

使用纯化硫酸酯酶水解硫酸化类固醇、毒性内源性物质与外源性物质，用于硫酸化及非结合型化合物的定量分析

Nikki Sitasuwan, Amanda McGee, L. Andrew Lee*

Integrated Micro-Chromatography Systems, Inc,Irmo, SC

摘要

在人体中，硫酸化和葡萄糖醛化是促进外源性及内源性化学物质与副产物清除的主要解毒过程。由于高纯度硫酸化参考物质数量有限且现有硫酸化参考材料成本高昂，硫酸化代谢物的监测面临挑战。此外，使用气相色谱质谱法进行类固醇监测需要在衍生化步骤前裂解硫酸酯。然而，现有硫酸酯酶的效果有限，部分原因在于高质量试剂的缺乏及酶学特性研究不足。本研究系统表征了一种能裂解多种硫酸化分析物的纯化硫酸酯酶。通过比较经硫酸酯酶处理与未经处理的血浆和尿液样本的质谱数据，进行非靶向代谢组学分析，以评估大规模监测硫酸结合物的可行性。

引言

不同来源的硫酸酯酶对一系列硫酸化化合物（包括显色底物对硝基苯硫酸酯及九种不同硫酸化类固醇）的水解效率存在差异（文献1）。表1汇总的五种硫酸酯酶对 α 型硫酸酯酶无活性，且对硫酸化类固醇活性较差。其中，源自铜绿假单胞菌的硫酸酯酶活性最高，但所有受试酶对硫酸雄酮、硫酸本胆烷醇酮及硫酸表睾酮均未检测到或仅检测到微量催化转化（表1）。

Substrate	Sulfate position	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Helix pomatia</i>	<i>Haliotis rufescens</i>	<i>Patella vulgata</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Cortisol sulfate	21	no data	no data	no data	no data	no data
Tapentadol sulfate	aromatic	no data	no data	no data	no data	no data
para-nitrophenyl sulfate (PNPS)	aromatic	7	6	5	3	2
Estadiol sulfate (ES)	aromatic	7	5	3	2	0
Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS)	3 β	3	3	3	1	0
Epiandrosterone sulfate (EAS)	3 β	3	3	2	2	0
Androsterone sulfate (AS)	3 α	0	0	0	0	0
Etiiocholanolone sulfate (ECS)	3 α	0	2	2	0	0
Testosterone sulfate (TS)	17 β	2	1	1	0	0
Boldenonsulfate (BS)	17 β	2	2	0	0	0
Nandrolone sulfate (NS)	17 β	3	1	0	0	0
Epitestosterone sulfate (ETS)	17 α	0	0	0	0	0

反应条件：100 μ M 底物，37°C。
酶活性以 μ mol $\cdot$ min⁻¹·[g 蛋白]⁻¹ 表示，并采用对数刻度标示，其中：

0	no detectable activity
1	0.005-0.05
2	0.05-0.5
3	0.5-5
4	5-50
5	50-500
6	500-5000
7	5000-50000

五种来源硫酸酯酶的底物作用范围（反应条件：100 μ M 底物，37°C；数据改编自文献1）

而源自蜗牛消化腺的粗制酶对结合态特布他林无明显释放作用（图1b）。通过使用纯化硫酸酯酶与葡萄糖醛酸苷酶，研究报告了尿液中硫酸结合型、葡萄糖醛酸结合型。及游离型特布他林的排泄规律（图1c）。通过监测硫酸化与葡萄糖醛酸化代谢物，可在摄入特布他林后 3 天内检出其代谢痕迹。

