中国科学: 化学 2018 年 第 48 卷 第 11 期: 1420 ~ 1428
SCIENTIA SINICA Chimica chemcn.scichina.com
《中国科学》杂志社 SCIENCE CHINA PRESS

评 述 化学生物学驱动的药物创新专刊

中药作用靶点方法学研究进展

曾克武*, 屠鹏飞*

北京大学药学院, 天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100191
*通讯作者, E-mail: ZKW@bjmu.edu.cn; pengfeitu@bjmu.edu.cn

收稿日期: 2018-03-30; 接受日期: 2018-07-18; 网络版发表日期: 2018-09-05
国家自然科学基金(编号: 81773932, 51273012)和国家重点研发计划(编号: 2017YFC1702400)资助项目

摘要 靶点(drug target)是药物作用的源头, 是药物治疗疾病最直接、最重要、最初始的生物学基础. 长期以来, 中药由于其自身成分复杂的特点, 关于作用靶点的揭示与阐明, 以及分子药理机制等相关研究一直未能获得突破性进展, 因此严重制约了中药的现代化和国际化进程. 但是近年来, 随着分子生物学、化学生物学以及生物物理学等前沿学科的发展, 人们不断摸索和建立了一系列药物靶点的鉴定和识别方法, 并尝试将这些方法应用于中药活性成分以及中药复方的作用靶点研究中, 且取得了不少原创性成果, 极大地推动了中医药的前进步伐. 本文总结了近年来在中药靶点研究中出现的新方法与新策略, 希望能够对从事中药现代化研究的人们提供全新思路, 并拓展新的研究方向, 最终促进中医药现代科学研究取得更大的突破.

关键词 中药, 复杂体系, 靶点鉴定, 方法学, 靶点钩钓

1 引言

中医药作为我国最具原创特色的研究领域, 具有与西方医学完全不同的理论体系与思维方式, 一直受到人们的广泛关注[1]. 其经历了千百年大量临床实践的检验, 在疗效、适应症以及给药方式等方面都积累了丰富的经验, 已然成为当今社会人们防治疾病的一种重要手段[2]. 然而, 中医药在现代化发展过程中受到了西方医学的强烈冲击, 特别是无法用现代科学语言来诠释其用药规律及药理机制, 因此很难被西方国家所广泛接受和认同, 严重影响了其国际化进程[3]. 所以, 人们也在不断反思, 如何将中药的临床疗效与其背后的药理机制联系起来, 使人们不但知其然, 还知其所以然, 使中医药治病背后的道理科学化, 进而从根本上改变中医药的现状, 并最终促进中医药的现代化与国际化[4,5].

目前, 中药作用机理研究还有很多棘手问题. 特别是中药具有多成分的特点, 其包含的复杂化学成分体系必然对应复杂的药理机制, 因此如何从分子水平揭示中药复杂的作用机理, 进而阐明其调控疾病网络的精确时空规律, 将是当前中医药研究面临的巨大挑战[6,7]. 值得注意的是, 中药对疾病的调控并不是直接对构成疾病网络的所有生物大分子同时发挥调控作用, 更多情况下是作用于疾病网络中的几个关键节点蛋白[8]. 中药活性成分通过作用于这些关键节点蛋白, 进而通过蛋白之间的相互作用与蛋白级联反应将药物的作用逐级传递给网络中的其他节点或称下游效应分子, 进而对整个复杂疾病网络发挥调控作用, 实现疾病

引用格式: Zeng KW, Tu PF. Recent progress on the methodology for target study of traditional Chinese medicine. *Sci Sin Chim*, 2018, 48: 1420–1428, doi: 10.1360/N032018-00066

© 2018 《中国科学》杂志社

的治疗. 而一般将这些中药活性成分作用的关键节点蛋白称为靶点(drug target).

2 靶点鉴定对于解析中药作用机理的重要意义

药物靶点是药物与生命体内生物大分子的直接结合部位, 主要包括蛋白酶、受体、离子通道和核酸(DNA和RNA)等生物大分子[9~11]. 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. 例如, 药物分子作用于细胞表面的离子通道, 并调控通道的开放和关闭状态, 进而影响通道内的离子流, 由此引起神经或心肌细胞的生物学功能变化, 最终实现其药理学效应[12].

实际上, 无论是中药还是西药, 都有其发挥作用的生物学基础, 即靶点[13,14]. 尽管中药在我国已经发展了几千年, 但目前大多数中药及其活性成分的作用靶点并不清楚, 因此严重影响了人们对中医药科学内涵的诠释与理解, 阻碍了中医药的国际化进程. 我们认为, 中药作用靶点的揭示与阐明可以作为中药现代化的一个突破口, 通过中药靶点的发现, 可以顺藤摸瓜阐明其背后的复杂药理机制, 进而使中医药理论得以科学化. 同时, 现代新药研发大多是针对已有药物靶点去设计药物分子, 而目前已知的药物靶点数量严重不足, 因此通过中药靶点的揭示, 还可能发现一些全新的药物靶点, 对基于靶点的新药创制提供关键的指导信息, 并使古老的中医药为现代医学发挥更大的作用.

针对中药作用靶点的鉴定, 目前已经有若干方法被报道, 包括分子靶点“钩钓”技术及其相关衍生方法、基于蛋白质芯片的靶点鉴定技术、基于非标记的靶点鉴定技术, 以及中药复杂体系的多靶点鉴定技术等. 对此我们分别进行详细介绍.

