

应用化学定量蛋白质组学方法发现天然产物(黄芩苷)的作用靶点

吴崇明 中国医科学院药用植物研究所 chomingwu@163.com

传统中医药凝聚着中华民族上千年的医学理念及实践经验，在众多病因复杂的慢性疾病的治疗中具有明显的优势。尽管中医药的确切疗效已经逐渐被国际社会所认同，但在分子层面对其药理机制的阐释却相对薄弱。当前，传统中药以及从中获得的天然产物药理学研究的最大难点之一就是发现并确认其体内作用靶点，从而阐释其药效作用的分子机制。

近日，北京大学化学与分子工程学院王初研究员课题组在《美国科学院院刊》杂志上以长文形式发表了题为“Chemoproteomics reveals baicalin activates hepatic CPT1 to ameliorate diet-induced obesity andhepatic steatosis”的研究论文 [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1801745115]，介绍了利用定量化学蛋白质组学技术揭示传统中药活性分子黄芩苷治疗肥胖、脂肪肝及其相关代谢疾病的分子机制，确认肉碱酯酰转移酶 1(CPT1)是黄芩苷的重要结合蛋白，并通过变构调节增强 CPT1 的活性，从而促进脂肪酸的氧化降解，发挥降脂和抗脂肪变性功能。他们的工作为何能够发表到 PNAS 上？有何创新之处？对天然产物药理学研究有何普遍的启示意义？下面将逐一进行解读。

1. 论文的创新之处

这个工作之所以能够发表到 PNAS 上，主要的创新之处在于：首次发现了能够直接激动 CPT1 的天然产物，从而揭示了黄芩苷发挥减肥功效的分子机制，更重要的是，开示了可以基于 CPT1 发现具有减肥功效的天然药物的可能性，为将 CPT1 作为减肥/抗代谢病药物研发新靶点提供了契机和例证。

2. 获得上述发现的核心技术——定量化学蛋白质组学技术

这篇论文的核心亮点就是发现并确认了 CPT1 是黄芪苷的体内结合靶点。那么作者是如何获得上述创新发现的呢？他们主要借助了一种基于小分子探针的药物靶点发现技术，即所谓的“定量化学蛋白质组学技术”。这项技术的主要流程是：（1）合成与天然药物键合的荧光亲和探针；（2）在细胞培养条件下用轻和重两种稳定同位素对总蛋白进行标

记；（3）裂解细胞，将轻重细胞裂解物分别与探针和探针+原始化合物进行孵育（后者作为竞争结合组），使探针与靶蛋白结合；（4）利用 UV 照射，使探针与生物素脂肪链交联，从而使探针-靶蛋白复合体与生物素偶联；（5）加入链霉亲和素偶联的微球，使靶蛋白-探针-生物素复合物与微球上的链霉亲和素偶联，并附着在微球上；（6）通过离心将微球沉淀，从而将靶蛋白-探针-生物素偶联物富集下来；（7）LC-MS/MS 分析，对富集的蛋白质进行质谱检测和定量；（8）计算每种同一蛋白的轻同位素标记量与重同位素标记量的比值，给出该蛋白被原始化合物竞争结合的程度，比值越大，则表示该蛋白与天然产物的结合概率越高；（9）设定上述比值的阈值（例如 Ratio>4.0），对所有符合条件的蛋白质进行归类，确定潜在的化合物结合蛋白。

在本论文中，该定量化学蛋白质组学技术的操作流程如下：

2.1 合成黄芩苷光亲和探针

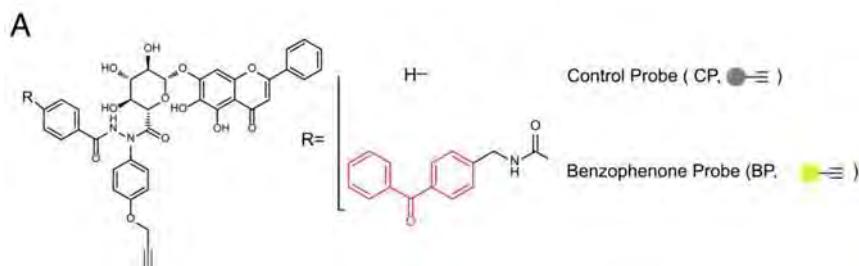


图 1. 光亲和探针的结构

作者首先合成了黄芩苷的荧光光亲和探针 BP，在黄芩苷的葡萄糖基上键合了二甲苯酮光亲和探针。该探针的特点是光亲和反应性，即通过紫外光照射下可以进一步发生化学反应，与生物素交联的报告脂肪链形成完整的探针复合体。这种探针的优点在于，（1）尽量减少了过长的富集和报告探针对天然药物与靶蛋白结合的干扰，提高了结果的可靠性；（2）引入的二甲苯酮具有荧光，因此可以通过 In-gel fluorescence 分析，给出探针与蛋白结合的直观信息。

该光亲和探针的合成路线如下：

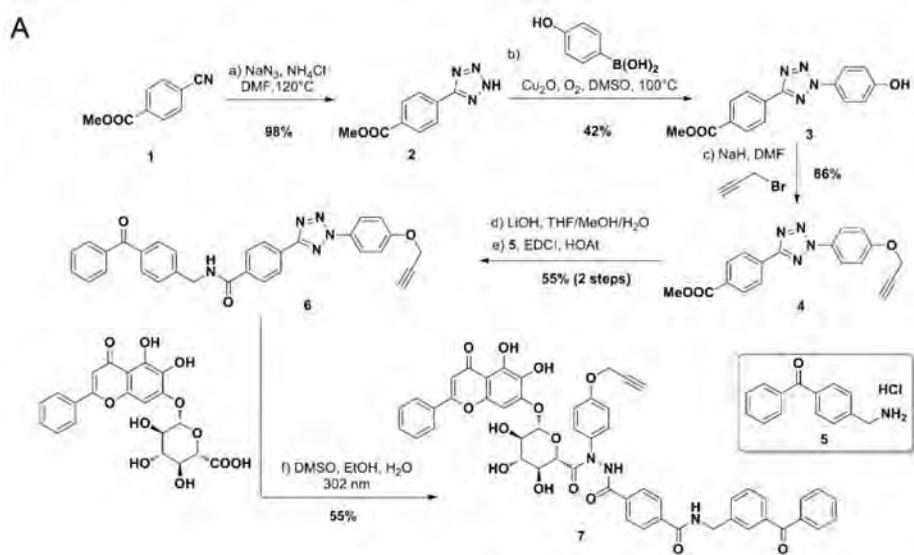


图 2. 光亲和探针的合成路线

2.2 探针活性确认

在利用探针寻找靶蛋白之前，首先要证明探针基团的引入不会影响化合物的药理活性，从而间接证明所得蛋白是天然药物在体内发挥活性的靶蛋白，避免假阳性结果发生。作者通过中性脂染色法证明，该探针依然具有较好的降脂活性，不过由于少量化学基团的加入导致药理效力略有降低。总体上，该探针是可用的。

