



中药药效物质辨析技术: 现状与未来

武雨含¹, 李敏¹, 刘豪¹, 王毅^{1,2*}

1. 浙江大学药学院中药科学与工程学系, 杭州 310058;

2. 天津中医药大学, 组分中药国家重点实验室浙江大学交叉创新中心, 天津 301617

* 联系人, E-mail: zjuwangyi@zju.edu.cn

收稿日期: 2021-11-12; 接受日期: 2022-02-11; 网络版发表日期: 2022-06-09

国家自然科学基金(批准号: 82173941)和国家中医药管理局中医药创新团队及人才支持计划项目(批准号: ZYYCXTD-D-202002)资助

摘要 中医药在心脑血管疾病、糖尿病等慢性复杂性疾病防治上具有独特优势, 在抗击新冠肺炎疫情等突发重大传染性疾病中发挥了重要作用。如何从复杂中药物质体系中快速辨析其中的药效物质是中药现代化研究的核心科技问题之一。本文归纳了中药药效物质发现策略, 总结了常用于中药药效物质发现的多尺度筛选模型, 展望了中药药效多模态辨识等创新技术发展方向, 为开展中药药效物质研究提供可借鉴的思路与可行的技术手段。

关键词 中药药效物质, 多模态辨识, 化学生物学, 生物色谱, 高内涵筛选

中药药效物质是从中药材、中药饮片、中成药或方剂中提取、分离得到的具有特定药理活性且能防治疾病或有目的地调节机体生理功能的化学物质^[1]。自20世纪20年代陈克恢教授^[2]发现麻黄碱药理作用以来, 中药药效物质研究一直是现代中医药研究的核心内容之一。1997年中药现代化科技产业行动启动后, 中药药效物质研究策略与技术手段不断创新。据本课题组的不完全统计, 近20年来中药药效物质的相关研究论文数量有明显增长, 从药理活性的构成比例来看, 抗肿瘤、心血管疾病、糖尿病等活性评价占50%以上(图1)。中药药效物质研究领域面临的最大挑战是中药复杂化学组成及其与机体交互作用的复杂性。从包含成百上千种化学成分的中药复杂体系中辨析少数几个或几十个活性物质, 进一步明确其结构与药效作用机制, 研究流程长且工作耗费较大, 往往涉及中药化学、分

析化学、药理学、细胞与分子生物学等多学科技术^[3,4]。因此, 在中药药效物质研究过程中, 需要突破的瓶颈是如何综合运用多种方法从中药复杂混合物体系中快速辨析出其中的药效物质。

中药药效物质快速辨析的重点在于“快速”, 可以从两方面加以解决。一方面是提升中药化学样品制备的自动化程度, 高效制备和持续供应可用于活性评价的样品^[5]; 另一方面是构建灵敏度高、特异性好的中药药效物质筛选模型, 同时检测多个活性指标^[6]。中药药效物质快速辨析的目的在于“辨析”。“辨”对应分辨和识别, 从分子、细胞、类器官到模式生物、整体动物等跨尺度模型, 为中药药效物质的高维度辨识奠定了基础; “析”对应分析、解析, 随着高效液相色谱、质谱、核磁、红外光谱等分析仪器的技术提升, 谱图解析方法的优化以及相关数据库的不断涌现, 研究人

引用格式: 武雨含, 李敏, 刘豪, 等. 中药药效物质辨析技术: 现状与未来. 中国科学: 生命科学, 2022, 52: 943–956

Wu Y H, Li M, Liu H, et al. Identification of active substances from Traditional Chinese Medicine: state-of-the-art and perspectives (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2022, 52: 943–956, doi: [10.1360/SSV-2021-0398](https://doi.org/10.1360/SSV-2021-0398)

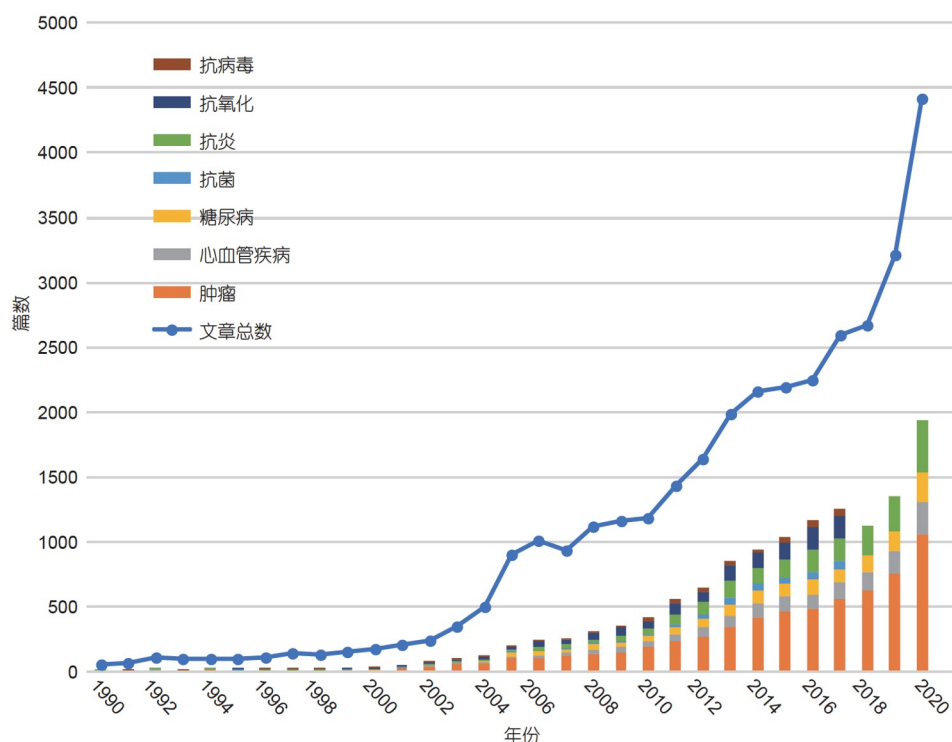


图 1 1990~2020年Web of Science数据库收入的中药药效物质研究论文及变化趋势

Figure 1 Annual numbers of research articles concerning active constituents of Traditional Chinese Medicine indexed by Web of Science from 1990 to 2020 and their trends

员可以在较短时间内实现中药化学成分的分析及鉴定。化学生物学(chemical biology)、网络药理学、组学等新兴技术的快速发展, 又为建立中药药效物质作用机制研究新方法提供了帮助。据此, 本文总结归纳了中药药效物质快速辨析策略, 并简要论述了应用研究示例, 为中药药效物质多模态辨识技术体系的发展提供可供借鉴的总结与展望。

1 中药药效物质辨析策略

总体上看, 研究者大都在分子、细胞、类器官、模式生物、整体动物和临床试验等6个不同层次上开展中药药效物质研究。根据研究对象的复杂程度差异, 又包括基于中药化学、化学生物学、生物色谱技术等不同辨析策略, 其简要划分如图2所示。

1.1 基于中药化学的中药药效物质辨析策略

采用中药化学思维模式发现中药药效物质是利用

各种分离提取技术获取中药的馏分、组分或成分, 经活性评价后筛选发现其中的药效物质。这类方法随着技术进展, 主要有三个研究阶段, 即系统分离筛选、活性追踪、高通量/高内涵筛选。

(1) 系统分离。系统分离筛选作为天然药物化学研究方法最传统的思路, 通过按部就班地提取、分离、结构鉴定, 将复杂体系逐步细分为不同极性部位、组分, 直至单体, 而后进行活性评价从而发现有效成分。该思路虽然典型, 目标化合物结构明确, 但其局限也显而易见, 通常需要较大的工作量, 易发生活性丢失, 同时忽略了中药的整体性, 难以满足中药研究的实际需要。

(2) 活性追踪。活性追踪是在传统的研究思路基础上, 将活性评价环节前移, 与化学分离同步开展, 仅针对有效部位进行持续的分离, 缩减冗杂的无意义分离步骤, 也成为目前较为常见的研究策略。然而减轻工作量的同时, 仍不可避免活性丢失的问题, 以及欠缺中药的整体性思考^[5]。

