

基于 UHPLC-QTRAP-MS/MS 结合网络药理学 探讨不同厂家龟甲胶中氨基酸含量差异 及其抗骨质疏松的潜在机制

陈巧巧¹,唐皓²,王芬¹,汤延富¹,何清湖^{3*},余娜^{1*}

¹湖南中医药大学药学院,长沙 410208;²湖南省中医药研究院附属医院,长沙 410006;³湖南医药学院,怀化 418000

摘要:比较市面上龟甲胶的质量差异,探索龟甲胶治疗骨质疏松症的潜在活性成分及靶点。我们选取市面上 4 个厂家共 15 批次的龟甲胶样品,采用 UHPLC-QTRAP-MS/MS 检测各龟甲胶中水解氨基酸的含量,多元统计分析各批次中水解氨基酸含量的差异性。采用网络药理学预测龟甲胶的活性成分及治疗骨质疏松症的核心靶点,通过 GO 与 KEGG 富集分析预测分子机制,并运用分子对接预测各氨基酸与 Hub 靶点的结合模式。结果显示,厂家 A 和 D 的样品聚类良好,其中 A 厂家的龟甲胶综合得分最高。17 种水解氨基酸中谷氨酸、天冬氨酸、丝氨酸、L-羟脯氨酸、赖氨酸、精氨酸、苏氨酸、蛋氨酸的含量差异对龟甲胶质量影响较大。筛选出 17 个水解氨基酸的 175 个潜在靶点,68 个骨质疏松症核心靶点,其中甘氨酸、丙氨酸为关键成分。GO/KEGG 分析核心靶点主要涉及 α -氨基酸代谢过程、细胞氨基酸代谢过程、小分子分解代谢过程等生物进程,以及氨基酸合成、精氨酸和脯氨酸代谢、碳代谢等 212 条信号通路。分子对接则显示 2 个关键成分甘氨酸、丙氨酸与 11 个 Hub 靶点的活性口袋结合较好。综上,市面上不同厂家及批次间的龟甲胶水解氨基酸含量存在一定差异。龟甲胶抗骨质疏松的关键活性成分可能是甘氨酸、丙氨酸,其作用机理可能与 CAT、NOS1、GATM 等靶点相关,通过影响氨基酸生物合成、精氨酸和脯氨酸代谢、碳代谢等途径而起作用。

关键词:龟甲胶;氨基酸;UHPLC-QTRAP-MS/MS;骨质疏松症;多元统计分析;网络药理学

中图分类号:R282.74

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2023)12-2154-14

DOI:10.16333/j.1001-6880.2023.12.015

Difference of amino acid content in Testudinis Carapacis et Plastris Colla from different manufacturers and its potential mechanism of anti-osteoporosis based on UHPLC-QTRAP-MS/MS combined with network pharmacology

CHEN Qiao-qiao¹, TANG Hao², WANG Fen¹, TANG Yan-fu¹, HE Qing-hu^{3*}, YU Na^{1*}

¹School of Pharmacy, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China;

²Hunan Academy of Traditional Chinese Medicine Affiliated Hospital, Changsha 410006, China;

³Hunan Pharmaceutical University, Huaihua 418000, China

Abstract: To compare the quality differences of Testudinis Carapacis et Plastris Colla (TCPC) in the market, and explore the potential active ingredients for osteoporosis, 15 batches of TCPC samples from four companies were selected to detect the contents of hydrolysis amino acid by UHPLC-QTRAP-MS/MS. Compared the content differences of hydrolyzed amino acids in 15 batches with multivariate statistics. To predict the active components of TCPC and the core targets for treating osteoporosis with network pharmacology, to predict the molecular mechanism with GO and KEGG enrichment analysis, and the binding mode of amino acid and the Hub target were predicted by molecular docking. The results showed that the samples from compa-

收稿日期:2023-04-28 接受日期:2023-09-28

基金项目:湖南中医药大学横向项目(50010190);湖南省研究生科研创新项目(2022CX85);湖南省中医药管理局基金(B2023012);湖南中医药大学大学生创新创业训练计划(1008040)

*通信作者 Tel:86-731-88458009;E-mail:yuna0525@163.com, hqh19651111@163.com

nies A and D were well clustered, and the synthesis score of company A was the highest. The contents of glutamate, aspartate, serine, *L*-hydroxyproline, lysine, arginine, threonine, and methionine had a greater impact on the quality of TCPC. 175 potential targets and 68 core targets for treating osteoporosis were selected in the 17 amino acids, of which glycine and alanine were the key components. The core targets mainly involved of the alpha amino acid metabolism, cellular amino acid metabolism, small molecule catabolism and other biological processes, as well as amino acid synthesis, arginine and proline metabolism, carbon metabolism and other 212 signaling pathways. Molecular docking showed that the glycine and alanine were well bound to the active pockets of 11 Hub targets. In conclusion, there are some differences in the amino acid content of TCPC between different companies and batches. The key active ingredients of TCPC anti-osteoporosis may be glycine and alanine, and the mechanism may be related to the targets of CAT, NOS1, GATM, etc. which affecting the pathways of amino acid biosynthesis, arginine and proline metabolism, and carbon metabolism.

Key words: Testudinis Carapacis et Plastris Colla; amino acid; UHPLC-QTRAP-MS/MS; osteoporosis; multivariate statistical analysis; network pharmacology

龟甲胶 (Testudinis Carapacis et Plastris Colla, TCPC) 是我国传统滋补中药, 由龟科动物 *Chinemys reevesii* (Gray) 的龟甲经水煎煮、浓缩制成的固体胶^[1,2], 始载于《本草汇言》, 其性凉, 味咸、甘, 归肝、肾、心经, 临床上常用于骨质疏松症的治疗, 以龟甲胶为主药的经典方剂如龟鹿二仙系列方、左归丸、虎潜丸等在益精填髓、强筋壮骨方面具有显著功效。龟甲胶富含胶原蛋白、角蛋白及游离氨基酸, 蛋白水解后的氨基酸是龟甲胶中最终被人体吸收利用的主要活性成分。在中医诊疗中, 骨质疏松症多归属于“骨痹”“骨枯”“骨痿”范畴^[3], 《备急千金要方》^[4]曰:“骨极者……手足疼, 不能久立, 屈伸不利身痹脑髓痿”。肾藏精主骨生髓, 不足则髓减骨萎, 骨髓失养致使骨脆性增加而引发骨质疏松。现代研究表明龟甲胶及其经典方剂在健骨、增强免疫、抗肿瘤等方面具有较好的活性^[5], 龟甲胶中的甘氨酸、脯氨酸可作为诊断绝经后骨质疏松症的潜在标志物^[6], 氨基酸本身为信号分子, 还可协同钙离子激活钙敏感受体, 提高骨密度并促进成骨细胞分化, 增强骨钙化^[7,8]。为探讨不同厂家龟甲胶的氨基酸含量差异, 本研究选取 4 个不同厂家共 15 批龟甲胶样品, 采用液质联用技术对龟甲胶酸水解后 17 种氨基酸进行测定, 通过多元统计比较不同厂家龟甲胶中水解氨基酸成分的组成差异, 为龟甲胶的质量控制提供参考。并结合网络药理学对龟甲胶中各氨基酸成分进行分析, 为进一步预测龟甲胶抗骨质疏松的主要活性成分与靶点提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

