

以質譜法分析被修飾的 DNA 與蛋白質作為疾病的生化指標之研究

Analysis of Modified DNA and Proteins by Mass Spectrometry as Disease Biomarkers

陳皓君

Hauh-Jyun Candy Chen

去氧核糖核酸 (DNA) 被體內或環境中具反應性物種修飾後會在 DNA 複製時導致基因突變，為細胞癌化的第一步。因此將 DNA 之修飾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。蛋白質因具反應性物種產生的後轉譯修飾，會因改變其結構而導致功能上的改變。本文介紹以各種質譜法分析生物體 (組織與體液) 內超微量之被修飾後的 DNA 與蛋白質作為疾病的生化指標之研究。

Modifications of DNA by endogenous or environmental reactive species could lead to mutation during DNA replication, which is the initiation step of carcinogenesis. Thus, accurate quantification of modified DNA products has been used for cancer risk assessment and for strategies in cancer prevention. Post-translational modifications of proteins by reactive species could cause functional alteration of proteins due to structural change. In this article, analyses of the ultra-trace amounts of the DNA and protein modification products by various mass spectrometric methods are reviewed.

一、前言

體內或環境中之具反應性物種 (reactive species) 會與去氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA) 及蛋白質等生物分子反應，產生構造上的修飾。對 DNA 的修飾若未被體內修復機制所修復，會在 DNA 複製的過程中引起錯誤的鹼基配對，並導致突變與降低染色體的穩定性。DNA 上鹼基的修飾生成 DNA 加成產物 (DNA adducts)，它在多階段性

的致癌過程中扮演一個關鍵性的角色，為導致細胞癌化的起始步驟 (initiation stage)，因此將 DNA 之修飾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。蛋白質的種類遠超過它的基因密碼所能預測的，原因就是在於蛋白質在轉譯合成後的共價修飾。若要研究蛋白質的後轉譯修飾在生理上的意義，首先必須將被修飾的蛋白質以及修飾的種類鑑定出來，再加以定量，而蛋白質的後轉譯修飾程度通常甚低，也是屬於微量分析。

二、DNA 加成產物的質譜分析法

為了準確定量分析物，我們合成出與分析物化學構造相同之穩定同位素作為內標準物。利用此穩定同位素之化學與物理性質相同於分析物，只能以質量不同來區分的特性，可以追蹤分析物在樣品前處理流程的回收率，並將微量的分析物以較大量的穩定同位素帶出，可準確地定量樣品中微量分析物的含量，此為同位素稀釋質譜法之特色。

本實驗室至今已發展出數個同位素稀釋氣相層析負化學游離質譜法 (isotope dilution gas chromatography negative ion chemical ionization mass spectrometry, GC/NICI/MS) 用以分析 DNA 與尿液中 1, N⁶-乙烯基腺嘌呤 (εAde)⁽¹⁻³⁾、3, N⁴-乙烯基胞嘧啶 (εCyt)⁽⁴⁾、3, N⁴-乙烯基胞嘧啶核苷 (εdCyd)⁽⁵⁾、5-氯胞嘧啶 (5Cl-Cyt)⁽⁶⁾ 與 5-羥甲基尿嘧啶 (5HMU)⁽⁷⁾ 等 DNA 加成產物 (圖 1) 的含量。生物體組織 (tissue) 中 DNA 加成產物的含量為受到破壞與修復後達到平衡的穩定量 (steady-state level)，而體液 (biological fluids，例如血漿及尿液) 中 DNA 加成產

物的含量則為被修復後從 DNA 上移除下來的量，後者與個人修復機制的強弱有關。因此應該要同時測量加成產物在 DNA 上的量以及掉下來的量，才能準確地評估個人致癌的風險^(8,9)。

氣相層析負化學游離質譜法之高靈敏度，主要來自於親電性衍生化試劑的使用以及在質譜上以負化學游離的模式來偵測，當然，氣相層析的高解析度也對靈敏度的提昇有貢獻。為了維持分析時的低背景值，我們在樣品前處理流程中用了兩根固相萃取 (solid phase extraction, SPE) 管柱，一為逆相，另一為正相萃取管柱，分別用於衍生化前後濃縮 (enrich) 分析物之用。此法使用在單一四極柱質譜儀之選擇離子追蹤 (selective ion monitoring, SIM) 模式下分析；若使用三級式四極柱串聯質譜儀 (triple quadrupole tandem mass spectrometer, QQQ-MS/MS) 在選擇反應追蹤 (selective reaction monitoring, SRM，或稱 multiple reaction monitoring, MRM) 模式下分析，可增加它的特異性 (specificity) 以及因為降低背景值而提高靈敏度。

