

靶向垂钓技术在中药活性成分筛选中的研究进展

孔伟浩, 徐依桐, 徐达峰, 刘开科, 张锦原, 高珣^{*}(江苏海洋大学, 江苏 连云港 222005)

摘要: 目的 研究近年来靶向垂钓技术(主要为配体垂钓和靶标垂钓)在中药活性成分筛选方面的进展, 并做相关总结。
方法 以近年来发表的相关文献为依据, 对靶向垂钓-液质联用技术在中药活性成分的筛分与鉴定进行了综述。**结果** 目前常使用靶向垂钓技术筛分不同种类的中药活性成分, 该方法具有筛分速度快、设备简单、操作简单及特异性好等优点。
结论 对复杂多样的中药混合物进行分析时, 利用靶向垂钓-液质联用技术可以较好地筛分目标物并鉴定其结构。

关键词: 中药; 活性成分; 靶标垂钓; 配体垂钓

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2021)18-2288-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.18.016

引用本文: 孔伟浩, 徐依桐, 徐达峰, 等. 靶向垂钓技术在中药活性成分筛选中的研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(18): 2288-2295.

Research Progress of Target Fishing Technology in Screening Active Ingredients of Traditional Chinese Medicine

KONG Weihao, XU Yitong, XU Dafeng, LIU Kaike, ZHANG Jinyuan, GAO Xun^{*}(Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the progress of target fishing(mainly ligand fishing and target fishing) in the screening of active components in Chinese medicine and make the related summary. **METHODS** Based on the related articles published in recent years, the screening and identification of active components in Chinese medicine by target fishing-liquid chromatography-mass spectrometry were reviewed. **RESULTS** Target fishing was often used to screen different kinds of active ingredients in Chinese medicine. This method had the advantages of fast screening, simple equipment, simple operation and good specificity. **CONCLUSION** Target fishing-liquid chromatography-mass spectrometry can be used to screen the target substances and identify their structures in the analysis of complex and diverse mixtures of Chinese medicine.

KEYWORDS: traditional Chinese medicine; active ingredient; target fishing; ligand fishing

中药活性成分凭借其明确的药效作用、多样的骨架结构、方便的获取途径、广泛的生物活性等特点, 在如今的新药研发中占据了一席之地^[1]。在过去几十年时间里, 有超过一半已批准上市的药物直接或间接来源于天然产物^[2], 其中包括中国首个植物组分降糖原创药-桑枝总生物碱片、青蒿素等^[3]。因此, 以中药为来源的药物活性成分筛选备受研究者的关注。与此同时, 中药活性成分对新药转化、复方组成、现代化中药的生产标准以及中药复方专利均具有重要意义^[4], 因而有必要加强对中药活性成分筛选的研究。

中药是一个复杂的体系。通常单味药所含化合物就达到数百种, 而将不同单味药进行组合而

产生的复方多味药的成分更为复杂, 因此复杂多样的中药成分给中药活性成分筛选的研究带来了不少阻力。传统的中药筛选过程, 一般是先从化学分离开始, 之后进行纯化和分析。在重复的分离和纯化步骤中, 众多活性化合物和非活性化合物一同被分离出来, 这导致了整个过程耗时长、工作量大、效率低, 并且容易丢失一些微量潜在活性物质和受到假阳性结果的干扰^[5-6]。近年来, 随着“精准医疗”概念的提出, 传统的药物研究模式已经转向了“精准”靶向药物分子设计策略^[7-8], 其中以配体垂钓和靶标垂钓为代表的靶向垂钓技术, 因能与色谱技术联用而具有了快速筛选功能与结构鉴定功能, 特别适用于从多组分的体系中

基金项目: 国家自然科学基金项目(82104349)

作者简介: 孔伟浩, 男, 硕士 Tel: 17314500145 E-mail: kwh687197@163.com *通信作者: 高珣, 女, 博士, 讲师 Tel: 13555824733 E-mail: gaoxun_2017@163.com

筛分出潜在的活性物质,也可用于以中药活性成分为先导化合物的新药开发,因此对继承和发展中药,实现中药现代化具有重要意义,这使其受到越来越多研究者的关注^[9]。

1 配体垂钓及其分类

配体垂钓是指依托分子间的亲和作用,筛选出能够相互作用的配体与受体,再与液相色谱(LC)或质谱(MS)等现代有机分析手段联用,最终得到的中药活性成分的一类分析方法。这些基于亲和力的筛选方法不仅可用于研究在生物系统中存在的多种相互作用对,例如受体-配体、抗原-抗体、抑制剂/激活剂以及蛋白质间的相互作用^[10],而且也能应用于众多类型的靶标,包括酶、受体、神经递质、转运蛋白、DNA 和任何其他生物大分子,甚至细胞膜和活细胞^[11]。

配体垂钓技术有离线和在线 2 种模式。在离线模式下,首先利用固定化生物分子(例如受体)筛选出复合物,其次将筛选出的复合物用洗脱液洗脱以分离活性成分,最后使用 LC 或 MS 等方法对其进行结构分析与鉴定。在线模式则是成分分离和结构分析同时进行,筛选出的复合物直接通过色谱方法分析,并且与原始样品的色谱图进行比较,最终得到复合物中活性成分的暂时分析结果^[11]。配体垂钓技术的分类见表 1。

