

液相層析質譜儀於致癌風險評估上之應用

Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Cancer Risk Assessment: Analysis of DNA Adducts

陳皓君

Hauh-Jyun Candy Chen

細胞癌化的第一步為破壞正常的 DNA 而形成「DNA 加成產物」，因此，在生物體中對 DNA 加成產物準確地定量，可用來評估致癌的風險，進而發展預防癌症的策略。在複雜的生物樣品中，要準確地測量這些超微量的 DNA 加成產物，便需要發展高特異性與高靈敏度的分析方法。本文將介紹液相層析串聯質譜儀在分析 DNA 加成產物之應用，主要著重於乙烯基與 8 羥基嘌呤兩類加成產物，且與其他質譜法作比較；並討論這些 DNA 加成產物之生理意義與重要性。

DNA adduct formation is involved in the initiation stage of carcinogenesis. Characterization and accurate quantification of DNA adducts are required for cancer risk assessment and the subsequent cancer prevention strategy. Highly specific and sensitive analytical methodologies are imperative for measurement of the ultratrace amounts of DNA adducts in the complex mixture of biological samples. This article reviews application of DNA adducts, especially etheno adducts and 8-oxo-purine adducts, by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry and compared with other mass spectrometric assays. The physiological significance and implications of these DNA adducts are discussed.

一、前言

各種外來的環境污染物或內生的化學物質會破壞蛋白質與去氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA) 等重要的生化分子，正常的 DNA 被破壞後

若未修復會導致基因突變，而最終形成腫瘤 (圖 1)。除了少數先天性的因素之外，大部份的癌症都是可以預防的，可從減少致癌物的暴露劑量與增加體內之修復機制著手。例如從飲食中可攝取得某些成分，可直接與致癌物反應而去毒化或是促進去毒

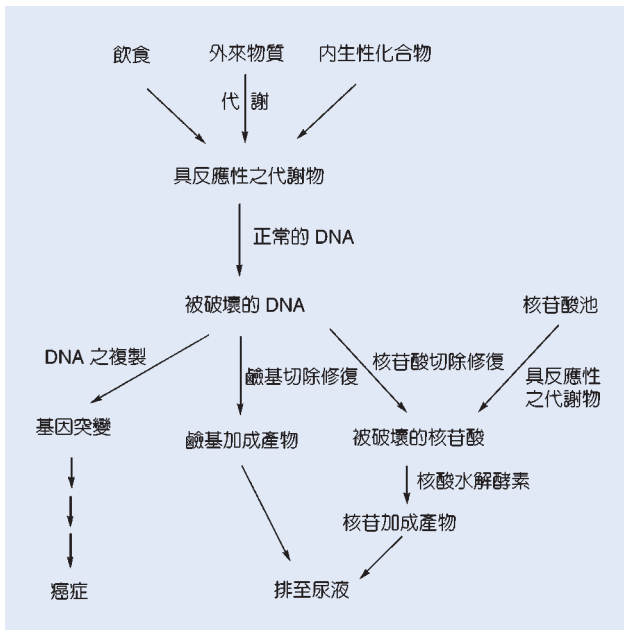


圖 1. DNA 加成產物之形成與修復和癌症的關係。

化酵素的作用，降低 DNA 的破壞，進而預防癌症的形成，此課題在癌症的研究上是個很重要的領域。

以 DNA 加成產物作為人的致癌風險之生化指標是有動物實驗當依據的⁽¹⁾，這也是分子流行病學 (molecular epidemiology) 的一個重要根據⁽²⁾。例如細胞色素 P450 (cytochrome P450) 之突變為基因的多形性 (genetic polymorphisms)，與去毒化酵素 GSTM1 (glutathione S-transferase M1) 之殘缺可代表一個人代謝致癌物的強弱，而後者與膀胱癌及肺癌之致癌率增加有關^(3,4)。致癌物的代謝、被破壞 DNA 的修復及細胞循環的控制均決定 DNA 最終被破壞的程度。

體內蛋白質加成產物 (addition product, 即 adduct) 與 DNA 加成產物之形成均可作為其所曝露之化學物質劑量 (dosimetry) 的指標，但因 DNA 加成產物與癌細胞形成有直接的關連，較適合做為致癌風險的評估及防癌物質效率評估之生化指標⁽¹⁾。因為破壞正常的 DNA 而形成 DNA 加成產物為細胞癌化的第一步，若要瞭解 DNA 的破壞在基因突變與癌症形成所扮演的角色，就需要在細胞中鑑定此種型式之 DNA 的傷害，並將之準確地定量。然而大量的生物體組織 (尤其是活體之組織) 通常不

容易獲得，而 DNA 中加成產物屬微量，通常在 10^6 至 10^8 甚至 10^9 個正常 DNA 鹼基中才有數個；因此，在分析前將加成產物與 DNA 水解液 (hydrolysate) 中大量的正常 DNA 鹼基分離，並達到濃縮 (enrich) 的效果則相當重要。

