

# 源自针灸的靶标发现之科学路径: 以针刺防治哮喘为例

杨永清<sup>1\*</sup>, 尹磊森<sup>1</sup>, 朱维良<sup>2</sup>, 王宇<sup>1</sup>, 徐玉东<sup>1</sup>, 陈艳焦<sup>1</sup>

1. 上海中医药大学上海市针灸经络研究所, 上海 200030;

2. 中国科学院上海药物研究所, 上海 201203

\* 联系人, E-mail: dryqyang@163.com

传承精华, 守正创新, 是习近平总书记对中医药工作作出的重要指示. 长期以来, 党和政府高度重视中医药工作, 中医药事业发展取得了明显成绩, 但中医药传承不足、创新不够, 在为建设健康中国贡献力量、发挥中医药原创优势、推动我国生命科学实现创新突破等方面作用发挥不充分, 针灸学也是如此.

针灸是我国临床治疗疾病的常用方法之一, 其临床有效性已经被世界多国接受或成为医疗方法之一被推广应用. 今后如何在传承精华的基础上实现针灸医学守正创新, 既要科学认识针灸, 从科学出发研究针灸学问题, 更要科学发展针灸, 从针灸出发研究医学与生命科学问题<sup>[1]</sup>, 以期从服务健康中国, 引领世界科学前沿, 实现中共中央国务院《关于促进中医药传承创新发展的意见》中提出的发挥中医药原创优势、推动我国生命科学实现创新突破的伟大目标.

我们结合针刺防治哮喘的长期工作积累, 基于针灸治疗有效性的针灸效应物质基础研究, 系统建立了源自针灸的靶标发现科学路径(图 1), 包括经验传承、临床疗效、效应调节、生物过程、物质基础、靶标发现等, 并对未来可期的新药创制进行了展望.

## 1 经验传承

促进中医药传承创新发展, 创新的源泉在传承. “传”有转授、宣扬、流布之意, 《礼记·祭统》曰“有善而弗知, 不明也. 知而弗传, 不仁也”, 是名医所拥有并传递给我们的; “承”有接续、继承之意, 《诗·小雅》曰“如松柏之茂, 无不尔或承”, 是我们从名医所领悟的、学习的. 全国首批名老中医邵经明教授的“三穴五针”法针刺治疗哮喘是其经验之精华. 邵教授认为, 哮喘的病因病机虽然复杂, 但归纳起来不外乎内因与外因两方面, 治疗上当以发作期治标, 缓解期治本, 两期治疗并重为纲. 作者学习邵教授临床经验, 承继其学术流派, 深切体悟到, 我们所蒙受的不仅仅是名医的临床经验, 更应当是其品德修为、人格魅力的恩泽. 承继的过程既要拜师学艺, 更应随师悟人<sup>[2]</sup>. 正如先师邵教授传授的不仅仅是“三穴五针”法针刺治疗哮喘的临床经验, 更是其慈悲、静心、谦恭之精神意志, 人生价值所



**杨永清** 研究员, 上海中医药大学副校长, 校学位评定委员会副主任, 教育部省部共建上海中医健康服务协同创新中心主任, 主要研究方向为针刺抗哮喘临床与基础研究. 基于“三穴五针”法针刺防治哮喘临床有效性, 利用功能基因组学、蛋白质组学、生物信息学等理论与技术, 建立从响应基因、应答蛋白到蛋白质相互作用的针灸效应物质基础研究新领域.

流淌出的上善若水, 对学生的泽被与感悟<sup>[3]</sup>.

## 2 临床疗效

临床疗效评价的核心就是要回答 4 个问题(PICO), 即什么患者或人群(population/patient)、用什么干预措施(intervention/indicator)、通过什么对照(comparator/control)、得到了什么终点结局(outcome). 任何能够回答上述问题, 并符合干预方法自身特点的评价方法, 都应当是科学的. 针灸临床研究的主要方法包括病例报道、医案医话、对照与非对照临床观察、随机对照临床试验等<sup>[4]</sup>.

我们临床与基础研究应用的“三穴五针”法(大椎、风门、肺俞)针刺治疗哮喘, 由河南中医学院邵经明教授创立. 目前, “三穴五针”法针刺治疗哮喘已经成为国家中医药管理局适宜推广技术在全国推广应用<sup>[5]</sup>.