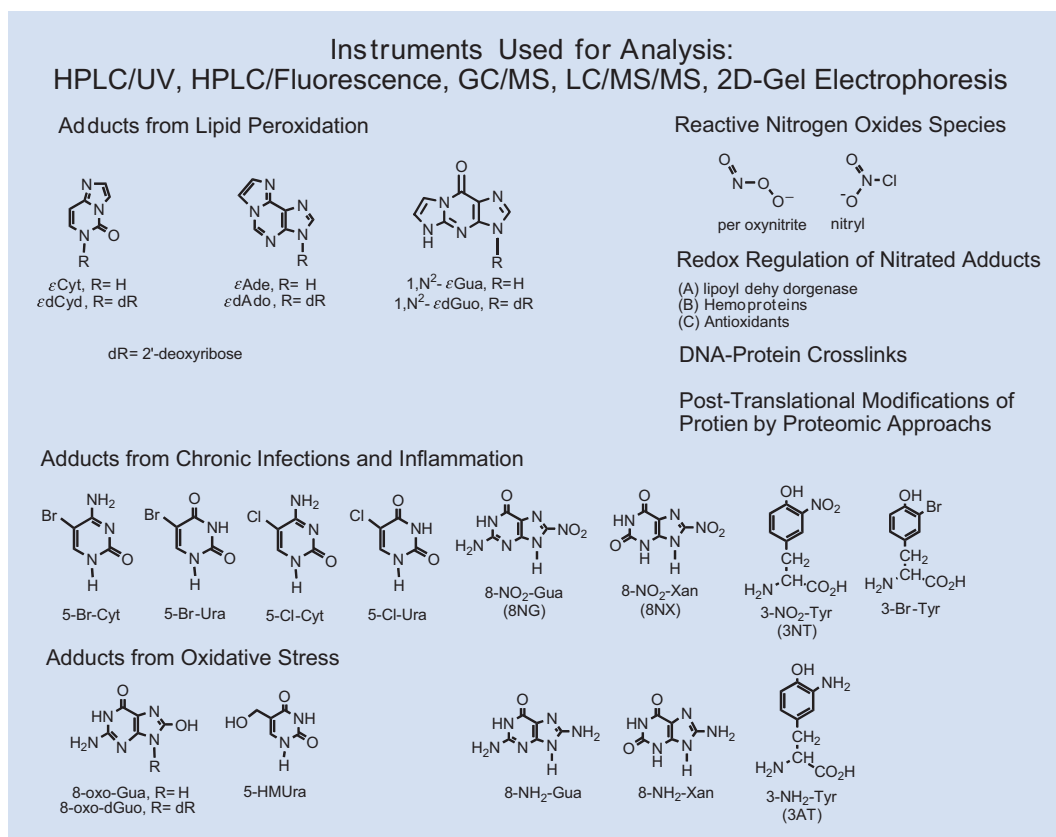


圖 1. 我們有興趣的主題與修飾產物。

為了避免氣相層析儀需要對高極性分析物進行衍生化的步驟，同位素稀釋液相層析電噴灑游離串聯質譜法 (isotope dilution liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry, LC/ESI/MS/MS) 即為最佳的選擇⁽¹⁰⁾。後來也用以分別分析人的尿液中 ϵAde ⁽¹¹⁾ 與 1,N²-乙炔基鳥嘌呤 (1,N²- ϵGua)⁽¹²⁾ 的含量。在串聯質譜法上使用三級式四極柱質量偵測器會比用離子阱 (ion trap) 靈敏許多，特異性也高，因為它是監控在第一個四極柱之特定的母離子經過第二個四極柱之撞裂後，飛至第三個四極柱之特定的子離子；而離子阱質量偵測器則是記錄整個完整的質譜圖，再作資料處理的。

