

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

## 基因氧化傷害之全面臨床分析檢驗方法開發及國際合作 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型  
計畫編號：NSC 96-2314-B-040-021-  
執行期間：96年08月01日至97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：翁瑞宏

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中華民國 97年10月24日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫  成果報告  
 期中進度報告

基因氧化傷害之全面臨床分析檢驗方法開發及國際合作

計畫類別： 個別型計畫  整合型計畫

計畫編號：NSC 96-2314-B-040 - 021 -

執行期間：96年08月01日至97年07月31日

計畫主持人：胡瓊文

共同主持人：翁瑞宏

計畫參與人員：周怡君、李宜潔

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告  完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、  
列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學

中華民國 97 年 09 月 15 日

# 基因氧化傷害之全面臨床分析檢驗方法開發及國際合作

胡瓊文、翁瑞宏

## 中文摘要

許多研究已證實生物體內反應性含氧物質(Reactive oxygen species, ROS)可能是造成老化、慢性疾病、癌症的原因之一。當生物體內無法適當移除 ROS 則會造成氧化壓力進而攻擊生物體內的重要分子如核酸、蛋白質、脂肪，最後導致細胞或組織在結構及功能上產生改變。8-羥基去氧鳥糞嘌呤核 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG, so called 8-oxodGuo)，為主要的基因氧化性傷害產物。它是遭受最具反應性之氫氧自由基(OH·)攻擊 guanine C-8 位置時的產物。在基因複製時，此種基因氧化傷害會導致 G → T 之反轉突變。過去十年，臨床研究已廣泛使用 8-oxodGuo 的含量作為體內氧化壓力的生物指標。研究發現在許多疾病及癌症的病患上量測到體內極高的 8-oxodGuo 含量，甚至某些疾病的嚴重程度與 8-oxodGuo 含量呈正相關性。因此近年來，許多學者建議基因氧化傷害的量測未來可當做疾病發展的風險指標及評估治療的效標。然而在基因氧化傷害量測 (i.e. 8-oxodGuo)可完全作為臨床的指標之前，有些問題仍待釐清其中包括標準分析方法的建立及一般健康人的背景值範圍(reference range)確立。

文獻中 8-oxodGuo 的分析方法主要有包括高效液相層析儀配合電化學偵測 (HPLC-ECD)，氣相層析質譜儀 (GC-MS) 及酵素連結免疫吸附分析 (enzyme-link immunosorbent assay, 簡稱 ELISA)。然而這些分析法都有缺點且無法應用在大量樣本或每天例行的分析。最近由於質譜儀的快速發展學者開始運用 LC-MS/MS 在 8-oxodGuo 及其他基因損傷產物分析上。此分析方法其特異性及敏感性高可配合使用同位素稀釋法(isotope dilution)，所以可說是當前最精準的定量方法。同時可搭配線上固相萃取方法(on-line solid phase extraction, on-line SPE)。樣本注入後可自動萃取純化濃縮且連線直接進入 LC-MS/MS 進行分析，非常適用於臨床高通量的檢測。

本研究計畫將建立一系列「連線固相萃取-液相層析串聯質譜儀配合同位素稀釋法」於各種生物檢體的 8-oxodGuo(及 8-oxoGua)定量以期未來能全面應用於臨床分析。同時並參與國際合作計畫藉由國際間不同分析方法的比較以確立基因氧化傷害之標準分析方法及一般人體內 8-oxodGuo (及 8-oxoGua)之基礎背景值範圍。

**關鍵字:**基因氧化傷害、液相層析串聯質譜儀、連線固相萃取、臨床級、DNA、體液

# **Clinical-scale high-throughput analysis of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in various biological samples by isotope-dilution LC-MS/MS with on-line solid-phase extraction & international cooperation**

Chiung-Wen Hu and Ruey-Hong Wong

## **Abstract**

Reactive oxygen species (ROS) in living cells have been suggested to be associated with the development of aging, cancer and some degenerative diseases since they cause oxidative damage to nucleic acids, proteins, and lipids. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG or so called 8-oxodGuo) is one of the most abundant DNA lesion formed by the addition of the hydroxyl radical to the C8 position of guanine in DNA. The presence of 8-oxodGuo residues in DNA can lead to GC to TA transversion unless repaired before DNA replication. In the past decade, 8-oxodGuo measurement has been widely used to evaluate oxidative stress in patients with various diseases and cancers. It has been suggested that 8-oxodGuo measurement has a great potential in clinical use to serve as a biomarker of disease development risk and efficacy of therapy. However, there are some problems that need to be solved before markers could be used clinically. For example, what are the standard analytical methodology and reference ranges for 8-oxodGuo ?

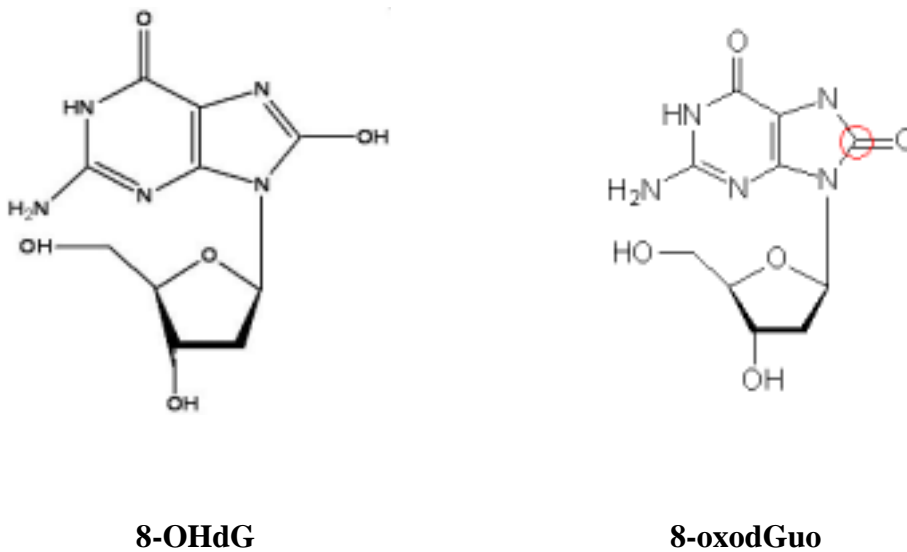
In the past 20 years, several methods have been successfully applied for analyzing 8-oxodGuo, such as high performance liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-ECD), gas chromatography with mass spectrometry (GC-MS) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). However, they have drawbacks and could be difficult to perform in the clinical laboratory for routine measurements, such as labor intensiveness, necessity for chemical derivatization, low sensitivity or a limited specificity due to possible interferences arising from the complex biological matrix (i.e. crude urine). Recently, liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) has become a powerful technology to overcome the sensitivity and specificity issues in analysis of DNA lesions. With the use of isotope-dilution and on-line sample extraction (on-line SPE), LC-MS/MS has been proved to be the most accurate methodology and would allow for high-throughput analysis such as clinical trials. Therefore, the aims of this work are to develop a serial "on-line SPE LC-MS/MS" method for clinical scale high-throughput 8-oxodGuo analysis in various biological samples. In the meantime, we have been invited to participate 「European Standards Committee for the Analysis of Urinary (DNA) Lesions (ESCUA)」. With our newly developed methods, we are going to compare multiple methods for analysis urinary 8-oxodGuo and 8-oxoGua and further establish reference ranges of 8-oxodGuo/8-oxoGua.

