

# 化学蛋白质组学鉴定天然产物作用靶标的研究进展

王平, 罗佳, 李海舟\*, 许敏

昆明理工大学生命科学与技术学院, 昆明 650500

**摘要:** 活性天然产物的作用靶标、具体作用机制难以确定, 阻碍了其在新药研发方面的发展。化学蛋白质组学, 特别是基于亲和性蛋白组学分析方法 (affinity-based protein profiling, ABPP), 经过近年的发展, 已成为较为成熟的鉴定天然产物作用靶标的方法。本文主要以天然产物结构进行分类介绍了基于亲和性蛋白组学分析方法 (affinity-based protein profiling, ABPP) 在天然产物作用靶标鉴定方面的应用, 并讨论了各种探针设计的应用范围以及优缺点, 且对 ABPP 方法的发展应用和其他靶标蛋白鉴定方法进行展望。

**关键词:** 天然产物; 化学蛋白质组学; ABPP; 靶标鉴定

中图分类号: R932

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2020)1-0144-10

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2020.1.020

## Advances in identifying targets of natural products by chemical proteomics approaches

WANG Ping, LUO Jia, LI Hai-zhou\*, XU Min

Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China

**Abstract:** The bottlenecks in natural drug discovery and development are cellular target identification. Affinity-based Protein Profiling (ABPP), exploiting protein-reactive functional group in many natural product structure (NPs), is a new technique used in identifying the drug targets of these NPs. This review article describes the current status of ABPP of this field and some examples according to structural skeletons of NPs are given. In addition, the advantages and disadvantages of probe molecules designed from NPs are discussed in detail. We also prospect the development of ABPP and other new techniques used to identify drug targets of NPs.

**Key words:** natural products; chemical proteomics; ABPP; target identification

从天然产物中寻找高效低毒的先导化合物一直是新药研究的热点, 据统计从 1981 年到 2014 年大约有 53% 的上市药物都是天然产物或基于天然产物结构发展得到的<sup>[1]</sup>。中药在我国有悠久的历史, 是经过临床应用和时间考验留下来的财富, 从传统中草药中提取的天然产物具有结构多样、药理活性显著等特点。但是大多数天然产物作用机制不明确、靶标蛋白的难以确定, 阻碍了其在新药研发中的发展。因此, 鉴定天然产物的靶标蛋白, 有助于阐明天然产物的作用机制、指导构效关系的研究, 是药物发现的关键步骤, 而靶标的确定仍然是目前研究的

难点<sup>[2,3]</sup>。化学蛋白质组学则是最近发展的一类方法可以用来很好的解决这一问题<sup>[4]</sup>。

### 1 化学蛋白质组学

化学蛋白质组学方法是利用小分子与特异性蛋白之间的相互作用, 为我们提供有效的信息从而鉴定特异性作用的靶标蛋白。其需要对化合物进行修饰, 引入一些亲和基质或报告基团来钓取需要的靶标蛋白, 再通过质谱等其他辅助技术来分析, 具体流程如图 1 所示<sup>[5]</sup>。化学蛋白质组学主要有基于化合物为中心的化学蛋白质组学方法 (compound-centric chemical proteomics, CCCP) 和基于亲和性蛋白组学方法 (affinity-based protein profiling, ABPP) 等。

最早确定靶标蛋白的方法是运用 CCCP 方法<sup>[6]</sup>, 运用化学方法将天然产物固定在树脂上再通

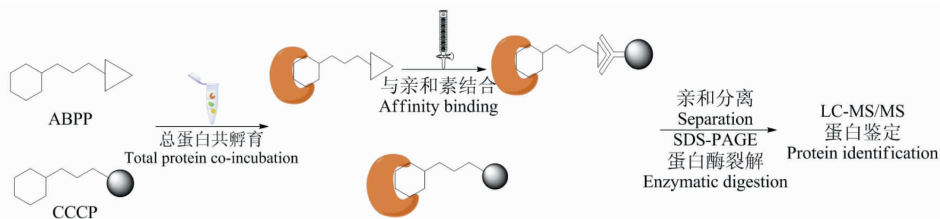


图1 化学蛋白质组学方法应用于蛋白的鉴定

Fig. 1 Chemical proteomics method for protein identification

过亲和层析的方法来分离鉴定靶标蛋白,这是鉴定小分子靶标蛋白较为经典的方法,具有快速、大量富集靶标蛋白的优点,但对细胞材料、将小分子合成到树脂上的化学合成方法要求较高,现已较少使用。ABPP方法是在 CCCP 的基础上发展起来的一种更方便、适用性更广、较为有效的一种方法。它的基本原理和 CCCP 是一样的,都是利用蛋白与活性分子之间的结合作用来发现靶标蛋白。具体步骤是将有活性的小分子运用化学的方法直接或间接引入报告基团(荧光素或生物素),再通过报告基团富集分离与小分子作用的靶标蛋白<sup>[7]</sup>。