在游離源的選擇上，使用電噴灑游離源配合小孔徑的液相層析分離之靈敏度會比大氣壓化學游離源為高，因為後者受限於無法降低層析管柱的孔徑與流速。對於尿液中的 ϵAde ，我們比較以 GC/NICI/MS 及 LC/ESI/MS/MS 這兩種方法分析相同的樣品，發現一致性很高，顯示此兩項分析方法都很準確，但是各有其優缺點。例如，若使用 LC/ESI/MS/MS 則偵測不到幾個低含量的樣品，而使用 GC/NICI/MS 卻可偵測到，因為後者的靈敏度較高，但是它需要比較複雜的前處理步驟⁽¹¹⁾。

截至目前為止，在人的尿液中偵測並且準確地定量的 DNA 加成產物包括 (ϵCyt)⁽⁴⁾、(ϵdCyd)⁽⁵⁾、 ϵAde ^(3,11) 與 1,N²- ϵGua ⁽¹²⁾。人體內的這些乙炔基 DNA 加成產物主要來自於脂質過氧化 (lipid peroxidation)，而尿液中偵測到的含乙炔基鹼基與去氧核糖核苷，很可能分別來自鹼基切除修復 (base excision repair) 中 DNA 糖解酵素 (glycosylase) 與核苷酸切除修復 (nucleotide excision repair) 機制的作用⁽⁹⁾。

當探討尿液中 DNA 加成產物的含量與抽煙之關係時，發現抽煙者尿液中之 ϵAde ⁽³⁾、 ϵCyt ⁽¹³⁾ 與 1,N²- ϵGua ⁽¹²⁾ 平均含量高於非抽煙者，而且其分布具有統計上之意義。分析尿液中 DNA 加成產物的含量應可作為致癌風險評估之生化指標。我們也致力於發展同時分析多個 DNA 加成產物的方法，以同位素稀釋氣相層析負化學游離質譜法同時分析尿液中之 ϵAde 與 ϵCyt 的含量時，發現只有尿液中之 ϵAde 的含量與性別有關聯⁽¹⁴⁾，可能由於 ϵAde 之鹼基切

除修復酵素有性別上的特異性。同時分析多個分析物說來容易，卻有實際的困難；例如，因為在固相萃取管柱之前處理步驟要同時收集多個分析物，造成在質譜分析頻道上之干擾或是背景值的提高。

有了這些分析方法，就可以探討這些 DNA 加成產物在人體內癌細胞形成過程中所扮演的角色。目前文獻中已證實組織 DNA 中 ϵAde 及 ϵCyt 與癌症的關係，但它們在癌症病人尿液中之含量是否高於正常人則尚未被探討，主要原因在於之前沒有好的分析法可以準確地在尿液中定量 ϵAde 與 ϵCyt 。我們的同位素稀釋質譜法配合固相萃取管柱之前處理步驟為解決尿液基質干擾問題的利器。此外，人體組織 DNA 取得不易，乙炔基 DNA 加成產物之含量又低 (每 10⁶ 至 10⁸ 個正常鹼基中才有數個加成產物)，使用高靈敏度與高特異性的分析方法才能降低檢體的需要量，增加臨床上的可應用性。

近年來層析管柱的孔徑與流速之微小化迅速發展，增加蛋白質體學研究之靈敏度，較常用的層析管柱的內徑為 75 μm ，流速為 200–300 nL/min，搭配奈電噴灑 (nanoelectrospray，或稱 nanospray) 游離源。但是此種奈升流速液相層析/奈電噴灑游離的系統卻很少用在小分子的分析上，或許是因為此系統需要克服層析管柱易阻塞以及流速不易控制的技術關卡。然而當臨床檢體得來不易之時，分析化學家必須將分析方法的靈敏度提升至極限，才能將此方法廣泛地應用在預防醫學上。否則，當分析方法的靈敏度不夠高時，只能用在動物實驗上或是經手術切除的組織，即使後者也不一定能夠萃取出足夠的 DNA 可供分析。因此目前致力於發展以血液中之白血球作為替代組織 (surrogate tissue)，並發展一個可以同時偵測 ϵAde 、 ϵCyt 與 1,N²- ϵGua 之去氧核糖核苷的奈升流速/奈電噴灑游離質譜法，來分析萃取自白血球的 DNA 中這三種乙炔基加成產物之含量，作為人體內氧化壓力與疾病之生化指標。

