

科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

質譜法建立氮氧化物之生物暴露與效應指標：職業暴露危害研究 (第3年)

計畫類別：個別型計畫
計畫編號：NSC 102-2314-B-040-016-MY3
執行期間：104年08月01日至105年07月31日
執行單位：中山醫學大學公共衛生學系(所)

計畫主持人：胡瓊文
共同主持人：趙木榮、巖正傑、潘致弘
計畫參與人員：碩士級-專任助理人員：蔡依虹
碩士班研究生-兼任助理人員：黃百崧
大專生-兼任助理人員：廖啟軒

中華民國 105 年 10 月 03 日

中文摘要：氮氧化物(NO_x)為普遍存在於環境的空氣汙染物，燃燒過程中空氣中大量的可氧化產生NO_x。因此除了吸煙及交通工具外，高溫燃燒的鑄造、熔接及煉焦爐等工作環境皆會長時間暴露高量的NO_x。NO_x在體內最終會轉換形成硝酸鹽類(NO₂⁻及NO₃⁻)，因此體液中NO₂⁻及NO₃⁻濃度的量測常用作環境NO_x的暴露指標。暴露NO_x會使體內活性含氮物質(reactive nitrogen species, RNS)增高進而造成硝化傷害，其中過氧亞硝酸根陰離子(peroxynitrite, PN)可與DNA作用形成8-nitroguanine (8-NO₂-G) 或與蛋白質反應生成3-nitrotyrosine (3-NTYR)及3-nitro-4-hydroxyphenylacetic acid (NHPA)。PN也能釋出活性含氧物質(reactive oxygen species, ROS)造成核酸(DNA及RNA)氧化傷害。8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodGuo)及8-oxoguanosine (8-oxoGuo) 分別為DNA及RNA主要氧化傷害產物。研究也證實暴露NO_x不僅使體內產生大量的ROS/RNS，NO可在體內自行氧化成強亞硝化物質並與二級胺衍生形成亞硝胺。亞硝胺經代謝活化後可產生烷基偶氮離子，進而造成DNA烷基化傷害，如alkylguanines、alkyladenines及alkylthymines；同時亞硝胺代謝亦會產生ROS造成氧化傷害。也可直接攻擊DNA導致去胺作用(deamination)，當CpG島上的5-methylcytosine鹼基經去胺化及氧化作用可形成thymidine glycol (dTg)、5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine (5-hmdU) 和5-hydroxymethyl-2'-deoxycytidine (5-hmdC)，將干擾基因的表觀遺傳調控機制(epigenetic mechanism)，這與許多慢性疾病及癌症有關。

本計畫預計執行三年，將利用液相層析串聯質譜儀(LC-MS/MS)搭配連線固相萃取(on-line solid phase extraction, on-line SPE)及同位素稀釋法(isotope dilution)建立多項NO_x暴露的生物偵測/效應指標，用以評估NO_x暴露及其可能造成的健康危害。目標如下，(1): 運用on-line SPE LC-MS/MS搭配isotope dilution開發尿液中亞硝酸鹽/硝酸鹽(NO₂⁻及NO₃⁻)、尿液中DNA/蛋白質硝化傷害指標(8-NO₂-G、3-NTYR及NHPA)及尿液/細胞中RNA氧化傷害指標(8-oxoGuo)分析方法；(2): 運用on-line SPE LC-MS/MS搭配isotope dilution開發尿液/細胞中DNA表觀遺傳物質(5-mdC、5-hmdC)分析方法；(3): 探討各指標間的相關性。

中文關鍵詞：氮氧化物、硝酸鹽類、亞硝胺、核酸氧化損傷、基因烷基化損傷、硝化損傷、基因甲基化

英文摘要：Nitrogen oxides (NO_x) is a common air pollutant that is formed when nitrogen reacts with oxygen. In addition to cigarette smoke and vehicle emission, high levels of NO_x emissions can be easily found in manufacturing environment of high temperature, including coke oven, welding and foundry work. In vivo, NO_x is rapidly oxidized to nitrite and nitrate, and thus the levels of nitrite and nitrate in body fluids have been used as indicators of NO_x exposure. NO_x exposure could increase reactive nitrogen species (RNS) in vivo that are able to cause nitrative damage to cellular constituents (i.e., DNA and proteins). RNS (e.g.,

peroxynitrite, PN) can react with DNA to form nitrative lesion 8-nitroguanine (8-NO₂-G) or with protein to form 3-nitrotyrosine (3-NTYR) and 3-nitro-4-hydroxyphenylacetic acid (NHPA). RNS can also release reactive oxygen species (ROS) and cause oxidative damage to nucleic acids (DNA and RNA). 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodGuo) and 8-oxoguanosine (8-oxoGuo) are the most used biomarkers for oxidative lesion of DNA and RNA, respectively. Meanwhile, RNS (e.g., N₂O₃) can react with secondary amines to form N-nitrosamines, that are capable of further alkylating nucleobase to form mutagenic lesions (e.g., alkylguanines, alkyladenines and alkylthymines). Furthermore, N₂O₃ has been shown to promote the nitrosative deamination of purines and pyrimidines. Particularly, deamination/oxidation of 5-methylcytosine in CpG dinucleotides that results in the formation of thymidine glycol (dTg), 5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine (5-hmdU) and 5-hydroxymethyl-2'-deoxycytidine (5-hmdC), can affect genetic and epigenetic processes. This is a three-year project, which aims to develop serial "on-line SPE LC-MS/MS" methods to quantitate various biomarkers for assessing the potential adverse health effect of NO_x exposure. Subaims are stated as follows: (1) To develop isotope dilution LC-MS/MS with on-line SPE methods for determining nitrite/nitrate, 8-NO₂-G/3-NTYR/NHPA and 8-oxoGuo; (2) To develop isotope dilution LC-MS/MS with on-line SPE methods for determining 5-mdC and 5-hmdC; (3) To investigate the possible associations between biomarkers.

英文關鍵詞： Nitrogen oxides, nitrite/nitrate, N-nitrosamines, oxidative DNA/RNA lesions, alkylated DNA lesions, nitrative lesions, DNA methylation

質譜法建立氮氧化物之生物暴露與效應指標:職業暴露危害研究

胡瓊文

中文摘要

氮氧化物(NO_x)為普遍存在於環境的空氣污染物，燃燒過程中空氣中大量的N₂可氧化產生NO_x。因此除了吸煙及交通工具外，高溫燃燒的鑄造、熔接及煉焦爐等工作環境皆會長時間暴露高量的NO_x。NO_x在體內最終會轉換形成硝酸鹽類(NO₂⁻及NO₃⁻)，因此體液中NO₂⁻及NO₃⁻濃度的量測常用作環境NO_x的暴露指標。暴露NO_x會使體內活性含氮物質(reactive nitrogen species, RNS)增高進而造成硝化傷害，其中過氧亞硝酸根陰離子(peroxynitrite, PN)可與DNA作用形成8-nitroguanine (8-NO₂-G)或與蛋白質反應生成3-nitrotyrosine (3-NTYR)及3-nitro-4-hydroxyphenylacetic acid (NHPA)。PN也能釋出活性含氧物質(reactive oxygen species, ROS)造成核酸(DNA及RNA)氧化傷害。8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodGuo)及8-oxoguanosine (8-oxoGuo)分別為DNA及RNA主要氧化傷害產物。研究也證實暴露NO_x不僅使體內產生大量的ROS/RNS，NO可在體內自行氧化成強亞硝化物質N₂O₃並與二級胺衍生形成亞硝胺。亞硝胺經代謝活化後可產生烷基偶氮離子，進而造成DNA烷基化傷害，如alkylguanines、alkyladenines及alkylthymines；同時亞硝胺代謝亦會產生ROS造成氧化傷害。N₂O₃也可直接攻擊DNA導致去胺作用(deamination)，當CpG島上的5-methylcytosine鹼基經去胺化及氧化作用可形成thymidine glycol (dTg)、5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine (5-hmdU)和5-hydroxymethyl-2'-deoxycytidine (5-hmdC)，將干擾基因的表觀遺傳調控機制(epigenetic mechanism)，這與許多慢性疾病及癌症有關。

本計畫預計執行三年，將利用液相層析串聯質譜儀(LC-MS/MS)搭配連線固相萃取(on-line solid phase extraction, on-line SPE)及同位素稀釋法(isotope dilution)建立多項NO_x暴露的生物偵測/效應指標，用以評估NO_x暴露及其可能造成的健康危害。目標如下，(1): 運用on-line SPE LC-MS/MS搭配isotope dilution開發尿液中亞硝酸鹽/硝酸鹽(NO₂⁻及NO₃⁻)、尿液中DNA/蛋白質硝化傷害指標(8-NO₂-G、3-NTYR及NHPA)及尿液/細胞中RNA氧化傷害指標(8-oxoGuo)分析方法；(2): 運用on-line SPE LC-MS/MS搭配isotope dilution開發尿液/細胞中DNA表觀遺傳物質(5-mdC、5-hmdC)分析方法；(3): 探討各指標間的相關性。

關鍵字：氮氧化物、硝酸鹽類、亞硝胺、核酸氧化損傷、基因烷基化損傷、硝化損傷、基因甲基化

Development and application of mass spectrometry-based biomarkers for assessing occupational exposure to nitrogen oxides

Chiung-Wen Hu

Abstract

Nitrogen oxides (NO_x) is a common air pollutant that is formed when nitrogen reacts with oxygen. In addition to cigarette smoke and vehicle emission, high levels of NO_x emissions can be easily found in manufacturing environment of high temperature, including coke oven, welding and foundry work. *In vivo*, NO_x is rapidly oxidized to nitrite and nitrate, and thus the levels of nitrite and nitrate in body fluids have been used as indicators of NO_x exposure. NO_x exposure could increase reactive nitrogen species (RNS) *in vivo* that are able to cause nitrative damage to cellular constituents (i.e., DNA and proteins). RNS (e.g., peroxyxynitrite, PN) can react with DNA to form nitrative lesion 8-nitroguanine (8-NO₂-G) or with protein to form 3-nitrotyrosine (3-NTYR) and 3-nitro-4-hydroxyphenylacetic acid (NHPA). RNS can also release reactive oxygen species (ROS) and cause oxidative damage to nucleic acids (DNA and RNA). 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodGuo) and 8-oxoguanosine (8-oxoGuo) are the most used biomarkers for oxidative lesion of DNA and RNA, respectively. Meanwhile, RNS (e.g., N₂O₃) can react with secondary amines to form *N*-nitrosamines, that are capable of further alkylating nucleobase to form mutagenic lesions (e.g., alkylguanines, alkyladenines and alkylthymines). Furthermore, N₂O₃ has been shown to promote the nitrosative deamination of purines and pyrimidines. Particularly, deamination/oxidation of 5-methylcytosine in CpG dinucleotides that results in the formation of thymidine glycol (dTg), 5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine (5-hmdU) and 5-hydroxymethyl-2'-deoxycytidine (5-hmdC), can affect genetic and epigenetic processes.

This is a three-year project, which aims to develop serial “on-line SPE LC-MS/MS” methods to quantitate various biomarkers for assessing the potential adverse health effect of NO_x exposure. Subaims are stated as follows: **(1)** To develop isotope dilution LC-MS/MS with on-line SPE methods for determining nitrite/nitrate, 8-NO₂-G/3-NTYR/NHPA and 8-oxoGuo; **(2)** To develop isotope dilution LC-MS/MS with on-line SPE methods for determining 5-mdC and 5-hmdC; **(3)** To investigate the possible associations between biomarkers.