QTRAP 6500 + 型液相质谱联用仪 (美国 AB SCIEX 公司); MF MS105DU 型 NewClassic 电子天平

(瑞士 METTLER TOLEDO 公司); Wonbio-96E 型冷冻研磨仪 (上海万柏生物); SBL-10DT 型超声波清洗机 (宁波新芝生物); DW-86L390 型超低温保存箱 (澳柯玛股份有限公司); Centrifuge 5430R 型冷冻离心机、手动单道移液器 (德国 Eppendorf 公司)。

17 种氨基酸对照品: 甘氨酸 (glycine, Gly, 批号: S29A10I96410)、丙氨酸 (alanine, Ala, 批号: S20A6G17672)、脯氨酸 (proline, Pro, 批号: S30J6G1)、天冬氨酸 (aspartate, Asp, 批号: S24A8I34463)、谷氨酸 (glutamate, Glu, 批号: S12A10I85582)、组氨酸 (histidine, His, 批号: Z19A9H59384)、精氨酸 (arginine, Arg, 批号: MKBD3032V)、缬氨酸 (valine, Val, 批号: S10M11I09402)、异亮氨酸 (isoleucine, Ile, 批号: SLBF7068V)、亮氨酸 (leucine, Leu, 批号: BCBN3570V)、苯丙氨酸 (phenylalanine, Phe, 批号: H20N8H48638)、赖氨酸 (lysine, Lys, 批号: S10D9I76996)、蛋氨酸 (methionine, Met, 批号: SLBK1770V)、酪氨酸 (tyrosine, Tyr, 批号: BCBK5272V)、丝氨酸 (serine, Ser, 批号: S20M11I09959)、苏氨酸 (threonine, Thr, 批号: S01F4G1)、*L*-羟脯氨酸 (*L*-hydroxyproline, *L*-Hyp, 批号: Z03J10H92127), 纯度均大于 98%, 购自上海源叶公司; 龟甲胶 (A 厂家生产, 编号 A-1 ~ A-6, 批号依次为 20210110、20210106、20210101、20210201、20210102、20210104; B 厂家生产, 编号 B-1 ~ B-3, 批号依次为 20090405、20111105、19110105; C 厂家生产, 编号 C-1 ~ C-3, 批号依次为 2020121202、2020061601、2020061603; D 厂家生产, 编号 D-1 ~ D-3, 批号依次为 180302、201103、211204); 色谱纯级盐酸购自国药集团; 色谱纯 HPLC 级乙腈 (批号:

A998-4)、HPLC 级甲醇(批号:A452-4)、LC-MS 级纯净水(批号:W6-4)均购自美国 Fisher 公司。

网络药理学所需数据库有 TCMSP(<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)、Swiss Target Prediction(<http://swisstargetprediction.ch/>)、UniProt(<https://sparql.uniprot.org/>)、OMIM(<https://omim.org/>)、Genecards(<https://www.genecards.org/>)、Drugbank(<https://go.drugbank.com/>)、PharmGKB(<https://www.pharmgkb.org/>)、STRING(<https://string-db.org/>)、Hiplot(<https://hiplot.com.cn/>)、ZINC(<https://zinc.docking.org/substances/home/>)、Plip(<https://plip-tool.biotech.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>)、PDB(<https://ww1.rcsb.org/>), 以及 LeDock、PyMol 和 Cytoscape 3.7.2 软件。

1.2 方法

1.2.1 对照品及龟甲胶供试品溶液的制备

对照品溶液的制备:精确称取 17 种氨基酸对照品各 10 mg,加 0.1 mol/L HCl 溶解并定容至 1 mL,涡旋混匀,即得对照品储备液(10 mg/mL)。取上述对照品储备液各 10 μ L,加 90% 乙腈分别稀释得 2、5、10、20、50、100、200、500、1 000、2 000、5 000、10 000、20 000 ng/mL 混合对照品工作液,装入 1.5 mL EP 管中。供试品溶液的制备:取龟甲胶粗粉约 0.25 g,精密称量,置 25 mL 量瓶中,加 0.1 mol/L 盐酸溶液 20 mL,超声处理(300W,40 kHz)30 min,放冷,加 0.1 mol/L 盐酸溶液至刻度,摇匀;精密量取 2 mL,置 5 mL 安瓿中,加 6 mol/L 盐酸 2 mL,150 $^{\circ}$ C 水解 1.5 h,放冷,移至蒸发皿中,用纯水 10 mL 分次洗涤,洗液并入蒸发皿中,蒸干,残渣加 0.1 mol/L 盐酸溶液溶解,转移至 25 mL 量瓶中,加 0.1 mol/L 盐酸溶液至刻度,摇匀后取 4 mL 装入 EP 管;取 20 μ L 样本,加入 380 μ L 50% 乙腈水溶液,分别涡旋、离心 5 min(13 000 r/min,4 $^{\circ}$ C),取上清。为保证系统重复性、稳定性,每 5 针进行 1 次 QC 分析。

1.2.2 龟甲胶化学成分分析

色谱条件采用 Waters BEH Amide 色谱柱(100 mm \times 2.1 mm,1.7 μ m),柱温 35 $^{\circ}$ C,进样量 2 μ L;流动相 A(0.4% 甲酸-20 mmol/L 甲酸铵-95% 乙腈溶液),流动相 B(0.4% 甲酸-20 mmol/L 甲酸铵-5% 乙腈水溶液),梯度洗脱(0~1 min,0% \rightarrow 10% B;1.0~2.6 min,10% \rightarrow 15% B;2.5~3.5 min,15% \rightarrow 30% B;3.6~4.0 min,30% \rightarrow 30% B;4.1~6.0 min,0% \rightarrow 0% B)。质谱采用正模式检测,气帘气

35 psi,碰撞气 Medium,离子喷雾电压 5.5 kV,温度 350 $^{\circ}$ C,喷雾气 70 psi,辅助加热气 70 psi。ExionLC AD system 为操作系统。

1.2.3 数据处理

在 AB Sciex 定量软件 OS 中采用氨基酸默认参数对各离子碎片进行识别和积分,采用面积归一化法确定各成分相对百分含量,根据取样量计算样品中水解氨基酸的实际含量。采用 SIMCA 14.1 软件以 15 个批次中 17 种水解氨基酸为变量进行主成分分析,得主成分得分图及载荷图。采用 SPSS 20.0 软件对 15 批龟甲胶药材进行因子分析。采用 SIMCA 14.1 软件以 17 种水解氨基酸为变量进行系统聚类分析。