邵经明教授自 1963 年始创该方法治疗哮喘后<sup>[6]</sup>, 应用其治疗哮喘 3 个月内总有效率 96.6%<sup>[7]</sup>. 该方法对过敏性哮喘和慢性支气管炎同样有效, 且实证比虚证效果好, 阳虚比阴虚收效佳, 寒性哮喘病程短者疗效好, 肾虚哮喘病程长者疗效差, 儿童及青壮年易于获效, 老年体弱者奏效较慢, 伴肺气肿者效果较差, 心源性哮喘疗效多不稳定, 应配合中西药物助治<sup>[8]</sup>.

多年来我们应用邵氏“三穴五针”法治疗哮喘, 不仅取得了良好的近期效果, 也有一定的远期疗效. 一个夏季疗程治疗结束时的即时总有效率为 85%. 长期疗效观察显示

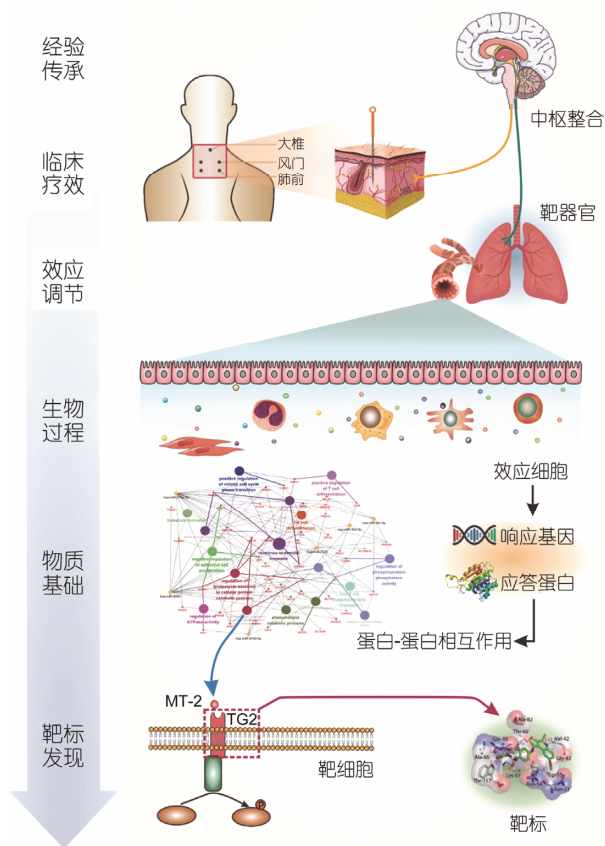


图1 源自针灸的靶标发现科学路径

Figure 1 Scientific pipelines for target discovery originating from acupuncture

过敏性哮喘一年临床控制率为 39%，三年临床痊愈率 22%<sup>[9,10]</sup>。

多中心随机对照研究证明，“三穴五针”法针刺治疗哮喘急性发作期疗效显著，可显著改善哮喘患者症状体征，改善肺功能，效果优于茶碱缓释片<sup>[11]</sup>。对于肺脾亏虚型慢性哮喘，“三穴五针”法能够显著改善患者肺功能和各项临床症状体征，与常规针刺对照组比较有显著性差异。末次治疗后 1、3、6 个月的随访，患者的症状体征总积分较治疗前明显降低，具有良好的远期疗效，显示该方法是安全有效、取穴简单、操作易学、成本较低、易于推广的针刺治疗哮喘方法<sup>[12]</sup>。

### 3 效应调节

针灸效应是针灸作用于机体所产生的与疾病相关的反应效果，在一定程度上反映针灸治疗与疗效间的因果关系。临床研究表明，“三穴五针”法针刺治疗哮喘能明显改善患者的呼吸功能，增加患者第一秒呼气容积、用力肺活量、最大呼气流速<sup>[13]</sup>，改善患者甲皱微循环<sup>[14]</sup>、血液流变学指标<sup>[8]</sup>等，明显降低过敏性哮喘患者的唾液和鼻分泌

液中 SIgA 与总 IgA 含量、外周血 IL-2R+活化 T 细胞数目、外周血嗜酸粒细胞绝对和分类数以及血清总 IgE 浓度，使患者原本升高的唾液 SIgA 局部分泌率和外周血 CD4/CD8 比值恢复到正常人水平<sup>[10]</sup>。

针刺能显著抑制哮喘患者血清中 Th2 类细胞因子 IL-4、GM-CSF 及 Th17 类细胞因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、IL-17A、IL-23 含量，抑制 Th2、Th17 细胞群免疫应答，显著提升 IFN- $\gamma$ /IL-4 比值，发挥免疫调节作用，促进 Th1/Th2 细胞免疫状态趋于平衡，从而显著控制哮喘发作<sup>[15]</sup>。

