

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

甲苯暴露工人之生物偵測研究-DNA 鍵結物、氧化壓力及基因多型性分析(第 2 年)
研究成果報告(完整版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 95-2314-B-040-043-MY2
執行期間：96 年 08 月 01 日至 97 年 07 月 31 日
執行單位：中山醫學大學職業安全衛生學系(所)

計畫主持人：毛義方
共同主持人：陳美蓮、劉宗榮

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 97 年 10 月 31 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫期末報告

甲苯暴露工人之生物偵測研究- DNA 鍵結物及氧化壓力分析

計畫編號：NSC 95-2314-B-010-065-MY2

執行期限：95 年 8 月 1 日至 97 年 7 月 31 日

主持人：毛義方 中山醫學大學 職業安全衛生學系暨碩士班

共同主持人：陳美蓮 國立陽明大學 環境與職業衛生研究所

協同主持人：劉宗榮 國立陽明大學 環境與職業衛生研究所

計畫參與人員：張富貴 義守大學 健康管理學系

摘要

甲苯在人體內會代謝成 p-cresol。試管及細胞實驗指出 p-cresol 經由酵素氧化，會形成活性 p-cresol quinone methide (PCQM)，此活性物質會和 DNA 反應形成鍵結物。本研究目的為開發以高效能液相層析儀來偵測 PCQM-DNA 鍵結物，並探討甲苯暴露工人周邊血液白血球是否有 PCQM-DNA 鍵結物之形成。並以 8-OHdG 來評估甲苯暴露工人 DNA 氧化傷害情形。

本研究自行合成 PCQM 溶液，分別以分光光度計和 GC/MS 測定，結果顯示 PCQM 溶液分別在 333 nm 及 371 nm 有最大吸光值，主要片段離子之荷質比(m/z)為 213.9、198.8。在合成 PCQM-DNA 鍵結物方面，將活化之 PCQM 溶液加入 DNA 標準品進行反應，再以酵素分解成核苷酸，層析方法初步以 HPLC/UV 進行分析，其層析管柱為 SUPELCOIL LC-18 (25cm × 4.6 mm I.D., 5µm)，移動相為 30 mM 磷酸二氫鉀(pH=7.5, 溶液內含 10 mM 之 tetrabutyl ammonium hydrogen sulfate) 與 methanol，其體積比 91.7:8.3，流速為 0.7 ml/min。研究結果顯示 PCQM-DNA 鍵結物之層析圖，分別在 6.4 min、24.9 min，比 DNA 標準品之層析圖，多出兩個波峰。

在 6.4 min 之波峰，其波長在 272 nm 有最大吸收值；在 24.9 min 之波峰，其波長在 260 nm 最大吸收值，此兩 PCQM-DNA 鍵結物之化學結構，須先進行純化分離，再以 NMR 進行判定。

本研究共收集 64 名研究對象。暴露組為 15 名造船廠噴漆工人，以 3M 3500 型有機蒸氣監測器進行甲苯個人暴露採樣，並收集工人上、下班之尿液。對照組為 19 名造船廠噴砂工人、30 名辦公室人員，並收集噴砂工人上、下班及辦公室人員下班之尿液。

空氣採樣分析結果顯示，造船廠噴漆工人甲苯、乙苯及二甲苯之暴露濃度分別為 2.0 ± 1.23 ppm (mean \pm SE)、 47.6 ± 13.9 、 23.2 ± 5.69 ppm。噴漆工人工作後的 8-OHdG 濃度為 28.99 ± 6.52 µg/g cr，分別高於噴砂工人(9.14 ± 2.05 µg/g creatinine; $p = 0.01$)及辦公室人員(8.35 ± 0.84 µg/g creatinine; $p = 0.007$)。在調整年齡、抽菸及喝酒等變項後，噴漆工人工作後之 8-OHdG，仍明顯高於噴砂工人及辦公室人員($p < 0.001$; $p < 0.001$)。

在尿中代謝物方面，8-OHdG 與 mandelic acid 呈現邊緣性相關($p = 0.06$)。在調整 hippuric acid、methyl hippuric acid 變項後，尿中 8-OHdG 與乙苯代謝物 mandelic acid 有顯著的相關($p = 0.043$)。

本研究說明暴露油漆有機溶劑 toluene, ethylbenzene, xylene 之噴漆工人，其 DNA 氧化性傷害情形明顯高於其他職業族群。未來將繼續探討暴露, ethylbenzene 造成尿中 8-OHdG 增加之機制。

關鍵詞：甲苯、p-cresol、p-cresol quinone methide、DNA 鍵結物、尿中 8-OHdG、噴漆工人

Abstract

The purpose of the study is to determine DNA adducts for workers exposed to toluene by HPLC. Urinary 8-OHdG was used as biomarker of oxidative DNA damage.

The PCQM was recorded the UV spectra and identified by GC/MS. The DNA standard solution was reacted with PCQM to form DNA adducts. The DNA adducts were hydrolyzed to deoxyribonucleoside 3'-monophosphates and then analyzed by HPLC/UV.

Results showed the mean toluene exposure was 33.6 ± 3.84 ppm, with a range of 0.94~81.5 ppm. The UV spectrum of the PCQM was shifted having absorption maxima at 333 and 371 nm. The major fragment ions of PCQM were 213.9 and 198.8 m/z. In the chromatography of DNA reacted with PCQM, two peaks of DNA adducts at 6.4 and 24.9 min were found. The peak at 6.4 min had absorption maxima at 272 nm. The peak at 24.9 min had absorption maxima at 260 nm.

Fifteen spray painters exposed to solvents, together with two non-exposed groups, namely 19 sandblasting workers and 30 office staffs were selected as the subjects. Toluene in the air was collected by using 3M model 3500 organic vapor monitors. Urine was collected after work shift.

Results showed the post-workshift concentration of urinary 8-OHdG was higher among spray painters (29.0 ± 6.52 μ g/g creatinine) than sandblasting workers (9.14 ± 2.05 μ g/g creatinine; $p = 0.01$) and office staffs (8.35 ± 0.84 μ g/g creatinine; $p = 0.007$). After adjusting for urinary methyl hippuric acid (MHA), a significant correlation was found between urinary MA and 8-OHdG levels ($p = 0.043$).

This study suggests that urinary 8-OHdG levels displayed greater DNA damage in spray painters compared to other unexposed groups and their rest samples. Moreover, occupational exposure to ethylbenzene increased oxidative DNA injury.

Keywords: toluene, p-cresol, p-cresol quinone methide, DNA adducts, urinary 8-OHdG, spray painter

前言

過去甲苯、二甲苯、乙苯及苯廣泛使用於製造業、化學工廠，用來當作溶劑、染料、油漆、黏著劑和合成用之中間物質【1,2】。研究指出暴露在苯環境下之工人，罹患急性髓質白血病的危險性會增加【3】，目前已經很少用。另外，有些研究指出暴露在甲苯環境，也會增加罹患癌症的風險【4-7】。這些物質經由呼吸道進入人體後，會在肝臟代謝，目前已知在苯的代謝過程中，會有反應性中間產物的形成，並且能和 DNA 或蛋白質結合【8-11】。在動物及人類的研究，這些物質之 DNA 鍵結物亦被當作暴露的生物指標之一【12-16】。

甲苯與苯的物理化學性質相近，其中苯的毒性是由其代謝物扮演重要角色。苯主要在肝臟代謝，會形成 ring-hydroxylated 和 ring-opened 的化合物【17】，其代謝物對於骨髓具有毒性【18】。目前這些代謝物已發現有些會和 DNA 鍵結，此外，quinone 類的代謝物則會經由還原產生 reactive oxygen species (ROS)，引起 DNA 氧化性傷害【18】。動物實驗指出，苯暴露會造成白血球中 8-OHDG 增加【19-20】。去毒酵素 NQO (NAD(P)H: quinone oxidoreductase) 利用電子還原可將 quinone 轉換成具較少毒性之化合物，避免苯誘導產生的氧化壓力【21】。此外，苯在人體代謝成環氧化物後，會和 glutathione 結合，形成 phenylmercapturic acid 分泌至尿中【22-24】。

人體暴露於環境有毒物質後，DNA 可能遭受過氧化氫、氫氧自由基等 ROS 的攻擊。DNA 如果產生損害，體內之內切酶及糖化酶會進行修補，釋出切除的去氧核甘酸，經水解後分泌至尿中，其產物 8-hydroxy-2'-deoxyquanosine (8-OHDG) 常被用來當作 DNA 氧化傷害指標。Loft 等人從事苯暴露和 DNA 氧化性傷害之研究，發現苯之生物指標 s-phenylmercapturic acid (S-PMA) 和白血球中測得之 8-OHDG 有顯著相關($R_s=0.39$)【25】。

甲苯在人體有 70-90% 會經由 CYP2E1 及 CYP2B 酵素作用，轉換成 benzyl alcohol，benzyl alcohol 進一步轉換成 benzaldehyde 及 benzoic acid，最後代謝為 hippuric acid，經由尿液排泄。另有 1% 的甲苯經由 CYP1A2/1 酵素轉換成 o-cresol 或 p-cresol，接著會和 sulfate、glucuronide、glutathione 或 cysteine 結合，經由尿液排泄【26】，此路徑受到 GST 酵素之調控。Thompson 等人指出 p-cresol 比 o,m-cresol

更具肝毒性，因為它會形成反應性中間產物【27】。Angerer 等人(2003)指出 toluene 之氧化物與 glutathione 結合，形成 toluylmercapturic acid 之可能路徑，並在 33 位甲苯暴露工人尿中測到 S-p-toluymercapturic acid，不過含量很低【28】。

Lodon 等人指出 p-cresol 經酵素氧化後會形成 PCQM【29】。Bodell 等人進行試管實驗，結果指出 p-cresol 會與 liver microsomes、horseradish peroxidase 或 MnO₂ 作用，形成中間產物 PCQM，PCQM 會和 DNA 反應，形成 PCQM-DNA 鍵結物【30】。最近，Bodell 等人在細胞模型實驗，證實 PCQM 是造成 p-cresol 加入人類白血病細胞(HL-60)，形成 DNA 鍵結物之反應性中間產物，而且 PCQM 形成之 DNA 鍵結物，可用來當作評估甲苯暴露之生物指標【31】。

除了甲苯之外，乙苯和二甲苯也是目前工廠廣泛使用之溶劑。甲苯在人體主要代謝物為 hippuric acid。乙苯在人體主要代謝物為最後產生 mandelic acid 和 phenylglyoxylic acid 排出體外，但 phenylglyoxylic acid 量很少。二甲苯大部份以甲基苯甲酸代謝，且立刻與 glycine 結合，以甲基馬尿酸排出體外。