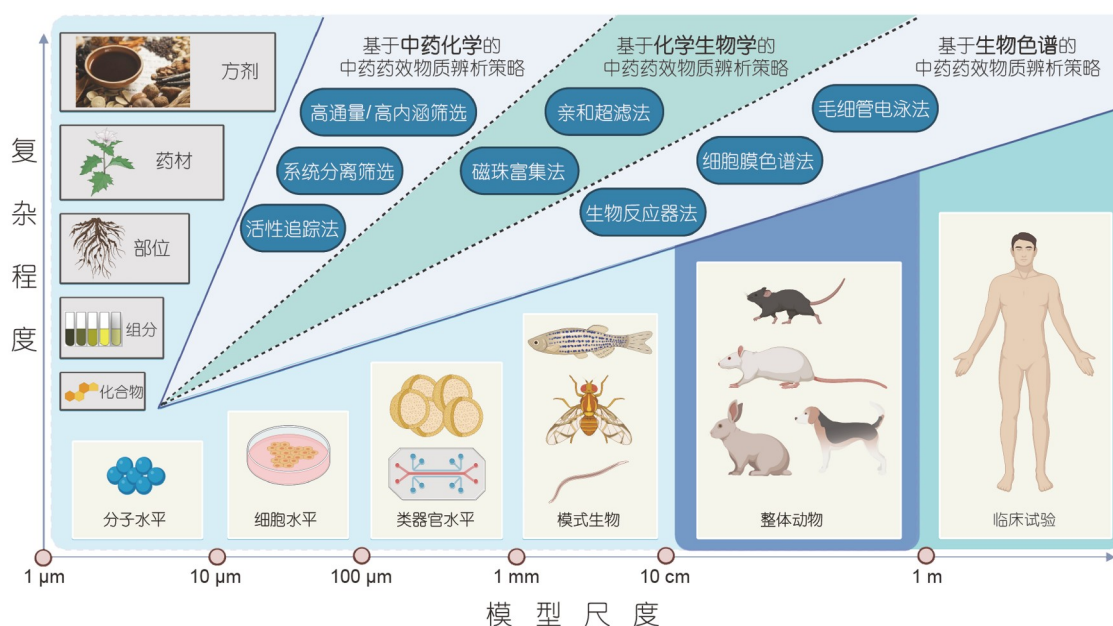


图 2 不同尺度上中药药效物质辨析策略总结

Figure 2 Summary of strategies for discrimination of active constituents of Traditional Chinese Medicine at different scales

(3) 高通量/高内涵筛选. 高通量筛选(high throughput screening, HTS)技术于20世纪90年代中期首次引入, 用以促进药物发现^[7]. HTS技术使用自动化设备评价数千到数百万个样本的生物活性. 在药物发现的早期阶段, 高通量筛选系统以其高效、高速和定量的特点被广泛用于寻找活性化合物以及中药活性成分的筛选^[8,9].

然而, 单靶点筛选有时无法满足中药或化合物库中对化合物活性进行综合评估的需要^[10]. 高内涵成像技术是指利用自动化显微镜和图像分析软件, 同时大规模捕获和分析基于图像的各种生物表型和特征, 形成高内涵筛选技术(high content screening, HCS). HCS作为一种多维评价方法, 随着生物探针和荧光团的快速发展, 荧光成像技术得到长足进步, 同时图像处理能力随着计算机技术的提升而越来越强大, 于是在基于靶点和基于表型的药物发现筛选中都显示出独特的优势^[11]. 与人工筛选技术相比, 自动筛选平台避免了对有效靶标的检测误差和主观偏差, 从而获得更准确的实验结果. 此外, 自动化药物筛选平台节省了人力和资源, 提高了药物筛选的速度和规模, 大大加快了药物发现过程. 本课题组^[12]建立了一种基于细胞模型的高内涵筛选方法, 通过自动采集和处理人近端肾小管

上皮细胞(HK-2)中双荧光标记图像, 从通脉养心丸中发现三个肾小管上皮间质转化的抑制剂.

高通量、高内涵筛选借助创新型的平台工具, 大幅提高活性评价效率和活性化合物的筛选速率, 高通量实现对成分的快速大规模活性筛选, 高内涵实现同时刻的评价维度增加, 对于中药复杂体系中活性物质的快速发现有着极大的助力.

1.2 基于化学生物学的中药药效物质辨析策略

化学生物学是一门利用化学的理论、技术和方法从分子水平研究生命科学的学科. 具体而言, 化学生物学从对生命体生理或病理过程具有调控作用的活性小分子入手, 明晰其结构并找出其在生理或病理过程中的靶点, 研究相互作用; 进一步采用化学手段对小分子的结构进行改造, 形成具有特异性质的活性小分子化合物, 用于解释某种生理或病理过程的发生发展与调控机制^[13]. 与传统的系统分离方法的不同在于它以靶点为目标, 反向寻找与其作用的药效物质(图3).

(1) 亲和超滤法. 亲和超滤(ultrafiltration, UF)结合了亲和捕获和超滤技术, 通过与滤膜上特定靶标的高度亲和作用, 将有效化合物从复杂混合物中分离出来. 将靶点(受体、酶等)与中药提取物共同孵育, 当混合

物通过超滤膜时, 亲和配体被保留在滤膜上, 随后通过离心力将其分离, 经过适当的洗脱处理后重新释放, 然后通过液相色谱或质谱进行分析。亲和超滤技术已广泛应用于中药活性化合物的筛选。Li等人^[14]建立了一种超滤液相色谱-光电二极管阵列检测-电喷雾串联质谱方法(ultrafiltration combined with liquid chromatography-mass spectrometry, UF-LC-MS), 筛选和鉴定山楂叶黄酮类提取物中抗 α -葡萄糖苷酶活性成分。Cheng课题组^[15]提出了一种基于UF-HPLC-DAD-MS筛选和鉴定桑叶中酪氨酸酶抑制剂的新方法。Zhao等人^[16]采用一种基于酶标仪的乙酰胆碱酯酶抑制剂实验结合超滤-高效液相色谱-电喷雾四极飞行时间质谱法快速筛选和鉴定了黄连中具有乙酰胆碱酯酶抑制效果的5种生物碱, 包括哥伦比亚胺、药根碱、黄连碱、巴马汀和小檗碱。Li课题组^[17]提出了以亲和超滤LC-MS和硅分子对接的新策略从中草药中发现高质量的酶抑制剂, 利用这一策略他们预测并证明了异绿原酸A等两种化合物为有效的黄嘌呤氧化酶抑制剂, 其体外 IC_{50} 值低于阳性对照别嘌呤。这些工作表明, 亲和超滤结合LC-MS技术可用于筛选和识别具有靶向作用的底物或抑制剂活性化合物, 适用于快速筛选中药提取物和中药方剂如中药注射剂当中的药效物质。与传统的筛选方法相比, 超滤在从大量混合物中筛选活性化合物时回收率高, 减少了劳动强度和实验时间。

(2) 磁珠富集法。磁珠富集法是采用磁珠作为载体, 通过共价键或吸附固定蛋白质或酶, 与中药提取液共孵育, 磁珠上的靶点将结合中药提取液中的小分子。再通过磁场作用沉降磁珠, 分离混合物中特异性结合的成分。结合蛋白的稳定性, 磁性分离的简便性, 是这种技术的独特优势。

目前, 磁珠在复杂天然产物中发现生物活性化合物中的应用中取得了显著进展。SIRT6是Sirtuin家族中的一种组蛋白去乙酰化酶, 在调节生物通路中发挥重要作用, 被认为是代谢紊乱和预防年龄相关性疾病的潜在治疗靶点, Yasuda等人^[18]建立了利用SIRT6固定化磁珠筛选方法, 从天然植物提取物中发现槲皮素和牡荆素在体外具有抑制SIRT6活性的能力。Singh课题组^[19]使用SIRT6包被的磁珠并结合质谱分析技术从葫芦巴提取物中鉴定了新型SIRT6抑制剂荭草苷。本课题组^[20,21]利用 α -葡萄糖苷酶包被的磁珠结合LC-MS和NMR技术从药用植物桑树提取物中筛选潜在的 α -葡

萄糖苷酶抑制剂异槲皮苷和黄芪甲苷, 还开发了一种利用多靶点固定化磁珠结合高效液相色谱-质谱法从中药筛选生物活性化合物的方法, 可以从混合提取物中富集和鉴定不同类型的配体, 磁珠上通过共价键固定了麦芽糖酶、转化酶、脂肪酶这三个靶点, 并对pH、离子强度、培养时间和温度进行了优化, 并鉴定了中药方剂“糖脂清”中对这三个靶点表现出活性的2,3,4,6-tetra-*O*-galloyl-D-glucose等5种化合物, 表明该方法不仅适用于从单一药用植物提取物中分离鉴定单靶点的化合物, 也同样适用于中药复方中多种靶点的药效物质鉴定。大量研究表明, 基于磁珠的方法可以快速识别各种混合物中的活性化合物, 并结合液相色谱和质谱准确阐明这些生物活性物质的结构^[22,23]。