Keywords: Nitrogen oxides, nitrite/nitrate, *N*-nitrosamines, oxidative DNA/RNA lesions, alkylated DNA lesions, nitrative lesions, DNA methylation

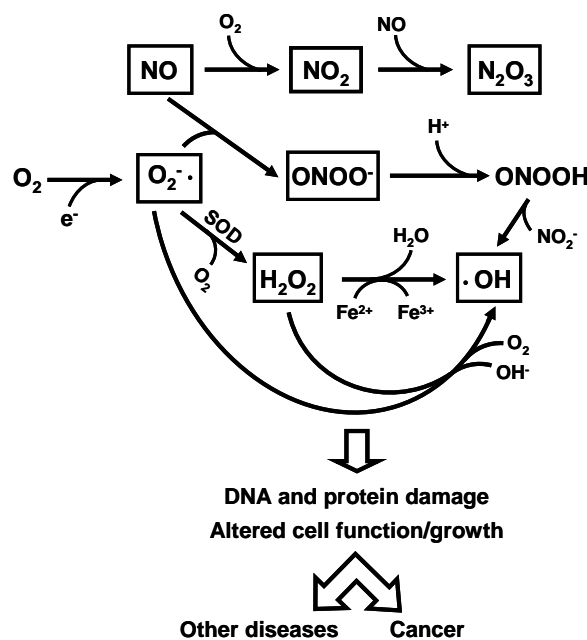
一、研究計畫背景

(1) 氮氧化物

氮氧化物(nitrogen oxides, NOx)是普遍存在於環境中的空氣污染物質，包含 NO, NO₂, NO₃, N₂O, N₂O₃ 與 N₂O₄ 等形式，其中以 NO 及 NO₂ 含量最多且較穩定存在於大氣中。依據環保署對氮氧化物之定義，將 NO 與 NO₂ 合稱為 NOx。當燃燒溫度超過 1000°C 時，空氣中的氮氣會與氧氣大量形成 NO，接著在室溫下 NO 可進一步氧化成 NO₂，若同時有 O₃ 存在時則更易轉換為 NO₂。NO 是一種無色、無味具毒性之強氧化性氣體，其大鼠實驗之 LC50 值為 870 ppm/4 hrs；NO₂ 為紅棕色具辛辣味之毒性氣體，大鼠實驗之 LC50 值為 88 ppm/4 hrs。NO 及 NO₂ 在細菌與哺乳類動物細胞測試下皆發現具有致突變性，但動物致癌實驗則都尚未有明確答案。作業環境中，如鑄造業、焊接或是橡膠合成因高溫製程中即可將空氣中大量的 N₂ 氧化產生 NOx，勞工若長時間暴露於此兩種氣體將導致肺炎、肺水腫及支氣管炎等疾病。

目前評估體內 NOx 的劑量大多以量測 NO₂⁻ 及 NO₃⁻ 為主，然而飲食對體內的 NO₂⁻ 及 NO₃⁻ 也有貢獻[Bryan et al., 2012]。生物樣本中 NO₂⁻ 及 NO₃⁻ 的量測主要分為兩大類：比色分析法及 HPLC 層析法。目前文獻尚未有敏感度高且簡易的分析方法，足以準確定量 NO₂⁻，本研究將首先建立液相層析串聯質譜儀(LC-MS/MS)的分析方法來偵測尿液中的 NO₂⁻ 及 NO₃⁻。

NO 在生物體內可自行氧化形成 NO₂ 與 N₂O₃，亦可與超氧陰離子(superoxide anion, O₂⁻)反應產生過氧亞硝酸根陰離子(peroxynitrite, PN, ONOO⁻)，PN 再進一步反應可產生體內最具反應性之氫氧自由基(hydroxyl radicals, ·OH) (圖一)。PN 是一強氧化劑且被證實具有神經毒性，並會造成上皮細胞傷害及脂質過氧化等作用，也可造成體內核酸、蛋白質之損傷。因此暴露 NOx 將使體內的活性含氧物質(reactive oxygen species, ROS)及活性含氮物質(reaction nitrogen species, RNS)增加。



圖一、ROS/RNS 的交互生成反應

由於 ROS/RNS 活性高、不穩定(半衰期極短)很容易攻擊生物體內的重要分子如核酸、蛋白質、

脂肪等，導致細胞或組織在結構及功能上產生改變[Roberts et al., 2010]。ROS/RNS 本身不易量測，因此分析 ROS/RNS 與體內重要分子所形成的修飾產物，是評估 NO_x 暴露及其衍生效應較佳的指標。

(2) 氮氧化物促使體內衍生亞硝胺

亞硝胺(*N*-nitrosamines)廣泛存在於環境中，早在1956年就有大鼠實驗證實二甲基亞硝胺(*N*-nitrosodimethylamine, NDMA)會促使肝腫瘤生成，此後陸續發現二乙基亞硝胺(*N*-nitrodiethylamine, NDEA)及亞硝基嗎林(*N*-nitrosomorpholine, NMOR)亦會使啮齒類動物產生腫瘤[Garland et al., 1986]。後續的研究證實在體內有氧的狀態下NO可轉為強亞硝化物質 N₂O₃，當二級胺被 N₂O₃ 亞硝化後即可形成*N*-nitrosamines [Jourdeuil et al., 1997]。

體內亞硝化反應所需的胺類來源包含內生性及外生性，內生性來源例如體內本身含有的胺類(如二甲基胺 dimethylamine, DMA 或二乙基胺 diethylamine, DEA);外生性來源有飲食或空氣污染物(例如 MOR)等。雖然動物實驗證實 NO_x 暴露會造成亞硝化衍生反應，可能是體內亞硝胺產生的重要因素之一，但尚沒有研究證實外在 NO_x 暴露與人體內亞硝胺間的關連性。

除 NDMA、NDEA 及 NMOR 外，常見的亞硝基化合物(*N*-nitroso compounds, NOC)還有：*N*-nitrosomethylethylamine (NMEA)、*N*-nitrosodi-*n*-propylamine (NDPA)、*N*-nitrosopyrrolidine (NPYR)、*N*-nitrosopiperidine (NPIP)、*N*-nitrosodi-*n*-butylamine (NDBA)、*N*-nitrosodiphenylamine (NDPHA)及 *N*-Nitroso-*L*-proline (NPRO)等。先前已有研究利用氣相層析儀(gas chromatography, GC)搭配質譜偵測器(mass spectrometry)或熱能分析儀(thermal energy analyzer, TEA)分析尿液中的幾種亞硝胺[Abdel Mohsen et al., 1999; Iavicoli and Carelli, 2006; Vermeer et al., 2001]，然而目前並沒有運用 LC-MS/MS 開發尿液中亞硝胺的分析方法。

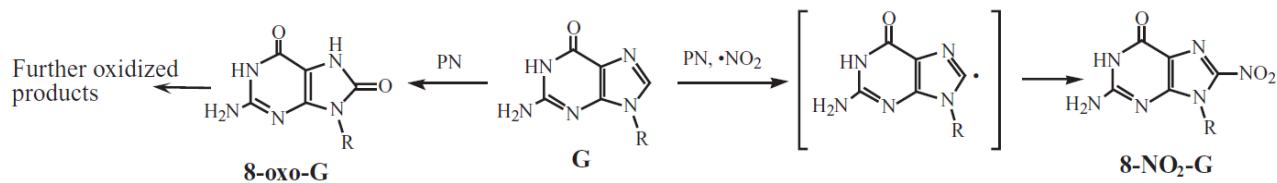
(3) 亞硝胺造成 DNA 烷基化損傷(Alkylated DNA damage)

亞硝胺(如 NDMA、NDEA)在體內代謝後可造成 DNA 烷基化損傷。如 N7-alkylguanine、N3-alkyladenine、O⁶-alkylguanine 及 O⁴-alkylthymine 等，都是鹼基中的氧或氮原子上發生了烷基取代反應而生成的修飾鹼基。由於 N7-alkylguanine 及 N3-alkyladenine 是最主要的烷基化鍵結產物，因此常被視為評估亞硝胺暴露的標記。最近我們已成功開發 DNA 中 O⁶-methylguanine LC-MS/MS 分析法 [Hu et al., 2012a]。

先前研究發現吸煙者因暴露香煙中的亞硝胺，尿液中的 N7-methylguanine 會明顯增高 [Chao et al., 2005; Ichiba et al., 2006];最近一個大族群的世代研究更發現吸煙者尿液中 N7-methylguanine 與吸煙者的肺癌風險有相關[Loft et al., 2007]。此外，本研究團隊先前針對煉焦爐工廠作業員分析其尿液中的 N7-methylguanine，結果發現其尿液中有顯著高量的 N7-methylguanine [Chao et al., 2008]。曾有研究指出煉焦爐作業空氣中亞硝胺濃度低於 1 μg/m³，我們推測此濃度暴露下並無法造成體內如此高量的 N7-methylguanine，另有研究量測煉焦爐頂周界空氣中的 NO_x 總濃度約在 47-53 ppm 之間[Tsai et al., 2007];因此我們推測 NO_x 暴露可能促使體內衍生形成亞硝胺(如 *N*-nitrosodimethylamine)，進而造成 DNA 烷基化損傷；但這推論亟待本研究同時分析體內亞硝胺及各種 DNA 烷基化鍵結物來證實。

(4) 氮氧化物造成核酸氧化及硝化傷害(Oxidative/ nitrative damage to nucleic acids)

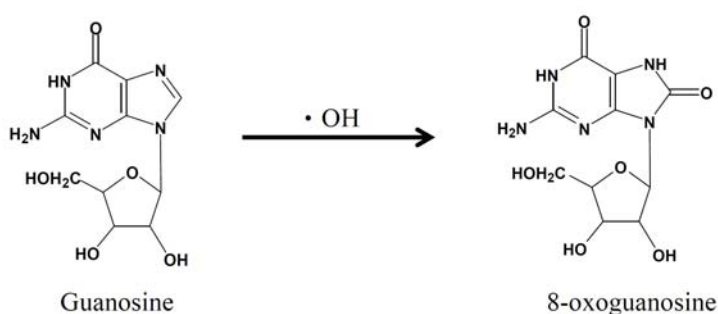
暴露 NO_x 與體內 O₂^{·-} 反應所形成的 ONOO⁻ (PN) 是重要的 RNS，其為強硝化劑同時也是強氧化劑。如圖二所示，PN 與 DNA 作用形成 8-nitroguanine (8-NO₂-G) 是主要的基因硝化傷害產物之一。PN 也能直接生成氧化性傷害產物 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoGua) [Chen et al., 2001]。



圖二、RNS所形成的DNA硝化及氧化產物[Ohshima et al., 2006]

RNA 氧化傷害

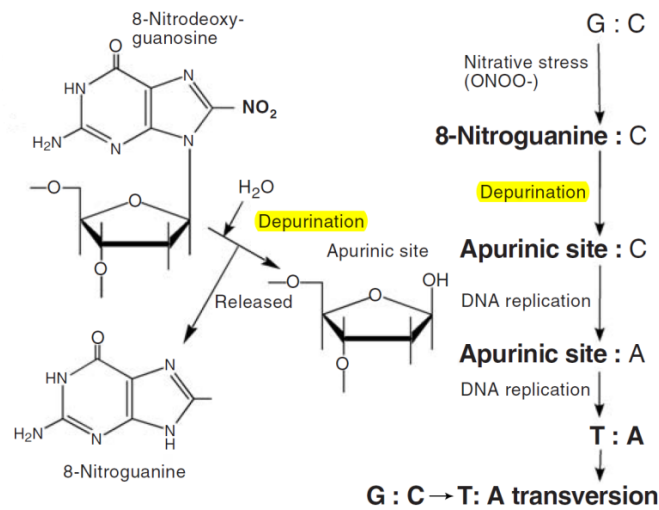
近年來 RNA 氧化傷害開始引起高度注意。ROS 增加所造成的 RNA 氧化性傷害主要產物為 8-羥基鳥嘌呤核 8-hydroxyguanosine (8-OHGuo 或 8-oxoguanosine, 8-oxoGuo，如圖三所示)。過去研究發現糖尿病患尿液中 8-oxoGuo 濃度越高其長期存活率越低[Broedbaek et al., 2011]。先前研究量測核酸氧化傷害皆以 DNA 為主(亦即 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine, 8-oxodGuo)，而 RNA 的氧化傷害產物相對少。8-oxoGuo 分析方法以 HPLC 搭配電化學偵測器(electrochemical detection, ECD)為主，但特异性差[Hofer et al., 2006]；近年來開始有學者運用 LC-MS/MS 開發分析法[Malayappan et al., 2007]，我們則將嘗試開發 on-line SPE LC-MS/MS 搭配同位素稀釋法(isotope dilution)分析尿液及細胞中 8-oxoGuo。



圖三、RNA 上的 G 受氫氧自由基攻擊形成 8-OHGuo (亦稱 8-oxoGuo)

DNA 硝化傷害

8-NO₂-G 目前被認為是體內基因硝化損傷的重要指標，8-NO₂-G 在 DNA 上非常不穩定(half-life: 4 hr at 37°C)，很容易自發性去嘌呤(depuration)在 DNA 上形成缺鹼基位(abasic sites)，進而造成 G:C→T:A 反轉突變(圖四)。



圖四、8-NO₂-G 的形成促使基因突變的機制[Kawanishi and Hiraku, 2006]

目前分析 DNA 中的 8-NO₂-G 以免疫螢光分析法或組織免疫染色法為主，它們雖可分析組織中的 8-NO₂-G，但屬於半定量方式。文獻中尚未有可準確定量 8-NO₂-G 的分析方法。

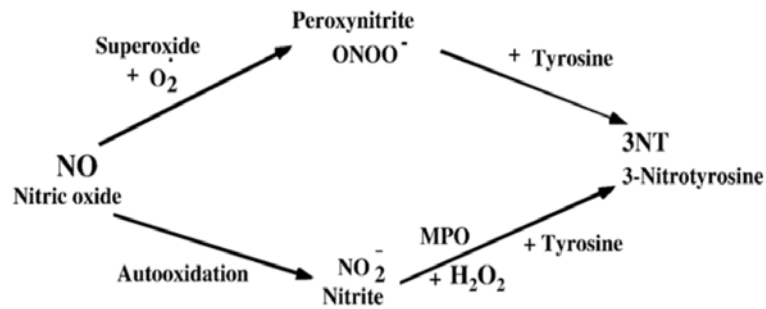
(5) 氮氧化物造成 DNA 去胺化(deamination)進而干擾 DNA 甲基化