最近，美國政府職業安全衛生師協會 (ACGIH) 將甲苯的八小時日時量平均容許濃度，從 100 ppm 降低為 50 ppm。目前對於人體暴露甲苯，周邊血液白血球是否會形成 PCQM-DNA 鍵結物，國內外尚無任何相關研究，本研究目的為探討暴露甲苯之工人，周邊血液白血球是否有 PCQM-DNA 鍵結物之形成。此外，DNA 鍵結物和 DNA 氧化損害有關，故評估暴露甲苯工人，DNA 氧化傷害情形，也是本研究目標之一。

研究目的

1. 開發以高效能液相層析法偵測 p-cresol quinone methide DNA 鍵結物。
2. 探討 PCQM 與 DNA 可能鍵結之核鹼基部位。
3. 調查噴漆工人進行作業時，有機溶劑暴露濃度情形。
4. 評估暴露與非暴露甲苯工人，尿中 8-OHDG 濃度之差異。
5. 探討尿中 hippuric acid、mandelic acid 及 methyl hippuric acid 與 8-OHDG 間之相關性。

材料與方法

(一) 試藥

p-cresol, calf thymus DNA, micrococcal nuclease, spleen phosphodiesterase, Adenine (A), Guanine (G), thymine (T), cytosine (C), uracil (U) 購自 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)。其它化學藥品均是分析用之最高級。

(二) p-cresol quinone methide(PCQM)活性物質之合成

根據 Bodell 等人發表之方法【32, 33】製備 p-cresol quinone methide。將 8mg p-cresol 溶在 1mL 的 acetonitrile，加熱至 60°C。Ag(I)O 加入溶液中 100%反應，充分攪拌 10 分鐘。將溶液過濾後，置於分光光度計下記錄波長。此外，將溶液注入 GC/MS 進行分析。

(三) DNA 鍵結物

將 PCQM (大約 2 mg) 加入 2mL 含有 1mg DNA 的磷酸二氫鉀溶液(10mM, PH 7.4)，在 37°C 培養 2 小時，隨後進行萃取和沈澱。

(四) 萃取 DNA

將上述 (三) 之溶液，加入等量的 chloroform:isoamylalcohol (24:1) 緩慢搖晃五分鐘，放入離心機中以每分鐘 12000 轉，離心 20 分鐘，吸取上層溶液到另一試管，重複此步驟五次。萃取後之溶液加入 4 M 醋酸鈉 0.3 mL，再加入 6.6 mL 冰的絕對酒精，放到 -80°C 冰箱中 30 分鐘取出，再以每分鐘 12000 轉，離心 15 分鐘後，倒掉上層溶液，再加入 75% 的酒精 0.5 mL，以每分鐘 12000 轉，離心 5 分鐘後，等待自然乾燥後，加入 60 μ L 去離子水溶解 DNA。

(五) DNA 濃度及純度測定

確認 DNA 完全溶解於水中後，取適當量之 DNA 溶液到石英管中與水稀釋一定倍數。再以紫外光分光光度分析儀測定，測定吸光度及濃度。其中 260nm/280nm 吸光度比值須介於 1.6 至 2.0 之間。測定後之 DNA 保存在 -20°C 冰箱，直到分析時才取出。

(六) PCQM-DNA 鍵結物之分析

本實驗是參考 Reddy and Randerath 發表之方法【34】，並加以修改，以高效能液相層析儀進行初步分析，實驗步驟如下：

自 DNA 鍵結物中，取 10 μ g 的 DNA 溶液到 1.5 mL 的試管中【35-37】，加入 260 μ L 混合溶液 (50 μ g micrococcal nuclease、20 μ g spleen phosphodiesterase、20 mM sodium succinate、10mM CaCl₂)，調整 PH 值至 6.0 後，於 37°C 水浴下作用 3 小時，使 DNA 消解為核甘酸。

取 40 μ L 注入 HPLC (Lachrom Elite, Hitachi)，層析管柱為，SUPELCOIL LC-18 (25cm \times 4.6 mm I.D., 5 μ m)，移動相為 30 mM 磷酸二氫鉀(pH=7.5, 溶液內含 10 mM 之 tetrabutyl ammonium hydrogen sulfate) 與 methanol，其體積比 91.7:8.3，流速為 0.7 ml/min，使用之偵測器為 diode array (model L-2455, Hitachi)，波長為 254 nm。

(七)核鹼基鍵結物

將 PCQM (大約 2 mg) 分別加入含有 1mg A, T, C, G, U 之 2mL 磷酸二氫鉀溶液(10mM, PH 7.4), 在 37°C 培養 2 小時。

(八)核鹼基標準品及其鍵結物之分析

分別取 10 µL A, T, C, G, U 之標準品及步驟(七)合成之核鹼基鍵結物, 注入 HPLC (Lachrom Elite, Hitachi) 進行分析, 層析條件與 DNA 鍵結物分析方法相同。

(九) 研究對象

研究對象分為暴露組與對照組。暴露組為 15 名造船塗裝廠之噴漆工人, 其作業會接觸大量有機溶劑。對照組分為兩組, 對照組 A 為 19 名造船塗裝廠之噴砂工人, 對照組 B 為 30 名設計處之辦公室人員。

(十)個人空氣採樣

噴漆工人於上班前佩帶 3M 3500 型被動式採樣器於衣領上, 中午休息時不取下, 至下班時再取下密封, 並記錄採樣時間、ID 後帶回實驗室於一星期內完成分析。每日每人採樣時間至少六小時。

(十一)尿液樣本

暴露組之尿液於休假後(休息 35 天後, 第一天上上班前之尿液)、上班前、下班後收集。噴砂工人之尿液為上、下班收集, 辦公室人員之尿液為下班後收集。尿液樣本每次至少收集 20 cc 以上, 於工作現場收集後, 置入低溫保存箱, 隨即當日送回實驗室 -20°C 冰箱中保存備驗。

(十二) 空氣樣本中有機溶劑之分析方法

將 2 ml 二硫化碳注入被動式採樣器進行萃取, 適當地搖動 30 分鐘, 再將其萃取液倒入 2 mL 玻璃小瓶, 以自動注射器取 1µL 到 GC/FIDI (HP 5870; Hewlett-Packard, Wilmington, DE, USA) 進行分析。氣相層析管柱為 DB-WAX (30 m × 0.53

mm I.D., 1.0 µm), 氣相層析儀分析條件為注射口溫度 220°C, 偵測器溫度 230°C, 加溫爐起始溫度為 50°C, 以 25°C/min 之速率升溫至 230°C, 維持 1 分鐘, 總共分析時間為 23 分鐘。攜帶氣體為氮氣, 流速為 1.72ml/min。

(十三)尿液樣本中 creatinine、hippuric acid、mandelic acid 及 methyl hippuric acid 之分析方法

尿液樣本以每分鐘 3000 轉離心 15 分鐘, 取 10µL 上清液以 water/methanol (1:1) 稀釋 100 倍。取 10 µL 注入 HPLC (Waters 2695 Separation Module, Waters, Milford, MA, USA), 層析管柱為, Gemini™ C18 (4.6×250 mm, 5µm; Phenomenex, CA), 移動相為 20 mM 磷酸二氫鉀(pH=3.0)與 acetonitrile, 其體積比 85:15, 流速為 0.8 ml/min, 使用之偵測器為 UV (Waters 2478 Dual λ Absorbance), 波長為 225 nm。

(十四)8-OHDG 之測定方法

使用 BIOXYTECH 8-OHDG-EIA Kit (OXIS Health Products, Inc.) 進行尿中 8-OHDG 之測定, 此 Kit 為競爭性酵素免疫分析, 其方法步驟如下: 1. 先取 50µL 尿液或標準溶液加到 plate 上的 well, 再取 50µL 的 primary antibody 加入 well, 搖晃 plate 使混合均勻, 培養在 37°C 1 小時。2. 加入 250µL 的 washing buffer 進行清洗, 倒出洗液, 將 plate 反轉在乾淨的紙巾上拍打, 去除可能殘留的洗液, 重覆此清洗步驟 2 次。3. 取 100µL 的 secondary antibody 加入 well, 搖晃 plate 使混合均勻, 培養在 37°C 1 小時。重覆上述清洗步驟。4. 每個 well 加入 100µL 的 chromogen, 在室溫黑暗中培養 15 分鐘。5. 加入 100µL 的 stop solution, 3 分鐘後放入 microtiter plate reader 進行判讀, 波長設為 450 nm。每個

樣本、標準溶液及 blank 重複測量 3 次，標準溶液濃度範圍為 0.5~200 ng/mL。

(十五)QA/QC

除 8-OHDG 之品質管制作 blank、標準溶液及樣本，重複測量 3 次外(測定吸光值之 C.V.不可大於 20%)外，本研究其他每項之實驗進行均依照實驗室相關的 QA/QC 程序，包括 blank、標準曲線或標準品、回收率、精確度、精密度進行必要性之工作。

(十六)問卷

由於工人生活習慣可能影響 8-OHDG 之尿中濃度，故用問卷來輔助研究。問卷內容包括年齡、性別等基本資料，抽煙、喝酒、碳烤食物等飲食習慣，以及交通方式、居住環境等非職業暴露來源。

(十七)統計分析

所有實驗數據及問卷調查資料均以 Microsoft Excel 2000 版 進行建檔與整理，以統計軟體 SAS8.1 進行統計分析。研究對象基本資料、尿液中 hippuric acid、mandelic acid、methylhippuric acid 及 8-OHDG 之濃度，以描述性統計表示。以 student t test 比較暴露組及對照組其 8-OHDG 濃度，在探討 hippuric acid、mandelic acid、methylhippuric acid 多個變項與尿液 8-OHDG 代謝量的關係，是以複回歸來分析。

結果

(一) PCQM 吸收波長之測定

分別將 p-cresol 和 PCQM 置於分光光度計中，p-cresol 在 296 nm 有最大吸光值；PCQM 在 333 nm 及 371 nm 有最大吸光值。將 p-cresol 和 PCQM 注入 GC/MS，可得 p-cresol 主要及次要片段離子之荷質

比為 107.9、76.8 (圖一)，PCQM 之主要及次要片段離子之荷質比為 213.9、198.8 (圖二)。GC/MS 之 NIST 資料庫並無 PCQM 的比對資料，須進一步以 NMR 判讀，才能推測其化學結構。

(二) DNA 濃度及純度的測定

將 DNA 標準品與 PCQM 反應，形成 PCQM-DNA 鍵結物，經萃取純化後之溶液，取 1 μ L 以去離子水稀釋 100 倍，置於石英管中，再以分光光度分析計測定 260 nm/280nm 吸光度。結果顯示波長 260 nm 之吸光度為 0.8861，280 nm 之吸光度為 0.4886。260 nm/280 nm 吸光度之比值為 1.8137。代入 DNA 濃度計算公式，可得 DNA 濃度為 4.435 μ g/mL，體積為 56 μ L。

