 喜树碱对DNA以及RNA合成酶具有抑制作用^[55]。随后, Hsiang等人^[56]发现, 喜树碱主要作用于拓扑异构酶 I, 通过改变拓扑异构酶 I 的空间结构, 抑制DNA的合成代谢。但是, 最近基于质谱的高通量筛选研究发现, 喜树碱既不是直接作用于DNA, 也不是直接作用于拓扑异构酶 I, 而是通过与DNA-Topo I 复合物作用发挥药效^[57]。苦参是一种来源于豆科植物苦参的常用中药, 主要活性成分为苦参碱^[4]。研究发现, 苦参碱具有抗肿瘤活性^[58], 通过上调Bax、下调Bcl-2水平, 诱导细胞凋亡, 发挥抗癌作用^[59]。此外, 苦参碱也可通过下调NF- κ B1抑制肿瘤细胞的侵袭和转移^[60]。在临床综合化疗中, 苦参碱常用作调节剂改善患者生存质量^[61,62]。最近, Wang等人^[63]通过光亲和标记结合质谱分析发现, 苦参碱在癌细胞中的直接靶标蛋白质可能是膜连蛋白质Annexin A2。Yi等人^[64]利用黄连素衍生物构建亲和探针, 从细胞裂解液中捕获黄连素的靶标蛋白, 质谱分析发现Actin是黄连素特异性结合的蛋白质。他们进一步的分子生物学和荧光共聚焦成像研究表明, 黄连素通过阻止Acting的多聚化, 抑制肿瘤细胞的迁移和侵袭。

3.5 矿物类活性成分靶标蛋白质的鉴定

传统中药砒霜(三氧化二砷)在中国具有悠久的历史, 它是一种矿物质, 在中国常被用于治疗APL^[65,66], 临床治疗效果较好, 患者5年生存期可达到

图4 化学蛋白质组学技术分离鉴定青蒿素靶标蛋白质的流程图。改编自参考文献^[29]

3.6 其他中药活性成分靶标蛋白质的鉴定

146

4 总结与展望

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/N052017-00167>

以及两者之间的关系的争论一直没有一个明确的定论,但是并不妨碍医学科研人员对于天然产物的研究兴趣.然而,研究人员不得不面对的一个棘手的问题是,中药的多成分、多靶点以及复杂的体内代谢过程给药物靶标鉴定带来的挑战.蛋白质组学研究可以在分子层面揭示药物作用的物质基础,其中利用药物活性单体组分功能化的纳米亲和探针捕获与富集细胞内的靶标蛋白质,进而通过定性、定量质谱分析鉴定药物靶标蛋白质的化学蛋白质组学分析方法,在中药靶标蛋白质鉴定及分子作用机制研究中具有广阔的应用前景.

基于质谱的化学蛋白质组学药物靶标鉴定方法需要解决的关键技术之一,是在尽量保持药物分子探针与靶标蛋白之间的亲和力不被破坏的同时,尽可能地减少药物分子与非靶标蛋白之间的非特异性吸附;其次是在分离富集靶标蛋白以及洗脱、酶解靶标蛋白的过程中,尽可能减少目标蛋白的损失.随着生物信息学、网络药理学、化学蛋白质组学等新兴学科和技术的交叉融合与不断完善,将会有更多、更新的药物靶标鉴定新方法、新技术出现,中药活性成分靶标蛋白质鉴定的报道也会越来越多,将持续推动中药现代化的研究向更高的层次迈进.