在生物染色體上不同程度的甲基化修飾控制著基因的表現與基因體的穩定性，並關係著細胞功能的正常運作。DNA 上 cytosine 五號碳位置經甲基轉移酵素 DNA methyltransferase (DNMT)形成的 5-methyl-2'-deoxycytidine (5-mdC)是主要的甲基化訊息，在人類細胞中 5-mdC 的量約佔總 DNA 的 1% [Muller and Widschwendter, 2003]。在有氧的狀態下 NO 可轉為強亞硝化物質 N₂O₃，其可直接攻擊 DNA 導致去胺作用(deamination) [Grisham et al., 2000]。N₂O₃ 可分別促使 cytosine、5-methylcytosine、adenine 及 guanine 去胺化，含氮鹽基轉為 uracil、thymine、hypoxanthine 及 xanthine。NO_x 暴露可否經由去胺作用或其衍生物影響人體內整體 DNA 甲基化程度(global DNA methylation)，目前仍無相關研究。

最近本研究團隊成功開發 on-line SPE LC-MS/MS 方法可同時分析尿液中 5-mC 及 5-mdC 能間接幫助評估體內整體 DNA 甲基化的變化情形[Hu et al., 2012b]。同時我們進一步發現 5-mC 與尿液中的 DNA 氧化損傷有極佳相關性，並提出了新的假說：外在暴露所造成的氧化壓力也可能引起體內甲基自由基(methyl radicals)，促使 DNA 上的 cytosine 形成 5-methylcytosine。

(6) 氮氧化物與蛋白質硝化傷害(Protein nitration)

氮氧化物的暴露將使體內 ROS/RNS 增加進而造成蛋白質硝基化修飾，其中以硝基化酪胺酸 (3-nitrotyrosine, 3-NTYR)最常被討論。如下圖五所示，體內形成 3-NTYR 的反應路徑有兩種[Sun et al., 2007]：第一種為 NO 與 O₂^{·-} 反應形成 ONOO⁻，再與二氧化碳(CO₂)進行反應形成 NO₂[·]，進一步造成 tyrosine 或是蛋白質殘基(residue)的 tyrosine 被 NO₂[·] 鍵結；第二種途徑是 NO 經氧化反應形成亞硝酸鹽(nitrite, NO₂⁻)，在過氧化氫(hydroperoxide, H₂O₂)的參與下藉由骨髓過氧化酶(myeloperoxidase, MPO)酵素催化作用產生 NO₂[·]。



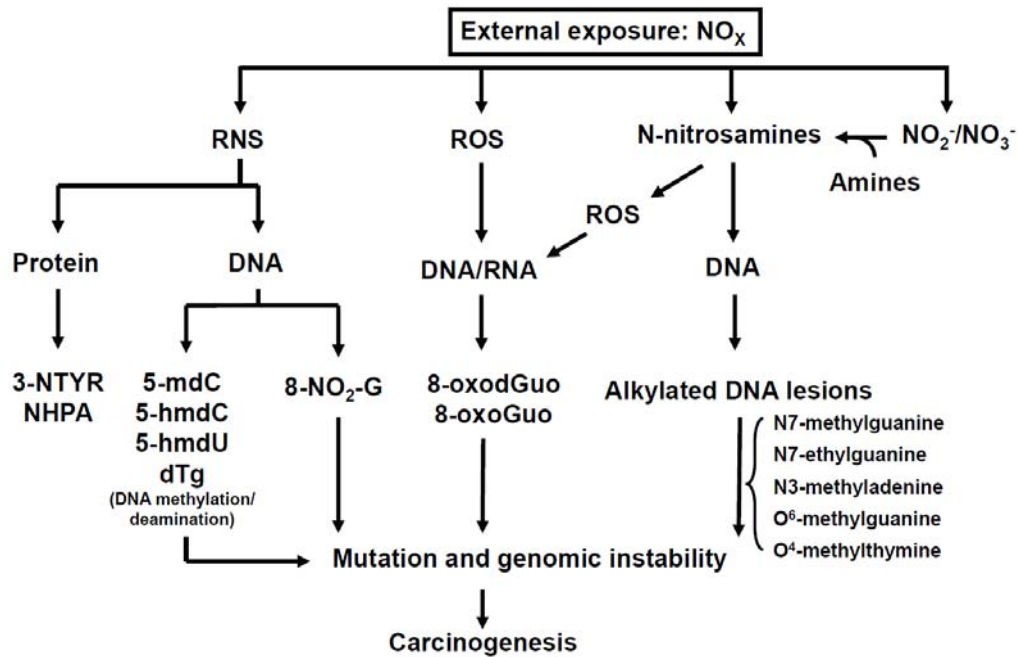
圖五、體內兩種形成 3-Nitrotyrosine 的反應途徑[Sun et al., 2007]

3-NTYR亦被認為與發炎反應、帕金森氏症、老年癡呆症等神經退化性疾病、心臟血管疾病以及癌症有關。研究發現在心血管病患組織樣本中平均可偵測到3-NTYR的範圍在10-100 pmol/mg，相當於每10000個tyrosine中有1-5個3-NTYR [Shishehbor et al., 2003]。

許多偵測體內3-NTYR的方法已被開發使用。3-NTYR在體內可被進一步代謝成主要代謝物3-nitro-4-hydroxyphenylacetic acid (NHPA)並由尿液排出。此外，當體內自由態的tyrosine代謝生成para-hydroxyphenylacetic acid (PHPA)後，PHPA也可經RNS硝化形成NHPA [Mani et al., 2003]，因此NHPA也可能是代表體內硝化壓力及蛋白質硝化傷害的重要指標[Dalle-Donne et al., 2006];然而卻從未有研究運用LC-MS/MS開發體液中NHPA的分析方法。

二、研究目的

本計劃將運用 on-line SPE LC-MS/MS 搭配同位素稀釋法(isotope dilution)建立各項氮氧化物暴露的生物偵測指標，並運用 NO_x(或其 ¹⁵N 同位素)暴露動物試驗探討所開發指標的適用性及特異性。圖六為本計畫 NO_x 暴露所考量的各項生物偵測指標：



圖六、氮氧化物暴露所造成之各項生物偵測指標及其潛在危害

本計劃「質譜法建立氮氧化物之生物暴露與效應指標:職業暴露危害研究」預計將執行三年，目標如下：

- (1) 運用 on-line SPE LC-MS/MS 搭配 isotope dilution 開發尿液中亞硝酸鹽/硝酸鹽(NO₂⁻及 NO₃⁻)、尿液中 DNA/蛋白質硝化傷害指標(8-NO₂-G、3-NTYR 及 NHPA)及尿液/細胞中 RNA 氧化傷害指標(8-oxoGuo)分析方法;
- (2) 運用 on-line SPE LC-MS/MS 搭配 isotope dilution 開發尿液/細胞中 DNA 表觀遺傳物質 5-mdC 及 5-hmdC 分析方法;
- (3) 探討各指標間的相關性

三、研究方法

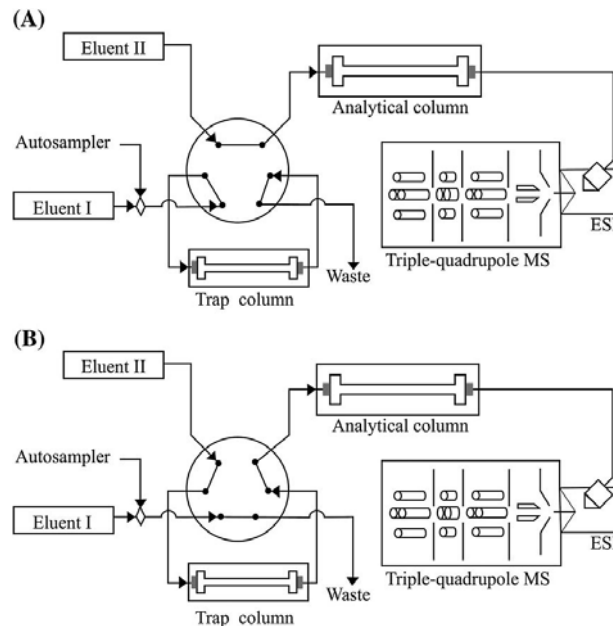
(1) 穩定同位素標準品

本研究採同位素稀釋法(isotope dilution)來進行質譜分析。¹⁵N-NaNO₂ and ¹⁵N-NaNO₃ 購自 Cambridge Isotope Laboratories 公司; ¹³C₂-¹⁵N-8-NO₂G、d₃-3-NTYR、¹³C-¹⁵N₂-8-oxoGuo、d₃-5-mdC 和 d₃-5-hmdC 購自 Toronto Research Chemicals 公司。¹⁵N-8-oxodGuo 購自 Sigma-Aldrich 公司。

d_3 -NHPA 無商業產品，我們參考先前文獻[Ohshima et al., 1990]自行合成，係利用 L-氨基酸氧化酶 (L-amino acid oxidase) 水解 d_3 -3-NTYR 以生成 d_3 -NHPA。所生成的 d_3 -NHPA 以 HPLC 純化、再利用 NHPA 外標準品搭配質譜儀定性及定量。

(2) 連線固相萃取液相層析串聯質譜儀(on-line SPE LC-MS/MS)

本研究將採用 on-line SPE LC-MS/MS(圖七)全面建立體液中各式 NO_x 暴露及效應的生物偵測指標之分析法。此外，由於香菸煙霧中含有 NO_x 及亞硝胺，吸煙習慣可能會干擾上述指標，因此我們也將運用已建立的 LC-MS/MS 方法分析尿液中的 nicotine 及 cotinine [Hu et al., 2010a]，以評估或校正吸煙暴露的影響。



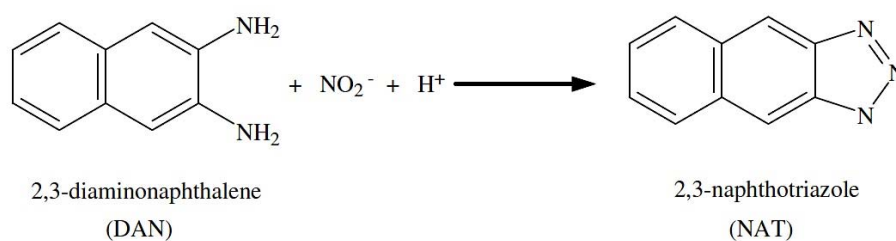
圖七、On-line SPE LC-MS/MS 之自動系統架構圖；(A)圖為樣本濃縮與淨化階段，(B)圖為待測分析物沖提並進入 HPLC 管柱層析及 MS/MS 進行分析[Hu et al., 2010b]

四、成果與討論

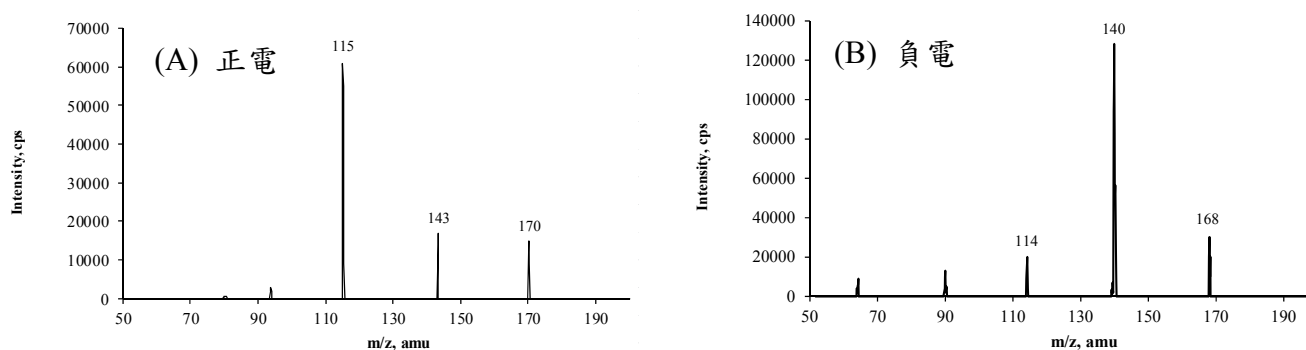
(1) 成功建立 on-line SPE LC-MS/MS 搭配同位素稀釋法及 2,3-diaminonaphthalene(DAN)衍生化分析尿液中亞硝酸鹽(NO₂⁻)

- 質譜正負電模式比較:** NO₂⁻與 DAN 衍生化反應後形成衍生物 2,3-naphthotriazole (NAT) (如圖八)。NAT 的分子量為 169。質譜條件設定為正電荷模式下操作，NAT 標準品以灌流方式，進行全離子掃描 (Q1 scan)可發現其母離子 m/z 170。以 m/z 170 進行子離子掃描，給予碰撞能量後，產生的子離子依訊號強度從大至小分別為 m/z 115、143 及 93 (圖九 A)。若將質譜條件設定為負電荷模式下操作，進行全離子掃描可發現其母離子 m/z 168。以 m/z 168 進行子離子掃描，產生的子離子訊號強度從大至小分別為 m/z 140 及 114 (圖九 B)。正電和負電模式下質譜參數如表一所示。比較正負電模式，發現兩種模式所產生的子離子訊號強度類似。我們選擇正電模式進行後續質譜分析方法開發。圖十為典型尿液樣本在正電模式下分析的層析圖