## 2 ABPP 方法中小分子探针的设计与发展

ABPP 是目前使用较广泛、发展也较快的一种方法,其中很重要一部分是设计合成小分子探针(ABPs),小分子探针是由报告基团(生物素、荧光素等)、链接基团(亲水性链、亲脂性链、肽链等)、反应基团(活性小分子)组成<sup>[8,9]</sup>。

ABPs 探针分子一般是直接在活性小分子上引入报告基团来钓取靶标蛋白,但具有局限性。因为引入的生物素或荧光素报告基团较大,一般会影响小分子的活性,造成活性下降或消失,阻碍探针分子进入细胞膜内,不利于靶标蛋白的鉴定,一般用于细胞裂解液且只能钓取和小分子共价作用的靶蛋白。随着技术的发展,ABPP 方法中探针的合成也不再局限于原来的方法,特别光亲和方法(photoaffinity labeling, PAL)和点击化学方法(click-chemistry, CC)的引入,是对原先传统的 ABPP 的方法进行补充<sup>[10]</sup>。

自 1962 年 Singh A 提出光亲和技术,这一技术发展十分迅速<sup>[11]</sup>。探针分子上引入光亲和基团在紫外光照射下会产生很活泼的反应中间体卡宾,使探针和靶蛋白之间形成较稳定的共价键,可以用于

发现与小分子非共价作用的靶标蛋白。在 2001 年 Sharpless 等提出点击化学的概念<sup>[12]</sup>,探针分子上引入炔基或者叠氮基团,可以使探针分子先作用于活细胞减少小分子修饰后活性改变的问题,再在一价铜作用下形成三氮唑引入报告基团<sup>[13]</sup>。近几年李正球等设计合成了一些极简的光交联基团用于蛋白质组学<sup>[14-17]</sup>,这些极简的光交联基团使点击化学与光亲和技术共同引入一个小分子上而较小的影响小分子自身的活性,结合了两种方法的优点,扩大了化学蛋白质组学对于活性小分子的应用范围。因此现根据探针合成方法的不同,进一步可细分为 ABPP, CC-ABPP, PAL-ABPP, PAL-CC-ABPP, 其对应的四种探针如图 2 所示。

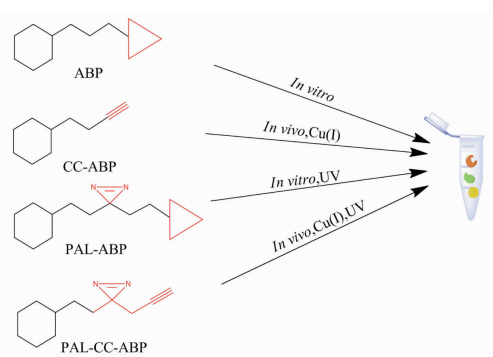


图2 ABPP 的四种探针图示

Fig. 2 Four probes of ABPP

## 3 ABPP 方法在天然产物的靶标鉴定中的应用

天然产物通常具有多功能多靶点的特点,其发挥药理作用的靶标蛋白却难以确定,利用 ABPP 方法可以帮助我们解决天然产物靶点不明确的问题。下面根据天然产物类型分类介绍近几年发表的 ABPP 方法在鉴定活性小分子靶标蛋白方面的应用,如表 1 和图 3 所示。当有多个探针分子时,只列举比较重要或有效的探针结构。因活性小分子接上荧光

基团,主要是可以观察小分子的具体作用位置,作为一个靶点鉴定的辅助作用,具体的靶点分离还是需要使用到生物素标记的活性小分子。故列出的小分子探针结构是选取连有生物素报告基团或连有炔基作为报告基团可以潜在的连接生物素的探针分子。

ABPP方法的核心在于活性小分子与靶标蛋白的相互作用,根据这些实例我们发现同一个化合物在不同位置进行探针分子合成的设计,或设计不同的探针,最后得到的标记蛋白可能会有所不同。因此设计合成小分子探针需要结合小分子的结构特性,需要保证引入报告基团或潜在报告基团的小分子探针依然能保持与原有的小分子相当的活性,同时在实验过程中设定阴性对照来排除一些背景蛋白也非常重要。

当然也可以发现当使用不同的细胞系、组织、细菌等与同一探针作用时,得到的结果也不相同,提醒我们在探索化合物的作用机制、发现其靶标蛋白时,可以全面的运用不同的样品进行处理,可能会有不一样的发现。而中药通常具有多靶点、多药理活性的特性,因此运用这一方法可以帮助我们有效的了解中药的作用机制。

#### 4 小结与展望

ABPP方法的广泛应用说明其非常适合用于鉴定活性天然产物的未知靶标蛋白,同时也可以用来验证以前已经确定的化合物其相互作用的靶标蛋白。理论上ABP与PAL-ABP探针主要是作用于细胞裂解液,用来钓取与小分子共价作用的靶标蛋白,可以获得与小分子特异性结合较为稳定的靶蛋白,但因为方法的局限性不能得到较为全面的靶标蛋白谱图。而CC-ABP、PAL-CC-ABP探针可作用于活细胞,可用来钓取与小分子非共价作用的靶标蛋白,所获得的靶标蛋白较为全面,但同时也会存在非特异性背景蛋白的影响从而使特异性作用的蛋白确定较为困难。