1.3 基于生物色谱技术的中药药效物质辨析策略

生物色谱是将生命科学与色谱、质谱等化学分析技术集成所发展起来的新兴技术, 主要包括两种研究思路: 一种是将靶点分子如受体、酶、核酸等, 细胞膜或活细胞等键合在固定相上, 通过活性成分与生物大分子间的相互作用实现色谱分离, 从而快速筛选鉴定中药药效物质; 另一种是在色谱分离的基础上, 通过柱前或柱后引入在线生化检测器, 实现活性筛选、化学在线分析。

(1) 细胞膜亲和色谱。细胞膜亲和层析(cellular membrane affinity chromatography, CMC)是生物亲和层析技术的一种, 它将人或动物的活细胞膜固定在特定的载体表面, 用于研究药物与受体的相互作用。CMC利用经典色谱、细胞生物学和受体动力学的特点, 可实现天然产物的高通量在线筛选。Hou等人^[24]利用血管平滑肌细胞膜色谱-气相色谱/质谱联用技术, 从白芷、羌活、蛇床子中发现了可舒张KCl刺激的胸动脉预收缩的活性化合物。Wang等人^[25]通过人表皮鳞状细胞膜色谱结合高效液相色谱和质谱联用方法, 从苦参中发现表皮生长因子受体拮抗剂。Wu等人^[26]报道了CMC与超高效液相色谱飞行时间质谱联用筛选远志中的自噬诱导物。Wang等人^[25]将人表皮鳞状细胞(A431细胞)的细胞膜吸附到基质表面制成固定相用于中药提取物样品分离, 由于该细胞高表达表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR), 故样品中含有的活性物质会与EGFR相互作用, 保留时间延长。他们用该生物色谱筛选苦参提取物中EGFR抑制

剂. Bu等人^[27]将高表达表皮生长因子受体4(fibroblast growth factor receptor 4, FGFR4)的成纤维细胞膜包裹二氧化硅颗粒, 作为固相萃取剂对中药川乌进行了预处理用于富集中药川乌中FGFR4配体, 并与高效液相色谱/飞行时间质谱(high performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry, HPLC/TOFMS)联用筛选并鉴定了4种生物碱, 其中一种生物碱茶普洛宁在包括细胞增殖和分子对接试验在内的初步药理验证试验中显示出良好的抗肿瘤活性.

(2) 毛细管电泳. 毛细管电泳(capillary electrophoresis, CE)作为一种高效的分离方法, 具有分离效率高、分析速度快、样品消耗少等独特优势^[28,29]. 酶可以固定在CE的内表面上或使用生物反应器作为CE的入口. 由于生化分析被集成到CE的分离过程中, 避免了底物和复杂样品基质的干扰. Li等人^[30]利用CE结合高效液相色谱-串联质谱(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)筛选天然产物提取物中EGFR抑制剂, 对39种中药天然产物提取物进行了研究.

(3) 生物反应器/生物芯片. 生物反应器已成为分析和筛选生物活性化合物的一种有吸引力的介质, 其中酶固定化微反应器极具潜力, 适用于固定化酶的表面类型包括玻璃、琼脂糖、磁珠以及其他聚材料^[31]. 固定化酶反应器(international maritime emission reduction scheme, IMERs)也成为一种有效的亲和筛选潜在酶抑制剂或活化剂的技术, 也经常与CE结合使用. Camara等人^[32]使用多层CE-IMERs在线检测绿茶提取物对葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PDH)的活性和抑制作用. Zhang等人^[33]介绍了一种利用IMER从天然产物中筛选 α -葡萄糖苷酶抑制剂的方法, 其中金纳米粒子共价吸附在毛细管表面作为固定相. Schejbal等人^[34]使用磁性微粒为药物代谢酶CYP2C9创造了一种IMER, 将酶反应混合孵育、分离、检测和定量集成为一个单一的全自动过程, 实现了CYP2C9的在线研究.

生物芯片是一种表面以阵列形式接上细胞、多肽、抗原、抗体、激酶以及各种功能性生物分子的载体(如玻璃片、金属片、云母片、滤膜、纳米微球和微孔板)等, 从而形成具有特殊筛选靶点的反应平台, 用于筛选复杂样品中的能与这些生物靶点特异性结合的活性物, 快速、简便以及高通量, 多用于疾病的诊

断、生物标志物的发现、药物活性物质筛选以及药物作用靶点的鉴定等. Zhang等人^[35]设计了一种生物素标记的探针, 将人类全蛋白质组芯片与其共同孵育, 对芯片扫描后发现了一系列具有特异性荧光的潜在靶点, 他们认为其中己糖激酶2是抑制剂治疗白血病最为关键的靶点蛋白. Tu课题组^[36]利用微流控共培养系统建立了一个体外芯片病理模型来模拟炎症性心脏损伤, 该装置由两组薄的互连槽组成, 这些槽在空间上隔离异质细胞, 但保持其可溶因子的通讯. 他们研究了时空受控微环境中巨噬细胞和心肌细胞之间的动态相互作用, 模拟了体内病理生理过程的一个关键方面, 并且在芯片上探索了槲皮素的抗炎和心脏保护作用, 证明了活化炎症的机制与几种炎症细胞因子和NF- κ B(nuclear factor κ -B)途径的上调有关以及该芯片具有抗炎药物筛选的潜力.

2 中药药效物质多尺度筛选模型

近半个世纪以来, 药物筛选技术不断推陈出新. 20世纪60年代以前, 活性化合物筛选大都在整体动物水平上进行, 不仅费时费力, 且成本极高. 20世纪90年代起, 逐渐发展形成了表型筛选和基因型筛选为主的药物筛选技术. 随着分子生物学和细胞生物学的发展, 近年来建立了许多以受体蛋白、酶、离子通道为靶标的高通量筛选模型, 并逐渐在中药药效物质筛选领域得到广泛使用. 与西药先导化合物筛选策略不同的是, 多数中药是基于长期临床实践总结的经验规律, 因此, 中药药效物质的筛选模型包括了从分子水平到整体动物水平, 从微观至宏观的跨尺度、多层次的多种模型, 各有优势和适用范围(表1).

2.1 分子水平

分子水平模型可根据生物大分子的类型, 分为受体、酶、离子通道以及其他类型等. 这类筛选模型从靶点自身的特性出发, 或通过模拟生化反应过程, 从而在分子水平上直接筛选能够结合特定靶点或影响某一生化过程的活性物质, 优势在于快速、微量且易于评价. 但由于该方法往往集中于单个生化反应步骤, 特异性较强, 无法模拟体内起效的真实情况, 因此仅适用于初步筛选.

例如, 本课题组^[37]前期设计了一种能够特异性检

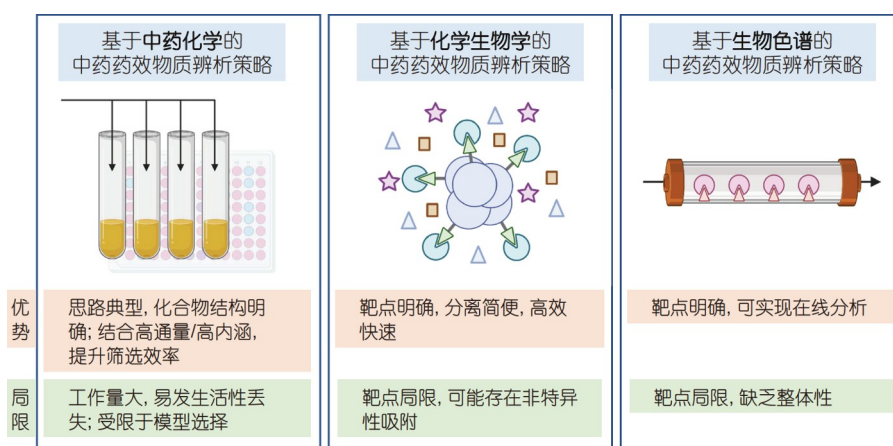


图3 不同辨析策略的优势和局限对比

Figure 3 Comparison of advantages and limitations of different strategies

测Sirt1蛋白的荧光探针, 并在体外筛选得到了19个天然产物来源的Sirt1激动剂, 并在叔丁基过氧化氢诱导的H9c2心肌细胞氧化损伤的模型上对筛选得到的化合物进行验证; 也针对二肽基肽酶-4(dipeptidyl peptidase-4, DPP4)开发了一种新型荧光探针, 用于检测临床样品中的DPP4活性, 并在中药DPP4抑制剂高通量筛选中得到应用^[38]。Guo课题组^[39]设计的异构体特异性探针(*N*-乙基萘酰亚胺)可用于实时和选择性成像生物系统中的内源性CYP3A4活性, 并利用该探针评估了225种中药对CYP3A4酶的抑制作用。