临床研究还显示，针刺对患者血浆皮质醇水平无明显影响，嗜酸粒细胞绝对和分类计数与血浆皮质醇水平在针刺治疗前后均无明显的统计相关关系，这与医学界普遍认识的嗜酸粒细胞主要受糖皮质激素影响的观点不吻合，并提示针刺可能不主要通过糖皮质激素发挥作用，而受针刺激发的体内其他内源性途径调节<sup>[10]</sup>。

### 4 生物过程

针灸作用是针灸刺激在机体产生的生物反应，也是一种生命活动现象。对这一生物反应的启动、过程、结果进行的研究称之为针灸作用原理研究。其目标是明确针灸作用的生物现象和生物效应，研究针灸作用的生物过程，寻求针灸作用的规律及其代表的生物过程的响应规律与机制<sup>[16]</sup>。

针灸效应的整体性调节特征其实正是系统生物学干涉的一种表现方式，具备干涉的系统性、高通量性等基本特征，因此将针灸效应机制研究与系统生物学相结合，不仅是针灸学研究新的切入点，也是系统生物学研究新的出发点，对当代针灸学和生命科学的发展都将产生深远的科学影响<sup>[17]</sup>。

我们在“三穴五针”法针刺治疗哮喘临床有效的基础上，利用蛋白质组、转录组学技术与方法，研究了针刺对大鼠哮喘模型生物过程的影响。针刺对哮喘与正常大鼠肺组织蛋白质表达谱的质谱鉴定结果显示，针刺对哮喘与正常大鼠的非特异蛋白涉及能量代谢、信号转导、细胞骨架和抗氧化蛋白；针刺对哮喘大鼠的特异作用蛋白涉及抗炎和免疫调节相关的蛋白。针刺的抗哮喘作用包括两部分：一是针刺的非特异作用，如对能量代谢、信号转导、细胞骨架、抗氧化等不同类型蛋白的调节；二是针刺对哮喘病理状态的特异作用，如对抗炎和免疫调节相关蛋白的调节<sup>[18]</sup>。针刺抗哮喘差异表达基因的生物信息学分析表明，针刺组抑制了哮喘大鼠抗原递呈、细胞迁移、胆碱能受体信号、毒蕈碱通路等免疫与平滑肌收缩生物过程，增加了调节生物合成、表面活性物质、表皮生长因子受体信号通路等生物过程。上述研究表明，针刺抗哮喘效应包括了抗原递呈减弱、免疫抑制调节、平滑肌收缩舒张调控等三类关键生物过程，涉及抗原加工提呈、Toll 样受体、肌动蛋

白细胞骨架调节等具体信号通路<sup>[19]</sup>。

## 5 物质基础

针灸效应物质基础研究是将针灸效应作为一种生命活动现象,研究这一生命活动过程从基因表达、蛋白质功能表现到蛋白质相互作用的信息反应序列及其规律的科学。这一信息反应序列建立在蛋白质及其相互作用基础上,是基因表达、蛋白质功能表现、蛋白质-蛋白质相互作用的信息反应序列。因此从基因、蛋白质入手,研究针灸效应的响应基因和应答蛋白,成为研究针灸效应物质基础的最佳突破口<sup>[20,21]</sup>。

“三穴五针”法针刺治疗哮喘患者外周血细胞的基因芯片检测和实时定量PCR验证研究表明,针刺效应可能通过调节 *NRG2*、*KCNJ11*、*RECQL4*、*GF11*、*THBD* 和 *KLRC1* 等基因表达发挥作用<sup>[22]</sup>。

对针刺抗哮喘大鼠血清的 ÄKTApurifier 高分辨率液相柱层析分析结果表明,针刺血清分别在 9.646、22.333、22.293 和 27.323 min 存在明显不同于对照组的 280 nm 强吸收峰,分子量分别估计为 69.54、9.85、9.88 和 4.57 kD,初步提示针刺血清中存在差异蛋白<sup>[23]</sup>。双向电泳分析结果显示,针刺血清中存在 5 个差异表达蛋白。质谱鉴定结果表明,这 5 个差异表达蛋白分别是 60S 核糖体蛋白 L13、锌指蛋白 208、甲状腺激素受体相关蛋白、亲环蛋白 A 和锌指蛋白 91<sup>[24]</sup>。

通过双向电泳和质谱鉴定相结合的蛋白质组学技术,比较针刺前后哮喘大鼠肺组织蛋白质谱的变化,发现 32 个与针刺效应相关的蛋白点,并最终鉴定出 28 种相关蛋白,其中 25 种蛋白为针刺治疗哮喘特异性效应蛋白,包括 CC10、S100A8、S100A11、RAGE、ANXA5、RhoGDI2 和 PRDX6 在内的 7 种蛋白质之间存在直接或间接的蛋白-蛋白相互作用关系,并形成一個与免疫和炎症相关的系统调节网络<sup>[18]</sup>。