在 IMCS-PSF 的早期特性研究中，我们使用这种纯化硫酸酯酶，在尿液和血浆基质中测试了多种市售硫酸化代谢物的水解特性曲线。

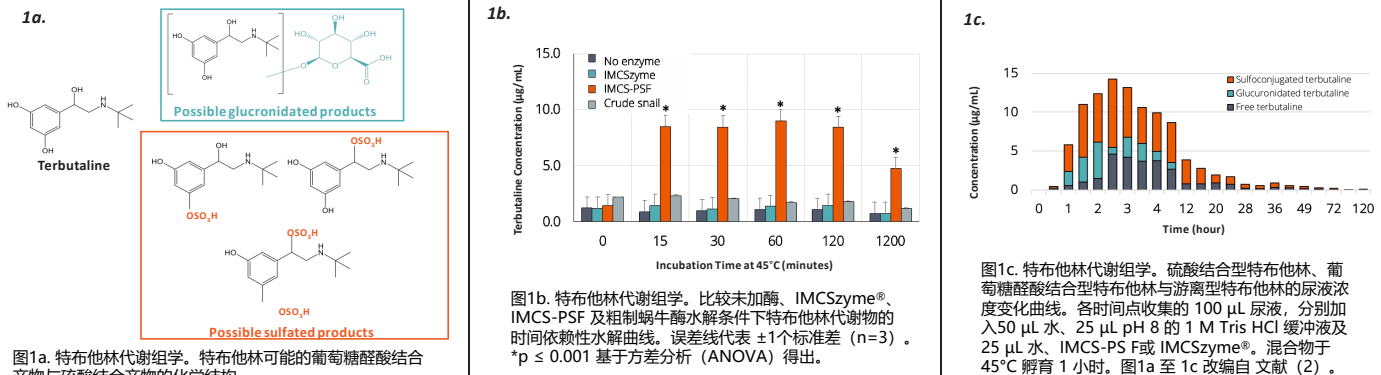


图1a. 特布他林代谢组学。特布他林可能的葡萄糖醛酸结合产物与硫酸结合产物的化学结构

图1b. 特布他林代谢组学。比较未加酶、IMCSzyme®、IMCS-PSF 及粗制蜗牛酶水解条件下特布他林代谢物的时间依赖性水解曲线。误差线代表 ± 1 个标准差（n=3）。*p $\leq$ 0.001 基于方差分析（ANOVA）得出。

材料与方法

分别使用酚酞葡萄糖苷酸（25°C）、对硝基邻苯二酚硫酸酯（37°C）和 Calcein-AM（37°C）进行显色法测定葡萄糖醛酸酶、硫酸酯酶和酯酶活性。孵育时间为 30 分钟。

将人尿液和血浆样品分为三组：第一组不进行酶水解处理，第二组用 β -葡萄糖醛酸酶孵育，第三组用硫酸酯酶孵育。所有孵育样品均设置三个平行重复，分析物采用反相分散式吸头萃取技术进行分离。样品首先用 100% 甲醇洗脱，经 CentriVap 离心浓缩干燥后，用 20% 甲醇水溶液复溶，注入配备反相色谱柱的 UPLC-MS/MS 或 UPLC-qTOF 系统进行分析。对于 MS/MS 检测，采用 TSQ-Endura 质谱仪搭配 Vanquish 二元泵液相系统，以优化硫酸化代谢物的水解条件。

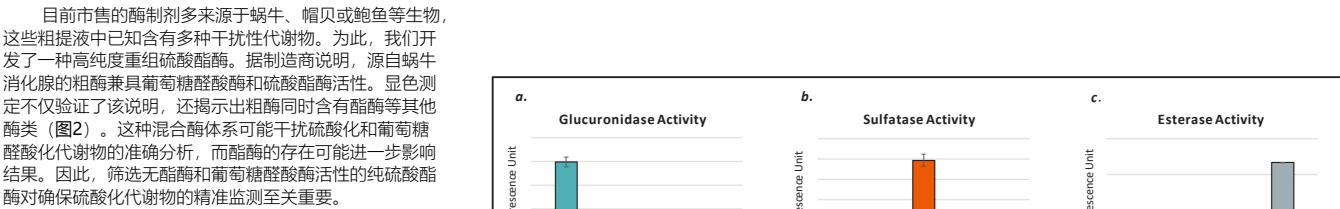


图 2. 用于检测 IMCSzyme、IMCS-PSF 及粗制蜗牛酶相对活性的显色测定。

(a) 使用酚酞葡萄糖苷酸测定葡萄糖醛酸酶活性，反应温度 25°C。
(b) 使用对硝基邻苯二酚硫酸酯测定硫酸酯酶活性，反应温度 37°C。
(c) 使用 Calcein-AM 测定酯酶活性，反应温度 37°C。