**Key words:** Oxidatively damaged DNA; LC-MS/MS; On-line SPE; Clinical scale; DNA; Body fluid

# 一、研究計畫背景及目的

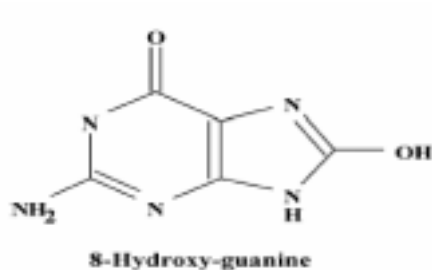
## 1. 基因氧化傷害與疾病

許多研究已證實生物體內反應性含氧物質(Reactive oxygen species, ROS)可能是造成老化、慢性疾病、癌症的原因之一。生物體內的 ROS 本身可為自由基或非自由基的物質。若生物體內無法適當移除 ROS 則會造成氧化壓力進而攻擊生物體內的重要分子如核酸、蛋白質、脂肪，最後導致細胞或組織在結構及功能上產生改變[Dizdaroglu et al., 2002; Halliwell 2007]。8-羥基去氧鳥糞嘌呤核 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)，為主要的基因氧化性傷害產物之一。它是遭受最具反應性之氫氧自由基(OH·)攻擊 guanine C-8 位置時的產物。在基因複製時，此種基因氧化傷害會導致 G → T 之反轉突變[Kasai, 1997]。由於在水相此物質主要以 6,8-diketo 異構型式存在，所以又稱為 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosin (8-oxodGuo)。

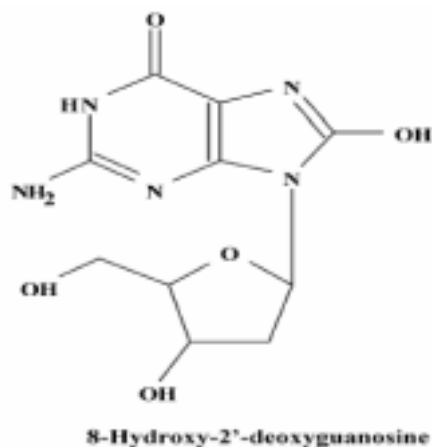


圖一、8-OHdG & 8-oxodGuo 化學結構

體內的基因氧化傷害可被適時的修復其主要的修復路徑包括(1)鹼基移除修復(Base Excision Repair, BER):其修復產物為 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoGua)及(2)核酸切除修復(Nucleotide Excision Repair, NER): 其修復產物為 8-oxodGuo。這些被修復後的基因氧化性傷害產物會進而排至體液，例如血液及尿液。通常基因氧化性傷害的量測，可由生物組織 DNA 中直接定量 8-oxodGuo 的含量，所代表的是細胞受到破壞與修復後達到平衡的穩定量 (steady-state level)，或由體液中定量 8-oxodGuo 與 8-oxoGua，其代表的是經修復後的結果 [Cooke et al., 2005]。



又稱 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoGua)



又稱 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodGuo)

## 圖二、體液 8-oxoGua 與 8-oxodGuo

過去許多研究已廣泛利用 8-oxodGuo 含量作為生物指標來探討體內基因氧化傷害與疾病的相關性。Wu et al. [2004]回顧文獻中提到癌症病患(包含肺癌、膀胱癌、前列腺癌、乳癌)尿液中 8-oxodGuo 的含量皆較一般正常人高出許多。相同的在(乳癌、子宮頸癌、血癌、肝癌、肺癌、腎臟癌及直腸癌等)癌症病患身上也發現到癌組織中 8-oxodGuo 的含量相較其周邊正常組織還高[Matsui et al., 2000; Evans et al., 2004]。其中在 Musarrat et al. [1996] 研究發現到乳癌病患其癌組織的 8-oxodGuo 含量甚至是正常組織的 9.76 倍之多。而在肝癌、肺癌及日光曝曬所導致的皮膚癌的 *p53* 抑癌基因上也發現到可能由 8-oxodG 所造成的 G → T 之反轉突變 [Basset-Sequin et al., 1994; Wiseman and Halliwell 1996]。

另外在慢性病如糖尿病、高血壓、中風、血液病的病患亦發現到尿液中高濃度的 8-oxodGuo [Negishi et al., 2000; Mizukoshi et al., 2005; Honda et al., 2000]。最近對於罹患神經性退化如巴金森氏症的老人尿液也發現到類似的情況[Sato et al., 2005]。有些研究更進一步發現到尿液 8-oxodGuo 濃度與疾病的嚴重程度(葛雷克氏症、異位性皮炎、C 型肝炎)成正相關[reviewed in Evans et al., 2004]。

## 2. 各種生物檢體之 8-oxodGuo 分析發展現況

在臨床上常見的生物檢體主要是尿液、唾液、血液及各種組織 DNA。由於過去十年對於 8-oxoGua (BER 的修復產物)的分析描述甚少，以下只就 8-oxodGuo 於不同檢體之分析方法發展現況，簡述之。