3 中药活性成分靶点鉴定的方法学

3.1 分子靶点“钩钓”技术

分子靶点“钩钓”技术(图1)是识别药物靶点的重要技术, 也是目前国际上靶点识别的主流方法[15]. 分子靶点“钩钓”技术基于蛋白质可与药物分子发生特异性结合的原理, 将药物分子通过化学反应连接到固相微球表面的功能基上, 进而将靶点蛋白捕获并富集到固相微球表面, 使之得以分离、纯化和鉴定的一种靶点鉴定方法[16]. 该方法的基本实验思路如下: 首先将药物分子通过化学手段进行修饰, 链接一个标签分子(如生物素), 进而利用标签分子与固相载体微球表面的活性反应基团相互作用, 将该药物分子连接到微球表面, 得到药物分子修饰的固相微球. 继而将微球与细胞裂解液混合, 使微球表面的药物分子捕捉靶点蛋白, 并富集到微球表面, 最后经凝胶电泳分离纯化, 高分辨质谱分析, 以及数据库序列比对, 确定该靶点蛋白的名称及属性.

分子靶点“钩钓”技术是目前应用十分广泛的药物分子靶点识别方法, 且发展相对成熟. 目前基于该技术人们已经成功地对多个中药或天然活性成分的作用靶点进行了研究. 例如, 针对腺花香茶菜中提取的活性成分腺花素治疗急性髓细胞性白血病(AML)的靶点研究发现, 腺花素通过靶向过氧化物还原酶家族成员(过氧化还原酶 Ⅰ/Ⅱ), 进而发挥诱导AML细胞分化的作用[17]; 针对萜类天然产物Ainsliadimer A的抗炎靶点研究发现, Ainsliadimer A可以选择性作用于IKKα/β蛋白上保守的46位半胱氨酸残基, 通过变构效应抑制其活性, 进而阻断下游的NF-κB炎症信号通路, 实现抗炎作用[18]; 针对从越南巴豆中提取的二萜类天然产物Kongensin A的抗肿瘤靶点研究发现, Kongensin A可以特异性作用于HSP90的420位半胱氨酸位点, 阻碍HSP90与伴侣分子CDC37互作, 实现抗肿瘤作用[19]; 此外还包括针对毛萼乙素的抗肿瘤靶点的研究[20], 以及针对旋复花活性成分IJ-5的抗炎靶点的研究[21]等.

本课题组前期针对中药苏木活性成分苏木酮A具有明显抗神经炎症作用且靶点不明这一问题, 利用分子靶点“钩钓”技术, 构建了生物素标记的苏木酮A分子探针, 从神经小胶质细胞中钩钓并鉴定了苏木酮A的作用靶点为肌苷5′-磷酸脱氢酶2 (IMPDH2). 研究发现, 苏木酮A不直接调控IMPDH2的催化结构域, 而是作用于其调节性结构域, 并特异修饰其140位半胱氨酸位点(Cys140), 进而间接引起催化结构域的构象变化, 使IMPDH2失活. 值得一提的是, 该Cys140位点是一个全新的药物作用位点, 通过该位点可以实现对炎症反应特异性蛋白IMPDH2的选择性抑制, 并显著降低药物的毒副作用[22]. 此外, 野菊花内酯是从清热解毒中药野菊花中发现的一个具有良好抗炎作用的活性成分, 但是其发挥抗炎作用的靶点尚不清楚. 本课题

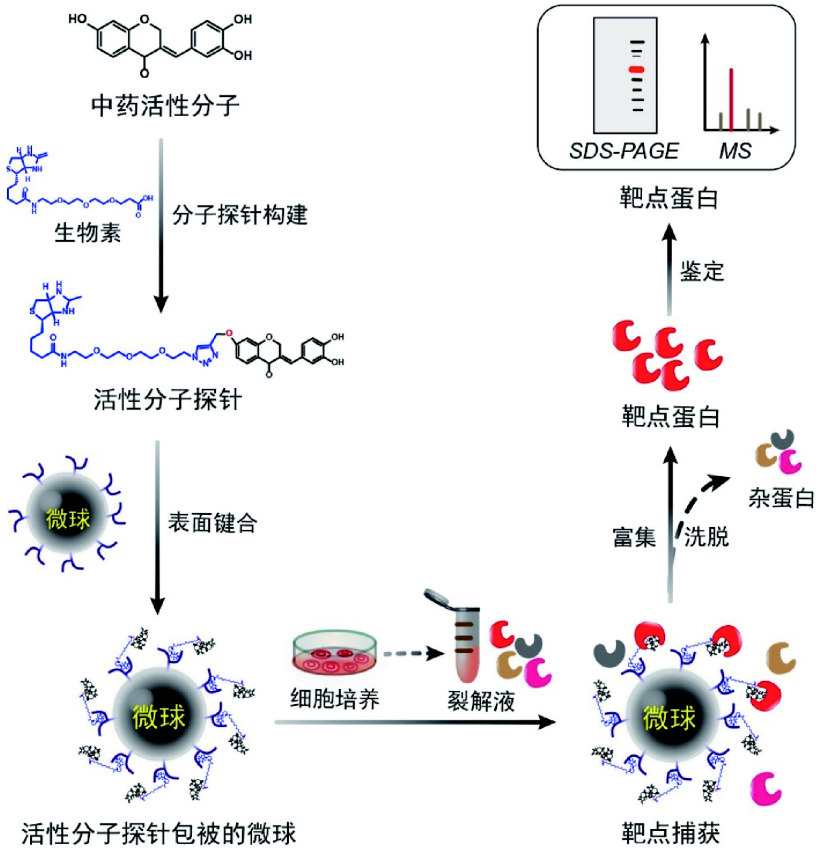


图 1 分子靶点“钩钓”技术(网络版彩图)
Figure 1 Drug target “Fishing” technology (color online).