表 1 配体垂钓技术的分类
Tab. 1 Classification of ligand fishing techniques

配体垂钓技术的离线模式	配体垂钓技术的在线模式
亲和超滤法	细胞膜色谱法
亲和磁性法	受体色谱法
	基于表面等离子共振的生物分子相互作用分析技术
	毛细管电泳法
	生物反应器法

1.1 配体垂钓的离线模式技术

在离线模式中,成分分离与结构分析通常是分开进行的,因此可搭配各种技术来筛选中药活性成分。常见的方法有亲和超滤法、亲和磁性法等。

1.1.1 亲和超滤法 亲和超滤法又称超滤-质谱法,实质上是一种液相筛选技术,利用超滤膜对不同分子量物质的选择透过性差异而对药物进行快速筛选的方法。具体步骤为把含有活性成分的配体和受体孵育形成复合物,而当复合物经过超滤膜时,配体-受体复合物被截留在滤膜上,之后用适宜的洗脱液处理以分离出小分子配体,最后

运用 LC 及 MS 分析潜在的活性成分^[12-13]。有研究者利用超滤-质谱技术对红车轴草提取溶液进行酶抑制剂的筛分与鉴定,最终筛出 6 种能够治疗脑卒中和糖尿病等疾病且具有酶抑制作用的活性配体^[14]。张泽坤^[12]利用超滤亲和-液质联用技术从丹参和当归提取物中筛分与鉴定出多种具有抗凝血酶活性的药物成分。Xie 等^[15]运用亲和超滤和液相色谱-质谱联用技术(LC-MS)对知母皂苷提取物进行 5-LOX/COX-2 酶双重抑制剂的筛选与鉴定,最终发现了螺甾烷醇苷和呋喃甾烷醇苷这 2 种全新的双重靶向抑制剂。Chen 等^[16]利用超滤亲和-液质联用技术从毛茛苳根提取物中筛选与鉴定出 4 种 α -葡萄糖苷酶抑制剂。大量实验证明该法可筛除大量无活性的化合物,加快活性化合物的筛选速度且捕获的活性配体具有药理活性明确、靶向准确等特点,因此可用作后续开发的候选化合物^[17-18]。亲和超滤-液质联用技术的工作原理见图 1。

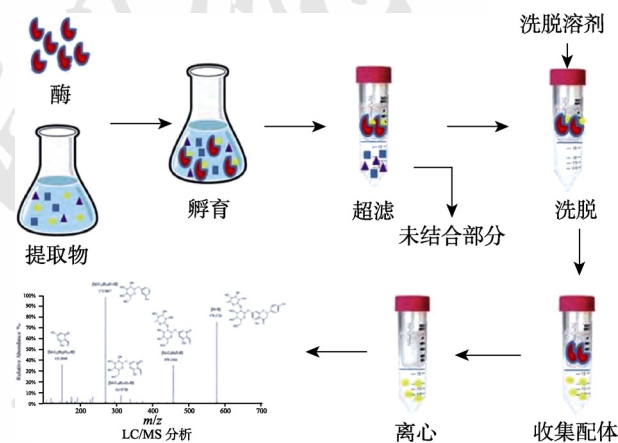


图 1 亲和超滤-液质联用技术的工作原理示意图^[13]
Fig. 1 Schematic diagram of working principle of affinity ultrafiltration coupled with liquid chromatography-mass spectrometry^[13]

1.1.2 亲和磁性法 亲和磁性法利用蛋白质的稳定固定和易磁隔离特性,通过使用磁性微球以共价键或吸附的方式来捕获蛋白质或酶,用于筛分复杂体系中的已知配体或未知化合物^[19-22]。具体步骤为在磁性纳米材料表面附着生物分子,再把磁性纳米材料放入待分离溶液中进行孵育结合,基于生物分子和配体之间的亲和特性,使用磁分离设备将配体从溶液里筛分出来,最后利用 LC 和 MS 鉴定活性物质的结构^[23]。He 等^[24]利用活性成分与细胞膜(cell membranes, CMs)受体间的特异性亲和作用,建立一种新型、高效的纳米磁珠(magnetic

nanoparticles, MNPs)辅助 CMs(MN-CMs)垂钓的方法,从当归中成功筛分出活性成分——藁本内酯,该方法的工作流程见图2。也有研究者采用磁性配体垂钓技术对桑白皮提取液进行 α -葡萄糖苷酶抑制剂的筛分与鉴定,结果发现了11种对 α -葡萄糖苷酶具有抑制效果的活性配体^[25]。黎人恺^[26]以磁性纳米粒子为载体,利用其对羧基的特异性结合作用,从银杏叶里的烷基酚类化合物中筛分出银杏酸。与传统的筛分方法相比,该法能从复杂多样的样品中快速筛分出药物活性成分,具有筛分速度快、样品处理量大、设备简单等优势。