2.2 细胞水平

细胞模型在中药药效物质筛选中应用最为广泛, 采用细胞筛选模型, 能够在保持细胞结构的完整和受体活性的条件下, 通过检测细胞的成活率、形态变化及各种生理生化指标来评价测试样品的药效, 相比于分子水平筛选得出的结论更可靠。与整体动物模型等相比, 细胞模型筛选效率更高、成本更低、所需样本量更少, 是中药药效物质发现较为理想的方法。

例如, 果德安课题组^[40]采用结肠腺癌细胞Caco-2单层细胞模型评价中药名剂葛根苓连汤中42种生物活性化合物的肠道通透性; 本课题组^[41]借助血管紧张素II诱导大鼠(*Rattus norvegicus*)心肌细胞H9c2肥大模型评估了通脉养心丸抗心肌肥大的药效。

2.3 类器官水平

随着新型生物材料的广泛使用, 借助各种工程结

构和材料的三维细胞培养模型比普通二维细胞培养更符合机体生理环境, 类器官模型应运而生。最近的研究结果表明, 3D培养技术使细胞表现出显著的自组织特性, 由此产生的类器官反映了肾脏、肺、肠道、大脑、视网膜等器官的关键结构和功能特性。与动物或临床试验相比, 3D培养能够实现用较低成本、简单手段达到高通量筛选的目的。此外, 类器官可以模拟器官发育的动态时空过程, 模拟各种人类疾病, 并作为一个有效的临床前平台来测试和指导个性化治疗。

虽然目前类器官技术在中药药效物质发现的领域应用较少, 但其培养技术已经可以逐步实现在培养皿中模拟人体器官发育和人类疾病病理, 并在基础研究、药物发现和再生医学中得到了广泛的应用。例如, Li等人^[42]从最常见的肺癌亚型肺腺癌(lung adenocarcinoma, LADC)中建立了12个源自患者的类器官, 并验证其基因组和组织病理, 为体外生物标志物鉴定和高通量药物筛选提供了工具。

2.4 模式生物水平

模式生物的开发与运用对现代生命科学的发展极为关键。模式动物通常具有生长发育周期短、人工繁育简单等特点, 常见的用于药物筛选的生物模型有线虫(*Caenorhabditis elegans*)、果蝇(*Drosophila melanogaster*)和斑马鱼(*Brachydanio rerio*)等。

斑马鱼体外受精发育、胚胎透明、体型小且繁殖能力强, 尤其适合开展中药的药理作用研究、药物活性评价以及药效物质的筛选工作。本课题组^[43]前期利

用Cmlc2-GFP心肌特异性荧光标记的斑马鱼品系, 可以在荧光下直接观察心脏的形态和动态, 用特非他定损伤斑马鱼胚胎构建心律失常模型并对稳心颗粒的组分活性进行评价. Xia等人^[44]利用斑马鱼胚胎发现常用中药补骨脂中的补骨脂素能通过氧化应激和能量代谢途径引起斑马鱼胚胎发育畸形, 揭示了补骨脂中的毒性物质, 为临床应用提供了实验依据.

2.5 整体动物水平

整体动物模型最贴近生物实际情况, 可以从整体水平观察药物效应、不良反应及毒性作用, 具备高可信度. 但其实验成本较高、消耗的样品量较大、难以实现大量样品的筛选, 大多只对分子、细胞等简单模型上已发现的中药活性物质进行药效评价和机制研究.

比如, Jiang等人^[45]建立了肾间质纤维化大鼠模型并验证了中药康仙灵抑制肾间质纤维化的药效, 实验结果支持了康仙灵在肾纤维化治疗中的临床应用. Pan等人^[46]从高糖高脂饮食联合链脲佐菌素诱导的2型糖尿病大鼠模型中收集血清样本, 通过测量生化标志物水平评估了黄连汤的药效; 其课题组前期使用心肌缺氧复氧损伤的大鼠来模拟心肌缺血/再灌注过程中的心脏损伤, 通过心电超声、组织病理学等手段评估了通脉方对心血管疾病的治疗效果.

3 中药药效物质辨析的新兴技术和研究思路

随着对生理和病理进程中生物大分子结构与功能的了解日益深入, 现代科学与医学对生命现象和疾病本质的认识不断推进, 基因敲除/过表达的细胞、动物与转基因动物、模式生物等模型能够更准确地反映药理效应, 可用于深入阐明中药药效物质的作用机制. 基因组学、蛋白质组学、代谢组学等技术在寻找中药作用靶点和作用途径上也得到了广泛的应用. 网络药理学、多向药理学等新技术的引入, 突破了传统药理学以单靶点为对象的研究思路, 为阐释中药多靶点、多途径的作用模式提供了新策略^[47].

3.1 荧光检测法

这类方法是将荧光基团引入受体或配体中, 通过

受体与配体结合反应使荧光产生变化, 通过药物加入后荧光信号的变化反映药物对该生理过程的影响, 将反应前后荧光的变化作为药物活性的检测指标. 常见的荧光检测方法包括荧光强度检测、荧光共振能量转移检测以及荧光偏振检测方法、比率型荧光检测等. 荧光检测方法最常用于高通量快速筛选化合物, 具有灵敏度高、检测方便、易于微量化等特点^[48].

(1) 荧光强度检测法. 荧光强度检测法是以反应前后荧光强度的变化作为检测反应的表征. 一般采用共价结合的方法将荧光基团反应体系中的生化反应作为荧光响应的开关. 比如, 本课题组^[49]前期利用Sirt1的特异性底物肽段连接一个TPE基团设计合成了Sirt1特异性探针, 并用该探针筛选了195种中药单体化合物. 随着超分子化学的发展, 无须荧光基团共价标记的方法频繁出现. 比如, Wang课题组^[50]根据荧光指示剂置换分析策略设计了一种筛选黄素单加氧酶3 (flavin monooxygenase 3, FMO3) 抑制剂的方法, oxazine 1阳离子荧光染料(OX1)和磺化杯4芳烃(4-sulfo-calix[4]arene, SC4A)组成荧光报告对, SC4A可以淬灭OX1的荧光, 盐酸三甲胺(trimethylamine, TMA)可被FMO3催化形成氮氧化物(N-oxide, TMAO), TMA从SC4A中置换出OX1的能力强于TMAO, 当FMO3被抑制时, TMA转化成TMAO变少, 更多的OX1被置换出来, 会产生更强的荧光, 他们利用该方法从血府逐瘀汤中筛选出柚皮苷等8种对FMO3有抑制作用的中药化合物.

(2) 荧光共振能量转移法. 荧光共振能量转移法 (fluorescent resonance energy transfer, FRET)是指两个不同的荧光基团, 如果一个荧光基团(供体)的发射光谱与另一个荧光基团的吸收光谱有所重叠, 当这两个荧光基团的间距合适时就可以观察到荧光能量由供体向受体转移的现象, 即以供体的激发波长激发时可以观察到受体发射的荧光. 该原理常被用于蛋白酶的检测, 在对应的底物多肽的两端分别标记上供体和受体荧光基团, 由于两者距离相近会发生FRET效应导致荧光淬灭, 而当底物被催化后, 供体与受体分开, 同一激发波长下最大发射波长处荧光强度增加, 且与酶催化反应产物成正比. Tian等人^[51]基于荧光共振转移原理设计了一种依赖细胞的高通量FRET筛选方法, 建立表达基于FRET的生物传感器蛋白稳定的HeLa细胞系. 细胞凋亡时激活caspase-3蛋白酶, 这种酶激活后会切

表 1 不同筛选模型的优缺点

Table 1 Advantages and disadvantages of different screening models

模型	优点	缺点
分子	快速、微量、易于评价	仅适用于初步筛选, 没有整体性
细胞	筛选效率高、成本低、所需样本量少, 结论比分子更可靠	仅适用于初步筛选, 没有整体性
类器官	筛选效率高、成本低, 更接近体内真实情况	不易实现多个样品的同时筛选
模式生物	生长发育周期短、人工繁育简单	实验成本较高, 给药方式受限
整体动物	最贴近生物实际情况, 具备高可信度	实验成本高, 消耗的样品量大, 难以实现大量样品的筛选

割传感器蛋白, 导致其荧光发射从535 nm(绿色)波长转移到486 nm(蓝色). 通过绿/蓝发射比的降低直接表明细胞凋亡. 利用这种方法从丹参等中药材种筛选得到了能够诱导细胞凋亡的单体化合物.