对建立的正常大鼠对照组、大鼠哮喘模型组、大鼠哮喘模型针刺组和正常针刺对照组 4 个肺组织 SAGE 标签数据库差异表达标签进行生物信息学分析,并应用实时定量 PCR 技术对基因表达量进行校验,获得了针刺抗哮喘特异基因 21 个,其中 *S100A9*、*MT-2*、*Dusp1* 为针刺潜在的抗哮喘效应差异表达基因,进行了下游的克隆和蛋白表达工作<sup>[19]</sup>。

## 6 靶标发现

针灸作用的临床有效性表明其效用客观物质基础的存在,其研究过程本身不仅为针灸作用机制研究和针灸临床发展提供科学依据,同时也是靶标发现的过程。基于针灸治疗有效性的针灸效应物质基础研究,将靶标发现的分子策略与基于生理病理调节作用的整体策略有机地结合

在一起,成为结合临床有效性的靶标发现发展方向之一<sup>[25]</sup>。这样的靶标可以是针刺效应蛋白本身或其作用于靶细胞的受体。

在前期蛋白质组、转录组研究中,我们发现并鉴定了一些针刺抗哮喘特异性响应基因和应答蛋白,如 S100A8、S100A9、S100A11、Cyclophilin A、CC10、MT2 等,并对这些响应基因和应答蛋白进行了基因克隆和蛋白质表达纯化,用于后续的功能验证研究。其中 S100A8、S100A9、CC10 蛋白与支气管哮喘的关系密切,但 S100A11、Cyclophilin A、MT2 与哮喘的关系鲜有报道,说明已部分明确针刺对抗哮喘特异性响应基因和应答蛋白上调或下调与疾病治疗的关系,展现了针刺效应的科学依据,但也有一部分是针刺效应引起的独特变化,这些独特变化尚未与疾病存在已知的关联性,很可能意味着疾病新机制、新生物标志物或新靶标的发现,非常值得进一步研究加以证实,这也正是发挥中医药原创优势、推动我国生命科学实现创新的关键突破口。

我们的研究发现,金属硫蛋白 2(metallothionein-2, MT2)在哮喘大鼠肺组织含量明显降低,针刺治疗后伴随着哮喘大鼠呼吸功能的改善,肺组织 MT2 含量也明显增高,说明 MT2 是针刺抗哮喘效应的特异性调节蛋白<sup>[26]</sup>。MT2 的经典功能是结合二价金属离子、参与氧化应激<sup>[27]</sup>,但我们进一步的研究发现,MT2 全身敲除使小鼠的哮喘发作程度明显增强,给予 MT2 能明显舒张气道平滑肌。MT2 舒张气道平滑肌细胞的效应是经典的  $\beta_2$  激动剂特布他林(TB)的 200 倍,防治大鼠哮喘发作的作用达到 TB 的 500 倍以上。MT2 作为针刺效应蛋白本身即可以成为生物制剂药物用于哮喘治疗<sup>[28]</sup>。

MT2 是一种分泌蛋白,它发挥效应必须通过气道平滑肌细胞膜传递信息,或者在细胞膜上存在与 MT2 相互作用的受体。激光共聚焦实验发现,MT2 与气道平滑肌细胞膜结合。放射受体分析证明,MT2 与气道平滑肌存在单一受体结合,平衡解离常数为 33.4 nmol/L,细胞表面的结合位点达到  $6.6 \times 10^5$ ,最大结合值为 110 pmol/L,表明气道平滑肌上存在与 MT2 结合的单一受体。免疫共沉淀、放射竞争结合实验、激光共聚焦、表面等离子共振分子相互作用等研究确认该受体是肌动蛋白结合蛋白 2(Transgelin-2, TG2)。气道平滑肌细胞低表达 TG2 可明显减弱 MT2 的舒张效应, TG2 全身敲除使小鼠的哮喘发作程度明显增强,证明 TG2 是 MT2 对平滑肌细胞发挥作用的特异结合受体, TG2 对哮喘发生有明显影响<sup>[28]</sup>。

进一步根据 TG2 蛋白的 CH 功能域核磁共振结构,我们从 6000 余个化合物中虚拟筛选出了 21 个可能与 TG2 结合的小分子,经分子相互作用和气道平滑肌收缩舒张实验,获得了称为 TSG12 的 TG2 激动剂, TSG12 与 TG2 特异结合,明显舒张气道平滑肌并显著优于传统  $\beta_2$  激动剂。进一步研究证明, TSG12 能显著改善不同抗原不同动物哮喘的