在生物體組織中的 DNA 加成產物含量，代表取樣時此生物體 DNA 被破壞與修復後達到平衡的一個穩定量 (steady-state level)。體內受損之 DNA 有特定的酵素負責修復，而被修復之 DNA 加成產物通常不再代謝，便直接流入體液 (例如血漿、尿液) (圖 1)。尿液中之 DNA 加成產物含量代表被修復後從 DNA 上掉下來的量，因為個人修復機制的強弱差異不會太大，但個人所承受的 DNA 被破壞的程度差異可以很大，因此尿液中之 DNA 加成產物含量可用來評估組織 DNA 被破壞的程度。體液的取得屬於非侵入性 (noninvasive)，較從生物體組織中分離出少量的 DNA 要容易，但體液 (尤其是尿液) 中基質複雜，欲測量其中之 DNA 加成產物的含量，也必須經過恰當的前處理步驟，才能避免分析時的干擾。

二、分析方法

1. 同位素稀釋質譜法

在複雜的生物樣品中，要準確地測量這些超微量的 DNA 加成產物，需要發展高特異性與高靈敏度的分析方法。DNA 加成產物之分析方法包括質譜法、電化學檢測法、雷射誘導螢光、螢光與磷光光譜法、免疫分析法及 ^{32}P -後標籤法等。這些方法不止要包含適當的前處理步驟，也需要使用高特異性與高靈敏度的分析方式；其中只有質譜法可以提供分析物化學結構上的資訊，雖然其靈敏度不及 ^{32}P -後標籤法，卻是具有高特異性的分析方法。氣相層析質譜儀是靈敏度相當好的儀器，尤其是將不具揮發性的分析物以親電物衍生 (electrophore labeling) 後，以解析度高的毛細管氣相層析搭配電子捕捉負離子化學游離質譜儀 (electron capture negative ion chemical ionization/mass spectrometry, GC/ECNICI/MS) 可以使偵測極限輕易地達到 femto (10^{-15}) 甚至 atto (10^{-18}) 莫耳的數量級，並已成功地

用在許多的相關研究中⁽⁵⁾。將質譜法應用於超微量分析的一個優點是，可以採用同位素當標準品在不同的荷質比 (m/z) 頻道測量，稱為同位素稀釋質譜法 (isotope dilution mass spectrometry, IDMS)。用同位素稀釋質譜法做定量分析的先決條件是要具備與分析物相同的同位素，除了一些常用藥品的同位素已商品化之外，通常這些同位素必須來自於全合成或是半合成，而合成同位素需要一些技巧；換言之，沒有同位素當標準品就無法準確地定量分析物。

2. 液相層析質譜法

DNA 之鹼基 (base) 或去氧核糖核苷 (deoxyribonucleosides) 或核苷酸 (deoxyribonucleotides) 之加成產物為極性分子，以近年來迅速發展的液相層析質譜儀 (liquid chromatography/mass spectrometry, LC/MS) 來分析極性分子的含量則可以省略衍生化的步驟，若配合串聯質譜 (tandem mass, 即 mass/mass) 則特异性更高。雖然它的靈敏度較氣相層析質譜儀差些，大約為氣相層析質譜儀的十分之一至百分之一，但若配合適當的前處理，是相當有用的分析方法。

對於如 DNA 加成產物這類不具揮發性之高極性生化分子，基質輔助雷射脫附游離 (matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI) 與電噴灑游離 (electrospray ionization, ESI) 質譜法之軟性游離方式適合直接分析極性分子^(6,7)。一般而言，基質輔助雷射脫附游離法不易直接與分離技術連接使用；而在大分子的定性分析上，將 MALDI 與飛行時間 (time-of-flight, TOF) 質譜儀配合使用，在蛋白質體學發展上貢獻匪淺，但此法不在本文之敘述範圍內。電噴灑游離質譜法可與液相層析或電泳等分離技術連接，以分析含複雜基質的樣品。與液相層析分離法比較，毛細管電泳能夠承載樣品的量比液相層析管柱小多了 (通常在奈升 nL 的數量級)，因此限制了它的濃度偵測極限 (concentration detection limit)，進而限制了它的實用性；所以毛細管電泳分析需要配合適當的樣品前處理或是線上濃縮之步驟。但是，如果分析等量的同一樣品，毛細管電泳所出現之波峰較尖銳，也使得它的靈敏度較高。液

相層析儀操作容易，應用很廣泛普遍，本文著重於以液相層析質譜儀為工具定量分析去氧核糖核酸加成產物做為致癌風險評估上之生化指標。

質譜檢測器一般使用離子阱 (ion trap) 或是三段四極柱 (triple quadrupole) 可有串聯質譜的功能。也有採用快速原子衝撞 (fast atom bombardment, FAB) 質譜儀以及具高解析度之傅立葉轉換離子同步共振 (Fourier transform ion cyclotron resonance, FT-ICR) 質譜儀與加速 (accelerator) 質譜儀；而後者之靈敏度已超過 ³²P-後標籤法，可在 10¹² 個正常鹼基中偵測到一個 DNA 加成產物，但因價格昂貴較不被普遍使用。質譜儀方面本期刊最近已有數篇精湛的報導⁽⁸⁻¹¹⁾，本文著重於在分析 DNA 加成產物上之應用，限於篇幅只提及已被探討較多的乙炔基加成產物與 8-羥基鳥糞嘌呤兩類加成產物。或許是限於同位素標準品之取得不易，質譜儀在分析體內之其他加成產物上大多屬於結構鑑定。若讀者對其他加成產物有興趣，可參考其他文章⁽¹²⁾ 中所引用的文獻。