譜。NAT 的滯留時間為 9.5 分鐘。相關研究成果已發表在國際知名期刊 Free Radical Biology and Medicine [Chao et al., 2016]。



圖八、NAT 衍生物生成

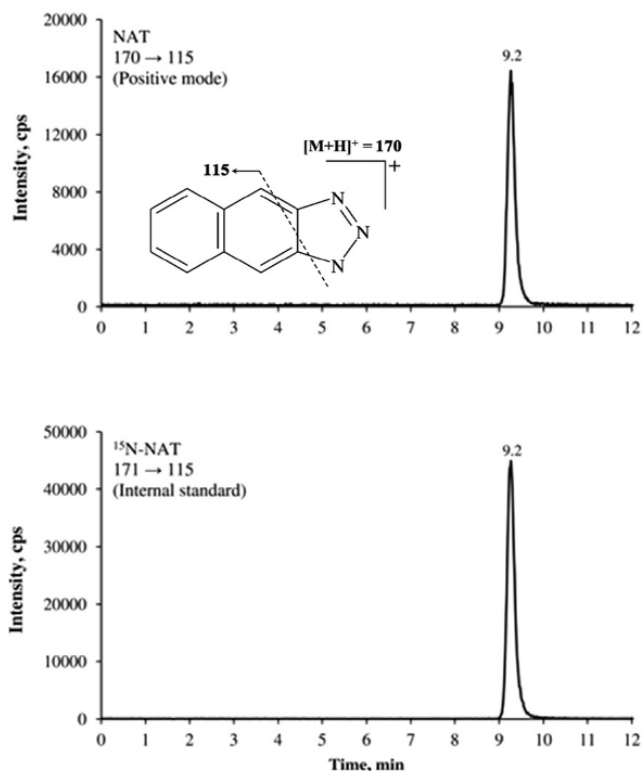


圖九、NAT 衍生物(A)正電子離子掃瞄及(B)負電子離子掃瞄

表一、NAT 的正電和負電模式下質譜參數

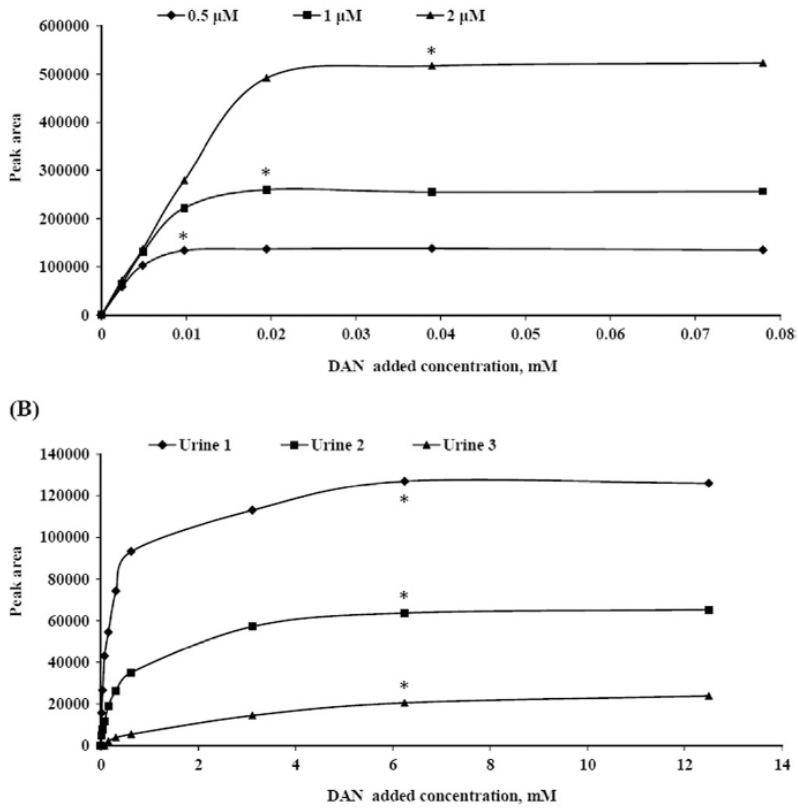
Models	Analytes	Q1 mass (amu)	Q3 mass (amu)	Dwell time (ms)	DP ^a (V)	FP ^b (V)	CE ^c (V)
Positive	NAT	170	115	100	30	150	30
	¹⁵ N-NAT	171	115	100	30	150	30
Negative	NAT	168	140	100	-60	-200	-30
	¹⁵ N-NAT	169	140	100	-60	-200	-30

^a declustering potential; ^b focusing potential; ^c collision energy



圖十、尿液中亞硝酸鹽(衍生物 NAT)on-line SPE LC-MS/MS 層析圖譜

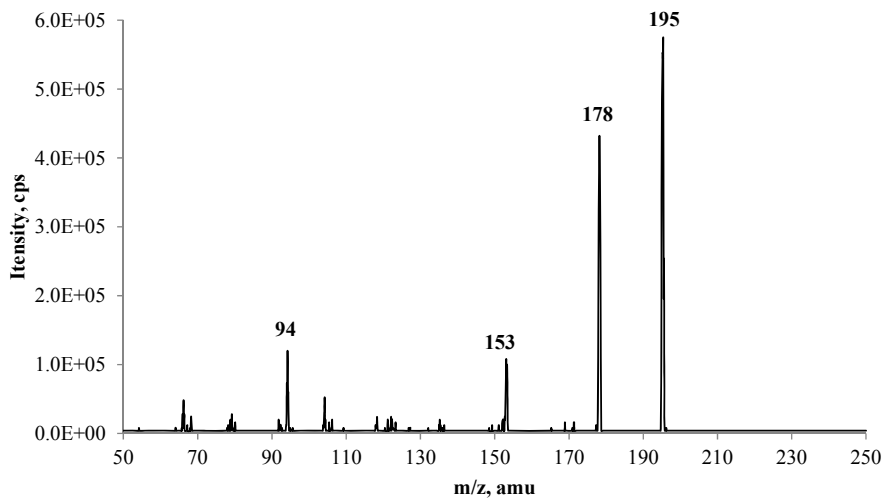
- b. NO_2^- 與 DAN 衍生化反應最佳化: 本研究為探討 NO_2^- 與 DAN 之最佳衍生化反應莫耳比, 我們將 NO_2^- 標準品配置於去離子水使其最終濃度為 0.5、1、2 μM , 與不同濃度 DAN 於 37°C 下反應 30 分鐘, 隨後加入 NaOH 以終止反應。圖十一為 NO_2^- 與 DAN 之衍生化反應曲線圖。在去離子水基質下, 三種不同濃度 NO_2^- 與 DAN 達到反應飽和所需 DAN 濃度分別為 0.00975、0.0195 及 0.039 mM (如圖十一 A)。DAN / NO_2^- 莫爾比為 1.95 即可達到反應飽和。在尿液基質下(5 倍稀釋尿樣), 三種不同濃度 (0.06-0.29 μM) 的尿液樣本皆需要與 6.25 mM DAN 才會達到反應飽和 (如圖十一 B) 而 DAN / NO_2^- 莫爾比為 2155-10,417。由此結果發現, 尿液中富含許多物質會與 DAN 反應。因此, 在尿液基質下需添加較多之 DAN 才足以與 NO_2^- 反應完全。故未來尿液樣本分析, DAN 的添加量皆為 6.25 mM。



圖十一、NO₂⁻與 DAN 之生化反應曲線圖：(A)以去離子水為基質(B)以尿液為基質 [Chao et al. 2016]

(2)成功建立 on-line SPE LC-MS/MS 搭配同位素稀釋法直接分析 DNA 硝化損傷產物 8-NO₂-G

a. 8-NO₂-G 質譜鑑定：8-NO₂-G 的分子量為 196。質譜條件設定為負電荷模式下操作，進行全離子掃描可發現其理論母離子 m/z 195。以母離子 m/z 195 進行子離子掃描其掃描結果如圖十二所示，產生的子離子依訊號強度分別為 m/z 178、94 及 153。表二為 8-NO₂-G 及其同位素內標準品質譜參數設定。



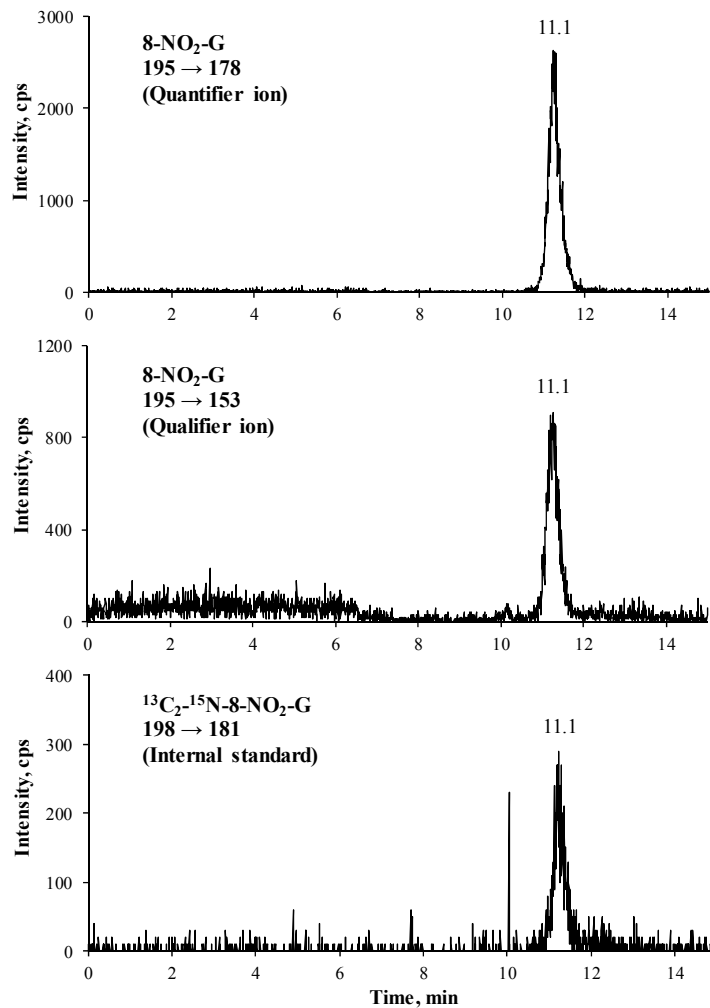
圖十二、8-NO₂-G 標準品子離子掃描

表二、8-NO₂-G 及 ¹³C₂-¹⁵N-8-NO₂-G 質譜參數設定

Analytes	Q1 mass (amu)	Q3 mass (amu)	Dwell time (ms)	DP ^c (V)	CXP ^d (V)	CE ^e (V)
8-NO ₂ -G	195	178 ^a	100	-50	-11	-20
	195	153 ^b	100	-50	-11	-20
¹³ C ₂ - ¹⁵ N-8-NO ₂ -G	198	181	100	-50	-11	-20
	198	156	100	-50	-11	-20

^a quantifier ion; ^b qualifier ion; ^c declustering potential; ^d collision exit potential; ^e collision energy

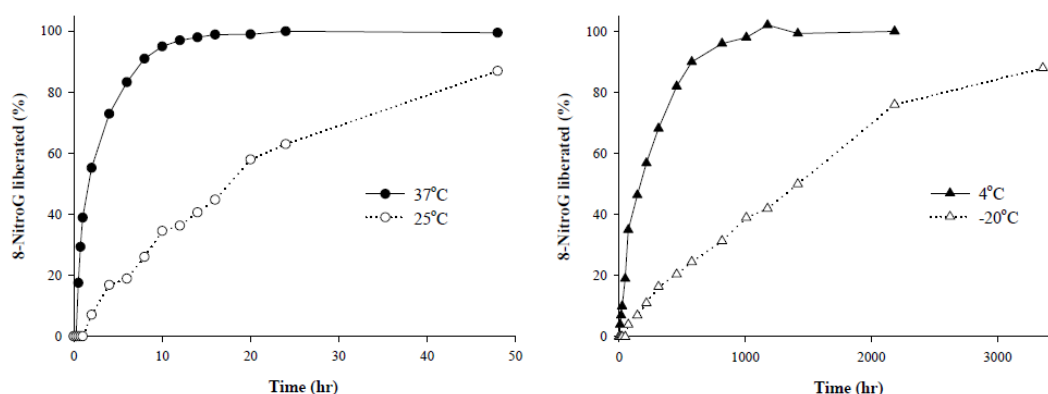
b. DNA 樣本分析: 為確認本分析方法能有效應用於真實樣品檢測，我們將分析方法直接量測 calf thymus DNA 與過氧亞硝酸鹽反應所生成的 8-NO₂-G。如下圖所示，我們所建立的分析方法可有效定量 calf thymus DNA 上的 8-NO₂-G。其滯留時間為 11.1 分鐘。