参考文献

- 1 Evans W E, Relling M V. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science*, 1999, 286: 487–491
- 2 Gao Z, Li H, Zhang H, et al. PDTD: a web-accessible protein database for drug target identification. *BMC Bioinf*, 2008, 9: 104–110
- 3 Cai Y, Luo Q, Sun M, et al. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci*, 2004, 74: 2157–2184
- 4 Wang C Y, Bai X Y, Wang C H. Traditional Chinese medicine: a treasured natural resource of anticancer drug research and development. *Am J Chin Med*, 2014, 42: 543–559
- 5 Newman D J, Cragg G M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod*, 2007, 70: 461–477
- 6 罗国安, 王义明. 中药复方物质基础和药效相关性研究. 世界科学技术: 中医药现代化, 1999, 1: 11–15
- 7 罗国安, 王义明. 中药复方有效部分研究方法以及理论初探. 中成药, 1997, 1: 43–44
- 8 秦秋. 国家重点基础研究发展规划——“方剂关键科学问题的基础研究”项目启动. 中国中药杂志, 2000, 3: 178–178
- 9 Zhang X W, Yan X J, Zhou Z R, et al. Arsenic trioxide controls the fate of the PML-RAR α oncoprotein by directly binding PML. *Science*, 2010, 328: 240–243
- 10 Wang L, Zhou G B, Liu P, et al. Dissection of mechanisms of Chinese medicinal formula Realgar-Indigo naturalis as an effective treatment for promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 4826–4831
- 11 张伯礼, 王永炎. 方剂关键科学问题的基础研究——以组分配伍研制现代中药. 中国天然药物, 2005, 3: 258–261
- 12 Sato S I, Kwon Y, Kamisuki S, et al. Polyproline-rod approach to isolating protein targets of bioactive small molecules: isolation of a new target of indomethacin. *J Am Chem Soc*, 2007, 129: 873–880
- 13 Lagner C, Kokel D, Setola V, et al. Chemical informatics and target identification in a zebrafish phenotypic screen. *Nat Chem Biol*, 2011, 8: 144–146
- 14 Bantscheff M, Scholten A, Heck A J R. Revealing promiscuous drug-target interactions by chemical proteomics. *Drug Discov Today*, 2009, 14: 1021–1029
- 15 Cheung A K, Jain R K. Accelerating the discovery of new drug targets with chemical proteomics. *Idrugs*, 2010, 13: 862–868
- 16 Rix U, Superti-Furga G. Target profiling of small molecules by chemical proteomics. *Nat Chem Biol*, 2009, 5: 616–624
- 17 Barglow K T, Cravatt B F. Activity-based protein profiling for the functional annotation of enzymes. *Nat Meth*, 2007, 4: 822–827
- 18 Naoki K, Kaori H, Siro S, et al. Photo-cross-linked small-molecule affinity matrix for facilitating forward and reverse chemical genetics. *Angew Chem*, 2005, 44: 3625–3628
- 19 Sakamoto S, Kabe Y, Hatakeyama M, et al. Development and application of high-performance affinity beads: toward chemical biology and drug discovery. *Chem Record*, 2009, 9: 66–85
- 20 Du Z, Luo Q, Yang L, et al. Mass spectrometric proteomics reveals that nuclear protein positive cofactor PC4 selectively binds to cross-linked DNA by a *trans*-platinum anticancer complex. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 2948–2951
- 21 梁祖青. 基于质谱的利水中药活性成分靶标蛋白质的捕获与鉴定. 硕士学位论文. 北京: 中国科学院大学, 2017
- 22 Katayama H, Oda Y. Chemical proteomics for drug discovery based on compound-immobilized affinity chromatography. *J Chromatogr B*, 2007, 855: 21–27

