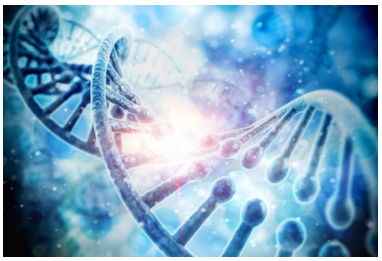
·生命科学与新药探索·
LIFE SCIENCES AND
NEW DRUG DISCOVERY



天然产物靶标识别策略的研究进展

王晶[1]，李陈城[1]，胡庆华[2*]

（1. 中国药科大学药学院，江苏 南京 211198；2. 中国药科大学生命科学与技术学院，江苏 南京 211198）

[摘要] 天然产物因具有广泛的生物活性，一直是新药研发的重要来源。新药研发的关键环节包括药物筛选及作用蛋白靶标的识别。药物分子与靶标的相互作用是发挥药理活性的基础，明确天然产物的作用靶标，对阐明其分子机制并推动临床预防与治疗应用具有重要意义。随着生命科学技术、生物信息学及人工智能的快速发展，药物靶标识别方法不断推陈出新并持续优化，主要分为两类：一类是直接评估药物与靶标相互作用的直接筛选法；另一类是基于药物诱导后表型和信号通路变化进行分析的间接筛选法。这些方法相辅相成，共同为天然产物靶标鉴定提供了有力工具。综述当前多种常用的天然产物靶标识别方法，以期为后续天然产物药物研究提供参考。

[关键词] 天然产物；蛋白质靶标；靶标识别策略；化学蛋白质组学

[中图分类号] R969.1；O503 [文献标志码] A [文章编号] 1001-5094（2025）08-0640-08

DOI: 10.20053/j.issn1001-5094.20250019

Research Progress of Target Identification Strategies for Natural Products

WANG Jing[1], LI Chencheng[1], HU Qinghua[2]

(1. School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China; 2. School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China)

[Abstract] Natural products, due to their wide range of biological activities, have always been an important source for new drug development. The key steps in new drug research and development include drug screening and the identification of protein targets. The interaction between drug molecules and targets serves as the basis for exerting pharmacological activities, so clarifying the action targets of natural products is of great significance for elucidating their molecular mechanisms and promoting their application in clinical prevention and treatment. With the rapid development of life science and technologies, bioinformatics, and artificial intelligence, methods for identifying drug targets have been constantly updated and optimized, being divided mainly into two categories: the direct screening method for directly assessing the interaction between drugs and targets, and the indirect screening method for analyzing the changes in phenotypes and signaling pathways induced by drugs. These methods complement each other and together provide powerful tools for the identification of targets of natural products. This article reviews a variety of commonly used methods for identifying the targets of natural products, with the aim of providing some reference for subsequent research on drugs from natural products.

[Key words] natural product; protein target; target identification strategy; chemical proteomics

天然产物是动物、植物提取物，以及昆虫、海洋生物和微生物体内组成成分或代谢产物的统称，存在形式多样，具有丰富的化学结构和广泛的生物活性，是新药研发的重要来源[1]。在传统中药中，单一药材往往含有数十种甚至上百种天然活性成分，但仅有少数天然产物单体发挥治疗作用。若要深入阐明药物的治病机制，需明确其化学结构式与作用靶标。然而，天然产物复杂独特的化学结构虽有助于其发挥治疗功效，但也严重制约了化学合成与靶标信息解析，对药物发现与合成造成阻碍[1]。因此，在药物研发过程中，发现并鉴定天然产物的靶标成为不可或缺的关键环节。

一般而言，药物通过与细胞内蛋白质靶标相互作用来发挥药理活性，在此基础上才能进一步探究其作用机制和潜在毒性[2]。可见，药物靶标识别是新药开发的首要关键步骤。天然产物来源广泛、生成

接受日期：2024-04-23
基金项目：国家自然科学基金资助项目（No. 82373887）
* 通信作者：胡庆华，教授
研究方向：抗炎免疫药理
E-mail：huqh@cpu.edu.cn

方式多样，可能与多个靶点发生相互作用，这使得其靶标确定更具挑战性。鉴于天然产物结构复杂且具有多靶标结合特性，多种药物靶标识别技术应运而生。根据天然产物、靶标与疾病间的关系，天然产物靶标识别策略大致可分为两大类[3]：一类是直接评估药物-靶标相互作用的直接筛选法，主要包括化学蛋白质组学、细胞热位移测定（cellular thermal shift assay，CETSA）等；另一类是基于表型发现识别靶标的间接筛选法，该方法通过分析天然产物引起的表型变化和细胞分子信号通路改变，间接推测靶标，但不直接提供药物与靶标相互作用的信息。本文对近年来天然产物靶标识别策略的发展进行总结与介绍，旨在为天然产物靶标研究提供思路与方法。以下为几种典型的靶标识别策略（见表 1）。