(1) 尿液 8-oxodGuo 分析: 由於收集尿液對人體不具侵入性，樣品取得容易，適合連續及長時間的採樣，是最常被量測的檢體。分析方法包括高效液相層析儀配合電化學偵測 (HPLC-ECD)、液相層析儀-氣相層析質譜儀 (LC-GC-MS) 及酵素連結免疫吸附分析 (Enzyme-link immunosorbent assay, 簡稱 ELISA)。基本而言，上述分析方法都已能成功定量尿液 8-oxodGuo。然而這些分析法都有缺點無法應用在大量樣本或每天例行的分析。例如: HPLC-ECD 此方法最普遍，然而此方法的準確度經常受到生物樣品中所含之生物基質影響(尤以尿液最為嚴重)，因此需要冗長的前處理、非常耗時 [Pilger et al., 2002]。同樣的 LC-GC-MS 而言，此種分析方法是先以 LC 純化尿液後再以 GC-MS 分析，由於純化後的樣品還需要衍生化反應，所以分析程序繁瑣 [Poulsen 2005]。ELISA kit 是目前最為簡易的分析法且最常用於臨床研究上，但 ELISA 分析方法亦遭到與 HPLC-ECD 相同的問題，亦即特异性較低，易受生物基質影響而導致誤判。已有文獻建議當利用 ELISA kit 定量尿液 8-oxodGuo 時，是需要預先以 HPLC 法純化尿液以提高分析的準確度 [Shimoi et al., 2002]。

最近由於質譜儀的快速發展學者開始運用 LC-MS/MS 在 8-oxodGuo 及其他基因損傷產物分析上[Singh and Farmer 2006]。此分析方法其特異性及敏感性高可配合使用同位素稀釋法(isotope dilution)，所以可說是當前最精準的定量方法。在我們先前的研究中，比較 isotope dilution LC-MS/MS 與 ELISA kit 兩種方法，同時分析遭受 PAHs 暴露工人之尿液樣本。我們發現到唯有 isotope dilution LC-MS/MS 方法能精確的偵測樣品中的 8-oxodGuo，進而有效評估基因氧化傷害。而利用 ELISA 則無法有效分析出 PAHs 暴露工人與非暴露工人間尿液中 8-oxodGuo 含量的差異[Hu et al., 2004]。

另外，LC-MS/MS 可搭配連線固相萃取方法(on-line solid phase extraction, on-line SPE)。原理主要是利用在高效液相層析儀的分析管柱前加裝另一支固相萃管柱(SPE column)與一轉換閥(switching valve)，樣本注入後可自動萃取且連線直接進入 LC-MS/MS 進行分析。我們最近已成功建立一 on-line SPE LC-MS/MS 分析方法用於臨床級高通量之尿液 8-oxodGuo 定量並已發表在 2006 年的 *Clinical Chemistry* 國際知名期刊。此分析方法具有高敏感度及特異性，同時因連線固相萃取可大大節省分析之時間與耗材，能快速連續處理大量樣本。未來甚至可以運用在臨床檢驗分析上[Hu et al., 2006]。

(2) 唾液 8-oxodGuo 分析: 唾液收集與尿液相同對人體不具侵入性，樣品取得容易，特別適合於口腔疾病方面如牙周病變的評估[Sawamoto et al., 2005]。但目前關於唾液 8-oxodGuo 的相關分析卻很少。原因之一是唾液包含多種蛋白質且 8-oxodGuo 含量遠低於尿液(~pg/ml)不易偵測。目前研究主要是利用 ELISA kit 來定量唾液 8-oxodGuo[Takane et al., 2002]。然而如前所述，ELISA 分析方法特異性低，準確定量唾液 8-oxodGuo 的分析方法仍待開發。最新的研究曾嘗試以 LC-MS/MS 搭配手動固相萃取以分析唾液 8-oxodGuo，然而由於唾液的雜質太多導致回收率很低，所有唾液樣品皆低於分析方法的偵測極限，無法準確定量[Cooke et al., 2006]。

(3) 血液(血清/血漿)8-oxodGuo 分析: 8-oxodGuo 於血液樣本的相關分析在文獻中也很少見。特別是採血是侵入性的且血液 8-oxodGuo 的含量極低(~ pg/ml)並含多種蛋白，所以血液分析經常需要冗長的前處理，也因此臨床上的應用受到限制。目前文獻中的分析方法主要是 HPLC-ECD 與 ELISA kit。然而兩種方法所分析出一般健康人的背景值差異竟然高達~100 倍(HPLC-ECD: ~ 13 pg/ml; ELISA: > 1200 pg/ml)。因此已有學者建議當利用 ELISA kit 定量血液 8-oxodGuo 時，是需要以 HPLC 法純化血液以提高分析的準確度[Breton et al., 2003]。同樣的，準確且快速的血液 8-oxodGuo 分析方法，亦待開發。

(4) 組織 DNA 8-oxodGuo 分析: 不同於前面各種體液的 8-oxodGuo 的分析，直接定量組織 DNA 中 8-oxodGuo 含量反映的是體內穩定態(steady-state)的基因氧化傷害程度。然而由於 DNA 樣本中有著極高量的正常核苷，所以 DNA 中的 8-oxodGuo 量測最另人擔心的就是樣品前處理到分析過程中所造成的人為氧化。有鑑於此，European Standards Committee on Oxidative DNA Damage (ESCODD)於 1997 年開始致力解決人為氧化的問題。ESCODD 一系列的研究結果發現 DNA 萃取及水解的過程是造成人為氧化的主要來源，可藉由全程添加抗氧化劑與使用 NaI-based DNA 萃取法來有效降低人為氧化的發生[Ravanat et al., 2002]。另外在各種不同分析方法比較結果發現，HPLC-ECD 是最多人使用的分析方法且準確度高。而 GC-MS 因發現在衍生化的過程中造成嚴重的人為氧化，建議 DNA 樣本在衍生化之前需先以 LC 純化[Cadet et al., 1997; ESCODD 2002]。LC-MS/MS 分析法具高敏感性、特異性。近十年亦運用在 DNA 中 8-oxodGuo 的定量同時也被認為是除 HPLC-ECD 外，另一個準確性高的分析方法。然而許多研究發現到電噴霧離子化過程會導致人為氧化[Ravanat et al., 1998; Guetens et al., 2002]。所以大部份 LC-MS/MS 分析法在分析 DNA 樣本時皆搭配 UV 偵測儀分析高濃度的正常核苷，不以質譜儀直接偵測，以避免人為氧化與質譜儀的過飽和[Frelon et al., 2000]。目前尚未有簡單、準確的 LC-MS/MS 分析方法於 DNA 樣本的分析。