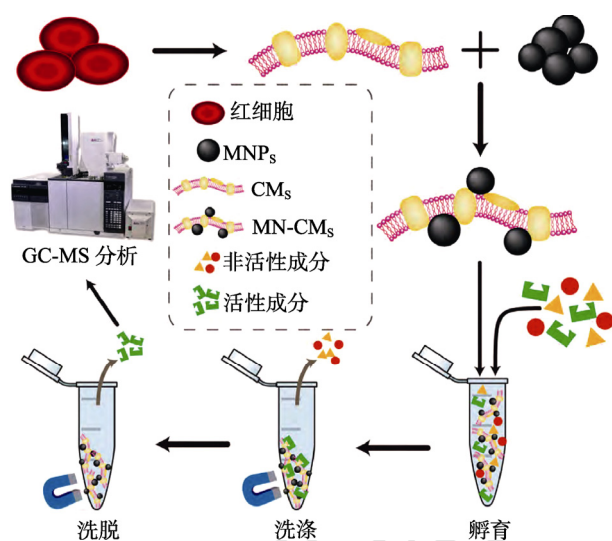


图2 CMs的固定化及MN-CMs垂钓活性成分过程^[24]
Fig. 2 Immobilization of CMs and fishing process of active compounds by MN-CMs^[24]

1.2 配体垂钓的在线模式技术

相比于离线模式,一些研究者认为在线模式是一种更高效的配体筛分方法。由于成分分离和结构分析同步进行,在线模式能够获得有关活性成分更直接和快速的结果^[11]。常见的方法有细胞膜色谱法、受体色谱法、基于表面等离子共振的生物分子相互作用分析技术、毛细管电泳法(capillary electrophoresis, CE)、生物反应器法等。

1.2.1 细胞膜色谱法 细胞膜色谱法是指将含受体的活性组织细胞膜附着在特殊载体表面,再利用液相色谱法研究药物配体与膜受体相互作用的一种分析方法。具体方法为剥离得到活性组织细胞膜,再将剥离得到的细胞膜附着在活化的载体表面(如硅胶),得到细胞膜固定相。之后在色谱柱内装填入制好的细胞膜固定相,得到细胞膜色谱柱。最后将缓冲溶液作为流动相,以含有药物活

性成分的提取液作为样品,进行细胞膜色谱分离与分析^[27-28]。例如Du等^[29]为筛选川芎-白芷中5-羟胺受体激动剂,利用细胞膜色谱技术从川芎-白芷药中筛分出了潜在的活性成分——欧前胡素。Wei等^[30]建立了一种细胞膜色谱与液相色谱联用技术,从元胡提取物中筛选出2种具有高表达血管内皮生长因子受体的药物活性物质——延胡索甲素和延胡索乙素,后续实验验证了其能抑制HEK293细胞生长。闫玉梅^[31]研发了一种血小板细胞膜色谱体系,从丹参提取液中筛分和鉴定出丹参素、隐丹参酮、二氢丹参酮等多种潜在的抗血栓活性成分。Jia等^[32]构建了人肝癌细胞膜色谱体系(HepG2/CMC),从含有黄芩成分的大鼠血清中筛分能与HepG2细胞膜受体结合的活性成分和代谢物,实验发现了6种潜在的结合成分,并在含药血清中首次发现汉黄芩素、新黄芩素和木蝴蝶素。Zhang等^[33]制备了人神经母细胞瘤细胞膜色谱模型(SH-SY5Y/CMC),从柴胡提取物中筛选出3种可能用于抗精神分裂症的候选药物。相比传统方法,该方法具有细胞膜的生物活性和色谱分离2种特性,能同步进行药物活性成分的分

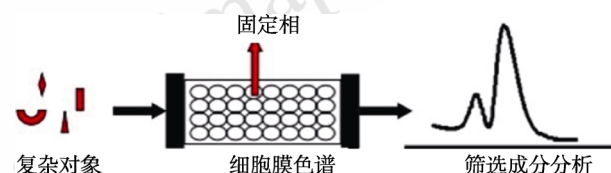


图3 细胞膜生物亲和色谱法的原理示意图^[27]
Fig. 3 Schemaprinciple diagram of cell membrane bio-affinity chromatography^[27]

1.2.2 受体色谱法 受体色谱法是指将受体直接附着在载体材料表面对中药及其复方中的特异性配体及活性成分进行分离分析操作。以药物靶蛋白特异性识别药物为原理,类似于模拟体内药物与蛋白相互作用的过程,并结合色谱技术的高分离能力^[37],使药物筛选的准确性和效率得到了提升。例如Wang等^[38]将纯化的 β_2 -肾上腺素受体(β_2 -AR)附着在大孔硅胶上,制成 β_2 -AR固定相,利用该法成功筛分出复方双黄连中能与 β_2 -AR受体特异性结合的绿原酸。有研究者利用 β_2 肾上腺素受体色谱法,从麻杏石甘汤中筛选出能与 β_2 -AR产生特异性作用的药效成分——麻黄碱^[39]。也有其他研究者构建了固定化 β_2 -AR色谱模型,从中药复方

三子养亲汤中筛选出 2 种抗哮喘活性成分——迷迭香酸和芥子碱硫氰酸盐, 后续实验表明这 2 种成分通过特异性识别并结合 β_2 -AR 以发挥止咳平喘作用^[40]。Liu^[41]制备了内皮素 A 型受体(ETA)和血管紧张素 II-1 型受体(AT1)2 种心血管受体色谱柱, 对中药复方葛根芩连汤进行靶向活性成分筛选, 实验发现筛选出的黄酮类物质葛根素能够同时作用于 ETA 和 AT1。Li 等^[42]利用电压依赖性阴离子通道蛋白 1 型(VDAC-1)受体色谱法从大黄提取物中筛分出 5 种 VDAC-1 的活性配体。由于受体色谱法集成了受体识别药物的高特异性和色谱技术的高分离能力, 因而具有灵敏度高、稳定性高和特异性强等优势^[43]。