三、乙炔基加成產物 (Etheno Adducts)

1. 在 DNA 中之含量分析

塑膠工業所用之氯乙炔單體 (vinyl chloride, VC) 以及發酵產物如麵包與含酒精之飲料所含的胺基碳酸乙酯 (ethyl carbamate, 即 urethane) 皆會與 DNA 作用，而生成乙炔基腺嘌呤 (1, N^6 -ethenoadenine, ϵ Ade)、乙炔基胞嘧啶 (3, N^4 -ethenocytosine, ϵ Cyt) 及乙炔基鳥糞嘌呤 ($N^2,3$ -ethenoguanine, $N^2,3$ - ϵ Gua)，如圖 2 所示。此三種乙炔基加成產物也是可由體內產生的，可能來自細胞之脂質過氧化 (lipid peroxidation) 作用⁽¹³⁾ 或是 DNA 糖骨架之斷裂⁽¹⁴⁾。Svenberg 實驗室於 2001 年用免疫親和管柱配合高解析氣相層析電子捕捉負離子化學游離質譜法同時分析 $N^2,3$ - ϵ Gua 與另一個乙炔基加成產物 1, N^2 - ϵ Gua (圖 2)；他們在暴露於氯乙炔之代謝物 2-氯環氧乙烷 (2-chloroethylene oxide, CEO) 的大老鼠肝臟 DNA 中並未發現 1, N^2 - ϵ Gua，表示它在因為氯乙炔而致癌所扮演的角色上並不重要，但其含量卻因脂質過氧化程度提高而增加；相反地， $N^2,3$ - ϵ Gua 隨

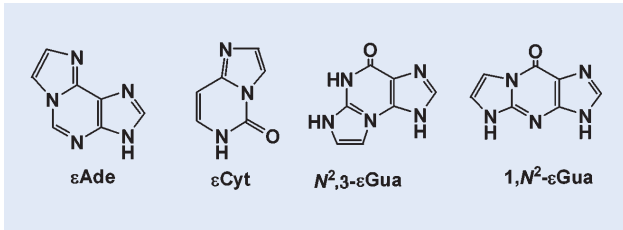


圖 2. 乙烷基加成產物的構造。

脂質過氧化程度提高而增加的程度很有限，卻在氫乙烯之致癌機制上扮演重要的角色⁽¹⁵⁾。1996 年 Swenberg 實驗室發表用同位素稀釋液相層析電噴灑游離質譜法 (LC/ESI/MS) 在選擇離子追蹤 (selected ion monitoring, SIM) 模式下，分析在人的肝臟注入 CEO 後所產生 $N^2,3$ - ϵ Gua 的量，發現其含量與注入 CEO 的量成正比，而且隨著注入後的時間而下降，表示 $N^2,3$ - ϵ Gua 可迅速地被修復；此分析法之偵測極限為 5 fmol，而其定量極限為 50 fmol⁽¹⁶⁾；此法無串聯質譜的功能，特異性較差。

之前分析 DNA 中 ϵ Ade 與 ϵ Cyt 乙烷基加成產物均採用特異性低但靈敏度高的 32 P-後標籤法，直至筆者於 1998 年發展出穩定同位素稀釋氣相層析負離子化學游離質譜法 (GC/NICI/MS) 偵測 DNA 中之 ϵ Ade⁽¹⁷⁾。目前文獻中報導老鼠或人體內 DNA 加成產物之含量出現很大的差距，很難判斷此差距是因為老鼠或人的狀況不同 (飲食或年齡均有影響)，或是因分析方法不同所致。要確定測得準確應該用不同的分析方法對同一 DNA 樣品進行偵測，若得到相同的數量，則表示分析正確。筆者於 1999 年首次報導，用三種不同的分析方法對一人體胎盤 DNA 樣品進行偵測而得到很相似的 ϵ Ade 含量⁽¹⁸⁾。此三種不同的方法為 (1) 同位素稀釋 GC/NICI/MS、(2) 同位素稀釋液相層析電噴灑游離串聯質譜法 (LC/ESI/MS/MS)，以及 (3) 高效能液相層析螢光檢測法 (HPLC/fluorescence)。

此三種方法中以 GC/NICI/MS 法最靈敏，但其流程中須用到酸水解與衍生化。同位素稀釋 LC/ESI/MS/MS 法之靈敏度雖不及 GC/NICI/MS 法，但它不需將高極性的分析物衍生化，且可根據分析物離子之裂解追蹤而具高特異性；將 DNA 用酵素水解成核苷後不必經過衍生化，直接用離子

阱串聯質譜儀在正離子模式下，追蹤其去氧核糖核苷 ϵ dAdo 之 $[M + H]^+$ 掉了核糖而得到鹼基 ϵ Ade 之 $[BH_2]^+$ 之多重反應追蹤 (multiple reaction monitoring, MRM) 或稱選擇反應追蹤 (selected reaction monitoring, SRM) (圖 3)。而 HPLC/fluorescence 用了酸水解，但不經衍生化，直接偵測。上述三種方法均測得在人體胎盤 DNA 中每 10^6 個正常腺嘌呤含 2.3–2.8 個 ϵ Ade⁽¹⁸⁾。