而通过实例我们发现每种探针的应用条件并不是一定的,像ABP探针更适用于细胞裂解液,但同时如果合成的探针保留较好的活性也可以用于活细胞。当运用CC-ABPP、PAL-ABPP或CC-PAL-ABPP方法时,通常会得到较为全面的活性小分子作用的

靶标谱图,但同时也带来一个问题就是会有很多非特异性的背景蛋白被标记,影响我们蛋白的确认和解析,此时通常会结合生物信息学网络分析方法、同位素标记法等其他方法来综合分析和活性小分子作用的靶蛋白。因此,不管是ABPP、CC-ABPP、PAL-ABPP还是PAL-CC-ABPP,或者其他发展起来的方法,每种方法都有优劣,但都是根据需求逐步发展的,它们具体的原理相同,使用者可以根据具体的需要来进行选择。

ABPP方法不仅可以用来发现活性小分子的靶蛋白,也会被用来作为工具来研究某一类化合物的具体作用机制,确定其有效的官能团或者骨架,为开发更有效的药物提供基础<sup>[63]</sup>。同样也会被用来作为工具研究某一个蛋白在疾病中的作用<sup>[64,65]</sup>。从中药材中分离的天然产物一般都具有多种药理作用、多靶点的特性,而靶点不清晰也是面临的重要问题,ABPP方法可以有效的解决这一困难,许多中药中的“明星分子”像雷公藤、青蒿素、砒等都运用这一方法鉴定出其靶蛋白,故可以证明此方法具有较高的可行性,为鉴定天然产物的靶标蛋白提供了一种较为有效的方法。

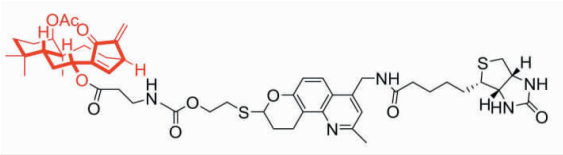
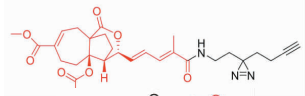
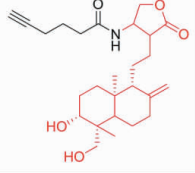
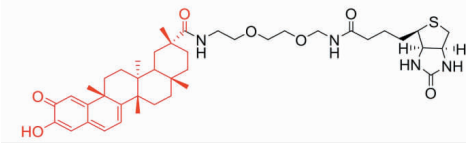
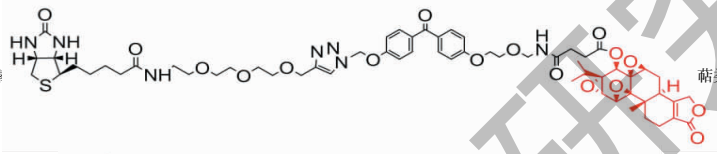
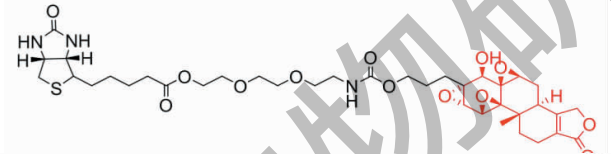
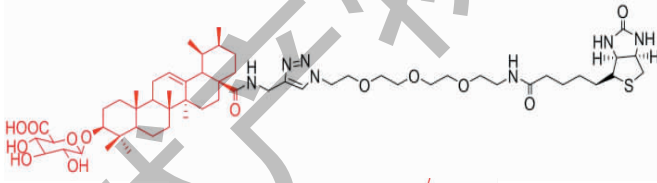
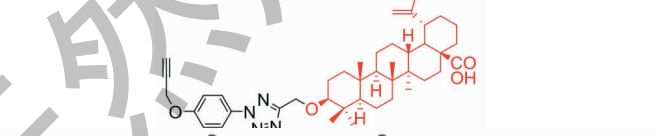
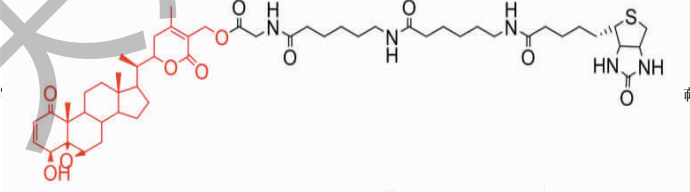
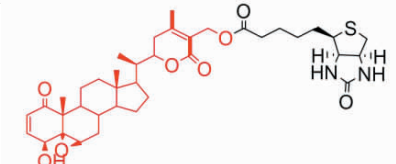
近年来还发展了一些方法可以直接鉴定未经修饰的天然产物靶标蛋白,也叫无标签的天然产物靶标蛋白鉴定,可以应用于一些缺乏可标记位点的化合物,获得结果较为方便快捷,可以较为快速的确定药物的作用机制,有利于促进化合物进入临床药物的开发,是对ABPP方法用于鉴定小分子蛋白的补充。主要运用的方法包括基于药物与靶点亲和作用的稳定性(drug affinity responsive target stability, DARTS)、基于蛋白质氧化率的稳定性(stability of proteins from rates of oxidation, SPROX)、基于细胞热变化实验(cellular thermal shift assay, CETSA)、热蛋白质组学分析(thermal proteome profiling, TPP)和基于生物网络信息学分析药物作用靶点<sup>[66]</sup>(bioinformatics-based analysis of connectivity)等方法<sup>[67]</sup>。但是技术的发展还不成熟,限制了这些方法的使用,但是可以期待未来科学技术发展的更完善,结合如今发展较为完善的化学蛋白质组学技术,使这些方法在药物发现中得到更好的应用。