1.2.3 基于表面等离子共振的生物分子相互作用技术(biomolecular interaction technology, BIA)

BIA 是一种基于表面等离子共振(surface plasmon resonance, SPR)原理的生物传感分析技术, 在无需荧光或同位素标记以及纯化生物组分的天然情况下, 依靠传感器芯片, 直接通过测量 SPR 的物理光学反射率的变化就能实时监测和追踪各类生物分子(如多肽、蛋白质等)之间的相互作用^[44-46]。具体步骤为将受体直接附着在传感器芯片表面, 再将样品(配体)放到芯片表面, 当样品经过芯片表面时, 样品里的配体则会与受体发生特异性结合, 在芯片表面被捕获, 最后获取传感器表面上的结合组分^[47]。有研究者利用 SPR 生物传感器结合 UHPLC-MS 分析, 首次从大黄中筛选出微量物质大黄素-甲醚-8-O- β -D-葡萄糖苷, 其是肿瘤坏死因子受体的配体^[48]。罗长莉^[49]利用 BIAcoreSPR 技术对中药 KA-15 提取液进行多靶点筛选, 之后利用 HPLC 和 MS 分析得到 4 个抗 HIV-1 的活性成分。Yang 等^[50]发明了一种高分辨串联质谱技术和表面等离子体共振技术的结合体系, 从银杏叶口服液中垂钓筛选出 4 种能与 β -淀粉样蛋白特异性结合的活性成分, 该成分可用于治疗阿尔茨海默病。Huang^[51]利用表面等离子体共振技术垂钓捕获人 IgEC ϵ 2-4 的相互作用蛋白, 在原位酶解芯片上的蛋白后, 又运用 LC-MS 从捕获到的蛋白中筛选出 37 种可能与 IgEC ϵ 2-4 结合的蛋白。

1.2.4 亲和毛细管电泳法(affinity capillary electrophoresis, ACE)

CE 是一种有效的分离分析手段, 与高选择性及高灵敏度的 MS 联用, 不仅能明显提升系统的灵敏度, 而且还能解决 CE 在定

性方面的缺陷^[52]。因此 CE-MS 与 LC-MS 相辅相成、互为补充, 可显著提高数据的精确性^[53]。ACE 正是基于上述 2 种技术产生, 其是指通过分析受体或配体进行亲和作用前后的电泳谱图以筛分出活性物质, 最终利用色谱技术分析药物活性成分的一种分析方法^[54]。具体步骤为将受体置于缓冲盐中, 随后将含有配体的中药溶液作为样品进行电泳分析, 因为配体与受体间会发生特异性相互作用, 进而改变其质荷比与迁移淌度, 最终达到分离效果, 最后采用 LS-MS 进行分析与鉴定^[55]。Li 等^[56]利用装配有荧光检测器的 CE 结合 LC-MS 技术从泽兰提取物中筛分出黄酮类成分——槲皮素和芦丁。Huang 等^[57]采用 CE 结合 MS 从油菜籽提取物中筛分和鉴定了 11 种酚酸成分, 并与高效液相色谱和薄层色谱的结果进行了比较, 结果表明 CE 对于油菜籽提取物中酚类化合物的鉴定具有一定的优势。与其他传统筛选方法相比, 该法具有高效、省时、筛分范围广以及样品用量少等特点^[58]。

1.2.5 生物反应器法

生物反应器是指基于酶或者生物体的特性, 于体外进行生物化学反应的分析装置, 用于筛分与鉴定药物活性物质。其中, 固定化酶反应器(immobilized enzyme reactor, IMER)作为一种高效的亲和筛选技术, 主要用于筛分潜在的酶激动剂或抑制剂^[54]。Zhao 等^[59]运用戊二醛交联技术制备了一类高效的神经氨酸酶固定化毛细管微反应器, 用于筛分与鉴定中药里的神经氨酸酶抑制剂, 结果在 18 种筛选成分中找到 6 种有生物活性的神经氨酸酶抑制剂。有研究者利用基于多层毛细管电泳的固定化酶微反应器(CE-IMERs)在线检测绿茶提取物对葡萄糖 6-磷酸脱氢酶(G6PDH)的活性与抑制率, 后续实验表明绿茶提取物对 G6PDH 酶有竞争性抑制作用^[60]。Hu^[61]建立了一种新型的一步原位青霉素酶诱导凝胶化的毛细管固定化酶反应器, 能够进行准确的在线酶分析。有研究者利用磁性纳米材料结合固定化酶技术构建了新型神经氨酸酶微反应器, 从金银花提取物中筛选出能够抑制神经氨酸酶活性的 4 个有效成分: 木犀草苷、木犀草素、异绿原酸 A 和异绿原酸 B^[62]。