2000 年 Doerge 等人發展了以線上樣品處理 (on-line sample processing) 配合穩定同位素稀釋液相層析電噴灑游離三段四極柱串聯質譜法以相同的多重反應追蹤模式偵測 DNA 樣品中 ϵ dAdo 與 ϵ dCyd (圖 3)。其線上樣品處理系統包含兩支逆相液相層析管柱以開關閥 (switch valve) 串聯在一起，第一支層析管柱為捕捉 (trap) 管柱，將正常的去氧核糖核苷捕捉；第二支層析管柱為分析管柱，當它分析加成產物時，可清洗捕捉管柱，使廢液不會流入分析管柱。正常的腺嘌呤去氧核糖核苷不只分子量與 ϵ dCyd 相同，其 MRM 的模式也相同 (均為失去一個去氧核糖)，雖然可以層析分離，但

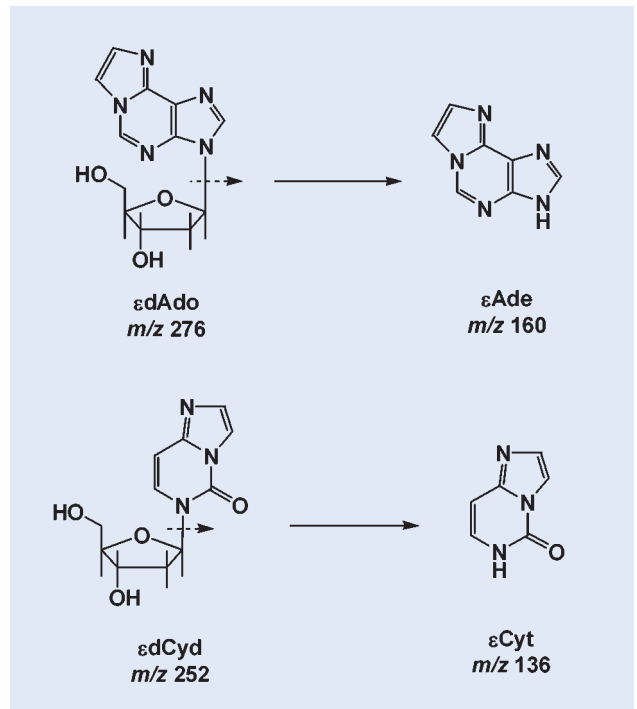


圖 3. 乙烷基腺嘌呤去氧核糖核苷與乙烷基胞嘧啶去氧核糖核苷在質譜上之多重反應追蹤模式。

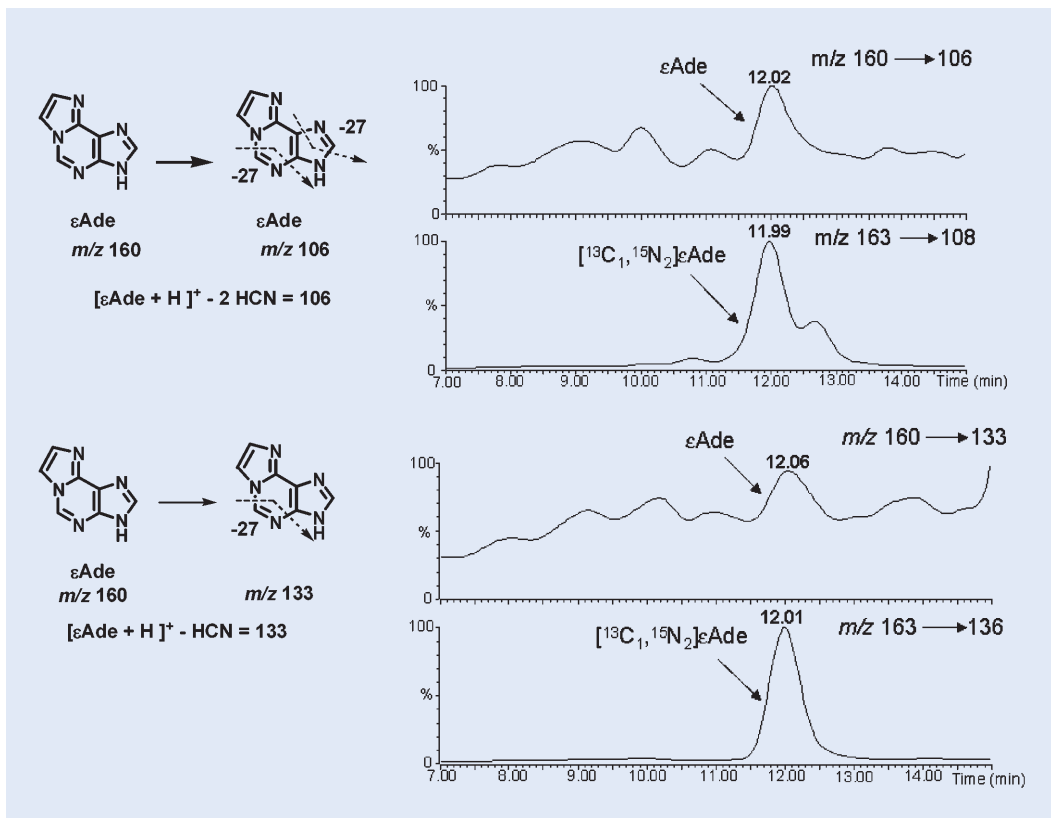


圖 4. 乙烯基腺嘌呤的兩種多重反應追蹤模式及尿液分析之層析圖。

大量的腺嘌呤去氧核糖核苷會使分析的背景雜訊升高，而壓抑了分析物 ϵ dCyd 的訊號。以此法在 MRM 下之偵測極限，經過換算後 ϵ dAdo 為 0.93 fmol，定量極限則為 3.1 fmol；而 ϵ dCyd 之偵測極限為 3.1 fmol，定量極限則為 9.3 fmol⁽¹⁹⁾。一般而言，三段四極柱串聯質譜儀之靈敏度高於以離子阱當質譜偵測器。他們用此法測得之人體胎盤 DNA 中 ϵ dAdo 之含量，經過換算後為每 10^7 個正常腺嘌呤含 1.1 個 ϵ Ade，而 ϵ dCyd 則低於其定量極限； ϵ dAdo 之含量較筆者測得之數值為低，可能與 ϵ dAdo 沒有被酵素完全水解有關。2001 年同實驗室之 Roberts 等人用線上免疫親和層析管柱來純化樣品，並用兩支串聯的石墨碳之層析管柱取代一般的逆相矽膠管柱分析 ϵ dCyd，但還是無法完全去除腺嘌呤去氧核糖核苷，靈敏度也沒有改善⁽²⁰⁾。

I. A. Blair 實驗室於 2000 年使用液相層析搭配大氣壓化學游離 (APCI)，配合三段四極柱質譜儀分析 heptanone 1, N^2 - ϵ dGuo，此加成產物是從體內脂質過氧化物分解產生的 4-酮 2-壬烯醛 (4-oxo-2-