表 1 天然产物的靶标识别策略对比

Table 1 Comparison of target identification strategies for natural product

靶标识别策略		优点	缺点
直接筛选法	化学蛋白质组学	应用广泛，且适用于与天然产物低亲和力结合靶标的识别	探针设计繁琐复杂，修饰或固定可能影响靶标结合
	CETSA	无需开发探针，操作简便，适用范围广泛	不适合识别含有未折叠结合位点的蛋白质靶标
	DARTS	无需开发探针，操作简便，适用范围广泛	无靶标富集步骤，存在一定概率的假阴性结果
间接筛选法	dTAG	高选择性，可逆、可调节，快速高效	需明确 dTAG 对细胞的毒性
	基因组文库筛选方法	高通量筛选	获得全基因组文库耗费大量时间和金钱
	差异组学筛选方法	能够反映大量基因或蛋白质给药前后的水平变化	难以直接识别靶标，仅提供参考与补充
	网络药理学	宏观，全面，能够建立基因、靶标、疾病之间的生物网络关系	疾病靶标的选取相对主观
	表型筛选	直观，简单，与疾病、生物学相关性强	仅为识别靶标提供参考与补充

CETSA：cellular thermal shift assay（细胞热位移测定）；DARTS：drug affinity responsive target stability（药物亲和反应靶向稳定性）；dTAG：degradation tag（降解标签）

1 天然产物药物的直接识别靶标策略

1.1 化学蛋白质组学

化学蛋白质组学是用于寻找和鉴定活性小分子蛋白质靶标的重要技术，主要包括 2 个关键步骤：1）探针设计和合成；2）靶标蛋白的捕获和识别。根据工作流程差异，可将其分为以化合物为中心的化学蛋白质组学（compound-centric chemical proteomics，CCCP）和基于活性的蛋白质组分析（activity-based protein profiling，ABPP）[4]。

CCCP 是根据构效关系，将药物分子固定于固体基质（如磁珠或琼脂糖珠）上制备成探针。该探针与蛋白质裂解物孵育后，通过洗涤去除非特异性结合蛋白，从而富集靶标蛋白[5]。此方法要求药物与基质连接时存在特定化学基团（如巯基、羧基等），因而需预先全面了解药物结构与构效关系，并确保药物固定后仍具有活性。尽管 CCCP 在靶标筛选上更为全面、客观，甚至能够识别非酶类靶标[6]，但固体基质连接所产生的空间位阻可能影响靶标蛋白与药物活性基团的结合，进而导致假阳性结果，限制了该技术的发展。

ABPP 结合了基于活性的探针（activity-based probe，ABP）和蛋白质组学技术。首先，需根据药物分子构效关系设计并合成具有药理活性的探针，该探针包含 3 个功能元件：与靶标蛋白共价连接的反应性基团、连接区域，以及用于表征和修饰靶标蛋白的标签。随后，将探针与含有靶标蛋白的活细胞或裂解物共同孵育，促使探针与靶标结合，再利用磁珠或琼脂糖珠富集靶标，最后完成靶标蛋白的鉴定[7]。

1.1.1 探针的设计与合成 探针设计与合成是化学蛋白质组学的核心环节。目前，多种类型探针已用于靶标蛋白捕获，适用于不同种类和结构的蛋白质筛选。早期的固定化探针通过将活性天然产物共价连接至固体基质（如琼脂糖珠），实现靶标蛋白的富集。例如，Li 等[8]将青蒿琥酯偶联到琼脂糖基质上，与细胞裂解物孵育后经洗脱、胰蛋白酶消化，结合高效液相色谱法（high performance liquid chromatography，HPLC）与 Orbitrap Velos 质谱分析，鉴定出 gephyrin 蛋白为特异性相互作用蛋白。然而，固定化产生的空间位阻限制了该技术的应用。为克服这一问题，ABP 应运而生，其标签和连接区域不影响药物活性，最大限度保留了药理功能。常见的 ABP 包括生物素偶联探针、点击化学探针和光亲和探针。

生物素-亲和素系统凭借其强特异性结合能力，广泛用于探针构建。例如，Liang 等[9]为解析白头翁中活性成分 anemoside B4（AB4）的抗炎机制，合成 AB4-生物素探针，利用链霉亲和素琼脂糖珠捕获结合蛋白。通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel

electrophoresis，SDS-PAGE）、银染和液相色谱-质谱联用（liquid chromatography-mass spectrometry，LC-MS）定量蛋白质组学分析，发现 AB4 显著调控 19 种蛋白，并结合 CETSA、药物亲和反应靶向稳定性（drug affinity responsive target stability，DARTS）实验、表面等离子共振技术（surface plasmon resonance，SPR）等验证丙酮酸羧化酶（pyruvate carboxylase，PC）为其作用靶标。研究还使用 AB4- 香豆素荧光探针，通过共聚焦免疫荧光直接观察到 PC 与 AB4 的细胞内共定位，进一步确证了二者的特异性结合。