(3) 荧光偏振法. 荧光偏振^[52]是研究水溶液中生物分子相互作用的一种强有力的荧光技术. 荧光偏振, 或各向异性, 是荧光分子的一种性质, 可以使用荧光偏振仪器进行测量. 利用偏振光激发荧光样品, 并收集平行于和垂直于偏振光电矢量通道的发射光强度. 当荧光分子越小时, 其被偏振光激发时所偏转的角度就越随机, 导致偏振值低, 而当分子比较大时, 被偏振光照射时所偏转的角度不大, 会导致偏振值高. 所以当荧光小分子与生物大分子集合后其偏振值会发生变化从而实现生化反应的检测. Iyamu和Huang^[53]设计了一种荧光偏振探针, 由对烟酰胺 N -甲基转移酶具有高度亲和力的抑制剂分子LL320, 丙基连接子和荧光素三个部分组成, 他们对一系列已知配体进行了表征, 结果表明, 除了高强度化合物(<500 nmol/L)外, 其他值与文献报道值非常一致, 可用于高通量筛选烟酰胺 N -甲基转移酶抑制剂.

(4) 基于荧光检测法的高内涵筛选. 高内涵筛选通过使用自动显微镜和图像分析软件来大规模捕获和分析表型, 以同时研究生物复合体中的多个生物特征. 通过化学染料、基因编码的荧光蛋白或用于免疫荧光的荧光团偶联抗体或寡核苷酸等方法, 标记感兴趣的蛋白或基因, 并对细胞或组织中的隔室或细胞器进行分子成像^[54]. 荧光标记应足够亮, 以尽量减少曝光时间. 使用多个荧光探针进行标记时, 必须避免不同通道之间的渗漏^[55]. 在大规模筛选应用之前, 应首先在单个样品上测试探针以确认适用性并确保特定和可测的关键表型.

例如, Yan等人^[56]基于真核起始因子4E(eukaryotic translation initiation factor 4E, eIF4E)在小鼠胚胎成纤维细胞中的亚细胞定位, 通过高内涵筛选实验发现了mTOR信号通路的抑制剂, 鉴定出两种化合物可以导致癌细胞的细胞毒性和细胞凋亡. Zou等人^[57]将经典Wnt信号通路的重要成员, β -catenin作为靶点进行高内涵筛选, 在评估的14种植物提取物中, 白藜芦醇显著下调了 β -catenin的表达, 被用来鉴定一种用于治疗骨肉瘤的新型潜在药物.

3.2 中药药效物质辨析的组学研究方法

近年来, “组学”在中医药研究中的应用备受关注^[58]. 组学研究方法关注生物体整体变化, 与中医理论存在一定程度的共同性. 目前, 最常用的组学技术包括miRNA组学、转录组学、表观基因组学、蛋白质组学和代谢组学. 其中, 转录组学、蛋白质组学和代谢组学在中药药效物质研究中的应用方兴未艾^[59]. 通过比较中药干预前后miRNA、基因、蛋白或代谢物的表达谱差异, 一方面有利于阐明中药药效物质的作用机制, 另一方面也有望对活性成分或组分进行系统性的药效评价. 组学领域的快速发展为中医药与现代技术和系统生物学的融合提供了新的工具, 进一步推动了中医药的现代化和国际化.

转录组学与中医理论的整合有助于理解中药多组分成分的协同起效^[60,61]. 如范晓辉课题组^[62]基于转录组学, 从血塞通注射液治疗的心肌梗死大鼠心脏的病变区域收集样本并用于筛选验证差异基因. 基于蛋白质组学技术, 研究中药药效物质是如何调控、修饰多个靶点蛋白, 如何通过多通路作用发挥整合调节作用的新途径, 有助于阐释中药药效物质作用机制^[63]. 例如, Chou等人^[64]使用赖氨酸和半胱氨酸标记的两种

方法分析了小檗碱治疗对人乳腺癌细胞系MCF-7中差异蛋白表达和氧化还原调节的影响. 代谢组学是对生物体内所有小分子代谢物进行定性定量分析, 并寻找代谢物与生理病理变化的对应关系, 是系统生物学的组成部分. 近年来, 代谢组学已成功应用于中医证候的研究. 例如, Zhang等人^[65]采用综合蛋白组学和代谢组学研究苦参诱导的肝毒性的机制和物质基础. 结果显示, 254种蛋白质和42种代谢物差异表达, 其中7种蛋白质在3条途径中显著富集. 生物信息学表明, 20种化合物可能会干扰7个靶点的表达. Dong等人^[66]提出了“组学鉴别-灰色关联-生物学验证”研究策略, 实现了梔子的关键药理成分的快速鉴定, 鉴定了27种潜在的保肝活性成分和21种具有抗炎特性的潜在活性成分.

3.3 中药谱效学研究方法

中药谱效学研究方法, 采用色谱、质谱等分析技术构建中药单味或复方的一维、二维、多维指纹图谱, 对其中化学成分进行定性、定量分析, 同时结合合适的药效评价模型形成活性数据, 最后将化学成分信息和活性数据进行关联, 建立谱-效关系, 从而确定与药效相关的化学成分群^[67], 已应用于血府逐瘀汤^[68]、吴茱萸汤^[69]等研究工作中. 该研究思路仍存在整体思路的局限性, 单一图谱不能完全反映分析对象全部的化学特征, 药效评价模型难以结合中医证候特点, 使得化学与活性的关联性仍有待考究. 随着分析技术的提升, 高通量、高内涵筛选方法的引入, 使得化学内涵和活性评价速率大幅提升, 如何高效地整合大量化学信息和生物信息, 正确反映化学成分在药效中的贡献值是其中值得深究的环节, 传统数理方法包括相关分析、典型相关分析、聚类分析、主成分分析等得到了应用^[70], 人工神经网络、机器学习等新工具方法也产生了新的应用可能.

3.4 质谱分子网络研究方法

物质基础鉴定已成为中药材及复方等复杂体系研究的基本步骤, 全面的物质解析能够为后续靶点发现、药效物质筛选、质量标准建立等工作提供最为坚实的基础. 目前主要的分析技术中, LC-MS结合了液相的高效分离和质谱的解析能力, 是物质基础快速解析的不二选择^[71]. 然而, 质谱数据产出大量数据的同时,

解析效率却受到局限, 数据不能快速地转化为有用的信息. 质谱数据库应用能力欠缺, 大部分天然产物相关的质谱数据库收录不全面, 需要多数据库互相补充^[72,73].

质谱分子网络(molecular networking, MN)作为质谱数据可视化的新兴策略^[74], 以各个前体离子的碎裂模式之间的相似性为基本原理, 组织串联质谱的大数据集, 将MS/MS谱中相似程度高的进行集中, 并输出为可视化网络, 有助于质谱数据的可视化和注释^[75]. 结合多样的拓展工具, 已经广泛应用于天然产物包括微生物、海洋生物、植物及相关代谢组学的研究当中. Caesar等人^[76]采用活性导向分离、生物化学计量比分析与MN结合的方法, 用于评估当归(*Angelica keiskei*)对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的抗菌活性, 首次报道具有抗菌活性的低丰度化合物 xanthoangelol. K. Li等人^[77]通过MN从灵芝孢子粉中鉴定了109种成分, 并结合斑马鱼模型筛选免疫活性化合物. Wang等人^[78]采用Q-Orbitrap结合MN方法, 开展平滑肌化学分析和代谢物分析, 从70%甲醇提取物中鉴定出89个生物碱、类黄酮、有机酸和酚类化合物, 在大鼠血液中迅速确认了15种吸收的原型化合物及其代谢产物. 此外MN应用于黄芩(*Scutellaria baicalensis*)^[79]、地龙(*Pheretima aspergillum*)^[80]、云南花莲(*Paris polyphylla* var. *yunnanensis*)^[81]、青蒿(*Artemisia annua* L.)^[82]等也有相关报道.