### 3. 基因氧化傷害量測作為臨床指標之可行性

許多的研究已證實氧化壓力與疾病及癌症的發生有關。而基因氧化傷害的量測能反映出體內氧化壓力的情形，同時未來可當做疾病發展的風險指標及評估治療的效標。然而在基因氧化傷害量測 (i.e. 8-oxodGuo) 可完全作為臨床的指標之前，有些問題仍待釐清[Cooke et al., 2006]:

(1) 一般健康人其體內基礎背景值範圍(reference range)?

雖然已有近千篇的文獻可參考，然而文獻所提供的背景值範圍卻不一致，主要的原因是所使用的分析方法不同以及樣本數不足不具代表性；

(2) 體內各種細胞其氧化傷害程度是否相同?

Rozalski et al. [2003]的研究發現到人腦脊髓液 8-oxodGuo 濃度是血漿中的 8 倍。他們推測是由於腦細胞氧的需求量較其他部位細胞多而導致腦細胞承受較高的氧化壓力及基因氧化傷害；

(3) 周邊血液單核細胞(如白血球或淋巴球)是否可作為其他組織的替代檢體?

臨床研究常使用白血球或淋巴球作為體內其他不易取得組織的替代檢體，然而有研究發現到淋巴球中 8-oxodGuo 濃度與其他正常或病變的組織並無相關性[Foksinski et al., 2000]；

(4) 標準分析方法?

如前面所述，在 ESCODD 的研究發現不同的分析方法所分析出的基礎背景值也不相同。目前尚未有一套準確、快速的標準分析方法，這也是 ESCODD 及許多學者一直在努力的方向。

在基因氧化傷害量測可完全作為臨床的指標之前，為了回答上述的問題，我們需要建立敏感性、特異性高，且能高通量運用在臨床上的分析方法(如 on-line SPE LC-MS/MS)。同時也藉由準確的分析方法讓我們更加了解基因氧化傷害在疾病發病上所扮演的確切角色。

### 研究目的

本研究計畫將建立一系列「連線固相萃取-液相層析串聯質譜儀配合同位素稀釋法」於各種生物檢體的 8-oxodGuo(及 8-oxoGua)定量以期未來能全面應用於臨床分析。同時並參與國際合作計畫藉由國際間不同分析方法的比較以確立基因氧化傷害之標準分析方法及一般人體內 8-oxodGuo (及 8-oxoGua)之基礎背景值範圍。

建立「連線固相萃取-液相層析串聯質譜儀(on-line SPE LC-MS/MS)配合同位素稀釋法」之分析技術，能夠同時準確且快速分析尿液/唾液之 8-oxodGuo 及 8-oxoGua 含量。

1. 合成 8-oxoGua 之同位素內標準品  $^{15}\text{N}_5$ -8-oxoGua。(因無商業產品，需重新合成)
2. 開發尿液樣本 8-oxodGuo & 8-oxoGua 之「連線固相萃取-液相層析串聯質譜儀(on-line SPE LC-MS/MS) 配合同位素稀釋法」分析方法。以期未來尿液加入同位素內標後，不需經前處理可直接上機分析，大大節省分析之時間與耗材，同時可快速連續分析大量樣本。

由於受到歐洲學者「European Standards Committee for the Analysis of Urinary (DNA) Lesions (ESCULA)」的邀請，共同參與基因氧化傷害的相關研究。未來將以我們所建立的 on-line SPE LC-MS/MS 於各種生物檢體的 8-oxodGuo & 8-oxoGua 分析方法:



3. 與歐洲、美國、日本其他實驗室的分析方法進行比較，以找出不同分析方法造成分析結果差異的原因
4. 與歐洲、美國、日本其他實驗室的分析方法進行比較，以確立基因氧化傷害之標準分析方法。(分析方法包括: LC-MS/MS、GC-MS、LC-EC、ELISA)
5. 與歐洲、美國、日本其他實驗室合作建立尿液的 biobank 以確立一般健康人尿液中 8-oxodGuo & 8-oxoGua 之基礎背景值範圍。

## 參考文獻

- Basset-Seguín N, Moles JP, Mills V, Dereure O, Guillhou JJ. TP53 tumor suppressor gene and skin carcinogenesis. *J Invest Dermatol* 1994;103(5 Suppl):102S-106S.
- Bogdanov MB, Beal MF, McCabe DR, Griffin RM, Matson WR. A carbon column-based liquid chromatography electrochemical approach to routine 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine measurements in urine and other biologic matrices: a one-year evaluation of methods. *Free Radic Biol Med* 1999;27:647-66.
- Breton J, Sichel F, Bianchini F, Prevost V. Measurement of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by a commercially available ELISA test: comparison with HPLC/electrochemical detection in calf thymus DNA and determination in human serum. *Anal Lett* 2003;36:123-34.
- Cadet J, Berger M, Douki T, Ravanat JL. Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1997;131:1-87.
- Cooke MS, Evans MD, Dove R, Rozalski R, Gackowski D, Siomek A, et al. DNA repair is responsible for the presence of oxidatively damaged DNA lesions in urine. *Mutat Res* 2005;574:58-66.
- Cooke MS, Olinski R, Evans MD. Does measurement of oxidative damage to DNA have clinical significance? *Clin Chim Acta* 2006;365:30-49.
- Cooke MS, Singh R, Hall GK, Mistry V, Duarte TL, Farmer PB, Evans MD. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay and liquid chromatography-tandem mass spectrometry methodology for the analysis of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in saliva and urine. *Free Radic Biol Med* 2006;41:1829-1836.
- Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic Biol Med* 2002;32:1102-15.
- ESCODD (European Standards Committee on Oxidative DNA Damage). Comparative analysis of baseline 8-oxo-7,8-dihydroguanine in mammalian cell DNA, by different methods in different laboratories: an approach to consensus. *Carcinogenesis* 2002;23:2129-33.
- Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat Res* 2004;567:1-61.
- Foksinski M, Kotzbach R, Szymanski W, Olinski R. The level of typical biomarker of oxidative stress 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine is higher in uterine myomas than in control tissues and correlates with the size of the tumor. *Free Radic Biol Med* 2000;29:597-601.
- Frelon S, Douki T, Ravanat JL, Pouget JP, Tornabene C, Cadet J. High-performance liquid chromatography--tandem mass spectrometry measurement of radiation-induced base damage to isolated and cellular DNA. *Chem Res Toxicol* 2000;13:1002-10.
- Guetens G, De Boeck G, Highley M, van Oosterom AT, de Bruijn EA. Oxidative DNA damage: biological significance and methods of analysis. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2002;39:331-457.
- Halliwell B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem J* 2007;401:1-11.