1.2.4 网络药理学分析

1.2.4.1 龟甲胶中 17 种水解氨基酸的潜在靶点筛选

以龟甲胶的 17 种水解氨基酸作为潜在活性成分,采用 TCMSP、Swiss Target Prediction 数据库对活性成分进行潜在靶点预测;采用 UniProt 数据库矫正靶点的基因名。

1.2.4.2 骨质疏松症相关靶点与“核心靶点-活性成分-药物”的关联网络构建

以“Osteoporosis”为关键词,检索得到 OMIM、Genecards、Drugbank、PharmGKB 4 个数据库中的骨质疏松症靶点,取并集,然后与水解氨基酸的潜在靶点作交集,即得骨质疏松症核心靶点。利用 Cytoscape 3.7.2 构建“核心靶点-活性成分-药物”网络图,借助“NetworkAnalyzer”对网络图进行拓扑分析得出龟甲胶治疗骨质疏松症的关键成分。

1.2.4.3 PPI 网络的构建与 Hub 基因筛选

通过 STRING 数据库分析骨质疏松症核心靶点间相互关系,生成 PPI 网络,利用 Cytoscape 绘制“骨质疏松症核心靶点关联图”,并通过“NetworkAnalyzer”进行拓扑分析得到 Hub 靶点。

1.2.4.4 GO 与 KEGG 通路富集分析

将骨质疏松症核心靶点导入 Hiplot^[9] 中“GO/KEGG 富集分析”模块,阈值 $P < 0.05$,进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析,探究靶点在生物过程(biological process, BP)、分子功能(molecular function, MF)和细胞组分(cellular component, CC)方面涉及的功能及通路。

1.2.5 分子对接

将 Hub 靶点和关键成分进行分子对接验证。利用 ZINC 数据库获取关键成分的 3D 结构,下载为

mol 2 格式。PDB 数据库下载 Hub 靶点,借助“Get-box”寻找对接口袋并用 Ledock^[10]进行分子对接,PyMol 输出配体和受体为复合物,借助 Plip 平台^[11]明确配体与受体间相互作用力。统计各组合得分,最后用 PyMol 对活性前四的结果进行可视化。

2 结果

2.1 龟甲胶中 17 种水解氨基酸的定性分析

通过液质联用获得 17 种对照品氨基酸具体质

谱检测条件(见表 1)及龟甲胶样品和混合对照品的总离子流色谱图(total ion chromatogram, TIC, 见图 1),图中标准品出峰时间可与龟甲胶中的水解氨基酸相对应。质量控制样本(quality control sample, QC)可以较好重叠,说明仪器稳定性和重复性良好。

2.2 4 所不同厂家龟甲胶中 17 种水解氨基酸含量比较

《中华人民共和国药典》(2020 年版)中规定龟

表 1 对照品离子对参数信息

Table 1 Parameter information for the control ion pair

成分 Component	母离子 Parent ion(m/z)	子离子 Daughter ion(m/z)	去簇电压 Declustering voltage(eV)	碰撞能量 Collision energy(eV)	出峰时间 Peak time (min)
Ala	90.0	44.1	10.0	16.0	3.2
Arg	175.1	70.1	50.0	32.0	4.1
Asp	134.0	88.0	10.0	14.0	4.1
Glu	148.1	84.0	30.0	24.0	4.0
Gly	76.0	30.0	10.0	18.0	3.4
His	156.1	110	50.0	19.7	4.3
Ile	132.0	86.1	10.0	14.0	2.3
Leu	132.1	86.1	10.0	15.0	2.4
L-Hyp	132.1	86.1	60.0	25.0	3.2
Lys	147.1	84.0	30.0	25.0	4.2
Met	150.1	104.0	10.0	15.0	2.5
Phe	166.1	120.1	60.0	21.0	2.2
Pro	116.1	70.0	30.0	20.0	2.6
Ser	106.1	60.1	20.0	16.0	3.6
Thr	120.1	74.1	15.0	15.0	3.4
Tyr	182.1	136.0	30.0	19.5	2.7
Val	118.1	55.1	50.0	25.0	2.6

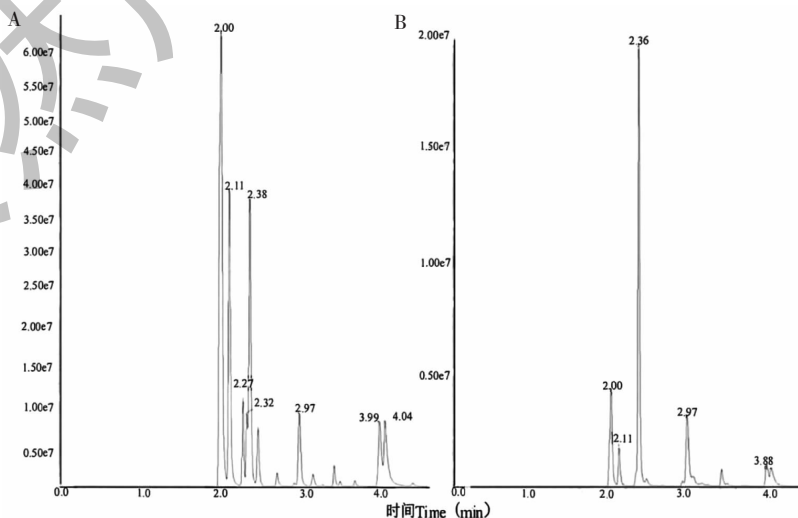


图 1 混合对照品(A)与样品(B)的 TIC 图

Fig. 1 TIC diagram of mixed controls (A) and samples (B)

甲胶按干燥品计算,含 *L*-Hyp 不得少于 5.4%, Gly 不得少于 12.4%, Ala 不得少于 5.2%, Pro 不少于 6.2%。结果显示(见表 2),A 厂家 6 个批次中 2 个(A-2、A-5)、B 厂家 3 个批次中 2 个(B-2、B-3)、C 厂

家 3 个批次中 1 个(C-1)的 *L*-Hyp、Gly、Ala 的含量均高于药典标准,D 厂家样品三个氨基酸均低于药典标准。但各厂家 Pro 检测含量均略低于药典标准。