2 靶标垂钓

药物靶标是指在体内通过键合的方式(例如氢键和共价键等)与药物结合而发挥药效作用的生物大分子, 主要包括蛋白质、酶、受体等^[63]。而靶

标垂钓是指通过对多种蛋白混合物进行筛分操作,进而捕获可能与药物活性物质发生特异性相互作用的靶标蛋白,再利用靶标蛋白作为诱饵,直接从复杂的中药样品中精准地垂钓活性成分的一种分析方法^[64]。分子探针技术是新药靶标发现和靶蛋白特异性识别的重要方法。Liu 等^[64]利用 FITC 研发了一种 uPA 探针并构建了基于抑制 uPA-uPAR 结合原理的中药混合物筛分方法,成功从中药大蓟混合物中分离得到了能够竞争性抑制 uPA 和 uPAR 结合的潜在先导化合物。如 Liao 等^[65]建立了一种专门针对肌昔-5-单磷酸脱氢酶 2(IMPDH2)的小分子探针——苏木酮 A,通过靶向调控 IMPDH2 的半胱氨酸残基 140(Cys140),从而促使 IMPDH2 失活,最终发挥出抑制神经炎症的作用。实验结果表明 Cys140 是选择性抑制 IMPDH2 的可用药位点,这为后续开发治疗神经炎症性疾病的药物奠定了基础。Ismail 等^[66]利用青蒿素衍生物构建分子探针,该探针既可定位靶标蛋白的分布,也可捕获靶标蛋白,进行 MS 分析,结果从蛋白混合物中鉴定出 124 个可与青蒿素结合的蛋白。后续实验发现这些结合蛋白大多和疟原虫的生物过程有关,表明青蒿素是通过众多蛋白质间的协同作用以治疗疟疾。Yi 等^[67]制备了与黄连素结构和活性相似的衍生物分子探针,从细胞裂解液中筛选得到与黄连素特异性结合的肌动蛋白。有研究表明,黄连素通过抑制肌动蛋白的多聚化以控制肿瘤细胞的迁移。梁祖青^[68]利用磁性纳米材料制备了一种针对黄芩苷的亲亲和探针结合 MS 分析技术,从人胚肾 293 细胞蛋白提取液中捕获了能与黄芩苷特异性结合的靶标蛋白——核仁磷酸蛋白质,有研究表明核仁磷酸蛋白质可能是黄芩苷治疗癌症的作用靶标^[69]。此项技术的重大意义在于,可以应用于旧的药物小分子以筛分出新的靶标蛋白,从而实现老药新用,其次可以通过探究药物小分子与靶标蛋白间的相互作用,进而研究在疾病的治疗过程中药物小分子的作用机制^[70]。

3 靶向垂钓技术的缺陷

配体垂钓不足之处在于药物活性成分的损耗大、色谱柱寿命短、蛋白质假阴性和假阳性以及配体从靶体上无法有效解吸等^[11]。而靶标垂钓也存在着诸多问题,例如:①步骤较繁琐;②筛选出的靶标蛋白无法证明其体外的活性,所垂钓出

来的药物活性成分仅得知能够与靶点蛋白结合,其对靶点的激动或拮抗作用未知^[64];③只能筛选出一种药物小分子与一种靶标蛋白的特异性结合,存在着严重的低通量问题;④检测得到的信息不够丰富。这些都还需要后续的研究^[70]。

4 中药靶向垂钓技术的展望

4.1 靶标垂钓技术的展望

有研究者发明了一种基于阻断 uPA-uPAR 相互作用,以竞争性抑制后的荧光强度变化为指针的中药活性成分筛分与鉴别方法,可以快速高效地筛分垂钓出目标物质。该方法无需蛋白的分离纯化及后续的蛋白质固定化操作,不仅简化了实验步骤,还最大程度上保证蛋白的体外活性,并且还能筛选拮抗剂与激动剂,因此具有高通量与高灵敏度的优势^[64]。

4.2 配体垂钓技术的未来展望

基于多靶点的活性成分筛选是配体垂钓的热门研究领域,通过扩展当前的亲和选择技术,对多靶点或多通道进行筛分。具体为将多种受体附着在磁性微球或纳米材料的表面,进而能够一次筛分 ≥ 2 种的活性成分。例如 Zhao 等^[71]通过将 2 种 G 蛋白偶联受体附着在大孔硅胶表面,制成的色谱柱用于分析丹参和黄连的提取物,最终得到了 3 种活性成分,实现了对复杂样品的在线双靶点筛选。

微流控技术同样也是活性成分筛选领域的重要方法,通过微制造或组装改造聚合物层得到的微流体反应装置可用于多个目标成分的筛选。上述技术都为中药现代化的实现做出了贡献^[72]。

5 总结

相比西药,中药既有不良反应小、价格低等优点,也存在着有效成分不明、成分过于复杂以及活性成分与生物靶点间的相互作用不明等缺点^[73]。因此利用靶向垂钓技术从中药里筛分与鉴定活性成分是实现中药现代化的重要途径。麻黄素、小檗碱、芦丁、甘草酸等中药筛选成分仍是临床一线药物^[48];紫杉醇、喜树碱、青蒿素等中草药更是成为了新药开发的无价药用资源^[73-75]。这些成功的药物案例告诉人们利用靶向垂钓等现代科学研究技术,中药可以成为新药研发的宝库,中药现代化将成为现实。