组[23]将野菊花内酯作为一个分子探针，从小胶质细胞中特异性“钩钓”到其发挥抗炎作用的靶点蛋白为热休克蛋白70 (HSP70). 同时还发现, 野菊花内酯可以共价修饰HSP70的603位半胱氨酸，并特异性激活HSP70, 即野菊花内酯通过变构作用引起HSP70蛋白构象变化, 进而加速HSP70催化腺苷三磷酸(ATP)水解为二磷酸腺苷(ADP)的酶活性, 促进HSP70与下游炎症节点蛋白TRAF6相互作用, 并抑制TRAF6的泛素化和TRAF6/NF-kB炎症信号通路的激活, 最终实现抗炎作用. 该研究不仅从靶点源头上揭示了野菊花内酯的抗炎药理机制，同时也从分子层面用现代科学语言诠释了野菊花发挥清热解毒功效的科学内涵.

由此可见，分子靶点“钩钓”是一种切实有效的中药靶点研究方法，在推动中药药理机制阐明方面具有重要意义.

3.2 基于定量蛋白质组学的靶点鉴定技术

由于传统的分子靶点“钩钓”策略对于细胞内的低丰度蛋白特别是痕量蛋白的识别与鉴定能力有限，因此亟待更加高效灵敏的方法. 近年来人们在分子靶点“钩钓”策略基础上引入定量蛋白质组学技术，进而可以在更加灵敏的水平上发现药物的潜在靶点. 在定量蛋白质组学技术中，最经典的是细胞培养条件下稳定同位素标记技术(stable isotope labeling with amino acids in cell culture, SILAC) (图2). 其主要通过使用天然同位素(轻标)和稳定同位素(重标)标记的必需氨基酸取代细胞培养基中的相应氨基酸，使稳定同位素标记的氨基酸掺入到细胞新合成的蛋白质中，替代原有氨基酸，再通过高分辨质谱对稳定同位素标记的蛋白质进行精确定量. 使用该方法进行药物靶点鉴定时，

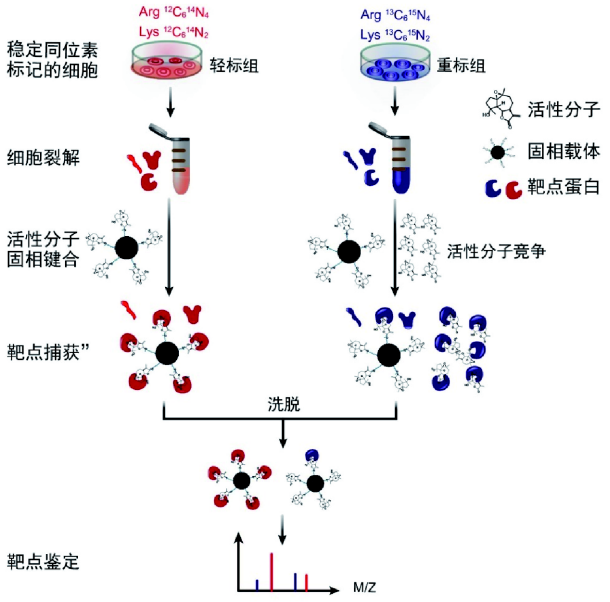


图 2　基于SILAC的靶点鉴定技术(网络版彩图)

Figure 2　Drug target identification based on SILAC technology (color online).

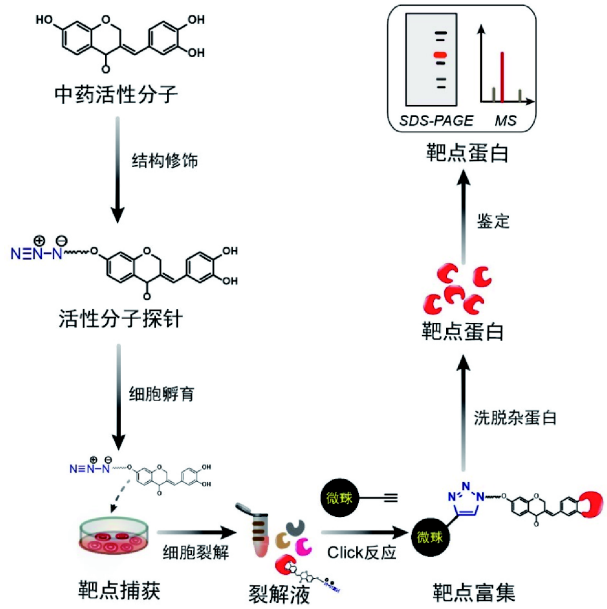


图 3　基于“点击化学”的靶点鉴定技术(网络版彩图)

Figure 3　Drug target identification based on “click chemistry” (color online).

将重标同位素标记的细胞裂解液用于靶点捕获，而轻标同位素标记的细胞裂解液作为空白对照，然后使用定量蛋白质组学技术检测两组细胞裂解液中捕获的不同种类蛋白量的差异，进而寻找含量差异较大的蛋白作为潜在的药物靶点进行后续研究. 利用此法可以发现很多天然活性成分的作用靶点[15,24~26]. 例如，Wang等[27]鉴定了中药穿心莲的活性成分穿心莲内酯的抗肿瘤靶点，发现穿心莲内酯可以作用于细胞内的NF-κB以及actin蛋白，进而干扰肿瘤细胞的骨架形成、细胞运动以及增殖等多个环节，发挥抗肿瘤作用；此外，Dale等[28]针对药物分子CCT251545的作用靶点进行研究，结果成功发现CCT251545可特异性作用于细胞内的CDK8和CDK19等多个激酶蛋白.