表 1 ABPP 方法用于天然产物的靶点鉴定实例

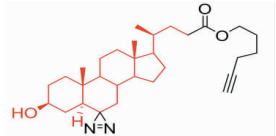
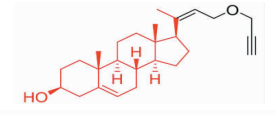
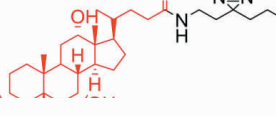
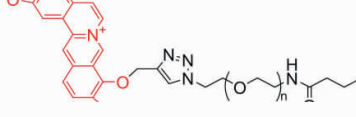
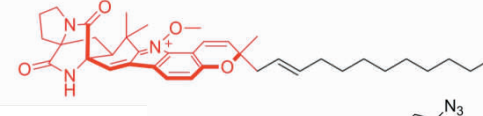
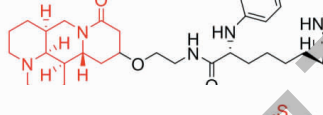
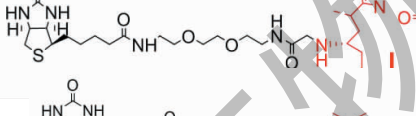
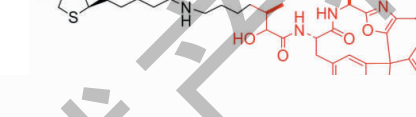
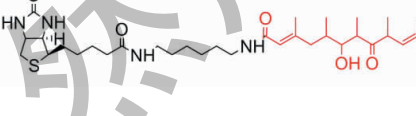
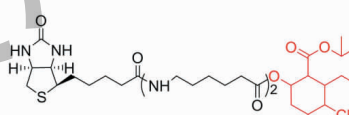

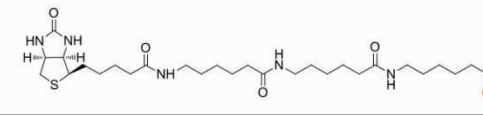
Table 1 Examples of the ABPP method for target identification of natural products

天然产物 Natural products	探针结构 ABPs	类型 Type	药理活性 Pharmacology activity	探针方法 Probe method	靶蛋白 Protein target	实验所用细胞系或其他 Cell line or others	<i>in vivo</i> / <i>in vitro</i>
藤黄酸 <sup>[18]</sup>		醌类	抗癌、抗炎	CC-ABPP	>250 个	HeLa cells and K562 cells	<i>in vivo</i> / <i>in vitro</i>
苏木酮 A <sup>[19]</sup>		黄酮类	抗神经炎症	ABPP	IMPDH2 的 Cys140	BV-2 cell	<i>in vitro</i>
4-羟基德里辛 <sup>[20]</sup>		黄酮类	抗菌	CC-ABPP	Seryl-tRNA 合成酶	S. aureus 细菌	<i>in vivo</i>
小白菊内酯 <sup>[21]</sup>		萜类	抗炎	ABPP	IκB 激酶 β 的 Cys179	Hela cells	<i>in vitro</i>
青蒿素 <sup>[22]</sup>		萜类	抗疟疾	PAL-ABPP	三条特异性条带	Trypanosoma brucei 布氏锥虫	<i>in vivo</i>
同上 <sup>[23]</sup>		萜类	同上	CC-ABPP	124 个	P. falciparum 3D7 和 ARS270	<i>in vivo</i>
同上 <sup>[24]</sup>		萜类	同上	CC-ABPP	67 个	Plasmodium falciparum 3D7	<i>in vivo</i>
同上 <sup>[25]</sup>		萜类	同上	CC-ABPP	79 个	Hela cells	<i>in vitro</i>
Ainsliadimer A <sup>[26]</sup>		萜类	抗癌、抗炎	ABPP	IKKα/β 的 Cys46	264.7 cells and HeLa cells	<i>in vivo</i>
花姜酮 <sup>[27]</sup>		萜类	抗癌、抗炎	CC-ABPP	197 个	HCT116 结肠癌细胞系	<i>in vivo</i>
烟曲霉素 <sup>[28,29]</sup>		萜类	抗生素, 血管生成抑制剂	ABPP	2 型甲硫氨酰氨肽酶 (MetAP2)	High Five cells	<i>in vitro</i>
腺毒素 <sup>[30]</sup>		萜类	诱导 APL 细胞分化	ABPP	peroxiredoxin I and II	NB4 cells	<i>in vitro</i>