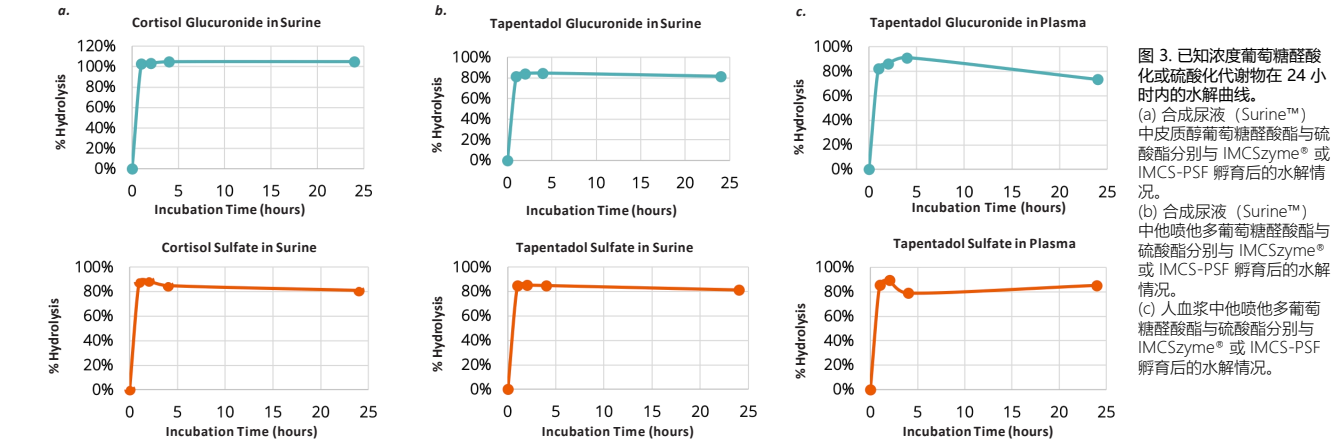


图 3. 已知浓度葡萄糖醛化或硫酸化代谢物在 24 小时内的水解曲线。

(a) 合成尿液（Surine™）中皮质醇葡萄糖醛酸酯与硫酸酯酶分别与 IMCSzyme® 或 IMCS-PSF 孵育后的水解情况。
(b) 合成尿液（Surine™）中他喷他多葡萄糖醛酸酯与硫酸酯酶分别与 IMCSzyme® 或 IMCS-PSF 孵育后的水解情况。
(c) 人血浆中他喷他多葡萄糖醛酸酯与硫酸酯酶分别与 IMCSzyme® 或 IMCS-PSF 孵育后的水解情况。