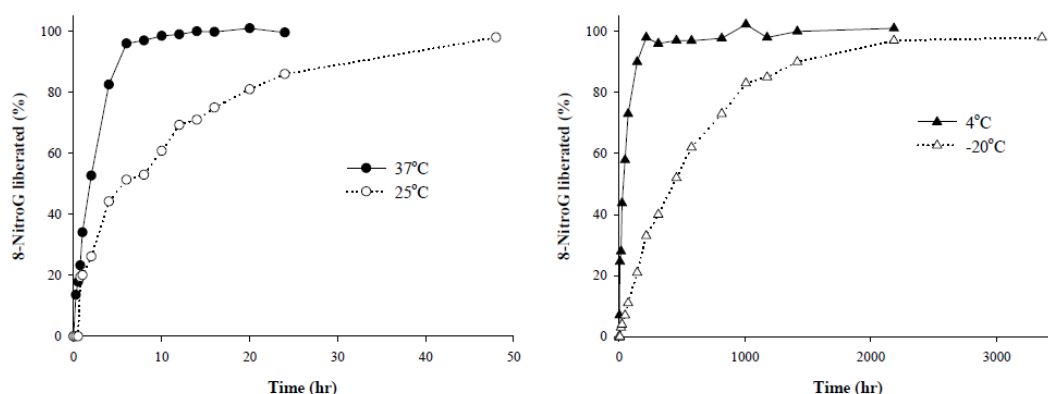
圖十三、8-NO₂-G on-line SPE LC-MS/MS 層析圖譜

c. DNA 上 8-NO₂-G 穩定性測試: DNA 上的 8-NO₂-G 非常的不穩定會自發性去嘌呤 (depurination)。探討其在 DNA 上的穩定性將有助於準確量測細胞內 8-NO₂-G。我們將過氧亞硝酸鹽與各種不同形式的 DNA 反應(包含單股 DNA 及雙股 DNA)，量測不同時間及溫度下 8-NO₂-G 釋出的程度。其結果如下圖所示，隨著溫度增加 8-NO₂-G 愈不穩定。雙股 DNA 上的半衰期分別為 2.4 hr (37°C)、16 hr (25°C)、94 hr (4°C)、1115 hr (-20°C)。而單股 DNA 上的半衰期分別為 1.6 hr (37°C)、8.5 hr (25°C)、52 hr (4°C)、533 hr (-20°C)。比較 8-NO₂-G 於單股 DNA 及雙股 DNA 上的穩定性，發現單股上的 8-NO₂-G 較不穩定。相關研究已投稿中[Hu et al., 2016]。

(A) DS-ctDNA 雙股 DNA



(B) SS-ctDNA 單股 DNA

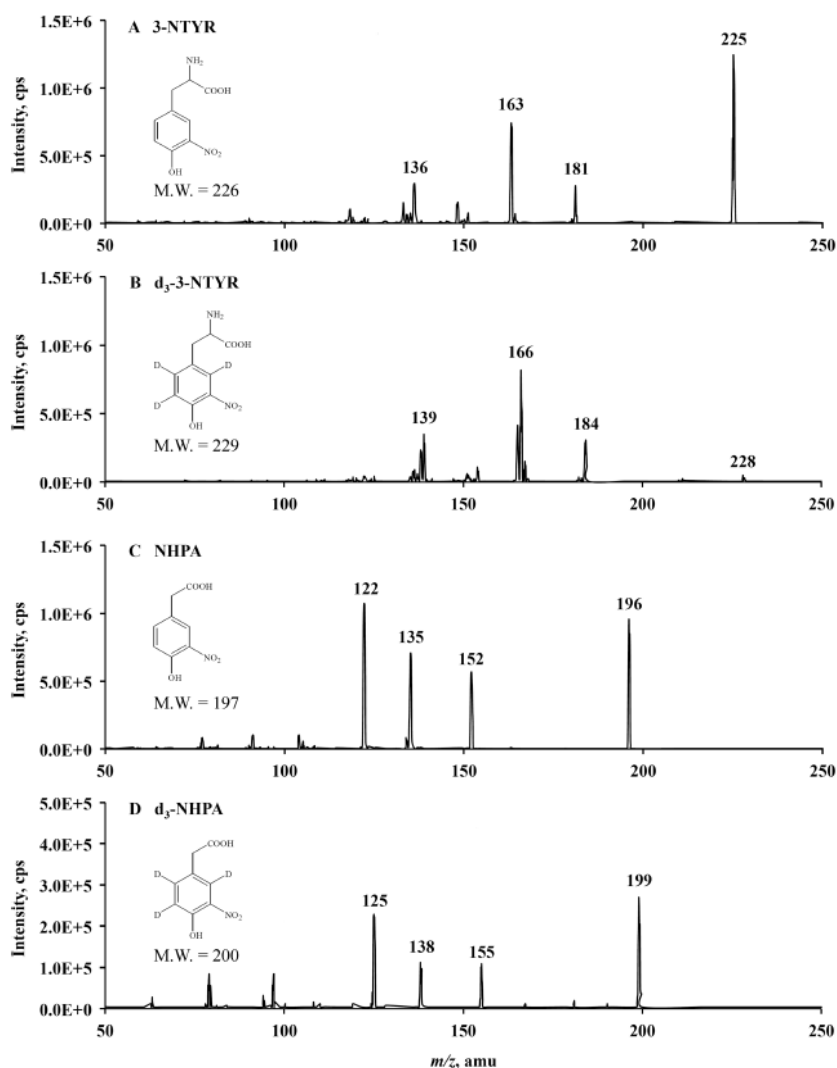


圖十四、8-NO₂-G 穩定性於(A)雙股 DNA (B)單股 DNA [Hu et al., 2016]

(3) 成功建立 on-line SPE LC-MS/MS 搭配同位素稀釋法分析尿液中 3-NTYR 及 NHPA

a. 3-NTYR 及 NHPA 標準品及其同位素內標準品之質譜鑑定: 3-NTYR 及 NHPA 為蛋白硝化傷害產物。3-NTYR 及 NHPA 的分子量分別為 226 及 197。質譜條件設定為負電荷模式下操作，進行全離子掃描可發現 3-NTYR 理論母離子 m/z 225。以母離子 m/z 225 進行子離子掃描其掃描結果如圖十五(A)所示，產生的子離子依訊號強度分別為 m/z 163、136 及 181。NHPA 在

負電荷模式下其理論母離子為 m/z 196。以母離子 m/z 196 進行子離子掃描其掃描結果如圖十五(C)所示，產生的子離子依訊號強度分別為 m/z 122、135 及 152。同位素內標準品 d_3 -3-NTYR 及 d_3 -NHPA 斷片模式與其外標準品一致如圖十五(B 及 D)所示。表三為 3-NTYR、NHPA 及其同位素內標準品質譜參數設定。相關研究成果已發表在國際知名期刊 *Chemical Research in Toxicology* [Chao et al., 2015]。



圖十五、3-NTYR、NHPA 及其同位素內標準品子離子掃描 [Chao et al., 2015]

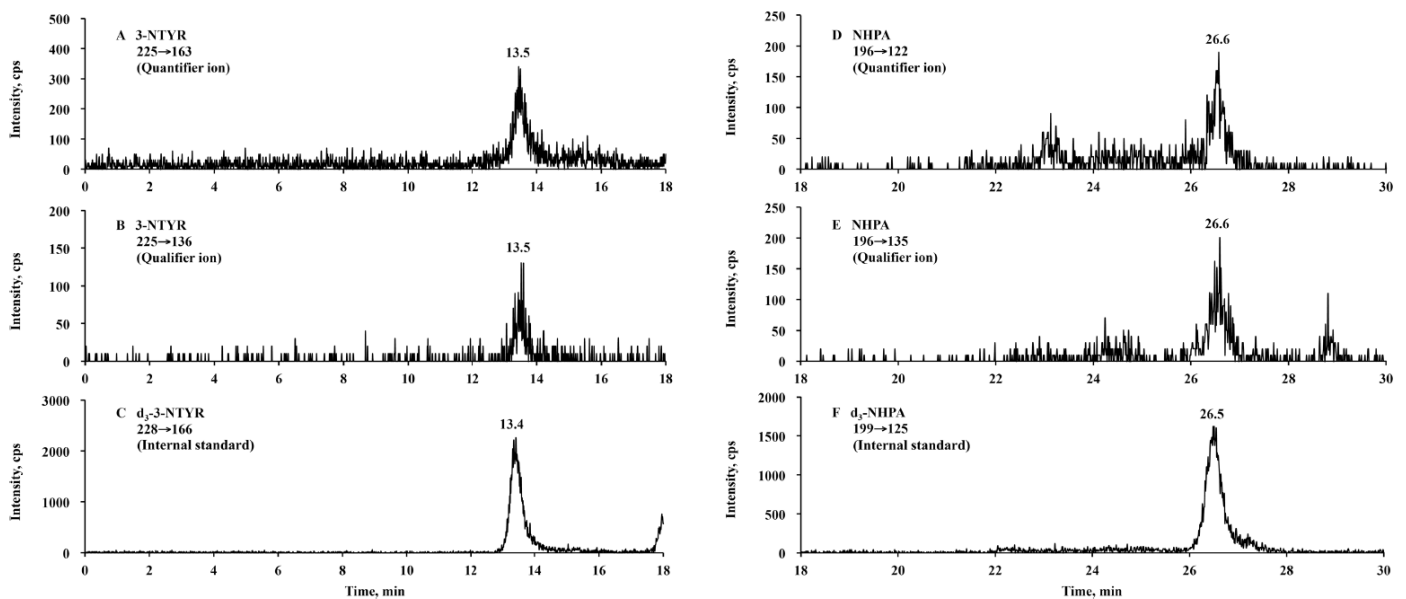
表三、3-NTYR、NHPA 及其同位素內標準品質譜參數設定

Analytes	Q1 mass (amu)	Q3 mass (amu)	Dwell time (ms)	DP ^c (V)	FP ^d (V)	CE ^e (V)
3-NTYR	225	163 ^a	100	-35	-130	-20
	225	136 ^b	100	-35	-130	-25
d_3 -3-NTYR	228	166	100	-50	-190	-20

NHPA	196	122	100	-30	-120	-15
	196	135	100	-30	-120	-15
d ₃ -NHPA	199	125	100	-40	-190	-15

^a quantifier ion; ^b qualifier ion; ^c declustering potential; ^d focusing potential; ^e collision energy

b. 尿液樣本分析:由於尿液中 3-NTYR 及 NHPA 濃度低,尿液樣本須利用手動固相萃取及 HPLC 進行純化/濃縮 30 倍,再由 on-line SPE LC-MS/MS 分析。圖十六為 3-NTYR 及 NHPA 典型尿液樣本層析結果。3-NTYR 及 NHPA 的滯留時間分別為 13.5 及 26.6 分鐘。



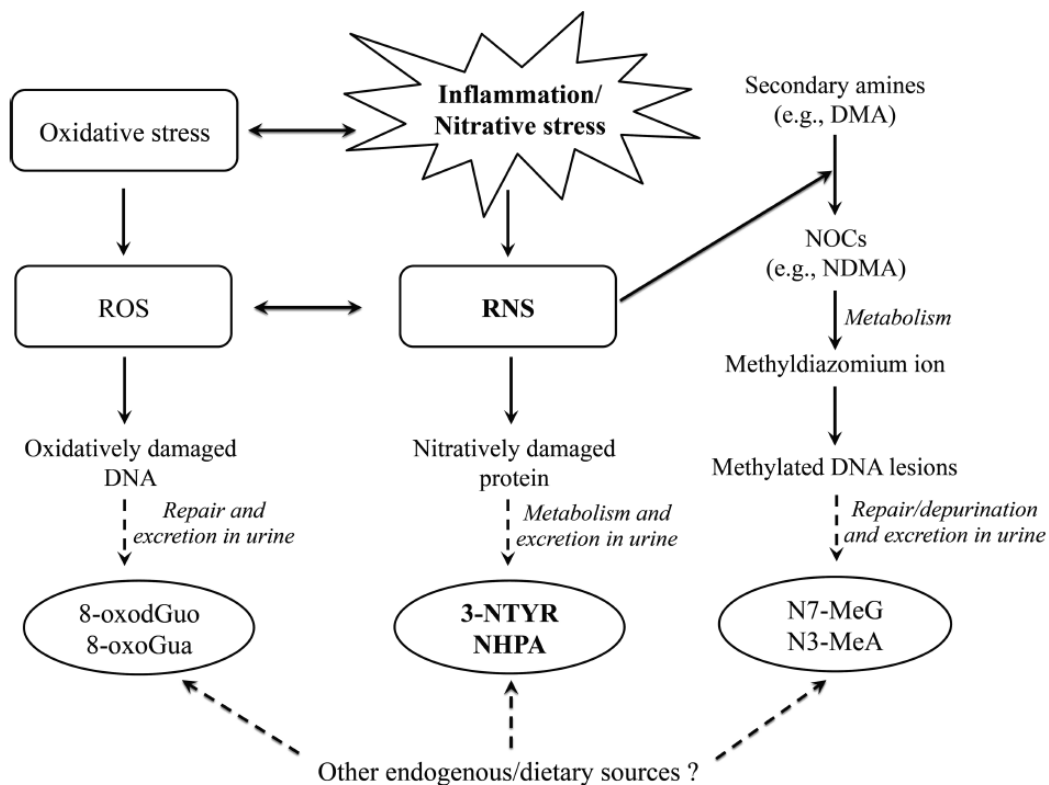
圖十六、3-NTYR 及 NHPA on-line SPE LC-MS/MS 尿液層析圖譜

c. 尿液中 3-NTYR、NHPA 與 DNA 基因損傷及 DNA 甲基化損傷產物的相關性:

我們分析 65 位健康人尿液中蛋白質硝化產物(3-NTYR 及 NHPA)、DNA 基因損傷產物(8-oxoGua 及 8-oxodGuo)、DNA 甲基化損傷產物(N7-MeG 及 N3-MeA)。結果發現蛋白質硝化產物、DNA 基因損傷產物及 DNA 甲基化損傷產物彼此統計上呈顯著相關,如下表所示。我們提出一假說用以解釋相關性的發生。如下圖所示,當體內有發炎或硝化壓力時,RNS(如 ONOO⁻)及 ROS 都會產生,進而促使體內重要分子硝化損傷(3-NTYR/NHPA)及氧化損傷(8-oxoGua /8-oxodGuo)。另一方面,RNS 會與體內二級胺或醃胺(如 dimethylamine and N-methylurea)反應生成致甲基化的產物,會進一步造成 DNA 甲基鍵結損傷(N7-MeG and N3-MeA)。

表四、尿液中蛋白硝化產物與 DNA 氧化及甲基化損傷產物相關性[Chao et al., 2015]

	3-NTYR	NHPA	8-oxoGua	8-oxodGuo	N7-MeG	N3-MeA
NHPA	$r = 0.411$ $P = 0.001$					
8-oxoGua	$r = 0.301$ $P = 0.015$	$r = 0.335$ $P = 0.006$				
8-oxodGuo	$r = 0.362$ $P = 0.003$	$r = 0.515$ $P < 0.001$	$r = 0.773$ $P < 0.001$			
N7-MeG	$r = 0.316$ $P = 0.010$	$r = 0.423$ $P < 0.001$	$r = 0.807$ $P < 0.001$	$r = 0.858$ $P < 0.001$		
N3-MeA	$r = 0.320$ $P = 0.009$	$r = 0.376$ $P = 0.002$	$r = 0.398$ $P = 0.001$	$r = 0.435$ $P < 0.001$	$r = 0.395$ $P = 0.001$	
NDMA	$r = 0.043$ $P = 0.738$	$r = 0.082$ $P = 0.526$	$r = -0.009$ $P = 0.942$	$r = 0.137$ $P = 0.289$	$r = 0.192$ $P = 0.135$	$r = 0.133$ $P = 0.302$

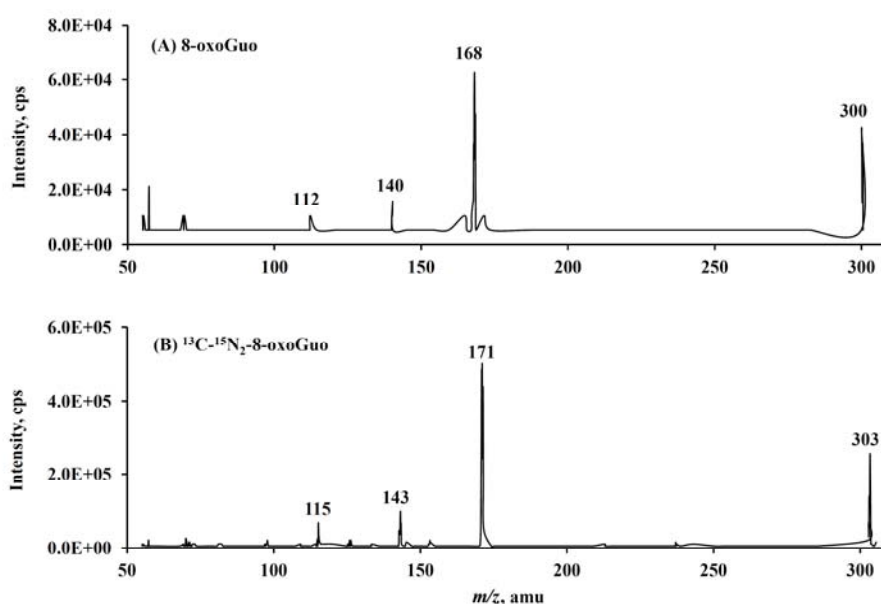


圖十七、蛋白硝化產物與 DNA 氧化及甲基化損傷產物相關性的可能機制[Chao et al., 2015]

(4) 成功建立 on-line SPE LC-MS/MS 搭配同位素稀釋法分析尿液中 DNA (8-oxoGua、8-oxodGuo)及 RNA 氧化損傷產物(8-oxoGuo)

- a. 8-oxoGuo 標準品及同位素內標準品 $^{13}\text{C}-^{15}\text{N}_2\text{-8-oxoGuo}$ 之質譜鑑定: 8-OxoGuo 為 RNA 的氧化損傷產物，8-oxoGuo 的分子量為 299。將質譜條件設定為正電荷模式下操作，進行全離子掃描可發現其理論母離子 m/z 300。將母離子進一步進行子離子掃描。如圖十八(A) 所示，掃描結果產生的子離子依訊號強度大小依次分別為 m/z 168、140 及 112。同位素內標準品 $^{13}\text{C}-^{15}\text{N}_2\text{-8-oxoGuo}$ 之分子量比 8-oxoGuo 多 3，進行全離子掃描可發現其理論母離子 m/z 303。以母離子 m/z 303 進行子離子掃描其結果如圖十八(B) 所示。產生之子離子依訊號強度大小依

序為 m/z 171、143 及 115。表五為 8-oxoGua 及 DNA 氧化傷害指標(8-oxoGua 及 8-oxodGuo) 質譜參數設定。



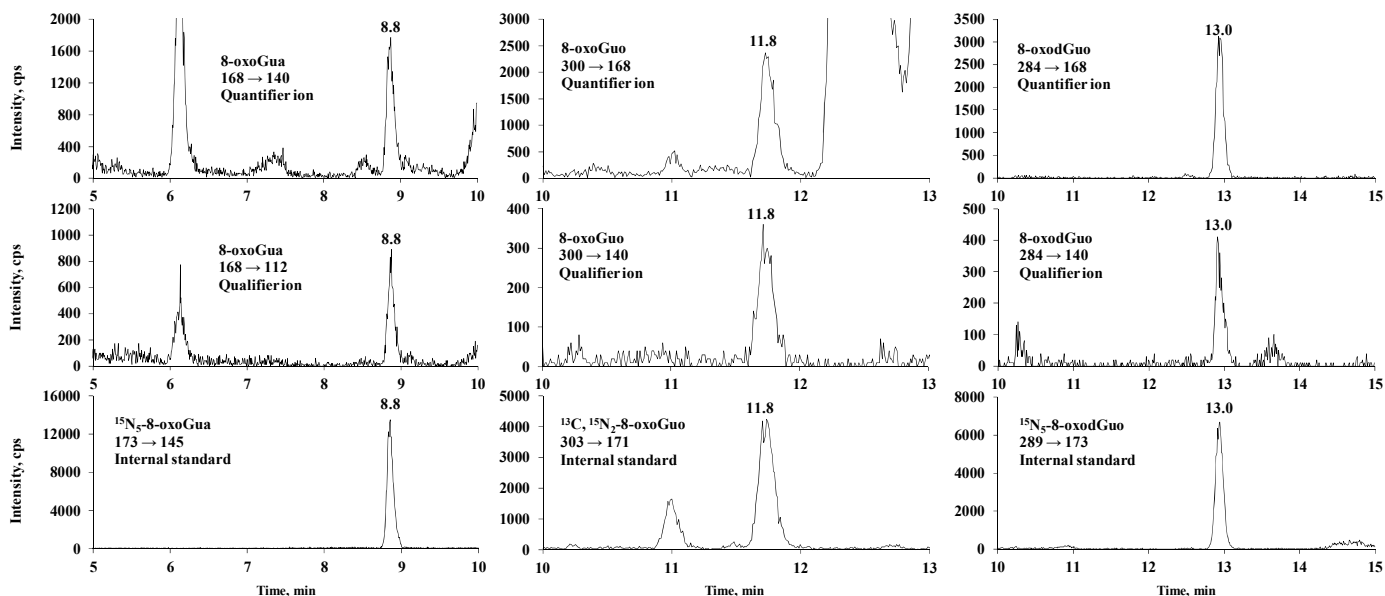
圖十八、8-oxoGua 標準品(A)和 $^{13}\text{C}-^{15}\text{N}_2$ -8-oxoGua 內標準品(B)的子離子掃描

表五、8-oxoGua, 8-oxodGuo 及 8-oxoGuo 質譜參數設定

Analytes	Q1 mass (amu)	Q3 mass (amu)	Dwell time (ms)	DP ^c (V)	CXP ^d (V)	CE ^e (V)
8-oxoGua	168	140 ^a	100	50	11	25
	168	112 ^b	100	50	11	30
$^{15}\text{N}_5$ -8-oxoGua	173	145	100	50	11	25
8-oxoGuo	300	168	100	40	10	20
	300	140	100	40	10	45
$^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}_2$ -8-oxoGuo	303	171	100	40	10	20
8-oxodGuo	284	168	100	30	10	15
	284	140	100	30	10	45
$^{15}\text{N}_5$ -8-oxodGuo	289	173	100	30	10	15

^a quantifier ion; ^b qualifier ion; ^c declustering potential; ^d collision exit potential; ^e collision energy

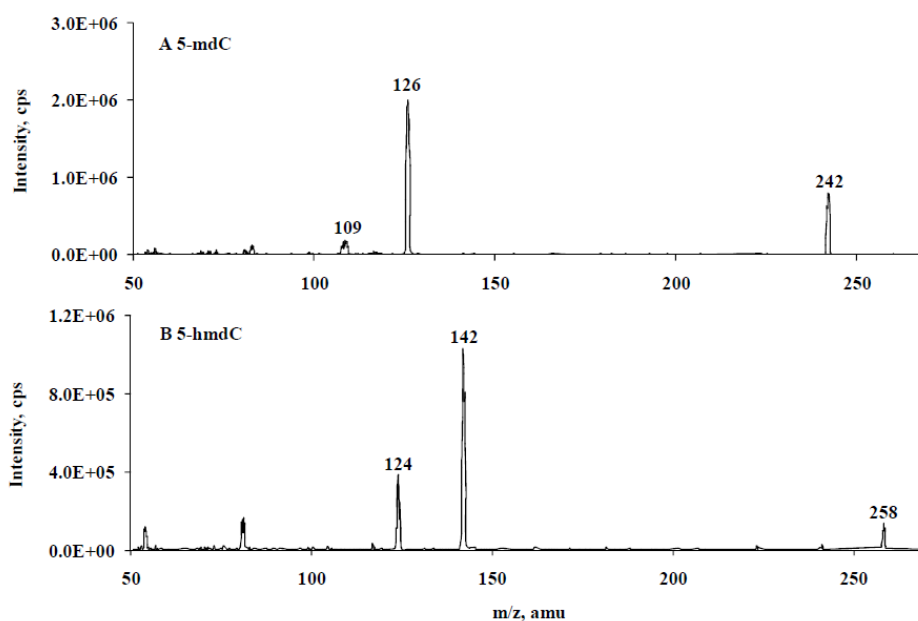
b. 尿液樣本分析: 尿液稀釋 2 倍後加入同位素內標後直接以 on-line SPE LC-MS/MS 分析。圖十九為同時分析尿液中 8-oxoGua、8-oxodGuo 及 8-oxoGuo 層析結果。8-oxoGua、8-oxodGuo 及 8-oxoGuo 的滯留時間分別為 8.8、13.0 及 11.8 分鐘，與其各自同位素內標準品滯留時間相同。



圖十九、尿液 8-oxoGua、8-oxodGuo 及 8-oxoGuo 層析圖譜

(5) 成功建立 on-line SPE LC-MS/MS 搭配同位素稀釋法分析尿液中 5-mdC 及 5-hmdC

a. 5-mdC 及 5-hmdC 標準品及同位素內標準品之質譜鑑定: 5-mdC 及 5-hmdC 為 DNA 表觀遺傳物質。5-mdC 及 5-hmdC 的分子量分別為 241 及 257。質譜條件設定為正電荷模式下操作，進行全離子掃描可發現 5-mdC 理論母離子 m/z 242。以母離子 m/z 242 進行子離子掃描其掃描結果如下圖(A)所示，產生的子離子依訊號強度分別為 m/z 126 及 109。5-hmdC 在正電荷模式下其理論母離子為 m/z 258。以母離子 m/z 258 進行子離子掃描其掃描結果如圖二十(B)所示，產生的子離子依訊號強度分別為 m/z 142 及 124。同位素內標準品 d_3 -5-mdC 及 d_3 -5-hmdC 斷片模式與其外標準品一致。表六為 5-mdC、5-hmdC 及其同位素內標準品質譜參數設定。部分研究成果已發表在國際知名期刊 *Chemical Research in Toxicology* [Hu et al., 2012]。