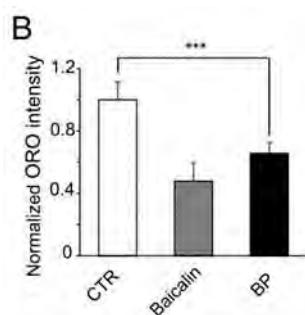


图 3. 细胞实验证明，光亲和探针不影响黄芩苷的降脂活性

2.3 细胞培养条件下稳定同位素标记技术

利用蛋白质组学鉴定结合蛋白的一个重要技术难题就是如何保证蛋白定量的准确性。由于不同的样品需要分别进行处理，传统的单独上样检测方法上样量不可避免地发生不一致，而靶蛋白垂钓能够获得的目标蛋白量极少且质谱检测技术非常灵敏，这就会造成蛋白定量的误差极大，使所得结果不真实。为了克服这个困难，作者采用了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)。

SILAC 技术的基本原理如下：利用含轻、中或重型同位素标记的必需氨基酸（主要是 Lys 和 Arg）培养基培养细胞，来标记细胞内新合成的蛋白质，一般培养 5-6 代，细胞中的蛋白质将都被同位素标记。在总蛋白被完全标记之后，从轻和重标记的总蛋白样品中分别取出相同量的蛋白进行后续实验，此时由于总蛋白的量丰富，定量和取样都比较准确，因此此部的误差会很小。然后，将轻和重的蛋白组分别用探针结合或者探针+化合物竞争结合、UV 反应、生物素微球偶联。此时，微球所亲和的蛋白量已经非常微小，如果此时再进行蛋白粗定量并进行随后的上样量均一化，则实验误差会极大。而使用 SILAC 技术，则不需要对每个样品的蛋白总量进行均一化，而是直接混合两种样品，并执行随后的 LC-MS/MS 分析，从而大大减少操作误差。

整个实验的操作流程大体如下：

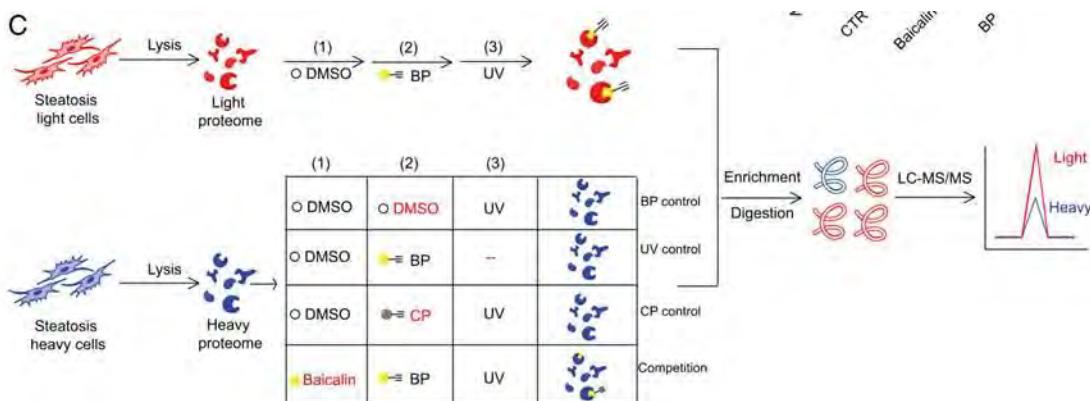


图 4. SILAC 实验过程

2.4 胶内荧光测定(In-gel fluorescence assay)

在将样品进行 LC-MS/MS 分析之前，作者先利用胶内荧光分析技术，通过 SDS-PAGE 对样品进行了粗分离和观察。由于探针的二苯甲酮具有荧光性质，因此可以通过荧光凝胶分析得到直观的蛋白丰富度量结果。这样，一方面可以获得更加直观的数据，同时也可以确保送去 MS 分析的样品的可靠性，避免由于实验操作失误送去无效样品，而增加时间和金钱成本。

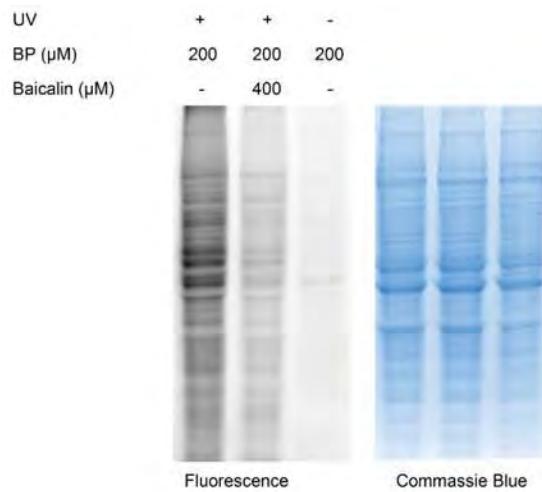


图 5. In-gel fluorescence assay 显示，虽然蛋白上样量相似(考马斯蓝染色)，但竞争条件下，与探针结合的蛋白荧光明显减弱

2.5 HPLC-MS 分析

分离得到的蛋白样品经质谱分析后，通过 light protein/heavy protein 的比值显示了黄芩苷与探针的竞争性，差异越大，表示竞争越强。最终获得了 142 个与黄芩苷具有密切结合的潜在蛋白。对这 142 个蛋白进行代谢通路的归类，发现参与脂肪酸降解途径的 7 个蛋白具有极显著的差异，因此作为黄芩苷体内结合的候选蛋白。