nonenal) 與 dGuo 反應所產生的。他們將此核苷加成產物以五氟苯甲基在鳥糞嘌呤之 O6 衍生後，用大氣壓負離子化學游離串聯質譜法分析，此分析法對此加成產物之偵測極限為 710 amol，比傳統的正離子大氣壓化學游離法靈敏了一百倍，但還是不及 GC/NICI/MS 法靈敏。為了增加靈敏度，他們也在液相層析管柱之後補充有機溶劑 (甲醇) 之流量 (make-up flow)，以總共每分鐘一毫升的流速進入質譜儀。此分析法的好處是它可接受每分鐘一毫升的流速，而且在衍生化之前不需去除核糖，也因此可以分辨尿液中的 DNA 加成產物與 RNA 加成產物；另一個特點是液相層析儀之注射器比氣相層析儀更能容忍過量的衍生化試劑⁽²¹⁾。

2. 在尿液中之含量分析

乙烯基加成產物可被醣解酵素修復，而排流至尿液中。文獻中有用液相層析電噴灑游離質譜法偵測未處理過的大老鼠尿液，在選擇離子追蹤模式下之偵測極限為 270 fmol⁽²²⁾。人體內乙烯基加成產物

有不只一種醣解酵素可修復 ϵ Ade、 ϵ Cyt 與 $N^2,3$ - ϵ Gua，因此這些加成產物很可能存在於人體尿液中。2001 年筆者發展了同位素稀釋 GC/NICI/MS 法來分析 DNA 與尿液中 ϵ Cyt 的含量，並首次在人體尿液中偵測到 ϵ Cyt⁽²³⁾。最近我們亦發展在尿液中偵測 ϵ Ade 之同位素稀釋 GC/NICI/MS 法⁽²⁴⁾。抽煙 (cigarette smoking) 會導致體內氧化壓力升高⁽²⁵⁾，並與肺癌之發生有直接的關係⁽²⁶⁾。我們以此二方法分別探討抽煙與人體尿液中 ϵ Ade 與 ϵ Cyt 之含量，發現抽煙者尿液中 ϵ Ade 與 ϵ Cyt 之含量高於非抽煙者，而此項發現是具有統計學上之意義的^(24,27)。

為了避開衍生化與其後之純化步驟，並且提高分析方法之特異性，我們最近亦發展了同位素稀釋液相層析電噴灑游離配合三段四極柱串聯質譜法，來定量人體尿液中之 ϵ Ade 與 ϵ Cyt。在電噴灑游離串聯質譜法中，通常以脫去核苷上之核糖的 MRM 方式來分析核苷加成產物，此種形式的分析法因為核糖易於碰撞時解離，而有不錯的靈敏度。但在鹼基加成產物的分析上較少使用，因為欲將鹼基碰撞而解離成碎片離子所需之碰撞能量較高，加上可能會有不只一個碎片離子而導致靈敏度降低。追求高特異性便須付出降低靈敏度的代價。我們使用從同一母離子經碰撞而解離之兩個碎片離子，來定量人的尿液中之鹼基加成產物 ϵ Ade 及 ϵ Cyt，用兩個 MRM 模式來定量同一分析物的好處是可以避免干擾。例如，以 m/z 163 \rightarrow m/z 108 之 MRM 分析尿液中之 ϵ Ade 時，在某些樣品中同位素之層析圖上發現干擾 (圖 5(a))；當改用 m/z 163 \rightarrow m/z 136 則可準確定量，雖然後者之靈敏度比前者差些⁽²⁸⁾ (圖 5(b))。