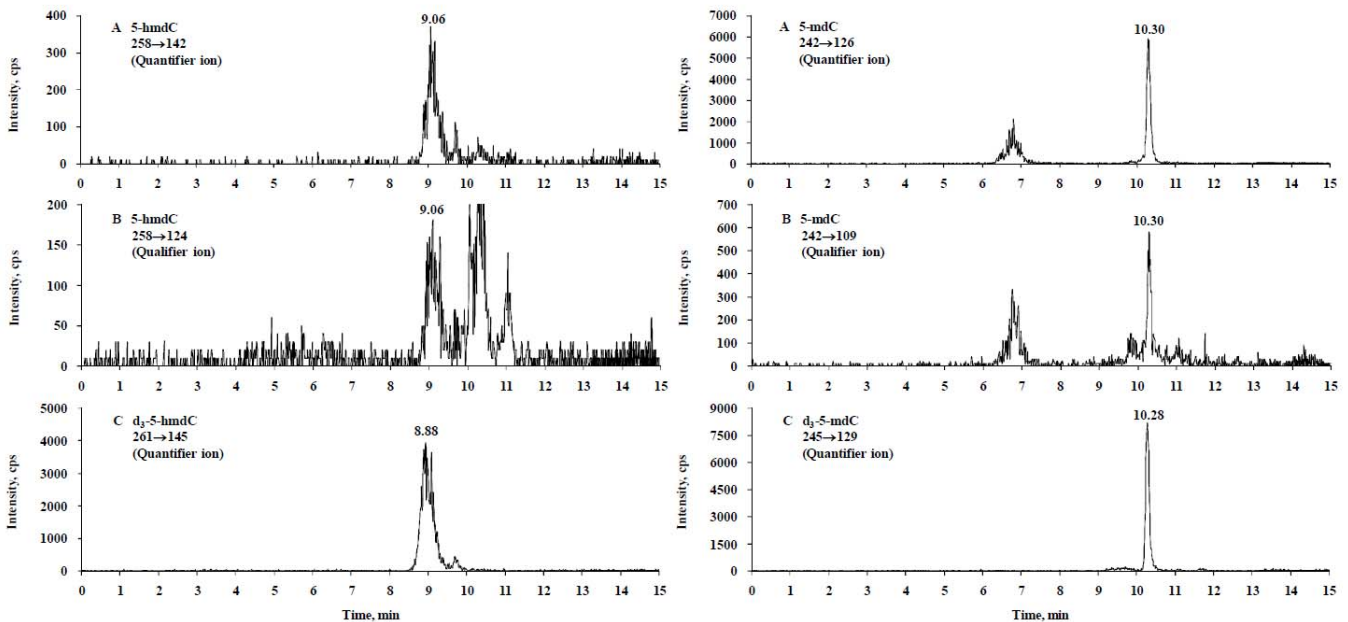
圖二十、5-mdC 及 5-hmdC 標準品子離子掃描

表六、5-mdC、5-hmdC 及其同位素內標準品質譜參數設定

Analytes	Q1 mass (amu)	Q3 mass (amu)	Dwell time (ms)	DP ^c (V)	CE ^d (V)
5-mdC	242	126 ^a	100	40	15
	242	109 ^b	100	40	50
d ₃ -5-mdC	245	129	100	40	15
5-hmdC	258	142	100	40	15
	258	124	100	40	35
d ₃ -5-hmdC	261	145	100	40	15

^a quantifier ion; ^b qualifier ion; ^c declustering potential; ^d collision energy

b. 尿液樣本分析: 尿液稀釋 5 倍後加入同位素內標後直接以 on-line SPE LC-MS/MS 分析。圖二十一為同時分析尿液中 5-mdC 及 5-hmdC 層析結果。5-mdC 及 5-hmdC 的滯留時間分別為 10.3 及 9.0 分鐘。



圖二十一、尿液中 5-mdC/5-hmdC on-line SPE LC-MS/MS 層析圖譜

五、計畫成果自評

NO_x 是極普遍存在的空氣污染物，只要有燃燒就可產生的毒性氣體。外在氮氧化物暴露可在體內衍生致癌物質外，同時可生成 ROS 及 RNS 進而造成氧化壓力或硝化壓力；研究也證實

ROS/RNS 是老化、慢性病及多種癌症的重要原因。本計畫執行三年已成功利用 on-line SPE LC-MS/MS 建立多種生物指標可用以評估 NO_x 暴露及探討其可能造成的健康危害 (包括體內重要分子的硝化性損傷及氧化性損傷。生物指標分析方法有:尿液中亞硝酸鹽、DNA 的硝化傷害指標 (8-NO₂-G)、蛋白質的硝化傷害指標 (3-NTYR 及 NHPA)、RNA 氧化傷害指標(8-oxoGuo) 及 DNA 表觀遺傳物質 5-mdC/5-hmdC。對於 DNA 氧化傷害指標及蛋白硝化傷害指標間的相關性更進一步提出假說。本研究建立多種高敏感度高特異性的質譜分析方法, 其相關研究成果將幫助了解 NO_x 暴露對人體可能的健康危害。三年因本計畫支持共計發表:

SCI 國際期刊 10 篇:

1. **Chiung-Wen Hu**, Jian-Lian Chen, Yuan-Jhe Chang, Yu-Wen Hsu, Chih-Hung Hu, Mu-Rong Chao. A comprehensive analysis of formation and stability of peroxyxynitrite-derived 8-nitroguanine in vitro by online column-switching LC-MS/MS. Submitted.
2. Mu-Rong Chao, Ying-Ming Shih, Yu-Wen Hsu, Hung-Hsin Liu, Yuan-Jhe Chang, Bo-Huei Lin, **Chiung-Wen Hu*** (**Corresponding Author**). Urinary nitrite/nitrate ratio measured by isotope-dilution LC-MS/MS as a tool to screen for urinary tract infections. *Free Radical Biology and Medicine*, 2016, 93, 77-83. (SCI; Impact factor = **5.784**, Ranking in Biochemistry & Molecular Biology = 37/289 = 12.8%).
3. Mu-Rong Chao, Yu-Wen Hsu, Hung-Hsin Liu, Jia-Hong Lin, **Chiung-Wen Hu*** (**Corresponding Author**). Simultaneous detection of 3-nitrotyrosine and 3-nitro-4-hydroxyphenylacetic acid in human urine by online SPE LC-MS/MS and their association with oxidative and methylated DNA lesions. *Chemical Research in Toxicology*, 2015, 28, 997-1006. (SCI; Impact factor = **3.025**, Ranking in Chemistry, medicinal = 17/59 = 28.8%).
4. **Chiung-Wen Hu**, Marcus S. Cooke, Yi-Hung Tsai, Mu-Rong Chao. 8-Oxo-7,8-dihydroguanine and 8-oxo-7,8-dihydro-2-deoxyguanosine concentrations in various human body fluids: implications for their measurement and interpretation. *Archives of Toxicology*, 2015, 89, 201-210. (SCI; Impact factor = **6.637**, Ranking in Toxicology = 5/89 = 5.6%).
5. **Chiung-Wen Hu**, Jian-Lian Chen, Yu-Wen Hsu, Cheng-Chieh Yen, Mu-Rong Chao. Trace analysis of methylated and hydroxymethylated cytosines in DNA by isotope-dilution LC-MS/MS: first evidence of DNA methylation in *Caenorhabditis elegans*. *Biochemical Journal*, 2015, 465, 39-47. (SCI; Impact factor = **3.562**, Ranking in Biochemistry & Molecular Biology = 94/289 = 32.5%).
6. Mu-Rong Chao, Domniki Fragou, Panos Zanos, **Chiung-Wen Hu**, Alexis Bailey, Sofia Kouidou, Leda Kovatsi. Epigenetically modified nucleotides in chronic heroin and cocaine treated mice. *Toxicology Letters*, 2014, 229, 451-457. (SCI; Impact factor = **3.522**, Ranking in Toxicology = 18/89 = 20.2%).
7. **Chiung-Wen Hu**, Yu-Wen Hsu, Jian-Lian Chen, Lai-Man Tam, Mu-Rong Chao. Direct analysis of tobacco-specific nitrosamine NNK and its metabolite NNAL in human urine by LC-MS/MS: evidence of linkage to methylated DNA lesions. *Archives of Toxicology*, 2014, 88, 291-299. (SCI; Impact factor = **6.637**, Ranking in Toxicology = 5/89 = 5.6%).
8. Mu-Rong Chao, Pavel Rossner Jr., Siamak Haghdoost, Hueiwang Anna Jeng, **Chiung-Wen Hu**. Nucleic Acid Oxidation in Human Health and Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, 2013, 368651. (SCI; Impact factor = **4.492**, Ranking in Cell Biology = 53/187 = 28.3%).
9. **Chiung-Wen Hu**, Huei Lee, Jian-Lian Chen, Yi-Jie Li, Mu-Rong Chao. Optimization of global DNA methylation measurement by LC-MS/MS and its application in lung cancer patients. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2013, 405, 8859-8869. (SCI; Impact factor = **3.125**, Ranking in Chemistry, analytical = 15/75 = 20%).
10. **Chiung-Wen Hu**, Hung-Hsin Liu, Yi-Jie Li, Mu-Rong Chao. Direct analysis of 5-methylcytosine and 5-methyl-2'-deoxycytidine in human urine by isotope dilution LC-MS/MS: correlations with

N-methylated purines and oxidized DNA lesions. *Chemical Research in Toxicology*, 2012, 25, 462-470. (SCI; Impact factor = **3.025**, Ranking in Chemistry, medicinal = 17/59 = 28.8%).

國際會議論文 10 篇:

1. Chi-Syuan Liao, Yi Hung Tsai, Ying-Ming Shih, Mu-Rong Chao, **Chiung-Wen Hu**. "Urinary levels of oxidative stress biomarkers in patients with mechanical ventilation". the 56th Annual Meeting of Japanese Respiratory Society, EPD8-3, April 8-10, 2016, Kyoto, Japan.
2. Ying-Ming Shih, Ciao-Han Sie, Chi-Syuan Liao, **Chiung-Wen Hu**, Mu-Rong Chao. "Tobacco-specific nitrosamine NNK and its metabolite NNAL in patients with chronic obstructive pulmonary disease". the 56th Annual Meeting of Japanese Respiratory Society, EPD3-2, April 8-10, 2016, Kyoto, Japan.
3. Massimiliano Mascelloni, Barbara Macias-Hernandez, Silvia Fustinoni, Elisa Polledri, Laura Campo, Mu-Rong Chao, **Chiung-Wen Hu**, Marcus S. Cooke, Roy M. Harrison, Juana Maria Delgado-Saborit." Biomonitoring of exposure to air pollutants: contribution of different air pollution sources towards oxidative stress". the 25th anniversary of International Society for Exposure Science, Oct. 18-22, 2015, Nevada, USA.
4. **Chiung-Wen Hu**, Yi-Hung Tsai, Mu-Rong Chao. "Simultaneous analysis of oxidative DNA and RNA damage products in urine by automated online solid-phase extraction LC-MS/MS". the 15th International Congress of Radiation Research, 3-PS3B-07, May 25-29, 2015, Kyoto, Japan.
5. Mu-Rong Chao, Yi-Hung Tsai, **Chiung-Wen Hu**. "Quantitative analysis of 5-hydroxymethyl-2'-deoxycytidine in human urine by automated online solid-phase extraction LC-MS/MS". the 15th International Congress of Radiation Research, 3-PS3B-08, May 25-29, 2015, Kyoto, Japan.
6. Lin Bo-Huei, **Chiung-Wen Hu**, Mu-Rong Chao. "Urinary analysis of nitrite by isotope dilution LC-MS/MS with automated solid-phase extraction" Clinical Applications of Mass Spectrometry Conference, pp.14, 29-30 October 2014, Barcelona, Spain.
7. Yi-Chen Hsieh, **Chiung-Wen Hu**, Mu-Rong Chao. "Determination of urinary nitrate by isotope dilution LC-MS/MS coupled with automated solid-phase extraction sample preparation" Clinical Applications of Mass Spectrometry Conference, pp.14, 29-30 October 2014, Barcelona, Spain.
8. Chia-Yu Wang, Yi-Hung Tsai, Mu-Rong Chao, **Chiung-Wen Hu**. "Urinary analysis of 8-oxo-7, 8-dihydroguanosine by isotope dilution LC-MS/MS with automated solid-phase extraction" Separation Science Asia 2014, pp.10, 19-20 November 2014, Biopolis, Singapore.
9. Chih-Hung Hu, Yu-Wen Hsu, **Chiung-Wen Hu**, Mu-Rong Chao. "Direct analysis of 8-nitroguanine in DNA by isotope dilution LC-MS/MS coupled with automated solid-phase extraction" Separation Science Asia 2014, pp.10, 19-20 November 2014, Biopolis, Singapore.
10. **Chiung-Wen Hu**, Mu-Rong Chao. "Clinical diagnosis of tobacco/areca nut exposure" (Invited Lecture). Mass Spectrometry for Clinical Diagnosis 2014, pp.42, November 7-8, Kaohsiung.