使用傳統的液相層析電噴灑游離串聯質譜法分析一種含量約為 10⁶ 個正常鹼基中有數個丙烷基 (propano) 加成產物，需要 50 毫升的血液，還不一定每個樣品都偵測得到⁽¹⁵⁾。而使用奈升流速液相層析/奈電噴灑游離串聯質譜法，只需要 1–3 毫

升的血液，就可以偵測到 10^8 個正常鹼基中有數個加成產物的分析物，靈敏度增加了數百倍；其中層析管柱內徑的因素約為一百倍，而奈電噴灑游離源也貢獻了數倍的靈敏度。以奈升流速液相層析／奈電噴灑游離的系統分析 DNA 加成產物，文獻上目前僅有三篇論文發表⁽¹⁶⁻¹⁸⁾，其中有兩篇用於分析罹患阿茲海默 (Alzheimer) 症病人腦部的 DNA 樣品，由 1—2 微克的 DNA 水解液中可測得含量為 10^6 個正常鹼基中有數個丙烷基加成產物^(17,18)。

最常被研究的 DNA 加成產物應該是氧化產物 8-oxo-7, 8-dihydroguanine (8-oxoGua)。Gackowski 等人⁽¹⁹⁾ 量測肺癌病人白血球中 8-oxoGua 以及尿液中 8-oxoGua 之含量，並與健康的吸煙與不吸煙者比較，發現此二指標與抽煙與否很有相關性，而且肺癌病人之白血球中 8-oxoGua 含量高於健康人，尿液中 8-oxoGua 含量則與吸煙與否有關。另外，肺癌病人對此加成產物在白血球中之修復能力遠低於健康人。此研究將血液與尿液中 DNA 加成產物之含量和個人修復能力以及肺癌之關聯性作了很好的詮釋。對於我們有興趣之乙炔基加成產物，Speina 等人⁽²⁰⁾ 用靈敏但是特異性很差之 ^{32}P -後標定法，量測肺癌病人經手術切除的腫瘤組織與附近之正常組織 DNA 中 ϵAde 與 ϵCyt 之含量，雖然其含量沒有明顯的差異，但是白血球 DNA 中此二加成產物之含量均高於組織 DNA 之含量。而且全部肺癌病人白血球中修復 ϵAde 之能力明顯低於健康人，而與發炎有關的腺癌 (adenocarcinoma) 病人，白血球中修復 ϵCyt 之能力明顯低於健康人。可惜的是，此篇論文受限於技術關係，並未分析尿液中 ϵAde 與 ϵCyt 之含量，也沒有量測健康人白血球 DNA 中此二加成產物之含量，來與肺癌病人作比較。因為發炎與自由基都會激發 (stimulate) 脂質過氧化，若能透過分析尿液與血液中 ϵAde 、 ϵCyt 與 $1,N^2\text{-}\epsilon\text{Gua}$ 之含量，來詮釋肺癌與其他癌症 (例如，與高脂質過氧化有關的乳癌、大腸癌等，或是與發炎有關的肝癌、胃癌等) 的關係，分析尿液與血液中 DNA 加成產物之含量，便能成為有用的不具侵犯性的 (noninvasive) 疾病危險評估 (risk assessment) 的生化指標 (biomarkers)，也可以用來評估抗癌藥物的效果。