(三) DNA 核甘酸之測定

將正常 DNA 與 PCQM-DNA 鍵結物，經酵素水解後之產物，各取 40 μ L 注入 HPLC/UV 分析。在比對 blank、DNA 標準品及 PCQM-DNA 鍵結物之層析圖後，發現 DNA 鍵結物之層析圖，分別在 6.4、24.9 min，比對 DNA 標準品之層析圖，多出兩個波峰(圖 3-圖 7)。在 6.4 min 之波峰，其最大吸收波長為 272 nm，在 24.9 min 之波峰，其最大吸收波長為 260 nm。此兩波峰可能為合成之 PCQM-DNA 鍵結物。

(四) 核鹼基標準品及其鍵結物之測定

圖 8-17 為 A, T, C, G, U 標準品及分別與 PCQM 反應溶液之層析圖。其中 C, G, U (圖 11, 13, 17)在加入 PCQM 後，其層析圖分別有新的波峰出現，表示可能有鍵結物的產生。

(五) 研究對象基本資料

Table1 為研究對象之基本資料。噴漆工人、噴砂工人及辦公室人員平均年齡分別為 39.6 \pm 8.34 歲(mean \pm SD)、37.6 \pm 11.0 歲及 47.0 \pm 5.38 歲。噴漆、噴砂工人有抽煙及喝酒之比率高於辦公室人員。在工作年資方面，噴漆工人、噴砂工人及辦公室人員分別平均工作 5.91 \pm 2.90 年、8.45 \pm

9.96 年及 20.5 ± 7.83 年。

(六) 個人空氣採樣

空氣採樣分析結果顯示，造船噴漆工人暴露之有機溶劑以乙苯及二甲苯為主，其次為甲苯。甲苯平均個人暴露濃度為 2.0 ± 1.23 ppm (mean \pm SE)，範圍從 0.02 ppm~16.6 ppm。乙苯平均個人暴露濃度為 47.6 ± 13.9 ppm，範圍從 5.05 ppm~202.8 ppm。二甲苯平均個人暴露濃度為 23.2 ± 5.69 ppm，範圍從 4.84 ppm~88.3 ppm。

(七) 噴漆工人尿液中 hippuric acid(HA)、mandelic acid(MA)及 methyl hippuric acid(MHA)濃度

尿液樣本之 MA 的平均濃度為 89.3 mg/g creatinine，工作後的平均濃度為 116.9 mg/g creatinine，變化值為 27.6 mg/g creatinine ($p=0.468$)。MHA 的平均濃度為 55 mg/g creatinine，工作後的平均濃度為 105 mg/g creatinine，變化值為 50.1 mg/g creatinine ($p=0.044$)。工作前 HA 的平均濃度為 924.7 mg/g creatinine，工作後的平均濃度為 827.3 mg/g creatinine，變化值為 -97.4 mg/g creatinine($p=0.036$)。

(八) 暴露組與對照組尿中 8-OhdG 濃度之比較

噴漆工人工作前尿液中 8-OhdG 的平均濃度為 19.29 ± 2.89 $\mu\text{g/g cr.}$ ，工作後的平均濃度為 28.99 ± 6.52 $\mu\text{g/g cr.}$ 。噴砂工人工作前尿液中 8-OhdG 的平均濃度為 8.59 ± 0.77 $\mu\text{g/g cr.}$ ，工作後的平均濃度為 9.14 ± 2.05 $\mu\text{g/g cr.}$ 。辦公室人員工作後 8-OhdG 的平均濃度為 8.35 ± 0.84 $\mu\text{g/g cr.}$ 。噴漆工人工作後的 8-OhdG 濃度，分別高於噴砂工人及辦公室人員工作後之 8-OhdG 濃度($p=0.01$ ； $p=0.007$) (Table 2)。在調整年齡、抽菸及喝酒等變項後，噴漆工人工作後的 8-OhdG 濃度，均明顯高於噴砂工人及辦公室人員工作後之 8-OhdG 濃度($p<0.001$ ； $p<0.001$)。噴砂工人工作後之 8-OhdG 濃度也明顯高於辦公室人員 ($p=0.016$) (Table 3)。

(九) 尿液中 8-OhdG 與 hippuric acid、mandelic acid 及 methyl hippuric acid 之相關

尿中 8-OhdG 與 mandelic acid 呈現邊緣性相關($p=0.06$)，與 hippuric acid、methyl hippuric acid 則未有統計相關($p=0.563$ ， $p=0.338$)。在調整 hippuric acid、methyl hippuric acid 變項後，尿中 8-OhdG 與 mandelic acid 有顯性相關($p=0.043$)，與 hippuric acid、methyl hippuric acid 則無相關。

討論

本研究嘗試發展以 HPLC/MS/MS 技術來偵測甲苯 PCQM-DNA 鍵結物，初步使用 HPLC/UV 偵測器，尋找適合分析 dAMP、dCMP、dGMP、dTTP 等去氧核苷酸之層析管柱及條件，最後選定之分析方法為使用 SUPELCOIL LC-18 (25cm \times 4.6 mm I.D., 5 μm)管柱，移動相為 30 mM 磷酸二氫鉀($\text{pH}=7.5$ ，溶液內含 10 mM 之 tetrabutyl ammonium hydrogen sulfate)與 methanol，其體積比 91.7:8.3，流速為 0.7 mL/min，波長為 254 nm，可分離 DNA 水解後產生之核苷酸。此外，以此方法分析 DNA 與 PCQM 反應水解後之溶液，與 DNA 標準品水解之層析圖比較，可以確定 PCQM 會和 DNA 形成至少兩種鍵結物(圖 6, 圖 7)。

為了探討 PCQM 活性物質與 DNA 鍵結之位置，以 A、T、C、G、U 核鹼基標準品和 PCQM 反應，結果指出 PCQM 會和 C、G、U 鍵結，在層析圖上分別有新的波峰產生，A、T 鹼基部分則不會有鍵結反應。

欲發展以 HPLC/MS/MS 進行 DNA 鍵結物之定性定量分析，必須先合成 PCQM-DNA 鍵結物，然後以純化分離、冷凍乾裸之方法，製備 PCQM-DNA 鍵結物之標準品。由於本實驗 PCQM-DNA 鍵結物、核鹼基鍵結物波峰出現之時間，均接近其他波峰，因此無法有效將 PCQM-DNA 鍵結物、核鹼基純化分離，以合成標準品。

試管實驗指出，將 p-cresol 加入人類肝細胞微粒體，在 glutathione 存在的情況下，會形成三種 PCQM 與 glutathione 之鍵結物【38】。因此，當人體產生 PCQM 活性物質時，glutathione 可能會和 PCQM 結合，保護 DNA 避免受到 PCQM 之攻擊。測定人體尿液中是否有 PCQM 與 glutathione 形成之鍵結物，為本研究未來努力之方向。

近年來，8-OHdG 被用來當作 DNA 受到氧化傷害的指標。8-OHdG 除了與年齡、抽菸、喝酒等變項有關外，工作量也可能會影響 8-OHdG 之濃度，因此本研究對照組，分為噴砂工人與辦公室人員兩組。噴砂工人之工作量與噴漆工人相同，但作業時未接觸有機溶劑，因此以噴砂工人當作對照組，可用來去除工作量對 8-OHdG 可能之影響。

研究結果顯示在控制年齡、抽菸、喝酒變項後，噴漆工人工作後尿中 8-OHdG 的濃度明顯高於噴砂工人、辦公室人員下班後的尿液，平均分別高出 3.2 及 3.5 倍。說明作業暴露油漆有機溶劑之 toluene, ethylbenzene, xylene, DNA 會受到較多的氧化性傷害。

在尿中代謝物與 8-OHdG 相關方面，研究發現乙苯尿中代謝物 MA 與 8-OHdG 有統計上的相關。最近有研究指出，乙苯經過陽光照射後，會產生 ethylbenzene-hydroperoxide, ethylbenzenhydroperoxide 會產生 peroxide and H₂O₂，會增加 8-OHdG 的濃度【39】。乙苯目前被 IARC 歸類為有可能對人類有致癌性(Group 2B)，本研究可作為有關乙苯致癌性之參考資料。

參考文獻

1. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Some organicsolvents, resin monomers and related compounds pigments and occupational exposures in paint manufacture and painting, Lyon, vol. 47,1989, pp. 79-123.
2. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Re-evaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide*/part two, Lyon,vol. 71, 1999, pp. 829_/864.
3. M. Aksoy, Hematotoxicity and carcinogenicity of benzene, Environ. Health Persp. 82 (1989) 193-197.
4. B.G. Svensson, G. Nise, V. Englander, R. Attewell, S.Skeffving, T. Moller, Deaths and tumors among rotogravureprinters exposed to toluene, Br. J. Ind. Med. 47 (1990) 372-379.
5. J.T. Walker, T.F. Bloom, B.S. Stern, A.H. Okun, M.A. Fingerhut, W.E. Halperin, Mortality of workers employed in shoe manufacturing, Scand. J. Work Environ. Health 19 (1993) 89-95.
6. M. Gerin, J. Siemiatycki, M. Desy, D. Krewski, Associations between several sites of cancer and occupational exposure to benzene, toluene, xylene, and styrene: results of a case-control study in Montreal, Am. J. Ind. Med. 34(1998) 144-156.
7. A. Anttila, E. Pukkala, R. Riala, M. Sallmen, K. Hemminki, Cancer incidence among Finnish workersexposed to aromatic hydrocarbons, Int. Arch. Occup. Environ. Health 71 (1998) 187-193.
8. W.J. Bodell, D.N. Pathak, G. Levay, Q. Ye, K. Pongracz, Investigation of DNA adducts formed in B6C3F1 mice treated with benzene: implications for molecular dosimetry, Environ. Health Persp. 104 (Suppl 6) (1996) 1189-1193.