表 2 4 所厂家龟甲胶 17 种水解氨基酸含量的测定结果

Table 2 Results of the determination of 17 amino acids in TCPC from 4 companies

成分 Component	含量 Content(%)														
	A-1	A-2	A-3	A-4	A-5	A-6	B-1	B-2	B-3	C-1	C-2	C-3	D-1	D-2	D-3
Ala	5.02	5.72	4.46	4.83	5.86	4.63	3.53	5.47	5.30	5.90	3.89	5.18	3.48	4.37	4.72
Arg	4.18	4.79	3.68	3.80	5.34	3.87	2.97	4.23	4.39	5.06	3.32	4.40	2.69	3.29	3.90
Asp	1.99	2.71	2.46	2.51	3.65	2.48	1.67	2.49	2.68	2.79	2.17	2.98	2.13	2.13	2.63
Glu	4.60	5.62	4.33	4.92	7.01	4.56	3.60	4.43	5.44	6.28	3.81	6.16	3.89	4.40	5.18
Gly	13.62	15.32	11.31	12.71	15.64	9.95	8.63	15.93	13.44	14.71	10.79	14.01	10.34	11.30	12.07
His	0.40	0.39	0.32	0.36	0.43	0.34	0.26	0.37	0.34	0.39	0.28	0.36	0.23	0.26	0.28
Ile	1.40	1.51	1.25	1.19	1.68	1.09	0.88	1.47	1.42	1.59	0.96	1.16	0.89	0.97	1.26
Leu	0.63	0.80	0.58	0.59	0.77	0.48	0.41	0.63	0.57	0.77	0.53	0.51	0.41	0.45	0.50
<i>L</i> -Hyp	5.73	6.55	4.97	5.56	6.75	5.33	4.07	5.88	6.38	6.67	4.65	6.17	4.61	5.33	5.65
Lysi	1.68	1.73	1.46	1.56	2.22	1.53	1.30	1.82	1.76	1.77	1.34	1.85	1.10	1.22	1.39
Met	0.02	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02	0.04	0.02	0.02	0.01	0.02	0.03
Phe	1.01	1.19	0.92	0.99	1.25	0.84	0.67	1.06	0.98	1.08	0.72	0.83	0.64	0.73	0.90
Pro	5.06	6.04	4.13	4.66	5.93	4.17	3.18	5.42	5.02	5.75	3.89	4.36	3.14	3.87	4.36
Ser	1.96	2.34	1.97	2.08	2.69	1.95	1.74	2.29	2.30	2.35	1.63	2.58	1.77	1.98	1.87
Thr	1.18	1.35	0.93	1.13	1.39	1.08	0.82	1.21	1.29	1.41	0.86	1.26	0.88	0.97	1.17
Tyr	0.56	0.52	0.51	0.53	0.58	0.54	0.34	0.48	0.50	0.52	0.30	0.43	0.34	0.38	0.45
Val	0.84	0.87	0.64	0.72	0.96	0.73	0.52	0.90	0.71	0.94	0.71	0.59	0.48	0.52	0.54

2.3 多元统计分析结果

2.3.1 4 所厂家龟甲胶的差异成分筛选

主成分分析 4 个厂家不同批次龟甲胶中水解氨基酸成分的差异性。结果显示, A-1、A-3、A-4、A-6、

D-2、D-3、B-3 样品相似度近; A-2、B-2、C-1 号样品相似度近。载荷图显示, Pro、Ile、Ala、Arg、Thr、Phe、His、*L*-Hyp、Lys 距离原点横坐标 > 0.25 , 对整体样品质量差异的贡献度较高(见图 2)。

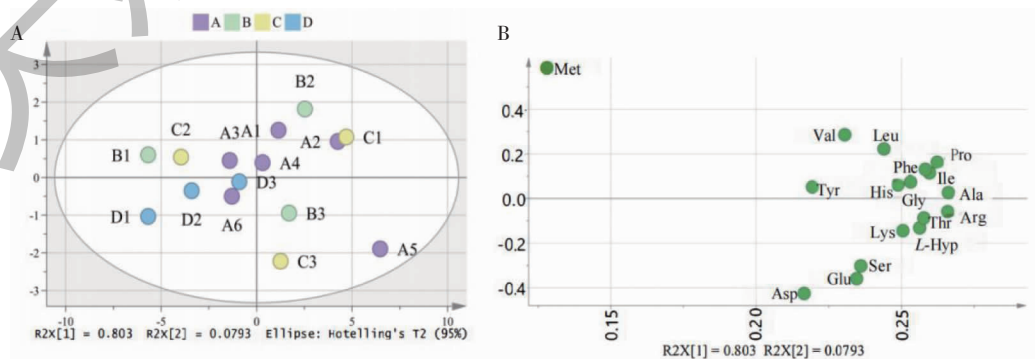


图 2 4 所厂家龟甲胶主成分得分及 17 种氨基酸成分载荷图

Fig. 2 PCA scores of TCPC from four companies and load diagram of 17 amino acids

2.3.2 4 所厂家龟甲胶样品的主因子提取

选择初始特征值大于 1 的公因子作为主因子,结果显示,前 2 个公因子累计方差贡献率为 88.28% (见表 3)。为明确所提取的各主因子的实际意义,经方差最大正交旋转后,得到 2 个主因子的因子载荷系数矩阵(见表 4)。因子载荷量 >0.6 则纳

入主因子,主因子 1 特征值为 13.66,方差贡献率占总因子的 80.35%,主要受 Glu、Asp、Ser、L-Hyp、Lys、Arg、Thr、Ala、His、Gly 含量的影响,说明这 10 种氨基酸对龟甲胶质量影响较大。主因子 2 特征值为 1.35,方差贡献率为 7.93%,主要受到 Ile、Phe、Pro、Leu、Val、Met 含量的影响,说明其对龟甲胶起次要作用。

表 3 公因子的特征值及方差贡献率

Table 3 Eigenvalues and variance contribution of the common factors

公因子 Common factor	初始特征值 Initial eigenvalue			提取载荷平方和 Extraction of load sum of squares		
	总计 Total	方差贡献率 Variance contribution rate(%)	累积方差贡献率 Cumulative variance Contribution margin(%)	总计 Total	方差贡献 率 Variance contribution rate(%)	累积方差贡献率 Cumulative variance Contribution margin (%)
1	13.66	80.35	80.35	13.66	80.35	80.35
2	1.35	7.93	88.28	1.35	7.93	88.28
3	0.71	4.16	92.44			
4	0.37	2.17	94.62			
5	0.28	1.66	96.27			
6	0.21	1.24	97.51			
7	0.15	0.92	98.42			
8	0.09	0.55	98.97			
9	0.07	0.42	99.40			
10	0.04	0.26	99.66			
11	0.03	0.16	99.82			
12	0.02	0.12	99.95			
13	6.00E-3	3.60E-2	99.98			
14	2.00E-3	1.40E-2	100.00			
15	3.57E-16	2.10E-15	100.00			
16	-3.74E-17	-2.20E-16	100.00			
17	-6.40E-16	-3.77E-15	100.00			

表 4 旋转后的因子载荷系数

Table 4 Factor loading coefficients after rotation

变量 Variable	主因子 Main factor		变量 Variable	主因子 Main factor	
	F1	F2		F1	F2
Glu	0.93	0.23	Gly	0.67	0.64
Asp	0.93	0.12	Ile	0.66	0.71
Ser	0.90	0.28	Phe	0.64	0.72
L-Hyp	0.83	0.48	Pro	0.63	0.76
Lys	0.82	0.45	Tyr	0.59	0.56
Arg	0.81	0.57	Leu	0.54	0.77
Thr	0.80	0.52	Val	0.45	0.80
Ala	0.74	0.65	Met	-0.07	0.83
His	0.67	0.66			