- Honda M, Yamada Y, Tomonaga M, Ichinose H, Kamihira S. Correlation of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-oxodGuo), a biomarker of oxidative DNA damage, and clinical features of hematological disorders: a pilot study. *Leuk Res* 2000;24:461-8.
- Hu CW, Wu MT, Chao MR, Pan CH, Wang CJ, Swenberg JA, et al. Comparison of analyses of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine using isotope-dilution liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry and enzyme-linked immunosorbent assay. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2004;18:505-10.
- Hu CW, Wang CJ, Chang LW, Chao MR. Clinical-scale high-throughput analysis of urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine by isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry with on-line solid-phase extraction. *Clin Chem* 2006;52:1381-8.
- Kasai H. Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutat Res* 1997;387:147-63.
- Koal T, Deters M, Casetta B, Kaefer V. Simultaneous determination of four immunosuppressants by means of high speed and robust on-line solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004;805:215-22.
- Matsui A, Ikeda T, Enomoto K, Hosoda K, Nakashima H, Omae K, Watanabe M, Hibi T, Kitajima M. Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, in human breast cancer tissue and its relationship to GSTP1 and COMT genotypes. *Cancer Lett* 2000;151:87-95.
- Mizukoshi G, Katsura K, Katayama Y. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and serum S100beta in acute cardioembolic stroke patients. *Neurol Res* 2005;27:644-6.
- Musarrat J, Arezina-Wilson J, Wani AA. Prognostic and aetiological relevance of 8-hydroxyguanosine in human breast carcinogenesis. *Eur J Cancer* 1996;32A:1209-14.
- Negishi H, Njelekela M, Ikeda K, Sagara M, Noguchi T, Kuga S, et al. Assessment of in vivo oxidative stress in hypertensive rats and hypertensive subjects in Tanzania, Africa. *Hypertens Res* 2000;23:285-9.
- Pilger A, Ivancsits S, Germadnik D, Rudiger HW. Urinary excretion of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine measured by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002;778:393-401.
- Poulsen HE. Oxidative DNA modifications. *Exp Toxicol Pathol* 2005;57 Suppl 1:161-9.
- Ravanat JL, Duret B, Guiller A, Douki T, Cadet J. Isotope dilution high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry assay for the measurement of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in biological samples. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1998;715:349-56.
- Ravanat JL, Douki T, Duez P, Gremaud E, Herbert K, Hofer T, et al. Cellular background level of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine: an isotope based method to evaluate artefactual oxidation of DNA during its extraction and subsequent work-up. *Carcinogenesis* 2002;23:1911-8.
- Rozalski R, Winkler P, Gackowski D, Paciorek T, Kasprzak H, Olinski R. High concentrations of excised oxidative DNA lesions in human cerebrospinal fluid. *Clin Chem* 2003;49:1218-21.
- Sato S, Mizuno Y, Hattori N. Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine levels as a biomarker for progression of Parkinson disease. *Neurology* 2005;64:1081-3.
- Singh R, Farmer PB. Liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry: the future of DNA adduct detection. *Carcinogenesis* 2006;27:178-96.
- Shimoi K, Kasai H, Yokota N, Toyokuni S, Kinae N. Comparison between high-performance liquid chromatography and enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in human urine. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11:767-70.

- Sawamoto Y, Sugano N, Tanaka H, Ito K. Detection of periodontopathic bacteria and an oxidative stress marker in saliva from periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol* 2005;20:216-20.
- Takane M, Sugano N, Iwasaki H, Iwano Y, Shimizu N, Ito K. New biomarker evidence of oxidative DNA damage in whole saliva from clinically healthy and periodontally diseased individuals. *J Periodontol* 2002;73:551-4.
- Takane M, Sugano N, Ezawa T, Uchiyama T, Ito K. A marker of oxidative stress in saliva: association with periodontally-involved teeth of a hopeless prognosis. *J Oral Sci* 2005;47:53-7.
- Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J* 1996;313 ( Pt 1):17-29.
- Wu LL, Chiou CC, Chang PY, Wu JT. Urinary 8-oxodGuo: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta* 2004;339:1-9.