光亲和标记技术与生物正交化学的发展拓展了探针应用范围。光亲和探针与活性蛋白质组孵育后，在特定波长光照下可生成高活性自由基中间体，与靶标蛋白共价交联，避免了体外实验环境与体内差异导致的结合失效 [10]。例如，Geng 等 [11] 设计光亲和探针 ART-P1 和 ART-P2，引入双吖丙啶光反应基团促进青蒿素与靶标共价结合，经大规模下拉实验筛选出微粒体前列腺素合成酶-2 为关键靶标，揭示了青蒿素通过阻断前列腺素 E2 合成抑制结直肠癌的机制。类似地，Chen 等 [12] 用 365 nm 光照激活白藜芦醇（resveratrol，RSV）光亲和探针 RSV-P，结合点击化学与生物素标记，鉴定出脂肪酸结合蛋白 5 为 RSV 抑制宫颈癌转移的潜在靶标。

1.1.2 靶标蛋白的捕获与识别 探针富集靶标蛋白后，需通过 SDS-PAGE 电泳分离，并对比条带灰度值，最终利用质谱法进行定量检测 [13]。尽管质谱法操作简便，但难以检测低丰度靶标或排除非特异性结合干扰。为此，定量蛋白质组学和蛋白质微阵列等技术被用于优化靶标鉴定流程。

定量蛋白质组学可有效区分特异性与非特异性结合，提升低丰度靶标检测能力，主要包括稳定同位素标记法和无标记法 [14]。稳定同位素标记法中，细胞培养中氨基酸稳定同位素标记技术通过轻、重同位素标记不同细胞群，经多代培养后结合质谱分析差异表达蛋白。例如，He 等 [15] 使用 $^{13}C_6{}^{15}N_2$-赖氨酸和 $^{13}C_6{}^{15}N_4$-精氨酸标记细胞，经 LC-MS/MS 技术分析鉴定出 rosamultin 的靶标蛋白为 CCAAT 增强子结合蛋白同源蛋白。同位素标记相对和绝对定量（isobaric tags for relative and absolute quantification，iTRAQ）技术则利用化学试剂标记，无需细胞培养标记且可同时分析多个样品。He 等 [16] 通过 iTRAQ 标记结合 Nano-LC-MS/MS，鉴定出 esculentoside A 在阿尔茨海默病小鼠模型中的差异表达蛋白及潜在靶标。随着数据无关性采集（data-independent acquisition，DIA）技术与高性能质谱仪（如 Orbitrap Astral）的发展，无标记（label-free）定量蛋白质组学的准确性和灵敏度显著提升，成为更简便、高效的分析手段。

尽管化学标记技术推动了天然产物靶标发现，但标记过程可能影响复杂结构天然产物的药理活性。无标记方法通过监测蛋白质与配体结合前后的生理特性变化（如热稳定性、蛋白酶解抗性等），从蛋白质组学层面推断靶标，降低了探针设计合成成本，为缺乏有效探针时的靶标鉴定提供了重要补充。

1.2 CETSA

CETSA 方法于 2013 年首次提出，该方法基于靶蛋白与药物结合后稳定性增强的原理，通过检测蛋白质的温度依赖性变性情况及复合蛋白熔解曲线的偏移，来评估药物分子与细胞和组织样品中蛋白质靶标的结合情况 [17]。随着生物技术的发展，CETSA 衍生出多种蛋白质靶标鉴定技术，如基于免疫印迹（Western blotting，WB）进行检测的 WB-CETSA[17]，热蛋白质组学分析（thermal proteome profiling，TPP，又称 MS-CETSA）[18]、高通量（high-throughput，HT）-CETSA[19] 等。

WB-CETSA 是 CETSA 的经典方法，该方法对实验设备要求低、操作简单，能够为药物与靶标的相互作用提供直接证据，是检测天然产物药物与靶标结合的有力工具。例如，Qu 等 [20] 在探究天然产物类似物 gambogic amide 的潜在作用靶标时，使用 WB-CETSA 对规律间隔成簇短回文重复序列（clustered regularly interspaced short palindromic repeats，CRISPR）基因文库筛选出的前 14 个基因进行鉴定，蛋白质印迹条带显示，在 67～70 ℃时，二甲基亚砜（dimethyl sulfoxide，DMSO）处理的细胞中 WD 重复结构域（WD repeat domain 1，WDR1）条带几乎完全消失，而 gambogic amide 处理的细胞中该条带依然存在。由于操作简便且适用性广泛，WB-CETSA 常与 DARTS 和 SPR 等其他靶标验证方法结合，通过对比药物处理前后相同温度下的条带变化，直观地判断药物与靶标的结合情况 [21-22]。此外，WB-CETSA 还可用于验证药物靶标的关键结合位点 [23]、评估药物在动物体内与靶标的结合情况 [24] 以及反映药物与靶标的剂量依赖性结合 [25] 等。

TPP 是一种结合了基于 MS 的定量蛋白质组学的检测方法，为 CETSA 引入了 MS 检测平台，可在全蛋白质组范围内检测蛋白质的热稳定性，极大地拓展了 CETSA 的应用范围。例如，He 等 [26] 利用 TPP 技术，从原代成骨细胞裂解物中筛选仙茅提取物 orcinol 的直接结合靶标，共鉴定出 44 个热稳定性受 orcinol 影响的蛋白，进一步分析验证后确