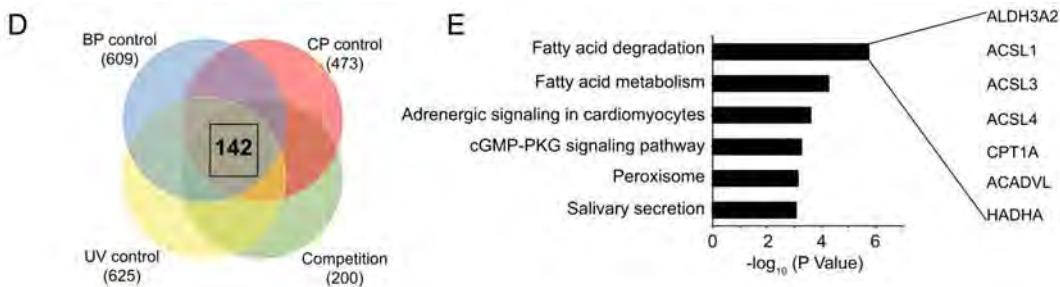


图 6. 各处理条件下轻/重比 >4.0 的蛋白的 Venn 图和代谢通路分析

3. 靶蛋白的验证

在通过化学定量蛋白质组学技术鉴定了 7 个潜在黄芩苷结合蛋白之后，需要对其真实性进行验证。作者做了如下的工作：

3.1 通过 Knock-down 实验从 7 个候选者中确定最真实的结合蛋白

作者首先利用 siRNA 分别特异性敲减了 7 个脂肪酸降解通路蛋白，检查哪种蛋白与黄芩苷的药效密切相关，从而确认该蛋白是最可能的靶蛋白。这部分工作分为两个试验，首先是确认 siRNA 的可靠性，图 7 结果显示，7 种 siRNA 均可以有效降低对应蛋白质的表达水平。随后，分别检查 7 种蛋白的敲减对黄芩苷降脂活性的影响。图 8 结果显示，只有 CPT1 敲减之后，黄芩苷的降脂效力消失，因此，这 7 个潜在结合蛋白之中，只有 CPT1 是更可信的黄芩苷结合靶蛋白。

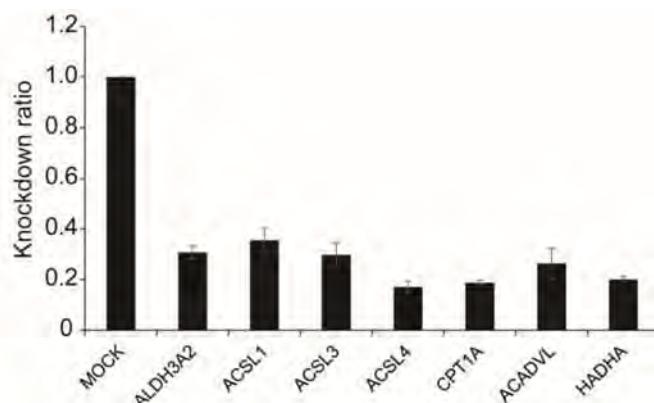


图 7. siRNA 的敲减效率验证

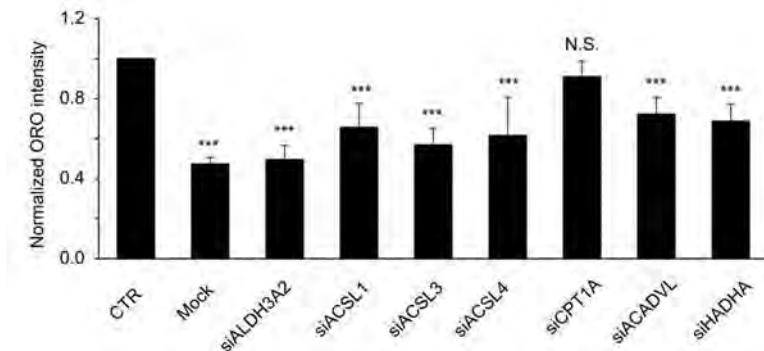


图 8. siRNA 敲减对黄芩苷降脂功效的影响

3.2 抑制剂实验

在确认 CPT1A 是可能的黄芩苷结合蛋白之后，作者进一步利用 CPT1 的化学抑制剂 Malonyl-CoA 从另一个角度对其进行确认。图 9 的结果显示，用化学抑制剂抑制 CPT1 的活性之后，黄芩苷的降脂功效大幅减弱，从而进一步确认 CPT1 是黄芩苷的结合靶点。

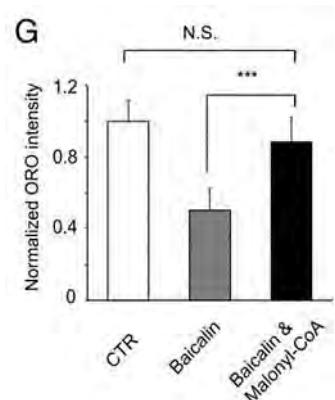


图 9. CPT1 化学抑制剂试验

3.3 研究黄芩苷对 CPT1 活性的调节

在确认 CPT1A 是黄芩苷的结合蛋白之后，需要进一步分析黄芩苷与 CPT1A 结合是激活还是抑制了该酶的活性。于是，作者设计了系列的实验进行研究。

首先，通过 Western blot 实验证明，黄芩苷不影响 CPT1A 的蛋白水平（图 10B）。这个数据表明，黄芩苷与 CPT1A 的结合不影响该蛋白的稳定性，因此是直接调节该酶的活性（激活或者抑制）。

然后，作者测定了黄芩苷对 CPT1A 酶活的影响。为了全面的反映黄芩苷对 CPT1A 的酶活影响，作者先在完整 Hela 细胞（图 10A）、Hela 细胞裂解物（图 10C）、纯化的线粒体（图 10D）和异源表达人 CPT1A 的大肠杆菌裂解物（图 10E）中考察酶活性。结果显示，黄芩苷对不同纯度的 CPT1A 均可以增强其活性。逐级证明了黄芩苷对 CPT1A 酶活的精确调节。