## 二、研究方法

### 1. 採用之研究方法

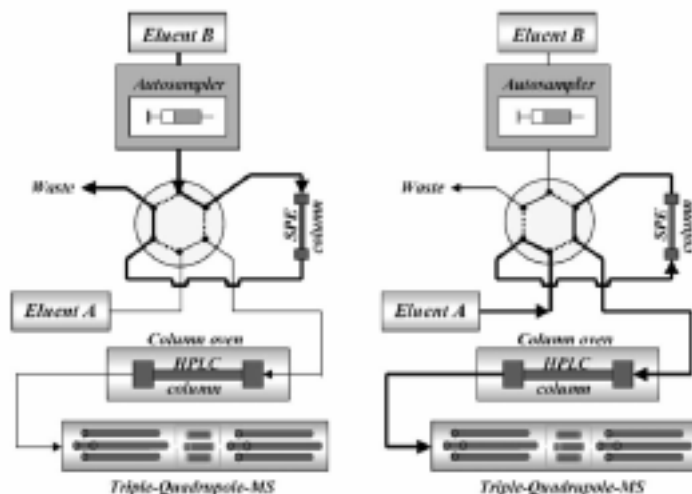
本研究將開發連線固相萃取-液相層析串聯質譜儀 (On-line SPE LC-MS/MS) 搭配「同位素稀釋法」的分析方法，以期能快速、準確定量臨床上各種生物檢體中 8-oxodGuo(及 8-oxoGua)含量。並與歐洲標準委員會所屬的尿液基因損傷分析的成員合作「European Standards Committee for the Analysis of Urinary (DNA) Lesions (ESCUA)」，藉由各種分析方法的比較以(1)建立 8-oxodGuo & 8-oxoGua 的標準分析方法；(2)確立一般健康人體液 8-oxodGuo & 8-oxGua 之基礎背景值範圍。

#### (1) 合成同位素內標準品 $^{15}\text{N}_5$ -8-oxodGuo & $^{15}\text{N}_5$ -8-oxoGua

本研究欲開發的液相層析串聯質譜儀配合同位素稀釋法(isotope dilution LC-MS/MS method)。此方法首重於以同位素  $^{15}\text{N}_5$  標示之 8-oxodGuo 與 8-oxoGua(內標準品)之合成，以利於運用同位素稀釋法精準分析樣本中 8-oxodGuo 及 8-oxoGua。 $^{15}\text{N}_5$ -8-oxodGuo 已有商業產品，至於  $^{15}\text{N}_5$ -8-oxoGua 尚未有商業產品需自行合成。合成步驟主要是將  $^{15}\text{N}_5$ -8-oxodGuo 以加酸加熱的方式斷其醯鍵 (1 M -HCl、80°C、30 min)再以 HPLC 純化、乾燥取得。

#### (2) 尿液中 8-oxodGuo & 8-oxoGua 分析

本研究將開發連線固相萃取-液相層析串聯質譜儀 (on-line SPE LC-MS/MS) 的分析方法，以期能直接同時定量尿液中 8-oxodGuo & 8-oxoGua 的含量。如下圖所示，連線固相萃取方法(on-line solid phase extraction, on-line SPE)的原理主要是利用在高效液相層析儀的分析管柱前加裝另一支固相萃管柱(SPE column)與一轉換閥(switching valve)，樣本注入後可自動萃取且連線直接進入 LC-MS/MS 進行分析。尿樣添加同位素內標後直接置於自動注射系統(autosampler)上，樣本在注射進入系統後，先被 Eluent B 帶至固相萃管柱(SPE column)進行吸附與淨化。接著藉由轉換閥轉位，利用 Eluent A 將待測物反沖提而出並進入 LC-MS/MS 系統分析。



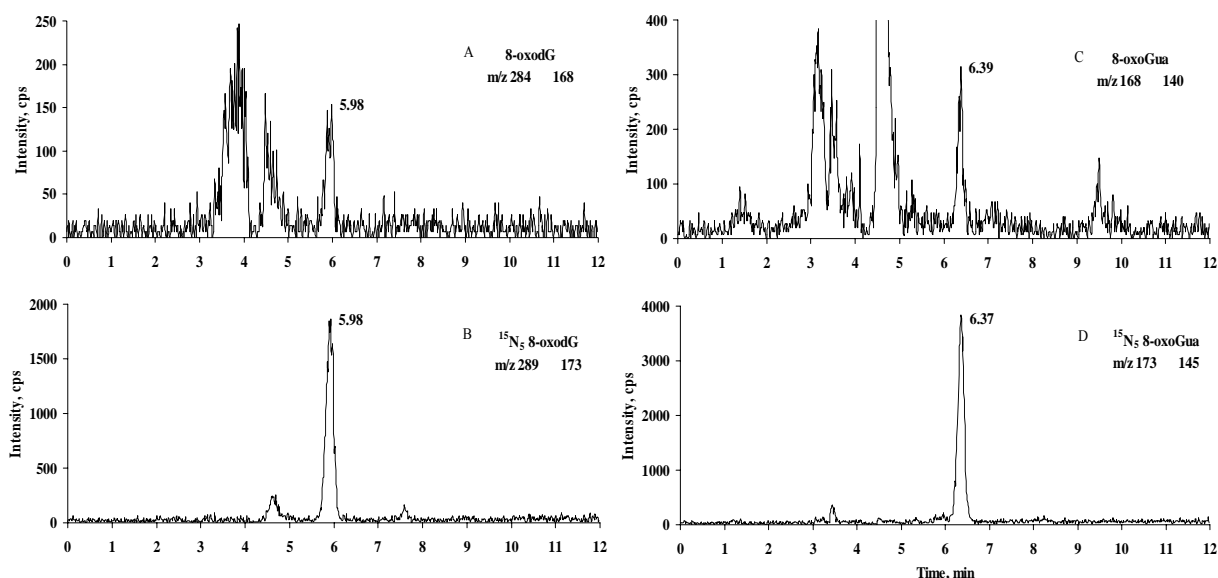
圖三、On-line SPE LC-MS/MS 系統示意圖 [Koal et al., 2004]

此連線方法可提高分析敏感度及特异性，同時可大大節省分析之時間與耗材，能快速連續處理大量樣本。未來甚至可以運用在臨床檢驗分析上。

### 三、結果與討論

#### 1. 成功建立 on-line SPE LC-MS/MS 配合同位素稀釋法同時分析尿液 8-oxodGuo 及 8-oxoGua

取尿液(100  $\mu$ l)添加  $^{15}\text{N}_5$ -8-oxoGua 及  $^{15}\text{N}_5$ -8-oxodGuo 內標準品後，以 on-line SPE LC-MS/MS 分析，其層析圖譜及分析條件分別列於圖四及表一。