3.3　基于“点击化学”的靶点鉴定技术

近年来，研究者将化学生物学中的点击化学(click chemistry)概念引入到药物靶点鉴定中(图3)，进而在细胞内利用点击化学反应将药物分子与靶点蛋白直接“固定”在一起，再通过裂解细胞和富集靶点等操作纯化药物靶点，最后经高分辨质谱进行靶点蛋白鉴定[29,30]. 该方法目前已引起人们的广泛关注，并在近年出现了大量报道. 例如，Ismail等[31]构建了青蒿素的分子探针并在细胞内通过点击化学反应捕获其靶点蛋白，进而发现了青蒿素抗寄生虫作用的多个作用靶点. 此外，有些研究者利用该方法鉴定了天然产物Symplostatin 4[32]、芒果苷[33]以及鹤草酚[34]的作用靶点.

3.4　基于蛋白质芯片的靶点鉴定技术

蛋白质芯片，亦称蛋白阵列，是一种高通量的研究蛋白质与蛋白质相互作用、核酸与蛋白质相互作用以及药物小分子与蛋白质相互作用的有效工具[35,36]. 特别是近年来，研究发现，蛋白质芯片在药物靶点鉴定中具有重要作用. 基于蛋白质芯片研究药物靶点的基本思路就是将不同种类的重组蛋白固定到芯片材质(如玻片、金属片或云母片)的表面，然后让生物素标记的小分子探针流过芯片表面，再用可特异结合生物素标签的荧光探针去标记小分子，进而根据荧光点在芯片上的位置信息确定该点对应的蛋白质信息，最终发现潜在的药物靶点(图4). 例如，Zhang等[37]研究砷剂治疗早幼粒细胞白血病的作用靶点，采用生物素标记砷的探针，进而与人体蛋白芯片孵育，捕捉砷剂的特异性靶点蛋白. 最后发现，砷剂的可能作用靶点为己糖激酶2 (hexokinase2)，即砷剂可能通过调控己糖激酶2的生物学功能，进而发挥多靶点协同作用并实现

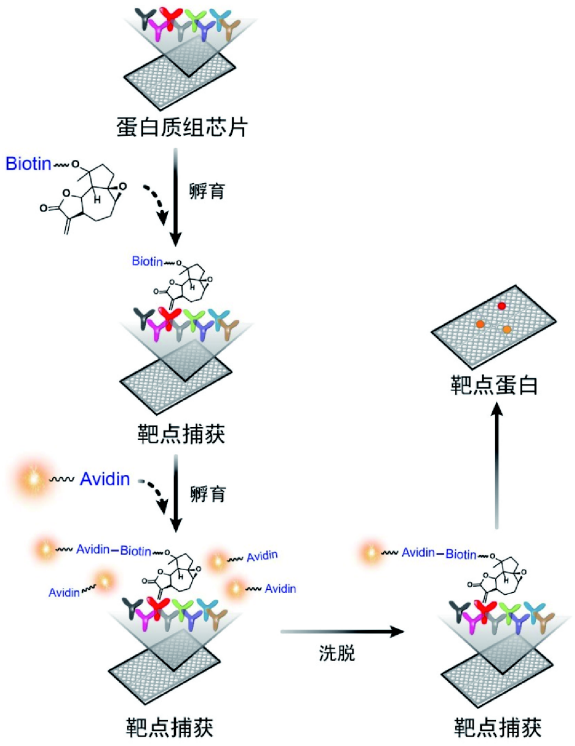


图 4 基于蛋白质芯片的靶点鉴定技术(网络版彩图)
Figure 4 Drug target identification based on protein chip (color online).

对白血病的治疗. 此外, To等[38]使用蛋白芯片技术研究了三萜类化合物的作用靶点, 发现三萜类化合物可以与细胞内actin骨架蛋白作用, 进而调控actin骨架蛋白的聚集状态, 最终影响细胞运动及迁移过程, 发挥抗肿瘤作用.

蛋白质芯片技术是对分子靶点"钩钓"技术的重要补充, 其最大特点是药物分子与每个蛋白质具有均等的"接触"机会, 在很大程度上避免了靶点"钩钓"技术中经常出现的药物分子与细胞内低丰度蛋白结合后被高峰度蛋白信号所掩盖的问题, 进而对低丰度蛋白靶点的检测具有优势. 但是由于蛋白芯片表面已经完全脱离细胞内环境, 表征的仅是药物分子与蛋白质之间纯粹简单的化学作用, 后续还需要依托细胞或整体动物进行确证. 因此, 蛋白质芯片技术与分子靶点"钩钓"技术可以交互使用并相互印证.

3.5 基于细胞热转变分析的靶点鉴定技术

上述方法在使用过程中大多存在一个重要问题, 即需要对药物分子进行结构修饰, 而结构修饰会导致药物的药效团破坏, 生物学作用减弱或消失; 另外, 很多天然产物的结构复杂多样, 甚至无法进行结构修饰, 因此人们也在寻找是否有不需对药物分子进行化学标记的靶点鉴定方法. 细胞热转变分析(CETSA) (图5)是由瑞典科研人员创立的一种药物靶点研究新方法, 其不需要对药物进行化学标记, 而可以直接测定药物分子是否在细胞中与靶点蛋白存在相互作用. 该方法利用药物分子与靶点蛋白结合时会使蛋白质的空间构象变得更加稳定的特性, 进而开发出了一种非标记的药物靶点鉴定新技术[39]. 该方法是对前述靶点鉴定方法的一个重要补充. 目前应用该方法已经发现并确证了多个药物分子的作用靶点. 例如, Jin等[40]利用CETSA技术确证了木菠萝所含活性成分香叶草基柚皮素的抗肿瘤作用靶点为SHP2 酪氨酸磷酸酶. Miettinen等[41]利用该方法确证了对乙酰氨基酚的作用靶点为醌氧化还原酶2 (NQO2), 并发现对乙酰氨基酚可能通过作用于NQO2而产生一定的肝毒性. 由此可见, 非标记技术在今后中药活性成分的靶点研究中将发挥越来越大的作用, 并可能解决传统方法所无法解决的问题.