9. T.A. McDonald, K. Yeowell-O'Connell, S.M. Rappaport, Comparison of protein adducts of benzene oxide and benzoquinone in the blood and bone marrow of rats and mice exposed to [14C/13C] benzene, *Cancer Res.* 54 (1994) 4907-4914.
10. M. Byfalt Nordqvist, A. Lof, S. Osterman-Golkar, S.A.S. Walles, Covalent binding of styrene and styrene 7,8-oxide to plasma proteins, hemoglobin and DNA in the mouse, *Chem.-Biol. Interact.* 55 (1985) 63-73.
11. D. Ting, M.T. Smith, P. Doane-Setzer, S.M. Rappaport, Analysis of styrene oxide-globin adducts based upon reaction with Raney nickel, *Carcinogenesis* 11 (1990) 755-760.
12. D. Pathak, G. Levay, W.J. Bodell, 32P-postlabeling detection of DNA adducts in bone marrow of B6C3F1 mice treated with benzene, *Carcinogenesis* 16 (1995) 1803-1808.
13. G. Levay, D.N. Pathak, W.J. Bodell, Detection of DNA adducts in white blood cells of B6C3F1 mice treated with benzene, *Carcinogenesis* 17 (1996) 151-153.
14. P. Vodicka, L. Vodickova, K. Hemminki, 32P-postlabeling of DNA adducts of styrene exposed lamination workers, *Carcinogenesis* 14 (1993) 2059-2061.
15. E. Horvath, K. Pongracz, S. Rappaport, W.J. Bodell, 32Ppostlabeling detection of DNA adducts in workers occupationally exposed to styrene, *Carcinogenesis* 15 (1994) 1309-1315.
16. S.M. Rappaport, K. Yeowell-O'Connell, W.J. Bodell, J.W. Yager, E. Symanski, An investigation of cancer biomarkers among workers exposed to styrene and styrene 7,8-oxide, *Cancer Res.* 56 (1996) 5410-5416.
17. R. Snyder, C.C. Hedli, An overview of benzene metabolism. *Environ Health Perspect* 1996;104(Suppl 6):1165-1171.
18. V.V. Subrahmanyam, P. Kolachana, M.T. Smith, Hydroxylation of phenol to hydroquinone catalyzed by a human myeloperoxidase- superoxide complex: possible implications in benzene-induced myelotoxicity. *Free Radic Res Commun* 1991;15:285-296.
19. J. Tuo, S. X. Deng, Loft, M.S. Thomsen, H.E. Poulsen, Dexamethasone ameliorates oxidative DNA damage induced by benzene and LPS in mouse bone marrow. *Free Radic Res* 1999;30:29-36.
20. J. Tuo, S. Loft, M.S. Thomsen, H.E. Poulsen, Benzene-induced genotoxicity in mice in vivo detected by the alkaline comet assay: reduction by CYP2E1 inhibition. *Mutat Res* 1996;368:213-219.
21. J.L. Moran, D. Siegel, D. Ross, A potential mechanism underlying the increased susceptibility of individuals with a polymorphism in NAD(P)H:quinine oxidoreductase 1(NQO1) to benzene toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 8150 -8155.
22. P. Stommel, G. Muller, W. Stucker, C. Verkoyen, S. Schobel, K. Norpoth (1989) Determination of S-phenylmercapturic acid in the urine – an improvement in the biological monitoring of benzene

- exposure. *Carcinogenesis* 10 (2): 279-282.
23. P.J. Boogaard, N.J. van Sitter (1996) Suitability of S-phenylmercapturic acid and trans, trans-muconic acid as biomarker for exposure to low concentrations of benzene. *Environ Health perspect* 104 [Suppl 6]: 1151-1157.
 24. O. Inoue, E. Kanno, M. Kakizaki, T. Watanabe, K. Higashikawa, M. Ikeda (2000) Urinary phenylmercapturic acid as a marker of occupational exposure to benzene. *Ind Health* 38(23): 195-204.
 25. H. Skov, O. Hertel, S. Loft, Urban benzene exposure and oxidative DNA damage: influence of genetic polymorphisms in metabolism genes. *The science of the Total Environment* 309(2003)69-90.
 26. ACGIH. Documentation of TLVs and BEIs, 6th ed. 1991581-584, BEI-169-174, BEI-187-193.
 27. D. C. Thompson, K. perera, R. Loden. Quinone methide formation para isomers of methylphenol (cresol), ethylphenol, and isopropylphenol: relationship to toxicity. *Chem. Res. Toxicol.* 1995,8, 55-60.
 28. J. Angerer, M. Schildbach, A. Kramer, S-p-Toluymercapturic acid in the urine of worker exposed to toluene: a new biomarker for toluene exposure, *Arch. Toxicol.* (1998) 72: 119-123.
 29. D.C. Thompson, K. Perera, R. London, Quinone methide formation from para isomers of methyl phenol (cresol), ethyl phenol and isopropyl phenol: relationship to toxicity, *Chem. Res. Toxicol.* 8 (1995) 55-60.
 30. N.W. Gaikwad, W.J. Bodell, Formation of DNA adducts by microsomal and peroxidase activation of p- cresol: role of quinone methide formation, *Chem. Biol. Interact.* 138 (2001) 217-229.
 31. N.W. Gaikwad, W. J. Bodell, Formation of DNA adducts in HL-60 cells treated with the toluene metabolite p-cresol: a potential biomarker for toluene exposure, *Chem. Biol. Interact.* 145 (2003) 149-158.
 32. S. Hayshi, J. Watanabe, K. Kawajiri, Genetic polymorphism in the 5'-flanking region change transcriptional regulation of the human cytochrome P450IIE1 gene. *J. Biochem,* 110 (1991): 559-565.
 33. W.J. Bodell, Q. Ye, D.N. Pathak, K. Pongracz, Oxidation of eugenol to form DNA adducts and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: role of quinone methide derivative in DNA adduct formation, *Carcinogenesis* 19 (1998) 437-443.
 34. J.L. Bolton, E. Comeau, V. Vukomanovic, The influence of 4-alkyl substituents on the formation and reactivity of 2-methoxy-quinone methides: evidence that extended pconjugation dramatically stabilizes the quinone methide formed from eugenol, *Chem.-Biol. Interact.* 95 (1995) 279-290.
 35. M.V. Reddy, K. Randerath, Nuclease P1 mediated enhancement of sensitivity of ³²P- postlabeling test for structurally diverse DNA adducts, *Carcinogenesis* 7(1986) 1543-1551.

36. G. Levay, K. Pongracz, W.J. Bodell, Detection of DNA adducts in HL-60 cells treated with hydroquinone and pbenzoquinone by ³²P-postlabeling, *Carcinogenesis* 12 (1991) 1181-1186.
37. G. Levay, D. Ross, W.J. Bodell, Peroxidase activation of hydroquinone results in the formation of DNA adducts in HL-60 cells, mouse bone marrow macrophages and human bone marrow, *Carcinogenesis* 14 (1993) 2329-2334.
38. Yan Z, Zhong HM, Maher N, Torres R, Leo GC, Caldwell GW, and Huebert N Bioactivation of 4-methylphenol (p-cresol) via cytochrome P450-mediated aromatic oxidation in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 33(2005):1867–1876.
39. Toda, C., Uchida, T., Midorikawa, K., Murata, M., Hiraku, Y., and Okamoto, Y.(2003) DNA damage by ethylbenzene-hydroperoxide formed from carcinogenic ethylbenzene by sunlight irradiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 304(4): 638-642.