根据主因子得分系数矩阵(见表5)得到原变量 X_i 与主因子 F_i 间的数量关系并计算 F_i 得分,由因子得分系数矩阵可得各主因子的得分函数式,见公式(1)。计算各批次龟甲胶主成分得分(PC_z),以各主因子贡献率为权重,主因子的得分与相应权重累积叠加建立综合评分函数式,见公式(2)。将综合得分由低到高分分为3组:综合得分 <-1.0 为组1, $-1.0 < \text{综合得分} < 1.0$ 为组2,综合得分 > 1.0 为组3。结果显示(见表6),组3的样品A-2、A-5、B-2、C-

1总氨基酸含量最高;其次为组2的样品A-1、A-3、A-4、A-6、B-3、C-3、D-3;再次为组1的样品B-1、C-2、D-1、D-2。

$$F_i = \sum_{j=1}^{17} a_{ij}X_j (j = 1, 2) \quad (1)$$

式中, a_{ij} 为因子得分系数矩阵第j列第i行的系数, X_j 为原变量标准化后的数值。

$$PC_z = (80.35F_1 + 7.93F_2)/88.83 \quad (2)$$

表5 成分得分系数矩阵

Table 5 Component score coefficient matrix

变量 Variable	主因子 Main factor		变量 Variable	主因子 Main factor	
	F1	F2		F1	F2
Asp	0.28	-0.25	Tyr	0.02	0.07
Glu	0.24	-0.20	His	0.01	0.09
Ser	0.21	-0.16	Ile	-0.01	0.12
Lys	0.13	-0.05	Phe	-0.02	0.13
L-Hyp	0.13	-0.04	Pro	-0.03	0.15
Thr	0.10	-0.01	Leu	-0.07	0.19
Arg	0.09	0.01	Val	-0.11	0.23
Ala	0.04	0.06	Met	-0.30	0.42
Gly	0.02	0.08			

表6 不同厂家龟甲胶的主因子得分及综合质量评分

Table 6 Main factor scores and combined quality scores of TCPC in different companies

样品编号 Sample number	PC1	PC2	综合得分 Combined score	得分分组 Scoring group
A-1	-0.43	1.03	0.60	2
A-2	0.38	1.35	1.73	3
A-3	-0.54	0.07	-0.47	2
A-4	-0.15	0.32	0.16	2
A-5	2.39	-0.16	2.23	3
A-6	0.00	-0.56	-0.56	2
B-1	-1.52	-0.57	-2.09	1
B-2	-0.45	1.64	1.19	3
B-3	0.88	-0.35	0.53	2
C-1	0.40	1.52	1.92	3
C-2	-1.13	-0.31	-1.45	1
C-3	1.48	-1.28	0.20	2
D-1	-0.64	-1.66	-2.30	1
D-2	-0.52	-0.81	-1.33	1
D-3	-0.13	-0.24	-0.37	2

2.3.3 4所厂家龟甲胶中水解氨基酸含量的聚类分析

按各批次水解氨基酸含量由低到高聚类,将15批样品聚为3大类(见图3),依次为I类:B-1、C-2、D-1、D-2号样品;II类:A-2、A-5、C-1号样品;III类:A-1、A-3、A-4、A-6、B-2、B-3、C-3、D-3号样品。

综上所述,多元统计结果显示,4个厂家中B、C二家样品水解氨基酸含量离散程度较高,A、D二家样品聚类良好。其中A厂家综合得分最高,推测A厂家6个批次的龟甲胶中水解氨基酸含量高且离散度小,质量稳定。

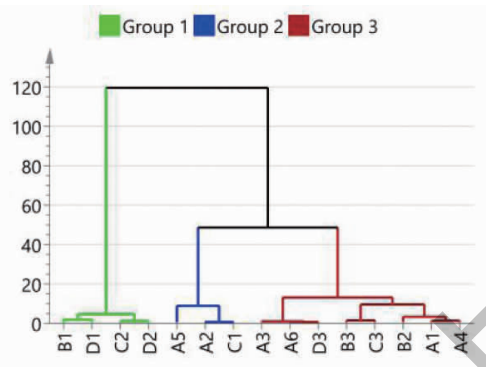


图3 不同厂家龟甲胶聚类分析图

Fig. 3 Cluster analysis diagram of TCPC from different companies

2.4 网络药理学结果

2.4.1 龟甲胶中17种水解氨基酸的潜在靶点筛选

17种水解氨基酸通过 SwissTargetPrediction、TC-

MSP、Uniprot 数据库筛重后共得到175靶点。靶点较多的成分有 Gly(137)、Ala(68)、Ser(52)、Asp(47)等(见表7)。

表7 龟甲胶中潜在成分及对应潜在靶点数

Table 7 Potential components in TCPC and the corresponding number of potential targets

MOL ID	化合物名称 Compound name	代码 Code	靶点数 Number of target
MOL000042	Ala	GJJ1	68
MOL000054	Arg	GJJ2	2
MOL000065	Asp	GJJ3	47
MOL000052	Glu	GJJ4	28
MOL000050	Gly	GJJ5	137
MOL000071	His	GJJ6	2
MOL000068	Ile	GJJ7	14
MOL005448	Leu	GJJ8	12
MOL007579	L-Hyp	GJJ9	6
MOL000055	Lys	GJJ10	2
MOL005449	Met	GJJ11	5
MOL000041	Phe	GJJ12	24
MOL000061	Pro	GJJ13	20
MOL003969	Ser	GJJ14	52
MOL003971	Thr	GJJ15	31
MOL000056	Tyr	GJJ16	21
MOL000067	Val	GJJ17	26

2.4.2 骨质疏松症核心靶点筛选与“核心靶点-活性成分-药物”网络图的构建结果

通过 OMIM、Genecards、Drugbank、PharmGKB 数据库筛选后共得到 4 894 个骨质疏松症靶点,与水解氨基酸的潜在靶点作交集后获得 68 个骨质疏松

症核心靶点(见表 8)。由 68 个骨质疏松症核心靶点反推药物活性成分,并构建“核心靶点-活性成分-药物”网络(见图 4A),通过拓扑分析得到符合度值 2 倍中位数(≥ 24),且平均中心度(≥ 0.0693)、紧密度(≥ 0.4081)的关键成分 2 个(见表 9)。