呼吸功能,且不产生药物耐受、不影响心血管功能,证明TG2是针刺抗哮喘效应蛋白MT2在气道平滑肌的作用新靶标,TSG12结合并激动新靶标TG2防治哮喘<sup>[28]</sup>,为哮喘治疗提供Transgelin-2新靶标和优效支气管扩张剂,有望为解决哮喘气道舒张困境开辟一条新路径<sup>[29]</sup>。

## 7 展望

创新药物是现代生物医药发展的核心,靶标发现是创新药物的首要步骤。传统的靶标发现基本策略主要有两种,即整体策略和分子策略。整体策略通过对疾病机体的研究发现靶标,侧重应用临床科学和动物体内实验的生理学、病理学和流行病学方法进行研究,也称之为生理学策略。分子策略通过研究疾病表型的细胞机制,利用临床样品和细胞模型发现新靶标,又称为机制导向的靶标发现策略<sup>[25]</sup>。

上述靶标发现的策略与方法对现代药物研究的发展起到了一定的促进作用,但问题依然严峻。近十几年靶标发现理论与技术的创新性迅速发展并没有带来新药创制的增加,相反,带来的是新药申请量的迅速下降和新药开发成本的急剧攀升。这一问题已经引起了美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)的极大关注<sup>[25]</sup>。

传统靶标发现存在忽视机体复杂性的固有问题,导致

靶标功能验证(validation)失败率较高、临床成功率较低的研发风险,今后寻求新的靶标发现策略依然任重而道远。为此,人们重新重视了临床实践在靶标发现中的重要作用,但如何与临床结合进行靶标发现是困扰人们的关键问题之一<sup>[25]</sup>。

源自针灸的靶标发现,建立在针灸治疗临床有效的基础上,将靶标发现的分子策略与针灸生理病理调节作用的整体策略有机地结合在一起,以针灸效应响应基因和应答蛋白为靶标筛选起点,其筛选范围建立在安全有效前提下,可最大限度提高靶标验证、临床研发的成功率,避免传统靶标发现的上述风险,在阐明针灸效应机制的同时,创立以针灸治疗为基础的靶标发现新策略,将在靶标筛选路径和提高靶标验证成功率方面拥有原创性的自主知识产权<sup>[25,30]</sup>。我们以针刺防治哮喘为例,经过多年来的探索和研究,从“三穴五针”针刺治疗哮喘有效出发,成功发现并验证Transgelin-2是针刺效应蛋白MT2的防治哮喘新靶标,成为我国学者发现并验证的第一个支气管哮喘新靶标,也是中国针灸人拥有自主知识产权的原创性科研成果<sup>[31]</sup>。今后我们将在上述发现基础上,进一步优化靶标激动剂,获得全新结构与更优功能的先导化合物,实现从源自针灸的靶标发现到新药创制的临床转化,服务健康中国战略。