3.6 其他靶点鉴定方法

近年来, 随着分子生物学和计算机科学技术的不断发展, 人们也在尝试建立其他药物靶点鉴定新方法,

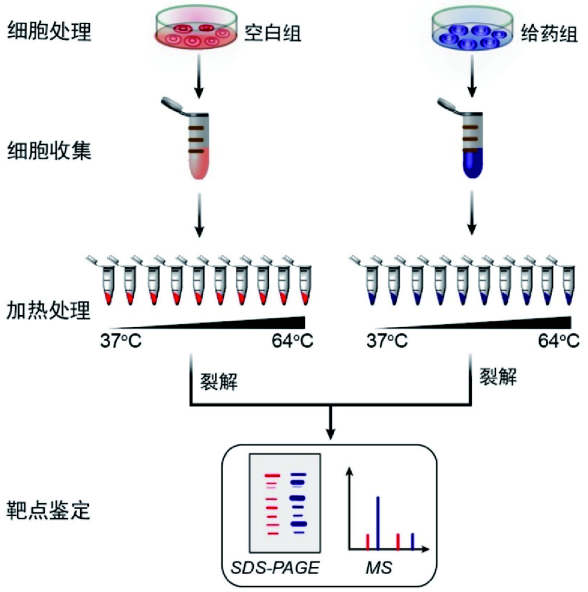


图 5 基于细胞热转变分析的靶点鉴定技术(网络版彩图)
Figure 5 Drug target identification based on CETSA (color online).

其中比较典型的包括: 反向对接分子靶点鉴定技术[42,43]、基于噬菌体展示的药物靶点鉴定技术[44]、基于酵母突变株的药物靶点发现技术[45]以及基于计算机图形学的药物靶点预测技术[46]. 尽管目前这些技术的应用还不广泛, 但均有在靶点研究方面的成功案例. 因此, 这些新的鉴定方法在未来研究中药作用靶点的发现与确证中, 可能会发挥不容小觑的作用.

4　中药复杂体系作用靶点的鉴定

目前, 针对中药复杂成分体系的作用靶点研究还很少, 尚无十分有效的手段. 本课题组[47]前期基于分子靶点"钩钓"技术建立了一种针对复杂中药作用靶点群的鉴定方法(图6). 该方法主要是通过将中药复杂成分整体键合到固相微球上, 进而从细胞或组织中捕获相应的靶点蛋白. 该方法应用的前提是如何将中药复杂成分键合到固相微球表面. 在此, 我们采用一种表面键合有光敏基团二苯甲酮的高分子固相微球, 该微球表面的二苯甲酮基团受到紫外光照后会立即活化为碳自由基, 该碳自由基可以随机插入到中药活性成分的碳氢键之间, 进而将中药活性成分整体键合到固相微球表面. 因此, 我们称这种键合中药活性成分的固相载体微球为中药成分芯片.

基于中药成分芯片的中药复杂体系作用靶点群鉴定主要基于如下流程开展: (1) 表面修饰有光敏基团的固相微球的构建; (2) 中药成分整体键合到固相微球表面并得到中药成分芯片; (3) 利用中药成分芯片与细胞或组织裂解液孵育并捕获靶点群; (4) 将捕获的靶点群洗脱下来并用高分辨质谱进行鉴定; (5) 研究靶点群的生物学功能并诠释中药复杂体系的作用机理. 目前, 利用中药成分芯片的靶点群捕获技术, 我们初步实现了中药复杂体系的作用靶点群鉴定, 并成功对多个中药乃至复方的作用靶点进行了研究.

合欢皮作为常用中药, 临床除用于治疗失眠、焦虑外, 还用于肿瘤的治疗. 为了阐明合欢皮的抗肿瘤靶点群, 我们构建了合欢皮总皂苷修饰的中药成分芯片, 并从肿瘤细胞中鉴定了5个主要抗肿瘤靶点, 初步阐释了合欢皮抗肿瘤的多靶点分子机制[48]. 此外, 肉苁蓉为著名补益中药, 其含有的寡糖具有良好的免疫激活作用. 我们通过构建肉苁蓉寡糖修饰的成分芯片, 从巨噬细胞中捕获了24个靶点, 并从靶点功能学角度

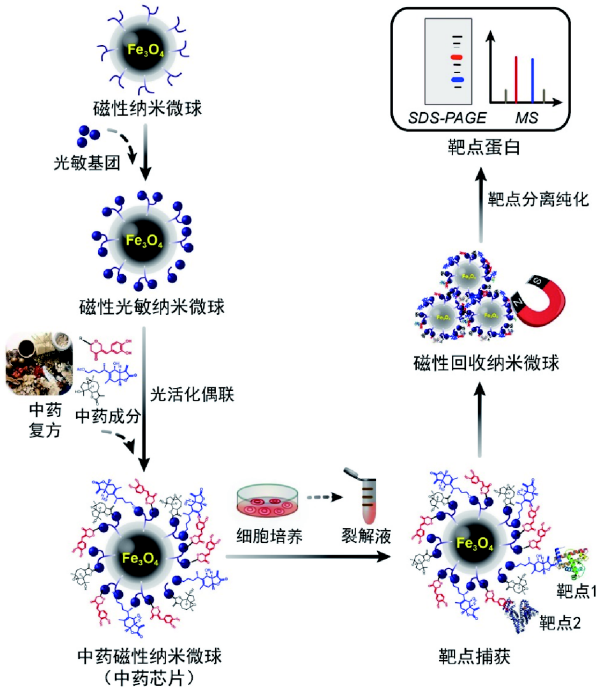


图 6　中药复杂体系的靶点群鉴定技术(网络版彩图)
Figure 6　TCM target group identification technology (color online).