表 8 骨质疏松症核心靶点
Table 8 Core targets in osteoporosis

序号 Code	UNIProt ID	核心靶点 Core target	蛋白名称 Protein name	序号 Code	UNIProt ID	核心靶点 Core target	蛋白名称 Protein name
1	P23219	PTGS1	前列腺素 G/H 合酶 1 Prostaglandin G/H synthase 1	35	P31040	SDHA	线粒体型琥珀酸脱氢酶[泛醌]黄素蛋白亚基 Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial
2	P14867	GABRA1	γ -氨基丁酸受体亚基 A1 Gamma-aminobutyric acid receptor subunit alpha-1	36	Q9UJS0	SLC25A13	钙结合线粒体载体蛋白 Aralar2 Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar2
3	P12931	SRC	原癌基因酪氨酸蛋白激酶 Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src	37	P98194	ATP2C1	钙离子 ATP 酶通道蛋白抗体 Calcium-transporting ATPase type 2C member 1
4	P11217	PYGM	肌肉源糖原磷酸化酶 Glycogen phosphorylase, muscle form	38	P05091	ALDH2	线粒体乙醛脱氢酶 Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial
5	P07339	CTSD	组织蛋白酶 D Cathepsin D	39	P00797	REN	肾素 Renin
6	P22894	MMP8	中性粒细胞胶原酶 Neutrophil collagenase	40	P08709	F7	凝血因子 VII Coagulation factor VII
7	P39900	MMP12	巨噬细胞金属弹性蛋白酶 Macrophage metalloelastase	41	P02788	LTF	乳铁蛋白 Lactotransferrin
8	P06276	BCHE	胆碱酯酶 Cholinesterase	42	O14920	IKBKB	核因子 KB 抑制蛋白激酶 β Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta
9	P47989	XDH	黄嘌呤脱氢酶/氧化酶 Xanthine dehydrogenase/oxidase	43	Q16881	TXNRD1	硫氧还蛋白还原酶 1 Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic
10	P00325	ADH1B	全反式视黄醇脱氢酶 All-trans-retinol dehydrogenase	44	O15067	PFAS	磷酸核糖甲酰甘氨酸脲合酶 Phosphoribosylformylglycinamide synthase
11	P00326	ADH1C	醇脱氢酶 1C Alcohol dehydrogenase 1C	45	Q99707	MTR	蛋氨酸合酶 Methionine synthase
12	P07327	ADH1A	醇脱氢酶 1A Alcohol dehydrogenase 1A	46	P15289	ARSA	芳基硫酸酯酶 A Arylsulfatase A
13	P04040	CAT	过氧化氢酶 Catalase	47	P06737	PYGL	肝糖原磷酸化酶 Glycogen phosphorylase, liver form
14	P23921	RRM1	核苷酸还原酶 M1 Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit	48	P23786	CPT2	肉毒碱棕榈酰基转移酶 2 Carnitine O-palmitoyltransferase 2, mitochondrial
15	P16278	GLB1	β -半乳糖苷酶 Beta-galactosidase	49	Q61B77	GLYAT	甘氨酸 N-乙酰基转移酶 Glycine N-acyltransferase

续表 8(Continued Tab. 8)

序号 Code	UNIProt ID	核心靶点 Core target	蛋白名称 Protein name	序号 Code	UNIProt ID	核心靶点 Core target	蛋白名称 Protein name
16	P00488	F13A1	凝血因子 XIII A 链 Coagulation factor XIII A chain	50	Q8N159	NAGS	N-乙酰谷氨酰胺合酶 <i>N</i> -acetylglutamate synthase, mitochondrial
17	P00505	GOT2	天冬氨酸氨基转移酶, 线粒体 Aspartate aminotransferase, mitochondrial	51	Q8TD30	GPT2	丙氨酸氨基转移酶 2 Alanine aminotransferase 2
18	P21549	AGXT	丝氨酸丙酮酸氨基转移酶 Serine-pyruvate aminotransferase	52	P22557	ALAS2	5-氨基乙酰丙酸合酶 1 5-Aminolevulinic acid synthase, erythroid-specific, mitochondrial
19	P24298	GPT	丙氨酸氨基转移酶 1 Alanine aminotransferase 1	53	P13196	ALAS1	氨基乙酰丙酸 δ 合酶 1 5-Aminolevulinic acid synthase, nonspecific, mitochondrial
20	P32929	CTH	胱硫醚 γ 裂解酶 Cystathionine gamma-lyase	54	P49189	ALDH9A1	γ -氨基丁醛脱氢酶 4 4-Trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase
21	P48163	ME1	NADP-依赖性苹果酸酶 NADP-dependent malic enzyme	55	P11498	PC	丙酮酸羧化酶 Pyruvate carboxylase, mitochondrial
22	P50440	GATM	甘氨酸脒基转移酶 Glycine amidinotransferase, mitochondrial	56	P38606	ATP6V1A	V 型质子 ATP 酶催化亚基 A 蛋白 V-type proton ATPase catalytic subunit A
23	P35030	PRSS3	胰蛋白酶-3 Trypsin-3	57	P13807	GYS1	肌肉源葡萄糖合成酶 [starch] synthase, muscle
24	P04181	OAT	线粒体型鸟氨酸氨基转移酶 Ornithine aminotransferase, mitochondrial	58	P00734	F2	凝血酶原 Prothrombin
25	Q14376	GALE	UDP-葡萄糖 4-差向异构酶 UDP-glucose 4-epimerase	59	P08588	ADRB1	β 肾上腺素受体 Beta-1 adrenergic receptor
26	Q9UNI1	CELA1	胰弹性蛋白酶 Chymotrypsin-like elastase family member 1	60	Q14524	SCN5A	钠通道蛋白 5 亚基 α Sodium channel protein type 5 subunit alpha
27	P29475	NOS1	神经型一氧化氮合酶 Nitric oxide synthase, brain	61	P29474	NOS3	内皮型一氧化氮合酶 Nitric oxide synthase, endothelial
28	P35354	PTGS2	山羊素 G/H 合酶 2 Prostaglandin G/H synthase 2	62	P08913	ADRA2A	α 2A 肾上腺素能受体 Alpha-2A adrenergic receptor
29	P18031	PTPN1	非受体型蛋白酪氨酸磷酸酶 1 Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 1	63	P35348	ADRA1A	α 1A 肾上腺素能受体 Alpha-1A adrenergic receptor
30	Q00266	MAT1A	蛋氨酸腺苷转移酶 I α S S-adenosylmethionine synthase isoform type-1	64	Q01959	SLC6A3	钠依赖性多巴胺转运蛋白 Sodium-dependent dopamine transporter
31	P20292	ALOX5AP	花生四烯酸 5-脂氧合酶激活蛋白 Arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein	65	P07550	ADRB2	肾上腺素能受体 β 2 Beta-2 adrenergic receptor
32	P42261	GRIA1	谷氨酸受体 1 Glutamate receptor 1	66	P27487	DPP4	二肽基肽酶-4 Dipeptidyl peptidase 4
33	P17612	PRKACA	CAMP 依赖性蛋白激酶催化亚基 α cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha	67	P62937	PPIA	肽基脯氨酸顺反异构酶 A Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A
34	P00480	OTC	线粒体型鸟氨酸转氨甲酰酶 Ornithine transcarbamylase, mitochondrial	68	P17707	AMD1	腺苷蛋氨酸脱羧酶 S-Adenosylmethionine decarboxylase proenzyme

2.4.4 GO 功能及 KEGG 通路富集分析

GO 富集分析结果共得到 2 375 个条目,其中 BP 相关条目 1 992 条, MF 283 条, CC 200 条。取 P 值前 10 条结果进行可视化分析(见图 5A)。BP 主要涉及 α -氨基酸代谢过程、细胞氨基酸代谢过程、小分子分解代谢过程等。MF 主要涉及维生素结合、吡哆醛磷酸结合、维生素 B6 结合、有机酸结合等。CC 主要与膜筏、膜微域、线粒体基质等密切相关。