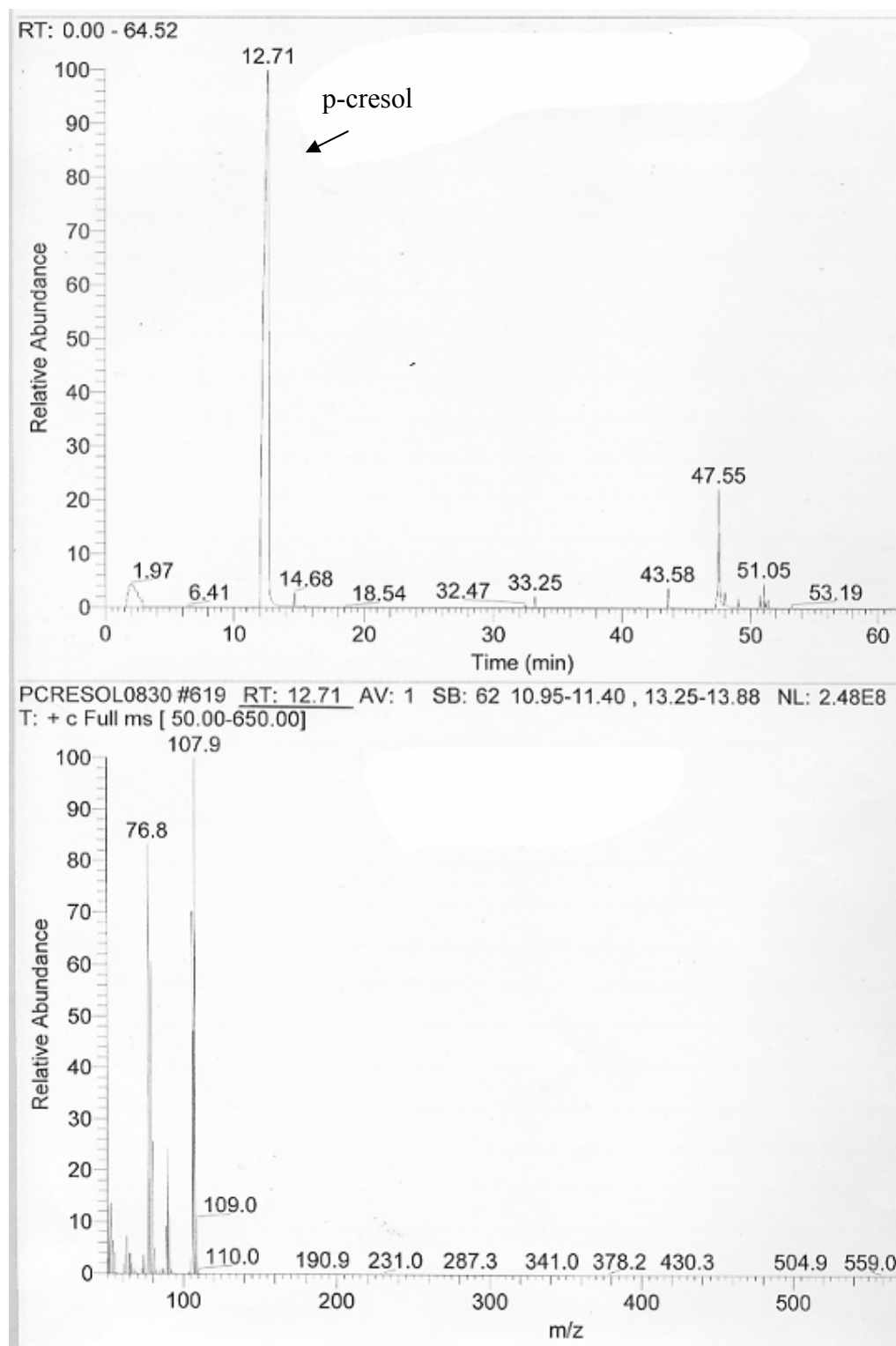


圖 1 本研究 p-cresol 之 GC/MS 層析圖及質譜碎片離子

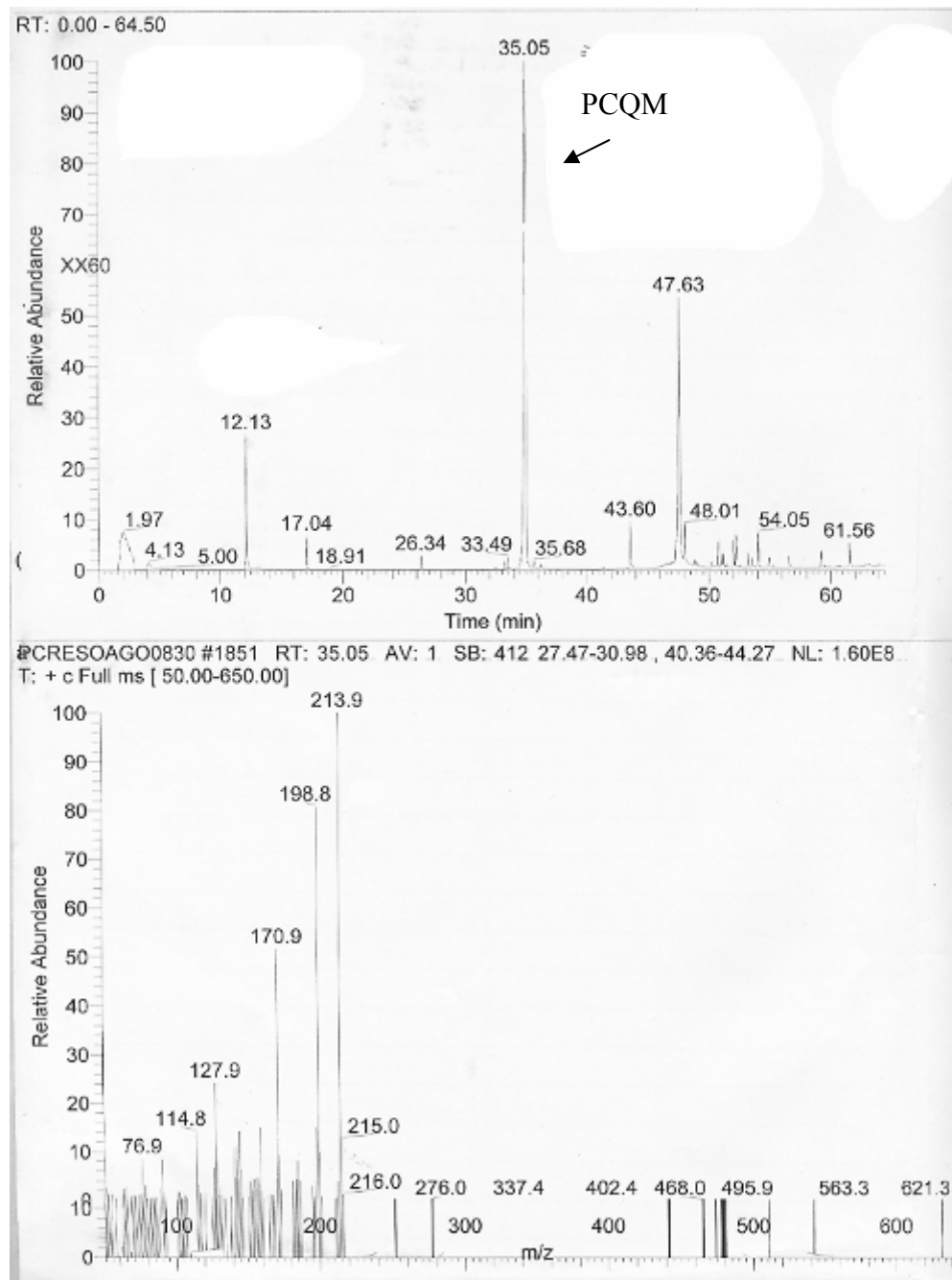


圖 2 本研究合成的 PCQM 之 GC/MS 層析圖及質譜碎片離子

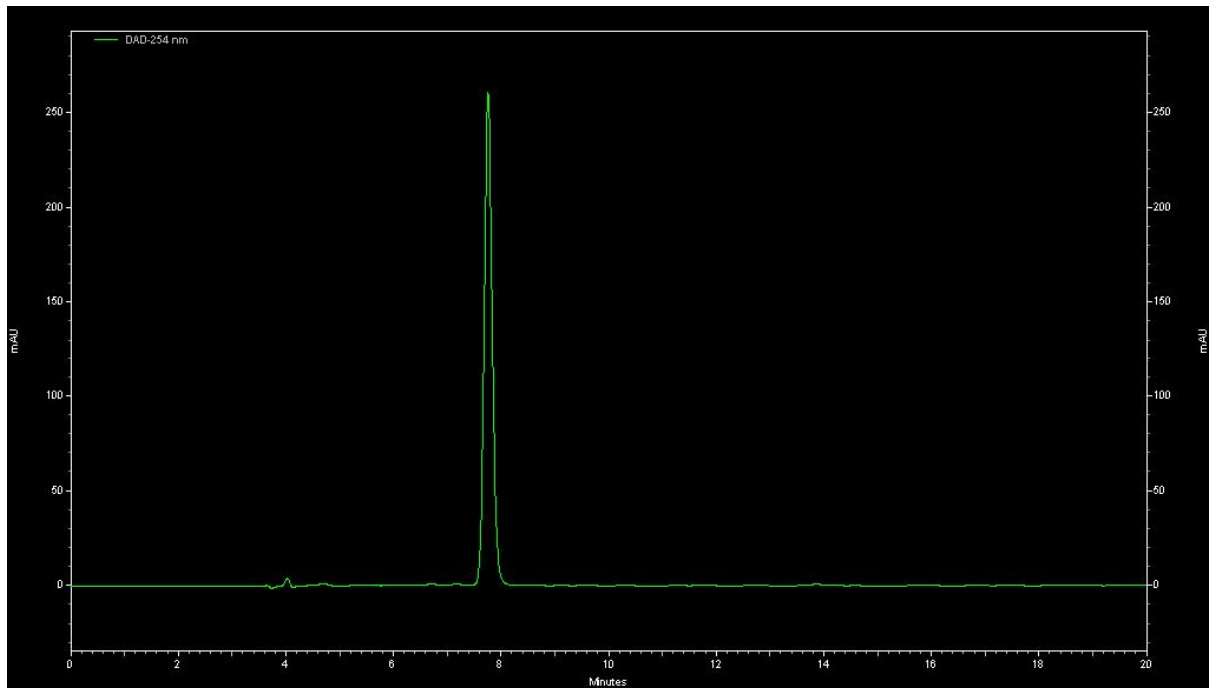


圖 3. 本研究 DNA 空白樣本(含外切酶及內切酶酵素)之 HPLC 層析圖

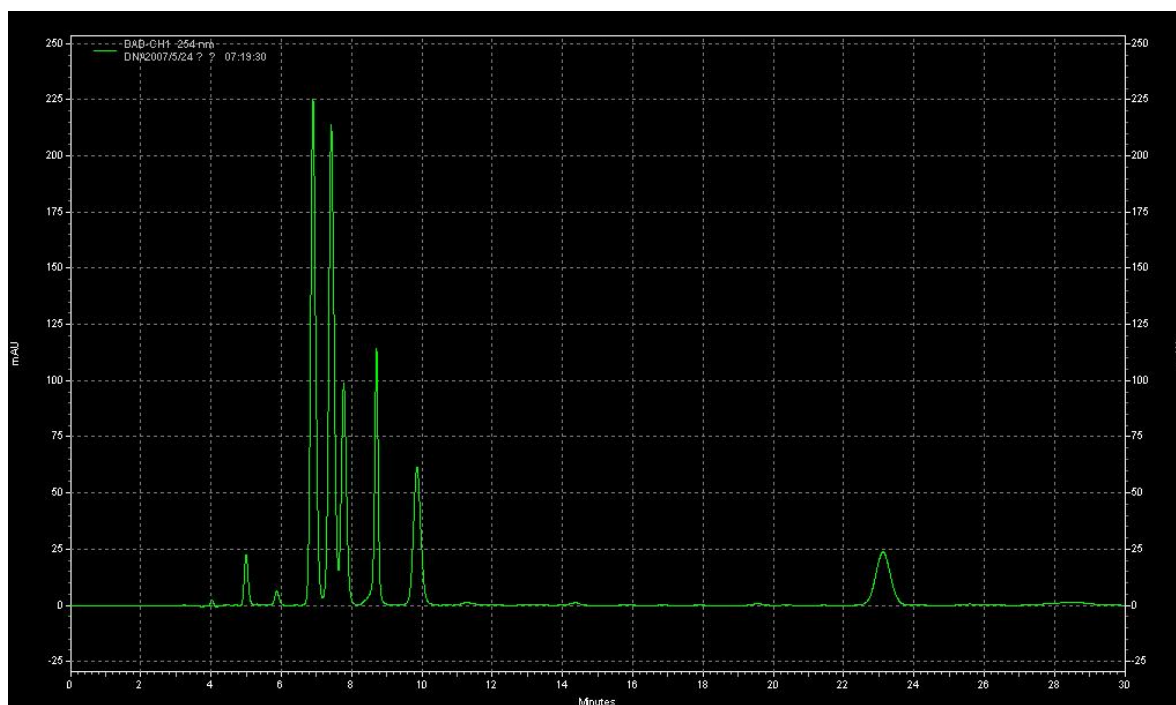


圖 4. 本研究測定 DNA 標準品之 HPLC 層析圖