參考文獻

Abdel Mohsen, M. A., Hassan, A. A., El-Sewedy, S. M., Aboul-Azm, T., Magagnotti, C., Fanelli, R., Airoidi, L. Biomonitoring of n-nitroso compounds, nitrite and nitrate in the urine of Egyptian bladder cancer patients with or without Schistosoma haematobium infection. *Int J Cancer* 1999;82:789-94.

- Broedbaek, K., Siersma, V., Henriksen, T., Weimann, A., Petersen, M., Andersen, J. T., Jimenez-Solem, E., Stovgaard, E. S., Hansen, L. J., Henriksen, J. E., Bonnema, S. J., Olivarius Nde, F., Poulsen, H. E. Urinary markers of nucleic acid oxidation and long-term mortality of newly diagnosed type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2011;34:2594-6.
- Bryan, N. S., Alexander, D. D., Coughlin, J. R., Milkowski, A. L., Boffetta, P. Ingested nitrate and nitrite and stomach cancer risk: an updated review. *Food Chem Toxicol* 2012;50:3646-65.
- Chao, M. R., Shih, Y. M., Hsu, Y. W., Liu, H. H., Chang, Y. J., Lin, B. H., Hu, C. W. Urinary nitrite/nitrate ratio measured by isotope-dilution LC-MS/MS as a tool to screen for urinary tract infections. *Free Radic Biol Med* 2016;93:77-83.
- Chao, M. R., Hsu, Y. W., Liu, H. H., Lin, J. H., Hu, C. W. Simultaneous detection of 3-nitrotyrosine and 3-nitro-4-hydroxyphenylacetic acid in human urine by online SPE LC-MS/MS and their association with oxidative and methylated DNA lesions. *Chem Res Toxicol* 2015;28:997-1006.
- Chao, M. R., Wang, C. J., Wu, M. T., Pan, C. H., Kuo, C. Y., Yang, H. J., Chang, L. W., Hu, C. W. Repeated measurements of urinary methylated/oxidative DNA lesions, acute toxicity, and mutagenicity in coke oven workers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17:3381-9.
- Chao, M. R., Wang, C. J., Yang, H. H., Chang, L. W., Hu, C. W. Rapid and sensitive quantification of urinary N7-methylguanine by isotope-dilution liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry with on-line solid-phase extraction. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2005;19:2427-32.
- Chen, H. J., Chen, Y. M., Wang, T. F., Wang, K. S., Shiea, J. 8-Nitroxanthine, an adduct derived from 2'-deoxyguanosine or DNA reaction with nitryl chloride. *Chem Res Toxicol* 2001;14:536-46.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., Milzani, A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem* 2006;52:601-23.
- Garland, W. A., Kuenzig, W., Rubio, F., Kornychuk, H., Norkus, E. P., Conney, A. H. Urinary excretion of nitrosodimethylamine and nitrosoproline in humans: interindividual and intraindividual differences and the effect of administered ascorbic acid and alpha-tocopherol. *Cancer Res* 1986;46:5392-400.
- Grisham, M. B., Jour'd'heuil, D., Wink, D. A. Review article: chronic inflammation and reactive oxygen and nitrogen metabolism--implications in DNA damage and mutagenesis. *Aliment Pharmacol Ther* 2000;14 Suppl 1:3-9.
- Hofer, T., Seo, A. Y., Prudencio, M., Leeuwenburgh, C. A method to determine RNA and DNA oxidation simultaneously by HPLC-ECD: greater RNA than DNA oxidation in rat liver after doxorubicin administration. *Biol Chem* 2006;387:103-11.
- Hu, C. W., Chen, J. L., Chang, Y. J., Hsu, Y. W., Hu, C. H., Chao, M. R. A comprehensive analysis of formation and stability of peroxynitrite-derived 8-nitroguanine in vitro by online column-switching LC-MS/MS. 2016 (Submitted)
- Hu, C. W., Chen, C. M., Ho, H. H., Chao, M. R. Simultaneous quantification of methylated purines in DNA by isotope dilution LC-MS/MS coupled with automated solid-phase extraction. *Anal Bioanal Chem* 2012a;402:1199-208.
- Hu, C. W., Liu, H. H., Li, Y. J., Chao, M. R. Direct analysis of 5-methylcytosine and 5-methyl-2'-deoxycytidine in human urine by isotope dilution LC-MS/MS: correlations with N-methylated purines and oxidized DNA lesions. *Chem Res Toxicol* 2012b;25:462-70.
- Hu, C. W., Chang Y. Z., Wang, H. W., Chao M. R.. High-throughput simultaneous analysis of five urinary metabolites of areca nut and tobacco alkaloids by isotope-dilution LC-MS/MS with on-line solid-phase extraction. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010a;19:2570-81.
- Hu, C. W., Chao, M. R., Sie, C. H. Urinary analysis of 8-oxo-7,8-dihydroguanine and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine by isotope-dilution LC-MS/MS with automated solid-phase extraction: Study of 8-oxo-7,8-dihydroguanine stability. *Free Radic Biol Med* 2010b; 48:89-97.
- Iavicoli, I., Carelli, G. Evaluation of occupational exposure to N-nitrosamines in a rubber-manufacturing industry. *J Occup Environ Med* 2006;48:195-8.

- Ichiba, M., Matsumoto, A., Kondoh, T., Horita, M., Tomokuni, K. Decreasing urinary PAH metabolites and 7-methylguanine after smoking cessation. *Int Arch Occup Environ Health* 2006;79:545-9.
- Jourd'heuil, D., Kang, D., Grisham, M. B. Interactions between superoxide and nitric oxide: Implications in DNA damage and mutagenesis. *Frontiers in Bioscience (online)* 1997;2:D189-96.
- Kawanishi, S., Hiraku, Y. Oxidative and nitrative DNA damage as biomarker for carcinogenesis with special reference to inflammation. *Antioxid Redox Signal* 2006;8:1047-58.
- Loft, S., Svoboda, P., Kasai, H., Tjonneland, A., Moller, P., Sorensen, M., Overvad, K., Autrup, H., Raaschou-Nielsen, O. Prospective study of urinary excretion of 7-methylguanine and the risk of lung cancer: Effect modification by mu class glutathione-S-transferases. *Int J Cancer* 2007;121:1579-84.
- Malayappan, B., Garrett, T. J., Segal, M., Leeuwenburgh, C. Urinary analysis of 8-oxoguanine, 8-oxoguanosine, fapy-guanine and 8-oxo-2'-deoxyguanosine by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry as a measure of oxidative stress. *J Chromatogr A* 2007;1167:54-62.
- Mani, A. R., Pannala, A. S., Orie, N. N., Ollosson, R., Harry, D., Rice-Evans, C. A., Moore, K. P. Nitration of endogenous para-hydroxyphenylacetic acid and the metabolism of nitrotyrosine. *Biochem J* 2003;374:521-7.
- Muller, H. M., Widschwendter, M. Methylated DNA as a possible screening marker for neoplastic disease in several body fluids. *Expert Rev Mol Diagn* 2003;3:443-58.
- Ohshima, H., Friesen, M., Brouet, I., and Bartsch, H. Nitrotyrosine as a new marker for endogenous nitrosation and nitration of proteins. *Food Chem Toxicol* 1990;28:647-52.
- Ohshima, H., Sawa, T., Akaike, T. 8-nitroguanine, a product of nitrative DNA damage caused by reactive nitrogen species: formation, occurrence, and implications in inflammation and carcinogenesis. *Antioxid Redox Signal* 2006;8:1033-45.
- Roberts, R. A., Smith, R. A., Safe, S., Szabo, C., Tjalkens, R. B., Robertson, F. M. Toxicological and pathophysiological roles of reactive oxygen and nitrogen species. *Toxicology* 2010;276:85-94.
- Shishehbor, M. H., Aviles, R. J., Brennan, M. L., Fu, X., Goormastic, M., Pearce, G. L., Gokce, N., Keaney, J. F., Jr., Penn, M. S., Sprecher, D. L., Vita, J. A., Hazen, S. L. Association of nitrotyrosine levels with cardiovascular disease and modulation by statin therapy. *JAMA* 2003;289:1675-80.
- Sun, Y. C., Chang, P. Y., Tsao, K. C., Wu, T. L., Sun, C. F., Wu, L. L., Wu, J. T. Establishment of a sandwich ELISA using commercial antibody for plasma or serum 3-nitrotyrosine (3NT). Elevation in inflammatory diseases and complementary between 3NT and myeloperoxidase. *Clin Chim Acta* 2007;378:175-80.
- Tsai, J. H., Lin, K. H., Chen, C. Y., Ding, J. Y., Choa, C. G., Chiang, H. L. Chemical constituents in particulate emissions from an integrated iron and steel facility. *J Hazard Mater* 2007;147:111-9.
- Vermeer, I. T., Engels, L. G., Pachen, D. M., Dallinga, J. W., Kleinjans, J. C., van Maanen, J. M. Intra-gastric volatile N-nitrosamines, nitrite, pH, and *Helicobacter pylori* during long-term treatment with omeprazole. *Gastroenterology* 2001;121:517-25.

科技部補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2016/08/29

科技部補助計畫	計畫名稱: 質譜法建立氮氧化物之生物暴露與效應指標:職業暴露危害研究
	計畫主持人: 胡瓊文
	計畫編號: 102-2314-B-040-016-MY3 學門領域: 公共衛生及環境醫學
無研發成果推廣資料	

102年度專題研究計畫成果彙整表

計畫主持人：胡瓊文			計畫編號：102-2314-B-040-016-MY3				
計畫名稱：質譜法建立氮氧化物之生物暴露與效應指標:職業暴露危害研究							
成果項目			量化	單位	質化 (說明：各成果項目請附佐證資料或細項說明，如期刊名稱、年份、卷期、起訖頁數、證號...等)		
國內	學術性論文	期刊論文		0	篇		
		研討會論文		0			
		專書		0	本		
		專書論文		0	章		
		技術報告		0	篇		
		其他		0	篇		
	智慧財產權及成果	專利權	發明專利	申請中	0	件	
				已獲得	0		
			新型/設計專利		0		
		商標權		0			
		營業秘密		0			
		積體電路電路布局權		0			
		著作權		0			
		品種權		0			
		其他		0			
	技術移轉	件數		0	件		
		收入		0	千元		
	國外	學術性論文	期刊論文		10	篇	
			研討會論文		10		
			專書		0	本	
專書論文			0	章			
技術報告			0	篇			
其他			0	篇			
智慧財產權及成果		專利權	發明專利	申請中	0	件	
				已獲得	0		
			新型/設計專利		0		
		商標權		0			
		營業秘密		0			
		積體電路電路布局權		0			
		著作權		0			
		品種權		0			
其他		0					

	技術移轉	件數	0	件	
		收入	0	千元	
參與計畫人力	本國籍	大專生	1	人次	
		碩士生	1		
		博士生	0		
		博士後研究員	0		
		專任助理	1		
	非本國籍	大專生	0		
		碩士生	0		
		博士生	0		
		博士後研究員	0		
		專任助理	0		
其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)					

科技部補助專題研究計畫成果自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現（簡要敘述成果是否具有政策應用參考價值及具影響公共利益之重大發現）或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以100字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形（請於其他欄註明專利及技轉之證號、合約、申請及洽談等詳細資訊）

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以200字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性，以500字為限）

NO_x 是極普遍存在的空氣污染物，只要有燃燒就可產生的毒性氣體。外在氮氧化物暴露可在體內衍生致癌物質外，同時可生成ROS及RNS進而造成氧化壓力或硝化壓力；研究也證實ROS/RNS 是老化、慢性病及多種癌症的重要原因。本計畫執行三年已成功利用on-line SPE LC-MS/MS建立多種生物指標可用以評估NO_x暴露及探討其可能造成的健康危害（包括體內重要分子的硝化性損傷及氧化性損傷。生物指標分析方法有：尿液中亞硝酸鹽、DNA的硝化傷害指標(8-NO₂-G)、蛋白質的硝化傷害指標(3-N₂TYR及NHPA)、RNA 氧化傷害指標(8-oxoGuo)及 DNA表觀遺傳物質5-mdC/5-hmdC。對於DNA氧化傷害指標及蛋白硝化傷害指標間的相關性更進一步提出假說。本研究建立多種高敏感度高特異性的質譜分析方法，其相關研究成果將幫助了解NO_x暴露對人體可能的健康危害。

4. 主要發現

本研究具有政策應用參考價值： 否 是，建議提供機關

（勾選「是」者，請列舉建議可提供施政參考之業務主管機關）

本研究具影響公共利益之重大發現： 否 是

說明：（以150字為限）

本研究建立多種高敏感度高特異性的質譜分析方法，其相關研究成果將幫助了

解NO_x暴露對人體可能的健康危害。