**致谢** 感谢国家自然科学基金(81973951, 81922076, 81873373, 81973952, 81872797, 81774429)资助。

## 推荐阅读文献

- 1 Yang Y Q. Research acupuncture and acupuncture research: Comment on "Systematic Acupuncture and Moxibustion-Renaissance of 'Body surface Medicine'" (in Chinese). *Acup Res*, 2016, 41: 94-95 [杨永清. 研究针灸与针灸研究——评《系统针灸学——复兴“体表医学”》]. *针刺研究*, 2016, 41: 94-95]
- 2 Yang Y Q. Purifying the heart, passing the torch (in Chinese). *Chin Med Cult*, 2015, 10: 1 [杨永清. 览于心乃止水之常净烛于物靡传薪之无绝. *中医药文化*, 2015, 10: 1]
- 3 Yang Y Q, Shao S J, Wang P Y, et al. Master of acupuncture and moxibustion: Professor Shao Jingming (in Chinese). *Chin Med Cult*, 2015, 10: 48-51 [杨永清, 邵素菊, 王培育, 等. 针灸学精诚大医: 邵经明教授. *中医药文化*, 2015, 10: 48-51]
- 4 Yang Y Q, Wei Y, Wang Y, et al. Current status and fundamental strategies for clinical research on acupuncture and moxibustion (in Chinese). *Shanghai J Tradit Chin Med*, 2012, 45: 7-10 [杨永清, 魏颖, 王宇, 等. 针灸临床研究现状与基本策略. *上海中医药杂志*, 2012, 45: 7-10]
- 5 Shao S J. Shao's "Five Needles" technique for the treatment of lung and spleen deficiency asthma in remission period (in Chinese). *Chin J Rural Med Pharm*, 2011, 18: 83-84 [邵素菊. 邵氏“五针法”治疗肺脾亏虚型哮喘病缓解期技术. *中国乡村医药杂志*, 2011, 18: 83-84]
- 6 Shao J M. Some experience in treating asthma based on syndrome differentiation (in Chinese). *Harbin Tradit Chin Med*, 1963, 6: 32-36 [邵经明. 对哮喘辨证分型施治的点滴体会. *哈尔滨中医*, 1963, 6: 32-36]
- 7 Shao J M. Acupuncture and cupping to treat asthma (observation of clinical curative effect in 180 cases) (in Chinese). *J Barefoot Doct*, 1973, 1: 36-37 [邵经明. 针刺拔火罐治疗哮喘(180例临床疗效观察). *赤脚医生杂志*, 1973, 1: 36-37]
- 8 Shao J M, Shao S J, Zhu Y C, et al. Clinical observation and experimental study on acupuncture treatment of 188 cases of asthma (in Chinese). *Henan Tradit Chin Med*, 1992, 12: 68-70 [邵经明, 邵素菊, 朱彦岑, 等. 针灸治疗哮喘188例临床观察及实验研究. *河南中医*, 1992, 12: 68-70]
- 9 Yang Y Q, Chen H P, Wang A Q, et al. Analysis of the effect of acupuncture on 174 cases of asthma (in Chinese). *Shanghai J Acu-mox*, 1994, 13: 153-154 [杨永清, 陈汉平, 王安琪, 等. 针灸治疗哮喘174例疗效分析. *上海针灸杂志*, 1994, 13: 153-154]
- 10 Yang Y Q, Chen H P, Wang Y, et al. Considerations for use of acupuncture as supplemental therapy for patients with allergic asthma. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2013, 44: 254-261