定 p38 为 orcinol 的直接结合靶标。作为一种无标记筛选方法，TPP 无需设计探针，当药物分子修饰设计探针可能干扰与靶标的结合时，TPP 可作为替代方法。例如，Kirsch 等 [27] 在探究 vioprolide A 的作用靶点时，首先尝试基于亲和力的蛋白质组学分析构建探针下拉靶标蛋白，但未获得明确靶标。考虑到分子修饰对药物靶标结合的潜在影响，转而使用 TPP 技术对 37~67 ℃细胞裂解物中的蛋白进行分析，鉴定出 U2SURP 和 NOP14 这 2 种在 vioprolide A 处理后高度稳定的蛋白，并对其进行了深入验证。

CETSA 技术还可与高通量筛选结合，利用 AlphaScreen 荧光共振能量转移技术 [28]、反相蛋白阵列 [29]、β-半乳糖苷酶化学发光 [30] 等技术，在 384 和 1 536 孔板中进行大规模筛选。

目前，CETSA 技术仍在快速发展，为天然产物药物的靶标识别与验证提供了可靠依据。经典的 WB-CETSA 方法成熟、便捷，常用于天然产物药物与靶标结合的验证；TPP 及其衍生方法结合 MS 技术，进一步拓展了 CETSA 的应用范围；HT-CETSA 具有快速、大规模筛选的特点，在药物先导物发现中已有应用，但其在天然产物靶标发现方面的应用仍有待进一步探索。

1.3 DARTS

基于蛋白质与配体或药物结合后水解敏感性改变的特性，研究人员于 2009 年提出 DARTS 方法用于靶标识别：通过用蛋白酶分别处理与药物孵育和未孵育的细胞裂解物，检测对蛋白酶具有抗性的蛋白质，从而判断其是否与药物结合 [31]。简单来说，首先裂解细胞，提取总蛋白，随后向总蛋白中添加待测天然产物进行孵育，对照组加入等体积溶剂，同时向上述实验组和对照组加入等量梯度蛋白酶进行孵育，最后利用 WB 验证小分子和靶蛋白之间的相互作用。该方法的理论基础是溶液中蛋白质的构象状态处于动态平衡，而配体结合会改变蛋白质构象，进而影响其对蛋白酶水解的敏感性 [32]。作为无标记筛选技术，DARTS 操作简便、快速，已广泛应用于天然产物药物靶标的鉴定，例如用于检测罗汉果苷Ⅱ B、苦杏仁苷和木犀草素分别与线粒体融合蛋白 2 和 E3 连接酶 synoviolin 1 的相互作用 [33]；此外，DARTS 还常与化学蛋白质组学结合，如通过设计点击化学探针，并利用 CETSA 和 DARTS 等方法验证天然产物与靶标的结合 [34]，或结合 HPLC-MS/MS 分析药物干预前后的差异蛋白，从而发现潜在靶标 [35]。

除 DARTS 外，多种无标记靶标筛选方法也不断发展完善。例如，基于相似原理开发的有限蛋白水解质谱技术 [36]，以及利用药物与靶标蛋白结合后甲硫氨酸残基抗氧化能力增强特性的氧化速率蛋白稳定性分析 [37]。这些技术与化学蛋白质组学相互补充，为天然产物药物的靶标筛选与鉴定提供了多元化的研究手段。

2 天然产物药物的间接识别靶标策略

2.1 降解标签

降解标签（degradation tag，dTAG）是一种靶蛋白降解技术。通过 CRISP/CRISPR 相关蛋白 9（CRISPR-associated protein 9，Cas9）技术或慢病毒转基因表达，将含有 $FKBP12^{F36V}$ 突变体的靶蛋白嵌合体转入细胞内。dTAG 化合物（由 $FKBP12^{F36V}$ 配体与 E3 连接酶配体组成）能够促使 $FKBP12^{F36V}$ 与 E3 连接酶形成复合物，实现靶蛋白的多聚泛素化和降解 [38]。利用 dTAG 技术可以识别靶蛋白降解过程中蛋白质组学和转录信号的变化。dTAG 化合物具有绝对选择性，其明确的作用机制以及快速起效的特点，使其在小鼠生物学及临床研究中得到广泛应用，也为天然产物药物的靶标鉴定提供了有力工具 [39-40]。