进一步，为了考察黄芩苷对 CPT1A 酶活的调节是否具有种属特异性，作者利用大肠杆菌异源表达了人、小鼠和线虫 CPT1A（图 10E、F 和 G），在其裂解物中均证明黄芩苷能够提高 CPT1A 的活性。证明黄芩苷激动 CPT1A 是 universal 的，而与种属无关。

最后，作者考察了黄芩苷对 CPT1B 和 CPT1C 两种相关蛋白活性的影响。利用异源表达系统，证明黄芩苷对于 CPT1B 和 CPT1C 的活性无影响（图 10H 和 I）

这些结果证明，黄芩苷能够直接提高人、小鼠和线虫来源的 CPT1A 的活性，对 CPT1B 和 CPT1C 的活性无影响。

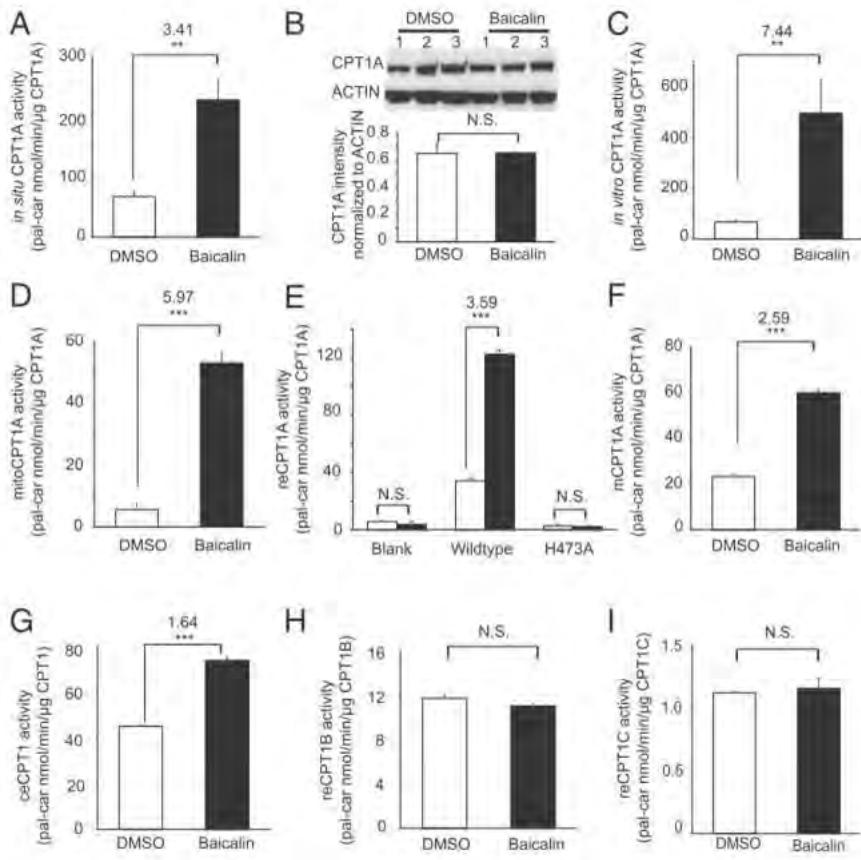


图 10. 黄芩苷对 CPT1 活性的影响

3.4 黄芩苷激动 CPT1A 的酶学参数

在确认黄芩苷可以结合并激动 CPT1A 的活性之后，作者进一步测定了黄芩苷激动 CPT1A 的酶学参数。首先确定了黄芩苷激动 CPT1A 的 EC₅₀ 值为 247 μM，这个活力并不高。

这个结果带来了两个后果。第一，提示黄芩苷具有有进行深入结构改造的需要；第二，EC₅₀ 值如此高，其在体内的生理浓度是否能够达到？第三，抑制效率并不高，使人深切怀疑 CPT1A 是否是黄芩苷发挥体内降脂功效的真实靶点，或者是否是关键靶点。关于后面两个疑问，直接导致了这个工作难以被所有人完全同意，也或许成为该论文未能发表到 CNS 等顶级期刊的重要原因。

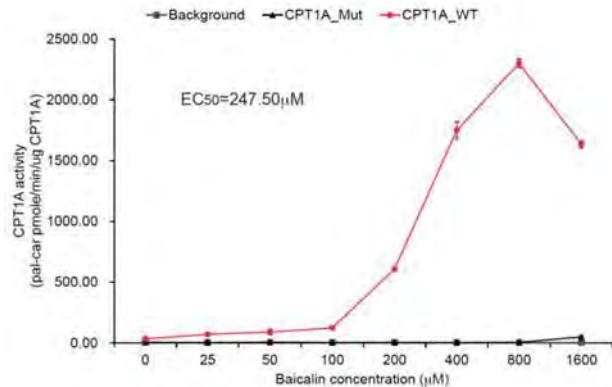


图 11. 黄芩苷激动 CPT1A 的 EC50 值

作者进一步分析了黄芩苷对 CPT1A 热稳定的影响。一般而言，当化合物与蛋白结合之后，会增强蛋白的结构稳定性，从而在加热时使蛋白的热稳定性提高，从而成为化合物与蛋白直接结合的一个重要证据。热迁移试验显示，黄芩苷可以提高 CPT1A 的热稳定性，证明黄芩苷可以直接与 CPT1A 相互结合。