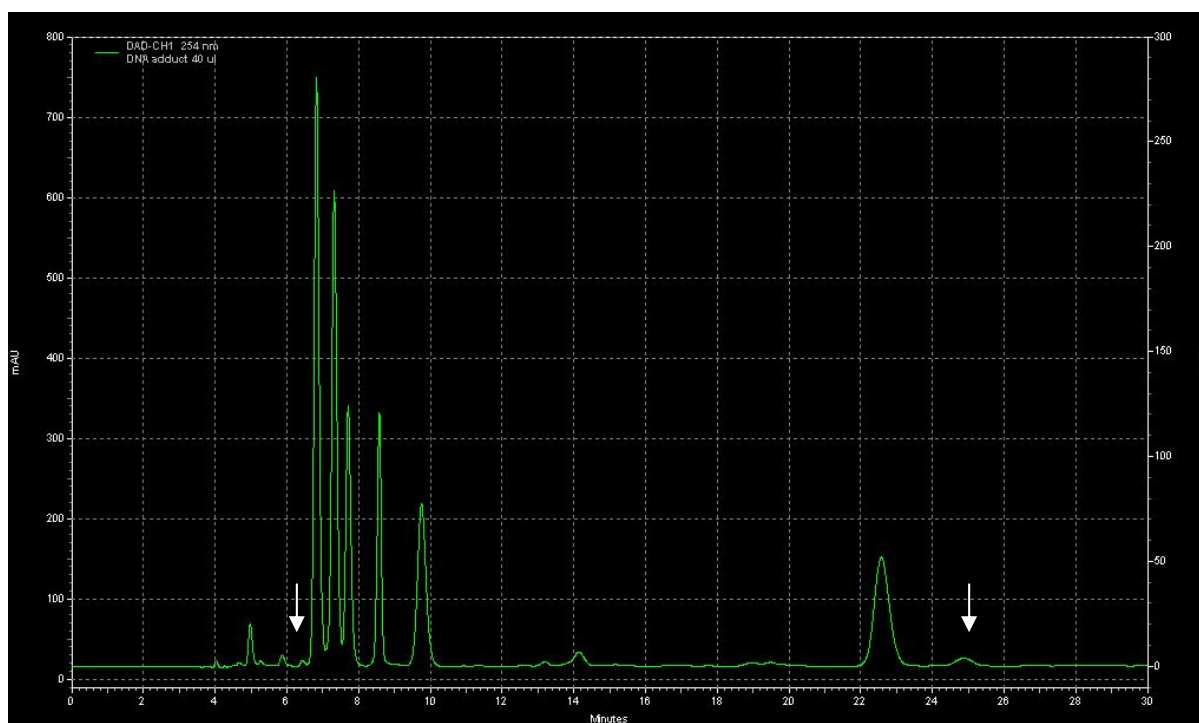


圖 5. 本研究測定 PCQM-DNA 鍵結物之 HPLC 層析圖，↓可能為 PCQM-DNA 之鍵結物

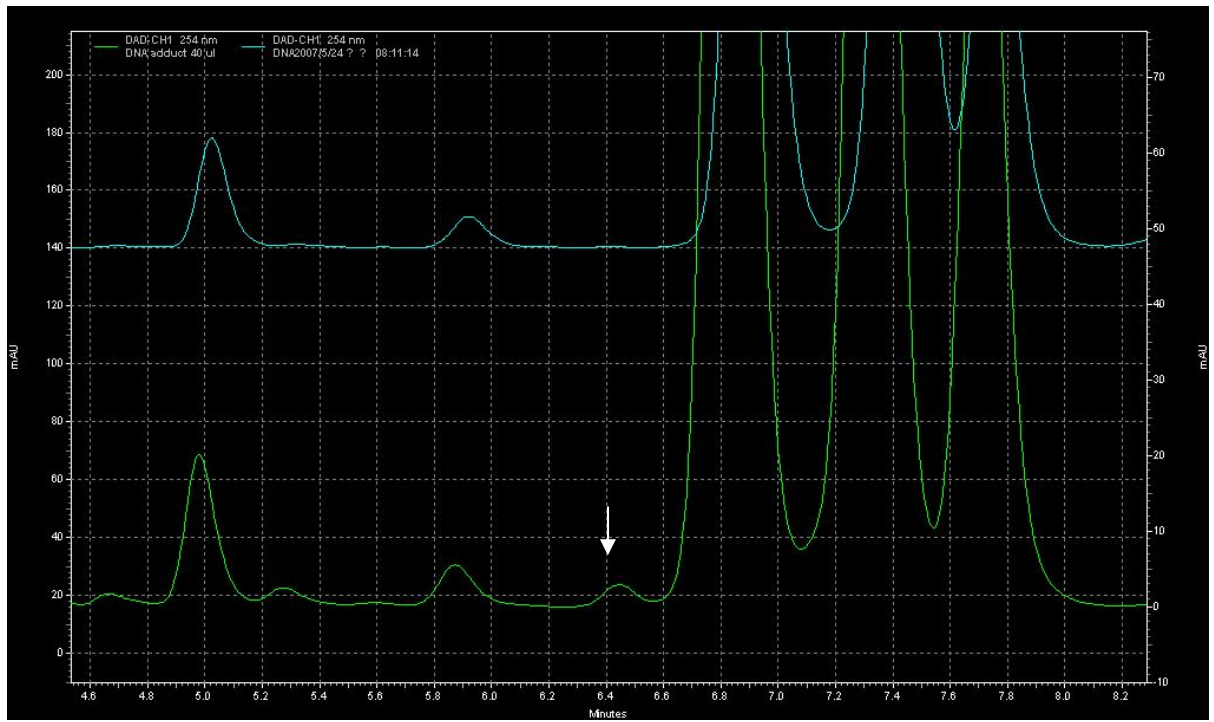


圖 6. DNA 標準品(上)與 PCQM-DNA 鍵結物(下)之 HPLC 層析圖比較(6.4 min)

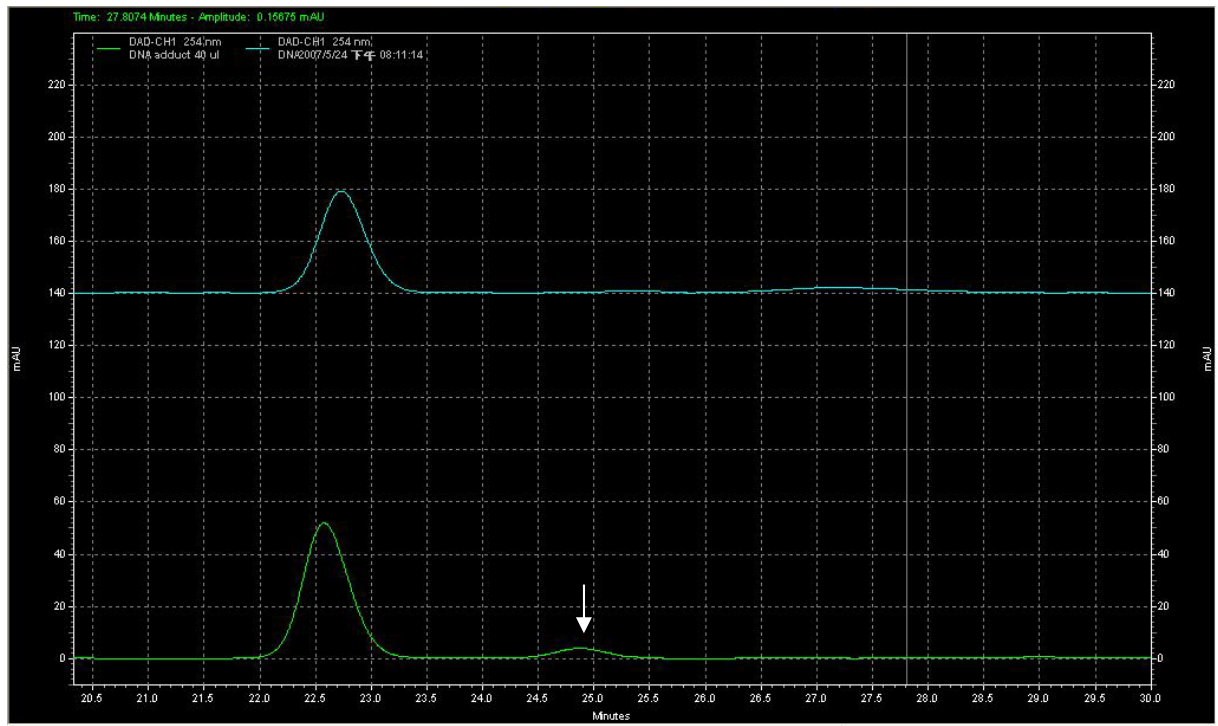


圖 7. DNA 標準品(上)與 PCQM-DNA 鍵結物(下)之 HPLC 層析圖比較(24.9 min)