另一方面，發炎組織所產生之具反應性物種對 DNA 與蛋白質的修飾是一個很有趣的課題，因為慢性發炎是致癌的危險因子。這些具反應性物種會硝化、氯化、氧化 DNA 與蛋白質^(6,21,22)，其中以氧化破壞被研究得較多。我們對硝化反應 (nitration) 最感興趣，探討如何降低由於形成 8-硝基鳥嘌呤 (8-nitroguanine) 與 8-硝基黃嘌呤 (8-nitroxanthine) 所造成對 DNA 的破壞：如果將硝基還原成胺基，則不會形成無嘌呤部位。我們找到兩類蛋白質，其還原態可將 8-硝基鳥嘌呤與 8-硝基黃嘌呤及 3-硝基酪胺酸 (3-nitrotyrosine) 之硝基部位還原成胺基。除了硫辛醯脫氫酶 (lipoyl dehydrogenase)⁽²³⁾ 外，另一類為含紫質 (heme) 之蛋白質 (hemoproteins)⁽²⁴⁾，例如血紅蛋白 (hemoglobin) 與粒線體中的細胞色素 c (cytochrome c)。我們證明這些蛋白質可將雙股螺旋 DNA 上之 8-硝基鳥嘌呤與 8-硝基黃嘌呤還原成突變性很低的 8-胺基鳥嘌呤與 8-胺基黃嘌呤⁽²⁴⁾，這是很有趣也很有意義的一種 DNA 與蛋白質間之作用 (DNA-protein interaction)，由食物中攝取的一些抗氧化劑也有降低 DNA 上之硝基嘌呤的效果⁽²⁵⁾。

三、蛋白質的後轉譯修飾的質譜分析法

除了 DNA 的修飾之外，蛋白質的後轉譯修飾 (post-translational modifications) 也是一個很有趣的課題。蛋白質經共價修飾後，對其功能影響很大，例如磷酸化 (phosphorylation)、醣化 (glycosylation)、甲基化 (methylation)、乙醯基化 (acetylation) 及泛肽素化 (ubiquitination) 等，與癌細胞形成時之訊息傳導有關聯⁽²⁶⁾，因此蛋白質的後轉譯修飾在癌症之生化指標的尋找上提供了很多選擇。

對於我們所感興趣的蛋白質硝化而言，3-硝基酪胺酸在許多病理組織中都被偵測到 (通常是以免疫組織化學 (immunohistochemistry) 的方式)，包括動脈硬化症、阿茲海默症、Parkinson 症、幽門桿菌引發之胃炎、腸炎與在關節炎患者之關節滑液，以及食道癌、乳癌、胃癌與肺癌等之組織⁽²¹⁾，甚至於正常的老化組織都有⁽²⁷⁾。近年來質譜技術也迅速地被應用在這些研究上⁽²⁸⁾，我們曾探討含金

屬之蛋白質 (metalloproteins)，如肌紅蛋白、血紅蛋白、細胞色素 *c* 以及血晶質 (hemin) 與維生素 B₁₂ (cyanocobalamin) 催化硝化與還原反應的效果⁽²⁹⁾。並發現與證明在 H₂O₂ 與一氧化氮 (NO) 的代謝物亞硝酸鹽 (NO₂) 存在下 (此為模擬體內發炎的狀況)，氧化態的金屬蛋白催化酪胺酸與色胺酸之硝化反應，而在抗氧化劑濃度大於氧化劑的情況下，3-硝基酪胺酸會被還原成 3-胺基酪胺酸。

以液相層析奈電噴灑游離串聯質譜法偵測到血紅蛋白中只有四個胺基酸 (包括三個酪胺酸與一個色胺酸) 會被硝化，而此硝化後的血紅蛋白在抗壞血酸 (即維生素 C，為一種還原劑) 存在下，只有一個 3-硝基酪胺酸會被還原成 3-胺基酪胺酸。除此之外，硝化後之血紅蛋白的過氧化酶活性在經過還原後可逆轉為抗氧化酶⁽²⁹⁾，此種以氧化還原反應調控蛋白質的後轉譯硝化反應是一個新的概念，此結果可用於探討以抗氧化劑降低因發炎所造成體內蛋白質的硝化破壞。

我們已發展出以同位素稀釋液相層析電噴灑游離串聯質譜法來定量全部尿液蛋白中 3-硝基酪胺酸與 3-溴酪胺酸 (3-bromotyrosine) 所占的比例⁽³⁰⁾，作為尿液蛋白硝化與溴化程度的生化指標。此法使用的是三級式四極柱串聯質譜儀定量經過酸水解後之酪胺酸、3-硝基酪胺酸與 3-溴酪胺酸，無法提供目標蛋白質為何，以及被修飾胺基酸位置的資訊，要鑑定目標蛋白質以及被修飾胺基酸的位置，就必須藉助於蛋白質體技術的使用。