- 23 Shinichi N, Yuko A, Miyuki H, et al. Marine antifungal theonellamides target 3 β -hydroxysterol to activate Rho1 signaling. *Nat Chem Biol*, 2010, 6: 519–526
- 24 Zhang Y, Fonslow B R, Shan B, et al. Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. *Chem Rev*, 2013, 113: 2343–2394
- 25 Tran J C, Zamdborg L, Ahlf D R, et al. Mapping intact protein isoforms in discovery mode using top-down proteomics. *Nature*, 2011, 480: 254–258
- 26 Wu C, Tran J C, Zamdborg L, et al. A protease for ‘middle-down’ proteomics. *Nat Meth*, 2012, 9: 822–824
- 27 Deng G, Sanyal G. Applications of mass spectrometry in early stages of target based drug discovery. *J Pharmaceut Biomed Anal*, 2006, 40: 528–538
- 28 Zhou Y, Li W, Xiao Y. Profiling of multiple targets of artemisinin activated by hemin in cancer cell proteome. *ACS Chem Biol*, 2016, 11: 882–888
- 29 Wang J, Zhang C J, Chia W N, et al. Haem-activated promiscuous targeting of artemisinin in *Plasmodium falciparum*. *Nat Commun*, 2015, 6: 10111
- 30 Ismail H M, Barton V, Phanchana M, et al. Artemisinin activity-based probes identify multiple molecular targets within the asexual stage of the malaria parasites *Plasmodium falciparum* 3D7. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: 2080–2085
- 31 Li J, Zhao P, Yang L, et al. System biology analysis of long-term effect and mechanism of Bufe Yishen on COPD revealed by system pharmacology and 3-omics profiling. *Sci Rep*, 2016, 6: 25492
- 32 Gao Z, Huang K, Xu H. Protective effects of flavonoids in the roots of *Scutellaria baicalensis* georgi against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in hs-sy5y cells. *Pharmacol Res*, 2001, 43: 173–178
- 33 Kitamura K, Honda M, Yoshizaki H, et al. Baicalin, an inhibitor of HIV-1 production *in vitro*. *Antiviral Res*, 1998, 37: 131–140
- 34 Tsai C C, Lin M T, Wang J J, et al. The antipyretic effects of baicalin in lipopolysaccharide-evoked fever in rabbits. *Neuropharmacology*, 2006, 51: 709–717
- 35 Zhang X, Jie Z, Qin X, et al. Influence of baicalin and octreotide on NF- κ B and P-selectin expression in liver and kidney of rats with severe acute pancreatitis. *Inflammation*, 2009, 32: 1–11
- 36 Wang N, Tang L J, Zhu G Q, et al. Apoptosis induced by baicalin involving up-regulation of P53 and bax in MCF-7 cells. *J Asian Nat Products Res*, 2009, 10: 1129–1135
- 37 Ling W, Yun L, Yan C, et al. Flavonoid baicalein suppresses adhesion, migration and invasion of MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Cancer Lett*, 2010, 1: 42–48
- 38 Dong L H, Wen J K, Miao S B, et al. Baicalin inhibits PDGF-BB-stimulated vascular smooth muscle cell proliferation through suppressing PDGFR β -ERK signaling and increase in p27 accumulation and prevents injury-induced neointimal hyperplasia. *Cell Res*, 2010, 20: 1252–1262
- 39 Jin A K, Nagappan A, Park H S, et al. Proteome profiling of lipopolysaccharide induced L6 rat skeletal muscle cells response to flavonoids from *Scutellaria baicalensis* Georgi. *BMC Complement Altern Med*, 2014, 14: 379
- 40 Dong J, Zhang Y, Chen Y, et al. Baicalin inhibits the lethality of ricin in mice by inducing protein oligomerization. *J Biol Chem*, 2015, 290: 12899–12907
- 41 Tsou L K, Lara-Tejero M, RoseFigura J, et al. Antibacterial flavonoids from medicinal plants covalently inactivate type III protein secretion substrates. *J Am Chem Soc*, 2016, 138: 2209–2218
- 42 Zhang Y, Li X, Ciric B, et al. Therapeutic effect of baicalin on experimental autoimmune encephalomyelitis is mediated by SOCS3 regulatory pathway. *Sci Rep*, 2015, 5: 17407
- 43 Li D, Lin B, Yusuf N, et al. Proteomic analysis and functional studies of baicalin on proteins associated with skin cancer. *Am J Chin Med*, 2017, 45: 599–614
- 44 崔庆新. 基于化学生物学的中药有效成分牛蒡子苷元等的作用靶点及体内分布研究. 博士学位论文. 天津: 南开大学, 2014
- 45 Hirose M, Yamaguchi T, Lin C, et al. Effects of arctiin on PhIP-induced mammary, colon and pancreatic carcinogenesis in female Sprague-Dawley rats and MeIQx-induced hepatocarcinogenesis in male F344 rats. *Cancer Lett*, 2000, 155: 79–88
- 46 Cheng B, Hou Y, Wang L, et al. Dual-bioactivity-based liquid chromatography-coupled quadrupole time-of-flight mass spectrometry for NF- κ B inhibitors and β 2AR agonists identification in Chinese Medicinal Preparation Qingfei Xiaoyan Wan. *Anal Bioanal Chem*, 2012, 404: 2445–2452
- 47 Zhao Z, Yin Y, Wang Z, et al. Arctigenin exhibits relaxation effect on bronchus by affecting transmembrane flow of calcium. *Biol Trace Elem Res*, 2013, 156: 181–187
- 48 Ishihara K, Yamagishi N, Saito Y, et al. Arctigenin from *Fructus arctii* is a novel suppressor of heat shock response in mammalian cells. *Cell Stress Chapter*, 2006, 11: 154
- 49 Cui Q, Hou Y, Hou J, et al. Preparation of functionalized alkynyl magnetic microspheres for the selective enrichment of cell glycoproteins based