初步揭示了肉苁蓉低分子糖的多靶点免疫调节机理, 为肉苁蓉的临床应用提供了理论依据[49]. 鉴于中药成分芯片的优势和中医临床多数使用复方治疗疾病的事实, 本课题组还针对中药复方进行了研究. 例如, 我们将具有抗心衰作用的中药保元汤的全化学成分整体键合到固相微球表面, 得到保元汤成分芯片, 进而利用该芯片从心肌细胞裂解液中富集相应的靶点群, 并利用高分辨质谱对靶点群进行鉴定, 最终发现了43个潜在的具有心肌保护作用的靶点, 并基于这些靶点的生物学功能初步解释了保元汤改善心衰的分子药理机制. 另外, 我们还针对具有抗老年痴呆作用的中药复方加味五子衍宗丸的作用靶点群进行了研究. 将加味五子衍宗丸的化学成分整体键合到固相微球表面, 得到加味五子衍宗丸成分芯片, 进而利用该芯片从神经细胞裂解液中特异性捕获相应的靶点群, 通过高分辨质谱鉴定, 最后发现了32个潜在作用靶点, 并基于这些靶点的生物学功能初步揭示了加味五子衍宗丸发挥脑保护和抗痴呆作用的分子机制[50,51]. 通过对不同靶点构成的靶点群整体生物学功能的分析, 初步探讨了保元汤和加味五子衍宗丸发挥心肌保护和脑保护功效的多靶点分子机制, 如果在后期能够对这些所发现的靶点

进行有效的功能学验证，特别是基于动物模型进行药理活性验证，则会进一步诠释这些中药方剂治疗疾病的科学内涵.

5 结论与展望

现代药物研发的一个关键问题就是明确分子靶点. 中医药不能走向国际的一个关键问题就是靶点不明确. 因此如何建立有效的靶点发现与确证技术一直是中医药现代化进程中的瓶颈问题. 随着中药及其活性成分的作用靶点不断得到揭示，其分子药理机制和临床功效也不断得以科学化和透明化，但是目前针对中药靶点鉴定的技术方法还存在较多问题. 例如，很多中药活性成分与靶点之间仅是瞬时或微弱的相互作用，因此采用传统的靶点钩钓技术常常难以发现此类药物分子的靶点信息，对此还需要探索和开发具有更高灵敏度的方法. 特别是针对膜蛋白为靶点的药物，捕获难度更大，需要在一定程度上保持靶点蛋白的空间构象不被破坏，因此对细胞裂解及膜蛋白的获取技术也提出了更高的要求.

越来越多的研究发现，很多药物的作用靶点除了蛋白质之外还有RNA和DNA，如抗肿瘤药物顺铂在进入细胞后，可以与细胞核内的DNA发生反应，形成DNA交联，从而抑制DNA的复制和转录，并引起DNA断裂和错码，最终抑制细胞分裂与增殖[52]. 研究发现，很多天然产物如阿霉素、马兜铃酸等均是通过作用于细胞内的DNA或RNA而发挥药理或毒性作用的[53~55]. 但是目前针对这些作用于DNA或RNA的药物，如何进行有效的靶点识别还尚无完善手段，因此亟待开展相关研究加以解决. 此外，目前药物靶点的发现与鉴定都是在细胞水平开展的，而基于体外分子细胞生物学发现的药物靶点在进入临床阶段的淘汰率极高，主要原因就在于离体培养的细胞与体内细胞在生长微环境、营养代谢、生物学特性及功能方面存在巨大差异，体外培养的细胞往往不能真实反映人体生理环境下的细胞生物学特性. 因此，在离体细胞水平找到的药物靶点很多情况下并不是药物在体内真实发挥作用的靶点，亟待发现一种行之有效的方法能够实现在体内真实生理环境下直接捕获药物靶点.

还有最为关键的一点就是，目前中药的使用多以复方形式，而中药复方化学成分体系的作用靶点识别与鉴定是一个特别困难的问题[56]. 尽管现在已经有人开始探索将单分子靶点鉴定策略拓展至中药复杂体系的多靶点鉴定中，但是对所发现的靶点进行功能确证、通过这些靶点如何诠释中药复杂体系的临床功效以及中药方剂配伍原理等中医药基础问题，还有待今后深入挖掘和探讨. 希望通过对中药复杂体系作用靶点的研究，可以将中医药所蕴含的深奥规律得以科学化，使中西医能够使用一种通用语言进行对话. 这不仅对今后中医药的发展具有重要作用，同时对于西医借鉴中医思维进而推动自身向前发展也具有重要意义.