REFERENCES

- [1] 叶文才. 中药及天然药物活性成分: 新药研发的重要源泉

- [J]. 药学进展, 2016, 40(10): 721-722.
- [2] ATANASOV A G, WALTENBERGER B, PFERSCHY-WENZIG E M, et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review[J]. Biotechnol Adv, 2015, 33(8): 1582-1614.
- [3] TU Y Y. The discovery of artemisinin(qinghaosu) and gifts from Chinese medicine[J]. Nat Med, 2011, 17(10): 1217-1220.
- [4] ZHU D Y. Studies on active ingredients of TCM—the essential part of TCM’s modernization[J]. Prog Chem(化学进展), 2009, 21(1): 24-29.
- [5] ZHOU H, WANG Y M, ZHENG Z, et al. Recent advances of affinity ultrafiltration mass spectrometry in screening active components of traditional Chinese medicine[J]. J Chin Mass Spectrom Soc(质谱学报), 2018, 39(6): 641-652.
- [6] WU S Q, YANG H, LI P. Application of the affinity ultrafiltration coupled with LC-MS technology in screening active components of traditional Chinese medicines[J]. Acta Pharm Sin, 2016, 51(7): 1060-1067.
- [7] ZHAN P, WANG X S, LIU X Y. Contemporary molecular targeted drug in the context of “precision medicine”: An attempting discussion of “precision drug design”[J]. Prog Chem(化学进展), 2016, 28(9): 1363-1386.
- [8] NEWMAN D J, CRAGG G M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014[J]. J Nat Prod, 2016, 79(3): 629-661.
- [9] BERGSDORF C, OTTL J. Affinity-based screening techniques: Their impact and benefit to increase the number of high quality leads[J]. Expert Opin Drug Discov, 2010, 5(11): 1095-1107.
- [10] HAGE D S, ANGUIZOLA J A, BI C, et al. Pharmaceutical and biomedical applications of affinity chromatography: Recent trends and developments[J]. J Pharm Biomed Anal, 2012(69): 93-105.
- [11] ZHUO R J, LIU H, LIU N N, et al. Ligand fishing: A remarkable strategy for discovering bioactive compounds from complex mixture of natural products[J]. Molecules, 2016, 21(11): E1516.
- [12] 张泽坤. 超滤亲和-液质联用技术筛选中药抗凝血酶活性成分研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2019.
- [13] YANG L, ZHAO B Y, LI C L, et al. Research progress on screening active components from medicinal plants based on affinity ultrafiltration coupled with LC-MS technology[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2021, 27(8): 196-208.
- [14] HAO Y, LIU C M, LI S N, et al. Screening of bioactive ligands in *Trifolium pratense* by affinity ultrafiltration mass spectrometry[J]. North Hortic(北方园艺), 2019(17): 102-107.
- [15] XIE L L, LEE D Y, SHANG Y, et al. Characterization of spirostanol glycosides and furostanol glycosides from anemarrhenae rhizoma as dual targeted inhibitors of 5-lipoxygenase and Cyclooxygenase-2 by employing a combination of affinity ultrafiltration and HPLC/MS[J]. Phytomedicine, 2020(77): 153284.
- [16] CHEN H J, MA S Z, JIANG M, et al. Screening of α -glucosidase inhibitors from roots of *Cichorium glandulosum* by UF-LC-MS and molecular docking[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2019, 50(2): 344-351.
- [17] QIN S S, REN Y R, FU X, et al. Multiple ligand detection and affinity measurement by ultrafiltration and mass spectrometry analysis applied to fragment mixture screening[J]. Anal Chim Acta, 2015(886): 98-106.
- [18] ZHANG G, GUO X H, WANG S S, et al. Screening and identification of natural ligands of tyrosinase from *Pueraria lobata* Ohwi by a combination of ultrafiltration and LC-MS[J]. Anal Methods, 2017, 9(33): 4858-4862.
- [19] YASUDA M, WILSON D R, FUGMANN S D, et al. Synthesis and characterization of SIRT6 protein coated magnetic beads: Identification of a novel inhibitor of SIRT6 deacetylase from medicinal plant extracts[J]. Anal Chem, 2011, 83(19): 7400-7407.
- [20] MARSZAŁŁ M P, MOADDEL R, KOLE S, et al. Ligand and protein fishing with heat shock protein 90 coated magnetic beads[J]. Anal Chem, 2008, 80(19): 7571-7575.
- [21] HAN S L, LI C L, HUANG J, et al. Cell membrane chromatography coupled with UHPLC-ESI-MS/MS method to screen target components from *Peucedanum praeruptorum* Dunn acting on α 1A adrenergic receptor[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2016(1011): 158-162.
- [22] JI L Y, WU J H, LUO Q, et al. Quantitative mass spectrometry combined with separation and enrichment of phosphopeptides by titania coated magnetic mesoporous silica microspheres for screening of protein kinase inhibitors[J]. Anal Chem, 2012, 84(5): 2284-2291.
- [23] 顾宁. 生物医用磁性纳米材料与器件[M]. 北京: 化学工业出版社, 2013.
- [24] HE J H, MAO R Z, TANG C, et al. Application of magnetic nanoparticle-assisted erythrocyte membrane fishing assay on active compounds screening from *Angelica sinensis*[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2018, 49(5): 1041-1047.
- [25] SONG H P, CHEN J, HONG J Y, et al. A strategy for screening of high-quality enzyme inhibitors from herbal medicines based on ultrafiltration LC-MS and in silico molecular docking[J]. Chem Commun(Camb), 2015, 51(8): 1494-1497.
- [26] 黎人恺. Fe₃O₄ 磁性纳米粒子在中药成分分离分析中的应用研究[D]. 长沙: 湖南师范大学, 2015.
- [27] WU Z T, DU W X, XIAO X F, et al. Advances in application of cell membrane chromatography in screening bioactive components of traditional Chinese medicines[J]. J Tianjin Univ Tradit Chin Med(天津中医药大学学报), 2017, 36(1): 71-75.
- [28] CHEN Y Y, GUO J. Advances in application of cell membrane chromatography in screening bioactive components of Chinese materia medica[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2012, 43(2): 383-387.
- [29] DU H, LV N, HUANG J, et al. A cell membrane chromatography method for screening 5-HT receptor agonists from drug pair of Chuanxiong Rhizoma and Angelicae Dahuricae Radix[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2015, 40(3): 490-494.
- [30] WEI F, HU Q, HUANG J, et al. Screening active compounds from *Corydalis yanhusuo* by combining high expression VEGF receptor HEK293 cell membrane chromatography with HPLC-ESI-IT-TOF-MSn method[J]. J Pharm Biomed Anal,