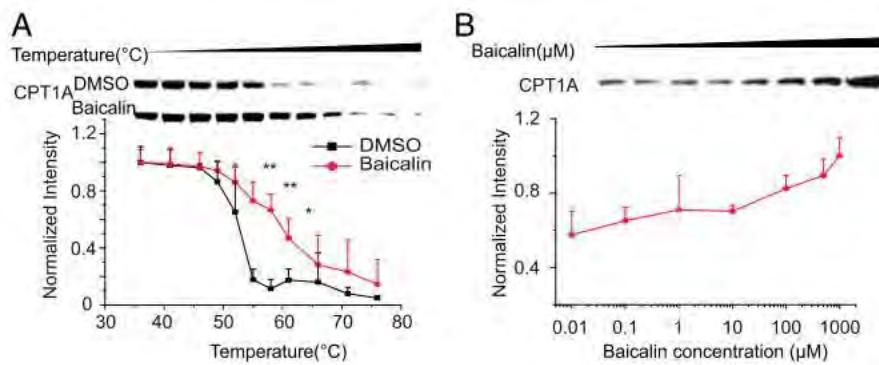


图 12. 热稳定性试验

4. 黄芩苷激动 CPT1A 的分子模式

在确认黄芩苷能够结合并激活 CPT1A 活性之后，作者进一步对黄芩苷激动 CPT1A 的分子模式进行了系列研究。

4.1 通过肽段竞争试验寻找蛋白与黄芩苷结合的关键肽段

为了确认黄芩苷与 CPT1A 蛋白的结合模式，首先需要确定蛋白与化合物结合的具体区段。

目前，实现这个目的最常用的方法是将化合物与蛋白的已知底物进行对比，然后进行同源建模，从而利用计算机直接推测化合物与蛋白质的结合模式。但这种方法需要前人已经建立了标准结合模型，无法做出开创性结果，而且不同的化合物可能与蛋白的不同位点结合。另一种更可信的方法是获得化合物与蛋白的共结晶体，通过 X 射线衍射等方法确定化合物与蛋白的结合模式。虽然这是最直接最可信的方法，但经常受制于无法获得纯蛋白或者无法获得共结晶的困难。我相信，作者应该曾经努力尝试过制作黄芩苷与 CPT1A 的共结晶，但由于各种原因失败了。那么，当这两种常用方法都失败之后，是否还有别的可替代的方法研究化合物与蛋白的结合模式呢？这篇论文的作者就采用了一种新方法——化学修饰同位素标记+肽段扫描法。

作者首先将过表达 CPT1A 的 E.coli 裂解物与 DMSO 或黄芩苷进行孵育，随后通过 UV 照射用探针进行标记，然后将标记的裂解物用胰酶进行消化，再后通过还原性二甲基化同位素标记对肽段进行标记，最后混合样品并进行 LC-MS/MS 分析。由于黄芩苷与 CPT1A 结合，会导致结合位点附近的肽段的甲基化修饰减少。所以，距离黄芩苷的结合位点越近的肽段，轻重链比值差异(黄芩苷:DMSO)越高，而距离结合位点远的肽段，比值差异不变。通过这种方法，可以得知哪些肽段紧邻结合位点。

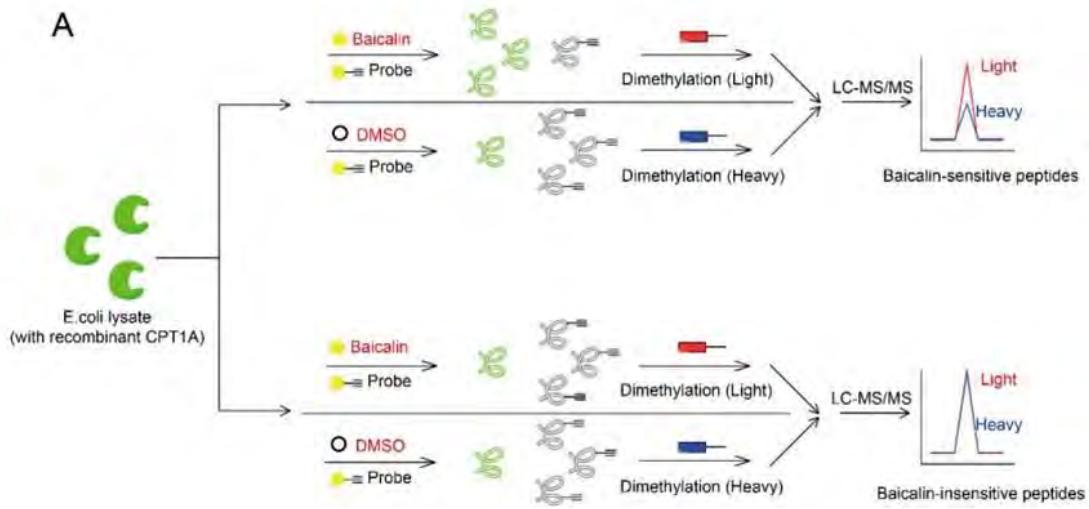
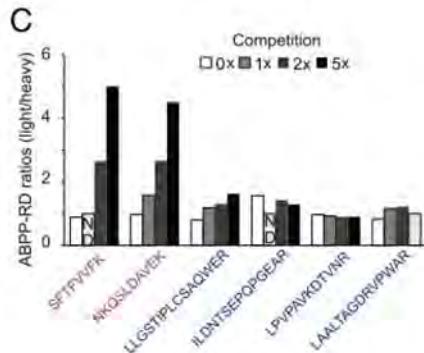


图 13. 肽段竞争结合试验



CPT1A_human

MAEAHQAV AFQFTTVT PDGIDLRL SHEAL RQIYLSGLH SWK 40
 KK FIRFKNG IITGVYPA SPSSWLI VVVGVV MT TMYAK IDPS 80
 LG III AK IN RRTLETAN CMSSQTKNV VSGVL FGTGLWVAL IV 120
 TMRY SLKV LL SYHGWM FTEHGKMS RATK IWMGMV KI FSGR 160
 KPMY SFSQTSLPRL PVPAVK DTVNRYL QSVRPLMKE EDFK 200
 RMTAL AQDFAV GLG PRLQWYLLK SWWAT NYVSDWWEYI 240
 YL RGRGPLMVNSNYY AMDLL YI LPHTI QAARAGNA IHAIL 280
 LY RRKLD REEIKP I RLL GSTIPL CSAQWER MFNTSRI PGE 320
 ETDT IQHMRDSKHIVVY HRGRYFK VWLYHDG RLLK PREME 360
 QQMQRI LDNTSE PQPGEARLA ALT AGDRV PWA RCRQAYFG 400
 RGK NKQ SLDAVE KAA FFVTLDETEEGYRSEDPDTSMDSYA 440
 KSLL HGR CYD RWFDK SFTFVVF KNG KM GLNAEH SWADA PI 480
 VAH LWEYVM SIDS LQL GYAEDGHCKGD INPNPI PYPTRL QW 520
 DIPGECQEVIETSLNTANLLANDVDFHSFPFVAFGKGIIK 560
 KCRTSPDAFVQLALQL AHYK DMG KFC LTYEASMTRL FREG 600
 RTETVRSCTTESCDFVRAMV DPAQTVQRLKL FKLA SEKH 640
 QHMY RLAM TGSGIDRHLFCLYVVKYLA VE SPFLKEVLSE 680
 PWRLSTSQT PQQQVEL FDLENNPEYVSSGGGFGPVADDGY 720
 GVSY I LVGENL INFHISSKF SCPETDSHR FGRHLKEAMTD 760
 II TL FGLSSNSKK 773