参考文献

1 Chan K. *Trends Pharmacol Sci*, 1995, 16: 182–187
2 Lin AX, Chan G, Hu Y, Ouyang D, Ung COL, Shi L, Hu H. *Chin Med*, 2018, 13: 9
3 Guo DA. *Pharm Biol*, 2012, 50: 663–663
4 Liao SJ. *Conn Med*, 1980, 44: 381–383
5 Shen YC, Chiou WF, Wang GJ, Chou CJ, Chen CF. *Orien Foods Herb*, 2003, 859: 32–47
6 Lin ZB. *J Pharmacol Sci*, 2011, 115: 16
7 Xu Q, Bauer R, Hendry BM, Fan TP, Zhao Z, Duez P, Simmonds MSJ, Witt CM, Lu A, Robinson N, Guo D, Hylands PJ. *BMC Complem Altern Med*, 2013, 13: 132
8 Zhao S, Li S. *PLoS ONE*, 2010, 5: e11764
9 Thompson N, Lyons J. *Curr Opin Pharmacol*, 2005, 5: 350–356
10 Zhang J, Zhang F, Li H, Liu C, Xia J, Ma L, Chu W, Zhang Z, Chen C, Li S, Wang S. *Curr Med Chem*, 2012, 19: 2957–2975
11 Zheng XF, Sun ZX. *Prog Biochem Biophys*, 2001, 28: 486–489
12 Bagal SK, Brown AD, Cox PJ, Omoto K, Owen RM, Pryde DC, Sidders B, Skerratt SE, Stevens EB, Storer RI, Swain NA. *J Med Chem*, 2013,

56: 593–624
13 Bhat SP, Sharma A. *Curr Drug Targets*, 2017, 18: 983–993
14 Jain A, K. Jain S. *Curr Nanosci*, 2011, 7: 21–36
15 Saxena C, Higgs RE, Zhen E, Hale JE. *Expert Opin Drug Dis*, 2009, 4: 701–714
16 Kanoh N. *Nat Prod Rep*, 2016, 33: 709–718
17 Liu CX, Yin QQ, Zhou HC, Wu YL, Pu JX, Xia L, Liu W, Huang X, Jiang T, Wu MX, He LC, Zhao YX, Wang XL, Xiao WL, Chen HZ, Zhao Q, Zhou AW, Wang LS, Sun HD, Chen GQ. *Nat Chem Biol*, 2012, 8: 486–493
18 Dong T, Li C, Wang X, Dian L, Zhang X, Li L, Chen S, Cao R, Li L, Huang N, He S, Lei X. *Nat Commun*, 2015, 6: 6522
19 Li D, Li C, Li L, Chen S, Wang L, Li Q, Wang X, Lei X, Shen Z. *Cell Chem Biol*, 2016, 23: 257–266
20 Kong LM, Deng X, Zuo ZL, Sun HD, Zhao QS, Li Y. *Oncotarget*, 2014, 5: 11354–11364
21 Liu L, Hua Y, Wang D, Shan L, Zhang Y, Zhu J, Jin H, Li H, Hu Z, Zhang W. *Chem Biol*, 2014, 21: 1341–1350
22 Liao LX, Song XM, Wang LC, Lv HN, Chen JF, Liu D, Fu G, Zhao MB, Jiang Y, Zeng KW, Tu PF. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114: E5986–E5994
23 Wang LC, Liao LX, Lv HN, Liu D, Dong W, Zhu J, Chen JF, Shi ML, Fu G, Song XM, Jiang Y, Zeng KW, Tu PF. *Ebiomedicine*, 2017, 23: 160–172
24 Ong SE, Li X, Schenone M, Schreiber SL, Carr SA. *Methods Mol Biol*, 2012, 803: 129–140
25 Wright MH, Sieber SA. *Nat Prod Rep*, 2016, 33: 681–708
26 Wang J, Gao L, Lee YM, Kalesh KA, Ong YS, Lim J, Jee JE, Sun H, Lee SS, Hua ZC, Lin Q. *Pharmacol Therapeut*, 2016, 162: 10–22
27 Wang J, Tan XF, Nguyen VS, Yang P, Zhou J, Gao M, Li Z, Lim TK, He Y, Ong CS, Lay Y, Zhang J, Zhu G, Lai SL, Ghosh D, Mok YK, Shen HM, Lin Q. *Mol Cell Proteomics*, 2014, 13: 876–886
28 Dale T, Clarke PA, Esdar C, Waalboer D, Adeniji-Popoola O, Ortiz-Ruiz MJ, Mallinger A, Samant RS, Czodrowski P, Musil D, Schwarz D, Schneider K, Stubbs M, Ewan K, Fraser E, TePoele R, Court W, Box G, Valenti M, de Haven Brandon A, Gowan S, Rohdich F, Raynaud F, Schneider R, Poeschke O, Blaukat A, Workman P, Schiemann K, Eccles SA, Wienke D, Blagg J. *Nat Chem Biol*, 2015, 11: 973–980
29 Willand N, Desroses M, Toto P, Dirie B, Lens Z, Villeret V, Rucktooa P, Locht C, Baulard A, Deprez B. *ACS Chem Biol*, 2010, 5: 1007–1013
30 Christianson R, Lokey RS. *Biopolymers*, 2011, 96: 494–494
31 Ismail HM, Barton VE, Panchana M, Charoensutthivarakul S, Biagini GA, Ward SA, O'Neill PM. *Angew Chem Int Ed*, 2016, 55: 6401–6405
32 Zweerink S, Pollmann T, Ninck S, Kaschani F, Kaiser M. *Methods Mol Biol*, 2017, 1491: 23–46
33 Wang J, Nie Y, Li Y, Hou Y, Zhao W, Deng J, Wang PG, Bai G. *J Agric Food Chem*, 2015, 63: 10013–10021
34 Zhao N, Sun M, Burns-Huang K, Jiang XJ, Ling Y, Darby C, Ehrt S, Liu G, Nathan C. *PLoS ONE*, 2015, 10: e0126211
35 Puskas LG, Dorman G, Urge L, Darvas F, Feher LZ, Hackler L. *Febs J*, 2005, 272: 505
36 Hueber W, Lee BJ, Genovese MC, Bruce B, van Venrooij WJ, Smolen JS, Steinman L, Utz PJ, Robinson WH. *Arthritis Rheum*, 2003, 48: S429
37 Zhang HN, Yang L, Ling JY, Czajkowsky DM, Wang JF, Zhang XW, Zhou YM, Ge F, Yang MK, Xiong Q, Guo SJ, Le HY, Wu SF, Yan W, Liu B, Zhu H, Chen Z, Tao SC. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 15084–15089
38 To C, Shilton BH, Di Guglielmo GM. *J Biol Chem*, 2010, 285: 27944–27957
39 Jensen AJ, Martinez Molina D, Lundbäck T. *Future Med Chem*, 2015, 7: 975–978
40 Jin Y, Yoon YJ, Jeon YJ, Choi J, Lee YJ, Lee J, Choi S, Nash O, Han DC, Kwon BM. *Biochem Pharmacol*, 2017, 142: 46–57
41 Miettinen TP, Björklund M. *Mol Pharm*, 2014, 11: 4395–4404
42 Lee A, Lee K, Kim D. *Expert Opin Drug Dis*, 2016, 11: 707–715
43 Park K, Cho AE. *J Gins Res*, 2017, 41: 534–539
44 Jin Y, Yu J, Yu YG. *Chem Biol*, 2002, 9: 157–162
45 Lum PY, Armour CD, Stepaniants SB, Cavet G, Wolf MK, Butler JS, Hinshaw JC, Garnier P, Prestwich GD, Leonardson A, Garrett-Engele P, Rush CM, Bard M, Schimmack G, Phillips JW, Roberts CJ, Shoemaker DD. *Cell*, 2004, 116: 121–137
46 Diestel R, Irschik H, Jansen R, Khalilâ MW, Reichenbach H, Sasse F. *Chembiochem*, 2009, 10: 2900–2903
47 Zeng K, Tu P. *China J Chin Mater Med*, 2017, 42: 3645–3649 (in Chinese) [曾克武, 屠鹏飞. 中国中药杂志, 2017, 42: 3645–3649]
48 Qian Y, Han Q, Liu D, Tu P, Zeng K, Liang H. *China J Chin Mater Med*, 2017, 42: 3661–3665 (in Chinese) [钱薏, 韩清华, 刘丹, 屠鹏飞, 曾克武, 梁鸿. 中国中药杂志, 2017, 42: 3661–3665]