KEGG 通路富集分析共得到 212 个信号通路

(见图 5B), 龟甲胶治疗骨质疏松症主要涉及氨基酸的生物合成(biosynthesis of amino acids)、精氨酸和脯氨酸代谢(arginine and proline metabolism)、碳代谢(carbon metabolism)、精氨酸生物合成(arginine biosynthesis)等通路,其中氨基酸的生物合成涉及 NAGS-GPT2-SLC25A13-PFAS-OTC 等 9 个靶点;精氨酸和脯氨酸代谢涉及 OAT-NOS3-NOS1-GOT2-GATM 等 8 个;碳代谢涉及 GPT2-SDHA-PC-ME1-GPT 等 8 个;精氨酸生物合成涉及 NAGS-GPT2-OTC-NOS3-NOS1 等 7 个。

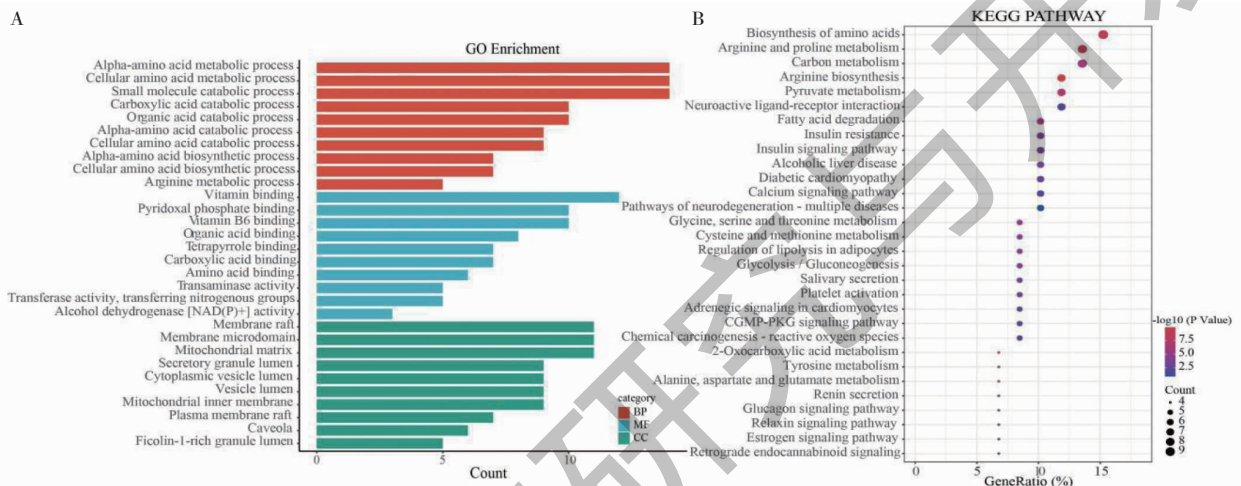


图 5 GO 功能 (A) 及 KEGG 通路 (B) 富集分析图

Fig. 5 GO function (A) and KEGG pathway (B) enrichment analysis diagram

2.5 分子对接

将关键成分及 Hub 靶点进行分子对接。本文对接结合能在 -4.30 kcal/mol 到 -2.75 kcal/mol 之间,平均结合能 -3.49 kcal/mol,小于 -1.20 kcal/mol,

表明 Hub 靶点与关键成分之间结合良好(见表 11);由分子模式图(见图 6)可知,关键成分通过氢键、盐桥等相互作用与 Hub 靶点形成较强的结合力。

表 11 分子对接结合能

Table 11 Molecular docking binding energy

靶点 Target	结合能 Binding energy (kcal/mol)	
	Ala	Gly
CAT	-2.84	-2.75
NOS1	-4.30	-3.94
NOS3	-3.55	-3.38
F2	-3.88	-3.69
SRC	-3.26	-3.46
AGXT	-3.42	-3.43
GATM	-4.03	-3.91
GPT2	-3.21	-3.00
SDHA	-3.56	-3.44
PTGS2	-3.34	-3.20
CTH	-3.80	-3.53

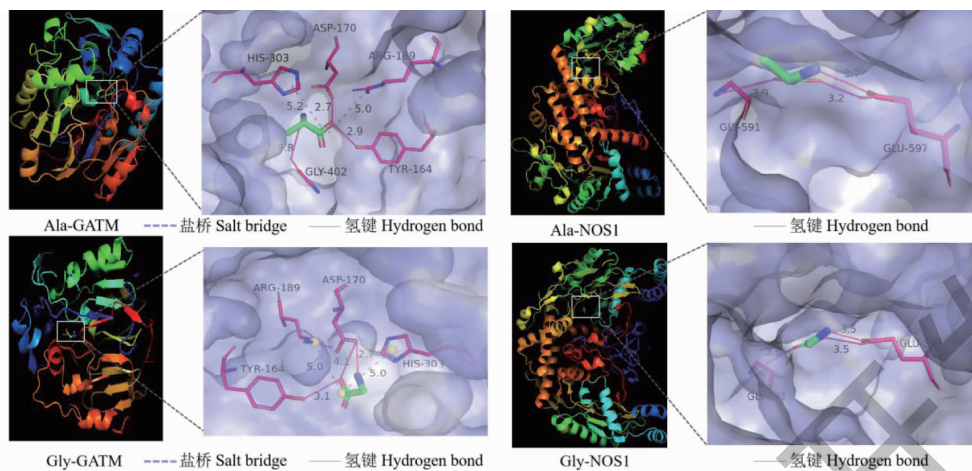


图6 分子对接模式图

Fig. 6 Molecular docking pattern diagram

3 讨论与结论

本文各厂家各批次的龟甲胶水解氨基酸含量整体较药典水平偏低,分析原因除与样品本身质量相关外,亦有可能与检测方法相关。我们采用液质联用检测水解氨基酸的特征子母离子对信号,具有高灵敏度和高特异性;而药典采用的 HPLC 法检测的是化合物特征官能团的吸光度信号,难以区分相似结构的化合物。两者比较液质联用法更为精确,可排除非特异性成分的干扰,故水解氨基酸含量可能较药典偏低。网络药理学结果显示,龟甲胶治疗骨质疏松症的关键成分有 Ala、Gly。其中 Ala 能够帮助糖类和有机酸的代谢,改善绝经后骨质疏松相关^[12-14]。Gly 与男性的骨折风险直接相关,在胶原蛋白中发生突变会引起成骨不全症^[15,16]。龟甲胶治疗骨质疏松症的关键靶点有 CAT、NOS1、NOS3、F2 等。过氧化氢酶(catalase, CAT)可通过抑制氧化应激,提高小鼠体内骨密度和骨矿含量^[17-19];神经型一氧化氮合酶(nitric-oxide synthase, brain, NOS1)与骨愈合相关,主要表达于纤维软骨区内纤维组织和骨痂间的区域;内皮型一氧化氮合酶(nitric-oxide synthase, endothelial, NOS3)也与骨愈合相关,主要表达于主要分布于软骨区和血管周围细胞^[20];凝血酶原(prothrombin)是成骨细胞中的特异性激动剂,能够刺激器官培养中的骨吸收^[21]。KEGG 和 GO 富集分析结果提示龟甲胶可能涉及骨细胞中维生素结合、吡哆醛磷酸结合、有机酸结合、氨基酸合成代谢等一系列生物功能;通过影响胰岛素信号通路、钙信号通路、环磷酸鸟苷-蛋白激酶 G (cyclic guanosine