3.5 中药药效物质多模态辨识方法

多模态辨识是依据中医整体观, 运用多尺度模型, 围绕多个靶点, 检测多个指标, 获取多模态信息进行的综合药效物质研究辨析. 以化学分析、影像学、多组学以及信息学等学科技术为基础, 通过不同尺度辨析中药化学组成与生物效应间的相关性, 并运用模式识别、机器学习等智能计算方式融合多模态信息, 从而推动中药药效物质辨识向高效发展^[1]. 例如, 本课题组围绕“如何系统辨识生脉方药效物质”问题, 开展了系统制备、鉴定其全方和组分的化学组成研究; 从整体动物上评价其药效, 运用多组学技术发现其可能的多种作用途径, 并在分子水平设计Sirt1和ACE探针, 用于药效成分的筛选. 依托多尺度模型、多指标观测诠释了生脉方抗心肌损伤的药理作用^[37,83-85].

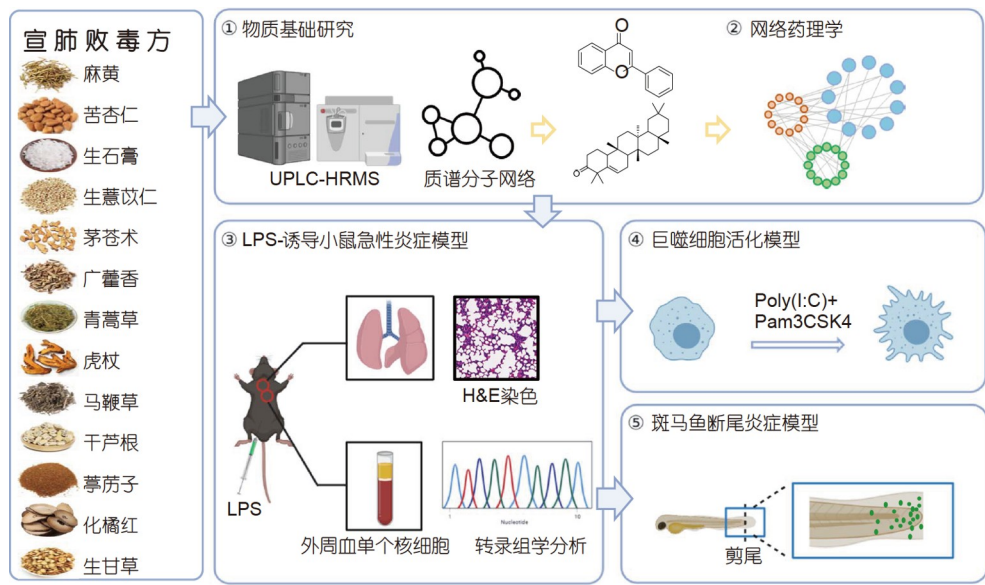


图 4 宣肺败毒方的药效物质多模态辨析流程
Figure 4 Schematic flowchart for multi-modal study of active constituents of Xuanfeibaidu Formula

4 研究示例

本课题组^[86]前期采用多尺度评价模型开展了宣肺败毒方抑制炎症反应药效物质辨析研究。首先通过液质联用技术对中药复方中的化学成分进行快速鉴别, 并通过网络药理学方法初步分析作用靶点。聚焦于巨噬细胞相关免疫调节作用, 采用整体动物模型验证了宣肺败毒方对肺部炎症的治疗作用(图4), 并分离了外周血单核细胞进行转录组分析, 筛选其抗炎作用的靶点和通路。在此基础上, 采用巨噬细胞活化模型和斑马鱼巨噬细胞迁移模型对宣肺败毒方中的主要化学成分进行筛选, 从而发现虎杖苷、异甘草苷等药效物质。该实例结合化学分析和多尺度的药理模型, 实现了复杂方剂中的药效物质辨析。

5 展望

随着研究的不断深入, 新方法、新仪器的出现大幅提升了分析中药药效成分的能力, 运用多种技术手段实现中药药效物质的多模态跨尺度辨识已成为可能。尽管如今已涌现出多样的策略和途径用于探索中药药效物质, 但其中仍有诸多限制和难处, 需要思考如何在中医理念指导下开展研究, 从研究思路、方法及评价指标等方面突破创新, 展现中医药的特色。此外, 需要继续坚持化学、生物学、药理学、信息学等多学科交叉, 多领域、多种技术的融合发展, 从微观到宏观的多尺度评价、化学信息和生物信息的多模态融合^[1], 助力新时代中药的科学发展。

参考文献

- 1 Wang Y, Zhang H, Zhang B L, et al. Methodology and applications for multimodal identification of active constituents of Traditional Chinese Medicine (in Chinese). Chin J Chin Mater Med, 2020, 45: 1-6 [王毅, 张晗, 张伯礼, 等. 中药药效物质多模态辨识方法学及其应用研究. 中国中药杂志, 2020, 45: 1-6]
- 2 Ding G S, Ke Hui Chen, Internationally renowned pharmacologist (in Chinese). Prog Physiol Sci, 2009, 40: 289-291 [丁光生. 陈克恢——国际著名药理学家. 生理科学进展, 2009, 40: 289-291]
- 3 Li P. Analysis of development trend in the field of Traditional Chinese medicine (in Chinese). Sci Front, 2018, 10: 44-50 [李萍. 中药领域的发展态势分析. 科学观察, 2018, 10: 44-50]

- 4 Wang Y H, Yang L. Systems pharmacology-based research framework of Traditional Chinese Medicine (in Chinese). *World Chin Med*, 2013, 8: 801–808 [王永华, 杨凌. 基于系统药理学的现代中药研究体系. *世界中医药*, 2013, 8: 801–808]
- 5 Tu P F, Shi S P, Jiang Y. Strategies and approaches on exploring material basis of Chinese materia medica (in Chinese). *Chin Trad Herb Drugs*, 2012, 43: 209–215 [屠鹏飞, 史社坡, 姜勇. 中药物质基础研究思路与方法. *中草药*, 2012, 43: 209–215]
- 6 Yao X S, Hu K. Studies on the modernization of Chinese Traditional Compound Medicine (in Chinese). *Prog Chem*, 1999, 11: 192 [姚新生, 胡柯. 中药复方的现代化研究. *化学进展*, 1999, 11: 192]
- 7 Fu M. Drug discovery from traditional Chinese herbal medicine using high content imaging technology. *J Trad Chin Med Sci*, 2021, 8: 198–204
- 8 Wang Y, Fan X, Qu H, et al. Strategies and techniques for multi-component drug design from medicinal herbs and Traditional Chinese Medicine. *Curr Topic Med Chem*, 2012, 12: 1356–1362
- 9 Zhu Y, Zhang Z, Zhang M, et al. High throughput screening for bioactive components from Traditional Chinese Medicine. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2010, 13: 837–848
- 10 Dove A. Screening for content—the evolution of high throughput. *Nat Biotechnol*, 2003, 21: 859–864
- 11 Wang J, Wu M Y, Tan J Q, et al. High content screening for drug discovery from Traditional Chinese Medicine. *Chin Med*, 2019, 14: 5
- 12 Liu N, Li L, Zhu X, et al. A high content screening assay to identify compounds with anti-epithelial-mesenchymal transition effects from the Chinese Herbal Medicine Tong-Mai-Yang-Xin-Wan. *Molecules*, 2016, 21: 1340
- 13 Bucci M, Goodman C, Sheppard T L. A decade of chemical biology. *Nat Chem Biol*, 2010, 6: 847–854
- 14 Li H, Song F, Xing J, et al. Screening and structural characterization of α -glucosidase inhibitors from hawthorn leaf flavonoids extract by ultrafiltration LC-DAD-MSⁿ and SORI-CID FTICR MS. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2009, 20: 1496–1503
- 15 Yang Z, Zhang Y, Sun L, et al. An ultrafiltration high-performance liquid chromatography coupled with diode array detector and mass spectrometry approach for screening and characterising tyrosinase inhibitors from mulberry leaves. *Anal Chim Acta*, 2012, 719: 87–95
- 16 Zhao H, Zhou S, Zhang M, et al. An *in vitro* AChE inhibition assay combined with UF-HPLC-ESI-Q-TOF/MS approach for screening and characterizing of AChE inhibitors from roots of *Coptis chinensis* Franch. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 120: 235–240
- 17 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. *Chem Commun*, 2015, 51: 1494–1497
- 18 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. *Anal Chem*, 2011, 83: 7400–7407
- 19 Koh C Y, Schaff U Y, Piccini M E, et al. Centrifugal microfluidic platform for ultrasensitive detection of botulinum toxin. *Anal Chem*, 2015, 87: 922–928
- 20 Tao Y, Zhang Y, Cheng Y, et al. Rapid screening and identification of α -glucosidase inhibitors from mulberry leaves using enzyme-immobilized magnetic beads coupled with HPLC/MS and NMR. *Biomed Chromatogr*, 2013, 27: 148–155
- 21 Tao Y, Chen Z, Zhang Y, et al. Immobilized magnetic beads based multi-target affinity selection coupled with high performance liquid chromatography-mass spectrometry for screening anti-diabetic compounds from a Chinese medicine “Tang-Zhi-Qing”. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 78–79: 190–201
- 22 Jonker N, Kretschmer A, Kool J, et al. Online magnetic bead dynamic protein-affinity selection coupled to LC-MS for the screening of pharmacologically active compounds. *Anal Chem*, 2009, 81: 4263–4270
- 23 Pochet L, Heus F, Jonker N, et al. Online magnetic bead based dynamic protein affinity selection coupled to LC-MS for the screening of acetylcholine binding protein ligands. *J Chromatogr B*, 2011, 879: 1781–1788
- 24 Hou X, Zhou M, Jiang Q, et al. A vascular smooth muscle/cell membrane chromatography-offline-gas chromatography/mass spectrometry method for recognition, separation and identification of active components from Traditional Chinese Medicines. *J Chromatogr A*, 2009, 1216: 7081–7087
- 25 Wang S, Sun M, Zhang Y, et al. A new A431/cell membrane chromatography and online high performance liquid chromatography/mass spectrometry method for screening epidermal growth factor receptor antagonists from *Radix sophorae flavescentis*. *J Chromatogr A*, 2010, 1217: 5246–5252
- 26 Wu A G, Kam-Wai Wong V, Zeng W, et al. Identification of novel autophagic *Radix Polygalae* fraction by cell membrane chromatography and UHPLC-(Q)TOF-MS for degradation of neurodegenerative disease proteins. *Sci Rep*, 2015, 5: 17199
- 27 Bu Y, He X, Hu Q, et al. A novel cell membrane affinity sample pretreatment technique for recognition and preconcentration of active