質譜在蛋白質體學的應用，通常使用基質輔助雷射脫附游離 (matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI) 飛行時間 (time-of-flight, TOF) 質譜法，或是奈升流速逆相液相層析/奈電噴灑游離離子阱質譜儀，配合蛋白質資料庫與搜尋比對軟體，經由分析蛋白質經特定酵素水解後所得之胜肽群之碰撞誘導解離 (collision-induced dissociation, CID) 質譜圖，來鑑定蛋白質的身分 (identification)。因為經由這種程序所得的胜肽群質譜圖特異性很高，相當於可以作為蛋白質身分鑑定的指紋，稱為生物資訊輔助之胜肽質量指紋分析 (bioinformatics-assisted peptide mass fingerprinting)。

生物體內的蛋白質通常會有後轉譯修飾，也可

以經由設定而令軟體搜尋比對後找出修飾發生的位置。質譜技術是研究蛋白質後轉譯修飾的利器，它可以鑑定出目標蛋白質上胺基酸反應的位置，並提供產生何種修飾的定性分析，這些資訊比使用抗體所得到的資訊可靠得多了。質譜法還可以借助穩定同位素的使用，而對蛋白質後轉譯修飾的程度作相對或是絕對的定量分析。

以蛋白質體學的方法來分析含 3-硝基酪胺酸之胜肽，通常採用先以西方轉漬法使二維電泳膠上與抗體反應之點顯色，挖出水解後再以其奈升流速逆相液相層析/奈電噴灑游離離子阱質譜之指紋來分析。然而用此法鑑定到的硝化蛋白質數目通常並不多，例如，在年長老鼠的軀幹肌肉組織中鑑定到 11 個蛋白質⁽²⁷⁾ 以及人的大腦垂體組織中鑑定到 4 個蛋白質⁽³¹⁾。以此法在老鼠的心肌組織中鑑定到 29 個硝化蛋白質，但若先使用免疫沉澱法將硝化蛋白質分離後，再以一維電泳分離，共可鑑定到 48 個硝化蛋白質⁽³²⁾。這是因為二維電泳膠的容量並不大 (< 1 mg)，加上有些蛋白質無法溶解於電泳的裝載溶液 (loading buffer) 中，而且硝化蛋白質是微量成分，因此導致硝化蛋白質在二維電泳膠上之含量可能少到無法以西方轉漬法偵測。

以基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜法來分析含 3-硝基酪胺酸之胜肽必須要克服一些技術上的問題。相對於電噴灑游離離子阱質譜儀之慢加熱法，基質輔助雷射脫附游離源給予的是快速的能量，而且 3-硝基酪胺酸會吸收此雷射光的能量，因此胜肽的斷裂採用高能量的裂解途徑，所產生的碎片離子並非傳統的 *b_n* 與 *y_n* 離子，不易被搜尋比對軟體找到⁽³³⁾。基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜法所用的雷射光通常為紫外光，會導致含 3-硝基酪胺酸胜肽之光化學反應而生成 3-胺基酪胺酸^(34,35)，此問題可以將雷射光採用紅外光來解決⁽³⁶⁾。

我們目前使用奈升流速逆相液相層析/奈電噴灑游離離子阱質譜儀，致力於用蛋白質體學的方法鑑定人的尿液中被硝化後之蛋白質的種類。尿液蛋白質的成分與血液蛋白質相似，容易取得且不具侵犯性，被認為可取代血液來偵測生物指標，目前已有初步結果，未來希望可與發炎或是其他疾病找到關聯。