3. 與癌症之關係

當人們攝取大量的 ω -6 不飽和脂肪酸時，增加了罹患乳癌與直腸癌的機率，白血球 DNA 中 ϵ Ade 與 ϵ Cyt 的含量也會增多；相反地，深海魚油中含量很多之 ω -3 不飽和脂肪酸與橄欖油中之 ω -9 單一不飽和脂肪酸對乳癌與直腸癌有防護的效果⁽²⁹⁾。乙烯基加成產物也與慢性發炎及感染有關，在此種情況之下會有過多的一氧化氮 (NO) 產生，而 NO 會誘導脂質之過氧化，使 ϵ Ade 與 ϵ Cyt 在小老鼠脾臟之 DNA 的含量增加了大約 6 倍，而 8-oxo-dGuo 含量並無明顯的上升⁽³⁰⁾。

ϵ Ade 與 ϵ Cyt 的含量在色素性肝硬變 (hemochromatosis) 與 Wilson 症的病人之肝臟組織中偏高，此疾病是因為金屬 (如鐵與銅離子) 無法排除而累積過多所引發的。這些病人之肝臟發炎，其脂質過氧化程度也偏高，也是肝癌之高危險群⁽³¹⁾。這些病人的肝臟中，p53 腫瘤抑制基因 (tumor suppressor gene) 之突變熱點 (mutational hot spot) codon 249 與 codon 250 的突變頻率較正常人高⁽³²⁾。p53 腫瘤抑制基因會因單一鹼基發生錯誤而活化成為原致癌基因 (proto-oncogene)，反而促進腫瘤的形成。在一半以上之癌症病人身上均發現突變之 p53 基因，由此可知此基因與致癌的關係。雖然肺癌患者 (尤其是腺瘤) 之肺臟組織 DNA 中 ϵ Ade 與 ϵ Cyt 的含量與正常人差不多，但是他們白血球 DNA 中 ϵ Ade 與 ϵ Cyt 的含量卻比正常人高，而且他們修復 ϵ Ade 與 ϵ Cyt 的能力明顯地比正常人低多了⁽³³⁾。如果這些研究也能同時偵測尿液中 ϵ Ade 與 ϵ Cyt 之含量，將有助於進一步闡釋 ϵ Ade 與 ϵ Cyt 之缺乏修復在癌症發展上的重要性。尿液分析不具

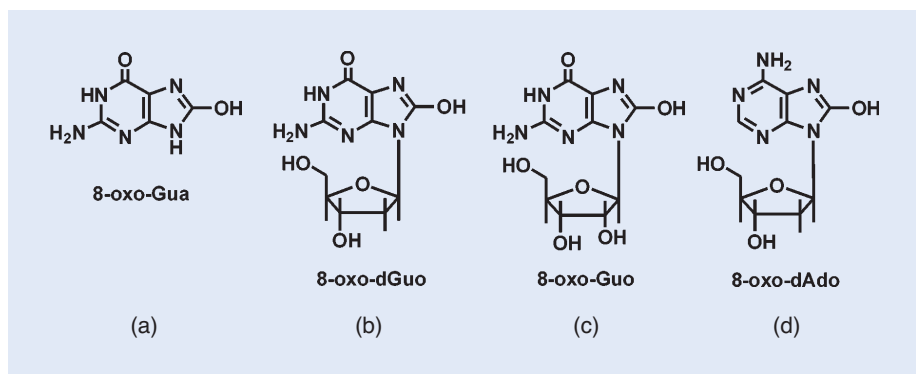


圖 5.
8 羥基嘌呤及其核苷的構造。

侵入性 (noninvasive)，可與人體組織中之 DNA 加成產物含量一起用來評估體內 DNA 受到破壞的程度與速度。

四、8 羥基嘌呤 (8-Oxo-Purines)

氧化物與輻射線破壞 DNA 最容易在鳥糞嘌呤鹼基之 8 號碳上接上一個羥基，形成 8 羥基鳥糞嘌呤 (8-oxo-7,8-dihydroguanine, 8-oxo-Gua)，它是 DNA 氧化加成產物中存在量最高的，最常用來分析它的方法除了液相層析配合電化學檢測法之外，就是 GC/MS 法。直到 1998 年 J. Cadet 之實驗室首先報導以穩定同位素稀釋 LC/ESI/MS/MS 偵測豬肝、小牛胸腺 DNA 與尿液樣品中 8 羥基鳥糞嘌呤去氧核糖核苷 (8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine, 8-oxo-dGuo) 之含量。若選擇追蹤單一離子，其偵測極限為 5 pmol；而用三段四極柱串聯質譜法之 MRM 分析，偵測極限則降為 20 fmol⁽³⁴⁾，可見串聯質譜法之威力。2000 年 Renner 等人將此方法之前處理步驟改進，降低偵測極限至 7 fmol，並可應用於快速分析人的尿液樣品，一天可分析 50 個人的尿液樣品⁽³⁵⁾。