- on click chemistry. *Biomacromolecules*, 2013, 14: 124–131
- 50 Fang R, Cui Q, Sun J, et al. PDK1/Akt/PDE4D axis identified as a target for asthma remedy synergistic with β_2 AR agonists by a natural agent arctigenin. *Allergy*, 2015, 70: 1622–1632
- 51 Yu W L, Guizzunti G, Foley T L, et al. An optimized immunoaffinity fluorescent method for natural product target elucidation. *J Nat Prod*, 2010, 73: 1659–1666
- 52 Ho Y, Gruhler A, Heilbut A, et al. Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature*, 2002, 415: 180–183
- 53 张伯礼, 张俊华. 屠呦呦研究员获诺贝尔生理学或医学奖的启示. 中国科学: 生命科学, 2015, 45: 1153–1155
- 54 Kley N. Chemical dimerizers and three-hybrid systems. *Chem Biol*, 2004, 11: 599–608
- 55 Gallo R C, Whangpen J, Adamson R H. Studies on antitumor activity, mechanism of action, and cell cycle effects of camptothecin. *J Natl Cancer Inst*, 1971, 46: 789–795
- 56 Hsiang Y H, Hertzberg R, Hecht S, et al. Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase-I. *J Biol Chem*, 1985, 260: 4873–4878
- 57 Yao C, Na N, Huang L, et al. High-throughput detection of drugs binding to proteins using desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chim Acta*, 2013, 794: 60–66
- 58 Liu T, Song Y, Chen H, et al. Matrine inhibits proliferation and induces apoptosis of pancreatic cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Biol Pharmaceut Bull*, 2010, 33: 1740–1745
- 59 Li H, Li X, Bai M, et al. Matrine inhibited proliferation and increased apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells via upregulation of Bax and downregulation of Bcl-2. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8: 14793–14799
- 60 Li Q, Lai Y, Wang C, et al. Matrine inhibits the proliferation, invasion and migration of castration-resistant prostate cancer cells through regulation of the NF- κ B signaling pathway. *Oncol Rep*, 2016, 35: 375–381
- 61 Zhang G L, Jiang L, Yan Q, et al. Anti-tumor effect of matrine combined with cisplatin on rat models of cervical cancer. *Asian Pac J Tropical Med*, 2015, 8: 1055–1059
- 62 Lin Y, Lin L, Jin Y, et al. Combination of matrine and sorafenib decreases the aggressive phenotypes of hepatocellular carcinoma cells. *Chemotherapy*, 2014, 60: 112–118
- 63 Wang D, Cao Y, Zheng L, et al. Identification of Annexin A2 as a target protein for plant alkaloid matrine. *Chem Commun*, 2017, 53: 5020–5023
- 64 Yi C M, Yu J, Kim H, et al. Identification of actin as a direct proteomic target of berberine using an affinity-based chemical probe and elucidation of its modulatory role in actin assembly. *Chem Commun*, 2017, 53: 7045–7047
- 65 Shen Z X, Chen G Q, Ni J H, et al. Use of arsenic trioxide (As_2O_3) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APE): II. Clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients. *Blood*, 1997, 89: 3354–3360
- 66 Chen G Q, Shi X G, Tang W, et al. Use of arsenic trioxide (As_2O_3) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): I. As_2O_3 exerts dose-dependent dual effects on APL cells. *Blood*, 1997, 89: 3345–3353
- 67 Zhu J, Koken M H M, Quignon F, et al. Arsenic-induced PML targeting onto nuclear bodies: implications for the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 3978–3983
- 68 Raj L, Ide T, Gurkar A U, et al. Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to ROS. *Nature*, 2011, 475: 231–234
- 69 Wang H, Ye Y, Pan S Y, et al. Proteomic identification of proteins involved in the anticancer activities of oridonin in HepG2 cells. *Phytomedicine*, 2011, 18: 163–169
- 70 Titov D V, Gilman B, He Q L, et al. XPB, a subunit of TFIIH, is a target of the natural product triptolide. *Nat Chem Biol*, 2011, 7: 182–188
- 71 Lomenick B, Olsen R W, Huang J. Identification of Direct protein targets of small molecules. *ACS Chem Biol*, 2011, 6: 34–46
- 72 Lee D H, Thoenissen N H, Goff C, et al. Synergistic effect of low-dose cucurbitacin B and low-dose methotrexate for treatment of human osteosarcoma. *Cancer Lett*, 2011, 306: 161–170
- 73 Zhang L, Yu Z, Wang Y, et al. Quantitative proteomics reveals molecular mechanism of gambufotalin and its potential inhibition on Hsp90 in lung cancer. *Oncotarget*, 2016, 7: 76551–76564
- 74 Ren Y, Yuan C, Chai H, et al. Absolute configuration of (–)-gambogic acid, an antitumor agent. *J Nat Prod*, 2011, 74: 460–463
- 75 Li D, Song X Y, Yue Q X, et al. Proteomic and bioinformatic analyses of possible target-related proteins of gambogic acid in human breast carcinoma MDA-MB-231 cells. *Chin J Nat Meds*, 2015, 13: 41–51
- 76 Yue Q, Feng L, Cao B, et al. Proteomic analysis revealed the important role of vimentin in human cervical carcinoma HeLa cells treated with gambogic acid. *Mol Cell Proteomics*, 2016, 15: 26–44