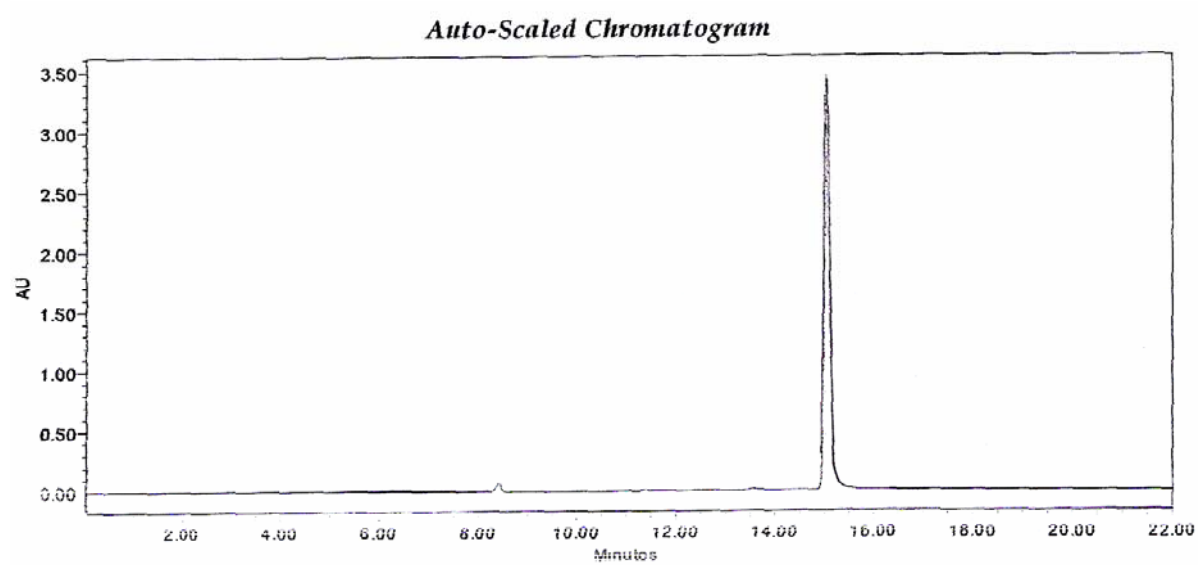


圖 8. 本研究測定 Adenine 標準品之 HPLC 層析圖

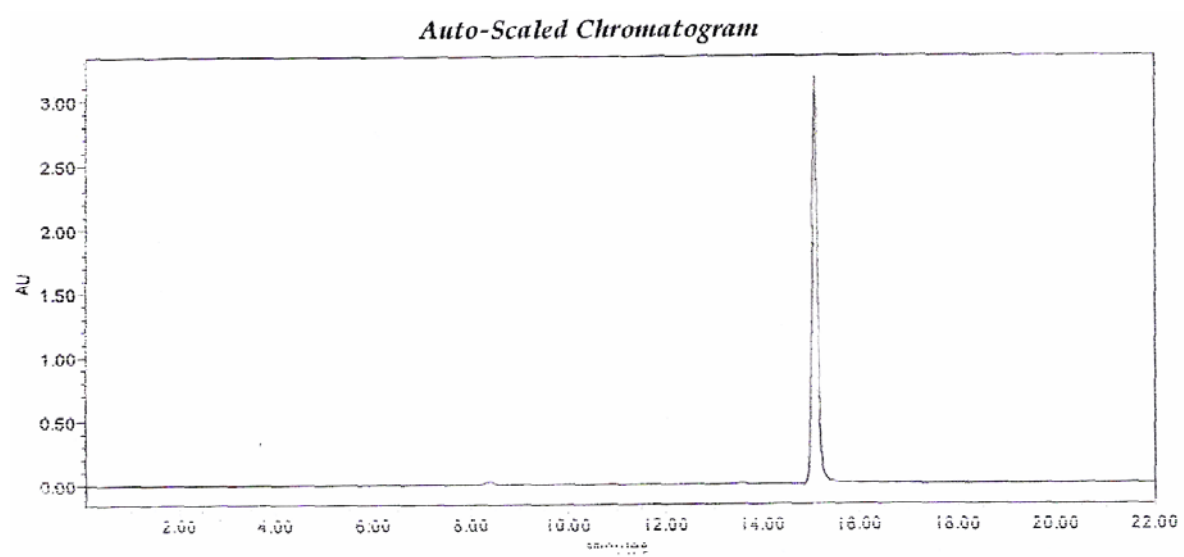


圖 9. 本研究測定 PCQM 與 Adenine 反應溶液之 HPLC 層析圖

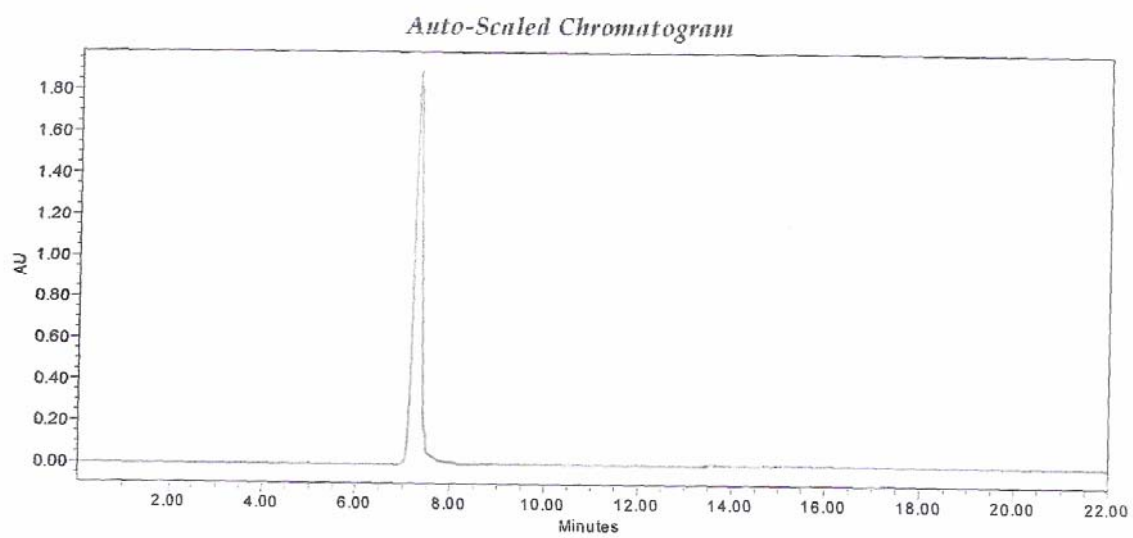


圖 10. 本研究測定 Cytosine 標準品之 HPLC 層析圖

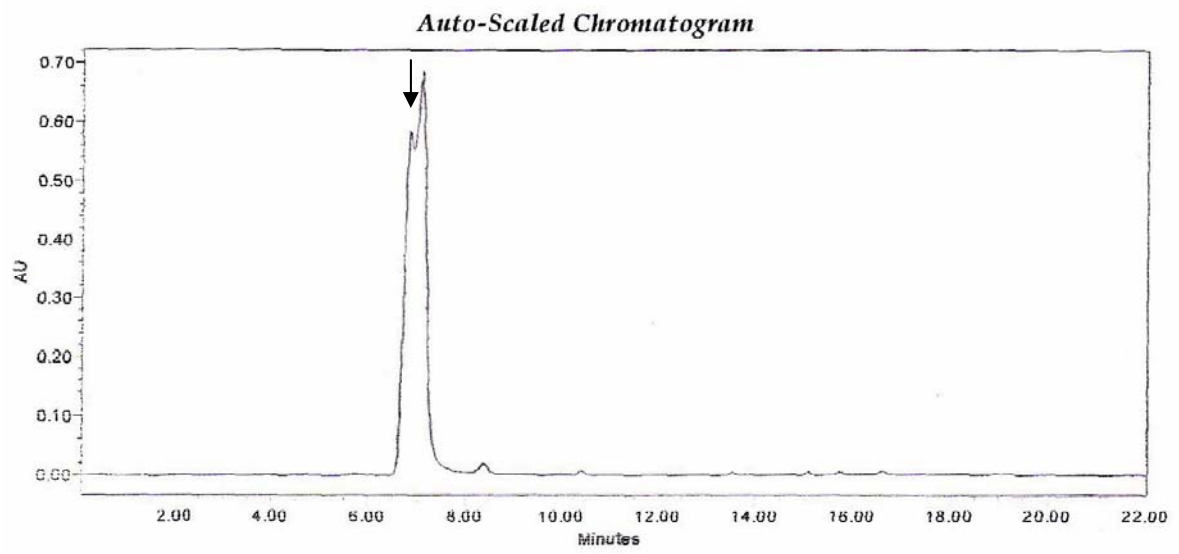


圖 11. 本研究測定 PCQM 與 Cytosine 反應溶液之 HPLC 層析圖，↓可能為 PCQM-Cytosine 之鍵結物

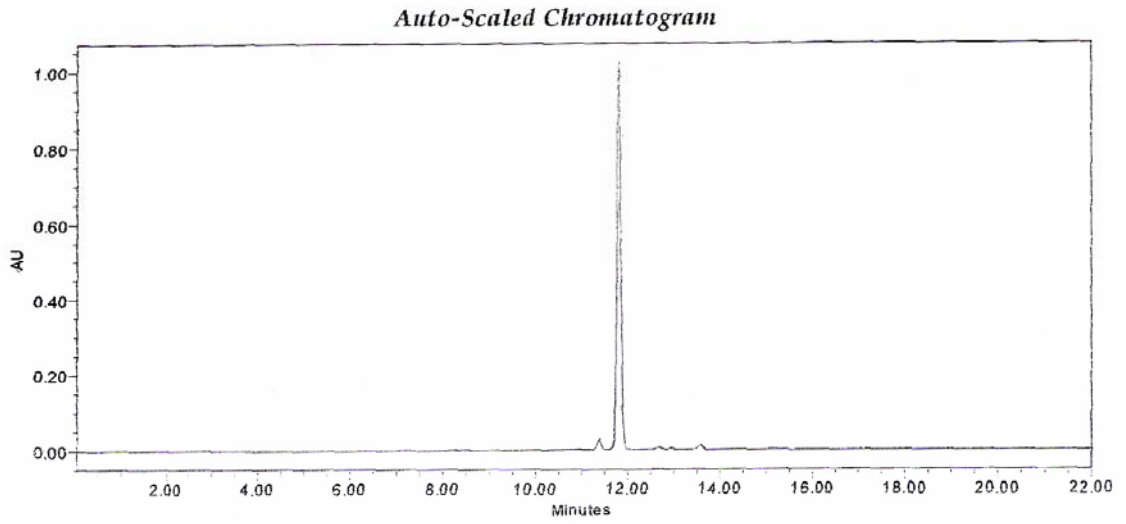


圖 12. 本研究測定 Guanine 標準品之 HPLC 層析圖

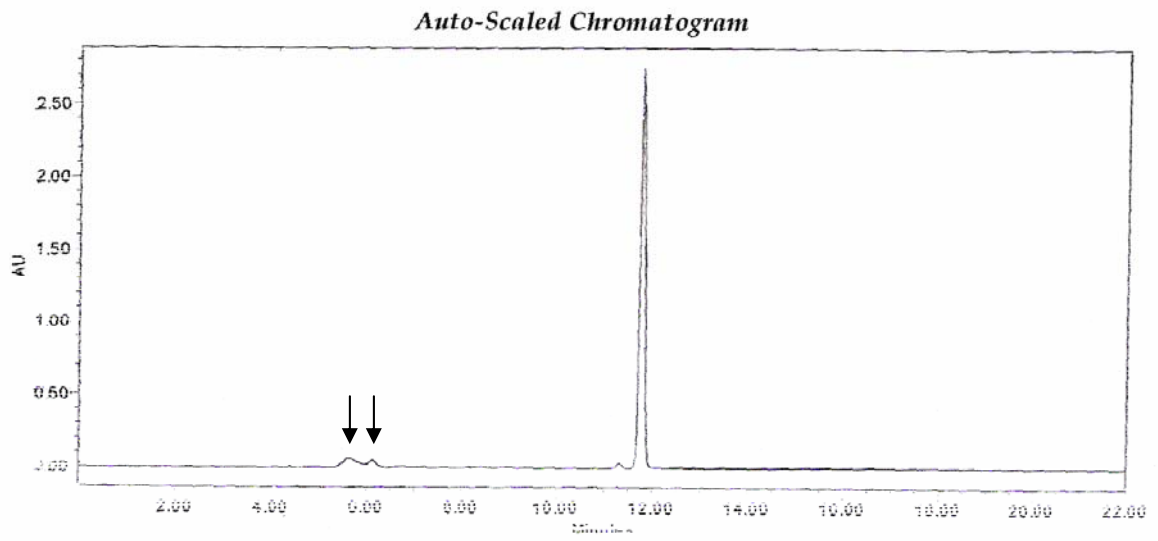


圖 13. 本研究測定 PCQM 與 Guanine 反應溶液之 HPLC 層析圖，↓可能為 PCQM-Guanine 之鍵結物

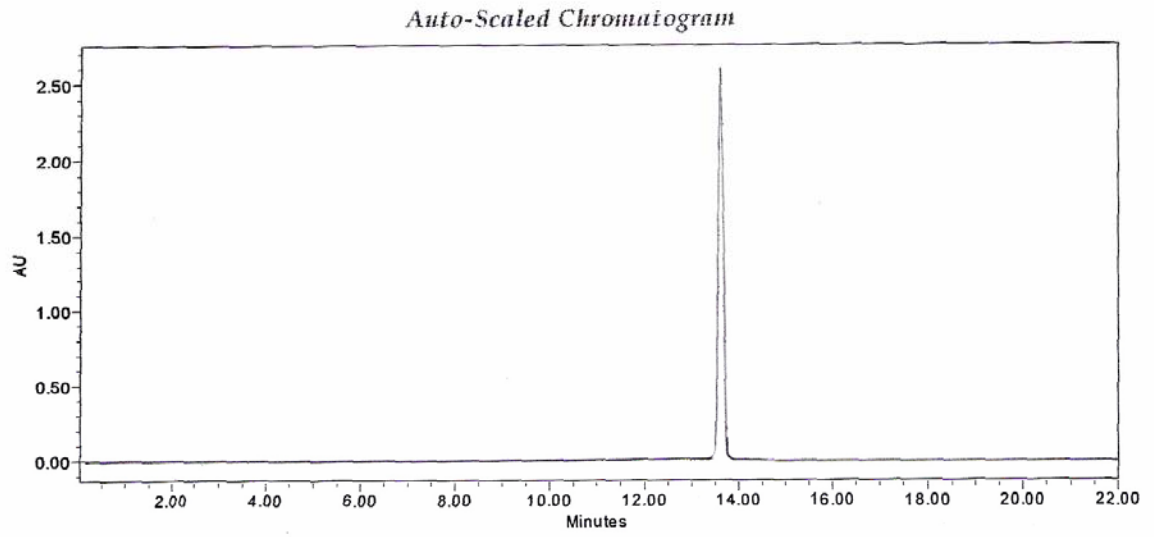


圖 14. 本研究測定 Thymine 標準品之 HPLC 層析圖

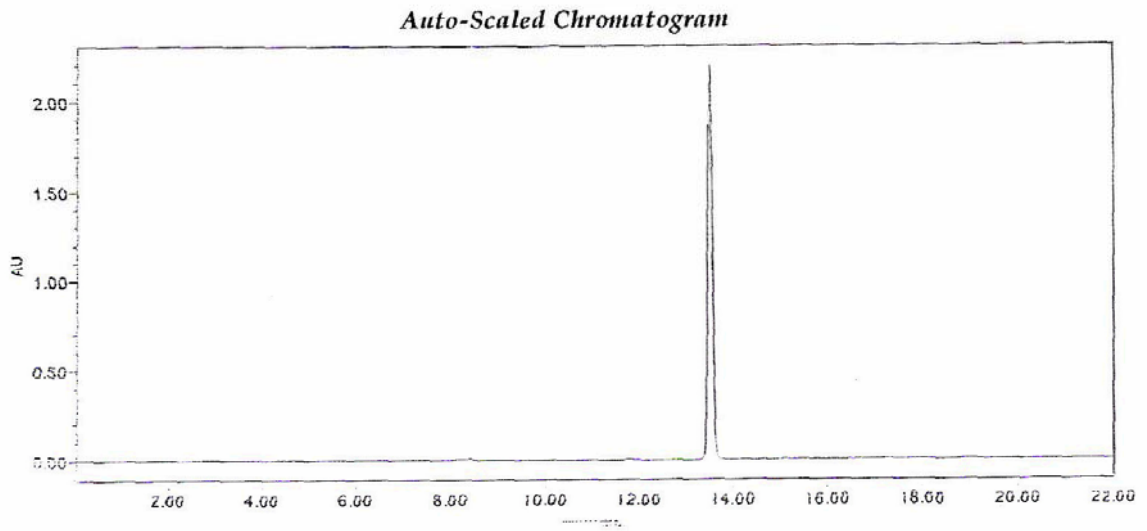


圖 15. 本研究測定 PCQM 與 Thymine 反應溶液之 HPLC 層析圖

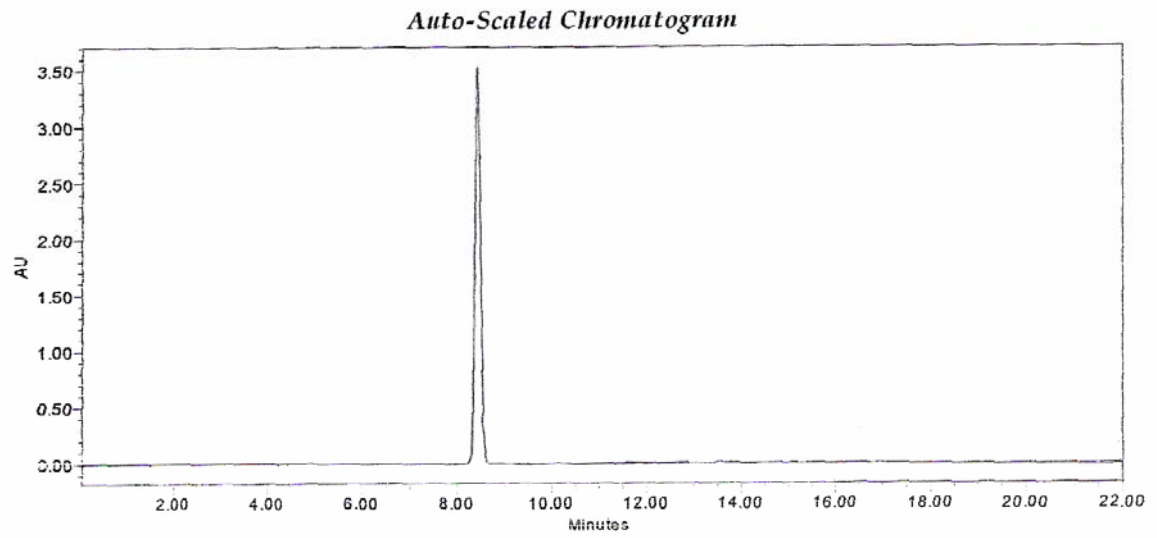


圖 16. 本研究測定 Uracil 標準品之 HPLC 層析圖

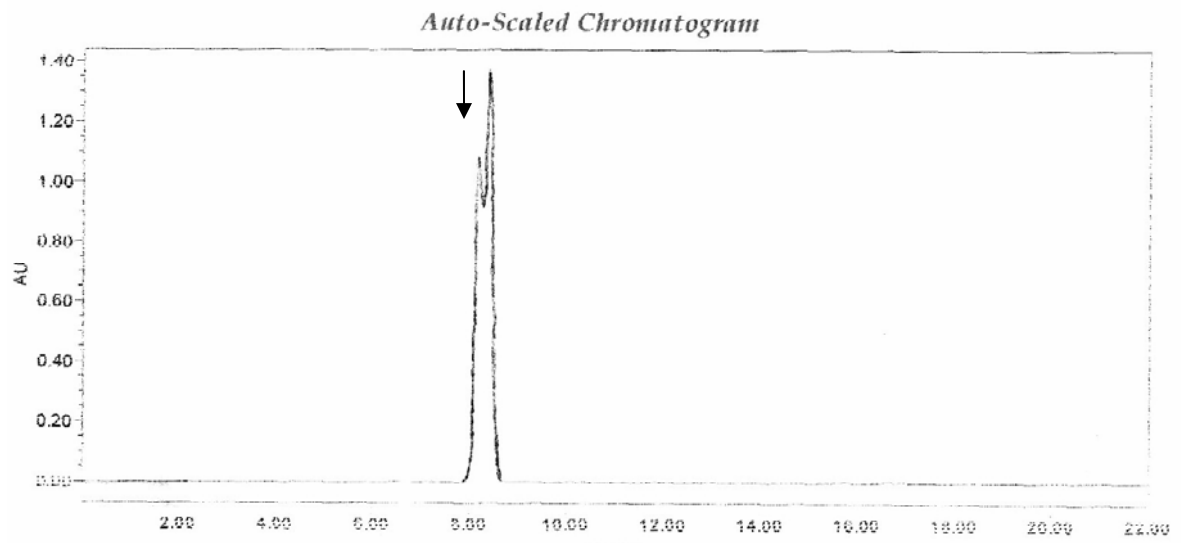


圖 17. 本研究測定 PCQM 與 Uracil 反應溶液之 HPLC 層析圖，↓可能為 PCQM-Uracil 之鍵結物

Table 1 Characteristics of the study population

Characteristics	Spray painter (exposed group) n=15	Sandblasting worker (unexposed group A) n=19	p* between sandblasting worker and spray painter	Office staff (unexposed group B) n=30	p* between office staff and spray painter	P* between sandblasting worker and office staff
Education						
senior high	15 (100%)	18 (94.7%)	1.000	2 (6.70%)	<0.001	<0.001
university	0	1 (5.3%)		28 (93.3)		
Smoking	11 (73.3)	12 (63.2)	1.000	3 (10.0)	<0.001	<0.001
Drinking	10 (66.7)	15 (78.9)	0.832	1 (3.3)	<0.001	<0.001
Age (yr)	39.6 ± 8.34 ^a	37.6 ± 11.0	0.559	47.0 ± 5.38	0.005	0.002
Work experience (yr)	5.91 ± 2.90	8.45 ± 9.96	0.303	20.5 ± 7.83	<0.001	<0.001