尿液中加成產物之分析，被研究最多的就屬 8-oxo-dGuo 了。尿液中的 8-oxo-dGuo 去氧核糖核苷一直被用來估計體內 DNA 氧化破壞的程度，而非 8-oxo-Gua 鹼基；其原因是 B. Ames 之實驗室於 1992 年發現大老鼠尿液中 8-oxo-Gua 鹼基含量與它們所吃的食物有關，而 8-oxo-dGuo 核苷才與氧化壓力有關⁽³⁶⁾。當時他們所採用的方法為先用單株抗體純化，再以液相層析配合電化學檢測法分析；或許是因為 B. Ames 為美國國家科學院院士，所以大家深信不疑。直到 2001 年波蘭的 R. Olinski 實驗室將尿液經 HPLC 純化後，以穩定同位素稀釋氣相層析電子碰撞游離質譜法 (GC/EI/MS) 同時偵測人的尿液樣品中 8-oxo-Gua 鹼基與 8-oxo-dGuo 去氧核糖核苷才證實人尿液樣品中此二者之含量均與飲食無關，此二者含量之總和可反映出人體細胞中內 DNA 中 8 羥基鳥糞嘌呤的含量⁽³⁷⁾。8-oxo-Gua 鹼基可能來自於鹼基切除修復 (base excision repair, BER)，而 8-oxo-dGuo 去氧核糖核苷則來自於核苷

酸切除修復 (nucleotide excision repair, NER) 酵素作用後排至尿液，因此，此二物種可分別代表此二種修復機制作用的結果⁽³⁸⁾ (圖 1)。

2002 年 A. Weimann 等人以穩定同位素稀釋液相層析電噴灑游離三段四極柱串聯質譜法 (LC/ESI/MS/MS) 同時偵測三種形式的鳥糞嘌呤、8-oxo-Gua 與其核糖核苷 (8-oxo-7,8-dihydroguanosine, 8-oxo-Guo) 以及其去氧核糖核苷 8-oxo-dGuo (圖 5)，這是第一個以 MRM 分析鹼基加成產物的例子⁽³⁹⁾。8-oxo-Gua 之偵測極限為 50 fmol，較其核糖 8-oxo-Guo 與 8-oxo-dGuo 之 12.5 fmol 的偵測極限高了 4 倍。此研究的目的是在於比較此加成產物三種形式的含量，他們發現 8-oxo-Gua 占了在 8 號碳上氧化之全部鳥糞嘌呤的 64%，8-oxo-Guo 占了 23%，而 8-oxo-dGuo 只占了 13%；其中被人體內酵素修復後之鹼基 8-oxo-Gua 可能來自 DNA 與 RNA 之氧化破壞，而 8-oxo-Guo 與 8-oxo-dGuo 則分別來自 RNA 與 DNA 之氧化破壞⁽³⁹⁾，但也不能排除來自核苷酸池 (nucleotide pool) 的可能性⁽³⁸⁾ (圖 1)。然而，將 8-oxo-Guo 自 RNA 上切除的酵素目前尚屬未知。

2001 年 M. Dizdaroglu 之實驗室使用穩定同位素稀釋液相層析大氣壓游離電噴灑游離質譜法，來偵測 8 羥基腺嘌呤去氧核糖核苷 (8-oxo-dAdo) (圖 5)，用選擇離子追蹤之偵測極限為 10 fmol；若用串聯質譜法採多重反應追蹤之偵測極限為 7.5 fmol。用此方法分析暴露於離子輻射下之 DNA 經酵素水解液後 8-OH-dAdo 之含量，與 DNA 經酸水解後用同位素稀釋氣相層析質譜法所得之量一致，但後者之靈敏度 (2.0 fmol) 還是較前者高些⁽⁴⁰⁾。2001 年 A. Weimann 等人以穩定同位素稀釋 LC/ESI/MS/MS 同時偵測人的尿液中 8-oxo-dAdo 與 8-oxo-dGuo，發現 8-OH-dAdo 在人體尿液中之含量比 8-oxo-dGuo 少許多，顯示後者之生理意義或許不大⁽⁴¹⁾。

五、結論

欲闡釋特定原因或致癌物導致人類某種癌症，需要臨床醫師、流行病學者與分析化學家充分合

作，準確地在人體內之組織或體液中定量所產生的 DNA 加成產物。DNA 加成產物之存在量不但可做為評估致癌風險之生化指標，也可用來評估食物成分或抗氧化之維生素預防癌症的效果。此一領域還有很多尚待探討之處，等待我們去發掘。而高特異性與高靈敏度的液相層析質譜法在分析體內超微量之 DNA 加成產物占著舉足輕重的地位，也有待分析化學家不斷地改良，增強其特異性、解析能力與靈敏度。