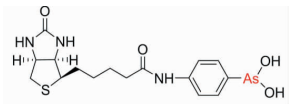
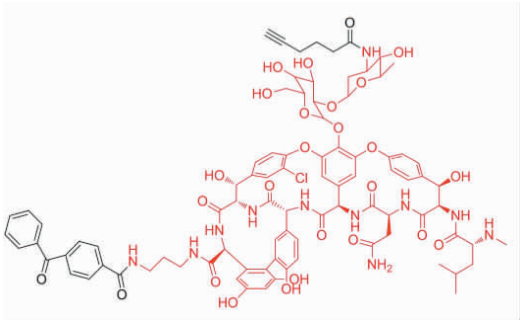
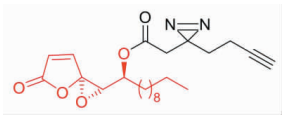
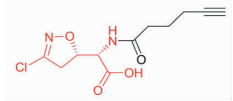
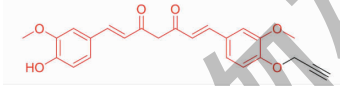
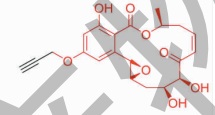
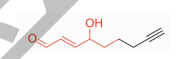
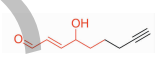
续表 1 (Continued Tab. 1)

天然产物 Natural products	探针结构 ABPs	类型 Type	药理活性 Pharmacology activity	探针方法 Probe method	靶蛋白 Protein target	实验所用细胞系或其他 Cell line or others	<i>in vivo</i> / <i>in vitro</i>
毛萆乙素 <sup>[31]</sup>		萜类	抗肿瘤和抗自身免疫系统	ABPP	p50 的 Cys62	SMMC-7721 cells	<i>in vitro</i>
Kongensin A <sup>[32]</sup>		萜类	坏死抑制剂和凋亡诱导剂	ABPP	热休克蛋白 HSP90 的 Cys420	HT29 cells	<i>in vitro</i>
土槿皮乙酸 <sup>[33]</sup>		萜类	抗肿瘤、抗病毒和抗真菌	PAL-CC-ABPP	CD147 蛋白	HeLa cells	<i>in vitro</i>
穿心莲内酯 <sup>[34]</sup>		萜类	抗癌、抗炎	CC-ABPP	NF-κB 和 actin	HCT116 cells	<i>in vitro</i>
雷公藤红素 <sup>[35]</sup>		萜类	抗癌、抑制脂质过氧化、抗炎	ABPP	Annexin II, eEF1A, and β-tubulin	pancreatic carcinoma cells (PANC-1)	<i>in vitro</i>
雷公藤甲素 <sup>[36]</sup>		萜类	抗氧化、抗炎、风湿、抗癌	ABPP	Prx I	MDCK cell	<i>in vitro</i>
同上 <sup>[37]</sup>		萜类	同上	PAL-ABPP	dCTP 焦磷酸酶 1	HeLa S3 cells	<i>in vitro</i>
金盏花苷 E <sup>[38]</sup>		萜类	内皮细胞保护	ABPP	128 个	HUVEC cell	<i>in vitro</i>
白桦酯酸 <sup>[39]</sup>		萜类	抗艾滋病、抗炎、抗疟疾、抗菌、抗肿瘤	PAL-CC-ABPP	21 个	MCF-7 cells	<i>in vitro</i>
醉茄素 A <sup>[40]</sup>		甾体	抗肿瘤和抗血管生成	ABPP	annexin II	bovine lung cells	<i>in vitro</i>

续表 1 (Continued Tab. 1)