四、DNA 與蛋白質之交聯產物的質譜分析法

質譜也可用在 DNA 與蛋白質之交聯產物 (DNA-protein cross-links) 的結構鑑定上。Oxanine 為一氧化氮 (NO) 或亞硝酸 (HNO_2) 與 DNA 反應的產物，我們結合電噴灑游離質譜、NMR 光譜與 HPLC-UV 鑑定出 oxanine 與三肽 glutathione 的兩個反應產物⁽³⁷⁾，分別為硫醇基 (thiol) 與胺基 (amino) 打在內酯 (lactone) 碳上，開環後的硫酯 (thioester) 與醯胺 (amide) 產物 (圖 2)。當此反應發生在染色質 (chromatin) 上，即生成 DNA 與蛋白質之交聯產物，為一種很難修復的交聯產物，對於 DNA 與蛋白質而言都是嚴重的傷害。硝化與氧化反應對蛋白質上特定位置的胺基酸會有選擇性，而這又與此胺基酸在蛋白質上之立體結構有關。使用蛋白質體學之奈電噴灑游離質譜法來分析蛋白質上之修飾，可探討不同胺基酸，因為在蛋白質上之立體結構不同，或是暴露於溶劑之表面積不同，或是鄰近胺基酸之性質不同，而造成對其反應選擇性之影響。結果顯示 oxanine 可與蛋白質 lysozyme 以另一種方式結合⁽³⁸⁾，即與絲胺酸 (serine) 形成酯類 (ester) (圖 2)。

五、結論

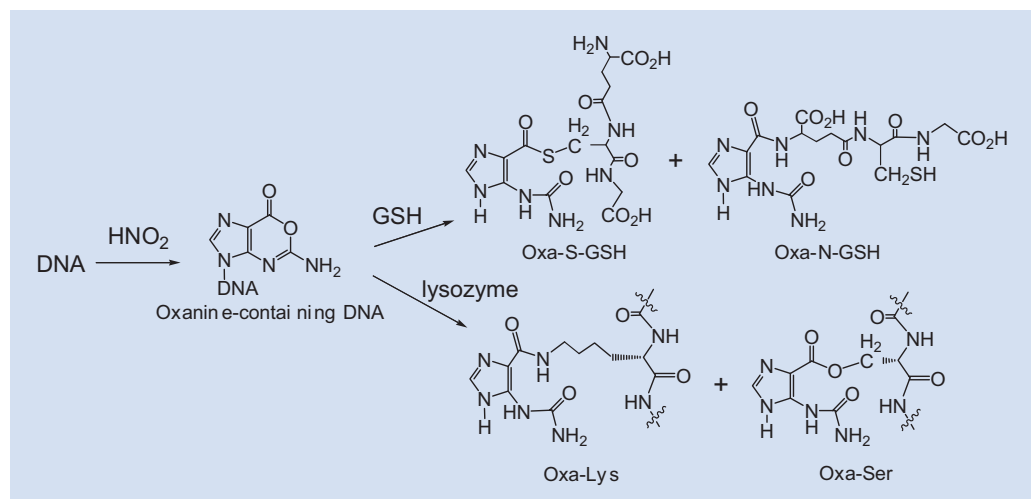
DNA 與蛋白質的結構因修飾而產生改變，對於它們的生理功能影響至巨，也因此與疾病有密不

可分的關係。高特异性與高靈敏度的質譜法在分析體內超微量之 DNA 加成產物與蛋白質的後轉譯修飾領域占著舉足輕重的地位，有待分析化學家不斷地改良，增強其特异性、解析能力與靈敏度，才能在臨床上有實際的應用。

參考文獻

1. H.-J. C. Chen, L. Zhang, J. Cox, J. A. Cunningham, and F.-L. Chung, *Chem. Res. Toxicol.*, **11**, 1474 (1998).
2. 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).
3. H.-J. C. Chen and W.-L. Chiu, *Chem. Res. Toxicol.*, **16**, 1099 (2003).
4. H.-J. C. Chen, T.-C. Lin, C.-L. Hong, and L.-C. Chiang, *Chem. Res. Toxicol.*, **14**, 1612 (2001).
5. H.-J. C. Chen, C.-F. Wu, C.-L. Hong, and C.-M. Chang, *Chem. Res. Toxicol.*, **17**, 896 (2004).
6. H.-J. C. Chen, S.-W. Row, and C.-L. Hong, *Chem. Res. Toxicol.*, **15**, 262 (2002).
7. H.-J. C. Chen, C.-F. Wu, and J.-L. Huang, *Toxicol. Lett.*, **155**, 403 (2005).
8. M. K. Shigenaga and B. N. Ames, *Free Radic. Biol. Med.*, **10**, 211 (1991).
9. H.-J. C. Chen, *Chin. Pharm. J.*, **56**, 1 (2004).
10. 陳皓君, 科儀新知, **25** (3), 47 (2003).
11. H.-J. C. Chen and C.-M. Chang, *Chem. Res. Toxicol.*, **17**, 963 (2004).
12. H.-J. C. Chen and W.-L. Chiu, *Chem. Res. Toxicol.*, **18**, 1593 (2005).
13. H.-J. C. Chen, C.-L. Hong, C.-F. Wu, and W.-L. Chiu, *Toxicol. Sci.*, **76**, 321 (2003).
14. H.-J. C. Chen and C.-F. Kao, *Toxicol. Lett.*, **169**, 72 (2007).
15. C. A. Rouzer, A. K. Chaudhary, M. Nokubo, D. M. Ferguson,