參考文獻

1. K. Hemminki, *Carcinogenesis*, **14**, 2007 (1993).
2. B. Singer and J. M. Essigmann, *Carcinogenesis*, **12**, 949 (1991).
3. J. M. Essigmann and M. L. Wood, *Toxicol. Lett.*, **67**, 29 (1993).
4. A. P. Grollman, *In Mutations and the Environment*, pp 61-70, New York: Wiley-Liss (1990).
5. R. W. Giese, *Chem. Res. Toxicol.*, **10**, 255 (1997).
6. K. C. Smith, *Mutat. Res.*, **277**, 139 (1992).
7. W. Xiao and L. Samson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 2117 (1993).
8. 白珮瑾, 何國榮, 科儀新知, **25** (1), 7 (2003).
9. 賴建成, 蔡輔仁, 科儀新知, **25** (1), 18 (2003).
10. 簡督憲, 科儀新知, **25** (1), 33 (2003).
11. 田育彰, 洪千雯, 廖寶琦, 科儀新知, **25** (1), 42 (2003).
12. 陳皓君, 化學, **60** (3), 319 (2002).
13. F.-L. Chung, H.-J. C. Chen, and R. G. Nath, *Carcinogenesis*, **17**, 2105 (1996).
14. W. R. Jones and P. C. Dedon, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 9231 (1999).
15. E. J. Morinello, A. J. Ham, A. Ranasinghe, R. Sangaiah, and J. A. Swenberg, *Chem. Res. Toxicol.*, **14**, 327 (2001).
16. T.-Y. Yen, N. I. Christova-Gueorguieva, N. Scheller, S. Holt, J. A. Swenberg, and M. J. Charles, *J. Mass Spectrom.*, **31**, 1271 (1996).
17. H.-J. C. Chen, L. Zhang, J. Cox, J. A. Cunningham, and F.-L. Chung, *Chem. Res. Toxicol.*, **11**, 1474 (1998).
18. H.-J. C. Chen, L.-C. Chiang, M.-C. Tseng, L.-L. Zhang, J. Ni, and F.-L. Chung, *Chem. Res. Toxicol.*, **12**, 1119 (1999).
19. D. R. Doerge, M. I. Churchwell, J.-L. Fang, and F. A. Beland, *Chem. Res. Toxicol.*, **13**, 1259 (2000).
20. D. W. Roberts, M. I. Churchwell, F. A. Beland, J. L. Fang, and D. R. Doerge, *Anal. Chem.*, **73**, 303 (2001).
21. G. Singh, A. Gutierrez, K. Xu, and I. A. Blair, *Anal. Chem.*, **72**, 3007 (2000).
22. T.-Y. Yen, S. Holt, R. Sangaiah, A. Gold, and J. A. Swenberg, *Chem. Res. Toxicol.*, **11**, 810 (1998).
23. H.-J. C. Chen, T.-C. Lin, C.-L. Hong, and L.-C. Chiang, *Chem. Res. Toxicol.*, **14**, 1612 (2001).
24. H.-J. C. Chen and W.-L. Chiu, *Chem. Res. Toxicol.*, **16**, 1099 (2003).
25. D. Hoffmann and E. L. Wynder, *IARC Sc. Publ.*, **74**, 145 (1986).
26. E. L. Wynder and D. Hoffmann, *Cancer Res.*, **54**, 5284 (1994).
27. H.-J. C. Chen, C.-L. Hong, C.-F. Wu, and W.-L. Chiu, *Toxicol. Sci.*, **76**, in press (2003).
28. H.-J. C. Chen and C.-M. Chang, manuscript submitted.
29. H. Bartsch, J. Nair, and R. W. Owen, *Carcinogenesis*, **20**, 2209 (1999).
30. J. Nair, A. Gal, S. Tamir, S. R. Tannenbaum, G. N. Wogan, and H. Bartsch, *Carcinogenesis*, **19**, 2081 (1998).
31. J. Nair, P. L. Carmichael, R. C. Fernando, D. H. Phillips, A. J. Strain, and H. Bartsch, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prevent.*, **7**, 435 (1998).
32. S. P. Hussain, K. Raja, P. A. Amstad, M. Sawyer, L. J. Trudel, G. N. Wogan, L. J. Hofseth, P. G. Shields, T. R. Billiar, C. Trautwein, T. Hohler, P. R. Galle, D. H. Phillips, R. Markin, A. J. Marrogi, and C. C. Harris, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 12770 (2000).
33. E. Speina, M. Zielinska, A. Barbin, D. Gackowski, J. Kowalewski, M. A. Graziewicz, J. A. Siedlecki, R. Olinski, and B. Tudek, *Cancer Res.*, **63**, 4351 (2003).
34. J.-L. Ravanat, B. Duret, A. Guiller, T. Douki, and J. J. Cadet, *Chromatogr. B*, **715**, 349 (1998).
35. T. Renner, T. Fechner, and G. Scherer, *J. Chromatogr. B*, **738**, 311 (2000).
36. E. M. Park, M. K. Shigenaga, P. Degan, T. S. Korn, J. W. Kitzler, C. M. Wehr, P. Kolachana, and B. N. Ames, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **89**, 3375 (1992).
37. D. Gackowski, R. Rozalski, K. Roszkowski, A. Jawien, M. Foksinski, and R. Olinski, *Free Radical Res.*, **35**, 825 (2001).
38. J. Lunec, K. A. Holloway, M. S. Cooke, S. Faux, H. R. Griffiths, and M. D. Evans, *Free Radic. Biol. Med.*, **33**, 875 (2002).
39. A. Weimann, D. Belling, and H. E. Poulsen, *Nucl. Acids Res.*, **30**, 7e (2002).
40. P. Jaruga, H. Rodriguez, and M. Dizdaroglu, *Free Radic. Biol. Med.*, **31**, 336 (2001).
41. A. Weimann, D. Belling, and H. E. Poulsen, *Free Radic. Biol. Med.*, **30**, 757 (2000).

· 陳皓君女士為美國紐約州立大學石溪分校有機化學博士，現任國立中正大學化學暨生物化學研究所副教授。

· Hauh-Jyun Candy Chen received her Ph.D. in organic chemistry from the State University of New York at Stony Brook. She is currently an associate professor in the Department of Chemistry and Biochemistry at National Chung Cheng University.