Progress in identifying target proteins of active ingredients in traditional Chinese medicine by biological mass spectrometry

LIANG ZuQing^{1,2,3}, LUO Qun^{1,2,3}, ZHENG Wei^{1,2}, ZHAO Yao^{1,2} & WANG FuYi^{1,2,3,4}

1 Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China;

2 Beijing National Laboratory of Molecular Science, Beijing 100190, China;

3 College of Chemical Science, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100049, China;

4 National Centre for Mass Spectrometry in Beijing, Beijing 100190, China

Because of its minimal side effects, rich drug resources, low drug resistance, and multi-targeting synergetic function in clinical use, traditional Chinese medicine (TCM) is thought to be an important natural resource for drug research and development and has been extensively studied worldwide. However, functional materials in many traditional Chinese medicines in clinical application have not been extensively examined, leading to undefined drug absorption, distribution, and metabolic pathways. Furthermore, the mechanisms of most TCM active ingredients remain unknown, limiting their clinical use. Therefore, the discovery and identification of drug targets of TCM active ingredients is important for clarifying the basis of drug efficacy and mechanism of action of TCM active ingredients at the molecular level, which are key scientific issues in the modernization of TCM. Owing to its advantages such as high sensitivity, high chemical specificity, high-throughput capability, and low sample requirement, biological mass spectrometry associated with soft ionization techniques has emerged a powerful tool for the qualitative and quantitative identification of target proteins of drugs and can be applied to identify target proteins of TCM active ingredients. This paper reviews recent progress in the identification of target proteins of TCM active ingredients determined by using biological mass spectrometry technology. We introduce the mass spectrometric strategy for investigating the molecular mechanism of action of TCM active ingredients and describe further applications of biological mass spectrometry for the modernization of TCM.

traditional Chinese medicine, active ingredient, target protein of drug, biological mass spectrometry, chemical proteomics

doi: [10.1360/N052017-00167](https://doi.org/10.1360/N052017-00167)