- 11 Shao S J, Quan C F, Shao S X, et al. Asthma at acute attack stage treated with “Shao’s five needling therapy”: A multi-center randomized controlled clinical trial (in Chinese). *Chin Acu-mox*, 2013, 33: 774–778 [邵素菊, 权春分, 邵素霞, 等. “邵氏五针法”治疗急性发作期哮喘: 多中心随机对照研究. *中国针灸*, 2013, 33: 774–778]
- 12 Shao S J, Qin X Y, Gao X Y, et al. A multi-center randomized controlled clinical trial: SHAO’s “five needling methods” for treatment of asthma of deficiency of lung and spleen (in Chinese). *Chin Acu-mox*, 2007, 27: 793–796 [邵素菊, 秦小永, 高希言, 等. 邵氏“五针法”治疗肺脾亏虚型哮喘: 多中心随机对照研究. *中国针灸*, 2007, 27: 793–796]
- 13 Ding Y D, Shao J M. Preliminary study on the anti-asthmatic effect of Feiyu, Dazhui and Fengmen (in Chinese). *Chin Acu-mox*, 1983, 3: 7–8 [丁一丹, 邵经明. 肺俞、大椎、风门平喘效应初步探索. *中国针灸*, 1983, 3: 7–8]
- 14 Shao J M, Du M Q, Yang Y Q, et al. Clinical observation of 128 cases of asthma treated by acupuncture (in Chinese). *Chin Acu-mox*, 1989, 9: 11–14 [邵经明, 杜鸣岐, 杨永清, 等. 针灸治疗哮喘 128 例临床观察. *中国针灸*, 1989, 9: 11–14]
- 15 Peng L L. Acupuncture treatment of clinical characteristics of serum cytokine immunity in patients with asthma. Master Dissertation. Shanghai: Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 2018 [彭玲玲. 针刺治疗哮喘患者血清细胞因子免疫临床特征研究. 硕士学位论文. 上海: 上海中医药大学, 2018]
- 16 Yang Y Q. Strategy, conception and methodology of acupuncture research (in Chinese). *Shanghai J Tradit Chin Med*, 2007, 53: 3–7 [杨永清. 针灸作用原理研究的观念、思路与方法. *上海中医药杂志*, 2007, 53: 3–7]
- 17 Yang Y Q, Yin L M, Xu Y D, et al. Systems biology and acupuncture science (in Chinese). *Shanghai J Acu-mox*, 2009, 28: 616–619 [杨永清, 尹磊淼, 徐玉东, 等. 系统生物学与针灸学. *上海针灸杂志*, 2009, 28: 616–619]
- 18 Xu Y D, Cui J M, Wang Y, et al. Proteomic analysis reveals the deregulation of inflammation-related proteins in acupuncture-treated rats with asthma onset. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 2012: 850512
- 19 Yin L M, Jiang G H, Wang Y, et al. Use of serial analysis of gene expression to reveal the specific regulation of gene expression profile in asthmatic rats treated by acupuncture. *J Biomed Sci*, 2009, 16: 46
- 20 Yang Y Q, Chen H P, Wang Y, et al. Research on the substantial basis of acupuncture efficacy (in Chinese). *Shanghai J Acu-mox*, 2006, 25: 4–6 [杨永清, 陈汉平, 王宇, 等. 针灸效应物质基础研究. *上海针灸杂志*, 2006, 25: 4–6]
- 21 Yang Y Q, Wang Y, Liu Y Y, et al. Research on the substantial basis of acupuncture effect and the mechanism of acupuncture action (in Chinese). *Shanghai J Acu-mox*, 2008, 9: 39–41 [杨永清, 王宇, 刘艳艳, 等. 针灸效应物质基础研究与针灸作用原理研究. *上海针灸杂志*, 2008, 9: 39–41]
- 22 Chen Y J. Transcriptome study of “Three Points and Five Needles Method” acupuncture treatment of patients with bronchial asthma and functional verification of KLRC1. Doctor Dissertation. Shanghai: Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 2019 [陈艳焦. “三穴五针”法针刺治疗支气管哮喘患者转录组研究与 KLRC1 功能验证. 博士学位论文. 上海: 上海中医药大学, 2019]
- 23 Wang Y, Ma S L, Cui J M, et al. Chromatographic analysis of anti-asthma serum different components in acupuncture asthma rats (in Chinese). *Shanghai J Acu-mox*, 2006, 25: 41–43 [王宇, 马淑兰, 崔建美, 等. 针刺抗哮喘大鼠血清差异组分的色谱分析. *上海针灸杂志*, 2006, 25: 41–43]
- 24 Wang Y, Yang Y Q, Ma S L, et al. SDS-PAGE analysis of components in serum with anti-asthma activity derived from rats treated by acupuncture. *J Acu Tuina Sci*, 2009, 7: 8–12
- 25 Yang Y Q, Wang Y, Cui J M, et al. Research on the substantial base of acupuncture effects and target discovery (in Chinese). *Shanghai J Acu-mox*, 2006, 25: 3–5 [杨永清, 王宇, 崔建美, 等. 针灸效应物质基础研究与靶标发现. *上海针灸杂志*, 2006, 25: 3–5]
- 26 Zhou D D, Ran J, Li C C, et al. Metallothionein-2 is associated with the amelioration of asthmatic pulmonary function by acupuncture through protein phosphorylation. *Biomed Pharmacother*, 2019, 123: 109785
- 27 Yin L M, Wang Y, Xu Y D, et al. The research progress of gene expression regulation and protein-protein interaction of metallothionein-2 (MT-2) (in Chinese). *Fudan Univ J Med Sci*, 2014, 41: 121–125 [尹磊淼, 王宇, 徐玉东, 等. 金属硫蛋白-2(MT-2)表达调控和蛋白相互作用研究进展. *复旦学报(医学版)*, 2014, 41: 121–125]
- 28 Yin L M, Xu Y D, Peng L L, et al. Transgelin-2 as a therapeutic target for asthmatic pulmonary resistance. *Sci Transl Med*, 2018, 10: eaam8604
- 29 Crunkhorn S. Asthma: Alternative route to airway relaxation. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, 17: 241
- 30 Yang Y Q. Target discovery and innovative drug development based on effectiveness of acupuncture (in Chinese). Internal Communication in China Association for Acupuncture and Moxibustion, 2018 [杨永清. 基于针灸有效性的靶标发现与创新药物研发. 中国针灸学会“引领世界科学的前沿科学问题、建设世界科技强国的工程技术难题”征集稿, 2018]
- 31 Chen H P. Scientific research program, concept leads to “acupuncture”: A scientific achievement that makes impossible possible (in Chinese). *Shanghai J Acu-mox*, 2018, 37: 1100–1103 [陈汉平. 科研规划, 概念引领“针灸药”: 一项变不可能为可能的科学成果. *上海针灸杂志*, 2018, 37: 1100–1103]

Summary for “源自针灸的靶标发现之科学路径：以针刺防治哮喘为例”