图 14. 对黄芩苷结合敏感的肽段（结合位点附近肽段）

4.2 Docking 建模

作者根据肽段竞争实验结果，利用 Rosetta software suite 软件包，通过同源建模和配体对接方法构建了黄芩苷-CPT1A 的结合模式。并且确定了 4 个潜在的关键氨基酸位点。

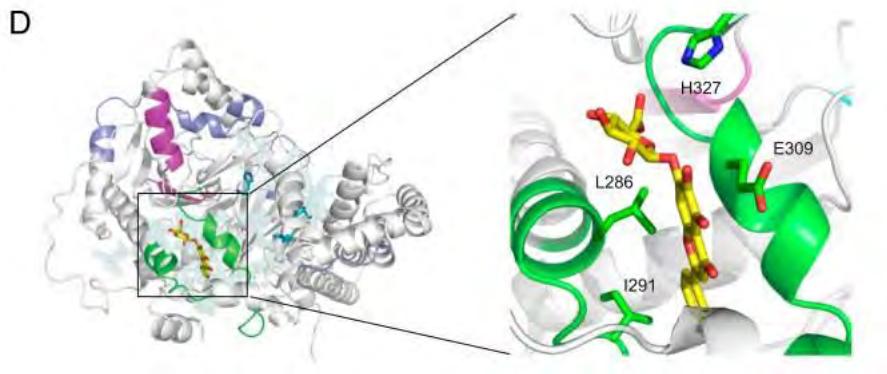


图 15. 黄芩昔与 CPT1A 的对接模式

4.3 关键氨基酸位点的确认

在确定了 4 个潜在关键结合氨基酸位点之后，作者分别设计了 4 个突变体 (L286W, I291F, E309Y, H327E)。

热稳定性测定显示，这 4 个突变体能够保持 CPT1A 蛋白的结构完整性。但是结合值测定显示，它们与黄芩昔的结合力减弱，特别是 L286W 突变体。肽段结合试验也证明，四种突变体与黄芩昔的结合显著降低，特别是 I291F 突变体（图 16）。

	Stability (REU)	Binding (REU)
WT	0	0
L286W	-1.374	17.809
I291F	-0.843	7.888
E309Y	-2.56	3.871
H327E	-1.991	3.807

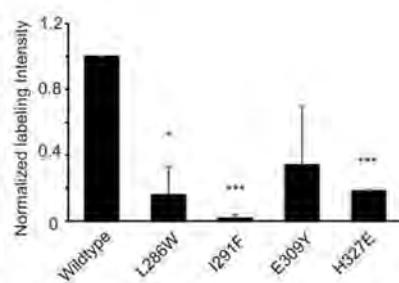


图 16. 突变体蛋白的热稳定性和探针结合试验

4.4 氨基酸突变体的酶活响应试验

为了更进一步证明，四个氨基酸位点是黄芩苷的关键结合位点，作者直接测定了四种突变体对黄芩苷药效的影响。首先，单独异源表达各个突变体，黄芩苷不能提高其活性（图 17F）；其次，在 CPT1A 表达被敲低的 HeLa 细胞中，分别过表达上述 4 种突变体，黄芩苷也不能再发挥降脂功效和酶激活，而表达野生型 CPT1A 时则可以恢复黄芩苷的药效（图 17G）和酶活力（图 17H）。这些结果证明，这四个氨基酸是黄芩苷结合 CPT1A 的关键位点。

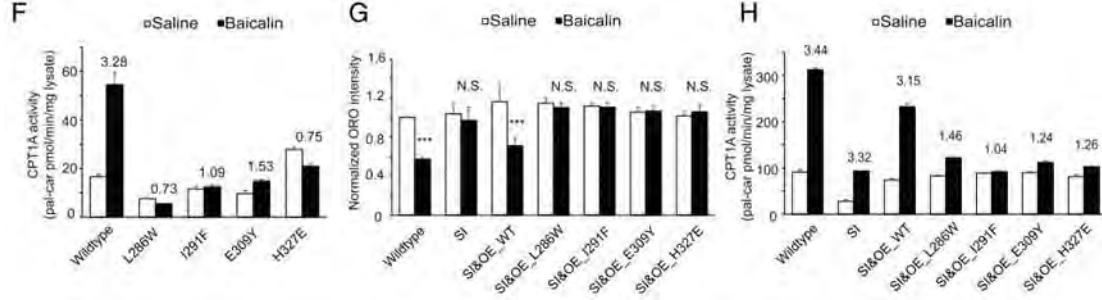


图 17. CPT1 突变体的活性验证

5. 激动 CPT1A 是黄芩苷降脂的主要作用机制确认

作者通过上面大量的研究证明，黄芩苷能够与 CPT1A 结合并提高其活性，并且利用细胞实验证明了这种结合是黄芩苷发挥降脂的主要机理。但是，证明前面我提到的，黄芩苷激动 CPT1A 的效力并不强，EC50 值接近 250 μM 。而且，黄芩苷的口服生物利用度不是很高，大约只有 15% 左右。这就带来了一个重要疑问——CPT1A 是否是黄芩苷发挥体内降脂功效的真实靶点？为此，作者必须在动物体内对黄芩苷激动 CPT1A 与其降脂功效的关系进行验证，以确认激动 CPT1A 是黄芩苷在体内发挥功效的主要作用机理。否则，前面的工作缺少了医学应用上的重要性。