圖 2.
從 oxanine 衍生出之 DNA 與蛋白質之交聯產物結構。



- G. R. Reddy, I. A. Blair, and L. J. Marnett, *Chem. Res. Toxicol.*, **10**, 181 (1997).
16. K. Vanhoutte, W. Van Dongen, I. Hoes, F. Lemiere, E. L. Esmans, H. Van Onckelen, E. Van den Eeckhout, R. E. van Soest, and A. J. Hudson, *Anal. Chem.*, **69**, 3161 (1997).
17. X. Liu, M. A. Lovell, and B. C. Lynn, *Anal. Chem.*, **77**, 5982 (2005).
18. X. Liu, M. A. Lovell, and B. C. Lynn, *Chem. Res. Toxicol.*, **19**, 710 (2006).
19. D. Gackowski, E. Speina, M. Zielinska, J. Kowalewski, R. Rozalski, A. Siomek, T. Paciorek, B. Tudek, and R. Olinski, *Cancer Res.*, **63**, 4899 (2003).
20. 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).
21. H. Ischiropoulos, *Arch. Biochem. Biophys.*, **356**, 1 (1998).
22. H.-J. C. Chen, Y.-M. Chen, T.-F. Wang, K.-S. Wang, and J. Shiea, *Chem. Res. Toxicol.*, **14**, 536 (2001).
23. H.-J. C. Chen, Y.-M. Chen, and C.-M. Chang, *Chemico-Biol. Interact.*, **140**, 199 (2002).
24. H.-J. C. Chen, C.-M. Chang, and Y.-M. Chen, *Free Radic. Biol. Med.*, **34**, 254 (2003).
25. H.-J. C. Chen, S.-B. Wu, and C.-M. Chang, *Arch. Biochem. Biophys.*, **415**, 109 (2003).
26. K. E. Krueger and S. Srivastava, *Mol. Cell. Proteomics*, **5**, 1799 (2006).
27. J. Kanski, S. J. Hong, and C. Schoneich, *J. Biol. Chem.*, **280**, 24261 (2005).
28. C. Schöneich and V. S. Sharov, *Free Radic. Biol. Med.*, **41**, 1507 (2006).
29. H.-J. C. Chen, C.-M. Chang, W.-P. Lin, D.-L. Cheng, and M.-I. Leong, *ChemBioChem*, **9**, 312 (2008).
30. H.-J. C. Chen and W.-L. Chiu, *Toxicol. Lett.*, **181**, 31 (2008).
31. X. Zhan and D. M. Desiderio, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **325**, 1180 (2004).
32. C. Kanski, A. Behring, J. Pelling, and C. Schöneich, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **288**, H371 (2005).
33. V. H. Wysocki, K. A. Resing, Q. Zhang, and G. Cheng, *Methods*, **35**, 211 (2005).
34. A.-S. Petersson, H. Steen, D. E. Kalume, K. Caidahl, and P. Roepstorff, *J. Mass Spectrom.*, **36**, 616 (2001).
35. A. Sarver, N. K. Scheffler, M. D. Shetlar, and B. W. Gibson, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **12**, 439 (2001).
36. B. A. Petre, N. Youhnovski, J. Lukkari, R. Weber, and M. Przybylski, *Eur. J. Mass Spectrom.*, **11**, 513 (2005).
37. H.-J. C. Chen, C.-J. Hsieh, L.-C. Shen, and C.-M. Chang, *Biochemistry*, **46**, 3952 (2007).
38. H.-J. C. Chen, W.-L. Chiu, W.-P. Lin, and S.-S. Yang, *ChemBioChem*, **9**, 1074 (2008).

• 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系所教授。

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