2.2 基因组文库筛选方法

基因组文库筛选方法是通过基因敲除调控靶蛋白的表达水平，以确认药物与蛋白质的相互作用，进而筛选药物靶标的方法。常用的基因敲除工具包括 RNA 干扰 [41]、CRISPR/Cas9 [42] 等。使用 CRISPR 文库能够检测药物治疗后细胞的变化，从而明确耐药机制和药物分子的靶向候选基因。例如，Heslop 等 [43] 构建了用于酵母细胞表面展示（yeast cell surface display，YSD）的全基因组文库，并开发了 YSD 适应性筛选技术来确定药物作用靶标；Qu 等 [20] 使用高度优化的 Brunello CRISPR 单引导 RNA 文库筛选 gambogic amide 的作用靶标，结果显示，与 DMSO 对照组相比，低剂量和高剂量的 gambogic amide 组有 601 个正选择基因重叠，且发现许多富集基因与线粒体和细胞凋亡通路相关，进一步结合 CETSA，DARTS 和分子对接模拟等方法，鉴定并验证了 gambogic amide 与靶标 WDR1 的结合。此外，Benslimane 等 [44] 在 NALM-6 细胞中进行 CRISPR/Cas9 全基因组筛选，以鉴定对白藜芦醇 RSV 及其类似物紫檀芪敏感或耐药的基因，发现复制应激是其抑制人类细胞增殖的主要作用机制。由此可见，基因组文库不仅是发现药物和疫苗靶标的有力工具 [45]，也为研究蛋白-蛋白相互作用、病原体-宿主相互作用以及配体-受体相互作用提供了宝贵资源。

2.3 差异组学筛选方法

差异组学筛选方法通过检测药物治疗前后基因表达水平、mRNA 表达水平或蛋白质相对丰度的变化，来预测天然产物药物的靶标。然而，基因表达谱和蛋白丰度的变化并不能直接反映药物的作用靶标，仅能为寻找靶标提供参考[46]。例如，Han 等[47]为探究 SBM（一种含人参萃取物、茶多酚、何首乌等多种天然产物的保健品）促进毛发再生的机制，对给予 SBM 14 天后的小鼠皮肤进行单细胞测序，发现真皮细胞和毛囊干细胞对毛发再生至关重要。通过对测序结果中的差异表达基因进行分析，并构建已知配体/受体对的细胞间通信网络，发现成纤维细胞生长因子（fibroblast growth factor，FGF）信号通路被激活，FGF7 的表达显著增加。Duan 等[48]分析了二氢丹参酮 I 处理的 H9c2 细胞的整体蛋白质组和磷酸化蛋白质组表达谱，发现该药治疗显著影响细胞周期，以及哺乳动物雷帕霉素靶蛋白和磷脂酰肌醇 3-激酶（phosphoinositide 3-kinase，PI3K）/v-akt 鼠胸腺瘤病毒癌基因同源物编码蛋白等多种信号通路，并且显著影响了与细胞代谢和刺激反应性相关的生物过程。

2.4 网络药理学

天然产物药物来源复杂，生物活性广泛且靶点不单一，因此需要系统分析来寻找其蛋白靶标。随着生物信息学、系统生物学等交叉学科的发展，网络药理学能够更系统、完整地阐述天然产物药物与各靶标之间的关系[49]。随着人工智能和多组学测序技术的进步，网络药理学在挖掘网络关系、预测天然产物药物相关靶点等方面发挥着越来越重要的作用[50]。网络药理学可以根据公共数据库建立疾病基因与药物之间的交叉网络，预测药物靶标；也可以借助各种组学和高通量技术，构建预测药物靶标网络模型，进而揭示药物与基因、靶标、疾病之间的生物网络关系[51]。例如，Gao 等[52]对服用清心莲子饮的糖尿病小鼠进行了非靶向尿液代谢组学、血清代谢组学和肾脏代谢组学研究，利用网络药理学发现清心莲子饮治疗对氨基酸代谢和脂质代谢通路有显著影响，为进一步探究其药理机制和作用靶标提供了依据。Qi 等[53]根据藤茶中的活性成分以及与疲劳相关的基因，构建了化合物-靶标网络，结果显示 Src 家族酪氨酸激酶、信号转导和转录激活因子 3、PI3Kα 和丝氨酸/苏氨酸激酶 1 等靶标可能是藤茶治疗疲劳的潜在作用靶点。

通过网络药理学筛选出的靶标并非相互独立，而是存在联系和相互作用，体现了中药治疗多靶点的特点。人工智能与网络药理学相结合，基于深度学习的方法能够自动学习生物医学数据，剖析疾病与中药、天然产物以及靶标之间的网络关系，有力推动了天然产物在人工智能时代的研究与发展。机器学习模型和技术能够快速收集数据，预测蛋白质靶标结构、功能以及与天然产物的相互作用方式等重要属性。基于深度学习模型开发的 ProteinBERT，InterProScan 等多种数据库和工具的不断发展，极大地促进了天然产物靶标的识别与筛选[54]。例如，Zhu 等[55]采用人工智能、网络药理学与多种计算机辅助技术，对传统中药消渴丸进行了大鼠体内成分鉴定和靶标发现。

2.5 表型筛选

给药后细胞、组织以及整个生物体水平的形态变化往往反映了药物的作用机制，具有生物学相关性。基于此建立的细胞形态学比较方法，能够为天然产物蛋白靶标的识别提供参考和补充[56]。3D 细胞培养系统和类器官的发展，为细胞形态学比较方法提供了更广阔的应用空间。表型筛选的重点在于，能够在分子机制或化学结构未阐明的情况下，识别天然产物在细胞或生物体中引起的表型恢复或治愈情况。表型筛选与组学技术以及多种靶标鉴定方法相结合，为进一步探究和拓展天然产物的治疗作用提供了有力工具[57]。