- components from Traditional Chinese Medicine. *Sci Rep*, 2017, 7: 3569
- 28 Wen Y, Li J, Ma J, et al. Recent advances in enrichment techniques for trace analysis in capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 2012, 33: 2933–2952
- 29 Fan Y, Scriba G K E. Advances in-capillary electrophoretic enzyme assays. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 53: 1076–1090
- 30 Li F, Zhang Y, 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 Chromatogr A*, 2015, 1400: 117–123
- 31 Asanomi Y, Yamaguchi H, Miyazaki M, et al. Enzyme-immobilized microfluidic process reactors. *Molecules*, 2011, 16: 6041–6059
- 32 Camara M A, Tian M, Liu X, et al. Determination of the inhibitory effect of green tea extract on glucose-6-phosphate dehydrogenase based on multilayer capillary enzyme microreactor. *Biomed Chromatogr*, 2016, 30: 1210–1215
- 33 Zhang A, Ye F, Lu J, et al. Screening α -glucosidase inhibitor from natural products by capillary electrophoresis with immobilised enzyme onto polymer monolith modified by gold nanoparticles. *Food Chem*, 2013, 141: 1854–1859
- 34 Schejbal J, Řemínek R, Zeman L, et al. On-line coupling of immobilized cytochrome P450 microreactor and capillary electrophoresis: a promising tool for drug development. *J Chromatogr A*, 2016, 1437: 234–240
- 35 Zhang H N, Yang L, Ling J Y, et al. Systematic identification of arsenic-binding proteins reveals that hexokinase-2 is inhibited by arsenic. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 15084–15089
- 36 Ai X, Lu W, Zeng K, et al. Microfluidic coculture device for monitoring of inflammation-induced myocardial injury dynamics. *Anal Chem*, 2018, 90: 4485–4494
- 37 Wang Y, Chen Y, Wang H, et al. Specific turn-on fluorescent probe with aggregation-induced emission characteristics for SIRT1 modulator screening and living-cell imaging. *Anal Chem*, 2015, 87: 5046–5049
- 38 Zhao Y, Zou J, Song Y, et al. A novel label-free fluorescence assay for dipeptidyl peptidase 4 activity detection based on supramolecular self-assembly. *Chem Commun*, 2020, 56: 1629–1632
- 39 Wei W, Li Z, Li H J, et al. The inhibitory effect of 225 frequently-used Traditional Chinese Medicines for CYP3A4 metabolic enzyme by isoform-specific probe. *Fitoterapia*, 2021, 152: 104858
- 40 Wang Q, Kuang Y, Song W, et al. Permeability through the Caco-2 cell monolayer of 42 bioactive compounds in the TCM formula Gegen-Qinlian Decoction by liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis. *J Pharm Biomed Anal*, 2017, 146: 206–213
- 41 Guo R, Liu N, Liu H, et al. High content screening identifies licoisoflavone A as a bioactive compound of Tongmai yangxin Pills to restrain cardiomyocyte hypertrophy via activating Sirt3. *Phytomedicine*, 2020, 68: 153171
- 42 Li Z, Qian Y, Li W, et al. Human lung adenocarcinoma-derived organoid models for drug screening. *iScience*, 2020, 23: 101411
- 43 Liu H, Chen X, Zhao X, et al. Screening and identification of cardioprotective compounds from Wenxin Keli by activity index approach and *in vivo* zebrafish model. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 1288
- 44 Xia Q, Wei L, Zhang Y, et al. Psoralen induces developmental toxicity in *zebrafish embryos/larvae* through oxidative stress, apoptosis, and energy metabolism disorder. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 1457
- 45 Jiang Y, Zhu Y, Zhen T, et al. Transcriptomic analysis of the mechanisms of alleviating renal interstitial fibrosis using the traditional Chinese Medicine Kangxianling in a rat model. *Sci Rep*, 2020, 10: 10682
- 46 Pan L, Li Z, Wang Y, et al. Network pharmacology and metabolomics study on the intervention of Traditional Chinese Medicine Huanglian Decoction in rats with type 2 diabetes mellitus. *J Ethnopharmacol*, 2020, 258: 112842
- 47 Zhao Y, Guo R, Li L, et al. Tongmai formula improves cardiac function via regulating mitochondrial quality control in the myocardium with ischemia/reperfusion injury. *Biomed pharmacother*, 2020, 132: 110897
- 48 Sundberg S. High-throughput and ultra-high-throughput screening: solution- and cell-based approaches. *Curr Opin Biotechnol*, 2000, 11: 47–53
- 49 Wang Y, Liang X, Chen Y, et al. Screening SIRT1 activators from medicinal plants as bioactive compounds against oxidative damage in mitochondrial function. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 1–9
- 50 Yu H, Chai X, Geng W C, et al. Facile and label-free fluorescence strategy for evaluating the influence of bioactive ingredients on FMO3 activity via supramolecular host-guest reporter pair. *Biosens Bioelectron*, 2021, 192: 113488
- 51 Tian H, Ip L, Luo H, et al. A high throughput drug screen based on fluorescence resonance energy transfer (FRET) for anticancer activity of compounds from herbal medicine. *Br J Pharmacol*, 2007, 150: 321–334
- 52 Owicki J C. Fluorescence polarization and anisotropy in high throughput screening: perspectives and primer. *J Biomol Screen*, 2000, 5: 297–306