天然产物 Natural products	探针结构 ABPs	类型 Type	药理活性 Pharmacology activity	探针方法 Probe method	靶蛋白 Protein target	实验所用细胞系或其他 Cell line or others	<i>in vivo</i> / <i>in vitro</i>
同上[41]		甾体	同上	ABPP	中间纤维蛋白 (IF) 波形蛋白	HUVEC cells	<i>in vitro</i>
胆甾醇[42]		甾体	参与体内多种生物学活动	CC-ABPP	250 个	Hela cells	<i>in vitro</i>
同上[43]		甾体	同上	ABPP	Sonic hedgehog (SHH) 蛋白	HEK293a Shh + cells.	<i>in vitro</i>
胆汁酸[44]		甾体	帮助膳食脂肪消化	PAL-CC-ABPP	600	Hela cells	<i>in vitro</i>
小檗碱[45]		生物碱	抑菌、抗肿瘤	ABPP	肌动蛋白	Jurkat T-cells	<i>in vitro</i>
Avrainvillami-de[46]		生物碱	抗增殖	ABPP	核蛋白的 Cys275	T-47D	<i>in vitro</i>
苦参碱[47]		生物碱	抗癌	PAL-ABPP	膜联蛋白 A2 (ANXA2)	Hep3B cell	<i>in vitro</i>
Pateamine A[48]		海洋天然产物	真核翻译起始抑制剂	ABPP	真核翻译起始因子 4A (eIF4A)	RKO cells	<i>in vitro</i>
Diazonamide A[49]		海洋天然产物	阻断纺锤体组装	ABPP	一种线粒体酶 (OAT)	Hela cells	<i>in vitro</i>
来普霉素 B[50]		其他	抗真菌	ABPP	N-乙酰化-L-半胱氨酸甲酯	HeLa cells	<i>in vitro</i>
根赤壳菌素[51]		其他	抗真菌	ABPP	ATP-柠檬酸裂解酶-热休克蛋白 (HSP90)	HeLa cells	<i>in vitro</i>
FR177391[52]		其他	抗高血脂药	ABPP	蛋白磷酸酶 2A (PP2A)	3T3-L1 fibroblasts	<i>in vitro</i>

续表 1 (Continued Tab. 1)

天然产物 Natural products	探针结构 ABPs	类型 Type	药理活性 Pharmacology activity	探针方法 Probe method	靶蛋白 Protein target	实验所用细胞 系或其他 Cell line or others	<i>in vivo</i> / <i>in vitro</i>
环孢霉素 <sup>[53,54]</sup>		其他	抗肿瘤	ABPP	蛋白酶体	E14 cells	<i>in vivo</i>
砷 <sup>[55,56]</sup>		其他	治疗急性早幼粒细胞白血病	ABPP	360 个	HEK293T cells	<i>in vivo</i>
万古霉素 <sup>[57]</sup>		其他	糖苷类药物	PAL-CC-ABPP	葡萄糖菌自溶素 A11 蛋白和 ABC 转运蛋白	金黄色葡萄球菌	<i>in vivo</i>
Ramariolides A-D <sup>[58]</sup>		其他	抗菌	PAL-CC-ABPP	9 个	Mycobacterial cells	<i>in vivo</i>
阿西维辛 <sup>[59]</sup>		其他	抗癌、抗寄生虫	CC-ABPP	ALDH4A1 酶	mouse liver cells	<i>in vivo</i>
姜黄素 <sup>[60]</sup>		其他	抗癌、抗炎、抗感染	CC-ABPP	197 个	HCT116 cells	<i>in vivo</i>
寄端霉素 <sup>[61]</sup>		其他	抗肿瘤和抗菌	CC-ABPP	TbGSK3short 蛋白和 TbCLK1 激酶	布鲁氏菌	<i>in vivo</i>
4-hydroxy-2-nonenal <sup>[62]</sup>		其他	内源性的脂质亲电试剂	PAL-CC-ABPP	398 个	RKO cells	<i>in vivo</i>

## 参考文献

- Newman DJ, et al. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014 [J]. *J Nat Prod*, 2016, 79: 629-661.
- Siow YL, et al. Emerging issues in traditional Chinese medicine [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2005, 83: 321-334.
- Schenone M, et al. Target identification and mechanism of action in chemical biology and drug discovery [J]. *Nat Chem Biol*, 2013, 9: 232-240.
- Zhang XL, et al. Recent advances of chemical proteomics for protein drug target screening [J]. *Sci Sin Vitae (中国科学: 生命科学)*, 2018, 48: 160-170.
- Miao Q, et al. Chemical proteomics and its impact on the drug discovery process [J]. *Expert Rev Proteomics*, 2014, 9: 281.
- Harding MW, et al. A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase [J]. *Nature*, 1989, 341: 758-760.
- Zhou YQ, et al. Target identification of bioactive natural products [J]. *Acta Chim Sinica (化学学报)*, 2018, 76: 177-189.
- Chen X, et al. Target identification with quantitative activity based protein profiling (ABPP) [J]. *Proteomics*, 2017, 17: 1600212.
- Krysiak J, et al. Activity-based protein profiling for natural