3 总结与展望

天然产物在药物开发和临床治疗中占据重要地位，庞大的天然产物库是新药研发的宝贵资源。因此，对天然产物的研究需进一步深入和拓展，其中靶标的识别是关键步骤，能为阐明天然产物作用机制、进行结构改造以及新药设计提供思路。

在药物研发快速发展的当下，蛋白质组学、基因组学、CRISPR/Cas9 基因编辑技术等已应用于靶标筛选。然而，天然产物药物化学结构复杂且可能存在多个结合靶标，单纯依靠大规模实验来探明靶标既耗时又费力。借助生物信息学手段对天然产物进行分析和靶标预测，可有效缩短实验周期。

在众多靶标识别策略中，化学蛋白质组学可直接评估药物与靶标蛋白的结合，是目前识别天然产物药物靶标的主流方法。但分子修饰对天然产物与靶标的结合以及药理活性的影响，是该方法需要克服的缺陷。各种无标记筛选方法，为靶标蛋白的筛选提供了除探针亲和富集之外的新选择。此外，基于基因组学、蛋白质组学、网络药理学和细胞形态学比较的间接筛选方法，也为天然产物药物靶标的识别提供了补充和参考。

高通量、高灵敏度的筛选方法不断涌现，从众

多靶标识别策略中选择适合天然产物药物靶标识别的方法至关重要。随着蛋白质组学、质谱技术、生物信息学以及人工智能研究的深入，更多创新优化技术将应用于天然产物药物靶标的识别，有助于进一步阐明天然产物的作用机制，为疾病的预防治疗以及药物的研发与改造提供重要的方法基础和参考依据。

[参考文献]

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

[2] Schenone M, Dančík V, Wagner B K, *et al*. Target identification and mechanism of action in chemical biology and drug discovery[J]. *Nat Chem Biol*, 2013, 9(4): 232-240.

[3] Cui Z, Li C, Chen P, *et al*. An update of label-free protein target identification methods for natural active products[J]. *Theranostics*, 2022, 12(4): 1829-1854.

[4] Chen X, Wang Y, Ma N, *et al*. Target identification of natural medicine with chemical proteomics approach: probe synthesis, target fishing and protein identification[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 72.

[5] Raida M. Drug target deconvolution by chemical proteomics[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2011, 15(4): 570-575.

[6] Dieters-Castator D Z, Manzanillo P, Yang H Y, *et al*. Magnetic bead-based workflow for sensitive and streamlined cell surface proteomics[J]. *J Proteome Res*, 2024, 23(2): 618-632.

[7] Benns H J, Wincott C J, Tate E W, *et al*. Activity- and reactivity-based proteomics: recent technological advances and applications in drug discovery[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2021, 60: 20-29.

[8] Li J, Casteels T, Frogne T, *et al*. Artemisinins target $GABA_A$ receptor signaling and impair α cell identity[J]. *Cell*, 2017, 168(1/2): 86-100. e15.

[9] Liang Q H, Li Q R, Chen Z, *et al*. Anemoside B4, a new pyruvate carboxylase inhibitor, alleviates colitis by reprogramming macrophage function[J]. *Inflamm Res*, 2024, 73(3): 345-362.

[10] Kozoriz K, Shkel O, Hong K T, *et al*. Multifunctional photo-cross-linking probes: from target protein searching to imaging applications[J]. *Acc Chem Res*, 2023, 56(1): 25-36.

[11] Geng Y, Li W, Wong N K, *et al*. Discovery of artemisinins as microsomal prostaglandins synthase-2 inhibitors for the treatment of colorectal cancer *via* chemoproteomics[J]. *J Med Chem*, 2024, 67(3): 2083-2094.

[12] Chen X, Tian J, Zhao C, *et al*. Resveratrol, a novel inhibitor of fatty acid binding protein 5, inhibits cervical cancer metastasis by suppressing fatty acid transport into nucleus and downstream pathways[J]. *Br J Pharmacol*, 2024, 181(11): 1614-1634.

[13] Zhao Y, Duan K, Fan Y, *et al*. Catalyst-free late-stage functionalization to assemble α-acyloxyenamide electrophiles for selectively profiling conserved lysine residues[J]. *Commun Chem*, 2024, 7(1): 31.

[14] Tian X, Permentier H P, Bischoff R. Chemical isotope labeling for quantitative proteomics[J]. *Mass Spectrom Rev*, 2023, 42(2): 546-576.

[15] He L, Liu N, Wang K, *et al*. Rosamultin from *Potentilla anserine* L. exhibits nephroprotection and antioxidant activity by regulating the reactive oxygen species/C/EBP homologous protein signaling pathway[J]. *Phytother Res*, 2021, 35(11): 6343-6358.

[16] He Z, Zhang H, Li X, *et al*. Comparative proteomic analysis of cerebral cortex revealed neuroprotective mechanism of esculentoside A on Alzheimer's disease[J]. *Eur J Pharmacol*, 2024, 964: 176226.