- 53 Iyamu I D, Huang R. Development of fluorescence polarization-based competition assay for nicotinamide *N*-methyltransferase. *Anal Biochem*, 2020, 604: 113833
- 54 Bray M A, Singh S, Han H, et al. Cell painting, a high-content image-based assay for morphological profiling using multiplexed fluorescent dyes. *Nat Protoc*, 2016, 11: 1757–1774
- 55 Jonkman J, Brown C M, Wright G D, et al. Tutorial: guidance for quantitative confocal microscopy. *Nat Protoc*, 2020, 15: 1585–1611
- 56 Yan J, Zhou H, Kong L, et al. Identification of two novel inhibitors of mTOR signaling pathway based on high content screening. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2013, 72: 799–808
- 57 Zou Y, Yang J, Jiang D. Resveratrol inhibits canonical Wnt signaling in human MG-63 osteosarcoma cells. *Mol Med Rep*, 2015, 12: 7221–7226
- 58 Buriani A, Garcia-Bermejo M L, Bosio E, et al. Omic techniques in systems biology approaches to Traditional Chinese Medicine research: present and future. *J Ethnopharmacol*, 2012, 140: 535–544
- 59 Wang P, Chen Z. Traditional Chinese Medicine ZHENG and Omics convergence: a systems approach to post-genomics medicine in a global world. *OMICS-J Integrat Biol*, 2013, 17: 451–459
- 60 Jiang M, Xiao C, Chen G, et al. Correlation between cold and hot pattern in Traditional Chinese Medicine and gene expression profiles in rheumatoid arthritis. *Front Med*, 2011, 5: 219–228
- 61 Zhang P, Wang X, Xiong S, et al. Genome wide expression analysis of the effect of the Chinese patent medicine Zilongjin tablet on four human lung carcinoma cell lines. *Phytother Res*, 2011, 25: 1472–1479
- 62 Wang L, Li Z, Shao Q, et al. Dissecting active ingredients of Chinese medicine by content-weighted ingredient-target network. *Mol Biosyst*, 2014, 10: 1905–1911
- 63 Suo T, Wang H, Li Z. Application of proteomics in research on Traditional Chinese Medicine. *Expert Rev Proteom*, 2016, 13: 873–881
- 64 Chou H C, Lu Y C, Cheng C S, et al. Proteomic and redox-proteomic analysis of berberine-induced cytotoxicity in breast cancer cells. *J Proteom*, 2012, 75: 3158–3176
- 65 Zhang S N, Li H M, Li X Z, et al. Integrated omics and bioinformatics analyses for the toxic mechanism and material basis of *Sophorae tonkinensis* radix et rhizome-induced hepatotoxicity. *J Pharm Biomed Anal*, 2021, 198: 113994
- 66 Dong R, Tian Q, Shi Y, et al. An integrated strategy for rapid discovery and identification of quality markers in gardenia fructus using an omics discrimination-grey correlation-biological verification method. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 705498
- 67 Qi J, Yu B Y. A new methodology for the quality evaluation of Traditional Chinese Medicine-integrated spectrum-effect fingerprint research (in Chinese). *Chin J Nat Med*, 2010, 8: 171–176 [戚进, 余伯阳. 中药质量评价新模式——“谱效整合指纹谱”研究进展. 中国天然药物, 2010, 8: 171–176]
- 68 Li X, Xiao H, Liang X, et al. LC-MS/MS determination of naringin, hesperidin and neohesperidin in rat serum after orally administrating the decoction of *Bulpleurum falcatum* L. and *Fractus aurantii*. *J Pharm Biomed Anal*, 2004, 34: 159–166
- 69 Ning L L, Bi K S, Wang L, et al. Methodological study on the material basis for the efficacy of the Traditional Chinese Medicine Wuzhuyu decoction (in Chinese). *Acta Pharm Sin*, 2000, 35: 131–134 [宁黎丽, 毕开顺, 王瑞, 等. 吴茱萸汤药效物质基础的方法学研究. 药学报, 2000, 35: 131–134]
- 70 Cai L, Zhang Q, Yang F Q. Applications progress on spectrum-effect relationship in study of Chinese Materia Medica (in Chinese). *Chin Trad Herb Drugs*, 2017, 48: 5005–5011 [蔡靓, 张倩, 杨丰庆. 中药谱效学的应用进展. 中草药, 2017, 48: 5005–5011]
- 71 Kozhura V L, Solov'Eva Zh V, Novoderzhkina I S, et al. Molecular and cellular mechanisms of ischemic damage of the brain in hemorrhagic shock. *Anesteziol Reanimatol*, 1994, 3: 24–28
- 72 Vannucci R C. Mechanisms of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Semin Perinatol*, 1993, 17: 330–337
- 73 Choi M, Choi S J, Jang S, et al. Shikimic acid, a mannose bioisostere, promotes hair growth with the induction of anagen hair cycle. *Sci Rep*, 2019, 9: 17008
- 74 Wang M, Carver J J, Phelan V V, et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat Biotechnol*, 2016, 34: 828–837
- 75 Nothias L F, Petras D, Schmid R, et al. Feature-based molecular networking in the GNPS analysis environment. *Nat Methods*, 2020, 17: 905–908
- 76 Caesar L K, Kellogg J J, Kvalheim O M, et al. Integration of biochemometrics and molecular networking to identify antimicrobials in *Angelica keiskei*. *Planta Med*, 2018, 84: 721–728
- 77 Li Z, Shi Y, Zhang X, et al. Screening immunoactive compounds of ganoderma lucidum spores by mass spectrometry molecular networking

- combined with *in vivo* zebrafish assays. [Front Pharmacol](#), 2020, 11: 287
- 78 Wang D, Fu Z, Xing Y, et al. Rapid identification of chemical composition and metabolites of Pingxiao Capsule *in vivo* using molecular networking and untargeted data-dependent tandem mass spectrometry. [Biomed Chromatogr](#), 2020, 34
- 79 Al-Buhairi A R, Phillips S J, Llewellyn G, et al. Prediction of infarct topography using the Oxfordshire Community Stroke Project classification of stroke subtypes. [J Stroke Cerebrovasc Dis](#), 1998, 7: 339–343
- 80 Ueda M, Katayama Y. Characteristics and assessment of TOAST classification for diagnosing stroke subtypes. *Nihon Rinsho Jpn J Clin Med*, 2006, 64: 56–60
- 81 Paradowski B, Maciejak A. TOAST classification of subtypes of ischaemic stroke: diagnostic and therapeutic procedures in stroke. [Cerebrovasc Dis](#), 2005, 20: 319–324
- 82 Wraige E, Pohl K R E, Ganesan V. A proposed classification for subtypes of arterial ischaemic stroke in children. [Dev Med Child Neurol](#), 2005, 47: 252–256
- 83 Wang Y, Wu X, Cheng Y, et al. A fluorescent switchable AIE probe for selective imaging of dipeptidyl peptidase-4 *in vitro* and *in vivo* and its application in screening DPP-4 inhibitors. [Chem Commun](#), 2016, 52: 3478–3481
- 84 Wang Y, Zhao Y, Jiang W, et al. iTRAQ-based proteomic analysis reveals recovery of impaired mitochondrial function in ischemic myocardium by Shenmai formula. [J Proteome Res](#), 2018, 17: 794–803
- 85 Jiang M, Kang L, Wang Y, et al. A metabonomic study of cardioprotection of ginsenosides, schizandrin, and ophiopogonin D against acute myocardial infarction in rats. [BMC Complement Altern Med](#), 2014, 14: 350
- 86 Zhao L, Liu H, Wang Y, et al. Multimodal identification by transcriptomics and multiscale bioassays of active components in Xuanfeibaidu formula to suppress macrophage-mediated immune response. [Engineering](#), 2021, doi: [10.1016/j.eng.2021.09.007](#)

Identification of active substances from Traditional Chinese Medicine: state-of-the-art and perspectives

WU YuHan¹, LI Min¹, LIU Hao¹ & WANG Yi^{1,2}

¹ Department of Chinese Medicine Science & Engineering, College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;
² Innovation Center in Zhejiang University, State Key Laboratory of Component-Based Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

Traditional Chinese medicine (TCM) has demonstrated unique advantages in the prevention and treatment of chronic and complex diseases such as cardiovascular and cerebrovascular diseases and diabetes. It has also played a major role in the fight against sudden infectious diseases such as COVID-19. Therefore, how to quickly identify effective constituents from the complex system is the most critical issue in the study of modernization of TCM. Based on this, this article summarizes the rapid identification strategies and multiscale screening models, which provides ideas for analyzing the scientific connotation and explaining the mechanism of TCM.

active constituents of Traditional Chinese Medicine, multimodal identification, chemicobiology, biological chromatography, high content screening

doi: [10.1360/SSV-2021-0398](#)