- 2017(136): 134-139.
- [31] 闫玉梅. 血小板细胞膜色谱筛选模型的构建及P2Y₁₂受体的表达纯化研究[D]. 西安: 西北大学, 2016.
- [32] JIA D, CHEN X F, CAO Y, et al. On-line comprehensive two-dimensional HepG2 cell membrane chromatographic analysis system for charactering anti-hepatoma components from rat serum after oral administration of Radix Scutellariae: A strategy for rapid screening active compounds *in vivo*[J]. J Pharm Biomed Anal, 2016(118): 27-33.
- [33] ZHANG Y, LIU F H, ZHANG X H, et al. Recognition and identification of active components from Radix Bupleuri using human neuroblastoma SH-SY₅Y cells[J]. Biomed Chromatogr, 2016, 30(3): 440-446.
- [34] CHEN X F. Methodology study of the screening of active ingredients from traditional Chinese medicines by cell membrane chromatography and identification of their binding targets[D]. Shanghai: Second Military Medical University, 2014.
- [35] FANG S M. VEGFR-2Cell membrane chromatography for screening inhibitors[D]. Jinan: Shandong University, 2012.
- [36] CAO Y, WANG S Z, LI Y H, et al. A method for screening active components from Chinese herbs by cell membrane chromatography-offline-high performance liquid chromatography/mass spectrometry and an online statistical tool for data processing[J]. J Chromatogr A, 2018(1540): 68-76.
- [37] TONG Z H, SCHIEL J E, PAPANASTAVROS E, et al. Kinetic studies of drug-protein interactions by using peak profiling and high-performance affinity chromatography: Examination of multi-site interactions of drugs with human serum albumin columns[J]. J Chromatogr A, 2011, 1218(15): 2065-2071.
- [38] WANG J, LI F W, ZENG K Z, et al. Bioactive compounds of Shuang-Huang-Lian prescription and an insight into its binding mechanism by β_2 -adrenoceptor chromatography coupled with site-directed molecular docking[J]. J Sep Sci, 2017, 40(22): 4357-4365.
- [39] 李易非. β_2 -肾上腺素受体色谱筛选麻杏石甘汤的活性成分[D]. 西安: 西北大学, 2012.
- [40] WANG J. New methodology for immobilization of β_2 -adrenoceptor and application in screening bioactive compound targeting the receptor from Sanzi Yangqin decoction[D]. Xi'an: Northwest University, 2019.
- [41] LIU T. Establishment and evaluation of chromatographic method for screening multi-target bioactive compounds from Gegenqilian decoction[D]. Xi'an: Northwest University, 2019.
- [42] LI Q, QIAO P, CHEN X, et al. Affinity chromatographic methodologies based on immobilized voltage dependent anion channel isoform 1 and application in protein-ligand interaction analysis and bioactive compounds screening from traditional medicine[J]. J Chromatogr A, 2017(1495): 31-45.
- [43] LIU J J, JIA X N, WANG J, et al. Receptor chromatography: High-efficient screening technology of receptor-targeting bioactive compounds in traditional Chinese medicine[J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med - World Sci Technol(世界科学技术-中医药现代化), 2018, 20(8): 1476-1481.
- [44] WEI G H, CHAI X Q, YIN L P. BIA and its applications in protein science research[J]. J Cap Norm Univ(首都师范大学学报: 自然科学版), 2003, 24(2): 60-63, 67.
- [45] CAO Y, LI Y H, LV D Y, et al. Identification of a ligand for tumor necrosis factor receptor from Chinese herbs by combination of surface plasmon resonance biosensor and UPLC-MS[J]. Anal Bioanal Chem, 2016, 408(19): 5359-5367.
- [46] WANG H M, QIAN K X. Principle of surface plasmon resonance biosensor technology and its application in biomolecular interacting analysis[J]. J Zhejiang Univ: Eng Sci(浙江大学学报: 工学版), 2003, 37(3): 98-101.
- [47] LI W P, SUN Z K. Ligand fishing is a new method for proteomics study[J]. Life Sci Res(生命科学研究), 2005, 9(S2): 6-9.
- [48] ZHANG H M. Common methods of ligand fishing and its perspective of application in the research and development of new traditional Chinese medicine[J]. Pharm Clin Chin Mater Med(中药与临床), 2019, 10(Z2): 70-74.
- [49] 罗长莉. 中药KA-15抗HIV-1有效成分分离提取的研究[D]. 北京: 北京工业大学, 2016.
- [50] YANG P, CAO Z L, WANG J, et al. Method for fishing screening of active component monomer or active component group from mixture: CN105987888B[P]. 2019-06-21.
- [51] HUANG H H. Eukaryotic expression, purification of human IgE α 2-4 protein and its target fishing[D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2018.
- [52] REDMAN E A, RAMOS-PAYAN M, MELLORS J S, et al. Analysis of hemoglobin glycation using microfluidic CE-MS: A rapid, mass spectrometry compatible method for assessing diabetes management[J]. Anal Chem, 2016, 88(10): 5324-5330.
- [53] DI VENERE M, VIGLIO S, CAGNONE M, et al. Advances in the analysis of "less-conventional" human body fluids: An overview of the CE- and HPLC-MS applications in the years 2015-2017[J]. Electrophoresis, 2018, 39(1): 160-178.
- [54] WANG J L, QIAN X H. Theory and application of affinity capillary electrophoresis[J]. Chin J Chromatogr(色谱), 1999, 17(4): 342-345.
- [55] FEI F H. Establishment of A fishing method and application in screening target bioactive compounds in San-ao decoction[D]. Xi'an: Northwest University, 2019.
- [56] LI F, ZHANG Y M, QIU D Y, et al. Screening of epidermal growth factor receptor inhibitors in natural products by capillary electrophoresis combined with high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2015(1400): 117-123.
- [57] HUANG Y, JANSEN O, FRÉDÉRICH M, et al. Capillary electrophoresis, high-performance liquid chromatography, and thin-layer chromatography analyses of phenolic compounds from rapeseed plants and evaluation of their antioxidant activity[J]. J Sep Sci, 2019, 42(2): 609-618.
- [58] LIN J H, WANG H, SHAO H, et al. Advances in research on mass spectrometry based chiral amino acid analysis for quality control of racemic peptide impurities[J]. Acta Pharm Sin(药学报), 2019, 54(11): 1958-1964.
- [59] ZHAO H Y, CHEN Z L. Screening of neuraminidase inhibitors from traditional Chinese medicines by integrating capillary electrophoresis with immobilized enzyme microreactor[J]. J Chromatogr A, 2014(1340): 139-145.