圖四、尿液 8-oxodGuo & 8-oxoGua 層析圖譜

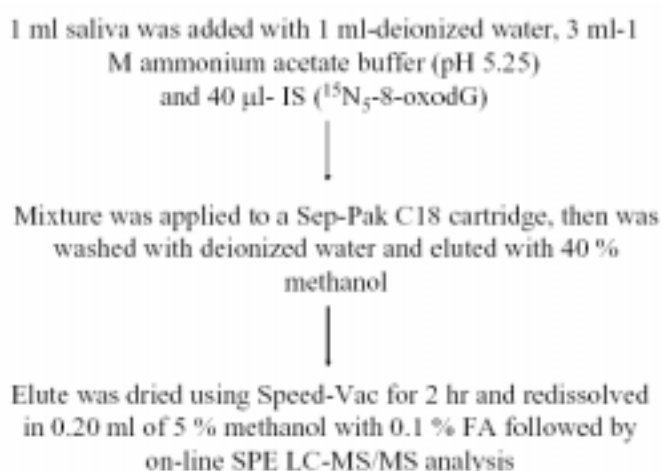
<b>On-line SPE</b>	
Injection volume	100 $\mu$ l
On-line SPE	Inertsil , ODS-3, 150*4.6 mm, 5 $\mu$ m
Applied buffer (Eluent B)	Solvent A: 3%MeOH+0.1% FA Solvent B: 50%MeOH+0.1% FA
<b>LC:</b>	
Analytical column	YMC polyamine II , 150*4.6 mm , 5 $\mu$ m
Mobile Phase (Eluent A)	Solvent A: 80%MeOH+0.1% FA Solvent B: 85%MeOH+0.1% FA
<b>MS/MS:</b>	
NEB gas:	10
CUR gas:	12
CAD:	4
IonSpray Voltage(IS) :	5500
Turbo gas T :	500 $^{\circ}$ C

表一、 On-line SPE LC-MS/MS 分析條件

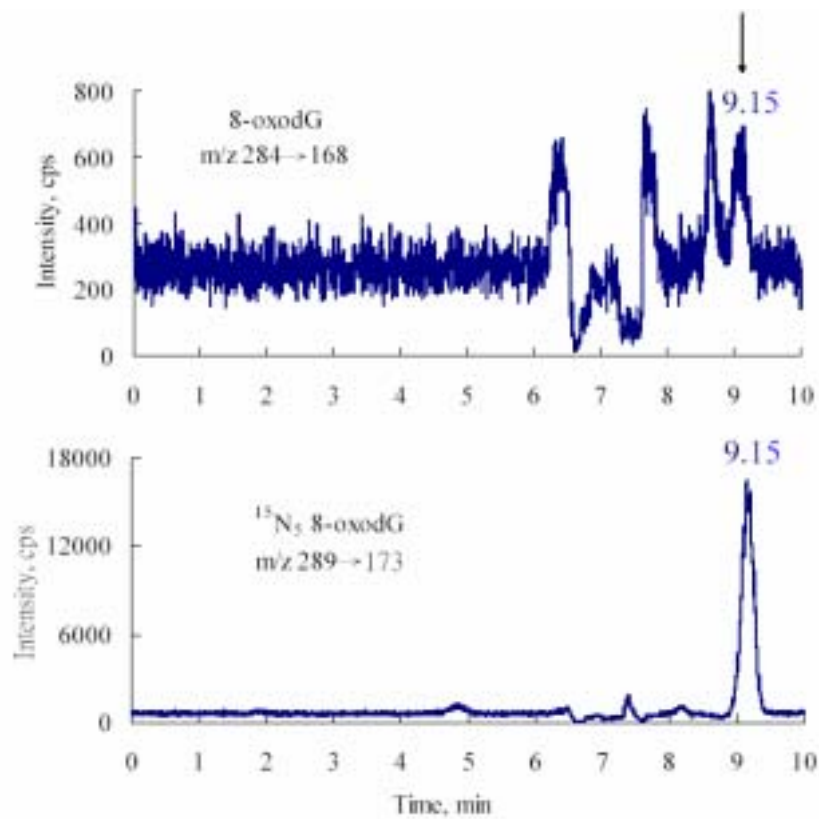
對於 8-oxodGuo 我們選擇監測 m/z 284-168 ( $^{15}\text{N}_5$ -8-oxodGuo 內標準品則為 m/z 289-173) 而 8-oxoGua 監測 m/z 168-140 ( $^{15}\text{N}_5$ -8-oxoGua 內標準品則為 m/z 173-145)。由圖四得知，尿液 8-oxodGuo 與 8-oxoGua 滯留時間分別在 5.98 min 及 6.39 min。樣品總分析時間為 12 min。綜合上述，我們已成功建立 on-line SPE LC-MS/MS 分析方法能同時分析尿液中 8-oxodGuo & 8-oxoGua。未來尿液不需任何前處理即可直接注入 on-line SPE LC-MS/MS 直接進行線上樣品純化及定量。

## 2. 成功建立 on-line SPE LC-MS/MS 配合同位素稀釋法分析唾液 8-oxodGuo

由於唾液的雜質太多，本研究嘗試以手動固相萃取先行將唾液作初步純化，再以 on-line SPE LC-MS/MS 分析。唾液 8-oxodGuo 前處理如下圖所示。其層析圖譜如圖六所示。由圖譜可以發現到，我們已成功定量唾液中 8-oxodGuo。但也同時注意到儘管唾液已先進行手動固相萃取純化，唾液圖譜亦呈現出許多干擾物質的存在，基質效應嚴重 (matrix effect)。此分析方法未來仍有很大的改善空間。初步唾液的分析結果，一般健康成人唾液 8-oxodGuo 的濃度約 0.024 ng/ml (n=10)。與先前的文獻比較，我們的分析結果與 Bogdanov et al.[1999] 利用 HPLC-ECD 的結果相近(0.015 ng/ml)，但遠低於以 ELISA 的分析結果 (2.3 ng/ml，Takane et al., 2005)。