[17] 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(6141): 84-87.

[18] Mateus A, Kurzawa N, Perrin J, *et al*. Drug target identification in tissues by thermal proteome profiling[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2022, 62: 465-482.

[19] Henderson M J, Holbert M A, Simeonov A, *et al*. High-throughput cellular thermal shift assays in research and drug discovery[J]. *SLAS Discov*, 2020, 25(2): 137-147.

[20] Qu J, Qiu B, Zhang Y, *et al*. The tumor-enriched small molecule gambogic amide suppresses glioma by targeting WDR1-dependent cytoskeleton remodeling[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 424.

[21] Luo P, Liu D, Zhang Q, *et al*. Celastrol induces ferroptosis in activated HSCs to ameliorate hepatic fibrosis *via* targeting peroxiredoxins and HO-1[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12(5): 2300-2314.

[22] Wang X, Lin C, Jin S, *et al*. Cannabidiol alleviates neuroinflammation and attenuates neuropathic pain *via* targeting FKBP5[J]. *Brain Behav Immun*, 2023, 111: 365-375.

[23] Lu Y, Zhang M, Zhang J, *et al*. Psoralen prevents the inactivation of estradiol and treats osteoporosis *via* covalently targeting HSD17B2[J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 311: 116426.

[24] Ishii T, Okai T, Iwatani-Yoshihara M, *et al*. CETSA quantitatively verifies *in vivo* target engagement of novel RIPK1 inhibitors in various biospecimens[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 13000.

[25] Zhang X, Yang Q, Zhang R, *et al*. Sodium Danshensu ameliorates cerebral ischemia/reperfusion injury by inhibiting CLIC4/NLRP3 inflammasome-mediated endothelial cell pyroptosis[J]. *Biofactors*, 2024, 50(1): 74–88.

[26] He X Y X, Zhao W L, Yao L P, *et al*. Orcinol glucoside targeted p38 as an agonist to promote osteogenesis and protect glucocorticoid-induced osteoporosis[J]. *Phytomedicine*, 2023, 119: 154953.

[27] Kirsch V C, Orgler C, Braig S, *et al*. The cytotoxic natural product vioprolide a targets nucleolar protein 14, which is essential for ribosome biogenesis[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2020, 59(4): 1595–1600.

[28] Rowlands H, Tschapalda K, Blackett C, *et al*. High throughput screening of 0.5 million compounds against CRAF using Alpha CETSA®[J]. *SLAS Discov*, 2023, 28(3): 102–110.

[29] Owens A E, Iannotti M J, Sanchez T W, *et al*. High-throughput cellular thermal shift assay using acoustic transfer of protein lysates[J]. *ACS Chem Biol*, 2022, 17(2): 322–330.

[30] McNulty D E, Bonnette W G, Qi H, *et al*. A high-throughput dose-response cellular thermal shift assay for rapid screening of drug target engagement in living cells, exemplified using SMYD3 and IDO1[J]. *SLAS Discov*, 2018, 23(1): 34–46.

[31] Lomenick B, Hao R, Jonai N, *et al*. Target identification using drug affinity responsive target stability (DARTS)[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(51): 21984–21989.

[32] Wankowicz S A, de Oliveira S H, Hogan D W, *et al*. Ligand binding remodels protein side-chain conformational heterogeneity[J]. *eLife*, 2022, 11: e74114.

[33] Lu Y H, Wang M, Lin J Q, *et al*. Fufang Luohanguo Qingfei granules reduces influenza virus susceptibility *via* MAVS-dependent type I interferon antiviral signaling[J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 324: 117780.

[34] Dong X, Lu S, Tian Y, *et al*. Bavachinin protects the liver in NAFLD by promoting regeneration *via* targeting PCNA[J]. *J Adv Res*, 2024, 55: 131–144.

[35] Cheng C, Zhang J, Liu K, *et al*. Ginsenoside CK targeting KEAP1-DGR/Kelch domain disrupts the binding between KEAP1 and NRF2-DLG motif to ameliorate oxidative stress damage[J]. *Phytomedicine*, 2023, 119: 154992.

[36] Morretta E, Capuano A, D'Urso G, *et al*. Identification of mortalin as the main interactor of mycalin A, a poly-brominated C-15 acetogenin sponge metabolite, by MS-based proteomics[J]. *Mar Drugs*, 2024, 22(2): 52.

[37] Lu K Y, Quan B, Sylvester K, *et al*. Plasmodium chaperonin TRiC/CCT identified as a target of the antihistamine clemastine using parallel chemoproteomic strategy[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(11): 5810–5817.

[38] Jaeger M G, Winter G E. Fast-acting chemical tools to delineate causality in transcriptional control[J]. *Mol Cell*, 2021, 81(8): 1617–1630.

[39] Grohmann C, Magtoto C M, Walker J R, *et al*. Development of NanoLuc-targeting protein degraders and a universal reporter system to benchmark tag-targeted degradation platforms[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 2073.

[40] Seong B K A, Dharia N V, Lin S, *et al*. TRIM8 modulates the EWS/FLI oncoprotein to promote survival in Ewing sarcoma[J]. *Cancer Cell*, 2021, 39(9): 1262–1278.e7.