- [60] CAMARA M A, TIAN M M, LIU X X, et al. Determination of the inhibitory effect of green tea extract on glucose-6-phosphate dehydrogenase based on multilayer capillary enzyme microreactor[J]. *Biomed Chromatogr*, 2016, 30(8): 1210-1215.
- [61] HU X T. Investigation and application of immobilized enzyme reactor and paper-based sensor based on penicillinase[D]. Changchun: Northeast Normal University, 2018.
- [62] ZHAO Y M. Neuraminidase enzyme microreactor as A drug discovery tool for screening anti-influenza virus agents[D]. Guangzhou: Jinan University, 2017.
- [63] YANG J X, LIU Z H. Effects of drug targets in developing novel drug[J]. *Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药)*, 2009, 20(3): 750-751.
- [64] LIU X F, LIU J H, LI L, et al. Screening and fishing method for active pharmaceutical ingredients with function of blocking uPA-uPAR interaction: CN108226117A[P]. 2018-06-29.
- [65] LIAO L X, SONG X M, WANG L C, et al. Highly selective inhibition of IMPDH2 provides the basis of antineuroinflammation therapy[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(29): E5986-E5994.
- [66] 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[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(8): 2080-2085.
- [67] 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[J]. *Chem Commun (Camb)*, 2017, 53(52): 7045-7047.
- [68] 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[D]. 北京: 中国科学院大学, 2017.
- [69] LI D, LIN B J, YUSUF N, et al. Proteomic analysis and functional studies of baicalin on proteins associated with skin cancer[J]. *Am J Chin Med*, 2017, 45(3): 599-614.
- [70] ZHU J S, WANG R, YANG M, et al. Method for realizing target fishing and characterization through small molecule microarray: CN105067821A[P]. 2015-11-18.
- [71] ZHAO X F, LI Q, BIAN L J, et al. Using immobilized G-protein coupled receptors to screen bioactive traditional Chinese medicine compounds with multiple targets[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012(70): 549-552.
- [72] REN K N, ZHOU J H, WU H K. Materials for microfluidic chip fabrication[J]. *Accounts Chem Res*, 2013, 46(11): 2396-2406.
- [73] RESHMA P L, UNNIKRISHNAN B S, PREETHI G U, et al. Overcoming drug-resistance in lung cancer cells by paclitaxel loaded galactoxyloglucan nanoparticles[J]. *Int J Biol Macromol*, 2019(136): 266-274.
- [74] DILSHARA M G, JAYASOORIYA R G P T, CHOI Y H, et al. Camptothecin induces c-Myc-and Sp1-mediated hTERT expression in LNCaP cells: Involvement of reactive oxygen species and PI3K/Akt[J]. *Food Chem Toxicol*, 2019(127): 53-60.
- [75] DAI T M, JIANG W F, GUO Z Z, et al. Comparison of *in vitro/in vivo* blood distribution and pharmacokinetics of artemisinin, artemether and dihydroartemisinin in rats[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2019(162): 140-148.

收稿日期: 2020-11-25

(本文责编: 曹粤锋)