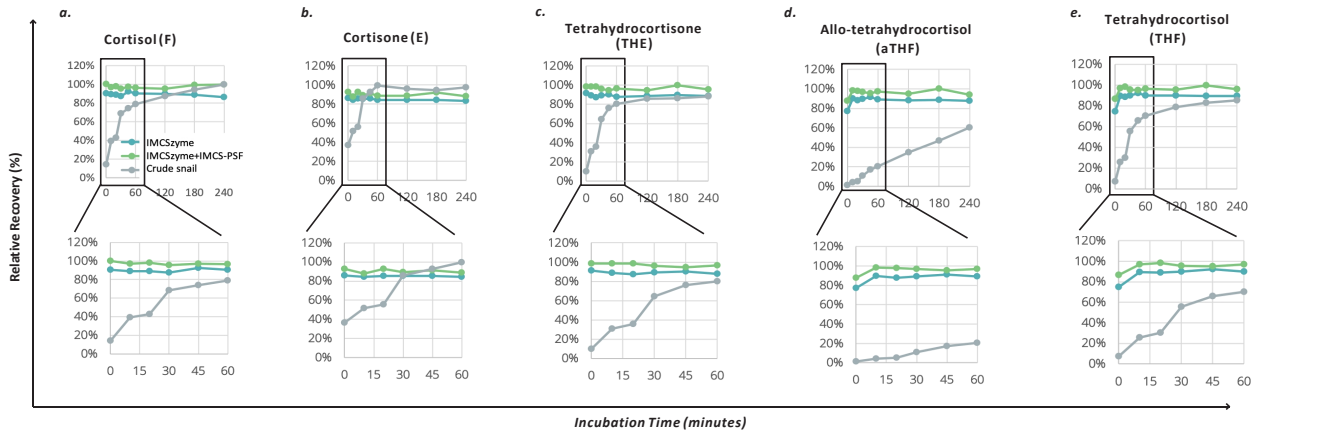


图 5. 对含有最高含量别四氢皮质醇（aTHF）的人尿液样本进行水解，以测定水解效率与孵育时间的关系。

水解百分比以最大水解量为 100% 计算：(a) 皮质醇，(b) 可的松，(c) 四氢可的松，(d) 别四氢皮质醇，(e) 四氢皮质醇。使用 IMCSzyme 与 IMCS-PSF 两种酶孵育 10 分钟后，水解反应达到平台期，表明水解完全。

本研究进一步探索了利用两种纯化酶通过鸟枪法代谢组学分析技术在血浆和尿液中广泛筛查葡萄糖醛化及硫酸化化合物的应用方法。通过对经酶处理与未处理样本的 UPLC-qTOF 质谱数据，我们筛选出因去结合反应导致的化合物浓度升高信号。当使用纯化 β -葡萄糖醛酸酶处理时，质荷比偏移 176.13 对应 O-连接葡萄糖醛酸苷，偏移 139.67 对应 N-连接葡萄糖醛酸苷；而经纯化硫酸酯酶处理后，质荷比偏移 79.89 则与硫酸基团的解离相关。通过 UPLC-qTOF 采集的初步数据经全局代谢组学云图分析（文献5）显示，样本经 IMCSzyme 或 IMCS-PSF 处理后出现多个特征峰变化（图6），表明存在多种代谢物的非结合形态。总体而言，血浆与尿液中的葡萄糖醛酸化及硫酸化模式存在差异。通过鉴定这些葡萄糖醛酸化与硫酸化代谢物，我们计划构建商业化 β -葡萄糖醛酸酶和硫酸酯酶产品对不同代谢物水解效率的特性表征表。