[41] Henderson M C, Azorsa D O. High-throughput RNAi screening for the identification of novel targets[J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 986: 89–95.

[42] Yang X, Zheng X, Zhu Y, *et al*. Asialoglycoprotein receptor 1 promotes SARS-CoV-2 infection of human normal hepatocytes[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, 9(1): 42.

[43] Heslop R, Gao M, Brito Lira A, *et al*. Genome-wide libraries for protozoan pathogen drug target screening using yeast surface display[J]. *ACS Infect Dis*, 2023, 9(5): 1078–1091.

[44] Benslimane Y, Bertomeu T, Coulombe-Huntington J, *et al*. Genome-wide screens reveal that resveratrol induces replicative stress in human cells[J]. *Mol Cell*, 2020, 79(5): 846–856.e8.

[45] Sharon D M, Nesdoly S, Yang H J, *et al*. A pooled genome-wide screening strategy to identify and rank influenza host restriction factors in cell-based vaccine production platforms[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 12166.

[46] Zhou X, Tan F, Zhang S, *et al*. A strategy based on bioinformatics and machine learning algorithms reveals potential mechanisms of Shelian Capsule against hepatocellular carcinoma[J]. *Curr Pharm Des*, 2024, 30(5): 377–405.

[47] Han M, Li C, Zhang C, *et al*. Single-cell transcriptomics reveals the natural product Shi-Bi-Man promotes hair regeneration by activating the FGF pathway in dermal papilla cells[J]. *Phytomedicine*, 2022, 104: 154260.

[48] Duan S, Zhang M, Zeng H, *et al*. Integrated proteomics and

phosphoproteomics profiling reveals the cardioprotective mechanism of bioactive compounds derived from *Salvia miltiorrhiza* Burge[J]. *Phytomedicine*, 2023, 117: 154897.

[49] Nogales C, Mamdouh Z M, List M, *et al*. Network pharmacology: curing causal mechanisms instead of treating symptoms[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2022, 43(2): 136-150.

[50] Zhang S, Yang K, Liu Z, *et al*. DrugAI: a multi-view deep learning model for predicting drug-target activating/inhibiting mechanisms[J]. *Brief Bioinform*, 2023, 24(1): bbac526.

[51] Kibble M, Saarinen N, Tang J, *et al*. Network pharmacology applications to map the unexplored target space and therapeutic potential of natural products[J]. *Nat Prod Rep*, 2015, 32(8): 1249-1266.

[52] Gao W Y, Tian M Y, Li M L, *et al*. Study on the potential mechanism of Qingxin Lianzi Yin Decoction on renoprotection in *db*/*db* mice *via* network pharmacology and metabolomics[J]. *Phytomedicine*, 2024, 126: 155222.

[53] Qi S, Zeng T, Sun L, *et al*. The effect of vine tea (*Ampelopsis grossedentata*) extract on fatigue alleviation *via* improving muscle mass[J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 325: 117810.

[54] 李金甲 , 陈都鑫 , 柴人杰 , 等 . 基于人工智能的蛋白质属性预测的潜能与应用 [J]. 药学进展 , 2023, 47(10): 733-740.

[55] Zhu C, Cai T, Jin Y, *et al*. Artificial intelligence and network pharmacology based investigation of pharmacological mechanism and substance basis of Xiaokewan in treating diabetes[J]. *Pharmacol Res*, 2020, 159: 104935.

[56] Trapotsi M A, Mervin L H, Afzal A M, *et al*. Comparison of chemical structure and cell morphology information for multitask bioactivity predictions[J]. *J Chem Inf Model*, 2021, 61(3): 1444-1456.

[57] Lin Z, Yang P, Hu Y, *et al*. RING finger protein 13 protects against nonalcoholic steatohepatitis by targeting STING-relayed signaling pathways[J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 6635.



[专家介绍] 胡庆华：中国药科大学教授、博士生导师，生命科学与技术学院院长。国家级高层次青年人才计划入选者，国家重点研发计划首席青年科学家，江苏省“青蓝工程”中青年学术带头人；兼任中国药理学会抗炎免疫药理专委会常务委员。主要研究领域为疾病治疗原创靶标发现和新药研发，先后主持国家重点研发计划、国家自然科学基金、江苏省自然科学基金等纵向课题 7 项和企事业单位横向合作课题多项。近年来以通信作者在 *Eur Heart J*, *Nat Commun*, *Pharmacol Ther*, *Acta Pharm Sin B*, *J Adv Res*, *J Med Chem* 等国际权威期刊发表科研论文 60 余篇；申请发明专利 17 项，获授权 15 项，其中 1 项抗痛风新药专利以 2 000 万金额完成转化。获高等教育（研究生）国家级教学成果奖二等奖 1 项、江苏省教学成果奖二等奖 1 项；获第十三届全国大学生创新创业年会优秀指导教师；全国高等医药院校药学类专业第五轮规划教材《药物毒理学》主编、《药理学》编委。