证明激动 CPT1A 是黄芩苷在体内发挥功效的主要作用机理的最好方法是建立 CPT1A 敲除的遗传动物，如果此时黄芩苷的药效消失，则可以证明以上推论。但是系统

敲除 CPT1A 是致死的，因此，作者使用 shRNA 敲低了 DIO 小鼠的肝脏 CPT1A 表达，并发现黄芩苷的所有减肥相关功效消失了（图 18）。

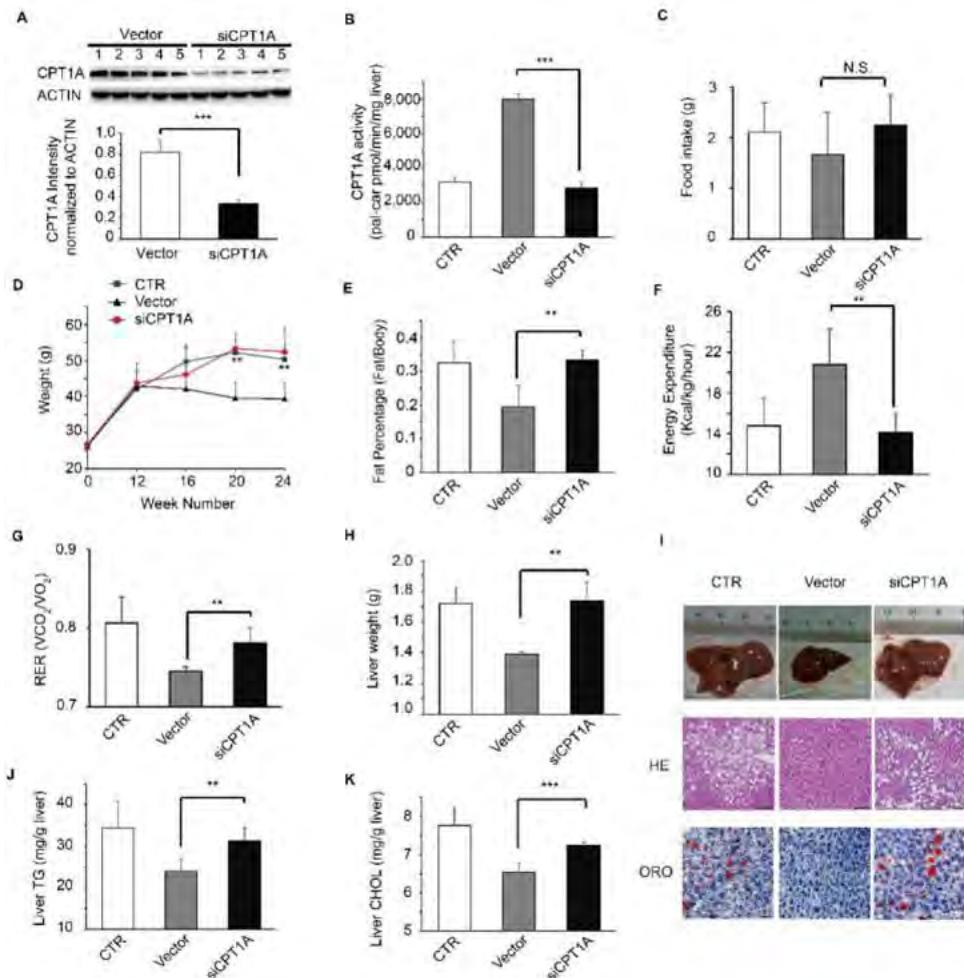


图 18. shRNA 敲低 CPT1A 后，黄芩苷的体内减肥功效消失

为了进一步证明 CPT1A 的关键作用，作者在敲减 CPT1A 的肝脏中过表达了野生型 CPT1A 和不能与黄芩苷结合的 H327E 突变体。发现，黄芩苷的功效可以被野生型 CPT1A 互补，而突变体则不能（图 19）。