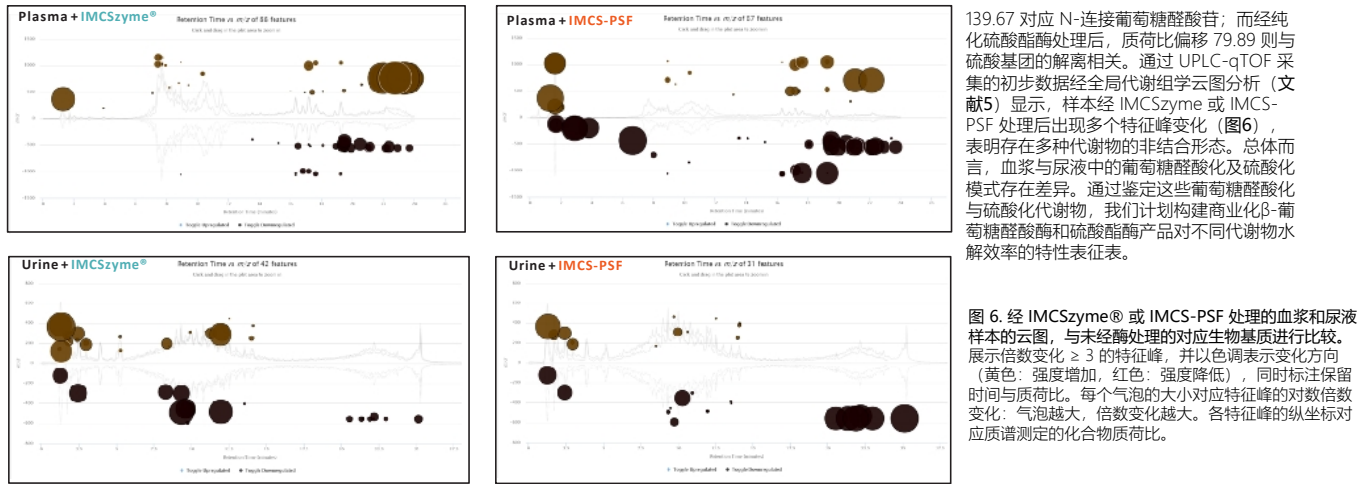


图 6. 经 IMCSzyme® 或 IMCS-PSF 处理的血浆和尿液样本的云图，与未经酶处理的对应生物基质进行比较。展示倍数变化 ≥ 3 的特征峰，并以色调表示变化方向（黄色：强度增加，红色：强度降低），同时标注保留时间与质荷比。每个气泡的大小对应特征峰的对数倍数变化：气泡越大，倍数变化越大。各特征峰的纵坐标对应质谱测定的化合物质荷比。

结论

纯化的 β -葡萄糖醛酸酶与硫酸酯酶可在温和孵育条件下处理生物样本，从而促进结合型代谢物的检测——这类代谢物若保持结合状态将难以通过质谱技术被识别。使用粗酶制剂可能影响检测准确性，因其含有非特异性酯酶活性，在代谢物转化过程中可能引发副反应。采用独立纯化的酶制剂，既能通过质谱技术发现结合型外源性或内源性代谢物，也能实现对其的准确定量分析。

参考文献

- Stevenson BJ, Waller CC, Ma P, Li K, Cawley AT, Ollis DL, and MD McLeod (2015) Pseudomonas aeruginosa arylsulfatase: a purified enzyme for the mild hydrolysis of steroid sulfates. *Drug Test. and Anal.* 7, 903-911.
- Wang FR, Fei J, Yu XL, Zhao XC, Wang Q, and K Metavarayuth (2018) Advancing the analysis of terbutaline in urine samples using novel enzyme hydrolysis. *Bioanalysis*. 10, 1853-1860.
- Tomlinson JW, et al. (2004) 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1: A Tissue-Specific Regulator of Glucocorticoid Response. *Endocrine Reviews*. 25, 831-866.
- Cuzzola A, Mazzini F, and A Petri (2014) A comprehensive study for the validation of a LC-MS/MS method for the determination of free and total forms of urinary cortisol and its metabolites. *J. Pharm Biomed Anal.* 94, 203-209.
- Patti GJ, et al. (2013) A View from Above: Cloud Plots to Visualize Global Metabolomic Data. *Anal Chem.* 85 (2), 798-804.

*Contact: L. Andrew Lee, Ph.D. – lee@imcstips.com

Artwork and layout created by IMCS, Inc.

©2019 IMCS, Inc. All rights reserved. IMCStips is a registered trademark of Integrated Micro-Chromatography Systems, Inc.

Interested in more information about my poster?

Scan the QR code. I will follow up with you by email after the conference.



皮质醇是肾上腺皮质产生的主要糖皮质激素产物，其代谢途径如图4a所示，临床诊断通常基于这些代谢产物的比值。在肾脏和结肠中，11 β -羟基类固醇脱氢酶2型（11 β -HSD2）将皮质醇（F）失活转化为可的松（E），而在肝脏和脂肪组织中，11 β -羟基类固醇脱氢酶1型（11 β -HSD1）可将 E 重新转化为 F（文献3）。此外，A 环还原酶（5 α -和 5 β -还原酶）能将皮质醇和可的松转化为四氢皮质醇，而代谢产物（aTHF、THF、THE）仅存在于尿液中。在假定 IMCS-PSF 能有效水解皮质醇代谢产物的前提下，通过不同酶处理样本的回收率表明，aTHF、THF 和 THE 在尿液中主要以葡萄糖醛化形式分泌（图4b）。