## Scientific pipelines for target discovery originating from acupuncture: Taking acupuncture for asthma as an example

Yongqing Yang<sup>1\*</sup>, Leimiao Yin<sup>1</sup>, Weiliang Zhu<sup>2</sup>, Yu Wang<sup>1</sup>, Yudong Xu<sup>1</sup> & Yanjiao Chen<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Shanghai Research Institute of Acupuncture and Meridian, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200030, China;

<sup>2</sup>Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China

\* Corresponding author, E-mail: dryqyang@163.com

Acupuncture has been an important therapy in traditional Chinese medicine (TCM) for more than 2000 years. However, based on the characteristics and advantages of acupuncture, how to promote further innovations and breakthroughs for the subject itself, as well as for Medicine and Life Sciences, is of great importance. Combined with our years of working in acupuncture, the life sciences, and our long-term practice in the prevention and treatment of asthma with acupuncture, scientific pipelines of target discovery originating from acupuncture have been systematically established, including experience inheritance, clinical efficacy, effect regulation, biological process, material basis, and target discovery.

The acupuncture points GV14, BL12, and BL13 were selected based on the theory of traditional Chinese medicine in treating asthma, and the acupuncture therapy, named “three acupuncture points and five-needle method”, is inherited from the national famous traditional Chinese medicine doctor, professor Jing-Ming Shao. With this method, acupuncture has achieved sound regulatory effects on mucosal and cellular immunity in patients with allergic asthma. The total efficacy of acupuncture for patients with allergic asthma at the end of one course of treatment was 85%. However, the concentration of cortisol in the plasma of asthmatic patients did not change significantly after the acupuncture. To identify the exact active biological processes, response genes and proteins of acupuncture in treating asthma, four tag libraries of serial analysis of gene expression (SAGE) were established from the lung tissues of control rats (CK), asthmatic rats (AS), asthmatic rats treated by acupuncture (ASAC), and control rats treated by acupuncture (CKAC). The results revealed that hundreds of differentially expressed genes and several critical biological processes were found using informatics tools, including antigen processing and presentation, toll-like receptor, regulation of actin cytoskeleton. Moreover, 21 specific genes of the acupuncture in treating asthma were detected using Venn diagrams, including metallothionein-2 (MT-2).

Our study further found that MT-2 protein expression was more than 50% lower in asthmatic lung tissue of ovalbumin (OVA)-induced asthmatic rats compared to control animals. However, acupuncture could significantly increase the MT-2 expression in lung tissue in a rat model of asthma. Consistently, injection of recombinant MT-2 into OVA-induced asthmatic rats through an external jugular vein rapidly reduced pulmonary resistance, to a greater extent than that achieved with the  $\beta_2$ -agonist terbutaline. Mechanistic studies revealed that MT-2 bound to transgelin-2 (TG-2, an actin-binding protein) on the membranes of airway smooth muscle cells (ASMCs), an interaction that was specifically required for MT-2 induced ASMC relaxation. Therefore, TG-2 has been considered to be a new target of acupuncture in treating asthma based on the clinical efficacy of acupuncture. We subsequently performed molecular docking analyses for more than 6000 compounds from an in-house database based on the nuclear magnetic resonance structure for the binding site of the TG-2 calponin-homology domain. Optimization of hit compounds led to the identification of the TG-2 agonist TSG12, which inhibited acetylcholine-induced contraction of rat ASMCs and reduced asthmatic pulmonary resistance in mice. TSG12 induced MYPT1 dephosphorylation and was shown to inactivate the RhoA-ROCK-MYPT1-MLC pathway, thereby causing ASMC relaxation. TSG12 inhalation (100 ng/kg) inhibited pulmonary resistance by more than 80% in asthmatic mice that had been challenged with house dust mite, and was more effective than the  $\beta$ -agonist isoproterenol. TSG12 (1–100 ng/kg) similarly inhibited pulmonary resistance in OVA-challenged asthmatic mice, to a greater extent than that achieved with the  $\beta_2$ -agonist terbutaline. Importantly, TSG12 also reduced acetylcholine-induced contraction of human ASMC in a dose-dependent manner, without signs of toxicity or desensitization. These results suggest that TG-2 agonists may represent a promising novel therapeutic approach for treating asthma, with potential clinical advantages over existing therapies.

The above-mentioned target discovery originating from acupuncture is a vivid practice and concrete example of “Inheriting the essence, keeping integrity and innovation”. The research of target discovery originating from acupuncture can not only clarify the scientific mechanism of acupuncture on the basis of inheritance, and actively promote the development of medicine and the life sciences, but also push forward for target discovery and drug development, and therefore extend new horizons for the innovation and development of acupuncture.

**acupuncture, asthma, target discovery, first-in class drug research & development**

doi: 10.1360/TB-2020-0928