圖五、唾液前處理

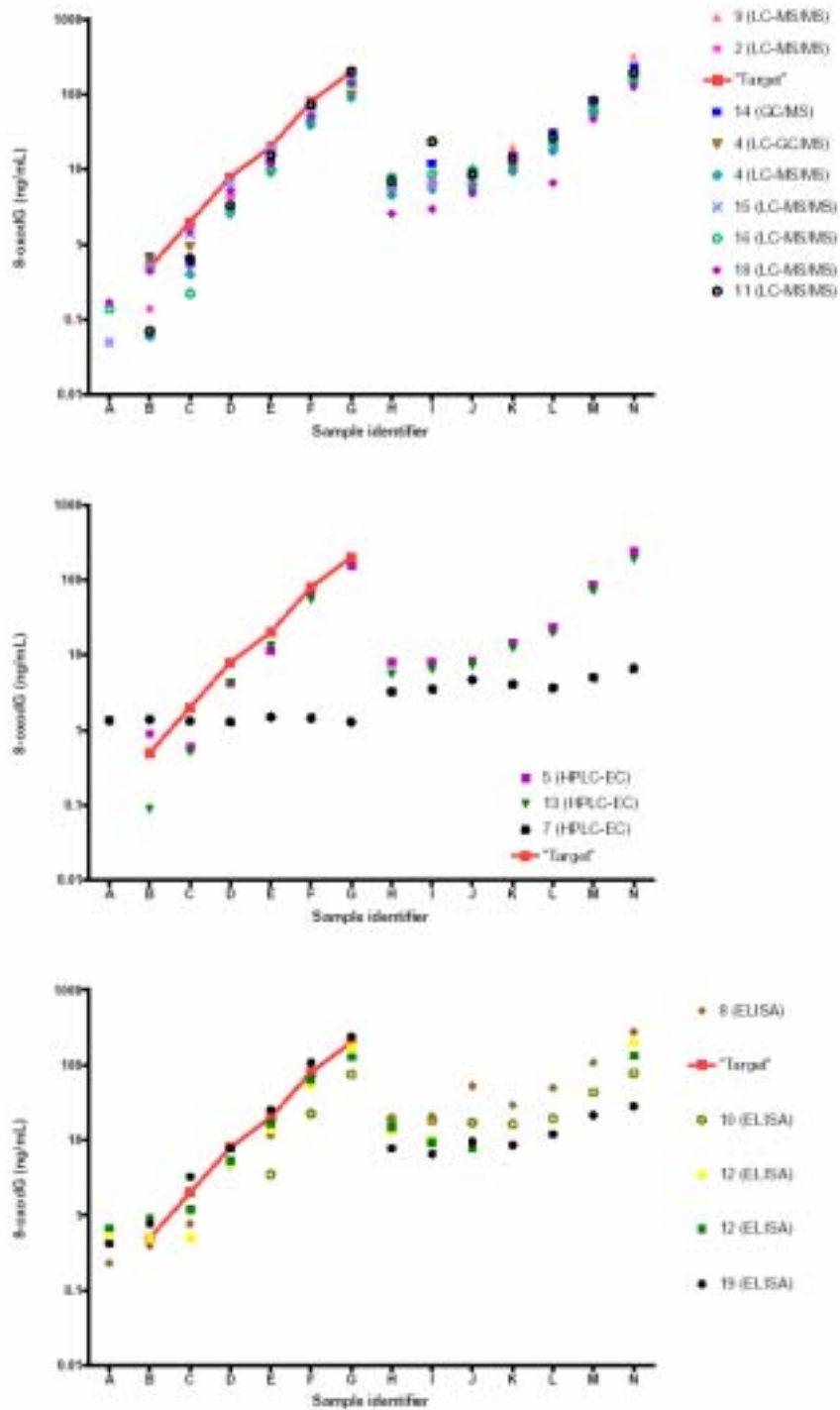


圖六、唾液 8-oxodGuo 層析圖譜

### 3. 尿液中 8-oxodGuo 國際分析方法比對

我們近期運用新建立的 on-line SPE LC-MS/MS [Hu et al., 2006]與歐洲標準委員會所屬的尿液基因損傷分析的成員合作「European Standards Committee for the Analysis of Urinary (DNA) Lesions (ESCUA)」，進行各種分析方法的比較以(1)建立 8-oxodGuo 的標準分析方法；(2)確立一般健康人體液 8-oxodGuo 之基礎背景值範圍。總計有 11 國際實驗室進行 8-oxodGuo 分析方法比較，分析方法包括有 HPLC-ECD、GC-MS、LC-MS/MS 及 ELISA 等。初步比較結果如下圖所示(盲樣分析樣品:未知濃度的 8-oxodG 標準品溶液, sample B-G)

### Analysis of standards



圖七、8-oxodGuo 各種分析方法比較 (Reprint from ESCULA)

初步比較結果發現到 4 種分析方法，以 LC-MS/MS 較為準確且穩定能有效定量 8-oxodGuo。而 HPLC-ECD 及 ELISA 實驗室間比對結果差異較大。目前仍持續比較對於實際尿液 8-oxodGuo 的量測結果，其比較結果由 ESCULA 整理中。

#### 四、成果自評

過去十年，體內 8-oxodGuo 含量分析，已被廣泛用作體內氧化壓力生物指標。尤其非侵入性的尿液檢測。許多臨床研究認為 8-oxodGuo 檢測未來可作為疾病發展的風險指標及評估治療的效標。然而在基因氧化傷害量測可完全作為臨床的指標之前，如前面所提過的有些問題仍待學者們進一步釐清。為解決這些問題，當前急需的是去建立敏感性、特異性高，且能高通量運用在臨床上的分析方法(如 on-line SPE LC-MS/MS)。本研究的初步成果即是開發一” on-line SPE LC-MS/MS” 適用於臨床高通量 8-oxodGuo(及 8-oxoGua)於各種檢體的分析方法。其中唾液 8-oxodGuo 的分析方法最近已發表在第 14 屆國際自由基學術會議中。另一方面，本研究也加入歐盟研究團隊(ESCUA)與其他國家實驗室進行各種現有分析方法的比較(HPLC-ECD、GC-LC-MS、LC-MS/MS 及 ELISA)，找出不同分析方法造成分析結果差異的原因及最佳的分析方法。國際實驗間初步比對的結果發現到 LC-MS/MS 是目前最為準確且穩定度高的分析法。未來我們將與 ESCULA 其他國際實驗室進一步比對於實際尿液 8-oxodG 的量測結果，以幫助確立一般人 8-oxodG 之基礎背景值範圍。