本研究比较了同一位志愿者血浆与尿液中皮质醇代谢物的分布情况。样本分别采用无酶处理、IMCSzyme®处理或 IMCS-PSF 处理。与血浆相比，尿液中的代谢物分布存在显著差异：血浆中 F 水平高于尿液，而尿液中失活型 E 水平则高于血浆（图4b）。酶水解并未显著增加 F 或 E 的水平，表明这两种代谢物在血浆和尿液基质中均未发生葡萄糖醛化或硫酸化修饰。分析物 F 和 E 在尿液和血浆中均能被检测到，而代谢产物（aTHF、THF、THE）仅存在于尿液中。在假定 IMCS-PSF 能有效水解皮质醇代谢产物的前提下，通过不同酶处理样本的回收率表明，aTHF、THF 和 THE 在尿液中主要以葡萄糖醛化形式分泌（图4b）。

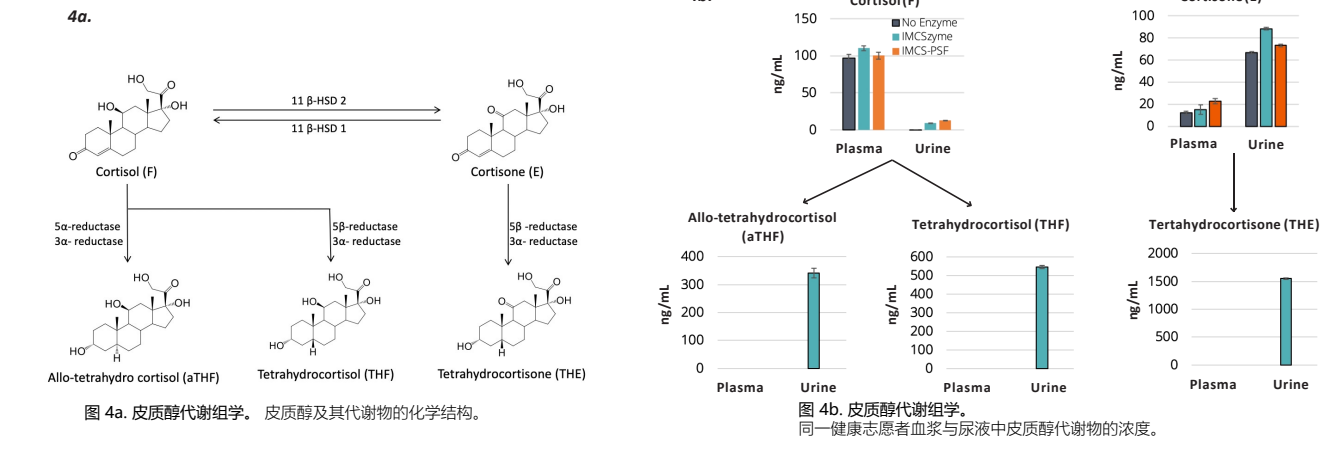


图 4a. 皮质醇代谢组学。皮质醇及其代谢物的化学结构。

图 4b. 皮质醇代谢组学。同一健康志愿者血浆与尿液中皮质醇代谢物的浓度。

在我们 2017 年美国质谱学会会议上发表的先前研究中，主要使用葡萄糖醛酸酶（IMCSzyme®）以及 IMCSzyme® 与 IMCS-PSF 的混合酶对尿液中皮质醇及其代谢物的浓度进行监测。该研究表明，在与蜗牛粗酶孵育时，aTHF 结合物的酶解速率最慢（图5）。IMCSzyme 能在 15 分钟内完全水解 aTHF 葡萄糖醛酸苷，且其回收率显著高于 4 小时蜗牛粗酶孵育的结果（图5d）。Cuzzola 等人此前曾报道 aTHF 葡萄糖醛酸苷的水解速率较慢，但使用新一代 β -葡萄糖醛酸酶可能无需担忧此问题（文献4）。