- product target discovery [J]. *Top Curr Chem*, 2012, 324 (19):43-84.
- 10 Qiu WW, et al. Photoaffinity labeling in drug discovery [J]. *Chin Bull Life Sci (生命科学)*, 2005, 17:296-303.
- 11 Singh A, et al. The photolysis of diazoacetylchymotrypsin [J]. *J Biol Chem*, 1962, 237:3006-3008.
- 12 Dr HCK, et al. Click-Chemie: diverse chemische Funktionalität mit einer Handvoll guter Reaktionen [J]. *Angew Chem*, 2001, 113:2056-2075.
- 13 Speers AE, et al. Profiling enzyme activities *in vivo* using click chemistry methods [J]. *Chem Biol*, 2004, 11:535-546.
- 14 Li Z, et al. Tetrazole photoclick chemistry: reinvestigating its suitability as a bioorthogonal reaction and potential applications [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2016, 55:2002-2006.
- 15 Li Z, et al. "Minimalist" cyclopropene-containing photo-cross-linkers suitable for live-cell imaging and affinity-based protein labeling [J]. *J Am Chem Soc*, 2014, 136:9990-9998.
- 16 Li Z, et al. Design and synthesis of minimalist terminal alkyne-containing diazirine photo-crosslinkers and their incorporation into kinase inhibitors for cell- and tissue-based proteome profiling [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2013, 52:8551-8556.
- 17 Li Z, et al. Tetrazole-Based probes for integrated phenotypic screening, affinity-based proteome profiling and sensitive detection of a cancer biomarker [J]. *Angew Chem*, 2013, 52:8551-8556.
- 18 Zhou Y, et al. Global profiling of cellular targets of gambogic acid by quantitative chemical proteomics [J]. *Chem Commun*, 2016, 52:14035-14038.
- 19 Liao LX, et al. Highly selective inhibition of IMPDH2 provides the basis of antineuroinflammation therapy [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114:5986-5994.
- 20 Battenberg OA, et al. Target profiling of 4-hydroxyderricin in *S. aureus* reveals seryl-tRNA synthetase binding and inhibition by covalent modification [J]. *Mol Bio Syst*, 2013, 9:343-351.
- 21 Kwok BHB, et al. The anti-inflammatory natural product parthenolide from the medicinal herb feverfew directly binds to and inhibits I $\kappa$ B kinase [J]. *Chem Biol*, 2001, 8:759-766.
- 22 Konziase B. Biotinylated probes of artemisinin with labeling affinity toward *Trypanosoma brucei* target proteins [J]. *Anal Biochem*, 2015, 482:25-31.
- 23 Ismail HM, 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 USA*, 2016, 11:2080.
- 24 Wang J, et al. Haem-activated promiscuous targeting of artemisinin in *Plasmodium falciparum* [J]. *Nat Commun*, 2015, 6:10111.
- 25 Zhou Y, et al. Profiling of multiple targets of artemisinin activated by hemin in cancer cell proteome [J]. *ACS Chem Biol*, 2016, 11:882-888.
- 26 Dong T, et al. Ainsliadimer a selectively inhibits IKK $\alpha$ /beta by covalently binding a conserved cysteine [J]. *Nat Commun*, 2015, 6:6522.
- 27 Kalesh KA, et al. Target profiling of zerumbone using a novel cell-permeable clickable probe and quantitative chemical proteomics [J]. *Chem Commun*, 2015, 51:5497-5500.
- 28 Sin N, et al. The anti-angiogenic agent fumagillin covalently binds and inhibits the methionine aminopeptidase, MetAP-2 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94:6099-6103.
- 29 Griffith EC, et al. Molecular recognition of angiogenesis inhibitors fumagillin and ovalicin by methionine aminopeptidase 2 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95:15183-15188.
- 30 Liu CX, et al. Adenanthin targets peroxiredoxin I and II to induce differentiation of leukemic cells [J]. *Nat Chem Biol*, 2012, 8:486-493.
- 31 Kong LM, et al. Identification and validation of p50 as the cellular target of eriocalyxin B [J]. *Oncotarget*, 2014, 5:11354-11364.
- 32 Li D, et al. Natural product kongensin A is a non-canonical HSP90 inhibitor that blocks RIP3-dependent necroptosis [J]. *Cell Chem Biol*, 2016, 23:257-266.
- 33 Zhou Y, et al. Chemical proteomics reveal CD147 as a functional target of pseudolaric acid B in human cancer cells [J]. *Chem Commun*, 2017, 53:8671-8674.
- 34 Wang J, et al. A quantitative chemical proteomics approach to profile the specific cellular targets of andrographolide, a promising anticancer agent that suppresses tumor metastasis [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2014, 13:876-886.
- 35 Klaić L, et al. Celastrol analogues as inducers of the heat shock response. design and synthesis of affinity probes for the identification of protein targets [J]. *ACS Chem Biol*, 2012, 7:928-937.
- 36 Corson TW, et al. Triptolide directly inhibits dCTP pyrophosphatase [J]. *Chembiochem*, 2011, 12:1767-1773.
- 37 Zhao Q, et al. Natural products triptolide, celastrol, and withaferin A inhibit the chaperone activity of peroxiredoxin I [J]. *Chem Sci*, 2015, 6:4124-4130.
- 38 Tian Y, et al. The proteomic profiling of calenduloside E targets in HUVEC; design, synthesis and application of biotinylated probe BCEA [J]. *RSC Adv*, 2017, 7:6259-6265.
- 39 Guo H, et al. Competitive affinity-based proteome profiling and imaging to reveal potential cellular targets of betulinic