monophosphate-protein kinase G, cGMP-PKG) 信号、碳代谢、氨基酸合成等信号通路起作用。胰岛素信号通路可刺激骨骼肌摄取全身 80% 的葡萄糖^[22]; cGMP-PKG 信号通路能够调控骨形成,还可促进成骨细胞矿化成熟,对成骨调控具有双向性和复杂性^[23,24]。

综上,本文采用 UHPLC-QTRAP-MS/MS 结合多元统计分析发现 4 个厂家中 A 厂家龟甲胶质量稳定,水解氨基酸含量高;龟甲胶可能通过丙氨酸、甘氨酸等成分调控 CAT、NOS1、NOS3 等 68 个骨质疏松核心靶点进而影响氨基酸合成、精氨酸和脯氨酸代谢、碳代谢等 212 条信号通路发挥治疗骨质疏松的作用。

参考文献

- 1 Tang Y, Xiao D, Liu L, et al. Study on the determination of donkey-hide gelatin, bovine-hide gelatin and heavy metals in tortoise shell glue [J]. *Modern Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol* (世界科学技术-中医药现代化), 2021, 23:1390-1396.
- 2 Zhao C, Wu T, Xiong T, et al. Therapeutic effect and mechanism of Testudinis Carapacis et Plastris Colla on gastric ulcer model mice [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm* (中华中医药杂志), 2020, 35:4957-4961.
- 3 Liu XX, Guo YK, Ai Q, et al. Study on the mechanism of Li-wei Dihuang Pills in the treatment of osteoporosis based on network pharmacology and molecular docking [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2021, 33:1593-1602.
- 4 Sun SM. *The Essential Prescriptions of a Thousand Jins for Emergency Treatment* (备急千金要方) [M]. Beijing: Peo-

- ple's Health Publishing House, 1955. 05.
- 5 Tang Y, Xiao D, Liu Z Y, et al. Research status and prospect of Testudinis Carapacis et Plastri Colla [J]. China J Tradit Chin Med Pharm (中华中医药杂志), 2019, 34: 2593-2598.
 - 6 Zhong XY. Exploring the mechanism of action of turtle gum on PMOP model rats based on amino acid metabolic pathway [D]. Changsha: Hunan University of Chinese Medicine (湖南中医药大学), 2022.
 - 7 Zwart SR, Davis-Street JE, Paddon-Jones D, et al. Amino acid supplementation alters bone metabolism during simulated weightlessness [J]. J Appl Physiol, 2005, 99: 134-140.
 - 8 MacDonell R, Hamrick MW, Isaacs CM. Protein/amino-acid modulation of bone cell function [J]. Bonekey Rep, 2016, 5: 827.
 - 9 Li J, Miao B, Wang S, et al. Hplot: a comprehensive and easy-to-use web service for boosting publication-ready biomedical data visualization [J]. Briefings Bioinf, 2022, 23: bbac261.
 - 10 Wang Z, Sun H, Yao X, et al. Comprehensive evaluation of ten docking programs on a diverse set of protein-ligand complexes; the prediction accuracy of sampling power and scoring power [J]. Phys Chem Chem Phys, 2016, 18: 12964-12975.
 - 11 Adasme MF, Linnemann KL, Bolz SN, et al. PLIP 2021: Expanding the scope of the protein-ligand interaction profiler to DNA and RNA [J]. Nucleic Acids Res, 2021, 49: W530-W534.
 - 12 Nie YP, Xu H, Yao MJ, et al. Application and production status of *L*-alanine [J]. China Brew (中国酿造), 2021, 40: 26-30.
 - 13 Holvik K, Frøylund L, Haugen M, et al. Risk assessment of "other substances" - *L*-alanine [J]. Eur J Nutr Food Safe, 2018, 8: 330-332.
 - 14 Yang F, Feng WB, Dong X, et al. Effect of Tubson-2 on metabolism in ovariectomized rats based on UPLC-Q-Exactive-MS metabolomics [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2021, 52: 5939-5947.
 - 15 Eriksson AL, Friedrich N, Karlsson MK, et al. Serum glycine levels are associated with cortical bone properties and fracture risk in men [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2021, 106: e5021-e5029.
 - 16 Yao L, Liu Z, Yu J, et al. Morphology of osteogenesis imperfecta collagen mimetic peptide assemblies correlates with the identity of glycine-substituting residue [J]. ChemBioChem, 2019, 20: 3013-3019.
 - 17 Hamada Y, Fujii H, Fukagawa M. Role of oxidative stress in diabetic bone disorder [J]. Bone, 2009, 45: S35-S38.
 - 18 Yang YH, Li B, Zheng XF, et al. Oxidative damage to osteoblasts can be alleviated by early autophagy through the endoplasmic reticulum stress pathway-implications for the treatment of osteoporosis [J]. Free Radic Biol Med, 2014, 77: 10-20.
 - 19 Mi JG, Qiao RQ, Liu SZ. Bushen Jianpi Huoxue Recipe improves bone metabolism, oxidative stress, and autophagy in osteoporotic rats [J]. Chin J Tissue Eng Res (中国组织工程研究), 2022, 26: 4147-4152.
 - 20 Zhu W, Diwan AD, Lin JH, et al. Nitric oxide synthase isoforms during fracture healing [J]. J Bone Miner Res, 2001, 16: 535-540.
 - 21 Abraham LA, Jenkins AL, Stone SR, et al. Expression of the thrombin receptor in developing bone and associated tissues [J]. J Bone Miner Res, 1998, 13: 818-827.
 - 22 Perrini S, Natalicchio A, Laviola L, et al. Abnormalities of insulin-like growth factor-I signaling and impaired cell proliferation in osteoblasts from subjects with osteoporosis [J]. Endocrinology, 2008, 149: 1302-1313.
 - 23 Liu YQ. Effects of myostatin on insulin resistance and insulin signaling pathway in skeletal muscle of mice with type 2 diabetes mellitus [D]. Zhengzhou: Henan University (河南大学), 2020.
 - 24 Ren X. Study on the low frequency pulse electromagnetic fields promoted bone formation by primary cilia and NO-cGMP-PKG pathway [D]. Lanzhou: Lanzhou University of Technology (兰州理工大学), 2017.