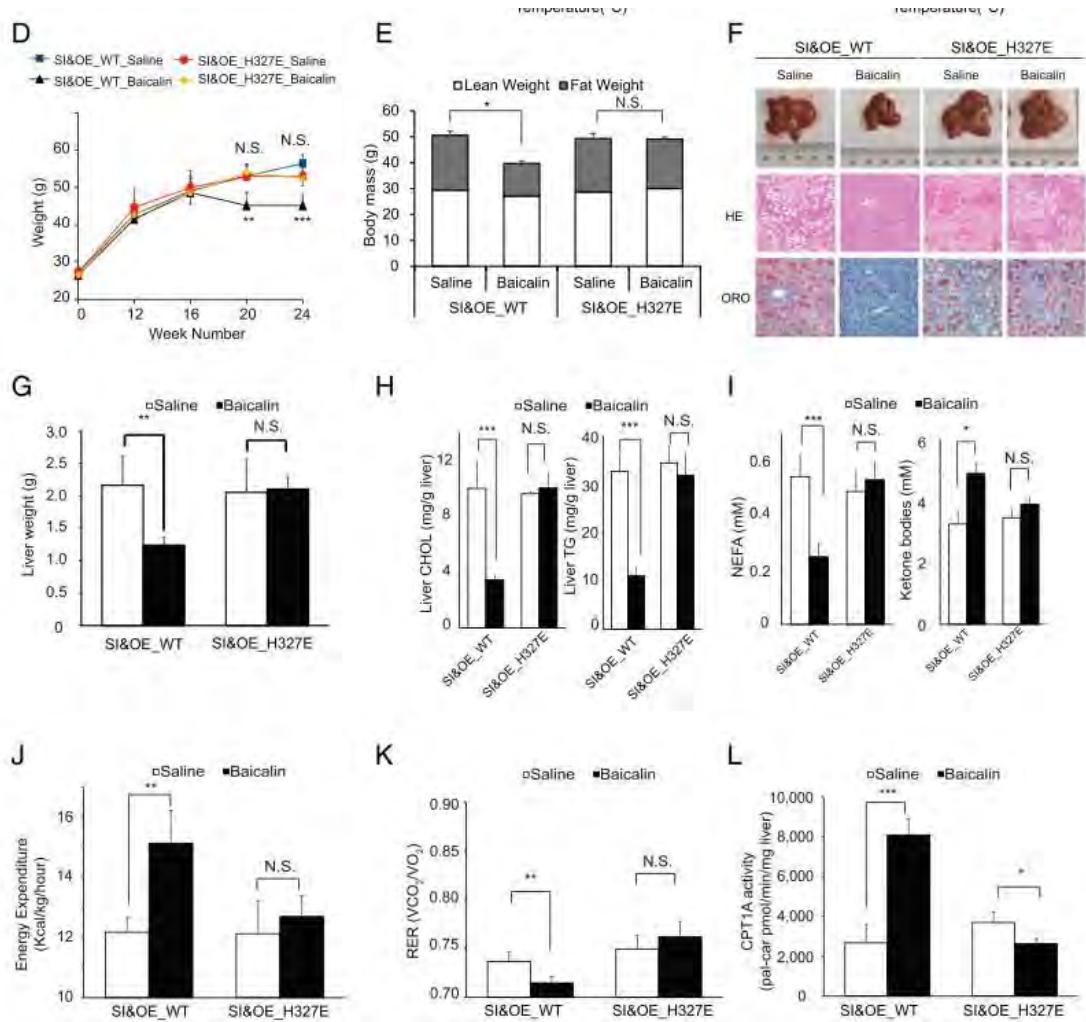


图 19. 野生型 CPT1A 而非突变体 CPT1A 能够在敲减小鼠中互补黄芩苷的药理活性。

(点评：虽然作者做了努力，但是这种 shRNA 干扰得到的结果还是更加间接。作者为何不做肝脏特异性敲除的遗传小鼠？如果此敲除也是致死的，那么作者也可以做 CPT1A 无活性突变体或 H327E 突变体的过表达遗传小鼠，来考察黄芩苷的效果；再次，既然黄芩苷对于线虫 CPT1A 也有激动作用，为何不尝试在果蝇或线虫中制作基因敲除动物，考察黄芩苷的药效？总之，这些数据虽然很有意义，但不能算是铁证)

6. 黄芩苷激动 CPT1A 的器官特异性

在证明了 CPT1A 是黄芩苷发挥功效的关键靶点之后，作者进一步分析了哪种/哪些器官的 CPT1A 是黄芩苷的主要作用靶点。实验结果显示，黄芩苷可以提高其他器官，如脂肪、小肠和肾脏中的 CPT1A 活性，但是对肝脏 CPT1A 的活性增加是最明显的。因此，推测黄芩苷的主要作用靶点是肝脏的 CPT1A。

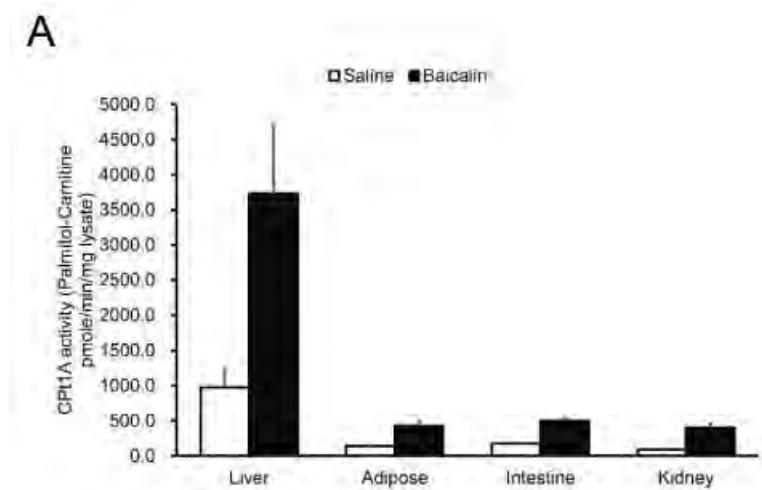


图 20. 黄芩苷激动 CPT1A 的器官特异性

（点评：作者对 CPT1A 在肝、脂肪、肠和肾的蛋白表达水平进行了研究，显示 CPT1A 在小肠中的表达水平很高，甚至接近管家蛋白 Actin 的水平。已知黄芩苷的口服生物利用度较差，但在小肠中却可以达到很高的浓度。虽然黄芩苷对小肠组织的单位活性提升仅为肝脏的 1/7 左右。但是肝脏组织主要是纯的代谢功能细胞，而小肠组织则含有大量的结缔组织，因此，我推测，实际上，黄芩苷对小肠代谢活性组织的激活能力应该强于作者所提供的数据。另一方面，黄芩苷在小肠内的浓度至少是肝脏的 7 倍(15%生物利用度计算)。两相比较，黄芩苷对小肠组织 CPT1A 的激动可能是更加重要的途径。而且，由于黄芩苷可以在小肠达到很高的浓度，也就可以解决之前担忧的，黄芩苷体内浓度可能达不到其体外激动 CPT1A 有效浓度的担忧，但是作者并未对此进行深入的分析和讨论，不能说一种遗憾）

总结：本文通过小分子探针技术，发现了黄芩苷的潜在结合蛋白——CPT1A；随后通过一系列实验证明黄芩苷能够提高 CPT1A 的活性，但对 CPT1B/C 的活性无影响，同时 CPT1A 是黄芩苷在体外发挥降脂功效的关键靶点；进一步利用肽段结合和分子对接研究寻找了黄芩苷与 CPT1A 的结合模式及关键氨基酸位点；并利用点突变确认 4 个氨基酸是黄芩苷与 CPT1A 结合的关键位点，而且是其发挥功效的关键位点；最后，在动物水平证明激动 CPT1A 是黄芩苷发挥功效的关键机理。

这是一个非常完整的关于发现天然产物体内作用靶点和揭示作用机制的研究工作。单纯从工作的完整性上讲，应该能够发表到任何期刊杂志。这个工作可以成为天然产物作用靶点和分子机制研究的范例，非常值得天然药物药理学研究人员参考和借鉴！

链接地址：<http://blog.sciencecn.com/blog-3384137-1118746.html>