- acid[J]. Chem Commun,2017,53:9620-9623.
- 40 Falsey RR, et al. Actin microfilament aggregation induced by withaferin A is mediated by annexin II[J]. Nat Chem Biol, 2006,2(1):33-38.
- 41 Paola BM, et al. The tumor inhibitor and antiangiogenic agent withaferin A targets the intermediate filament protein vimentin[J]. Chem Biol,2007,14:623-634.
- 42 Hulce JJ, et al. Proteome-wide mapping of cholesterol-interacting proteins in mammalian cells[J]. Nat Methods,2013,10:259-264.
- 43 Ciepla P, et al. New chemical probes targeting cholesterylation of Sonic Hedgehog in human cells and zebrafish[J]. Chem Sci,2014,5:4249-4259.
- 44 Zhuang S, et al. Chemoproteomic profiling of bile acid interacting proteins[J]. ACS Cent Sci,2017,3:501-509.
- 45 Yi CM, 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,2017,53:7045-7047.
- 46 Wulff JE, et al. The natural product avrainvillamide binds to the oncoprotein nucleophosmin[J]. J Am Chem Soc,2007,129:14444-14451.
- 47 Wang D, et al. Identification of Annexin A2 as a target protein for plant alkaloid matrine[J]. Chem Commun,2017,53:5020-5023.
- 48 Low WK, et al. Isolation and identification of eukaryotic initiation factor 4A as a molecular target for the marine natural product Pateamine A[J]. Methods Enzymol,2007,431:303-324.
- 49 Wang GL, et al. Diazonamide toxins reveal an unexpected function for ornithine delta-amino transferase in mitotic cell division[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2007,104:2068-2073.
- 50 Kudo N, et al. Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1999,96:9112-9117.
- 51 Ki SW, et al. Radicol binds and inhibits mammalian ATP citrate lyase[J]. J Biol Chem,2000,275:39231-39236.
- 52 Yamaoka M, et al. FR177391, a new anti-hyperlipidemic agent from *Serratia*. IV. Target identification and validation by chemical genetic approaches[J]. J Antibiot,2005,58:654-662.
- 53 Meng LH, et al. Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits *in vivo* antiinflammatory activity[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1999,96:10403-10408.
- 54 Sin N, et al. Total synthesis of the potent proteasome inhibitor epoxomicin: a useful tool for understanding proteasome biology[J]. Bioorg Med Chem Lett,1999,9:2283-2288.
- 55 Zhang HN, et al. Systematic identification of arsenic-binding proteins reveals that hexokinase-2 is inhibited by arsenic[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2015,112:15084-15089.
- 56 Zhang X, et al. Identification of arsenic-binding proteins in human breast cancer cells[J]. Cancer Lett,2007,255:95-106.
- 57 Eirich J, et al. Unraveling the protein targets of vancomycin in living *S. aureus* and *E. faecalis* cells[J]. J Am Chem Soc,2011,133:12144-12153.
- 58 Lehmann J, et al. Synthesis of ramariolide natural products and discovery of their targets in mycobacteria[J]. Chem Commun,2017,53:107-110.
- 59 Kreuzer J, et al. Target discovery of acivicin in cancer cells elucidates its mechanism of growth inhibition[J]. Chem Sci,2015,6:237-245.
- 60 Wang J, et al. In situ proteomic profiling of curcumin targets in HCT116 colon cancer cell line[J]. Sci Rep,2016,6:22146.
- 61 Nishino M, et al. Hypothemycin, a fungal natural product, identifies therapeutic targets in *Trypanosoma brucei*[J]. Elife,2013,2:e00712.
- 62 Yang J, et al. Quantitative chemoproteomics for site-specific analysis of protein alkylation by 4-hydroxy-2-nonenal in cells[J]. Anal Chem,2015,87:2535-2541.
- 63 Wright MH, et al. Quantitative chemoproteomic profiling reveals multiple target interactions of spongiolactone derivatives in leukemia cells[J]. Chem Commun,2017,53:12818-12821.
- 64 Zheng BH, et al. Clickable analogue of cerulenin as chemical probe to explore protein palmitoylation[J]. ACS Chem Biol,2015,10:115-121.
- 65 Hewings DS, et al. Reactive-site-centric chemoproteomics identifies a distinct class of deubiquitinase enzymes[J]. Nat Commun,2018,9:1162.
- 66 Han LZ. The mechanism of action *Eucommia ulmoides* and *Cornus officinalis* in the treatment of diabetes mellitus based on network pharmacology[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2019,37:1130-1137.
- 67 Chang J, et al. Advances in identification and validation of protein targets of natural products without chemical modification[J]. Nat Prod Rep,2016,33:719-730.