49 Wang L, Liu D, Jiang Y, Tu P, Zeng K. *China J Chin Mater Med*, 2017, 42: 3666–3671 (in Chinese) [王丽超, 刘丹, 姜勇, 屠鹏飞, 曾克武. 中国中药杂志, 2017, 42: 3666–3671]

50 Wan Y, Liao L, Liu Y, Jiang Y, Liu L, Zeng K, Tu P. *China J Chin Mater Med*, 2017, 42: 3650–3655 (in Chinese) [万彦军, 廖理曦, 刘瑜琦, 姜勇, 刘莲英, 曾克武, 屠鹏飞. 中国中药杂志, 2017, 42: 3650–3655]

51 Zeng K, Wan Y, Liao L, Jiang K, Wang X, Liu L, Tu P. *China J Chin Mater Med*, 2017, 42: 3656–3660 (in Chinese) [曾克武, 万彦军, 廖理曦, 姜昆, 王学美, 刘莲英, 屠鹏飞. 中国中药杂志, 2017, 42: 3656–3660]

52 Gonçalves MS, Silveira AF, Teixeira AR, Hyppolito MA. *J Laryngol Otol*, 2013, 127: 536–541

53 Keizer HG, Pinedo HM, Schuurhuis GJ, Joenje H. *Pharmacol Therapeut*, 1990, 47: 219–231

54 Chen T. *J Food Drug Anal*, 2007, 15: 387–399

55 Bara T, Gurzu S, Sugimura H, Bara T, Beleaua MA, Jung I. *Rom J Morphol Embryo*, 2017, 58: 41–44

56 Ma S, Feng C, Zhang X, Dai G, Li C, Cheng X, Liu P, Ju W, Yu H. *Complement Ther Med*, 2013, 21: 35–41

Recent progress on the methodology for target study of traditional Chinese medicine

Ke-Wu Zeng*, Peng-Fei Tu*

State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China
**Corresponding authors (email: ZKW@bjmu.edu.cn; pengfeitu@bjmu.edu.cn)*

Abstract: As an original source of pharmacological actions, drug target is the most direct, important and primary biological basis for drug effects. For a long time, no dramatic breakthroughs have been achieved on traditional Chinese medicine (TCM) target identification and clarification, as well as potential molecular mechanism exploration because of the complicated components, leading to a huge obstruction on the progress of TCM modernization and internationalization. However, with the development of molecular biology, chemical biology and biophysics, researchers have established a series of methods for drug target identification for TCM, and tried to apply these methods to the target identification for TCM active ingredients and prescriptions, resulting in many innovative findings and promoting the development of TCM. Thus, this review summarizes the recent progress on TCM target identification, and hopes to provide a new idea to expand new research direction for the breakthrough progress of TCM study.

Keywords: traditional Chinese medicine (TCM), complex system, target identification, methodology, target fishing

doi: 10.1360/N032018-00066