^a mean±SD

* Chi-square test

Table 2 Comparison of urinary 8-OHdG between the exposed and reference groups

	Spray painter (exposed group) n=15		Sandblasting worker (unexposed group A) n=19		Office staff (unexposed group B) n=30
	Pre-workshift	Post-workshift	Pre-workshift	Post-workshift	Post-workshift
8-OHdG (µg/g cr.)	19.29 ± 2.89 ^a	28.99 ± 6.52 ^{¶, §}	8.59±0.77	9.14±2.05	8.35±0.84

^a mean±SE

[¶] Comparison of the post-workshift 8-OHdG level between spray painter and sandblasting worker, p = 0.010, student t test

[§] Comparison of the post-workshift 8-OHdG level between spray painter and office staff, p = 0.007, student t test

Table 3 Simple linear regression of 8-OHdG by group and a general linear regression with potential confounders as covariates (n=69)

	Increase in 8-OHdG			
	Unadjusted		Adjusted	
	B	95% CI	B	95% CI
Model (1)				
Group				
Spray painter vs. office staff	20.647	12.33 to 28.96	32.126	21.101 to 43.151
Sandblasting worker vs. office staff	0.792	-6.919 to 8.503	12.830	2.699 to 22.961
Age	0.152	-0.28 to 0.584	0.358	-0.04 to 0.756
Drink	-0.311	-8.447 to 7.825	-10.408	-18.942 to -1.874
Smoke	1.473	-6.359 to 9.305	-3.534	-12.242 to 5.174
Model (2)				
Group				
Spray painter vs. sandblasting worker	19.588	10.772 to 28.938	19.296	10.795 to 27.797
Office staff vs. sandblasting worker	-0.792	-8.503 to 6.919	-12.830	-22.961 to -2.699
Age	0.152	-0.279 to 0.583	0.358	-0.034 to 0.756
Drink	-0.311	-8.447 to 7.825	-10.408	-1.874 to -18.942
Smoke	1.473	-6.359 to 9.305	-3.534	-12.242 to 5.174